

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202192641 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.12.30

(22) Дата подачи заявки  
2020.03.30

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)  
*C12N 15/86* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)  
*A61P 7/00* (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИ-DLL3 ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/830,598; 62/861,377; 62/896,790;  
62/928,615

(32) 2019.04.08; 2019.06.14; 2019.09.06;  
2019.10.31

(33) US

(86) PCT/US2020/025643

(87) WO 2020/210067 2020.10.15

(71) Заявитель:

ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

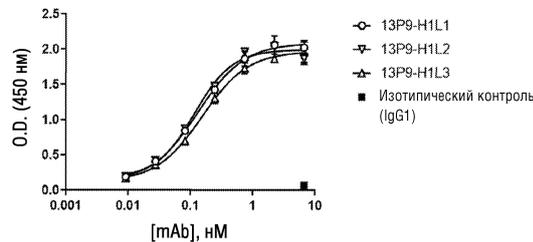
(72) Изобретатель:

Ван Минхань, Цзоу Хой, Цзя Хайцюнь  
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Химерные антигенные рецепторы (CAR), специфичные к DLL3, векторы, кодирующие DLL3 CAR, рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие DLL3 CAR (CAR-T или CAR-NK), и способы применения CAR-T или CAR-NK для лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией DLL3.



A1

202192641

202192641

A1

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-569291EA/050

### **ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ ANTI-DLL3 ХИМЕРНЫЕ ANТИГЕННЫЕ РЕЕПТОРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

#### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки США № 62/928,615, поданной 31 октября 2019 г.; временной заявки США № 62/896,790, поданной 6 сентября 2019 г.; временной заявки США № 62/861,377, поданной 14 июня 2019 г.; и временной заявки США 62/830,598, поданной 8 апреля 2019 года. Каждое раскрытие полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

#### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Настоящее изобретение относится к анти-DLL3 химерным антигенным рецепторам (CAR), нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим CAR, Т-клеткам, сконструированным для экспрессии CAR (CAR-T), и НК-клеткам, сконструированным для экспрессии CAR (CAR-NK). Изобретение также относится к способам получения CAR, способам получения CAR-T/CAR-NK и способам применения CAR-T/CAR-NK для лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией DLL3, включая рак.

#### **ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ ЭЛЕКТРОННЫМ ОБРАЗОМ**

Эта заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с именем файла «065799.20WO1 Sequence Listing» и датой создания 12 марта 2020 г. и размером 215 кб. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью спецификации и полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Стандартные противораковые лекарственные средства дают значительные преимущества. В последнее время наличие иммуно-онкологических лекарственных средств, таких как анти-PD-1 mAb, анти-PD-L1 mAb и анти-CD3 привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы продвинуло концепцию привлечения и активации иммунной системы пациента к борьбе с различными типами рака. Тем не менее, слабый ответ, недостаточная эффективность и/или вопросы безопасности все еще являются проблемами. Клеточная терапия CAR-T (химерным антигенным рецептором-Т) включает генетическое конструирование собственных иммунных клеток пациента, таких как Т-клетки, и перенаправление их на подходящий поверхностный антиген раковых клеток (Mayor et al., Immunotherapy 2016; 8: 491-494). Этот подход продемонстрировал успех у пациентов, страдающих хеморефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями и другими видами рака (Pettitt et al., Mol Ther. 2018; 26:342-353). Т-клетки могут быть сконструированы так, чтобы обладать специфичностью к одной или нескольким мишеням/антигенам поверхности раковых клеток для распознавания и уничтожения раковых клеток. Процесс включает трансдукцию Т-клеток с ДНК или другим генетическим

материалом, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR), который включает внеклеточный антигенспецифический связывающий домен, такой как один или более одноцепочечных вариабельных фрагментов (ScFv) моноклонального антитела, шарнирная и трансмембранная область и внутриклеточный сигнальный домен (включая один или более костимулирующих доменов и один или более активирующих доменов) (Kochenderfer et al., *Nat Rev Clin Oncol.* 2013; 10: 267-276). CAR-экспрессирующие иммунные клетки, такие как Т-клетки и НК-клетки, могут применяться для лечения различных заболеваний, включая гемобластозы и солидные опухоли. Успешные CAR-Т-клеточные терапии могут специфически распознавать и разрушать клетки-мишени и сохранять способность выживать и пролиферировать с течением времени.

Дельта-подобный канонический Notch лиганд 3 (DLL3), также известный как дельта-подобный 3 или дельта-подобный белок 3, необходим для сегментации сомита на ранней стадии развития (Dunwoodie et al., *Development* 2002; 129: 1795-806). В отличие от лигандов семейства Notch млекопитающих DLL1, DLL4, JAG1 и JAG2, все которые активируют передачу сигналов рецептора Notch в транс (Ntziachristos et al., *Cancer Cell* 2014; 25(3):318-34), DLL3 преимущественно локализуется в аппарате Гольджи и неспособен активировать передачу сигналов Notch (Chapman et al., *Hum Mol Genet* 2011; 20(5):905-16 и Geffers et al., *J Cell Biol* 2007; 178(3):465-76). Во время нормального развития, DLL3 ингибирует активацию как цис-, так и транс-действующих путей Notch через взаимодействие с Notch и DLL1 (Chapman et al., *Hum Mol Genet* 2011; 20(5):905-16). DLL3 обычно либо отсутствует, либо присутствует на очень низких уровнях в здоровых тканях взрослых людей, за исключением мозга, но сверхэкспрессируется при раке легких, раке яичек, глиоме и меланоме (Uhlen et al., *Science* 2017; 357(6352): eaan2507). Кроме того, DLL3 обнаруживается на поверхности опухолевых клеток мелкоклеточного рака легких (SCLC) и крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC) (Saunders et al., *Sci Transl Med* 2015; 7(302):302ra136 и Sharma et al., *Cancer Res.* 2017; 77(14):3931-41), что делает его потенциальной мишенью моноклональных антител для лечения рака. Таким образом, DLL3 является идеальной мишенью для CAR-Т-клеточной терапии для лечения и излечения DLL3-положительных раков.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ.

В одном общем аспекте изобретение относится к конструкции химерного антигенного рецептора (CAR), которая индуцирует опосредованное Т-клетками уничтожение рака, где конструкция CAR содержит, по меньшей мере, один антигенсвязывающий домен, который специфически связывает DLL3, шарнирную область, трансмембранную область, и внутриклеточный сигнальный домен.

Изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR). CAR может содержать (а) внеклеточный домен, содержащий, по меньшей мере, один антигенсвязывающий домен, который специфически связывает DLL3; (б) шарнирную область; (с) трансмембранную область; и (д) внутриклеточный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 25, 26, 27, 61, 62 и 63, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 28, 29, 30, 64, 65 и 66, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 31, 32, 33, 67, 68 и 69, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 34, 35, 36, 70, 71 и 72, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 37, 38, 39, 73, 74 и 75, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 40, 41, 42, 76, 77 и 78, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 43, 44, 45, 79, 80 и 81, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 46, 47, 48, 82, 83 и 84, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 49, 50, 51, 85, 86 и 87, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 52, 53, 54, 88, 89 и 90, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 55, 56, 57, 91, 92 и 93, соответственно; или
- (12) SEQ ID NO: 58, 59, 60, 94, 95 и 96, соответственно;

где антигенсвязывающий домен, специфически связывается с DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 97, 98, 99, 133, 134 и 135, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 100, 101, 102, 136, 137 и 138, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 103, 104, 105, 139, 140 и 141, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 106, 107, 108, 142, 143 и 144, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 109, 110, 111, 145, 146 и 147, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 112, 113, 114, 148, 149 и 150, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 115, 116, 117, 151, 152 и 153, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 118, 119, 120, 154, 155 и 156, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 121, 122, 123, 157, 158 и 159, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 124, 125, 126, 160, 161 и 162, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 127, 128, 129, 163, 164 и 165, соответственно; или
- (12) SEQ ID NO: 130, 131, 132, 166, 167 и 168, соответственно ;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичную SEQ ID. NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19,

21, или 23, или переменную область легкой цепи, имеющей полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, или 24.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;

(9) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;

(10) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20 ;

(11) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22; или

(12) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи, имеющую

полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, на 99% идентичную любой из SEQ ID NOs: 170, 175-209 или 248-255, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентичную любой из SEQ ID NOs: 171-174, 210-240 или 256-264.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 171;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 172;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 173 ;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 183, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 183, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 184, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 184, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 198, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 229;

(9) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 229;

(10) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 198, и переменную область легкой цепи, имеющую





последовательность SEQ ID NO: 202, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 232;

(38) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 202, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 233;

(39) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 202, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(40) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 232;

(41) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 233;

(42) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(43) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 204, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(44) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 239;

(45) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 240;

(46) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 253, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261; или

(47) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 255, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающим доменом является одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающим доменом является гуманизированный одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность, по меньшей мере, на 95%

идентичную любой из SEQ ID NO: 241-247 или 265-286.

В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор (CAR) содержит один или более антигенсвязывающих доменов.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит один или более костимулирующих доменов и один или более активирующих доменов.

Также предложены химерные антигенные рецепторы (CAR), кодированные выделенными полинуклеотидами по изобретению.

Также предоставлены векторы, содержащие выделенные полинуклеотиды, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

Также представлены клетки-хозяева, содержащие векторы по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, клеткой-хозяином является Т-клетка, предпочтительно, Т-клетка человека. В некоторых вариантах осуществления, клеткой-хозяином является НК-клетка, предпочтительно, НК-клетка человека. Например, Т-клетка или НК-клетка могут быть сконструированы для экспрессии CAR по изобретению для лечения таких заболеваний, как рак.

Также представлены способы получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению. Способы включают трансдукцию Т-клетки или НК-клетки вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

Также представлены способы получения CAR-Т клеток или CAR-НК клеток по изобретению. Способы включают культивирование Т-клеток или НК-клеток, содержащих выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению в условиях для получения CAR-Т клетки или CAR-НК клетки, и выделение CAR-Т клетки или CAR-НК клетки.

Также представлены способы создания популяции РНК-сконструированных клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению. Эти способы включают контакт клетки с выделенным полинуклеотидом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению, где выделенный полинуклеотид *in vitro* транскрибируется РНК или синтетической РНК.

Также представлены способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту CAR-Т-клеток и/или CAR-НК-клеток по изобретению. Раком может быть любой гемобластоз или солидный рак, например, он может быть выбран из, но не ограничиваться ими, рака легких, такого как мелкоклеточный рак легких (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (HLL),

хронического миелогенного лейкоза (HML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов. Предложены также способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, дополнительно включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который увеличивает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

В некоторых вариантах осуществления, способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, дополнительно включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который ослабляет один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

В некоторых вариантах осуществления, способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, дополнительно включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который лечит заболевание, связанное с DLL3.

Также представлены гуманизированные анти-DLL3 моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 170, 175-209 или 248-255, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 171-174, 210-240 или 256-264.

В некоторых вариантах осуществления, гуманизированные анти-DLL3 моноклональные Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 171;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 172;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 173.

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 183, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 183, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную







последовательность SEQ ID NO: 253, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261; или

(47) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 255, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263.

В некоторых вариантах осуществления, гуманизированное моноклональное анти-DLL3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать эффектор-опосредованный лизис опухолевых клеток, опосредуя привлечение конъюгированных лекарственных средств, и/или образует биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, оказывая эффект, уничтожающий рак.

Также представлены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизированные анти-DLL3 моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также представлены векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизированные анти-DLL3 моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также предоставлены клетки-хозяева, содержащие векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизированные моноклональные анти-DLL3 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также представлена фармацевтическая композиция, содержащая гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Также представлены способы таргетирования DLL3 на поверхности раковой клетки у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

Также представлены способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Раком может быть любой гемобластоз или солидный рак, например, он может быть выбран из, но не ограничиваясь этим, рака легких, такого как мелкоклеточный рак легких (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (HLL), хронического миелогенного лейкоза (HML), множественной

миеломы (ММ), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

Также представлены способы получения гуманизированного моноклонального анти-DLL3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающие культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Также представлены способы получения фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающие объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Приведенная выше сущность изобретения, а также следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будет лучше понято при чтении вместе с прилагаемыми чертежами. Однако следует понимать, что заявка не ограничивается точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На фиг. 1A-1Q показано связывание гуманизированных mAb с иммобилизованным рекомбинантным DLL3 человека в анализе ELISA.

На фиг. 2A- 2I показано связывание одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv) с иммобилизованным рекомбинантным белком DLL3 человека по ELISA.

На фиг. 3A-3F показано связывание scFv с клетками HEK293-huDLL3, стабильно экспрессирующими DLL3 человека. Эксперимент проводят FACS анализом.

На фиг. 4 показана активность по уничтожению опухолевых клеток CAR T-клеток, собранных с анти-DLL3 scFv. Ложно трансфицированные T-клетки используют в качестве контроля.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе «Известный уровень техники» и по всему описанию; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей и подобных, которые были включены в настоящее описание, имеет целью предоставить контекст для изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что некоторые или все эти вопросы составляют часть известного уровня техники в отношении любых описанных или заявленных изобретений.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится это изобретение. В противном случае некоторые используемые здесь термины имеют значения, указанные в описании.

Следует отметить, что используемые здесь и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественные ссылки, если контекст явно не

диктует иное.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные здесь, следует понимать как измененные во всех случаях термином «примерно». Таким образом, числовое значение обычно содержит  $\pm 10\%$  от приведенного значения. Например, концентрация 1 мг/мл содержит от 0,9 до 1,1 мг/мл. Аналогично, диапазон концентраций от 1% до 10% (масс./об.) содержит от 0,9% (масс./об.) до 11% (масс./об.). В данном контексте использование числового диапазона явно включает в себя все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в этом диапазоне, включая целые числа в таких диапазонах и доли значений, если контекст явно не указывает иное.

Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалисты в данной области техники поймут или смогут установить, используя не более чем рутинное экспериментирование, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения.

Используемые здесь термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» или любые другие их варианты будут поняты как включающие указанное целое число или группы целых чисел, но не исключающие любое другое целое число или группы целых чисел, и предназначены для того, чтобы быть неисключительными или открытыми. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или аппарат, который содержит список элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не указанные в явном виде или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или аппарату. Кроме того, если прямо не указано иное, «или» относится к включающему или, а не к исключаящему или. Например, условие А или В удовлетворяется одним из следующих условий: А истинно (или присутствует), а В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует) и В истинно (или присутствует), и оба А и В истинны (или присутствуют).

Используемый здесь термин «и/или» между множеством перечисленных элементов понимается как охватывающий как индивидуальные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов вместе. Подразумевается, что любой из этих вариантов подпадают под значение и, следовательно, удовлетворяют требованию термина «и/или», как он используется в данном документе. Подразумевается, что одновременное применение более чем одного из вариантов подпадают под это значение и, следовательно, удовлетворяют требованию термина «и/или».

Используемый здесь термин «состоит из» или его варианты, такие как «состоит из»

или «состоящий из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого перечисленного целого числа или группы целых чисел, но что никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не может быть добавлено к указанному способу, структуре или композиции.

Используемый здесь термин «состоит по существу из» или варианты, такие как «состоит по существу из» или «состоящий по существу из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого перечисленного целого числа или группы целых чисел и необязательное включение любого перечисленного целого числа или группы целых чисел, которые по существу не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

Используемый здесь термин «субъект» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно, человека. Термин «млекопитающее», используемый здесь, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т.д., более предпочтительно, человека.

Слова «правый», «левый», «нижний» и «верхний» обозначают направления на чертежах, на которые делается ссылка.

Также следует понимать, что термины «примерно», «приблизительно», «в целом», «по существу» и подобные термины, используемые здесь при ссылке на размер или характеристику компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительные отклонения от них, которые функционально являются одинаковыми или подобными, как было бы понятно специалисту в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, будут включать вариации, которые, используя математические и промышленные принципы, принятые в данной области техники (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т. д.), не будут изменять наименее значащую цифру..

Термины «идентичный» или доля «идентичности» в контексте двух или несколько нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, химерных антигенных рецепторов (CAR), содержащих антигенсвязывающие домены, специфичные для DLL3, и полинуклеотидов, кодирующих их, полипептидов DLL3 и полинуклеотидов DLL3, кодирующих их), относятся к двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенную долю одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального осмотра.

Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравниваются тестируемые

последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемая и эталонная последовательности вводят в компьютер, при необходимости указывают координаты подпоследовательности и указывают параметры программы алгоритма последовательности. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет долю идентичности последовательностей для тестируемой последовательности(ей) относительно эталонной последовательности на основе указанных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 1981; 2:482, с помощью алгоритма выравнивания гомологии Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 1970; 48:443, поиском по способу сходства Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 1988; 85:2444, с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или путем визуального осмотра (см. о целом *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., 1995 Supplement (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, которые подходят для определения доли идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 1990; 215: 403-410 и Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST публично доступно через National Center for Biotechnology Information. Этот алгоритм содержит в себя сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) через идентификацию коротких слов длины  $W$  в последовательности запроса, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторой положительной пороговой оценке  $T$  при выравнивании со словом такой же длины в последовательности базы данных.  $T$  называется порогом показателя сходства слов (Altschul et al, *supra*). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как заправка для инициирования поиска, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Затем совпадения слов расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может быть увеличена совокупная оценка выравнивания.

Совокупные оценки вычисляют с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров  $M$  (поощрительных баллов для пары совпадающих остатков; всегда  $>0$ ) и  $N$  (штрафных баллов за несовпадающие остатки; всегда  $<0$ ). Для аминокислотных последовательностей используют оценочную матрицу для вычисления совокупной оценки. Расширение совпадений слов в каждом направлении прекращается, когда: совокупная оценка выравнивания падает на величину  $X$  от ее максимального достигнутого значения; совокупная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой;

либо достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST,  $W$ ,  $T$  и  $X$  определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова ( $W$ ), равную 11, математическое ожидание ( $E$ ), равное 10,  $M=5$ ,  $N = -4$ , и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует по умолчанию длину слова ( $W$ ), равную 3, математическое ожидание ( $E$ ), равное 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 89:10915).

Помимо вычисления доли идентичности последовательностей, алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 1993; 90:5873-5787). Одной из мер сходства, обеспечиваемой алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ( $P(N)$ ), которая обеспечивает указание вероятности того, что совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может произойти случайно. Например, нуклеиновая кислота считается подобной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее примерно 0,1, более предпочтительно, менее примерно 0,01 и наиболее предпочтительно, менее примерно 0,001.

Еще одним признаком того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или полипептиды, по существу, идентичны в том, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно по существу идентичен второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот по существу идентичны, является то, что две молекулы гибридизируются друг с другом в строгих условиях.

Используемый здесь термин «выделенный» означает биологический компонент (такой как нуклеиновая кислота, пептид или белок), который был по существу отделен, продуцирован отдельно от или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т.е. других хромосомных и внехромосомных ДНК и РНК, и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были «выделены», включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. «Выделенные» нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и при этом быть выделенными, если композиция не является частью нативной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также охватывает нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

Используемый здесь термин «полинуклеотид», синонимично обозначаемый как «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может быть не

модифицированной РНК или ДНК или модифицированной РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничения, одно- и двухцепочечную ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечную РНК и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными, или смесью одноцепочечных и двухцепочечных областей. Кроме того, «полинуклеотид» относится к трехцепочечным областям, содержащим РНК или ДНК, или и РНК и ДНК. Термин полинуклеотид также включает ДНК или РНК, содержащие одно или несколько модифицированных оснований, и ДНК или РНК со скелетами, модифицированными для стабильности или по другим причинам. «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК можно вносить различные модификации; таким образом, «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, которые обычно встречаются в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. «Полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

Используемый здесь термин «вектор» означает репликон, в который может быть функционально вставлен другой сегмент нуклеиновой кислоты, чтобы вызвать репликацию или экспрессию сегмента.

Используемый здесь термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. «Клетка-хозяин» может быть клеткой любого типа, например, первичной клеткой, клеткой в культуре или клеткой из клеточной линии. В одном варианте осуществления, «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную или трансдуцированную молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению. В другом варианте осуществления, «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной или трансдуцированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или влияний окружающей среды, которые могут происходить в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

Термин «экспрессия», как используется здесь, относится к биосинтезу генного продукта. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и, кроме того, охватывает все существующие в природе посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессированный CAR может находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для роста клеточной культуры, или быть прикрепленным к клеточной мембране.

Как используется в настоящем описании, термин «иммунная клетка» или «иммунные эффекторный клетки» относится к клетке, которая вовлечена в иммунный

ответ, например, в способствовании ответу иммунного эффектора. Примеры иммунных клеток включают Т-клетки, В-клетки, естественные киллеры (NK), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения. Согласно конкретным вариантам осуществления, сконструированные иммунные клетки представляют собой Т-клетки и называются CAR-T-клетками, поскольку они сконструированы для экспрессии CAR по изобретению.

Используемый здесь термин «сконструированная иммунная клетка» относится к иммунной клетке, также называемой иммунной эффекторной клеткой, которая была генетически модифицирована путем добавления дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК к общему генетическому материалу клетки. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, сконструированные иммунные клетки были генетически модифицированы для экспрессии конструкции CAR согласно изобретению.

### **Химерный антигенный рецептор (CAR)**

Используемый здесь термин «химерный антигенный рецептор» (CAR) относится к рекомбинантному полипептиду, содержащему, по меньшей мере, внеклеточный домен, который специфически связывается с антигеном или мишенью, трансмембранный домен и внутриклеточный Т-клеточный рецептор-активирующий сигнальный домен. Взаимодействие внеклеточного домена CAR с антигеном-мишенью на поверхности клетки-мишени приводит к кластеризации CAR и доставляет стимул активации в CAR-содержащую клетку. CAR перенаправляют специфичность иммунных эффекторных клеток и запускают пролиферацию, продуцирование цитокинов, фагоцитоз и/или продуцирование молекул, которые могут опосредовать гибель антигенэкспрессирующих клеток-мишеней независимо от основного комплекса гистосовместимости (МНС) образом.

В одном из аспектов, CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирную область, костимулирующий домен, активирующий домен и трансмембранную область. В одном аспекте, CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирную область, два костимулирующих домена, активирующий домен и трансмембранную область. В одном аспекте, CAR содержит два антигенсвязывающих домена, шарнирную область, костимулирующий домен, активирующий домен и трансмембранную область. В одном аспекте, CAR содержит два антигенсвязывающих домена, шарнирную область, два костимулирующих домена, активирующий домен и трансмембранную область.

