

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046808**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.04.24**

(21) Номер заявки  
**202092672**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.04.30**

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)

---

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ DLL3 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **62/668,427; 62/754,207; 62/787,815**

(32) **2018.05.08; 2018.11.01; 2019.01.03**

(33) **US**

(43) **2021.03.10**

(86) **PCT/US2019/029888**

(87) **WO 2019/217145 2019.11.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Ван Минхань, Цзоу Хой, Цзя Хайцюнь  
(US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-2017147368**  
**US-A1-20120195831**  
**US-A1-20120042416**  
UniProt Accession No **E3RP86\_PYRTT**,  
Uncharacterized protein, submitted 11 January 2011  
[online]. [Retrieved on 22 August 2019], Retrieved  
from the internet <URL: <https://www.uniprot.org/uni-prot/E3RP86>>  
**US-A1-20160130356**  
**US-A1-20060121049**  
**US-A1-20110312505**

---

(57) Изобретение относится к антителам против DLL3 и их антигенсвязывающим фрагментам, антителам против CD47 и их антигенсвязывающим фрагментам, и к биспецифическим антителам против CD47/DLL3 и их антигенсвязывающим фрагментам. Настоящее изобретение относится также к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела, к композициям, содержащим антитела, и к способам получения антител и применения антител для лечения или предотвращения заболеваний, таких как злокачественная опухоль и/или ассоциированные осложнения.

---

**B1**

**046808**

**046808**

**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной патентной заявки США 62/787815, поданной 3 января 2019 г.; Предварительной патентной заявки США № 62/754207, поданной 1 ноября 2018 г.; и Предварительной патентной заявки США № 62/668427, поданной 8 мая 2018 г. Полное содержание каждого описания приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам против DLL3, к антителам против CD47 и к биспецифическим антителам против CD47/DLL3, к нуклеиновым кислотам и к экспрессирующим векторам, кодирующим антитела, к рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и к композициям, содержащим антитела. Настоящее изобретение относится также к способам получения антител и к способам применения антител для лечения заболеваний, включая злокачественные опухоли и/или ассоциированные осложнения.

### Ссылка на список последовательностей, принятый в электронной форме

Настоящая заявка содержит список последовательностей, принятый в электронной форме через EFS-Web как список последовательностей в формате ASCII с наименованием файла "689204.17WO Sequence Listing" и датой создания 29 апреля 2019 г. и имеющий размер 70 кБ. Список последовательностей, принятый через EFS-Web, составляет часть описания, и его полное содержание приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

### Уровень техники для изобретения

Дельта-подобный канонический лиганд 3 Notch (DLL3), также известный как дельта-подобный 3 или дельта-подобный белок 3, необходим для сегментации сомитов в ходе ранних стадий развития (Dunwoodie et al., *Development* 129:1795-806 (2002)). В отличие от лигандов DLL1, DLL4, JAG1 и JAG2 семейства лигандов Notch млекопитающих, которые все активируют передачу сигналов рецептора Notch в транс (Ntziachristos et al., *Cancer Cell* 25(3):318-34 (2014)), DLL3 преимущественно локализован в аппарате Гольджи и является неспособным активировать передачу сигналов Notch (Charman et al., *Hum Mol Genet* 20(5):905-16 (2011) и Geffers et al., *J Cell Biol* 178(3):465-76 (2007)). В ходе нормального развития, DLL3 ингибирует как цис-, так и трансдействующую активацию пути Notch посредством взаимодействия с Notch и DLL1 (Charman et al., *Hum Mol Genet* 20(5):905-16(2011)). DLL3 в норме либо отсутствует, либо присутствует на очень низких уровнях в нормальных тканях взрослого, за исключением головного мозга, но сверхэкспрессирован в образцах рака легкого, рака яичка, глиомы и меланомы (Uhlen et al., *Science* 357(6352): eaan2507 (2017)). Кроме того, DLL3 поддается детекции на поверхности клеток опухолей мелкоклеточного рака легкого (SCLC) и крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC) (Saunders et al., *Sci Transl Med* 7(302):302ra136 (2015) и Sharma et al., *Cancer Res* 77(14):3931-41 (2017)), что делает его потенциальной мишенью моноклональных антител для терапии злокачественных опухолей. Таким образом, моноклональное антитело против DLL3 может быть использовано для специфического нацеливания на экспрессирующие DLL3 клетки опухолей и может служить потенциальным противораковым лекарственным средством.

### Краткое изложение сущности изобретения

В одном общем аспекте, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам против DLL3 или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают DLL3.

Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам против DLL3 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

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

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам против DLL3 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- (1) SEQ ID NO: 97, 98, 99, 133, 134 и 135 соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 100, 101, 102, 136, 137 и 138 соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 103, 104, 105, 139, 140 и 141 соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 106, 107, 108, 142, 143 и 144 соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 109, 110, 111, 145, 146 и 147 соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 112, 113, 114, 148, 149 и 150 соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 115, 116, 117, 151, 152 и 15, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 118, 119, 120, 154, 155 и 156 соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 121, 122, 123, 157, 158 и 159 соответственно;
- (10) SEQ ID NO: 124, 125, 126, 160, 161 и 162 соответственно;
- (11) SEQ ID NO: 127, 128, 129, 163, 164 и 165 соответственно или
- (12) SEQ ID NO: 130, 131, 132, 166, 167 и 168 соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 или 23, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 или 24.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В конкретных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

В конкретных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело против DLL3 или

его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным. В конкретных вариантах осуществления, гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

б) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 172; или

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

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого фагоцитоза (ADPC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC), и/или опосредовать привлечение конъюгированных лекарственных средств, и/или формировать биспецифическое антитело с другим mAb или антигенсвязывающим фрагментом с эффектом уничтожения злокачественных опухолей.

Настоящее изобретение относится также к моноклональным антителам против CD47 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим переменную область гуманизированной тяжелой цепи моноклонального антитела против CD47 и переменную область гуманизированной легкой цепи моноклонального антитела против DLL3, где моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 175, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 171;

б) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 175, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 172;

в) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 175, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 173;

д) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 176, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 171;

е) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 176, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 172;

ф) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 176, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 173;

г) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 177, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 171;

г) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 177, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 172;

и) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 177, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 173; или

ж) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 177, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 174.

В конкретных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным блокировать связывание CD47 с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP $\alpha$ ).

В конкретных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз клеток злокачественных опухолей.

Настоящее изобретение относится к гуманизированным биспецифическим антителам против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим первый антигенсвязывающий домен,

специфически связывающий CD47, предпочтительно CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно DLL3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 178, 179 и 180; второй антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 181, 182 и 183; и каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 184, 185 и 186.

Настоящее изобретение относится к гуманизированным биспецифическим антителам против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно, CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно, DLL3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 187, 188 и 189; второй антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 190, 191 и 192; и каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 193, 194 и 195.

В конкретных вариантах осуществления выделенные гуманизированные биспецифические антитела против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты содержат первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно, CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно, DLL3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 176, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 172; и где второй антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 172.

В конкретных вариантах осуществления выделенное гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным блокировать связывание CD47 с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP $\alpha$ ) на клетках злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47.

В конкретных вариантах осуществления выделенное гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47.

В конкретных вариантах осуществления выделенное гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным связывать клетки злокачественных опухолей, экспрессирующие как DLL3, так и CD47, со связыванием с эритроцитами (RBC) человека от минимального до не поддающегося детекции.

Настоящее изобретение относится также к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим моноклональные антитела против DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты, моноклональные антитела против CD47 или их антигенсвязывающие фрагменты, или гуманизированные биспецифические антитела против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, описанные в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится также к векторам, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела против DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты, моноклональные антитела против CD47 или их антигенсвязывающие фрагменты, или гуманизированные биспецифические антитела против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к клеткам-хозяевам, содержащим векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела против DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты, моноклональные антитела против CD47 или их антигенсвязывающие фрагменты, или гуманизированные биспецифические антитела против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической

композиции, содержащей выделенные моноклональные антитела против DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты, выделенные моноклональные антитела против CD47 или их антигенсвязывающие фрагменты, или выделенные гуманизированные биспецифические антитела против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится также к способам нацеливания на DLL3 на поверхности клеток злокачественных опухолей у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих выделенные моноклональные антитела против DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам блокирования связывания CD47 с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP $\alpha$ ) у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих выделенные моноклональные антитела против CD47 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам индукции опосредованного макрофагами фагоцитоза клеток злокачественных опухолей у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих выделенные моноклональные антитела против CD47 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам нацеливания на DLL3 и CD47, которые оба экспрессированы на поверхности клеток злокачественных опухолей у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих выделенные гуманизированные биспецифические антитела против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам блокирования связывания CD47 с SIRP $\alpha$  на клетках злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47, у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих выделенные гуманизированные биспецифические антитела против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам индукции опосредованного макрофагами фагоцитоза клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47, у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих выделенные гуманизированные биспецифические антитела против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам связывания клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47, посредством гуманизированного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или антигенсвязывающего фрагмента, со связыванием с эритроцитами (RBC) человека от минимального до не поддающегося детекции, у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих выделенные гуманизированные биспецифические антитела против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению. Злокачественная опухоль может представлять собой любую жидкую или солидную злокачественную опухоль, например она может быть выбрана, но без ограничения, из рака легкого, такого как мелко-клеточный рак легкого (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжскинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

Настоящее изобретение относится также к способам получения выделенного моноклонального антитела против DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, выделенного моноклонального антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, или выделенного гуманизированного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающим культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Настоящее изобретение относится также к способам получения фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, выделенное моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, или выделенное гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающим объединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение относится также к способам определения уровня DLL3 у субъекта. Способы включают: (а) получение образца от субъекта; (б) приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом против DLL3 или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению и (с) определение уровня DLL3 у субъекта. В конкретных вариантах осуществления образец представляет собой образец ткани. Образец ткани может, например, представлять собой образец ткани злокачественной опухоли. В конкретных вариантах осуществления образец представляет собой образец крови.

#### **Краткое описание чертежей**

Приведенное выше краткое изложение сущности изобретения, так же как следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, станет лучше понятным при чтении в сочетании с прилагаемыми чертежами. Следует понимать, однако, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На фиг. 1А-1С показано связывание очищенных химерных mAb против DLL3 с использованным в качестве покрытия рекомбинантным белком DLL3 посредством ELISA.

На фиг. 2А-2С показано связывание химерных mAb против DLL3 с клетками HEK293-huDLL3 посредством FACS. Три различных концентрации mAb использовали в анализе (666,67 нМ (фиг. 2А); 333,33 нМ (фиг. 2В) и 66,67 нМ (фиг. 2С)).

На фиг. 3 показано связывание гуманизированных mAb против DLL3 H1L2 с клетками SHP-77 посредством FACS.

На фиг. 4А-4В показаны данные мостикового ELISA биспецифических антител ВА1 и ВА1(С) (фиг. 4А) и ВА4(С) (фиг. 4В).

На фиг. 5 показано связывание биспецифических антител ВА1, ВА1(С) и ВА4(С) с иммобилизованным CD47 посредством анализа ELISA.

На фиг. 6А-6В показано связывание биспецифических антител ВА1 и ВА1(С) (фиг. 6А) и ВА4(С) (фиг. 6В) с иммобилизованным DLL3 посредством анализа ELISA.

На фиг. 7 показано связывание биспецифических антител ВА1, ВА1(С) и ВА4(С) с одновременно иммобилизованными CD47 и DLL3 в соотношении концентраций 1:1 посредством анализа ELISA.

На фиг. 8А-8В показана активность биспецифических антител ВА1, ВА1(С) и ВА4(С) в блокировании взаимодействия CD47/SIRP $\alpha$  в анализе ELISA. Только CD47 был иммобилизован в анализе на фиг. 8А, и оба CD47 и DLL3 были иммобилизованы в соотношении концентраций 2:1 в анализе на фиг. 8В.

На фиг. 9 показано связывание биспецифических антител ВА1, ВА1(С) и ВА4(С) с клетками Raji.

На фиг. 10 показан ингибирующий эффект F(ab')<sub>2</sub> против CD47 или против DLL3 на связывание биспецифического антитела ВА1(С) с клетками SHP-77.

На фиг. 11А-11С показано связывание биспецифических антител с эритроцитами (RBC) человека при различных концентрациях mAb (1600 нМ (фиг. 11А), 533 нМ (фиг. 11В) и 178 нМ (фиг. 11С)).

