

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034182**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.01.15**

**(21)** Номер заявки  
**201500835**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.02.12**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ CD3\*DLL3**

---

**(31)** 1302447.6

**(32)** 2013.02.12

**(33)** GB

**(43)** 2016.02.29

**(86)** PCT/GB2014/050407

**(87)** WO 2014/125273 2014.08.21

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Хадсон Линдси Джейн (GB)**

**(74)** Представитель:  
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,  
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,  
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,  
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)**

**(56)** EP-A1-2530091  
WO-A2-2007111733  
KENTARO MAEMURA: "Delta-like 3 is silenced by methylation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma", INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 42, 17 January 2013 (2013-01-17), pages 817-822, XP055109598, ISSN: 1019-6439, DOI: 10.3892/ijo.2013.1778 page 817, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2 paragraph [results]  
KROESEN ET AL.: "Approaches to lung cancer treatment using the CD3 x EGP-2-directed bispecific monoclonal antibody BIS-1", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, vol. 45, no. 3-4, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 203-206, XP055110107, ISSN: 0340-7004 the whole document  
MARTIN SEBASTIAN ET AL.: "Treatment of non-small cell lung cancer patients with the trifunctional monoclonal antibody catumaxomab (anti-EpCAM anti-CD3): a phase I study", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 56, no. 10, 5 April 2007 (2007-04-05), pages 1637-1644, XP019539101, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-007-0310-7 the whole document  
WO-A2-2013126746

---

**(57)** Изобретение относится к способу лечения рака, такого как рак легких, рак поджелудочной железы и рак кожи, который включает введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, которое связывается с DLL3\* CD3.

---

**B1**

**034182**

**034182 B1**

### Введение

Представленное изобретение касается способа лечения рака. Для этого предварительно идентифицировали мембранный белок, связанный с раком, например раком легких, раком поджелудочной железы и/или раком кожи, который применяется в качестве терапевтической мишени для лечения рака или в качестве маркера рака. В частности, белок представляет собой биологическую мишень, против которой могут быть сделаны аффинные реагенты, в том числе терапевтические антитела. Изобретение также касается применения таких реагентов для лечения рака.

### Предпосылки создания изобретения

Основными проблемами в лечении рака, такого как рак легких, рак поджелудочной железы и рак кожи, являются улучшение уровня раннего обнаружения, открытие новых неинвазивных маркеров, которые могут быть использованы для отслеживания прогрессирования заболевания и идентификации рецидива, и нахождение более эффективных и менее токсичных методов лечения, особенно для более поздних стадий заболевания, когда 5-летняя выживаемость до сих пор является низкой. Существует большая потребность в идентификации мишеней, которые являются более специфичными для раковых клеток, например, тех, которые экспрессируются на поверхности опухолевых клеток, таким образом, что они могут быть атакованы иммунотерапевтическими и целенаправленными токсинами.

Дельта-подобный белок 3 представляет собой мембранный белок I типа и является членом семейства дельта. Автор изобретения показал, что дельта-подобный белок 3 экспрессируется при раке, что дает основание предполагать, что лечение, направленное против дельта-подобного белка 3 у пациентов, в том числе у пациентов с раком, будет производить терапевтический эффект.

### Сущность изобретения

Дельта-подобный белок 3 (DLL3) был обнаружен в мембранных экстрактах различных, пораженных болезнью тканей, например, раком легких, раком поджелудочной железы и раком кожи, далее в данном документе называемых как "заболевания согласно изобретению".

Дифференциальная экспрессия DLL3 при различных раковых заболеваниях позволяет белку быть мишенью используемого антитела при терапии таких видов рака. Таким образом, DLL3 может быть использован для генерации антител, которые специфически связываются с эпитопами в пределах DLL3, и являться мишенями таких реагентов для лечения. Антитела, которые нацелены на поверхностный клеточный белок раковых клеток, могут быть использованы в лечении рака с помощью различных механизмов, в том числе (i) лизиса опосредованным комплементом или антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC), (ii) лизиса лекарственными средствами или токсином(ами), конъюгированными с такими аффинными реагентами, или (iii) ингибирования физиологической функции такого белка, который может управлять ростом раковых клеток, например, через сигнальные пути. Важным аспектом такого лечения является то, что нормальный профиль экспрессии белка-мишени, с точки зрения распределения в тканях и уровня экспрессии, является таким, что какое-либо нацеливание белка-мишени на нормальные ткани антителом не вызывает неблагоприятных побочных эффектов за счет связывания с нормальными тканями.

Изобретение предусматривает способ лечения рака, включающий введение субъекту, который нуждается в этом терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, которое связывается с DLL3 и CD3, где указанный рак выбирают из группы, состоящей из рака легкого, рака поджелудочной железы и рака кожи.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого.

При этом биспецифическое антитело индуцирует апоптоз раковых клеток, уничтожает или уменьшает количество раковых стволовых клеток и/или уничтожает или уменьшает количество циркулирующих опухолевых клеток.

Присутствие DLL3 или его фрагментов может быть обнаружено с помощью аффинного реагента, который связывается с DLL3. Субъектом способа может быть человек.

Другие аспекты изобретения представлены ниже в данном документе и в формуле изобретения.

### Краткое описание чертежей

Фиг. 1a показывает интернализацию анти-DLL3 поликлональных антител клетками SHP-77, используя PabZAP анализ;

фиг. 1b - интернализацию анти-DLL3 поликлональных антител клетками N82, используя PabZAP анализ;

фиг. 2 - специфический лизис DMS79 DLL3, экспрессирующей клетки путем активации Т клеток биспецифическими анти-DLL3-анти-CD3 поликлональными антителами.

### Подробное описание изобретения

Изобретение, подробно описанное ниже, охватывает введение биспецифического антитела субъекту, например субъекту-млекопитающему, для лечения рака. Изобретение основывается на открытии того, что белок DLL3 экспрессируется при определенных видах рака. В частности, подтверждающие это данные содержатся в данном документе, которые демонстрируют экспрессию белка DLL3 в плазматической мембране рака легкого, рака поджелудочной железы и рака кожи. Поэтому антитела, нацеленные на

DLL3, могут иметь применение как терапевтические средства при данных видах рака и других видах рака, демонстрирующих экспрессию DLL3.

Как используется в данном документе, термин "субъект" касается животного, предпочтительно млекопитающего. Субъектом-млекопитающим может быть не человекообразное млекопитающее, но, как правило, это человек, такой как взрослый человек.

Субъект вообще должен быть живым субъектом. Как используется в данном документе, термин "пациент" относится к субъекту, который имеет или предполагается, что имеет одно или несколько заболеваний согласно изобретению.

Как используется в данном документе, термин "белок согласно изобретению" касается дельта-подобного белка 3 (GeneID: 10683). Обнаружено, что данный белок дифференциально экспрессируется в различных видах рака, таким образом, он является новой мишенью для терапий данных видов рака. Человеческая последовательность белка DLL3 приводится как SEQ ID NO: 1. Термин DLL3 (в контексте белка) включает белки, чьи аминокислотные последовательности состоят из или содержат аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, или их производные или варианты, в частности, те, которые встречаются у человека.

Данный белок был идентифицирован в образцах экстрагированной раковой ткани мембранного белка от раковых пациентов, используя способы и устройства, описанные в примере 1 (например, используя жидкостную хроматографию-масс-спектроскопию экстрактов мембранного белка). Пептидные последовательности сравнивали с SWISS PROT и TrEMBL базами данных (held by Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) и European Bioinformatics Institute (EBI), которые являются доступными [www.expasy.org](http://www.expasy.org)) и идентифицировали вход Q9NYJ7, дельта-подобного белка 3 - DLL3. Нуклеотидная последовательность, кодирующая данный белок, найден под номером доступа NM\_016941, как приведено в SEQ ID NO: 3.

В соответствии с SWISS-PROT, дельта-подобный белок 3 является мембранным белком типа I семейства дельта и состоит из одного домена DSL, шести EGF-подобных доменов, одной трансмембранной области и внеклеточного хвоста между аминокислотами 27-492 SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 12). Автор изобретения показал, что дельта-подобный белок 3 экспрессируется при раке, что дает основание предполагать, что терапия, направленная против дельта-подобного белка 3 у пациентов, в том числе у пациентов с раком, будет производить терапевтический эффект.

DLL3 содержит фрагменты, в частности эпитопсодержащие фрагменты, например, их антигенные или иммуногенные фрагменты и их производные, в частности фрагменты, содержащие внеклеточные домены (например, внеклеточные хвосты или петли) белка. Эпитопсодержащие фрагменты включают антигенные или иммуногенные фрагменты, как правило, длиной 12 аминокислот или больше, например 20 аминокислот или больше, например 50 или 100 аминокислот или больше. Фрагменты могут составлять 95% или больше от длины полного белка, например 90% или больше, например 75%, или 50%, или 25%, или 10% или больше от длины полного белка.

Альтернативно, белок/полипептид, рассматриваемый в данном документе, может быть ограничен теми белками/полипептидами, в частности, перечисленными/описанными в представленном описании, или вариантом или производным, которое имеет по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность аминокислотной последовательности. Процентная идентичность аминокислотной последовательности может быть определена с помощью какого-либо приемлемого алгоритма, например BLAST, CLUSTAL, используя соответствующие параметры по умолчанию.

Таким образом, термин "DLL3" в контексте белка или полипептида касается белка, чья аминокислотная последовательность состоит из или содержит аминокислотную последовательность, приведенную в какой-либо из SEQ ID NO: 1 или 2, или ее производное или вариант, который по меньшей мере на 90 или 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и который имеет, по существу, такое же распределение в ткани, как DLL3.

В контексте нуклеиновой кислоты термин "DLL3" касается нуклеиновой кислоты, чья нуклеотидная последовательность кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 или 2, или ее производное или вариант, который по меньшей мере на 90 или 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и который имеет, по существу, такое же распределение в ткани, как у белка DLL3.

Термин "DLL3" в контексте нуклеиновой кислоты также касается нуклеиновой кислоты, чья нуклеотидная последовательность содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 или 4, или ее производное или вариант, который по меньшей мере на 90 или 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 3 или 4, и которая кодирует белок, который имеет, по существу, такое же распределение в ткани, как у белка DLL3.

Эпитопсодержащие фрагменты DLL3, включающие антигенные или иммуногенные фрагменты, способны вызывать соответствующий иммунный ответ у пациента. ДНК, кодирующая DLL3, также подходит, поскольку содержит фрагменты, например фрагменты ДНК, кодирующие иммуногенные фрагменты DLL3. Фрагменты нуклеиновой кислоты (например, ДНК), кодирующие DLL3, могут составлять 95% или более от длины полной кодирующей области, например 90% или более, например 75%, или

50%, или 25%, или 10% или более от длины полной кодирующей области. Фрагменты нуклеиновой кислоты (например ДНК) могут составлять в длину 36 нуклеотидов или более, например 60 нуклеотидов или более, например 150 или 300 нуклеотидов или более.

Производные DLL3 включают варианты последовательности, в которой были сделаны одна или более (например, 1-20) от количества аминокислот на основе общей длины белка делеций, вставок или замен. Замены, как правило, могут быть консервативными заменами. Производные, как правило, имеют, по существу, такую же биологическую функцию, как у белка, из которого они получены. Производные, как правило, сравнительно антигенны или иммуногенны к белку, из которого они получены. Производные, как правило, будут иметь или лиганд-связывающую активность, или способность к образованию комплекса с активным рецептором, или предпочтительно обе, как у белка, из которого они получены. Производные и варианты, как правило, будут иметь такое же распределение в ткани, как DLL3.

Производные белков также включают химически обработанные белки, такие как карбоксиметилированные, карбоксиамидированные, ацетилированные белки, например, обработанные в процессе очистки.

Применение в клинических исследованиях.

Диагностические способы и композиции для обнаружения DLL3 помогают в мониторинге клинического исследования, например, чтобы оценить пригодность лекарственного средства для терапии заболеваний. Молекулы-кандидаты испытывали на их способность восстанавливать уровни DLL3 у субъекта, имеющего, например, заболевания согласно изобретению, до уровней, найденных у субъектов, не имеющих заболевания согласно изобретению, или в лечении субъекта, чтобы сохранить уровни DLL3 такие же или близкие по значению, как у субъектов без рака легкого, без рака поджелудочной железы или без рака кожи.

Их используют для отбора кандидатов для клинического исследования, чтобы идентифицировать, индивидуумы имеющие, например, заболевания согласно изобретению; такие индивидуумы потом могут быть исключены из исследования или могут быть выделены в отдельную когорту для лечения или анализа.

Получение белка DLL3, а также соответствующей нуклеиновой кислоты.

ДНК, кодирующая DLL3, может быть получена путем выделения, как кДНК фрагмент из кДНК библиотек, используя в качестве исходных материалов коммерческие мРНК, и определение и идентификацию их нуклеотидных последовательностей. Другими словами, в частности, клоны случайно выделяют из кДНК библиотек, которые получают в соответствии со способами Ohara et al. (DNA Research Vol.4, 53-59 (1997)). Далее путем гибридизации дублированные клоны (которые регулярно появляются) удаляют и потом осуществляют транскрипцию и трансляцию *in vitro*. Кроме того, базы данных известных генов для установления гомологичности применяют терминальные нуклеотидные последовательности.

В дополнение к описанным выше способам скрининга 5' и 3' терминальные последовательности кДНК сопоставляют с последовательностями генома человека. Затем неизвестный ген с длинной цепью определяют в области между последовательностями и анализируют полную длину кДНК. Таким образом, неизвестный ген, который не может быть получен с использованием обычного способа клонирования, может быть систематически клонирован.

Кроме того, все области геномодержащей ДНК человеческого происхождения также могут быть получены с использованием метода ПЦР, такого как RACE, уделяя достаточное внимание предотвращению появления искусственных ошибок в коротких фрагментах или полученных последовательностях. Могут быть получены клоны, имеющие целевую ДНК.

Синтетический праймер ДНК, имеющий соответствующую нуклеотидную последовательность части полипептида, может быть получен с последующей амплификацией согласно способу ПЦР, используя соответствующую библиотеку. Альтернативно, выбор может быть выполнен путем гибридизации ДНК с ДНК, которая была встроена в соответствующий вектор, меченный ДНК фрагментом или синтетической ДНК, кодирующей некоторые или все области полипептида. Гибридизация может быть выполнена, например, согласно способу, описанному в Current Protocols in Molecular Biology (под ред. Frederick M. Ausubel et al., 1987). ДНК может быть любой ДНК при условии, что она содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие нужные полипептиды. Такие ДНК могут представлять собой кДНК, идентифицированную и выделенную из кДНК библиотек, которые получены из ткани легкого, поджелудочной железы и кожи. Такая ДНК, кроме того, может быть синтетической ДНК. Векторы для использования в конструкции библиотеки могут быть бактериофагами, плазмидами, космидами, фагами, или пр. Кроме того, при использовании фракции общей РНК или фракции мРНК, полученной из вышеуказанных клеток и/или тканей, амплификация может быть выполнена путем прямой обратной транскрипции в сочетании с полимеразной цепной реакцией (далее в данном документе сокращается как "ОТ-ПЦР способ").

ДНК, кодирующая указанный выше полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, которая, по существу, является идентичной аминокислотной последовательности DLL3, или ДНК, кодирующая указанный выше полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности DLL3 путем делеции, замены или вставки одной или больше

аминокислот, составляющих часть аминокислотной последовательности, может быть легко получена путем соответствующей комбинации, например способа сайт-направленного мутагенеза, способа генгомологичной рекомбинации, способа удлинения праймера и способа ПЦР. Кроме того, на данный момент, возможный способ получения полипептида, для того чтобы иметь, по существу, эквивалентную биологическую активность, представляет собой замену гомологичных аминокислот (например, полярных и неполярных аминокислот, гидрофобных и гидрофильных аминокислот, положительно заряженных и отрицательно заряженных аминокислот и ароматических аминокислот) среди аминокислот, составляющих полипептид. Кроме того, для поддержания, по существу, эквивалентной биологической активности аминокислоты в пределах функциональных доменов, содержащихся в полипептиде, предпочтительно сохраняются.

Кроме того, примеры ДНК включают ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность DLL3, и гибридизацию ДНК в жестких условиях для получения ДНК, кодирующей полипептид (белок), имеющий биологическую активность (функцию), эквивалентную активности полипептида, состоящего из аминокислотной последовательности DLL3. Пример такой ДНК, способной к гибридизации, представляет собой ДНК, которая включает нуклеотидную последовательность, которая имеет степень общей средней гомологии со всей нуклеотидной последовательностью ДНК, такую как приблизительно 80% или более, предпочтительно приблизительно 90% или более и более предпочтительно приблизительно 95% или более. Гибридизация может быть выполнена в соответствии со способом, известным в данной области уровня техники, таким как, способ описанный в *Current Protocols in Molecular Biology* (под ред. Frederick M. Ausubel et al., 1987). В данном документе "жесткие условия" представляют собой, например, условия, приблизительно 1\*SSC, 0,1% SDS и 37°C, более жесткие условия приблизительно 0,5\*SSC, 0,1% SDS и 42°C или еще более жесткие условия приблизительно 0,2\*SSC, 0,1% SDS и 65°C. Указанные выше комбинации SSC, SDS и температурные условия приведены в иллюстративных целях. Жесткость, аналогичная приведенной выше, может быть достигнута квалифицированным специалистом в данной области с использованием соответствующей комбинации перечисленных выше факторов или других факторов (например, концентрация зонда, длина зонда и время реакции гибридизации) для определения жесткости гибридизации.

Клонированную ДНК можно непосредственно использовать или использовать, при необходимости, после расщепления ферментом рестрикции или добавления линкера в зависимости от целей. ДНК может иметь ATG как кодон инициации трансляции на 5' терминальном конце, и может иметь TAA, TGA или TAG как кодон терминации трансляции на 3' терминальном конце. Данный кодон инициации трансляции и кодон терминации трансляции также могут быть добавлены, используя соответствующий синтетический адаптер ДНК.

DLL3 может, например, быть в изолированной форме, при которой DLL3 полипептид был очищен, по меньшей мере, до некоторой степени. DLL3 полипептид может быть в практически чистом виде, т.е. свободный, в значительной степени, от других белков. DLL3 полипептид также может быть получен, используя рекомбинантные способы, синтетические способы или путем комбинации данных способов. DLL3 может быть легко получен согласно какому-либо способу, известному квалифицированному специалисту в данной области уровня техники, который включает получение вектора экспрессии, содержащего соответствующую ДНК, или ДНК, содержащей ген, культивирование трансформанта, трансформированного с использованием вектора экспрессии, генерирование и накопление соответствующего полипептида или рекомбинантного белка, содержащего полипептид, и потом сбор полученного в результате белка.

Рекомбинантный полипептид DLL3 может быть получен согласно способам, хорошо известным в данной области уровня техники, т.е. из генетически модифицированных клеток-хозяев, которые включают системы экспрессии. Для получения рекомбинантного DLL3 полипептида, клетки-хозяева могут быть генетически модифицированы, для введения систем экспрессии или их частей. Такое введение может быть осуществлено с использованием способов, хорошо известных в данной области уровня техники, таких как кальцийфосфатная трансфекция, DEAD-декстран опосредованная трансфекция, трансфекция, микроинъекция, катионная липид-опосредованная трансфекция, электропорация, трансдукция, введение при соскабливании, баллистическое введение или инфекция (см., например Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, 1986 and Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989).

Как клетки-хозяева используют, например, бактерии рода *Escherichia*, *Streptococci*, *Staphylococci*, *Streptomyces*, бактерии рода *Bacillus*, дрожжи, клетки *Aspergillus*, клетки насекомых, насекомые и клетки животных. Конкретные примеры бактерий рода *Escherichia*, которые используют в данном документе, включают *Escherichia coli* K12 и DH1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 60, 160 (1968)), JM103 (*Nucleic Acids Research*, Vol. 9, 309 (1981)), JA221 (*Journal of Molecular Biology*, Vol. 120, 517 (1978)), и HB101 (*Journal of Molecular Biology*, Vol. 41, 459 (1969)). Из бактерий рода *Bacillus* используют, например, *Bacillus subtilis* M114 (*Gene*, Vol. 24, 255 (1983)) и 207-21 (*Journal of Biochemistry*, Vol. 95, 87 (1984)). Из дрожжей используют, например, *Saccaromyces cerevisiae* AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, и 20B-12,

*Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913 и NCYC2036 и *Pichia pastoris*. Из клеток насекомых используют, например, клетки *Drosophila* S2 и *Spodoptera* Sf9. Из клеток животных используют, например, клетки COS-7 и клетки обезьяны Vero, клетки китайского хомячка CHO (далее в данном документе сокращается как клетки CHO), dhfr-ген-дефицитные клетки CHO, клетки мыши L, клетки мыши AtT-20, клетки мышинной миеломы, клетки крысы GH3, клетки человека FL, COS, HeLa, C127, 3T3, HEK 293, ВНК и клетки меланомы Боуэса.

Бесклеточные трансляционные системы также могут быть использованы для получения рекомбинантных полипептидов (например, лизат ретикулоцитов кролика, лизат зародышей пшеницы, SP6/T7 *in vitro* T&T и RTS 100 E. Coli HY транскрипционные и трансляционные наборы от Roche Diagnostics Ltd., Lewes, UK и TNT быстро сочетаемая транскрипционная/трансляционная система от Promega UK, Southampton, UK).

Вектор экспрессии может быть получен в соответствии со способом, известным в данной области с уровня техники. Например, вектор может быть получен путем (1) вырезания ДНК фрагмента, содержащего ДНК, или ДНК, содержащей ген, и (2) сшивки ДНК фрагмента по ходу транскрипции промотора в соответствующем векторе экспрессии. Может быть использовано широкое разнообразие систем экспрессии, таких как и без ограничения, хромосомная, эписомальная и полученная из вируса система, например плазмиды, полученные из *Escherichia coli* (например pBR322, pBR325, pUC18 и pUC118), плазмиды, полученные из *Bacillus subtilis* (например, pUB110, pTP5 и pC194), из бактериофага, из транспозонов, из дрожжевых эписом (например, pSH19 и pSH15), из элементов вставки, из дрожжевых хромосомных элементов, из вируса, такого как бакуловирус, паповавирус, такой как SV40, вирус осповакцины, аденовирус, вируса птичьей оспы, вирус псевдобешенства и ретровирус, и векторов, полученных из их комбинаций, таких как те, что получены из плазмиды и бактериофага (такого как [лямбда] фаг), генетических элементов, таких как космиды и фагмиды. Системы экспрессии могут содержать контрольные области, которые регулируют, а также обеспечивают экспрессию. Промоторы могут представлять собой любые промоторы при условии, что они являются подходящими для хозяев, которые будут использоваться для генной экспрессии. Например, когда хозяин представляет собой *Escherichia coli*, предпочтительными являются trp промотор, lac промотор, recA промотор, pL промотор, lpp промотор, и т.д. Когда хозяин представляет собой *Bacillus subtilis*, предпочтительными являются SPO1 промотор, SPO2 промотор, penP промотор и т.д. Когда хозяин представляет собой дрожжи, предпочтительными являются PHO5 промотор, PGK промотор, GAP промотор, ADH промотор и т.д. Когда животную клетку используют как хозяин, примеры промоторов для использования в данном случае включают SRa промотор, SV40 промотор, LTR промотор, CMV промотор и HSV-TK промотор. Как правило, могут использовать любую систему или вектор, который способен поддерживать, репродуцировать или экспрессировать нуклеиновую кислоту, чтобы получить полипептид в хозяине.

Соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты может быть встроена в систему экспрессии согласно любому хорошо известному и рутинному способу, такому, как описан в Sambrook et al. выше. Соответствующие сигналы секреции могут быть введены в DLL3 полипептид, чтобы дать секрецию транслируемого белка в просвет эндоплазматического ретикулула, периплазматическое пространство или внеклеточную среду. Данные сигналы могут быть эндогенными к полипептиду DLL3, или они могут быть гетерологичными сигналами. Трансформация клеток-хозяев может быть выполнена в соответствии со способами, известными в данной области уровня техники. Например, на следующие документы может быть сделана ссылка: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 69, 2110 (1972); Gene, Vol. 17, 107 (1982); Molecular & General Genetics, Vol. 168, 111 (1979); Methods in Enzymology, Vol. 194, 182-187 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 75, 1929 (1978); Cell Technology, separate volume 8, New Cell Technology, Experimental Protocol. 263-267 (1995) (issued by Shujunsha); and Virology, Vol. 52, 456 (1973). Таким образом, полученный трансформант, трансформированный с вектором экспрессии, содержащим ДНК, или ДНК, содержащей ген, могут культивировать в соответствии со способом, известным в данной области уровня техники. Например, когда хозяевами являются бактерии рода *Escherichia*, бактерии, как правило, культивируют приблизительно от 15 до 43°C в течение приблизительно 3-24 ч. При необходимости, также может быть осуществлена аэрация или перемешивание. Когда хозяевами являются бактерии рода *Bacillus*, то бактерии, как правило, культивируют приблизительно от 30 до 40°C в течение приблизительно 6-24 ч. При необходимости, также может быть осуществлена аэрация или перемешивание. Когда трансформанты, хозяевами которых являются дрожжи, культивируют, то культивирование, как правило, осуществляют приблизительно от 20 до 35°C в течение приблизительно 24-72 ч, используя среды с регулируемым pH от 5 до 8. При необходимости, также может быть осуществлена аэрация или перемешивание. Когда трансформанты, хозяевами которых являются клетки животных, то клетки, как правило, культивируют приблизительно от 30 до 40°C в течение приблизительно 15-60 ч, используя среды с регулируемым pH от 6 до 8. При необходимости, также может быть добавлена аэрация или перемешивание.

Если полипептид DLL3 должен экспрессироваться для использования в скрининговых анализах на основе клеток, предпочтительным является то, что полипептид продуцируется на поверхности клетки. В

этом случае клетки могут быть собраны перед использованием в скрининг-анализе. Если полипептид DLL3 секретируется в среду, среда может быть восстановлена для того, чтобы выделить указанный полипептид. Если он продуцируется внутриклеточно, клетки сначала необходимо лизировать перед тем, как выделить полипептид DLL3.

DLL3 полипептид может быть выделен и очищен из рекомбинантных клеточных культур или из других биологических источников с помощью хорошо известных способов, включающих, осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анион- или катионообменную хроматографию, фосфоцеллюлозную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию с гидрофобными взаимодействиями, хроматографию с гидроксиллапатитом, молекулярную просеивающую хроматографию, способы центрифугирования, способы электрофореза и лектиновую хроматографию. Можно применять комбинацию данных способов. Для того чтобы выделить и очистить полипептид или белок от продуктов культуральной среды, например, после того, как культуру, микробные тела или клетки собирают с помощью известного способа, их суспендируют в соответствующем буфере, микробные тела или клетки разрушают, например, действием ультразвуковых волн, лизоцимами и/или замораживанием-оттаиванием, полученный в результате продукт затем подвергают центрифугированию или фильтрованию, а затем может быть получен сырой экстракт белка. Буфер может также содержать агент денатурации белка, такой как мочевины или гидрохлорид гуанидина, или поверхностно-активное вещество, такое как Triton X-100 (TM). Когда белок секретируется в культуральной среде, микробные тела или клетки и супернатант разделяют с помощью известного способа после завершения культивирования, и затем собирают супернатант. Белок, содержащийся в полученном культуральном супернатанте или экстракте, может быть очищен с помощью соответствующей комбинации известных способов разделения и очистки. Таким образом, полученный полипептид (белок) может быть превращен в соль известным способом. И наоборот, когда полипептид (белок) получают в виде соли, его можно превратить в свободный белок, или пептид, или другую соль согласно известному способу или способу в соответствии с ним. Больше того, трипсин или химотрипсин можно использовать для воздействия на белок, получаемый по рекомбинантным способам, до или после очистки для его расщепления. Присутствие полипептида (белка) или его соли может быть измерено с помощью различных анализов связывания, ферментных иммунологических анализов, используя специфические антитела и т.д.

Способы, хорошо известные в данной области уровня техники, могут быть использованы для вторичной укладки, чтобы регенерировать нативную или активную конформацию полипептида DLL3, когда полипептид был денатурирован в процессе выделения и/или очистки. DLL3 полипептид может быть получен из биологического образца из какого-либо источника, такого как образец крови или образец ткани, например образец ткани легкого, поджелудочной железы и кожи.

DLL3 полипептид может быть в виде "зрелого белка" или может быть частью более крупного белка, такого как слитый белок. Часто предпочтительным является включать дополнительную аминокислотную последовательность, которая содержит секреторные или лидерные последовательности, последовательность пре-, про- или препробелка, или последовательность, которая помогает в очистке, например, такая как аффинная метка, например несколько остатков гистидина, FLAG метка, HA метка или тус-метка.

DLL3 может, например, быть слитым с гетерологичным партнером слияния, таким как поверхностный белок, известный как белок D из Haemophilus Influenza B, неструктурный белок из вируса гриппа, такой как NS1, S антиген из вируса гепатита B, или белок, известный как LYTA, такой как его С-терминальная часть.

Может быть использована дополнительная последовательность, которая обеспечивает его стабильность во время рекомбинантного продуцирования. Такие последовательности необязательно могут быть удалены, по мере необходимости, путем включения расщепляемой последовательности в качестве дополнительной последовательности или ее части. Таким образом, DLL3 полипептид может быть слит с другими фрагментами, включающими другие полипептиды или белки (например, глутатион S-трансферазы и белок А). Такой слитый белок может быть расщеплен с помощью соответствующей протеазы. Такие дополнительные последовательности и аффинные метки хорошо известны в данной области уровня техники. В дополнение к указанному выше энхансер, сигнал сплайсинга, сигнал полиаденилирования, селективный маркер и точка начала репликации SV40 могут быть включены в вектор экспрессии, при необходимости.

Получение аффинных реагентов к DLL3.

В данной области существует три основных типа иммуноаффинного реагента - моноклональные антитела, фаговый дисплей антитела и малые молекулы, полученные из антитела, такие как Affibodies, доменные антитела (dAbs), Nanobodies, UniBodies, DARPins, антикарины, дуокарины, Avimers или Versabodies. Такие вещества способны к иммуноспецифическому связыванию с DLL3.

Получение антител к DLL3.

Согласно изобретению DLL3, аналог DLL3, DLL3-связанный белок или фрагмент или их производное могут быть использованы в качестве иммуногена для получения антител, которые иммуноспецифически связывают такой иммуноген. Такие иммуногены могут быть получены с помощью приемлемого способа, включающего способы, описанные выше. Термин "антитело", как используется в данном доку-

менте, касается пептида или полипептида и, по существу, кодируемого с помощью гена иммуноглобулина или генов иммуноглобулина или их фрагментов, способных к специфическому связыванию антигена или эпитопа. См., например, *Fundamental Immunology*, 3<sup>rd</sup> Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) *J. Immunol.* Способы 175:267-273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97. Термин "антитело" включает антигенсвязывающие части, т.е. "сайты связывания антигена" (например, фрагменты, субпоследовательности, области, определяющие комплементарность (CDRs)), которые сохраняют способность связывать антиген, в том числе (i) Fab фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1 доменов; (ii) F(ab')<sub>2</sub> фрагмент, бивалентный фрагмент, который включает два Fab фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd фрагмент, состоящий из VH и CH1 доменов; (iv) Fv фрагмент, состоящий из VL и VH доменов одного плеча антитела, (v) dAb фрагмент (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из VH домена; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Одноцепочечные антитела также охватываются термином "антитело". Антитела включают, но не ограничиваются этим, поликлональные, моноклональные, биспецифические, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab фрагменты и F(ab')<sub>2</sub> фрагменты, фрагменты, продуцированные библиотекой Fab экспрессии, антиидиотипические (анти-Id) антитела, и эпитопсвязывающие фрагменты. Молекулы иммуноглобулина могут быть из какого-либо класса (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA, такие как IgG) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

Термин "специфически связывает" или "связывается специфически" (или "иммуноспецифически связывает") не предназначен для того, чтобы показать, что антитело связывается исключительно с предназначенной для него мишенью.

Скорее антитело "специфически связывает", если его аффинность в отношении предназначенной для него мишени составляет, как правило, приблизительно в 5 раз большее значение по сравнению с его аффинностью к молекуле-немишени. Соответственно, не существует никакой значительной перекрестной реакции или перекрестного связывания с нежелательными веществами, особенно белками или тканями, встречающимися в природе, здорового человека или животного. Предпочтительно аффинность антитела будет по меньшей мере приблизительно в 5 раз, предпочтительно в 10 раз, более предпочтительно в 25 раз, еще более предпочтительно в 50 раз и наиболее предпочтительно в 100 раз или более больше по отношению к молекуле-мишени, чем его аффинность к молекуле-немишени. Специфическое связывание между антителом или другим агентом связывания и антигеном означает, что аффинность связывания составляет по меньшей мере  $10 \text{ M}^{-1}$ . Антитела могут, например, связываться с аффинностью по меньшей мере приблизительно  $10 \text{ M}^{-1}$  и предпочтительно от приблизительно  $10^8$  до приблизительно  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , от приблизительно  $10^9$  до приблизительно  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  или от приблизительно  $10^{10}$  до приблизительно  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ .

Аффинность рассчитывают как  $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  ( $k_{\text{off}}$  - это константа скорости диссоциации,  $k_{\text{on}}$  - это константа скорости ассоциации и  $K_d$  - это константа равновесия). Аффинность может быть определена в равновесии путем измерения связанной фракции ( $r$ ) меченого лиганда при различных концентрациях ( $c$ ). Данные представлены в виде графика, используя уравнение Скэтчарда

$$r/c = K(n-r),$$

где  $r$  = моль связанного лиганда/моль рецептора при равновесии;

$c$  = концентрация свободного лиганда при равновесии;

$K$  = равновесная константа ассоциации и

$n$  = количество сайтов лигандного связывания на молекулу рецептора.

Согласно графическому анализу  $r/c$  наносят на ось Y против  $r$  по оси X, таким образом получая график Скэтчарда. Аффинность представляет собой отрицательный наклон линии.  $k_{\text{off}}$  может быть определен путем конкуренции связанного меченого лиганда с немеченым избыточным лигандом (см., например, патент США № 6316409). Аффинность целенаправленного агента к его молекуле-мишени составляет, например, по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-6}$  моль/л, по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  моль/л, по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  моль/л, особенно по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  моль/л и, в частности, по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  моль/л. Измерение аффинности антитела по анализу Скэтчарда хорошо известно в данной области уровня техники, см., например, van Erp et al., *J. Immunoassay* 12: 425-43, 1991; Nelson and Griswold, *Comput. Methods Программы Biomed.* 27: 65-8, 1988.

Могут быть использованы какие-либо общедоступные антитела, которые распознают продукты из генов, кодирующих DLL3. Способы, известные квалифицированному специалисту в данной области уровня техники, используются для получения антител, которые распознают DLL3, аналог DLL3, DLL3-связанный полипептид или фрагмент или производное. Квалифицированному специалисту в данной области известны многие процедуры для получения антител, например, как описано в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y. Квалифицированному специалисту в данной области известно также, что фрагменты или Fab фрагменты, которые имитируют антитела, также могут быть получены из генетической информации с помощью раз-

личных процедур (Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebæck, C, ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992)).

Фрагменты DLL3 могут использоваться как иммуногены для получения антитела.

При производстве антител скрининг требуемого антитела может быть достигнут, используя способы, известные в данной области уровня техники, например, ИФА (твердофазный иммуоферментный анализ). Например, для выбора антител, которые распознают специфический домен DLL3, их могут анализировать с помощью гибридом, продуцирующих продукт, который связывается с DLL3 фрагментом, содержащим такой домен. Для выбора антитела, которое специфически связывает первый DLL3 гомолог, но который специфически не связывается со (или связывается менее активно) вторым DLL3 гомологом, используют определение положительного связывания с первым DLL3 гомологом и отсутствие связывания со (или уменьшенное связывание с) вторым DLL3 гомологом. Аналогично, для выбора антитела, которое специфически связывает DLL3, но специфически не связывается с (или связывает менее активно) другой изоформой того же самого белка (например, отличающейся гликоформой, имеющей такой же основной пептид, как DLL3), применяют определение положительного связывания с DLL3 и отсутствия связывания с (или уменьшенное связывание с) другой изоформой (например, отличающейся гликоформой). Таким образом, предпочтительно антитело (такое как моноклональное антитело), которое связывается с большей аффинностью (например, по меньшей мере в 2 раза, например по меньшей мере в 5 раз, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз большей аффинностью) с DLL3, чем с другой изоформой или изоформами (например, гликоформами) с DLL3.

Поликлональные антитела представляют собой гетерогенные популяции антительных молекул, полученных из сывороток иммунизированных животных. Кроме того, можно использовать нефракционированную иммунную сыворотку. Различные способы, известные в данной области уровня техники, могут быть использованы для получения поликлональных антител к DLL3, фрагменту DLL3, DLL3-соответствующему полипептиду или фрагменту DLL3-соответствующего полипептида. Например, один из способов состоит в очистке полипептидов, вызывающих интерес, или в синтезе полипептидов, вызывающих интерес, используя, например, способы твердофазного пептидного синтеза, хорошо известные в данной области уровня техники. См., например, Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol. Vol. 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields ed., Meth. Enzymol. Vol 289 (1997); Kiso et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1: 255-60, 1995; Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44: 1326-31, 1996. Такие полипептиды затем можно использовать, чтобы иммунизировать путем инъекции различных хозяев-животных, включая, но не ограничиваясь этим, кроликов, мышей, крыс и т.д., чтобы генерировать поликлональные или моноклональные антитела. Если DLL3 очищают, используя гель-электрофорез, DLL3 могут быть использованы для иммунизации с или без предварительной экстракции из полиакриламидного геля. Различные вспомогательные вещества (т.е. иммуностимуляторы) могут быть использованы для повышения иммунного ответа в зависимости от вида хозяина, включая, но не ограничиваясь этим, полный или неполный адьювант Фрейнда, минеральный гель, такой как гидроксид алюминия, поверхностно-активное вещество, такое как лизолецитин, плуроник-полиол, полианион, пептид, масляная эмульсия, гемоцианин лимфы улитки, динитрофенол, и вспомогательное вещество, такое как BCG (бацилла Кальметта-Герена) или *coynebacterium parvum*. Дополнительные вспомогательные вещества также хорошо известны в данной области уровня техники.

Для получения моноклональных антител (mAbs), нацеленных на DLL3, фрагмент DLL3, DLL3-связанный полипептид или фрагмент DLL3 соответствующего полипептида могут быть использованы непрерывные клеточные линии в культуре по методике, которая предусматривает получение молекул антитела. Например, гибридомный способ, первоначально разработанный Kohler и Milstein (1975, Nature 256:495-497), а также триомный способ, гибридомный способ на В-клетках человека (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72) и EBV- гибридомный способ для получения моноклональных антител человека (Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Такие антитела могут быть из любого класса иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD и какой-либо из его подклассов. Гибридомы для получения mAbs можно культивировать *in vitro* или *in vivo*. Моноклональные антитела могут быть получены у животных, свободных от микробов, применяя известную технологию (PCT/US 90/02545, включенный в данный документ в качестве ссылки).

Моноклональные антитела включают, но не ограничиваются этим, человеческие моноклональные антитела и химерные моноклональные антитела (например, химеры человек-мышь). Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части происходят от разных видов животных, таких как те, которые имеют константную область и переменную область человеческого иммуноглобулина, полученного из мышинового mAb, (см., например Cabilly et al., патент США № 4816567; и Boss et al., патент США № 4816397, которые включены в данный документ в виде ссылки в полном объеме). Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антитела от не человеческого вида, имеющие одну или больше определяющих комплементарность областей (CDRs) от не человеческого вида и каркасную область от молекулы иммуноглобулина человека (см., например, Queen, патент США № 5585089, которые включены в данный документ в виде ссылки в полном своем объеме).

Химерные и гуманизированные моноклональные антитела могут быть получены согласно способам рекомбинантных ДНК, известным в данной области уровня техники, например, используя способы, описанные в публикации PCT № WO 87/02671; заявке на европейский патент 184187; заявке на европейский патент 171496; заявке на европейский патент 173494; публикации PCT № WO 86/01533; патенте США № 4816567; заявке на европейский патент 125023; Better et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Cane. Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; и Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; патенте США 5225539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525; Verhoevan et al. (1988) Science 239:1534; и Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.

Полностью человеческие антитела особенно предпочтительны для терапевтического лечения субъектов-людей. Такие антитела могут быть получены с использованием трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать гены эндогенного иммуноглобулина с тяжелой и легкой цепью, но которые могут экспрессировать человеческие гены с тяжелой и легкой цепью. Трансгенных мышей иммунизируют обычным антигеном, например всем или частью DLL3. Моноклональные антитела, направленные против антигена, могут быть получены с использованием традиционной гибридомной технологии. Человеческие иммуноглобулиновые трансгены, введенные трансгенным мышам, перегруппировываются во время дифференциации В-клеток, а затем подвергаются классовому переключению и соматической мутации. Таким образом, используя такую методику, можно получить терапевтически эффективные IgG, IgA, IgM и IgE антитела. Для обзора этой технологии получения антител человека см. Lonberg and Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93). Более подробное обсуждение этой технологии для получения антител человека и моноклональных антител человека и протоколов получения таких антител, см., например, патенты США 5625126; 5633425; 5569825; 5661016 и 5545806. Кроме того, компании, такие как Abgenix, Inc. (Freemont, CA) и Genpharm (San Jose, CA), могут быть задействованы для получения антител человека, направленных против выбранного антигена.

Полностью человеческие антитела, которые распознают выбранный эпитоп, могут быть получены с использованием методики, которую называют как "управляемая селекция". В данном подходе выбранное нечеловеческое моноклональное антитело, например антитело мыши, используется, для того, чтобы обеспечивать выбор полностью человеческого антитела, распознающего тот же эпитоп (Jespers et al. (1994) BioTechnology 12:899-903).

Антитела также могут быть получены с использованием технологии фагового дисплея, предназначенного для получения и скрининга библиотек полипептидов для связывания с выбранной мишенью. См., например, Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-82, 1990; Devlin et al., Science 249, 404-6, 1990; Scott and Smith, Science 249, 386-88, 1990; и Ladner et al., патент США № 5571698. Основная концепция способов фагового дисплея состоит в создании физической ассоциации между ДНК, кодирующей полипептид, который выявляется, и полипептидом. Данная физическая ассоциация обеспечивается фаговой частицей, которая отображает полипептид, как часть капсида, входящего в состав генома фага, который кодирует полипептид. Создание физической связи между полипептидами и их генетическим материалом позволяет одновременный массовый скрининг очень большого количества фагов несущих различные полипептиды. Итак, данный фаг является обогащенным за счет аффинного скрининга мишени. Идентичность полипептидов, отображаемая этими фагами, может быть определена на основе соответствующих геномов. Используя эти способы полипептид, идентифицированный как имеющий аффинность связывания с желаемой мишенью, может быть синтезирован с использованием обычных способов. См., например, патент США № 6057098, который включен в данный документ во всей его полноте, включая все таблицы, фигуры и формулу изобретения. В частности, такой фаг может быть использован для отображения доменов антигена связывания, экспрессированных из репертуарной или комбинаторной библиотеки антитела (например, человека или мышинного). Фаг, экспрессирующий домен антигена связывания, который связывает представляющий интерес антиген, может быть выбран из меченого антигена или антигена, связанного или нанесенного на твердую поверхность или шарик.

Фаг, использованный в данных способах, как правило, представляет собой нитевидный фаг, включающий fd и M13 домены связывания, экспрессированные фагогом Fab, Fv, или стабилизированные дисульфидом домены Fv антитела, рекомбинантно слитые с геном фага III или белком гена VIII. Способы фагового дисплея, которые могут быть использованы для создания антитела, включают те, которые раскрыты в Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); заявке № PCT/GB 91/01134; публикации PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; и патентах США №№ 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 и 5969108; каждый из которых включен в данный документ в виде ссылки.

Как описано в вышеуказанных ссылках, после выбора фага, области, кодирующее антитело, из фага могут быть выделены и использованы для создания целых антител, в том числе человеческих антител,

или антигенсвязывающего фрагмента и экспрессированы в хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, как подробно описано ниже. Например, также могут быть применены методы рекомбинантного получения Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub> фрагментов с использованием способов, известных в данной области уровня техники, которые раскрыты в публикации PCT; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992), Sawai et al., *AJRI* 34:26-34 (1995); и Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988) (указанные ссылки, включены посредством ссылки во всей своей полноте).

Примеры способов, которые могут быть использованы для получения одноцепочечных Fvs и антител, включают те, которые описаны в патентах США 4946778 и 5258498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); и Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

Биспецифические антитела могут быть получены способами, известными в данной области уровня техники. Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основывается на ко-экспрессии двух иммуноглобулиновых пар тяжелой цепь-легкая цепь, где две цепи обладают различной специфичностью (Milstein et al., 1983, *Nature* 305:537-539). Из-за случайного выбора иммуноглобулина тяжелой и легкой цепей, данные гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка правильной молекулы, которую обычно осуществляют путем стадий аффинной хроматографии, является довольно громоздкой, и выходы продукта являются низкими. Аналогичные процедуры раскрыты в WO 93/08829, опубликованной 13 мая 1993, и в Traunecker et al., 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659.

В соответствии с другим подходом переменные домены антитела с желаемой специфичностью связывания (антитело-антигенсвязывающими сайтами) сливаются с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. Слияние предпочтительно осуществляют с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, который включает по меньшей мере часть шарнирной области, CH2, и CH3. Предпочтительным является то, что имеется первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствующей по меньшей мере в одном из слияний. ДНК, кодирующая слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, при необходимости, легкой цепи иммуноглобулина, встраиваются в отдельные векторы экспрессии и совместно трансфицируют в приемлемый организм-хозяин. Это предусматривает большую гибкость в регулировании взаимных соотношений трех полипептидных фрагментов в вариантах, когда неравные соотношения трех полипептидных цепей, используемых в конструкции, дают оптимальные выходы. Однако существует возможность вставить кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях в результате приводит к высоким выходам, или когда соотношения не имеют особого значения.

Биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и гибридной парой иммуноглобулина тяжелая цепь-легкая цепь (это обеспечивает вторую специфичность связывания) в другом плече. Было обнаружено, что такая асимметричная структура облегчает отделение нужного биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, поскольку присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы предусматривает простой способ разделения. Данный подход раскрыт в WO 94/04690, опубликованной 3 марта 1994. Для более подробной информации о генерировании биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 1986, 121:210.

Функционально активный означает, что фрагмент, производное или аналог способен вызвать анти-антиидиотипические антитела (т.е. третичные антитела), которые распознают один и тот же антиген, из которого получают фрагмент, производное или аналог. В частности, антигенность идиотипа молекулы иммуноглобулина может быть повышена путем делеции каркасной и CDR последовательностей, которые являются С-терминальными к CDR последовательности, которая специфически распознает антиген. Для того чтобы определить, какие CDR последовательности связывают антиген, синтетические пептиды, содержащие CDR последовательности, могут быть использованы в анализах связывания с антигеном согласно любому способу анализа связывания, известному в данной области из уровня техники.