Используемый здесь термин «сигнальный пептид» относится к лидерной последовательности на аминоконце (N-конце) растущего белка CAR, который ко-трансляционно или пост-трансляционно направляет растущий белок в эндоплазматический ретикулум и последующую поверхностную экспрессию.

Используемый здесь термин «внеклеточный антигенсвязывающий домен», «внеклеточный домен» или «внеклеточный лигандсвязывающий домен» относится к части CAR, которая расположена вне клеточной мембраны и способна связываться с антигеном, мишенью или лигандом.

Используемый здесь термин «шарнирная область» относится к части CAR, которая соединяет два соседних домена белка CAR, например внеклеточный домен и трансмембранный домен.

Используемый здесь термин «трансмембранный домен» относится к части CAR, которая проходит через клеточную мембрану и прикрепляет CAR к клеточной мембране. «Трансмембранный домен» также может быть обозначен как «трансмембранная область».

### **Костимулирующие домены**

В контексте настоящего описания химерные антигенные рецепторы могут включать костимулирующие (сигнальные) домены для повышения их эффективности. Костимулирующий (сигнальный) домен может быть получен из костимулирующей молекулы. Костимулирующими молекулами являются молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие домены могут быть получены из костимулирующих молекул, которые могут включать, но не ограничиваются ими, CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, запрограммированную смерть-1 (PD-1), индуцируемый костимулятор Т-клетки (ICOS), антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1; CD11a и CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член суперсемейства фактора некроза опухоли 14; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP10, Fc гамма рецептор, молекулу МНС класса I, TNFR, интегрин, молекулу сигнальной активации лимфоцитов, BTLA, лиганда Toll-рецептора, ICAM-1, CDS, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, ITGAM, ITGAX, ITGB1, CD29, ITGB2 (CD18), ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Тактиль), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD83 лиганд, рецептор цитокина, активирующие рецепторы NK-клеток, или их фрагменты или любые их комбинации.

### **Активирующие домены**

В настоящем описании химерные антигенные рецепторы могут содержать активирующие домены. Активирующие домены могут включать, но не ограничиваются ими, CD3. CD3 является элементом Т-клеточного рецептора на нативных Т-клетках и, как было показано, является важным внутриклеточным активирующим элементом в CAR. В предпочтительном варианте осуществления, CD3 является CD3 дзета.

### **Шарнирная область**

Как описано в настоящем документе, химерный антигенный рецептор может содержать шарнирную область. Это часть внеклеточного домена, который иногда

называют как «спейсерной» областью. Множество шарниров может быть использовано в соответствии с изобретением, включая костимулирующие молекулы, как обсуждалось выше, иммуноглобулиновые (Ig) последовательности или другие подходящие молекулы для получения желаемого специального расстояния от клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления, вся внеклеточная область содержит шарнирную область.

### **Трансмембранная область**

В настоящем описании химерные антигенные рецепторы (CAR) могут включать трансмембранную область/домен. CAR может быть сконструирован так, чтобы содержать трансмембранный домен, который слит с внеклеточным доменом CAR. Аналогичным образом он может быть слит с внутриклеточным доменом CAR. В одном варианте используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях, трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других поверхностных мембранных белков, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. Трансмембранный домен может быть получен из природного или синтетического источника. Если источник является природным, домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области, которые можно использовать в настоящем изобретении, могут быть получены из (т.е. содержат или сконструированы из), но не ограничиваются ими, CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, запрограммированную смерть-1 (PD-1), индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS), антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1; CD11a и CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член суперсемейства фактора некроза опухоли 14; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP10, рецептор Fc гамма, молекулу MHC класса I, TNFR, интегрин, сигнальную молекулу активации лимфоцитов, BTLA, лиганд Toll-рецептора, ICAM-1, CDS, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, IA4, CD49D, ITGA6, VLA -6, CD49f, ITGAD, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, ITGAM, ITGAX, ITGB1, CD29, ITGB2 (CD18), ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Тактиль), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD 160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганд CD83, рецептор цитокина, активирующие рецепторы NK-клеток, белок иммуноглобулина или их фрагменты или любую их комбинацию.

### **Иммунные клетки**

Согласно конкретным аспектам, изобретение относится к клеткам, которые являются иммунными клетками, которые содержат выделенные полинуклеотиды, или

векторы, содержащие выделенные полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR. Иммунные клетки, содержащие выделенные полинуклеотиды и/или векторы по изобретению, можно назвать «сконструированными иммунными клетками». Предпочтительно, сконструированные иммунные клетки получают от человека (имеют человеческое происхождение до того, как будут сделаны рекомбинантными).

Сконструированные иммунные клетки могут быть, например, клетками лимфоидной линии. Неограничивающие примеры клеток лимфоидной линии могут включать Т-клетки и естественные киллеры (NK). Т-клетки экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR), при этом большинство клеток экспрессирует  $\alpha$  и  $\beta$  цепи и меньшая популяция экспрессирует  $\gamma$  и  $\delta$  цепи. Т-клетки, используемые в качестве сконструированных иммунных клеток по изобретению, могут быть  $CD4^+$  или  $CD8^+$  и могут включать, но не ограничиваться ими, Т-хелперные клетки ( $CD4^+$ ), цитотоксические Т-клетки (также называемые цитотоксическими Т-лимфоцитами, CTL;  $CD8^+$  клетки) и Т-клетки памяти, включая центральные Т-клетки памяти, подобные стволовым Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки памяти, естественные киллеры Т-клетки, ассоциированные со слизистой инвариантные Т-клетки, и  $\gamma\delta$  Т-клетки. Другие типовые иммунные клетки включают, но не ограничиваются ими, макрофаги, антигенпрезентирующие клетки (APC) или любую иммунную клетку, которая экспрессирует ингибитор клеточно-опосредованного иммунного ответа, например рецептор пути ингибитора иммунной контрольной точки (например, PD-1). Клетки-предшественники иммунных клеток, которые можно использовать по изобретению, включают гемопоэтические стволовые клетки и/или клетки-предшественники. Гемопоэтические стволовые клетки и/или клетки-предшественники могут быть получены из костного мозга, пуповинной крови, периферической крови взрослых после мобилизации цитокинов и подобных, способами, известными в данной области техники. Иммунные клетки сконструированы для рекомбинантной экспрессии CAR по изобретению.

Иммунные клетки и их клетки-предшественники могут быть выделены способами, известными в данной области техники, включая коммерчески доступные способы (см., например, Rowland Jones et al., *Lymphocytes: A Practical Approach*, Oxford University Press, NY 1999). Источники иммунных клеток или их предшественников включают, но не ограничиваются ими, периферическую кровь, пуповинную кровь, костный мозг или другие источники гемопоэтических клеток. Для разделения клеток с целью выделения или обогащения желаемых иммунных клеток можно использовать различные способы. Например, способы отрицательного селектирования могут использоваться для удаления клеток, которые не являются желаемыми иммунными клетками. Кроме того, для выделения или обогащения желаемых иммунных клеток или их предшественников можно использовать способы положительного селектирования, или можно использовать комбинацию способов положительного и отрицательного селектирования. Если

необходимо выделить конкретный тип клеток, например конкретную Т-клетку, для разделения клеток можно использовать различные маркеры клеточной поверхности или комбинации маркеров (например, CD3, CD4, CD8, CD34).

Иммунные клетки или их клетки-предшественники могут быть аутологичными или не аутологичными по отношению к субъекту, которому они вводятся в способах лечения по изобретению. Аутологичные клетки выделяют у субъекта, которому должны быть введены сконструированные иммунные клетки, рекомбинантно экспрессирующие CAR. Необязательно, клетки можно получить с помощью лейкофереза, при котором лейкоциты выборочно удаляются из взятой крови, делаются рекомбинантными, а затем повторно трансфицируются донору. Альтернативно, можно использовать аллогенные клетки от не аутологичного донора, который не является субъектом. В случае не аутологичного донора, клетки типировать и сравнивают с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA), для определения соответствующего уровня совместимости. Как для аутологичных, так и для не аутологичных клеток, клетки необязательно могут быть криоконсервированы до готовности к использованию.

Различные способы выделения иммунных клеток, которые можно использовать для рекомбинантной экспрессии CAR по изобретению, были описаны ранее и могут быть использованы, включая, но не ограничиваясь ими, использование периферических донорных лимфоцитов (Sadelain et al., *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3:35-45, Morgan et al., *Science* 2006; 314:126-9), использование культур лимфоцитов, полученных из лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL) в биопсиях опухоли (Panelli et al., *J. Immunol.* 2000; 164:495-504, Panelli et al., *J. Immunol.* 2000; 164:4382-92) и использование селективно *in vitro* размноженных антигенспецифических лейкоцитов периферической крови, использование искусственных антигенпрезентирующих клеток (AAPC) или дендритных клеток (Dupont et al., *Cancer Res.* 2005; 65:5417-427; Papanicolaou et al., *Blood* 2003; 102:2498-505). В случае использования стволовых клеток, клетки можно выделить способами, хорошо известными в данной области (см., например, Klug et al., *Hematopoietic Stem Cell Protocols*, Humana Press, NJ 2002; Freshney et al., *Culture of Human Stem Cells*, John Wiley & Sons 2007).

Согласно конкретным вариантам осуществления, способ создания сконструированных иммунных клеток включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от индивидуума, так, чтобы иммунные эффекторные клетки экспрессировали один или более CAR согласно вариантам осуществления изобретения. Способы получения иммунных клеток для иммунотерапии описаны, например, в WO2014/130635, WO2013/176916 и WO2013/176915, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки. Отдельные стадии, которые можно использовать для получения сконструированных иммунных клеток, описаны, например, в WO2014/039523, WO2014/184741, WO2014/191128, WO2014/184744 и WO2014/184143, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки.

В конкретном варианте осуществления, иммунные эффекторные клетки, такие как

Т-клетки, генетически модифицированы CAR по изобретению (например, трансдуцированы вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем активируются и размножаются *in vitro*. В различных вариантах осуществления, Т-клетки могут быть активированы и размножены до или после генетической модификации для экспрессии CAR с использованием способов, описанных, например, в US6352694, US6534055, US6905680, US6692964, US5858358, US6887466, US6905681, US7144575, US7067318, US7172869, US7232566, US7175843, US5883223, US6905874, US6797514, US6867041, US2006/121005, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки. Т-клетки можно размножать *in vitro* или *in vivo*. Как правило, Т-клетки по изобретению можно размножить через контакт с поверхностью, к которой прикреплен агент, который стимулирует сигнал, ассоциированный с комплексом CD3/TCR, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В качестве неограничивающих примеров, популяции Т-клеток могут быть стимулированы, как описано здесь, например, через контакт с анти-CD3 антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, или анти-CD-3 антителом, иммобилизованным на поверхности, или через контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция или через активацию самого CAR. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяция Т-клеток может контактировать с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом в условиях, подходящих для стимулирования пролиферации Т-клеток. Условия, подходящие для культивирования Т-клеток, включают, например, подходящую среду (например, Minimal Essential Media или RPMI Media 1640 или X-vivo 5 (Lonza)), которая может содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, фетальную бычью или человеческую сыворотку), цитокины, такие как IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, инсулин, IFN-g, GM-CSF, TGF $\beta$  и/или какие-либо другие добавки для роста клетки, известные специалисту в данной области техники. В других вариантах осуществления, Т-клетки могут быть активированы и стимулированы для пролиферации питающими клетками и подходящими антителами и цитокинами с использованием способов, таких как описаны в US6040177, US5827642 и WO2012129514, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки.

#### **Антитела и антигенсвязывающие домены**

Используемый здесь термин «антитело» используется в широком смысле и включает молекулы иммуноглобулина или антитела, включая человеческие, гуманизированные, композитные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Как правило, антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые проявляют специфичность связывания с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины можно отнести к пяти основным классам (т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG далее

подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут относиться к любому из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно, антитела по изобретению представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител позвоночных можно отнести к одному из двух четко различающихся типов, а именно к каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи из антител крысы или человека. В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепи, антитела содержат антигенсвязывающую область, которая состоит из варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е. определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Домены варибельной области легкой цепи альтернативно называют LCDR1, LCDR2, и LCDR3, и домены варибельной области тяжелой цепи альтернативно называют HCDR1, HCDR2, и HCDR3.

Используемый здесь термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с DLL3, по существу не содержит антител, которые не связываются с DLL3). Кроме того, выделенное антитело практически не содержит другой клеточный материал и/или химические вещества.

Используемый здесь термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены способом гибридомы, технологией фагового дисплея, технологией клонирования гена единичных лимфоцитов или способами рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела могут быть продуцированы гибридомой, которая содержит В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека.

Используемый здесь термин «антигенсвязывающий фрагмент» и/или «антигенсвязывающий домен» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидом фрагмент Fv (dsFv), а (dsFv)<sub>2</sub>, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), диатело, стабилизированное дисульфидом (ds диатело), молекула одноцепочечного антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или несколько CDR, камелизированное однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело

или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий домен способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело. Согласно конкретным вариантам осуществления, антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечную молекулу антитела (scFv).

Используемый здесь термин «одноцепочечное антитело» относится к обычному одноцепочечному антителу в данной области, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом от примерно 5 до примерно 20 аминокислот. Используемый здесь термин «однодоменное антитело» относится к обычному однодоменному антителу в данной области, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

Используемый здесь термин «антитело человека» относится к антителу, продуцируемому человеком, или антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с использованием любого способа, известного в данной области. Это определение антитела человека содержит интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие, по меньшей мере, один полипептид тяжелой и/или легкой цепи человека.

Используемый здесь термин «гуманизированное антитело» и/или «гуманизированный антигенсвязывающий домен» относится к не человеческому антителу и/или не человеческому антигенсвязывающему домену, который модифицирован для увеличения гомологии последовательности последовательностью антитела человека и/или антигенсвязывающего домена человека, так что антигенсвязывающие свойства антигенсвязывающего домена сохраняются, но его антигенность в организме человека снижается.

В настоящем описании, термин «химерное антитело» и/или «химерный антигенсвязывающий домен» относится к антителу и/или антигенсвязывающему домену, где последовательность аминокислот молекулы иммуноглобулина получают из двух или нескольких видов. Переменная область как легкой, так и тяжелой цепей часто соответствует переменной области антитела и/или антигенсвязывающего домена, происходящего от одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т. д.), имеющего желаемую специфичность, сродство, и способность, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела и/или антигенсвязывающего домена, происходящего от другого вида млекопитающего (например, человека), чтобы избежать возникновения иммунного ответа у этого вида.

Используемый здесь термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, которое содержит множество последовательностей переменного домена иммуноглобулина, причем первая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для первого эпитопа, и

вторая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для второго эпитопа. В варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, *например*, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В варианте осуществления, первый и второй эпитопы не перекрываются или по существу не перекрываются. В варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, *например*, на разных белках (или разных субъединицах мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления, мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый переменный домен иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления, мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела или молекулу тетраспецифического антитела.

Используемый здесь термин «биспецифическое антитело» относится к мультиспецифическому антителу, которое связывает не более двух эпитопов или двух антигенов. Биспецифическое антитело характеризуется первой последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая имеет специфичность связывания для первого эпитопа, и второй последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая имеет специфичность связывания для второго эпитопа. В варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, *например*, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, *например*, на разных белках (или разных субъединицах мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления, биспецифическое антитело содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания для первого эпитопа, и последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания для второго эпитопа. В одном из вариантов осуществления, биспецифическое антитело содержит полуантитело или его фрагмент, обладающее специфичностью связывания для первого эпитопа, и половину антитела или его фрагмент, имеющую специфичность связывания для второго эпитопа. В одном из вариантов осуществления, биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания для первого эпитопа, и scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания для второго эпитопа. В одном из вариантов осуществления, первый эпитоп расположен на DLL3, а второй эпитоп расположен на PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3, CD73, апелине, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD3, CD19, CD20, CD33, CD47, TIG-1, CLDN18.2, FOLR1 и/или других опухлеассоциированных иммунодепрессантах или поверхностных антигенах.

Используемый здесь термин «DLL3» относится к дельта-подобному каноническому Notch лиганду 3 (DLL3), также известному как дельта-подобный 3 или дельта-подобный белок 3, который необходим для сегментации сомита на ранней стадии развития (Dunwoodie et al., *Development* 2002; 129:1795-806). В отличие от лигандов семейства Notch млекопитающих DLL1, DLL4, JAG1 и JAG2, все которые активируют передачу сигналов рецептора Notch в транс (Ntziachristos et al., *Cancer Cell* 2014; 25(3):318-34), DLL3 преимущественно локализуется в области аппарата Гольджи и неспособен активировать передачу сигналов Notch (Chapman et al., *Hum Mol Genet* 2011; 20(5):905-16 и Geffers et al., *J Cell Biol* 2007; 178(3):465-76). Во время нормального развития DLL3 ингибирует активацию как цис-, так и транс-действующих путей Notch через взаимодействие с Notch и DLL1 (Chapman et al., *Hum Mol Genet* 2011; 20(5):905-16). DLL3 обычно либо отсутствует, либо присутствует на очень низких уровнях в здоровых тканях взрослых людей, за исключением мозга, но сверхэкспрессируется при раке легких, раке яичек, глиоме и меланоме (Uhlen et al., *Science* 2017; 357(6352):eaan2507). Кроме того, DLL3 обнаруживается на поверхности опухолевых клеток мелкоклеточного рака легкого (SCLC) и крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC) (Saunders et al., *Sci Transl Med* 2015; 7(302):302ra136 и Sharma et al., *Cancer Res* 2017; 77(14):3931-3941), что делает его потенциальной мишенью для моноклональных антител и/или химерных антигенных рецепторов (CAR) для лечения рака. Термин «DLL3 человека» относится к DLL3, происходящему от человека. Типовая аминокислотная последовательность DLL3 человека представлена в GenBank под номером доступа NP\_058637.1 (SEQ ID NO: 169).

В настоящем описании антитело и/или антигенсвязывающий домен, который «специфически связывается с DLL3», относится к антителу и/или антигенсвязывающему домену, который связывается с DLL3, предпочтительно с DLL3 человека, с  $KD$   $1 \times 10^{-7}$  М или менее, предпочтительно,  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, более предпочтительно,  $5 \times 10^{-9}$  М или менее,  $1 \times 10^{-9}$  М или менее,  $5 \times 10^{-10}$  М или менее, или  $1 \times 10^{-10}$  М или менее. Термин «KD» относится к константе диссоциации, которая получается из отношения  $Kd$  к  $Ka$  (т.е.  $Kd/Ka$ ) и выражается в виде молярной концентрации (М). Значения  $KD$  для антигенсвязывающего домена можно определить с использованием способов, известных в данной области техники, с учетом настоящего описания. Например,  $KD$  антитела и/или антигенсвязывающего домена можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением биосенсорной системы, например, системы *Viacore®*, или с применением технологии биослойной интерферометрии, такой как система *Octet RED96*.

Чем меньше значение  $KD$  антитела и/или антигенсвязывающего домена, тем выше аффинность, с которой антитело и/или антигенсвязывающий домен связываются с антигеном-мишенью.

В соответствии с конкретным аспектом, настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), включающим антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область

тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1, (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 25, 26, 27, 61, 62 и 63, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 28, 29, 30, 64, 65 и 66, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 31, 32, 33, 67, 68 и 69, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 34, 35, 36, 70, 71 и 72, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 37, 38, 39, 73, 74 и 75, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 40, 41, 42, 76, 77 и 78, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 43, 44, 45, 79, 80 и 81, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 46, 47, 48, 82, 83 и 84, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 49, 50, 51, 85, 86 и 87, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 52, 53, 54, 88, 89 и 90, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 55, 56, 57, 91, 92 и 93, соответственно; или
- (12) SEQ ID NO: 58, 59, 60, 94, 95 и 96, соответственно;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

В соответствии с другим конкретным аспектом, настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), содержащим антигенсвязывающий домен, в котором антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 97, 98, 99, 133, 134 и 135, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 100, 101, 102, 136, 137 и 138, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 103, 104, 105, 139, 140 и 141, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 106, 107, 108, 142, 143 и 144, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 109, 110, 111, 145, 146 и 147, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 112, 113, 114, 148, 149 и 150, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 115, 116, 117, 151, 152 и 153, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 118, 119, 120, 154, 155 и 156, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 121, 122, 123, 157, 158 и 159, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 124, 125, 126, 160, 161 и 162, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 127, 128, 129, 163, 164 и 165, соответственно; или
- (12) SEQ ID NO: 130, 131, 132, 166, 167 и 168, соответственно ;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

В соответствии с другим конкретным аспектом, данное изобретение относится к антигенсвязывающему домену, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, или, по крайней мере, 99%

идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, или 23, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, или 24.

Согласно другому конкретному аспекту изобретение относится к антигенсвязывающему домену, содержащему:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;

(9) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;

(10) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20;

(11) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22; или

(12) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24.

Согласно другому конкретному аспекту, антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99%. % идентичную любой из SEQ ID NOs: 170, 175-209 или 248-255, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по крайней мере, на 99% идентичную любой из SEQ ID NOs: 171-174, 210-240 или 256-264.

Согласно другому конкретному аспекту, антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 171;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 172;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 173 ;

(4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 183, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217;

(5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 183, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218;

(6) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 184, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217;

(7) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 184, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218;

(8) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 198, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 229;

(9) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 229;





полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

(37) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 202, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 232;

(38) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 202, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 233;

(39) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 202, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(40) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 232;

(41) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 233;

(42) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(43) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 204, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(44) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 239;

(45) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 240;

(46) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 253, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261; или

(47) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 255, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263.

Согласно другому конкретному аспекту, антигенсвязывающим доменом является одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающим доменом является гуманизированный одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99%, идентичную любой из SEQ ID NOs: 241-247 или 265-286. В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 241-247 или 265-286.

В соответствии с другим конкретным аспектом, химерный антигенный рецептор содержит один или более антигенсвязывающих доменов.

Согласно другому конкретному аспекту, внутриклеточный сигнальный домен содержит один или более костимулирующих доменов и один или более активирующих доменов.

