

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201500835** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.02.29

(22) Дата подачи заявки
2014.02.12

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

**(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ РАКА,
ВКЛЮЧАЮЩАЯ DLL3-СВЯЗЫВАЮЩИЕ РЕАГЕНТЫ**

(31) **1302447.6**

(32) **2013.02.12**

(33) **GB**

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

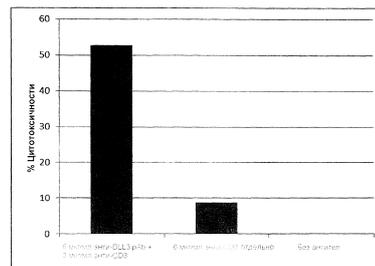
(87) **WO 2014/125273 2014.08.21**

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
Хадсон Линдси Джейн (GB)

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

(57) Представленное изобретение предусматривает способы и композиции для лечения, скрининга, диагностики и прогнозирования рака, такого как рак легких, рак поджелудочной железы и рак кожи, мониторинга эффективности лечения рака, такого как рак легких, рак поджелудочной железы и рак кожи, и разработку лекарственного средства.



201500835

A1

A1

201500835

5

10

15

Заявка № 201500835

Заявитель Бёрингер Ингельхайм

Интернациональ ГмбХ, DE

20

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ РАКА,
ВКЛЮЧАЮЩАЯ DLL3-СВЯЗЫВАЮЩИЕ РЕАГЕНТЫ

ВВЕДЕНИЕ

25

30

Представленное изобретение касается идентификации мембранного белка, связанного с раком, например, раком легких, раком поджелудочной железы и/или раком кожи, который применяется в качестве терапевтической мишени для лечения рака или в качестве маркера рака. В частности, белок представляет собой биологическую мишень, против которой могут быть сделаны аффинные реагенты, в том числе терапевтические антитела или другие фармацевтические агенты. Изобретение также касается применения таких аффинных реагентов для лечения и/или диагностики рака.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Основными проблемами в лечении рака, такого как рак легких, рак поджелудочной железы и рак кожи, являются улучшение уровня раннего

обнаружения, открытие новых неинвазивных маркеров, которые могут быть использованы для отслеживания прогрессирования заболевания и идентификации рецидива, и нахождение более эффективных и менее токсичных методов лечения, особенно для более поздних стадий заболевания, когда 5-летняя выживаемость до сих пор является низкой. Существует большая потребность в идентификации мишеней, которые являются более специфичными для раковых клеток, например, тех, которые экспрессируют на поверхности опухолевых клеток, таким образом, что они могут быть атакованы перспективными новыми подходами, такими как иммунотерапевтические и целенаправленные токсины.

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

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение раскрывает обнаружение дельта-подобного белка 3, далее в данном документе называемого как DLL3, в мембранных экстрактах различных, пораженных болезнью тканей, например, раком легких, раком поджелудочной железы и раком кожи, далее в данном документе называемых как "заболевания, согласно изобретения».

Дифференциальная экспрессия DLL3 при различных раковых заболеваниях позволяет белку быть мишенью используемого аффинного реагента-, например, антитела-, основанной терапии для таких видов рака. Таким образом, DLL3 могут использовать в генерации аффинных реагентов, в том числе антител, которые специфически связываются с эпитопами в пределах DLL3, и могут быть сделаны мишенями такими аффинными реагентами в качестве основы лечения. Аффинные реагенты, в том числе антитела, которые нацелены на поверхностный клеточный белок раковых клеток, могут быть использованы в лечении рака с помощью различных механизмов, в том числе (i) лизиса опосредованным комплементом или антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC), (ii) лизиса лекарственными средствами или токсином(ами), конъюгированными с

такими аффинными реагентами или (iii) ингибирования физиологической функции такого белка, который может быть управляющим ростом раковых клеток, например, через сигнальные пути. Важным аспектом такого аффинного реагент-основанного лечения является то, что нормальный профиль экспрессии белка-мишени, с точки зрения распределения в тканях и уровня экспрессии, является таким, что какое-либо нацеливание белка-мишени на нормальные ткани антителом не вызывает неблагоприятные побочные эффекты за счет связывания с нормальными тканями.

Изобретение предусматривает способ лечения или профилактики рака, в котором DLL3 экспрессируется при указанных раковых заболеваниях, которое включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества аффинного реагента, который связывается с DLL3.

Рак, предпочтительно, представляет собой одно из болезней, согласно изобретению.

Изобретение, кроме того, предусматривает аффинный реагент, который связывается с DLL3 для использования в лечении или профилактике рака, предпочтительно, где рак представляет собой одно из заболеваний, согласно изобретению.

Изобретение, кроме того, предусматривает применение аффинного реагента, который связывается с DLL3 в процессе производства лекарственного средства для лечения или профилактики рака, предпочтительно, где рак представляет собой одно из заболеваний, согласно изобретению.

Аффинные реагенты для применения в настоящем изобретении, предпочтительно, специфически связываются с DLL3.

Аффинный реагент может представлять собой антитело, например, целое антитело, или его функциональный фрагмент, или миметик антитела. Предпочтительные аффинные реагенты включают антитела, например, моноклональные антитела.

Аффинный реагент может быть химерным антителом, антителом человека, гуманизированным антителом, одноцепочечным антителом, дефукозилированным антителом или биспецифическим антителом.

Функциональные фрагменты антител включают UniBody, доменное антитело или Nanobody.

Миметики антител включают Affibody, DARPin, Anticalin, Avimer, Versabody или Дуокалин.

Аффинные реагенты для использования в данном изобретении могут содержать или быть конъюгированы с терапевтической молекулой, такой как цитотоксический фрагмент или радиоактивный изотоп. Аффинный реагент может быть конъюгатом антитела с лекарственным препаратом или иммуноконъюгатом.

Аффинный реагент может вызвать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или может вызвать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Аффинный реагент может индуцировать апоптоз раковых клеток, уничтожать или уменьшать количество раковых стволовых клеток и/или уничтожать или уменьшать количество циркулирующих раковых клеток. Аффинные реагенты могут модулировать физиологическую функцию DLL3, ингибировать связывание лиганда с DLL3 и/или ингибировать путь передачи сигнала, опосредованного DLL3.

В альтернативном варианте осуществления, изобретение также предусматривает способ лечения или профилактики рака, в котором DLL3 экспрессируется в указанных раковых опухолях, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гибридирующего агента, способного к гибридизации с нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3.

Изобретение, кроме того, предусматривает гибридирующий агент, способный к гибридизации с нуклеиновой кислотой, кодирующей DLL3 для использования в лечении или профилактике рака, предпочтительно, где рак представляет собой одно из заболеваний согласно изобретению.

Изобретение, кроме того, предусматривает применение гибридирующего агента, способного гибридизоваться с нуклеиновой кислотой, кодирующей DLL3, в процессе производства лекарственного средства для лечения или профилактики рака, предпочтительно, где рак представляет собой одно из заболеваний согласно изобретению.

Гибридирующие агенты для использования в настоящем изобретении, предпочтительно, специфически связываются с нуклеиновой кислотой, кодирующей один или несколько внеклеточных доменов DLL3.

Подходящие гибридизирующие агенты для использования в настоящем изобретении включают ингибиторную РНК, короткую интерферирующую РНК (киРНК), короткую шпилечную РНК (кшРНК), микроРНК (миРНК), антисмысловую нуклеиновую кислоту, комплементарную ДНК (кДНК), олигонуклеотиды и рибозимы.

Изобретение, кроме того, предусматривает способ определения, диагностики и/или скрининга, или мониторинга прогрессирующего рака, где DLL3 экспрессируется в указанном раке, или мониторинга эффекта лекарственного средства или терапии рака, при которой DLL3 экспрессируется в указанном раковом образовании у субъектов, который включает определение присутствия или уровня DLL3, или одного или более их фрагментов, или присутствия или уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или который включает обнаружение изменения их уровня у указанного субъекта.

Такой способ может включать обнаружение присутствия DLL3 или одного или больше его фрагментов, или присутствия нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, в котором или (а) присутствие повышенного уровня DLL3 или указанного одного или больше его фрагментов, или повышенного уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3 у субъекта по сравнению с уровнем у здорового субъекта, или (b) присутствие детектируемого уровня DLL3 или указанного одного или больше его фрагментов, или детектируемого уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, у субъекта по сравнению с соответствующим недетектируемым уровнем у здорового субъекта, свидетельствует о наличии рака, при котором DLL3 экспрессируется в указанном раковом образовании, у указанного субъекта.

Изобретение, кроме того, предусматривает способ определения, диагностики и/или скрининга или мониторинга прогрессирующего рака, где DLL3 экспрессируется в указанном раковом образовании, или мониторинга эффекта препарата рака или терапии, где DLL3 экспрессируется в указанном раковом образовании, у субъекта, который включает обнаружение присутствия или уровень антител, способных к иммуноспецифическому связыванию с DLL3, или одним или больше его фрагментами.

В способах согласно изобретению, присутствие DLL3, или одного или больше его фрагментов, или присутствие нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или присутствие или уровень антител, способных к

иммуноспецифическому связыванию с DLL3, или одним или больше его фрагментами, могут быть обнаружены с помощью анализа биологического образца, полученного от субъекта.

5 Присутствие DLL3, или одного или больше его фрагментов, могут быть обнаружены, используя аффинный реагент, который связывается с DLL3. Аффинный реагент может быть каким-либо приемлемым аффинный реагент, как упоминалось в данном документе. Аффинный реагент может содержать или быть конъюгированным с детектируемой меткой.

10 В каком-либо из аспектов изобретения, который рассматривается в данном документе, субъектом может быть человек.

Изобретение, кроме того, предусматривает способы идентификации агента для лечения или профилактики рака, в которых DLL3 экспрессируется в указанном раковом образовании, где способ включает (а) контактирование DLL3, или одного или больше его фрагментов, с потенциальным агентом; и (b) 15 определение связывается ли агент с DLL3, или одним или больше его фрагментами. Способ, кроме того, может дополнительно включать стадию исследования способности агента, который связывается с DLL3, или одним или больше его фрагментами, чтобы ингибировать рак, где DLL3 экспрессируется в указанном раковом образовании. Агент может, среди прочего, модулировать 20 активность DLL3, уменьшать лигандное связывание с DLL3 или уменьшать димеризация DLL3.

В различных вариантах осуществления изобретения, описанных в данном документе, определенные типы рака, которые могут упоминаться, являются одним из заболеваний согласно изобретению.

25 В одном варианте осуществления рак, который обнаруживают, предупреждают или лечат, представляет собой рак легкого, например, немелкоклеточный рак легких и/или мелкоклеточный рак легких.

В другом варианте осуществления рак, который обнаруживают, предупреждают или лечат, представляет собой рак поджелудочной железы.

30 В другом варианте осуществления рак, который обнаруживают, предупреждают или лечат, представляет собой рак кожи, например, меланому.

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

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

5 Фигура 1b показывает интернализацию анти-DLL3 поликлональных антител клетками N82, используя PabZAP анализ.

Фигура 2 показывает специфический лизис DMS79 DLL3, экспрессирующий клетки путем активации Т клеток биспецифическими анти-DLL3-анти-CD3 поликлональными антителами.

10 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение, подробно описанное ниже, охватывает введение терапевтических композиций субъекту, например, субъекту-млекопитающему, для лечения или предупреждения рака, например, заболеваний согласно изобретению. Изобретение, кроме того, предусматривает способы и композиции
15 для клинического скрининга, диагностики и прогнозирования рака, например, заболеваний согласно изобретению, у субъекта-млекопитающего для идентификации пациентов, которые с наибольшей вероятностью отвечают на определенное терапевтическое лечение, для мониторинга результатов рака, например, терапии заболеваний, согласно изобретению, для скрининга
20 лекарственных средств и разработки лекарственных средств.

Изобретение основывается на открытии, что белок DLL3 экспрессируется при определенных видах рака. В частности, подтверждающие данные содержатся в данном документе, которые демонстрируют экспрессию белка DLL3 в плазматической мембране рака легкого, рака поджелудочной железы и
25 рака кожи. Поэтому, антитела, нацеленные на DLL3, могут иметь применение, как терапевтические средства и диагностические средства при данных видах рака и других видах рака, показывающих экспрессию DLL3.

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

Субъект вообще должен быть живым субъектом. Тем не менее, в то время как, применения, способы и композиции согласно представленному изобретению являются особенно приемлемыми для скрининга, диагностики и

прогнозирования у живого субъекта, они, кроме того могут использоваться для посмертного диагноза у субъекта, например, для идентификации членов семьи с риском развития такого же заболевания.

5 Как используется в данном документе, термин "пациент" относится к субъекту, который имеет, или подозревается, что имеет одно или больше заболеваний согласно изобретению.

10 Как используется в данном документе, термин "белок согласно изобретению" касается дельта-подобного белка 3 (GeneID: 10683), который рассматривается в данном документе как DLL3. Обнаружено, что данный белок дифференциально экспрессируется в различных видах рака, таким образом, обеспечивая новую мишень для терапий на основе аффинности данных видов рака. Человеческая последовательность белка DLL3 приводится как SEQ ID NO: 1. Термин DLL3 (в контексте белка) включает белки, чьи аминокислотные последовательности состоят из или содержат аминокислотную

15 последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 или их производные или варианты, в частности, те, которые встречаются у человека их производные или варианты.

20 Данный белок был идентифицирован в образцах экстрагированной раковой ткани мембранного белка от раковых пациентов, используя способы и устройства, описанные в примере 1 (например, используя жидкостную хроматографию-масс-спектроскопию экстрактов мембранного белка).

Пептидные последовательности сравнивали с SWISS PROT и TrEMBL базами данных (held by Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) и European Bioinformatics Institute (EBI), которые являются доступными www.expasy.org), и

25 идентифицировали вход Q9NYJ7, дельта-подобного белка 3 - DLL3.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая данный белок, найден с номером доступа NM_016941, как приведено в SEQ ID NO: 3.

30 В соответствии с SWISS-PROT, дельта-подобный белок 3 является мембранным белком типа I семейства Дельта и состоит из одного домена DSL, шести EGF-подобных доменов, одной трансмембранной области и внеклеточного хвоста между аминокислотами 27-492 SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 12). Автор изобретения показал, что дельта-подобный белок 3 экспрессируется при раке, что дает основание предполагать, что терапии на основе аффинности,

направленные против дельта-подобного белка 3 у пациентов, в том числе у пациентов с раком, будут иметь терапевтический эффект

DLL3 является пригодным, поскольку представляет собой фрагменты, в частности, эпитоп, содержащий фрагменты, например, их антигенные или иммуногенные фрагменты и их производные, в частности, фрагменты, содержащие внеклеточные домены (например, внеклеточные хвосты или петли) белка. Эпитоп, содержащий фрагменты, включающие антигенные или иммуногенные фрагменты, как правило, будут длиной 12 аминокислот или больше, например 20 аминокислот или больше, например 50 или 100 аминокислот или больше. Фрагменты могут составлять 95% или больше от длины полного белка, например, 90% или больше, например, 75% или 50% или 25% или 10% или больше от длины полного белка.

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

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

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

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

Эпитоп-содержащие фрагменты DLL3, включающие антигенные или иммуногенные фрагменты, будут способны вызывать соответствующий иммунный ответ у пациента. ДНК, кодирующая DLL3, также является подходящей, поскольку имеет его фрагменты, например, ДНК, кодирующая фрагменты DLL3, такие как его иммуногенные фрагменты. Фрагменты нуклеиновой кислоты (например, ДНК), кодирующие DLL3 могут составлять 95% или больше от длины полной кодирующей области, например, 90% или больше, например, 75% или 50%, или 25%, или 10%, или больше от длины полной кодирующей области. Фрагменты нуклеиновой кислоты (например ДНК) могут составлять в длину 36 нуклеотидов или больше, например, 60 нуклеотидов или больше, например, 150 или 300 нуклеотидов или больше.

Производные DLL3 включают варианты последовательности, в которой были сделаны одна или больше (например, 1-20, такие как 15 аминокислот, или вплоть до 20%, такие как вплоть до 10% или 5% или 1% по количеству аминокислот на основе общей длины белка) делеций, вставок или замещений. Замещения, как правило, могут быть консервативные замещения. Производные, как правило, имеют по существу такую же биологическую функцию, как у белка, из которого они получены. Производные, как правило, будут сравнительно антигенной или иммуногенной к белку, из которого они получены. Производные, как правило, будут иметь или лиганд-связывающую активность, или способность к образованию комплекса с активным рецептором, или предпочтительно обе, как у белка, из которого они получены. Производные и варианты, как правило, будут иметь, такое же распределение в ткани как DLL3.

Производные белков также включают химически обработанный белок, такой как карбоксиметилированные, карбоксиамидированные, ацетилированные белки, например, обработанный в процессе очистки.

В одном аспекте, изобретение предусматривает DLL3 или композицию, содержащую DLL3. Белок может находиться в изолированной или очищенной форме. Изобретение, кроме того, предусматривает нуклеиновую кислоту, кодирующую DLL3, и композицию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую DLL3.

В дополнительном аспекте, предусматривается композиция, способная вызывать иммунный ответ у субъекта, где композиция содержит полипептид DLL3 и/или один или больше его антигенных или иммуногенных фрагментов, и один или больше приемлемых носителей, наполнителей, разбавителей или вспомогательных веществ (приемлемые вспомогательные вещества обсуждаются ниже).

Композиция, способная вызывать иммунный ответ, например, может быть предусмотрена, как вакцина, содержащей полипептид DLL3 или его производное или вариант, и/или один или больше антигенных или иммуногенных фрагментов, необязательно вместе с одним или больше приемлемыми носителями, наполнителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

В другом аспекте, изобретение предусматривает полипептид DLL3, или один или больше фрагментов или его производных или вариантов, для лечения или профилактики, например, одного или больше заболеваний согласно изобретению.

В другом аспекте, изобретение предусматривает применение полипептида DLL3, или одного или больше фрагментов или его производных или вариантов, для лечения или профилактики, например, одного или больше заболеваний согласно изобретению.

Изобретение, кроме того, предусматривает применение полипептида DLL3, одного или больше фрагментов, или его производных или вариантов, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики, например, одно или больше заболеваний согласно изобретению.

В одном аспекте предусматривается способ лечения, который включает введение терапевтически эффективного количества полипептида DLL3, одного или больше фрагментов или его производных или вариантов, для лечения или профилактики, например, одного или больше заболеваний согласно изобретению.

Изобретение, кроме того, предусматривает способ для лечения или профилактики, например, заболеваний согласно изобретению у субъекта, или вакцинации субъекта против, например, одно или больше из заболеваний согласно изобретению, который включает стадию введения субъекту эффективного количества полипептида DLL3 и/или одно или больше антигенных или иммуногенных фрагментов или их производных или вариантов, например, в виде вакцины.

В другом аспекте, изобретение предусматривает способы лечения, например, заболеваний согласно изобретению, которые включают введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, которое модулирует (например, повышает регулирование или понижает регулирование) или дополняет экспрессию или биологическую активность (или обе) DLL3 у пациентов, имеющих, например, заболевания согласно изобретению, для того, чтобы (a) предотвращать возникновение или развитие, например, заболеваний согласно изобретению; (b) предотвращать прогрессирование, например, заболеваний согласно изобретению; или (c) смягчить симптомы, например, заболеваний согласно изобретению.

В еще одном варианте осуществления, изобретение предусматривает лекарственное средство, которое включает, по отдельности или вместе:

(a) DLL3, и

(b) противораковое средство,

для одновременного, последовательного или отдельного введения в лечении рака, предпочтительно, в лечении одного из заболеваний согласно изобретению.

DLL3 может быть использован для обнаружения, прогнозирования, диагностики или мониторинга, например, заболеваний согласно изобретению или для разработки лекарственного средства.

В соответствии с другим аспектом изобретения, мы предусматриваем способ определения, диагностики и/или скрининга или мониторинга прогрессирования, например, заболеваний согласно изобретению или мониторинга эффекта, например, от противоракового лекарственного средства или терапии, нацеленной на заболевания согласно изобретению, у субъекта, который включает обнаружение присутствия или уровня DLL3, или одного или больше его фрагментов, или присутствия или уровня нуклеиновой кислоты,

кодирующей DLL3 или присутствия или уровня активности DLL3, или который включает детектирование изменения в его уровне у указанного субъекта.

В соответствии с другим аспектом изобретения мы предусматриваем способ детектирования, диагностирования и/или скрининга, например, заболеваний согласно изобретению у субъекта-кандидата, который включает обнаружение присутствия DLL3, или одного или больше его фрагментов, или присутствия нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или присутствия активности DLL3 у указанного субъекта-кандидата, в котором или (a) присутствие повышенного уровня DLL3 или указанного одного или больше его фрагментов или повышенного уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или присутствие повышенного уровня активности DLL3 у субъекта-кандидата по сравнению с уровнем у здорового субъекта, или (b) присутствие детектируемого уровня DLL3 или указанного одного или больше его фрагментов или детектируемого уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или присутствие детектируемого уровня активности DLL3 у субъекта-кандидата по сравнению с соответствующим недетектируемым уровнем у здорового субъекта, указывает на наличие, например, заболеваний согласно изобретению у указанного субъекта.

В соответствии с другим аспектом изобретения, мы предусматриваем способ мониторинга прогрессирования, например, заболеваний согласно изобретению у субъекта или мониторинга эффекта, например, от противоракового лекарственного средства или терапии, нацеленной на заболевания согласно изобретению, который включает обнаружение присутствия DLL3, или одного или больше его фрагментов, или присутствия нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или присутствия активности DLL3 у указанного субъекта-кандидата в первоначальный момент времени и в более поздний период времени, присутствие повышенного или пониженного уровня DLL3 или указанного одного или больше его фрагментов, или повышенного или пониженного уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или присутствие повышенного или пониженного уровня активности DLL3 у субъекта в более поздний период времени по сравнению с уровнем у субъекта в указанный первоначальный момент времени, указывая на прогрессирование или регрессирование, например, заболеваний согласно изобретению, или показывая действие или бездействие, например, противоракового лекарственного средства

или терапии нацеленных на заболевания согласно изобретению у указанного субъекта.

Для DLL3, обнаруженный уровень, полученный при анализе образца ткани от субъектов, имеющих, например заболевания согласно изобретению, по отношению к обнаруженному уровню, полученному при анализе ткани от субъектов, не имеющих, например, заболеваний согласно изобретению, будет зависеть от конкретного аналитического протокола и способа обнаружения, который используется. Соответственно, представленное изобретение предусматривает, что каждая лаборатория будет устанавливать диапазон референсных значений у субъектов, не имеющих, например, заболеваний согласно изобретению в соответствии с аналитическим протоколом и способ обнаружения, который используется, как это принято в диагностической области. Предпочтительно, по меньшей мере, один контрольный положительный образец ткани от субъекта, о котором известно, что у него, например, заболевания согласно изобретению, или, по меньшей мере, один контрольный отрицательный образец ткани от субъекта, о котором известно, что не имеет, например, заболеваний согласно изобретению (и более предпочтительно, как положительный, так отрицательный контрольные образцы) включаются в каждую серию исследуемых образцов, которые анализируют.

В одном аспекте изобретения, анализ жидкостной хроматографии-масс-спектрологии или другие соответствующие способы используют, чтобы проанализировать образцы ткани субъекта с заболеваниями согласно изобретению, предпочтительно живого субъекта, для того, чтобы измерить экспрессию DLL3 для скрининга или диагностики, например, заболеваний согласно изобретению, определить прогноз для пациента с заболеваниями согласно изобретению, контролировать эффективность терапии заболеваний согласно изобретению, или разработать лекарственное средство.

В каком-либо из описанных выше способов, уровень, который может быть обнаружен у субъекта-кандидата, который имеет рак, например, заболеваний согласно изобретению, является, предпочтительно, в 2 или больше раз выше, чем уровень у здорового субъекта.

В одном варианте осуществления изобретения, образец ткани от субъекта (например, субъекта с подозрением на наличие заболеваний согласно изобретению) анализируют с помощью жидкостной хроматографии-масс-

спектрологии для обнаружения DLL3. Увеличенный избыток DLL3 в ткани от субъекта по отношению к ткани от субъекта или субъектов не имеющих заболевания согласно изобретению (например, контрольный образец) или предварительно определенный диапазон референсных значений показывает присутствие заболеваний согласно изобретению.

По отношению к фрагментам, эпитоп, содержащий фрагменты, иммуногенные фрагменты или антигенные фрагменты DLL3:

для соответствующих применений при раке, в одном аспекте изобретения они включают последовательность, идентифицированную как трипсиновая последовательность в примере 1.

Как используется в данном документе, DLL3 является “изолированным” когда он присутствует в препарате, который по существу не содержит загрязняющие белки, то есть препарата, в котором меньше, чем 10% (например, меньше, чем 5%, такое как меньше, чем 1%) от общего присутствующего белка составляет загрязняющий(ие) белок(и). Загрязняющий белок представляет собой белок, имеющий значительно отличающуюся аминокислотную последовательность от той, которая у изолированного DLL3, как определено по масс-спектральному анализу. Как используется в данном документе, “значительно отличающаяся” последовательность представляет собой последовательность, которая позволяет отличить загрязняющий белок от DLL3 по масс-спектральному анализу, выполняемому в соответствии с протоколом, описанным в данном документе в примере 1.

В диагностических и прогностических способах согласно изобретению, DLL3 может быть проанализированным согласно какому-либо способу, известному квалифицированному специалисту в данной области с уровня техники, включая, но, не ограничиваясь этим, предпочтительные технологии, описанные в данном документе, киназные анализы, ферментные анализы, анализы связывания и другие функциональные анализы, иммунологические анализы и вестерн-блоттинг.

Альтернативно, DLL3 может быть обнаруженным в иммунологическом анализе. В одном варианте осуществления, иммунологический анализ осуществляется путем контактирования образца от субъекта, который исследуется, с анти-DLL3 антителом (или другим аффинным реагентом) в условиях таких, что связывание (например, иммуноспецифическое связывание)

может происходить, если DLL3 присутствует, и детектирования или измерения количества какого-либо связывания (например, иммуноспецифический связывание) агентом. DLL3 связывающие агенты могут быть получены согласно способам и методикам, описанным в данном документе. В конкретном варианте осуществления, DLL3 анализируют, используя иммуногистохимию.

DLL3 могут быть обнаружены посредством обнаружения их фрагмента, например, эпитопа, содержащего (например, иммуногенный или антигенный) его фрагмент. Фрагменты могут иметь длину, по меньшей мере, 10, больше, как правило, по меньшей мере, 20 аминокислот, например, по меньшей мере, 50 или 100 аминокислот, например, по меньшей мере, 150 или 200 аминокислот; например, по меньшей мере 300 или 500 аминокислот; например, по меньшей мере, 700 или 900 аминокислот.

В одном варианте осуществления, связывание аффинного реагента (например, антитела) в тканевых срезах могут быть использованы для обнаружения aberrантной локализации DLL3 или aberrантного уровня DLL3. В конкретном варианте осуществления, антитело (или другой аффинный реагент) с DLL3 могут быть использованы для анализа ткани пациента (например, ткани легких, поджелудочной железы и кожи) на уровень DLL3, где aberrантный уровень DLL3 указывает на заболевания согласно изобретению. Как используется в данном документе, “aberrантный уровень” означает уровень, который является увеличенным по сравнению с уровнем у субъекта, не имеющего заболевания согласно изобретению, или эталонным уровнем.

