

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047971**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.04

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202092928

(22) Дата подачи заявки
2019.06.07

(54) **DLL3/CD3 СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) **18176888.8; 18176889.6; 19159321.9**

(56) **WO-A1-2017021349**
WO-A2-2013126746
WO-A1-2014125273

(32) **2018.06.09; 2018.06.09; 2019.02.26**

(33) **EP**

(43) **2021.04.07**

(86) **PCT/EP2019/064942**

(87) **WO 2019/234220 2019.12.12**

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

(72) Изобретатель:
**Хипп Зузанне, Адам Пауль (DE),
Дзегелевски Майкл, Ганешан
Раджкумар, Горман Филип Николас,
Гупта Приянка, Гупта Панкадж,
Шеер Джастин, Войнов Владимир Х.
(US)**

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

(57) Изобретение относится к новым DLL3/CD3 связывающим белкам для лечения рака. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим такие белки; к способам получения таких белков; к клеткам-хозяевам, экспрессирующим или способным экспрессировать такие белки; к композициям, содержащим такие белки; и к применениям таких белков или таких композиций, в особенности, для терапевтических целей в области онкологических заболеваний.

047971
B1

047971
B1

Предпосылки создания изобретения

Область техники

Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим связывающим белкам, включающим первую антигенсвязывающую единицу, специфическую для DLL3, и вторую антигенсвязывающую единицу, специфическую для CD3. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим такие связывающие белки, к способам приготовления таких связывающих белков; клеткам-хозяевам, экспрессирующим или способным экспрессировать такие связывающие белки, композициям, содержащим такие связывающие белки и к применениям таких связывающих белков или таких композиций, в особенности, для терапевтических целей в области онкологических заболеваний.

Исходная информация

DLL3 представляет собой трансмембранный белок I типа, который относится к семейству лигандов Notch. DLL3 в основном вовлечен в сомитогенез, где он локализован в основном в аппарате Гольджи и действует в качестве ингибитора пути передачи сигналов Notch, в отличие от других представителей семейства DLL, DLL1 и DLL4, которые расположены на клеточной поверхности. Только в злокачественных клетках, где DLL3 сверхэкспрессируется, некоторые DLL3 молекулы убегают на клеточную поверхность (Dylla, *Molecular & Cellular Oncology* 2016, том 3, № 2). DLL3 был идентифицирован в качестве опухолеспецифической мишени с помощью нескольких методов, например, ЖХ/МС анализа опухолевых тканей (WO 2014/125273), секвенирования РНК (WO 2017/021349), и иммуногистохимии (Saunders и др., *Sci Transl Med.* 2015 Aug 26; 7(302):302ra136; Saunders и др., *AACR* 2017; WO 2013/126746). Экспрессия DLL3 была описана в нейроэндокринных опухолях, таких как крупноклеточная нейроэндокринная карцинома (LCNEC), мелкоклеточный рак легких (SCLC), мелкоклеточный рак мочевого пузыря, нейроэндокринный рак предстательной железы, нейроэндокринный рак поджелудочной железы и глиобластома (Saunders и др., *Sci Transl Med.* 2015 Aug 26; 7(302):302ra136; Saunders и др., *AACR* 2017).

SCLC является показанием для чрезвычайно высокой медицинской потребности. SCLC составляет 13% диагностированного рака легких и имеет худший прогноз, чем NSCLC. Общепринятые лечения для этих злокачественных новообразований главным образом включают химиотерапию, лучевую терапию, хирургию или их комбинации, до настоящего времени не были доступны целевые терапии. В то время как частота начального ответа на химиотерапию является высокой, у многих пациентов быстро развивается рецидив с химиорезистентным заболеванием, для которого отсутствуют доступные варианты лечения. Несмотря на то что за последние годы наблюдаются улучшения при лечении этих злокачественных новообразований, коэффициенты общей выживаемости для этих типов опухолей остаются неизменными, следовательно, существует неудовлетворенная медицинская потребность для более нацеленных и эффективных терапий.

Один из подходов нацеленной терапии обеспечивается с помощью конъюгатов антител с лекарственными средствами (ADC). Однако, для DLL3 эта стратегия не является предпочтительной в связи с низкой экспрессией DLL3 на поверхности клеток и высокой частотой резистентности к химиотерапии. Поскольку у большинства пациентов развивается рецидив после лечения с применением химиотерапии и вследствие низкой экспрессии DLL3 на клеточной поверхности, нацеливание на DLL3 с помощью ADC может иметь ограничения. Дополнительно ADC подходы часто имеют нецелевые токсичности, вызываемые свободным лекарственным средством в результате нестабильности или деградации линкера.

Были предприняты попытки комбинировать нацеливание на DLL3 с нацеливанием на другие белки. Например, в WO 2017/021349 описана конструкция биспецифического антитела, в которой скомбинировано связывание с DLL3 человека на поверхности целевой клетки и связывание с CD3 человека на поверхности Т-клетки. Тем не менее, отсутствуют подтверждения, будут ли такие подходы успешными и до настоящего времени не доступны целевые терапии для SCLC и глиобластомы, а также для других опухолей, экспрессирующих DLL3.

Принимая во внимание плохие перспективы для таких пациентов со злокачественными новообразованиями, существует потребность в идентификации более эффективных терапий, в особенности эффективных терапий с улучшенной переносимостью. Таким образом, задачей изобретения является обеспечение фармакологически активных средств, композиций и/или способов лечения, которые обеспечивают определенные преимущества по сравнению со средствами, композициями и/или способами, используемыми в настоящее время и/или известными в данной области техники. Эти преимущества включают *in vivo* эффективность, улучшенные терапевтические и фармакологические свойства, увеличенную специфичность, улучшенный профиль безопасности, меньшие побочные эффекты, уменьшенную иммуногенность, и другие благоприятные свойства, такие как улучшенная простота приготовления или уменьшенная стоимость товаров, более высокая стабильность/более длительное время полужизни, необходимость менее частых схем введения, в особенности, по сравнению с кандидатными лекарственными средствами, уже известными в данной области техники.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение основано на подходе с привлечением биспецифических Т-клеток, применяя мультиспецифические связывающие белки со связывающим плечом с CD3 на Т-клетках и связывающим плечом на DLL3 на клеточной поверхности опухолевых клеток. Путем одновременного связывания с Т-

клетками и опухолевыми клетками, Т-клетки осуществляют принудительное образование цитолитического синапса между двумя клетками и следовательно, перенаправляют селективные Т-клетки на целевые опухолевые клетки. В одном аспекте, изобретение обеспечивает мультиспецифический связывающий белок, включающий первую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с DLL3, и вторую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с CD3, где указанную первую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с DLL3, выбирают из группы, включающей I) - XVIII):

I) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3);

II) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3);

III) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3);

IV) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) и SEQ ID NO:21 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) и SEQ ID NO:24 (CDR3);

V) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) и SEQ ID NO:27 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) и SEQ ID NO:30 (CDR3);

VI) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) и SEQ ID NO:33 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) и SEQ ID NO:36 (CDR3);

VII) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3);

VIII) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) и SEQ ID NO:141 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) и SEQ ID NO:144 (CDR3);

IX) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:145 (CDR1), SEQ ID NO:146 (CDR2) и SEQ ID NO:147 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:148 (CDR1), SEQ ID NO:149 (CDR2) и SEQ ID NO:150 (CDR3);

X) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:151 (CDR1), SEQ ID NO:152 (CDR2) и SEQ ID NO:153 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:154 (CDR1), SEQ ID NO:155 (CDR2) и SEQ ID NO:156 (CDR3);

XI) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:157 (CDR1), SEQ ID NO:158 (CDR2) и SEQ ID NO:159 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:160 (CDR1), SEQ ID NO:161 (CDR2) и SEQ ID NO:162 (CDR3);

XII) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:163 (CDR1), SEQ ID NO:164 (CDR2) и SEQ ID NO:165 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:166 (CDR1), SEQ ID NO:167 (CDR2) и SEQ ID NO:168 (CDR3);

XIII) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:169 (CDR1), SEQ ID NO:170 (CDR2) и SEQ ID NO:171 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:172 (CDR1), SEQ ID NO:173 (CDR2) и SEQ ID NO:174 (CDR3);

XIV) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:175 (CDR1), SEQ ID NO:176 (CDR2) и SEQ ID NO:177 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:178 (CDR1), SEQ ID

ший аминокислотную последовательность SEQ ID NO:220;

XV) антигенсвязывающую единицу, включающую вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:221, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:222;

XVI) антигенсвязывающую единицу, включающую вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:223, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:224;

XVII) антигенсвязывающую единицу, включающую вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:225, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:226; и

XVIII) антигенсвязывающую единицу, включающую вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:227, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:228.

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка согласно изобретению, вторую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с CD3, выбирают из группы, включающей I) - III):

I) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) и SEQ ID NO:57 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) и SEQ ID NO:60 (CDR3);

II) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3); и

III) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:96 (CDR1), SEQ ID NO:97 (CDR2) и SEQ ID NO:98 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:99 (CDR1), SEQ ID NO:100 (CDR2) и SEQ ID NO:101 (CDR3).

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка согласно изобретению, вторая антигенсвязывающая единица, которая специфически связывается с CD3, включает второй вариабельный домен легкой цепи, и второй вариабельный домен тяжелой цепи и выбирают из группы, включающей:

I) антигенсвязывающую единицу, включающую вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68;

II) антигенсвязывающую единицу, включающую вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70; и

III) антигенсвязывающую единицу, включающую вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая антигенсвязывающая единица, которая специфически связывается с DLL3, включает с ее N-конца до C-конца: первый вариабельный домен легкой цепи, первый константный домен легкой цепи, первый пептидный линкер, первый вариабельный домен тяжелой цепи и первый константный CH1 домен тяжелой цепи; и вторая антигенсвязывающая единица, которая специфически связывается с CD3, включает с ее N-конца до C-конца: второй вариабельный домен легкой цепи, второй константный домен легкой цепи, второй пептидный линкер, второй вариабельный домен тяжелой цепи, и второй константный CH1 домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый и/или второй пептидный линкер включает 26-42 аминокислот, предпочтительно любое количество из 30-40 аминокислот, 34-40 аминокислот, или 36-39 аминокислот, более предпочтительно 38 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый линкер и/или второй линкер представляет собой Gly-Ser линкер, предпочтительно включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, более предпочтительно указанный первый и второй пептидный линкер включают ту же самую последовательность. В некоторых вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению дополнительно включает первый и второй Fc домен, где указанный первый Fc домен ковалентно связан с указанной первой антигенсвязывающей единицей, и указанный второй Fc домен ковалентно связан с указанной второй антигенсвязывающей единицей. В некоторых вариантах осуществления изобретения,

I) первый Fc домен включает тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], и второй Fc домен включает треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

II) первый Fc домен включает триптофан (W) в положении 366 [T366W], и второй Fc домен включает серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V], или

III) второй Fc домен включает тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], и первый Fc домен включает треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

IV) второй Fc домен включает триптофан (W) в положении 366 [T366W], и первый Fc домен включает серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V],

предпочтительно первый или второй Fc домен дополнительно включает аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F]. В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй Fc домен дополнительно включает аланин в положении 234 [L234A] и в положении 235 [L235A]. В некоторых вариантах осуществления, первый константный домен легкой цепи, и второй константный домен легкой цепи включают каппа или лямбда домен человека.

В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, и SEQ ID NO:252 и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80 или SEQ ID NO:105.

В дальнейшем аспекте, изобретение обеспечивает выделенную молекулу нуклеиновой кислоты I) кодирующую первую антигенсвязывающую единицу и/или вторую антигенсвязывающую единицу белка согласно изобретению, которая дополнительно необязательно кодирует первый и/или второй Fc домен, или II) кодирующую первую и/или вторую полипептидную цепь белка согласно изобретению. В дальнейших аспектах осуществления настоящего изобретения обеспечиваются экспрессионные векторы, включающие молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению, клетки-хозяева, трансфектированные такими экспрессионными векторами, и способы приготовления белка согласно изобретению.

В дальнейшем аспекте в соответствии с изобретением, в настоящей заявке обеспечивается мультиспецифический связывающий белок, включающий первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, где первая полипептидная цепь включает первую легкую цепь, первый линкер, и первую тяжелую цепь, и вторая полипептидная цепь включает вторую легкую цепь, второй линкер, и вторую тяжелую цепь, предпочтительно С-конец указанной первой легкой цепи ковалентно связан с N-концом указанной первой тяжелой цепи с помощью указанного первого пептидного линкера и С-конец указанной второй легкой цепи ковалентно связан с N-концом указанной второй тяжелой цепи с помощью указанного второго пептидного линкера.

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка согласно изобретению, первая полипептидная цепь, которая специфически связывается с DLL3, включает вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, включающие CDR последовательности и/или VH/VL последовательности, как определено для антигенсвязывающих единиц для DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17, или DLL3#18, описанные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления, вторая полипептидная цепь, которая специфически связывается с CD3, включает вариабельную легкую цепь и вариабельный домен тяжелой цепи, включающие CDR последовательности и/или VH/VL последовательности, как определено для антигенсвязывающих единиц для CD3#1, CD3#2, или CD3#3, описанные в настоящей заявке.

Дальнейшие аспекты, варианты осуществления, применения и способы, охватывающие связывающие белки в соответствии с изобретением, будут становиться понятными на основе последующего подробного описания изобретения и пунктов приложенной формулы изобретения.

Изобретение обеспечивает новые связывающие белки, которые предоставляют возможность более эффективного лечения DLL3 экспрессирующих злокачественных новообразований, таких как SCLC, глиобластома или DLL3 экспрессирующая нейроэндокринная опухоль.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - схематическое изображение биспецифического связывающего белка согласно изобретению.

Фиг. 2 - схематическое изображение конструкций полноразмерного белка DLL3 и DLL3 домена, экспрессируемых на HEK293 клетках для картирования домена эпитопа. Для конструкций DLL3 домена, трансмембранный и внутриклеточный домены имеют происхождение из ErCAM.

Фиг. 3А - картирование домена эпитопа DLL3 для семи иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков. Иллюстративные DLL3/CD3 связывающие белки распознают мембранный проксимальный пептид, EGF4, EGF1 и DSL домены из DLL3. На оси Y представлены отсчеты, на оси X представлены PE-A (площадь сигнала фикоэритрина).

Фиг. 3В - картирование домена эпитопа DLL3 для шести иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков. Иллюстративные DLL3/CD3 связывающие белки распознают EGF1, EGF3, EGF4 или EGF6 из

DLL3. На оси Y представлены отсчеты, на оси X представлены PE-A (сигнал фикоэритрина).

Фиг. 3C - картирование домена эпитопа DLL3 для шести иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков. Иллюстративные DLL3/CD3 связывающие белки распознают DSL домены, но ни DSL, EGF, ни мембранный проксимальный пептид из DLL3. На оси Y представлены отсчеты, на оси X представлены PE-A (сигнал фикоэритрина).

Фиг. 4 - связывание для семи иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков с клеточными линиями, экспрессирующими DLL3 человека и яванской макаки. На оси Y представлены отсчеты, на оси X представлены PE-A (площадь сигнала фикоэритрина).

Фиг. 5 - связывание для семи иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков с клеточными линиями, экспрессирующими DLL1 и DLL4 человека, не обнаружено связывания с DLL1 и DLL4 человека. На оси Y представлены отсчеты, на оси X представлены PE-A (площадь сигнала фикоэритрина).

Фиг. 6A - связывание для семи иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков с клеточными линиями SCLC и Т-клетками человека с помощью анализа проточной цитометрии.

Фиг. 6B - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на пептид, который не представляет собой ни DSL, ни EGF1-6, ни мембранный проксимальный пептид) с SHP77 клетками.

Фиг. 6C - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на DSL домен) с SHP77 клетками.

Фиг. 6D - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF1 домен) с SHP77 клетками.

Фиг. 6E - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF3 домен) с SHP77 клетками.

Фиг. 6F - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF4 домен) с SHP77 клетками.

Фиг. 6G - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на DSL домен) с SHP77 клетками.

Фиг. 6H - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на мембранный проксимальный пептидный домен) с SHP77 клетками.

Фиг. 6I - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на пептид, который не представляет собой ни DSL, ни EGF1-6, ни мембранный проксимальный пептид) с NCI-H82 клетками.

Фиг. 6J - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на DSL домен) с NCI-H82 клетками.

Фиг. 6K - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF1 домен) с NCI-H82 клетками.

Фиг. 6L - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF3 домен) с NCI-H82 клетками.

Фиг. 6M - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF4 домен) с NCI-H82 клетками.

Фиг. 6N - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на DSL домен) с NCI-H82 клетками.

Фиг. 6O - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на мембранный проксимальный пептидный домен) с NCI-H82 клетками.

Фиг. 6P - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на пептид, который не представляет собой ни DSL, ни EGF1-6, ни мембранный проксимальный пептид) с Т-клетками.

Фиг. 6Q - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на DSL домен) с Т-клетками.

Фиг. 6R - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF1 домен) с Т-клетками.

Фиг. 6S - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF3 домен) с Т-клетками.

Фиг. 6T - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF4 домен) с Т-клетками.

Фиг. 6U - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF6 домен) с Т-клетками.

Фиг. 6V - связывание иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на мембранный проксимальный пептидный домен) с Т-клетками.

Фиг. 7A - эффективность лизиса клеток семи DLL3/CD3 связывающих белков, перенацеливающих нестимулированные PBMC на линии клеток SCLC человека.

Фиг. 7B - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на пептид, который не представляет собой ни DSL, ни EGF1-6, ни мембранный проксимальный пептид), перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на SHP77 клетки человека.

Фиг. 7С - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на DSL домен), перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на SHP77 клетки человека.

Фиг. 7D - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF1 домен, перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на SHP77 клетки человека.

Фиг. 7E - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF3 домен), перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на SHP77 клетки человека.

Фиг. 7F - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF4 домен), перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на SHP77 клетки человека.

Фиг. 7G - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF6 домен), перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на SHP77 клетки человека.

Фиг. 7H - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на мембранный проксимальный пептид, перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на SHP77 клетки человека.

Фиг. 7I - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на пептид, который не представляет собой ни DSL, ни EGF1-6, ни мембранный проксимальный пептид), перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на NCI-H82 клетки человека.

Фиг. 7J - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на DSL домен), перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на NCI-H82 клетки человека.

Фиг. 7K - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF1 домен, перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на NCI-H82 клетки человека.

Фиг. 7L - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF3 домен), перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на NCI-H82 клетки человека.

Фиг. 7M - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF4 домен), перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на NCI-H82 клетки человека.

Фиг. 7N - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на EGF6 домен), перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на NCI-H82 клетки человека.

Фиг. 7O - эффективность лизиса клеток иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (нацеленных на мембранный проксимальный пептид, перенацеливающих нестимулированные Т-клетки на NCI-H82 клетки человека.

Фиг. 8 - анализ интернализации *in vitro* с двумя иллюстративными DLL3/CD3 связывающими белками. DLL3/CD3 связывающие белки предварительно инкубировали с DLL3-положительными SHP77 клетками в течение 2 и 4 ч перед совместным инкубированием в течение 48 ч с РВМС человека.

Фиг. 9 - фармакокинетика двух иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков. Средние фармакокинетические профили для DLL3#3/CD3#1 (незакрашенные квадраты) и DLL3#3/CD3#2 (закрашенные квадраты) у самцов C57BL/6 мышей после однократной внутривенной дозы 1 мг/кг.

Фиг. 10 - противоопухолевая активность двух иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков. На оси Y представлены средние объемы опухолей и на оси X представлено время.

Фиг. 11 - эффективность лизиса клеток иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка, перенацеливающего нестимулированные РВМС на SHP77 и RKO-E6 клетки человека.

Фиг. 12 - эффективность активации Т-клеток в присутствии SHP77 клеток для иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка.

Фиг. 13 - эффективность дегрануляции Т-клеток в присутствии SHP77 клеток для иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка.

Фиг. 14А - эффективность секреции гамма-интерферона с помощью РВМС в присутствии SHP77 клеток для иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка.

Фиг. 14В - эффективность секреции MCP-1 с помощью РВМС в присутствии SHP77 клеток для иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка.

Фиг. 15 - эффективность пролиферации Т-клеток в присутствии SHP77 клеток для иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка.

Фиг. 16 - эффективность лизиса клеток иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка, перенацеливающего нестимулированные пан Т-клетки и интактные Т-клетки на SHP77 клетки человека.

Фиг. 17 - эффективность лизиса клеток иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка, перенацеливающего нестимулированные CD4⁺ и CD4⁺ центральные Т-клетки памяти на SHP77 клетки человека.

Фиг. 18 - эффективность лизиса клеток иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка, перенацеливающего нестимулированные CD4⁺ и CD4⁺ эффекторные Т-клетки памяти на SHP77 клетки человека.

Фиг. 19 - эффективность лизиса клеток иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка, перенацеливающего нестимулированные CD8⁺ и CD8⁺CD45RA⁺ эффекторные Т-клетки памяти на SHP77 клетки человека.

Фиг. 20 - эффективность лизиса клеток иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка, перенацеливающего нестимулированные CD8⁺ и CD8⁺ Т-клетки памяти на SHP77 человека.

Фиг. 21 - инфильтрация Т-клеток в SHP77 ксенотрансплантат опухолевой ткани с применением иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка.

Фиг. 22 - связывание трех иллюстративных антител к DLL3 с рекомбинантным DLL3 белком в ELISA анализе. На оси Y представлены отсчеты, на оси X представлена концентрация DLL3 белка.

Фиг. 23 - связывание шести иллюстративных антител к DLL3 с DLL3-положительными SCLC клеточными линиями, определенное с помощью проточной цитометрии. На оси Y представлены отсчеты, на оси X представлена концентрация антитела к DLL3.

Фиг. 24 - репрезентативное окрашивание образца SCLC ткани с применением 5 иллюстративных антител к DLL3. Антитела к DLL3 DLL3#1 и DLL3#5 продемонстрировали, что опухолевые клетки проявляют точечное и/или диффузное цитоплазматическое и/или мембранное DLL3 окрашивание. Изображения были получены электронно с помощью LEICA SCN400 автоматический сканер с увеличением 10x.

Фиг. 25 - репрезентативное окрашивание клеточной массы после центрифугирования из SCLC клеточных линий с различными уровнями DLL3 экспрессии. Антитело к DLL3 DLL3#5.

Подробное описание изобретения

Применяемые термины и определения.

Вышеописанные и другие аспекты и варианты осуществления в соответствии с изобретением будут понятными из последующего раскрытия в настоящем описании, в котором:

Если не указано или не определено иное, все использованные термины имеют обычное для данной области значение, которое очевидно специалисту. К примеру, настоящим ссылаемся на стандартные пособия, такие как Sambrook и др., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2-е изд.), т. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, Нью-Йорк, (1990), Roitt и др., "Immunology" (2-е изд.), Gower Medical Publishing, Лондон, Нью-Йорк (1989), а также на процитированные здесь документы общего уровня техники. Кроме того, если не указано иное, все способы, этапы, методики и манипуляции, конкретные детали которых не описаны, могут быть выполнены и выполнялись известным *per se* способом, что будет ясно специалисту. Для примера опять-таки ссылаемся на стандартные пособия, процитированные здесь документы общего уровня техники и дальнейшие упоминаемые документы. При использовании в настоящей заявке, термин "включающий" и его вариации, такие как "включает" и "включают", могут быть заменены на термин "содержащий" или "включая" или "имеющий".

Термин "последовательность", как используется в настоящей заявке, (например, в таких терминах как "последовательность тяжелой/легкой цепи", "последовательность антитела", "последовательность варибельного домена", "последовательность константного домена" или "последовательность белка"), в целом должны пониматься как охватывающие и релевантную аминокислотную последовательность, так и последовательности нуклеиновых кислот или нуклеотидные последовательности, кодирующие такую же последовательность, если только контекстом не подразумевается более ограниченное толкование. "Антигенсвязывающая единица", как используется в настоящей заявке, относится к полипептиду, способному связываться с его специфической мишенью или антигеном и включающему минимальные структурные требования, имеющему происхождение из антитела (типично присутствующему в антителе), который предоставляет возможность целевого связывания. Таким образом, антигенсвязывающая единица включает по меньшей мере присутствие трех CDR последовательностей легкой цепи и трех CDR последовательностей тяжелой цепи, предпочтительно по меньшей мере варибельный домен легкой цепи и варибельный домен тяжелой цепи.