В другом общем аспекте, изобретение относится к изолированному полинуклеотиду, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит его антигенсвязывающий домен по изобретению. Специалистам в данной области техники будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, заменена, удалена, вставлена и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие их антигенсвязывающие домены по изобретению, могут быть изменены без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где CAR содержит его антигенсвязывающий домен, по изобретению. Может быть использован любой вектор, известный специалистам в данной области техники, с учетом настоящего раскрытия, такой как плаزمид, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как плаزمид. Вектор может включать в себя любой элемент для установления обычной функции вектора экспрессии, например промотор, элемент связывания рибосомы, терминатор, энхансер, маркер селектирования и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцируемым или репрессируемым промотором. Множество векторов экспрессии, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известно в данной области техники и может быть использовано здесь для продуцирования их антигенсвязывающего домена в клетке. Обычные методы клонирования или синтез искусственного гена могут быть использованы для создания рекомбинантного вектора экспрессии согласно вариантам осуществления изобретения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к клетке, трансдуцированной вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению. Термин «трансдуцированный» или «трансдукция» относится к процессу, в

котором экзогенная нуклеиновая кислота переносится или вводится в клетку-хозяин. «Трансдуцированной» клеткой является такая, которая была трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка содержит первичную клетку субъекта и ее потомство. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой CAR-T-клетку человека, где Т-клетка сконструирована, чтобы экспрессировать CAR по изобретению для лечения заболеваний, таких как рак. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой CAR-NK-клетку человека, где NK-клетка, сконструированная для экспрессии CAR по изобретению, используется для лечения таких заболеваний, как рак.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу создания CAR-T-клетки через трансдукцию Т-клетки вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

В другом общем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения CAR-T-клетки по изобретению, включающему культивирование Т-клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению в условиях получения CAR-T-клетки и восстановления CAR-T-клетки.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения CAR-NK-клетки трансдукцией NK-клетки вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения CAR-NK-клетки по изобретению, включающему культивирование NK-клеток, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие химерный антигенный рецептор (CAR), в условиях получения CAR-NK-клетки и восстановления CAR-NK-клетки.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу создания популяции РНК-сконструированных клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению. Способы включают контакт популяции клеток с выделенными полинуклеотидами, содержащими нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR по изобретению, где выделенные полинуклеотиды представляют собой *in vitro* транскрибированную РНК или синтетическую РНК.

В другом общем аспекте, настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-DLL3 моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 170, 175-209 или 248-255, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 171-174, 210-240. или 256-264.

В соответствии с другим конкретным аспектом, гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 171;







(42) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(43) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 204, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(44) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 239;

(45) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 240;

(46) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 253, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261; или

(47) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 255, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263.

В соответствии с другим конкретным аспектом, гуманизованное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно индуцировать эффектор-опосредованный лизис опухолевых клеток, опосредующий привлечение конъюгированных лекарственных средств, и/или образует биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, оказывая эффект, уничтожающий рак.

В другом общем аспекте, настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей гуманизованные анти-DLL3 моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизованные анти-DLL3 моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

В другом общем аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизованные анти-DLL3 моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения гуманизованного анти-DLL3 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент в условиях для получения моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или

культуры.

### **Фармацевтические композиции**

В другом общем аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенный полинуклеотид по изобретению, выделенный полипептид по изобретению, клетку-хозяин по изобретению и/или сконструированную иммунную клетку по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом общем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гуманизированные анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Термин «фармацевтическая композиция», используемый здесь, означает продукт, содержащий выделенный полинуклеотид по изобретению, выделенный полипептид по изобретению, клетку-хозяин по изобретению и/или сконструированную иммунную клетку по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Полинуклеотиды, полипептиды, клетки-хозяева и/или сконструированные иммунные клетки по изобретению и композиции, содержащие их, также могут быть использованы в производстве лекарственного средства для терапевтического применения, упомянутого в настоящем документе.

Используемый здесь термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солубилизатору, маслу, жиру, жиросодержащей везикуле, микросфере, липосомной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для использования в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения. Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не влияет на эффективность композиции по изобретению или биологическую активность композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, с учетом настоящего описания, в изобретении можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для использования в фармацевтической композиции полинуклеотида, полипептида, клетки-хозяина и/или сконструированной иммунной клетки.

Составы фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известны в данной области техники, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21-е издание (2005) и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, регуляторы тоничности, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или более фармацевтически приемлемых носителей могут применяться при составлении фармацевтических композиций по изобретению.

В другом общем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное анти-DLL3

моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

### **Способы применения**

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению. Раком может быть любой гемобластоз или солидный рак, например, он может быть выбран из, но не ограничиваться ими, рака легких, такого как мелкоклеточный рак легких (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (HLL), хронического миелогенного лейкоза (HML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

В другом общем аспекте, настоящее изобретение относится к способу таргетирования DLL3 на поверхность раковых клеток у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

В другом общем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Раком может быть любой гемобластоз или солидный рак, например, он может быть выбран из, но не ограничиваясь этим, рака легких, такого как мелкоклеточный рак легких (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (HLL), хронического миелогенного лейкоза (HML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

Согласно вариантам осуществления изобретения, CAR-T-клетка или CAR-NK-клетки содержат терапевтически эффективное количество экспрессированных CAR по изобретению, и фармацевтические композиции содержат «терапевтически эффективное количество» гуманизованного анти-DLL моноклонального антитела или его

антигенсвязывающего фрагмента. Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает желаемый биологический или лекарственный ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным способом в соответствии с заявленной целью.

Как используется в настоящем документе со ссылкой на CAR, терапевтически эффективное количество означает количество молекулы CAR, экспрессируемой в трансдуцированной Т-клетке или НК-клетке, которое модулирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом. Кроме того, как используется в настоящем описании со ссылкой на CAR, терапевтически эффективное количество означает количество CAR молекулы, экспрессированной в трансдуцированной Т-клетке или НК-клетке, которое приводит к лечению заболевания, нарушения или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, нарушения или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, нарушением или состоянием.

Как используется в настоящем описании со ссылкой на CAR-Т-клетку или CAR-NK-клетку, терапевтически эффективное количество означает количество CAR-Т-клеток или CAR-NK-клеток, которое модулирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом. Кроме того, как используется в настоящем описании со ссылкой на CAR-Т клетки или CAR-NK клетки, терапевтически эффективное количество означает количество CAR-Т-клеток или CAR-NK клеток, которые вызывает лечение заболевания, нарушения или состояние; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, расстройства или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, нарушением или состоянием.

Как используется в настоящем описании со ссылкой на гуманизованное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, терапевтически эффективное количество означает количество гуманизованного анти-DLL3 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое модулирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом. Кроме того, как используется в настоящем описании со ссылкой на гуманизованное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, терапевтически эффективное количество означает количество гуманизованного анти-DLL3 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое вызывает лечение заболевания, нарушения или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, нарушения или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, нарушением или состоянием.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащем лечению, является рак, предпочтительно, рак, выбранный из группы, состоящей из рака легких, такого как мелкоклеточный рак легких (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы,

уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (HLL), хронического миелогенного лейкоза (HML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

Согласно конкретным вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество относится к количеству терапии, которое достаточно для достижения одного, двух, трех, четырех или несколько из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (iii) профилактика прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (iv) регресс заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (v) профилактика развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (vi) профилактика рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (vii) сокращения госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) сокращение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) увеличение выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, или симптомом, связанным с ним; (x) подавление или уменьшение заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним, у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, способы введения, мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, массу тела, состояние здоровья), является ли субъект человеком или животным, другие вводимые лекарства и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Лечебные дозировки оптимально подобраны для оптимизации безопасности и эффективности.

Согласно конкретным вариантам осуществления, описанные здесь композиции составлены таким образом, чтобы они подходили для предполагаемого пути введения субъекту. Например, описанные здесь композиции могут быть составлены таким образом, чтобы они подходили для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

Клетки по изобретению могут быть введены любым удобным способом, известным специалистам в данной области техники. Например, клетки по изобретению можно

вводить субъекту путем аэрозольной ингаляции, инъекции, приема внутрь, переливания, имплантации и/или трансплантации. Композиции, содержащие клетки по изобретению, могут быть введены трансартериально, подкожно, внутривожно, внутрь опухоли, внутрь узла, интрамедуллярно, внутримышечно, интраплеврально, внутривенной (ВВ) инъекцией или внутривентриально. В некоторых вариантах осуществления клетки по изобретению могут быть введены субъекту вместе с противопалищной терапией или без нее.

Фармацевтические композиции, содержащие клетки по изобретению, экспрессирующие CAR по изобретению, могут быть представлены в виде стерильных жидких препаратов, обычно изотонических водных растворов с суспензиями клеток или, необязательно, в виде эмульсий, дисперсий и т.п., которые обычно забуферены до выбранного pH. Композиции могут содержать носители, например воду, физиологический раствор, физиологический раствор с фосфатным буфером и подобные, подходящие для целостности и жизнеспособности клеток, а также для введения клеточной композиции.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем введения клеток по изобретению в подходящем количестве подходящего растворителя с различными другими ингредиентами по желанию. Такие композиции могут включать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент, такой как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза, декстроза и подобные, которые подходят для использования с клеточной композицией и для введения субъекту, такому как человек. Подходящие буферы для получения клеточной композиции хорошо известны в данной области техники. Любой используемый носитель, разбавитель или добавка совместим с сохранением целостности и жизнеспособности клеток по изобретению.

Клетки по изобретению можно вводить в любом физиологически приемлемом носителе. Популяция клеток, содержащая клетки по изобретению, может включать очищенную популяцию клеток. Специалисты в данной области техники могут легко определить клетки в популяции клеток, используя различные хорошо известные способы. Диапазон чистоты клеточных популяций, содержащих генетически модифицированные клетки по изобретению, может составлять от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60%, от примерно 60% до примерно 65%, от примерно 65% до примерно 70%, от примерно 70% до примерно 75%, от примерно 75% до примерно 80%, от примерно 80% до примерно 85%, от примерно 85% до примерно 90%, от примерно 90% до примерно 95% или от примерно 95% до примерно 100%. Дозировки могут быть легко скорректированы специалистами в данной области техники, например, снижение чистоты может потребовать увеличения дозировки.

Клетки по изобретению обычно вводят в дозе на основе количества клеток на килограмм (клеток/кг) массы тела субъекта, которому вводят клетки. Обычно дозы клеток находятся в диапазоне от примерно  $10^4$  до примерно  $10^{10}$  клеток/кг массы тела, например, от примерно  $10^5$  до примерно  $10^9$ , от примерно  $10^5$  до примерно  $10^8$ , от примерно  $10^5$  до примерно  $10^7$  или от примерно  $10^5$  до примерно  $10^6$ , в зависимости от способа и места введения. Обычно в случае системного введения используют более высокую дозу, чем при

местном введении, когда иммунные клетки по изобретению вводят в область опухоли и/или рака. Типовые диапазоны доз включают, но не ограничиваются ими, от  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^8$ , от  $2 \times 10^4$  до  $1 \times 10^8$ , от  $3 \times 10^4$  до  $1 \times 10^8$ , от  $4 \times 10^4$  до  $1 \times 10^8$ , от  $5 \times 10^4$  до  $6 \times 10^8$ , от  $7 \times 10^4$  до  $1 \times 10^8$ , от  $8 \times 10^4$  до  $1 \times 10^8$ , от  $9 \times 10^4$  до  $1 \times 10^8$ , от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^8$ , от  $1 \times 10^5$  до  $9 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^5$  до  $8 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^5$  до  $7 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^5$  до  $6 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^5$  до  $4 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^5$  до  $4 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^5$  до  $3 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^5$  до  $2 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^5$  до  $9 \times 10^6$ , от  $1 \times 10^5$  до  $8 \times 10^6$ , от  $1 \times 10^5$  до  $7 \times 10^6$ , от  $1 \times 10^5$  до  $6 \times 10^6$ , от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^6$ , от  $1 \times 10^5$  до  $4 \times 10^6$ , от  $1 \times 10^5$  до  $4 \times 10^6$ , от  $1 \times 10^5$  до  $3 \times 10^6$ , от  $1 \times 10^5$  до  $2 \times 10^6$ , от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6$ , от  $2 \times 10^5$  до  $9 \times 10^7$ , от  $2 \times 10^5$  до  $8 \times 10^7$ , от  $2 \times 10^5$  до  $7 \times 10^7$ , от  $2 \times 10^5$  до  $6 \times 10^7$ , от  $2 \times 10^5$  до  $5 \times 10^7$ , от  $2 \times 10^5$  до  $4 \times 10^7$ , от  $2 \times 10^5$  до  $4 \times 10^7$ , от  $2 \times 10^5$  до  $3 \times 10^7$ , от  $2 \times 10^5$  до  $2 \times 10^7$ , от  $2 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$ , от  $2 \times 10^5$  до  $9 \times 10^6$ , от  $2 \times 10^5$  до  $8 \times 10^6$ , от  $2 \times 10^5$  до  $7 \times 10^6$ , от  $2 \times 10^5$  до  $6 \times 10^6$ , от  $2 \times 10^5$  до  $5 \times 10^6$ , от  $2 \times 10^5$  до  $4 \times 10^6$ , от  $2 \times 10^5$  до  $4 \times 10^6$ , от  $2 \times 10^5$  до  $3 \times 10^6$ , от  $2 \times 10^5$  до  $2 \times 10^6$ , от  $2 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6$ , от  $3 \times 10^5$  до  $3 \times 10^6$  клеток/кг и подобные. Кроме того, доза может быть скорректирована с учетом того, вводят ли однократную дозу или вводят несколько доз. Точное определение того, какая доза будет считаться эффективной, может быть основано на факторах, индивидуальных для каждого субъекта.

Используемые здесь термины «лечить», «лечение» и «лечение» предназначены для обозначения облегчения или отмены, по меньшей мере, одного измеримого физического параметра, связанного с раком и/или воспалительным заболеванием, нарушением или состоянием, которое не обязательно проявляется у субъекта, но может проявляться у субъекта. Термины «лечить», «лечение» и «лечение» также могут относиться к регрессу, профилактике прогрессирования или, по меньшей мере, замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, «лечить», «лечить» и «лечение» относятся к облегчению, профилактике развития или начала или сокращению продолжительности одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием, нарушением или состоянием, например в виде опухоли или, более предпочтительно, рака. В конкретном варианте осуществления, «лечить», «лечить» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, «лечить», «лечить» и «лечение» относятся к увеличению выживаемости субъекта, страдающего заболеванием, нарушением или состоянием. В конкретном варианте осуществления, «лечить», «лечить» и «лечение» относятся к устранению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

Согласно конкретным вариантам осуществления представлены композиции, используемые для лечения рака и/или воспалительного заболевания, нарушения или состояния. Для лечения рака предлагаемые композиции можно использовать в сочетании с другим лечением, включая, но не ограничиваясь ими, химиотерапию, анти-CD20 mAb, анти-TIM-3 mAb, анти-LAG-3 mAb, анти-EGFR mAb, анти-HER-2 mAb, анти-CD19 mAb, анти-CD33 mAb, анти-CD47 mAb, анти-CD73 mAb, анти-Claudin18.2 mAb, анти-апелиновое mAb, анти-TIP-1 mAb, анти-FOLR1 mAb, анти-CTLA-4 mAb, анти-PD-L1

mAb, анти-PD-1 mAb, другие иммуноонкологические препараты, антиангиогенный агент, радиационную терапию, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), таргетную терапию или другие противоопухолевые препараты.

Согласно конкретным вариантам осуществления, способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включают введение субъекту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению в комбинации с агентом, который увеличивает эффективность клеток, экспрессирующих молекулу CAR. Такие агенты включают, но не ограничиваются ими, фрагмент антитела, который связывается с CD73, CD39, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3 или LAG-3, или антагонист рецептора аденозина A2a.

Согласно конкретным вариантам осуществления, способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включают введение субъекту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению в комбинации с агентом, который улучшает одну или несколько побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR. Такие агенты включают, но не ограничиваются ими, стероид, ингибитор TNF $\alpha$  или ингибитор IL-6.

Согласно конкретным вариантам осуществления, способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включают введение субъекту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению в комбинации с агентом, который лечит заболевание, связанное с DLL3. Такие агенты включают, но не ограничиваются ими, анти-DLL3 моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

Используемый здесь термин «в комбинации» в контексте введения субъекту двух или нескольких терапий относится к применению более чем одной терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором терапия вводится субъекту. Например, первая терапия (например, композиция, описанная здесь) может вводиться до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения субъекту второй терапии.

## **ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

Изобретение представляет также следующие неограничивающие варианты осуществления.

Вариантом осуществления 1 является выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий, по меньшей мере, один антигенсвязывающий домен, который специфически связывает DLL3; (b) шарнирную область; (c) трансмембранную область; и (d) внутриклеточный сигнальный домен.

Вариантом осуществления 2 является выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 1, в котором антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую

комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 25, 26, 27, 61, 62 и 63, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 28, 29, 30, 64, 65 и 66, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 31, 32, 33, 67, 68 и 69, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 34, 35, 36, 70, 71 и 72, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 37, 38, 39, 73, 74 и 75, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 40, 41, 42, 76, 77 и 78, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 43, 44, 45, 79, 80 и 81, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 46, 47, 48, 82, 83 и 84, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 49, 50, 51, 85, 86 и 87, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 52, 53, 54, 88, 89 и 90, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 55, 56, 57, 91, 92 и 93, соответственно; или
- (12) SEQ ID NO: 58, 59, 60, 94, 95 и 96, соответственно ;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

Вариантом осуществления 3 является выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 1, в котором антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 97, 98, 99, 133, 134 и 135, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 100, 101, 102, 136, 137 и 138, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 103, 104, 105, 139, 140 и 141, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 106, 107, 108, 142, 143 и 144, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 109, 110, 111, 145, 146 и 147, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 112, 113, 114, 148, 149 и 150, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 115, 116, 117, 151, 152 и 153, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 118, 119, 120, 154, 155 и 156, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 121, 122, 123, 157, 158 и 159, соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 124, 125, 126, 160, 161 и 162, соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 127, 128, 129, 163, 164 и 165, соответственно; или
- (12) SEQ ID NO: 130, 131, 132, 166, 167 и 168, соответственно ;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

Вариантом осуществления 4 является выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 1-3, в котором антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, 3, 5,

7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, или 23, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, или 24.

Вариантом осуществления 5 является выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 1-4, где антигенсвязывающий домен содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

(4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

(5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;

(6) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

(7) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

(8) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;

(9) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;

(10) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20;

(11) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22; или

(12) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24.

Вариантом осуществления 6 является выделенный полинуклеотид по любому из вариантов 1-4, в котором антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентичную любой из SEQ ID NOs: 170, 175-209 или 248-255, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, на 98%, или, по меньшей мере, на 99% идентичную любой из SEQ ID NOs: 171-174, 210-240 или 256-264.

Вариантом осуществления 7 является выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 6, в котором антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 171;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 172;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 173 ;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 183, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 183, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 184, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 184, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 198, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 229;

(9) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200, и переменную область легкой цепи, имеющую





последовательность SEQ ID NO: 182, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215;

(37) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 202, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 232;

(38) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 202, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 233;

(39) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 202, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(40) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 232;

(41) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 233;

(42) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(43) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 204, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(44) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 239;

(45) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 240;

(46) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 253, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261; или

(47) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 255, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263.

Вариантом осуществления 8 является выделенный полинуклеотид по любому из вариантов 1-7, где антигенсвязывающим доменом является одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

Вариантом осуществления 9 является выделенный полинуклеотид по варианту

осуществления 8, в котором одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) является гуманизированным.

Вариантом осуществления 10 является выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 8 или 9, где одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 241-247 или 265-286.

Вариантом осуществления 11 является выделенный полинуклеотид по любому одному из вариантов осуществления 1-10, в котором химерный антигенный рецептор (CAR) содержит один или более антигенсвязывающих доменов.

Вариантом осуществления 12 является выделенный полинуклеотид по любому одному из вариантов осуществления 1-11, в котором внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит один или более костимулирующих доменов и один или более активирующих доменов.

Вариантом осуществления 13 осуществления является химерный антигенный рецептор (CAR), кодируемый выделенным полинуклеотидом по любому из вариантов осуществления 1-12.

Вариантом осуществления 14 является вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 1-12.

Вариантом осуществления 15 является клетка-хозяин, содержащая вектор из варианта осуществления 14.

Вариантом осуществления 16 является клетка-хозяин по варианту осуществления 15, где клеткой является CAR-T-клетка, предпочтительно CAR-T-клетка человека.

Вариантом осуществления 17 является клетка-хозяин по варианту осуществления 15, где клеткой является клетка CAR-NK, предпочтительно клетка CAR-NK человека.

Вариантом осуществления 18 является способ получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает стадии трансдукции T-клетки с вектором по варианту осуществления 14.

Вариантом осуществления 19 является способ получения химерного антигенного рецептора (CAR)-T клетки, где указанный способ содержит культивирование T-клетки, содержащей выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из вариантов осуществления 1-12 в условиях получения CAR-T-клетки и выделения CAR-T-клетки.

Вариантом осуществления 20 является способ изготовления клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает стадии трансдукции клетки NK с вектором по варианту осуществления 14.

Вариантом осуществления 21 является способ получения химерного антигенного рецептора (CAR)-NK клеток, где указанный способ включает культивирование NK-клетки, содержащие выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому одному из вариантов осуществления 1-12 в условиях получения CAR-NK клетки и восстановления CAR-NK

клетки.

Вариантом осуществления 22 является способ получения клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает контакт клетки с изолированным полинуклеотидом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из вариантов осуществления 1-12, где выделенным полинуклеотидом является *in vitro* транскрибированная РНК или синтетическая РНК.

Вариантом осуществления 23 является способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту клетки-хозяина по любому из вариантов осуществления 15-17.

Вариантом осуществления 24 является способ по варианту осуществления 23, в котором рак выбран из рака легких, такого как мелкоклеточный рак легких (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (HLL), хронического миелогенного лейкоза (HML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

Вариантом осуществления 25 является способ по варианту осуществления 2, 3 или 24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который увеличивает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

Вариантом осуществления 26 является способ по варианту осуществления 2, 3 или 24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который ослабляет один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

Вариантом осуществления 27 является способ по варианту осуществления 2, 3 или 24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который лечит заболевание, связанное с DLL3.

Вариантом осуществления 28 является гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент его, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 170, 175-209 или 248-255, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 171-174, 210-240 или 256-264.

Вариантом осуществления 29 является гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вариантом осуществления 28, где указанное антитело или его антигенсвязывающий







полипептидную последовательность SEQ ID NO: 232;

(41) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 233;

(42) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 203, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(43) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 204, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 234;

(44) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 239;

(45) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 208, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 240;

(46) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 253, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261; или

(47) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 255, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263.

Вариантом осуществления 30 является гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 28 или 29, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать эффектор-опосредованный лизис опухолевых клеток, опосредующий привлечение конъюгированных лекарственных средств, и/или образует биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, с получением эффекта уничтожения рака.

Вариантом осуществления 31 является выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 28-30.

Вариантом осуществления 32 является вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту из варианта осуществления 31.