Какой-либо приемлемый иммунологический анализ может быть использованы, включая, без ограничения, конкурентные и неконкурентные системы анализа, используя способы, такие как вестерн-блоттинг, радиоиммунологические анализы, ИФА (твердофазный иммуоферментный анализ), “сэндвич” иммунологические анализы, анализы иммуопреципитации, реакции преципитации, гель-диффузные реакции преципитации, иммуодиффузионные анализы, агглютинационные анализы, комплемент-фиксирующие анализы, иммуорадиометрические анализы, флуоресцентные иммунологические анализы и иммунологические анализы на белок А.

Например, DLL3 может быть обнаружен в образце жидкости (например, в крови, моче или слюне) с помощью двухстадийного сэндвич анализа. На первой стадии, реагент захвата (например, анти-DLL3 антитела или другого аффинного

реагента) используется для захвата DLL3. Реагент захвата, необязательно, может быть иммобилизованным на твердой фазе. На второй стадии, непосредственно или опосредовано меченный реагент обнаружения используется для детектирования захваченного DLL3. В одном варианте осуществления, реагент обнаружения представляет собой лектин. Какой-либо лектин может быть использован для этой цели, который преимущественно связывается с DLL3 быстрее, чем с другими изоформами, которые имеют такой же сердцевинный белок как DLL3, или другие белки, которые имеют такую же антигенную детерминанту, распознаваемую антителом. В предпочтительном варианте осуществления, выбранный лектин связывает DLL3, по меньшей мере, с в 2-раза большей аффинностью, более предпочтительно, по меньшей мере, в 5-раз большей аффинностью, еще более предпочтительно, по меньшей мере, в 10-раз большей аффинностью, чем указанные другие изоформы, которые имеют такой же сердцевинный белок, как DLL3, или указанные другие белки, которые имеют общую антигенную детерминанту распознаваемую аффинным реагентом. На основании данного описания, лектин, который является приемлемым для детектирования DLL3 могут быть легко определены согласно способам, хорошо известным в данной области с уровня техники, например, для исследования одного или больше лектинов, перечисленных в таблице I на страницах 158-159 Sumar et al., *Lectins as Indicators of Заболевание-Associated Glycoforms*, In: Gabius H-J & Gabius S (eds.), 1993, *Lectins and Glycobiology*, at pp. 158-174 (которые включены в данный документ в виде ссылки в полной своем объеме). В альтернативном варианте осуществления, реагент обнаружения представляет собой антитело (или другой аффинный реагент), например, антитело, которое специфически (например, иммуноспецифически) обнаруживает другие посттрансляционные модификации, такие как антитело, которое иммуноспецифически связывается с фосфорилированными аминокислотами. Примеры таких антител включают те, которые связываются с фосфотирозином (BD Трансдукция Laboratories, каталожные номера: P11230-050/P11230-150; P11120; P38820; P39020), те, которые связываются с фосфосерином (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, каталожный номер 61-8100) и те, которые связываются с фосфотреонином (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, каталожные номера. 71-8200, 13-9200).

При необходимости, ген, кодирующий DLL3, соответствующий ген, или соответствующие последовательности или субпоследовательности нуклеиновой кислоты, включающие комплементарные последовательности, также могут использовать в гибридизационных анализах. Нуклеотид, кодирующая DLL3, или его субпоследовательности, который включает, по меньшей мере, 8 нуклеотидов, предпочтительно, по меньшей мере, 12 нуклеотидов, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 15 нуклеотидов могут быть использованы, как гибридизационный зонд. Гибридизационные анализы могут быть использованы для обнаружения, прогнозирования, диагностики, или мониторинга состояний, расстройств или болезненных состояний, связанных с aberrантной экспрессией гена, кодирующей DLL3, или для дифференциальной диагностики субъектов с признаками или симптомами, напоминающими, например, заболевания согласно изобретению. В частности, такой гибридизационный анализ может быть выполнен согласно способам, которые включают контактирование образца субъекта, содержащего нуклеиновую кислоту с зондом нуклеиновой кислоты, способной к гибридизированию с ДНК или РНК, которая кодирует DLL3, в условиях таких, что гибридизация может происходить, и детектирование или измерение какой-либо полученной в результате гибридизации.

Таким образом, нуклеиновая кислота, кодирующая DLL3 (например, ДНК или более предпочтительно РНК) могут быть обнаружены, например, используя гибридизирующий агент (в частности, олигонуклеотидный зонд), способный к гибридизированию нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3.

Один такой иллюстративный способ включает:

контактирование одного или больше олигонуклеотидных зондов, которые включают 10 или больше следующих друг за другом нуклеотидов комплементарных с нуклеотидной последовательностью, кодирующей DLL3, с РНК, полученной из биологического образца от субъекта, или с кДНК, скопированной с РНК, где указанное контактирование осуществляется в условиях, которые позволяют гибридизацию зонда с нуклеотидной последовательностью, если присутствует;

детектирование гибридизации, если таковые имеются, между зондом и нуклеотидной последовательностью; и

сравнение гибридизаций, если таковые имеются, обнаруженных на стадии (b) с гибридизацией, обнаруженной в контрольном образце, или с предварительно определенным диапазоном референсных значений.

Изобретение, кроме того, предусматривает диагностические наборы, которые включают анти-DLL3 антитело (или другой аффинный реагент). Кроме того, такой набор может необязательно включать одно или больше из следующих:

(1) инструкции по использованию анти-DLL3 аффинного реагента для диагностики, прогнозирования, терапевтического мониторинга или какой-либо комбинации из данных применений;

(2) меченого партнера связывания с аффинным реагентом;

(3) твердой фазы (такой как полоска для реагента), на которую иммобилизируют анти-DLL3 аффинный реагент; и

(4) этикетки или вставки с указанием регуляторного разрешения для диагностического, прогностического или терапевтического использования или какой-либо их комбинации. Если никакого меченого партнера связывания с аффинным реагентом не предусмотрено, анти-DLL3 аффинный реагент сам по себе может быть меченым способным к детектированию маркером, например, хемилюминесцентным, ферментным, флуоресцентным или радиоактивным фрагментом.

Изобретение, кроме того, предусматривает набор, который включает зонд нуклеиновой кислоты, способный к гибридизованию с нуклеиновой кислотой, приемлемо РНК, кодирующей DLL3. В конкретном варианте осуществления, набор включает один или больше контейнеров с парой праймеров (например, каждый в диапазоне размеров 6-30 нуклеотидов, более предпочтительно 10-30 нуклеотидов и еще более предпочтительно 10-20 нуклеотидов) которые при соответствующих условиях реакции может инициировать амплификацию, по меньшей мере, части нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, например, с помощью полимеразной цепной реакции (смотри, например Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA), лигазной цепной реакции (смотри, EP 320,308), использования Q β репликазы, циклической реакции зонда, или других способов, известных в данной области с уровня техники.

Набор может необязательно дополнительно содержать предварительно определенное количество DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, например, для использования в качестве стандарта или контроля.

5 Как используется в данном документе, термин "образец" включает жидкости организма (например, кровь, мочу или слюну) и ткани биопсии, взятые у субъекта с риском наличия одного или больше заболеваний согласно изобретению (например, биопсия, такая как биопсия легкого, поджелудочной железы и кожи) или их гомогенат.

10 Например, используемый биологический образец может быть из какого-либо источника, такого как образец сыворотки или образец ткани, например, ткань легкого, поджелудочной железы и кожи. Например, если смотреть на наличие метастатических заболеваний согласно изобретению, можно было бы смотреть на основные места метастаз заболеваний согласно изобретению, например, мозг, печень, кости и надпочечники для рака легкого; печень для рака
15 поджелудочной железы; или легкие, мозг и кости для рака кожи.

Альтернативно присутствие DLL3, или одного или больше его фрагментов, или присутствие нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или присутствие активности DLL3 могут быть обнаружены с помощью анализа *in situ*.

20 В некоторых вариантах осуществления, способы диагностики, описанные в данном документе, могут быть, по меньшей мере, частично, или полностью, выполнены *in vitro* или *ex vivo*.

Соответственно присутствие DLL3, или одного или больше его фрагментов, или присутствие нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или присутствие активности DLL3 обнаруживается количественно.

25 Например, количественное детектирование может включать:

контактирование биологического образца с аффинным реагентом, который является специфическим для DLL3, где указанный аффинный реагент необязательно является конъюгированным с детектируемой меткой; и

30 детектирование произошло ли связывание между аффинным реагентом и, по меньшей мере, одним видом в образце, где указанное обнаружение выполняют, или непосредственно, или опосредовано.

Альтернативно, присутствие DLL3, или одного или больше его фрагментов, или присутствие нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или присутствие

активности DLL3 могут быть обнаружены количественно посредством вовлечения использования технологий визуализации.

В другом варианте осуществления, способ изобретения включает использование иммуногистохимии, например, на тканевых срезах легкого, 5 поджелудочной железы и кожи для того, чтобы определить присутствие DLL3, или одного или больше его фрагментов, или присутствие нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или присутствие активности DLL3, и, таким образом, локализовать, например, клетки заболевания согласно изобретению.

В одном варианте осуществления присутствие DLL3 или его один или 10 больше эпитоп-содержащие фрагменты детектируются, например, используя аффинный реагент, способный к специфическому связыванию с DLL3 или одним или больше его фрагментов, таким как антитело.

В другом варианте осуществления детектируют активность DLL3.

Применение в клинических исследованиях

15 Диагностические способы и композиции согласно представленному изобретению могут помочь в мониторинге клинического исследования, например, чтобы оценить лекарственные средства для терапии заболеваний согласно изобретению. В одном варианте осуществления, молекулы-кандидаты 20 испытывали на их способность восстанавливать уровни DLL3 у субъекта, имеющего, например, заболевания согласно изобретению, до уровней, найденных у субъектов, не имеющих заболевания согласно изобретению, или, в лечении субъекта, чтобы сохранить уровни DLL3 такие как или около значений как без рака легкого, без рака поджелудочной железы или без рака кожи.

В другом варианте осуществления, способы и композиции согласно 25 представленному изобретению используют для отбора кандидатов для клинического исследования, чтобы идентифицировать, индивидуумы, имеющие, например, заболевания согласно изобретению; такие индивидуумы потом могут быть исключены из исследования или могут быть определены в отдельную когорту для лечения или анализа.

30 Получение белка согласно изобретению та соответствующая нуклеиновая кислота

В одном аспекте изобретение предусматривает способ лечения или предупреждения, например, заболеваний согласно изобретению, который включает введение субъекту, который нуждается в таком лечении или

предупреждении, терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или одного или больше ее фрагментов или производных, например, в виде вакцины.

5 В другом аспекте предусматривается способ лечения или предупреждения, например, заболеваний согласно изобретению, который включает введение субъекту, который нуждается в таком лечении или предупреждении, терапевтически эффективного количества нуклеиновой кислоты, которая ингибирует функцию или экспрессию DLL3.

10 Способы (и/или другие ДНК аспекты, раскрытые в данном документе) согласно изобретению могут, например, включать способы, в которых нуклеиновая кислота представляет собой DLL3 антисмысловую нуклеиновую кислоту или рибозим.

15 Таким образом, изобретение включает использование нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или одного или больше ее фрагментов или производных, в производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения, например, заболеваний согласно изобретению.

20 Кроме того, предусмотренным является использование нуклеиновой кислоты, которая ингибирует функцию или экспрессию DLL3 в производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения, например, одно или больше из заболеваний согласно изобретению.

25 ДНК, используемая в представленном изобретении, может быть получена путем выделения, как кДНК фрагмент из кДНК библиотек, используя в качестве исходных материалов коммерческие мРНК, и определение, и идентификацию их нуклеотидных последовательностей. Другими словами, в частности, клоны являются случайно выделенными из кДНК библиотек, которые получают в соответствии со способами Ohara et al. (DNA Research Vol.4, 53-59 (1997)). Далее, путем гибридизации, дублированные клоны (которые регулярно появляются) удаляют и потом *in vitro* осуществляют транскрипцию и трансляцию. Нуклеотидные последовательности на обоих концах клонов, для 30 которых продукты 50 kDa или больше являются подтвержденными, определяются.

Кроме того, базы данных известных генов являются поисковыми по гомологичности, используя, таким образом, полученные терминальные нуклеотидные последовательности, как запросы.

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

Кроме того, все области ген-содержащей ДНК человеческого происхождения, согласно представленному изобретению также могут быть получены с использованием метода ПЦР, такого как RACE, уделяя достаточное внимание, для предотвращения появления искусственных ошибок в коротких фрагментах или полученных последовательностях. Как описано выше, могут быть получены клоны имеющие ДНК согласно представленному изобретению.

В других способах клонирования ДНК согласно представленному изобретению, синтетический праймер ДНК, имеющий соответствующую нуклеотидную последовательность части полипептида согласно представленному изобретению получают, с последующей амплификацией согласно способу ПЦР, используя соответствующую библиотеку. Альтернативно, выбор может быть выполнен путем гибридизации ДНК согласно представленному изобретению с ДНК, которая была введена в соответствующий вектор и меченный ДНК фрагментом или синтетическим ДНК, кодирующая некоторые или все области полипептида согласно представленному изобретению. Гибридизация может быть выполнена, например, согласно способу, описанному в *Current Protocols in Molecular Biology* (под редакцией Frederick M. Ausubel et al., 1987). ДНК согласно представленному изобретению может быть какой-либо ДНК, при условии, что они содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды согласно представленному изобретению, как описано выше. Такие ДНК могут представлять собой кДНК, идентифицированную и выделенную с кДНК библиотек или тому подобное, которые получены из ткани легкого, поджелудочной железы и кожи. Такие ДНК, кроме того, может быть синтетической ДНК или подобной. Векторы для использования в конструкции библиотеки могут быть каким-либо из бактериофагов, плазмидов, космидов, фаргемидов, или подобных. Кроме того, при использовании фракции общей РНК или фракции мРНК, полученной из

вышеуказанных клеток и/или тканей, амплификация может быть выполнена путем прямой обратной транскрипции в сочетании с полимеразной цепной реакцией (далее в данном документе сокращается как “ОТ-ПЦР способ”).

ДНК, кодирующая указанный выше полипептид, состоящий из
5 аминокислотной последовательности, которая по существу является идентичной к аминокислотной последовательности из DLL3, или ДНК, кодирующая указанный выше полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности DLL3 путем делеции, замещения или добавления одной или больше аминокислот,
10 составляющих часть аминокислотной последовательности, могут быть легко получены путем соответствующей комбинации, например, способа сайт-направленного мутагенеза, способа ген гомологичной рекомбинации, способа удлинения праймера, и способа ПЦР, известной квалифицированному специалисту в данной области с уровня техники. Кроме того, на данный момент,
15 возможный способ для вызывания полипептида, чтобы иметь по существу эквивалентную биологическую активность, представляет собой замещение гомологичных аминокислот (например, полярные и неполярные аминокислоты, гидрофобные и гидрофильные аминокислоты, положительно-заряженные и отрицательно заряженные аминокислоты, и ароматические аминокислоты) среди
20 аминокислот, составляющих полипептид. Кроме того, для поддержания по существу эквивалентной биологической активности, аминокислоты в пределах функциональных доменов, содержащихся в полипептиде согласно представленному изобретению, предпочтительно сохраняется.

Кроме того, примеры ДНК согласно представленному изобретению
25 включает, ДНК которая включает нуклеотидную последовательность, которая кодируют аминокислотную последовательность DLL3, и гибридизирование ДНК в жестких условиях до ДНК и кодирующего полипептида (белка), имеющего биологическую активность (функцию) эквивалентную функции полипептида, состоящего из аминокислотной последовательности DLL3. В таких условиях,
30 пример такой ДНК, способной к гибридизированию до ДНК, которая включает нуклеотидную последовательность, которая кодируют аминокислотную последовательность DLL3, представляет собой ДНК, которая включает нуклеотидную последовательность, которая имеет степень общей средней гомологичности со всей нуклеотидной последовательностью ДНК, такую как

приблизительно 80% или больше, предпочтительно приблизительно 90% или больше, и более предпочтительно приблизительно 95% или больше.

Гибридизация может быть выполнена в соответствии со способом, известным в данной области с уровня техники, таким как, способ описанный в Current
5 Protocols in Molecular Biology (под редакцией Frederick M. Ausubel et al., 1987), или со способом в соответствии с ним. В данном документе, “жесткие условия” представляют собой, например, условия, приблизительно “1*SSC, 0,1% SDS, и 37°C, более жесткие условия приблизительно “0,5*SSC, 0,1% SDS, и 42°C, или еще более жесткие условия, приблизительно “0,2*SSC, 0,1% SDS, и 65°C. С
10 более жесткими условиями гибридизации, выделение ДНК, имеющей высокую гомологичность с зондом последовательности, могут быть ожидаемыми. Указанные выше комбинации SSC, SDS и температурные условия приведены в иллюстративных целях. Жесткость, аналогичная приведенной выше, может быть достигнута квалифицированным специалистом в данной области, используя
15 соответствующую комбинацию перечисленных выше факторов или других факторов (например, концентрация зонда, длина зонда и время реакции гибридизации) для определения жесткости гибридизации.

Клонированная ДНК согласно представленному изобретению могут непосредственно использовать или использовать, при необходимости, после
20 расщепления ферментом рестрикции, или добавлением линкера, в зависимости от целей. ДНК может иметь ATG, как кодон инициирования трансляции на 5' терминальной стороне, и может иметь TAA, TGA, или TAG как кодон терминирования трансляции на 3' терминальной стороне. Данный кодон инициирования трансляции и кодон терминирования трансляции также могут
25 быть добавлены, используя соответствующий синтетический адаптер ДНК.

В способах/использованиях согласно изобретению, DLL3 может, например, быть предусмотрен в изолированной форме, такой как, где DLL3 полипептид был очищен, по меньшей мере, до некоторой степени. DLL3 полипептид может
30 быть предусмотрен в практически чистом виде, то есть свободный, в значительной степени, от других белков. DLL3 полипептид также может быть получен, используя рекомбинантные способы, синтетически получены или получены путем комбинации данных способов. DLL3 может быть легко получен согласно какому-либо способу, известному квалифицированному специалисту в данной области с уровня техники, который включает получение вектора

экспрессии, содержащего соответствующую ДНК согласно представленному изобретению, или, ген-содержащей ДНК согласно представленному изобретению, культивирование трансформанта, трансформированного с использованием вектора экспрессии, генерирование и накопление соответствующего полипептида согласно представленному изобретению или рекомбинантного белка, содержащего полипептид, и потом собирание полученного в результате.

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

Как клетки-хозяева, используют, например, бактерии рода *Escherichia*, *Streptococci*, *Staphylococci*, *Streptomyces*, бактерии рода *Bacillus*, дрожжи, клетки *Aspergillus*, клетки насекомых, насекомые, и клетки животных. Конкретные примеры бактерий рода *Escherichia*, которые используют в данном документе, включают *Escherichia coli* K12 и DH1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 60, 160 (1968)), JM103 (*Nucleic Acids Research*, Vol. 9, 309 (1981)), JA221 (*Journal of Molecular Biology*, Vol. 120, 517 (1978)), и HB101 (*Journal of Molecular Biology*, Vol. 41, 459 (1969)). Как бактерии рода *Bacillus*, используют, например, *Bacillus subtilis* MI14 (*Gene*, Vol. 24, 255 (1983)) и 207-21 (*Journal of Biochemistry*, Vol.

95, 87 (1984)). Как дрожжи, используют, например, *Saccaromyces cerevisiae* AN22, AN22R-, NA87-11A, DKD-5D, и 20B-12, *Schizosaccaromyces pombe* NCYC1913 и NCYC2036, и *Pichia pastoris*. Как клетки насекомых, используют, например, клетки *Drosophila* S2 и *Spodoptera* Sf9. Как клетки животных, используют, например, клетки COS-7 и клетки обезьяны Vero, клетки китайского хомячка CHO (далее в данном документе сокращается как клетки CHO), dhfr-ген-дефицитные клетки CHO, клетки мышцы L, клетки мышцы AtT-20, клетки мышинной миеломы, клетки крысы GH3, клетки человека FL, COS, HeLa, C127,3T3, НЕК 293, ВНК и клетки меланомы Боуэса.

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

Вектор экспрессии может быть получен в соответствии со способом, известным в данной области с уровня техники. Например, вектор может быть получен путем (1) вырезания ДНК фрагмента, содержащего ДНК согласно представленному изобретению, или ген-содержащего ДНК согласно представленному изобретению и (2) сшивание ДНК фрагмента по ходу транскрипции промотора в соответствующем векторе экспрессии. Широкое разнообразие систем экспрессии может быть использовано, такие как и без ограничения, хромосомная, эписомальная и полученные из вируса системы, например, плазмиды, полученные из *Escherichia coli* (например pBR322, pBR325, pUC18, и pUC118), плазмиды, полученные из *Bacillus subtilis* (например pUB110, pTP5, и pC194), из бактериофага, из транспозонов, from из дрожжевых эписом (например pSH19 и pSH15), из элементов вставки, из дрожжевых хромосомных элементов, из вируса, такого как бакуловирус, паповавирус, такой как SV40, вирус осповакцины, аденовирус, птичьего вируса оспы, вирус псевдобешенства и ретровирус, и векторов, полученных из их комбинаций, такие как те, что получены из плазмиды и бактериофага (такие как [лямбда] фаг), генетических элементов, такие как космиды и фагемиды. Системы экспрессии могут содержать контрольные области, которые регулируют, а также порождают экспрессию. Промоторы для использования в представленном изобретении

могут представлять собой какие-либо промоторы, при условии, что они являются подходящими для хозяев, которые будут использоваться для генной экспрессии. Например, когда хозяин представляет собой *Escherichia coli*, предпочтительными являются *trp* промотор, *lac* промотор, *gcsA* промотор, *pL* промотор, *lpp* промотор, и подобные. Когда хозяин представляет собой *Bacillus subtilis*, предпочтительными являются *SPO1* промотор, *SPO2* промотор, *penP* промотор, и подобные. Когда хозяин представляет собой дрожжи, предпочтительными являются *PHO5* промотор, *PGK* промотор, *GAP* промотор, *ADH* промотор, и подобные. Когда животную клетку используют как хозяин, примеры промоторов для использования в данном случае включают *SRA* промотор, *SV40* промотор, *LTR* промотор, *CMV* промотор, и *HSV-TK* промотор. Как правило, могут использовать какую-либо систему или вектор, который является способным поддерживать, репродуцировать или экспрессировать нуклеиновую кислоту, чтобы получить полипептид в хозяине.

Соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты может быть встроена в систему экспрессии согласно какому-либо из множества хорошо известных и рутинных способов, таких как те, что представлены в Sambrook et al., выше. Соответствующие сигналы секреции могут быть введены в *DLL3* полипептид, чтобы дать секрецию транслируемого белка в просвет эндоплазматического ретикулума, периплазматическое пространство или внеклеточную среду. Данные сигналы могут быть эндогенными к полипептиду *DLL3*, или они могут быть гетерологичными сигналами. Трансформация клеток-хозяев может быть выполнена в соответствии со способами, известными в данной области с уровня техники. Например, на следующие документы может быть сделана ссылка: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 69, 2110 (1972); Gene, Vol. 17, 107 (1982); Molecular & General Genetics, Vol. 168, 111 (1979); Methods in Enzymology, Vol. 194, 182-187 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 75, 1929 (1978); Cell Technology, separate volume 8, New Cell Technology, Experimental Protocol. 263-267 (1995) (issued by Shujunsha); and Virology, Vol. 52, 456 (1973). Таким образом, полученный трансформант, трансформированный с вектором экспрессии, содержащей ДНК согласно представленному изобретению или ген-содержащий ДНК согласно представленному изобретению, могут культивировать в соответствии со способом, известным в данной области с уровня техники. Например, когда хозяевами являются бактерии рода *Escherichia*,

бактерии, как правило, культивируют при приблизительно от 15°C до 43°C в течение приблизительно 3 - 24 часов. При необходимости, также может быть добавлена аэрация или перемешивание. Когда хозяевами являются бактерии рода *Bacillus*, бактерии, как правило, культивируют при приблизительно от 30°C до 40°C в течение приблизительно 6 - 24 часов. При необходимости, также может быть добавлена аэрация или перемешивание. Когда трансформанты, хозяевами которых являются дрожжи, культивируют, культивирование, как правило, осуществляют при приблизительно от 20°C до 35°C в течение приблизительно 24 - 72 часов, используя среды с регулируемым рН, чтобы составлять приблизительно от 5 до 8. При необходимости, также может быть добавлена аэрация или перемешивание. Когда трансформанты, хозяевами которых являются клетки животных, культивируют, клетки, как правило, культивируют при приблизительно от 30°C до 40°C в течение приблизительно 15 - 60 часов, используя среды с регулируемым рН, чтобы составлять приблизительно от 6 до 8. При необходимости, также может быть добавлена аэрация или перемешивание.

Если полипептид DLL3 должен экспрессироваться для использования в скрининговых анализах на основе клеток, предпочтительным является то, что полипептид продуцируется на поверхности клетки. В этом случае, клетки могут быть собраны перед использованием в скрининг-анализе. Если полипептид DLL3 секретируется в среду, среда может быть восстановлена для того, чтобы выделить указанный полипептид. Если продуцированы внутриклеточно, клетки сначала должны лизировать, перед тем, как выделяют полипептид DLL3.

DLL3 полипептид может быть выделен и очищен из рекомбинантных клеточных культур или из других биологических источников с помощью хорошо известных способов, включающих, осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анион- или катион-обменную хроматографию, фосфоцеллюлозную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию с гидрофобными взаимодействиями, хроматографию с гидроксилалпатитом, молекулярную просеивающую хроматографию, способы центрифугирования, способы электрофореза и лектиновую хроматографию. В одном варианте осуществления, используют комбинацию данных способов. В другом варианте осуществления, используют высокоэффективную жидкостную хроматографию. В следующем варианте осуществления, антитело, которое специфически

связывается с полипептидом DLL3, может быть использовано, чтобы разрушить образец, который включает полипептид DLL3 указанного полипептида, или очистить указанный полипептид.

Для того, чтобы отделить и очистить полипептид или белок согласно
5 представленному изобретению от культуральных продуктов, например, после того, как культуру, микробные тела или клетки собирают с помощью известного способа, их суспендируют в соответствующем буфере, микробные тела или клетки разрушают, например, действием ультразвуковых волн, лизоцимами и/или замораживанием-оттаиванием, полученный в результате продукт затем
10 подвергают центрифугированию или фильтрованию, и затем может быть получен сырой экстракт белка. Буфер может также содержать агент денатурации белка, такой как мочевины или гуанидина гидрохлорид, или поверхностно-активное вещество, такое как Triton X-100(TM). Когда белок секретируется в культуральном растворе, микробные тела или клетки и супернатант разделяют
15 по известному способу после завершения культивирования, и затем собирают супернатант. Белок, содержащийся в, таким образом, полученном культуральном супернатанте или экстракте, может быть очищен с помощью соответствующей комбинации известных способов разделения и очистки. Таким образом, полученные полипептид (белок) согласно представленному изобретению может
20 быть превращен в соль известным способом или способ в соответствии с ним. И наоборот, когда полипептид (белок) согласно представленному изобретению получают в виде соли, его можно превратить в свободный белок или пептид или другую соль по известному способу или способу в соответствии с ним. Больше того, соответствующий фермент модификации белка, такой как трипсин или
25 химотрипсин, вызываются для того, чтобы действовать на белок, получаемый по рекомбинантным способам до или после очистки, таким образом, что модификация может быть произвольно добавлена, или полипептид может быть частично удален. Присутствие полипептида (белка) согласно представленному изобретению или его соли может быть измерено с помощью различных анализов
30 связывания, ферментных иммунологических анализов, используя специфические антитела, и тому подобное.