Общая структура антитела или иммуноглобулина хорошо известна квалифицированным специалистам в данной области. Эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, типично с молекулярной массой приблизительно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей и типично обозначаются как полноразмерные антитела. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью с помощью одной дисульфидной связи с образованием гетеродимера, и гетеротетрамерная молекула образуется с помощью ковалентной дисульфидной связи между двумя идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Несмотря на то что легкие и тяжелые цепи связаны вместе с помощью одной дисульфидной связи, число дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями зависит от изоформа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь имеет также регулярно распределенные внутрицепочечные дисульфидные связи. Каждая тяжелая цепь имеет на N-конце варибельный домен (VH), за которым расположены три или четыре (в случае IgE) константных доменов (CH1, CH2, CH3, и CH4), а также шарнирную область между CH1 и CH2. Каждая легкая цепь имеет два домена, N-концевой варибельный домен (VL) и C-концевой константный домен (CL). VL домен ассоциирован нековалентно с VH доменом, в то время как CL домен обычно ковалентно связан с CH1 доменом с помощью дисульфидной связи. Полагают, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между варибельными доменами легкой и тяжелой цепи (Chothia и др., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663). Варибельные домены также в настоящей заявке называются как варибельные области или Fv и обозначают часть, которая придает специфичность антителу к антигену путем наличия антигенсвязывающего сайта.

"Варибельный домен легкой цепи" (или "варибельная область легкой цепи") и "варибельный до-

мен тяжелой цепи" (или "вариабельная область тяжелой цепи"), как используется в настоящей заявке, имеют идентичную общую структуру и каждый домен по существу состоит из четырех каркасных (FR) областей, последовательности которых являются в значительной степени консервативны, которые обозначаются в данной области техники и в настоящей заявке ниже как "каркасная область 1" или "FR1"; как "каркасная область 2" или "FR2"; как "каркасная область 3" или "FR3"; и как "каркасная область 4" или "FR4", соответственно; где каркасные области прерваны тремя гипервариабельными областями, HVR (или CDR), которые обозначаются в данной области техники и в настоящей заявке ниже как "область, определяющая комплементарность 1" или "CDR1"; как "область, определяющая комплементарность 2" или "CDR2"; и как "область, определяющая комплементарность 3" или "CDR3", соответственно. Таким образом, общая структура или последовательность вариабельного домена иммуноглобулина может быть представлена следующим образом: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Каркасные области принимают бета-складчатую конформацию и CDR могут образовывать петли, соединяя бета-складчатую структуру. CDR в каждой цепи удерживаются в их трехмерной структуре с помощью каркасных областей и образуют совместно с CDR из другой цепи антигенсвязывающий сайт.

В контексте настоящего изобретения, ссылка на CDR основана на определении CCG, также обозначаемой как IMGT (Lefranc MP, Pommié C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E, Truong L, Thouvenin-Contet V, Lefranc G. "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", *Dev Comp Immunol.* 2003 Jan; 27(1):55-77; Giudicelli V, Brochet X, Lefranc MP. "IMGT/V-QUEST: IMGT standardized analysis of the immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) nucleotide sequences". *Cold Spring Harb Protoc.* 2011; 2011(6):695-715. Альтернативное определение для CDR, известное в данной области техники, основано на Чотиа (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 1987, 196: 901-917), совместно с Кэботом (E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller and H. Perry, *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda (1983)).

Термин "константные домены" или "константная область", как используется в контексте настоящей заявки, обозначают сумму доменов антитела, отличающихся от вариабельной области. Такие константные домены и области хорошо известны в данной области техники и, описаны, например, Kabat и др. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, публикация № 91).

"Fc часть" или "Fc домен" антитела не вовлечен непосредственно в связывание антитела с антигеном, но проявляет различные эффекторные функции. "Fc часть/домен антитела" является термином, хорошо известным квалифицированному специалисту в данной области техники и определяется на основе расщепления антител папаином. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей, антитела или иммуноглобулины разделяются на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. В соответствии с константными областями тяжелых цепей различные классы иммуноглобулинов называются α , δ , ϵ , γ , и μ соответственно. Некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изоотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4, IgA1, и IgA2. Fc часть антитела непосредственно задействована в ADCC (антителозависимая клеточно-обусловленная цитотоксичность) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность) на основе активации комплемента, связывания C1q и связывания Fc рецептора. Активация комплемента (CDC) инициируется связыванием фактора комплемента C1q с Fc часть большинства антител подкласса IgG. В то время как влияние антитела на систему комплемента зависит от определенных условий, связывание с C1q вызывается определенными связывающими сайтами в Fc части. Такие связывающие сайты представляют собой, например, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация в соответствии с EU нумерацией (Edelman и др., *Proc Natl Acad Sci USA.* 1969 May; 63(1):78-85)). Из этих остатков, наиболее важными для опосредования связывания C1q и Fc гамма рецептора в IgG1 являются L234 и L235 (Hezareh и др., *J. Virology* 75 (2001) 12161-12168, Shields и др. (2001) *JBC*, 276 (9): 6591-6604). Антитела подклассов IgG1 и IgG3 обычно проявляют активацию комплемента и C1q и C3 связывание, в то время как IgG2 и IgG4 не активируют систему комплемента и не связывают C1q и C3.

Термин "антитело" или "молекула антитела" (используемые синонимично в настоящей заявке) охватывает моноклональное антитело, поликлональное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), фрагмент антитела, в особенности Fv, Fab, Fab', или F(ab')₂ фрагмент, одноцепочечное антитело, в особенности одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), одноцепочечный Fab фрагмент (scFab), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP), доменное антитело, нанотело, диатело. Антитело может иметь эффекторную функцию, такую как ADCC или CDC, которая обычно опосредуется с Fc частью (константная область антитела) антитела, или оно может не иметь эффекторной функции, например, путем отсутствия Fc часть или имея блокированную, замаскированную Fc часть, в сущности Fc часть, которая не распознается или неэффективно распознается иммунными клетками или компонентами иммунной системы, такими как система комплемента.

Моноклональные антитела (mAb) представляют собой моноспецифические антитела, которые являются идентичными по аминокислотной последовательности. Они могут быть получены с помощью гибридомной технологии из гибридной клеточной линии (называемой гибридомой), представляющей

собой клон слияния специфической антитело-продуцирующей В-клетки с миеломной (В-клеточный рак) клеткой (Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-7.). Альтернативно, моноклональные антитела могут быть продуцированы путем рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (Norderhaug L., Olafsen T., Michaelsen T.E., Sandlie I. (May 1997). "Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells", *J Immunol Methods* 204 (1): 77-87; см. также ниже). "Рекомбинантное антитело" или "рекомбинантный связывающий белок" представляет собой антитело или связывающий белок, которое(ый) продуцируется рекомбинантно сконструированной клеткой-хозяином. Оно (он) необязательно является выделенным или очищенным.

Полноразмерные антитела можно обрабатывать ферментами, такими как папаин или пепсин, с получением требуемых фрагментов антител. Расщепление папаином применяют для получения двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, которые называют "Fab"-фрагментами, каждый с одним антигенсвязывающим центром, при этом оставшуюся часть обозначают как "Fc"-фрагмент. Fab-фрагмент содержит также константный домен легкой цепи и CH1-домен тяжелой цепи. После обработки пепсином получают F(ab')₂-фрагмент, который несет два антигенсвязывающих центра и все еще сохраняет способность к перекрестному сшиванию с антигеном.

Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов присутствием дополнительных остатков, включая один или несколько остатков цистеина из шарнирной области антитела на С-конце CH1-домена. F(ab')₂-фрагменты антител представляют собой пары Fab'-фрагментов, связанных с помощью остатков цистеина в шарнирной области. Известны другие химические сочетания фрагментов антител.

"Fv"-фрагмент содержит полный антиген-распознающий и антиген-связывающий центр, состоящий из димера, включающего переменную область одной тяжелой и одной легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В этой конфигурации три CDR каждой переменной области взаимодействуют с определенным антигенсвязывающим центром на поверхности димера V_H-V_L. В целом, шесть CDR обуславливают специфичность антитела в отношении связывания антигена.

"Одноцепочечный Fv" или "scFv"-фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный Fv-вариант, содержащий V_H- и V_L-области антитела, при этом области присутствуют в одной полипептидной цепи. Одноцепочечный Fv обладает способностью распознавать антиген и связываться с ним. Полипептид scFv необязательно может содержать также полипептидный линкер, расположенный между V_H- и V_L-областями для облегчения образования трехмерной структуры, требуемой для связывания антигена с помощью scFv (см., например, Pluckthun, в: *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, т. 113, под ред. Rosenburg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1991, с. 269-315).

"Одноцепочечный Fab" или "scFab" фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный вариант, включающий VL, CL, VH и CH1 домены антитела, где домены находятся в единственной полипептидной цепи. Одноцепочечный Fab обладает способностью распознавать и связывать антиген. scFab полипептид необязательно также может содержать полипептидный линкер, расположенный между CL и VH доменами (Hust и др. (2007) *BMC Biotechnology*). Для применения у человека, часто является желательным уменьшать иммуногенность терапевтических молекул, таких как антитела или связывающие белки, включающие антигенсвязывающую единицу, как описано в настоящей заявке, изначально имеющих происхождение из других видов, таких как мышь. Это можно осуществлять путем конструирования химерных антител /связывающих белков, или с помощью процесса, называемого "гуманизацией". В этом контексте, "химерное антитело"; или "химерная антигенсвязывающая единица" понимается как антитело или антигенсвязывающая единица, включающее часть последовательности (например, переменный домен), имеющее происхождение из одного вида (например, мыши), слитую с частью последовательности (например, константными доменами), имеющей происхождение из других видов (например, человека). В этом контексте, "гуманизованное антитело", "гуманизованный связывающий белок" или "гуманизованная антигенсвязывающая единица" представляет собой антитело, белок или антигенсвязывающую единицу, включающее(ую) переменный домен, изначально имеющий происхождение из видов, отличающихся от человека, где определенные аминокислоты были мутированы для получения общей последовательности такого переменного домена, которая будет очень похожа на последовательность переменного домена человека. Методы гуманизации антител хорошо известны в данной области техники (Billetta R., Lobuglio A.F. "Chimeric antibodies". *Int Rev Immunol*. 1993; 10(2-3): 165-76; Riechmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G. (1988). "Reshaping human antibodies for therapy". *Nature*: 332:323).

"Оптимизированное антитело" или "оптимизированная антигенсвязывающая единица или белок" представляет собой специфический тип гуманизованного антитела или гуманизованной антигенсвязывающей единицы/белка, которое включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина, или его фрагмент, который способен связываться с предварительно определенным антигеном и который включает один или больше FR, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, практически соответствующую последовательности иммуноглобулина человека, и одну или больше CDR, которая(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, практически соответствующую последовательности нечеловеческого иммуноглобулина. Эту нечеловеческую аминокислотную последова-

тельность, часто обозначаемую как "импортированная" последовательность, типично получают из "импортированного" домена антитела, в особенности переменного домена. Как правило, оптимизированное антитело включает по меньшей мере CDR (или HVL) нечеловеческого антитела или имеющие происхождение из нечеловеческого антитела, встроенные между FR переменным доменом тяжелой или легкой цепи человека. Должно быть очевидно, что определенные остатки мышиного FR могут быть важными для функционирования оптимизированных антител и, следовательно, определенные остатки последовательностей переменного домена тяжелой и легкой цепи зародышевой линии человека модифицируют для того, чтобы они были такими же, как в соответствующей мышиной последовательности. Во время этого процесса нежелательные аминокислоты также могут быть удалены или заменены, например, для избегания дезамидирования, нежелательных зарядов или липофильности или неспецифического связывания. "Оптимизированное антитело", "оптимизированный фрагмент антитела" или "оптимизировано" иногда могут обозначаться как "гуманизированное антитело", "гуманизированный фрагмент антитела" или "гуманизированное", или как "с оптимизированной последовательностью".

Кроме того, были разработаны технологии для создания антител или VH/VL доменов на основе последовательностей, имеющих происхождение из генома человека, например, путем фагового дисплея или применения трансгенных животных (WWW. Ablexis.com/technology-alivamab.php; WO 90/05144; D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths and G. Winter (1991) "By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage", J.Mol.Biol., 222, 581-597; Knappik и др., J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000; S. Carmen and L. Jeremius, "Concepts in antibodies phage display". Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2002 1(2): 189-203; Lonberg N, Huszar D. "Human antibodies from transgenic mice". Int Rev Immunol. 1995; 13(1):65-93.; Brüggemann M, Taussig MJ. "Production of human antibody repertoires in transgenic mice". Curr Opin Biotechnol. 1997 Aug; 8(4):455-8.). Такие антитела или антигенсвязывающие единицы или VH/VL домены представляют собой "антитела человека," "антигенсвязывающие единицы человека," или "VH/VL домены человека" в контексте настоящего изобретения.

Термин "антитело человека", "антигенсвязывающая единица человека", или "VH/VL домен человека", как используется в настоящей заявке, охватывает антитела, антигенсвязывающие единицы или VH/VL домены, имеющие переменные (и константные, если применимо) области, имеющие происхождение из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека, антигенсвязывающие единицы, белки или VH/VL домены согласно данной технологии могут включать аминокислотные остатки, но кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, интродуцируемые с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*). Тем не менее, термин "антитело человека", "антигенсвязывающая единица человека", или "VH/VL домен человека", как используется в настоящей заявке, не охватывает антитела, в которые CDR последовательности, имеющие происхождение из зародышевой линии другого вида (млекопитающих), таких как мышь, крыса или кролик, были привиты на каркасные последовательности человека. Таким образом, как используется в настоящей заявке, термин "антитело человека", "антигенсвязывающая единица человека", или "VH/VL домен человека" относится к антителу, антигенсвязывающей единице или VH/VL домену, в котором (ой) по существу каждая часть белка (например, CDR, каркасная, CL, CH домены (например, CH1, CH2, CH3), шарнирная, VL, VH) по существу является неиммуногенной у людей, только с незначительными изменениями или вариациями последовательности. Такие изменения или вариации необязательно и предпочтительно сохраняют или уменьшают иммуногенность у людей или других видов по отношению к немодифицированным антителам или антигенсвязывающей единице. Таким образом, антитело человека, антигенсвязывающая единица человека или VH/VL домен человека отличаются, например, от химерного или гуманизированного антитела. Следует отметить, что антитело человека, антигенсвязывающая единица человека или VH/VL домен человека может быть продуцировано с помощью животного, отличающегося от человека, или прокариотической или эукариотической клетки, которое(ая) способно(а) экспрессировать функционально перестроенные гены иммуноглобулина человека (например, тяжелую цепь и/или легкую цепь).

Термин "мономер" относится к гомогенной форме антитела или мультиспецифического белка, как описано в настоящей заявке. Например, для полноразмерного антитела, мономер обозначает мономерное антитело, имеющее две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи. В контексте настоящего изобретения, мономер обозначает белок согласно настоящему изобретению, имеющей одну антигенсвязывающую единицу, специфическую для DLL3, и одну антигенсвязывающую единицу, специфическую для CD3, как описано в настоящей заявке. Например, мономер связывающего белка, описанный в настоящей заявке, может иметь две цепи, первую цепь, включающую одноцепочечный Fab с первой антигенсвязывающей единицей и необязательно первый Fc домен, и вторую цепь, включающую одноцепочечный Fab со второй антигенсвязывающей единицей и необязательно второй Fc домен. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антителом или антигенсвязывающим компонентом (например, антигенсвязывающей единицей белков, описанных в настоящей заявке). Термин "эпитоп" включает любую полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с антителом или антигенсвязывающим компонентом. В определенных вариантах осуществления, эпитопные детерми-

нантны включают химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи гликанов, фосфорил, или сульфонил, и, в определенных вариантах осуществления, могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, и/или специфические характеристики заряда.

Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что связывание первым из них, но не из последним, теряется в присутствии денатурирующих растворителей.

Считается, что антигенсвязывающая молекула/белок (такая как иммуноглобулин, антитело, антигенсвязывающая единица, или фрагмент такой(го) антигенсвязывающей молекулы/белка), которая(ый) может "связывать", "связываться с", "специфически связывать", или "специфически связываться с", которая(ый) "имеет аффинность для", "имеет специфичность для" и/или которая(ый) "имеет специфичность для" определенного эпитопа, антигена или белка (или для по меньшей мере его одной части, фрагмента или эпитопа) "против" или "направлена к" указанному эпитопу, антигену или белку или представляет собой "связывающую"(ый) молекулу/белок по отношению к такому эпитопу, антигену или белку.

Как используется в настоящей заявке, термины "связывание" и "специфическое связывание" относятся к связыванию антитела или антигенсвязывающего компонента (такого как иммуноглобулин, антитело, антигенсвязывающая единица, или фрагмент такой(го) антигенсвязывающей молекулы/белка) с эпитопом антигена в исследовании *in vitro*, предпочтительно в исследовании плазмонного резонанса ((Malmqvist M., "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics", *Curr Opin Immunol.* 1993 Apr; 5(2):282-6.)) с очищенным антигеном дикого типа. Аффинность антитела также может быть измерена, используя технологию анализа кинетического исключения (KinExA) (Darling, R.J., and Braut P.-A., "Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions", *ASSAY and Drug Development Technologies.* 2004, Dec 2(6): 647-657).

В целом, термин "специфичность" относится ко многим различным типам антигенов или эпитопов, с которыми может связываться предпочтительная(ый) антигенсвязывающая(ий) молекула/белок (такая как иммуноглобулин, антитело, антигенсвязывающая единица, или фрагмент такой(го) антигенсвязывающей молекулы/белка). Специфичность антигенсвязывающей(го) молекулы/белка может быть определена на основе ее(его) аффинности и/или avidности. Аффинность, характеризуемая константой равновесия для диссоциации антигена с антигенсвязывающим белком (K_D), представляет собой критерий силы связывания между эпитопом и антигенсвязывающим сайтом на антигенсвязывающей(м) молекуле/белке: чем меньше значение K_D , тем сильнее прочность связывания между эпитопом и антигенсвязывающей(им) молекулой/белком (альтернативно, аффинность также может быть представлена в виде константы аффинности (K_A), которая равна $1/K_D$). Как является очевидным для квалифицированного специалиста в данной области техники (например, на основании дальнейшего раскрытия, представленного в настоящей заявке), аффинность может быть определена с помощью метода, известного *per se*, в зависимости от специфического антигена, представляющего интерес. Avidность является показателем силы связывания между антигенсвязывающей(им) молекулой/белком (такой как иммуноглобулин, антитело, антигенсвязывающая единица, или фрагмент такой(го) антигенсвязывающей молекулы/белка) и релевантным антигеном. Avidность относится как к аффинности между эпитопом и его антигенсвязывающим сайтом на антигенсвязывающей(м) молекуле/белке, так и к числу релевантных связывающих сайтов, присутствующих на антигенсвязывающей(м) молекуле/белке. Термин "выделенный", как используется в настоящей заявке, относится к материалу, который выделен из его первоначальной или природной окружающей среды (например, природной окружающей среды, если он встречается в природе). Например, встречающийся в природе полинуклеотид или полипептид, присутствующий в живом организме животного, не является выделенным, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенный с помощью человеческого вмешательства от некоторых или всех совместно существующих материалов природной системе, является выделенным. Такие полинуклеотиды могут быть частью вектора и/или такие полинуклеотиды или полипептиды могут быть частью композиции, и все еще быть выделенными в том понимании, что такой вектор или композиция не является частью окружающей среды, в которой он обнаружен в природе. Например, молекула нуклеиновой кислоты, белка/полипептида рассматривается как представленная "(в) по существу выделенной (форме)" - если по сравнению с ее природным биологическим источником и/или реакционной средой или культивационной средой, из которой она была получена - если она была отделена от по меньшей мере одного другого компонента, с которым она обычно ассоциирована в указанном источнике или среде, таким как другая нуклеиновая кислота, другой белок/полипептид, другой биологический компонент или макромолекула или по меньшей мере один загрязнитель, примесь или второстепенный компонент. В особенности, молекула нуклеиновой кислоты или белка/полипептида рассматривается "по существу выделенной", если она была очищена по меньшей мере в 2 раза, в особенности по меньшей мере в 10 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 100 раз, и вплоть до 1000 раз или больше. Молекула нуклеиновой кислоты или белка/полипептида, которая находится "в по существу выделенной форме" предпочтительно является по существу гомогенной, как определено с помощью подходящей методики, например, подходящей хроматографической методики, например, полиакриламид-гельэлектрофорез.

Термины "идентичный" или "процент идентичности" касательно двух или большего количества

нуклеотидных или полипептидных последовательностей относится к двум или большему количеству последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Для определения процента идентичности последовательности выравнивают для оптимального сравнения (например, можно интродуцировать бреши в последовательность первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности для оптимального сравнительного анализа первичной структуры со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Когда в положении в первой последовательности находится такой же аминокислотный остаток или нуклеотид, что и в соответствующем положении во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в указанном положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от количества идентичных положений в последовательностях (т.е. % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений (например, перекрывающихся положений) $\times 100$). В некоторых вариантах осуществления изобретения две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после интродукции при необходимости брешей в последовательности (например, включая дополнительную последовательность, пропускающуюся за последовательностями, подлежащими сравнению). Например, когда сравнивают последовательности переменных областей, то лидерные и/или последовательности константных доменов не рассматриваются. При сравнении последовательностей двух последовательностей, "соответствующий" CDR относится к CDR, расположенному в одинаковом положении в обеих последовательностях (например, CDR-H1 каждой последовательности). Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма. Предпочтительным примером математического алгоритма, который можно применять для сравнения двух последовательностей, является (но не ограничиваясь только ими) алгоритм Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1990, с. 2264-2268, модифицированный согласно описанному у Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, с. 5873-5877. Указанный алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, описанные у Altschul и др., J. Mol. Biol. 215, 1990, с. 403-410. Анализ нуклеотидов с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы NBLAST, в которой балл = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей представляющей интерес белок. Анализ белков с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, в которой балл = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющему интерес белку. Для осуществления сравнительных анализов первичной структуры, включающей бреши, можно применять программу Gapped BLAST, описанную у Altschul и др., Nucleic Acids, 25, 1997, с. 3389-3402. В другом варианте можно применять PSI-Blast для осуществления итерационного поиска, позволяющего определять отдаленные взаимосвязи между молекулами (Id.). При применении программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно применять задаваемые по умолчанию параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным примером (но, не ограничиваясь только им) математического алгоритма, который можно применять для сравнения последовательностей, является алгоритм, описанный у Myers и Miller, CABIOS, 1989. Указанный алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ для сравнительного анализа первичной структуры последовательностей GCG. Когда программу ALIGN применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, то можно применять таблицу взвешенных остатков PAM120, штраф за длину бреши 12 и штраф за брешь 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей известны в данной области и включают ADVANCE и ADAM, описанные у Torellis и Robotti, Comput. Appl. Biosci. 10, 1994, с. 3-5; и FASTA, описанный у Pearson и Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, с. 2444-2448. В программе FASTA параметр k_{tup} обозначает контрольный параметр, который задает чувствительность и скорость поиска. Если $k_{\text{tup}} = 2$, то сходные области в двух подлежащих сравнению последовательностях выявляют путем просмотра пар выровненных остатков; если $k_{\text{tup}} = 1$, то оценивают индивидуальные выровненные аминокислоты. Для белковых последовательностей можно задавать значение k_{tup} , равное 2 или 1, а для последовательностей ДНК значения в пределах от 1 до 6. В альтернативном варианте сравнительный анализ первичной структуры белковых последовательностей можно осуществлять с помощью алгоритма CLUSTAL W, описанного у Higgins и др., Methods Enzymol. 266, 1996, с. 383-402.