Вариантом осуществления 33 является клетка-хозяин, содержащая вектор из варианта осуществления 32.

Вариантом осуществления 34 является фармацевтическая композиция, содержащая изолированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 28-30, и фармацевтический приемлемый носитель.

Вариантом осуществления 35 является способ таргетирования DLL3 на

поверхность раковых клеток субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 28-30.

Вариантом осуществления 36 является способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 34.

Вариантом осуществления 37 является способ по варианту осуществления 36, в котором рак выбран из рака легких, такого как мелкоклеточный рак легких (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (HLL), хронического миелогенного лейкоза (HML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

Вариантом осуществления 38 является способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 28-30, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Вариантом осуществления 39 является способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 28-30, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Идентификация антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3**

Антигенсвязывающие домены, которые специфически связывают DLL3, являющиеся анти-DLL3 mAb, выделяют и секвенируют, как описано в заявке на патент PCT № PCT/US2019/029888, поданной 30 апреля, 2019, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки во всей своей полноте.

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3 представлены в таблицах 1 и 2, и CDR области для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3 представлены в таблицах 3-6.

Таблица 1: Последовательности переменных областей тяжелой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3

Наименование	VH	SEQ ID NO:
13P9A	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCASGYTFTSYVMHWVKQKP GQGPDWIGYINPYNDATKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELS SLTSEDSAVYYCARGGYDYDGDYWGQGTTLTVSS	1
5A16A	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCASGYTFTRYILHWVKLKPG QGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSR LTSYDSAVYYCARDSSGYGGAYAMDFWGQGTSTVTVSS	3
14L22A	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEK RLEWVAAINSNGGNTYYPDTVKDRFTISRDNKNTLYLQMSSL RSEDTALYYCARHRGGFYAVDYWGQGTSTVTVSS	5
10P18A	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYIDWVKQSPGK SLEWIGYIYPSNGETSYNQKFKGKATLTVDKSSSTVNMQLNSL TSEDSAVYYCARESYAMDYWGQGTSTVTVSS	7
13P11A	DVQLQESGPELVKPSQTVSLTCTVTGYSITNGNHWWSWIRQVS GSKLEWMGYISSSGSTDSNP SLKSRISITRDTSKNQLFLHLNSVT TEDIATYYCATTGTWGYFDYWGQGTTLTVSS	9
3C16A	EVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCASGYTFTSYVMHWVKQKPG QGLEWIGYVIPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSS LTSEDSAVYYCARPSNWDEFDYWGQGTTLTVSS	11
3I21A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMNWVKQRP GRGLEWIGRIHPSDSETHYNQKFKTKATLTVDKSSSTAYIQLSS LTSEDSAVYYCARYDGYFAYWGQGLTVTVSA	13
8H5A	QVTLKESGPGILQPSQTLTCSFSGFSLSTFGMGVGVWIRQPSGK GLEWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLKIANV DIADTATYYCARTYDYDEYFDYWGQGTTLTVSS	15
15K2A	QVQLQQPGAELVQPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWMKQRP GRGLEWIGRIHPSDSETHYNQKFKRTKATLTVDKSSSTAYIQLSS LTSEDSAVYYCAREGGYYWYFDVWGAGTTVTVSS	17
5A24A	EVQLQQSGAELVKPGASVKIPCKASGYKFTDFNMDWVKQSHG KSLEWIGDINPNSGGTIYNQKFKGKATLTVDKSLSTAYMELGSL TSEDTAVYYCARWDYGNFAYWGQGLTVTVSA	19
15P17A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMNWVKQRP	21

	GRGLEWIGRIHPSDSETHYNQKFKSKATLTVDKSSSTAYIQLSS LTSEDSAVYYCAREDDGYYWYFDVWGAGTTVTVSS	
15N21A	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEK RLEWVAAINSNGGRNYYPDTVKDRFTISRDNANTLYLQMSL RSEDTALYYCARHRGGYYYAMDYWGQGTSVTVSS	23

VH: переменная область тяжелой цепи

Таблица 2: Последовательности переменных областей легкой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3

Наименование	VL	SEQ ID NO:
13P9A	DIQMNQSPSSLSASLGDSITITCHASQNINWLSWYQQKPGNIPKL LIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDATYYCQQGQ SYPFTFGSGTKLEIK	2
5A16A	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQGRSPQ LLVYNAKTLPGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYQCQH FWTTPWTFGGGKLEIK	4
14L22A	NIMMTQSPSSLA VSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLA WYQ QKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDL AVYYCHQYLSSRTFGGGKLEIK	6
10P18A	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPG QPPKLLIYLA SNEGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYY CQHSRELPYTFGGGKLEIK	8
13P11A	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLSCASENVGTYVSWYQQKPEQSP KLLIYGASNRFTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCG QSYSYPFTFGSGTKLEIK	10
3C16A	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWYQQKPGQSP KALIYLA S NRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCL QHWNYPLTFGAGTKLELK	12
3I21A	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINWLA WYQQKPGNAP RLLISGATSLETGDPSRFSGSGSGKDYTLTSLQIEDVATYYCQQ YWSIPFTFGAGTKLELK	14
8H5A	DIVMTQA AFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHSNGITYFYWYLQKPG QSPQLLIYQMSNLA SGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVY YCAQNLELPFTFGSGTKLEIK	16
15K2A	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDIYGN SFMHWYQQKPG	18

	QPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYY CQQNNEDPWTFGGGKLEIK	
5A24A	DIVMTQAAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQKP GQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV YYCAQNLELPLTFGAGTKLELK	20
15P17A	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPG QPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYY CQQNHEDPWTFGGGKLEIK	22
15N21A	DIVMSQSPSSLA VSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLA VYYCQQYYTYLTFGAGTKLELK	24

VL: варибельная область легкой цепи

Таблица 3: CDR области 1-3 тяжелой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3

Наименование	HC CDR1	NO	HC CDR2	NO	HC CDR3	NO
13P9A	GYTFTSYV	25	INPYNDAT	26	ARGGYDYDGDY	27
5A16A	GYTFTRYI	28	INPYNDGT	29	ARDSSGYGGAYAMDF	30
14L22A	GFTFSSYA	31	INSNGGNT	32	ARHRGGFYAVDY	33
10P18A	GYSFTGY	34	IYPSNGET	35	ARESYAMDY	36
13P11A	GYSITNGNHW	37	ISSSGST	38	ATTGTWGYFDY	39
3C16A	GYTFTSYV	40	VIPYNDGT	41	ARPSNWDEFDY	42
3I21A	GYTFTNYW	43	IHPSDSET	44	ARYDGYFAY	45
8H5A	GFSLSTFGMG	46	IWWDDDK	47	ARTYDYDEYFDY	48
15K2A	GYTFTSYW	49	IHPSDSET	50	AREDGYYWYFDV	51
5A24A	GYKFTDFN	52	INPNSSGT	53	ARWDYGNFAY	54
15P17A	GYTFTNYW	55	IHPSDSET	56	AREDGYYWYFDV	57
15N21A	GFTFSSYA	58	INSNGGRN	59	ARHRGGYYYAMDY	60

HC: тяжелая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; NO: SEQ ID NO

CDR HC для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3, определяют с использованием способа I-MGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 4: CDR-области 1-3 легкой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3

Наименование	LC CDR1	NO	LC CDR2	NO	LC CDR3	NO
13P9A	QNINVW	61	KAS	62	QQGQSY PFT	63
5A16A	GNIHNY	64	NAK	65	QHFWTTPWT	66
14L22A	QSVLYSSNQKNY	67	WAS	68	HQYLSSRT	69
10P18A	KSVSTSGYSY	70	LAS	71	QHSRELPYT	72
13P11A	ENVGTY	73	GAS	74	GQSYSYPFT	75
3C16A	QNVRTA	76	LAS	77	LQHWNYPLT	78
3I21A	DHINNW	79	GAT	80	QQYWSIPFT	81
8H5A	KSLLSHNGITY	82	QMS	83	AQNLELPFT	84
15K2A	ESVDIYGNSF	85	LAS	86	QQNNEDPWT	87
5A24A	KSLLSHNGITY	88	QMS	89	AQNLELPLT	90
15P17A	ESVDSYGNSF	91	LAS	92	QQNHEDPWT	93
15N21A	QSLLYSSNQKNY	94	WAS	95	QQYYTYLT	96

LC: легкая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; NO: SEQ ID NO

LC CDR для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3, определяют с использованием способа IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 5: CDR-участки 1-3 тяжелой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3

Наименование	HC CDR1	NO	HC CDR2	NO	HC CDR3	NO
13P9A	SYVMH	97	YINPYNDATKYNEKFK G	98	GGYDYDGDY	99
5A16A	RYILH	100	YINPYNDGTYKYNEKFK G	101	DSSGYGGAYAMD F	102
14L22A	SYAMS	103	AINSNGGNTYYPDTVK D	104	HRGGFYAVDY	105
10P18A	GYIID	106	YIYPSNGETSYNQKFKG	107	ESYAMDY	108
13P11A	NGNHW WS	109	YISSSGSTDSNP SLKS	110	TGTWGYFDY	111
3C16A	SYVMH	112	YVIPYNDGTYKYNEKFK G	113	PSNWDEFDY	114

3I21A	NYWMN	115	RIHPSDSETHYNQKFKT	116	YDGYFAY	117
8H5A	TFGMGV G	118	HIWWDDDKYYNPALKS	119	TYDYDEYFDY	120
15K2A	SYWMN	121	RIHPSDSETHYNQKFRF	122	EDGYYWYFDV	123
5A24A	DFNMD	124	DINPNSGGTIYNQKFKG	125	WDYGNFAY	126
15P17 A	NYWMN	127	RIHPSDSETHYNQKFKS	128	EDGYYWYFDV	129
15N21 A	SYAMS	130	AINSNNGGRNYYPDTVK D	131	HRGGYYYAMDY	132

HC: тяжелая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; NO: SEQ ID NO

HC CDR для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3 определяют с использованием способа Kabat (Elvin A. Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. 1991).

Таблица 6: CDR-участки 1-3 легкой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают DLL3

Наименование	LC CDR1	NO	LC CDR2	NO	LC CDR3	NO
13P9A	HASQNINVWLS	133	KASNLHT	134	QQGQSYPF	135
5A16A	RASGNIHNYLA	136	NAKTLPY	137	QHFWTTPWT	138
14L22A	KSSQSVLYSSNQKNYLA	139	WASTRES	140	HQYLSSRT	141
10P18A	RASKSVSTSGYSYMH	142	LASNLES	143	QHSRELPYT	144
13P11A	KASENVGTYVS	145	GASNRFT	146	GQSYSPFT	147
3C16A	KASQNVRTAVA	148	LASNRHT	149	LQHWNYPLT	150
3I21A	KASDHINNWLA	151	GATSLET	152	QQYWSIPFT	153
8H5A	RSSKSLHNSGITYFY	154	QMSNLAS	155	AQNLELPFT	156
15K2A	RASESVDIYGNSFMH	157	LASNLES	158	QQNNEDPWT	159
5A24A	RSSKSLHNSGITYLY	160	QMSNLAS	161	AQNLELPLT	162
15P17A	RASESVDIYGNSFMH	163	LASNLES	164	QQNHEDPWT	165
15N21A	KSSQSLLYSSNQKNYLA	166	WASTRES	167	QQYYTYLT	168

LC: легкая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; NO: SEQ ID NO

LC CDR, для антигенсвязывающие домены, которые специфически связывают DLL3 определяют с использованием способа Kabat (Elvin A. Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. 1991).

### Пример 2: Гуманизация анти-DLL3 mAb мыши

Анти-DLL3 mAb мыши гуманизируют для снижения потенциала иммуногенности

при использовании у людей, как описано в заявке на патент PCT № PCT/US2019/029888, поданной 30 апреля 2019 г., которая включена в настоящее описание в качестве ссылки полностью. Последовательности гуманизованных VH и VL областей приведены в таблицах 7 и 8. Гуманизованные VH и VL называют следующим образом: 13P9-H1 относится к последовательности H1 гуманизованной VH для mAb мыши 13P9A; 13P9-L1 относится к последовательности L1 гуманизованной VL для mAb 13P9A мыши. Все остальные гуманизованные области VH и VL принимают то же правило наименования.

Таблица 7: Последовательности гуманизованной переменной области тяжелой цепи анти-DLL3 mAb

Дизайн	VH	SEQ ID NO:
13P9-H1	EVRLSQSGGQMKKPGESMRLSCRASGYTFTSYVMHWVRQAPG RRPEWIGYINPYNDATKYARKFQGRATLTSDKYSDTAFLELRSL TSDDTAVYYCARGGYDYDGDYWGRGAPVTVSS	170
5A16-H1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTRYILHWVRLAPG QGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSTNTAYMELSS LRSEDTAVYYCARDSSGYGGAYAMDFWGQGLTVTVSS	175
5A16-H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYILHWVRLAPG QGLEWIGYINPYNDGTYNQKFKGKATLTSDKSTNTAYMELSS LRSEDTAVYYCARDSSGYGGAYAMDFWGQGLTVTVSS	176
5A16-H3	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCASGYTFTRYILHWVRLAPG QGLEWIGWINPYNDGTQYNEKFKGRATLTSDKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARDSSGYGGAYAMDFWGQGTTVTVSS	177
5A16-H4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYILHWVRLAPG QGLEWIGWINPYNDGTQYNEKFKGRATLTSDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARDSSGYGGAYAMDFWGQGTTVTVSS	178
10P18-H1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSFTGYYIDWVRQAPG QGLEWIGYIYPSNGETSYNQKFKGRATLTVDKSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARESYAMDYWGQGLTVTVSS	179
10P18-H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGYYIDWVRQAPG QGLEWIGYIYPSNGETSYNQKFKGRATLTVDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARESYAMDYWGQGTTVTVSS	180
10P18-H3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYMDWVRQAPG KGLEWIGDIYPSNGETIYNQEFKGRATLSVDKSKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCARESYAMDYWGQGLTVTVSS	181
10P18-H4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYMSWVRQAPG	182

	KGLEWIGDIYPSNGETIYNQSFKGRATLSVDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARESYAMDYWGQGLTVTVSS	
3C16-H1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTSYVLHWVRQAPG QGLEWIGWVIPYNDGTQYNEKFKGRATLTSDKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARPSNWDEFDYWGQGTTVTVSS	183
3C16-H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYVLHWVRQAPG QGLEWIGWVIPYNDGTYNEKFKGRATLTSDKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARPSNWDEFDYWGQGLTVTVSS	184
3C16-H3	EVQFVQSGAEVKKPGASVRVSCEASGYTFTSYVLQWVRQAPG QRLEWIGWVIPYNDGTSYAPQFQGRATLTSDKYTSTAYMHFK NLRSDDTAIYYCARPSNWDEFDYWGQGLTVTVSS	185
3I21-H1	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTASGYTFTNYWVSWVRQPPGK ALEWIGHIHPDSETRYNPSLKS RATLTVDKSKNQAVLTMNTM DPVDTATYYCARYDGYFAYWGQGLTVTVSS	186
3I21-H2	QVTLESGPALVKPTQTLTLTCTASGYTFTNYWVSWVRQPPGK ALEWIGHIHPDSETRYNPSLKS RATLTVDTSKNQAVLTMNTM DPVDTATYYCARYDGYFAYWGQGLTVTVSS	187
3I21-H3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFTNYWMSWVRQAPG KGLEWIGAIHPDSEYYADSVKGRATLSVDKSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARYDGYFAYWGQGLTVTVSS	188
3I21-H4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFTNYWMSWVRQAPG KGLEWIGAIHPDSEYYADSVKGRATLSVDNSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARYDGYFAYWGQGLTVTVSS	189
3I21-H5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFTNYWMSWVRQAPG KGLEWIGAIHPDSEYYADSVKGRATLSVDNSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARYDAYFAYWGQGLTVTVSS	190
15K2-H1	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLS CAASGYTFTSYWMHWMRQAPG KGLEWIGGIHPDSETGYADSVKGRATLSVDKAKNSAYLQMNS LRAEDMALYYCAREDDGYWYFDVWGQGTMTVTVSS	191
15K2-H2	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCRASGYTFTSYWIGWMRQMPG KGLEWIGIIHPDSETRYSPSFQGGQATLSVDKSINTAYLQWSSLK ASDTAMYCYCAREDDGYWYFDVWGQGLTVTVSS	192
15K2-H3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTSYWISWVRQAPG QGLEWIGSIHPDSETNYAQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSL	193

	RSEDTAVYYCAREDGYWYFDVWGQGLTVTVSS	
5A24-H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTDFNMHWVRQAP GQGLEWIGNINPNSGGTNYAEKFKNRATLTVDKSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARWDYGNFAYWGQGLTVTVSS	194
5A24-H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTDFNMDWVRQAP GQGLEWIGNINPNSGGTNYAEKFKNRATLTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARWDYGNFAYWGQGLTVTVSS	195
5A24-H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTDFNMHWVRQAP GQGLEWIGEINPNSGGTTYNEKFKGKATLTVDKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARWDYGNFAYWGQGLTVTVSS	196
5A24-H4	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFTDFNMHWVRQAP GQGLEWIGYINPNSGGTEYNQKFKDKATLTVDKSTNTAYMELS SLRSEDTAVYYCARWDYGNFAYWGQGLTVTVSS	197
15P17-H1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWISWVRQAPG QGLEWIGSIHPSDSETNYAQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCAREDGYWYFDVWGQGLTVTVSS	198
15P17-H2	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWISWVRQAPG QGLEWIGSIHPSDSETNYAQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCAREDGYWYFDVWGQGLTVTVSS	199
15P17-H3	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTASGYTFTNYWMNWVRQPPG KALEWIGRIHPSDSETHYNQFKSRATLTVDKSKNQAVLTMTN MDPVDATYYCAREDGYWYFDVWGQGLTVTVSS	200
15P17-H4	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTASGYTFTNYWMNWVRQPPG KALEWIGRIHPSDSETHYNQFKSRATLTVDTSKNQAVLTMTN MDPVDATYYCAREDGYWYFDVWGQGLTVTVSS	201
15N21-H1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAINSNGGRNYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARHRGGYYYAMDYWGQGLTVTVSS	202
15N21-H2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAINSNGGRNYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARHRGGYYYAMDYWGQGLTVTVSS	203
15N21-H3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVASAINSNGGRNYYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARHRGGYYYAMDYWGQGLTVTVSS	204

8H5-H1	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFGMGVSWIRQPPG KALEWLAHIWWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTMN MDPVDATYYCARTYDYDEYFDYWGQGLVTVSS	205
8H5-H2	QVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFGMGVSWIRQPPG KALEWLAHIWWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTMN MDPVDATYYCARTYDYDEYFDYWGQGLVTVSS	206
8H5-H3	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTFSGFSLSTFGMGVSWIRQPPG KALEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSKSQVVLTMN MDPVDATYYCARTYDYDEYFDYWGQGLVTVSS	207
14L22-H1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAINSNGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARHRGGFYAVDYWGQGLVTVSS	208
14L22-H2	QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVAAINSNGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARHRGGFYAVDYWGQGLVTVSS	209
3I21-H6	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCKASGYTFTNYWMNWVRQPPG KALEWIGRIHPSDSETHYNPSLKSRLTLTVDKSKNQAVLTMN MDPVDATYYCARYDGYFAYWGQGLVTVSS	248
3I21-H7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPG KGLEWIGRIHPSDSETHYNDSVKGRATLSVDKSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARYDGYFAYWGQGLVTVSS	249
15K2-H4	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYWMNWMRQAPG KGLEWIGRIHPSDSETHYNDSVKGRATLSVDKAKNSAYLQMNS LRAEDMALYYCAREGGYYWYFDVWGQGMTVTVSS	250
15K2-H5	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYTFTSYWMNWMRQMPG KGLEWIGRIHPSDSETHYNPSFQGGATLSVDKSKNTAYLQWSSL KASDTAMYVCAREGGYYWYFDVWGQGLVTVSS	251
15K2-H6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWMNWMRQAP GGGLEWIGRIHPSDSETHYNQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELS SLRSEDVAVYYCAREGGYYWYFDVWGQGLVTVSS	252
5A24-H5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYKFTDFNMDWVRQAP GGGLEWIGDINPNSGGTIYNEKFKNRATLTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARWDYGNFAYWGQGLVTVSS	253
8H5-H4	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCSFSGFSLSTFGMGVSWIRQPPG	254

	KALEWLAHIWWDDDKYYNP SLKSRLTITKDT SKNQVVL TMTN MDPVD TATYYCARTYDYDEYFDYWGQGLVTVSS	
8H5-H5	EVT LKESGPVLVKPTETLTLTCSFSGFSLSTFGMGVGVWIRQPPG KALEWLAHIWWDDDKYYNP ALKSRLTISKDT SKSQVVL TMTN MDPVD TATYYCARTYDYDEYFDYWGQGLVTVSS	255

Таблица 8: Последовательности гуманизированных переменных областей легкой цепи анти-DLL3 mAb

Дизайн	VL	SEQ ID NO:
13P9-L1	EIVMTQSPGTL S LSPGERATLSCHASQNIN VWLSWYQQKPGQAP RLLIYKASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQ GQSY PFTFGQGTKVEIK	171
13P9-L2	EIVLTQSPGTL S LSPGERATLSCHASQNIN VWLSWYQQKPGQAP RLLIYKASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQ GQSY PFTFGQGTKVEIK	172
13P9-L3	EIVMTQSPATLS LSPGETAII SCHASQNIN VWLSWYQQRPGQAPR LLIYKASNLHTGIPDRFSGSGWGTDFNLSISNLESGDFGVYYCQQ GQSY PFTFGQGTKVEIK	173
13P9-L4	EIVMTQSPATLS LSPGETAII SCHASQNIN VWLSWYQQRPGQAPR LLIYKASNLHTGIPDRFSGSGWGTDFNLSISNLESGDFGVYYCQQ GQSY PWTFGQGTKVEIK	174
5A16-L1	DIQMTQSPSTLSASV GDRVTITCRASGNIHNYLAWYQQKPGKAP KLLVYNAKTL PYGVPARFSGSGSGTEYTLTISLQPD DFATYYC QHFWTTPWTFGQGTKVEVK	210
5A16-L2	DIQMTQSPSTLSASV GDRVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQ GKAP KLLVYNAKTL PYGVPARFSGSGSGTEYTLTISLQPD DFATYYC QHFWTTPWTFGGGTKVEVK	211
5A16-L3	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCKASGNIHNYLAWYQQKPGKAP KLLVYNAKYRYS GVP SRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC QHFWTTPWTFGQGTKVEIK	212
10P18-L1	DIQLTQSPSSVSASV GDRVTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY YCQHSREL PYTFGQGTKVEIK	213
10P18-L2	DIVLTQSPDSLAVSL GERATINCRASKSVSTSGYSYLA WYQQKP GQPPKLLIYLASNLESGV PDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAV	214