Способы, хорошо известны в данной области с уровня техники, могут быть использованы для повторной укладки, чтобы регенерировать нативную или активную конформации полипептида DLL3, когда полипептид был

денатурирован в процессе выделения и/или очистки. В контексте представленного изобретения, DLL3 полипептид может быть получен из биологического образца из какого-либо источника, такого как и без ограничения, образец крови или образец ткани, например образец ткани легкого, поджелудочной железы и кожи.

DLL3 полипептид может быть в виде "зрелого белка" или может быть частью более крупного белка, такого как слитый белок. Часто предпочтительным является включать дополнительную аминокислотную последовательность, которая содержит секреторные или лидерные последовательности, последовательность пре-, про- или препро-белка, или последовательность, которая помогает в очистке, такой как аффинной метки, например, но без ограничения, несколько остатков гистидина, FLAG метки, HA метки или тус метки.

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

Дополнительная последовательность, которая может обеспечить стабильность во время рекомбинантного продуцирования, также может быть использована. Такие последовательности необязательно могут быть удалены, по мере необходимости, путем включения расщепляемой последовательности, как дополнительной последовательности или ее части. Таким образом, DLL3 полипептид могут быть слиты с другими фрагментами, включающими другие полипептиды или белки (например, глутатион S-трансферазы и белок A). Такой слитый белок может быть расщеплен с помощью соответствующей протеазы, и затем разделен на каждый белок. Такие дополнительные последовательности и аффинные метки хорошо известны в данной области с уровня техники. В дополнение к указанному выше, особенности, известные в данной области с уровня техники, такие как энхансер, сигнал сплайсинга, полиА добавленный сигнал, селективный маркер, и происхождение SV40 репликации, могут быть добавлены к вектору экспрессии, при необходимости.

В одном аспекте изобретение предусматривает агент, способный к специфическому связыванию с DLL3, или его фрагмент, или гибридизирующий

агент, способный к гибридизированию нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или агент, способный к детектированию активности DLL3 для использования в лечении, скрининге, детектировании и/или диагностировании заболевания, такого как рак, и особенно заболеваний согласно изобретению.

5 Получение аффинных реагентов к DLL3

В одном аспекте, изобретение предусматривает аффинный или иммуноаффинный реагент, который способен к специфическому связыванию с DLL3 или его фрагментом, например, аффинный реагент, который содержит или является конъюгированным с детектируемой меткой или содержит или является конъюгированным с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксичный фрагмент. Аффинный агент может, например, быть антителом. Аффинный реагент может быть изолированным аффинным реагентом или очищенным аффинным реагентом.

Аффинный реагент для использования в изобретении может связываться с эпитопом на DLL3, например, одной или больше частями какой-либо из SEQ ID NO: 1 или 2. Предпочтительно, аффинный реагент специфически связывается с внеклеточным доменом (например, внеклеточным хвостом или внеклеточной петлей) DLL3 (например, SEQ ID NO: 12).

В соответствии с этим в данной области, существует три основных типа иммуноаффинного реагента – моноклональные антитела, фаговый дисплей антитела и малые молекулы, полученные из антитела, такие как Affibodies, доменные антитела (dAbs), Nanobodies, UniBodies, DARPs, Антикалины, Дуокалины, Avimers или Versabodies. В целом в применениях в соответствии с представленным изобретением, где использование антител является установленным, другие аффинные реагенты (например, Affibodies, доменные антитела, Nanobodies, UniBodies, DARPs, Антикалины, Дуокалины, Avimers или Versabodies) могут быть использованы. Такие вещества могут быть, как указывалось, способными к иммуноспецифическому связыванию с DLL3. В случае необходимости термин “аффинный агент” должен интерпретироваться так, чтобы охватить иммуноаффинные реагенты и другие вещества, способные к специфическому связыванию с DLL3 включая, но не ограничиваясь этим, лиганды, лектины, стрептавидины, миметики антитела и синтетические агенты связывания.

Получение антител к DLL3

Согласно изобретению DLL3, аналог DLL3, DLL3-связанный белок, или фрагмент, или производное какого-либо из вышеперечисленных, могут быть использованы в качестве иммуногена для получения антител, которые иммуноспецифически связывают такой иммуноген. Такие иммуногены могут быть изолированы по какому-либо приемлемому способу, включающему 5 способы, описанные выше. Термин “антитело”, как используется в данном документе, касается пептида или полипептида полученного из, по образцу или по существу кодируемого с помощью гена иммуноглобулина или генов иммуноглобулина, или их фрагментов, способных к специфическому 10 связыванию антигена или эпитопа. Смотри, например, *Fundamental Immunology*, 3rd Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) *J. Immunol.* Способы 175:267-273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97. Термин антитело включает антиген-связывание части, то есть, “сайты связывания антигена” (например фрагменты, субпоследовательности, 15 определяющие комплементарность области (CDRs)), которые сохраняют способность связывать антиген, в том числе (i) Fab фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1 доменов; (ii) F(ab')₂ фрагмент, бивалентный фрагмент, который включает два Fab фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd фрагмент, состоящий из 20 VH и CH1 доменов; (iv) Fv фрагмент, состоящий из VL и VH доменов одного плеча антитела, (v) dAb фрагмент (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из VH домена; и (vi) изолированную определяющую комплементарность область (CDR). Одноцепочечные антитела также включены в виде ссылки в термин “антитело”. Антитела согласно изобретению включают, но не ограничиваются этим, поликлональные, моноклональные, биспецифические, 25 гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab фрагменты и F(ab')₂ фрагменты, фрагменты, продуцированные библиотекой Fab экспрессии, антиидиотипические (анти-Id) антитела, и эпитоп-связывание фрагменты из каких-либо из описанных выше. Молекулы иммуноглобулина 30 согласно изобретению могут быть из какого-либо класса (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA, такие как IgG) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

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

Скорее, антитело “специфически связывает”, если его аффинность к предназначенной для него мишени составляет, как правило, приблизительно в 5-раз большее значение, по сравнению с его аффинностью к молекуле-немишени. Соответственно, не существует никакой значительной перекрестной реакции или перекрестного связывания с нежелательными веществами, особенно белками или тканями, встречающимися в природе, здорового человека или животного.

Предпочтительно, аффинность антитела, будет, по меньшей мере, приблизительно в 5 раз, предпочтительно в 10 раз, более предпочтительно в 25 раз, еще более предпочтительно в 50 раз, и наиболее предпочтительно в 100 раз или более, больше к молекуле-мишени, чем его аффинность к молекуле-немишени. В некоторых вариантах осуществления, специфическое связывание между антителом, или другим агентом связывания, и антигеном означает, что аффинность связывания составляет, по меньшей мере, 10^6 M^{-1} . Антитела могут, например, связываться с аффинностями, по меньшей мере, приблизительно 10^7 M^{-1} , и предпочтительно от приблизительно 10^8 M^{-1} до приблизительно 10^9 M^{-1} , от приблизительно 10^9 M^{-1} до приблизительно 10^{10} M^{-1} , или от приблизительно 10^{10} M^{-1} до приблизительно 10^{11} M^{-1} .

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

где

- 25 r = моли связанного лиганда/моль рецептора при равновесии;
- c = концентрация свободного лиганда при равновесии;
- K = равновесная константа ассоциации; и
- n = количество сайтов лигандного связывания на молекулу рецептора.

Согласно графическому анализу, r/c наносят на ось Y против r по оси X, таким образом, получая график Скэтчарда. Аффинность представляет собой отрицательный наклон линии. k_{off} может быть определен путем конкуренции связанного меченого лиганда с немеченым избыточным лигандом (смотри, например патент США № 6,316,409). Аффинность целенаправленного агента к его молекуле-мишени составляет, например, по меньшей мере, приблизительно 1

х 10^{-6} моль/литр, такая как, по меньшей мере, приблизительно 1×10^{-7} моль/литр, такая как, по меньшей мере, приблизительно 1×10^{-8} моль/литр, особенно, по меньшей мере, приблизительно 1×10^{-9} моль/литр, и в частности, по меньшей мере, приблизительно 1×10^{-10} моль/литр. Измерение аффинности антитела по анализу Скэтчарда хорошо известно в данной области с уровня техники, смотри, например, van Erp et al., J. Immunoassay 12: 425-43, 1991; Nelson and Griswold, Comput. Methods Программ Biomed. 27: 65-8, 1988.

В одном варианте осуществления, могут быть использованы какие-либо общедоступные антитела, которые распознают генные продукты из генов, кодирующих DLL3. В другом варианте осуществления, способы, известные квалифицированному специалисту в данной области с уровня техники, используются для получения антител, которые распознают DLL3, аналог DLL3, DLL3-связанный полипептид, или фрагмент или производное какого-либо из вышеперечисленных. Квалифицированному специалисту в данной области будет понятно, что многие процедуры доступны для получения антител, например, как описано в Antibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N. Y. Квалифицированному специалисту в данной области будет также понятно, что связывание фрагментов или Fab фрагментов, которые имитируют антитела, также могут быть получены из генетической информации, с помощью различных процедур (Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebaeck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992)).

В одном варианте осуществления изобретения, производятся антитела к специфическому домену DLL3. В конкретном варианте осуществления, гидрофильные фрагменты DLL3 используются как иммуногены для получения антитела.

При производстве антител, скрининг требуемого антитела может быть достигнут, используя способы, известные в данной области с уровня техники, например ИФА (твердофазный иммуноферментный анализ). Например, для выбора антител, которые распознают специфический домен DLL3, их могут анализировать с помощью генерированных гибридом для продукта, который связывается с DLL3 фрагментом, содержащим такой домен. Для выбора антитела, которое специфически связывает первый DLL3 гомолог, но который специфически не связывается со (или связывается менее активно) вторым DLL3

гомологом, его могут выбирать на основе положительного связывания с первым DLL3 гомологом и отсутствие связывания со (или уменьшенное связывание с) вторым DLL3 гомологом. Аналогично, для выбора антитела, которое специфически связывает DLL3, но специфически не связываться с (или связывает менее активно) другой изоформой того же самого белка (например, отличающейся гликоформой, имеющей такой же основной пептид как DLL3), его можно выбрать на основании положительного связывания с DLL3 и отсутствия связывания с (или уменьшенное связывание с) другой изоформой (например, отличающейся гликоформой). Таким образом, представленное изобретение предусматривает антитело (такое как моноклональное антитело), которое связывается с большей аффинностью (например, по меньшей мере, в 2-раза, например, по меньшей мере, в 5-раз, предпочтительно, по меньшей мере, в 10-раз большей аффинностью) с DLL3, чем с другой изоформой или изоформами (например, гликоформами) с DLL3.

Поликлональные антитела, которые могут быть использованы в способах согласно изобретению, представляют собой гетерогенные популяции антительных молекул, полученных из сывороток иммунизированных животных. Кроме того могут использовать нефракционированную иммунную сыворотку. Различные способы, известные в данной области с уровня техники, могут быть использованы для получения поликлональных антител к DLL3, фрагменту DLL3, DLL3-соответствующему полипептиду, или фрагменту DLL3-соответствующего полипептида. Например, один из способов состоит в очистке полипептидов, вызывающих интерес, или в синтезе полипептидов, вызывающих интерес, используя, например, способы твердофазного пептидного синтеза, хорошо известные в данной области с уровня техники. Смотри, например, Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol. Vol 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields ed., Meth. Enzymol. Vol 289 (1997); Kiso et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1: 255-60, 1995; Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44: 1326-31, 1996. выбранные полипептиды, затем могут использовать, чтобы иммунизировать путем инъекции различных хозяев-животных, включая, но не ограничиваясь этим, кроликов, мышей, крыс, т.д., чтобы генерировать поликлональные или моноклональные антитела. Если DLL3 очищают, используя гель-электрофорез, DLL3 могут быть использованы для иммунизации с или без

предварительной экстракции из полиакриламидного геля. Различные вспомогательных веществ (то есть иммуностимуляторы) могут быть использованы для повышения иммунного ответа, в зависимости от вида хозяина, включая, но неограничиваясь этим, полный или неполный адъювант Фрейнда, минеральный гель, такой как гидроксид алюминия, поверхностно-активное 5 вещество, такое как лизолецитин, плуроник-полиол, полианион, пептид, масляная эмульсия, гемоцианин лимфы улитки, динитрофенол, и вспомогательное вещество, такое как BCG (бацилла Кальметта-Герена) или *согупебактериум parvum*. Дополнительные вспомогательные вещества также 10 хорошо известны в данной области с уровня техники.

Для получения моноклональных антител (mAbs), нацеленных на DLL3, фрагмент DLL3, DLL3-связанный полипептид, или фрагмент DLL3-соответствующего полипептида, по какой-либо методике, которая 15 предусматривает получение молекул антитела, могут быть использованы непрерывные клеточные линии в культуре. Например, гибридомный способ, первоначально разработанный Kohler и Milstein (1975, Nature 256:495-497), а также триомный способ, гибридомный способ на В-клетках человека (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72), и EBV- гибридомный способ, для получения 20 моноклональных антител человека (Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Такие антитела могут быть из какого-либо класса иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD и какой-либо его подкласс. Гибридомное получение mAbs согласно изобретению может быть культивированы *in vitro* или *in vivo*. В дополнительном варианте 25 осуществления изобретения, моноклональные антитела могут быть получены у животных, свободный от микробов, применяя известную технологию (PCT/US90/02545, включенный в данный документ в качестве ссылки).

Моноклональные антитела включают, но не ограничиваются этим, человеческие моноклональные антитела и химерные моноклональные антитела (например, химеры человек-мышь). Химерное антитело представляет собой 30 молекулу, в которой различные части происходят от разных видов животных, таких как те, которые имеют константную область и переменную область человеческого иммуноглобулина, полученного из мышинового mAb, (смотри, например Cabilly et al., Патент США № 4,816,567; и Boss et al., Патент США № 4,816,397, которые включены в данный документ в виде ссылки в полном

объеме.). Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антитела от не человеческого вида, имеющего одну или больше определяющие комплементарность области (CDRs) от не человеческого вида и каркасную область от молекулы иммуноглобулина человека, (смотри, например Queen, Патент США № 5,585,089, которые включены в данный документ в виде ссылки в полной своем объеме.)

Химерные и гуманизированные моноклональные антитела могут быть получены согласно рекомбинантным ДНК способам, известным в данной области с уровня техники, например используя способы, описанные в Публикации РСТ № WO 87/02671; Заявке на Европейский патент 184,187; Заявке на Европейский патент 171,496; Заявке на Европейский патент 173,494; Публикации РСТ № WO 86/01533; Патенте США № 4,816,567; Заявке на Европейский патент 125,023; Better et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; и Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Патент США 5,225,539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534; и Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.

Полностью человеческие антитела являются особенно желательными для терапевтического лечения субъектов-людей. Такие антитела могут быть получены с использованием трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать гены эндогенного иммуноглобулина с тяжелой и легкой цепью, но которые могут экспрессировать человеческие гены с тяжелой и легкой цепью. Трансгенных мышей иммунизируют обычным образом выбранным антигеном, например, всеми или частью из DLL3. Моноклональные антитела, направленные против антигена, могут быть получены с использованием традиционной гибридомной технологии. Человеческие иммуноглобулиновые трансгены, введенные трансгенным мышам, перегруппировывались во время дифференцирования В-клеток, и затем подвергаются классовому переключению и соматической мутации. Таким образом, используя такую методику, можно получить терапевтически эффективные IgG, IgA, IgM и IgE антитела. Для обзора этой технологии для получения антител человека, смотри Lonberg and Huszar

(1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Для более подробное обсуждение этой технологии для получения антител человека и моноклональных антител человека и протоколов получения таких антител, смотри, например, Патент США 5,625,126; Патент США 5,633,425; Патент США 5,569,825; Патент США 5,661,016; и Патент США 5,545,806. Кроме того, компании, такие как Abgenix, Inc. (Freemont, CA) и Genpharm (San Jose, CA) могут быть задействованы для обеспечения антител человека, направленных против выбранного антигена, используя технологию, аналогичную той, что описана выше.

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

15 Антитела согласно представленному изобретению также могут быть получены с использованием технологии фагового дисплея для получения и скрининга библиотек полипептидов для связывания с выбранной мишенью. Смотри, например, Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82, 1990; Devlin et al., *Science* 249, 404-6, 1990, Scott and Smith, *Science* 249, 386-88, 1990; 20 и Ladner et al., Патент США № 5,571,698. Основная концепция способов фагового дисплея состоит в создании физической ассоциации между ДНК, кодирующей полипептид, который скринингуется, и полипептидом. Данная физическая ассоциация обеспечивается фаговой частицей, которая отображает полипептид, как часть капсида, охватывающего геном фага, который кодирует полипептид. Создание физической связи между полипептидами и их 25 генетическим материалом позволяет одновременного массовый скрининг очень большого количества фага, несущего различные полипептиды. Фаговый дисплейинг полипептида с аффинностью к мишени связываться с мишенью, и данный фаг является обогащенным за счет аффинного скрининга к мишени. 30 Идентичность полипептидов, отображаемая от этих фагов, может быть определенной из их соответствующих геномов. Используя эти способы полипептид, идентифицированный, как имеющий аффинность связывания для желаемой мишени, может быть синтезирован в объеме с использованием обычных способов. Смотри, например, Патент США № 6,057,098, который

включен в данный документ во всей ее полноте, включая все таблицы, фигуры и формулу изобретения. В частности, такой фаг может быть использован для отображения доменов антигена связывания, экспрессированных из репертуарной или комбинаторной библиотеки антитела (например, человека или мышиноного).

5 Фаг, экспрессирующий домен антигена связывания, который связывает антиген, вызывающий интерес, может быть выбран или идентифицирован антигеном, например, используя меченный антиген или антиген, связанный или нанесенный на твердую поверхность или шарик. Фаг, использованный в данных способах, как правило, представляет собой нитевидный фаг, включающий fd и M13

10 домены связывания, экспрессированные из фага с Fab, Fv, или дисульфидом стабилизированные домены Fv антитела, рекомбинантно слитые с геном фага III или белком гена VIII. Способы фагового дисплей, которые могут быть использованы для создания антитела согласно представленному изобретению, включают те, которые раскрыты в Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50

15 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); Заявке РСТ № РСТ/GB91/01134; Публикации РСТs WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; и Патентах США № 5,698,426; 5,223,409; 20 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 и 5,969,108; каждый из которых включены в данный документ в виде ссылки в полной своем объеме.

Как описано в вышеуказанных ссылках, после выбора фага, антитело, кодирующее области из фага, может быть выделено и использовано для создания

25 целых антител, в том числе человеческих антител, или какого-либо другого желаемого антиген-связывающего фрагмента, и экспрессировано в каком-либо желательном хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, как подробно описано ниже. Например, методы рекомбинантного получения Fab, Fab 'и F (ab')₂ фрагментов

30 также могут быть применены с использованием способов, известных в данной области с уровня техники, таких как те, которые раскрыты в публикации РСТ; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); и Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); и Better et al., Science 240:1041-1043 (1988) (указанные ссылки, включены посредством ссылки во всей своей полноте).

Примеры способов, которые могут быть использованы для получения одноцепочечных Fvs и антител включают те, которые описаны в Патентах США 4,946,778 и 5,258,498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); и Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

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

В соответствии с другим и более предпочтительным подходом,
20 переменные домены антитела с желаемой специфичностью связывания (антитело-антиген связывающими сайтами) сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. Слияние предпочтительно осуществляют с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, который включает, по меньшей мере, часть шарнирной, CH2, и CH3 областей.
25 Предпочтительным является то, что имеется первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствующей в, по меньшей мере, в одном из слияний. ДНК, кодирующая слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, при необходимости, легкой цепи иммуноглобулина, вставляются в отдельные вектора экспрессии, и
30 совместно трансфицируются в приемлемый организм-хозяин. Это предусматривает большую гибкость в регулировании взаимных соотношений трех полипептидных фрагментов в вариантах, когда неравные соотношения трех полипептидных цепей, используемых в конструкции, дают оптимальные выходы. Однако, существует возможность вставить кодирующие последовательности для

двух или всех трех полипептидных цепей в одном векторе экспрессии, когда экспрессия, по меньшей мере, двух полипептидных цепей в равных соотношениях в результате приводит к высоким выходам, или когда соотношения не имеют особого значения.

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

Изобретение предусматривает функционально активные фрагменты, производные или аналоги анти-DLL3 молекул иммуноглобулина. Функционально активный означает, что фрагмент, производное или аналог
20 способен вызвать анти-анти-идиотип антитела (то есть, третичные антитела), которые распознают один и тот же антиген, который является распознаваемым антителом, из которого получают фрагмент, производное или аналог. В частности, в предпочтительном варианте осуществления антигенность идиотипа молекулы иммуноглобулина может быть повышена путем делеции каркасной и
25 CDR последовательностей, которые являются C-терминальными к CDR последовательности, которая специфически распознает антиген. Для того, чтобы определить, какие CDR последовательности связывают антиген, синтетические пептиды, содержащие CDR последовательности могут быть использованы в
30 анализах связывания с антигеном согласно какому-либо способу анализа связывания, известному в данной области с уровня техники.

Представленное изобретение предусматривает фрагменты антитела, такие как, но не ограничиваясь этим, $F(ab')_2$ фрагменты и Fab фрагменты. Фрагменты антитела, которые распознают специфические эпитопы, могут быть сформированы с помощью известных методик. $F(ab')_2$ фрагменты состоят из

вариабельной области, константной области легкой цепи и CH1 домен тяжелой цепи и генерируются пепсиновым разложением молекулы антитела. Fab фрагменты генерируются восстановлением дисульфидных мостиков the F(ab')₂ фрагментов. Изобретение, кроме того, предусматривает димеры тяжелой цепи и легкой цепи антитела согласно изобретению, или какого-либо его минимального фрагмента, такого как Fvs или одноцепочечные антитела (SCAs) (например, как описано в Патенте США 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; и Ward et al., 1989, Nature 334:544-54), или какую-либо другую молекулу с такой же специфичностью как у антитела согласно изобретению. Одноцепочечные антитела образуются путем связывания фрагментов тяжелой и легкой цепи Fv области через аминокислотный мостик, получая в результате одноцепочечный полипептид. Способы сборки функциональных Fv фрагментов в E. coli могут быть использованы (Skerra et al., 1988, Science 242:1038-1041).

В других вариантах осуществления, изобретение предусматривает слитые белки из иммуноглобулинов согласно изобретению (или функционально активные его фрагменты), например, в которых иммуноглобулин сливается посредством ковалентной связи (например, пептидной связи), либо на N-конце, или С конце аминокислотной последовательности другого белка (или его части, предпочтительно, по меньшей мере, 10, 20 или 50 аминокислотной части белка), который не является иммуноглобулином. Предпочтительно иммуноглобулин, или его фрагмент, является ковалентно связанным с другим белком на N-конце константного домена. Как указано выше, такие слитые белки могут облегчить очистку, повысить период полувыведения *in vivo*, и повысить доставку антигена через эпителиальный барьер в иммунную систему.

Имуноглобулины согласно изобретению включают аналоги и производные, которые модифицируются, то есть, путем ковалентного присоединения какого-либо типа молекулы при условии, что такое ковалентное присоединение не нарушает иммуноспецифическое связывание. Например, но не в качестве ограничения, производные и аналоги иммуноглобулинов включают те, которые были далее модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком, и т.д.

Какая-либо из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена с помощью известных способов, включая, но неограничиваясь этим, специфического химического расщепления, ацетилирования, формилирования, т.д. Кроме того, аналог или производное может содержать одну или больше неклассических аминокислот.

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

Получение Affibodies к DLL3

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

Меченые Affibodies также могут быть полезны в получении изображений для определения обилия изоформ.

Получение доменных антител DLL3

Ссылки на антитела в данном документе охватывают ссылки на доменные антитела. Доменные антитела (dAbs) являются наименьшими функциональными единицами связывания антител, соответствующих переменным областям или тяжелой (VH), или легкой (VL) цепи антител человека. Доменные антитела имеют молекулярную массу приблизительно 13 кДа. Domantis разработала ряд крупных и высоко функциональных библиотек полностью человеческих VH и VL dAbs (более десяти миллиардов различных последовательностей в каждой библиотеке), и использует эти библиотеки для выбора dAbs, которые являются специфическими для терапевтических мишеней. В отличие от многих традиционных антител, доменные антитела хорошо экспрессируются в бактериальных, дрожжевых клеточных системах и клеточных системах млекопитающих. Дальнейшие подробности доменных антител и способы их получения могут быть получены путем ссылки на патенты США 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; США серийный № 2004/0110941; Заявку на Европейский патент № 1433846 и Европейские патенты 0368684 и 0616640; WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 и WO03/002609, каждый из которых включен в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

Получение Nanobodies DLL3

Nanobodies представляют собой терапевтические белки, производные от антитела, которые содержат уникальные структурные и функциональные свойства от встречающихся в природе антител с тяжелой-цепью. Данные антитела с тяжелой-цепью содержат один переменный домен (VHH) и два константных домена (C_{H2} и C_{H3}). Важно отметить, что клонированный и изолированный VHH домен представляет собой совершенно стабильный полипептид, содержащий полную способность антигенного связывания исходного антитела с тяжелой-цепью. Nanobodies имеют высокую гомологичность с V_H доменами человеческих антител, и могут быть в дальнейшем гуманизированными без какой-либо потери активности. Важно отметить, что Nanobodies имеют низкий иммуногенный потенциал, который был подтвержден в исследованиях на приматах с Nanobody соединениями свинца.

Nanobodies сочетают в себе преимущества обычных антител с важными особенностями низкомолекулярных лекарственных средств. Как и обычные

антитела, Nanobodies показывают высокую мишенную специфичность, высокую аффинность для их мишени и низкую, присущую им токсичность. Однако, подобно низкомолекулярным лекарственным средствам, они могут ингибировать ферменты и легко достигать расщелины рецепторов. Кроме того, Nanobodies являются чрезвычайно устойчивыми, могут быть введены способами другие, чем инъекции (смотри, например, WO 04/041867, которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме) и просты в изготовлении. Другие преимущества Nanobodies включают распознавание необычных или скрытых эпитопов в результате их небольшого размера, связывание в полостях или в активных сайтах белковых мишеней с высокой аффинностью и избирательностью в связи с их уникальным 3-мерным форматом гибкости лекарственного средства, заданным периодом полувыведения и, легкостью и быстротой открытия новых лекарственных средств.

Nanobodies кодируются одиночными генами и эффективно продуцируются почти во всех эукариотических и прокариотических хозяевах, например, *E. coli* (смотри, например US 6,765,087, которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме), плесенных грибах (например, *Aspergillus* или *Trichoderma*) и дрожжах (например, *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Hansenula* или *Pichia*) (смотри, например, US 6,838,254, которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме). Процесс получения масштабируется и были произведены многокилограммовые количества Nanobodies. Поскольку Nanobodies демонстрируют превосходную стабильность по сравнению с обычными антителами, они могут быть сформулированы в виде готового к использованию раствора с длительным сроком годности.