Фрагменты антитела, которые распознают специфические эпитопы, могут быть сформированы с помощью известных методик. F(ab')<sub>2</sub> фрагменты состоят из переменной области, константной области легкой цепи и CH1 домена тяжелой цепи и генерируются пепсиновым разложением молекулы антитела. Fab фрагменты генерируются восстановлением дисульфидных мостиков F(ab')<sub>2</sub> фрагментов. Получение димеров тяжелой цепи и легкой цепи антитела или какого-либо его минимального фрагмента, такого как Fvs или одноцепочечного антитела (SCAs) (например, как описано в патенте США 4946778; Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; и Ward et al., 1989, *Nature* 334:544-54), или какой-либо другой молекулы с такой же специфичностью, как у антитела, известно из уровня техники. Одноцепочечные антитела образуются путем связывания фрагментов тяжелой и легкой цепи Fv области через аминокислотный мостик с получением в результате одноцепочечного полипептида. При этом могут быть использованы способы сборки функциональных Fv фрагментов в *E. coli* (Skerra et al., 1988, *Science* 242:1038-1041).

Описано также получение слитых белков из иммуноглобулинов (или их функционально активных фрагментов), например, в которых иммуноглобулин сливается посредством ковалентной связи (например, пептидной связи), либо на N-конце, или C-конце с аминокислотной последовательностью другого белка (или его частью, предпочтительно по меньшей мере 10, 20 или 50 аминокислотной частью белка), который не является иммуноглобулином. Предпочтительно иммуноглобулин или его фрагмент может быть ковалентно связан с другим белком на N-конце константного домена. Как указано выше, такие слитые белки могут облегчить очистку, повысить период полувыведения *in vivo* и повысить доставку антигена через эпителиальный барьер в иммунную систему.

Имуноглобулины включают аналоги и производные, которые модифицируются, т. е. путем ковалентного присоединения какого-либо типа молекулы при условии, что такое ковалентное присоединение не нарушает иммуноспецифическое связывание. Например, но не в качестве ограничения, производные и аналоги иммуноглобулинов включают те, которые были далее модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Какая-либо из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена с помощью известных способов, включая, но не ограничиваясь этим, с помощью специфического химического расщепления, ацетилирования, формилирования и т.д. Кроме того, аналог или производное может содержать одну или больше неклассических аминокислот.

Вышеуказанные антитела могут быть использованы в способах, известных из уровня техники, касающихся локализации и активности DLL3, например, для визуализации данного белка, измерения их уровней в соответствующих физиологических образцах, в диагностических способах и т.д.

Получение аффинантител к DLL3.

Молекулы аффинантител представляют собой новый класс белков с аффинностью на основе 58-аминокислотного остатка домена белка, полученного из одного из IgG-связывающих доменов стафилококкового белка A. Данный домен был использован в качестве каркаса для строительства комбинаторных фагмидных библиотек, из которых варианты аффинантител, которые нацелены на желаемые молекулы, могут быть выбраны с помощью технологии фагового дисплея (Nord K., Gunneriusson E., Ringdahl J., Stahl S., Uhlen M., Nygren P.A., Binding proteins selected from combinatorial libraries of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain, *Nat Biotechnol* 1997; 15:772-7. Ronmark J., Gronlund H., Uhlen M., Nygren P.A., Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, *Eur. J. Biochem.* 2002; 269:2647-55). Простая прочная конструкция молекул аффинантител в сочетании с их низкой молекулярной массой (6 кДа) делают их пригодными для различных применений, например, в качестве реагентов обнаружения (Ronmark J., Hansson M., Nguyen T., et al. Construction and characterization of Affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*, *J. Immunol. Methods* 2002; 261:199-211) и ингибирования рецепторных взаимодействий (Sandstorm K., Xu Z., Forsberg G., Nygren P.A., Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, *Protein Eng* 2003; 16:691-7). Дальнейшие подробности относительно аффинантител и методы их получения раскрыты в патенте США № 5831012, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Меченые аффинантитела также могут быть полезны для определения обилия изоформ.

Получение доменных антител DLL3.

Ссылки на антитела в данном документе охватывают ссылки на доменные антитела. Доменные антитела (dAbs) являются наименьшими функциональными единицами связывания антител, соответствующих вариабельным областям или тяжелой (VH), или легкой (VL) цепи антител человека. Доменные антитела имеют молекулярную массу приблизительно 13 кДа. Domantis разработала ряд крупных и высоко функциональных библиотек полностью человеческих VH и VL dAbs (более десяти миллиардов различных последовательностей в каждой библиотеке), и использует эти библиотеки для выбора dAbs, которые являются специфическими для терапевтических мишеней. В отличие от многих традиционных антител, доменные антитела хорошо экспрессируются в бактериальных, дрожжевых клеточных системах и клеточных системах млекопитающих. Дальнейшие подробности, касающиеся доменных антител и способов их получения могут быть получены из патентов США 6291158; 6582915; 659081; 6172197; 6696245; США серийный № 2004/0110941; заявку на европейский патент № 1433846 и европейские патенты 0368684 и 0616640; WO 05/035572, WO 04/101790, WO 04/081026, WO 04/058821, WO 04/003019 и WO 03/002609, каждый из которых включен в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

Получение наноантител DLL3.

Наноантитела представляют собой терапевтические белки, производные от антитела, которые содержат уникальные структурные и функциональные свойства природных антител с тяжелой цепью. Данные антитела с тяжелой цепью содержат один вариабельный домен (VHH) и два константных домена (C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>). Важно отметить, что клонированный и изолированный VHH домен представляет собой стабильный полипептид, сохранивший способность связывания с антигеном, присущую исходному антителу с тяжелой-цепью. Наноантитела имеют высокую гомологию с V<sub>H</sub> доменами человеческих антител, и могут быть в дальнейшем гуманизированными без потери активности. Важно отметить, что наноантите-

ла имеют низкий иммуногенный потенциал, который был подтвержден в исследованиях на приматах.

Наноантитела сочетают в себе преимущества обычных антител с важными особенностями низкомолекулярных лекарственных средств. Как и обычные антитела, наноантитела демонстрируют высокую специфичность в отношении мишени, высокую аффинность к мишени и низкую токсичность. Однако, подобно низкомолекулярным лекарственным средствам, они могут ингибировать ферменты и легко достигать рецепторов. Кроме того, наноантитела являются чрезвычайно устойчивыми, могут быть введены способами, отличными от инъекции (см., например, WO 04/041867, которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме) и просты в изготовлении. Другие преимущества наноантител включают распознавание необычных или скрытых эпитопов в результате их небольшого размера, связывание в полостях или в активных сайтах белковых мишеней с высокой аффинностью и избирательностью в связи с уникальным 3-мерным форматом гибкости этого лекарственного средства, заданным периодом полувыведения.

Наноантитела кодируются одиночными генами и эффективно продуцируются почти во всех эукариотических и прокариотических хозяевах, например *E. coli* (см., например US 6765087, которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме), плесневых грибах (например, *Aspergillus* или *Trichoderma*) и дрожжах (например, *Saccharomyces*, *Kluuyveromyces*, *Hansenula* или *Pichia*) (см., например, US 6838254, которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме). Поскольку наноантитела демонстрируют превосходную стабильность по сравнению с обычными антителами, они могут входить в состав готового к использованию раствора с длительным сроком годности.

Способ наноклонирования (см., например, WO 06/079372, которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме) является способом создания наноантител против нужной мишени на основании автоматизированного отбора В-клеток.

#### Получение унитела DLL3.

Унитело представляет собой другой фрагмент антитела; данный фрагмент представляет собой фрагмент с удаленной шарнирной областью IgG4 антител. Делеция шарнирной области в молекуле в результате приводит к молекуле, которая, по существу, по размеру в два раза меньше традиционных IgG4 антител и имеет одновалентную связывающую область, а не двухвалентную связывающую область IgG4 антител. Кроме того, хорошо известно, что IgG4 антитела являются инертными и, таким образом, не взаимодействуют с иммунной системой, что может быть предпочтительным для лечения заболеваний, где иммунный ответ не требуется, и данное преимущество присуще унителу. Например, оно может ингибировать, но не убивать клетки, к которым они присоединены. Кроме того, связывание унитела с раковыми клетками не стимулируют их к пролиферации. Кроме того, поскольку унитело имеют приблизительно половину размера традиционных IgG4 антител, они могут демонстрировать лучшее распределение на больших солидных опухолях, что обеспечивает лучшую эффективность. Унитела удаляются из организма с такой же скоростью, что и полноразмерные IgG4 антитела, и способны связываться с аналогичной аффинностью с антигенами, как и целые антитела. Дальнейшая подробная информация об унителах может быть получена из заявки на патент WO 2007/059782, которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

#### Получение DARPins DLL3.

DARPins (разработанные анкириновые повторные белки) являются одним из примеров миметика антитела DRP (разработанные повторяющиеся белки). Повторяющиеся белки, такие как анкирин- или лейцинбогатые повторяющиеся белки, являются молекулами связывания, которые возникают в отличие от антител внутри- и внеклеточно. Их уникальная модульная архитектурная характеристика повторяющихся структурных единиц (повторов), которые складываются вместе, чтобы сформировать удлиненные повторяющиеся домены, отображая переменные и модульные мишеньсвязывающие поверхности. Основываясь на данной модульности, могут быть получены комбинаторные библиотеки полипептидов с высокодиверсифицированной специфичностью связывания. Данная стратегия включает консенсусный дизайн самостоятельных совместимых повторов, которые отображают переменные поверхностные остатки и их случайную сборку в повторяющихся доменах.

DARPins могут быть получены в бактериальных системах экспрессии с очень высокими выходами, и они относятся к числу наиболее стабильных известных белков. Были получены высокоспецифические, высокоаффинные DARPins с широким диапазоном белков-мишеней, включающих человеческие рецепторы, цитокины, киназы, человеческие протеазы, вирусные и мембранные белки. DARPins могут обладать аффинностью от наномолярного до пикомолярного диапазонах.

DARPins используются в ИФА, сэндвич ИФА, анализе проточной цитометрии (FACS), иммуногистохимии (ИНС), чипировании, аффинной очистке или Вестерн-блоттинге. Кроме того, DARPins являются высокоактивным во внутриклеточном пространстве, например, как внутриклеточные маркерные белки, слитые с флуоресцентным белком (GFP). DARPins, кроме того, использовали для ингибирования попадания вируса с IC<sub>50</sub> в пМ диапазоне. DARPins не только идеально подходят для блокирования взаимодействия белок-белок, но также для ингибирования ферментов. Протеазы, киназы и транспортеры успешно ингибировались, наиболее часто аллостерическим способом. Очень быстрые и специфические накопления на опухоли и использование в качестве подходящей мишени рака крови делает возможным

использование DARPins *in vivo* в качестве диагностических или терапевтических средств.

Дополнительную информацию относительно белков DARP и других технологий DRP можно найти в заявке на патент США № 2004/0132028 и в публикации международной патентной заявки № WO 02/20565, каждая из которых включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

Получение антикалинов к DLL3.

Антикалины представляют собой антитело миметической технологии, однако в данном случае специфичность связывания обусловлена липокалинами - семейство низкомолекулярных белков, которые естественным образом экспрессируются в человеческих тканях и жидкостях организма. Липокалины эволюционировали, чтобы выполнять ряд функций *in vivo*, связанных с физиологическим транспортом и хранением химически чувствительных или нерастворимых соединений. Липокалины имеют надежную внутреннюю структуру, которая включает высококонсервативный В-ствол, который поддерживает четыре петли на одном конце белка. Эти петли формируют вход в карман связывания и конформационные различия в этой части молекулы обеспечивают изменение специфичности связывания между отдельными липокалинами.

В то время как общая структура гипервариабельных петель, поддерживаемых консервативной β-листовой рамкой напоминает иммуноглобулины, липокалины значительно отличаются от антител с точки зрения размера, так как они состоят из одной полипептидной цепи из 160-180 аминокислот, которая незначительно больше, чем один иммуноглобулиновый домен.

Липокалины клонируют и их петли подвергаются инжинирингу, чтобы создать антикалины. Были получены библиотеки структурно различных антикалинов, и антикалиновый дисплей позволяет выбрать и скринировать функции связывания, с последующей экспрессией и получением растворимого белка для дальнейшего анализа в прокариотических или эукариотических системах. Было продемонстрировано, что могут быть разработаны антикалины, которые являются специфическими для любого человеческого белка-мишени. Они могут быть выделены, и они будут обладать аффинностью связывания в наномолярном или более высоком диапазоне.

Антикалины также могут быть отформатированы в качестве двойных нацеленных белков, так называемых дуокалинов. Дуокалин связывает две отдельные терапевтические мишени, сохраняя целевую специфичность и аффинность независимо от структурной ориентации двух его связывающих доменов.

Модуляция нескольких мишеней с помощью одной молекулы особенно выгодна при заболеваниях, обусловленных ни одной причиной. Кроме того, би- или поливалентные связывающие форматы, такие как дуокалины имеют значительный потенциал в ориентации молекул на клеточной поверхности при болезни, опосредуя агонистические воздействия на пути сигнальной трансдукции или индуцируя улучшенные эффекты интернализации за счет связывания и кластеризации рецепторов на клеточной поверхности. Кроме того, высокая внутренняя устойчивость дуокалинов сравнима с мономерными антикалинами.

Дополнительную информацию о антикалинах можно найти в патенте США № 7250297 и публикации международной заявки на патент WO 99/16873, оба эти документа включены в качестве ссылки в полном объеме.

Получение авимеров к DLL3.

Авимеры были получены из большого семейства внеклеточных доменов рецептора человека путем перетасовки экзона и фагового дисплея *in vitro*, в результате были созданы многодоменные белки со связывающими и ингибирующими свойствами. Они связывают многочисленные независимые домены, как было показано, создают avidности и в результате это приводит к улучшенной аффинности и специфичности по сравнению с обычными одноэпитопными связывающими белками. Другие потенциальные преимущества авимеров включают простое и эффективное получение мультимишень-специфических молекул в *Escherichia coli*, повышенную термостабильность и устойчивость к протеазам. Авимеры с субнаномолярными аффинностями были получены против различных мишеней.

Дополнительную информацию об авимерах можно найти в публикациях заявок на патенты США №№ 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Получение версател к DLL3.

Версатела представляют собой небольшие белки 3-5 кДа с более 15% цистеинов, которые образуют дисульфидный скаффолд высокой плотности, заменяя гидрофобное ядро, которое имеют типичные белки. Замещение большого количества гидрофобных аминокислот, которое содержит гидрофобное ядро с небольшим количеством дисульфидов, в результате приводит к белку, который более менее гидрофильный (меньше агрегации и неспецифического связывания), более устойчивый к протеазе и нагреванию и имеет более низкую плотность Т-клеточных эпитопов, поскольку остатки, которые в наибольшей степени способствуют презентации МНС, являются гидрофобными. Все эти четыре свойства, как хорошо известно, влияют на иммуногенность, и вместе они, как ожидается, вызывают значительное уменьшение иммуногенности.

Конструирование версател осуществляют с использованием естественных инъекционных биофарма-

цветических препаратов, получаемых от пиявок, змей, пауков, скорпионов, улиток и анемонов, которые, как известно, демонстрируют неожиданно низкую иммуногенность. Выбранные природные белки подвергают дизайну и скринингу в отношении размера, гидрофобности, протеолитического процессинга антигена и плотности эпитопа, для минимизации этих параметров до уровня ниже среднего по отношению к природным инъекционным белкам.

Учитывая структуру версатела, данные миметики-антитела имеют универсальный формат, который включает мультивалентность, мультиспецифичность, разнообразие механизмов полувыведения, модули тканевой ориентации и отсутствие Fc области антитела. Кроме того, версателю получают в *E.coli* с высоким выходом из-за их гидрофильности и малого размера. Версатела хорошо растворимы и могут быть включены в лекарственный препарат в высоких концентрациях. Версатела являются исключительно термостойкими и имеют длительный срок хранения.

Дополнительную информацию о версателах можно найти в публикации заявки на патент США № 2007/0191272, которая включена в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

Экспрессия аффинных реагентов.

Экспрессия антитела.

Антитела могут быть получены любым способом, известным в данной области уровня техники, в частности путем химического синтеза или путем рекомбинантной экспрессии.

Рекомбинантная экспрессия антител или их фрагментов, производных или аналогов требует конструирования нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело. Если нуклеотидная последовательность антитела известна, то нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, может быть собрана из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques* 17:242). Этот способ включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, ренатурацию и сшивание данных олигонуклеотидов, а потом амплификацию сшитых олигонуклеотидов путем ПЦР.

Альтернативно, нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, может быть получена путем клонирования антитела. Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, не доступен, но последовательность молекулы антитела известна, то нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, может быть получена из соответствующего источника (например, библиотеки кДНК антитела, или библиотеки кДНК, генерированной из какой-либо ткани или клеток, экспрессирующих антитело), используя ПЦР амплификацию с использованием синтетических праймеров, способных гибридизоваться на 3' и 5' концах последовательности или путем клонирования с использованием олигонуклеотидного зонда, специфического для конкретной последовательности гена.

Если молекула антитела, которая специфически распознает специфический антиген не доступна, то антитела, специфичные к определенному антигену могут быть сгенерированы любым способом, известным в данной области уровня техники, например, путем иммунизации животного, такого как кролик, чтобы создать поликлональные антитела или, например, путем получения моноклональных антител. В качестве альтернативы клон, кодирующий, по меньшей мере, Fab часть антитела, может быть получен путем скрининга Fab библиотек экспрессии (например, как описано в Huse et al., 1989, *Science* 246:1275-1281) для клонов Fab фрагментов, которые связывают специфический антиген, или путем скрининга библиотек антитела (см., например, Clackson et al., 1991, *Nature* 352:624; Hane et al., 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4937).

После того как получают нуклеиновую кислоту, кодирующую, по меньшей мере, переменную область молекулы антитела, она может быть введена в вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, публикации PCT WO 86/05807; PCT WO 89/01036 и патент США № 5122464). Векторы, содержащие полноразмерную легкую или тяжелую цепь для одновременной экспрессии нуклеиновой кислоты, для обеспечения экспрессии полноразмерной молекулы антитела, также доступны. Затем нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, используют для введения нуклеотидного(ых) замен или делеции(й), необходимых для замен (или делеции) одного или более остатков цистеина в переменных областях. Такие модификации могут быть выполнены любым способом, известным в данной области для введения специфических мутаций или делеций в нуклеотидную последовательность, например, но не ограничиваясь этим, химический мутагенез, *in vitro* сайт-направленный мутагенез (Hutchinson et al., 1978, *J. Biol. Chem.* 253:6551), способы, описанные в PCT и т.д.

Кроме того, могут быть использованы способы получения "химерных антител" (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:851-855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454) с использованием генов сплайсинга молекулы мышинного антитела с соответствующей специфичностью к антигену и генов молекулы человеческого антитела с соответствующей биологической активностью. Как описано выше, химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части происходят от разных видов животных, например переменную область, полученную из мышинного mAb, и константную область человеческого антитела.

После того как нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу антитела, была получена, соответствующий вектор может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием

методов, хорошо известных в данной области уровня техники. Таким образом, способы получения DLL3 путем экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащей последовательности молекулы антитела, описаны в данном документе. Способы, которые хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области уровня техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих молекулу антитела, кодирующую последовательности и соответствующие транскрипционные и трансляционные контрольные сигналы. Данные способы включают, например, способы рекомбинантных ДНК *in vitro*, синтетические способы и генетические рекомбинации *in vivo*. См., например, способы, описанные в Sambrook et al. (1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) and Ausubel et al. (eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY).

Вектор экспрессии переносят в клетку-хозяин с помощью обычных способов, и трансфицированные клетки затем культивируют обычными методами с получением антитела.

Клетки-хозяева, используемые для экспрессии рекомбинантного антитела, могут быть либо бактериальными клетками, такими как *Escherichia coli*, или предпочтительно эукариотическими клетками, особенно для экспрессии всей рекомбинантной молекулы антитела. В частности, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной промежуточный элемент раннего промотора гена цитомегаловируса человека, являются эффективной системой экспрессии для антител (Foecking et al., 1986, *Gene* 45:101; Cockett et al., 1990, *BioTechnology* 8:2).

Разнообразие систем экспрессии вектор-хозяин может быть использовано, чтобы экспрессировать молекулу антитела. Такие системы-хозяева экспрессии представляют собой носители, с помощью которых могут быть получены кодирующие последовательности, которые затем очищают. Они также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфицировании соответствующими кодирующими последовательностями могут экспрессировать молекулу антитела *in situ*. Они включают, но не ограничиваются микроорганизмами, такими как бактерии (например, *E. coli*, *B. Subtilis*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии на основе ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащей последовательности, кодирующие антитело; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии дрожжей, содержащими последовательности, кодирующие антитело; клеточные системы насекомых, инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии вирусов (например, бакуловируса), содержащие последовательности, кодирующие антитело; клеточные системы растений, инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии вирусов (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV), или трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии плазмиды (например, Ti plasmid), содержащими последовательности, кодирующие антитело; или клеточные системы млекопитающих (например, COS, CHO, ВНК, 293, 3Т3 клетки), несущие рекомбинантные конструкты экспрессии, содержащие промоторы, производные генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотронеина) или из вируса млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса осповакцины 7.5К).

В бактериальных системах ряд векторов экспрессии может быть выбран в зависимости от молекулы антитела, которая экспрессируется. Например, когда должно быть произведено большое количество такого белка, для создания фармацевтических композиций, содержащих молекулу антитела, желательно использовать векторы, которые обеспечивают экспрессию высоких уровней слитого белка. Такие векторы включают, но не ограничиваются вектором экспрессии pUR278 *E. coli* (Ruther et al., 1983, *EMBO J.* 2:1791), в котором последовательность кодирующая антитело, может быть встроена в вектор в рамке считывания с *lac Z*-кодирующей областью, так что продуцируется слитый белок; pIN векторы (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509) и т.п. Векторы pGEX также могут быть использованы для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион S-трансферазой (GST). В общем, такие слитые белки являются растворимыми и могут быть легко очищены от лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матричными глутатион-агарозными шариками, с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX включают тромбин или сайты фактора расщепления Ха-протеазы таким образом, что клонированный продукт гена мишени может быть освобожден от GST фрагмента.

В системе насекомого, *Autographa californica* - вирус ядерного полиэдроза (AcNPV) используется в качестве вектора, чтобы экспрессировать чужеродные гены. Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Последовательность, кодирующая антитело, может быть клонирована в неосновных областях (например, ген полиэдрина) вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина). В клетках-хозяевах млекопитающих могут быть использованы ряды систем экспрессии на основе вируса (например, аденовирусная система экспрессии).

Как обсуждалось выше, штамм клеток-хозяев может быть выбран из тех, которые обеспечивают экспрессию встроенных последовательностей или модифицируют и обрабатывают генный продукт желаемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и обработка (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функции белка.

Для долгосрочной перспективы предпочтительным является получение рекомбинантных антител с высоким выходом при стабильной экспрессии. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют целевое антитело могут быть получены путем трансфекции клетки вектором экспрессии, содержащим нуклеотидную последовательность антитела, и нуклеотидную последовательность, обеспечивающую селекцию (например, с помощью неомицина или гигромицина). Такие сконструированные клеточные линии могут быть особенно полезны в скрининге и оценке соединений, которые взаимодействуют непосредственно или опосредованно с молекулой антитела.