	YYCQHSRELPYTFGGGTKVEIK	
10P18-L3	RIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASKSVSTSGYSYVHWYQQKP GKAPKLLIYLASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQHSRELPYTFGQGTKVEIK	215
3C16-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVRTAVAWYQQKPGKA PKALIYLASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCL QHWNYPLTFGQGTKVEIK	216
3C16-L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVRTALAWYQQKPGKAP KALIYLANRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCLQ HWNYPLTFGQGTKVEIK	217
3C16-L3	EIVMTQSPVTVSVSRGGTATLSCRASQNVRTAVAWYQQKPGQT PRALIYLASTRASGVPERFSGSGFGTDFTLTISGLQPEDVAIYFCL QHWNYPLTFGQGTKVEIK	218
3I21-L1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASDHINNWMAWYQQKPGQP PKLLISGATNPESGVPRFSGSGSGKDYTLTISSLQAEDVAVYYC QQYWSIPFTFGQGTKVEIK	219
3I21-L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASDHINNWLAWYQQKPGQP PKLLISGATTRESGVPRFSGSGSGKDYTLTISSLQAEDVAVYYC QQYWSIPFTFGQGTRLEIK	220
15K2-L1	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESVDIYGNSFLHWYQQKPG KVPKLLIYLASSLESGVPSRFSGSGSRTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQNNEDPWTFGPGTKVDIK	221
15K2-L2	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESVDIYGNSFLAWYQQKPG KVPKLLIYLASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQNNEDPWTFGPGTKVDIK	222
15K2-L3	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDIYGNSFLHWYQQKPG KTPKLLIYLASSLQSGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQNNEDPWTFGQGTKVEIK	223
15K2-L4	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDIYGNSFLHWYQQKPG KTPKLLIYLASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQNNEDPWTFGQGTKVEIK	224
5A24-L1	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPG QSPQLLIYQMSDRFSGVPRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDGVVY YCAQNLELPLTFGQGTKVEIK	225

5A24-L2	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKP GQSPKLLIYQMSYRFSGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCAQNLELPLTFGQGTKLEIK	226
5A24-L3	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSSSKSLLSNGITYMYWYQQK GKAPKLLIYQMSNLAGVPARFSSSGSGTEFTLTISLQPDFFAT YYCAQNLELPLTFGQGTKVEVK	227
5A24-L4	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSSSKSLLSNGITYLAWYQQK GKAPKLLIYQMSNLAGVPARFSSSGSGTEFTLTISLQPDFFAT YYCAQNLELPLTFGQGTKVEVK	228
15P17-L1	DIQLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASESVDSYGNSFLHWYQQK GKAPKLLIYLASSLQSGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDFATY YCQQNHEDPWTFGQGTKVEIK	229
15P17-L2	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGNSFMHWYQQK GQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISLQAEDVAV YYCQQNHEDPWTFGQGTKVEIK	230
15P17-L3	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGNSFMHWYQQK GQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAV YYCQQNHEDPWTFGQGTKVEIK	231
15N21-L1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCQQYYTYLTFGQGTKVEIK	232
15N21-L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCQQYYTYLTFGQGTRLEIK	233
15N21-L3	DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCMSSQSLLYSSNQKNYMAWYQ QKPGQAPRLLIYWASTRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQEPEDF AVYYCQQYYTYLTFGQGTKVEIK	234
8H5-L1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSKSLLSNGITYMYWYQQK PGQPPKLLIYQMSNPESGVPDRFSSSGSGTDFTLTISLQAEDVAV YYCAQNLELPFTFGQGTKVEIK	235
8H5-L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSKSLLSNGITYMYWYQQK PGQPPKLLIYQMSNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCAQNLELPFTFGQGTKVEIK	236
8H5-L3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSKSLLSNGITYMYWYQQK	237

	PGQPPKLLIYQMSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCAQNLELPFTFGQGTKVEIK	
8H5-L4	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLHNSNGITYLYWYQQKP GQAPRLLIYQMSTLQSGIPARFSSSGSGTDFTLTISLPEPDAVY YCAQNLELPFTFGQGTKLEIK	238
14L22- L1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCHQYLSSRTFGQGTRLEIK	239
14L22- L2	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQ KPGQAPRLLIYWASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISLPEPDA TYCHQYLSSRTFGQGTKVEIK	240
3I21-L3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASDHINNWLAWYQQKPGQP KLLISGATSLESGVPDRFSGSGSGKDYTLTISSLQAEDVAVYYCQ QYWSIPFTFGQGTKVEIK	256
3I21-L4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASDHINNWLAWYQQKPGQP KLLISGATSLESGVPDRFSGSGSGKDYTLTISSLQAEDVAVYYCQ QYWSIPFTFGQGTRLEIK	257
15K2-L5	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESVDIYGNSFMHWYQQKP GKVPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSRTEFTLTISLQPDDFATY YCQQNNEDPWTFGPGTKVDIK	258
15K2-L6	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDIYGNSFMHWYQQKPG KTPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSRDFTLTISLQPEDFATYY CQQNNEDPWTFGQGTKVEIK	259
5A24-L5	DIVMTQSPLSLPVTGPASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQKPG QSPQLLIYQMSNLAGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCAQNLELPLTFGQGTKVEIK	260
5A24-L6	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQKP GQSPKLLIYQMSNLAGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YCAQNLELPLTFGQGTKLEIK	261
5A24-L7	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRSSKSLHNSNGITYLYWYQQKP GKAPKLLIYQMSNLAGVPARFSSSGSGTEFTLTISLQPDDFAT YCAQNLELPLTFGQGTKVEIK	262
8H5-L5	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSKSLHNSNGITYFYWYQQKP GQPPKLLIYQMSNLAGVPDRFSSSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV	263

	YYCAQNLELPFTFGQGTKVEIK	
8H5-L6	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLHNSGITYFYWYQQKP GQAPRLLIYQMSNLAGIPARFSSSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVY YCAQNLELPFTFGQGTKLEIK	264

Гуманизированные VH и VL области сливают с константными областями тяжелой цепи и легкой цепи каппа IgG1 человека, соответственно. Гуманизированные mAb называют следующим образом: 13P9-H1L1 относится к mAb с 13P9-H1 вариабельной областью тяжелой цепи и 13P9-L1 вариабельной областью легкой цепи; все другие гуманизированные mAb принимают то же правило наименования. Химерные антитела получают путем слияния областей VH и VL антител мыши с константными областями тяжелой цепи и легкой цепи каппа IgG1 человека, соответственно. 3C16 относится к химерному антителу, полученному с использованием 3C16A; все другие химерные mAb принимают то же правило наименования.

Гуманизированные mAb тестируют на их способность связывать DLL3 в анализе ELISA. Результаты показаны на фиг. 1A-1Q.

### **Пример 3: Превращение химерных и гуманизированных mAb в одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv)**

Химерные и гуманизированные mAb превращают в были преобразованы в scFv, каждый из которых состоит из одной VH и одной VL с  $(G_4S)_n$  линкером между ними (где «n» равно числу  $G_4S$  повторов). Либо VH, либо VL область помещают на N-конце слитого белка, чтобы определить наиболее эффективные дизайны scFv. Последовательности сконструированных scFv показаны в таблице 9. scFv были названы следующим образом: 13P9-H1 $(G_4S)_3$ L2 относится к scFv с 13P9-H1 вариабельной областью тяжелой цепи,  $(G_4S)_3$  линкером и 13P9-L2 вариабельную областью легкой цепи; 5A16-H $(G_4S)_3$ L относится к scFv с 5A16A вариабельной областью тяжелой цепи,  $(G_4S)_3$  линкером и 5A16A вариабельной областью легкой цепи; все остальные scFv используют то же правило наименования.

Таблица 9: Последовательности гуманизированных scFv, которые специфически связывают DLL3

<b>Наименование</b>	<b>ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
13P9-H1 $(G_4S)_3$ L2	EVRLSQSGGQMKKPGESMRLSCRASGYTFTSYVMHWVRQA PGRRPEWIGYINPYNDATKYARKFQGRATLTSDKYSDTAFLE LRSLTSDDTAVYYCARGGYDYDGDYWGRGAPVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCHASQNINV WLSWYQQKPGQAPRLLIYKASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQGQSYPTFTFGQGTKVEIK	241
13P9-	EVRLSQSGGQMKKPGESMRLSCRASGYTFTSYVMHWVRQA	242

H1(G <sub>4</sub> S) <sub>4</sub> L2	PGRRPEWIGYINPYNDATKYARKFQGRATLTSDKYSDTAFLE LRSLTSDDTAVYYCARGGYDYDGDYWGRGAPVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCHAS QNINWLSWYQQKPGQAPRLLIYKASNLHTGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQSYPFTEFGQGTKVEIK	
13P9- L2(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> H1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCHASQNINWLSWYQQKPGQ APRLLIYKASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQGQSYPFTEFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVRLS QSGGQMKKPGESMRLSCRASGYTFTSYVMHWVRQAPGRRP EWIGYINPYNDATKYARKFQGRATLTSDKYSDTAFLELRSLT SDDTAVYYCARGGYDYDGDYWGRGAPVTVSS	243
5A16- H(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> L	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTRYILHWVKLKP GQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYME LSRLTSYDSA VYYCARDSSGYGGAYAMDFWGQGTSVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASG NIHNYLAWYQQKQGRSPQLLVYNAKTLPGVPSRFSGSGSG TQYSLKINSLQPEDFGSYQCQHFWTTPWTFGGGKLEIK	244
15K2- H(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> L	QVQLQQPGAELVQPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWMKQ RPGRGLEWIGRIHPSDSETHYNQKFRTKATLTVDKSSSTAYIQ LSSLTSEDSA VYYCAREDGYWYFDVWGAGTTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSNIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDI YGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRT DFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPWTFGGGKLEIK	245
15P17- H(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> L	QVQLQQPGAELVQPGASVKLSCKASGYTFTNYWMNWMKQ RPGRGLEWIGRIHPSDSETHYNQKFKSKATLTVDKSSSTAYIQ LSSLTSEDSA VYYCAREDGYWYFDVWGAGTTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSNIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDS YGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRT DFTLTIDPVEADDAATYYCQQNHEDPWTFGGGKLEIK	246
15N21- H(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> L	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTP EKRLWVAAINSNGGRNYYPDTVKDRFTISRDNKNTLYLQ MSSLRSEDALYYCARHRGGYYYAMDYWGQGTSVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSDIVMSQSPSLAVSVGEKVTMSCKSSQSL LYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYTYLTFGAGTKLELK	247

15K2- H5(G4S) <sub>3</sub> L5	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYTFTSYWMNWMRQM PGKGLEWIGRIHPSDSETHYNPSFQGQATLSVDKSINTAYLQ WSSLKASDTAMYICAREGGYYWYFDVWGGQTLVTVSSGG GGSGGGGGSGGGGSDIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESVD IYGNSFMHWYQQKPGKVPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSR TEFTLTISLQPDDEFATYYCQQNNEDPWTFGPGTKVDIK	265
15K2- H4(G4S) <sub>3</sub> L5	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCKASGYTFTSYWMNWMRQA PGKGLEWIGRIHPSDSETHYNDSVKGRATLSVDKAKNSAYL QMNSLRAEDMALYYCAREGGYYWYFDVWGGQTMVTVSSG GGSGGGGGSGGGGSDIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESV DIYGNSFMHWYQQKPGKVPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGS RTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQNNEDPWTFGPGTKVDIK	266
3C16- H2(G4S) <sub>3</sub> L3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVLHWVRQA PGQGLEWIGWVIPYNDGTYNEKFKGRATLTSKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARPSNWDEFDYGWGGQTLVTVSSGGGG SGGGGGSGGGGSEIVMTQSPVTVSVSRGGTATLSCRASQNVRT AVAWYQQKPGQTPRALIYLASTRASGVPERFSGSGFGTDFTL SISGLQPEDVAIYFCLQHWNYPLTFGQGTKVEIK	267
15N21- H1(G4S) <sub>3</sub> L1	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVAAINSNGGRNYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHRGGY YYAMDYWGQGLVTVSSG GGSGGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS LLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYTYLTFGQGTKVEI K	268
15N21- H1(G4S) <sub>4</sub> L1	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVAAINSNGGRNYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHRGGY YYAMDYWGQGLVTVSSG GGSGGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYTYLTFGQ GTKVEIK	269
15N21- H3(G4S) <sub>3</sub> L1	EVQLVES GGGLVQP GGSLRLS CVASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVASINSNGGRNYYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHRGGY YYAMDYWGQGLVTVSSG	270

	GGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS LLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTYLTFGQGTKVEI K	
5A16- H1(G4S) <sub>3</sub> L1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTRYILHWVRLAP GQGLEWIGYINPYNDGTTYNEKFKGKATLTSDKSTNTAYME LSSLRSEDVAVYYCARDSSGYGGAYAMDFWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASG NIHNYLAWYQQKPGKAPKLLVYNAKTLPGVPPARFSGSGSG TEYTLTISSLQPDFATYYCQHFWTTPWTFGQGTKVEVK	271
5A16- H1(G4S) <sub>4</sub> L1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTRYILHWVRLAP GQGLEWIGYINPYNDGTTYNEKFKGKATLTSDKSTNTAYME LSSLRSEDVAVYYCARDSSGYGGAYAMDFWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASGNIHNYLAWYQQKPGKAPKLLVYNAKTLPGVPPARFS GSGSGTEYTLTISSLQPDFATYYCQHFWTTPWTFGQGTKVE VK	272
5A16- H2(G4S) <sub>3</sub> L3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYILHWVRLAP GQGLEWIGYINPYNDGTTYNQKFKGKATLTSDKSTNTAYME LSSLRSEDVAVYYCARDSSGYGGAYAMDFWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASG NIHNYLAWYQQKPGKAPKLLVYNAKYRYSRVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPDFATYYCQHFWTTPWTFGQGTKVEIK	273
5A16- H4(G4S) <sub>3</sub> L3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYILHWVRLAP GQGLEWIGWINPYNDGTYNEKFKGRATLTSDTSTSTAYME LSSLRSEDVAVYYCARDSSGYGGAYAMDFWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASG NIHNYLAWYQQKPGKAPKLLVYNAKYRYSRVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPDFATYYCQHFWTTPWTFGQGTKVEIK	274
5A16- H4(G4S) <sub>4</sub> L3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYILHWVRLAP GQGLEWIGWINPYNDGTYNEKFKGRATLTSDTSTSTAYME LSSLRSEDVAVYYCARDSSGYGGAYAMDFWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CKASGNIHNYLAWYQQKPGKAPKLLVYNAKYRYSRVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPDFATYYCQHFWTTPWTFGQGTKVEI	275

	IK	
8H5- H5(G4S) <sub>3</sub> L5	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCSFSGFSLSTFGMGVGVWIRQPP GKALEWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDTSKSQVVLT MTNMDPVDATATYYCARTYDYDEYFDYWGQGTLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSKSL LHNSGITYFYWYQQKPGQPPKLLIYQMSNLAGVDPDRFSSSG SGTDFTLTISLQAEDVAVYYCAQNLELPFTFGQGTKVEIK	276
8H5- H5(G4S) <sub>3</sub> L6	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCSFSGFSLSTFGMGVGVWIRQPP GKALEWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDTSKSQVVLT MTNMDPVDATATYYCARTYDYDEYFDYWGQGTLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSL HSNGITYFYWYQQKPGQAPRLLIYQMSNLAGIPARFSSSGS GTDFTLTISLPEPDAVYYCAQNLELPFTFGQGTKLEIK	277
3I21- H7(G4S) <sub>3</sub> L3	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCKASGYTFTNYWMNWVRQA PGKLEWIGRIHPSDSETHYND SVKGRATLSVDKSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARYDGYFAYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASDHINNWL AWYQQKPGQPPKLLISGATSLESGVPDRFSGSGSKDYTLTIS SLQAEDVAVYYCQQYWSIPFTFGQGTKVEIK	278
10P18- H1(G4S) <sub>3</sub> L2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTGYYIDWVRQAP GQGLEWIGYIYPSNGETSYNQKFKGRATLTVDKSTSTVYMEL SSLRSED TAVYYCARESYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYS YLAWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQHSRELPYTFGGGTKVEIK	279
10P18- H2(G4S) <sub>3</sub> L2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYIDWVRQAP GQGLEWIGYIYPSNGETSYNQKFKGRATLTVDTSTSTVYMEL SSLRSED TAVYYCARESYAMDYWGQGT TTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYS YLAWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQHSRELPYTFGGGTKVEIK	280
5A24- H5(G4S) <sub>3</sub> L5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTDFNMDWVRQA PGQGLEWIGDINPNSGGTIYNEKFKNRATLTVDKSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARWDYGNFAYWGQGTLVTVSSGGGGG GGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSN	281

	GITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGQGTKVEIK	
5A24- H5(G4S) <sub>3</sub> L7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFTDFNMDWVRQA PGQGLEWIGDINPNSGGTIYNEKFKNRATLTVDKSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARWDYGNFAYWGQGLTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRSSKSLLSN GITYLYWYQQKPGKAPKLLIYQMSNLASGVPARFSSSGSGTE FTLTISLQPDDEFATYYCAQNLELPLTFGQGTKVEVK	282
15P17- H4(G4S) <sub>3</sub> L2	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTASGYTFTNYWMNWVRQPP GKALEWIGRIHPSDSETHYNQKFKSRATLTVDTSKNQAVLT MTNMDPVDATATYYCAREGGYVYFDVWGQGLTVTVSSGG GGSGGGGGSGGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCREASESV DSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGS RTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQNHEDPWTFGQGTKVEIK	283
15P17- H3(G4S) <sub>3</sub> L1	EVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTASGYTFTNYWMNWVRQPP GKALEWIGRIHPSDSETHYNQKFKSRATLTVDKSKNQAVLT MTNMDPVDATATYYCAREGGYVYFDVWGQGLTVTVSSGG GGSGGGGGSGGGSDIQLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASESV DSYGNSFLHWYQQKPGKAPKLLIYLASSLQSGVPSRFSGS	284
14L22- H1(G4S) <sub>3</sub> L1	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVAAINSNGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHRGGFYAVDYWGQGLTVTVSSG GGSGGGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS VLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCHQYLSSRTFGQGRLEIK	285
14L22- H2(G4S) <sub>3</sub> L1	QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVAAINSNGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHRGGFYAVDYWGQGLTVTVSSG GGSGGGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS VLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCHQYLSSRTFGQGRLEIK	286

**Пример 4: ELISA анализ связывания scFv**

Слитые белки scFv, слитые с одним (G<sub>4</sub>S) линкером и Fc IgG4 человека (в порядке scFv, G<sub>4</sub>S линкер и Fc от N-конца до C-конца) тестируют на их способность связывать DLL3 человека с использованием способа ELISA, как описано в заявке РСТ №

PCT/US2019/029888, поданной 30 апреля 2019 г., которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Результаты анализа ELISA показаны на фиг. 2А-2І.

#### **Пример 5: FACS анализ гуманизированных scFv**

Связывание ScFv и Fc слитых белков с huDLL3 на поверхности клеток HEK293, измеряют с применением FACS с использованием способа, описанного в заявке PCT № PCT/US2019/029888, поданной 30 апреля 2019 года, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки, с одной модификацией, заключающейся в том, что йодид пропидия (PI) (Thermo Fisher Cat#: P3566) добавляют вместе с вторичным антителом, чтобы маркировать мертвые клетки. Результаты связывания показаны на фиг. 3А-3F.

#### **Пример 6: Конструирование конструкций химерного антигенного рецептора, содержащего анти-DLL3 моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.**

Для конструирования CAR, mAb превращают в scFv с использованием VH, VL и (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub> линкера, и scFv сливают с N-концом шарнира и трансмембранных доменов, полученных из CD8 $\alpha$  человека (ак 114-188, Boursier JP et al., J Biol Chem. 1993; 268(3): 2013-20). С-концевой внутриклеточный сигнальный домен CAR конструируют слиянием с внутриклеточным костимулирующим доменом CD28 (ак 162-202, Aruffo A and Seed B, Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84(23):8573-7), затем с активационным доменом CD3 дзета-цепи (ак 52-162, Letourneur F and Klausner RD, Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88(20):8905-9). Последовательность ДНК, кодирующую CAR, собирают и клонируют в вектор экспрессии (либо ретровирусный, лентивирусный, экстрахромосомный или интегрированный для создания конструкции CAR с использованием стандартных методов клонирования молекулярной биологии).

#### **Пример 7: Анализ уничтожения опухолевых клеток для оценки активности CAR Т-клеток.**

CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяют с использованием набора для выделения Pan T (Miltenyi Biotech, Cat#: 130-096-535), и активируют в течение 3 дней с применением Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher, Cat#: 11131D) в среде AIM V (ThermoFisher, Cat#: 12055083), содержащей 10% FBS, в соответствии с инструкциями производителя. Затем активные Т-клетки непрерывно культивируют в течение менее недели в среде AIM V, содержащей 10% FBS и 300 МЕ/мл IL2 (R&D systems, Cat#: 202-IL-050) и временно трансфицируют плазмидой 13P9-H1(G4S)<sub>3</sub>L2 CAR экспрессии через электропорацию с получением CAR Т-клеток. Активные Т-клетки также ложно трансфицируют и используют в качестве отрицательного контроля. После 48-часового периода восстановления, CAR Т-клетки и активные Т-клетки используют в качестве эффекторных клеток. Клетки-мишени HEK293-DLL3 окрашивают CFSE (ThermoFisher, Cat#: C34554) и культивируют совместно с CAR Т-клетками или активными Т-клетками в течение 24 часов при соотношении Е/Т (эффектор/мишень) 5:1. Затем клетки окрашивают

PI (ThermoFisher, Cat#: P3566) и аннексином V (Biolegend, Cat#: 640924) и анализируют проточной цитометрией (Attune NxT). Подсчитывают только CFSE-положительные клетки. Долю лизиса опухолевых клеток рассчитывают как долю PI и/или аннексин V-положительных клеток, и она показана на фиг.4.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что изменения могут быть внесены в варианты осуществления, описанные выше, без отступления от их широкой изобретательской концепции. Поэтому понятно, что это изобретение не ограничивается конкретными описанными вариантами осуществления, но предназначено для охвата модификаций в пределах сути и объема настоящего изобретения, как определено в настоящем описании.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит:

(1) внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который специфически связывает DLL3;

(2) шарнирную область;

(3) трансмембранную область; и

(4) внутриклеточный сигнальный домен.