Термин "ковалентно связанный", как используется в настоящей заявке, обозначает либо непосредственную ковалентную связь между остатками, или опосредованную ассоциацию, где два остатка не являются непосредственно связанными, но они оба ковалентно связаны с промежуточной молекулой или доменом, например, промежуточным доменом иммуноглобулина. Термины "конкурируют" или "перекрестно конкурируют" используются взаимозаменяемо в настоящей заявке по отношению к способности молекулы антитела препятствовать связыванию с молекулой антитела, например, молекулы антитела к DLL3 согласно изобретению, с мишенью, например, DLL3 человека. Препятствование связыванию может быть непосредственным или опосредованным (например, путем аллостерической модуляции молекулы антитела или мишени). Степень способности молекулы антитела препятствовать связыванию дру-

гой молекулы антитела с мишенью, и, следовательно, будет ли оно конкурировать, можно определить с помощью анализа конкурентного связывания, например, FACS анализа, ELISA или BIACORE анализа. В некоторых вариантах осуществления, анализ конкурентного связывания представляет собой количественный конкурентный анализ. В некоторых вариантах осуществления, первая молекула антитела к DLL3 конкурирует за связывание с мишенью со второй молекулой антитела к DLL3, если связывание первой молекулы антитела с мишенью уменьшено на 10% или больше, например, 20% или больше, 30% или больше, 40% или больше, 50% или больше, 55% или больше, 60% или больше, 65% или больше, 70% или больше, 75% или больше, 80% или больше, 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше, 98% или больше, 99% или больше в анализе конкурентного связывания (например, конкурентный анализ, описанный в настоящей заявке). Следует принять без детального пояснения и если другое не предусмотрено, что когда данная технология относится к полипептиду, белку, полинуклеотиду или антителу, то в объеме настоящей технологии охватывается его эквивалент или его биологический эквивалент.

Как используется в настоящей заявке, термин "его биологический эквивалент" является синонимом термина "его эквивалент" при ссылке на эталонный белок, антитело, полипептид, полинуклеотид или нуклеиновая кислота, и охватывает те, которые имеют минимальную гомологию, но все еще поддерживают желательную структуру или функциональность. Если специально не указано в настоящей заявке, то подразумевается, что любая нуклеиновая кислота, полинуклеотид, полипептид, белок или антитело, указанная в настоящей заявке, также охватывает ее (его) эквиваленты. Например, эквивалент предполагает по меньшей мере приблизительно 80% гомологии или идентичности и альтернативно, по меньшей мере приблизительно 85%, или альтернативно по меньшей мере приблизительно 90%, или альтернативно по меньшей мере приблизительно 95%, или альтернативно 98% процентов гомологии или идентичности и проявляет по существу эквивалентную биологическую активность к эталонному белку, полипептиду, антителу или нуклеиновой кислоте.

Как используется в настоящей заявке, термин "обнаруживаемая метка" относится к молекуле, соединению или композиции, которая может продуцировать обнаруживаемый сигнал, то есть физический или химический сигнал, включая колориметрический, флуоресцентный, электрический, радиоактивный и хемилюминесцентный сигнал, который может быть измерен с помощью визуальных или инструментальных методов, и который указывает на присутствие и/или количество/ концентрацию метки в образце. "Обнаруживаемый сигнал" может быть генерирован с помощью различных механизмов, включая абсорбцию, эмиссию и/или рассеивание фотона (включая фотоны в диапазоне радиочастоты, микроволновой частоты, инфракрасной частоты, видимой частоты и ультрафиолетовой частоты) и включает, но не ограничиваясь только ими, колориметрические, флуоресцентные, электрические, радиоактивные и хемилюминесцентные сигналы.

Как используется в настоящей заявке, "экспрессия" относится к процессу, с помощью которого полинуклеотиды транскрибируются в мРНК, и/или процессу, с помощью которого транскрибированная мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды, или белки. Если полинуклеотид имеет происхождение из геномной ДНК, то экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке. Уровень экспрессии гена может быть определен путем измерения количества мРНК или белка в клетке или образце ткани. Как используется в настоящей заявке термин "биологический образец" обозначает образец, имеющий происхождение из или находящийся в контакте с живыми клетками. Термин охватывает ткани, клетки и биологические жидкости, выделенные из субъекта. Как используется в настоящей заявке, термин "образец ткани" будет относиться к клеточному образцу, который сохраняет пространственное расположение поперечных срезов между клетками, как они существуют в субъекта, из которого был получен образец. Биологические образцы также могут быть получены из биопсий внутренних органов или из злокачественных новообразований.

"Гистохимия" и цитохимия" представляют собой техники, используемые для идентификации молекулы в контексте интактных клеток путем мечения образцов с помощью агентов, которые специфически связываются с молекулой таким образом, что могут быть визуализированы в микроскопе. "Иммуногистохимия" и "иммуноцитохимия" является типами гистохимии и цитохимии, которые используют антитела для мечения молекул.

Мультиспецифические связывающие белки согласно изобретению.

Настоящее изобретение обеспечивает мультиспецифические связывающие белки, включающие по меньшей мере одну антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с DLL3 (первую антигенсвязывающую единицу), и по меньшей мере одну антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3 (вторую антигенсвязывающую единицу). Такие (мультиспецифические) связывающие белки также обозначаются в настоящей заявке как (мульти-специфические) связывающие молекулы или DLL3/CD3 связывающие белки или DLL3/CD3 связывающие молекулы.

Изобретателями неожиданно было обнаружено, что мультиспецифические связывающие белки согласно изобретению индуцируют селективный лизис DLL3-положительных SCLC клеточных линий в присутствии Т-клеток и уже активные при низких соотношениях эффектор: клетка-мишень. Является важным, что связывающие белки в соответствии с изобретением не вызывают активации Т-клеток, пролиферации Т-клеток, и секреции цитокина при отсутствии DLL3-положительных клеток или лизиса

DLL3-отрицательных клеток.

Во избежание неопределенности, DLL3, как используется в настоящей заявке, относится к DLL3 человека UniProt Q9NYJ7 и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей этот белок. CD3, как используется в настоящей заявке относится, к комплексам CD3 эпсилон человека (UniProt P07766) и CD3 гамма (UniProt: P09693) (комплексы CD3 γ человека).

Полагают, что подход нацеливания DLL3 с привлечением биспецифических Т-клеток будет обеспечивать преимущества по сравнению с ADC подходом, так как на перенацеленные Т-клетки не оказывают влияние резистентность к химиотерапии и низкие уровни экспрессии на клеточной поверхности является менее критическим для этого механизма действия. Задействуемые Т-клетки представляют собой мультиспецифические связывающие белки со связывающими плечами к CD3 на Т-клетках и связывающими плечами к антигену на клеточной поверхности опухолевых клеток. Путем одновременно связывания с Т-клетками и опухолевыми клетками, задействованные Т-клетки принудительно образуют цитолитический синапс между двумя клетками и таким образом, перенацеливают активность Т-клеток селективно на целевые опухолевые клетки.

В одном аспекте, мультиспецифический связывающий белок согласно изобретению включает первую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с DLL3, и вторую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с CD3, где указанную первую связывающую единицу выбирают из группы, включающей I) - XVIII):

I) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#1);

II) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#2);

III) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#3);

IV) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) и SEQ ID NO:21 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) и SEQ ID NO:24 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#4);

V) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) и SEQ ID NO:27 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) и SEQ ID NO:30 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#5);

VI) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) и SEQ ID NO:33 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) и SEQ ID NO:36 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#6);

VII) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#7);

VIII) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) и SEQ ID NO:141 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) и SEQ ID NO:144 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#8);

IX) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:145 (CDR1), SEQ ID NO:146 (CDR2) и SEQ ID NO:147 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:148 (CDR1), SEQ ID NO:149 (CDR2) и SEQ ID NO:150 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#9);

X) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:151 (CDR1), SEQ ID NO:152 (CDR2) и SEQ ID NO:153 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:154 (CDR1), SEQ ID NO:155 (CDR2) и SEQ ID NO:156 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#10);

XI) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:157 (CDR1), SEQ ID NO:158 (CDR2) и SEQ ID NO:159 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:160 (CDR1), SEQ ID NO:161 (CDR2) и SEQ ID NO:162 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#11);

XII) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:163 (CDR1), SEQ ID NO:164 (CDR2) и SEQ ID NO:165 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:166 (CDR1), SEQ ID NO:167 (CDR2) и SEQ ID NO:168 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#12);

XIII) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:169 (CDR1), SEQ ID NO:170 (CDR2) и SEQ ID NO:171 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:172 (CDR1), SEQ ID NO:173 (CDR2) и SEQ ID NO:174 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#13);

XIV) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:175 (CDR1), SEQ ID NO:176 (CDR2) и SEQ ID NO:177 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:178 (CDR1), SEQ ID NO:179 (CDR2) и SEQ ID NO:180 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#14);

XV) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:181 (CDR1), SEQ ID NO:182 (CDR2) и SEQ ID NO:183 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:184 (CDR1), SEQ ID NO:185 (CDR2) и SEQ ID NO:186 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#15);

XVI) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:187 (CDR1), SEQ ID NO:188 (CDR2) и SEQ ID NO:189 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:190 (CDR1), SEQ ID NO:191 (CDR2) и SEQ ID NO:192 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#16);

XVII) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:193 (CDR1), SEQ ID NO:194 (CDR2) и SEQ ID NO:195 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:196 (CDR1), SEQ ID NO:197 (CDR2) и SEQ ID NO:198 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#17); и

XVIII) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:199 (CDR1), SEQ ID NO:200 (CDR2) и SEQ ID NO:201 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:202 (CDR1), SEQ ID NO:203 (CDR2) и SEQ ID NO:204 (CDR3) (антигенсвязывающая единица DLL3#18).

Предпочтительно, первая антигенсвязывающая единица связывающего белка согласно изобретению представляет собой любую из I) - III), как определено с помощью CDR последовательностей выше.

Во избежание неопределённости, каждый из специфических вариантов осуществления, перечисленных в настоящей заявке, также могут рассматриваться как независимые аспекты осуществления изобретения. В некоторых вариантах осуществления связывающего белка согласно изобретению, указанную вторую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с CD3, выбирают из группы, включающей I) - III):

I) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) и SEQ ID NO:57 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) и SEQ ID NO:60 (CDR3) (антигенсвязывающая единица CD3#1);

II) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3) (антигенсвязывающая единица CD3#2); и

III) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:96 (CDR1), SEQ ID NO:97 (CDR2) и SEQ ID NO:98 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:99 (CDR1), SEQ ID NO:100 (CDR2) и SEQ ID NO:101 (CDR3) (антигенсвязывающая единица CD3#3).

Первые антигенсвязывающие единицы I) - XVIII), как указано выше, обозначаются как DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 и DLL3#18, соответственно и вторые антигенсвязывающие единицы I) - III), как указано выше, обозначаются как CD3#1, CD3#2 и CD3#3, соответственно. В настоящей заявке представлена таблица последовательностей, которая предоставляет возможность легкой идентификации индивидуальных аминокислотных последовательностей для специфических антигенсвязывающих единиц и полноразмерных связывающих белков согласно настоящему изобретению. Сводные данные представлены в табл. 1 в примере 2.

Термины "первая" и "вторая" по отношению к антигенсвязывающим единицам в целом, как используется в настоящей заявке, предназначены исключительно для указания того, что эти единицы представляют собой различные единицы (так как они связываются с различными целевыми антигенами). Таким образом, эти термины не следует понимать как обозначение точного порядка или последовательности единиц в пределах связывающего белка согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первую антигенсвязывающую единицу, выбранную из группы, включающей DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3,

(CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3).

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с DLL3, включающие CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3) и вторую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с CD3, включающие CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3).

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с DLL3, включающие CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3) и вторую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с CD3, включающие CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3).

Дополнительно к CDR последовательностям, и как представлено в настоящей заявке, антигенсвязывающие единицы связывающих белков в соответствии с изобретением включают последовательности каркасной области (FR) иммуноглобулина. Эти последовательности предпочтительно не являются иммуногенными у людей, и, следовательно, предпочтительно представляют собой человеческие или гуманизированные FR последовательности. Подходящие человеческие или гуманизированные FR последовательности известны в данной области техники. Особенно предпочтительные FR последовательности могут быть заимствованы из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, описывающих полные антигенсвязывающие единицы и, следовательно, CDR последовательности, а также FR последовательности.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающих белков в соответствии с изобретением, первая и вторая связывающая единица каждая содержит переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, имеющий происхождение из молекулы антитела, где указанные переменные домены легкой/тяжелой цепи определены CDR последовательностям любой из DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 или DLL3#18 для первой антигенсвязывающей единицы и где указанные переменные домены легкой/тяжелой цепи определены CDR последовательностям любой из CD3#1, CD3#2 или CD3#3 для второй антигенсвязывающей единицы. В некоторых вариантах осуществления связывающего белка согласно изобретению, VH и/или VL домен антигенсвязывающих единиц для любой одной или нескольких из DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17, DLL3#18, CD3#1, CD3#2 или CD3#3 представляет собой человеческий или гуманизированный VH и/или VL домен.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, переменные домены легкой/тяжелой цепи первой антигенсвязывающей единицы дополнительно определены, как указано ниже:

I) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:37, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:38 (антигенсвязывающая единица DLL3#1); или

II) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:39, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:40 (антигенсвязывающая единица DLL3#2); или

III) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:41, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:42 (антигенсвязывающая единица DLL3#3); или

IV) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:43, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:44 (антигенсвязывающая единица DLL3#4); или

V) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:45, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:46 (антигенсвязывающая единица DLL3#5); или

VI) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:47, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:48 (антигенсвязывающая единица DLL3#6); или

VII) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:205, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:206 (антигенсвязывающая единица DLL3#7); или

VIII) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:207, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:208 (антигенсвязывающая единица DLL3#8); или

IX) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:209, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:210 (антигенсвязывающая единица DLL3#9); или

X) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:211, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:212 (антигенсвязывающая единица DLL3#10); или

XI) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:213, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:214 (антигенсвязывающая единица DLL3#11); или

XII) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:215, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:216 (антигенсвязывающая единица DLL3#12); или

XIII) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:217, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:218 (антигенсвязывающая единица DLL3#13); или

XIV) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:219, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:220 (антигенсвязывающая единица DLL3#14); или

XV) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:221, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:222 (антигенсвязывающая единица DLL3#15); или

XVI) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:223, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:224 (антигенсвязывающая единица DLL3#16); или

XVII) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:225, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:226 (антигенсвязывающая единица DLL3#17); или

XVIII) включающие вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:227, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:228 (антигенсвязывающая единица DLL3#18).

Предпочтительно, первая антигенсвязывающая единица связывающего белка согласно изобретению представляет собой любую из I) - III), как определено с помощью VL и VH последовательностей выше.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, вариабельные домены легкой/тяжелой цепи второй антигенсвязывающей единицы дополнительно определены, как указано ниже:

I) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68 (антигенсвязывающая единица CD3#1); или

II) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70 (антигенсвязывающая единица CD3#2); или

III) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103 (антигенсвязывающая единица CD3#3).

В некоторых вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает комбинацию первой и второй антигенсвязывающей единицы, выбранную из группы, включающей DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1, DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3, DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3, DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3, где первая и вторая антигенсвязывающая единица определены с помощью CDR и/или VH и VL последовательностей антигенсвязывающих единиц, как

опосредованно, со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи с помощью второго пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления связывающих белков в соответствии с изобретением, первая и/или вторая антигенсвязывающая единица дополнительно включает CL и CH1 домен, такой как в легком/тяжелом Fab домене общепринятой молекулы антитела, таким образом указанная первая связывающая единица включает а) VL домен (например, определенный с помощью CDR легкой цепи (LCCDR) или VL последовательностей любой из DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 или DLL3#18) ковалентно связанный (непосредственно или опосредованно связанный) с первым CL доменом и б) VH домен (например, определенный с помощью CDR тяжелой цепи (HCCDR) или VH последовательностей любой из DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 или DLL3#18) ковалентно связанный (непосредственно или опосредованно связанный) с первым CH1 доменом и/или указанный второй антигенсвязывающая единица включает а) VL домен (например, определенный с помощью LCCDR или VL последовательностей любой из CD3#1, CD3#2 или CD3#3), ковалентно связанный (непосредственно или опосредованно связанный) со вторым CL доменом и б) VH домен (например, определенный с помощью HCCDR или VH последовательностей любой из CD3#1, CD3#2 или CD3#3), ковалентно связанный (непосредственно или опосредованно связанный) со вторым CH1 доменом.

В контексте настоящего изобретения, CL домен представляет собой константный домен легкой цепи антитела, например, каппа (κ) или лямбда (λ) легкой цепи. Пример константной области каппа легкой цепи представлен в SEQ ID NO:87. Пример константной области лямбда легкой цепи представлен в SEQ ID NO:88. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй CL домен являются идентичными, например, первый и второй CL домен оба представляют собой константный домен каппа легкой цепи или первый и второй CL домен оба представляют собой константный домен лямбда легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй CL домен являются разными, например, первый CL домен представляет собой константный домен каппа, и второй CL домен представляет собой константный домен лямбда или наоборот. В контексте настоящего изобретения, CH1 домен представляет собой первый константный домен тяжелой цепи антитела. Пример константного CH1 домена представлен в SEQ ID NO:253.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающих белков в соответствии с изобретением, первая антигенсвязывающая единица (например, любая из DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 или DLL3#18, определенная с помощью CDR и/или VH/VL последовательностей, как указано выше) связывающих белков в соответствии с изобретением включает в направлении от N- до C-конца: первый вариабельный домен легкой цепи, первый CL домен, первый линкерный пептид, первый VH домен и первый CH1 домен, и/или вторая связывающая единица (например, любая из CD3#1, CD3#2 или CD3#3, определенная с помощью CDR и/или VH/VL последовательностей, как указано выше) связывающих белков в соответствии с изобретением включает в направлении от N- до C-конца: второй вариабельный домен легкой цепи, второй CL домен, второй линкерный пептид, второй VH домен, и второй CH1 домен. В этом варианте осуществления, первая и/или вторая связывающая единица имеют структуру одноцепочечного Fab. Для обоих, первой и/или второй антигенсвязывающей единицы, при образовании одноцепочечного Fab, порядок может быть обратным, таким образом, что в направлении от N- до C-конца антигенсвязывающая единица включает: VH-CH1-[линкерный пептид]-VL-CL. В некоторых вариантах осуществления белка в соответствии с изобретением, если первая и/или вторая антигенсвязывающая единица включают Fab или одноцепочечный Fab, то константные домены может быть одного и того же типа (например, оба CL домена представляют собой константные домены каппа или лямбда легкой цепи) или различных типов (первый CL домен представляет собой константный домен каппа легкой цепи, а второй CL домен представляет собой константный домен лямбда легкой цепи или наоборот).

В одном аспекте, линкер, используемый в связывающем белке согласно настоящему изобретению, включает 26-42 аминокислот, например, 30-40 аминокислот. В дальнейшем аспекте, линкер, используемый в белке согласно настоящему изобретению, включает 34-40 аминокислот, например, 36-39 аминокислот, например, 38 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, линкер включает последовательность согласно любой из SEQ ID NO:89, 90, 91, 92, 93, 94, или 95, предпочтительно SEQ ID NO:89. Линкерная последовательность может представлять собой встречающуюся в природе последовательность или не встречающуюся в природе последовательность. При использовании для терапевтических целей, линкер предпочтительно является неиммуногенным у субъекта, которому вводят связывающий белок согласно изобретению.

Одной из пригодных групп линкерных последовательностей являются линкеры, имеющие происхождение из шарнирной области тяжелой цепи антител, как описано в WO 1996/34103 и WO 1994/04678. Другими примерами являются поли-аланиновые линкерные последовательности, такие как Ala-Ala-Ala. Дальнейшими предпочтительными примерами линкерных последовательностей являются Gly/Ser линкеры различной длины, такие как (glyxser)_z линкеры, включая например, (gly4ser)₃, (gly4ser)₅, (gly4ser)₇, (gly3ser)₃, (gly3ser)₅, (gly3ser)₇,

(gly3ser2)3, (gly3ser2)5, и (gly3ser2)7 или линкер согласно любой из SEQ ID NO:89-95.

В некоторых вариантах осуществления связывающих белков в соответствии с изобретением, VL домен первой антигенсвязывающей единицы (например, определенный с помощью CDR легкой цепи (LCCDR) или VL последовательности из DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 или DLL3#18) ковалентно связан (например, непосредственно связан) с помощью первого Gly/Ser линкера (например, Gly/Ser линкер согласно любой из 26-42 аминокислот, 30-40 аминокислот, 34-40 аминокислот, или 36-39 аминокислот, предпочтительно 38 аминокислот) с VH доменом первой антигенсвязывающей единицы (например, определенный с помощью CDR тяжелой цепи (HCCDR) или VH последовательностями из DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 или DLL3#18); и VL домен второй антигенсвязывающей единицы (например, определенный с помощью CDR легкой цепи (LCCDR) или VL последовательности из CD3#1, CD3#2 или CD3#3) ковалентно связан (например, непосредственно связан) с помощью второго Gly/Ser линкера (например, Gly/Ser линкер согласно любой из 26-42 аминокислот, 30-40 аминокислот, 34-40 аминокислот, или 36-39 аминокислот, предпочтительно 38 аминокислот) с VH доменом второй антигенсвязывающей единицы (например, определенный с помощью CDR тяжелой цепи (HCCDR) или VH последовательностями из CD3#1, CD3#2 или CD3#3). Более предпочтительно, первый и второй линкер являются одинаковыми. Еще более предпочтительно, первый и второй линкер каждый содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:89. В некоторых вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, специфическую для DLL3, и включающий последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, и SEQ ID NO:240, и второй одноцепочечный Fab согласно SEQ ID NO:71, образующий вторую антигенсвязывающую единицу, специфическую для CD3. В предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую последовательность согласно SEQ ID NO:49, и второй одноцепочечный Fab, включающий последовательность согласно SEQ ID NO:71, образующий вторую антигенсвязывающую единицу. В предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую последовательность согласно SEQ ID NO:50, и второй одноцепочечный Fab, включающий последовательность согласно SEQ ID NO:71, образующий вторую антигенсвязывающую единицу. В предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую последовательность согласно SEQ ID NO:51, и второй одноцепочечный Fab, включающий последовательность согласно SEQ ID NO:71, образующий вторую антигенсвязывающую единицу.

В некоторых вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, специфическую для DLL3, и включающий последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, и SEQ ID NO:240, и второй одноцепочечный Fab согласно SEQ ID NO:72, образующий вторую антигенсвязывающую единицу, специфическую для CD3. В предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую последовательность согласно SEQ ID NO:49, и второй одноцепочечный Fab, включающий последовательность согласно SEQ ID NO:72, образующий вторую антигенсвязывающую единицу. В предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую последовательность согласно SEQ ID NO:50, и второй одноцепочечный Fab, включающий последовательность согласно SEQ ID NO:72, образующий вторую антигенсвязывающую единицу. В предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую последовательность согласно SEQ ID NO:51, и второй одноцепочечный Fab, включающий последовательность согласно SEQ ID NO:72, образующий вторую антигенсвязывающую единицу.

В некоторых вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, специфическую для DLL3, и включающий последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ

ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, и SEQ ID NO:240, и второй одноцепочечный Fab согласно SEQ ID NO:104, образующий вторую антигенсвязывающую единицу, специфическую для CD3. В предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую последовательность согласно SEQ ID NO:49, и второй одноцепочечный Fab, включающий последовательность согласно SEQ ID NO:104, образующий вторую антигенсвязывающую единицу. В предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую последовательность согласно SEQ ID NO:50, и второй одноцепочечный Fab, включающий последовательность согласно SEQ ID NO:104, образующий вторую антигенсвязывающую единицу. В предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первый одноцепочечный Fab, образующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую последовательность согласно SEQ ID NO:51, и второй одноцепочечный Fab, включающий последовательность согласно SEQ ID NO:104, образующий вторую антигенсвязывающую единицу.

В некоторых вариантах осуществления, первая антигенсвязывающая единица (например, DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 или DLL3#18, как определено с помощью CDR и/или VH/VL последовательностей, представленных выше) и/или вторая антигенсвязывающая единица (например, CD3#1, CD3#2 или CD3#3) включает VL домен, ковалентно связанный (например, непосредственно связанный) с CL доменом и VH домен, связанный с CH1 доменом (то есть вместе образующие Fab фрагмент, имеющий происхождение из антитела), и указанный CH1 домен дополнительно ковалентно связанный (например, непосредственно связанный) с Fc доменом, таким образом образуя плечо общепринятой Y-образной молекулы антитела с одной легкой и одной тяжелой цепью. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая антигенсвязывающая единица каждая образует Fab фрагмент, то есть первый и второй Fab фрагмент, который ковалентно связан (например, непосредственно связан) с первым и вторым Fc доменом, соответственно, таким образом образуя общепринятую гетеротетрамерную биспецифическую и бивалентную молекулу антитела.