Способ наноклонирования (смотри, например, WO 06/079372, которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме) является собственным способом создания Nanobodies против нужной мишени, на основании автоматизированной высокоповсюду действующего отбора В-клеток.

30 Получение UniBodies DLL3

UniBodies представляет собой другой фрагмент антительной технологии; однако данный фрагмент основан на удалении шарнирной области IgG4 антител. Делеция шарнирной области в молекуле в результате приводит к молекуле, которая, по существу, по размеру в два раза меньше традиционных IgG4 антител

и имеет одновалентную связывающую область, а не двухвалентную связывающую область IgG4 антител. Кроме того, хорошо известно, что IgG4 антитела являются инертными и, таким образом, не взаимодействуют с иммунной системой, что может быть предпочтительным для лечения заболеваний, где иммунный ответ не требуется, и данное преимущество передается на UniBodies. Например, UniBodies может функционировать, чтобы ингибировать или молчать, но не убивать клетки, к которым они присоединены. Кроме того, связывание UniBody с раковыми клетками не стимулируют их к пролифилитованию. Кроме того, поскольку UniBodies составляют приблизительно половину размера традиционных IgG4 антител, они могут показать лучшее распределение на больших солидных опухолях с потенциально выгодной эффективностью. UniBodies удаляются из организма с такой же скоростью к целым IgG4 антителам и способны связываться с аналогичной аффинностью к их антигенам, как целым антителам. Дальнейшая подробная информация о UniBodies может быть получена путем ссылки на патент WO2007/059782, которая включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

Получение DARPins DLL3

DARPins (разработанные анкириновые повторные белки) являются одним из примеров технологии миметика антитела DRP (разработанные повторные белки), которая была разработана, чтобы эксплуатировать способности к связыванию неантительных полипептидов. Повторные белки, такие как анкирин- или лейцин-богатые повторные белки, являются убиквитарными молекулами связывания, которые возникают, в отличие от антител, внутри- и внеклеточно. Их уникальная модульная архитектурная характеристика повторяющихся структурных единиц (повторов), которые складываются вместе, чтобы сформировать удлиненные повторные домены, отображая переменные и модульные мишень-связывающие поверхности. Основываясь на данной модульности, могут быть получены комбинаторные библиотеки полипептидов с высоко диверсифицированной специфичностью связывания. Данная стратегия включает консенсусный дизайн самостоятельно совместимых повторов, которые отображают переменные поверхностные остатки и их случайное собрание в повторных доменах.

DARPs могут быть получены в бактериальных системах экспрессии с очень высокими выходами, и они относятся к числу наиболее стабильных известных белков. Высоко специфические, высоко аффинные DARPs с широким диапазоном белков-мишеней, включающие человеческие рецепторы, цитокины, киназы, человеческие протеазы, вирусные и мембранные белки, были
5 выбраны. DARPs, имеющие аффинности в однозначных наномолярном до пикомолярного диапазону могут быть получены.

DARPs были использованы в широком диапазоне применений, включая ИФА, сэндвич ИФА, анализ проточной цитометрии (FACS), иммуногистохимию
10 (ИНС), чип приложений, аффинную очистку или Вестерн-блоттинг. Кроме того, предусматривается DARPs является высоко активным во внутриклеточном пространстве, например, как внутриклеточные маркерные белки, слитые с зеленым флуоресцентным белком (GFP). DARPs, кроме того, использовали, чтобы ингибировать попадание вируса с IC_{50} в пМ диапазоне. DARPs не только
15 идеально подходит для блокирования взаимодействий белок-белок, но также, чтобы ингибировать ферменты. Протеазы, киназы и транспортеры успешно ингибировались, наиболее часто аллостерическим способом ингибирования. Очень быстрые и специфические обогащения на опухоли и очень подходящая опухоль в соотношении крови, что делает DARPs хорошо исследованными для
20 *in vivo* диагностических средств или терапевтических подходов.

Дополнительная информация относительно белков DARP и других технологий DRP можно найти в заявке на патент США № 2004/0132028 и публикация международной патентной заявки № WO02/20565, каждая из которых включена в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

25 Получение антикалинов к DLL3

Антикалины представляют собой дополнительное антитело миметической технологии, однако в данном случае специфичность связывания происходит от липокалинов, семейства низкомолекулярных белков, которые естественным образом и обильно экспрессируется в человеческих тканях и жидкостях
30 организма. Липокалины эволюционировали, чтобы выполнять ряд функций *in vivo*, связанных с физиологическим транспортом и хранением химически чувствительных или нерастворимых соединений. Липокалины имеют надежную внутреннюю структуру, которая включает высоко консервативный β - ствол, который поддерживает четыре петли на одном конце белка. Эти петли

формируют вход в карман связывания и конформационные различия в этой части счета молекулы для изменения специфичности связывания между отдельными липокалинами.

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

10 Липокалины клонируют и их петли подвергаются инженерингу, чтобы создать антикалины. Были получены библиотеки структурно различных антикалинов, и антикалиновый дисплей позволяет выбрать и скрининговать функции связывания, с последующей экспрессией и получением растворимого белка для дальнейшего анализа в прокариотических или эукариотических
15 системах. Исследования успешно продемонстрировали, что антикалины могут быть разработаны, что являются специфическими для фактически любого человеческого белка-мишени; они могут быть выделены, и может быть получена аффинность связывания в наномолярном или более высоком диапазоне.

20 Антикалины также могут быть отформатированы в качестве двойных нацеленных белков, так называемых дуокалинов. Дуокалин связывает две отдельных терапевтических мишени в один легко получаемый мономерный белок с использованием стандартных производственных процессов, в тоже время, сохраняя целевую специфичность и аффинность независимо от структурной ориентации двух его связывающих доменов.

25 Модуляция нескольких мишеней, посредством одной молекулы, является особенно выгодным при известных заболеваниях, включающих больше одного причинного фактора. Кроме того, би- или поливалентные связывающие форматы, такие как дуокалины имеют значительный потенциал в ориентации молекул на клеточной поверхности при болезни, опосредуя агонистические
30 воздействия на пути сигнальной трансдукции или индуцируя улучшенные эффекты интернализации путем связывания и кластеризации рецепторов на клеточной поверхности. Кроме того, высокая внутренняя устойчивость дуокалинов сравнима с мономерными антикалинами, предлагая гибкие формулировки и доставки потенциала для дуокалинов.

Дополнительную информацию о антикалинах можно найти в патенте США № 7,250,297 и публикации международной заявки на патент WO 99/16873, оба из которых включены в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

Получение Avimers к DLL3

5 Avimers эволюционировали от большого семейства внеклеточных доменов рецептора человека путем *in vitro* перетасовки экзона и фагового дисплея, создавая многодоменные белки со связывающими и ингибирующими свойствами. Связывающие многочисленные независимые домены связывания, как было показано, создают avidности и в результате приводят к улучшенной
10 аффинности и специфичности по сравнению с обычными одно-эпитопными связывающими белками. Другие потенциальные преимущества включают простое и эффективное получение мультимишень-специфических молекул в *Escherichia coli*, повышенную термостабильность и устойчивость к протеазам. Avimers с суб-наномолярными аффинностями были получены против различных
15 мишеней.

Дополнительную информацию о Avimers можно найти в публикациях заявок на патент США № 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756, все из которых включены в
20 настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Получение Versabodies к DLL3

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

Стимулирование для Versabodies приходит от естественных инъекционных биофармацевтических препаратов, производимых пиявками, змеями, пауками,

скорпионами, улитками, и анемонами, которые, как известно, демонстрируют неожиданно низкую иммуногенность. Начиная с выбранных семейств природных белков, путем дизайна и скрининга по размеру, гидрофобности, протеолитического процессинга антигена и плотности эпитопа минимизируют до

5 уровня гораздо ниже среднего для природных инъекционных белков.

Учитывая структуру Versabodies, данные миметики-антитела предлагают универсальный формат, который включает мульти-валентность, мульти-специфичность, разнообразие механизмов полувыведения, модули тканевой ориентации и отсутствие Fc область антитела. Кроме того, Versabodies

10 производят в E.coli высокими выходами, и из-за их гидрофильности и малого размера, Versabodies являются хорошо растворимыми и могут быть сформулированными в высоких концентрациях. Versabodies являются исключительно термостойкими (они могут быть прокипячены) и имеют длительный срок хранения.

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

Экспрессия аффинных реагентов

Экспрессия антитела

20 Антитела согласно изобретению могут быть получены каким-либо способом, известным в данной области с уровня техники, для синтеза антител, в частности, путем химического синтеза или путем рекомбинантной экспрессии, и предпочтительно получают с использованием способов рекомбинантной экспрессии.

25 Рекомбинантная экспрессия антител, или их фрагментов, производных или аналогов, требует конструирования нуклеиновой кислоты, которая кодируют антитело. Если нуклеотидная последовательность антитела является известной, то нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, может быть собрана из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в

30 Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242), которые, кратко, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, ренатурацию и сшивание данных олигонуклеотидов, и потом амплификацию сшитых олигонуклеотидов путем ПЦР.

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

Если молекула антитела, которая специфически распознает специфический антиген не является доступной (или источником библиотеки кДНК для клонирования нуклеиновой кислоты, кодирующей такое антитело), то антитела, специфичные к определенному антигену могут быть сгенерированы каким-либо способом, известным в данной области с уровня техники, например, путем иммунизации животного, такого как кролик, чтобы генерировать поликлональные антитела или, например, путем генерирования моноклональных антител. В качестве альтернативы, клон, кодирующий, по меньшей мере, Fab часть антитела может быть получен путем скрининга Fab библиотек экспрессии (например, как описано в Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281) для клонов Fab фрагментов, которые связывают специфический антиген или путем скрининга библиотек антитела (смотри, например Clackson et al., 1991, Nature 352:624; Hane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937).

После того, как получают нуклеиновую кислоту, кодирующую, по меньшей мере, переменный домен молекулы антитела, она может быть введена в вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (смотри, например Публикация PCT WO 86/05807; Публикация PCT WO 89/01036; и Патент США № 5,122,464). Векторы, содержащие полную легкую или тяжелую цепь для совместной экспрессии с нуклеиновой кислотой, чтобы позволить экспрессию полной молекулы антитела, также являются доступными. Затем нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело могут использовать для введения нуклеотидного(ых) замещения(й) или делеции(й), необходимых для замещения (или делеции) одного или более

вариабельных областей остатков цистеина, участвующих в дисульфидной связи с аминокислотным остатком, который не содержит сульфидильную группу.

Такие модификации могут быть выполнены каким-либо способом, известным в данной области для введения специфических мутаций или делеций в

5 нуклеотидную последовательность, например, но не ограничиваясь этим, химический мутагенез, *in vitro* сайт-направленный мутагенез (Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551), способы, основанные РСТ и т.д.

Кроме того, могут быть использованы способы, разработанные для получения “химерных антител” (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454) с использованием генов сплайсинга из молекулы мышинового антитела антигена с соответствующей специфичностью вместе с генами из молекулы человеческого антитела с соответствующей биологической активностью. Как описано выше, химерное антитело представляет собой 15 молекулу, в которой различные части происходят от разных видов животных, таких как те, которые имеют вариабельную область, полученную из мышинового mAb и константной области человеческого антитела, например, гуманизированные антитела.

После того, как нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу антитела 20 согласно изобретению, была получена, вектор для получения молекулы антитела может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием методов, хорошо известных в данной области с уровня техники. Таким образом, способы получения DLL3 путем экспрессирования нуклеиновой кислоты, содержащей последовательности молекулы антитела, являются 25 описанными в данном документе. Способы, которые хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области с уровня техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих молекулу антитела, кодирующего последовательности и соответствующие транскрипционные и трансляционные контрольные сигналы. Данные способы 30 включают, например, *in vitro* рекомбинантные ДНК способы, синтетические способы, и *in vivo* генетические рекомбинации. Смотри, например, способы, описанные в Sambrook et al. (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) and Ausubel et al. (eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

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

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

Разнообразие систем экспрессии вектор-хозяин может быть использовано, чтобы экспрессировать молекулу антитела данного изобретения. Такие системы-хозяева экспрессии представляют собой носители, с помощью которых может 15 быть получено кодирование последовательностей, вызывающих интерес, и затем очищают, но также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфицировании с соответствующим нуклеотидом, кодирующим последовательности, могут экспрессировать молекулу антитела согласно изобретению *in situ*. Они включают, но не ограничиваются этим, 20 микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*, *B. Subtilis*), трансформированные с рекомбинантными векторами экспрессии бактериофаговой ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащей антитело, кодирующее последовательности; дрожжи (например *Saccharomyces*, 25 *Pichia*), трансформированные с рекомбинантными векторами экспрессии дрожжей, содержащими антитело, кодирующее последовательности; клеточные системы насекомых, инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии вирусов (например, бакуловирус), содержащие антитело, кодирующее последовательности; клеточные системы растений, инфицированные 30 рекомбинантными векторами экспрессии вирусов (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV), или трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии плазмиды (например, Ti plasmid), содержащими антитело, кодирующее последовательности; или клеточные системы млекопитающих (например, COS,

СНО, ВНК, 293, 3Т3 клетки), несущие рекомбинантные конструкторы экспрессии, содержащие промоторы, производные от генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотioneина) или из вируса млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса осповакцины 7.5К).

5 В бактериальных системах, ряд векторов экспрессии может быть преимущественно выбран в зависимости от использования, предназначенной для молекулы антитела, которое экспрессируется. Например, когда большое количество такого белка должно быть произведено, для создания фармацевтических композиций, содержащих молекулу антитела, векторы, 10 которые направляют экспрессию высоких уровней на продукты слитого белка, которые легко чистятся, могут быть желательными. Такие векторы включают, но не ограничиваются этим, вектор экспрессии pUR278 *E. coli* (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791), в котором антитело, кодирующее последовательность может быть шито по отдельности в вектор в рамке с *lac Z* кодирующей областью, так 15 что продуцируется слитый белок; pIN векторы (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); и тому подобное. Векторы pGEX могут быть также использованы для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион S-трансферазы (GST). В общем, такие слитые белки являются растворимыми и 20 могут быть легко очищены от лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матричными глутатион-агарозными шариками, с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX сконструированы, чтобы включить тромбин или сайты фактора расщепления Ха-протеазы таким образом, чтобы клонированный продукт гена мишени может 25 быть освобожден от GST фрагмента.

В системе насекомого, *Autographa californica* вирус ядерного полиэдроа (AcNPV) используется в качестве вектора, чтобы экспрессировать чужеродные гены. Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Последовательность, кодирующая антитело, может быть клонирована в отдельности неосновных 30 областях (например, ген полиэдрина) вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина). В клетках-хозяевах млекопитающих, могут быть использованы ряды систем экспрессии на основе вируса (например, аденовирусная система экспрессии).

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

Для долгосрочной перспективы, предпочтительным является получение с высоким выходом рекомбинантных антител со стабильной экспрессией. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют антитело, вызывающее интерес, может быть получено путем трансфекции клетки с вектором экспрессии, содержащим нуклеотидную последовательность антитела, и нуклеотидную последовательность, способную к селекции (например, неомицину или гигромицину), и выбор экспрессии селективного маркера. Такие сконструированные клеточные линии могут быть особенно полезны в скрининге и оценке соединений, которые взаимодействуют непосредственно или опосредовано с молекулой антитела.

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

Клетка-хозяин может быть совместно трансфицирована двумя векторами экспрессии согласно изобретению, где первый вектор кодирует тяжелую цепь производного полипептида, и, где второй вектор, кодирует легкую цепь производного полипептида. Два вектора могут содержать идентичные селективные маркеры, которые позволяют уравнивать экспрессию тяжелых и легких цепей полипептидов. В качестве альтернативы, один вектор может быть использован, который кодирует как тяжелую, так и легкую цепь полипептидов. В таких ситуациях, легкая цепь должны быть помещены перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197). Кодированные

последовательности для тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

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

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

Антитела, генерированные данными способами, могут затем быть выбраны
25 с использованием первого скрининга по аффинности и специфичности с очищенным, представляющим интерес полипептидом и, при необходимости, сравнивают результаты по аффинности и специфичности антител с полипептидами, которые являются желательными для исключения из
связывания. Процедура скрининга может включать иммобилизацию очищенных
30 полипептидов в отдельных лунках микротитровальных планшетов. Раствор, содержащий потенциальное антитело или группы антител, затем помещают в соответствующие лунки для микротитрования и инкубируют в течение от 30 мин до 2 ч. Микротитровальные лунки потом промывают, и меченое вторичное антитело (например, анти-мышинное антитело, конъюгированное со щелочной

фосфатазой, если повышенные антитела представляют собой мышинные антитела) добавляют в лунки и инкубируют в течение приблизительно 30 мин, а затем промывают. Субстрат добавляют в лунки, и возникает цветная реакция, где присутствует антитело с иммобилизованным полипептидом(ами).

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

15 Квалифицированным специалистам в данной области будет понятно, что многие подходы могут быть взяты для получения антитела или фрагмента связывания, и для скрининга и отбора по аффинности и специфичности для различных полипептидов, но данные подходы не меняют объем изобретения.

Для терапевтического применения антитела (особенно моноклональные антитела) могут быть соответственно человеческими или гуманизированными животными (например, мыши) антителами. Антитела животных могут быть подняты на животных с использованием человеческого белка (например, DLL3) в качестве иммуногена. Гуманизация, как правило, включает привитие CDR, идентифицированных таким образом, в человеческие каркасные области.

25 Обычно требуются некоторое последующее ретромутации, чтобы оптимизировать конформацию цепей. Такие способы известны специалистам в данной области.

Экспрессия Affibodies

30 Конструирование affibodies было описано в другом месте (Ronnmark J, Gronlund H, Uhlen, M., Nygren P.A, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647–2655.), включая конструирование библиотек фагового дисплея Affibody (Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhlen, M. & Nygren, P.A, A combinatorial library of an a-helical bacterial receptor domain, 1995, Protein Eng. 8, 601–608. Nord, K.,

Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. & Nygren, P.A, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, 1997, Nat. Biotechnol.15, 772–777.)

Биосенсоры анализируют для исследования оптимальных вариантов Affibody с использованием биосенсора связывания, исследования также были описаны в другом месте (Ronmark J, Gronlund H, Uhlen, M., Nygren P.A, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647–2655.).

Модификации аффинных реагентов

10 В предпочтительном варианте осуществления, анти-DLL3 аффинные реагенты, такие как антитела или их фрагменты, являются конъюгированными с диагностическим фрагментом (такие как, детектируемая метка) или терапевтическим фрагментом. Антитела могут быть использованы для диагностики или определения эффективности данной схемы лечения.

15 Обнаружение может быть облегчено путем сочетания антитела с детектируемым веществом (меткой). Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радионуклиды, позитрон-излучающие металлы (для использования в позитронно-эмиссионной томографии), и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов. Смотри, как правило, патент США 4,741,900 для ионов металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для использования как диагностического средства в соответствии с представленным изобретением. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или

20 ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные материалы включают умбеллиферон, флуоресцеин изотиоцианат флуоресцеина, родамин, флуоресцеина дихлортриазиниламин, дансилхлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; подходящие

25 биолюминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; и подходящие радионуклиды включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc . ^{68}Ga также может быть использован.

Как указано выше, аффинные реагенты, такие как антитела для применения в изобретении, могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом,

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

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

Цитотоксины могут быть конъюгированными с антителами согласно изобретению с использованием линкер-технологии, доступной в данной области с уровня техники. Примеры типов линкеров, которые были использованы для конъюгации цитотоксина с антителом, включают, но не ограничиваются этим, гидразоны, тиоэфиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептид-содержащие линкеры. Линкер может быть выбран таким образом, что, например, чувствительный к расщеплению при низком pH в пределах отсека лизосом, или чувствительный к расщеплению протеазами, такими как протеазы

преимущественно экспрессируемые в опухолевой ткани, такие как катепсины (например катепсины В, С, D).

Примеры цитотоксинов, описанных, например, в патентах США № 6,989,452, 7,087,600 и 7,129,261, а также в заявках РСТ № РСТ/US2002/17210, РСТ/US2005/017804, РСТ/US2006/37793, РСТ/US2006/060050, РСТ/US2006/060711, WO2006/110476, и в заявке на патент США № 60/891,028, все из которых включены в данный документ в виде ссылки в полном объеме. Для дальнейшего обсуждения типов цитотоксинов, линкеров и способов конъюгации терапевтических агентов с антителами, смотри также Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Аффинные реагенты также могут быть конъюгированы с радиоактивным изотопом для создания цитотоксических радиофармацевтических препаратов, называемых также радиоиммуноконъюгатами. Примеры радиоактивных изотопов также могут быть конъюгированными с антителами для использования диагностически или терапевтически включают, но не ограничиваются этим, йод¹³¹, индий¹¹¹, иттрий⁹⁰ и лютеций¹⁷⁷. Способы получения радиоиммуноконъюгатов установлены в данной области. Примеры радиоиммуноконъюгатов являются коммерчески доступными, в том числе Зевалин®, (IDEC Pharmaceuticals) и Веххар® (Corixa Pharmaceuticals), и подобные способы могут быть применены для получения радиоиммуноконъюгатов с использованием антител согласно изобретению.

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

Конъюгаты могут быть использованы для модификации данного биологического ответа, фрагмент лекарственное средство не должен рассматриваться, как ограничение химическим классическим терапевтическим агентам. Например, фрагмент лекарственного средства может представлять собой белок или полипептид, обладающий желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, ферментативно активный токсин, или его активный фрагмент, такой как абрин, ризин А, экзотоксин *Pseudomonas*, или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли или интерферон- γ ; или модификаторы биологического ответа, такие как, например, лимфокины, интерлейкин-1 ("IL-1"), интерлейкин-2 ("IL-2"), интерлейкин-6 ("IL-6"), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор ("G-CSF"), или другие факторы роста. Senter P.D. (2009) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13(3):235-244; Kovtun et al. (2010) *Cancer Res.* 70(6):2528-2537.

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

Альтернативно, антитело может быть конъюгированным со вторым антителом с образованием антительного гетероконъюгата, как описано Segal в патенте США № 4,676,980.

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

Изобретение, кроме того, предусматривает полностью человеческое или гуманизированное антитело, которое индуцирует направленную на антитела клеточную цитотоксичность (ADCC). Полностью человеческое антитело представляет собой антитело, в котором белковые последовательности кодируются встречающимися в природе последовательностями иммуноглобулина человека, или из изолированных продуцирующих антитела человеческих В-лимфоцитов, или из трансгенных мышинных В-лимфоцитов мышей, в которых мышинный иммуноглобулин, кодирующий хромосомные области были заменены на ортологичные человеческие последовательности. Трансгенные антитела последнего типа включают, но не ограничиваются этим, HuMab (Medarex, Inc, CA) and Xenomouse (Abgenix Inc., CA). Гуманизированное антитело представляет собой антитело, в котором константная область молекулы нечеловеческого антитела с соответствующей антигенной специфичностью, замещается на константную область человеческого антитела, предпочтительно подтипа IgG, с соответствующими эффекторными функциями (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454). Соответствующие эффекторные функции включают ADCC, которая представляет собой естественный процесс, с помощью которого полностью человеческие антитела или гуманизированные антитела, при связывании с мишенями на поверхности раковых клеток, переключаются на свойства по уничтожению клеток лимфоцитов, которые являются частью нормальной иммунной системы. Данные активные лимфоциты, называемые естественные киллеры (NK) клеток, используют цитотоксический процесс для разрушения живых клеток, с которыми данные антитела связываются. ADCC активность может быть обнаружена и количественно определена путем измерения высвобождения европия (Eu^{3+}) из Eu^{3+} меченых живых клеток в присутствии антиген-специфического антитела и мононуклеарных клеток периферической крови, экстрагированных из иммунокомпетентного, живого человеческого субъекта. Процесс ADCC подробно описан в Janeway Jr. C.A. et al., Immunobiology, 5th ed., 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. et al., Immunology, Infection, and Immunity, 2004, p246-5; Albanell J. et al., Advances in Experimental Medicine and Biology, 2003, 532:p2153-68 and Weng, W.-K. et al., Journal of Clinical Oncology, 2003, 21:p 3940-3947. Suitable methods for the detection and quantification of ADCC can be found in Blomberg et al., Journal of

Immunological Methods. 1986, 86:p225-9; Blomberg et al., Journal of Immunological Methods. 1986, 21;92:p117-23 and Patel & Boyd, Journal of Immunological Methods. 1995, 184:p29-38.

ADCC обычно включает активацию клеток NK, и зависит от распознавания
5 клеток, покрытых антителом Fc рецептором на поверхности клетки NK.
Рецепторы Fc распознают Fc (кристаллический) часть антител, таких как IgG,
связываются специфически к поверхности клетки-мишени. Рецептор Fc,
который вызывает активацию клетки NK, называется CD16 или FcγRIIIa. После
этого, рецептор FcγRIIIa связывается с IgG Fc, NK клетки высвобождает
10 цитокины, такие как IFN-γ и цитотоксические гранулы, содержащие перфорин и
гранзимы, которые входят в клетку-мишень и способствуют гибели клеток,
вызывая апоптоз.

Индукция антител 0-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC)
антителом может быть увеличена путем модифицирования, которые изменяют
15 взаимодействия между константной областью (Fc) антитела и различными
рецепторами, которые присутствуют на поверхности клеток иммунной системы.
Такие модификации включают уменьшение или отсутствие альфа1,6-связанных
фукозных фрагментов в комплексе олигосахаридных цепей, которые обычно
добавляются к Fc антител во время естественного или рекомбинантного синтеза
20 в клетках млекопитающих. В предпочтительном варианте осуществления, не
фукозилированные анти-DLL3 аффинные реагенты, такие как антитела или их
фрагменты, продуцируются с целью повышения их способности индуцировать
ADCC ответ.

Способы уменьшения или абляции альфа 1,6-связанных фукозных
25 фрагментов в олигосахаридных цепей Fc хорошо известны. В одном примере,
рекомбинантное антитело, синтезируется в клеточной линии, которая ослабевает
в своей способности добавлять фукозу в альфа 1,6 связывание с наиболее
внутренним N-ацетилглюкозамином из N-связанных биантенарных
комплексного типа Fc олигосахаридов. Такие клеточные линии включают, но не
30 ограничиваются этим, крысиные гибридомы YB2/0, которые экспрессируют
пониженный уровень гена альфа 1,6-фукозилтрансферазы, FUT8.
Предпочтительно антитело, синтезируется в клеточной линии, которая является
не способной к добавлению альфа-1,6-связанных фукозильных фрагментов в
сложные олигосахаридные цепи, из-за делеции обеих копий гена FUT8. Такие

клеточные линии включают, но не ограничиваются этим, FUT8 -/- CHO/DG44 клеточные линии. Способы синтеза частично фукозилированных, или не фукозилированных антител и аффинных реагентов являются описанными в Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278:3466–34735 (2003); Yamane-Ohnuki et al.,
5 Biotechnology and Bioengineering 87: 614-22 (2004) и в WO00/61739 A1, WO02/31140 A1 и WO03/085107 A1. Во втором примере, фукозилирование рекомбинантного антитела уменьшается или отменяется путем синтеза в клеточную линию, которая была генетически модифицированной, чтобы сверхэкспрессировать гликопротеин-модифицирующую гликозилтрансферазу на
10 уровне, который максимизирует получение сложных N-связанных олигосахаридов, несущих разделенный пополам N-ацетилглюкозамин. Например, антитело, синтезируется в клеточной линии яичника китайского хомячка, экспрессирующей фермент N-ацетилглюкозаминтрансферазы III (GnT III). Клеточные линии, стабильно трансфицированные с подходящими
15 гликопротеин-модифицирующими гликозилтрансферазами, и способы синтеза антител с использованием данных клеток описаны в WO 99/54342.