2. Выделенный полинуклеотид по п.1, в котором антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

(1) SEQ ID NO: 25, 26, 27, 61, 62 и 63, соответственно;

(2) SEQ ID NO: 28, 29, 30, 64, 65 и 66, соответственно;

(3) SEQ ID NO: 31, 32, 33, 67, 68 и 69, соответственно;

(4) SEQ ID NO: 34, 35, 36, 70, 71 и 72, соответственно;

(5) SEQ ID NO: 37, 38, 39, 73, 74 и 75, соответственно;

(6) SEQ ID NO: 40, 41, 42, 76, 77 и 78, соответственно;

(7) SEQ ID NO: 43, 44, 45, 79, 80 и 81, соответственно;

(8) SEQ ID NO: 46, 47, 48, 82, 83 и 84, соответственно;

(9) SEQ ID NO: 49, 50, 51, 85, 86 и 87, соответственно;

(10) SEQ ID NO: 52, 53, 54, 88, 89 и 90, соответственно;

(11) SEQ ID NO: 55, 56, 57, 91, 92 и 93, соответственно; или

(12) SEQ ID NO: 58, 59, 60, 94, 95 и 96, соответственно ;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

3. Выделенный полинуклеотид по п.1, в котором антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

(1) SEQ ID NO: 97, 98, 99, 133, 134 и 135, соответственно;

(2) SEQ ID NO: 100, 101, 102, 136, 137 и 138, соответственно;

(3) SEQ ID NO: 103, 104, 105, 139, 140 и 141, соответственно;

(4) SEQ ID NO: 106, 107, 108, 142, 143 и 144, соответственно;

(5) SEQ ID NO: 109, 110, 111, 145, 146 и 147, соответственно;

(6) SEQ ID NO: 112, 113, 114, 148, 149 и 150, соответственно;

(7) SEQ ID NO: 115, 116, 117, 151, 152 и 153, соответственно;

(8) SEQ ID NO: 118, 119, 120, 154, 155 и 156, соответственно;

(9) SEQ ID NO: 121, 122, 123, 157, 158 и 159, соответственно;

(10) SEQ ID NO: 124, 125, 126, 160, 161 и 162, соответственно;

(11) SEQ ID NO: 127, 128, 129, 163, 164 и 165, соответственно; или

(12) SEQ ID NO: 130, 131, 132, 166, 167 и 168, соответственно ;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

4. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-3, в котором антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 или 23, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 или 24.

5. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-4, где антигенсвязывающий домен содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

(4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

(5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;

(6) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

(7) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

(8) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;

(9) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18;

(10) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20;

(11) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 22; или

(12) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24.

6. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-4, в котором антигенсвязывающий домен гуманизован и содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NOs: 170, 175-209 или 248-255, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NOs: 171-174, 210-240 или 256-264.

7. Выделенный полинуклеотид по п.6, в котором антигенсвязывающий домен гуманизован и содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 171;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 172;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 173.

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 183, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 183, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 184, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 184, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 218;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 198, и переменную область легкой цепи, имеющую







который специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

9. Выделенный полинуклеотид по п.8, в котором одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) является гуманизированным.

10. Выделенный полинуклеотид по п.8 или 9, в котором одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 241-247 или 265-286.

11. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-10, где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит один или более антигенсвязывающих доменов.

12. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-11, где внутриклеточный сигнальный домен содержит один или более костимулирующих доменов и один или более активирующих доменов.

13. Химерный антигенный рецептор (CAR), кодируемый выделенным полинуклеотидом по любому из пп. 1-12.

14. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-12.

15. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.14.

16. Клетка-хозяин по п.15, причем клеткой-хозяином является Т-клетка, предпочтительно, Т-клетка человека.

17. Клетка-хозяин по п.15, причем клеткой-хозяином является НК-клетка, предпочтительно НК-клетка человека.

18. Способ получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий трансдукцию Т-клетки вектором по п.14.

19. Способ получения химерного антигенного рецептора (CAR)-Т-клетки, включающий культивирование Т-клеток, содержащих выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из пп. 1-12, в условиях получения CAR-Т-клетки и восстановления CAR-Т-клетки.

20. Способ получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий трансдукцию НК-клетки вектором по п.14.

21. Способ получения химерного антигенного рецептора (CAR)-НК-клетки, включающий культивирование НК-клеток, содержащих выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из пп. 1-12, в условиях получения CAR-НК-клетки и восстановления CAR-НК-клетки.

22. Способ получения клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий контакт клетки с выделенным полинуклеотидом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из пп. 1-12, причем выделенный полинуклеотид является *in vitro* транскрибированной РНК или синтетической РНК.

23. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту клетки-хозяина по любому из пп. 15-17.

24. Способ по п 23, в котором рак выбран из рака легких, такого как мелкоклеточный рак легких (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (HLL), хронического миелогенного лейкоза (HML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

25. Способ по п.23 или 24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который увеличивает эффективность клетки, экспрессирующей CAR.

26. Способ по п.23 или 24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который ослабляет один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

27. Способ по п.23 или 24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который лечит заболевание, ассоциированное с DLL3.

28. Гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 170, 175- 209 или 248-255, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 171-174, 210-240 или 256-264.

29. Гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.28, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 171;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 172;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 170, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 173.

(4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 183, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217;

(5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную







последовательность SEQ ID NO: 208, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 240;

(46) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 253, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261; или

(47) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 255, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263.

30. Гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.28 или 29, причем моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно индуцировать эффектор-опосредованный лизис опухолевых клеток, опосредуя привлечение конъюгированных лекарственных средств, и/или образует биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, обеспечивая эффект уничтожения рака.

31. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 28-30.

32. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.31.

33. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.32.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 28-30 и фармацевтически приемлемый носитель.

35. Способ таргетирования DLL3 на поверхность раковых клеток субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное анти-DLL3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 28-30.

36. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.34.

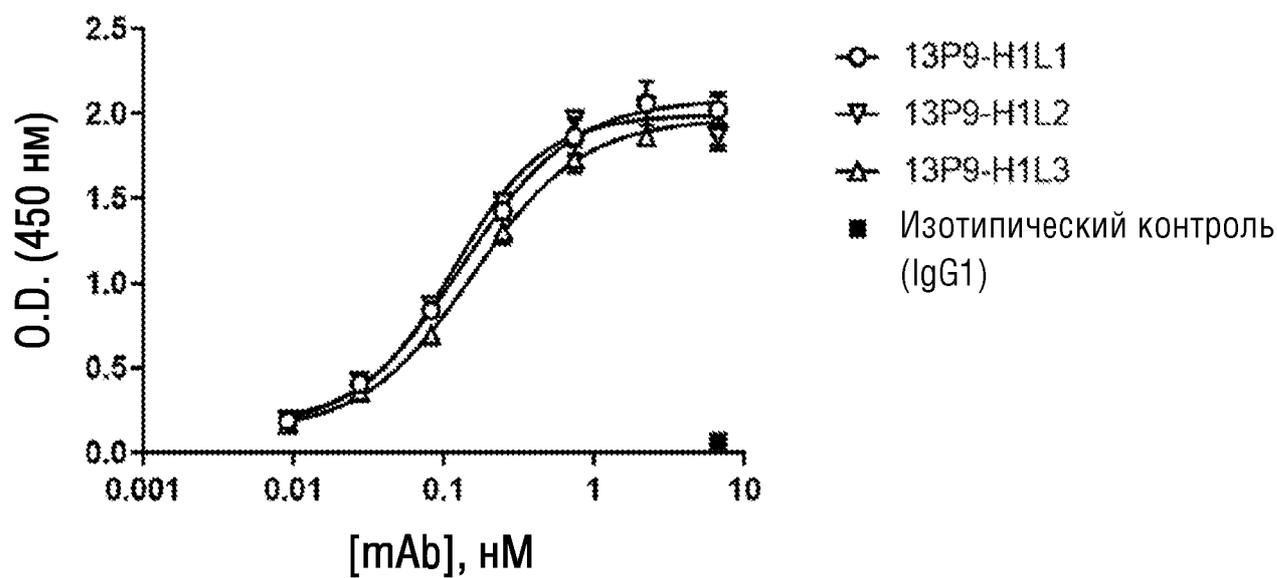
37. Способ по п. 36, в котором рак выбран из рака легких, такого как мелкоклеточный рак легких (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (HLL), хронического миелогенного лейкоза (HML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

38. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 28-30, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях получения моноклонального антитела или его

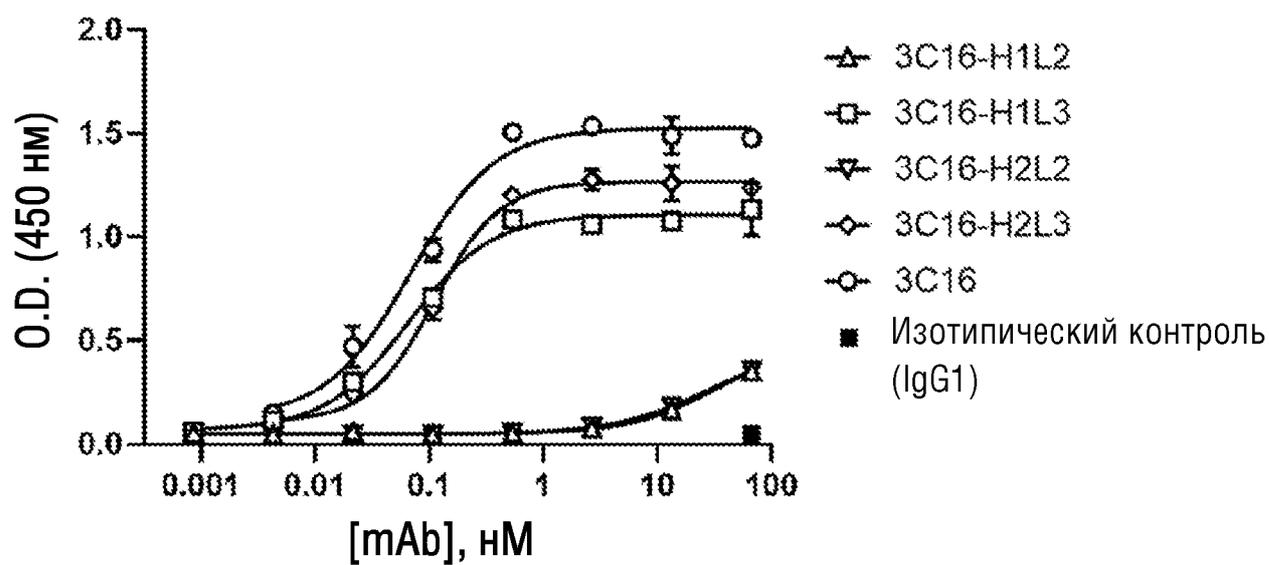
антигенсвязывающего фрагмента, и восстановление антитела или его антигенсвязывающего фрагмента его из клетки или культуры.

39. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 28-30, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