#### **Подробное описание изобретения**

Различные публикации, статьи и патенты процитированы или описаны в разделе уровень техники и на протяжении описания; полное содержание каждой из этих ссылок приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий или т.п., которое включено в настоящее описание, приведено с целью предоставления контекста по изобретению. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все из этих объектов составляют часть предшествующего уровня техники, применительно к любым описанным или заявленным изобретениям.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится настоящее изобретение. В ином случае конкретные термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, как указано в описании.

Следует отметить, что, как используют в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем описании, следует понимать, как модифицированные во всех случаях термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение, как правило, включает  $\pm 10\%$  от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает 0,9-1,1 мг/мл. Подобным образом, диапазон концентраций 1-10% (мас./об.) включает 0,9% (мас./об.) - 11% (мас./об.). В рамках изобретения, использование числового значения явно включает все возможные поддиапазоны, все индивидуальные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дроби значений, если контекст явно не указывает на иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий сериям элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в сериях. Специалисту в данной области известно, или он является способным определить с использованием не более, чем общепринятых экспериментов, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем описании. Такие эквиваленты предназначены для включения в изобретение.

В рамках изобретения, термины "содержит", "содержащий", "включает", "включая", "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий", или любые другие их варианты, понимают как подразумевающие включение указанного целого или группы целых, но не как исключение любого другого целого или группы целых, и они предназначены, чтобы является неисключительными или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которые включают список элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не перечисленные или не присущие таким композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если явно не указано обратное, "или" относится к включительному или, а не к исключительному или. Например, условие А или В удовлетворено посредством любого из следующего: А является истинным (или присутствует) и В является ложным (или не присутствует), А является ложным (или не присутствует) и В является истинным (или присутствует), и А и В оба являются истинными (или присутствуют).

В рамках изобретения, соединительный термин "и/или" между множеством перечисленных элементов понимают как включающий как индивидуальные, так и объединенные варианты. Например, когда два элемента соединены посредством "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента в отсутствие второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента в отсутствие первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимают как включенный в значение, и таким образом, удовлетворяющий требованию термина "и/или", в рамках изобретения. Одновременную применимость более одного из вариантов также понимают как включенную в значение, и таким образом, удовлетворяющую требованию термина "и/или".

В рамках изобретения, термин "состоит из" или его варианты, такие как "состоят из" или "состоящий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, однако на то, что никакие дополнительные целое или группа целых не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

В рамках изобретения, термин "в основном состоит из" или варианты, такие как "в основном состоящий из" или "в основном состоящий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, и необязательное включение любого из указанного целого или группы целых, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

В рамках изобретения, "субъект" обозначает любое животное, предпочтительно, млекопитающее, наиболее предпочтительно, человека. Термин "млекопитающее", в рамках изобретения, включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, человека и т.д., более предпочтительно человека.

Термины "справа", "слева", "ниже" и "выше" обозначают направления на чертежах, на которые сделана ссылка.

Следует также понимать, что термины "приблизительно", "около", "как правило", "по существу" и подобные термины, используемые в настоящем описании, применительно к измерению или характеристике компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанное измерение/характеристика не является точной границей или параметром, и не исключают незначительных отклонений от них, которые являются функционально одинаковыми или сходными, как понятно специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, включающие числовой параметр, включают отклонения, которые, с использованием математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округления, ошибок измерения или других систематических ошибок, технологических допусков и т.д.), не изменяют наименьшую значащую цифру.

Термины "идентичный" или процент "идентичности", в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, антитела против DLL3, антитела против CD47, биспецифические антитела против CD47/DLL3, полипептиды DLL3 и кодирующие их полинуклеотиды), относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей, или посредством визуальной проверки.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, назначают координаты подпоследовательности, при необходимости, и назначают параметры алгоритма программы сравнения последовательностей. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательностей для тестируемой последовательности(последовательностей), относительно эталонной последовательности, на основании назначенных параметров программы.



Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, посредством алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), посредством алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана и Вунша, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), посредством способа поиска сходства Пирсона и Липмана, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), посредством компьютеризированных осуществлений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или посредством визуальной проверки (см., в общем, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, пригодных для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является публично доступным через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) посредством идентификации коротких слов длиной  $W$  в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю  $T$  при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных.  $T$  обозначает пороговую оценку сходства соседних слов (Altschul et al, выше). Эти исходные попадания в соседнее слово действуют в качестве затравок для инициации поисков с целью найти более длинные HSP, содержащие их. Попадания в слова затем расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности, пока кумулятивный показатель выравнивания может увеличиваться.

Кумулятивные показатели рассчитывают с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров  $M$  (показатель вознаграждения за пару совпадающих остатков; всегда  $>0$ ) и  $N$  (показатель штрафа за несовпадающие остатки; всегда  $<0$ ). Для аминокислотных последовательностей, оценочную матрицу используют для расчета кумулятивного показателя. Расширение попадания в слова в каждом направлении прекращают, когда: кумулятивный показатель выравнивания уменьшается на значение  $X$  от его максимально достигнутого значения; кумулятивный показатель стремится к нулю или ниже, из-за накопления одного или нескольких отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или достигнут конец какой-либо из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST  $W$ ,  $T$  и  $X$  определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используют по умолчанию длину слова ( $W$ ) 11, ожидание ( $E$ ) 10,  $M=5$ ,  $N=-4$  и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP используют по умолчанию длину слова ( $W$ ) 3 и ожидание ( $E$ ) 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

В дополнение к расчету процента идентичности последовательностей, алгоритм BLAST осуществляет также статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Одним из измерений сходства, предоставленных алгоритмом BLAST, является наименьшая сумма вероятностей ( $P(N)$ ), которая указывает на вероятность, с которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей может происходить случайно. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая сумма вероятностей при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее приблизительно 0,1, более предпочтительно, менее приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно, менее приблизительно 0,001.

Дополнительным указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты или два полипептида являются в основном идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, обладает иммунологической перекрестной реакционной способностью по отношению к антителам, образованным против полипептида, закодированного второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является в основном идентичным второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются в основном идентичными, является то, что эти две молекулы гибридизуются друг с другом в строгих условиях.

#### Антитела

Изобретение, в общем, относится к выделенным антителам против DLL3, антителам против CD47, биспецифическим антителам против CD47/DLL3, нуклеиновым кислотам и экспрессирующим векторам, кодирующим антитела, к рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и к композициям, содержащим антитела. Изобретение также относится к способам получения антител и способам применения антител для лечения заболеваний, включая злокачественную опухоль. Антитела по изобретению обладают одним или несколькими желательными функциональными свойствами, включая, но без ограничения, высоко аффинное связывание с DLL3 и/или CD47, высокую специфичность для DLL3 и/или CD47, способность индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли, способность стимулиро-

вать комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимый фагоцитоз (ADPC) и/или антителозависимую опосредованную клетками цитотоксичность (ADCC) против клеток, экспрессирующих DLL3 и/или CD47, способность опосредовать привлечение конъюгированных лекарственных средств, способность формировать биспецифическое антитело с другим mAb или антигенсвязывающим фрагментом с эффектом уничтожения злокачественных опухолей, и способность ингибировать рост опухоли у субъектов и в моделях на животных при введении отдельно или в комбинации с другими видами противораковой терапии.

В общем аспекте изобретение относится к выделенным моноклональным антителам против DLL3 или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают DLL3.

В рамках изобретения, термин "антитело" используют в широком смысле, и он включает молекулы иммуноглобулина или антитела, включая человеческие, гуманизированные, композитные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Как правило, антитела представляют собой белковые или пептидные цепи, имеющие специфичность связывания для специфического антигена. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины можно приписать к пяти главным классам (т.е., IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG далее подклассифицируют как изоотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут принадлежать к любому из пяти главных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно, антитела по изобретению представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител из видов позвоночных можно приписать к одному из двух явно отличающихся типов, а именно каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи из крысиных или человеческих антител. В дополнение к тяжелым и легким константным доменам, антитела содержат антигенсвязывающую область, состоящую из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е., определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Домены вариабельной области легкой цепи, альтернативно обозначены как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и домены вариабельной области тяжелой цепи альтернативно обозначены как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

В рамках изобретения термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое является в основном свободным от других антител, имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное антитело, которое специфически связывает DLL3, является в основном свободным от антител, которые не связывают DLL3, выделенное антитело, которое специфически связывает CD47, является в основном свободным от антител, которые не связывают CD47, биспецифическое антитело, которое специфически связывает CD47 и DLL3, является в основном свободным от антител, которые не связывают CD47 и DLL3). Кроме того, выделенное антитело является в основном свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

В рамках изобретения термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е., индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению можно получать посредством способа гибридомы, технологии фагового дисплея, технологии клонирования генов из отдельных лимфоцитов или способов рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела можно получать посредством гибридомы, включающей В-клетку, полученную из трансгенного не относящегося к человеку животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий человеческий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

В рамках изобретения термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, например, такому как диатело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидным мостиком фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидным мостиком диатело (ds диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или несколько CDR, камелизированное однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело, или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент является способным связываться с тем же самым антигеном, с которым связывается исходное антитело или фрагмент исходного антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, константную область легкой цепи и фрагмент Fd тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

В рамках изобретения, термин "одноцепочечное антитело" относится к общепринятому в данной области одноцепочечному антителу, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом из от приблизительно 15 до приблизи-

тельно 20 аминокислот. В рамках изобретения термин "однодоменное антитело" относится к общепринятому в данной области однодоменному антителу, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, или которое содержит только вариабельную область тяжелой цепи.

В рамках изобретения термин "человеческое антитело" относится к антителу, продуцируемому человеком, или к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с использованием любого способа, известного в данной области. Это определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид человеческой тяжелой и/или легкой цепи.

В рамках изобретения термин "гуманизованное антитело" относится к не относящемуся к человеку антителу, модифицированному для увеличения гомологии последовательности с последовательностью человеческого антитела, таким образом, чтобы антигенсвязывающие свойства антитела сохранились, но его антигенность в организме человека уменьшалась.

В рамках изобретения термин "химерное антитело" относится к антителу, где аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит из двух или более видов. Вариабельная область как легкой, так и тяжелой цепей, часто соответствует вариабельной области антитела, происходящего из одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т.д.), имеющего желательную специфичность, аффинность и емкость, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, происходящим из другого вида животного (например, человека), чтобы исключить вызов иммунного ответа у этого вида.

В рамках изобретения термин "мультиспецифическое антитело" относится к антителу, содержащему множество последовательностей вариабельного домена иммуноглобулина, где последовательность первого вариабельного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность второго вариабельного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или в основном перекрываются. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются или в основном не перекрываются. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, на различных белках (или на различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый вариабельный домен иммуноглобулина. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела или молекулу тетраспецифического антитела.

В рамках изобретения, термин "биспецифическое антитело" относится к мультиспецифическому антителу, связывающему не более двух эпитопов или двух антигенов. Биспецифическое антитело характеризуется последовательностью первого вариабельного домена иммуноглобулина, имеющего специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательностью второго вариабельного домена иммуноглобулина, имеющего специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или в основном перекрываются. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, на различных белках (или на различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит полуантитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и полуантитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый эпитоп локализован на DLL3, и второй эпитоп локализован на PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3, CD73, апелине, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD3, CD19, CD20, CD33, CD47, TIP-1, CLDN18,2, FOLR1 и/или других опухолеассоциированных иммуносупрессорах или поверхностных антигенах.

В рамках изобретения термин "DLL3" относится к дельта-подобному каноническому лиганду 3 Notch (DLL3), также известному как дельта-подобный 3 или дельта-подобный белок 3, необходимому для сегментации сомитов в ходе ранних стадий развития (Dunwoodie et al., Development 129:1795-806 (2002)). В отличие от лигандов DLL1, DLL4, JAG1 и JAG2 семейства лигандов Notch млекопитающих, которые все активируют передачу сигналов рецептора Notch в транс (Ntziachristos et al., Cancer Cell

25(3):318-34 (2014)), DLL3 преимущественно локализован в аппарате Гольджи и является неспособным активировать передачу сигналов Notch (Chapman et al., Hum Mol Genet 2011;20(5):905-16 и Geffers et al., J Cell Biol 178(3):465-76 (2007)). В ходе нормального развития, DLL3 ингибирует как цис-, так и трансдействующую активацию пути Notch посредством взаимодействия с Notch и DLL1 (Chapman et al., Hum Mol Genet 20(5):905-16 (2011)). DLL3 в норме либо отсутствует, либо присутствует на очень низких уровнях в нормальных тканях взрослого, за исключением головного мозга, но сверхэкспрессирован в образцах рака легкого, рака яичка, глиомы и меланомы (Uhlen et al., Science 357(6352):eaan2507 (2017)). Кроме того, DLL3 поддается детекции на поверхности клеток опухолей мелкоклеточного рака легкого (SCLC) и крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC) (Saunders et al., Sci Transl Med 7(302):302gal36 (2015) и Sharma et al., Cancer Res 77(14):3931-3941 (2017)), что делает его потенциальной мишенью моноклональных антител для терапии злокачественных опухолей. Термин "DLL3 человека" относится к DLL3 человеческого происхождения. Иллюстративная аминокислотная последовательность DLL3 человека представлена посредством No. доступа в GenBank NP\_058637.1 (SEQ ID NO: 169).