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

В дальнейшей модификации, аминокислотные последовательности антитела Fc являются измененными таким образом, что повышает ADCC активацию, без влияния на аффинность лиганда. Примеры таких модификаций описаны в Lazar et al., Proceedings of the National Academy of Sciences 2006, 103:
25 p4005-4010; WO03/074679 и WO2007/039818. В данных примерах, замещение аминокислот в Fc антителе, такое как аспарат на серин в положении 239, и изолейцин на глутамат в положении в 332, изменяет аффинность связывания антитела с Fc рецепторами, что приводит к увеличению активации ADCC.

Реагентом антитела с повышенной ADCC активацией за счет
30 аминокислотных замещений могут быть использовано в качестве терапевтического средства, которое вводят самостоятельно или в сочетании с цитотоксическим(ими) фактором(ами) и/или цитокином(ами).

Изобретение, кроме того, предусматривает биспецифические молекулы, которые включают, по меньшей мере, одну первую специфичность связывания

для первого эпитопа-мишени (то есть DLL3), и вторую специфичность связывания для второго эпитопа-мишени. Второй эпитоп-мишень может присутствовать на одном и том же белке-мишени как в том, что связывается за счет первой специфичности связывания; или второй эпитоп-мишень может присутствовать в другом белке-мишени, с которым связывается с помощью первого белка, с которым связывается за счет первой специфичности связывания. Второй эпитоп-мишень может присутствовать на одной и той же клетке, как первый эпитоп-мишень (то есть DLL3); или второй эпитоп-мишень может присутствовать на мишени, которая не отображается клеткой, которая отображает первый эпитоп-мишень. Как используется в данном документе, термин 'специфичность связывания' касается фрагмента, который включает, по меньшей мере, один переменный домен антитела.

В одном варианте осуществления, биспецифическая молекула представляет собой ViTE (биспецифический T-клеточный блокировщик). В частности, изобретение предусматривает биспецифический аффинный реагент (предпочтительно биспецифическое антитело), которое содержит первый домен связывания для DLL3 и второй домен связывания для T-клеточного антигена, предпочтительно CD3.

Данные биспецифические молекулы-мишени DLL3, экспрессирующие клетки CD3, экспрессирующих эффекторные клетки (например, CD3 экспрессирующий цитотоксичные T клетки) и триггер CD3-опосредованные активности эффекторной клетки, такие как T клеточная клональная экспансия и T клеточная цитотоксичность. Биспецифические антитела согласно изобретению могут иметь в общей сложности два или три переменных домена антитела, где первая часть биспецифического антитела способна подбирать активность человеческой иммунной эффекторной клетки за счет специфического связывания с эффекторным антигеном, расположенным на человеческой иммунной эффекторной клетке, в которой эффекторный антиген является человеческим CD3 антигеном, где указанная первая часть состоит из одного переменного домена антитела, и вторая часть биспецифического антитела является способной к специфическому связыванию с антигеном-мишенью другим, чем эффекторный антиген, например DLL3, где указанный антиген-мишень располагается на клетке-мишени другой, чем указанная человеческая

иммунная эффекторная клетка, и указанная вторая часть, включает один или два переменных домена антитела.

В одном предпочтительном варианте осуществления, изобретение предусматривает биспецифическое антитело (предпочтительно ViTE), которое связывается с DLL3 и CD3 для лечения рака легкого, предпочтительно мелкоклеточного рака легкого.

Диагностика рака, включая заболевания согласно изобретению

В соответствии с другим аспектом изобретения, предусматривается способ определения, диагностики и/или скрининга, или мониторинга прогрессирования рака, например, заболеваний согласно изобретению или мониторинга эффекта, например, от противоракового лекарственного средства или терапии, нацеленной на заболевания согласно изобретению, у субъекта, который включает обнаружение присутствия или уровня антител, способных к иммуноспецифическому связыванию с DLL3, или одно или больше его эпитоп-содержащих фрагментов, или которое включает детектирование изменения в его уровне у указанного субъекта.

В соответствии с другим аспектом изобретения, кроме того, предусмотренным является способ детектирования, диагностирования и/или скрининга рака, например, заболеваний согласно изобретению, у субъекта, который включает обнаружение присутствия антител, способных к иммуноспецифическому связыванию с DLL3, или одного или больше его эпитоп-содержащих фрагментов, у указанного субъекта, в котором (а) присутствие повышенного уровня антител, способных к иммуноспецифическому связыванию с DLL3, или указанным одним или больше его эпитоп-содержащими фрагментами, у указанного субъекта по сравнению с уровнем в здорового субъекта, или (b) присутствие детектируемого уровня антител, способных к иммуноспецифическому связыванию с DLL3, или указанными одним или больше его эпитоп-содержащими фрагментами, у указанного субъекта по сравнению с соответствующим недетектируемым уровнем у здорового субъекта, указывает на наличие указанного вида рака у указанного субъекта.

Один конкретный способ детектирования, диагностирования и/или скрининга рака, например, заболеваний согласно изобретению, включает:

приведение в контакт с биологическим образцом, который исследуется на DLL3, или один или больше их эпитоп-содержащих фрагментов; и

обнаружение присутствия антител у субъекта, способных к иммуноспецифическому связыванию с DLL3, или одним или больше эпитоп-содержащими фрагментами.

5 В соответствии с другим аспектом изобретения, предусматривается способ мониторинга прогрессирования рака, например, заболеваний согласно изобретению, или мониторинга эффекта, например, от противоракового лекарственного средства или терапии нацеленной на заболевания согласно изобретению у субъекта, который включает обнаружение присутствия антител, способных к иммуноспецифическому связыванию с DLL3, или одним или
10 больше его эпитоп-содержащими фрагментами, у указанного субъекта в первый момент времени и в более поздний период времени, присутствия повышенного или пониженного уровня антител, способных к иммуноспецифическому связыванию с DLL3, или одним или больше его эпитоп-содержащими
15 фрагментами, у указанного субъекта в более поздний период времени по сравнению с уровнем у указанного субъекта в указанный первый момент времени, указывая на прогрессирование или регрессирование указанного рака, или на эффект или отсутствие эффекта от указанного противоракового лекарственного средства или терапии у указанного субъекта.

Присутствие антител способных к иммуноспецифическому связыванию с
20 DLL3, или одним или больше его эпитоп-содержащими фрагментами, как правило, детектируется с помощью анализа биологического образца, полученного от указанного субъекта (примерные биологические образцы указываются выше, например, образец представляет собой образец ткани легкого, поджелудочной железы и кожи, или другое, образец крови или слюны).
25 Способ, как правило, включает стадию получения указанного биологического образца для анализа от указанного субъекта. Антитела, которые могут быть обнаружены, включают IgA, IgM и IgG антитела.

В соответствии с представленным изобретением, образцы для исследования, например, ткани легкого, поджелудочной железы или кожи, сыворотки, плазмы или мочи, полученной от субъекта с подозрением на то, что у
30 него или установлено, что у него заболевания согласно изобретению, могут быть использованы для диагностики или мониторинга. В одном варианте осуществления, изменение в относительном содержании DLL3 в образце для исследования по отношению к контрольному образцу (от субъекта или

субъектов не имеющих заболевания согласно изобретению), или предварительно определенному диапазону референсных значений, указывает на наличие заболеваний согласно изобретению. В другом варианте осуществления, относительное обильное содержание DLL3 в образце для исследования по сравнению с контрольным образцом или предварительно определенным диапазоном референсных значений указывает на подтип заболеваний согласно изобретению (например, мелкоклеточный рак; плоскоклеточный рак легкого; эндокринные опухоли поджелудочной железы или плоскоклеточный рак кожи, меланома). В еще другом варианте осуществления, относительное обильное содержание DLL3 в образце для исследования по отношению к контрольному образцу или предварительно определенному диапазону референсных значений указывает на степень или тяжесть заболеваний согласно изобретению (например, вероятность метастазирования). В каком-либо из указанных выше способов, обнаружение DLL3 может необязательно быть комбинированным с обнаружением одного или больше дополнительных биомаркеров для заболеваний согласно изобретению. Какой-либо приемлемый способ в данной области может быть применен для измерения уровня DLL3, включая, но не ограничиваясь этим, предпочтительные технологии, описанные в данном документе, анализы киназы, иммунологические анализы для детектирования и/или визуализации DLL3 (например, Вестерн-блоттинг, иммунопреципитация с последующим натрий додецилсульфатным-полиакриламидным гелевым электрофорезом, иммуноцитохимический анализ, т.д.). В следующем варианте осуществления, изменение в относительном содержании мРНК, кодирующей DLL3 в образце для исследования по отношению к контрольному образцу или предварительно определенному диапазону референсных значений, указывает на наличие заболеваний согласно изобретению. Какой-либо приемлемый гибридационный анализ может быть использован для обнаружения экспрессии DLL3 путем детектирования и/или визуализации мРНК, кодирующей DLL3 (например, Нозерн анализы, дот-блоттинг, *in situ* гибридизация, и т.п.).

В другом варианте осуществления изобретения, меченые антитела (или другие аффинные реагенты), их производные и аналоги, которые специфически связываются с DLL3, могут быть использованы для диагностических целей для обнаружения, диагностики или мониторинга заболеваний согласно изобретению. Предпочтительно, заболевания согласно изобретению обнаруживают у

животного, более предпочтительно у млекопитающего, и наиболее предпочтительно у человека.

Анализы скрининга

Изобретение предусматривает способы для идентифицирования агентов (например, соединений-кандидатов или исследуемых соединений), которые связываются с DLL3 или имеют стимулирующее или ингибиторное действие на экспрессию или активность DLL3. Изобретение, кроме того, предусматривает способы идентифицирования агентов, соединений-кандидатов или исследуемых соединений, которые связываются с DLL3-связанным полипептидом или DLL3 слитым белком, или имеют стимулирующее или ингибиторное действие на экспрессию или активность DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитого белка. Примеры агентов, соединений-кандидатов или исследуемых соединений включают, но не ограничиваются этим, нуклеиновые кислоты (например, ДНК и РНК), углеводы, белки, пептиды, пептидомиметики, малые молекулы и другие лекарственные средства. Агенты могут быть получены, используя какой-либо из многочисленных подходов в комбинаторных библиотеках способов, известных в данной области с уровня техники, включая: биологические библиотеки; пространственно адресуемую параллельную твердую фазу или фазу раствора библиотек; синтетические способы библиотеки, требующие деконволюции; “один шарик, одно соединение” способ библиотеки; и синтетические способы библиотеки, используя выбор аффинной хроматографии. Подход биологической библиотеки ограничивается пептидными библиотеками, тогда как другие четыре подхода являются применимыми к пептиду, непептидному олигомеру или малым молекулам библиотек соединений (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145; Патент США № 5,738,996; и Патент США № 5,807,683, каждая из которых включена в данный документ во всей своей полноте в качестве ссылки).

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

Библиотеки соединений могут быть представлены, например, представлены в растворе (например, Houghten, 1992, *BioTechniques* 13:412-421), или на шариках (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), чипах (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), бактериях (патент США № 5,223,409), спорах (патенты № 5,571,698; 5,403,484; и 5,223,409), плазмидах (Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) или фage (Scott and Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; и Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310), каждая из которых включена в данный документ во всей своей полноте в качестве ссылки.

10 В одном варианте осуществления, агенты, которые взаимодействуют с (то есть связываются с) DLL3, фрагментом DLL3 (например, функционально активным фрагментом), с DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитым белком, определяются в основанной на клетке системе анализа. В соответствии с данным вариантом осуществления, 15 клетки, экспрессирующие DLL3, фрагмент DLL3, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитый белок, контактируют с соединением-кандидатом, или контрольным соединением, и определяется способность соединения-кандидата взаимодействовать с DLL3. При необходимости, данный анализ может быть использован для скрининга 20 множества (например, библиотеки) соединений-кандидатов. Клетка, например, может быть прокариотического происхождения (например, *E.coli*) или эукариотического происхождения (например, дрожжевой или млекопитающих). Кроме того, клетки могут экспрессировать DLL3, фрагмент DLL3, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида, или DLL3 25 слитый белок эндогенно или генетически модифицированный, чтобы экспрессировать DLL3, фрагмент DLL3, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида, или DLL3 слитый белок. В некоторых случаях, DLL3, фрагмент DLL3, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитый белок или соединение-кандидат является 30 меченым, например, радиоактивной меткой (например, ^{32}P , ^{35}S , и ^{125}I) или флуоресцентной меткой (такой как, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталальдегид или флуорескамин), чтобы иметь возможность обнаружить взаимодействие между DLL3 и соединением-кандидатом. Способность соединения-кандидата

взаимодействовать непосредственно или опосредованно с DLL3, фрагментом DLL3, DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитым белком может быть определена с помощью способов, известных квалифицированным специалистам в данной области.

5 Например, взаимодействие между соединением-кандидатом и DLL3, DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитым белком может быть определено с помощью анализа проточной цитометрии, сцинтилляционного анализа, иммунопреципитации или анализа Вестерн-блоттинга.

10 В другом варианте осуществления, агенты, которые взаимодействуют с (то есть связываются с) DLL3, фрагментом DLL3 (например, функционально активным фрагментом), DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида, или DLL3 слитым белком, определяются в
15 бесклеточной системе анализа. В соответствии с данным вариантом осуществления, нативный или рекомбинантный DLL3 или его фрагмент, или нативный или рекомбинантный DLL3-связанный полипептид или его фрагмент, или DLL3-слитый белок или его фрагмент, подвергают взаимодействию с соединением-кандидатом или контрольным соединением, и определяют
20 способность соединения-кандидата взаимодействовать с DLL3 или DLL3-связанным полипептидом, или DLL3 слитым белком. При необходимости, данный анализ может быть использован для скрининга множества (например, библиотеки) соединений-кандидатов. Предпочтительно, DLL3, DLL3 фрагмент, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида, или DLL3 слитый белок сначала иммобилизуют, например, путем контактирования
25 DLL3, DLL3 фрагмента, DLL3-связанного полипептида, фрагмента DLL3-связанного полипептида, или DLL3 слитого белка с иммобилизованным антителом (или другим аффинным реагентом), который специфически распознает и связывает его, или путем контактирования очищенного препарата DLL3, DLL3 фрагмента, DLL3-связанного полипептида, фрагмента DLL3-связанного полипептида, или DLL3 слитого белка с поверхностью,
30 сконструированной, чтобы связывать белки. DLL3, DLL3 фрагмент, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида, или DLL3 слитый белок может быть частично или полностью очищенным (например, частично или полностью свободный от других полипептидов) или частью

клеточного лизата. Кроме того, DLL3, DLL3 фрагмент, DLL3-связанный полипептид, или фрагмент DLL3-связанного полипептида может представлять собой слитый белок, который включает DLL3 или его биологически активную часть, или DLL3-связанный полипептид и домен, такой как

5 глутатионин-S-трансфераза. Альтернативно, DLL3, DLL3 фрагмент, DLL3-связанный полипептид, фрагмент DLL3-связанного полипептида или DLL3 слитый белок может быть биотинилированным, используя способы, хорошо известные квалифицированным специалистам в данной области (например, набор биотинилирования, Pierce Chemicals; Rockford, IL). Способность

10 соединения-кандидата взаимодействовать с DLL3, DLL3 фрагментом, DLL3-связанным полипептидом, фрагментом DLL3-связанного полипептида, или DLL3 слитым белком может быть определено, используя способы, известные квалифицированным специалистам в данной области.

В другом варианте осуществления система на основе анализа клеток

15 используется для идентификации агентов, которые связываются с или модулируют активность белка, такого как фермент, или его биологически активная часть, которая отвечает за получение или деградацию DLL3 или отвечает за посттрансляционную модификацию DLL3. В первичном скрининге, множество (например, библиотека) соединений приводят в контакт с клетками,

20 которые естественно или рекомбинантно экспрессируют: (i) DLL3, изоформу DLL3, гомолог DLL3, DLL3-связанный полипептид, DLL3 слитый белок, или биологически активный фрагмент какой-либо из вышеперечисленных; и (ii) белок, который отвечает за обработку DLL3, изоформы DLL3, гомолога DLL3, DLL3-связанного полипептида, DLL3 слитого белка или фрагмента для того,

25 чтобы идентифицировать соединения, которые модулируют получение, разложение или посттрансляционную модификацию DLL3, изоформы DLL3, гомолога DLL3, DLL3 связанного полипептида, DLL3 слитого белка или фрагмента. При необходимости, соединения, идентифицированные в первичном скрининге, затем могут быть проанализированы во вторичном скрининге против

30 T клеток, естественно или рекомбинантно экспрессирующие DLL3. Способность соединения-кандидата модулировать получение, разложение или посттрансляционную модификацию DLL3, изоформы, гомолога, DLL3-связанного полипептида, или DLL3 слитого белка может быть определена способами, известными квалифицированным специалистам в данной области,

включающие без ограничения, анализ проточной цитометрии, сцинтилляционный анализ, иммунопреципитацию или анализ Вестерн-блоттинга.

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

В другом варианте осуществления, агенты, которые модулируют (то есть повышают регуляцию или понижают регуляцию) экспрессию или активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида, определяют путем контактирования клеток (например, клетки прокариотического происхождения или

эукариотического происхождения), экспрессирующих DLL3 или DLL3-связанный полипептид, с соединением-кандидатом или контрольным соединением (например, фосфатным буферным солевым раствором (PBS)) и определяют экспрессию DLL3, DLL3-связанного полипептида, или DLL3-слитого белка, мРНК, кодирующую DLL3, или мРНК, кодирующую DLL3-связанный полипептид. Уровень экспрессии DLL3, DLL3-связанного полипептида, мРНК, кодирующей DLL3, или мРНК кодирующей DLL3-связанный полипептид, в присутствии соединения-кандидата сравнивают с уровнем экспрессии DLL3, DLL3-связанного полипептида, мРНК, кодирующей DLL3, или мРНК, кодирующей DLL3-связанный полипептид, в отсутствие соединения-кандидата (например, в присутствии контрольного соединения). Соединение-кандидат затем могут идентифицировать как модулятор экспрессии DLL3, или DLL3-связанного полипептида на основе данного сравнения. Например, когда экспрессия DLL3 или мРНК является значительно большей в присутствии соединения-кандидата, чем в его отсутствие, соединение-кандидат идентифицируют как стимулятор экспрессии DLL3 или мРНК. Альтернативно, когда экспрессия DLL3 или мРНК в присутствии соединения-кандидата значительно меньше, чем в его отсутствие, то соединение-кандидат идентифицируют как ингибитор экспрессии DLL3 или мРНК. Уровень экспрессии DLL3 или мРНК, кодирующей его, можно определить по способам, квалифицированным специалистами в данной области. Например, экспрессия мРНК может быть оценена с помощью анализа Нозерн-блоттинга или ОТ-ПЦР, и уровни белка могут быть оценены с помощью анализа Вестерн-блоттинга.

В другом варианте осуществления, агенты, которые модулируют активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида определяются путем контактирования препарата, содержащего DLL3 или DLL3-связанный полипептид или клетки (например прокариотические или эукариотические клетки), экспрессирующие DLL3 или DLL3-связанный полипептид, с исследуемым соединением или контрольным соединением, и определение способности исследуемого соединения модулировать (например, стимулировать или ингибировать) активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида. Активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида может быть оценена путем определения индукции клеточного пути сигнальной трансдукции DLL3 или DLL3-связанного полипептида (например, внутриклеточный Ca^{2+} ,

диацилглицерин, IP3, и т.д.), детектирование каталитической или ферментной активности мишени на приемлемом субстрате, детектирование индукции рецепторного гена (например, регуляторного элемента, который реагирует с DLL3 или DLL3-связанным полипептидом и функционально связывается с нуклеиновой кислотой, кодирующей способный к детектированию маркер, например люциферазу), или детектирование клеточного ответа, например, клеточной дифференцировки, или клеточной пролиферации. На основании представленного описания, способы, известные квалифицированным специалистам в данной области, могут быть использованы для измерения данных активностей (смотри, например патент США № 5,401,639, который включен в данный документ в качестве ссылки). Соединение-кандидат потом может быть идентифицировано в качестве модулятора активности DLL3 или DLL3-связанного полипептида путем сравнения эффектов соединения-кандидата с контрольным соединением. Подходящие контрольные соединения включают фосфатный буферный солевой раствор (PBS) и физиологический солевой раствор (NS).

В другом варианте осуществления, агенты, которые модулируют (то есть повышают регуляцию или понижают регуляцию) экспрессию, активность или как экспрессию, так и активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида, определяются в модели на животных. Примеры приемлемых животных включают, но не ограничиваются этим, мышей, крыс, кроликов, обезьян, морских свинок, собак и кошек. Предпочтительно, животное, которое используют, представляет модель заболеваний согласно изобретению (например ксенотрансплантаты клеточных линий мелкоклеточного рака легких, такие как NCI-H345; ксенотрансплантаты клеточных линий немелкоклеточного рака легких, такие как A549 и H460; ксенотрансплантаты клеточных линий рака поджелудочной железы, такие как MIA PaCa-2 у безтимусных мышей, Marincola et al., J Surg Res 1989 Dec; 47(6):520-9; или ксенотрансплантаты клеточных линий рака кожи, такие как MV3 у безтимусных мышей, van Muijen et al., Int J Cancer 1991 Apr 22;48(1):85-91). Они могут быть использованы для тестирования соединений, которые модулируют уровни DLL3, так как патология, продемонстрированная в данных моделях, является аналогичной, например, заболеваниям согласно изобретению. В соответствии с данным вариантом осуществления, исследуемое соединение или контрольное соединение вводят

(например, перорально, ректально или парентерально, например, внутривенно или внутримышечно) приемлемому животному и определяется эффект на экспрессию, активность или как экспрессию, так и активность DLL3 или DLL3-связанного полипептида. Изменения в экспрессии DLL3 или DLL3-связанного полипептида может быть оценено с помощью способов, описанных выше.

В еще одном варианте осуществления, DLL3 или DLL3-связанный полипептид используют как “приманку-белок” в двух гибридных анализах или трех гибридных анализах, чтобы идентифицировать другие белки, которые связываются с или взаимодействуют с DLL3 или DLL3-связанным полипептидом (смотри, например Патент США № 5,283,317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) BioTechniques 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696; и Публикацию РСТ № WO 94/10300). Квалифицированным специалистам в данной области будет понятно, что такие связывающие белки также могут быть вовлечены в распространение сигналов по DLL3 как, например, против хода транскрипции или по ходу транскрипции элементов сигнального пути с участием DLL3.

Данное изобретение, кроме того, предусматривает новые агенты идентифицированные по описанным выше анализам скрининга, и использует их для лечения как описано в данном документе. Кроме того, изобретение также предусматривает использование агента, который взаимодействует с, или модулирует активность DLL3 в производстве лекарственного средства для лечения заболеваний согласно изобретению.

25 Терапевтические применения DLL3

Изобретение предусматривает лечение или предупреждения различных заболеваний и расстройств путем введения терапевтического соединения. Такие соединения включают, но не ограничиваются этим: DLL3, DLL3 аналоги, DLL3-связанные полипептиды и его производные и варианты (включая фрагменты); антитела (или другие аффинные реагенты) к описанным выше; нуклеиновые кислоты кодирующие DLL3, DLL3 аналоги, DLL3-связанные полипептиды и их фрагменты; антисмысловые нуклеиновые кислоты к гену, кодирующему DLL3 или DLL3-связанный полипептид; и модулятор (например, агонисты и антагонисты) гена, кодирующего DLL3 или DLL3-связанный полипептид.

Важной особенностью представленного изобретения является идентификация генов, кодирующих DLL3, включенных в виды рака, такие как заболевания согласно изобретению. Заболевания согласно изобретению, например, могут лечить (например, для уменьшения симптомов или замедления начала или прогрессирования) или предупреждают путем введения терапевтического соединения, которое уменьшает функцию или экспрессию DLL3 в сыворотке или ткани субъектов, имеющих заболевания согласно изобретению.

В одном варианте осуществления, одно или больше антител (или других аффинных реагентов), где каждый специфически связывается с DLL3, вводят самостоятельно или в комбинации с одним или больше дополнительных терапевтических соединений или лечений.

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

Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагается, что терапевтическая активность антител (или других аффинных реагентов), которые специфически связываются с DLL3, может быть достигнута путем феномена антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) (смотри, например, Janeway Jr. C.A. et al., Immunobiology, 5th ed., 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. et al., Immunology, Infection, and Immunity, 2004, p246-5; Albanell J. et al., Advances in Experimental Medicine and Biology, 2003, 532:p2153-68 and Weng, W-K. et al., Journal of Clinical Oncology, 2003, 21:p 3940-3947).

Лечение и предупреждения заболеваний согласно изобретению

Заболеваний согласно изобретению, например, лечат или предупреждают путем введения субъекту, с подозрением, что у него или о котором известно, что у него одно или больше заболеваний согласно изобретению, или существует риск развития одного или больше заболеваний согласно изобретению,

соединения, которое модулирует (то есть повышает или понижает) уровень или активность (то есть функцию) DLL3, что дифференциально присутствует в сыворотке или ткани субъектов, имеющих одно или больше заболеваний согласно изобретению, по сравнению с сывороткой или тканью субъектов, не имеющих заболевания согласно изобретению. В одном варианте осуществления, заболевания согласно изобретению лечат или предупреждают путем введение субъекту, с подозрением, что у него или о котором известно, что у него одно или больше заболеваний согласно изобретению, или существует риск развития заболеваний согласно изобретению, соединения, которое повышает регулирование (то есть понижает) уровень или активность (то есть функцию) DLL3, который повышается в сыворотке или ткани субъектов, имеющих одно или больше заболеваний согласно изобретению. Примеры таких соединений включают, но не ограничиваются этим, DLL3 антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, антитела (или другие аффинные реагенты), направленные против DLL3, и соединения, которые ингибируют ферментную активность DLL3. Другие подходящие соединения, например, антагонисты DLL3 и малые молекулы антагонисты DLL3, могут быть идентифицированы, используя *in vitro* анализы.

Рак, например, заболевания согласно изобретению, могут также лечить или предупреждать путем введения субъекту, с подозрением, что у него или о котором известно, что у него такие cancer, или существует риск развития такого рака, соединения, которое понижает регулирование уровня или активности (то есть функции) DLL3, которая повышает в сыворотке или ткани субъектов, имеющих такой рак. Примеры таких соединений включают, но не ограничиваются этим: DLL3, DLL3 фрагменты и DLL3-связанные полипептиды; нуклеиновые кислоты, кодирующие DLL3, DLL3 фрагмент и DLL3-связанный полипептид (например для использования в генной терапии); и, для тех DLL3 или DLL3-связанных полипептидов с ферментной активностью, соединений или молекул, которые, как известно, модулируют ферментную активность. Другие соединения, которые могут быть использованы, например, агонисты DLL3, могут быть идентифицированы, используя *in vitro* анализы.