Уровни экспрессии молекулы антитела могут быть увеличены путем амплификации вектора (см. обзор Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3 (Academic Press, New York, 1987). Когда маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, способен к амплификации, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет обеспечивать увеличение количества копий маркерного гена. Поскольку амплифицированная область связана с геном антитела, то получение антитела также будет возрастать (Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

Клетка-хозяин может быть трансфицирована двумя векторами экспрессии, где первый вектор кодирует тяжелую цепь полипептида, и где второй вектор кодирует легкую цепь полипептида. Два вектора могут содержать идентичные селективные маркеры, которые позволяют уравнивать экспрессию тяжелых и легких цепей полипептидов. В качестве альтернативы может использоваться один вектор, кодирующий как тяжелую, так и легкую цепь полипептидов. В таких ситуациях легкая цепь должна быть помещена перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197). Кодированные последовательности для тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

После того как молекула антитела была рекомбинантно экспрессирована, она может быть очищена любым способом, известным в данной области уровня техники, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, такой как с белком А или специфическим антигеном и колоночной хроматографии по размеру), центрифугирования, различий в растворимости или с помощью какого-либо другого стандартного метода очистки белков.

Альтернативно, слитый белок может быть легко очищен с использованием антитела, специфичного для слитого белка, который экспрессируется. Например, система, описанная Janknecht и соавт., позволяет легко очистить неденатурированные слитые белки, экспрессированные в человеческих клеточных линиях Janknecht et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972-897). В данной системе представляющий интерес ген субклонирован в плазмиде осповакцины, так что открытая рамка считывания гена транскрипционно слита с аминотерминальной меткой, состоящей из шести остатков гистидина. Метка служит как матричный домен связывания для слитого белка. Экстракты из клеток, инфицированных рекомбинантным вирусом осповакцины, загружают в  $Ni^{2+}$  колонку с системой нитрилуксусная кислота-агароза, и гистидин меченные белки избирательно элюируют буферными растворами, содержащими имидазол.

Антитела, генерированные данными способами, затем могут быть отобраны с использованием первого скрининга в отношении аффинности и специфичности с очищенным, представляющим интерес полипептидом и, при необходимости, сравнены с аффинностью и специфичностью антител, которые являются нежелательными. Процедура скрининга может включать иммобилизацию очищенных полипептидов в отдельных лунках микротитровальных планшетов. Раствор, содержащий потенциальное антитело или группы антител, затем помещают в соответствующие лунки для микротитрования и инкубируют в течение от 30 мин до 2 ч. Микротитровальные лунки потом промывают, и меченое вторичное антитело добавляют в лунки и инкубируют в течение приблизительно 30 мин, а затем промывают. Субстрат добавляют в лунки, и при этом цветная реакция указывает на присутствие антитела с иммобилизованным полипептидом(ами).

Антитела, идентифицированные таким образом, затем могут быть дополнительно проанализированы на аффинность и специфичность. При разработке иммунологических анализов для белка-мишени очищенный белок-мишень действует в качестве стандарта, по которому судят о чувствительности и специфичности иммунологического анализа с использованием антител, которые были выбраны. Поскольку аффинность связывания различных антител может отличаться; некоторые пары антител (например, в сэндвич-анализах) могут создавать пространственные помехи друг другу и т.д., эффективность анализа антитела является более важной мерой, чем абсолютная аффинность и специфичность антитела.

Квалифицированным специалистам в данной области понятно, что для получения антител или их фрагментов могут применяться многие подходы. Это также относится и к скринингу и отбору по аффинности и специфичности.

Для терапевтического применения антитела (особенно моноклональные антитела) могут быть соответственно человеческими или гуманизированными (например, мыши) антителами. Гуманизация, как правило, включает привитие CDR на человеческие каркасные области. Обычно требуются некоторые последующие ретромутации, чтобы оптимизировать конформацию цепей. Такие способы известны специалистам в данной области.

Экспрессия аффинантител.

Конструирование аффинител было уже описано (Ronmark J., Gronlund H., Uhlen, M., Nygren P.A., Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655), включая конструирование библиотек фагового дисплея аффинитела (Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhlen, M. & Nygren, P.A., A combinatorial library of an a-helical bacterial receptor domain, 1995, Protein Eng. 8, 601-608. Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. & Nygren, P.A., Binding proteins selected from combinatorial libraries of an a-helical bacterial receptor domain, 1997, Nat. Biotechnol. 15, 772-777).

Для исследования оптимальных вариантов аффинитела используют биосенсор связывания, такие исследования также были описаны (см. Ronmark J., Gronlund H., Uhlen, M., Nygren P.A., Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655).

Модификации аффинных реагентов.

Анти-DLL3 аффинные реагенты, такие как антитела или их фрагменты, можно конъюгировать с диагностическим фрагментом (такие как детектируемая метка) или терапевтическим фрагментом. Антитела могут быть использованы для диагностики или определения эффективности данной схемы лечения. Обнаружение может быть облегчено путем сочетания антитела с детектируемым веществом (меткой). Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радионуклиды, позитрон-излучающие металлы (для использования в позитронно-эмиссионной томографии), и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов. В патенте США 4741900 описаны ионы металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для использования в качестве диагностического средства. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные материалы включают умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, флуоресцеин дихлортриазиниламин, дансилхлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; подходящие биолюминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; и подходящие радионуклиды включают  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  и  $^{99}\text{Tc}$ .  $^{68}\text{Ga}$  также может быть использован.

Как указано выше, аффинные реагенты, такие как антитела, могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммунодепрессант) или радиотоксин. Такие конъюгаты рассматриваются в данном документе как "иммуноконъюгаты". Иммуноконъюгаты, которые включают один или больше цитотоксинов, называют "иммунотоксинами". Цитотоксин или цитотоксический агент включает какой-либо агент, который пагубно влияет на (например, убивает) клетки. Примеры включают таксол, цитохалазин, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи. Терапевтические агенты, кроме того, включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиоэпахламбурцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклотосфамид, бусульфид, дибромманнитол, стрептозотозин, митомин C, и цис-дихлордиамин платины(II), (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)), и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другие предпочтительные примеры терапевтических цитотоксинов, которые могут быть конъюгированы с антителом, включают дуокармицины, калихеамицины, майтансины и ауристатины и их производные. Пример конъюгата антитела с калихеамицином является коммерчески доступным (Mylotarg®; American Home Products).

Цитотоксины могут быть конъюгированы с антителами с использованием линкер-технологии, доступной в данной области уровня техники. Примеры типов линкеров, которые были использованы для конъюгации цитотоксина с антителом, включают, но не ограничиваются этим, гидразоны, тиоэфиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептидсодержащие линкеры. Линкер может быть, например, чувствительным к расщеплению при низком pH или чувствительным к расщеплению протеазами, такими как протеазы преимущественно экспрессируемые в опухолевой ткани, такие как катепсины (например, катепсины B, C, D).

Примеры цитотоксинов приведены, например, в патентах США №№ 6989452, 7087600 и 7129261, а также в заявках PCT №№ PCT/US 2002/17210, PCT/US 2005/017804, PCT/US 2006/37793, PCT/US 2006/060050, PCT/US 2006/060711, WO 2006/110476 и в заявке на патент США № 60/891028, они включены в данный документ в виде ссылки в полном объеме. Для дальнейшего обсуждения типов цитотоксинов, линкеров и способов конъюгации терапевтических агентов с антителами, см. также Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337;

Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Аффинные реагенты также могут быть конъюгированы с радиоактивным изотопом для создания цитотоксических радиофармацевтических препаратов, называемых также радиоиммуноконъюгатами. Примеры радиоактивных изотопов, которые могут быть конъюгированы с антителами для использования в диагностических или терапевтических целях, включают, но не ограничиваются йодом<sup>131</sup>, индием<sup>111</sup>, иттрием<sup>90</sup> и лютецием<sup>177</sup>. Способы получения радиоиммуноконъюгатов известны в данной области. Примеры радиоиммуноконъюгатов являются коммерчески доступными, в том числе Зевалин®, (IDEC Pharmaceuticals) и Веххар® (Corixa Pharmaceuticals), и подобные способы могут быть применены для получения радиоиммуноконъюгатов с использованием антител.

Аффинные реагенты также могут быть конъюгированы с фталоцианиновым красителем, далее в данном документе называются как фталоцианиноконъюгаты. Примеры фталоцианиновых красителей, которые могут быть конъюгированы с антителами для использования в диагностических или терапевтических целях, включают, но не ограничиваются ими, IR700. Способы получения фталоцианиноконъюгатов описаны, например, в Mitsunaga M., Ogawa M., Kosaka N., Rosenblum L.T., Choyke P.L. and Kobayashi H. (2011) *Nat Med.* 2011 Nov 6. doi: 10.1038/nm.2554.

Конъюгаты могут быть использованы для модификации биологического ответа, фрагмент, относящийся к лекарственному средству, не должен ограничиваться классическими химическими терапевтическими агентами. Например, фрагмент лекарственного средства может представлять собой белок или полипептид, обладающий желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, ферментативно активный токсин, или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas*, или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли или интерферон- $\gamma$ ; или модификаторы биологического ответа, такие как, например, лимфокины, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), или другие факторы роста. Senter P.D. (2009) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13(3):235-244; Kovtun et al. (2010) *Cancer Res.* 70(6):2528-2537.

Способы конъюгирования таких терапевтических фрагментов хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy" in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Носителе Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabelled Antibody In Cancer Therapy" in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Альтернативно, антитело может быть конъюгировано со вторым антителом с образованием анти-тельного гетероконъюгата, как описано Segal в патенте США № 4676980.

Антитело с или без терапевтического фрагмента, конъюгированного с ним, можно использовать в качестве терапевтического средства, которое вводят самостоятельно или в сочетании с цитотоксическим фактором(ами) и/или цитокином(ами).

Полностью человеческое антитело представляет собой антитело, в котором белковые последовательности кодируются встречающимися в природе последовательностями иммуноглобулина человека, или антитело из выделенных продуцирующих антитела человеческих В-лимфоцитов или из трансгенных мышинных В-лимфоцитов, в которых мышинный иммуноглобулин, кодирующий хромосомные области, был заменен на ортологичные человеческие последовательности. Трансгенные антитела последнего типа включают, но не ограничиваются HuMab (Medarex, Inc, CA) and XenoMouse (Abgenix Inc., CA). Гуманизированное антитело представляет собой антитело, в котором константная область молекулы нечеловеческого антитела с соответствующей антигенной специфичностью замещается на константную область человеческого антитела, предпочтительно подтипа IgG, с соответствующими эффекторными функциями (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454). Соответствующие эффекторные функции включают ADCC, которая представляет собой естественный процесс, с помощью которого полностью человеческие антитела или гуманизированные антитела при связывании с мишенями на поверхности раковых клеток переключаются на уничтожение клеток лимфоцитами, которые являются частью нормальной иммунной системы.

Данные активные лимфоциты, называемые естественными киллерами (NK) клеток, используют цитотоксический процесс для разрушения живых клеток, с которыми данные антитела связываются. ADCC активность может быть обнаружена и количественно определена путем измерения высвобождения европия ( $\text{Eu}^{3+}$ ) из  $\text{Eu}^{3+}$  меченых живых клеток в присутствии антигенспецифического антитела и мононуклеарных клеток периферической крови, экстрагированных из иммунокомпетентного, живого человеческого субъекта. Процесс ADCC подробно описан в Janeway Jr. C.A. et al., *Immunobiology*, 5th ed., 2001, Garland

Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. et al., *Immunology, Infection, and Immunity*, 2004, p246-5; Albanell J. et al., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2003, 532:p2153-68 and Weng, W.-K. et al., *Journal of Clinical Oncology*, 2003, 21; p. 3940-3947. Suitable methods for the detection and quantification of ADCC can be found in Blomberg et al., *Journal of Immunological Methods*. 1986, 86; pp. 225-9; Blomberg et al., *Journal of Immunological Methods*. 1986, 21; 92; pp. 117-23 and Patel & Boyd, *Journal of Immunological Methods*. 1995, 184; pp. 29-38.

ADCC обычно включает активацию клеток NK и зависит от распознавания покрытых антителом клеток Fc рецептором на поверхности клетки NK. Рецепторы Fc распознают Fc (кристаллическую) часть антител, таких как IgG, связываются специфически с поверхностью клетки-мишени. Рецептор Fc, который вызывает активацию клетки NK, называется CD16 или Fc $\gamma$ RIIIa. После этого рецептор Fc $\gamma$ RIIIa связывается с Fc IgG, NK клетки высвобождают цитокины, такие как IFN- $\gamma$ , и цитотоксические гранулы, содержащие перфорин и гранзимы, которые проникают в клетку-мишень и способствуют гибели клеток, вызывая апоптоз.

Индукция антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) антителом может быть увеличена путем модификации, которая изменяет взаимодействие между константной областью (Fc) антитела и различными рецепторами, которые присутствуют на поверхности клеток иммунной системы. Такие модификации включают уменьшение или отсутствие  $\alpha$ -1,6-связанных фукозных фрагментов в комплексе олигосахаридных цепей, которые обычно добавляются к Fc антитела во время естественного или рекомбинантного синтеза в клетках млекопитающих. Не фукозилированные анти-DLL3 аффинные реагенты, такие как антитела или их фрагменты, продуцируются с целью повышения их способности индуцировать ADCC ответ.

Способы уменьшения или удаления  $\alpha$ -1,6-связанных фукозных фрагментов в олигосахаридных цепях Fc хорошо известны. Например, рекомбинантное антитело синтезируется в клеточной линии, которая не способна добавлять фукозу в  $\alpha$ -1,6-связывание с внутренним N-ацетилглюкозаминном из N-связанных биантенарных комплексного типа Fc олигосахаридов. Такие клеточные линии включают, но не ограничиваются крысиными гибридами YB2/0, которые обеспечивают сниженный уровень экспрессии гена  $\alpha$ -1,6-фукозилтрансферазы, FUT8. Предпочтительно антитело синтезируется в клеточной линии, которая является не способной к добавлению  $\alpha$ -1,6-связанных фукозильных фрагментов в сложные олигосахаридные цепи из-за делеции обеих копий гена FUT8. Такие клеточные линии включают, но не ограничиваются FUT8  $-/-$  CHO/DG44 клеточными линиями. Способы синтеза частично фукозилированных или не фукозилированных антител и аффинных реагентов описаны в Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.* 278:3466-34735 (2003); Yamane-Ohnuki et al., *Biotechnology and Bioengineering* 87: 614-22 (2004) и в WO 00/61739 A1, WO 02/31140 A1 и WO 03/085107 A1. Во втором примере фукозилирование рекомбинантного антитела уменьшается или подавляется при синтезе в клеточной линии, которая была генетически модифицированной, чтобы сверхэкспрессировать гликопротеин-модифицирующую гликозилтрансферазу на уровне, который максимизирует получение сложных N-связанных олигосахаридов, несущих разделенный пополам N-ацетилглюкозамин. Например, антитело, синтезируется в клеточной линии яичника китайского хомячка, экспрессирующей фермент N-ацетилглюкозаминтрансферазу III (GnT III). Клеточные линии, стабильно трансфицированные подходящими гликопротеин-модифицирующими гликозилтрансферазами, и способы синтеза антител с использованием данных клеток описаны в WO 99/54342.

Нефукозилированное антитело или аффинный реагент может быть использован в качестве терапевтического средства, которое вводят самостоятельно или в сочетании с цитотоксическим(ими) фактором(ами) и/или цитокином(ами).

Аминокислотные последовательности Fc антитела изменяют таким образом, что повышается ADCC активация без влияния на аффинность лиганда. Примеры таких модификаций описаны в Lazar et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103: p. 4005-4010; WO 03/074679 и WO 2007/039818. В данных примерах замещение аминокислот в Fc антитела, такое как аспартат на серин в положении 239 и изолейцин на глутамат в положении в 332, изменяет аффинность связывания антитела с Fc рецепторами, что приводит к увеличению активации ADCC.

Антитело с повышенной ADCC активацией за счет аминокислотных замен может быть использовано в качестве терапевтического средства, которое вводят самостоятельно или в сочетании с цитотоксическим(ими) фактором(ами) и/или цитокином(ами).

Биспецифические молекулы включают по меньшей мере одну первую специфичность связывания для первого эпитопа-мишени (т.е. DLL3), и вторую специфичность связывания для второго эпитопа-мишени. Второй эпитоп-мишень может присутствовать на одном и том же белке-мишени; или второй эпитоп-мишень может присутствовать в другом белке-мишени. Второй эпитоп-мишень может присутствовать на одной и той же клетке, что и первый эпитоп-мишень (т.е. DLL3); или второй эпитоп-мишень может присутствовать на мишени, которая не отображается клеткой, которая отображает первый эпитоп-мишень. Как используется в данном документе, термин "специфичность связывания" касается фрагмента, который включает по меньшей мере один вариативный домен антитела.

Биспецифическая молекула может представлять собой ViTE (биспецифический T-клеточный блокировщик). Биспецифический аффинный реагент (предпочтительно биспецифическое антитело) может содержать первый домен связывания для DLL3 и второй домен связывания для T-клеточного антигена, предпочтительно CD3.

Биспецифические антитела могут иметь в общей сложности два или три переменных домена антитела, где первая часть биспецифического антитела способна подавлять активность человеческой иммунной эффекторной клетки за счет специфического связывания с эффекторным антигеном, расположенным на человеческой иммунной эффекторной клетке, в которой эффекторный антиген является человеческим CD3 антигеном, где указанная первая часть состоит из одного переменного домена антитела, и вторая часть биспецифического антитела способна к специфическому связыванию с другим антигеном-мишенью, чем эффекторный антиген, например DLL3, где указанный антиген-мишень располагается на клетке-мишени другой, чем указанная человеческая иммунная эффекторная клетка, и указанная вторая часть включает один или два переменных домена антитела.

Биспецифическое антитело (предпочтительно ViTE) может связываться с DLL3 и CD3 для лечения рака легкого, предпочтительно мелкоклеточного рака легкого.

#### Диагностика рака.

Присутствие антител, способных к иммуноспецифическому связыванию с DLL3, или их эпитопсодержащих фрагментов, как правило, детектируется с помощью анализа биологического образца, полученного от указанного субъекта (биологический образец представляет собой образец ткани легкого, поджелудочной железы и кожи, образец крови или слюны). Способ, как правило, включает стадию получения указанного биологического образца для анализа от указанного субъекта. Антитела, которые могут быть обнаружены, включают IgA, IgM и IgG антитела.

Образцы для исследования, например, ткани легкого, поджелудочной железы или кожи, сыворотки, плазмы или мочи, полученные от субъекта, могут быть использованы для диагностики или мониторинга. Изменение содержания DLL3 в образце для исследования по отношению к контрольному образцу (от субъекта или субъектов, не имеющих заболеваний), или предварительно определенному диапазону референсных значений, указывает на наличие заболеваний. Относительно увеличенное содержание DLL3 в образце для исследования по сравнению с контрольным образцом или предварительно определенным диапазоном референсных значений указывает на подтип заболеваний (например, мелкоклеточный рак; плоскоклеточный рак легкого; эндокринные опухоли поджелудочной железы или плоскоклеточный рак кожи, меланому). Относительно увеличенное содержание DLL3 в образце для исследования по отношению к контрольному образцу или предварительно определенному диапазону референсных значений указывает на степень или тяжесть заболеваний (например, вероятность метастазирования). В каком-либо из указанных выше способов, обнаружение DLL3 необязательно может быть комбинированным с обнаружением одного или большего количества дополнительных биомаркеров для заболеваний. Любой приемлемый способ в данной области может быть применен для измерения уровня DLL3, включая, в частности, предпочтительные технологии, описанные в данном документе, анализы киназы, иммунологические анализы для детектирования и/или визуализации DLL3 (например, Вестерн-блоттинг, иммунопреципитация с последующим натрий додецилсульфатным-полиакриламидным гелевым электрофорезом, иммуноцитохимический анализ и т.д.). Изменение относительного содержания мРНК, кодирующей DLL3 в образце для исследования по отношению к контрольному образцу или предварительно определенному диапазону референсных значений, указывает на наличие заболеваний. Любой приемлемый гибридационный анализ может быть использован для обнаружения экспрессии DLL3 путем детектирования и/или визуализации мРНК, кодирующей DLL3 (например, Нозерн-анализы, дот-блоттинг, *in situ* гибридизация и т.п.).

Меченые антитела (или другие аффинные реагенты), их производные и аналоги, которые специфически связываются с DLL3, могут быть использованы для диагностических целей для обнаружения, диагностики или мониторинга заболеваний. Предпочтительно заболевания обнаруживают у животного, более предпочтительно у млекопитающего и наиболее предпочтительно у человека.

#### Анализ скрининга.

Возможна идентификация агентов, соединений-кандидатов или исследуемых соединений, которые связываются с DLL3-связанным полипептидом или DLL3 слитым белком или имеют стимулирующее или ингибиторное действие на экспрессию или активность DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитого белка. Примеры агентов, соединений-кандидатов или исследуемых соединений включают, но не ограничиваются нуклеиновыми кислотами (например, ДНК и РНК), углеводами белками, пептидами, пептидомиметиками, малыми молекулами и другими лекарственными средствами. Агенты могут быть получены, используя любой из многочисленных подходов с помощью комбинаторных библиотек, известных в данной области уровня техники, включая биологические библиотеки; пространственно адресуемую параллельную твердую фазу или фазу раствора библиотеки; синтетические библиотеки, требующие дековолюции; "один шарик, одно соединение" библиотеки; и синтетические библиотеки, выбранные аффинной хроматографией. Биологические библиотеки ограничиваются пептидными библиотеками, тогда как другие библиотеки, применимы к пептиду, непептидному олигомеру или малым молекулам

библиотек соединений (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145; патент США № 5738996 и патент США № 5807683, каждая из которых включена в данный документ в качестве ссылки).

Примеры способов синтеза молекулярных библиотек можно найти, например, в DeWitt et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erb et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et al., 1993, *Science* 261:1303; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; и Gallop et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:1233, каждая из которых включена в данный документ в качестве ссылки.

Библиотеки соединений могут быть представлены, например, в растворе (например, Houghten, 1992, *BioTechniques* 13:412-421), или на шариках (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), чипах (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), бактериях (патент США № 5223409), спорах (патенты №№ 5571698; 5403484 и 5223409), плазидах (Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) или фаре (Scott and Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; и Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310), каждая из которых включена в данный документ в качестве ссылки.

Агенты, которые взаимодействуют с (т.е. связываются с) DLL3, фрагментом DLL3 (например, функционально активным фрагментом), с DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитым белком, определяются на основе анализа. Клетки, экспрессирующие DLL3, фрагмент DLL3, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитый белок, контактируют с соединением-кандидатом или контрольным соединением, и определяется способность соединения-кандидата взаимодействовать с DLL3. При необходимости, данный анализ может быть использован для скрининга множества (например, библиотеки) соединений-кандидатов. Клетка, например, может быть прокариотического происхождения (например, *E.coli*) или эукариотического происхождения (например, дрожжевой или млекопитающих). Кроме того, клетки могут экспрессировать DLL3, фрагмент DLL3, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитый белок эндогенный или генетически модифицированный, для того чтобы экспрессировать DLL3, фрагмент DLL3, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитый белок. В некоторых случаях DLL3, фрагмент DLL3, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитый белок или соединение-кандидат метят, например, радиоактивной меткой (например,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  и  $^{125}\text{I}$ ) или флуоресцентной меткой (такой как флуоресцеина изотиоцианат, родамин, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталальдегид или флуорескамин), чтобы иметь возможность обнаружить взаимодействие между DLL3 и соединением-кандидатом. Способность соединения-кандидата взаимодействовать непосредственно или опосредованно с DLL3, фрагментом DLL3, DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитым белком может быть определена с помощью способов, известных квалифицированным специалистам в данной области. Например, взаимодействие между соединением-кандидатом и DLL3, DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитым белком может быть определено с помощью анализа проточной цитометрии, скинтилляционного анализа, иммунопреципитации или анализа Вестерн-блоттинга.