В рамках изобретения, термин "CD47" относится к трансмембранному рецептору, несколько раз пересекающему мембрану, принадлежащему к суперсемейству иммуноглобулинов, которое, как показано, вовлечено в множество клеточных процессов, включая клеточную миграцию, адгезию и функцию Т-клеток. CD47, также известный как ассоциированный с интегрином белок (IAP), антиген рака яичника (OA3), родственник Rh антигена и MER6, первоначально идентифицирован как антиген опухоли при раке яичника человека, и впоследствии показано, что он экспрессируется на множестве типов опухолей человека, включая как гематологические, так и солидные опухоли. Взаимодействие между CD47 и сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP $\alpha$ ), ингибирующим белком, экспрессированным на макрофагах, предотвращает фагоцитоз экспрессирующих CD47 клеток. CD47, кроме того, экспрессируется на низких уровнях практически на всех незлокачественных клетках. Термин "CD47 человека" относится к CD47 человеческого происхождения. Иллюстративная аминокислотная последовательность CD47 человека представлена посредством No. доступа в GenBank NP\_001768.1.

В рамках изобретения антитело, которое "специфически связывает DLL3", "специфически связывает CD47", или антитело, которое "специфически связывает CD47 и DLL3", относится к антителу, которое связывает DLL3, предпочтительно DLL3 человека; связывает CD47, предпочтительно CD47 человека; или DLL3 и CD47, предпочтительно DLL3 человека и CD47 человека, с  $KD$   $1 \times 10^7$  М или менее, предпочтительно  $1 \times 10^8$  М или менее, более предпочтительно  $5 \times 10^9$  М или менее,  $1 \times 10^9$  М или менее,  $5 \times 10^{10}$  М или менее, или  $1 \times 10^{10}$  М или менее. Термин "KD" относится к константе диссоциации, которая получена из отношения  $Kd$  к  $Ka$  (т.е.,  $Kd/Ka$ ) и выражена как молярная концентрация (М). Значения KD для антитела можно определять с использованием принятых в данной области способов, в свете настоящего описания. Например, KD антитела можно определять с использованием поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы биосенсора, например, системы Biacore®, или с использованием технологии интерферометрии биослоя, например, системы Octet RED96.

Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с антигеном-мишенью.

В соответствии с конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу против DLL3 или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

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

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает DLL3, предпочтительно, DLL3 человека.

В соответствии с конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу против DLL3 или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

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

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

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает DLL3, предпочтительно, DLL3 человека.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу против DLL3 или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную одной из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 или 23, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную одной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 или 24. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 или 23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 или 24 соответственно.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу против DLL3 или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, содержащему:

- a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2;
- b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 4;
- c) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 6;
- d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 8;
- e) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 10;
- f) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 12;
- g) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 14;
- h) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 16;
- i) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 18;
- j) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 20;













166, 167 и 168 соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 24. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 23; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 24.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизованному моноклональному антителу против DLL3 или его антигенсвязывающему фрагменту, где выделенное гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

б) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 170, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 172; или

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

В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого фагоцитоза (ADPC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC), и/или опосредовать привлечение конъюгированных лекарственных средств, и/или формировать биспецифическое антитело с другим mAb или антигенсвязывающим фрагментом с эффектом уничтожения злокачественных опухолей.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу против CD47 или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи гуманизованного моноклонального антитела против CD47 и вариабельную область легкой цепи гуманизованного моноклонального антитела против DLL3, где моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 175, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 171;

б) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 175, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 172;

с) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 175, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 173;

д) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 176, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 171;

е) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 176, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 172;

ф) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 176, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 173;

г) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 177, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 171;

h) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID

NO: 177, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 172;

i) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 177, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 173; или

j) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 177, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 174.

В соответствии с другим конкретным аспектом, выделенное моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным блокировать связывание CD47 с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP $\alpha$ ).

В соответствии с другим конкретным аспектом выделенное моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз клеток злокачественных опухолей.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизованному биспецифическому антителу против CD47/DLL3 или антигенсвязывающему фрагменту, содержащему первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно DLL3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 178, 179 и 180; второй антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 181, 182 и 183; и каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 184, 185 и 186.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизованному биспецифическому антителу против CD47/DLL3 или антигенсвязывающему фрагменту, содержащему первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно DLL3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 187, 188 и 189; второй антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 190, 191 и 192; и каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 193, 194 и 195.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизованному биспецифическому антителу против CD47/DLL3 или антигенсвязывающему фрагменту, содержащему первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно DLL3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 176, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 172; и где второй антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 170, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно на 90%, более предпочтительно на 95% или более, например на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 172.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизованному биспецифическому антителу против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно DLL3 человека, где гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным блокировать связывание CD47 с SIRP $\alpha$  на клетках злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизованному биспецифическому антителу против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно

CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно DLL3 человека, где гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47.

В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному гуманизованному биспецифическому антителу против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно DLL3 человека, где гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным связывать клетки злокачественных опухолей, экспрессирующие как DLL3, так и CD47, со связыванием с эритроцитами (RBC) человека от минимального до не поддающегося детекции.

В другом общем аспекте изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, или гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Специалисту в данной области понятно, что кодирующую последовательность белка можно изменять (например, заменять, делетировать, вставлять и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалисту в данной области понятно, что последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, или гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалисту в данной области в свете настоящего описания, такой как плаزمид, космид, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой рекомбинантный экспрессирующий вектор, такой как плазмид. Вектор может включать любой элемент для осуществления общепринятой функции экспрессирующего вектора, например, промотор, элемент для связывания рибосомы, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. Ряд экспрессирующих векторов, способных к доставке нуклеиновых кислот в клетку, известны в данной области и могут быть использованы в настоящем описании для продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке. Общепринятые способы клонирования или искусственный синтез генов можно использовать для получения рекомбинантного экспрессирующего вектора в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Такие способы хорошо известны специалисту в данной области в свете настоящего описания.

В другом общем аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, или гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любую клетку-хозяина, известную специалисту в данной области в свете настоящего описания, можно использовать для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TGI или BL21 (для экспрессии, например, scFv или Fab антитела), клетки CHO-DG44 или CHO-K1, или HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG). В соответствии с конкретными вариантами осуществления рекомбинантным экспрессирующим вектором трансформируют клетки-хозяева общепринятыми способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрирует в геном клетки-хозяина, таким образом, чтобы рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессировалась.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения моноклонального антитела против DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, моноклонального антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, или гуманизованного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры клеток (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми способами, известными в данной области, и как описано в настоящем описании.

Фармацевтические композиции другом общем аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязыва-

вающий фрагмент, выделенное моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, или выделенное гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтическая композиция", в рамках изобретения, обозначает продукт, содержащий антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по изобретению и содержащие их композиции также можно использовать в изготовлении лекарственного средства для терапевтических применений, упомянутых в настоящем описании.

В рамках изобретения термин "носитель" относится к любому расширителю, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, содержащей липид везикуле, микросфере, липосомной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области для использования в фармацевтических составах. Понятно, что характеристики носителя, наполнителя или разбавителя могут зависеть от способа введения для конкретного применения. В рамках изобретения термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не создает помех для эффективности композиции по изобретению или для биологической активности композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления в свете настоящего описания, любой фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для использования в фармацевтической композиции антитела, можно использовать по изобретению.

Получение состава фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известно в данной области, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21st edition (2005), и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, регулирующие тоничность средства, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или несколько фармацевтически приемлемых носителей можно использовать в составлении фармацевтических композиций по изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е., состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т.п. Водный состав, как правило, содержит по меньшей мере 50% мас./мас. воды или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или по меньшей мере 95% мас./мас. воды.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию можно составлять в инъекционной форме, которую можно вводить, например, посредством устройства для инъекции (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекцию можно вводить, например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, в стекловидное тело или внутривенно.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть, или в которую терапевт или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед использованием. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки, и/или покрытые таблетки, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция может также находиться в форме, например, саше, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для разведения.

Лекарственные формы могут иметь немедленное высвобождение, в этом случае, они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель или они могут иметь отсроченное высвобождение, замедленное высвобождение или модифицированное высвобождение, в этом случае, они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно доставлять интраназально, интрабуккально или подязычно.

pH в водном составе может составлять между pH 3 и pH 10. В одном варианте осуществления изобретения pH состава составляет от приблизительно 7,0 до приблизительно 9,5. В другом варианте осуществления изобретения pH состава составляет от приблизительно 3,0 до приблизительно 7,0.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит буфер. Неограничивающие примеры буферов включают аргинин, аспарагиновую кислоту, бигин, цитрат, гидрофосфат натрия, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, виннокаменную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)аминометан, и их смеси. Буфер может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг/мл, например от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных буферов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант. Неограничивающие примеры консервантов включают хлорид бензэтония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксibenзоат, имидомочевину, метил-4-гидроксibenзоат,

фенол, 2-феноксизтанол, 2-фенилэтанол, пропил-4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомеросал и их смеси. Консервант может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг/мл, например от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных консервантов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит изотоническое средство. Неограничивающие примеры изотонических средств включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиол пропиленгликоль), 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, PEG400) и их смеси. Другой пример изотонического средства включает сахар. Неограничивающие примеры сахаров могут представлять собой моно-, ди- или полисахариды, или водорастворимые глюкоаны, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа и бета-HPCD, растворимый крахмал, гидроксизетилкрахмал и карбоксиметилцеллюлозу натрия. Другим примером изотонического средства является сахарный спирт, где термин "сахарный спирт" определяют как C(4-8)углеводород, имеющий по меньшей мере одну -ОН-группу. Неограничивающие примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозитол, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Фармацевтические композиции, содержащие каждое изотоническое средство, перечисленное в этом абзаце, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения. Изотоническое средство может быть представлено индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг/мл, например от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных изотонических средств, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит хелатирующий агент. Неограничивающие примеры хелатирующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатирующий агент может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг/мл, например от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных хелатирующих агентов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Неограничивающие примеры стабилизаторов включают один или несколько ингибиторов агрегации, один или несколько ингибиторов окисления, одно или несколько поверхностно-активных веществ, и/или один или несколько ингибиторов протеаз.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой карбокси-/гидроксицеллюлозу и ее производные (такие как HPC, HPC-SL, HPC-L и HPMS), циклодекстрины, 2-метилтиозанол, полиэтиленгликоль (такие как PEG 3350), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), содержащие серу вещества, такие как моноглицерин) или тиогликолевая кислота. Стабилизатор может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг/мл, например от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В следующих вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит одно или несколько поверхностно-активных веществ, предпочтительно, поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два различных поверхностно-активных вещества. Термин "поверхностно-активное вещество" относится к любым молекулам или ионам, состоящим из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может, например, быть выбрано из группы, состоящей из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может быть представлено индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В следующем варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит один или несколько ингибиторов протеаз, например, таких как ЭДТА и/или соль бензамидина и соляной кислоты (HCl). Ингибитор протеазы может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных ингибиторов протеаз, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, моно-

клональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, или гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

#### Способы применения

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу нацеливания на DLL3 на поверхности клеток злокачественных опухолей у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту выделенного моноклонального антитела против DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего DLL3, или фармацевтической композиции по изобретению. Связывание моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с DLL3 может опосредовать комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимый фагоцитоз (ADPC) и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), или другие эффекты, приводящие к гибели подвергаемой нацеливанию клетки злокачественной опухоли. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, служить для привлечения конъюгированных лекарственных средств, и/или может формировать биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, чтобы опосредовать гибель подвергаемой нацеливанию клетки злокачественной опухоли.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу блокирования связывания CD47 с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP $\alpha$ ) у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту моноклонального антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу индукции опосредованного макрофагами фагоцитоза клеток злокачественных опухолей у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту моноклонального антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу нацеливания на DLL3 и CD47 на поверхности клеток злокачественных опухолей у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту гуманизированного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно, CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно, DLL3 человека, или фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу блокирования связывания CD47 с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP $\alpha$ ) на клетках злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту выделенного гуманизированного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно, CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно DLL3 человека, или фармацевтической композиции по изобретению. Связывание гуманизированного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента с клетками злокачественных опухолей может опосредовать блокирование связывания CD47 с SIRP $\alpha$ .