В другом варианте осуществления, терапия или профилактика специально разрабатывается в соответствии с потребностями отдельного субъекта. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления соединения, которые

способствуют уровню или функции DLL3 терапевтически или профилактически вводят субъекту с подозрением, что у него или о котором известно, что у него рак, например заболевания согласно изобретению, у которого уровни или функции DLL3 отсутствуют или является сниженным по отношению к контрольному или нормальному диапазону референсных значений. В дальнейших вариантах осуществления, соединения, которые способствуют уровню или функции DLL3 терапевтически или профилактически вводят субъекту, с подозрением, что у него или о котором известно, что у него рак, например, заболевания согласно изобретению, у которого уровни или функции DLL3 являются повышенными по отношению к контрольному или нормальному диапазону референсных значений. В дальнейших вариантах осуществления, соединения, которые повышают уровень или функцию DLL3 терапевтически или профилактически вводят субъекту с подозрением, что у него или о котором известно, что у него рак, например, заболевания согласно изобретению, у которого уровни или функции DLL3 являются повышенными по отношению к контрольному или диапазону референсных значений. В дальнейших вариантах осуществления, соединения, которые уменьшают уровень или функцию DLL3, терапевтически или профилактически вводят субъекту с подозрением, что у него или о котором известно, что у него рак, например, заболевания согласно изобретению, у которого уровни или функции DLL3 является сниженным по отношению к контрольному или к диапазону референсных значений. Изменение в DLL3 функции или уровне из-за введения таких соединений может быть легко обнаружена, например, путем получения образца (например, крови или мочи) и анализа *in vitro* уровней или активностей DLL3, или уровней мРНК, кодирующей DLL3, или какой-либо комбинации из вышеперечисленных. Такие анализы могут быть выполнены перед и после введения соединения, как описано в данном документе.

Соединения согласно изобретению включают, но не ограничиваются этим, какое-либо соединение, например, малую органическую молекулу, белок, пептид, антитело (или другой аффинный реагент), нуклеиновую кислоту, и т.д., которая восстанавливает DLL3 профиль до нормального. Соединения согласно изобретению могут быть введены в комбинации с какими-либо другими химиотерапевтическими лекарственными средствами.

Вакцинная терапия

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой иммуногенную композицию, соответствующую вакцинную композицию, содержащую DLL3 или эпитоп, содержащий фрагмент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую DLL3 или его фрагмент необязательно вместе с иммуностимулятором.

5 Кроме того, предусмотренным является способ повышения иммунного ответа, который включает введение субъекту таких композиций, и способу лечения или профилактики рака, например, заболеваний согласно изобретению, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества таких композиций, и такие композиции для
10 применения в предупреждении или лечении заболеваний согласно изобретению.

Таким образом, DLL3 может быть полезным в качестве антигенного материала, и может быть использован в производстве вакцин для лечения или профилактики рака, например заболеваний согласно изобретению. Такой материал может быть "антигенным" и/или "иммуногенным". Как правило, под
15 "антигенным" понимается, что белок способен использоваться для выработки антител (или других аффинных реагентов) или даже способен индуцировать гуморальный иммунный ответ у субъекта или экспериментального животного. Под "иммуногенным" понимается, что белок способен вызывать иммунный ответ, такой как защитный иммунный ответ у субъекта или
20 экспериментального животного. Таким образом, в последнем случае, белок может быть способен не только генерировать антительный ответ, но, кроме того, не основанный на антителе иммунный ответ. "Иммуногенный" также охватывает - может ли белок вызывать иммунный ответ, как в *in-vitro* установке, например, в анализе на Т-клеточную пролиферацию. Генерирование соответствующего
25 иммунного ответа может потребовать присутствие одного или больше вспомогательных веществ и/или соответствующего представителя антигена.

Квалифицированному специалисту в данной области будет понятно, что гомологи или производные DLL3 также будет найдено применение в качестве антигенного/иммуногенного материала. Таким образом, например белки,
30 которые включают одно или больше добавлений, делеций, замещений или подобное охватываются представленным изобретением. Кроме того, возможным может быть замещение одной аминокислоты на другие подобного "типа", например, замещение одной гидрофобной аминокислоты на другие. Они могут использовать программу, такую как CLUSTAL программа, чтобы сравнивать

аминокислотные последовательности. Данная программа сравнивает аминокислотные последовательности и находит оптимальное выравнивание путем вставки пробелов в каком-либо порядке в последовательность как соответствующую. Существует возможность рассчитать аминокислотную идентичность или подобность (идентичность плюс сохранение аминокислотного типа) для оптимального выравнивания. Такая программа, как BLASTx будет согласовывать самый длинный фрагмент секвенирования подобных последовательностей и присваивать значение подгонки. Таким образом, можно получить сравнение, где найдены несколько областей подобности, каждая из которых имеет различные оценки. Оба типа анализа рассматриваются в представленном изобретении.

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

В альтернативном подходе, гомологи или производные могут быть слитыми белками, включая фрагменты, которые делают очистку легче, например, путем эффективного введения метки желаемому белку или полипептиду. Это может быть необходимо, чтобы удалить "метку", или это может быть так, что сам слитый белок сохраняет достаточную антигенность, что делает его полезным.

Хорошо известно, что существует возможность скрининговать антигенный белок или полипептид, чтобы идентифицировать эпитопные

области, то есть те области, которые ответственны за антигенность или иммуногенность белка или полипептида. Способы, хорошо известные квалифицированному специалисту, могут быть использованы для исследования фрагментов и/или гомологов и/или производных на антигенность. Таким образом, фрагменты согласно представленному изобретению должны включать одну или больше таких эпитопных областей или быть в значительной степени подобными к таким областям, чтобы сохранить их антигенные/иммуногенные свойства. Таким образом, для фрагментов в соответствии с представленным изобретением степень идентичности возможно, не имеет значения, так как они могут быть на 100% идентичными к определенной части белка или полипептида, гомолога или производного как описано в данном документе. Ключевой проблемой, в очередной раз, является то, что фрагмент сохраняет антигенные/иммуногенные свойства белка, из которого его получают.

Что важно для гомологов, производных и фрагментов, это то, что они имеют, по крайней мере, некоторую степень антигенности/иммуногенности белка или полипептида, из которого они получены. Таким образом, в дополнительном аспекте настоящего изобретения, предусматриваются антигенные и/или иммуногенные фрагменты DLL3, или гомологи или их производные.

DLL3, или антигенные его фрагменты, может предусматриваться самостоятельно, как очищенный или изолированный препарат. Они могут быть предусмотрены как часть смеси с одним или больше других белков согласно изобретению, или их антигенными фрагментами. В дополнительном аспекте, поэтому, изобретение предусматривает антигенную композицию, которая включает DLL3 и/или один или больше его антигенных фрагментов. Такая композиция может быть использована для обнаружения и/или диагностики рака, например, заболеваний согласно изобретению.

Вакцинная композиция согласно изобретению может быть или профилактической или терапевтической вакцинной композицией.

Вакцинные композиции согласно изобретению могут включать один или больше вспомогательных веществ (иммуностимуляторов). Примеры, хорошо известных в данной области включают неорганические гели, такие как гидроксид алюминия, и эмульсии вода-в-масле, такие как неполный адьювант

Фрейнда. Другие полезные вспомогательные вещества будут хорошо известны квалифицированному специалисту.

Подходящие вспомогательные вещества для использования в вакцинной композиции для лечения рака включают: 3De-O- ацилированный монофосфориллипид А (известный как 3D-MPL или просто MPL смотри WO92/116556), сапонин, например QS21 или QS7, и TLR4 агонисты, такие как CpG-содержащая молекула, например, как раскрыто в WO95/26204. Используемые вспомогательные вещества могут представлять собой комбинацию компонентов, например, MPL и QS21, или MPL, QS21 и CpG-содержащей фрагмент. Вспомогательные вещества могут быть сформулированы как эмульсии масло-в-воде или липосомальные препараты. Такие препараты могут включать другие носители.

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

Ингибирование DLL3 для лечения заболеваний согласно изобретению

В одном варианте осуществления изобретения, рак, например заболевания согласно изобретению, лечат или предупреждают путем введения соединения, которое противодействует (ингибирует) уровню и/или функции DLL3, который является повышенным в сыворотке или ткани субъекта, имеющего такой рак, по сравнению с сывороткой или тканью от субъектов, у которых нет такого рака.

Соединения, применяемые для этой цели включают, но не ограничиваются этим, анти-DLL3 антитела (или другие аффинные реагенты, и фрагменты и производные, содержащие их область связывания), DLL3 антисмысловые или рибозимные нуклеиновые кислоты, и нуклеиновые кислоты, кодирующие дисфункциональный DLL3, которые могут быть использованы для “нокаута” эндогенной функции DLL3 за счет гомологичной рекомбинации (смотри, например Саресчи, 1989, Science 244:1288-1292). Другие соединения, которые ингибируют функцию DLL3, могут быть идентифицированы путем использования известных *in vitro* анализов, например анализов, которые касаются способности исследуемого соединения ингибировать связывание DLL3

с другим белком или связывание с партнером, или ингибировать известную функцию DLL3.

Такое ингибирование, например, может быть проанализировано *in vitro* или в клеточной культуре, но также могут быть использованы генетические анализы.

5 Предпочтительные технологии также могут использовать для обнаружения уровней DLL3 перед и после введения соединения. Приемлемые *in vitro* или *in vivo* анализы применяют, чтобы определить эффект конкретного соединения и покажет ли действие его введение для лечения пораженной ткани, как описано более детально ниже.

10 В конкретном варианте осуществления, соединение, которое ингибирует функцию DLL3 (активность) вводят терапевтически или профилактически субъекту, у которого определяется повышенный сывороточный или тканевой уровень или функциональная активность DLL3 (например больше чем
15 нормальный уровень или требуемый уровень) по сравнению с сывороткой или тканью у субъектов с, например, заболеваниями согласно изобретению, которые не получают лечения в соответствии с изобретением, или довести до уровня или активности, которые имеются у субъектов без такого рака или заранее
20 определенного диапазона значений. Способы стандартные в данной области, могут быть использованы для измерения увеличение уровня или функции DLL3, как описано выше. Подходящие ингибиторные композиции DLL3 могут, например, включать малые молекулы, то есть молекулы 1000 дальтон или меньше. Такие малые молекулы могут быть идентифицированы с помощью
способов скрининга, описанных в данном документе.

Анализы терапевтических или профилактических соединений

25 Представленное изобретение, кроме того, предусматривает анализы для использования в открытом лекарственном средстве для того, чтобы обнаружить или проверить эффективность соединений для лечения или предупреждения видов рака, экспрессирующих DLL3, например заболеваний согласно изобретению.

30 Таким образом предусматривается способ скрининга соединений, которые модулируют активность DLL3, где способ включает: (a) контактирование DLL3 или биологически активной его части с соединением-кандидатом; и (b) определение модулируется ли активность DLL3 таким образом. Такой способ может включать (a) контактирование DLL3 или его биологически активной

части с соединением-кандидатом в образце; и (b) сравнение активности DLL3 или его биологически активной части в указанном образце после контакта с указанным соединением-кандидатом с активностью DLL3 или его биологически активной части в указанном образце перед контактированием с указанным соединением-кандидатом, или с референтным уровнем активности.

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

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

Кроме того, предусмотренным является способ скрининга соединений, которые модулируют экспрессию DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, где способ включает: (a) контактирование клеток, экспрессирующих DLL3, или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, с соединением-кандидатом; и (b) определение модулируется ли экспрессия DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, таким образом. Такой способ может включать (a) контактирование клеток, экспрессирующих DLL3, или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, с соединением-кандидатом в образце; и (b) сравнение экспрессии DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, посредством клеток в указанном образце после контактирования с указанным соединением-кандидатом, с экспрессией DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3 клеток в указанном образце перед контактированием с указанным соединением-кандидатом, или с референтным уровнем экспрессии.

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

Другие аспекты настоящего изобретения включают: соединение, получаемое посредством вышеуказанного способа скрининга, соединение, которое модулирует активность или экспрессию DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, например, соединение, которое ингибирует активность или экспрессию DLL3 или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3.

Такое соединение предусматривается для применения в лечении или профилактики рака, например, заболеваний согласно изобретению. Кроме того,

предусмотренным является способ лечения или предупреждения рака, например, заболеваний согласно изобретению, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества такого соединения.

5 Исследуемые соединения могут быть проанализированы на их способность восстанавливать уровни DLL3 у субъекта, имеющего, например, заболевания согласно изобретению, до уровней, найденных у субъектов без таких видов рака, или получить подобные изменения в экспериментальных моделях на животных таких видов рака. Соединения, способные восстановить уровень DLL3 у
10 субъекта, имеющего, например, болезни согласно изобретению до уровней, найденных у субъектов без таких видов рака или осуществить аналогичные изменения в экспериментальных моделях на животных с такими раковыми заболеваниями, могут быть использованы в качестве соединений приводящих к дальнейшему открытию нового лекарственного средства, или терапевтическому
15 применению. Экспрессия DLL3 может быть проанализирована согласно предпочтительным технологиям, иммунологическим анализам, гель-электрофорез с последующей визуализацией, обнаружением активности DLL3, или каким-либо другим способом, предлагаемым в данном документе, или известному квалифицированному специалисту в данной области с уровня
20 техники. Такие анализы могут быть использованы чтобы выявить кандидата в лекарственное средство, в клинический мониторинг или в разрабатываемое лекарственное средство, где относительное содержание DLL3 может служить в качестве суррогатного маркера для клинической картины заболевания.

В различных конкретных вариантах осуществления, *in vitro* анализы может
25 быть выполнен на клетках, представителях типов клеток вовлеченных в расстройство субъекта, чтобы определить имеет ли соединение требуемый эффект на такие клеточные типы.

Соединения для использования в терапии могут быть исследованы в приемлемых системах моделей на животных перед исследованием на людях,
30 включая, но не ограничиваясь этим крыс, мышей, кур, коров, обезьян, кроликов, т.д. Для исследования *in vivo*, перед тем как вводить человеку, какой-либо модельная система на животных, известная в данной области с уровня техники может быть использована. Примеры моделей на животных заболеваний согласно изобретению включают, но не ограничиваются этим, клеточные линии

ксенотрансплантатов мелкоклеточного рака легких, такие как NCI-H345; клеточные линии ксенотрансплантатов немелкоклеточного рака легких, такие как A549 и H460; клеточные линии ксенотрансплантатов рака поджелудочной железы, такие как MIA PaCa-2 у безтимусных мышей, Marincola et al., J Surg Res 1989 Dec;47(6):520-9 или клеточные линии ксенотрансплантатов рака кожи, такие как MV3 у безтимусных мышей, van Muijen et al., Int J Cancer 1991 Apr 22;48(1):85-91. Они могут быть использованы для тестирования соединений, которые модулируют уровни DLL3, так как патология, продемонстрированная в данных моделях, является аналогичной, например, заболеваниям согласно изобретению. Кроме того, квалифицированному специалисту будет очевидно, что на основе представленного раскрытия трансгенные животные могут быть получены с “нокаут” мутациями в гене или генах, кодирующих DLL3. “Нокаут” мутация гена представляет собой мутацию, которая вызывает то, что мутированный ген не экспрессируется, или экспрессируется в aberrантной форме, или на низком уровне, так, что активность, связанная с генным продуктом почти или полностью отсутствует. Предпочтительно, трансгенное животное является млекопитающим; более предпочтительно, трансгенное животное представляет собой мышь.

Тестируемые соединения могут быть проанализированы на их способность восстанавливать уровни DLL3 у субъекта, имеющего, например, заболевания изобретения к уровням, найденные в субъектах освободить от таких раков или произвести подобные изменения в экспериментальных моделях на животных таких видов рака. Соединения, способные восстановить уровень DLL3 у субъекта, имеющего, например, болезни изобретения к уровням, найденные в субъектах свободны от таких видов рака или произвести аналогичные изменения в экспериментальных моделях на животных таких раковых заболеваний могут быть использованы в качестве соединений свинца для дальнейшего открытия новых лекарств, или терапевтическое применение. Выражение DLL3 могут быть проанализированы с помощью предпочтительных технологий, иммуноанализа, гель-электрофорез с последующим визуализации, обнаружение DLL3 активности, или любым другим способом описано здесь или известны специалистам в данной области. Такие анализы могут быть использованы для скрининга лекарств-кандидатов, в клинической мониторинга или в разработке

лекарственных средств, где обилие DLL3 может служить в качестве суррогатного маркера для клинической картины заболевания.

В одном варианте осуществления, исследуемые соединения, которые модулируют экспрессию DLL3, определяются у нечеловеческих животных (мышей, крыс, обезьян, кроликов, морских свинок), предпочтительно, в моделях заболеваний согласно изобретению, экспрессирующих DLL3, на нечеловеческих животных. В соответствии с данным вариантом осуществления, исследуемое соединение или контрольное соединение вводят животным, и определяют эффект исследуемого соединения на экспрессию DLL3. Исследуемое соединение, которое меняет экспрессию DLL3, может быть идентифицировано путем сравнения уровня DLL3 (или мРНК, кодирующей DLL3) у животного или группы животных, которых лечат исследуемым соединением, с уровнем DLL3 или мРНК у животного или группы животных, которых лечат контрольным соединением. Способы, известные квалифицированным специалистам в данной области, могут быть использованы, чтобы определить уровни мРНК и белка, например, *in situ* гибридизацией. Животные могут или не могут быть умерщвлены, чтобы проанализировать эффекты исследуемого соединения.

В другом варианте осуществления, исследуемые соединения, которые модулируют активность DLL3 или его биологически активной части, определяются у нечеловеческих животных (например, мышей, крыс, обезьян, кроликов, морских свинок), предпочтительно, в моделях заболеваний согласно изобретению, экспрессирующих DLL3, на нечеловеческих животных. В соответствии с данным вариантом осуществления, исследуемое соединение или контрольное соединение вводят животному, и определяют эффект исследуемого соединения на активность DLL3. Исследуемое соединение, которое меняет активность DLL3 может быть идентифицировано путем анализа животных, которых лечат контрольным соединением, и животных, которых лечат исследуемым соединением. Активность DLL3 может быть оценена путем определения индуцирования клеточного вторичного мессенджера DLL3 (например, внутриклеточного Ca²⁺, диацилглицерина, IP₃, и т.д.), обнаружения каталитической или ферментативной активности DLL3 или их партнеров по связыванию, обнаружение индукции репортерного гена (например, регуляторного элемента, который реагирует на DLL3, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей детектируемый маркер, такой как

люцифераза или зеленый флуоресцентный белок), или обнаружение клеточного ответа (например, клеточной дифференцировки или пролиферации клеток).

Способы, известные квалифицированным специалистам в данной области, могут быть использованы для обнаружения изменений в активности DLL3 (смотри, например, в патенте США 5,401,639, который включен в данный документ в качестве ссылки).

В еще одном варианте осуществления, исследуемые соединения, которые модулируют уровень или экспрессию DLL3, определяются у человеческих субъектов, имеющих, например, заболевания согласно изобретению,

предпочтительно имеют, например, тяжелые заболевания согласно изобретению. В соответствии с данным вариантом осуществления, исследуемое соединение или контрольное соединение вводят человеку-субъекту, и эффект исследуемого соединения на DLL3 экспрессию определяется путем анализа на экспрессию DLL3 или мРНК, кодирующей в том же самом биологическом образце (например

сыворотка, плазма, или моча). Исследуемое соединение, которое меняет экспрессию DLL3, может быть идентифицировано путем сравнения уровня DLL3 или мРНК, кодирующей то же самое у субъекта или группы субъектов, которых лечат контрольным соединением, тогда как субъекта или группу субъектов лечат исследуемым соединением. Кроме того, изменения в экспрессии DLL3 могут

быть идентифицированы путем сравнения уровня DLL3 или мРНК, кодирующей то же самое у субъекта или группы субъектов до и после введения исследуемое соединение. Способы, известные квалифицированным специалистам в данной области, могут быть использованы, чтобы получить биологические образцы и проанализировать экспрессию мРНК или белка. Например, предпочтительные технологии, описанные в данном документе, могут быть использованы для оценки изменений в уровне DLL3.

В другом варианте осуществления исследуемые соединения, которые модулируют активность DLL3 определяются у людей-субъектах, имеющих, например, заболевания согласно изобретению (предпочтительно те, например, у которых тяжелое заболевание согласно изобретению). В этом варианте осуществления, исследуемое соединение или контрольное соединение вводят человеку-субъекту, и определяют эффект исследуемого соединения на активность DLL3. Исследуемое соединение, которое меняет активности DLL3, может быть идентифицировано путем сравнения биологических образцов от

пациентов, получавших контрольное соединение, с образцами от пациентов, получавших исследуемые соединения. Альтернативно, изменения в активности DLL3 могут быть идентифицированы путем сравнения активности DLL3 у субъекта или группы субъектов перед и после введения исследуемого соединения. Активность DLL3 может быть оценена путем обнаружения в биологическом образце (например, сыворотке, плазме, или моче) индуцирования клеточного сигнального пути трансдукции DLL3 (например, внутриклеточный Ca^{2+} , диацилглицерин, IP3, и т.д.), каталитической или ферментной активности DLL3 или его партнера по связыванию, или клеточного ответа, например, клеточной дифференцировки, или клеточной пролиферации. Способы, известные квалифицированным специалистам в данной области, могут быть использованы, чтобы детектировать изменения в индукции вторичного мессенджера DLL3 или изменения в клеточном ответе. Например, РТ-ПЦР могут использовать, чтобы детектировать изменения в индукции клеточного вторичного мессенджера.

В другом варианте осуществления, исследуемое соединение, которое изменяет уровень или экспрессию DLL3 в направлении уровней, обнаруженных у контрольных субъектов (например, людей, не имеющих, например, заболевания согласно изобретению), выбирают для дальнейшего исследования или терапевтического использования. В другом варианте осуществления, исследуемое соединение, которое изменяет активность DLL3 до активности, найденной у контрольных субъектов (например, людей, не имеющих, например, заболевания согласно изобретению), выбирают для дальнейшего исследования или терапевтического использования.

В другом варианте осуществления, исследуемые соединения, которые снижают степень тяжести одного или нескольких симптомов, связанных, например, с заболеваниями согласно изобретению, определяются у человека-субъекта, имеющего, например, заболевания согласно изобретению, предпочтительно, у субъектов, например, с тяжелыми заболеваниями согласно изобретению. В соответствии с данным вариантом осуществления, исследуемое соединение или контрольное соединение вводят субъектам, и определяют эффект исследуемого соединения на один или больше симптомов, например, заболеваний согласно изобретению. Исследуемое соединение, которое уменьшает один или больше симптомов, может быть идентифицировано путем

сравнения субъектов, которых лечат контрольным соединением, с субъектами, которых лечат исследуемым соединением. Способы, известные врачам, знакомым, например, с заболеваниями согласно изобретению, могут быть использованы, чтобы определить уменьшает ли исследуемое соединение один или больше симптомов, связанных с, например, заболеваниями согласно изобретению. Например, исследуемое соединение, которое уменьшает нагрузку опухоли у субъекта, имеющего, например, заболевания согласно изобретению, будет полезным для таких субъектов.

В другом варианте осуществления, исследуемое соединение, которые снижают степень тяжести одного или больше симптомов, связанных с раком, например заболеваниями согласно изобретению, выбирают для дальнейшего исследования или терапевтического использования.

Терапевтические и профилактические композиции и их использование

Изобретение предусматривает способы лечения (и профилактики), которые включают введение субъекту эффективного количества соединения согласно изобретению (например, белка DLL3, аффинного реагента, способного к специфическому связыванию с DLL3 или его фрагмента, или нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3). В конкретном аспекте, соединение является в значительной мере очищенным (например, фактически свободным от вещества, которое ограничивает его эффекты и или вызывает нежелательные побочные эффекты).

Препараты и способы введения, которые могут быть применены, когда соединение содержит нуклеиновую кислоту описаны выше; дополнительные соответствующие препараты и способы введения описываются ниже.

Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения соединения согласно настоящему изобретению, например, инкапсуляции в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать соединение, опосредованный эндоцитоз рецепторов (см, например, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты как часть ретровирусного или другого вектора и т.д. Способы введения могут быть энтеральными или парентеральными и включают, но не ограничиваются этим, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, подкожное, интраназальное, эпидуральное и пероральное введение. Соединения могут быть

введены каким-либо удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые накладки (например, через слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и слизистую оболочку кишечника и т.д.) и могут быть введены вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение фармацевтических композиций согласно изобретению в центральную нервную систему каким-либо подходящим способом, в том числе путем внутрижелудочкового и интратекального введения; внутрижелудочковая инъекция может быть облегчена путем внутрижелудочкового катетера, например, прикрепленного к резервуару, такому как резервуар Оттауа. Легочное введение можно также использовать, например, путем использования ингалятора или распылителя и препарата с аэрозольным агентом.

В одном аспекте настоящего изобретения нуклеиновая кислота, используемая в изобретении, может быть доставлена в дерму, например с использованием частиц опосредованной эпидермальной доставки.

В конкретном варианте осуществления, желаемым может быть введение фармацевтической композиции согласно изобретению локально в область, нуждающуюся в лечении; это может быть достигнуто, например, но не в качестве ограничения, местной инфузией во время операции, местным нанесением, например, путем инъекции, посредством катетера, или посредством имплантата, где указанный имплантат из пористого, не пористого, или желатинового материала, включая мембраны, такие как силиконовые мембраны, или волокна. В одном варианте осуществления, введение может быть путем непосредственной инъекции, например, в легкое, поджелудочную железу и ткани кожи или в место (или бывшее место) злокачественной опухоли или неопластической или пре-неопластической ткани.

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

В еще одном варианте осуществления, соединение может быть доставлено в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте, может быть

использован насос (смотри Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). В другом варианте осуществления, могут быть использованы полимерные материалы (смотри Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; see also Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105). В еще одном варианте осуществления система с регулируемым высвобождением может быть помещена вблизи терапевтической мишени, например, при заболеваниях согласно изобретению, таким образом, требуя только часть фракции системной дозы (смотри, например Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением описаны в обзоре Langer (1990, Science 249:1527-1533).

В конкретном варианте осуществления, где соединение согласно изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, нуклеиновая кислота может быть введена *in vivo*, чтобы способствовать экспрессии кодируемого ею белка, путем конструирования его как части соответствующего вектора экспрессии нуклеиновой кислоты, и введения его таким образом, что он становится внутриклеточным, например, с использованием ретровирусного вектора (смотри Патент США № 4,980,286), или путем прямой инъекции, или путем использования бомбардировки микрочастицами (например, с помощью генной пушки; Biolistic, Dupont), или покрытия липидами или рецепторами клеточной поверхности или или трансфекции агентов или путем введения его в связи с гомеобоксом подобный пептид, which is который, как известно, проникает в ядро (смотри, например, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), т.д. Альтернативно, нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и включена в пределах клетки-хозяина ДНК для экспрессии, за счет гомологичной рекомбинации.