В предпочтительных вариантах осуществления, первая антигенсвязывающая единица (например, любая из DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 или DLL3#18, как определено с помощью CDR и/или VH/VL последовательностей, представленных выше) и/или вторая антигенсвязывающая единица (например, любая из CD3#1, CD3#2 или CD3#3) включают одноцепочечный Fab, то есть легкую цепь антитела (VL-CL), ковалентно связанную с VH-CH1 доменом тяжелой цепи с помощью пептидного линкера (например, Gly/Ser линкер согласно любой из 26-42 аминокислот, 30-40 аминокислот, 34-40 аминокислот, или 36-39 аминокислот, предпочтительно 38 аминокислот, еще более предпочтительно линкер согласно SEQ ID NO:89). В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первую полипептидную цепь, включающую первый одноцепочечный Fab, специфически связывающийся с DLL3 (например, любой из DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 или DLL3#18, как определено с помощью соответствующих CDR или VH/VL последовательностей выше, предпочтительно первая антигенсвязывающая единица представляет собой DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3) и первый Fc домен (эта полипептидная цепь далее в настоящей заявке также обозначается как "DLL3 цепь"), и вторую полипептидную цепь, включающую второй одноцепочечный Fab, специфически связывающийся с CD3 (например, любой из CD3#1 CD3#2 или CD3#3, как определено с помощью соответствующих CDR или VH/VL последовательностей выше) и второй Fc домен (эта полипептидная цепь далее в настоящей заявке обозначается как "CD3 цепь"). В некоторых вариантах осуществления, первый и второй Fc домен являются одинаковыми. В предпочтительных вариантах осуществления, первый и второй Fc домены являются разными. Образованные связывающие белки согласно изобретению несут полный Fc и имеют два независимых связывающих сайта, первая связывающая единица для DLL3, и вторая связывающая единица для CD3. В некоторых вариантах осуществления, первая антигенсвязывающая единица состоит из единственной полипептидной цепи (DLL3 цепь). В некоторых вариантах осуществления, вторая антигенсвязывающая единица состоит из единственной полипептидной цепи (CD3 цепь). В некоторых вариантах осуществления, обе, первая и вторая антигенсвязывающая единица состоят из единственной полипептидной цепи, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, первая антигенсвязывающая единица белка в соответствии с изобретением образована первой полипептидной цепью (DLL3 цепь) и вторая антигенсвязывающая единица образована второй полипептидной цепью (CD3 цепь). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает две различные полипептидные цепи, каждая из них включает антигенсвязывающую единицу с разной специфичностью, полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, либо с помощью дисульфидных связей или потенциально с помощью пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению представляет собой биспецифический, бивалентный гетеродимерный белок, включающие две полипеп-

тидные, одна полипептидная цепь (первая полипептидная цепь или DLL3 цепь), включающая антиген-связывающую единицу, которая специфически связывается с DLL3, (например, любая из DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 или DLL3#18, определенная с помощью соответствующих CDR и/или VH/VL последовательностей), и другая полипептид цепь (вторую полипептидную цепь или CD3 цепь), включающая антигенсвязывающую единицу, специфически связывающуюся с CD3 (например, любую из CD3#1, CD3#2 или CD3#3).

В контексте настоящего изобретения, Fc домен имеет происхождение, например, из тяжелой цепи IgG, например, IgG₁, IgG₂ или IgG₄. Например, Fc домен согласно настоящему изобретению представляет собой Fc домен тяжелой цепи IgG₁ или IgG₄ и включает шарнирную область и два константных домена (C_{H2} и C_{H3}). Примеры Fc доменов (включая шарнирную область) представлены в SEQ ID NO:81 и 84.

Нумерация аминокислот в аминокислотных цепях белка согласно настоящему изобретению в данной заявке осуществляется согласно системе EU нумерации (Edelman, Cunningham и др. 1969), если специально не указано иначе. Это обозначает, что указанная нумерация аминокислот в данной заявке соответствует положениям тяжелой цепи соответствующего подтипа (например, IgG₁ или IgG₄), в соответствии с системой EU нумерации, если специально не указано иначе.

В некоторых вариантах осуществления, первый Fc домен, и второй Fc домен в белке согласно настоящему изобретению каждый включает одно или несколько аминокислотных изменений, которые уменьшают образование гомодимеров первой или второй полипептидных цепей вместо гетеродимеров первой или второй полипептидной цепи. Благодаря этим изменениям, создается "протрузия" в одном из Fc доменов путем замены одного или нескольких, небольших боковых цепей аминокислот из области контакта одной из тяжелых цепей на более крупные боковые цепи (например, тирозин или триптофан). Компенсаторные "полости" идентичного или сходного размера создаются на области контакта другого Fc домена путем замены крупных боковых цепей аминокислот на боковые цепи меньшего размера (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм повышения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры, в особенности гомодимеры Fc домена с "протрузией" (см., например, Ridgway и др. Protein Eng, 1996. 9(7): с. 617-21; Atwell и др., JMB, 1997, 270, 26-35). В некоторых вариантах осуществления, такие аминокислотные изменения представляют собой тирозин (Y) в положении 366 [T366Y] первого Fc домена и треонин (T) в положении 407 [Y407T] второго Fc домена. В некоторых вариантах осуществления, первый Fc домен включает серин (S) в положении 366 [T366S], и второй Fc домен включает триптофан (W) в положении 366 [T366W], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V]. В предпочтительных вариантах осуществления, первый Fc домен включает триптофан (W) в положении 366 [T366W], и второй Fc домен включает серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V]. Например, положение 366 Fc домена в соответствии с EU нумерацией, что соответствует положению аминокислоты 146 в Fc последовательности IgG1 человека согласно SEQ ID NO:81, изменено вместо T в положении 146 в SEQ ID NO:81 на W в положении 146 в SEQ ID NO:82; и положения 366, 368 и 407 в соответствии с EU нумерацией, что соответствует положением аминокислот 146, 148 и 187, соответственно, в SEQ ID NO:81, изменены вместо T, L и Y в этих положениях в SEQ ID NO:81 на S, A и V в этих положениях в SEQ ID NO:83. В любом из этих вариантов осуществления, аминокислотные изменения, описанные для первого Fc домена, могут быть расположены во втором Fc домене и соответствующие аминокислотные изменения для второго Fc домена могут быть расположены в первом Fc домене. Другими словами, термин "первый" и "второй" могут быть заменены в этих вариантах осуществления. В некоторых вариантах осуществления, такой Fc домен представляет собой Fc домен, имеющий происхождение из тяжелой цепи IgG₁ или IgG₄.

В некоторых вариантах осуществления, первый Fc домен включает цистеин (C) в положении 354 [S354C] дополнительно к триптофану (W) в положении 366 [T366W], и второй Fc домен включает цистеин (C) в положении 349 [Y349C] дополнительно к серину (S) в положении 366 [T366S], аланину (A) в положении 368 [L368A] и валину (V) в положении 407 [Y407V]. В одном аспекте, такой Fc домен представляет собой Fc домен, имеющий происхождение из тяжелой цепи IgG₄.

В некоторых вариантах осуществления, первый Fc домен или второй Fc домен в связывающем белке согласно настоящему изобретению дополнительно включает одну или несколько аминокислотных изменений, которые уменьшают связывание Fc домена с белком А. В некоторых вариантах осуществления, такие аминокислотные изменения представляют собой аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F] одного из Fc доменов. Оба изменения имеют происхождение из последовательности IgG3 человека (IgG3 не связывается с белком А). Эти две мутации расположены в CH3 домене и инкорпорированы в один из Fc доменов для уменьшения связывания с Белком А (см., например, Jendeborg и др. J Immunol Methods, 1997. 201(1): р. 25-34). Эти два изменения облегчают удаление гомодимеров тяжелых цепей, содержащих эти изменения во время очистки белка.

В некоторых вариантах осуществления, в связывающем белке согласно настоящему изобретению, Fc домен, который включает треонин (T) в положении 407 [Y407T], дополнительно включает аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F]. В этом случае, другая тяжелая цепь

включает тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], но не включает два изменения в положениях 435 и 436. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, в белке согласно настоящему изобретению, Fc домен, который включает серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V], дополнительно включает аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F]. В этом случае, другой Fc домен включает триптофан (W) в положении 366 [T366W], но не включает два изменения в положениях 435 и 436. Таким образом, Fc домен, включающий аминокислотное изменение, которое приводит к "полости", как описано выше, также включает аминокислотные изменения, которые уменьшают связывание с Белком А. Гомодимеры, включающие этот Fc домен, удалены в рамках уменьшения связывания с Белком А. Продукция гомодимеров другого Fc домена, который включает "протрузию", уменьшено путем наличия "протрузии". В некоторых вариантах осуществления, Fc домен белка согласно настоящему изобретению дополнительно может включать или не включать YTE мутации (M252Y/S254T/T256E, EU нумерация (Dall'Acqua, Kiener и др. 2006)). Было показано, что эти мутации улучшают фармакокинетические свойства Fc доменов посредством предпочтительного усиления связывающей аффинности к неонатальному FcRn рецептору при pH 6,0.

В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй Fc домен согласно настоящему изобретению, имеющий происхождение из IgG1, также включает "КО" мутации (L234A, L235A). В дальнейшем аспекте, первый и/или второй Fc домен согласно настоящему изобретению, имеющий происхождение из IgG4, также включает Pro шарнирную мутацию (S228P).

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, связывающий белок включает: I) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:73, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#1/CD3#1), или II) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:74, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#2/CD3#1), или III) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:75, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#3/CD3#1), или IV) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:76, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#4/CD3#1), или V) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:77, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#5/CD3#1), или VI) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:78, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#6/CD3#1); или VII) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:241, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#7/CD3#1); или VIII) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:242, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#8/CD3#1); или IX) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:243, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#9/CD3#1); или X) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:244, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#10/CD3#1); или XI) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:245, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#11/CD3#1); или XII) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:246, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#12/CD3#1); или XIII) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:247, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#13/CD3#1); или XIV) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:248, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#14/CD3#1); или XV) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:249, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#15/CD3#1), или XVI) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:250, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#16/CD3#1); или XVII) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:251, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79 (DLL3#17/CD3#1); или XVIII) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:252, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность

(DLL3#16/CD3#3); или XVII) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:251, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:105 (DLL3#17/CD3#3); или XVIII) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:252, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:105 (DLL3#18/CD3#3). Предпочтительно, первая и вторая полипептидная цепь связаны с помощью одной или нескольких дисульфидных связей и образуют антитело-подобную структуру (фиг. 1), сходную с общепринятой Y-образной молекулой антитела.

В другом предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок включает первую полипептидную цепь, специфическую к DLL3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, и SEQ ID NO:75, и вторую полипептидную цепь, специфическую к CD3, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:105.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок включает первую полипептидную цепь, специфическую к DLL3, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:73 и вторую полипептидную цепь, специфическую к CD3, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:105.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок включает первую полипептидную цепь, специфическую к DLL3, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:74 и вторую полипептидную цепь, специфическую к CD3, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:105.

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок включает первую полипептидную цепь, специфическую к DLL3, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:75 и вторую полипептидную цепь, специфическую к CD3, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:105.

Для всех вышеописанных вариантов осуществления изобретения следует принять во внимание, что термин "включающий" также охватывает вариант осуществления, в котором соответствующий домен или молекула "состоит из" аминокислотной последовательности, как указано.

В дальнейшем аспекте, настоящее изобретение обеспечивает белок, включающий первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, где первая цепь включает первую легкую цепь, ковалентно связанную (например, непосредственно связанную) с первым линкером, который сам ковалентно связан (например, непосредственно связан) с первой тяжелой цепью, и где вторая цепь, которая специфически связывается с CD3, включает вторую легкую цепь, ковалентно связанную (например, непосредственно связанную), со вторым линкером, который сам ковалентно связан (например, непосредственно связан) со второй тяжелой цепью.

В некоторых вариантах осуществления, начиная с ее N-конца, первая полипептидная цепь включает первую переменную область легкой цепи, которая специфически связывается с DLL3, первую константную область легкой цепи, первый линкер, первую переменную область тяжелой цепи, которая специфическая к DLL3, и первую константную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления, начиная с ее N-конца, вторая полипептидная цепь включает вторую переменную область легкой цепи, которая специфически связывается с CD3, вторую константную область легкой цепи, второй линкер, вторую переменную область тяжелой цепи, которая специфическая к CD3 и вторую константную область тяжелой цепи. Полученные белки несут полный Fc, который немного больше, чем IgG, и имеет два независимых связывающих сайта (например, каждый связывающий сайт, который является моновалентным для соответствующего антигена), первый связывающий сайт для DLL3, и второй связывающий сайт для CD3. Предпочтительно, первая и вторая полипептидная цепь связаны с помощью одной или нескольких дисульфидных связей. Как таковые, белки согласно изобретению представляют собой антитело-подобные структуры, имеющие Y-образную структуру общепринятого полноразмерного антитела (см. фиг. 1).

Этот биспецифический формат значительно уменьшает гетерогенность после экспрессии и очистки (например, путем избегания ошибочного спаривания переменных доменов легкой и тяжелой цепей с различными связывающими специфичностями), при этом поддерживая функциональные свойства связывающих компонентов в пределах структуры, менее вероятно вызывающей нежелательные иммуногенные реакции. Это также обеспечивает хорошую экспрессию гетеродимерных белков, например, в клетках млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления белка в соответствии с изобретением, первая полипептидная цепь, которая специфически связывается с DLL3, включает первый переменный домен легкой цепи и первый переменный домен тяжелой цепи, которые включают CDR последовательности, выбранные из группы, включающей I) - XVIII):

I) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3);

II) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3);

III) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3);

IV) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) и SEQ ID NO:21 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) и SEQ ID NO:24 (CDR3);

V) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) и SEQ ID NO:27 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) и SEQ ID NO:30 (CDR3); и

VI) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) и SEQ ID NO:33 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) и SEQ ID NO:36 (CDR3);

VII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3);

VIII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) и SEQ ID NO:141 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) и SEQ ID NO:144 (CDR3);

IX) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:145 (CDR1), SEQ ID NO:146 (CDR2) и SEQ ID NO:147 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:148 (CDR1), SEQ ID NO:149 (CDR2) и SEQ ID NO:150 (CDR3);

X) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:151 (CDR1), SEQ ID NO:152 (CDR2) и SEQ ID NO:153 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:154 (CDR1), SEQ ID NO:155 (CDR2) и SEQ ID NO:156 (CDR3);

XI) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:157 (CDR1), SEQ ID NO:158 (CDR2) и SEQ ID NO:159 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:160 (CDR1), SEQ ID NO:161 (CDR2) и SEQ ID NO:162 (CDR3);

XII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:163 (CDR1), SEQ ID NO:164 (CDR2) и SEQ ID NO:165 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:166 (CDR1), SEQ ID NO:167 (CDR2) и SEQ ID NO:168 (CDR3);

XIII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:169 (CDR1), SEQ ID NO:170 (CDR2) и SEQ ID NO:171 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:172 (CDR1), SEQ ID NO:173 (CDR2) и SEQ ID NO:174 (CDR3);

XIV) включающие CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:175 (CDR1), SEQ ID NO:176 (CDR2) и SEQ ID NO:177 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:178 (CDR1), SEQ ID NO:179 (CDR2) и SEQ ID NO:180 (CDR3);

XV) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:181 (CDR1), SEQ ID NO:182 (CDR2) и SEQ ID NO:183 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:184 (CDR1), SEQ ID NO:185 (CDR2) и SEQ ID NO:186 (CDR3);

XVI) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:187 (CDR1), SEQ ID NO:188 (CDR2) и SEQ ID NO:189 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:190 (CDR1), SEQ ID NO:191 (CDR2) и SEQ ID NO:192 (CDR3);

XVII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:193 (CDR1), SEQ ID NO:194 (CDR2) и SEQ ID NO:195 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:196 (CDR1), SEQ ID NO:197 (CDR2) и SEQ ID NO:198 (CDR3); и

XVIII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:199 (CDR1), SEQ ID NO:200 (CDR2) и SEQ ID NO:201 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:202 (CDR1), SEQ ID NO:203 (CDR2) и SEQ ID NO:204 (CDR3).

Соответствующие переменные домены легкой/ тяжелой цепи, определяемые с помощью этих CDR последовательностей, обозначаются как DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17, и DLL3#18, соответственно. Предпочтительно, CDR последовательности выбирают из группы, включающей I) - III) (DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3), как определено выше.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающего белка согласно изобретению, указанная вторая полипептидная цепь, которая специфически связывается с CD3, включает второй переменный домен легкой цепи и второй переменный домен тяжелой цепи, который включает CDR последова-

цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3), и второй варибельный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3).

В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает (I) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающие первый варибельный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3) и первый варибельный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3); и (II) вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающие второй варибельный домен легкой цепи с CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3), и второй варибельный домен тяжелой цепи с CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3). В предпочтительных вариантах осуществления белка в соответствии с изобретением, указанная первая полипептидная цепь, которая специфически связывается с DLL3, включает варибельный домен легкой цепи (первый варибельный домен легкой цепи) и варибельный домен тяжелой цепи (первый варибельный домен тяжелой цепи), выбранный из группы, включающей I) - XVIII):

I) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:37, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:38 (DLL3#1);

II) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:39, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:40 (DLL3#2);

III) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:41, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:42 (DLL3#3);

IV) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:43, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:44 (DLL3#4);

V) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:45, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:46 (DLL3#5);

VI) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:47, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:48 (DLL3#6);

VII) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:205, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:206 (DLL3#7);

VIII) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:207, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:208 (DLL3#8);

IX) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:209, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:210 (DLL3#9);

X) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:211, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:212 (DLL3#10);

XI) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:213, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:214 (DLL3#11);

XII) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:215, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:216 (DLL3#12);

XIII) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:217, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:218 (DLL3#13);

XIV) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:219, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:220 (DLL3#14);

XV) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:221, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ

ID NO:222 (DLL3#15);

XVI) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:223, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:224 (DLL3#16);

XVII) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:225, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:226 (DLL3#17); и

XVIII) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:227, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:228 (DLL3#18).

Предпочтительно, последовательности варибельного домена легкой цепи и варибельного домена тяжелой цепи выбирают из группы, включающей I) - III) (DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3), как определено выше.

В предпочтительных вариантах осуществления белка в соответствии с изобретением, указанная вторая полипептидная цепь, которая специфически связывается с CD3, включает варибельный домен легкой цепи (второй варибельный домен легкой цепи) и варибельный домен тяжелой цепи (второй варибельный домен тяжелой цепи), выбранный из группы, включающей:

I) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68 (CD3#1);

II) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70 (CD3#2); и

III) варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103 (CD3#3).

В некоторых вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первую, и вторую полипептидную цепь, включающую CDR и/или VH и VL последовательности из варибельных доменов легкой/тяжелой цепи, выбранные из перечня, включающего DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1, DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3 и DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3, DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3. В предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает первую, и вторую полипептидную цепь, включающую CDR и/или VH и VL последовательности из варибельных доменов легкой/тяжелой цепи, выбранные из перечня, включающего DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, и DLL3#3/CD3#3. В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает (I) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающие варибельный домен легкой цепи согласно SEQ ID NO:37 и варибельный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:38; и (II) вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающие варибельный домен легкой цепи согласно SEQ ID NO:67 и варибельный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:68. В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает (I) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающие варибельный домен легкой цепи согласно SEQ ID NO:39 и варибельный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:40; и (II) вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающие варибельный домен легкой цепи согласно SEQ ID NO:67 и варибельный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:68. В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает (I) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающие варибельный домен легкой цепи согласно SEQ ID NO:41 и варибельный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:42; и (II) вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающие варибельный домен легкой цепи согласно SEQ ID NO:67 и варибельный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:68. В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает (I) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающие варибельный домен легкой цепи согласно SEQ ID NO:37 и варибельный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:38; и (II) вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающие варибельный домен легкой цепи согласно

SEQ ID NO:69 и переменный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:70. В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает (I) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающие переменный домен легкой цепи согласно SEQ ID NO:39 и переменный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:40; и (II) вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающие переменный домен легкой цепи согласно SEQ ID NO:69 и переменный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:70. В одном предпочтительном варианте осуществления, связывающий белок согласно изобретению включает (I) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающие переменный домен легкой цепи согласно SEQ ID NO:41 и переменный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:42; и (II) вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающие переменный домен легкой цепи согласно SEQ ID NO:69 и переменный домен тяжелой цепи согласно SEQ ID NO:70. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый и/или второй линкерный пептид включают линкер, как описано выше, например, линкер, имеющий происхождение из шарнирной области, поли-аланиновый линкер или Gly/Ser линкер, где линкер включает 26-42 аминокислот, например, любое количество из 30-40 аминокислот, 34-40 аминокислот, или 36-39 аминокислот, предпочтительно 38 аминокислот.

В предпочтительных вариантах осуществления, первая полипептидная цепь, специфическая к DLL3, включает аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и вторая полипептидная цепь, специфическая к CD3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:71.

В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь, специфическая к DLL3, включает аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и вторая полипептидная цепь, специфическая к CD3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:72.

В некоторых вариантах осуществления, первая полипептидная цепь, специфическая к DLL3, включает аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и вторая полипептидная цепь, специфическая к CD3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:104.

В одном предпочтительном варианте осуществления, первая полипептидная цепь, специфическая к DLL3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:49 и вторая полипептидная цепь, специфическая к CD3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:71. В одном предпочтительном варианте осуществления, первая полипептидная цепь, специфическая к DLL3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:50 и вторая полипептидная цепь, специфическая к CD3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:71.

В одном предпочтительном варианте осуществления, первая полипептидная цепь, специфическая к DLL3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:51 и вторая полипептидная цепь, специфическая к CD3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:71.

В одном предпочтительном варианте осуществления, первая полипептидная цепь, специфическая к DLL3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:49 и вторая полипептидная цепь, специфическая к CD3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:72.

В одном предпочтительном варианте осуществления, первая полипептидная цепь, специфическая к DLL3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:50 и вторая полипептидная цепь, специфическая к CD3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:72.

В одном предпочтительном варианте осуществления, первая полипептидная цепь, специфическая к DLL3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:51 и вторая полипептидная цепь, специфическая к CD3, включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:72.

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка согласно изобретению, первая и вторая полипептидная цепь включает Fc домен, имеющий происхождение из тяжелой цепи IgG, например, IgG1, IgG2 или IgG4.

Например, Fc домен согласно настоящему изобретению представляет собой Fc домен тяжелой цепи из IgG1 или IgG4 и включает шарнирную область и два константных домена (CH2 и CH3). Примеры Fc доменов человеческих IgG представлены в SEQ ID NO:81 и 84.

В некоторых вариантах осуществления связывающего белка согласно изобретению, тяжелая цепь включает одну или несколько аминокислотных изменений. Например, такие аминокислотные изменения представляют собой тирозин (Y) в положении 366 [T366Y] первой тяжелой цепи и треонин (T) в положении 407 [Y407T] второй тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления, первая тяжелая цепь

включает серин (S) в положении 366 [T366S] и вторая тяжелая цепь включает триптофан (W) в положении 366 [T366W], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V]. В предпочтительных вариантах осуществления, первая тяжелая цепь включает триптофан (W) в положении 366 [T366W] и вторая тяжелая цепь включает серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V]. Например, положение 366 Fc домена в соответствии с EU нумерацией, что соответствует положению аминокислоты 146 в Fc последовательности IgG1 человека согласно SEQ ID NO:81, изменено из T в положении 146 в SEQ ID NO:81 на W в положении 146 в SEQ ID NO:82; и положения 366, 368 и 407 в соответствии с EU нумерацией, что соответствует положением аминокислот 146, 148 и 187, соответственно, в SEQ ID NO:81, изменены вместо T, L и Y в этих положениях в SEQ ID NO:81 на S, A и V в этих положениях в SEQ ID NO:83. В любом из этих вариантов осуществления, аминокислотные изменения, описанные для первой тяжелой цепи, могут быть расположены во второй тяжелой цепи и соответствующие аминокислотные изменения для второй тяжелой цепи могут быть расположены в первой тяжелой цепи. Другими словами, термин "первый" и "второй" могут быть заменены в этих вариантах осуществления. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь имеет происхождение из тяжелой цепи IgG₁ или IgG₄.

В некоторых вариантах осуществления, первая тяжелая цепь или вторая тяжелая цепь в белке согласно настоящему изобретению дополнительно включает одну или несколько аминокислотных изменений, которые уменьшают связывание тяжелой цепи с белком А. В некоторых вариантах осуществления, такие аминокислотные изменения представляют собой аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F] одной из тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления, в белке согласно настоящему изобретению, тяжелая цепь, которая включает треонин (T) в положении 407 [Y407T], дополнительно включает аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F]. В этом случае, другая тяжелая цепь включает тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], но не включает два изменения в положениях 435 и 436. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, в белке согласно настоящему изобретению, тяжелая цепь, которая включает серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V], дополнительно включает аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F]. В этом случае, другая тяжелая цепь включает триптофан (W) в положении 366 [T366W], но не включает два изменения в положениях 435 и 436. Таким образом, тяжелая цепь, включающая аминокислотное изменение, приводящее к "полости", как описано выше, также включает аминокислотные изменения, которые уменьшают связывание с Белком А. Гомодимеры, включающие эти тяжелые цепи, удаляют для уменьшения связывания с Белком А. Продукция гомодимеров другой тяжелой цепи, которые включают "протрузию", уменьшается путем наличия "протрузии".