Агенты, которые взаимодействуют с (т.е. связываются с) DLL3, фрагментом DLL3 (например, функционально активным фрагментом), DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитым белком, можно определять в бесклеточной системе анализа. В соответствии с этим нативный или рекомбинантный DLL3 или его фрагмент, или нативный или рекомбинантный DLL3-связанный полипептид или его фрагмент, или DLL3-слитый белок или его фрагмент подвергают взаимодействию с соединением-кандидатом или контрольным соединением и определяют способность соединения-кандидата взаимодействовать с DLL3, или DLL3-связанным полипептидом, или DLL3 слитым белком. При необходимости, данный анализ может быть использован для скрининга множества (например, библиотеки) соединений-кандидатов. Предпочтительно DLL3, DLL3 фрагмент, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитый белок сначала иммобилизуют, например, путем контактирования DLL3, DLL3 фрагмента, DLL3-связанного полипептида, фрагмента DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитого белка с иммобилизованным антителом (или другим аффинным реагентом), который специфически распознает и связывает его, или путем контактирования очищенного препарата DLL3, DLL3 фрагмента, DLL3-связанного полипептида, фрагмента DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитого белка с поверхностью, сконструированной для того, чтобы связывать белки. DLL3, DLL3 фрагмент, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитый белок может быть частично или полностью очищенным (например, частично или полностью свободным от других полипептидов) или частью клеточного лизата. Кроме того, DLL3, DLL3 фрагмент, DLL3-связанный полипептид или фрагмент DLL3-связанного полипептида может представлять собой слитый белок, который включает DLL3 или его биологически активную часть или DLL3-связанный полипептид и домен, такой как домен глутатионин-S-трансферазы. Альтернативно, DLL3, DLL3 фрагмент, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитый белок может быть биотинилированным, используя способы, хорошо известные квалифицированным специалистам в данной области (например, с помощью набора биотинилирования, Pierce Chemicals;

Rockford, IL). Способность соединения-кандидата взаимодействовать с DLL3, DLL3 фрагментом, DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитым белком может быть определена, используя способы, известные квалифицированным специалистам в данной области.

Система на основе анализа клеток может использоваться для идентификации агентов, которые связываются с или модулируют активность белка, такого как фермент, или его биологически активная часть, которая отвечает за получение или деградацию DLL3 или отвечает за посттрансляционную модификацию DLL3. В первичном скрининге множество (например, библиотека) соединений приводят в контакт с клетками, которые естественно или рекомбинантно экспрессируют: (i) DLL3, изоформу DLL3, гомолог DLL3, DLL3-связанный полипептид, DLL3 слитый белок или биологически активный фрагмент; и (ii) белок, который отвечает за обработку DLL3, изоформы DLL3, гомолога DLL3, DLL3-связанного полипептида, DLL3 слитого белка или фрагмента для того, чтобы идентифицировать соединения, которые модулируют получение, разложение или посттрансляционную модификацию DLL3, изоформы DLL3, гомолога DLL3, DLL3 связанного полипептида, DLL3 слитого белка или фрагмента. При необходимости, соединения, идентифицированные в первичном скрининге, затем могут быть проанализированы во вторичном скрининге против T клеток, естественно или рекомбинантно экспрессирующих DLL3. Способность соединения-кандидата модулировать получение, разложение или посттрансляционную модификацию DLL3, изоформы, гомолога, DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитого белка может быть определена способами, известными квалифицированным специалистам в данной области, включающими без ограничения анализ проточной цитометрии, сцинтилляционный анализ, иммунопреципитацию или анализ Вестерн-блоттинга.

Агенты, которые конкурентно взаимодействуют с (т.е. связываются с) DLL3, DLL3 фрагментом, DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитым белком, определяются в анализе конкурентного связывания. Клетки, экспрессирующие DLL3, DLL3 фрагмент, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитый белок, подвергаются контактированию с соединением-кандидатом и известным соединением для обеспечения взаимодействия с DLL3, DLL3 фрагментом, DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитым белком; затем определяют способность соединения-кандидата предпочтительно взаимодействовать с DLL3, фрагментом DLL3, DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или слитым белком DLL3. Альтернативно, агенты, которые предпочтительно взаимодействуют с (т.е. связываются с) DLL3, DLL3 фрагментом, DLL3-связанным полипептидом или фрагментом DLL3-связанного полипептида, определяются в бесклеточной системе анализа за счет контактирования DLL3, DLL3 фрагмента, DLL3-связанного полипептида, фрагмента DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитого белка с соединением-кандидатом и известным соединением для обеспечения взаимодействия с DLL3, DLL3-связанным полипептидом или DLL3 слитым белком. Как указано выше, способность соединения-кандидата взаимодействовать с DLL3, DLL3 фрагментом, DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитым белком может быть определена с помощью способов известных квалифицированным специалистам в данной области. Данные анализы, будь-то на основе клетки или бесклеточные, могут быть использованы для скрининга множества (например, библиотеки) соединений-кандидатов.

Агенты, которые модулируют (т.е. повышают регуляцию или понижают регуляцию) экспрессию или активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида, определяют путем контактирования клеток (например, клетки прокариотического происхождения или эукариотического происхождения), экспрессирующих DLL3 или DLL3-связанный полипептид, с соединением-кандидатом или контрольным соединением (например, фосфатным буферным солевым раствором (PBS)) и определения экспрессии DLL3, DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитого белка, мРНК, кодирующей DLL3, или мРНК, кодирующей DLL3-связанный полипептид. Уровень экспрессии DLL3, DLL3-связанного полипептида, мРНК, кодирующей DLL3, или мРНК, кодирующей DLL3-связанный полипептид, в присутствии соединения-кандидата сравнивают с уровнем экспрессии DLL3, DLL3-связанного полипептида, мРНК, кодирующей DLL3, или мРНК, кодирующей DLL3-связанный полипептид, в отсутствие соединения-кандидата (например, в присутствии контрольного соединения). Соединение-кандидат затем могут идентифицировать как модулятор экспрессии DLL3 или DLL3-связанного полипептида на основе данного сравнения. Например, когда экспрессия DLL3 или мРНК является значительно большей в присутствии соединения-кандидата, чем в его отсутствие, соединение-кандидат идентифицируют как стимулятор экспрессии DLL3 или мРНК. Альтернативно, когда экспрессия DLL3 или мРНК в присутствии соединения-кандидата значительно меньше, чем в его отсутствие, то соединение-кандидат идентифицируют как ингибитор экспрессии DLL3 или мРНК. Уровень экспрессии DLL3 или мРНК, кодирующей его, можно определить с помощью указанных способов квалифицированными специалистами в данной области. Например, экспрессия мРНК может быть оценена с помощью анализа Нозерн-блоттинга или ОТ-ПЦР, и уровни белка могут быть оценены с помощью анализа Вестерн-блоттинга.

Агенты, которые модулируют активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида, определяются путем контактирования препарата, содержащего DLL3 или DLL3-связанный полипептид или клетки (например прокариотические или эукариотические клетки), экспрессирующие DLL3 или DLL3-связанный

полипептид, с исследуемым соединением или контрольным соединением и определения способности исследуемого соединения модулировать (например, стимулировать или ингибировать) активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида. Активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида может быть оценена путем определения индукции клеточного пути сигнальной трансдукции DLL3 или DLL3-связанного полипептида (например, внутриклеточный  $Ca^{2+}$ , диацилглицерин, IP3 и т.д.), детектирования каталитической или ферментной активности мишени на приемлемом субстрате, детектирования индукции рецепторного гена (например, регуляторного элемента, который реагирует с DLL3 или DLL3-связанным полипептидом и функционально связывается с нуклеиновой кислотой, кодирующей способный к детектированию маркер, например люциферазу), или детектирования клеточного ответа, например, клеточной дифференцировки или клеточной пролиферации. На основании представленного описания способы, известные квалифицированным специалистам в данной области, могут быть использованы для измерения данных активностей (см., например, патент США № 5401639, который включен в данный документ в качестве ссылки). Соединение-кандидат потом может быть идентифицировано в качестве модулятора активности DLL3 или DLL3-связанного полипептида путем сравнения эффектов соединения-кандидата с контрольным соединением. Подходящие контрольные соединения включают фосфатный буферный солевой раствор (PBS) и физиологический солевой раствор (NS).

Агенты, которые модулируют (т.е. повышают регуляцию или понижают регуляцию) экспрессию, активность или как экспрессию, так и активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида, определяются в модели на животных. Примеры приемлемых животных включают мышей, крыс, кроликов, обезьян, морских свинок, собак и кошек. В качестве модели заболеваний предпочтительно используют например ксенотрансплантаты клеточных линий мелкоклеточного рака легких, такие как NCI-H345; ксенотрансплантаты клеточных линий немелкоклеточного рака легких, такие как A549 и H460; ксенотрансплантаты клеточных линий рака поджелудочной железы, такие как MIA PaCa-2 у безтимусных мышей, Magincola et al., *J. Surg Res* 1989 Dec; 47(6):520-9; или ксенотрансплантаты клеточных линий рака кожи, такие как MV3 у безтимусных мышей, van Muijen et al., *Int. J. Cancer* 1991 Apr 22; 48(1):85-91. Они могут быть использованы для тестирования соединений, которые модулируют уровни DLL3, так как патология, продемонстрированная в данных моделях, является аналогичной. Исследуемое соединение или контрольное соединение вводят (например, перорально, ректально или парентерально, например внутривенно или внутривенно) приемлемому животному и определяют экспрессию, активность или как экспрессию, так и активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида. Изменения в экспрессии DLL3 или DLL3-связанного полипептида могут быть оценены с помощью способов, описанных выше.

DLL3 или DLL3-связанный полипептид используют как "приманку-белок" в двух гибридных анализах или трех гибридных анализах, чтобы идентифицировать другие белки, которые связываются с или взаимодействуют с DLL3 или DLL3-связанным полипептидом (см., например патент США № 5283317; Zervos et al. (1993) *Cell*. 72:223-232; Madura et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *BioTechniques* 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696 и публикацию PCT № WO 94/10300). Квалифицированным специалистам в данной области понятно, что такие связывающиеся белки также могут быть вовлечены в распространение сигналов по DLL3, например, против хода транскрипции или по ходу транскрипции элементов сигнального пути с участием DLL3.

#### Терапевтические применения DLL3.

Лечение или предупреждения различных заболеваний и расстройств предусматривает введение терапевтического соединения. Такие соединения включают, но не ограничиваются этим, DLL3, DLL3 аналоги, DLL3-связанные полипептиды и его производные и варианты (включая фрагменты); антитела (или другие аффинные реагенты); нуклеиновые кислоты, кодирующие DLL3, DLL3 аналоги, DLL3-связанные полипептиды и их фрагменты; антисмысловые нуклеиновые кислоты гена, кодирующего DLL3 или DLL3-связанный полипептид; и модулятор (например, агонисты и антагонисты) гена, кодирующего DLL3 или DLL3-связанный полипептид. Заболевания, например, могут лечить (например, для уменьшения симптомов или замедления начала или прогрессирования) или предупреждают путем введения терапевтического соединения, которое уменьшает функцию или экспрессию DLL3 в сыворотке или ткани субъектов, имеющих эти заболевания.

Антитела (или другие аффинные реагенты), где каждое из них специфически связывается с DLL3, вводят самостоятельно или в комбинации с одним или больше дополнительных терапевтических соединений или лечений.

Биологический продукт, такой как антитело (или другой аффинный реагент), является аллогенным к субъекту, которому его вводят. Человеческий DLL3 или человеческий DLL3-связанный полипептид, нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий DLL3 или человеческий DLL3-связанный полипептид, или антитело (или другой аффинный реагент) к человеческому DLL3 или человеческому DLL3-связанному полипептиду можно вводить человеку-субъекту для терапии (например, для уменьшения симптомов или замедления начала или прогрессирования) или профилактики.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагается, что терапевтическая активность антител (или других аффинных реагентов), которые специфически связываются с DLL3, может быть достигнута путем феномена антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) (см., например,

Janeway Jr. C.A. et al., Immunobiology, 5th ed., 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. et al., Immunology, Infection, and Immunity, 2004, p246-5; Albanell J. et al., Advances in Experimental Medicine and Biology, 2003, 532; p. 2153-68 and Weng, W-K. et al., Journal of Clinical Oncology, 2003, 21; p. 3940-3947).

Лечение и предупреждения заболеваний.

Заболевания например, лечат или предупреждают путем введения субъекту соединения, которое модулирует (т.е. повышает или понижает) уровень или активность (т.е. функцию) DLL3, который присутствует в сыворотке или ткани субъектов, имеющих одно или больше заболеваний, по сравнению с сывороткой или тканью субъектов, не имеющих заболевания. Заболевания лечат или предупреждают путем введения субъекту соединения, которое повышает регуляцию (т.е. понижает) уровень или активность (т.е. функцию) DLL3, который повышается в сыворотке или ткани субъектов, имеющих одно или больше заболеваний. Примеры таких соединений включают, но не ограничиваются этим, DLL3 антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, антитела (или другие аффинные реагенты), направленные против DLL3, и соединения, которые ингибируют ферментную активность DLL3. Другие подходящие соединения, например антагонисты DLL3 и малые молекулы антагонисты DLL3, могут быть идентифицированы, используя анализы *in vitro*.

Рак могут также лечить или предупреждать путем введения субъекту соединения, которое понижает уровень или активность (т.е. функцию) DLL3, которая повышается в сыворотке или ткани субъектов, имеющих такой рак. Примеры таких соединений включают, но не ограничиваются этим, DLL3, DLL3 фрагменты и DLL3-связанные полипептиды; нуклеиновые кислоты, кодирующие DLL3, DLL3 фрагмент и DLL3-связанный полипептид (например, для использования в генной терапии); и для тех DLL3 или DLL3-связанных полипептидов с ферментной активностью соединений или молекул, которые, как известно, модулируют ферментную активность. Другие соединения, которые могут быть использованы, например агонисты DLL3, могут быть идентифицированы, используя анализы *in vitro*.

Терапия или профилактика специально разрабатывается в соответствии с потребностями отдельного субъекта. Таким образом, соединения, которые влияют на уровень или функции DLL3, терапевтически или профилактически вводят субъекту, у которого подозревается или установлен рак, при котором уровни или активность DLL3 отсутствует или снижена по отношению к контрольному или нормальному диапазону референсных значений. Соединения, которые влияют на уровень или активность DLL3, терапевтически или профилактически вводят субъекту с подозрением или для которого известно, что у него рак, при котором уровни или активность DLL3 повышены по отношению к контрольному или нормальному диапазону референсных значений. Соединения, которые повышают уровень или активность DLL3, терапевтически или профилактически вводят субъекту с подозрением или о котором известно, что у него рак при котором уровни или активность DLL3 повышена по отношению к контрольному или диапазону референсных значений. Соединения, которые уменьшают уровень или активность DLL3, терапевтически или профилактически вводят субъекту с подозрением или о котором известно, что у него рак, у которого уровни или активность DLL3 снижена по отношению к контрольному или к диапазону референсных значений. Изменение DLL3 активности или уровня из-за введения таких соединений может быть легко обнаружена, например, путем получения образца (например, крови или мочи) и анализа *in vitro* уровней или активностей DLL3, или уровней мРНК, кодирующей DLL3, или их комбинации. Такие анализы могут быть выполнены перед и после введения соединения, как описано в данном документе.

Вакцинная терапия.

Иммуногенная композиция, соответствующая вакцинная композиция может содержать DLL3 или эпитоп, содержащий фрагмент или нуклеиновую кислоту, кодирующую DLL3 или его фрагмент необязательно вместе с иммуностимулятором.

Способ повышения иммунного ответа может включать введение субъекту таких композиций, а способ лечения или профилактики рака включать введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества таких композиций.

Таким образом, DLL3 может быть полезным в качестве антигенного материала и может быть использован в производстве вакцин для лечения или профилактики рака. Такой материал может быть "антигенным" и/или "иммуногенным". Как правило, под "антигенным" понимается, что белок способен использоваться для вырабатывания антител (или других аффинных реагентов) или даже способен индуцировать гуморальный иммунный ответ у субъекта или экспериментального животного. Под "иммуногенным" понимается, что белок способен вызывать иммунный ответ, такой как защитный иммунный ответ у субъекта или экспериментального животного. Таким образом, в последнем случае белок может быть способен не только генерировать антительный ответ, но, кроме того, не основанный на антителе иммунный ответ. Генерирование соответствующего иммунного ответа может потребовать присутствия одного или больше вспомогательных веществ и/или соответствующего антигена.

Квалифицированному специалисту в данной области понятно, что гомологам или производным DLL3 также будет найдено применение в качестве антигенного/иммуногенного материала. Возможна замена одной аминокислоты на другие подобного "типа", например, замена одной гидрофобной аминокислоты на другие. При этом может использоваться программа, такая как CLUSTAL программа, чтобы

сравнивать аминокислотные последовательности. Данная программа сравнивает аминокислотные последовательности и находит оптимальное выравнивание путем вставки пробелов в каком-либо порядке. Существует возможность рассчитать аминокислотную идентичность или подобность (идентичность плюс сохранение аминокислотного типа) для оптимального выравнивания. Такая программа, как BLASTx, способна согласовывать самые длинные фрагменты секвенирования подобных последовательностей, и присваивать значение подгонки. Таким образом, можно установить несколько областей подобия, каждая из которых имеет различные оценки.

В случае гомологов и производных, степень идентичности с белком менее важна, чем то, что гомолог или производное должно сохранить свою антигенность и/или иммуногенность. Соответственно, предусмотрены гомологи или производные, имеющие по меньшей мере 60% подобия (как описано выше) с белками или полипептидами, описанными в данном документе, например предусмотрены гомологи или производные, имеющие по меньшей мере 70% подобия, например по меньшей мере 80% подобия. В частности, предусмотрены гомологи или производные, имеющие по меньшей мере 90 или даже 95% подобия. Соответственно, гомологи или производные по крайней мере на 60% идентичны последовательности белков или полипептидов, описанных в данном документе. Предпочтительно гомологи или производные по меньшей мере на 70% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере на 80% идентичны. Наиболее предпочтительно гомологи или производные по меньшей мере на 90 или даже 95% идентичны.

Гомологи или производные могут быть слитыми белками, включая фрагменты, которые делают очистку легче, например, путем введения метки целевому белку или полипептиду. При этом после удаления метки, слитый белок сохраняет достаточную антигенность, что делает его полезным.

Существует возможность осуществлять скрининг антигенного белка или полипептида для того, чтобы идентифицировать эпитопные области, т.е. те области, которые ответственны за антигенность или иммуногенность белка или полипептида. Такие способы, хорошо известные квалифицированному специалисту, могут быть использованы для исследования фрагментов, и/или гомологов, и/или производных на антигенность. Таким образом, фрагменты должны включать одну или больше эпитопных областей или быть в значительной степени подобными таким областям, чтобы сохранить их антигенные/иммуногенные свойства. Таким образом, для фрагментов степень идентичности возможно не имеет значения, так как они могут быть на 100% идентичными определенной части белка или полипептида, гомолога или производного, как описано в данном документе. Ключевой проблемой является лишь то, чтобы фрагмент сохранял антигенные/иммуногенные свойства белка, из которого его получают.

Что важно для гомологов, производных и фрагментов, это то, чтобы они сохраняли, по крайней мере, некоторую степень антигенности/иммуногенности белка или полипептида, из которого они получены.

DLL3 или антигенные его фрагменты могут быть очищены или выделены в виде отдельного препарата. Они могут быть включены в смеси с одним или несколькими другими белками или их антигенными фрагментами. Вакцинная композиция может быть или профилактической, или терапевтической вакциной композицией.

Вакцинные композиции могут включать один или несколько вспомогательных веществ (иммуностимуляторов). Примеры хорошо известных в данной области вспомогательных веществ включают неорганические гели, такие как гидроксид алюминия, и эмульсии вода-в-масле, такие как неполный адъювант Фрейнда. Другие полезные вспомогательные вещества хорошо известны квалифицированному специалисту.

Подходящие вспомогательные вещества для использования в вакцинной композиции для лечения рака включают 3De-O- ацилированный монофосфориллипид А (известный как 3D-MPL или просто MPL, см. WO 92/116556), сапонин, например QS21 или QS7, и TLR4 агонисты, такие как CpG-содержащая молекула, например, как раскрыто в WO 95/26204. Используемые вспомогательные вещества могут представлять собой комбинацию компонентов, например MPL и QS21, или MPL, QS21 и CpG-содержащей фрагмент. Вспомогательные вещества могут быть включены в эмульсию масло-в-воде или липосомные препараты. Такие препараты могут включать другие носители.

Препарат из олигонуклеотидов, который включает 10 или больше следующих друг за другом нуклеотидов, комплементарных к нуклеотидной последовательности, кодирующей DLL3, или пептидные фрагменты DLL3, используют как вакцины для лечения рака. Такие препараты могут включать вспомогательные вещества или другие носители.

Ингибирование DLL3 для лечения заболеваний.

Рак можно лечить или предупреждать путем введения соединения, которое противодействует (ингибирует) уровень и/или активность DLL3, которые повышены в сыворотке или ткани субъекта, имеющего такой рак, по сравнению с сывороткой или тканью субъектов, у которых нет такого рака.

Соединения, применяемые для этой цели, включают, но не ограничиваются анти-DLL3 антителами (или другими аффинными реагентами, и фрагментами и производными, содержащими область связывания), DLL3 антисмысловые или рибозимные нуклеиновые кислоты и нуклеиновые кислоты, кодирующие бифункциональный DLL3, которые могут быть использованы для "нокаута" эндогенной функции DLL3

за счет гомологичной рекомбинации (см., например, Caracchi, 1989, Science 244:1288-1292). Другие соединения, которые ингибируют активность DLL3, могут быть идентифицированы путем использования известных анализов *in vitro*, например анализов, которые касаются способности исследуемого соединения ингибировать связывание DLL3 с другим белком или его партнером или ингибировать активность DLL3.

Такое ингибирование, например, может быть проанализировано *in vitro* или в клеточной культуре, но также могут быть использованы генетические анализы. Предпочтительные технологии также могут использоваться для обнаружения уровней DLL3 перед и после введения соединения. Приемлемые *in vitro* или *in vivo* анализы применяют, чтобы определить эффект конкретного соединения, а также установить, обеспечит ли его введение лечение пораженной ткани, как описано более детально ниже.

Соединение, которое ингибирует функцию DLL3 (активность), вводят терапевтически или профилактически субъекту, у которого определяется повышенный сывороточный или тканевой уровень или функциональная активность DLL3 (который, например, больше чем нормальный уровень или требуемый уровень) по сравнению с сывороткой или тканью у субъектов, которые не получают лечения. При этом необходимо довести его до уровня или активности, которые имеются у субъектов без такого рака, или до уровня заранее определенного диапазона значений. Для измерения увеличения уровня или функции DLL3 могут быть использованы способы стандартные в данной области. Подходящие ингибирующие композиции DLL3 могут, например, включать малые молекулы, т.е. молекулы 1000 Да или меньше. Такие малые молекулы могут быть идентифицированы с помощью способов скрининга, описанных в данном документе.

Анализы терапевтических или профилактических соединений.

Можно проводить скрининг соединений, которые модулируют активность DLL3, для этого осуществляют: (а) контактирование DLL3 или биологически активной его части с соединением-кандидатом; и (b) определение, модулируется ли активность DLL3 таким образом. Такой способ может включать (а) контактирование DLL3 или его биологически активной части с соединением-кандидатом в образце; и (b) сравнение активности DLL3 или его биологически активной части в указанном образце после контакта с указанным соединением-кандидатом с активностью DLL3 или его биологически активной части в указанном образце перед контактированием с указанным соединением-кандидатом или сравнением с референсным уровнем активности.

Способ скрининга может представлять собой способ скрининга соединений, которые ингибируют активность DLL3.

DLL3 или его биологически активная часть может, например, быть экспрессирована на или в клетке. DLL3 или его биологически активная часть может, например, быть выделена из клеток, которые экспрессируют его. DLL3 или его биологически активная часть может, например, быть иммобилизованной на твердой фазе.