Представленное изобретение, кроме того, предусматривает фармацевтические композиции. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество соединения согласно изобретению, и фармацевтически

приемлемый носитель. В конкретном варианте осуществления, термин “фармацевтически приемлемый” означает приемлемый для одобрения регуляторным ведомством Федеральным, или установленным государственным, или перечисленный в Фармакопее США или других, как правило, 5 общепризнанных фармакопеех для использования у животных, и более конкретно у человека. Термин “носитель” касается разбавителя, вспомогательного вещества, наполнителя, или носитель, с которым вводят терапевтический агент. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая те из нефти, 10 животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Вода является предпочтительным носителем, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в 15 качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и как. Композиция, при 20 необходимости, могут также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или рН буферных агентов. Эти композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, композиций с замедленным высвобождением и тому подобное. Композиция может быть приготовлена в виде суппозитория с 25 традиционными связывающими агентами и носителями, такими как триглицериды. Пероральные препараты могут включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.п. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в " Remington's Pharmaceutical Sciences" от EW Martin. Такие 30 композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения, например, в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя так, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения субъекту. Препарат должен соответствовать способу введения.

В одном варианте осуществления, например, где применяют одно или несколько антител, композицию получают в соответствии с рутинными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения человеку. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. Если необходимо, композиция может также включать солюбилизующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо отдельно, либо смешанные вместе в единичной дозированной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Когда композиция предназначена для введения путем инфузии, она может быть налита в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду фармацевтической чистоты или физиологический раствор. Когда композицию вводят путем инъекции, ампула стерильной воды для инъекций или физиологического раствора может быть обеспечена таким образом, что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

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

Количество соединения согласно изобретению, которое будет эффективно в лечении рака, например, заболеваний согласно изобретению, может быть определено стандартными клиническими методами. Кроме того, анализы *in vitro* могут необязательно быть использованы, чтобы помочь определить оптимальных диапазонов доз. Точная доза, используемая в композиции, также будет зависеть от пути введения и серьезности заболевания или расстройства, и должна устанавливаться в соответствии с решением врача и обстоятельствами каждого субъекта. Однако подходящие пределы доз для внутривенного введения, как правило, составляют приблизительно 20-500 мкг активного

соединения на килограмм массы тела. Подходящие диапазоны доз для интраназального введения, как правило, составляют приблизительно от 0,01 пг/кг массы тела до 1 мг/кг массы тела. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза – ответ, полученных *in vitro* и в тест-системах модели на животных.

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

Изобретение, кроме того, предусматривает фармацевтическую упаковку или набор, включающий один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций согласно изобретению. При необходимости, связанные с таким контейнером(ами) могут быть в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, где уведомление отражает (а) одобрение агентства на производство, применение или продажу для введения человеку, (б) инструкции по применению, или обоих.

Таким образом, в одном аспекте набор содержит антитела, используемые в изобретении, например, антитела могут быть лиофилизированными для восстановления перед введением или использованием. Если набор предназначен для использования в терапии/лечения, таких как рак, антитело или антитела могут быть восстановлены изотоническим водным раствором, который может быть необязательно включенным в набор. В одном аспекте набор может включать полипептид, такой как иммуногенный полипептид, используемый в изобретении, которые может быть, например, лиофилизированным. Последний набор может дополнительно содержать вспомогательное вещество для реконструирования иммуногенного полипептида.

Изобретение также распространяется на композиции, как описано в данном документе, например, на фармацевтическую композицию, и/или состав вакцины для использования в индукции иммунного ответа у субъекта.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает лекарственное средство, которое включает, по отдельности или вместе:

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

(б) противораковое средство или другой активный агент, для одновременного, последовательного или раздельного введения при лечении рака, предпочтительно в лечении одного из заболеваний согласно изобретению.

5 Определение относительного избыточного содержания DLL3 с помощью технология создания/обработки изображений

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

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

25 Диагностика и лечение рака, включая заболевания согласно изобретению с использованием иммуногистохимии.

30 Иммуногистохимия является отличным методика обнаружения и, следовательно, может быть очень полезным в диагностике и лечении рака, в том числе заболеваний согласно изобретению. Иммуногистохимия может быть использована для обнаружения, диагностики или мониторинга рака, такого как те, которые упомянуты выше, через локализации DLL3 антигенов в срезах

тканей путем использования меченых антител (или других аффинных реагентов), их производных и аналогов, которые специфически связываются с DLL3, в качестве специфических реагентов через антиген-антитело взаимодействия, которые визуализируются на маркер, такой как флуоресцентный краситель, фермент, радиоактивный элемент или коллоидное золото.

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

Предпочтительные особенности каждого аспекта изобретения являются для каждого из других аспектов с соответствующими изменениями. Документы уровня техники, упомянутые в данном документе, включены в полной мере, разрешенной законом.

Изобретение иллюстрируется следующими неограничивающими примерами.

ПРИМЕР 1: ИДЕНТИФИКАЦИЯ DLL3, ЭКСПРЕССИРУЕМОГО В НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО, МЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО, РАКЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКА КОЖИ, В ТКАНИ ОБРАЗЦОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (LC/MS)

С помощью следующего протокола, мембранные белки, выделенные из образцов ткани немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточный рак легкого, рака поджелудочной железы и рака кожи и соответствующих нормальным или

нормальных соседних тканей (НАТ), были расщеплены и полученные пептиды секвенировали тандемной масс-спектрометрией.

1.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

5 1.1.1 Фракционирование плазматической мембраны

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

1.1.2 Растворение плазматической мембраны

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

1.1.3 Трипсинолиз

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

30 Альтернативно, 105 мкг белкового раствора были восстановлены с помощью 3 мкл 50 мМ TCEP и инкубирования при 60°C в течение 1 часа. Затем образец обрабатывали на FASP фильтрации устройств расщепления Protein Digestion Kit (Protein Discovery) в соответствии с инструкциями завода-изготовителя, но с использованием бикарбоната триэтиламмония вместо

бикарбоната аммония. Трипсинолиз проводили в конечном объеме 75 мкл в, используя 1 мкг трипсина на 50 мкг белка.

1.1.4 Фракционирование пептидов

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

15 1.1.5 Масс-спектрометрия

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

1.1.6 Анализ аминокислотной последовательности пептида

 Исходные данные, полученные от LTQ Orbitrap Velos были обработаны с помощью программного обеспечения талисман (Matrix Science), который
30 использует алгоритм Mowse (Curr Biol. 1993 Jun 1;3(6):327-3), для выведения аминокислотных последовательностей из пиковых списков путем поиска в базе данных последовательности, состоящей из Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), IPI (www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html) и Swissprot (<http://www.uniprot.org>) на фоне загрязняющих белковых

последовательностей. Критерии для идентификации пептидов входит трипсиновое расщепление, вплоть до 2 ошибочных сайтов расщепления и различные биологические и химические модификации (окисленный метионин, цистеин модифицированный MMTS или иодацетамидом и фосфорилированный серин, треонин и тирозин). Пептиды, имеющие ранг 1 с ожидаемым значением 0,05% или менее, ионным индексом 28 или выше, загружали в базе данных OGAP, где они были обработаны в белковые группы.

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

В процессе идентификации DLL3 использовали пептидные последовательности, полученные экспериментально путем масс-спектрометрии, как описано выше, из естественных белков человека, чтобы определить и упорядочить кодирующие экзоны в опубликованной последовательности генома человека. Эти экспериментально определенные последовательности, указанные в Таблице 1, сравнивались с базой данных OGAP® которая была составлена в результате обработки и интеграции пептидных масс, пептидных подписей, EST и Public Domain Genomic Sequence Data, как описано в международной патентной заявке WO2009/087462.

Таблица 1. DLL3 специфические пептиды, идентифицированные ЖХ/МС в плазме мембран образцов тканей немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы и рака кожи.

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

1.1.8 Индекс белка

Индекс белка является мерой как распространенности белка, так и относительного избытка пептида. Алгоритм учитывает как количество образцов, в которых наблюдался белок и количество наблюдаемых пептидов, против пептидов способных наблюдаться в каждом образце. Полученное в результате

значение затем ранжированы попарным сравнением соответствующих нормальных образцов против образцов рака.

1.2 РЕЗУЛЬТАТЫ

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

Таблица 2. Белки DLL3 индекс (+++++ = Очень высокая; ++++ = высокий; +++ = средний; ++ = низкий; + = очень низкий; - = не наблюдается)

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

15

ПРИМЕР 2: Специфика антител к DLL3 Определяется проточной цитометрии

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

Материалы и методы

25 Анти-DLL3 антитела инкубировали с DLL3-экспрессирующими клетками, SHP-77. Клетки промывали в FACS буфере (DPBS, 2% FBS), центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл разбавленного первичного SHP-77 антитела (также разбавленном в FACS буфере). Комплекс антитело-H322 инкубировали на льду в течение 60 мин, а затем дважды промывали FACS буфером, как описано выше. Пеллеты клеточных антител ресуспендировали в 100 мкл разбавленного вторичного антитела (также разбавленного в FACS буфере) и инкубировали в течение 60 мин на льду. Осадок промывали, как и прежде, и суспендировали в

200 мкл FACS буфера. Образцы были загружены в BD FACSCanto II цитометр и данные анализировали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva.

Результаты

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

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

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

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

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

ПРИМЕР 4: Т-клеточная активация и специфический лизис клеток, экспрессирующих DLL3

Справочная информация:

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

Методы:

Для этого анализа мишень DLL3 экспрессируется на DMS79 клетках.

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

двух дней в 5% CO₂, увлажненном инкубаторе тканевых культур при 37 градусах.

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

Результаты:

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

ПРИМЕР 5: Иммуногистохимическое использование антитела к DLL3

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

5.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

5.1.1 Материалы

Citroclear (HC5005) от TCS Biosciences, Великобритания.

Реагент спирт (R8382) от Sigma-Aldrich, Великобритания.

Target Retrieval Solution, pH6 (S2369) от Dako, Великобритания.

REAL Peroxidase Blocking Solution (S2023) от Dako, Великобритания.

Разбавитель антител (S0809) от Dako, Великобритания.

EnVision+ HRP-конъюгированный полимер, мышь (K4000) от Dako, Великобритания.

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

5 Майера гематоксилин (X0909) от Dako, Великобритания.

Aquatex (1.08562.0050) от VWR, Великобритании

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

10 5.1.2 Депарафинирование и регидратация

Срезы были депарафинизированы в CitrocLEAR (2 x 5 минут), а затем регидратированы обработкой 100% спиртом (2 x 5 минут), 50%-ным спиртом (1 x 5 минут) и водопроводной водой (1 x 5 минут).

15 5.1.3 Восстановление антигена (Обработка под давлением)

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

5.1.4 Окрашивание тканей

25 Активность эндогенной пероксидазы блокировали путем инкубирования ткани с Peroxidase Blocking Solution в течение 10 минут при комнатной температуре во влажной камере. Затем срезы промывали один раз PBS и один раз в PBS-T (PBS, содержащий твин-20, 0,125% об/об), 3 минуты на каждое промывание. Первичные антитела (разбавленный 1/160 в Разбавителе антител) наносили на каждую секцию ткани и/или микропанель, и срезы инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре во влажной камере. Затем срезы промывали один раз PBS в и один раз в PBS-T, 3 минуты каждой промывки.

30 EnVision + HRP-конъюгированные полимер затем применяется к тканям и предметные стекла инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере. Затем срезы промывали один раз PBS в и один раз в PBS-T, 3 минуты каждой промывки. Ткани инкубировали в жидком DAB + субстрата при

комнатной температуре в течение 10 мин во влажной камере. Затем срезы промывали один раз PBS в и один раз в PBS-T, гематоксилином в течение 1 мин при комнатной температуре во влажной камере, и снова промывают, один раз в PBS и один раз в PBS-T, 3 минуты каждой промывки. Покровные стекла затем собираются со срезами с использованием Aquatex.

5.2 РЕЗУЛЬТАТЫ

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

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

15 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID №	Описание	Последовательность
1	Дельта-подобного белка 3 (DLL3)	MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGPGA PRSPCSARLПЦPLFFRVCLKPGLSEEAESPALGAALSARGPV YTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIETWREELGD QIGGPAWSSLARVAGRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYR ARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRGPGLRPCAPLEDECEAPLV CRAGCSPEHGFCEQPGEERCLEGTGWLCTVPVSTSSCLSPRGP SSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGL RCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNC EKRVDRCSLQПЦPNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDL DCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAA RPCAHGGRCYAHFSLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALP AAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGH SQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSVVDW NRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREVATPLFPPLHTGRAGQRQHLLF PYPSSILSVK
2	Изоформа 2 дельта-подобного белка 3 (NP_982353)	MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGPGA PRSPCSARLПЦPLFFRVCLKPGLSEEAESPALGAALSARGPV YTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIETWREELGD QIGGPAWSSLARVAGRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYR ARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRGPGLRPCAPLEDECEAPLV CRAGCSPEHGFCEQPGEERCLEGTGWLCTVPVSTSSCLSPRGP SSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGL RCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNC EKRVDRCSLQПЦPNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDL DCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAA RPCAHGGRCYAHFSLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALP AAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGH SQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSVVDW NRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREA

SEQ ID №	Описание	Последовательность
3	Дельта-подобный белок 3 (NM_016941)	agatataaggcttggagccagcagctgcgactcccagagacccccaccagaaggccatggc tccccacggatgtccgggctcctccagactgtgatctagcgtcatttctccccagacac ggcccgtggcgtcttcgagctgcagatccactcttccggccgggtccaggccctggggccc gcgggtccccctgcagcggcggctccccctgcgcctcttctcagagtctgcctgaagcctgggc tctcagaggaggccggcggagtccccgtgcgcctgggcggcgctgagtgcgcgggaccg gtctacaccgagcagcccggagcggcggcctgatctcccactgcccagcggcctctgcagg tgcccttccgggacgctggcctggcaccttctcttcatcgaacctggagagaggatgag gagaccagattggaggcccgcctggagcctgctggcggcgctggctggcaggcggcgtgg cagccggaggcccgtgggcccgggacattcagcgcgcaggcgcctgggagctgcgcttctct accgcgcgcgtgcgagccgctgcccgtcgggaccgcgtgcacgcgcctctgcccgcgcga gcgccccctcgcggtgcggtcgggactgcgcccctgcgcaccgctcagggacgaatgtgagg cgccgctggtgtgcccagcagctgcagccctgagcatggctctgtgaacagcccgggtgaatg ccgatcctagagggtggactggaccccctctgcacggctccctgtctccaccagcagctca gccccaggggcccgtcctctgctaccaccggatgccttgcctggcctgggcccctgtgacgg gaaccctgtgtccaatggaggcagctgtagttagacaccaggctcttgaatgacactgcccgc gtgggttctacgggctcgggtgtgaggtgagcggggtgacatgtgcagatggaccctgctaac ggccgcttgtgtcgggggtgcagacctgactctgcctacatctgccactgcccaccggtttc caaggctccaactgtgagaagagggtggaccgggtgcagcctgcagccatccgcaatggcgga ctctgctggacctgggcccacgcccctgcgctcgcgctgcgcgcccggcttcggggctcctgct gcgagcacgacctggacgactgcgcccggcgcgctgcgctaaccggcggcagctgtgtggag ggccggcggcgcgaccgctgctcctcgcgctgggcttcggcggccgcgactcgcgcgagcg cgcggaccctgcccgcgcgcccctgtgctcacggcggcctgctacgcccacttctccggc ctgctcgcgcttgcgctcccggctacatgggagcgcggtgtgagttccagtgacccccgagg cgcaagcgccttcccgcggccccgcggcctcaggcccggggaccctcagcgtacctttg cctccggctctgggactgctggtccgcggcggtggccggcgtgcgctcttgcgtggtccactg gcgcccccgtggcactcccaggatgctgggtctcgcttgcgtgggacccccggagccgtca gtccacgcactcccggatgcaactcaacaacctaaaggacgcagagggttccggggatggtccga gctcgtccgtagattggaatgcacctgaagatgtagaccctcaagggaattatgcatatctgctcct tccatctacgctgggaggtagcgacgcccctttccccccgctacacactgggcccgcgtgggca gaggcagcactgcttttccctacccttctcattctgctccgtgaaatgaattgggtagagtctct ggaaggtttaagcccatttccagttctaacttacttctcctatcttgcacccctctatgctttgagct acctgccatctctttgaaaaacctatgggcttgaggaggtcacgatccgactccgaccagagc tttccactgattgtactcagcggggaggcaggggagcagagggcagcctctctaatgcttctct actatttttctaggcctgacgcgtctcctccatccgcacctggagtcagagcgtgattttgta tttgctcgggtgcccagctctcgtccccagaggctttggagtcaatcttgaagggggtctgggg gaacttactgtgcaagttgtaataatggtatttatctctatttttctaccccatctcttagaaa cacctataaaggctattattgtatcagtttgactaacaaaaa

SEQ ID №	Описание	Последовательность
4	Изоформа 2 дельта-подобного белка 3 (NM_203486)	agataaaggcttgaagccagcagctgcgactcccagacccccaccagaaggccatggct tccccacggatgtccgggctcctctcccagactgtgatcctagcgtcatttctccccagacac ggcccgtggcgtcttcgagctgcagatccactcttccgggcccgggtccaggccctggggcccc gcgggtccccctgcagcggcggctcccctgcgcctctcttcagagctgctgtaagcctgggc tctcagaggaggccgcccagctcccctgagccctgggcccggcgtgagtgccgcccggaccg gtctacaccgagcagcccggagcggcccgcctgatctcccactgcccagcggcctcttgacgg tgccctccgggacgctggcctggcaccttctcttcatcagaaacctggagagaggtag gagaccagattggaggcccgcctggagcctgctggcgcgctggctggcagcggcgttgg cagccggaggcccgtgggcccgggacattcagcgcgagcggcctgggagctgcgcttctcgt accgcgcgctgcgagccgctgcccgtcgggaccgctgcacgcgcctctgcccgtccgcgca gcgcccctcgcgggtcgggtcgggactgcgcccctgcgaccgctcagggacgaatgtgagg cggcgtggtgtgcccagcaggtgcagccctgagcattgcttctgtaaccggcgggtgaaatg ccgatgcctagagggtggactggaccctctgcacggcctgctccaccagcagctgcctca gccccaggggcccgtcctctgctaccaccggatgcttgcctgggcccctgggcccctgtgacgg gaaccctgtgccaatggaggcagctgtagttagacaccaggctccttgaatgacatgcccgc gtgggtctacgggctgcgggtgtaggtgagcggggtgacatgtgagatggacctgcttaac ggcggctgtgtgctgggggtgcagacctgactctgctacatctgccactgccaccgggttc caaggctccaactgtgagaagagggtggaccgggtgcagcctgcagccatccgcaatggcggg ctctgctggacctgggcccacgcccctgcgctgcccgtgcccgcggcctcgcgggtctcgt gcgagcacgacctggagactgcgcccggcgcgctgcgctaaccggcggcacgtgtgtggag ggcggcggcgcgaccgctgctcctgcgctgggcttcggcggccgactgccgcgagcg cgggaccctgcgcccgcgcccctgtgctcacggcggccgctgctacgccacttctccggc ctcgtctgcgctgcgctcccggctacatgggagcgcggtgtgagttccagtgaccccagcgg cgcaagcgcttggccgcccggcccgggcccagggcccgggaccctcagcgtacctttg cctccggctctgggactgctcgtggccgcccggcgtggcccggcgtgcgctctgtgtggtccact gcgcccggctggccactcccaggatgctgggtctcgttctggtgggaccccggagccgctca gtccacgactcccggatgcaacaacctaaggacgcaggagggttccggggatgttccga gctcgtccgtagattggaatgccctgaagatgtagacctcaagggtatgatatactgctcct tccatctacgctcgggaggcctgacgcgtctcctccatccgcacctggagtcagagcgtgatttt gtattgctcgggtggtgccagctctctcccagaggcttggagttcaatctgaaggggtgctg ggggaactttactgtgcaagttgtaataatggtattatatactatttttctaccccactctctag aaacacataaaggctattattgtgatcagtttgaactaacaacaaaa
5	DLL3 Пептид 1	VCLKPGLSEEAESPICALGAALSAR
6	DLL3 Пептид 2	AGAWELR
7	DLL3 Пептид 3	CEPPAVGTACTR
8	DLL3 Пептид 4	AGCSPEHGFCEQPGECR
9	DLL3 Пептид 5	SFECTCPR
10	DLL3 Пептид 6	NGGLCLDLGHALR
11	DLL3 Пептид 7	CSCALGFGR

12	DLL3 ECD (аминокислоты 27-492 SEQ ID NO: 1)	AGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLS EEAAESPICALGAALSAR GPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPRDAWPGTFSFIETWRE ELGDQIGGPAWSLLARV AGRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTAC TRLRPRAPSRCGPGLRP CAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLC TVPVSTSSCLSPRGPSA TTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLR CEVSGVTCADGPCFNGGL CVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLC LDLGHALRCRCRAGFAGP RCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGRDC RERADPCAARPCAHGGRCYA HFSGLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDP QRYL
----	--	--

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ
- 5 <120> ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ
- <130> OV00134
- 10 <160> 12
- <170> PatentIn version 3.5
- 15 <210> 1
<211> 618
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 20 <400> 1
- Met Val Ser Pro Arg Met Ser Gly Leu Leu Ser Gln Thr Val Ile Leu
1 5 10 15
- 25 Ala Leu Ile Phe Leu Pro Gln Thr Arg Pro Ala Gly Val Phe Glu Leu
20 25 30
- 30 Gln Ile His Ser Phe Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro Arg Ser
35 40 45
- 35 Pro Cys Ser Ala Arg Leu Pro Cys Arg Leu Phe Phe Arg Val Cys Leu
50 55 60
- Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu Ser Pro Cys Ala Leu Gly
65 70 75 80
- 40 Ala Ala Leu Ser Ala Arg Gly Pro Val Tyr Thr Glu Gln Pro Gly Ala
85 90 95
- 45 Pro Ala Pro Asp Leu Pro Leu Pro Asp Gly Leu Leu Gln Val Pro Phe
100 105 110
- 50 Arg Asp Ala Trp Pro Gly Thr Phe Ser Phe Ile Ile Glu Thr Trp Arg
115 120 125
- Glu Glu Leu Gly Asp Gln Ile Gly Gly Pro Ala Trp Ser Leu Leu Ala
130 135 140
- 55 Arg Val Ala Gly Arg Arg Arg Leu Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Arg
145 150 155 160
- 60 Asp Ile Gln Arg Ala Gly Ala Trp Glu Leu Arg Phe Ser Tyr Arg Ala

					165					170						175
5	Arg	Cys	Glu	Pro	Pro	Ala	Val	Gly	Thr	Ala	Cys	Thr	Arg	Leu	Cys	Arg
				180					185					190		
10	Pro	Arg	Ser	Ala	Pro	Ser	Arg	Cys	Gly	Pro	Gly	Leu	Arg	Pro	Cys	Ala
			195					200					205			
15	Pro	Leu	Glu	Asp	Glu	Cys	Glu	Ala	Pro	Leu	Val	Cys	Arg	Ala	Gly	Cys
	210						215					220				
20	Ser	Pro	Glu	His	Gly	Phe	Cys	Glu	Gln	Pro	Gly	Glu	Cys	Arg	Cys	Leu
	225					230					235					240
25	Glu	Gly	Trp	Thr	Gly	Pro	Leu	Cys	Thr	Val	Pro	Val	Ser	Thr	Ser	Ser
					245					250					255	
30	Cys	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	Pro	Ser	Ser	Ala	Thr	Thr	Gly	Cys	Leu	Val
				260					265					270		
35	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Cys	Asp	Gly	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Ser
			275					280					285			
40	Cys	Ser	Glu	Thr	Pro	Arg	Ser	Phe	Glu	Cys	Thr	Cys	Pro	Arg	Gly	Phe
		290					295					300				
45	Tyr	Gly	Leu	Arg	Cys	Glu	Val	Ser	Gly	Val	Thr	Cys	Ala	Asp	Gly	Pro
	305					310					315					320
50	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Leu	Cys	Val	Gly	Gly	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Ala
					325					330					335	
55	Tyr	Ile	Cys	His	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Gln	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu	Lys
				340					345					350		
60	Arg	Val	Asp	Arg	Cys	Ser	Leu	Gln	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly	Gly	Leu	Cys
			355					360					365			
65	Leu	Asp	Leu	Gly	His	Ala	Leu	Arg	Cys	Arg	Cys	Arg	Ala	Gly	Phe	Ala
		370					375					380				
70	Gly	Pro	Arg	Cys	Glu	His	Asp	Leu	Asp	Asp	Cys	Ala	Gly	Arg	Ala	Cys
	385					390					395					400
75	Ala	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Gly	Gly	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Ser
					405						410					415

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

70 <210> 2
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

75 <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

75 Glu Gly Trp Thr Gly Pro Leu Cys Thr Val Pro Val Ser Thr Ser Ser

				245					250						255			
5	Cys	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	Pro	Ser	Ser	Ala	Thr	Thr	Gly	Cys	Leu	Val		
				260					265					270				
10	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Cys	Asp	Gly	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Ser		
			275					280					285					
15	Cys	Ser	Glu	Thr	Pro	Arg	Ser	Phe	Glu	Cys	Thr	Cys	Pro	Arg	Gly	Phe		
		290					295					300						
20	Tyr	Gly	Leu	Arg	Cys	Glu	Val	Ser	Gly	Val	Thr	Cys	Ala	Asp	Gly	Pro		
	305					310					315					320		
25	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Leu	Cys	Val	Gly	Gly	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Ala		
				325						330					335			
30	Tyr	Ile	Cys	His	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Gln	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu	Lys		
			340						345					350				
35	Arg	Val	Asp	Arg	Cys	Ser	Leu	Gln	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly	Gly	Leu	Cys		
			355					360					365					
40	Leu	Asp	Leu	Gly	His	Ala	Leu	Arg	Cys	Arg	Cys	Arg	Ala	Gly	Phe	Ala		
	370						375					380						
45	Gly	Pro	Arg	Cys	Glu	His	Asp	Leu	Asp	Asp	Cys	Ala	Gly	Arg	Ala	Cys		
	385				390						395					400		
50	Ala	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Gly	Gly	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Ser		
					405					410						415		
55	Cys	Ala	Leu	Gly	Phe	Gly	Gly	Arg	Asp	Cys	Arg	Glu	Arg	Ala	Asp	Pro		
			420						425					430				
60	Cys	Ala	Ala	Arg	Pro	Cys	Ala	His	Gly	Gly	Arg	Cys	Tyr	Ala	His	Phe		
			435					440					445					
65	Ser	Gly	Leu	Val	Cys	Ala	Cys	Ala	Pro	Gly	Tyr	Met	Gly	Ala	Arg	Cys		
	450						455					460						
70	Glu	Phe	Pro	Val	His	Pro	Asp	Gly	Ala	Ser	Ala	Leu	Pro	Ala	Ala	Pro		
	465					470					475					480		
75	Pro	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Pro	Gln	Arg	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala		
				485						490					495			