В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь белка согласно настоящему изобретению может дополнительно включать или может не включать YTE мутации (M252Y/S254T/T256E, EU нумерация (Dall'Acqua, Kiener и др. 2006)). Было показано, что эти мутации улучшают фармакокинетические свойства тяжелой цепи посредством предпочтительного усиления связывающей аффинности к неонатальному FcRn рецептору при pH 6,0.

В некоторых вариантах осуществления, первая и/или вторая тяжелая цепь согласно настоящему изобретению, имеющая происхождение из IgG1, также включает "КО" мутации (L234A, L235A). В дальнейшем аспекте, первая и/или вторая тяжелая цепь согласно настоящему изобретению, имеющая происхождение из IgG4, также включает Pro шарнирную мутацию (S228P). В дальнейшем аспекте, белки согласно изобретению включают первую антигенсвязывающую единицу или полипептидную цепь, специфическую к DLL3, с аффинностью предпочтительно ≤ 10 нМ, более предпочтительно ≤ 1 нМ, еще более предпочтительно $\leq 0,1$ нМ, еще более предпочтительно $\leq 0,01$ нМ к DLL3 человека и яванской макаки. Аффинность может быть измерена в SPR (BIAcore) анализе, используя рекомбинантный DLL3-белок, как описано, например, в примерах или других способах, которые хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области техники. Белки включают вторую антигенсвязывающую единицу или полипептидную цепь с аффинностью предпочтительно ≤ 500 нМ, более предпочтительно ≤ 100 нМ, еще более предпочтительно ≤ 10 нМ к комплексу CD3 ϵ человека и яванской макаки. В дальнейшем аспекте, DLL3/CD3 связывающие белки согласно изобретению не связываются с DLL3-отрицательными клетками и перекрестно не реагируют с человеческим и DLL3 паралогами DLL1 и DLL4, как показано в примере 5. В дальнейшем аспекте, DLL3/CD3 связывающие белки согласно настоящему изобретению включают первую антигенсвязывающую единицу или первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с мембранным проксимальным пептидом DLL3 белка. В дальнейшем аспекте, белки согласно изобретению проявляют слабое связывание с клетками, экспрессирующими DLL3 белок, например, не достигают насыщающегося связывания белка с клеточной поверхностью вплоть до концентрации 100 нМ (см., например, фиг. 6).

В дальнейшем аспекте, DLL3/CD3 связывающие белки согласно настоящему изобретению способны опосредовать цитотоксичность по отношению к опухолевыми клетками путем обеспечения оптимальных стерических условий для образования цитолитического синапса между опухолевой клеткой,

экспрессирующей DLL3, и Т-клеткой, для перенаправления активности Т-клеток селективно на целевые опухолевые клетки, что приводит к лизису опухолевых клеток.

Различные методы можно использовать для измерения цитотоксичности, опосредуемой DLL3/CD3 связывающими белками согласно настоящему изобретению. Например, цитотоксичность может быть измерена с применением метода, описанного в примере 10. Эффекторные клетки, могут представлять собой, например, стимулированные или нестимулированные (человека или яванской макаки) Т-клетки или их поднаборы (например, CD4, CD8) или нестимулированные (человека или яванской макаки) мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). Целевые клетки должны экспрессировать по меньшей мере внеклеточный домен (человека или яванской макаки) DLL3 и могут представлять собой клетки с эндогенной (натуральной) DLL3 экспрессией, такие как клеточные линии мелкоклеточной карциномы легких человека SHP77, NCI-H82, альтернативно также рекомбинантные клетки, которые экспрессируют либо полноразмерный DLL3 или внеклеточный домен из DLL3. Соотношение эффектора к клетке-мишени (E:T) обычно составляет около 10:1, но может изменяться. Цитотоксическая активность DLL3/CD3 связывающих молекул может быть определена, например, в анализе LDH-высвобождения после инкубации в течение 48 или 72 ч. Возможны модификации времени инкубирования и считывания данных, используемых для определения цитотоксичности и это известно для квалифицированного специалиста в данной области техники. Системы считывания данных для цитотоксичности могут включать МТТ/MTS анализы, анализы на основе АТФ, анализы на основе FACS, анализы высвобождения 51-Хрома, анализы сульфородамина В (SRB), колориметрические (WST) анализы, клоногенные анализы, ECIS технологию и биолюминесцентные анализы.

Цитотоксическую активность, опосредуемую с помощью DLL3/CD3 связывающих белков согласно настоящему изобретению, предпочтительно измеряют в клеточном анализе цитотоксичности. Цитотоксичность представляют в виде EC₉₀ значений, измеренных в анализе цитотоксичности. Для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятно, что можно ожидать более низкие значения EC₉₀ при использовании очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток, по сравнению с PBMC, также для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятно, что EC₉₀ значение может быть еще ниже, если использовать стимулированные Т-клетки. Кроме того, можно ожидать, что EC₉₀ значения являются ниже, если целевые клетки экспрессируют большое количество DLL3 на клеточной поверхности по сравнению с клеткой, экспрессирующей небольшое количество DLL3 молекул на клеточной поверхности. Значение EC₉₀ для DLL3/CD3 связывающего белка предпочтительно составляет ≤ 10 нМ, более предпочтительно ≤ 5 нМ и еще более предпочтительно ≤ 1 нМ. Предпочтительно, мультиспецифические связывающие белки согласно изобретению не индуцируют/ опосредуют лизис DLL3 отрицательных клеток. Термин "не индуцируют/ опосредуют лизис" DLL3 отрицательных клеток обозначает, что DLL3/CD3 связывающая молекула не индуцирует или не опосредует лизис более чем на 30%, предпочтительно не более, чем на 20%, более предпочтительно не более, чем на 10% и в особенности, не более, чем на 5% или DLL3-отрицательные клетки, в то время как лизис DLL3-положительной клеточной линии карциномы легких принят за 100%. Это обычно применяется для концентраций связывающего белка вплоть до 1000 нМ.

Предпочтительно, DLL3/CD3 связывающие белки согласно изобретению не интернализируются клетками-мишенями. Скорость интернализации может быть измерена, например, как описано в примере 11. Предпочтительно, скорость интернализации (например, измеренная в качестве снижения цитотоксичности) составляет ≤ 50% после 4 ч предварительной инкубации DLL3/CD3 связывающих белков с клетками-мишенями, более предпочтительно ≤ 40% и еще более предпочтительно ≤ 30%.

Кроме того, показано, что DLL3/CD3 связывающие белки согласно изобретению являются стабильными с содержанием мономера выше 95% (например, по меньшей мере 98%, см. пример 14), имеют благоприятные фармакокинетические свойства и хорошую дальнейшую производственную технологичность и, кроме того, как предполагают, имеют хорошее био-распределение (см., например, пример 12). Белки согласно настоящему изобретению кроме того имеют благоприятный профиль иммуногенности (см. пример 16) и имеют хорошую стабильность *in-vitro* и *in-vivo* (см., например, примеры 12 и 15). Кроме того, DLL3/CD3 связывающие белки согласно изобретению (например, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2) проявляют благоприятную эффективность на гуманизированной *in vivo* модели ксенотрансплантата у мышей. DLL3/CD3 связывающие белки индуцируют сильную регрессию опухоли, начиная уже после первой дозы DLL3/CD3 связывающих белков. Кроме того, DLL3/CD3 связывающие белки согласно изобретению индуцируют регрессию опухоли при очень низких дозах 0,25 мг/кг при введении один раз в неделю (q7d), дополнительно подтверждая их терапевтическую применимость. В особенности, DLL3/CD3 связывающие белки согласно изобретению индуцируют селективно пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток, дегрануляцию Т-клеток и секрецию цитокинов (см. пример 18) только в присутствии DLL3-положительных клеток-мишеней и не в присутствии DLL3-отрицательных клеток-мишеней, и дополнительно существенно усиливают инфильтрацию Т-клеток в опухолевую ткань (см. пример 20). Кроме того, в примере 19 было показано, что DLL3/CD3 связывающие белки опосредуют CD4⁺, а также CD8⁺ Т-клеточный перенацеленный лизис. В особенности, интактные Т-клетки, а также клетки CD4⁺ эф-

факторной памяти, CD4⁺ центральной памяти, CD8⁺CD45RA⁺ эффекторные и CD8⁺ клетки памяти способствуют Т-клеточному перенацеленному лизису DLL3-экспрессирующих опухолевых клеток. Дальнейший аспект настоящего изобретения обеспечивает выделенные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие первую и/или вторую антигенсвязывающую единицу мультиспецифического связывающего белка согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновых кислот дополнительно кодируют первый и/или второй Fc домен, как описано в настоящей заявке, первый и/или второй Fc домен, связанный с 3' концом молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей первую и/или вторую антигенсвязывающую единицу, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты кодирует I) первую полипептидную цепь, включающую первый одноцепочечный Fab, специфичный к DLL3 (например, любой из DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 и DLL3#18), и необязательно первый Fc домен и/или II) вторую полипептидную цепь, включающую второй одноцепочечный Fab, специфичный к CD3 (например, любой из CD3#1, CD3#2 и CD3#3) и необязательно второй Fc домен.

Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую первый одноцепочечный Fab согласно любой из SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID NO:239, или SEQ ID NO:240 и/или второй одноцепочечный Fab согласно SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:104. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую первую полипептидную цепь согласно любой из SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, или SEQ ID NO:252 и/или вторую полипептидную цепь, специфическую к CD3, включающую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80 или SEQ ID NO:105.

Дальнейший аспект в соответствии с изобретением обеспечивает экспрессионный вектор, содержащий молекулу ДНК, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующей первый и/или второй антигенсвязывающий домен (например, первый и/или второй одноцепочечный Fab согласно изобретению). Предпочтительно экспрессионный вектор включает, дополнительно, молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулу ДНК, кодирующую первый и/или второй Fc домен, связанную с молекулой нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулой ДНК, кодирующей первый и/или второй антигенсвязывающий домен (например, первый и/или второй одноцепочечный Fab, соответственно). Как таковой, экспрессионный вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную цепь, включающую первый одноцепочечный Fab, связанный с первым Fc доменом, и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную цепь, включающую второй одноцепочечный Fab, связанный со вторым Fc доменом.

В предпочтительном варианте осуществления, экспрессионный вектор содержит молекулу ДНК, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую первую и/или вторую полипептидную цепь согласно изобретению. В предпочтительном варианте осуществления, экспрессионный вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую первую полипептидную цепь согласно любой из SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, или SEQ ID NO:252 и/или вторую полипептидную цепь, включающую SEQ ID NO:79. В дальнейших предпочтительных вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую первую полипептидную цепь согласно любой из SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, или SEQ ID NO:252 и/или вторую полипептидную цепь, включающую SEQ ID NO:80.

В дальнейших предпочтительных вариантах осуществления изобретения, экспрессионный вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую первую полипептидную цепь согласно любой из SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, или SEQ ID NO:252 и/или вторую полипептидную цепь, включающую SEQ ID NO:105.

В особенно предпочтительном варианте осуществления, можно использовать два экспрессионных вектора, один из них для экспрессии первой полипептидной цепи, специфической к DLL3, а другой для экспрессии второй полипептидной цепи, специфической к CD3, затем эти два экспрессионных вектора могут быть трансфектированы в клетку-хозяина для экспрессии рекомбинантного белка. Предпочтительно, экспрессионный вектор будет представлять собой, вектор, включающий указанную молекулу или

молекулы нуклеиновой кислоты, функционально связанную(ые) с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, где такая регуляторная последовательность может представлять собой промотор, энхансер, или терминирующую последовательность, и наиболее предпочтительно гетерологичный промотор, энхансер, или терминирующую последовательность.

В другом аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, имеющей экспрессионный вектор, кодирующий первую полипептидную цепь, специфическую к DLL3 согласно изобретению, и экспрессионный вектор, кодирующий вторую полипептидную цепь, специфическую к CD3 согласно изобретению.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления, указанные клетки-хозяева представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих. В другом варианте осуществления, такие клетки-хозяева представляют собой бактериальные клетки. Другие пригодные клетки представляют собой клетки дрожжей или другие клетки грибов. Подходящие клетки млекопитающих включают, например, CHO клетки, BHK клетки, HeLa клетки, COS клетки, и другие. Тем не менее, также можно использовать клетки земноводных, клетки насекомых, клетки растений и любые другие клетки, используемые в данной области техники для экспрессии гетерологичных белков.

Антитела к DLL3.

DLL3 обычно экспрессируется на внутриклеточных мембранах, включая мембраны в аппарате Гольджи в эмбриональном головном мозге, и играет решающую роль в сомитогенезе в парааксиальной мезодерме (Gefferis и др., *J Cell Biol.* 2007; 178:465; Chapman и др., *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20:905-916). Заметная индукция DLL3 экспрессии в опухолях некоторых типов, включая SCLC, LCNEC и глиобластому, приводит к локализации на клеточной поверхности: это совместно с отсутствием обнаруживаемых DLL3 на клеточной поверхности у незлокачественных клетках открывает новое окно возможностей терапии, специфической для опухолевых клеток, и для применения антител к DLL3 в качестве диагностических и прогностических средств. Некоторые антитела к DLL3 (такие как LS-c167440, Lifespan; AP21739PU-N, Acris; LS-C148700, LSBio) являются коммерчески доступными. Тем не менее, эти антитела не зарекомендовали себя хорошо в иммуногистохимических (ИHC), FACS и ELISA анализах и не могут специфически связываться с DLL3 белком, экспрессируемым на клетках, в особенности, опухолевых клетках. Также были описаны антитела к DLL3, например, в WO 2007111733 и предполагается их диагностическое применение у пациентов с глиомой, но до настоящего времени не представлено данных ИHC анализов. Таким образом, применение антител к DLL3 в качестве надежных диагностических средств для точного измерения экспрессии DLL3 у пациентов, например, в опухолевых клетках/ тканях и/или для оценки эффективности DLL3 нацеленных терапий остается проблемным. Таким образом, существует потребность в идентификации альтернативных антител к DLL3, которые можно использовать для точного и специфического обнаружения экспрессии DLL3 белка в различных анализах, таких как FACS, ELISA, иммунопреципитация, вестерн-блоттинг, ELISA, радиоиммунологический анализ, проточная цитометрия, ИHC и иммунометрических анализах в биологических образцах любых видов и могут использоваться в качестве надежных диагностических реагентов. Таким образом, дальнейший аспект в соответствии с изобретением обеспечивает молекулы антител к DLL3, включающие:

I) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3); или

II) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3); или

III) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3); или

IV) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:19 (CDR1), SEQ ID NO:20 (CDR2) и SEQ ID NO:21 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:22 (CDR1), SEQ ID NO:23 (CDR2) и SEQ ID NO:24 (CDR3); или

V) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:25 (CDR1), SEQ ID NO:26 (CDR2) и SEQ ID NO:27 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:28 (CDR1), SEQ ID NO:29 (CDR2) и SEQ ID NO:30 (CDR3); или

VI) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:31 (CDR1), SEQ ID NO:32 (CDR2) и SEQ ID NO:33 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:34 (CDR1), SEQ ID NO:35 (CDR2) и SEQ ID NO:36 (CDR3); или

VII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:133 (CDR1), SEQ ID NO:134 (CDR2) и SEQ ID NO:135 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:136 (CDR1), SEQ ID NO:137 (CDR2) и SEQ ID NO:138 (CDR3); или

VIII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:139 (CDR1), SEQ ID NO:140 (CDR2) и SEQ ID NO:141 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:142 (CDR1), SEQ ID NO:143 (CDR2) и SEQ ID NO:144 (CDR3); или

IX) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:145 (CDR1),

SEQ ID NO:146 (CDR2) и SEQ ID NO:147 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:148 (CDR1), SEQ ID NO:149 (CDR2) и SEQ ID NO:150 (CDR3); или

X) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:151 (CDR1), SEQ ID NO:152 (CDR2) и SEQ ID NO:153 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:154 (CDR1), SEQ ID NO:155 (CDR2) и SEQ ID NO:156 (CDR3); или

XI) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:157 (CDR1), SEQ ID NO:158 (CDR2) и SEQ ID NO:159 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:160 (CDR1), SEQ ID NO:161 (CDR2) и SEQ ID NO:162 (CDR3); или

XII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:163 (CDR1), SEQ ID NO:164 (CDR2) и SEQ ID NO:165 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:166 (CDR1), SEQ ID NO:167 (CDR2) и SEQ ID NO:168 (CDR3); или

XIII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:169 (CDR1), SEQ ID NO:170 (CDR2) и SEQ ID NO:171 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:172 (CDR1), SEQ ID NO:173 (CDR2) и SEQ ID NO:174 (CDR3); или

XIV) включающие CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:175 (CDR1), SEQ ID NO:176 (CDR2) и SEQ ID NO:177 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:178 (CDR1), SEQ ID NO:179 (CDR2) и SEQ ID NO:180 (CDR3); или

XV) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:181 (CDR1), SEQ ID NO:182 (CDR2) и SEQ ID NO:183 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:184 (CDR1), SEQ ID NO:185 (CDR2) и SEQ ID NO:186 (CDR3); или

XVI) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:187 (CDR1), SEQ ID NO:188 (CDR2) и SEQ ID NO:189 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:190 (CDR1), SEQ ID NO:191 (CDR2) и SEQ ID NO:192 (CDR3); или

XVII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:193 (CDR1), SEQ ID NO:194 (CDR2) и SEQ ID NO:195 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:196 (CDR1), SEQ ID NO:197 (CDR2) и SEQ ID NO:198 (CDR3); или

XVIII) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:199 (CDR1), SEQ ID NO:200 (CDR2) и SEQ ID NO:201 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:202 (CDR1), SEQ ID NO:203 (CDR2) и SEQ ID NO:204 (CDR3).

Антитела I) - XVIII), как указано выше, обозначаются как DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17 или DLL3#18 соответственно. В настоящей заявке обеспечивается таблица последовательностей, которая предоставляет возможность легко идентифицировать индивидуальные аминокислотные последовательности для специфических антител согласно настоящему изобретению.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, молекула антитела включает CDR последовательности, как определено в I) или V) выше, соответствующие DLL3#1 или DLL3#5.

В некоторых вариантах осуществления, антитело к DLL3 изобретения представляет собой молекулу химерного, гуманизованного или человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела представляет собой моноклональное антитело Fab, F(ab)₂, F_v или scF_v. В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к DLL3 согласно изобретению включает константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, включающей константные области IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA и IgE. В некоторых вариантах осуществления, константная область легкой цепи молекулы антитела к DLL3 согласно изобретению представляет собой каппа или ламбда.

В некоторых вариантах осуществления, антитело к DLL3 изобретения имеет переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична любой из SEQ ID NO:38, 40, 42, 44, 46, 48, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, и 228. Предпочтительно, молекула антитела имеет переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:38, 40, 42, 44, 46, 48, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, или 228.

В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к DLL3 имеет переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична любой из SEQ ID NO:37, 39, 41, 43, 45, 47, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, и 227. Предпочтительно, молекула антитела имеет переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:37, 39, 41, 43, 45, 47, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225 или 227.

Способы расчета идентичностей аминокислотных последовательностей хорошо известны в данной области техники и в дальнейшем обсуждаются в настоящей заявке в разделе описания "Определения".

В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к DLL3 имеет I) переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 и переменный домен

легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37 (DLL3#1), или II) переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40 и переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39 (DLL3#2); или III) переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42 и переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41 (DLL3#3), или IV) переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44 и переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43 (DLL3#4); или V) переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46 и переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45 (DLL3#5); или VI) переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48 и переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47 (DLL3#6); или VII) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:205, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:206 (DLL3#7); или VIII) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:207, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:208 (DLL3#8); или IX) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:209, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:210 (DLL3#9); или X) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:211, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:212 (DLL3#10); или XI) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:213, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:214 (DLL3#11); или XII) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:215, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:216 (DLL3#12); или XIII) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:217, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:218 (DLL3#13); или XIV) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:219, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:220 (DLL3#14); или XV) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:221, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:222 (DLL3#15); или XVI) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:223, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:224 (DLL3#16); или XVII) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:225, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:226 (DLL3#17); или XVIII) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:227, и переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:228 (DLL3#18). В некоторых вариантах осуществления, антитело к DLL3 изобретения представляет собой мышинное моноклональное антитело. В контексте настоящего изобретения мышинное моноклональное антитело включает антитело, где VH и VL получены при иммунизации мышей с применением DLL3 белка человека, с последующей селекцией подходящих VH и VL последовательностей, связывающихся с определенной аффинностью с DLL3 человека, и затем дальнейшего соединения таких VH и VL последовательностями с константными доменами, которые имеют происхождение из мыши (например, из мышинного IgG2a) с помощью рекомбинантных технологий; и которые продуцируются путем рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах. Также изобретение охватывает химерные антитела, например, включающие переменные и константные области из разных видов. В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела согласно изобретению представляет собой химерное антитело, включающее VH и VL домены, имеющие происхождение из мыши, как описано выше, и дополнительно включающее константные домены, имеющие происхождение из других видов, таких как человек, кролик, крыса, козел, осел. В некоторых вариантах осуществления, химерное антитело включает VH и VL домены, имеющие происхождение из мыши и дополнительно гуманизированное или с оптимизированной последовательностью, как определено выше, и дополнительно включает константные домены, имеющие происхождение из других видов. В некоторых вариантах осуществления, химерное антитело включает VH и VL домены, имеющие происхождение из трансгенного животного (например, мыши), включающее IgG последовательности человека, следовательно, оно включает VH и VL последовательности человека, и дополнительно включает константные домены, имеющие происхождение из других видов. В любом из этих вариантов осуществления химерных антител, как изложено выше, константная область тяжелой цепи представляет собой область тяжелой цепи мыши, человека, кролика, крысы, козла или осла. В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к DLL3 согласно изобретению имеет константный домен, выбранный из группы, включающей IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA и IgE константные домены. В предпочтительном варианте

осуществления, антитело к DLL3 имеет константный домен из IgG2a, предпочтительно включающие последовательность согласно SEQ ID NO:254. В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к DLL3 имеет константный домен легкой цепи, который представляет собой каппа или лямбда, предпочтительно константный домен легкой цепи представляет собой каппа легкую цепь константный домен, предпочтительно включающий последовательность согласно SEQ ID NO:255.

В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к DLL3 способна связываться с DLL3 человека и яванской макаки с константа диссоциации (KD) предпочтительно ≤ 10 нМ, более предпочтительно ≤ 1 нМ, еще более предпочтительно $\leq 0,1$ нМ, еще более предпочтительно $\leq 0,01$ нМ. Аффинность (KD значение) может быть измерена в SPR (BIAcore) анализе, используя рекомбинантный DLL3-белок, как описано, например, в примерах или других способах, которые хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к DLL3 не связывается с DLL3 мыши.

В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к DLL3 способна обнаруживать DLL3 экспрессию (например, цитоплазматическую и экспрессию поверхностного белка) в образцах тканей (например, залитые парафином/зафиксированные в формалине образцы тканей), такие как образцы опухолевых тканей, или культивированные клеточные линии. Необязательно, залитые парафином/зафиксированные в формалине клеточные культуры или образцы тканей дополнительно обрабатывают ретривером эпитопа, таким как Протеиназа К.

В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к DLL3 согласно изобретению связывается с тем же самым эпитопом, как и любая из DLL3#1, DLL2#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17, или DLL3#18 антитела. В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к DLL3 согласно изобретению перекрестно конкурирует за связывание с DLL3 человека с любой из DLL3#1, DLL2#2, DLL3#3, DLL3#4, DLL3#5, DLL3#6, DLL3#7, DLL3#8, DLL3#9, DLL3#10, DLL3#11, DLL3#12, DLL3#13, DLL3#14, DLL3#15, DLL3#16, DLL3#17, или DLL3#18 молекулы антитела.

Дальнейший аспект настоящего изобретения обеспечивает выделенные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи молекулы антитела к DLL3 согласно изобретению.

Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи согласно любой из SEQ ID NO:38, 40, 42, 44, 46, 48, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, или 228. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный домен легкой цепи согласно любой из SEQ ID NO:37, 39, 41, 43, 45, 47, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225 или 227.

Дальнейший аспект в соответствии с изобретением обеспечивает экспрессионный вектор, содержащий молекулу ДНК, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи молекулы антитела к DLL3 согласно изобретению.

Предпочтительно экспрессионный вектор включает, дополнительно, молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулу ДНК, кодирующую константные домены тяжелой цепи и/или константный домен легкой цепи, соответственно, связанную с молекулой нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулой ДНК, кодирующей вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи, соответственно.

В особенно предпочтительном варианте осуществления, можно использовать два экспрессионных вектора, один из них для экспрессии тяжелой цепи, а другой для экспрессии легкой цепи, затем эти два экспрессионных вектора оба могут быть трансфектированы в клетку-хозяина для экспрессии рекомбинантного белка. Предпочтительно, экспрессионный вектор будет представлять собой вектор, включающий указанную(ые) молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты, функционально связанную(ые) с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, где такая регуляторная последовательность может представлять собой промотор, энхансер, или терминирующую последовательность, и наиболее предпочтительно гетерологичный промотор, энхансер, или терминирующую последовательность.

В другом аспекте, изобретение относится к клетке-хозяине, имеющей экспрессионный вектор, кодирующий тяжелую цепь молекулы антитела к DLL3 согласно изобретению и экспрессионный вектор, кодирующий легкую цепь молекулы антитела к DLL3 согласно изобретению.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления, указанные клетки-хозяева представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих. В другом варианте осуществления, такие клетки-хозяева представляют собой бактериальные клетки. Другие пригодные клетки представляют собой клетки дрожжей или другие клетки грибов. Подходящие клетки млекопитающих включают, например, CHO клетки, ВНК клетки, HeLa клетки, COS клетки, и другие. Тем не менее, также могут применяться клетки земноводных, клетки насекомых, клетки растений и любые другие клетки, используемые в данной области техники для экспрессии гетерологичных белков.

Способы приготовления и очистки.

Изобретение также обеспечивает способы приготовления мультиспецифического связывающего белка согласно изобретению, такие способы в целом включают стадии:

культивирование клеток-хозяев, содержащих экспрессионный вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую связывающий белок согласно изобретению в условиях, предоставляющих возможность образования связывающего белка согласно изобретению; и,

восстановление связывающего белка, экспрессируемого клетками-хозяевами, из культуры; и необязательно дальнейшую очистку и/или модификацию и/или приготовление препарата связывающего белка согласно изобретению.

Изобретение также обеспечивает способы приготовления антитела к DLL3 изобретения, такие способы в целом включают стадии:

культивирование клеток-хозяев, содержащих экспрессионный вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу антитела согласно изобретению в условиях, предоставляющих возможность образования молекулы антитела; и,

восстановление молекулы антитела, экспрессируемой клетками-хозяевами, из культуры; и необязательно дальнейшую очистку и/или модификацию и/или приготовление препарата молекулы антитела согласно изобретению.

Нуклеиновая кислота согласно изобретению может представлять собой, например, молекулу ДНК, включающую кодирующие последовательности, а также регуляторные последовательности и необязательно природные или искусственные интроны, или может представлять собой молекулу кДНК. Она может иметь свои исходные кодоны или может иметь оптимизированную частоту использования кодона, которая была специфически адаптирована для экспрессии в предназначенной клетке-хозяине или организме-хозяине. В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения, нуклеиновая кислота согласно изобретению находится в по существу выделенной форме, как определено выше.

Нуклеиновые кислоты согласно изобретению могут быть приготовлены или получены с помощью способа, известного в данной области техники (например, путем автоматизированного синтеза ДНК и/или технологии рекомбинантных ДНК), на основании информации относительно аминокислотных последовательностей для белков согласно изобретению, представленной в настоящей заявке.

Нуклеиновую кислоту согласно изобретению типично инкорпорируют в экспрессионный вектор, то есть вектор, который может обеспечивать экспрессию белка при трансфектировании в подходящую клетку-хозяин или другую экспрессионную систему.

Для приготовления связывающих белков или антител согласно изобретению, квалифицированный специалист в данной области техники может выбрать из различных экспрессионных систем, хорошо известных в данной области техники, например, их обзор представлен Kirpianow и Le Gall, 2004. Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, космиды, EBV-производные эписомы, и другие. Экспрессионный вектор и последовательности, контролирующие экспрессию, выбирают таким образом, чтобы они были совместимыми с клеткой-хозяином. Нуклеотидную последовательность, кодирующую первую антигенсвязывающую единицу (например, DLL3 специфический одноцепочечный Fab или полноразмерную DLL3 цепь связывающего белка согласно изобретению) и нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую антигенсвязывающую единицу (например, CD3 специфический одноцепочечный Fab или полноразмерную CD3 цепь связывающего белка согласно изобретению) DLL3/CD3 связывающего белка могут быть инсертированы в отдельные векторы. В определенных вариантах осуществления, обе ДНК последовательности инсертируют в один и тот же самый экспрессионный вектор. Нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь DLL3 антитела, и нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь DLL3 антитела, могут быть инсертированы в отдельные векторы. В определенных вариантах осуществления, обе ДНК последовательности инсертируют в один и тот же самый экспрессионный вектор. Подходящими векторами являются те, которые кодируют функционально полную последовательность СН (константную тяжелую) иммуноглобулина человека, с подходящими рестрикционными сайтами, сконструированными таким образом, что любая антигенсвязывающая единица, такая как одноцепочечная Fab последовательность или любой переменный домен тяжелой/легкой цепи может быть легко инсертирован и экспрессирован, как описано выше. Для тяжелой цепи антитела, она может представлять собой, но не ограничиваясь только ими, любой IgG изотип (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) или другие иммуноглобулины, включая аллельные варианты.

Рекомбинантный экспрессионный вектор также может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию полноразмерной CD3 или DLL3 цепи из клетки-хозяина или легкой/тяжелой цепи антитела к DLL3. ДНК, кодирующая белковую цепь, может быть клонирована в векторе, таким образом, что сигнальный пептид связан в рамке считывания с аминоконцом зрелой полноразмерной цепи ДНК. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный пептид из неиммуноглобулинового белка. Альтернативно, последовательность ДНК, кодирующая полноразмерные цепи белка в соответствии с изобретением, уже может содержать последовательность сигнального пептида.

Дополнительно к последовательностям ДНК, которые кодируют DLL3/CD3 цепи, или последовательностям ДНК, которые кодируют тяжелую/легкую цепь DLL3 антитела, кодирующей, рекомбинант-

ные экспрессионные векторы типично несут регуляторные последовательности, необязательно гетерологичные регуляторные последовательности, включая промоторы, энхансеры, сигналы терминации и полиаденилирования и другие элементы, контролирующие экспрессию, которые контролируют экспрессию цепей белка в клетке-хозяине. Примерами промоторных последовательностей (иллюстративными для экспрессии в клетках млекопитающих) являются промоторы и/или энхансеры, имеющие происхождение из CMV (такие как промотор/энхансер CMV вируса обезьян 40 (SV40)), аденовирус, (например, аденовирусный главный поздний промотор (AdMLP)), промоторы полиомы и сильные промоторы млекопитающих, такие как нативные иммуноглобулиновые и актиновые промоторы. Примерами для сигналов полиаденилирования являются BGH polyA, SV40 поздний или ранний polyA; альтернативно, можно использовать 3'UTR генов иммуноглобулинов и т.д.

Рекомбинантные экспрессионные векторы также могут нести последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и селективируемые маркерные гены. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полноразмерную цепь с первой антигенсвязывающей единицей (одноцепочечный Fab и Fc домен) или его антигенсвязывающую часть и/или полноразмерную цепь со второй антигенсвязывающей единицей (одноцепочечный Fab и Fc домен) или его антигенсвязывающую часть, и векторы, включающие эти молекулы ДНК, могут быть интродуцированы в клетки-хозяева, например, бактериальные клетки или клетки высших эукариот, например, клетки млекопитающих, в соответствии с методами трансфекции, хорошо известными в данной области техники, включая опосредованную липосомами трансфекцию, опосредованную поликатионами трансфекцию, слияние протопластов, микроинъекции, осаждение фосфатом кальция, электропорацию или перенос с помощью вирусных векторов. Предпочтительно, молекулы ДНК, кодирующие DLL3 и CD3 цепь белка в соответствии с изобретением, присутствуют в двух экспрессионных векторах, которые совместно трансфектируют в клетку-хозяин, предпочтительно клетку млекопитающего.

Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области техники и включают, в частности, клетки яичников китайского хомячка (CHO), NSO, SP2/0 клетки, HeLa клетки, клетки почек новорожденного хомячка (ВНК), клетки почек обезьян (COS), клетки карциномы человека (например, Нер G2 и A-549 клетки), 3Т3 клетки или производные/потомство любой такой клеточной линии. Можно использовать другие клетки млекопитающих, включая, но не ограничиваясь только ими, клеточные линии человека, мыши, крысы, обезьяны и грызунов, или другие эукариотические клетки, включая, но не ограничиваясь только ими, клетки дрожжей, насекомых и растений, или прокариотические клетки, такие как бактерии.

Белки согласно изобретению продуцируются путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для предоставления возможности экспрессии белка в клетках-хозяевах. Белок молекулы предпочтительно восстанавливают из культуральной среды в виде секретируемого полипептида или он может быть восстановлен из лизатов клеток-хозяев, если, например, он экспрессируется без секреторного сигнала. Необходимо очищать белковые молекулы, используя стандартные методы очистки белков, используемые для рекомбинантных белков и белков клеток-хозяев таким образом, чтобы получить по существу гомогенные препараты белков. В качестве примера, известные в данной области техники методы очистки, пригодные для получения белковых молекул согласно изобретению, включают, в качестве первой стадии, удаление клеток и/или частичек клеточного дебриса из культуральной среды или лизата. После этого белок очищают от загрязняющих растворимых белков, полипептидов и нуклеиновых кислот, например, путем фракционирования на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматографии на Sephadex, хроматографии на диоксиде кремния или на катионообменной смоле. В качестве конечной стадии в способе получения препарата белковых молекул, очищенная белковая молекула может быть высушена, например, лиофилирована, как описано ниже для терапевтических применений. Настоящее изобретение относится к связывающим белкам, которые имеют связывающие специфичности по меньшей мере к двум различным мишеням. По отношению к настоящему изобретению, связывающие молекулы имеют происхождение из антител. Методики получения связывающих молекул включают, но не ограничиваясь только ими, рекомбинантную совместную экспрессию двух иммуноглобулиновых цепей, имеющих различные специфичности (см. Milstein и Cuello, Nature 305: 537 (1983)), WO 93/08829, и Traunecker и др., EMBO J. 10: 3655 (1991)), и конструирование "выступ-во-впадину" (см., например, патент US № 5,731, 168; Atwell и др., JMB, 1997, 270, 26-35). Связывающие белки согласно изобретению также могут быть получены путем конструирования белков с использованием эффекта электростатического взаимодействия для получения Fc-гетеродимерных молекул антител (WO 2009/089004A1); перекрестного связывания двух или больше антител или фрагментов (см., например, патент US № 4,676,980, и Brennan и др., Science, 229: 81 (1985)); используя лейциновые застёжки для получения биспецифических белков (см., например, Kostelny и др., Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)); используя технологию "диатела" для получения биспецифических фрагментов антител (см., например, Hollinger и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); и используя одноцепочечные Fv (sFv) димеры (см., например, Gruber и др., J. Immunol., 152:5368 (1994)); и приготовления триспецифических антител, как описано, например, в Tutt и др. J. Immunol. 147: 60 (1991).

Композиции (например, мультиспецифические связывающие белки и антитела к DLL3) и способы,

описанные в настоящей заявке, охватывают полипептиды и нуклеиновые кислоты, имеющие указанные последовательности, или последовательности, по существу идентичные или сходные к ним, например, последовательности по меньшей мере на 85%, 90%, 95% идентичные или больше к указанной последовательности. В контексте аминокислотной последовательности, термин "по существу идентичная" используется в настоящей заявке по отношению к первой аминокислотной последовательности, которая содержит достаточное или минимальное число аминокислотных остатков, которые являются I) идентичными к, или II) консервативные замены выровненных аминокислотных остатков во второй аминокислотной последовательности таким образом, что первая и вторая аминокислотные последовательности могут иметь общий структурный домен и/или общую функциональную активность. Например, аминокислотные последовательности, которые содержат общий структурный домен, имеют по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность к референс-последовательности, например, последовательности, представленной в настоящей заявке. В контексте нуклеотидной последовательности, термин "по существу идентичная" используется в настоящей заявке по отношению к первой последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит достаточное или минимальное число нуклеотидов, которые являются идентичными к выровненным нуклеотидам во второй последовательности нуклеиновой кислоты, таким образом, что первая и вторая нуклеотидные последовательности кодируют полипептид, имеющий общую функциональную активность, или кодируют общий структурный полипептидный домен или общую функциональную полипептидную активность, например, нуклеотидные последовательности, имеющие по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность к референс-последовательности.

Молекулы нуклеиновых кислот изобретения включают, но не ограничиваясь только ими, молекулы ДНК, кодирующие полипептидные последовательности, представленные в перечне последовательностей. Также, настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые гибридизируются с молекулами ДНК, кодирующими полипептидные последовательности, представленные в перечне последовательностей в условиях высокой жесткости связывания и промывки, как определено в WO 2007/042309. Предпочтительные молекулы (из перспективной мРНК) представляют собой те молекулы, которые имеют по меньшей мере 75% или 80% (предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%) гомологии или идентичности последовательности с одной из молекул ДНК, описанных в настоящей заявке. В качестве примера, с учетом экспрессии антител в эукариотических клетках, были созданы последовательности ДНК, представленные в перечне последовательностей, для согласования частоты использования кодона в эукариотических клетках. Если желательно экспрессировать антитела в *E. coli*, то эти последовательности могут быть изменены для согласования частоты использования кодона в *E. coli*. Варианты молекул ДНК согласно изобретению могут быть сконструированы различными путями, как описано, например, в WO 2007/042309. Белки согласно изобретению могут иметь модифицированную N-концевую последовательность, например, делецию одной или нескольких N-концевых аминокислот, или замену, например, первой, N-концевой аминокислоты (например, глутамата на аланин), для оптимизации молекулы для возможности экспрессии с использованием определенных экспрессионных систем (таких как специфические векторы или клетки-хозяева), или для возможности экспрессии в качестве телец включения или в растворимой форме, или для возможности секретирования в среду или периплазматическое пространство или для содержания в клетке, или для получения более гомогенного продукта. Полипептиды согласно изобретению могут иметь модифицированную C-концевую последовательность, например, дополнительный аланин, и/или дополнительные аминокислотные замены в C-концевой части или в других определенных положениях в пределах любых каркасных областей, как объясняется, например, в WO 2012/175471, WO 2011/075861, или WO 2013/024059, например, для дальнейшего усиления стабильности или уменьшения иммуногенности таких полипептидов.

Во избежание неопределенности, все варианты осуществления, относящиеся к фармацевтическим композициям, наборам, способам лечения, медицинским применениям, комбинациям, способам введения и дозировки, как описано в настоящей заявке, охватываются для любого из мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, либо отдельно или в комбинации с дополнительными терапевтическими агентами (как более подробно описано ниже).

Фармацевтические композиции; способы введения; дозировки.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям для лечения заболевания (как более подробно описано ниже), где такие композиции содержат по меньшей мере один мультиспецифический связывающий белок согласно изобретению. Изобретение дополнительно охватывает способы лечения заболевания (как более подробно описано ниже), используя по меньшей мере один мультиспецифический белок согласно изобретению или фармацевтическую композицию, как указано ниже, и дополнительно охватывает приготовление лекарственного средства для лечения такого заболевания путем применения таких связывающего белка согласно изобретению или фармацевтической композиции.

Связывающие белки в соответствии с изобретением (например, любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1,

DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3 и DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3, DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3, предпочтительно любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) и/или композиции, которые их содержат, могут вводиться пациенту, который в этом нуждается, любым подходящим образом, в зависимости от конкретного используемого фармацевтического препарата или композиции. Таким образом, связывающие белки в соответствии с изобретением и/или композиции, которые их содержат, может вводиться, например, внутривенно (в/в), подкожно (п/к), внутримышечно (в/м), внутривентриально (в/б), через кожу, перорально, сублингвально (например, в форме сублингвальной таблетки, спрея или капель, помещаемых под язык и адсорбируемых через слизистые мембраны в подъязычную капиллярную сеть), (интра-)назально (например, в форме назального спрея и/или аэрозоля), местно, с помощью суппозитория, путем ингаляции, или любым другим подходящим способом в эффективном количестве или дозировке. Связывающий белок может вводиться путем инфузии, болюса или инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления, введение осуществляют путем внутривенной инфузии или подкожной инъекции.

Связывающие белки в соответствии с изобретением и/или композиции, которые их содержат, вводят согласно протоколу лечения, подходящему для лечения и/или облегчения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению или облегчению. Врач, как правило, может определить подходящий протокол лечения в зависимости от таких факторов, как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению или облегчению, степень тяжести заболевания, степень тяжести его симптомов, конкретный применяемый связывающий белок согласно изобретению, конкретный путь введения и применяемый фармацевтический препарат либо композиция, возраст, пол, вес, режим питания, общее состояние пациента и тому подобные факторы, хорошо известные врачу. Как правило, протокол лечения включает введение одного или нескольких связывающих белков согласно изобретению либо одной или более содержащих их композиций в терапевтически эффективных количествах или дозах.

Как правило, для лечения и/или облегчения упомянутых здесь заболеваний, расстройств и состояний, в зависимости от конкретного подлежащего лечению заболевания, расстройства или состояния, силы конкретного используемого связывающего белка согласно изобретению, используемых конкретного пути введения и конкретного фармацевтического препарата либо композиции, связывающего белка согласно изобретению в общем вводят в количестве от 0,005 до 20,0 мг на 1 кг массы тела и дозу, предпочтительно от 0,05 до 10,0 мг/кг/дозу, либо непрерывно (напр., инфузией), либо, что более предпочтительно, в виде отдельных доз (таких как, напр., принимаемые дважды в неделю, раз в неделю, раз в месяц; см. ниже), но все это может отличаться, особенно в зависимости от вышеупомянутых параметров. Поэтому в некоторых случаях достаточной может быть доза меньше указанной здесь минимальной дозы, тогда как в других случаях она может превышать верхнюю границу. При введении больших количеств рекомендуется разделять их на ряд меньших доз, принимаемых в течение дня.

В зависимости от конкретного связывающего белка согласно изобретению, а также его конкретных фармакокинетических и других свойств, его можно вводить раз в день, каждый второй, третий, четвертый, пятый или шестой день, раз в неделю, раз в месяц и т.п. Протокол введения может подразумевать долгосрочное еженедельное лечение. Под "долгосрочным" имеется в виду длительность по крайней мере две недели, предпочтительно месяцы или годы. Эффективность мультиспецифического белка согласно изобретению, а также содержащих его композиций можно проверить с помощью любого подходящего известного *per se* анализа *in vitro*, анализа на клетках, анализа *in vivo* и/или на животной модели, либо же любой их комбинации, в зависимости от конкретной рассматриваемой болезни. Подходящие анализы и животные модели будут ясны специалисту и для примера включают анализы и животные модели, используемые в примерах ниже.

Препараты.

Для фармацевтического применения, связывающие белки в соответствии с изобретением могут быть приготовлены в виде фармацевтического препарата, включающего (I) по меньшей мере один связывающий белок согласно изобретению (например, любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1, DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3 и DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3,

DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3, предпочтительно любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) и (II) по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество, адъювант, и/или стабилизатор, и (III) необязательно один или более дополнительных фармакологически активных полипептидов и/или соединений. Под "фармацевтически приемлемым" следует понимать материал, не проявляющий каких-либо биологических или других нежелательных эффектов при введении индивидууму и не взаимодействующий пагубно с любым из других компонентов фармацевтической композиции (таким как, напр., фармацевтически активный ингредиент), которая содержит соответствующий материал. Конкретные примеры можно найти в стандартных пособиях, таких как, напр., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., Mack Publishing Company, США (1990).

Например, связывающие белки согласно изобретению можно рецептировать и вводить любым способом, известным per se для обычных антител и фрагментов антител, а также других фармацевтически активных белков. Таким образом, согласно следующему варианту осуществления, изобретение относится к фармацевтической композиции или препарату, содержащим по меньшей мере один связывающий белок согласно изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество, адъювант и/или стабилизатор, а также необязательно одно или более дополнительных фармакологически активных веществ в форме лиофилизированных или другим способом обезвоженных препаратов или водных или неводных растворов или суспензий.

Фармацевтические препараты для парентерального введения, такого как внутривенная, внутримышечная, подкожная инъекция или внутривенная инфузия, могут, например, являться стерильными растворами, суспензиями, дисперсиями, эмульсиями или порошками, которые содержат действующее вещество и пригодны, необязательно после дополнительного этапа растворения или разведения, для инъекции или инфузии. Подходящие носители или разбавители для подобных препаратов включают, для примера и не для ограничения, стерильную воду и фармацевтически приемлемые водные буферы и растворы, такие как физиологический фосфатно-солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнкса; масла с водой; глицерин; этанол; гликоли, такие как пропиленгликоль, а также минеральные масла, животные масла и растительные масла, например, арахисовое масло, соевое масло и пригодные их смеси.

Растворы связывающих белков согласно изобретению могут также содержать консервант для предотвращения роста микроорганизмов, такой, как антибактериальные и противогрибковые вещества, например, п-гидроксibenзоаты, парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота, тиомерсал, этилендиаминтетрауксусная кислота (и ее соли со щелочными металлами) и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара, буферы или хлорид натрия. Необязательно могут использоваться эмульгаторы и/или диспергаторы. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, образованием липосом, поддержанием нужного размера частиц в случае дисперсий и применением поверхностно-активных веществ. Можно также добавлять другие вещества, задерживающие абсорбцию, например, алюминия моностеарат и желатин. Растворы можно разливать в инъекционные флаконы, ампулы, бутылки для инфузий и т.п.

В любом случае, конечная лекарственная форма должна быть стерильной, жидкой и стабильной в условиях производства и хранения. Стерильные инъекционные растворы изготавливают включением действующего вещества в необходимое количество надлежащего растворителя, по необходимости с различными другими ингредиентами из вышеперечисленных, с последующей стерилизующей фильтрацией. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами изготовления являются методы вакуумного высушивания и вымораживания, позволяющие получить порошок действующего вещества и любого желаемого дополнительного ингредиента из их раствора, предварительно прошедшего стерилизующую фильтрацию.

Обычно предпочитают водные растворы или суспензии. Как правило, подходящими препаратами для терапевтических белков, таких как связывающие белки согласно изобретению, являются забуференные растворы белков, такие как растворы, содержащие белок в подходящей концентрации (такой, как от 0,001 до 400 мг/мл, предпочтительно от 0,005 до 200 мг/мл, более предпочтительно от 0,01 до 200 мг/мл, более предпочтительно 1,0-100 мг/мл, такой, как 1,0 мг/мл (в/в введение) или 100 мг/мл (п/к введение) и водный буфер, такой как

фосфатно-солевой раствор, pH 7,4,
 другие фосфатные буферы, pH 6,2-8,2,
 ацетатные буферы, pH 3,2-7,5, предпочтительно pH 4,8-5,5
 гистидиновые буферы, pH 5,5-7,0,
 сукцинатные буферы, pH 3,2-6,6, и
 цитратные буферы, pH 2,1-6,2,

и, необязательно, соли (напр., NaCl) и/или сахара (напр., сахароза и трегалоза) и/или другие полиолы (напр., маннит и глицерин) для обеспечения изотоничности раствора.

Дополнительно, в такие растворы могут быть включены другие агенты, такие как детергент, например, 0,02% Tween-20 или Tween-80. Препараты для подкожного применения могут включать более высо-

кие концентрации антитела согласно изобретению, такие как вплоть до 100 мг/мл или даже выше 100 мг/мл. Тем не менее, квалифицированному специалисту в данной области техники будет понятно, что ингредиенты и их количества, указанные выше, являются только одной, предпочтительной возможностью. Их альтернативы и варианты будут непосредственно очевидными для квалифицированного специалиста в данной области техники, или легко могут быть выведены, исходя из вышеизложенного раскрытия. Вышеописанные препараты необязательно могут быть представлены в виде лиофилизированного препарата, который может быть восстановлен в растворе, например, в воде для инъекций (ВДИ). В соответствии с дальнейшим аспектом осуществления изобретения, связывающий белок согласно изобретению можно использовать в комбинации с устройством, пригодным для введения белка, таким как шприц, ручка-инъектор, микронасос, или другое устройство.