В другом общем аспекте изобретение относится к способу индукции опосредованного макрофагами фагоцитоза клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту выделенного гуманизированного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно, CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно, DLL3 человека, или фармацевтической композиции по изобретению. Связывание гуманизированного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или антигенсвязывающего фрагмента с клетками злокачественных опухолей может индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз клеток злокачественных опухолей.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу связывания клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47, со связыванием с эритроцитами (RBC) человека от минимального до не поддающегося детекции, у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту выделенного гуманизированного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно DLL3 человека, или фармацевтической композиции по изобретению.

Гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий



фрагмент по изобретению имеет высокую избирательность для клеток злокачественных опухолей, со связыванием с эритроцитами (RBC) человека от минимального до не поддающегося детекции.

Функциональную активность антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих DLL3 или CD47, или биспецифических антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих DLL3 и CD47, можно характеризовать посредством способов, известных в данной области, и как описано в настоящем описании. Способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих DLL3 или CD47, или биспецифических антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих DLL3 и CD47, включают, но без ограничения, анализы аффинности и специфичности, включая анализы Biacore, ELISA, FACS и OctetRed. В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих DLL3 или CD47, или биспецифических антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих DLL3 и CD47, включают способы, описанные ниже.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту выделенного моноклонального антитела против DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, выделенного моноклонального антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, или выделенного гуманизированного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции по изобретению. Злокачественная опухоль может, например, быть выбрана, но без ограничения, из рака легкого, такого как мелкоклеточный рак легкого (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжскинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество моноклонального антитела против DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, моноклонального антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, или гуманизированного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. В рамках изобретения термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, вызывающему желательный биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество можно определять эмпирически и общепринятым образом, применительно к поставленной цели.

В рамках изобретения применительно к антителам против DLL3 или их антигенсвязывающим фрагментам, антителам против CD47 или их антигенсвязывающим фрагментам, или биспецифическим антителам против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающим фрагментам, терапевтически эффективное количество обозначает количество антитела против DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, модулирующее иммунный ответ у нуждающегося в этом субъекта. Также в рамках изобретения, применительно к антителам против DLL3 или их антигенсвязывающим фрагментам, антителу против CD47 или его антигенсвязывающему фрагменту, или биспецифическим антителам против CD47/DLL3 или их антигенсвязывающим фрагментам, терапевтически эффективное количество обозначает количество антитела против DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, нарушения или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, нарушения или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, ассоциированные с заболеванием, нарушением или состоянием.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой злокачественную опухоль, предпочтительно, злокачественную опухоль, выбранную из группы, состоящей из рака легкого, такого как мелкоклеточный рак легкого (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжскинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, терапевтически эффективное количество относится к количеству лекарственного средства, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести

заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (ii) уменьшение длительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iii) предотвращение прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iv) вызов регрессии заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (v) предотвращение развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vi) предотвращение рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vii) уменьшение случаев госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (viii) уменьшение длительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (ix) увеличение выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, или ассоциированным с ним симптомом; (xi) ингибирование или уменьшение заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(эффектов) другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозу можно менять, в соответствии с различными факторами, такими как заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, способы введения, участок-мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, массу тела, общее состояние здоровья), является ли субъект человеком или животным, другие вводимые лекарственные средства, и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозы для лечения оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиции, описанные в настоящем описании, составляют, чтобы они являлись пригодными для намеченного способа введения субъекту. Например, композиции, описанные в настоящем описании, можно составлять, чтобы они являлись пригодными для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

В рамках изобретения термины "лечить", "лечение" и "обработка" все предназначены для обозначения облегчения или обращения по меньшей мере одного поддающегося измерению физического параметра, относящегося к злокачественной опухоли, который, необязательно, является различимым у субъекта, но может являться различимым у субъекта. Термины "лечить", "лечение" и "обработка", могут также относиться к вызову регрессии, предотвращению прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к облегчению, предотвращению развития или начала, или уменьшению длительности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно, злокачественная опухоль. В конкретном варианте осуществления "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к предотвращению заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к увеличению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние. В конкретном варианте осуществления "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к прекращению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления композицию используют для лечения злокачественной опухоли. Для терапии злокачественной опухоли, ее можно использовать в комбинации с другим лечением, включая, но без ограничения, химиотерапию, mAb против TIM-3, mAb против LAG-3, mAb против CD73, mAb против апелина, антитело против CTLA-4, mAb против EGFR, mAb против HER-2, mAb против CD19, mAb против CD20, mAb против CD33, mAb против CD47, mAb против TIG-1, mAb против CLDN18.2, mAb против FOLR1, антитело против PD-L1, антитело против PD-1, терапию PD-1/PD-L1, другие иммуноонкологические лекарственные средства, антиангиогенное средство, радиотерапию, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), направленную терапию или другие противораковые лекарственные средства.

В рамках изобретения термин "в комбинации", в контексте введения двух или более терапевтических средств субъекту, относится к использованию более одного терапевтического средства. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором терапевтические средства вводят субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, композицию, описанную в настоящем описании) можно вводить до (например, за 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель до), одновременно или после (например, через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель после) введения второго терапевтического средства субъекту.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу определения уровня DLL3 у субъекта. Способы включают: (a) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с моноклональным антителом против DLL3 или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению и (c) определение уровня DLL3 у субъекта.

В рамках изобретения "образец" относится к биологическому образцу, выделенному от субъекта, и

может включать, но без ограничения, цельную кровь, сыворотку, плазму, клетки крови, эндотелиальные клетки, биоптаты ткани (например, ткани злокачественной опухоли), лимфатическую жидкость, асцитную жидкость, интерстициальную жидкость, костный мозг, спинномозговую жидкость, слюну, слезы, мокроту, пот, мочу или любой другой продукт секреции, экскреции, или другие физиологические жидкости. "Образец крови" относится к цельной крови или любой ее фракции, включая клетки крови, сыворотку и плазму.

В конкретных вариантах осуществления уровень DLL3 у субъекта можно определять с использованием анализов, выбранных, но без ограничения, из анализа Вестерн-блоттинга, анализа ELISA и/или анализа иммуногистохимии (ИНС). Относительные уровни белка можно определять с использованием анализа Вестерн-блоттинга и ИНС, и абсолютные уровни белка можно определять с использованием анализа ELISA. При определении относительных уровней DLL3 уровни DLL3 можно определять в сравнении между по меньшей мере двумя образцами, например, между образцами от одного и того же субъекта в различных временных точках, между образцами из различных тканей одного и того же субъекта и/или между образцами от различных субъектов. Альтернативно, при определении абсолютных уровней DLL3, например, посредством анализа ELISA, абсолютный уровень DLL3 в образце можно определять посредством получения стандарта для анализа ELISA до тестирования образца. Специалисту в данной области понятно, какие аналитические способы использовать для определения уровня DLL3 в образце от субъекта с использованием антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

Использование способов определения уровня DLL3 в образце от субъекта может приводить к диагностике аномальных (увеличенных, уменьшенных или недостаточных) уровней DLL3 при заболевании и к принятию соответствующих терапевтических решений. Такое заболевание может представлять собой, но без ограничения, злокачественную опухоль. Кроме того, посредством мониторинга уровней DLL3 у субъекта, риск развития заболевания, как указано выше, можно определять на основании знаний об уровне DLL3 при конкретном заболевании и/или в ходе прогрессирования конкретного заболевания.

#### **Варианты осуществления**

Изобретение относится также к следующим неограничивающим вариантам осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарную область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

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

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает DLL3, предпочтительно специфически связывает DLL3 человека.

Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарную область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

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

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает DLL3, предпочтительно специфически связывает DLL3 человека.



Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-7, где моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли.

Вариант осуществления 9 представляет собой выделенное моноклональное антитело против CD47 или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область гуманизированной тяжелой цепи моноклонального антитела против CD47 и переменную область гуманизированной легкой цепи моноклонального антитела против DLL3, где моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 175, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 171;

b) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 175, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 172;

c) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 175, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 173;

d) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 176, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 171;

e) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 176, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 172;

f) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 176, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 173;

g) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 177, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 171;

h) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 177, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 172;

i) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 177, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 173; или

j) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 177, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 174.

Вариант осуществления 10 представляет собой выделенное моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент из варианта осуществления 9, где моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным блокировать связывание CD47 с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP $\alpha$ ).

Вариант осуществления 11 представляет собой выделенное моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент из варианта осуществления 9, где моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз клеток злокачественных опухолей.

Вариант осуществления 12 представляет собой выделенное гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно DLL3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 178, 179 и 180; второй антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 181, 182 и 183; и каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена содержит определяющую комплементарную область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 184, 185 и 186.

Вариант осуществления 13 представляет собой выделенное гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, предпочтительно CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, предпочтительно DLL3 человека, где первый

антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 187, 188 и 189; второй антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 190, 191 и 192; и каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 193, 194 и 195.

Вариант осуществления 14 представляет собой выделенное гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из варианта осуществления 12 или 13, где первый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 176, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 172; и где второй антигенсвязывающий домен содержит полипептидную последовательность переменной области тяжелой цепи, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 170, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 172.

Вариант осуществления 15 представляет собой выделенное гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 12-14, где гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным блокировать связывание CD47 с SIRP $\alpha$  на клетках злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47.

Вариант осуществления 16 представляет собой выделенное гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 12-14, где гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47.

Вариант осуществления 17 представляет собой выделенное гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 12-14, где гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным связывать клетки злокачественных опухолей, экспрессирующие как DLL3, так и CD47, со связыванием с эритроцитами (RBC) человека от минимального до не поддающегося детекции.

Вариант осуществления 18 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, или гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-17.

Вариант осуществления 19 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту из варианта осуществления 18.

Вариант осуществления 20 представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор из варианта осуществления 19.

Вариант осуществления 21 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, или гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-17 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 22 представляет собой способ нацеливания на DLL3 на поверхности клеток злокачественных опухолей у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-8.

Вариант осуществления 23 представляет собой способ блокирования связывания CD47 с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP $\alpha$ ) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 9-11.

Вариант осуществления 24 представляет собой способ индукции опосредованного макрофагами фагоцитоза клеток злокачественных опухолей у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 9-11.

Вариант осуществления 25 представляет собой способ нацеливания на DLL3 и CD47, которые оба экспрессированы на поверхности клеток злокачественных опухолей, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей вы-

деленное гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 12-17.

Вариант осуществления 26 представляет собой способ блокирования связывания CD47 с SIRP $\alpha$  на клетках злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 12-17.

Вариант осуществления 27 представляет собой способ индукции опосредованного макрофагами фагоцитоза клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 12-17.

Вариант осуществления 28 представляет собой способ связывания клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47, со связыванием с эритроцитами (RBC) человека от минимального до не подающегося детекции, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 12-17.

Вариант осуществления 29 представляет собой способ лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции из варианта осуществления 21.

Вариант осуществления 30 представляет собой способ из варианта осуществления 29, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легкого, такого как мелкоклеточный рак легкого (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

Вариант осуществления 31 представляет собой способ получения моноклонального антитела против DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, моноклонального антитела против CD47 или его антигенсвязывающего фрагмента, или гуманизованного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента из любого из вариантов осуществления 1-17, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Вариант осуществления 32 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, моноклональное антитело против CD47 или его антигенсвязывающий фрагмент, или гуманизованное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-17, включающий объединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Вариант осуществления 33 представляет собой способ определения уровня DLL3 у субъекта, включающий:

- a) получение образца от субъекта;
- b) приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом против DLL3 или его антигенсвязывающим фрагментом из любого из вариантов осуществления 1-8 и
- c) определение уровня DLL3 у субъекта.

Вариант осуществления 34 представляет собой способ из варианта осуществления 33, где образец представляет собой образец ткани.

Вариант осуществления 35 представляет собой способ из варианта осуществления 34, где образец ткани представляет собой образец ткани злокачественной опухоли.

Вариант осуществления 36 представляет собой способ из варианта осуществления 33, где образец представляет собой образец крови.