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

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

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

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

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

25 Ile Ser Ala Pro Ser Ile Tyr Ala Arg Glu Ala
 580 585

30 <210> 3
 <211> 2389
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

35 <400> 3
 agatataagg cttggaagcc agcagctgcg actcccgaga cccccccacc agaaggccat 60

ggtctcccca cggatgtccg ggctcctctc ccagactgtg atcctagcgc tcattttcct 120

cccccagaca cggcccgtcg gcgtcttcga gctgcagatc cactctttcg ggccgggtcc 180

40 aggccttggg gccccgcggt ccccctgcag cgcccggctc cctgcccgc tcttcttcag 240

agtctgcctg aagcctgggc tctcagagga ggccgcccag tccccgtgcg ccttgggcgc 300

ggcgctgagt ggcgcggac cggctacac cgagcagccc ggagcggccg gcctgatct 360

45 cccactgccc gacggcctct tgcaggtgcc cttccgggac gcctggcctg gcaccttctc 420

tttcatcctc gaaacctgga gagaggagtt aggagaccag attggagggc ccgctggag 480

50 cctgctggcg cgcgtggctg gcagggcgcg cttggcagcc ggaggcccgt gggcccggga 540

cattcagcgc gcagggcct gggagctgcg cttctcgtac cgcgcgcgct gcgagccgcc 600

tgccgtcggg accgcgtgca cgcgcctctg ccgtccgcgc agcggcccct cgcggtgcgg 660

55 tccgggactg cgccttgcg caccgctoga ggacgaatgt gaggcggcgc tgggtgtgccg 720

agcaggctgc agccctgagc atggcttctg tgaacagccc ggtgaatgcc gatgcctaga 780

60 gggctggact ggacctctt gcaaggctcc tgtctccacc agcagctgcc tcagccccag 840

gggcccgtcc tctgctacca ccggatgcct tgtccctggg cctgggcccct gtgacgggaa 900

	cccgtgtgcc aatggaggca gctgtagtga gacaccagg tcctttgaat gcacctgccc	960
5	gcgtgggttc tacgggctgc ggtgtgaggt gagcggggtg acatgtgcag atggaccctg	1020
	cttcaacggc ggcttgtgtg tcgggggtgc agaccctgac tetgectaca tetgccaactg	1080
	cccacccggc ttccaaggct ccaactgtga gaagaggggtg gaccgggtgca gcctgcagcc	1140
10	atgccgcaat ggcgactct gcctggacct gggccacgcc ctgcgctgcc gctgccgcgc	1200
	cggttcgcg ggtcctcgct gcgagcacga cctggacgac tgcgcgggcc gcgcctgcgc	1260
15	taacggcggc acgtgtgtgg agggcgggcg cgcgcaccgc tgctcctgcg cgctgggctt	1320
	cggcggccgc gactgccgcg agcgcgcgga cccgtgcgcc gcgcgcccct gtgctcacgg	1380
	cgcccgctgc tacgcccact tctccggcct cgtctgcgct tgcgctcccg gctacatggg	1440
20	agcgcggtgt gagttcccag tgcaccccga cggcgcaagc gccttgcccg cggccccgcc	1500
	gggcctcagg cccggggacc ctcagcgcta ccttttgct cggctctgg gactgctcgt	1560
25	ggccgcgggc gtggccggcg ctgcgctctt gctggtccac gtgcgcccgc gtggccactc	1620
	ccaggatgct gggctctcgct tgctggctgg gaccccgag ccgtcagtcc acgactccc	1680
	ggatgcactc aacaacctaa ggacgcagga gggttccggg gatggtccga gctcgtccgt	1740
30	agattggaat cgccctgaag atgtagacc tcaagggatt tatgtcatat ctgctccttc	1800
	catctacgct cgggaggtag cgacgcccct tttcccccg ctacacactg ggcgcgctgg	1860
35	gcagaggcag cacctgcttt tccctacc ttcctcgatt ctgtccgtga aatgaattgg	1920
	gtagagtctc tggaaggttt taagcccatt ttcagttcta acttactttc atcctatfff	1980
	gcatcccctc tatcgttttg agctacctgc catcttctct ttgaaaaacc tatgggcttg	2040
40	aggaggtcac gatgccgact ccgccagagc ttttccactg attgtactca gcggggaggc	2100
	aggggaggca gaggggcagc ctctctaatg ctctactc attttgtttc taggcctgac	2160
45	gcgtctctc catccgcacc tggagtcaga gcgtggattt ttgtatttgc tcggtggtgc	2220
	ccagtctctg cccagaggc tttggagttc aatcttgaag ggggtgtctgg ggaacttta	2280
	ctgttgcaag ttgtaaataa tggttattta tctctatfff tttctcacc catctctcta	2340
50	gaaacaccta taaaggctat tattgtgatc agttttgact aacaaaaaa	2389
	<210> 4	
55	<211> 2052	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 4	
60	agatataagg cttggaagcc agcagctgcg actcccgaga cccccacc agaaggccat	60
	ggtctcccca cggatgtccg ggctcctctc ccagactgtg atcctagcgc tcattttcct	120

	ccccagaca	cggcccgtg	ggtcttcga	gctgcagatc	cactctttcg	ggccgggtcc	180
5	aggccctggg	gccccgpgt	ccccctgcag	cgcccggctc	ccctgccgcc	tcttcttcag	240
	agtctgcctg	aagcctgggc	tctcagagga	ggccgccgag	tccccgtgcg	ccctgggpcg	300
	ggcgtgagt	gcgcgcggac	cggtctacac	cgagcagccc	ggagcgcgcc	cgctgatct	360
10	cccactgccc	gacggcctct	tgcaggtgcc	cttccgggac	gcctggcctg	gcaccttctc	420
	tttcatcadc	gaaacctgga	gagaggagt	aggagaccag	attggagggc	ccgcctggag	480
15	cctgctggcg	cgctggctg	gcaggcggcg	cttggcagcc	ggaggcccgt	gggcccggga	540
	cattcagcgc	gcaggcgcct	gggagctgcg	cttctcgtac	cgcgcgctct	gcgagccgcc	600
	tgccgtcggg	accgcgtgca	cgccctctg	ccgtccgcgc	agcgcacct	cgcggtgpcg	660
20	tccgggactg	cgccccctgcg	caccgctcga	ggacgaatgt	gaggcgcgc	tgggtgpcg	720
	agcaggctgc	agccctgagc	atggcttctg	tgaacagccc	ggtgaatgcc	gatgcctaga	780
25	gggctggact	ggacctctct	gcacggctcc	tgtctccacc	agcagctgcc	tcagccccag	840
	gggcccgtcc	tctgctacca	ccgatgcct	tgtccctggg	cctgggccct	gtgacgggaa	900
	cccgtgtgcc	aatggaggca	gctgtagtga	gacaccagc	tcctttgaat	gcacctgccc	960
30	gcgtgggttc	tacgggctgc	ggtgtgaggt	gagcggggtg	acatgtgcag	atggacctg	1020
	cttcaacggc	ggcttgtgtg	tgggggtgc	agacctgac	tctgcctaca	tctgccactg	1080
35	cccaccgggt	ttccaaggct	ccaactgtga	gaagagggtg	gaccgggtgca	gcctgcagcc	1140
	atgccgcaat	ggcggactct	gcctggacct	gggccacgcc	ctgcgctgcc	gctgccgcgc	1200
	cggcttcgcg	ggtcctcgt	gcgagcaoga	cctggacgac	tgcgcgggcc	gcgcctgcgc	1260
40	taacggcggc	acgtgtgtgg	agggcggcgg	cgcgcaaccg	tgtcctcgcg	cgctgggctt	1320
	cggcggccgc	gactgccgcg	agcgcgcgga	cccgtgcgcc	gcgcgccct	gtgctcacgg	1380
45	cggccgctgc	tacgcccact	tctccggcct	cgtctgcgct	tgcgctcccg	gctacatggg	1440
	agcgcgggtg	gagttcccag	tgcaccccga	cggcgcaagc	gccttgcccg	cgccccgcc	1500
	ggcctcagg	cccggggacc	ctcagcgtca	ccttttgct	ccggtctgg	gactgctcgt	1560
50	ggccgcgggc	gtggccggcg	ctgcgctctt	gctggctccac	gtgcgcgcc	gtggcactc	1620
	ccaggatgct	gggtctcgt	tgtggctgg	gacccccgag	ccgtcagtc	acgactccc	1680
55	ggatgcactc	aacaacctaa	ggacgcagga	gggttccggg	gatggctccga	gctcgtccgt	1740
	agattggaat	cgccctgaag	atgtagacc	tcaagggatt	tatgtcatat	ctgctccttc	1800
	catctacgct	cgggaggcct	gacgcgtctc	ctccatccgc	acctggagtc	agagcgtgga	1860
60	ttttgtatt	tgtcgggtgg	tgcccagtct	ctgccccaga	ggctttggag	ttcaatcttg	1920

aaggggtgtc tgggggaact ttactgttgc aagttgtaaa taatggttat ttatataccta 1980
 tttttttctca ccccatctct ctagaaacac ctataaaggc tattattgtg atcagttttg 2040
 5 actaacaaaa aa 2052

<210> 5
 <211> 25
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

15 Val Cys Leu Lys Pro Gly Leu Ser Glu Glu Ala Ala Glu Ser Pro Cys
 1 5 10 15

20 Ala Leu Gly Ala Ala Leu Ser Ala Arg
 20 25

25 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

30 Ala Gly Ala Trp Glu Leu Arg
 1 5

35 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

40 Cys Glu Pro Pro Ala Val Gly Thr Ala Cys Thr Arg
 1 5 10

45 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Ala Gly Cys Ser Pro Glu His Gly Phe Cys Glu Gln Pro Gly Glu Cys
 1 5 10 15

55 Arg

60 <210> 9
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 9
 5 Ser Phe Glu Cys Thr Cys Pro Arg
 1 5

 <210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 15 Asn Gly Gly Leu Cys Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg
 1 5 10

 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 25 Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg
 1 5 10

 <210> 12
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 30 Ala Gly Val Phe Glu Leu Gln Ile His Ser Phe Gly Pro Gly Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Arg Asn Gly Gly Leu Cys Leu Asp Leu Gly His Ala Leu Arg Cys Arg
 340 345 350

5 Cys Arg Ala Gly Phe Ala Gly Pro Arg Cys Glu His Asp Leu Asp Asp
 355 360 365

10 Cys Ala Gly Arg Ala Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Val Glu Gly Gly
 370 375 380

15 Gly Ala His Arg Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Gly Gly Arg Asp Cys
 385 390 395 400

Arg Glu Arg Ala Asp Pro Cys Ala Ala Arg Pro Cys Ala His Gly Gly
 405 410 415

20 Arg Cys Tyr Ala His Phe Ser Gly Leu Val Cys Ala Cys Ala Pro Gly
 420 425 430

25 Tyr Met Gly Ala Arg Cys Glu Phe Pro Val His Pro Asp Gly Ala Ser
 435 440 445

30 Ala Leu Pro Ala Ala Pro Pro Gly Leu Arg Pro Gly Asp Pro Gln Arg
 450 455 460

Tyr Leu
 35 465

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или профилактики рака легкого, в котором DLL3 экспрессируется в указанном раке легкого, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, которое связывается с DLL3 и CD3.
2. Способ лечения или профилактики рака, в котором DLL3 экспрессируется в указанном раке, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества аффинного реагента, который связывается с DLL3.
3. Способ по п. 2, для лечения или профилактики рака, выбранного из группы, состоящей из рака легкого, рака поджелудочной железы и рака кожи, предпочтительно мелкоклеточный рак легкого.
4. Способ по п. 2 или 3, в котором аффинный реагент специфически связывается с DLL3.
5. Способ по любому одному из п.п. 2-4, в котором аффинный реагент представляет собой антитело или его функциональный фрагмент или миметик антитела.
6. Способ по п. 5, в котором аффинный реагент представляет собой моноклональное антитело или его антиген-связывающий фрагмент.
7. Способ по п. 5 или 6, в котором аффинный реагент представляет собой химерное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, одноцепочечное антитело, дефукозилированное антитело или биспецифическое антитело (предпочтительно ViTE).
8. Способ по п. 5, в котором:
- (а) функциональный фрагмент антитела представляет собой UniBody, домен антитела или Nanobody; или

(б) миметик антитело представляет собой Affibody, DARPin, Anticalin, Avimer, Versabody или Дуокалин.

5 9. Способ по любому одному из п.п. 2-8, в котором аффинный реагент содержит или является конъюгированным с терапевтическим фрагментом.

10 10. Способ по п. 9, в котором терапевтическая группа представляет собой цитотоксичный фрагмент или радиоактивный изотоп.

10 11. Способ по п. 9 или 10, в котором аффинный реагент представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства.

15 12. Способ по любому одному из п.п. 1-8, в котором аффинный реагент вызывает антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

13. Способ по любому одному из п.п. 1-8, в котором аффинный реагент вызывает комплемент зависимую цитотоксичность (CDC).

20 14. Способ по любому одному из п.п. 1-8, в котором аффинный реагент вызывает Т-клеточную цитотоксичность.

25 15. Способ по любому одному из п.п. 1-8, в котором аффинный реагент индуцирует апоптоз раковых клеток, убивает или уменьшает количество раковых стволовых клеток и/или убивает или уменьшает количество циркулирующих опухолевых клеток.

30 16. Способ обнаружения, диагностики и/или скрининга или мониторинга прогрессирования рака, где DLL3 экспрессируется в указанном раковом образовании, или мониторинга эффекта препарата против рака или терапии, при которой DLL3 экспрессируется в указанный рак, у субъекта, который включает обнаружение присутствия или уровня DLL3, или одного или более фрагментов, или присутствия или уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или который включает обнаружение изменения в его уровне у указанного субъекта.

17. Способ по п. 16, который включает обнаружение присутствия DLL3, или одного или более его фрагментов или присутствия нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, в котором либо (а) присутствие повышенного уровня DLL3 или указанного одного или больше его фрагментов или повышенного уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, у субъекта, по сравнению с уровнем в здорового человека или (б) присутствие детектируемого уровня DLL3 или одного или нескольких его фрагментов или определяемого уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3 у субъекта, по сравнению с соответствующим неопределяемым уровнем у здорового человека, свидетельствует о наличии рака, где DLL3 экспрессируется в указанном виде рака, у указанного субъекта.

18. Способ обнаружения, диагностики и/или скрининга или мониторинга прогрессирования рака, где DLL3 экспрессируется в указанном раковом образовании, или мониторинга эффекта противоракового препарата или терапии, при котором DLL3 экспрессируется в указанном раке, у субъекта, который включает определение присутствия или уровня антител, способных иммуноспецифически связываться с DLL3, или одним или более его фрагментов.

19. Способ по любому одному из пунктов 16-18, в котором присутствие DLL3, или одного или нескольких его фрагментов, или присутствие нуклеиновой кислоты, кодирующей DLL3, или присутствие или уровень антител, способных иммуноспецифически связываться с DLL3, или одним или более его фрагментов, обнаруживают с помощью анализа биологического образца, полученного от субъекта.

20. Способ по любому одному из п.п. 16-19, где присутствие DLL3, или одного или больше его фрагментов, определяется с помощью аффинного реагента, который связывается с DLL3.

21. Способ по п. 20, в котором аффинный реагент, как определено как-либо одним из п.п. 3 - 8.

22. Способ по п. 20 или 21, в котором аффинный реагент содержит или является конъюгированным с детектируемой меткой.

23. Способ по любому одному из п.п. 16-22, в котором рак выбирают из группы, состоящей из рака легкого, рака поджелудочной железы и рака кожи.

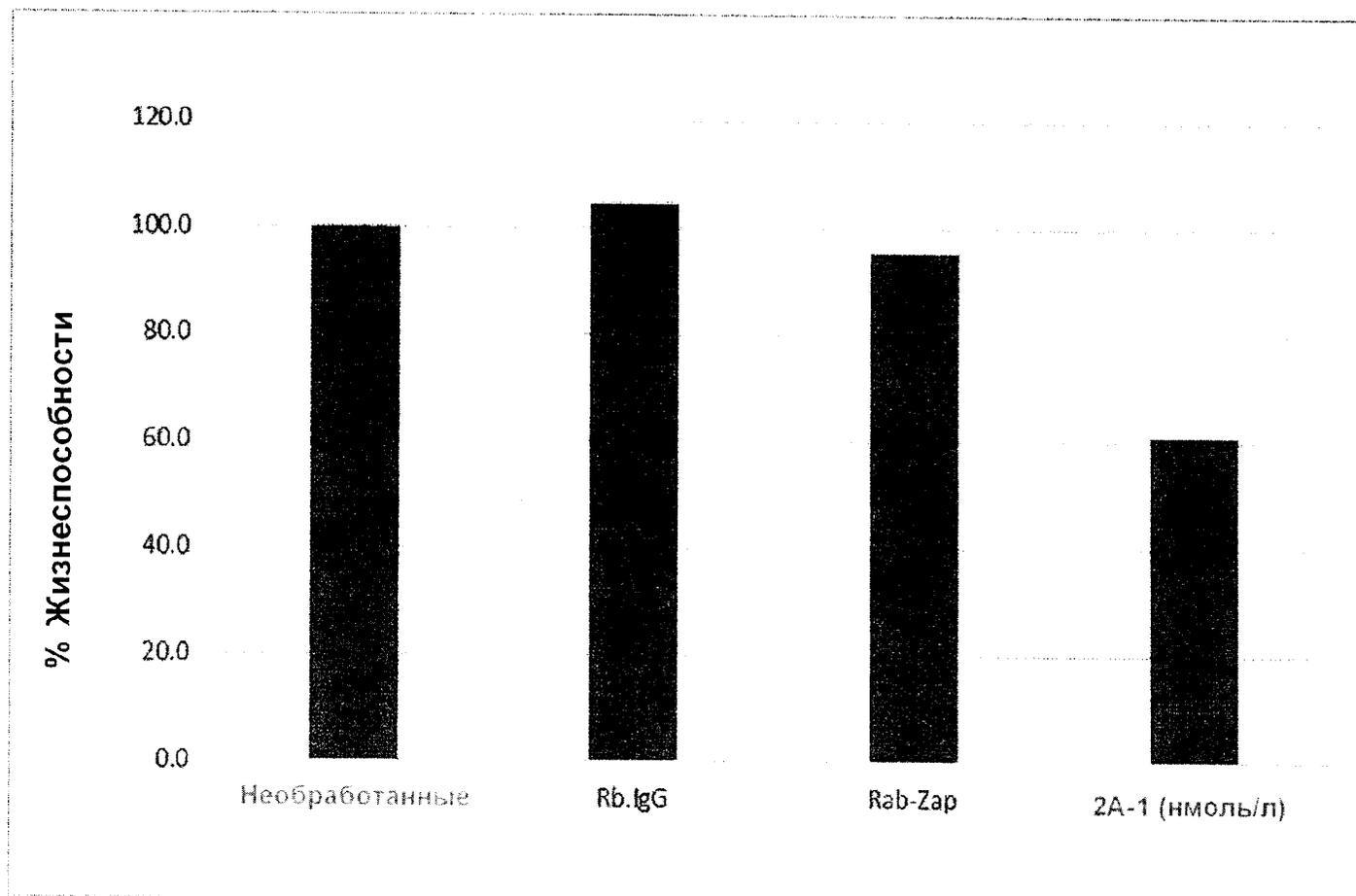
5 24. Способ по любому одному из п.п. 1-23, в котором субъектом является человек.

10 25. Способ идентификации агента для лечения или профилактики рака, в котором DLL3 экспрессируется в указанных видах рака, где способ включает (а) контактирование DLL3, или одного или более его фрагментов с потенциальным агентом; и (б) определение связывания указанного агента с DLL3, или одним или больше его фрагментами.

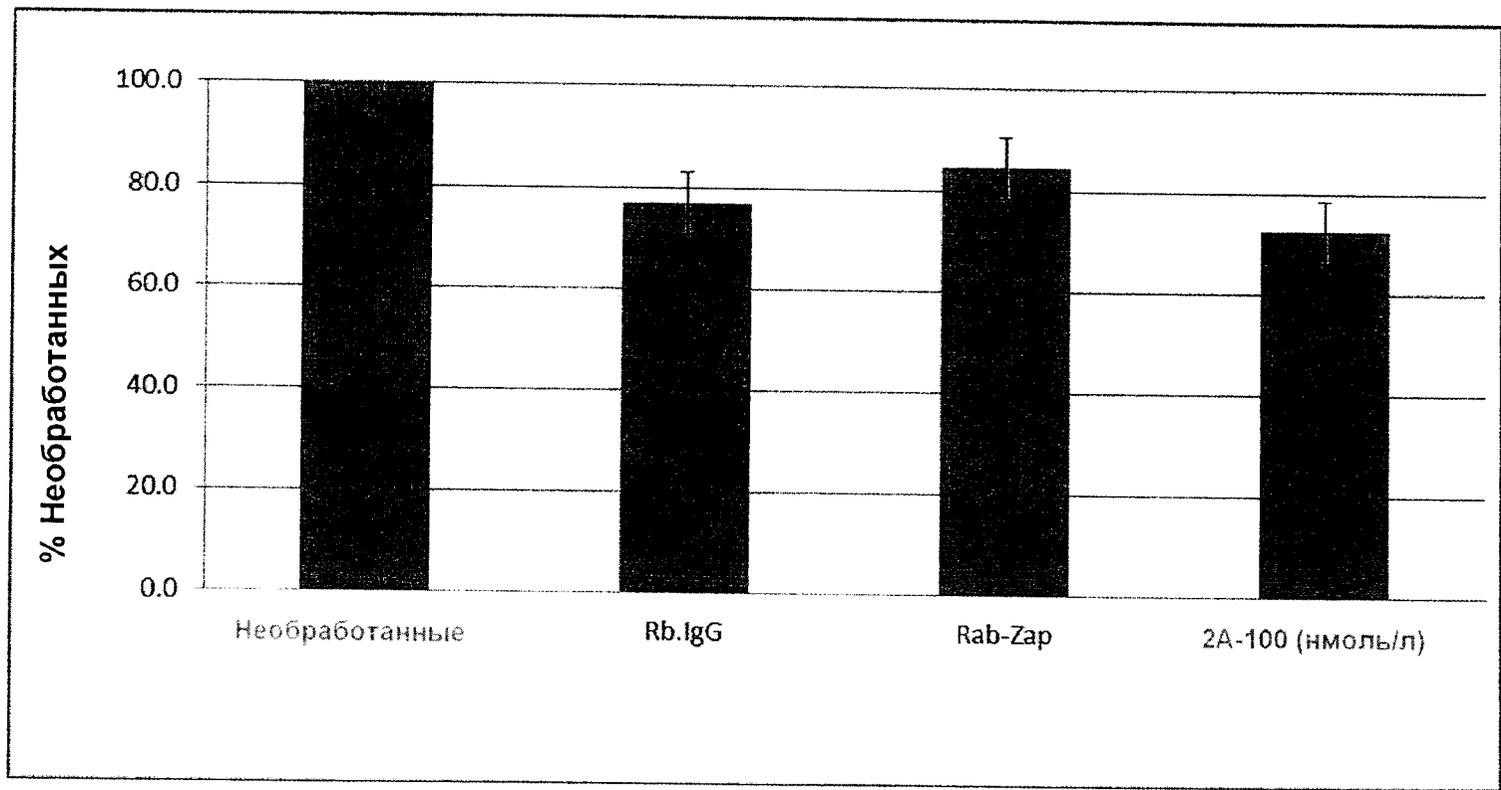
15 26. Способ по п. 25, который дополнительно включает стадию исследования способности агента, который связывается с DLL3, или одним или более его фрагментами, чтобы ингибировать рак, где DLL3 экспрессируется в указанном виде рака.

20 27. Способ по п. 25 или 26, в котором аффинный реагент модулирует физиологическую функцию DLL3, ингибирует связывание лиганда с DLL3 и/или ингибирует путь передачи сигнала, опосредованного DLL3.

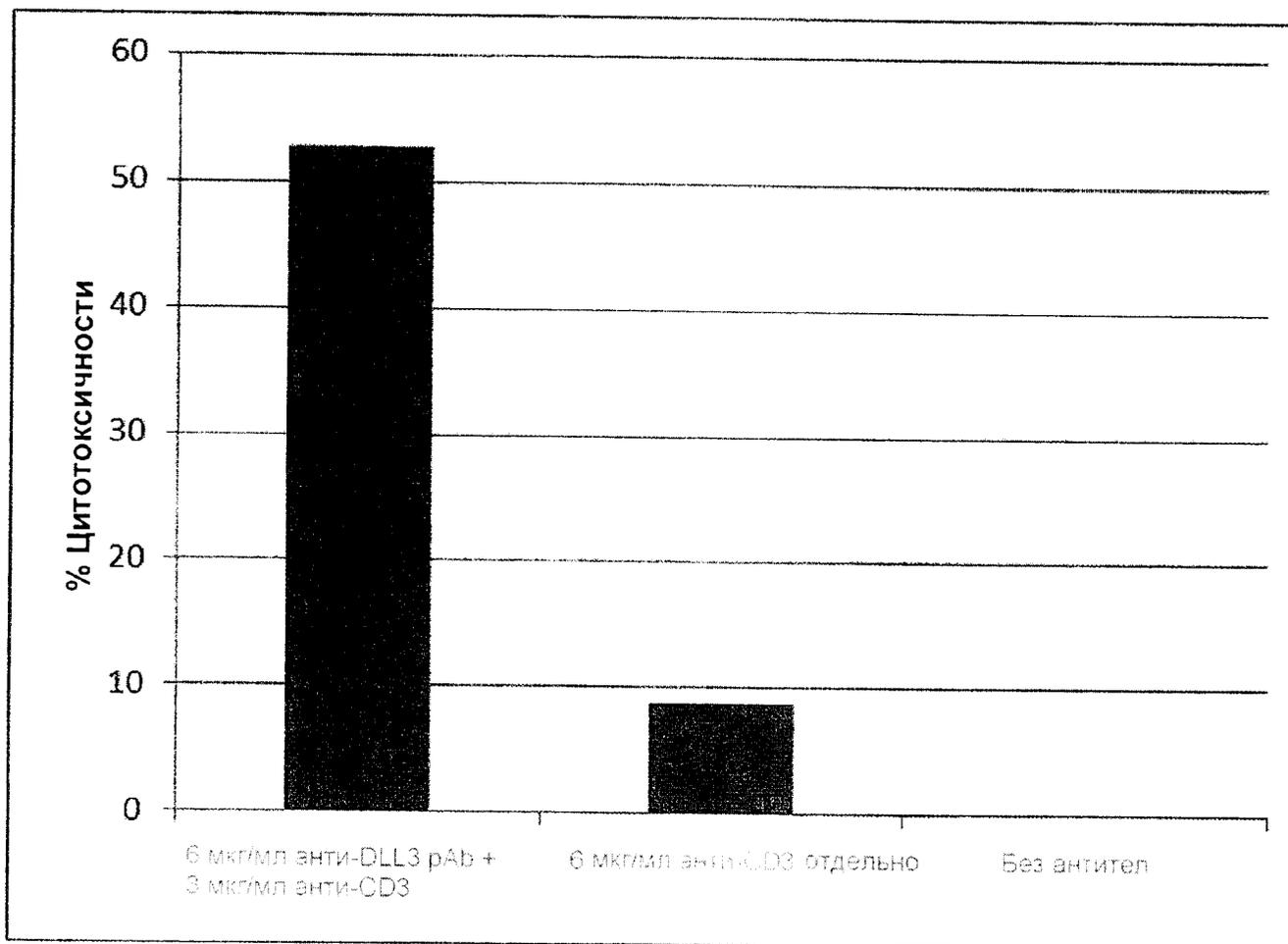
25 28. Способ по любому одному из п.п. 25-27, где рак выбирают из группы, состоящей из рака легкого, рака поджелудочной железы и рака кожи.



ФИГУРА 1a



ФИГУРА 1б



ФИГУРА 2