Способ лечения.

Дальнейший аспект в соответствии с изобретением обеспечивает способ лечения злокачественного новообразования, включающий введение пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества связывающего белка согласно изобретению.

Дальнейший аспект в соответствии с изобретением обеспечивает связывающий белок согласно изобретению для применения в способе лечения злокачественного новообразования.

Дальнейший аспект в соответствии с изобретением представляет собой применение связывающего белка согласно изобретению для приготовления фармацевтической композиции для лечения злокачественного новообразования. Во избежание неопределённости, аспекты медицинского применения согласно изобретению могут включать любой из специфических связывающих белков согласно изобретению, как описано выше (например, любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1, DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3 и DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3, DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3, предпочтительно любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3).

Как используется в настоящей заявке, термин "злокачественное новообразование" охватывает все типы злокачественного роста или онкогенных процессов или злокачественно трансформированные клетки, ткани или органы, независимо от гистопатологического типа или стадии инвазивности. Примерами злокачественных новообразований, рост которых может быть ингибирован с применением мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, являются любые DLL3 экспрессирующие опухоли, предпочтительно SCLC, LCNEC, глиома, глиобластома, меланома, или другие DLL3 экспрессирующие нейроэндокринные опухоли (например, нейроэндокринный рак предстательной железы или нейроэндокринный рак поджелудочной железы, мелкоклеточный рак мочевого пузыря). Нейроэндокринные опухоли (NET) возникают из рассредоточенной эндокринной системы и могут встречаться во многих различных областях организма. Традиционно, NET классифицируются по их анатомическому сайту происхождения и типично чрезвычайно агрессивные. Они наиболее часто локализованы в желудочно-кишечном тракте, поджелудочной железе или легких (мелкоклеточная карцинома легких и крупноклеточная нейроэндокринная карцинома), а также в почках, или в мочеполовом тракте (мочевом пузыре, предстательной железе, яичниках, шейке матки и эндометрии). NET включают определенные опухоли желудочно-кишечного тракта и клеток островков Лангерганса, определенные опухоли тимуса и легких, и медуллярная карцинома парафолликулярных клеток щитовидной железы.

Дополнительные злокачественные новообразования, рост которых может быть ингибирован с помощью мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящей заявке, представляют собой псевдонейроэндокринные опухоли (pNET), которые имеют общие определенные генотипические, фенотипические или биохимические характеристики с традиционно определенными нейроэндокринными опухолями.

В некоторых вариантах осуществления, следующие злокачественные новообразования, опухоли и другие пролиферативные заболевания можно лечить с помощью мультиспецифических связывающих белки согласно изобретению: рак легких; предпочтительно SCLC, NSCLC или LCNEC; молочной железы; шейки матки; ободочной кишки; толстой и прямой кишки; эндометрия; головы и шеи; печени (гепатобластома или гепатоклеточная карцинома); яичников; поджелудочной железы; предстательной железы; кожи; желудка; яичек; щитовидной железы; надпочечников; почек; мочевого пузыря; матки; пищевода; рак уротелия; опухоль головного мозга; лимфома; саркома Юинга; и другие нейроэндокринные и мелкоклеточные опухоли.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения злокачественное новообразование пред-

ставляет собой мелкоклеточный рак легких (SCLC) или глиобластому.

Все злокачественные новообразования, опухоли, неоплазмы и т.д., указанные выше, которые характеризуются их специфической локализацией /происхождением в организме, охватывают как первичные опухоли, так и метастатические опухоли, которые имеют происхождение из них. Представляется возможным, что пациент более вероятно отвечает на лечение с применением связывающего белка согласно изобретению (как описано в настоящей заявке), если этот пациент имеет злокачественное новообразование, которое характеризуется наличием высокой экспрессии DLL3. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование, подвергнутое лечению с применением связывающих белков в соответствии с изобретением, представляет собой злокачественное новообразование с высокой экспрессией DLL3, например, DLL3 экспрессия является более высокой по сравнению со средней экспрессией в раковых клетках популяции пациентов, страдающих от такого же типа злокачественного новообразования, экспрессирующего DLL3.

Связывающие белки в соответствии с изобретением могут использоваться в терапевтических схемах в контексте первой линии, второй линии или любых дальнейших линий лечения и поддерживающего лечения.

Связывающие белки в соответствии с изобретением могут использоваться для предотвращения, краткосрочного или продолжительного лечения вышеуказанных заболеваний, необязательно также в комбинации с лучевой терапией, одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами и/или хирургией.

В предпочтительных вариантах осуществления, белок в соответствии с изобретением применяют для лечения злокачественного новообразования в комбинации с PD-1 антагонистом, таким как антитело к PD-1 или антитело к PDL-1. Предпочтительно указанное антитело к PD-1 выбирают из группы, включающей пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, и PD1-5, как описано в настоящей заявке (как определено с помощью последовательностей в табл. А ниже) и в WO 2017/198741 (включено в настоящую заявку путем ссылки). Предпочтительно указанное антитело к PDL-1 выбирают из группы, включающей атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб. В особенно предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению (предпочтительно любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, или DLL3#3/CD3#3) применяют для лечения злокачественного новообразования в комбинации с PD1-1. В особенно предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению (предпочтительно любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, или DLL3#3/CD3#3) применяют для лечения злокачественного новообразования в комбинации с PD1-2. В особенно предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению (предпочтительно любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) применяют для лечения злокачественного новообразования в комбинации с PD1-3. В особенно предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению (предпочтительно любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) применяют для лечения злокачественного новообразования в комбинации с PD1-4. В особенно предпочтительных вариантах осуществления, связывающий белок согласно изобретению (предпочтительно любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) применяют для лечения злокачественного новообразования в комбинации с PD1-5.

Аминокислотные последовательности и SEQ ID NO последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи антител к PD1, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5

Номер SEQ ID:	Краткое описание последовательности	Последовательность
SEQ ID NO:256	PD1-1 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPG KGLEWVA YISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDN AKNSL YLQMN SLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPS NTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVHLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
SEQ ID NO:257	PD1-1 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWWYQQK PGQAPKLLIYVASNQGSQIPARFSGSGSDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
SEQ ID NO:258	PD1-2 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPG KGLEWVA YISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDN AKNSL YLQMN SLRAEDTAVYYCARHSNPNYYAMDYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSN TKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVHLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
SEQ ID NO:259	PD1-2 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWWYQQK PGQAPKLLIYVASNQGSQIPARFSGSGSDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
SEQ ID NO:260	PD1-3 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKAMSWVRQAPG KGLEWVA YISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDN AKNSL YLQMN

		SLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVHLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK AKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCVMHEALHNHYTQKLSLSLGLG
SEQ ID NO:261	PD1-3 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWYQQK PGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
SEQ ID NO:262	PD1-4 HC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWYQQK PGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
SEQ ID NO:263	PD1-4 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWYQQK PGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
SEQ ID NO:264	PD1-5 HC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWYQQK PGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
SEQ ID NO:265	PD1-5 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWYQQK PGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC

В соответствии с этими предпочтительными вариантами осуществления и любыми другими аспектами согласно настоящему изобретению, антитела PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5 представляют собой молекулы антител, как описано в WO 2017/198741, и определяются последовательностями, как показано в табл. А выше.

Таким образом, PD1-1 имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:256, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:257;

PD1-2 имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:258, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:259; PD1-3 имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:260, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:261; PD1-4 имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:262, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:263; и PD1-5 имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:264, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:265. Вышеописанное также включает примене-

ние связывающих белков в соответствии с изобретением в различных способах лечения вышеописанных заболеваний путем введения терапевтически эффективной дозы пациенту, который в этом нуждается, а также применение этих связывающих белков для приготовления лекарственных средств для лечения таких заболеваний, а также фармацевтические композиции, включающие такие связывающие белки согласно изобретению, а также препараты и/или приготовление лекарственных средств, включающих такие связывающие белки согласно изобретению, и другие.

Комбинации с другими активными веществами или лечениями.

Связывающий белок согласно изобретению может использоваться самостоятельно или в комбинации с одним или больше дополнительных терапевтических агентов, в особенности в комбинации с химиотерапевтическим агентом, таким как агенты, повреждающие ДНК, терапевтически активное соединение, которое ингибирует ангиогенез, ингибитор пути передачи сигналов, EGFR ингибитор, иммуномодулятор, иммуномодулятор иммунной контрольной точки, иммуномодулятор митотической контрольной точки или агент для гормональной терапии.

Дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно с, необязательно в виде компонент одного и того же фармацевтического препарата, или перед или после введения DLL3/CD3 связывающего белка. Цитостатические и/или цитотоксичные активные вещества, которые можно вводить в комбинации со связывающими молекулами согласно изобретению, включают, не ограничиваясь ими, гормоны, аналоги гормонов и антигормоны, ингибиторы ароматазы, агонисты и антагонисты LHRH, ингибиторы факторов роста (такие факторы роста, как, например, фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эпидермальный фактор роста (EGF), инсулиноподобные факторы роста (IGF), эпидермальный фактор роста человека (HER, напр., HER2, HER3, HER4) и фактор роста гепатоцитов (HGF)), где ингибиторы представляют собой, например, антитела против фактора роста, антитела против рецептора фактора роста и ингибиторы тирозинкиназы, такие как, например, цетуксимаб, gefитиниб, афатиниб, нинтеданиб, иматиниб, лапатиниб, босутиниб и трастузумаб; антиметаболиты (напр., антифолаты, такие как метотрексат, ралтитрексед, пиримидиновые аналоги, такие как 5-фторурацил (5-ФУ), гемцитабин, иринотекан, доксорубин, TAS-102, капецитабин и гемцитабин, пуриновые и аденозиновые аналоги, такие как меркаптопурин, тиогуанин, кладрибин и пентостатин, цитарабин (ara C), флударабин); противоопухолевые антибиотики (напр., антрациклины); производные платины (напр., цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин); алкилирующие агенты (напр., эстрамустин, мехлорэтамин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, дакарбазин, циклофосфамид, ифосфамид, темозоломид, нитрозомочевины, такие как, например, кармустин и ломустин, тиотепа); антimitotические агенты (напр., алкалоиды Vinca, такие как, например, винбластин, виндезин, винорелбин и винкристин; а также таксаны, такие как паклитаксел, доцетаксел); ингибиторы ангиогенеза, включая бевацизумаб, рамуцирумаб и афлиберцепт, ингибиторы тубулина; ингибиторы синтеза ДНК, ингибиторы PARP, ингибиторы топоизомеразы (например, эпиподофиллотоксины, такие как, например, этопозид и этопифос, тенипозид, амсакрин, топотекан, иринотекан, митоксантрон), ингибиторы серин/треонинкиназы (напр., ингибиторы PDK1, ингибиторы Raf, ингибиторы A-Raf, ингибиторы B-Raf, ингибиторы C-Raf, ингибиторы mTOR, ингибиторы mTORC1/2, ингибиторы PI3K, ингибиторы PI3K α , двойные ингибиторы mTOR/PI3K, ингибиторы STK33, ингибиторы AKT, ингибиторы PLK1 (такие как воласертиб), ингибиторы CDK, включая ингибиторы CDK3, ингибиторы киназы Auroga), ингибиторы тирозинкиназы (напр., ингибиторы PTK2/FAK), ингибиторы белок-белкового взаимодействия, ингибиторы MEK, ингибиторы ERK, ингибиторы FLT3, ингибиторы BRD4, ингибиторы IGF-1R, ингибиторы Bcl-xL, ингибиторы Bcl-2, ингибиторы Bcl-2/Bcl-xL, ингибиторы рецептора ErbB, ингибиторы BCR-ABL, ингибиторы ABL, ингибиторы Src, аналоги рапамицина (например, эверолимус, темзиролимус, ридафоролимус, сиролимус), ингибиторы синтеза андрогенов, ингибиторы рецепторов андрогенов, ингибиторы DNMT, ингибиторы HDAC, ингибиторы ANG1/2, ингибиторы CYP17, радиофармацевтические препараты, иммунотерапевтические агенты, такие как ингибиторы иммунных контрольных точек (напр., молекулы/иммуноглобулины, связывающие CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3 и TIM3, такие как ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб), а также различные химиотерапевтические агенты, такие как амифостин, анагрелид, клондронат, филграстин, интерферон, интерферон-альфа, лейковорин, ритуксимаб, прокарбазин, левамизол, месна, митотан, памидронат и порфирин; ингибиторы протеасомы (такие как Бортезомиб); Smac и BH3 миметики; агенты, восстанавливающие p53 функциональность, включая mdm2-p53 антагонист; ингибиторы пути передачи сигналов Wnt/бета-катенин; и/или ингибиторы циклин-зависимой киназы 9.

Особенно предпочтительными являются лечения с применением связывающих молекул согласно изобретению в комбинации с одним или несколькими иммунотерапевтическими агентами, включая анти-PD-1 и анти-PD-L1 агенты и анти LAG3 агенты. Иллюстративные анти-PD1 агенты включают, но не ограничиваясь только ими, антитело к PD-1 PDR-001, пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб и PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5, как описано в настоящей заявке (табл. А) и в WO 2017/198741. Иллюстративные анти-PDL-1 агенты включают, но не ограничиваясь только ими, атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб. В предпочтительных вариантах осуществления, связывающую молекулу согласно изобретению (предпочтительно любую из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1,

DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) комбинируют с PD1-1. В предпочтительных вариантах осуществления, связывающую молекулу согласно изобретению (предпочтительно любую из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) комбинируют с PD1-2. В предпочтительных вариантах осуществления, связывающую молекулу согласно изобретению (предпочтительно любую из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) комбинируют с PD1-3. В предпочтительных вариантах осуществления, связывающую молекулу согласно изобретению (предпочтительно любую из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) комбинируют с PD1-4. В предпочтительных вариантах осуществления, связывающую молекулу согласно изобретению (предпочтительно любую из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) комбинируют с PD1-5.

В определенных вариантах осуществления, дополнительный терапевтический агент может представлять собой дополнительный иммунотерапевтический агент, такой как модуляторы: TIM-1, TIM-3, TIM-4, PD-L2, LAG3, CTLA-4, Галектин 9, Галектин-1, CD69, CD113, GPR56, CD48, GARP, CAECAM-1, BTLA, TIGIT, CD160, LAIR1, 2B4, CEACAM, CD39, TGF β , IL-10, Fas лиганд, ICOS, B7 семейство (B7-1, B7-2, B7-H1 (PDL-1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA), или B7-H6).

В некоторых вариантах осуществления, дополнительный иммунотерапевтический агент представляет собой представителя TNF семейства молекул, которые связываются с представителями когнатного семейства рецепторов TNF, которые включают CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, GITR, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TLIA, TRAMP/DR3, EDAR, EDAI, XEDAR, EDA2, TNFR1, Лимфотоксин α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, Лимфотоксин α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR.

В некоторых вариантах осуществления, дополнительный терапевтический агент представляет собой SMAC миметик. SMAC миметики представляют собой соединения, которые связываются с ингибитором белков апоптоза (IAP) и имеют иммуномодулирующую функцию и опосредуют индукцию системных цитокинов (например, IL-6, TNF α и др.) и хемокинов (например, MCP-1) при введении животным или людям. В некоторых вариантах осуществления, SMAC миметик представляет собой (I) LCL161, то есть соединение А в примере 1 из WO 2008/016893 (стр. 28/29; [122]), или его фармацевтически приемлемая соль; (II) SMAC миметик, известный как Debio-1143, или его фармацевтически приемлемая соль; (III) SMAC миметик, известный как биринапант, или его фармацевтически приемлемая соль; (IV) SMAC миметик, известный как ASTX-660, или его фармацевтически приемлемая соль; или (V) SMAC миметик, известный как CUDC-427, или его фармацевтически приемлемая соль. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный иммунотерапевтический агент выбирают из (I) антагонистов цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF; "иммуносупрессивные цитокины") и/или (II) агонистов цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток и/или цитокинов, таких как IL2, для стимуляции иммунного ответа, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как злокачественное новообразование.

В некоторых вариантах осуществления, дополнительный иммунотерапевтический агент представляет собой агонист белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такой как CD28, GITRL, OX40L, CD27, и CD28H.

В некоторых вариантах осуществления, дополнительный терапевтический агент представляет собой онколитический вирус, включая, но не ограничиваясь только ими, онколитический вирус, имеющий происхождение из вируса осповакцины, аденовируса, (AdV), вирус простого герпеса (HSV1 или HSV2), реовирус, вирус миксомы (MYXV), полиовирус, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус Maraba, вирус ветряной оспы, вирус кори (MV), или вирус псевдочумы (NDV).

Диагностические применения.

Молекулы антител к DLL3 согласно изобретению пригодны в диагностических и прогностических способах и могут применяться для мечения, локализации или идентификации клеток или тканей, экспрессирующих DLL3 (например, в ELISA анализах, FACS анализе, иммуногистологии или другие) путем присоединения красителя, лекарственного средства или другой молекулы со связывающей специфичностью к отличающемуся антигену. Например, обнаруживаемая метка может быть конъюгировано с молекулой антитела к DLL3 согласно изобретению или вторичным реагентом, который специфически связывается с молекулой антитела согласно изобретению и конъюгирован с обнаруживаемой меткой (например, вторичным антителом), можно использовать в таких диагностических способах. В некоторых вариантах осуществления, DLL3 специфические антитела специфически связываются с DLL3, экспрессируемыми в клетках, либо в цитоплазме и/или на клеточной поверхности, и используются для локализации и/или идентификации таких клеток. В некоторых вариантах осуществления, DLL3 специфические анти-

тела, обеспечиваемые в настоящей заявке, используются для идентификации клеток или тканей, экспрессирующих DLL3 (например, опухолевых клеток).

Антитела согласно изобретению выбирают таким образом, чтобы они имели высокий уровень специфичности связывания эпитопа и высокую связывающую аффинность к DLL3 полипептиду. В целом, чем выше связывающая аффинность антитела, тем более жесткие условия промывки можно осуществлять в иммуноанализе для удаления неспецифически связанного материала без удаления целевого полипептида.

Таким образом, дополнительно в настоящей заявке обеспечиваются способы обнаружения DLL3 в биологическом образце. Специфически, в одном аспекте изобретение обеспечивает способ обнаружения DLL3 в образце (например, образец ткани, образец опухолевой ткани) включающие:

- (а) контактирование образца с антителом согласно изобретению и
- (б) обнаружение антитела к DLL3, связанного с DLL3.

Биологический образец может быть получен/выделен из любой ткани (включая биопсии), клетки или жидкости организма субъекта. В предпочтительном варианте осуществления, образец представляет собой образец ткани, предпочтительно образец опухолевой ткани. В специфическом варианте осуществления, образец представляет собой фиксированный (опухолевый) образец ткани, предпочтительно фиксированный в формалине, залитый парафином (FFPE) образец ткани, более предпочтительно фиксированный в формалине, залитый парафином (FFPE) образец опухолевой ткани. Образцы типично разделяют на несколько сегментов и фиксируют в среде для микроскопического анализа, такого как микроскопический препарат. Если образец представляет собой образец ткани, то несколько сегментов могут представлять собой тканевые срезы. В некоторых вариантах осуществления, серийные срезы получают из FFPE образцов тканей. В некоторых вариантах осуществления, серийные срезы отбирают из множества различных сайтов FFPE блока, что может быть осуществлено для захвата как для внутрисрезовой гетерогенности, так и внутриблоковой гетерогенности. В некоторых вариантах осуществления, серийные срезы отбирают из множества различных образцов биопсии, отобранных из различных локализации в одной и той же опухоли, что может быть осуществлено для захвата как внутрисрезовой гетерогенности, так и внутриопухолевой гетерогенности. Типично, образцы тканей сначала подвергают депарафинизации, демаскированию антигена (например, с помощью Протеиназы К) перед обнаружением антигена. Образец ткани может быть получен/выделен из различных тканей (например, из биопсии), специфически тканей, полученных из опухолей, включая, но не ограничиваясь только ими, SCLC, LCNEC, глиому, глиобластому, меланому или другие нейроэндокринные опухоли (например, нейроэндокринный рак предстательной железы или нейроэндокринный рак поджелудочной железы, мелкоклеточный рак мочевого пузыря).

Дальнейшие иллюстративные опухоли, из которых может быть получен/выделен образец (ткани), включают рак легких; предпочтительно SCLC, NSCLC или LCNEC; молочной железы; шейки матки; ободочной кишки; толстой и прямой кишки; эндометрия; головы и шеи; печени (гепатобластома или гепатоклеточная карцинома); яичников; поджелудочной железы; предстательной железы; кожи; желудка; яичек; щитовидной железы; надпочечников; почек; мочевого пузыря; матки; пищевода; рак уретелия; опухоль головного мозга; лимфому; саркому Юинга; и другие нейроэндокринные (включая псевдоэндокринные опухоли) и мелкосинекруглоклеточные опухоли.

Иллюстративные способы обнаружения DLL3 в образце представляют собой иммуноцитохимию (ICC), иммуногистохимию (IHC), вестерн-блоттинг, проточную цитометрию и/или ELISA.

В предпочтительном варианте осуществления, DLL3 обнаруживают с помощью IHC.

В специфическом аспекте изобретения, способ обнаружения DLL3 в образце ткани включает:

а) контактирование образца ткани (например, опухолевой ткани, такой как SCLC, глиобластома или нейроэндокринные опухоли), предпочтительно указанный образец ткани представляет собой фиксированный образец ткани (например, фиксированный в формалине и заделанный в парафин), с применением антитела согласно изобретению (например, DLL3#1 или DLL3#5)

б) разрешение образования комплексов антитело-антиген в образце, и

в) обнаружение антитела к DLL3, связанного с DLL3.

В некоторых вариантах осуществления способов согласно изобретению, антитело к DLL3 обнаруживают с помощью обнаруживаемого сигнала, предпочтительно, обнаруживаемый сигнал создается с помощью обнаруживаемой метки. В предпочтительном варианте осуществления способа согласно изобретению, обнаруживаемый сигнал обнаруживают в IHC анализе. В некоторых вариантах осуществления, обнаруживаемый сигнал обнаруживают в ELISA анализе, с помощью проточной цитометрии или с помощью вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящей заявке, можно использовать для обнаружения DLL3, присутствующего на клеточной поверхности клетки (например, опухолевой клетки), например, используя проточную цитометрию. В некоторых вариантах осуществления, способы, описанные в настоящей заявке, могут быть использованы для обнаружения присутствия DLL3 в образце ткани (например, образце опухолевой ткани), используя ELISA, вестерн-блоттинг или IHC. В некоторых вариантах осуществления, обнаруживаемая метка непосредственно конъюгирована с антителом к DLL3, и таким образом депонируется на образце при связывании антитела

к DLL3 с DLL3, это в целом обозначается как способ прямого мечения). Способы прямого мечения часто больше поддаются количественному определению, но часто недостатком является отсутствие чувствительности. В других вариантах осуществления, отложение обнаруживаемой метки осуществляют путем применения вторичного обнаруживающего реагента, который специфически связывается с молекулой антитела согласно изобретению и конъюгирован с обнаруживаемой меткой (например, вторичным антителом), это в целом обозначается как способ непрямого мечения. В некоторых вариантах осуществления, специфический вторичный обнаруживающий реагент может представлять собой видоспецифическое вторичное антитело, анти-гаптенное антитело, связывающееся с гаптен-конъюгированным антителом к DLL3, или биотин-связывающий белок, связанный с биотинилированным антителом к DLL3). Предпочтительные примеры обнаруживаемых меток, которые могут быть конъюгированы либо с антителом к DLL3 согласно изобретению или с вторичным обнаруживающим реагентом, включают хромогенные, флуоресцентные, фосфоресцентные, люминесцентные и радиоактивные молекулы и материалы, катализаторы (такие как ферменты), которые превращают один субстрат в другой субстрат для обеспечения обнаруживаемого отличия (например, путем превращения бесцветного вещества в окрашенное вещество или наоборот, или путем продуцирования осадка или увеличения мутности образца), гаптены, которые могут быть обнаружены с помощью связывающих взаимодействий антитело-гаптен, используя дополнительные обнаруживаемые меченные конъюгаты антител, и парамагнитные и магнитные молекулы или материалы.