### Примеры

Пример 1. Идентификация моноклональных антител против DLL3

Мышей иммунизировали рекомбинантным FLAG-huDLL3 (Adipogen, кат.#: AG40B-0151), слитым белком из внеклеточного домена (ECD) DLL3 человека с меткой FLAG на N-конце. Титр в плазме определяли посредством ELIS. После эвтаназии селезенки и лимфатические узлы собирали для получения гибридом. Гибридомы выращивали в 384-луночных культуральных планшетах и супернатанты из индивидуальных лунок подвергали скринингу посредством ELISA с использованием FLAG-huDLL3, FACS с

использованием стабильных пулов HEK293-huDLL3 и HEK293-cyDLL3, и анализу скорости диссоциации Octet с использованием FLAG-huDLL3. Наилучшие положительные клоны выделяли и секвенировали.

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи для моноклональных антител против DLL3 представлены в табл. 1 и 2, и области CDR для моноклональных антител против DLL3 представлены в табл. 3-6.

Таблица 1. Последовательности переменных областей тяжелой цепи для mAb против DLL3

Клоны mAb	VH	SEQ ID NO:
13P9A	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGGPDWIGYINPYNDATKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGGYDYDGDYWGQGTTLTVSS	1
5A16A	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYILHWVVKLPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSRLLTSYDSAVYYCARDSSGYGGAYAMDFWQGTSTVTVSS	3
14L22A	EVQLVESGGGLVVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVAAINSNGGNTYYPDTVKDRFTISRDNKNTLYLQMSLRSEDTALYYCARHRGGFYAVDYWGQGTSTVTVSS	5
10P18A	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTFTGYYIDWVKQSPGKSLWIGYIYPSNGETSYNQKFKGKATLTVDKSSSTVNMQLNSLTSEDSAVYYCARESYAMDYWGQGTSTVTVSS	7
13P11A	DVQLQESGPELVKPSQTVSLTCTVTGYSITNGNHWWSWIRQVSGSKLEWIMGYISSSGSDSNPSLKSRISTRDTSKNQLFLHLNSVTTEDIATYYCATTGTWGYFDYWGQGTTLTVSS	9
3C16A	EVQLQQSGPELVKPGTAVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVYIPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARPSNWDEFDYGQGTTLTVSS	11
3I21A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIHPSDSETHYNQKFKTKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCARYDGYFAYWGQGTTLTVSA	13
8H5A	QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTFGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWDDDDKYYPALKSRLTISKDTSKNQVFLKIANVADIADTATYYCARTYDYDEYFDYWGQGTTLTVSS	15
15K2A	QVQLQQPGAELVQPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWMKQRPGRGLEWIGRIHPSDSETHYNQKFKTKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAREDDYGYWYFDVWGAGTTVTVSS	17
5A24A	EVQLQQSGAELVKPGASVKIPCKASGYKFTDFNMDWVKQSHGKSLWIGDINPNSGGTIYNQKFKGKATLTVDKLSLSTAYMELGSLTSEDTAVYYCARWDYGNFAYWGQGTTLTVSA	19
15P17A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIHPSDSETHYNQKFKSKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAREDDYGYWYFDVWGAGTTVTVSS	21
15N21A	EVQLVESGGGLVVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVAAINSNGGRNYYPDTVKDRFTISRDNKNTLYLQMSLRSEDTALYYCARHRGGYAYAMDYWGQGTSTVTVSS	23

VH: переменная область тяжелой цепи

Таблица 2. Последовательности переменных областей легкой цепи для mAb против DLL3

Клоны mAb	VL	SEQ ID NO:
13P9A	DIQMNQSPSSLSASLGDSITITCHASQININWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFRSGSGSGTGFLLTSSSLQPEDIATYYCQQGQSYPFYFGSGTKLEIK	2
5A16A	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQGRSPQLLVYNAKTLPGVPSRFRSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYCYCHFWTTPWTFGGGTKLEIK	4
14L22A	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFLLTSSVQAEDLAVYYCHQYLSRRTFGGGTKLEIK	6
10P18A	DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPK8	8



	LLIYLASNLESGVPARFSGSGSDFTLNIHPVEEDAATYYCQHSRELP YTFGGGKLEIK	
13P11A	NIVMTQSPKSMSSVGERVTLSCASENVGTYSVWYQKPEQSPKLLI YGASNRFTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCGQSYSPFT FGSGTKLEIK	10
3C16A	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWYQKPGQSPKALI YLASNRTGVPDRFTGSGSDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPL TFGAGTKLEIK	12
3I21A	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTTITCKASDHINNLAWYQKPGNAPRLLIS GATSLETGDPSPRFSFGSGGKDYTLISITLQIEDVATYYCQYWSIPFTFG AGTKLEIK	14
8H5A	DIVMTQAAAFSNPVTLGTSASISCRSSKLLHSNGITYFYWYLQKPGQSPQ LLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSDFTLRISRVEAEDVGVVYCAQNLEL PFTFGSGTKLEIK	16
15K2A	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDIYGNFSFMHWYQKPGQPPK LLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNE PWTFGGGTKLEIK	18
5A24A	DIVMTQAAAFSNPVTLGTSASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQKPGQSP QLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSDFTLRISRVEAEDVGVVYCAQNLE LPLTFGAGTKLEIK	20
15P17A	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNFSFMHWYQKPGQPPK LLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNHED PWTFGGGTKLEIK	22
15N21A	DIVMSQSPSSLAHSVGEKVTMSCKSSQLLYSSNQKNYLAWYQKPGQ SPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSDFTLTISVKAEDLAVVYCQY YTYLTFGAGTKLEIK	24

VL: вариабельная область легкой цепи

Таблица 3. Области CDR 1-3 тяжелой цепи для mAb против DLL3

Клоны mAb	HC CDR1	SEQ NO:	ID	HC CDR2	SEQ NO:	ID	HC CDR3	SEQ NO:	ID
13P9A	GYTFTSYV	25		INPYNDA T	26		ARGGYDYDGDY	27	
5A16A	GYTFTRYI	28		INPYNDG T	29		ARDSSGYGGAYA MDF	30	
14L22A	GFTFSSYA	31		INSNGGN T	32		ARHRGGFYAVD Y	33	
10P18A	GYSFTGY	34		IYPSNGET	35		ARESYAMDY	36	
13P11A	GYSITNGNH W	37		ISSSGST	38		ATTGTWGYFDY	39	
3C16A	GYTFTSYV	40		VIPYNDG T	41		ARPSNWDEFDY	42	
3I21A	GYTFTNYW	43		IHPDSET	44		ARYDGYFAY	45	
8H5A	GFSLSTFGM G	46		IWWDDD K	47		ARTYDYDEYFDY	48	
15K2A	GYTFTSYW	49		IHPDSET	50		AREGGYWFYFDV	51	
5A24A	GKFTDFN	52		INPNSGG T	53		ARWDYGNFAY	54	
15P17A	GYTFTNYW	55		IHPDSET	56		AREGGYWFYFDV	57	
15N21A	GFTFSSYA	58		INSNGGR N	59		ARHRGGYYYAMD Y	60	

HC: тяжелая цепь; CDR: определяющая комплементарность область HC CDR для mAb против DLL3 определяли с использованием способа IMGIT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 4. Области CDR 1-3 легкой цепи для mAb против DLL3

Клоны mAb	LC CDR1	SEQ NO:	ID	LC CDR2	SEQ NO:	ID	LC CDR3	SEQ NO:	ID
13P9A	QNINWV	61		KAS	62		QQGQSYPT	63	
5A16A	GNIHNY	64		NAK	65		QHFWTTPWT	66	
14L22A	QSVLYSSNQKN Y	67		WAS	68		HQYLSSRT	69	
10P18A	KSVSTSGYSY	70		LAS	71		QHSRELPYT	72	
13P11A	ENVGTY	73		GAS	74		GQSYSPFT	75	
3C16A	QNVRTA	76		LAS	77		LQHWNYPLT	78	
3I21A	DHINW	79		GAT	80		QYWSIPFT	81	
8H5A	KSLLSNGITY	82		QMS	83		AQNLELPFT	84	
15K2A	ESVDIYGNF	85		LAS	86		QQNNEPWT	87	
5A24A	KSLLSNGITY	88		QMS	89		AQNLELPLT	90	
15P17A	ESVDSYGNF	91		LAS	92		QQNHEDPWT	93	
15N21A	QSLLYSSNQKN Y	94		WAS	95		QYYTYLT	96	

LC: легкая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область LC CDR для mAb против DLL3 определяли с использованием способа IMGIT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 5. Области CDR 1-3 тяжелой цепи для mAb против DLL3

Клоны mAb	HC CDR1	SEQ NO:	ID	HC CDR2	SEQ NO:	ID	HC CDR3	SEQ NO:	ID
13P9A	SYVMH	97		YINPYNDATKYNE KFKG	98		GGDYDGDY	99	
5A16A	RYLH	100		YINPYNDGTYNE KFKG	101		DSSGYGGAYA MDF	102	
14L22A	SYAMS	103		AINSNNGNTYYPD TVKD	104		HRGGFYAVD Y	105	
10P18A	GYIID	106		YIYPSNGETSYNQ KFKG	107		ESYAMDY	108	
13P11A	NGNHW WS	109		YISSSGSTDSNPSL KS	110		TGTWGYFDY	111	
3C16A	SYVMH	112		YVIPYNDGTYNE KFKG	113		PSNWDEFDY	114	
3I21A	NYWMN	115		RIHPSDSETHYNQK FKT	116		YDGYFAY	117	
8H5A	TFGMGV G	118		HIWWDDDKYYNP ALKS	119		TYDYDEYFDY	120	
15K2A	SYWMN	121		RIHPSDSETHYNQK FRT	122		EDGYYWYFDV	123	
5A24A	DFNMD	124		DINPNSGGTIYNQK FKG	125		WDYGNFAY	126	
15P17A	NYWMN	127		RIHPSDSETHYNQK FKS	128		EDGYYWYFDV	129	
15N21A	SYAMS	130		AINSNNGGRNYYPD TVKD	131		HRGGYYAY DY	132	

HC: тяжелая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область HC CDR для mAb против DLL3 определяли с использованием способа Kabat (Elvin A. Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991)).

Таблица 6. Области CDR 1-3 легкой цепи для mAb против DLL3

Клоны mAb	LC CDR1	SEQ NO:	ID	LC CDR2	SEQ NO:	ID	LC CDR3	SEQ NO:	ID
13P9A	HASQNINVWLS	133		KASNLHT	134		QQQSYPFT	135	
5A16A	RASGNIHNYLA	136		NAKTLPY	137		QHFWTTPWT	138	
14L22A	KSSQSVLYSSNQKNYL A	139		WASTRES	140		HQYLSSRT	141	
10P18A	RASKSVSTSGYSYMH	142		LASNLES	143		QHSRELPYT	144	
13P11A	KASENVGTYYVS	145		GASNRFT	146		GQSYYPFT	147	
3C16A	KASQNVRTAVA	148		LASNRHT	149		LQHWNYPLT	150	
3I21A	KASDHINNWLA	151		GATSLET	152		QQYWSIPFT	153	
8H5A	RSSKSLHNSNGITYFY	154		QMSNLAS	155		AQNLELPFT	156	
15K2A	RASESVDIYGNFSFMH	157		LASNLES	158		QQNEDPWT	159	
5A24A	RSSKSLHNSNGITYLY	160		QMSNLAS	161		AQNLELPLT	162	
15P17A	RASESVDSYGNFSFMH	163		LASNLES	164		QQNHEDPWT	165	
15N21A	KSSQSLLYSSNQKNYL A	166		WASTRES	167		QQYYTYLT	168	

LC: легкая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область LC CDR для mAb против DLL3 определяли с использованием способа Kabat (Elvin A. Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991)).

Пример 2. Продукция и очистка химерных mAb из культуральной среды трансфицированных клеток

Для получения рекомбинантных химерных mAb против DLL3, экспрессирующими векторами, содержащими мышинные варибельные области (VH и VL), слитые с константными областями тяжелой цепи IgG1 и легкой цепи каппа человека, соответственно, временно трансфицировали клетки 293E, ExpiCHO-S или Expi293F. Рекомбинантные антитела, продуцированные в суспензии клеток, очищали с использованием аффинной хроматографии с белком А.