ФИГ.1А



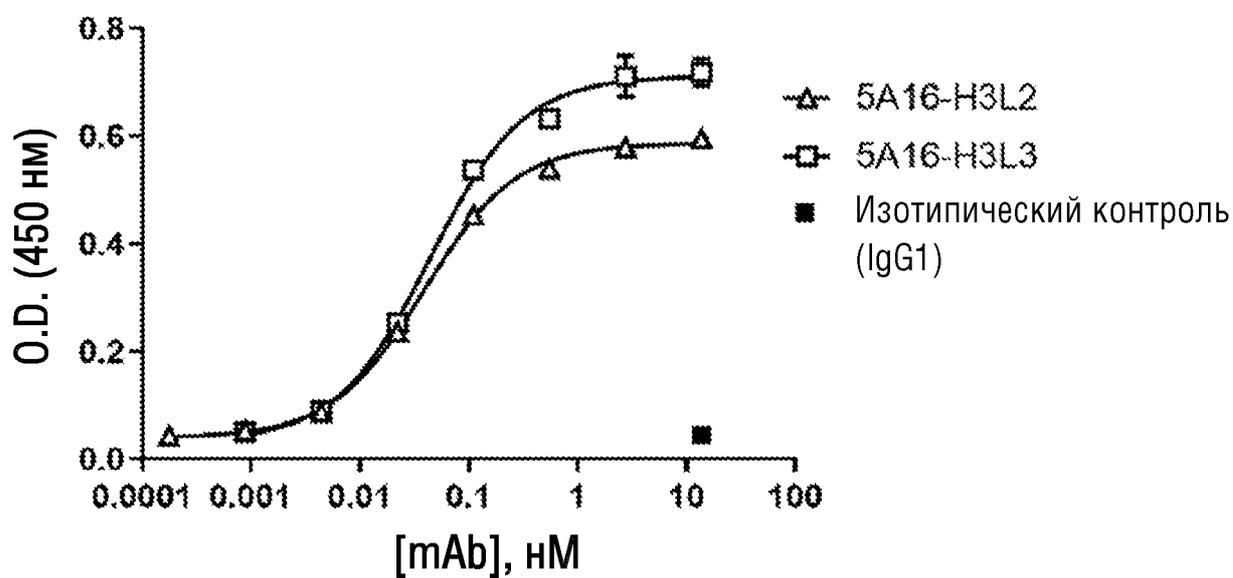
ФИГ.1В



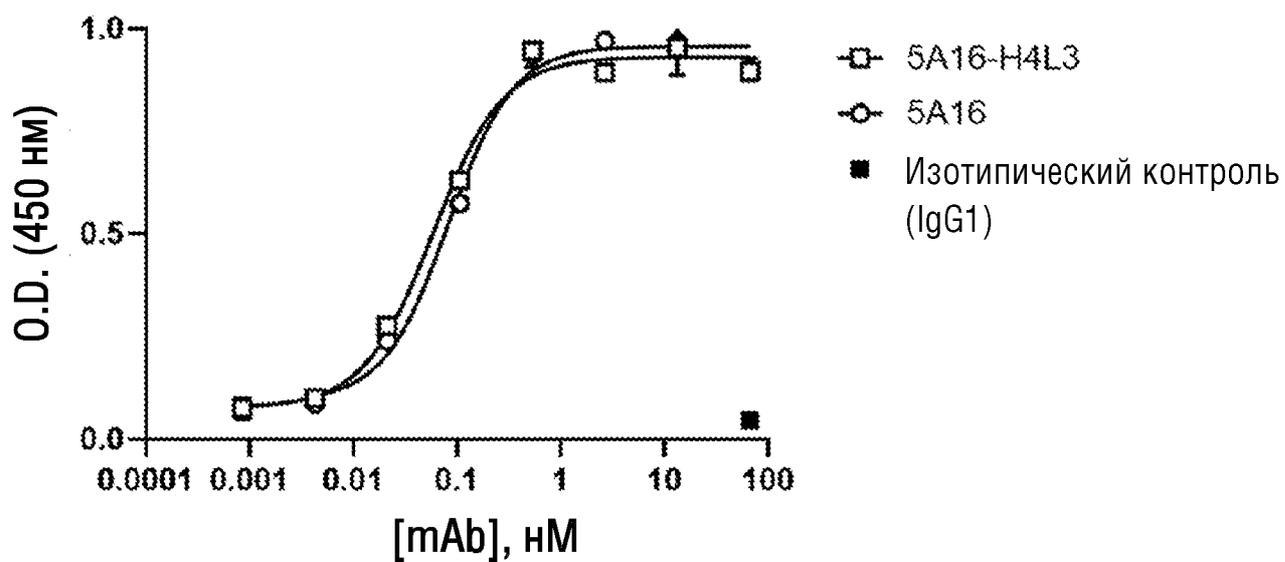




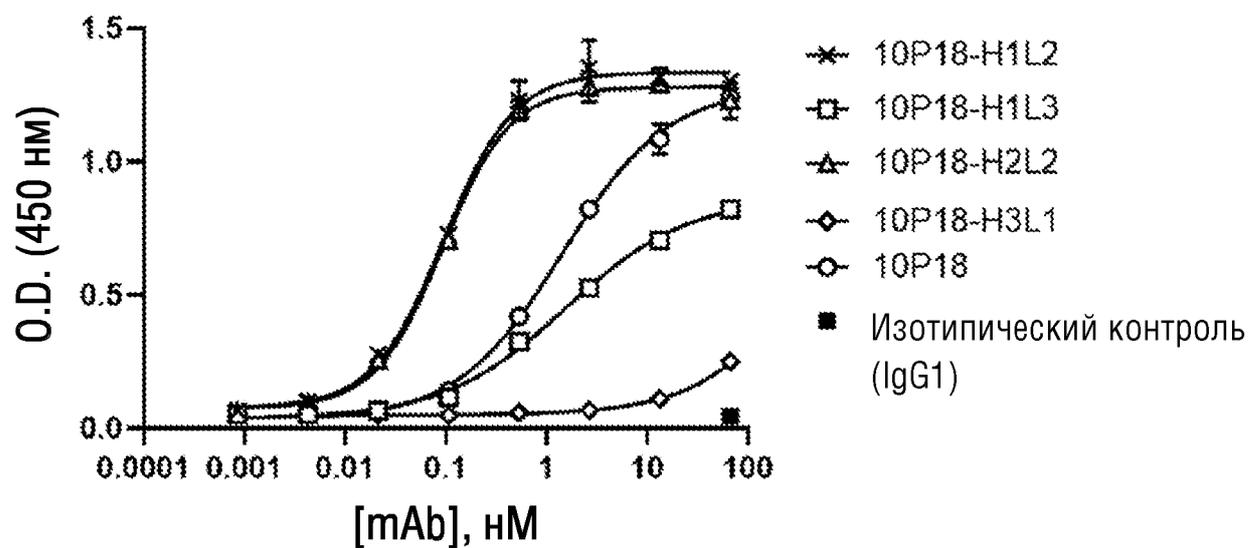
ФИГ.1G



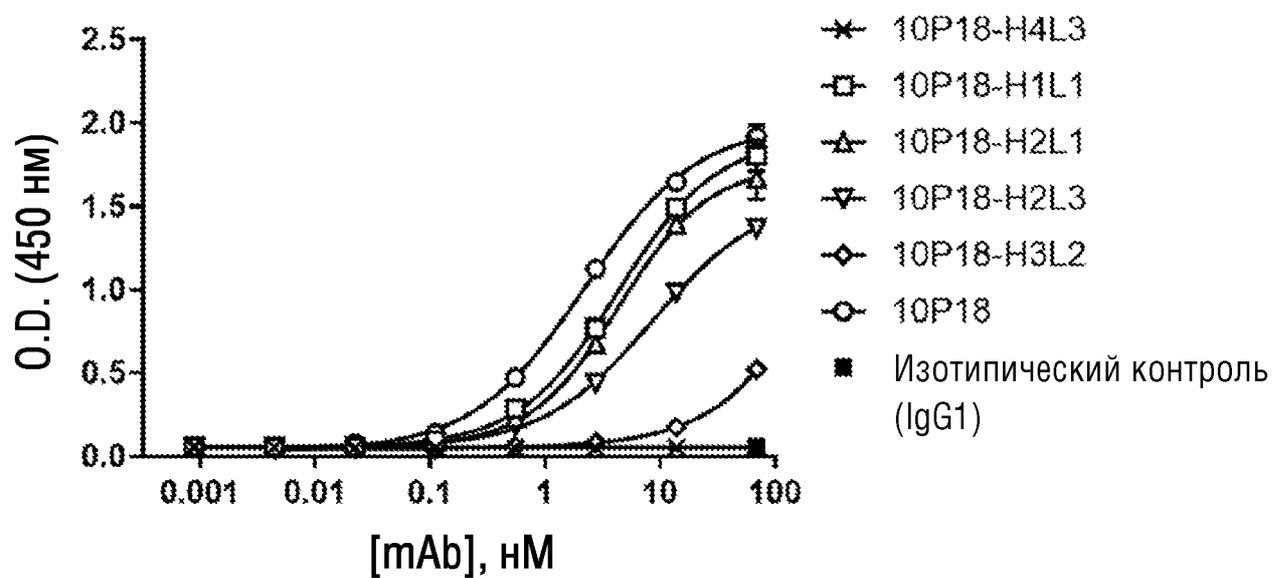
ФИГ.1H



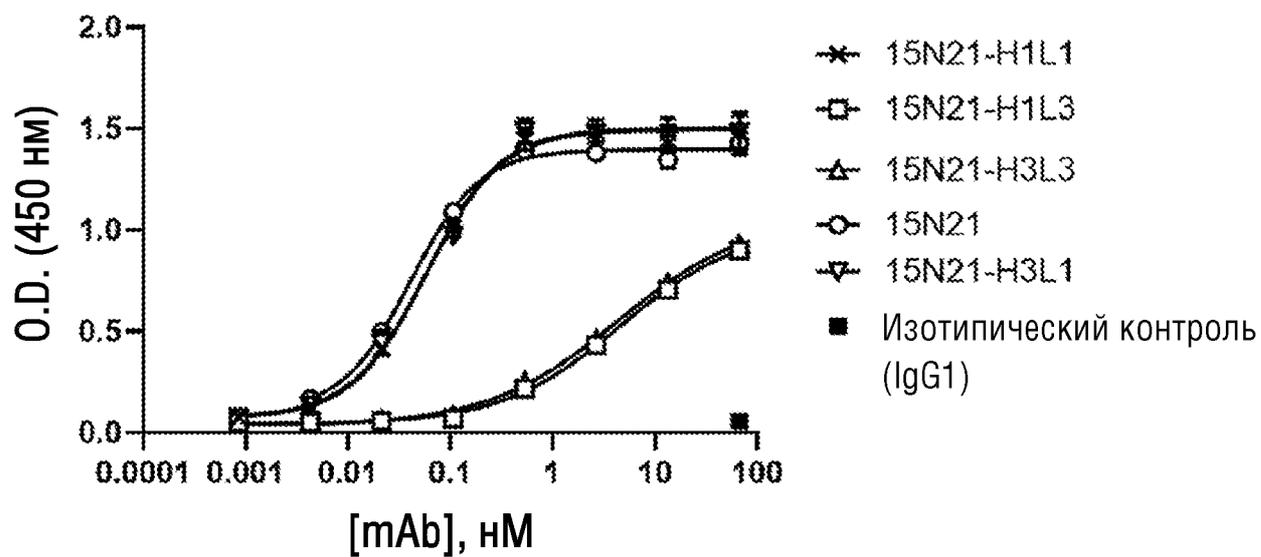
ФИГ.1I



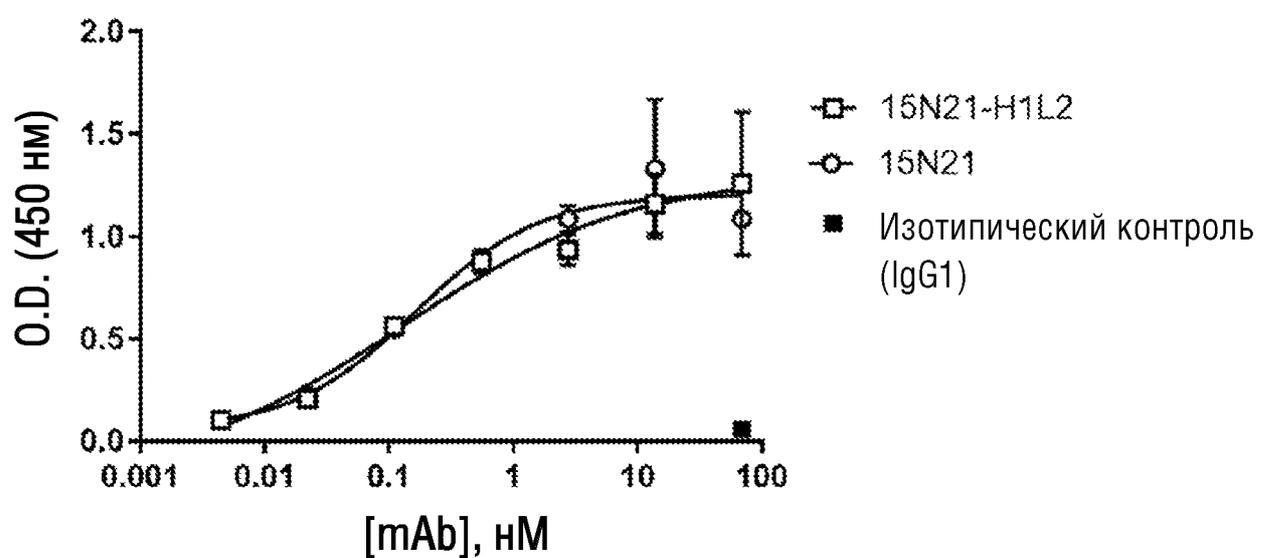
ФИГ.1J



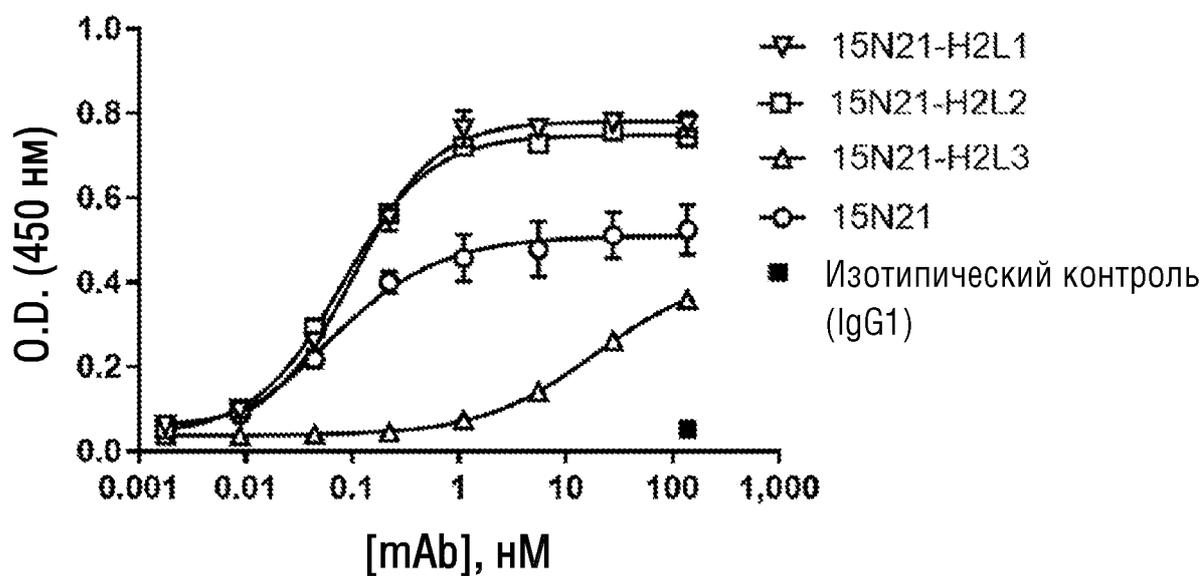
ФИГ.1К



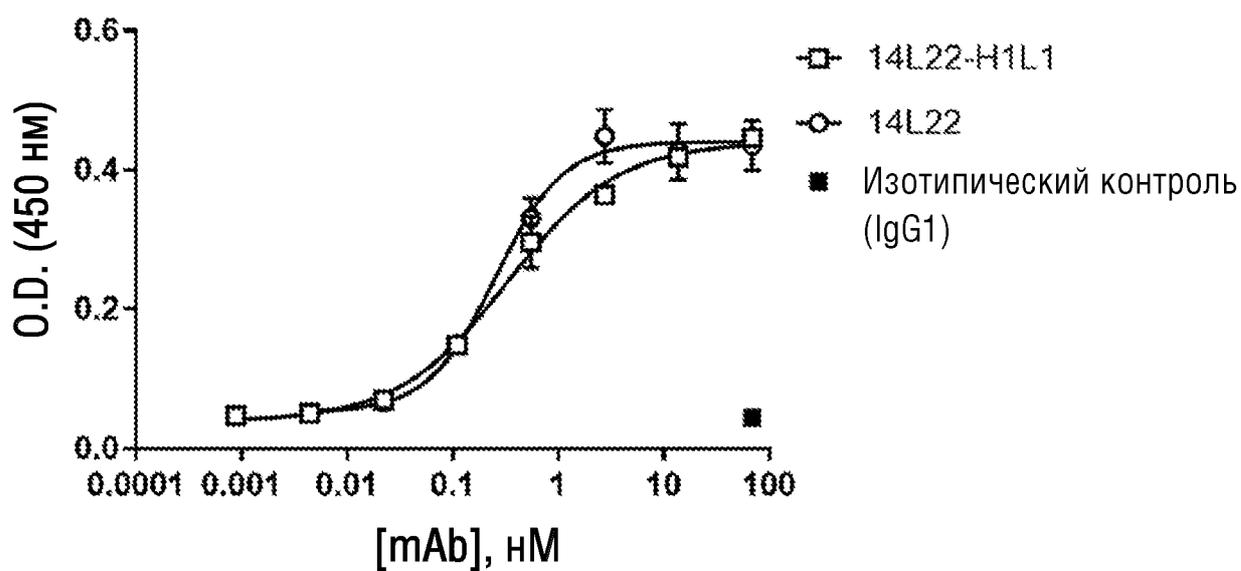
ФИГ.1L



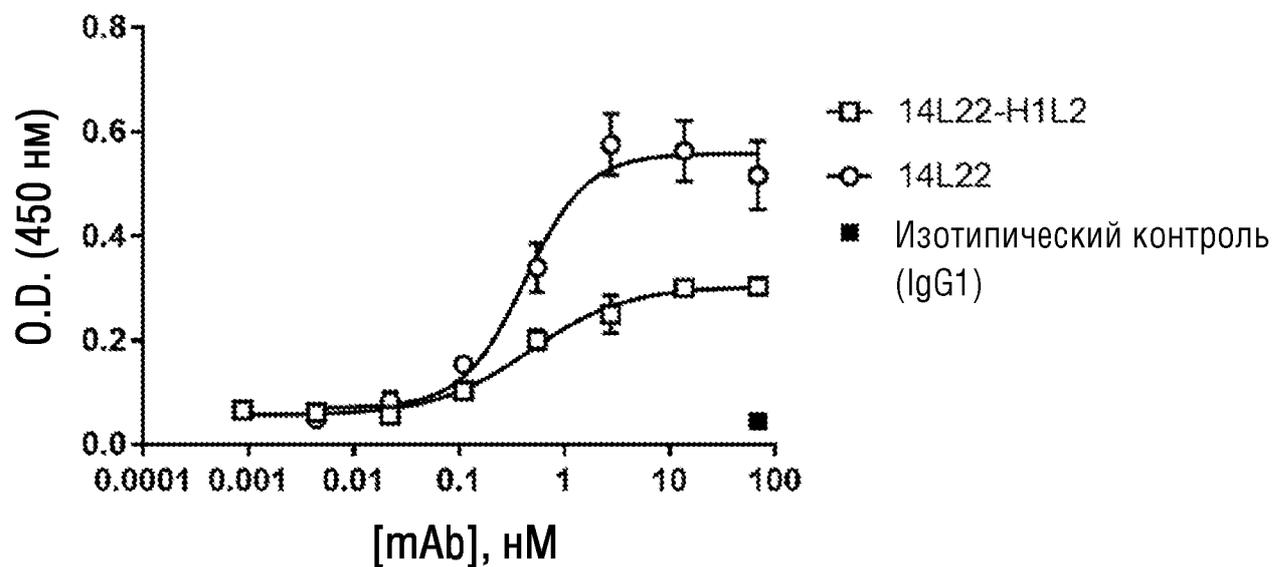
ФИГ.1М



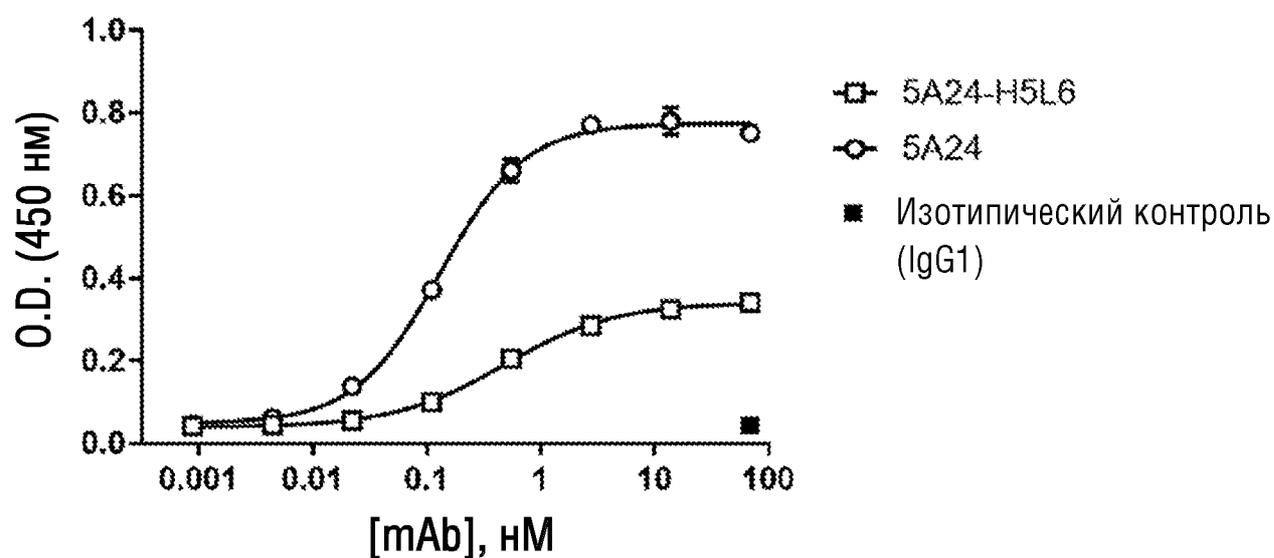
ФИГ.1N



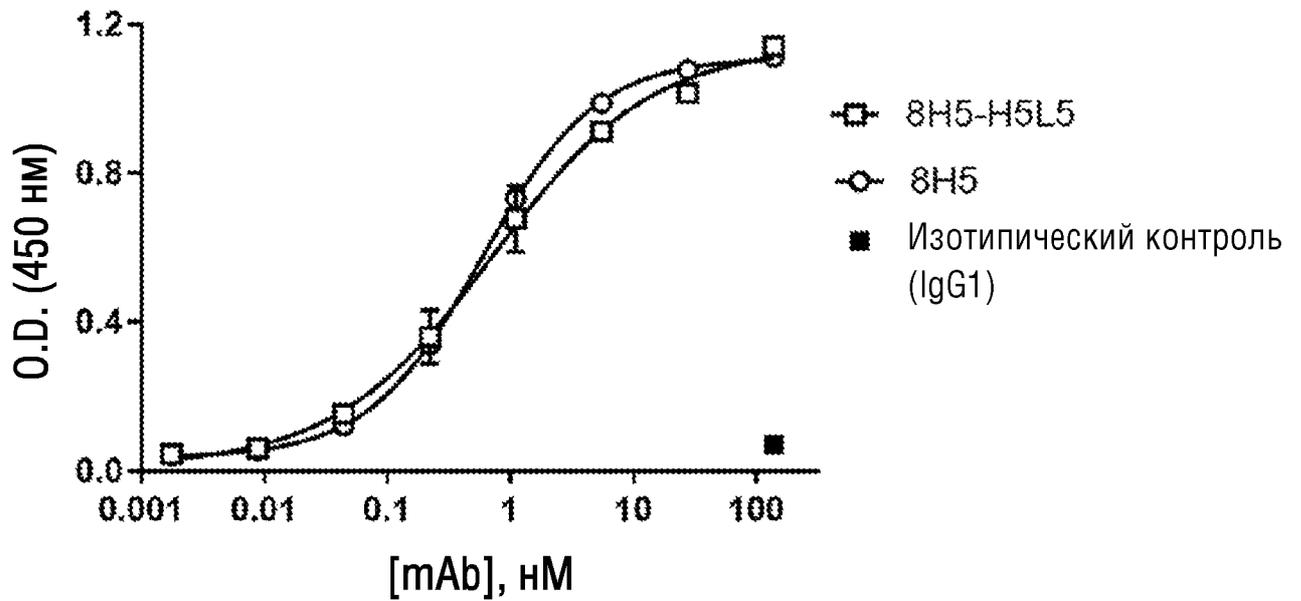
ФИГ.10



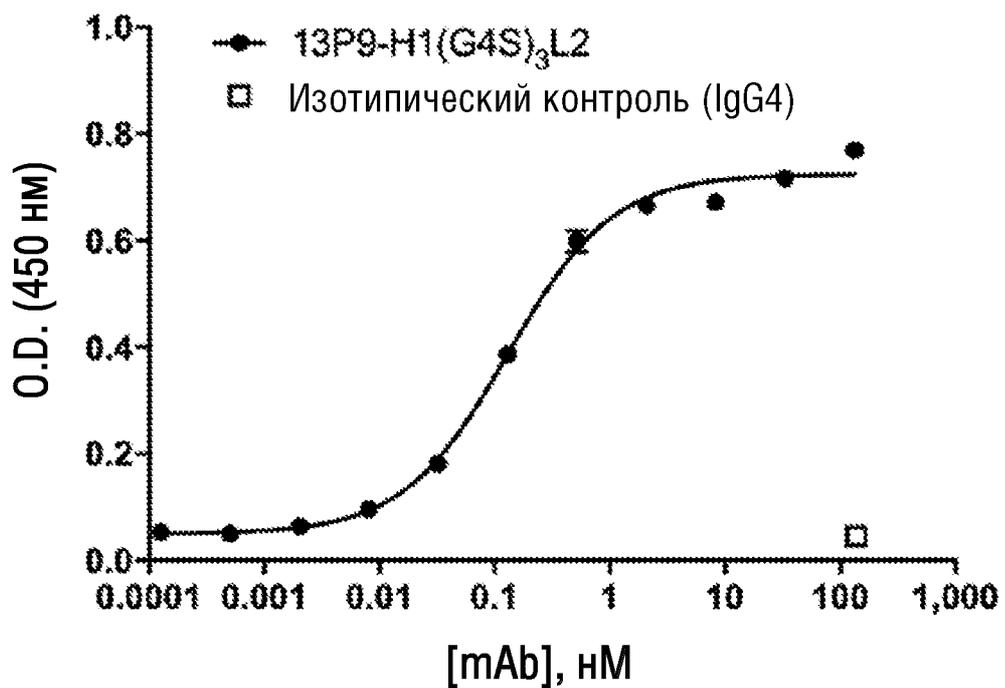
ФИГ.1Р



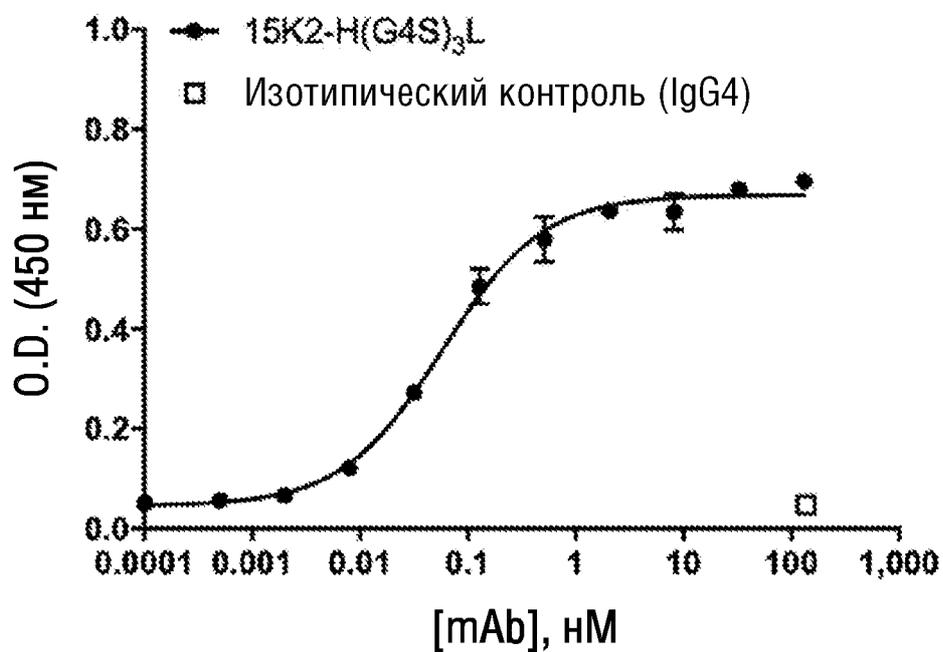
ФИГ.1Q