Кроме того, возможно проведение скрининга соединений, которые модулируют экспрессию DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, которое включает: (а) контактирование клеток, экспрессирующих DLL3, или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, с соединением-кандидатом; и (b) определение модулируется ли экспрессия DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3. Такой способ может включать (а) контактирование клеток, экспрессирующих DLL3, или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, с соединением-кандидатом в образце; и (b) сравнение экспрессии DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, в указанном образце после контактирования с указанным соединением-кандидатом, с экспрессией DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, в указанном образце перед контактированием с указанным соединением-кандидатом или сравнением с референсным уровнем экспрессии.

Способ может представлять собой способ скрининга соединений, которые ингибируют экспрессию DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3.

Полученные в результате такого скрининга соединения можно применять для лечения или профилактики рака. Способ лечения или предупреждения рака включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества такого соединения.

Исследуемые соединения могут быть проанализированы на их способность восстанавливать уровни DLL3 у субъекта, болеющего раком, до уровней, найденных у субъектов без таких видов рака, или получить подобные изменения на экспериментальных моделях на животных с такими видами рака. Соединения, способные восстановить уровень DLL3 у субъекта, имеющего, например, болезни до найденных у субъектов без таких видов рака или до измеренных на экспериментальных моделях животных с такими раковыми заболеваниями, могут быть использованы в качестве соединений для получения нового лекарственного средства. Экспрессия DLL3 может быть проанализирована с помощью предпочтительных технологий, а именно иммунологическим анализом, гель-электрофорезом с последующей визуализацией, обнаружением активности DLL3, или каким-либо другим способом, предлагаемым в данном документе, или известным квалифицированному специалисту в данной области с уровня техники. Такие анализы могут быть использованы, чтобы выявить кандидата для лекарственного средства, клинического мониторинга, где относительное содержание DLL3 может служить маркером клинической картины заболевания.

Анализы могут быть выполнены на клетках, на клетках, вовлеченных в расстройство субъекта, чтобы определить, обладает ли соединение требуемым эффектом на такие клетки.

Соединения для терапии могут быть исследованы в приемлемых системах моделей на животных перед исследованием на людях, включая, но не ограничиваясь крысами, мышами, курами, коровами, обезьянами, кроликами и т.д. Для исследования *in vivo* перед тем как вводить человеку может быть использована любая модельная система на животных, известная в данной области уровня техники. Примеры моделей заболеваний на животных включают клеточные линии ксенотрансплантатов мелкоклеточного рака легких, такие как NCI-H345; клеточные линии ксенотрансплантатов немелкоклеточного рака легких, такие как A549 и H460; клеточные линии ксенотрансплантатов рака поджелудочной железы, такие как MIA PaCa-2 у безтимусных мышей, Marincola et al., J. Surg. Res. 1989 Dec; 47(6):520-9 или клеточные линии ксенотрансплантатов рака кожи, такие как MV3 у безтимусных мышей, van Muijen et al., Int. J. Cancer 1991 Apr 22; 48(1):85-91. Они могут быть использованы для тестирования соединений, которые модулируют уровни DLL3, так как патология, продемонстрированная на данных моделях, является аналогичной заболеваниям. Кроме того, квалифицированному специалисту очевидно, что трансгенные животные могут быть получены с "нокаут" мутациями в гене или генах, кодирующих DLL3. "Нокаут" мутация гена представляет собой мутацию, которая приводит к тому, что мутированный ген не экспрессируется или экспрессируется в aberrантной форме или на низком уровне так, что активность, связанная с генным продуктом почти или полностью, отсутствует. Предпочтительно трансгенное животное является млекопитающим; более предпочтительно трансгенное животное представляет собой мышь.

Тестируемые соединения могут быть проанализированы на их способность восстанавливать уровни DLL3 у субъекта, имеющего, например, заболевания по отношению к уровням, найденным у субъектов без рака. Причем изучить подобные изменения можно на экспериментальных моделях на животных с таким видом рака. Соединения, способные восстановить уровень DLL3 у субъекта, имеющего болезни, по отношению к уровням, определенным у субъектов без таких видов рака. Причем они могут произвести аналогичные изменения на экспериментальных моделях на животных с таким раковым заболеванием для дальнейшего создания новых лекарств. DLL3 могут быть проанализированы с помощью предпочтительных технологий, иммуноанализа, гель-электрофореза с последующим визуализацией, обнаружением DLL3 активности или любым другим способом, известным специалистам в данной области. Такие анализы могут быть использованы для скрининга лекарств-кандидатов, в клиническом мониторинге или при разработке лекарственных средств, где повышенное содержание DLL3 может служить в качестве маркера клинической картины заболевания.

Соединения, которые модулируют экспрессию DLL3, можно определять на животных (мышях, крысах, обезьянах, кроликах, морских свинках), предпочтительно в моделях заболеваний, экспрессирующих DLL3. Исследуемое соединение или контрольное соединение вводят животным и определяют эффект исследуемого соединения на экспрессию DLL3. Исследуемое соединение, которое меняет экспрессию DLL3, может быть идентифицировано путем сравнения уровня DLL3 (или мРНК, кодирующей DLL3) у животного или группы животных, которых лечат исследуемым соединением, с уровнем DLL3 или мРНК у животного или группы животных, которых лечат контрольным соединением. Способы, известные квалифицированным специалистам в данной области, могут быть использованы, чтобы определить уровни мРНК и белка, например, *in situ* гибридизацией *in situ*. Животные могут или не могут быть умерщвлены, чтобы проанализировать эффекты исследуемого соединения.

Соединения, которые модулируют активность DLL3 или его биологически активной части, определяются на животных (например, мышях, крысах, обезьянах, кроликах, морских свинках), предпочтительно на моделях заболеваний, экспрессирующих DLL3. Исследуемые соединения или контрольное соединение вводят животному и определяют эффект исследуемого соединения на активность DLL3. Исследуемое соединение, которое меняет активность DLL3, может быть идентифицировано путем анализа животных, которых лечат контрольным соединением, и животных, которых лечат исследуемым соединением. Активность DLL3 может быть оценена путем определения индукции клеточного вторичного мессенджера DLL3 (например, внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , диацилглицерина, IP3 и т.д.), обнаружения каталитической или ферментативной активности DLL3 или его партнеров, обнаружения индукции репортерного гена (например, регуляторного элемента, который реагирует на DLL3, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей детектируемый маркер, такой как люцифераза или зеленый флуоресцентный белок) или обнаружения клеточного ответа (например, клеточной дифференциации или пролиферации клеток). Способы, известные квалифицированным специалистам в данной области, могут быть использованы для обнаружения изменений в активности DLL3 (см., например, в патенте США 5401639, который включен в данный документ в качестве ссылки).

Исследуемые соединения, которые модулируют уровень или экспрессию DLL3, определяются на человеке, имеющем заболевание, предпочтительно он имеет, например, тяжелое заболевание. Исследуемое соединение или контрольное соединение вводят человеку-субъекту, и эффект исследуемого соединения на DLL3 экспрессию определяется путем анализа экспрессии DLL3 или кодирующей мРНК в том же самом биологическом образце (например, сыворотка, плазма или моча). Исследуемое соединение, которое меняет экспрессию DLL3, может быть идентифицировано путем сравнения уровня DLL3 или

кодирующей мРНК у субъекта или группы субъектов, которых лечат контрольным соединением. Кроме того, изменения в экспрессии DLL3 могут быть идентифицированы путем сравнения уровня DLL3 или кодирующей мРНК у субъекта или группы субъектов до и после введения исследуемого соединения. Чтобы получить биологические образцы и проанализировать экспрессию мРНК или белка, могут быть использованы способы, известные квалифицированным специалистам в данной области. Например, предпочтительные технологии, описанные в данном документе, могут быть использованы для оценки изменений в уровне DLL3.

Исследуемые соединения, которые модулируют активность DLL3 определяются у людей, имеющих заболевания (предпочтительно тяжелое заболевание). Исследуемое соединение или контрольное соединение вводят человеку-субъекту и определяют эффект исследуемого соединения на активность DLL3. Исследуемое соединение, которое меняет активности DLL3, может быть идентифицировано путем сравнения биологических образцов пациентов, получавших контрольное соединение, с образцами пациентов, получавших исследуемые соединения. Альтернативно, изменения в активности DLL3 могут быть идентифицированы путем сравнения активности DLL3 у субъекта или группы субъектов перед и после введения исследуемого соединения. Активность DLL3 может быть оценена путем обнаружения в биологическом образце (например, сыворотке, плазме или моче) индукции клеточного сигнального пути трансдукции DLL3 (например, внутриклеточный  $Ca^{2+}$ , диацилглицерин, IP3 и т.д.), каталитической или ферментной активности DLL3 или его партнера, или клеточного ответа, например клеточной дифференциации или клеточной пролиферации. Способы, известные квалифицированным специалистам в данной области, могут быть использованы, чтобы установить изменения в индукции вторичного мессенджера DLL3 или изменения в клеточном ответе. Например, РТ-ПЦР могут использовать, чтобы определить изменения в индукции клеточного вторичного мессенджера.

Исследуемое соединение, которое изменяет уровень или экспрессию DLL3 в направлении уровней, обнаруженных у контрольных субъектов (например, людей, не имеющих заболевания), выбирают для дальнейшего исследования или терапии. Исследуемое соединение, которое изменяет активность DLL3 до активности, найденной у контрольных субъектов (например, людей, не имеющих заболевания), выбирают для дальнейшего исследования или терапевтического использования.

Исследуемые соединения, которые снижают степень тяжести одного или нескольких симптомов, связанных с заболеваниями, определяются на человеке, который имеет заболевания, предпочтительно на субъектах с тяжелыми заболеваниями. Исследуемое соединение или контрольное соединение вводят субъектам и определяют эффект исследуемого соединения по меньшей мере на один из симптомов заболеваний. Исследуемое соединение, которое уменьшает по меньшей мере один из симптомов, может быть идентифицировано путем сравнения субъектов, которых лечат контрольным соединением, с субъектами, которых лечат исследуемым соединением. Способы, известные врачам, могут быть использованы, чтобы определить, уменьшает ли исследуемое соединение по меньшей мере один из симптомов. Например, исследуемое соединение, которое уменьшает нагрузку опухоли у субъекта, а значит будет полезным для него.

Исследуемое соединение, которое снижает степень тяжести по меньшей мере одного симптома, связанного с раком, выбирают для дальнейшего исследования или терапии.

Терапевтические и профилактические композиции и их использование.

Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения соединения, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать соединение, опосредованный эндоцитоз рецепторов (см., например, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты в составе ретровирусного или другого вектора и т.д. Способы введения могут быть энтеральными или парентеральными и включают, но не ограничиваются внутрикожным, внутримышечным, внутрибрюшинным, внутривенным, подкожным, интраназальным, эпидуральным и пероральным введением. Соединения могут быть введены каким-либо удобным способом, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые накладки (например, через слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и слизистую оболочку кишечника и т.д.) и могут быть введены вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть осуществлено введение фармацевтических композиций в центральную нервную систему каким-либо подходящим способом, в том числе путем внутрижелудочкового и интратекального введения. Внутрижелудочковая инъекция может быть облегчена путем внутрижелудочкового катетера, например, прикрепленного к резервуару, такому как резервуар Омтауа. Легочное введение можно также использовать, например, путем использования ингалятора или распылителя и препарата с аэрозольным агентом.

Нуклеиновая кислота может быть доставлена в дерму, например, с использованием частиц опосредованной эпидермальной доставки.

Возможно введение фармацевтической композиции локально в область, нуждающуюся в лечении; это может быть достигнуто, например, местной инфузией во время операции, местным нанесением, например путем инъекции, посредством катетера или посредством имплантата, где указанный имплантат выполнен из пористого, не пористого или желатинового материала, включая мембраны или волокна.

Введение может быть осуществлено путем непосредственной инъекции, например, в легкое, поджелудочную железу и ткани кожи или в место (или бывшее место) злокачественной опухоли или неопластической или пренеопластической ткани.

Соединение может быть доставлено в емкости, в частности в липосоме (см. Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; см. там же).

Соединение может быть доставлено в системе с контролируемым высвобождением. Может быть использован насос (см. Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). Могут быть использованы полимерные материалы (см. *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; see also Levy et al., 1985, *Science* 228:190; Doring et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). Система с регулируемым высвобождением может быть помещена вблизи терапевтической мишени, дозы (см., например, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением описаны в обзоре Langer (1990, *Science* 249:1527-1533).

Соединение согласно изобретению может представлять собой нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, нуклеиновая кислота может быть введена *in vivo*, чтобы способствовать экспрессии кодируемого ею белка, путем конструирования его, как части соответствующего вектора экспрессии, и введения его таким образом, что он становится внутриклеточным, например, с использованием ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), или путем прямой инъекции, или путем использования бомбардировки микрочастицами (например, с помощью генной пушки; Biolistic, Dupont), или покрытия липидами, или рецепторами клеточной поверхности или трансфекции агентов, или путем введения его в связи с гомеобоксом, который, как известно, проникает в ядро (см., например, Joliot et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868) и т.д. Альтернативно, нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и включена в ДНК клетки-хозяина за счет гомологичной рекомбинации для экспрессии.

Композиции содержат терапевтически эффективное количество соединения и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном варианте осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный Федеральным или государственным ведомством или перечисленный в Фармакопее США как правило, в общепризнанных фармакопеех для использования на животных и более конкретно на человеке. Термин "носитель" касается разбавителя, вспомогательного вещества, наполнителя или носителя, с которым вводят терапевтический агент. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масло, включая нефти, масло животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол. Композиция, при необходимости, могут также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или pH буферных агентов. Эти композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, композиций с замедленным высвобождением и т.п. Композиция может быть приготовлена в виде суппозитория с традиционными связывающими агентами и носителями, такими как триглицериды. Пероральные препараты могут включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.п. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" от EW Martin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения, например, в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя так, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения субъекту. Препарат должен соответствовать способу введения.

В случае применения одного или нескольких антител композицию получают в соответствии с рутинными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения человеку. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. Если необходимо, композиция может также включать солибилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо раздельно, либо в смеси вместе в единичной дозированной форме, например в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Когда композиция предназначена для введения путем инфузии, она может быть налита в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду фармацевтической чистоты или физиологический раствор. Когда композицию вводят путем инъекции, ампула стерильной воды для инъекций или физиологического раствора

перед введением содержит смесь ингредиентов.

Соединения могут быть приготовлены в виде нейтральной или солевой формы. Фармацевтически приемлемые соли, где это уместно, включают соли, образованные со свободными аминогруппами, которые получены из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные из свободных карбоксильных групп, которые получены из натрия, калия, аммония, кальция, железа гидроксида, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.п.

Количество соединения, которое будет эффективно для лечения рака, может быть определено стандартными клиническими методами. Кроме того, анализы *in vitro* могут быть использованы, чтобы помочь определить оптимальный диапазон доз. Точная доза, используемая в композиции, также будет зависеть от пути введения и серьезности заболевания или расстройства и должна устанавливаться в соответствии с решением врача и обстоятельствами каждого субъекта. Однако подходящие пределы доз для внутривенного введения, как правило, составляют приблизительно 20-500 мкг активного соединения на 1 кг массы тела. Подходящие диапазоны доз для интраназального введения, как правило, составляют приблизительно от 0,01 мкг/кг массы тела до 1 мг/кг массы тела. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-эффект, полученных *in vitro* и в тест-системах модели на животных.

Суппозитории обычно содержат активный ингредиент в диапазоне от 0,5 до 10 мас.%; пероральные композиции предпочтительно содержат от 10 до 95% активного ингредиента.

Набор может содержать антитела. Они могут быть лиофилизированными для восстановления перед введением или использованием. Если набор предназначен для лечения рака, антитело может быть восстановлено изотоническим водным раствором, который необязательно может быть включен в набор. Набор может включать полипептид, такой как иммуногенный полипептид, который может быть, например, лиофилизированным. Набор дополнительно может содержать вспомогательное вещество для реконструирования иммуногенного полипептида.

Лекарственное средство может по отдельности или вместе содержать:

(а) аффинные реагенты, которые связываются с DLL3, и

(б) противораковое средство или другой активный агент,

для одновременного, последовательного или раздельного введения при лечении рака.

Определение избыточного содержания DLL3 с помощью технологии создания/обработки изображений.

Преимуществом определения избыточного содержания DLL3 с помощью технологии создания/обработки изображений может быть то, что такой способ является неинвазивным (кроме того, что реагенты должны быть введены), и нет никакой необходимости извлекать образец у субъекта.

Приемлемая технология создания/обработки изображений включает изображение позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ). Визуализация DLL3 с использованием таких методов требует включения или связывания с подходящей меткой, например, радиотрейсером, таким как <sup>18</sup>F, <sup>11</sup>C или <sup>123</sup>I (см., например, NeuroRx - The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics (2005) 2(2), 348-360 and *idem* pages 361-371 для более подробной информации о методах). Радиоактивные или другие метки могут быть включены в DLL3 путем введения субъекту (например, путем инъекции) соответственно меченого специфически лиганда. В качестве альтернативы они могут быть включены в аффинный реагент связывания (например, антитела), специфический для DLL3, который можно вводить субъекту (например, путем инъекции). Для обсуждения использования аффибоды для работы с изображениями, например, см. Orlova A., Magnusson M., Eriksson T.L., Nilsson M., Larsson B., Hoiden-Guthenberg I., Widstrom C., Carlsson J., Tolmachev V., Stahl S., Nilsson F.Y., Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding Affibody molecule, *Cancer Res.* 2006 Apr 15;66(8):4339-48).

Диагностика и лечение рака с использованием иммуногистохимии.

Имуногистохимия является отличной методикой обнаружения и, следовательно, может быть пригодна для диагностики и лечения рака. Иммуногистохимия может быть использована для обнаружения, диагностики или мониторинга рака через обнаружение DLL3 антигенов в срезах тканей путем использования меченых антител (или других аффинных реагентов), их производных и аналогов, которые специфически связываются с DLL3. Это осуществляется благодаря использованию специфических реагентов для выявления взаимодействия антиген-антитело, которое визуализируется благодаря маркеру, такому как флуоресцентный краситель, фермент, радиоактивный элемент или коллоидное золото.

Продвижение технологии моноклональных антител имеет большое значение для современной точной микроскопической диагностики новообразований человека. Идентификация распространяемых неопластических трансформированных клеток с помощью иммуногистохимии позволяет получить более четкое представление о раке и метастазах, а также эволюции опухолевых клеток, связанных с иммунофенотипом. Будущие противоопухолевые терапевтические подходы могут включать различные индивидуальные иммунотерапии, специфичные для конкретного иммунофенотипа, связанного с опухолевыми заболеваниями каждого отдельного пациента. Для дальнейшего обсуждения см., например Bodey B., The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms, *Expert Opin Biol Ther.* 2002 Apr; 2(4):371-93.

Изобретение иллюстрируется следующими неограничивающими примерами.

Пример 1. Идентификация DLL3, экспрессируемого в немелкоклеточном раке легкого, мелкоклеточном раке легкого, раке поджелудочной железы и раке кожи, в ткани образцов с использованием жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC/MS).

С помощью следующего протокола мембранные белки, выделенные из образцов ткани немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы и рака кожи и соответствующих нормальным или нормальных соседних тканей (НАТ), были расщеплены, и полученные пептиды секвенировали тандемной масс-спектрометрией.

#### 1.1. Материалы и методы.

##### 1.1.1. Фракционирование плазматической мембраны.

Клетки, извлеченные из немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы или рака кожи или нормальной или обычной прилегающей ткани, гомогенизировали и подвергали центрифугированию при 1000×g. Супернатант отделяли и ультрацентрифугировали при 49500×g. Полученный осадок повторно гомогенизировали и разделяли центрифугированием со ступенчатым градиентом плотности сахарозы. После ультрацентрифугирования при 107000×g фракции на границе раздела фаз извлекали и осаждали.

##### 1.1.2. Растворение плазматической мембраны.

Плазматические мембранные фракции ресуспендировали в SDS (додецилсульфат натрия), чтобы получить конечную концентрацию SDS 0,5%, центрифугировали и экстрагировали растворенный белок.

##### 1.1.3. Трипсинолиз.

Для расщепления в растворе объем раствора, содержащего 50 мкг белка, доводили до 100 мкл с помощью 200 мМ бикарбоната аммония. 10 мкл восстановителя DL-дителиотреитола (75 мМ) были добавлены к образцу и инкубировали при 80°C в течение 15 мин. Затем последовала стадия защиты цистеина с использованием 10 мкл 150 мМ иодацетамида и инкубирование в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре. Концентрацию SDS затем понижали до 0,05% добавлением сверхчистой воды. Достаточный объем трипсина (Promega V5111) добавляли к смеси из расчета 1 мкг трипсина на 2,75 мкг белка и инкубировали в течение ночи при 37°C.

Альтернативно, 105 мкг белкового раствора были восстановлены с помощью 3 мкл 50 мМ ТСЕР и инкубирования при 60°C в течение 1 ч. Затем образец обрабатывали на FASP фильтрации устройств расщепления Protein Digestion Kit (Protein Discovery) в соответствии с инструкциями завода-изготовителя, но с использованием бикарбоната триэтиламмония вместо бикарбоната аммония. Трипсинолиз проводили в конечном объеме 75 мкл, используя 1 мкг трипсина на 50 мкг белка.

##### 1.1.4. Фракционирование пептидов.

Расщепленные образцы белка сушили под вакуумом, ресуспендировали в 0,1% водном растворе муравьиной кислоты и трифторуксусную кислоту (TFA) добавляли для снижения pH раствора до <3. Пептиды были разделены путем ионного обмена с использованием колонки Agilent Zorbax Bio-Strong Cation Exchange Series II на системе жидкостной хроматографии Agilent LC1200 Series. В качестве альтернативы фракционатор Agilent 3100 OFFGEL и OFFGEL Kit pH 3-10 были использованы для разделения на основе pI в соответствии с протоколом поставщика. После повторного увлажнения полос IPG равные объемы мембранного гидролизата были загружены в каждую лунку. После отделения полученные фракции подкисляли.

##### 1.1.5. Масс-спектрометрия.

Фракционированные образцы были проанализированы с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии с использованием Waters nanoACQUITY UPLC System, оснащенной колонкой nanoACQUITY UPLC BEH 130 C18, 75 мкм × 250 мм (186003545) и LTQ Orbitrap Velos (компании Thermo Fisher Scientific). Пептиды элюировали 300 нл/мин с градиентом повышения от 3 до 35% ацетонитрила в течение 120 мин. Масс-спектры полного сканирования были получены при разрешающей способности 60000 между 400-2000 м/з диапазона масс в Orbitrap. В каждом цикле двадцать наиболее интенсивных пептидов были отобраны для CID MS/MS сканирования в линейной ионной ловушке с нанораспылительным источником ионов, установленным на приборе.

##### 1.1.6. Анализ аминокислотной последовательности пептида.

Исходные данные, полученные от LTQ Orbitrap Velos, были обработаны с помощью программного обеспечения талисман (Matrix Science), который использует алгоритм Mowse (Curt Biol. 1993 Jun 1; 3(6):327-3), для выведения аминокислотных последовательностей из пиковых списков путем поиска в базе данных последовательности, состоящей из Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), IPI (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html>) и Swissprot (<http://www.uniprot.org>) на фоне загрязняющих белковых последовательностей. В критерии для идентификации пептидов входит трипсиновое расщепление вплоть до 2 ошибочных сайтов расщепления и различные биологические и химические модификации (окисленный метионин, модифицированный цистеином MMTS или иодацетамидом и фосфорилированный серин, треонин и тирозин). Пептиды, имеющие ранг 1 с ожидаемым значением 0,05% или менее, ионным индексом 28 или выше, загружали в базу данных OGAР, где они были обработаны в белковые группы.