Пример 3. Анализ ELISA связывания очищенных химерных антител

FLAG-huDLL3 в карбонатном буфере для покрытия (50 мкл/лунку при 0,25 мкг/мл) покрывали планшет для ELISA в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки планшет для ELISA блокировали посредством 5% BSA в TBST в течение 1 ч при комнатной температуре и снова промывали. Добавляли mAb против DLL3, перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали и связывание mAb против DLL3 с иммобилизованным FLAG-huDLL3 детектировали посредством добавления вторичного антитела, антитела против IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (hIgG-HRP) (ThermoFisher Scientific, кат.#: H10007), в 5% BSA в TBST, инкубации в течение 1 ч и затем промывки планшета. ELISA проявляли с использованием раствора для одностадийной детекции (ThermoFisher Scientific, кат.#: 34028) и измеряли как оптическую плотность при 450 нм. Контроль изотипа IgG1 mAb, который не вступает в перекрестную реакцию с DLL3, использовали в качестве отрицательного контроля для обеспечения специфичности анализа. Результаты связывания для

химерных mAb против DLL3 представлены на фиг. 1A-1C.

#### Пример 4. Анализ FACS химерных mAb против DLL3

Линию клеток HEK293, стабильно экспрессирующих DLL3 человека (HEK-huDLL3), использовали в анализе FACS. Клетки (100000 клеток на лунку в 96-луночной планшете) инкубировали либо с раствором очищенных mAb в различных концентрациях (например, 666,67 нМ, 333,33 нМ или 66,67 нМ), либо с контролем изотипа в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS), содержащем 0,05% азид натрия и 0,1% BSA. С использованием конъюгированного с Alexa Fluor 488 вторичного антитела против IgG человека (ThermoFisher, кат.#: H10120), присутствие mAb на клетках HEK293-huDLL3 измеряли посредством FACS (Attune NxT; ThermoFisher, Carlsbad, CA). Результат анализа связывания для FACS представлены на фиг. 2A-2C.

#### Пример 5. Гуманизация mAb против DLL3

Мышиное антитело против DLL3 13P9A гуманизировали для уменьшения потенциала иммуногенности при использовании у пациентов-людей. Последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей (VH и VL) сравнивали с последовательностями человеческого антитела в базе данных Protein Data Bank (PDB) и строили модели гомологии. CDR как в тяжелых, так и в легких цепях мышиных mAb прививали в человеческие каркасы, имеющие наивысшую возможность поддержания надлежащей структуры, вероятно, необходимой для связывания антигена. Обратные мутации от человеческих остатков до мышиных остатков или другие мутации разрабатывали при необходимости. Последовательности гуманизованных областей VH и VL показаны в табл. 7 и 8. Гуманизованные области VH и VL сливали с константными областями тяжелой цепи IgG4 и легкой цепи каппа человека, соответственно. Антитела очищали из временно трансфицированных клеток 293E и анализировали по их способности связываться с рекомбинантным FLAG-huDLL3 человека на планшете с использованием ELISA. Значения EC<sub>50</sub> для связывания DLL3 гуманизованными mAb представлены в табл. 9.

Таблица 7. Последовательность переменной области гуманизованной тяжелой цепи mAb против DLL3 13P9A

Обозначение	VH	SEQ ID NO:
H1	EVRLSQSGGQMKKPGESMRLSCRASGYTFTSYVMHWVRQAPGRRPE WIGYINPYNDATKYARKFQGRATLTSDKYSDTAFLELRSLTSDDTAVY YCARGGYDYDGDYWGRRGAPVTVSS	170

Таблица 8. Последовательности переменных областей гуманизованной легкой цепи mAb против DLL3 13P9A

Обозначение	VL	SEQ ID NO:
L1	EIVMTQSPGTLSPGERATLSCHASQNINWLSWYQQKPGQAPRLLI YKASNLHTGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQGQSYPT FGQGTKVEIK	171
L2	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCHASQNINWLSWYQQKPGQAPRLLIY KASNLHTGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQGQSYPTF GQGTKVEIK	172
L3	EIVMTQSPATLSLSPGETAIIISCHASQNINWLSWYQQRPGQAPRLLIY KASNLHTGIPDRFSGSGWGTDFNLSISNLESGDFGVYYCQQGQSYPT FGQGTKVEIK	173
L4	EIVMTQSPATLSLSPGETAIIISCHASQNINWLSWYQQRPGQAPRLLIY KASNLHTGIPDRFSGSGWGTDFNLSISNLESGDFGVYYCQQGQSYPT FGQGTKVEIK	174

Таблица 9. Значения EC<sub>50</sub> для связывания DLL3 гуманизованными mAb против DLL3 в анализе ELISA

mAb ID	EC50 (нМ)
H1L1	0,13
H1L2	0,12
H1L3	0,15

H1L1 относится к mAb с переменной областью тяжелой цепи H1 и переменной областью легкой цепи L1; для всех других гуманизованных mAb в таблице принято такое же правило наименования.

Гуманизованное mAb против DLL3 H1L2 анализировали посредством проточной цитометрии по его способности связываться с DLL3 клеточной поверхности. Опубликовано, что клетки SHP-77 экспрессируют DLL3 (Barretina et al., Nature 483(7391):603-7 (2012)) и таким образом, их использовали в анализе. Клетки SHP-77 (ATCC# CRL-2195) (14000 клеток на лунку в 96-луночной планшете) инкубировали либо с раствором очищенного mAb в различных концентрациях, либо с контролем изотипа в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS), содержащем 0,05% азид натрия и 0,1% BSA. С использованием конъюгированного с PE-Cy7 вторичного антитела против IgG человека, присутствие mAb на клетках SHP-77 измеряли посредством FACS (Attune NxT; ThermoFisher, Carlsbad, CA). Результат связывания для FACS представлен на фиг. 3.

Пример 6. Сборка mAb против CD47 с использованием варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb против CD47 и варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb против DLL3

Для оценки того, могут ли варибельные области гуманизированной легкой цепи (VL) mAb против DLL3 из табл. 8 формировать mAb с варибельной областью тяжелой цепи (VH) mAb против CD47 17C6A (описанного в Международной патентной заявке № PCT/US 18/44384), гуманизированные последовательности области VH 17C6A, представленные в табл. 10, использовали для экспрессии антитела. Гуманизированные области VL mAb против DLL3 из табл. 8 и гуманизированные области VH 17C6A из таблицы 10 сливали с константными областями легкой цепи каппа и тяжелой цепи IgG4 человека, соответственно, и mAb экспрессировали в клетках 293E или клетках ExpiCHO-S. Рекомбинантные антитела, продуцированные в суспензии клеток 293E или в культурах ExpiCHO-S, очищали с использованием аффинной хроматографии с белком А.

Очищенные mAb анализировали по их способности связывать внеклеточный домен CD47 (CD47(ECD)) в анализе ELISA следующим образом: CD47 человека (ECD) (AcroBio, кат.#: CD7-HA2E9-50 мкг) в карбонатном буфере для покрытия (50 мкл/лунку при 1 мкг/мл) покрывали 96-луночный планшет для ELISA в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки, планшет блокировали посредством 5% BSA в TBST в течение 1 ч при комнатной температуре и снова промывали. В каждую лунку планшета, добавляли антитело при 50 мкл/лунку в различных концентрациях и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали, и связывание антитела с иммобилизованным CD47 детектировали посредством инкубации с антителом против IgG человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (hIgG-HRP) (ThermoFisher Scientific, кат.#: H10007) в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем, после промывки, ELISA проявляли с использованием раствора для одностадийной детекции (ThermoFisher Scientific, кат.#: 34028) и измеряли как оптическую плотность при 450 нм. Значения EC<sub>50</sub> для связывания показаны в табл. 11. Эти данные показывают, что гуманизированные легкие цепи антитела против DLL3 могут образовывать пары с гуманизированными тяжелыми цепями 17C6A для формирования mAb с сильной аффинностью для CD47.

Таблица 10. Последовательности варибельных областей гуманизированной тяжелой цепи mAb против CD47

Обозначение	VH	SEQ ID NO:
КН1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGNIDPSDSETHYAQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGTDLAYWGQGLTVVSS	175
КН2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGNIDPSDSETHYAQKFQGRVTLTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAGTDLAYWGQGLTVVSS	176
КН3	EVRLSQSGGQMKKPGESMRLSCRASGYTFTSYWMHWVRQAPGRRLEWIGNIDPSDSETHYARKFQGRATLTVDKYSDTAFLELRSLTSDDTAVYYCAGTDLAYWGRGAPVTVSS	177

Таблица 11. Значения EC<sub>50</sub> для связывания CD47 гуманизированными mAb против CD47 в анализе ELISA

mAb ID	EC50 (нМ)
КН1L1	1,17
КН1L2	0,64
КН1L3	0,76
КН2L1	0,19
КН2L2	0,18
КН2L3	0,09
КН3L1	0,09
КН3L2	0,08
КН3L3	0,18
КН3L4	0,08

КН1L1 относится к mAb с варибельной областью тяжелой цепи КН1 и варибельной областью легкой цепи L1; для всех других гуманизированных mAb в таблице принято такое же правило наименования.

Пример 7. Экспрессия и очистка биспецифических антител, несущих общую легкую цепь

Как упомянуто выше, DLL3 поддается детекции на поверхности клеток опухолей мелкоклеточного рака легкого (SCLC) и крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC) (Saunders et al., Sci Transl Med 7(302):302ra136 (2015) и Sharma et al., Cancer Res 77(14):3931-41 (2017)). Кроме того, CD47, опосредующий сигнал "не ешь меня", сверхэкспрессирован во множестве опухолей, таких как SCLC (Weiskopf et al., J Clin Invest 126(7):2610-2620 (2016)). Биспецифическое антитело с одним плечом, связывающим CD47, и другим плечом, связывающим DLL3 (названное биспецифическим антителом против CD47/DLL3), можно использовать для избирательного нацеливания на клетку, экспрессирующую оба антигена. Связывание биспецифического антитела с обоими антигенами на одной и той же клетке может приводить к увеличенной аффинности, по сравнению с любым плечом, благодаря авидности. Ожидают,

что биспецифическое антитело может иметь более слабую активность против клеток, экспрессирующих только CD47 (но не DLL3) из-за отсутствия avidности. Это помогает избегать нацеливания на нормальные клетки, экспрессирующие определенные уровни CD47, биспецифического антитела, и увеличивать его безопасность и/или переносимость. Биспецифическое антитело против CD47/DLL3 может избирательно блокировать взаимодействие CD47/SIRP $\alpha$  на клетке, экспрессирующей как CD47, так и DLL3, и активировать врожденную иммунную систему против этой клетки, такой как клетка злокачественной опухоли. Таким образом, биспецифическое антитело против CD47/DLL3 может представлять собой эффективное терапевтическое средство против SCLC, LCNEC и других опухолей, экспрессирующих значительные уровни как CD47, так и DLL3 на клеточной поверхности.

Сконструировано биспецифическое антитело против CD47 и DLL3 с использованием вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи H1 из табл. 7, вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи KH2 из табл. 10 и вариабельной области гуманизированной легкой цепи L2 из табл. 8. Области CDR для биспецифического mAb KH2/H1/L2 представлены в табл. 12 и 13. Области VH и VL биспецифического антитела сливали с константными областями тяжелой цепи IgG1 и легкой цепи каппа, соответственно. HC, содержащая KH2, имеет мутацию T366W для формирования "выступа", и HC, содержащая H1, имеет мутации T366S, L368A и Y407V для формирования "впадины", так чтобы благоприятствовать формированию из тяжелых цепей биспецифического антитела с гетеродимерными HC (KH2/H1), а не гомодимерными HC (KH2/KH2 или H1/H1). Полученное биспецифическое антитело (KH2/H1/L2), названное BA1, дополнительно модифицировали посредством введения цистеиновой мутации S354C в HC антитела против CD47 (KH2) и цистеиновой мутации Y349C в HC антитела против DLL3 (H1) для стабилизации гетеродимерного спаривания тяжелых цепей KH2 и H1 (Merchant et al. Nat. Biotechnol. 16(7):677-81 (1998)). Полученное биспецифическое антитело названо BA1(C). Вариабельные области BA1 также сливали с каркасом IgG4 с такими же цистеиновыми мутациями в BA1(C) для получения биспецифического антитела, названного BA4(C). Одновременная экспрессия двух тяжелых цепей и легкой цепи в одной и той же клетке приводила к экспрессии и сборке желательного биспецифического антитела, содержащего плечо против CD47 и плечо против DLL3. Различные соотношения ДНК тяжелых цепей использовали для оптимизации экспрессии. Биспецифические антитела продуцировали в суспензии клеток ExpiCHO-S и очищали с использованием аффинной хроматографии с белком A и ионообменной хроматографии.

Таблица 12. Области CDR 1-3 тяжелых цепей и общей легкой цепи для биспецифических антител

	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
KH2	GYTFTSYW (178)	IDPSDSET (179)	AGTDLAY (180)
H1	GYTFTSYV (181)	INPYNDAT (182)	ARGGYDYDGDY (183)
L2	QNINWV (184)	KAS (185)	QQGQSYPF (186)

CDR определяли с использованием способа IMGT.