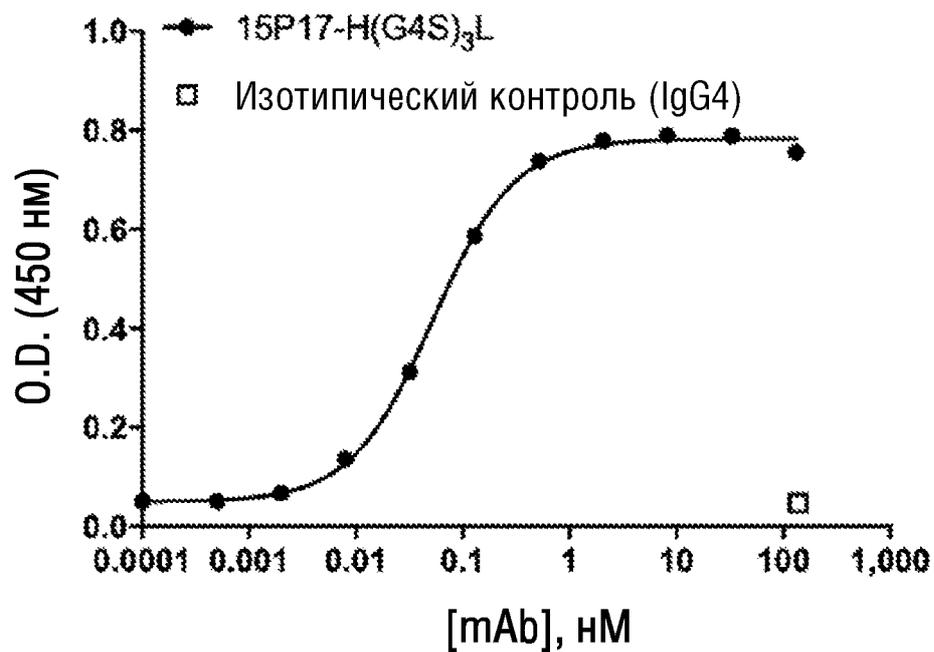
ФИГ.2A



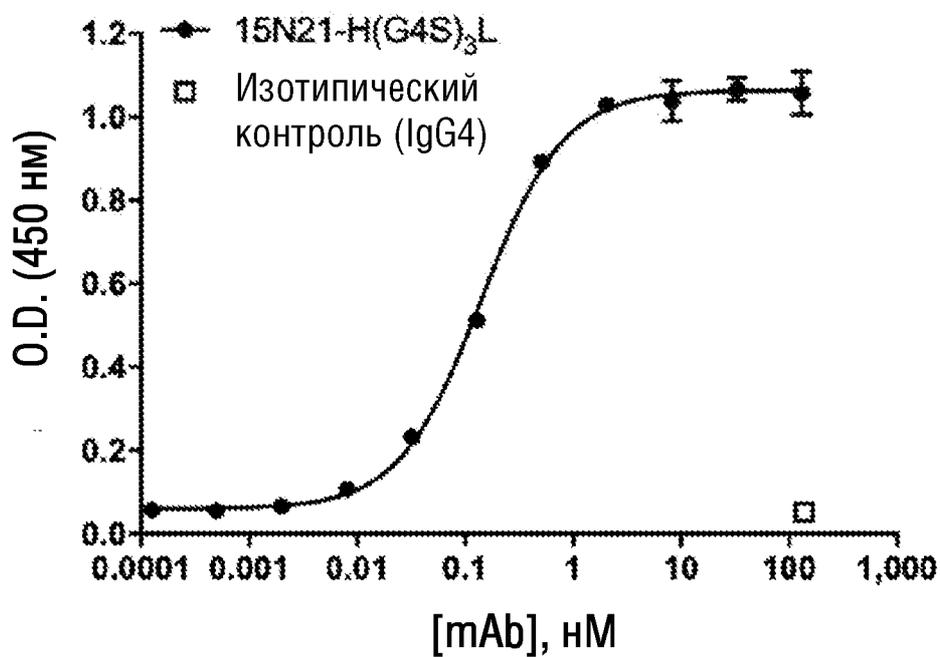
ФИГ.2В



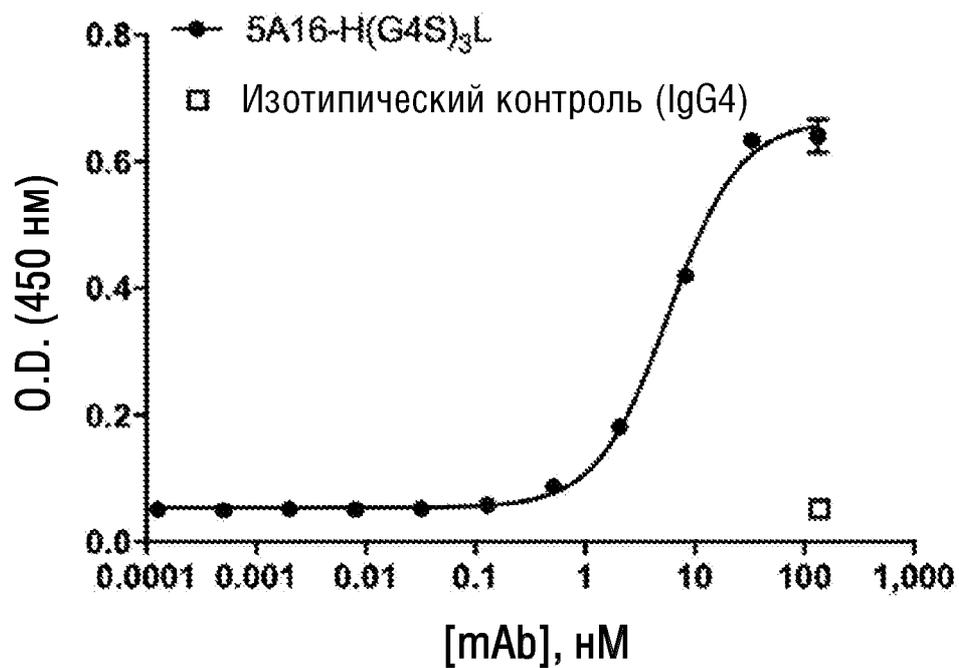
ФИГ.2С



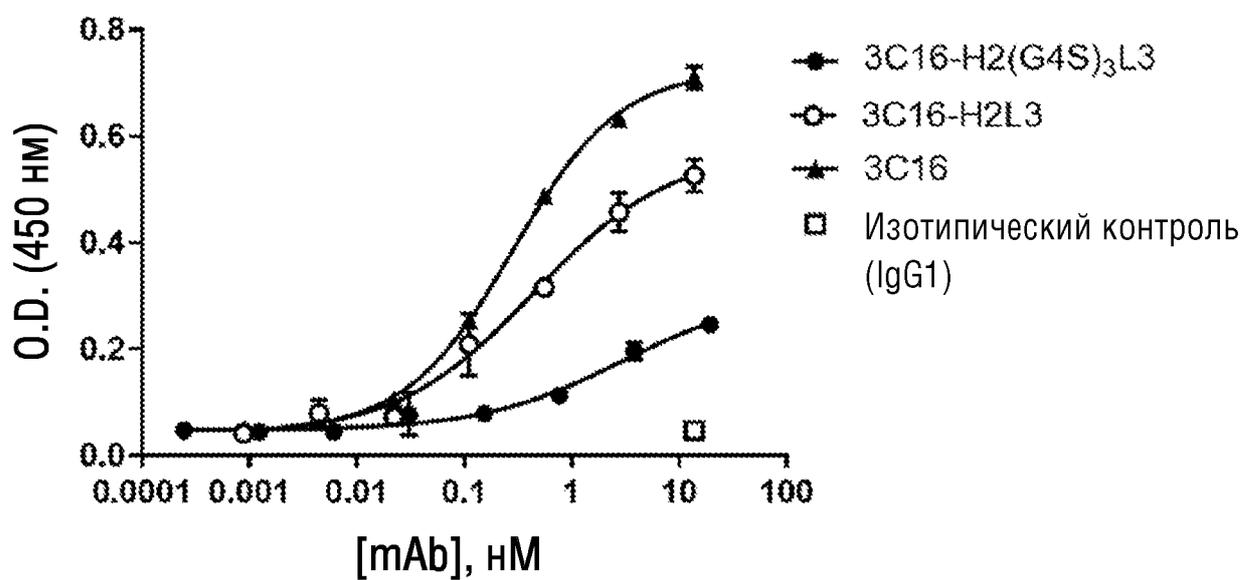
ФИГ.2D



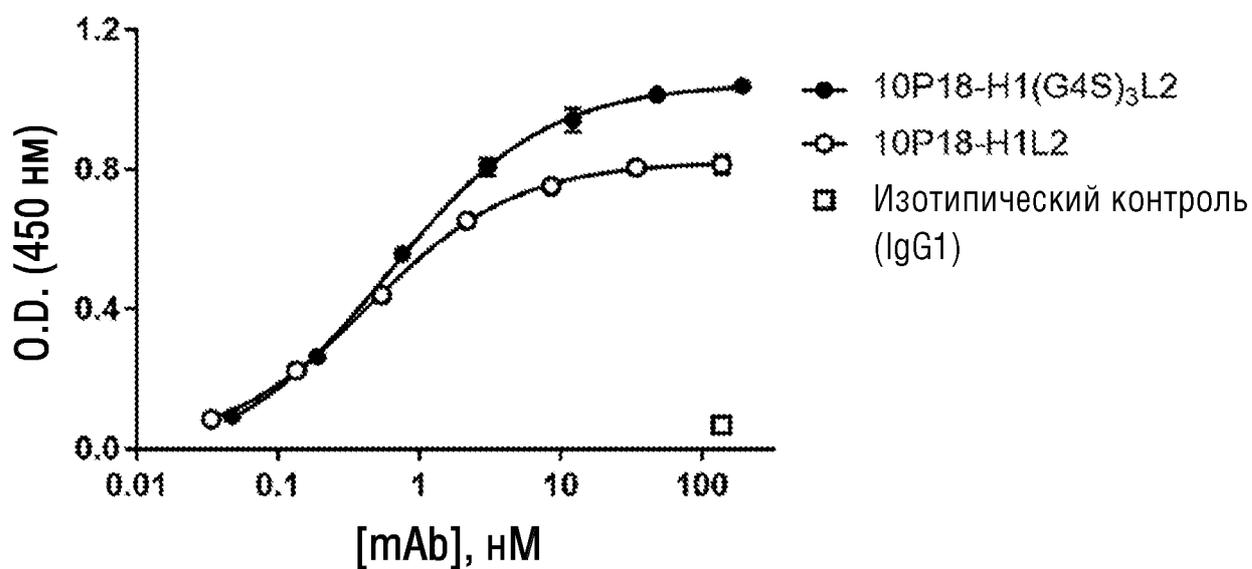
ФИГ.2E



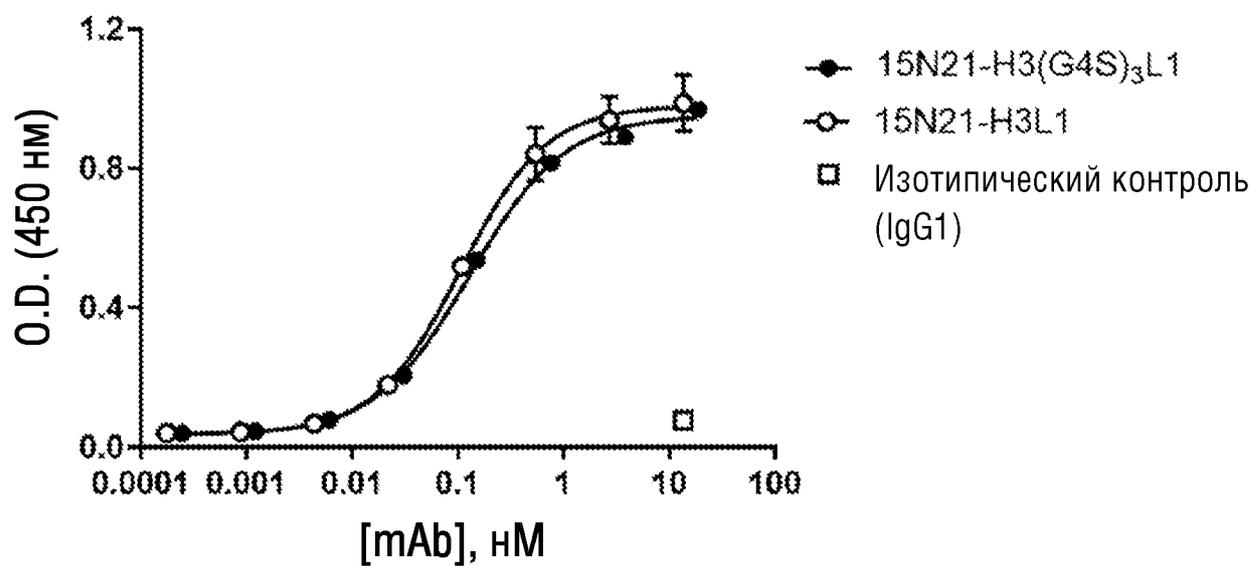
ФИГ.2F



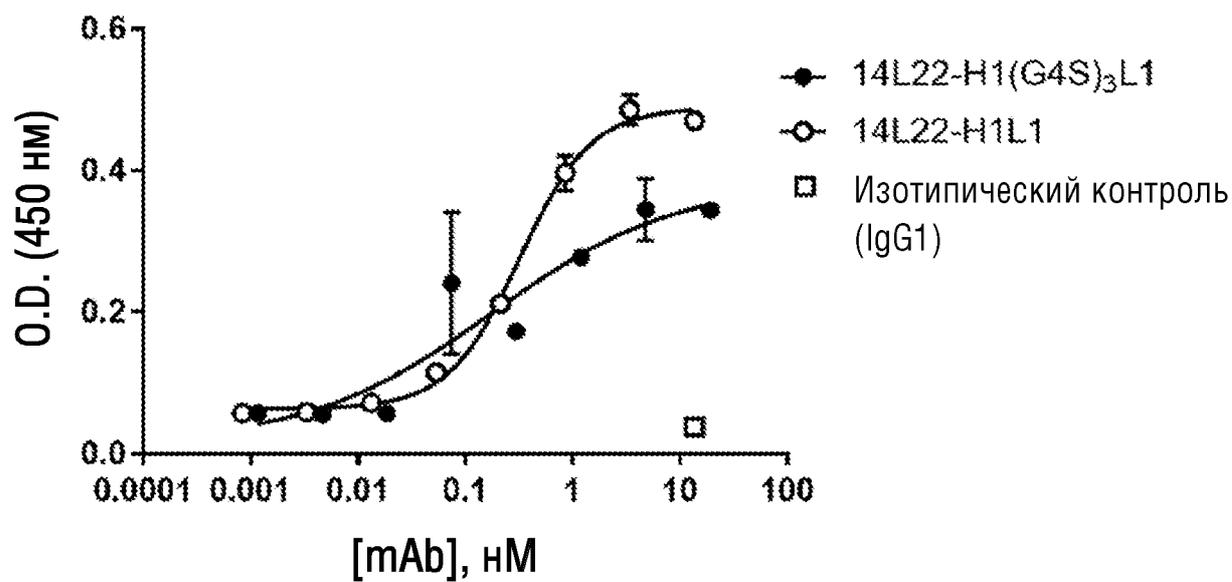
ФИГ.2G



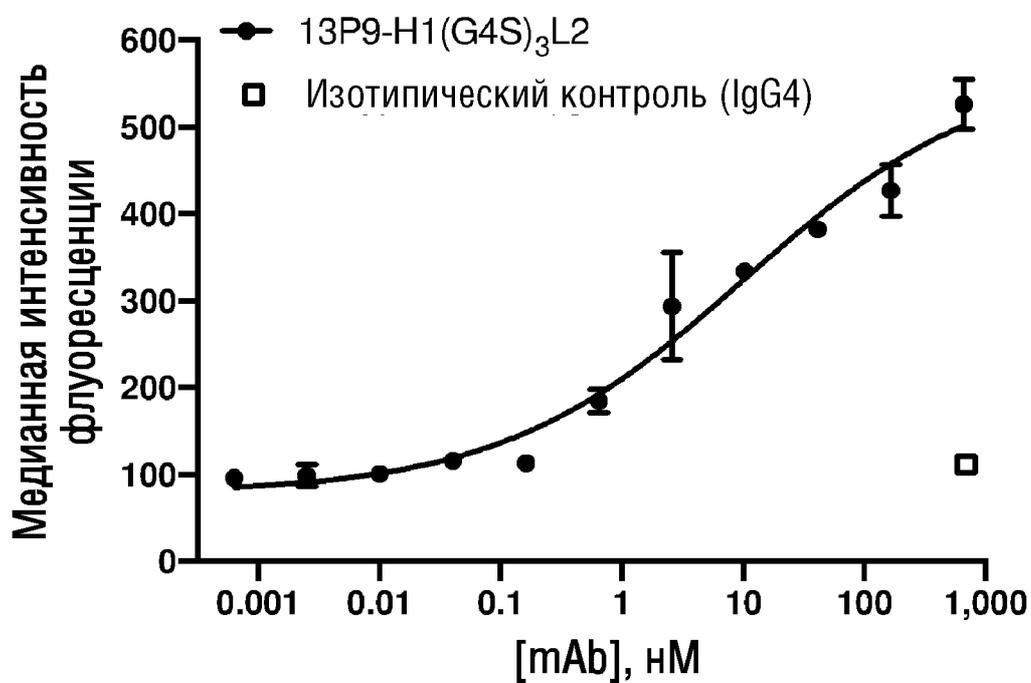
ФИГ.2Н



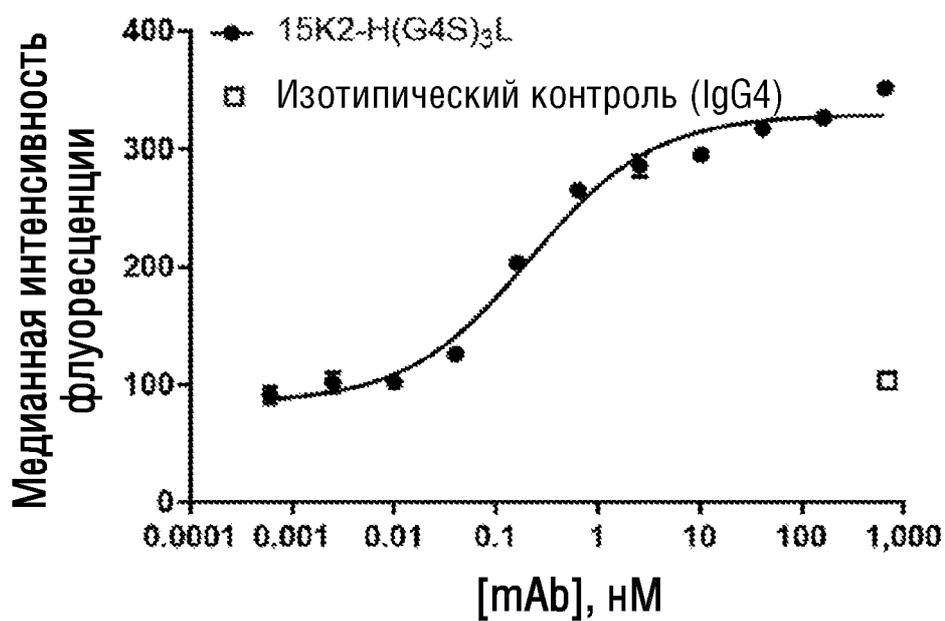
ФИГ.2I



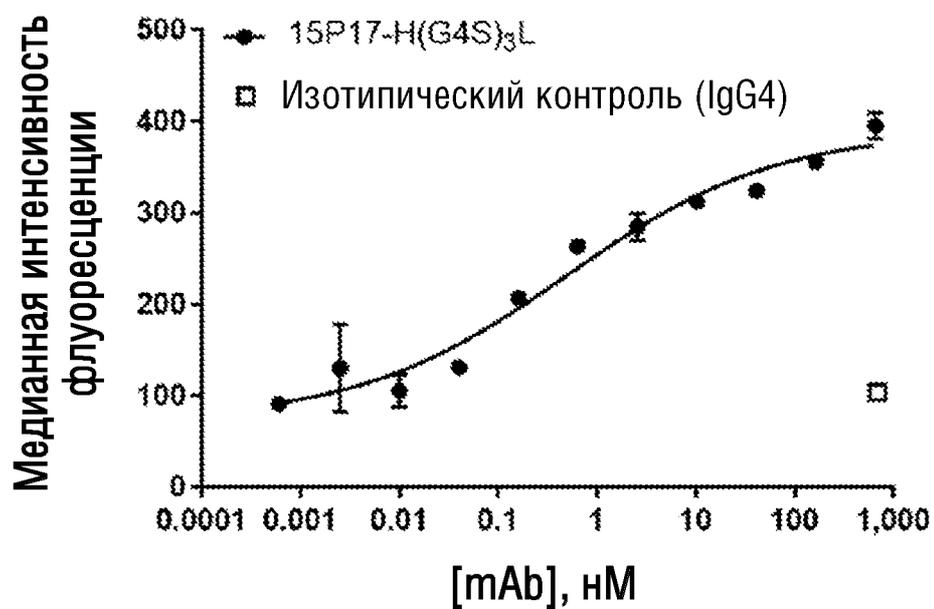
ФИГ.3А



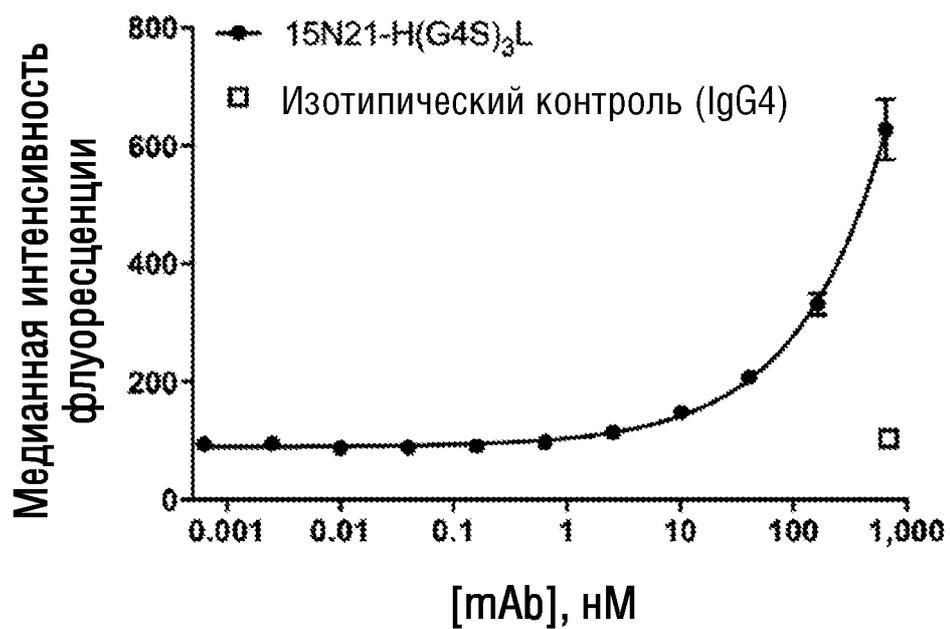
ФИГ.3В



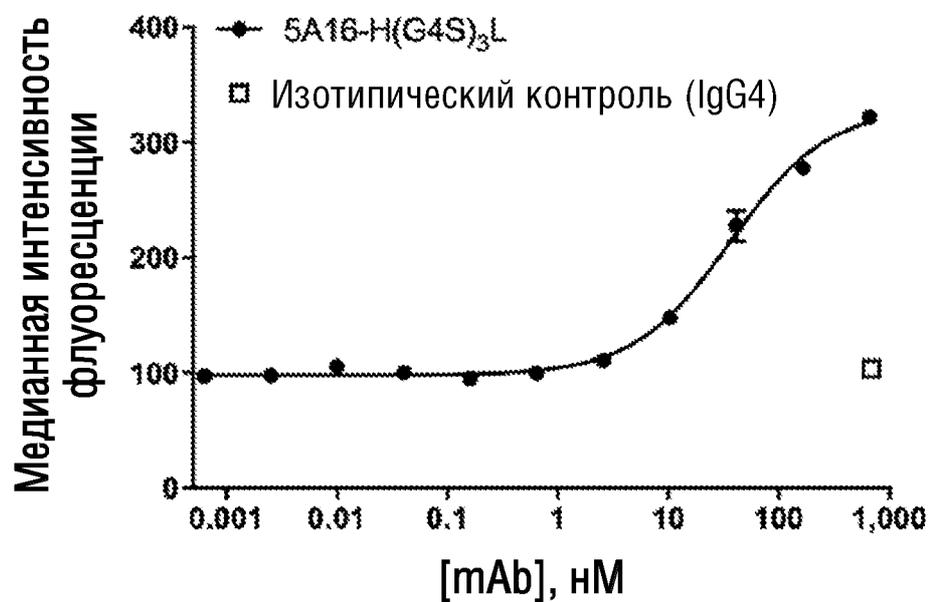
ФИГ.3С



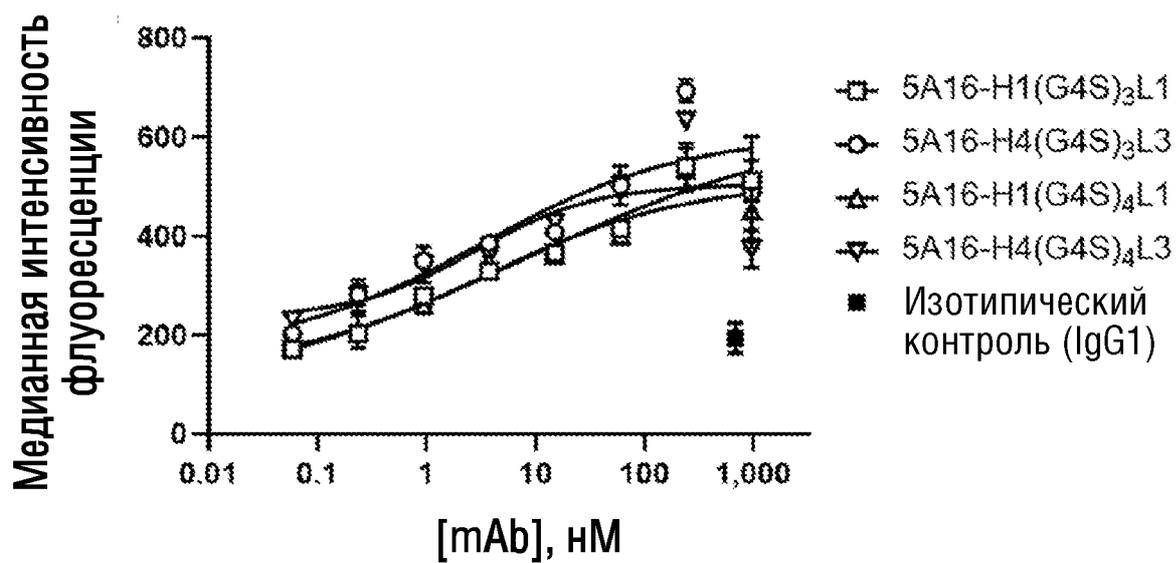
ФИГ.3D



ФИГ.3Е



ФИГ.3F



ФИГ.4