1.1.7. Дискриминация белков, связанных с немелкоклеточным раком легкого, мелкоклеточным раком легкого, раком поджелудочной железы и раком кожи.

В процессе идентификации DLL3 использовали пептидные последовательности, полученные экспериментально путем масс-спектрометрии, как описано выше, из естественных белков человека, чтобы определить и упорядочить кодирующие экзоны в опубликованной последовательности генома человека. Эти экспериментально определенные последовательности, указанные в табл. 1, сравнивались с базой данных OGAР®, которая была составлена в результате обработки и интеграции пептидных масс, пептидных подписей, EST и Public Domain Genomic Sequence Data, как описано в международной патентной заявке WO 2009/087462.

Таблица 1

DLL3 специфические пептиды, идентифицированные ЖХ/МС в плазме мембран образцов тканей немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы и рака кожи

SEQ ID No	Идентифицированный Пептид
SEQ ID No:5	VCLKPGLSEEAESPALGAALSAR
SEQ ID No:6	AGAWELR
SEQ ID No:7	CEPPAVGTACTR
SEQ ID No:8	AGCSPEHGFCEQPGECR
SEQ ID No:9	SFECTCPR
SEQ ID No:10	NGGLCLDLGHALR
SEQ ID No:11	CSCALGFGGR

#### 1.1.8. Индекс белка.

Индекс белка является мерой как распространенности белка, так и относительного избытка пептида. Алгоритм учитывает как количество образцов, в которых наблюдался белок и количество наблюдаемых пептидов, против пептидов, способных наблюдаться в каждом образце. Полученное в результате значение затем ранжированы попарным сравнением соответствующих нормальных образцов против образцов рака.

#### 1.2. Результаты.

Эти эксперименты идентифицировали DLL3, как в дальнейшем описано в данном документе. Полноцепочечный DLL3 был обнаружен в мембране образцов тканей немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы и рака кожи. Табл. 2 показывает распределение экспрессии DLL3, измеряемой индексом белка. Выражение DLL3 в этих раковых тканях указывает, что DLL3 является ценным терапевтической и диагностической мишенью в этих видах рака.

Таблица 2

Белки DLL3 индекс (+++++ = очень высокий; ++++ = высокий; +++ = средний; ++ = низкий; + = очень низкий; - = не наблюдается)

Ткань	Раковая	Нормальная
Немелкоклеточная легкого	+	-
Поджелудочная железа	+	-
Кожа	+	-
Мелкоклеточная легкого	+	-

Пример 2. Специфика антител к DLL3. Определяется проточной цитометрией.

Специфичность поликлональных антител к DLL3 была протестирована с помощью проточной цитометрии и осуществлялась для DLL3-экспрессирующих клеточных линий.

Материалы и методы.

Анти-DLL3 антитела инкубировали с DLL3-экспрессирующими клетками SHP-77. Клетки промывали в FACS буфере (DPBS, 2% FBS), центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл разбавленного первичного SHP-77 антитела (также разбавленном в FACS буфере). Комплекс антитело-N322 инкубировали на льду в течение 60 мин, а затем дважды промывали FACS буфером, как описано выше. Пеллеты клеточных антител ресуспендировали в 100 мкл разбавленного вторичного антитела (также разбавленного в FACS буфере) и инкубировали в течение 60 мин на льду. Осадок промывали, как и прежде, и ресуспендировали в 200 мкл FACS буфера. Образцы были загружены в BD FACSCanto II цитометр и данные анализировали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva.

Результаты.

Результаты проточной цитометрии показали, что анти-SHP-77 поликлональные антитела эффективно связаны с клеточно-поверхностным человеческим DLL3. Результаты показывают сильное связывание этих антител против DLL3 на SHP-77 клетках.

Пример 3. Интернализация анти-DLL3 поликлональных антител SHP-77 и N82 клетками.

При помощи PabZAP анализ было показано, что анти-DLL3 поликлональные антитела интернализировались SHP-77 (человеческий мелкоклеточный рак легких) и N82 после связывания с клетками. Антитела PabZAP связывались с первичными антителами. Далее PabZAP комплекс интернализировался клетками. Введение сапорина в клетки приводило к ингибированию синтеза белка и последующей гибели клеток.

PabZAP анализ проводили следующим образом.

Каждую из клеток высевали при плотности  $5 \times 10^3$  клеток на лунку. Анти-DLL3 поликлональные антитела или контрольного изотипа IgG человека серийно разбавляли и затем добавляли к клеткам. После того PabZAP добавляли до концентрации 50 мкг/мл и планшеты подвергали инкубированию в течение 48 и 72 ч. Жизнеспособность клеток в планшетах определяли набором CellTiter-Glo® для люминесцентного анализа жизнеспособность клеток (Promega, G7571) и планшеты считывали при длине волны 490 нм с помощью Luminomitor (Tuner BioSystems, Sunnyvale, CA). Данные анализировали с помощью Prism (GraphPad). Гибель клеток была пропорциональна концентрации анти-DLL3 поликлональных антител.

Результаты показывают, что анти-DLL3 поликлональные антитела были эффективно интернализированы SHP77 (фиг. 1A) и N82 (фиг. 1B) по сравнению с контрольным античеловеческим IgG изотипом. Результаты также показывают, анти-DLL3 поликлональные антитела, индуцировали примерно 40% гибели клеток в 1 нмоль/л у SHP77 и 25% гибели клеток в 100 нмоль/л у N82.

Пример 4. Т-клеточная активация и специфический лизис клеток, экспрессирующих DLL3.

Справочная информация.

Для возможности оценки пригодности мишени для ViTE подхода (биспецифические фрагменты антитела, сочетающие анти-CD3 эпитоп связывания с сайтом связывания для специфического антигена на клетке-мишени или ткани) был разработан анализ для проверки Т-клеточной активации анти-CD3 и поликлональных антител, специфичных для антигена-мишени, представляющей интерес.

Методы.

Для этого анализа мишень DLL3 экспрессируется на DMS79 клетках. Клетки окрашивали SIGMA PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits для General Cell Membrane Labeling Catalog number PKH26GL путем разбавления 15 мкл красителя в 0,5 мл буфера С (поставляется в комплекте). DMS79 клетки подсчитывали, центрифугировали при  $800 \times g$ , ресуспендировали в бессывороточной среде при 10 млн клеток в 0,5 мл. 0,5 мл буфера С, содержащего краситель 15 мкл FKH26, добавляли к клеткам, осторожно перемешивали и инкубировали от 1 до 5 мин при комнатной температуре. Среду FBS добавляли, чтобы погасить краситель. Клетки центрифугировали, как описано выше, ресуспендировали в среде для анализа (RPMI плюс 10% сверхнизким IgGFBS - Invitrogen каталог #16250078), центрифугировали еще раз и ресуспендировали в среде для анализа при 200,000 клеток на 1 мл. 10000 клеток (50 мкл) добавляли на дно в каждую соответствующую лунку 96-луночного планшета для культуры ткани. Планшет предварительно покрывали на ночь козьими антимышиными каппа от Southern Biotech (каталожный #1050-01) при 3 мкл/мл в PBS. Избыток раствора антител удаляли из планшетов перед добавлением DMS69 клеток. Человеческие CD8+ Т-клетки (замороженные) были приобретены в AllCells, каталожный номер PB009-3F. Т-клетки размораживали и промывали в соответствии с указаниями изготовителя. Клетки ресуспендировали в 1500000 клеток на мл в среде для анализа. Т-клетки были добавлены к DMS79 клеткам в 96-луночные анти-каппа покрытые планшеты, по 150000 клеток на лунку. Каждое из антител DLL3 были добавлены в соответствующие лунки до 18 мкг/мл, 6 мкг/мл или 2 мкг/мл. Функциональный класс анти-CD3 клон ОКТ3 (eBioscience, каталожный номер 16-0037-85) был добавлен в соответствующие лунки до 9 мкг/мл, 3 мкг/мл или 1 мкг/мл. Контрольные лунки не получили антитела. Планшет инкубировали в течение двух дней в 5% CO<sub>2</sub>, увлажненном инкубаторе тканевых культур при 37°C.

Планшет центрифугировали при  $400 \times g$  в течение 5 мин, клетки промывали в FACS буфере (PBS + 5% FBS) и снова центрифугировали при  $400 \times g$  в течение 5 мин. Клетки снова ресуспендировали в FACS буфере и центрифугировали при  $400 \times g$ . Клетки ресуспендировали в 200 мкл на лунку FACS буфера. Лунки осторожно перемешивали и сразу анализировали на проточном цитометре Guava Easycyte. Клетки FKH26, окрашенные красным, анализировали на желтом канале. Такое же общее количество клеток было помещено в каждую лунку и клетки в желтом (FKH26 окрашенные клеточные ворота) были подсчитаны и процент цитотоксичности рассчитывали по сравнению с контрольными лунами Т-клетки плюс DMS79 клетки без антикролика, анти-CD3 или поликлональных DLL3 (среднее количество клеток было то же самое  $\pm$  планшет связанное анти-каппа антитело).

Результаты.

Фиг. 2 показывает специфический лизис клеток DMS69 анти-DLL3 поликлональными антителами и что гибель клеток была пропорциональна концентрации антител. Таким образом, анти-DLL3 поликлональные антитела способны индуцировать Т-клеточную цитотоксичность с помощью активации CD3.

Пример 5. Иммуногистохимическое использование антитела к DLL3.

Используя следующей Reference Protocol, иммуногистохимию проводили на FFPE опухоли легких и на нормальных тканях с использованием поликлональных антител к DLL3.

5.1. Материалы и методы.

5.1.1. Материалы.

Citoclear (HC5005) от TCS Biosciences, Великобритания. Реагент спирт (R8382) от Sigma-Aldrich, Великобритания. Target Retrieval Solution, pH 6 (S2369) от Dako, Великобритания. REAL Peroxidase Blocking Solution (S2023) от Dako, Великобритания. Разбавитель антител (S0809) от Dako, Великобритания. EnVision+ HRP-конъюгированный полимер, мышь (K4000) от Dako, Великобритания.

Жидкость DAB + подложка (K3468) от Dako, Великобритания. Майера гематоксилин (X0909) от Dako, Великобритания.

Aquatex (1.08562.0050) от VWR, Великобритания.

Тканевые участки и массивы были из США Biotech Inc., Мэриленд, США.

5.1.2. Депарафинирование и регидратация.

Срезы были депарафинизированы в Citroclear (2×5 мин), а затем регидратированы обработкой 100% спиртом (2×5 мин), 50%-м спиртом (1×5 мин) и водопроводной водой (1×5 мин).

5.1.3. Восстановление антигена (обработка под давлением).

DLL3 антиген был восстановлен под давлением в течение 20 мин в 50 мл Target Retrieval Solution в сосуде Коплина. Затем срезы оставляли охлаждаться до комнатной температуры в течение еще 20 мин. Круги были нарисованы вокруг каждой секции ткани/ТМА с гидрофобным барьером пера и стекла затем промывают дважды в PBS, 3 мин на каждое промывание.

5.1.4. Окрашивание тканей.

Активность эндогенной пероксидазы блокировали путем инкубирования ткани с Peroxidase Blocking Solution в течение 10 мин при комнатной температуре во влажной камере. Затем срезы промывали один раз PBS и один раз в PBS-T (PBS, содержащий твин-20, 0,125% об./об.), 3 мин на каждое промывание. Первичные антитела (разбавленный 1/160 в разбавителе антител) наносили на каждую секцию ткани и/или микропанель и срезы инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре во влажной камере. Затем срезы промывали один раз PBS и один раз в PBS-T, 3 мин каждой промывки. EnVision + HRP-конъюгированные полимер затем применяется к тканям и предметные стекла инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере. Затем срезы промывали один раз в PBS и один раз в PBS-T, 3 мин каждой промывки. Ткани инкубировали в жидком DAB + субстрата при комнатной температуре в течение 10 мин во влажной камере. Затем срезы промывали один раз в PBS и один раз в PBS-T, гематоксилином в течение 1 мин при комнатной температуре во влажной камере, и снова промывают, один раз в PBS и один раз в PBS-T, 3 мин каждой промывки. Покровные стекла затем собираются со срезами с использованием Aquatex.

5.2. Результаты.

Анти-DLL3 поликлональные антитела показали положительный эффект в FFPE образцах легкого, где 60% из секций показали надежное (2+/3+) окрашивание.

Поэтому антитела, нацеленные наDLL3, могут применяться в качестве терапевтических и диагностических средств в некоторых из тестируемых видов рака и, возможно, других видов рака, показывающих экспрессию DLL3.

#### Последовательности

SEQ ID №	Описание	Последовательность
1	Дельта-подобного белка 3 (DLL3)	MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGGA PRSPCSARLPIPLFFRVCLKPGLSEEAESPCALGAALSARGPV YTEQPGAPADLPLPDGLLQVPRDAWPGTFSFIETWREELGD QIGGPAWLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYR ARCEPPAVGTACTRLCRPRSAAPSRGCGPLRCPAPLEDECEAPLV CRAGCSPENGFCEQPGECRCLEGTGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGP SSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGL RCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPGFGSNC EKRVDRCSLQPIPCNNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDL DCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALFGGRDCRERADPCAA RPCAHGGRCYAHFSLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALP AAPGLRPGDPQRYLLPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGH SQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNLRQTQEGSGDGPSSVDW NRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREVATPLFPPLHTGRAGQRQHLLF PYPSSILSVK
2	Изоформа 2 дельта-подобного белка 3 (NP_982353)	MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGGA PRSPCSARLPIPLFFRVCLKPGLSEEAESPCALGAALSARGPV YTEQPGAPADLPLPDGLLQVPRDAWPGTFSFIETWREELGD QIGGPAWLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYR ARCEPPAVGTACTRLCRPRSAAPSRGCGPLRCPAPLEDECEAPLV CRAGCSPENGFCEQPGECRCLEGTGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGP SSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGL RCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPGFGSNC EKRVDRCSLQPIPCNNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDL DCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALFGGRDCRERADPCAA RPCAHGGRCYAHFSLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALP AAPGLRPGDPQRYLLPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGH SQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNLRQTQEGSGDGPSSVDW NRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREA

3	Дельта-подобный белок 3 (NM_016941)	<p>agataaagcgttggaaagccagcagctgcgacccagacccccaccagaagccatggtc          tcccacaggatgccggctcctcccaagactgtgactcagcgtcattttctcccagacac          ggcccgcgtggctctcagctgcaatccactttccggccgggtccagccctggggcccc          gctgccccctgcagcgcggctcccctgcccctcttctcagaactgctgactgagccctg          tctcagaaggagcccgagtcctccctgcccctggcggcgcctgagtgccgcggaccg          gtctacaccagagaccccggagcccccgcctgacttcccactgcccagcccttgcagg          tccccctgggagcctggcctggcactctcttctcactcgaacctggagagagagtag          gagaccagattggaggcccgcctgagcctgctggcggcgtgctgagcggcggcctgg          cagcccaggcccgtggcccgggacatcagcgcgcagggcgcctgggagctgccttctg          accgcgcgcgtgcgagccctgctgcccgggacccgctgcccagcgcctctgcccgcgca          gcgccccctcgggtggctccggactgcccctggcccctggcccctgaggaacgctggaag          ccccgtggtgctccgagcagcctgcaagcctgagcctgctctgtaacaagcccgtgaatg          ccgatgcttagagcctggactggaccctctgacagccctctctccaccaagcctgctca          gccccaggcccctctctgctaccaccggatgcttctcccggcctggcccctgagcgg          gaaccctgtgccaatggagcagctgtagtgagacaccccagctcttgaatgacccctgccc          ggggttctacggcctggctgtagtgagcggggtagactgtagatggacctgctcaac          ggcggctgtgtgctgggggtgagacctgacttgcctacatctgcccactgcccaccgggtt          caagctccaactgtgagaaggaggtgaccggctgagcctgagccatgcccgaatggcgga          ctctgctggactggccacgcccctgctgcccctgcccggccttccgggtctctgctgct          gcgagcagcactggagcactgcccggcccgcctgctgctaacggcggcagctgtgtggag          ggcggcggcgcgaccgctgctctgcccggctggccttccggcggcggcagctgcccggc          cgcggaccctgcccgcgcgcccctgctcagcggcggcggcctgctagcccacttcccggc          ctgctgctgctgctcccggctacatggagcggcgtgtgagttccagctgacccccagc          cgcgaagccttgcccggcccggcccggcctcagcccggggaccctcagcctgactcttgg          cctccgctctgggactgctgctggcccggggctggcccggcctgctgctgctgctccact          gcgcccgtgctgcccactccagatgctggctctgctgctgctgggaccccggagccgta          gtccaccactcccggatgactcaaacactaaggagcagggaggttccggggatgctccga          gctcgtctgtagatggaaatcccctgaagatgtagaccctcaaggagattatgctacatctg          tccatctacgctggagtagcagcccctttccccccgctacacactggcgcgctgggca          gagcagcactgcttttccctacccttctcgtactgctgctgaaatgaatgggtagtagctct          ggaaggttttaagccatttcaagcttaacttctctctcttctgctcctctctctgcttggagct          acctccatctctcttgaanaactatggcttggaggaagcagcagcagcagcagcagcagc          tttccactgattgctacagcggggagcagggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc          actcatttttctagccctgacgctctctccatccgacactggagctagagcctggttttga          tttgctcgggtggcccagctctgcccagagccttggagttcaacttgaagggtgctgggg          gaacttactgttccaagttaaataatggtttatatactcttttctaccacctctctctagaa          cacctataaaggctattattgtagcatttgaactaacaataa</p>
4	Изоформа 2 дельта-подобного белка 3 (NM_203486)	<p>agataaagcgttggaaagccagcagctgcgacccagacccccaccagaagccatggtc          tcccacaggatgccggctcctcccaagactgtgactcagcgtcattttctcccagacac          ggcccgcgtggctctcagctgcaatccactttccggccgggtccagccctggggcccc          gctgccccctgcagcgcggctcccctgcccctcttctcagaactgctgactgagccctg          tctcagaaggagcccgccagtcctccctgcccctggcggcgcctgagtgccgcggaccg          gtctacaccagagaccccggagcgcggcggcctgacttcccactgcccagcccttgcagg          tccccctgggagcctggcctggcactctcttctcactcgaacctggagagagagtag          gagaccagattggaggcccgcctggagcctgctggcggcgtgctgagcggcggcctgg          cagccggaggcccgtggcccgggacattcagcgcagcggcctgggagctgctgctctg          accgcgcgcgtgcgagccctgcccgtcgggaccgctgacagcgcctctgcccgcgca          gcgccccctcgggtggctccgggactgcccctgcccagcctcaggagcaatgtgag          ccccgtggtgctggcagcagcctgcaagccctgagccttctgtaacaagcccgtgaatg          ccgatgcttagagcctggactggaccctctgacggctcctgctcaccagcagcagcagc          gccccaggcccctctctgctaccaccggatgcttcccctgggctggcccctgagcgg          gaaccctgtgccaatggagcagcctgtagtagacaccagctcttgaatgacactgcccgc          gttggttctacggcctggctgtagtgagcgggggtgacatgtgcaatgaccctgcttcaac          ggccgctgtgtgctgggggtgcaagacctgacttcccactgcccactgcccaccgggtt          caaggctcacaactgtgagaagaggtgaccggtgacagcctgagcctgcccgaatggcga          ctctgctgaccctggcccagcctgctgctgcccctgcccggcctggcctgctcctgct          gcgagcagcagctgagcagctgcccggcggcggcctgctaacggcggcagctgtgtgag          ggccggcggcggcagcctgctgctgcccctgctgcccggcggcggcagctgcccggag          cgggaccctgcccggcggcccctgctcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc          ctgctgctgctgctcccggctacatgggagcggcgtgtagttccagtgaccocgaggg          cgcgaagccttgcccggcccggcccggcctcagcccggggaccctcagcctacccttgg          cctccggctctgggactgctgctgcccggggcgtggcccggcctgctgctgctgctgctg          gcccggcctggccactcccagatgctggctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct          ctccagcactcccggatgactcaaacactaaggagcagaggggttccggggatgctcga          gctcgtctagattggaatcccctgaagatgtagacctcaagggtttatgctacatctgctct          tccatctacgctggaggcctgacgctgctctccatccgacctggagtagcagctggtttt          gatttctcgggtggcccagctctgcccagagccttggagttcaacttgaagggtgctg          ggggaacttactgttccaagttaaataatggtttatatactcttttctaccacctctctag          aaacacctataaaggctattattgtagcatttgaactaacaataa</p>
5	DLL3 Пептид 1	VCLKPGLSEEA AESPCALGALSAR
6	DLL3 Пептид 2	AGAWELR
7	DLL3 Пептид 3	CEPPAVGTACTR
8	DLL3 Пептид 4	AGCSPEHGFCEQPGECR
9	DLL3 Пептид 5	SFECTCPR
10	DLL3 Пептид 6	NGGLCLDLGHALR
11	DLL3 Пептид 7	CSCALGFGGR
12	DLL3 ECD (аминокислоты 27-492 SEQ ID NO: 1)	<p>AGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLS          EEAAESPCALGALSAR          GPVYTEQPGAPADLPLPDGLLQVPRDAPWGTFSEFIETWRE          ELGDQIGGPAWSLLARV          AGRRLAAGGPWARDIQRAGA WELRFSYRARCPEPPAVGTAC          TRLCRFRSAPSRGPGPLRP          CAPLEDECEAPLVCRA GCSPEHGFCEQPGECRCLGWTGPLC          TVPVSTSSCLSPRPSSA          TTGCLVPGPGCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGIFYGLR          CEVSGVTCADGPCFNGL          CVGGADPDSAYICHPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLC          LDLGHALRCRAGFAFP          RCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSALGFGGRDC          RERADPCARPCAHGGRCYA          HFSGLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDP          QRYL</p>

## Перечень последовательностей

<110> ВЕРИГЕР ИНТЕЛХАЙМ ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ

<120> СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ CD3\*DLL3

<130> 0B00134

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 618

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Ala Leu Ile Phe Leu Pro Gln Thr Arg Pro Ala Gly Val Phe Glu Leu  
20 25 30

Gln Ile His Ser Phe Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro Arg Ser  
35 40 45

Pro Cys Ser Ala Arg Leu Pro Cys Arg Leu Phe Phe Arg Val Cys Leu  
50 55 60

Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu Ser Pro Cys Ala Leu Gly  
65 70 75 80

Ala Ala Leu Ser Ala Arg Gly Pro Val Tyr Thr Glu Gln Pro Gly Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Asp Leu Pro Leu Pro Asp Gly Leu Leu Gln Val Pro Phe  
100 105 110

Arg Asp Ala Trp Pro Gly Thr Phe Ser Phe Ile Ile Glu Thr Trp Arg  
115 120 125

Glu Glu Leu Gly Asp Gln Ile Gly Gly Pro Ala Trp Ser Leu Leu Ala  
130 135 140

Arg Val Ala Gly Arg Arg Arg Leu Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Arg  
145 150 155 160

Asp Ile Gln Arg Ala Gly Ala Trp Glu Leu Arg Phe Ser Tyr Arg Ala  
165 170 175

Arg Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala Cys Thr Arg Leu Cys Arg  
180 185 190

Pro Arg Ser Ala Pro Ser Arg Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Cys Ala  
195 200 205

Pro Leu Glu Asp Glu Cys Glu Ala Pro Leu Val Cys Arg Ala Gly Cys  
210 215 220

Ser Pro Glu His Gly Phe Cys Glu Gln Pro Gly Glu Cys Arg Cys Leu  
225 230 235 240

Glu Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Thr Val Pro Val Ser Thr Ser Ser  
245 250 255