Таблица 13. Области CDR 1-3 тяжелых цепей и общей легкой цепи для биспецифических антител

	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
KH2	SYWMH (187)	NIDPSDSETHYAQKFQG (188)	TDLAY (189)
H1	SYVMH (190)	YINPYNDATKYARKFQG (191)	GGYDYDGDY (192)
L2	HASQNINWVLS (193)	KASNLHT (194)	QQGQSYPF (195)

CDR HC и LC определяли с использованием способа Kabat.

Пример 8. Характеризация биспецифических антител

Очищенные биспецифические антитела анализировали в мостиковом анализе ELISA, чтобы показать, что биспецифическое антитело может связывать оба антигена в одно и то же время. FLAG-huDLL3 человека в карбонатном буфере для покрытия (50 мкл/лунку при 0,25 мкг/мл) покрывали 96-луночный планшет для ELISA в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет блокировали посредством 5% BSA в TBST в течение 1 ч при комнатной температуре. В каждую лунку планшета, добавляли биспецифическое mAb (50 мкл/лунку в различных концентрациях) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки биотинилированный внеклеточный домен (ECD) CD47 человека (AcroBio, кат.#: CD7-H82E9) добавляли в каждую лунку (50 мкл/лунку при 0,05 мкг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Планшет промывали, и связывание биотинилированного CD47 с иммобилизованным биспецифическим антителом детектировали посредством добавления конъюгированного с пероксидазой хрена стрептавидина (JIR, кат.#: 016-030-084) и инкубации при комнатной температуре в течение 60 мин. Затем после промывки ELISA проявляли с использованием раствора для одностадийной детекции (ThermoFisher Scientific, кат.#: 34028) и измеряли как оптическую плотность при 450 нм. Результаты мостикового анализа ELISA для биспецифических антител BA1 и BA1(C) представлены на фиг. 4A; результат мостикового анализа ELISA для BA4(C) представлен на фиг. 4B.

Биспецифические антитела анализировали по их способности связывать CD47(ECD) или DLL3(ECD)-6His (R&D, кат.#: 9749-DL-050), иммобилизованные на обычных или покрытых никелем

планшетах, в анализе ELISA. Результаты анализа связывания CD47 для биспецифических антител BA1, BA1(C) и BA4C представлены на фиг. 5 (CD47(ECD) покрыты обычные планшеты). Исходное mAb против CD47 KH2L2 (отмеченное как исходное mAb против CD47 на фиг. ) в каркасе IgG4 использовали в качестве контроля. Результаты анализа связывания DLL3 для биспецифических антител BA1 и BA1(C) представлены на фиг. 6A (DLL3(ECD)-6His покрыт обычный планшет); результат анализа связывания DLL3 для BA4(C) представлен на фиг. 6B (DLL3(ECD)-6His иммобилизован на покрытом никелем планшете). Исходное mAb против DLL3 H1L2 (отмеченное как исходное mAb против DLL3 на фиг. 6B) в каркасе IgG4 использовали в качестве контроля. Результаты на фиг. 5 показали, что биспецифические антитела, имеющие одно плечо против CD47, являлись способными связывать CD47, но с более низкой аффинностью, чем исходное mAb KH2L2, имеющее два плеча против CD47 (фиг. 5). Подобным образом, результаты на фиг. 6A и 6B показали, что биспецифические антитела, имеющие одно плечо против DLL3, имели более слабое связывание с DLL3, по сравнению с исходным mAb против DLL3 H1L2, имеющим два плеча против DLL3.

Биспецифические антитела анализировали по их способности связывать как CD47(ECD), так и DLL3(ECD)-6His, когда они одновременно иммобилизованы на одном и том же планшете (50 мкл/лунку при 20 нМ для обоих антигенов). Результаты анализа связывания CD47/DLL3 для биспецифических антител BA1, BA1(C) и BA4(C) представлены на фиг. 7.

Биспецифические антитела анализировали также по их способности блокировать взаимодействие CD47/SIRP $\alpha$  в анализе ELISA. CD47 (ECD) человека (AcroBio, кат.#: CD7-NA2E9-50 мкг) при 1 мкг/мл в карбонатном буфере для покрытия покрывали 96-луночный планшет (50 мкл/лунку) при 4°C в течение ночи. Планшет блокировали посредством 5% BSA в TBST в течение 1 ч при комнатной температуре. Биспецифическое и исходное mAb в различных концентрациях добавляли в планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Внеклеточный домен (ECD) SIRP $\alpha$ , слитый с мышинным Fc (AcroBio, кат.#: SIA-H52A8-100 мкг), добавляли в каждую лунку (50 мкл/лунку при 1 мкг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшет промывали и связывание SIRP $\alpha$  с иммобилизованным CD47 детектировали посредством антитела против IgG мыши, конъюгированного с пероксидазой хрена (mIgG-HRP) (ThermoFisher Scientific, кат.#: A16084) с инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем после промывки ELISA проявляли с использованием раствора для одностадийной детекции (ThermoFisher Scientific, кат.#: 34028) и измеряли как оптическую плотность при 450 нм. В соответствии с данными анализа связывания CD47 в ELISA биспецифические Ab имеют уменьшенную способность блокировать взаимодействие CD47/SIRP $\alpha$  в этом контексте (фиг. 8A). Анализ проводили также, когда оба CD47(ECD) и DLL3(ECD)-6His были одновременно иммобилизованы на одном и том же планшете в соотношении CD47: DLL3 2:1 (50 мкл/лунку с CD47 при 40 нМ и DLL3 при 20 нМ) в течение 1 ч при комнатной температуре и планшет блокировали посредством 5% BSA в DPBS. В таких условиях биспецифические Ab имели сходную способность блокировать взаимодействие CD47/SIRP $\alpha$ , по сравнению с исходным mAb против CD47 (фиг. 8B), что позволяет предполагать, что связывание с иммобилизованным DLL3 на планшете посредством плеча против DLL3 каждого из биспецифических Ab вносит вклад в блокирование взаимодействия CD47/SIRP $\alpha$ .

Биспецифические антитела анализировали по их способности связывать клетки Raji, не имеющие поддающейся детекции экспрессии DLL3. Клетки Raji (14000 клеток на лунку в 96-луночном планшете) инкубировали либо с раствором очищенного mAb в различных концентрациях, либо с контролем изотипа в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS), содержащем 0,05% азид натрия и 0,1% BSA, при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубации планшеты промывали три раза тем же буфером. С использованием конъюгированного с PE-Cy7 вторичного антитела против IgG человека присутствие mAb на клетках Raji измеряли посредством FACS (Attune NxT; ThermoFisher, Carlsbad, CA). Результат анализа связывания для FACS представлен на фиг. 9.

Связывание биспецифического mAb BA1(C) и двух исходных контрольных mAb с клетками SHP-77 тестировали в присутствии или в отсутствие одного из конкурирующих F(ab')<sub>2</sub>: исходного F(ab')<sub>2</sub> против DLL3 (конечная концентрация в анализе составляла 25 мкМ) и исходного F(ab')<sub>2</sub> против CD47 (конечная концентрация в анализе составляла 10 мкМ). F(ab')<sub>2</sub> получали из mAb с использованием иммобилизованного пепсина (Thermo Fisher Scientific, кат.#: #20343), в соответствии с инструкцией, и очищали. Результат анализа связывания представлен на фиг. 10. Ингибирование связывания BA1(C) с клетками SHP-77 посредством обоих F(ab')<sub>2</sub> показывает, что плечи как против CD47, так и против DLL3 биспецифического антитела вносят вклад в его связывание с клетками SHP-77.

Биспецифические антитела тестировали по их способности связывать эритроциты (RBC) человека и яванского макака. 14000 RBC ресуспендировали в 20 мкл буфера для FACS (1X HBSS (Thermo Fisher Scientific, кат.#: 14175079) с 0,1% BSA и 0,05% азид натрия), содержащего разведенные mAb, и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубации, планшеты промывали три раза буфером для FACS, и клетки ресуспендировали с конъюгированным с PE-Cy7 вторичным антителом против IgG-Fc человека (BioLegend, кат.#: 409316) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Планшеты промывали 2x буфером для FACS. Клетки ресуспендировали и переноси-

ли в 384-луночный планшет для анализа с использованием проточного цитометра Attune NxT. На фиг. 11A-11C показано связывание биспецифических антител с эритроцитами (RBC) человека при следующих концентрациях mAb: 1600 нМ (фиг. 11A), 533 нМ (фиг. 11B) и 178 нМ (фиг. 11C). Исходные антитела против CD47 и против DLL3 и изотипы IgG1 и IgG4 использовали в качестве контроля.

Специалисту в данной области понятно, что изменения можно вносить в варианты осуществления, описанные выше, без отклонения от их широкого изобретательского замысла. Понятно, таким образом, что это изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предназначено для включения модификаций в пределах содержания и объема настоящего изобретения, как определено посредством настоящего описания.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с DLL3,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 25, 26, 27, 61, 62 и 63 соответственно, где способ IMGT использовали для определения CDR, или SEQ ID NO: 97, 98, 99, 133, 134 и 135 соответственно, где способ по Кабат использовали для определения CDR.

2. Выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие

вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 170, 1, или

вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 172, 2, 171 или 173.

3. Выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащие:

a) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 170 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 172;

b) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 1 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 2;

c) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 170 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 171 или

d) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 170 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 173.

4. Выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным или человеческим, или гуманизированным.

5. Выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4,

где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли, опосредовать привлечение конъюгированных лекарственных средств и/или формировать биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом или антигенсвязывающим фрагментом с эффектом уничтожения злокачественных опухолей.

6. Выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где DLL3 представляет собой DLL3 человека.

7. Выделенное гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающий CD47, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающий DLL3, где

первый антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 с полипептидными последовательностями SEQ ID NO: 178, 179 и 180 соответственно, где способ IMGT использовали для определения CDR, или с SEQ ID NO: 187, 188 и 189 соответственно, где способ Кабат использовали для определения CDR;

второй антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 181, 182 и 183 соответственно, где способ IMGT использовали для определения CDR или SEQ ID NO: 190, 191 и 192 соответственно, где способ Кабат использовали для определения CDR; и

каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 184, 185 и 186 соответственно, где способ IMGT использовали для определения CDR, или SEQ ID NO: 193, 194 и 195 соответственно, где способ Кабат исполь-

зовали для определения CDR.

8. Выделенное гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7,

где первый антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 176, и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 172; и

где второй антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 170, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 172.

9. Выделенное гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7 или 8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны

блокировать связывание CD47 с SIRP $\alpha$  на клетках злокачественных опухолей, экспрессирующих как CD47, так и DLL3,

индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47, или

связывать клетки злокачественных опухолей, экспрессирующие как DLL3, так и CD47, со связыванием с эритроцитами человека от минимального до не поддающегося детекции.

10. Выделенное гуманизированное биспецифическое антитело против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.7-9, где CD47 представляет собой CD47 человека и/или DLL3 представляет собой DLL3 человека.

11. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.7-10.

12. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.11.

13. Клетка-хозяин для получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащая вектор по п.12.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело против DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.7-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

15. Способ нацеливания на DLL3 на поверхности клеток злокачественных опухолей у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по п.14.

16. Способ нацеливания на DLL3 и CD47 на поверхности клеток злокачественных опухолей, блокирования связывания CD47 с SIRP $\alpha$  на клетках злокачественных опухолей, экспрессирующих как CD47, так и DLL3 на клеточной поверхности, индукции опосредованного макрофагами фагоцитоза клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как CD47, так и DLL3 на клеточной поверхности, или связывания клеток злокачественных опухолей, экспрессирующих как DLL3, так и CD47 на поверхности клеток злокачественных опухолей, со связыванием с эритроцитами человека от минимального до не поддающегося детекции, у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по п.14.

17. Способ лечения DLL3-экспрессирующей злокачественной опухоли у больного, включающий введение больному фармацевтической композиции по п.14.

18. Способ по п.17, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легкого, такого как мелкоклеточный рак легкого (SCLC), крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC), рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

19. Способ получения гуманизированного биспецифического антитела против CD47/DLL3 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.7-10, включающий

культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и

выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

20. Способ получения фармацевтической композиции по п.14, включающий объединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

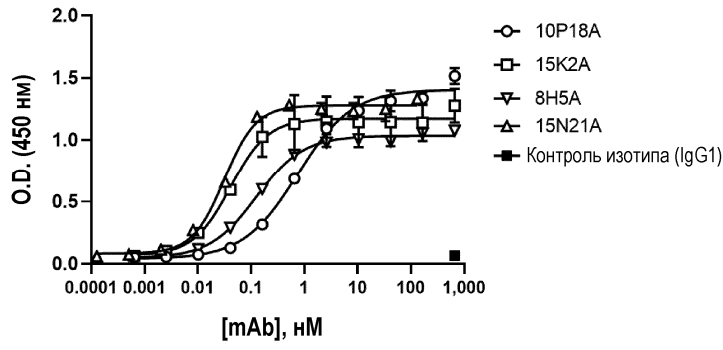
21. Способ определения уровня DLL3 у субъекта, включающий:

a) получение образца от субъекта;

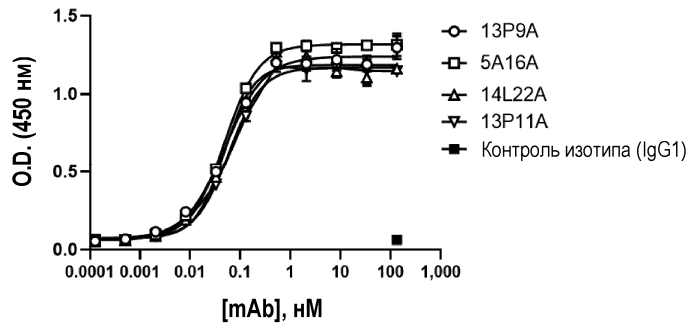
b) приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом против DLL3 или его



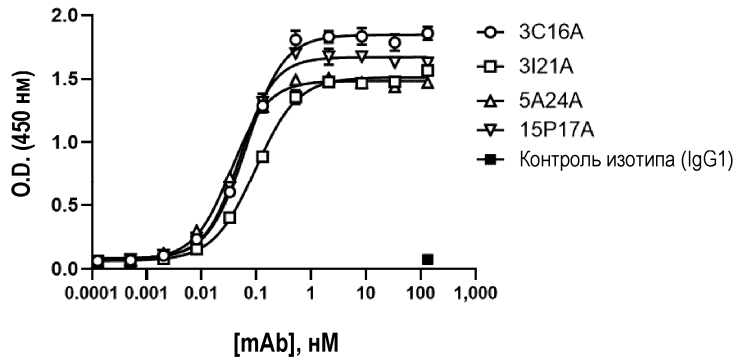
антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-6 и  
с) определение уровня DLL3 у субъекта.



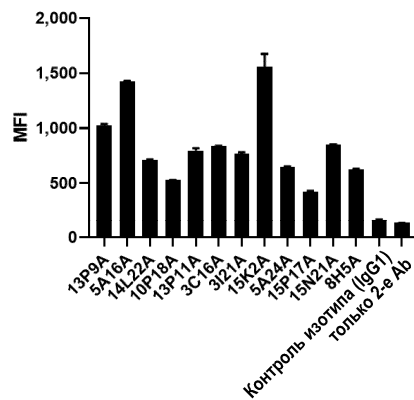
Фиг. 1А



Фиг. 1В



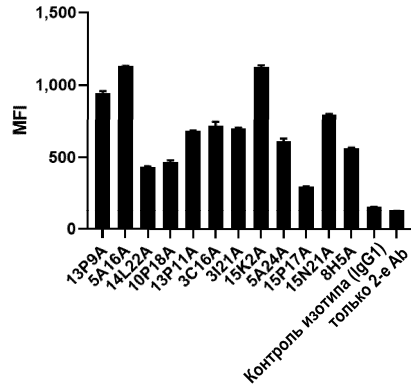
Фиг. 1С



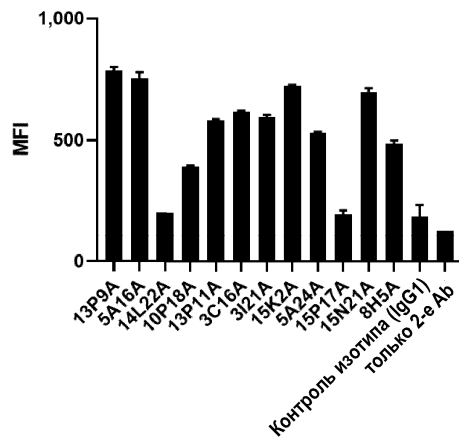
[mAb] = 666.67 нМ

Фиг. 2А

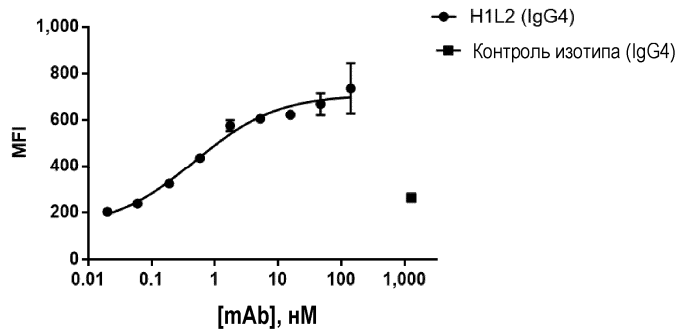
046808



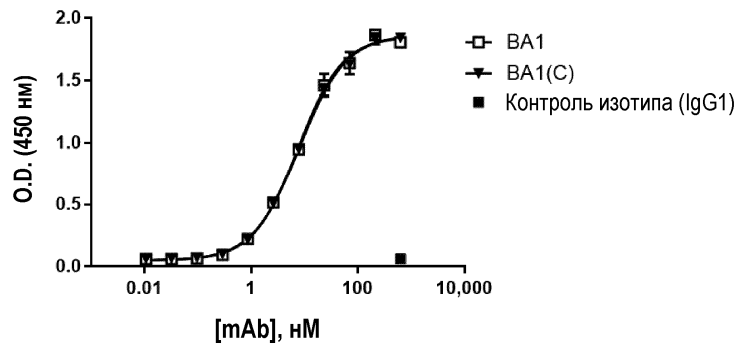
[mAb] = 333.33 нМ  
Фиг. 2В



[mAb] = 66.67 нМ  
Фиг. 2С

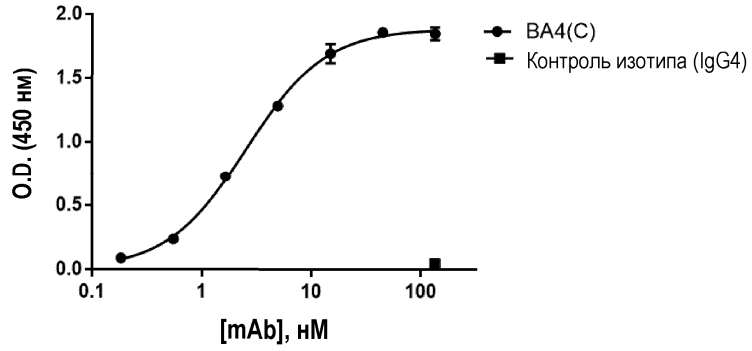


Фиг. 3

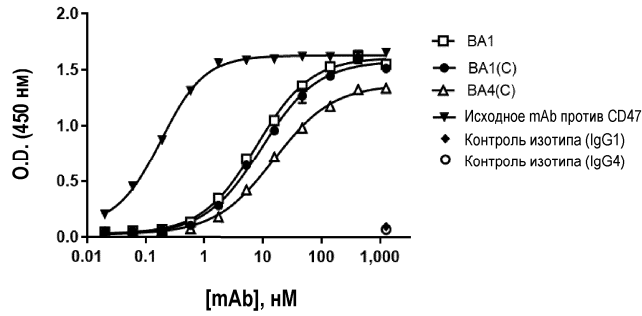


Фиг. 4А

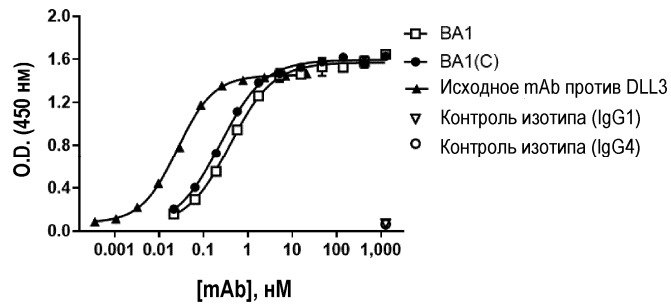
046808



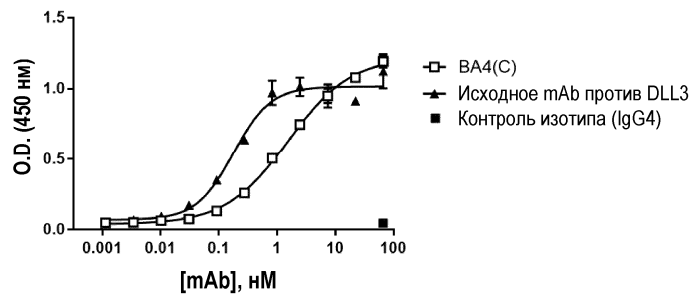
Фиг. 4В



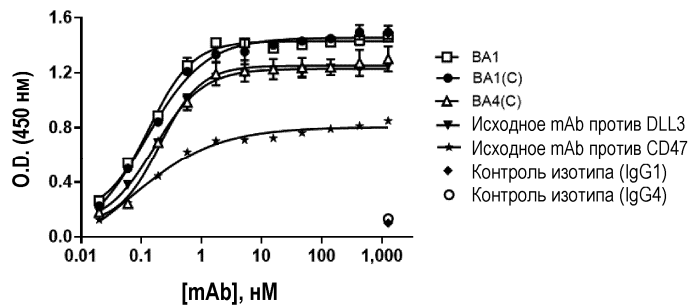
Фиг. 5



Фиг. 6А

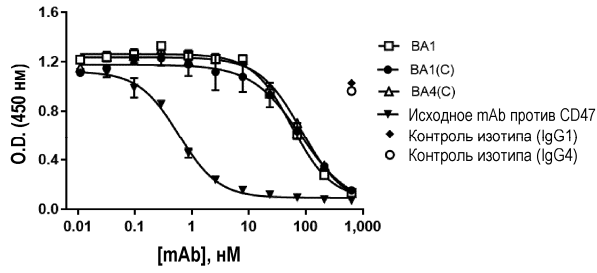


Фиг. 6В

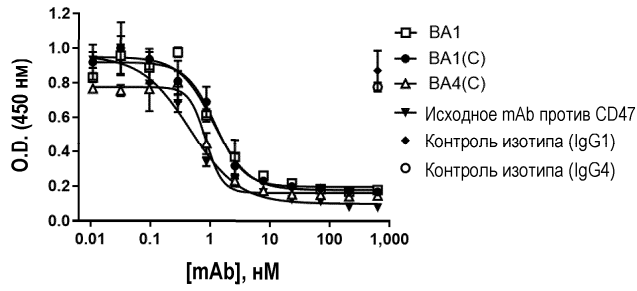


Фиг. 7

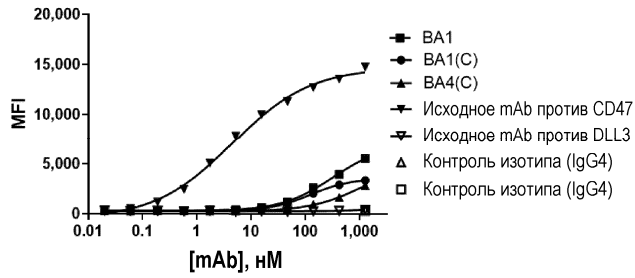
046808



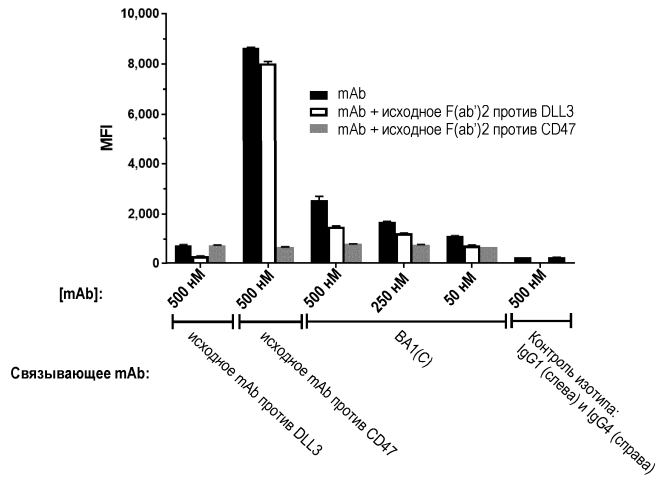
Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 9



Фиг. 10