Cys Leu Ser Pro Arg Gly Pro Ser Ser Ala Thr Thr Gly Cys Leu Val  
260 265 270

Pro Gly Pro Gly Pro Cys Asp Gly Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Ser  
275 280 285

Cys Ser Glu Thr Pro Arg Ser Phe Glu Cys Thr Cys Pro Arg Gly Phe  
290 295 300

Tyr Gly Leu Arg Cys Glu Val Ser Gly Val Thr Cys Ala Asp Gly Pro  
305 310 315 320

Cys Phe Asn Gly Gly Leu Cys Val Gly Gly Ala Asp Pro Asp Ser Ala  
325 330 335

Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Gln Gly Ser Asn Cys Glu Lys  
340 345 350

Arg Val Asp Arg Cys Ser Leu Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Leu Cys  
355 360 365

Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg Cys Arg Cys Arg Ala Gly Phe Ala  
370 375 380

Gly Pro Arg Cys Glu His Asp Leu Asp Asp Cys Ala Gly Arg Ala Cys  
385 390 395 400

Ala Asn Gly Gly Thr Cys Val Glu Gly Gly Gly Ala His Arg Cys Ser

034182

405 410 415

Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg Asp Cys Arg Glu Arg Ala Asp Pro  
420 425 430

Cys Ala Ala Arg Pro Cys Ala His Gly Gly Arg Cys Tyr Ala His Phe  
435 440 445

Ser Gly Leu Val Cys Ala Cys Ala Pro Gly Tyr Met Gly Ala Arg Cys  
450 455 460

Glu Phe Pro Val His Pro Asp Gly Ala Ser Ala Leu Pro Ala Ala Pro  
465 470 475 480

Pro Gly Leu Arg Pro Gly Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Leu Pro Pro Ala  
485 490 495

Leu Gly Leu Leu Val Ala Ala Gly Val Ala Gly Ala Ala Leu Leu Leu  
500 505 510

Val His Val Arg Arg Arg Gly His Ser Gln Asp Ala Gly Ser Arg Leu  
515 520 525

Leu Ala Gly Thr Pro Glu Pro Ser Val His Ala Leu Pro Asp Ala Leu  
530 535 540

Asn Asn Leu Arg Thr Gln Glu Gly Ser Gly Asp Gly Pro Ser Ser Ser  
545 550 555 560

Val Asp Trp Asn Arg Pro Glu Asp Val Asp Pro Gln Gly Ile Tyr Val  
565 570 575

Ile Ser Ala Pro Ser Ile Tyr Ala Arg Glu Val Ala Thr Pro Leu Phe  
580 585 590

Pro Pro Leu His Thr Gly Arg Ala Gly Gln Arg Gln His Leu Leu Phe  
595 600 605

Pro Tyr Pro Ser Ser Ile Leu Ser Val Lys  
610 615

<210> 2  
<211> 587  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Ala Leu Ile Phe Leu Pro Gln Thr Arg Pro Ala Gly Val Phe Glu Leu  
20 25 30

Gln Ile His Ser Phe Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro Arg Ser  
35 40 45

Pro Cys Ser Ala Arg Leu Pro Cys Arg Leu Phe Arg Val Cys Leu  
50 55 60

Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu Ser Pro Cys Ala Leu Gly  
65 70 75 80

Ala Ala Leu Ser Ala Arg Gly Pro Val Tyr Thr Glu Gln Pro Gly Ala  
85 90 95

Pro Ala Pro Asp Leu Pro Leu Pro Asp Gly Leu Leu Gln Val Pro Phe  
100 105 110

Arg Asp Ala Trp Pro Gly Thr Phe Ser Phe Ile Ile Glu Thr Trp Arg  
115 120 125

Glu Glu Leu Gly Asp Gln Ile Gly Gly Pro Ala Trp Ser Leu Leu Ala  
130 135 140

Arg Val Ala Gly Arg Arg Leu Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Arg  
145 150 155 160

Asp Ile Gln Arg Ala Gly Ala Trp Glu Leu Arg Phe Ser Tyr Arg Ala  
165 170 175

Arg Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala Cys Thr Arg Leu Cys Arg  
180 185 190

Pro Arg Ser Ala Pro Ser Arg Cys Gly Pro Gly Leu Arg Pro Cys Ala  
195 200 205

Pro Leu Glu Asp Glu Cys Glu Ala Pro Leu Val Cys Arg Ala Gly Cys  
210 215 220

Ser Pro Glu His Gly Phe Cys Glu Gln Pro Gly Glu Cys Arg Cys Leu  
225 230 235 240

Glu Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Thr Val Pro Val Ser Thr Ser Ser  
 245 250 255  
 Cys Leu Ser Pro Arg Gly Pro Ser Ser Ala Thr Thr Gly Cys Leu Val  
 260 265 270  
 Pro Gly Pro Gly Pro Cys Asp Gly Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Ser  
 275 280 285  
 Cys Ser Glu Thr Pro Arg Ser Phe Glu Cys Thr Cys Pro Arg Gly Phe  
 290 295 300  
 Tyr Gly Leu Arg Cys Glu Val Ser Gly Val Thr Cys Ala Asp Gly Pro  
 305 310 315 320  
 Cys Phe Asn Gly Gly Leu Cys Val Gly Gly Ala Asp Pro Asp Ser Ala  
 325 330 335  
 Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Gln Gly Ser Asn Cys Glu Lys  
 340 345 350  
 Arg Val Asp Arg Cys Ser Leu Gln Pro Cys Arg Asn Gly Gly Leu Cys  
 355 360 365  
 Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg Cys Arg Cys Arg Ala Gly Phe Ala  
 370 375 380  
 Gly Pro Arg Cys Glu His Asp Leu Asp Asp Cys Ala Gly Arg Ala Cys  
 385 390 395 400  
 Ala Asn Gly Gly Thr Cys Val Glu Gly Gly Gly Ala His Arg Cys Ser  
 405 410 415  
 Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg Asp Cys Arg Glu Arg Ala Asp Pro  
 420 425 430  
 Cys Ala Ala Arg Pro Cys Ala His Gly Gly Arg Cys Tyr Ala His Phe  
 435 440 445  
 Ser Gly Leu Val Cys Ala Cys Ala Pro Gly Tyr Met Gly Ala Arg Cys  
 450 455 460  
 Glu Phe Pro Val His Pro Asp Gly Ala Ser Ala Leu Pro Ala Ala Pro  
 465 470 475 480  
 Pro Gly Leu Arg Pro Gly Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Leu Pro Pro Ala  
 485 490 495  
 Leu Gly Leu Leu Val Ala Ala Gly Val Ala Gly Ala Ala Leu Leu Leu  
 500 505 510  
 Val His Val Arg Arg Arg Gly His Ser Gln Asp Ala Gly Ser Arg Leu  
 515 520 525  
 Leu Ala Gly Thr Pro Glu Pro Ser Val His Ala Leu Pro Asp Ala Leu  
 530 535 540  
 Asn Asn Leu Arg Thr Gln Glu Gly Ser Gly Asp Gly Pro Ser Ser Ser  
 545 550 555 560  
 Val Asp Trp Asn Arg Pro Glu Asp Val Asp Pro Gln Gly Ile Tyr Val  
 565 570 575  
 Ile Ser Ala Pro Ser Ile Tyr Ala Arg Glu Ala  
 580 585  
 <210> 3  
 <211> 2389  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3  
 agatataagg cttggaagcc agcagctgog actccogaga cccccccacc agaagggcat 60  
 ggtccccca oggatgtccg ggtctctctc ccagactgtg atcctagcgc tcattttcct 120  
 cccccagaca cggcccgctg gcyttctoga gctgcagatc cactcttttg ggcgggtcc 180  
 aggccttggg gccccgggt cccctgcag cgcgggctc ccttgcggcc tcttcttcag 240  
 agtctgctg aagcctggc tctcagagga ggcggccgag tccccgtgcy ccttgggggc 300  
 ggcgctgagt ggcggggac cgtctctcac cagcagccc ggagcggccg cgcctgatct 360  
 cccactgcc gaaggctct tgcaggtgcc ctccgggac gctggcctg gcactctctc 420  
 tttcctcctc gaaacctgga gagaggatt aggagaccag attggaggcc cgcctggag 480  
 cctgctggcy cgcgtgctg gcaggcggcy cttggcaagc ggaggccctt gggccccgga 540  
 cattcagcgc gcaggcgcct gggagctgcy cttctctctc cgcggcgcct ggcagccgcc 600  
 tgcctcggg acagctgca cgcctctctg cgtccgcgcg aggcgccctt cgcctgctg 660  
 tccgggactg cgcctctgcy caccctcga ggaagatgt gagggcggc tgggtgtcgg 720  
 agcaggctgc agccctgagc atggctctct tgaacagccc ggtgaatgcc gatcctaga 780  
 gggctggact ggaacctct gcaaggtccc tgtctccacc agcagctgoc teagccccag 840

gggcccgtaa totgtacca coggatgoot tgtccctggg cctgggcoot gtgacgggaa 900  
 ccctgtgtcc aatggaggca gctgtagtga gacacccagg tcccttgaat gcaactgccc 960  
 gctgtgggtc taocggctgc ggtgtgaggt gagcgggggt acatgtgcaag atggaccctg 1020  
 ctccaacggc ggcttgtgtg togggggtgc agaccctgac totgcoata tctgcoactg 1080  
 cccaccoggt ttccaaggct ccaactgtga gaagagggtg gacoggtgca goctgcagcc 1140  
 atgcogcaat ggoggaactc goctggaact gggccaogcc ctgogctgoc gctgcoogcc 1200  
 cggcttcogc ggtctctgct gogagcacga cctggaacac tgcoggggoc gogctgogc 1260  
 taacggcggc acgtgtgtgg agggcggcgg cgcgcacccg tgcctctgoc cgtgggctt 1320  
 cggcggcggc gactgocggc agcgcgcgga cccgtgoccc gogocccct gtgctcaagg 1380  
 cggcogctgc taocccactc totccggcct cgtctgogct tgcctcccg gctacatggg 1440  
 agcoggtgtg gacttcccag tgcacccoga cggcgaagc gcttgcocg cggcccccgc 1500  
 gggcctcagg cccggggacc ctcaagccta ccttttgct cccgtctgg gactgctcgt 1560  
 ggcgcggggc gtggcggcgg ctgocctctt gctggtccac gtgcgcggcc gtggcactc 1620  
 ccaggatgct gggctctgct tctgtgctgg gaccccgagg ccgtcagtc acgcaactcc 1680  
 ggatgcactc aacaaactaa ggaocgagga gggctcoggg gatggtccga gctcgtccgt 1740  
 agattggaat cgcctgaag atgtagacc ccaaggatt tatgtcaat ctgctcctc 1800  
 catctacgtc cgggaggtag cgaacccctc tttcccccg ctacacactg ggcgcctgg 1860  
 gcagaggcag cactgcttt ttccctacc ttctcagatt ctgtccgtga aatgaattgg 1920  
 gtagagctc tggaagggtt taagccactc ttcagttcta acctacttc atcctattt 1980  
 gcatccctc tatcgttttg agctacctgc catctctctc ttgaaaaac tatggcttg 2040  
 aggaagtcac gatgcgact cgcacagagc tttccactg attgactca ggggggggc 2100  
 aggggagga gggggcagc ctctataatg ctctcactc atttgtttc taggctgac 2160  
 gctctctc catccgacc tggagtcaga gctgggatt ttgtatttc cgggtgctc 2220  
 ccagctctc cccacagggc tttggagttc aatctgaag ggtgtctgg gggacctta 2280  
 ctgttgaag ttgtaataa tggttattta tctcctattc tttccacc catctctc 2340  
 gaaacacta taaaggctat tattgtgac agttttgact aacaaaaa 2389

<210> 4  
 <211> 2052  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 agatataagg ctgggaagc agcagctgoc actccogaga cccccccacc agaaggcoat 60  
 ggtctcccca cggatgtccg ggtcctctc ccagactgtg atcctagocg tcaatttccct 120  
 cccccagaca cgcocccctg gogctctoga gctgcaagac cactctttcg ggcgggtcc 180  
 aggcctggg gcccocgggt cccctgcaag cgcocggctc cctgcccgc tcttctcag 240  
 agtctgctg aagcctgggc tctcaagga ggcocggag tcccctgoc cctggggoc 300  
 ggcctgagt gcgcgcggac cgtctacac cgaagcagcc ggaagccccc cgcctgatct 360  
 cccactgccc gaocggctct tgcagggtgc cttccgggac gctgcccctg gcaactctc 420  
 tttcatcacc gaaacctgga gagagggtt aggagaccag attggaggc cgcctggg 480  
 ctgctggcg cggctgctg gcaagcggcg cttggcagcc ggaagccctg ggcocggga 540  
 catcagcgc gcaagcgcct gggagctgoc cttctcgtac cgcgcgcctc gogagccgc 600  
 tgcctcggg accocgtgca cgcgcctctg ccgtccgcgc agcgcccctc cgggtgogg 660  
 tccgggactc cgcocctgoc caccgctoga ggaagaatgt gaggcgcgc tgggtgccc 720  
 agcaggtgc agcctgagc atggctctg tgaacagccc ggtgaatgoc gatgocaga 780  
 gggctggaat ggaacccctc gcaoggtccc tgtctccacc agcagctgoc tcaagcccag 840  
 gggcccgctc totgtacca coggatgoot tgtccctggg cctgggcoot gtgacgggaa 900  
 cccgtgtgcc aatggaggca gctgtagtga gacacccagg tcccttgaat gcaactgccc 960  
 gctgtgggtc taocggctgc ggtgtgaggt gagcgggggt acatgtgcaag atggaccctg 1020  
 ctccaacggc ggcttgtgtg togggggtgc agaccctgac tctgcoata tctgcoactg 1080  
 cccaccoggt ttccaaggct ccaactgtga gaagagggtg gacoggtgca goctgcagcc 1140  
 atgcogcaat ggoggaactc goctggaact gggccaogcc ctgogctgoc gctgcoogcc 1200  
 cggcttcogc ggtctctgct gogagcacga cctggaacac tgcoggggoc ggcctgoc 1260  
 taacggcggc acgtgtgtgg agggcggcgg cgcgcacccc tgcctctgoc cgtgggctt 1320  
 cggcggcgc gactgocggc agcgcgcgga cccgtgoccc gogocccct gtgctcaagg 1380  
 cggcogctgc taocccactc totccggcct cgtctgogct tgcctcccg gctacatggg 1440  
 agcoggtgt gacttcccag tgcacccoga cggcgaagc gcttgcocg cggcccccgc 1500  
 gggcctcagg cccggggacc ctcaagccta ccttttgct cccgtctgg gactgctcgt 1560  
 ggcgcggggc gtggcggcgg ctgocctctt gctggtccac gtgcgcggcc gtggcactc 1620  
 ccaggatgct gggctctgct tctgtgctgg gaccccgagg ccgtcagtc acgcaactcc 1680  
 ggatgcactc aacaaactaa ggaocgagga gggctcoggg gatggtccga gctcgtccgt 1740  
 agattggaat cgcctgaag atgtagacc ccaaggatt tatgtcaat ctgctcctc 1800  
 catctacgtc cgggaggtct gacgcgtctc ctccatccgc acctggagtc agagcgtgga 1860  
 tttttgatt tgcoggtgg tgcacgtctc ctgcccaga ggtttggag tcaactctg 1920

```

aaggggtgtc tgggggaact ttactgttgc aagttgtaaa taatggttat ttatactcta      1980
ttttttctca ccccatctct ctagaaacac ctataaaggc tattattgtg atcagttttg      2040
actaacaaaa aa                                                                2052

<210> 5
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Val Cys Leu Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu Ser Pro Cys
1          5          10          15

Ala Leu Gly Ala Ala Leu Ser Ala Arg
20          25

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Ala Gly Ala Trp Glu Leu Arg
1          5

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7
Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala Cys Thr Arg
1          5          10

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8
Ala Gly Cys Ser Pro Glu His Gly Phe Cys Glu Gln Pro Gly Glu Cys
1          5          10          15

Arg

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9
Ser Phe Glu Cys Thr Cys Pro Arg
1          5

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10
Asn Gly Gly Leu Cys Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg
1          5          10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11
Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg
1          5          10

<210> 12
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12
Ala Gly Val Phe Glu Leu Gln Ile His Ser Phe Gly Pro Gly Pro Gly
1          5          10          15

Pro Gly Ala Pro Arg Ser Pro Cys Ser Ala Arg Leu Pro Cys Arg Leu
20          25          30

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

Ser Pro Cys Ala Leu Gly Ala Ala Leu Ser Ala Arg Gly Pro Val Tyr
50          55          60

Thr Glu Gln Pro Gly Ala Pro Ala Pro Asp Leu Pro Leu Pro Asp Gly
65          70          75          80

Leu Leu Gln Val Pro Phe Arg Asp Ala Trp Pro Gly Thr Phe Ser Phe
85          90          95

```

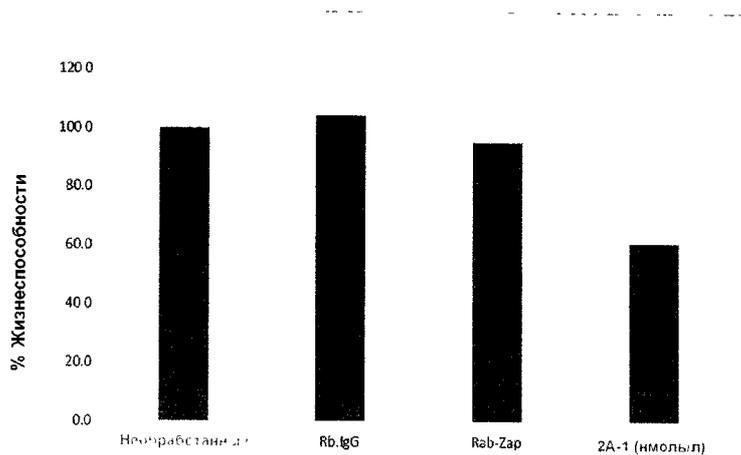
Ile Ile Glu Thr Trp Arg Glu Glu Leu Gly Asp Gln Ile Gly Gly Pro  
 100 105 110  
 Ala Trp Ser Leu Leu Ala Arg Val Ala Gly Arg Arg Arg Leu Ala Ala  
 115 120 125  
 Gly Gly Pro Trp Ala Arg Asp Ile Gln Arg Ala Gly Ala Trp Glu Leu  
 130 135 140  
 Arg Phe Ser Tyr Arg Ala Arg Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Cys Thr Arg Leu Cys Arg Pro Arg Ser Ala Pro Ser Arg Cys Gly Pro  
 165 170 175  
 Gly Leu Arg Pro Cys Ala Pro Leu Glu Asp Glu Cys Glu Ala Pro Leu  
 180 185 190  
 Val Cys Arg Ala Gly Cys Ser Pro Glu His Gly Phe Cys Glu Gln Pro  
 195 200 205  
 Gly Glu Cys Arg Cys Leu Glu Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Thr Val  
 210 215 220  
 Pro Val Ser Thr Ser Ser Cys Leu Ser Pro Arg Gly Pro Ser Ser Ala  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Gly Cys Leu Val Pro Gly Pro Gly Pro Cys Asp Gly Asn Pro  
 245 250 255  
 Cys Ala Asn Gly Gly Ser Cys Ser Glu Thr Pro Arg Ser Phe Glu Cys  
 260 265 270  
 Thr Cys Pro Arg Gly Phe Tyr Gly Leu Arg Cys Glu Val Ser Gly Val  
 275 280 285  
 Thr Cys Ala Asp Gly Pro Cys Phe Asn Gly Gly Leu Cys Val Gly Gly  
 290 295 300  
 Ala Asp Pro Asp Ser Ala Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Gly Phe Gln  
 305 310 315 320  
 Gly Ser Asn Cys Glu Lys Arg Val Asp Arg Cys Ser Leu Gln Pro Cys  
 325 330 335  
 Arg Asn Gly Gly Leu Cys Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg Cys Arg  
 340 345 350  
 Cys Arg Ala Gly Phe Ala Gly Pro Arg Cys Glu His Asp Leu Asp Asp  
 355 360 365  
 Cys Ala Gly Arg Ala Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Val Glu Gly Gly  
 370 375 380  
 Gly Ala His Arg Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg Asp Cys  
 385 390 395 400  
 Arg Glu Arg Ala Asp Pro Cys Ala Ala Arg Pro Cys Ala His Gly Gly  
 405 410 415  
 Arg Cys Tyr Ala His Phe Ser Gly Leu Val Cys Ala Cys Ala Pro Gly  
 420 425 430  
 Tyr Met Gly Ala Arg Cys Glu Phe Pro Val His Pro Asp Gly Ala Ser  
 435 440 445  
 Ala Leu Pro Ala Ala Pro Pro Gly Leu Arg Pro Gly Asp Pro Gln Arg  
 450 455 460  
 Tyr Leu  
 465

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

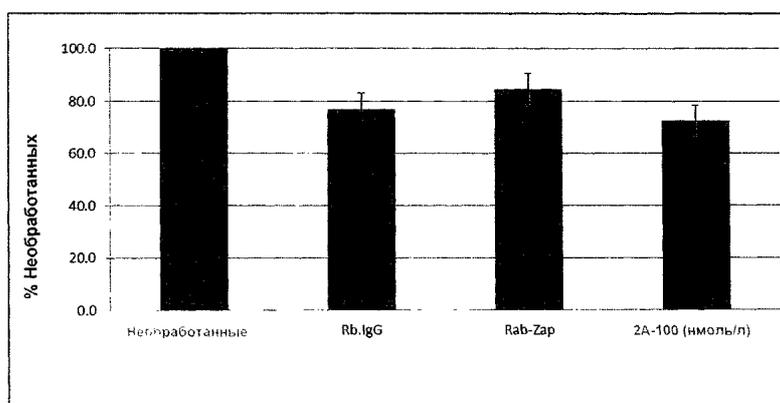
1. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, которое связывается с DLL3 и CD3, где указанный рак выбирают из группы, состоящей из рака легкого, рака поджелудочной железы и рака кожи.

2. Способ по п.1, где указанный рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого.

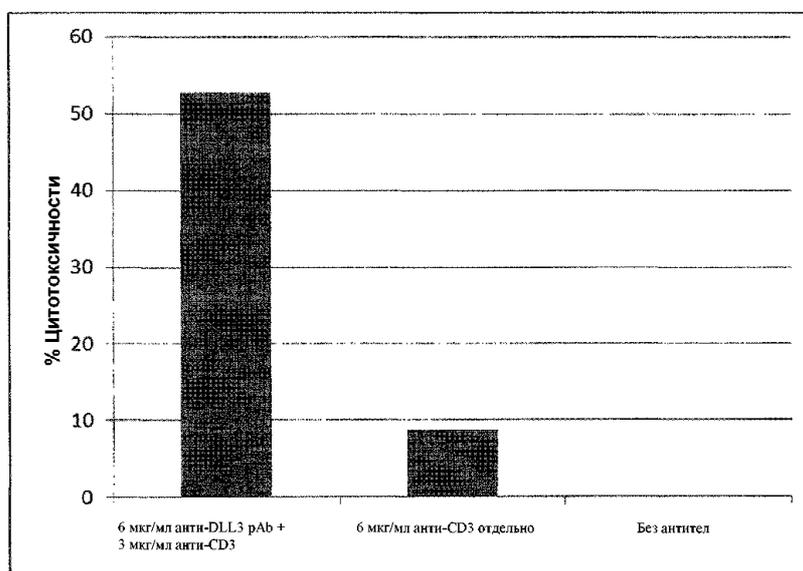
3. Способ по любому п.1 или 2, в котором биспецифическое антитело индуцирует апоптоз раковых клеток, уничтожает или уменьшает количество раковых стволовых клеток и/или уничтожает или уменьшает количество циркулирующих опухолевых клеток.



Фиг. 1a



Фиг. 1b



Фиг. 2