Например, обнаруживаемая метка может представлять собой фермент, такой как пероксидаза из хрена (HRP), щелочная фосфатаза (AP), кислая фосфатаза, глюкооксидаза, β -галактозидаза, β -глюкуронидаза, и β -лактамаза; флуорофор, такой как флюоресцеины, люминофоры, кумарины, BODIPY красители, резорфуины и родамины; наночастицы, такие как квантовые точки (патенты US №№6,815,064, 6,682,596 и 6,649,138); хелаты металлов, такие как DOTA и DPTA хелаты радиоактивных или парамагнитных ионов металлов, таких как Gd $<3+>$; и липосомы, например, липосомы, содержащие захваченные флуоресцентные молекулы.

Если обнаруживаемая метка включает фермент, то может использоваться обнаруживаемый субстрат, такой как хромогенное, флуорогенное соединение или люминогенное соединение, в комбинации ферментом для создания обнаруживаемого сигнала. Предпочтительные примеры хромогенных соединений включают диаминобензидин (DAB), 4-нитрофенилфосфат (pNPP), прочный красный, бромохлориндолил фосфат (BCIP), нитросиний тетразолий (NBT), BCIP/NBT, прочный красный, AP Оранжевый, AP синий, тетраметилбензидин (TMB), 2,2'-азино-ди-[3-этилбензотиазолин сульфат] (ABTS), о-дианизидин, 4-хлорнафтол (4-CN), нитрофенил-D-галактопиранозид (ONPG), о-фенилендиамин (OPD), 5-бром-4-хлор-3-индолил-галактопиранозид (X-Gal), метилумбеллиферил-D-галактопиранозид (MU-Gal), п-нитрофенил-а-D-галактопиранозид (PNP), 5-бром-4-хлор-3-индолил-D-глюкуронид (X-Gluc), 3-амино-9-этил карбазол (AEC), фуксин, йодонитротетразолий (INT), тетразолиевый голубой и тетразолиевый фиолетовый.

В некоторых примерах, обнаруживаемый компонент представляет собой флуорофор, который принадлежит к нескольким общеизвестным химическим классам, включая кумарины, флюоресцеины (или производные и аналоги флюоресцеина), родамины, резорфуины, люминофоры и цианины. В других вариантах осуществления, обнаруживаемый компонент представляет собой молекула, обнаруживаемую с помощью светлопольной микроскопии, такую как красители, включая диаминобензидин (DAB), 4-(диметиламино) азобензол-4'-сульфонамид (DABSYL), тетраметилродамин (DISCOVERY Purple), N,N'-бискарбоксихептил-5,5'-дисульфато-индо-дикарбоцианин (Cy5), и Родамин 110 (Родамин).

Гаптены представляют собой небольшие молекулы, которые специфически связываются антителами, хотя они сами по себе не могут вызывать иммунной ответной реакции в животном и сначала должны быть присоединены к более крупной молекуле-носителю, такой как белок, для вызывания иммунной ответной реакции. Примеры гаптенных включают ди-нитрофенил, биотин, диоксигенин и флюоресцеин.

Дополнительно в настоящей заявке обеспечиваются в одном аспекте способы диагностирования или идентификации опухоли в качестве DLL3 экспрессирующей опухоли (экспрессирующей DLL3 в цитоплазму и/или клеточную поверхность), включающие обнаружение DLL3 в образце (например, образце опухолевой ткани) субъекта, используя антитела к DLL3 (например, DLL3#1 или DLL3#5) согласно изобретению (например, используя ИНС на образце опухолевой ткани). В дальнейшем аспекте, в настоящем изобретении обеспечиваются способы отбора DLL3 нацеленной терапии для субъекта, включающие обнаружение DLL3 в образце (например, образце опухолевой ткани) субъекта, используя антитела к DLL3 (например, DLL3#1 или DLL3#5) согласно изобретению (например, используя ИНС на образце опухолевой ткани). В дальнейшем аспекте, в настоящем изобретении обеспечиваются способы мониторинга терапевтического эффекта (например, DLL3-нацеленной терапии) у субъекта, включающие обнаружение DLL3 в образце (например, образце опухолевой ткани) субъекта, используя антитела к DLL3 (например, DLL3#1 или DLL3#5) согласно изобретению (например, используя ИНС на образце опухолевой ткани).

Молекулы антител к DLL3 согласно изобретению также можно использовать для нацеливания клеток. В некоторых вариантах осуществления, DLL3 специфические антитела, обеспечиваемые в настоя-

шей заявке, используются для доставки лекарственного средства или цитотоксического агента в целевую клетку (например, опухолевую клетку, экспрессирующую DLL3) путем присоединения такого лекарственного средства или цитотоксического агента к указанному DLL3 антителу, таким образом, например, убивая указанную целевую клетку.

Наборы.

Изобретение также охватывает наборы, включающие по меньшей мере мультиспецифический связывающий белок согласно изобретению (например, любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#2/CD3#1, DLL3#3/CD3#1, DLL3#4/CD3#1, DLL3#5/CD3#1, DLL3#6/CD3#1, DLL3#7/CD3#1, DLL3#8/CD3#1, DLL3#9/CD3#1, DLL3#10/CD3#1, DLL3#11/CD3#1, DLL3#12/CD3#1, DLL3#13/CD3#1, DLL3#14/CD3#1, DLL3#15/CD3#1, DLL3#16/CD3#1, DLL3#17/CD3#1, DLL3#18/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#2/CD3#2, DLL3#3/CD3#2, DLL3#4/CD3#2, DLL3#5/CD3#2, DLL3#6/CD3#2, DLL3#7/CD3#2, DLL3#8/CD3#2, DLL3#9/CD3#2, DLL3#10/CD3#2, DLL3#11/CD3#2, DLL3#12/CD3#2, DLL3#13/CD3#2, DLL3#14/CD3#2, DLL3#15/CD3#2, DLL3#16/CD3#2, DLL3#17/CD3#2, DLL3#18/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#3, DLL3#4/CD3#3, DLL3#5/CD3#3 и DLL3#6/CD3#3, DLL3#7/CD3#3, DLL3#8/CD3#3, DLL3#9/CD3#3, DLL3#10/CD3#3, DLL3#11/CD3#3, DLL3#12/CD3#3, DLL3#13/CD3#3, DLL3#14/CD3#3, DLL3#15/CD3#3, DLL3#16/CD3#3, DLL3#17/CD3#3, DLL3#18/CD3#3, предпочтительно любой из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3) и необязательно один или несколько других компонентов, выбранных из группы, включающей другие лекарственные средства, применяемые для лечения заболеваний и нарушений, как описано выше.

В одном варианте осуществления, набор включает композицию, содержащую эффективное количество связывающего белка согласно изобретению в единичной дозированной форме.

Изобретение также охватывает наборы, включающие по меньшей мере мультиспецифический связывающий белок согласно изобретению, и один или несколько других компонентов, выбранных из группы, включающей другие лекарственные средства, применяемые для лечения заболеваний и нарушений, как описано выше.

В одном варианте осуществления, набор включает композицию, содержащую эффективное количество мультиспецифического связывающего белка согласно изобретению в единичной дозированной форме (предпочтительно любого из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3). В дальнейшем варианте осуществления набор включает как композицию, содержащую эффективное количество мультиспецифического связывающего белка согласно изобретению в единичной дозированной форме (предпочтительно любого из DLL3#1/CD3#1, DLL3#1/CD3#2, DLL3#1/CD3#3, DLL3#2/CD3#1, DLL3#2/CD3#2, DLL3#2/CD3#3, DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2, DLL3#3/CD3#3), так и композицию, содержащую эффективное количество PD-1 антагониста в единичной дозированной форме, такого как анти PD-1 антитело, наиболее предпочтительно PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, и PD1-5, как описано в настоящей заявке (например, табл. А) и в WO 2017/198741. В некоторых вариантах осуществления, набор включает стерильный контейнер, который содержит такую композицию; такие контейнеры могут представлять собой коробки, ампулы, бутылки, флаконы, пробирки, мешки, саше, блистерные упаковки, или другие подходящие формы контейнеров, известные в данной области техники. Такие контейнеры могут быть изготовлены из пластмассы, стекла, ламинированной бумаги, металлической фольги, или других материалов, подходящих для упаковки лекарственных средств. Дополнительно, набор может включать фармацевтическую композицию в первом контейнере со связывающим белком согласно изобретению в лиофилизированной форме, и второй контейнер с фармацевтически приемлемым разбавителем (например, стерильной водой) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения связывающего белка.

При необходимости, мультиспецифический связывающий белок согласно изобретению, обеспечивается совместно с инструкциями по введению мультиспецифических связывающих белков субъекту, имеющему злокачественное новообразование. Инструкции обычно включают информацию относительно применения композиции для лечения или предотвращения злокачественного новообразования. В других вариантах осуществления, инструкции включают по меньшей мере одну из следующих информации: описание терапевтического агента; схему приема лекарственного средства и введение для лечения или предотвращения злокачественного новообразования или его симптомов; предосторожности; предупреждения; показания; противопоказания; информация относительно передозировки; побочные реакции; фармакология на животных; клинические исследования; и/или ссылки. Инструкции могут быть напечатаны непосредственно на контейнере (если он присутствует), или на этикетке, прикрепленной к контейнеру, или в виде отдельного листа, брошюры, карточки, или проспекта, поставляемого в или с контейнером.

Как указано в настоящей заявке, данное раскрытие также обеспечивает диагностические способы для определения экспрессии DLL3 в биологическом образце. В одном аспекте, данное раскрытие обеспечивает наборы для осуществления таких способов, а также инструкции по осуществлению способов согласно настоящему изобретению, таких как сбор ткани и/или осуществление анализа на обнаружение,

и/или анализ результатов.

Набор включает, или альтернативно состоит по существу из, или еще дополнительно состоит из, композиция DLL3 антитела согласно изобретению (например, моноклональных антител) и инструкций по применению. Наборы пригодны для обнаружения присутствия DLL3 полипептидов в биологическом образце, например, любой жидкости организма или образцов биопсии ткани организма. В некоторых вариантах осуществления, набор может включать: одно или несколько DLL3 антител, способных связывать DLL3 полипептид в образце (например, антитело к DLL3 DLL3#1 или DLL3#5); средства для обнаружения DLL3 полипептида в образце; и необязательно средства для сравнения сигнала/количества DLL3 полипептида в образце с контролем. Одно или больше анти-DLL3 антител согласно изобретению могут быть мечены. Компоненты набора, (например, реагенты) могут быть упакованы в подходящий контейнер. Набор дополнительно может включать инструкции по применению набора для обнаружения DLL3 полипептидов. В определенных вариантах осуществления, набор включает антитело к DLL3 согласно изобретению (первое антитело) и второе, отличающееся антитело, которое связывается либо с DLL3 полипептидом или первым антителом и конъюгировано с обнаруживаемой меткой.

Набор также может включать, например, буферный агент, консервант или агент, стабилизирующий белок. Набор дополнительно может включать компоненты, необходимые для обнаружения обнаруживаемой метки, например, фермент или субстрат. Набор также может включать контрольный образец или серию контрольных образцов, которые можно анализировать и сравнивать с тестируемым образцом. Каждый компонент набора может быть включен в индивидуальный контейнер и все различные контейнеры могут находиться в одной упаковке, вместе с инструкциями по интерпретации результатов анализов, осуществленных с применением набора. Наборы согласно настоящему изобретению могут включать написанный продукт на или в контейнере с набором. Написанный продукт описывает, каким образом применять реагенты, содержащиеся в наборе.

Как полагают, эти предполагаемые компоненты набора могут быть упаковано общепринятым способом для применения с помощью квалифицированных специалистов в данной области техники. Например, эти предполагаемые компоненты набора могут быть обеспечены в растворе или в виде жидкой дисперсии или других.

Примеры

Последующие примеры иллюстрируют изобретение. Эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1. Создание и конструирование CD3/DLL3 связывающих белков.

Изобретатели настоящего изобретения разработали мультиспецифические связывающие белки, которые связывают DLL3 и CD3 и которые индуцируют активацию Т-клеток, что приводит к лизису опухолевых клеток, экспрессирующих DLL3. Используемая молекулярная схема представляла собой каркас IgG антитела и IgG-подобную структуру. Она использует технологию выступ-во-впадину в Fc для гетеродимеризации Выступа (анти-DLL3) и Впадины (анти-CD3) плечей. Дополнительно, связывающий белок имеет гибкие пептидные последовательности между легкой и соответствующей тяжелой цепью в каждом плече. Таким образом, связывающий белок включает два плеча, одно связывается с CD3, а другое связывается с DLL3, каждое плечо включает одноцепочечный Fab и Fc область.

Предпочтительно связывающая молекула является биспецифической и бивалентной (моновалентной для каждой из двух мишеней).

Приготовление связывающих доменов, которые распознают DLL3 и CD3, используя восстановление гена V с высокой пропускной способностью из гибридом и культивированных единичных В клеток.

Для получения анти-DLL3 связывающих агентов, *in vitro* культивировали гибридомы или единичные В клетки, имеющие происхождение из DLL3 иммунизированных мышей дикого типа и AlivaMab гуманизированных мышей (Ablexis, San Francisco, CA, USA: AlivaMab платформа трансгенных мышей с локусами иммуноглобулинов человека) культивировали. Супернатанты подвергали скринингу для определения реактивности по отношению к рекомбинантному DLL3 человека, с помощью AlphaLISA (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), и по отношению к SHP77 клеткам (ATCC®, CRL-2195TM), экспрессирующим DLL3 человека, с помощью проточной цитометрии. После этого VH и VL гены иммуноглобулина (Ig) амплифицировали из идентифицированных положительных клонов. Для выделения РНК из гибридом, приблизительно 2×10^6 клеток из единичных клонов осаждали центрифугированием и использовали в качестве банка клеток. Для единичных В клеток, 100-500 клеток обогащали из единично выделенных В клеток, используемых в качестве банка клеток. РНК выделяли, используя RNeasy Plus (Qiagen, Hilden, Germany). После этого синтезировали кДНК, используя набор для синтеза Smarter cDNA (Clontech, Mountain View, CA) в соответствии с инструкциями производителя. Для облегчения синтеза кДНК, oligodT использовали для примирования обратной транскрипции всех матричных МПК с последующим "5' кэппированием" с применением Smarter ПА олигонуклеотида. Последующую амплификацию VH и VL фрагментов осуществляли, используя 2-стадийную ПЛР амплификацию, используя 5' праймеры, нацеленные на Smarter ПА "кэп" и 3' праймеры, нацеленные на консенсусные области в CH1. Вкратце, каждая 50 мкл ПЛР реакция состояла из смеси 20 мкм прямых и обратных праймеров, 25 мкл PrimeStar

Мах ДНК-полимеразного премикса (Clontech), 2 мкл неочищенной кДНК, и 21 мкл дважды перегнанной H₂O. Цикл программы начинался при 94°C в течение 3 мин, с последующими 35 циклами (94°C в течение 30 с, 50°C в течение 1 мин, 68°C в течение 1 мин), и оканчивался при 72°C в течение 7 мин. Второй этап ПЦР осуществляли с VL и VH праймерами 2-го этапа, содержащими комплементарные удлинения 15 по, которые "перекрывают" соответствующие области в их соответствующем рТТ5 материнском векторе (VH и VL). Второй этап ПЛР осуществляли со следующей программой: 94°C в течение 3 мин; 35 циклов (94°C в течение 30 с, 50°C в течение 1 мин, 68°C в течение 1 мин), и заканчивали при 72°C в течение 7 мин. In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech, U.S.A.) использовали для прямого клонирования VL гена в рТТ5 huIgK вектор и VH гена в рТТ5 huIgG1KO вектор. Для облегчения In-Fusion® HD Cloning, ПЛР продукты очищали и обрабатывали с применением Cloning Enhancer перед In-Fusion HD Cloning. Клонирование и трансформацию осуществляли в соответствии с протоколом производителя (Clontech, U.S.A.). Мини-пригот. ДНК подвергали секвенированию по Сенгеру для подтверждения того, что были получены полные фрагменты V-гена. Используя эту методологию, были приготовлены пары VH и VL генов Ig, кодирующие связывающие домены со специфичностью к DLL3. Рекомбинантные антитела продуцировали с помощью транзientной трансфекции CHO-E37 клеток с применением соответствующих плазмид, кодирующие тяжелую и легкую цепь.

Подтверждающий скрининг рекомбинантных антител.

Супернатанты, содержащие экспрессированные рекомбинантные антитела, анализировали с помощью проточной цитометрии относительно связывания с клеточными линиями, экспрессирующими DLL3 человека или яванской макаки. Вкратце, клетки инкубировали с рекомбинантными супернатантами, промывали, и связанные mAb из супернатантов обнаруживали с помощью анти-человеческих-IgG-APC (Jackson ImmunoResearch 109-136-098). Отношения сигнал/фон (S/B) рассчитывали путем деления средней интенсивности флуоресценции (MFI) образца на соответствующие значения для изотипного контроля (вариабельные области относительно неродственного белка и различных остовов константной области).

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) на Biacore 400 осуществляли на рекомбинантных супернатантах. Вкратце, неоптимизированные IgG в НТР супернатантах захватывали с помощью Белок A/G на поверхность сенсора в течение 60 с при 10 мкл/мин. Связывание 100 нМ DLL3 человека с захваченными IgG мониторили в течение 180 с ассоциации при 30 мкл/мин, с последующей диссоциацией в течение 120 секунд в HBS-EP буфере. Регенерацию поверхности Белка A/G осуществляли с применением глицина pH 2,1 между каждым циклом связывания. В этом анализе использовали следующие материалы: Белковый реагент: рекомбинантно экспрессируемый DLL3 человека. Системный прогоночный буфер: HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, и 0,005% об./об. полисорбат P20). Захватывающий реагент: белок A/GG (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), со специфичностью ко всем изотипам IgG человека.

Представляющие интерес клоны (с Kd < 300 пМ) отбирали для мультиспецифического форматирования. Создавали мультиспецифические связывающие белки и в дальнейшем их оценивали в скринингах механизмов и функциональных скринингах (таких как клеточное связывание, цитотоксичность и активация Т-клеток, как описано ниже).

Гуманизация DLL3 и CD3 связывающих агентов.

Последовательности из DLL3 связывающих агентов, как описано выше, а также CD3 связывающих агентов, описанных в литературе (Pessano и др., EMBO J. 1985 Feb; 4(2): 337-44; Salmerón A. и др., J Immunol. 1991 Nov 1; 147(9):3047-52), были гуманизированы и/или оптимизированы. Оптимизация/гуманизация последовательностей антител представляет собой методологию для конструирования антител, выращиваемых у видов, отличающихся от человека (нацеленных на специфический антиген/эпитоп) для применения в качестве лекарственных средств, которые имеют сходство с антителами, продуцируемыми у людей, и таким образом элиминируя потенциальные побочные эффекты, такие как иммуногенность, сохраняя при этом специфичность. Подход оптимизации/ гуманизации последовательностей, используемый в настоящей заявке, был описан Singh и др., 2015 (Singh S. и др., mAbs 2015: 7(4):778-91). Вкратце, были идентифицированы максимально совпадающие зародышевые линии человека *in silico*, и варианты оптимизации/ гуманизации оценивали с использованием метода фагового скрининга. Конечные лидерные кандидатные последовательности отбирали на основе связывания, процента оценки человека и оценки EpiVax (*in silico* средство прогностической диагностики для потенциальной иммуногенности).

Конструирование биспецифических белков, которые связывают DLL3 и CD3.

Вариабельные области DLL3 и CD3 связывающих агентов клонировали в экспрессионном векторе рТТ5 (National Research Council, Canada), используя общепринятые методики молекулярной биологии для образования биспецифических связывающих белков с одной DLL3 специфической связывающей единицей, включающей одноцепочечный Fab, связывающейся с DLL3, и Fc область (такая связывающая единица далее обозначается в настоящей заявке как "DLL3 плечо" или "DLL3 цепь") и CD3 специфической связывающей единицы, включающей одноцепочечный Fab, связывающейся с CD3, и Fc область

(такая связывающая единица далее обозначается в настоящей заявке как "CD3 плечо" или "CD3 цепь. Fc области из DLL3 и CD3 плеч включают мутации либо "Выступ" или "Впадина" (Atwell и др, JMB, 1997, 270, 26-35) и соответствующие цепи обозначаются как цепи Выступ или Впадина. Для сборки мультифрагментов ДНК, использовали подходы сборки и NEBuilder HiFi сборки кДНК, согласно протоколам производителя (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Мини-преп. ДНК секвенировали.

Каждый экспрессионный вектор содержит эукариотические промоторные элементы для гена, кодирующего цепь (DLL3 или CD3 плечо/цепь), то есть, гена, кодирующего сигнальную последовательность и легкую и тяжелую цепь, экспрессионную кассету для прокариотического селекционного маркерного гена, такого как ампициллин, и точку начала репликации. Эти ДНК плазмиды размножали в устойчивых к ампициллину колониях *E. coli* и культурах и очищали.

Пример 2. Экспрессия и очистка биспецифических, бивалентных связывающих белков, которые связывают DLL3 и CD3.

Биспецифические молекулы, которые связывают DLL3 и CD3, продуцировали с помощью транзиторной трансфекции CHO-E клеток с применением рТТ5 векторов, несущих гены, кодирующие DLL3/CD3-цепь. Вкратце, трансфектированные CHO-E клетки, выращиваемые в суспензии в бессывороточной среде, культивировали во встряхиваемых колбах при перемешивании при 140 об/мин, 37°C и 5% CO₂ и поддерживали в условиях экспоненциального роста. В день трансфекции, клетки химически трансфектировали с применением плазмиды с Выступ-цепью и плазмиды с Впадина-цепью при массовом соотношении 1:3. Затем их высевали при 1-2×10⁶ клеток/мл в 1 л среды для экспрессии Gibco® FreeStyle™ CHO (LifeTechnologies, NY, US). После этого клетки инкубировали при орбитальном встряхивании в течение 10 дней с одноразовой подкормкой с помощью 200 мл коммерчески доступного питательного раствора для предоставления возможности экспрессии белков. Титры антител в супернатантах клеточных культур определяли, используя Octet® прибор (Pall ForteBio, CA, US) и protA биосенсорные щупы в соответствии с инструкциями производителя. Рекомбинантные DLL3/CD3 связывающие белки очищали из культурального супернатанта с помощью двухстадийного способа: сначала путем аффинной хроматографии на основе связывания с белком А, используя колонку MabSelect™ (GE Healthcare); на второй стадии, путем катионообменной хроматографии, используя колонку Poros 50 HS (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Двухстадийно очищенный материал хранили в конечном буфере, состоящем из 50 мМ ацетата натрия и 100 мМ NaCl, pH 5,0 чистоту и степень гетерогенности образцов оценивали с помощью аналитической гель-проникающей хроматографии, масс-спектрометрии и аналитического ультрацентрифугирования. Образцы, которые были перспективными для функционального тестирования, содержали двустадийно очищенный материал, приблизительно с 99% содержанием мономера.

Аминокислотные последовательности и SEQ ID для последовательностей CDR, VH, VL, scFab, DLL3-плеча и CD3-плеча из конструкций белка/антитела, описанных в настоящей заявке

Номер SEQ ID	Краткое описание последовательности	Последовательность
SEQ ID NO: 1	DLL3#1 LCCDR1	RASQSVSSNFLV
SEQ ID NO:2	DLL3#1 LCCDR2	GASTRAS
SEQ ID NO:3	DLL3#1 LCCDR3	QQYGDSPYT
SEQ ID NO:4	DLL3#1 HCCDR1	GNTFTNYMH
SEQ ID NO:5	DLL3#1 HCCDR2	IIDPSVGSKSYAQKFLG
SEQ ID NO:6	DLL3#1 HCCDR3	AGKRFGESYFDY
SEQ ID NO:7	DLL3#2 LCCDR1	RASQGISNYLA
SEQ ID NO:8	DLL3#2 LCCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO:9	DLL3#2 LCCDR3	LQHNSSPYT
SEQ ID NO:10	DLL3#2 HCCDR1	GYTFTSYMH
SEQ ID NO:11	DLL3#2 HCCDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG
SEQ ID NO:12	DLL3#2 HCCDR3	GEAVGGNYYYGMDV
SEQ ID NO:13	DLL3#3 LCCDR1	RASQGISNYLV
SEQ ID NO:14	DLL3#3 LCCDR2	AVSSLYS
SEQ ID NO:15	DLL3#3 LCCDR3	LQHDSYPYT
SEQ ID NO:16	DLL3#3 HCCDR1	GYTFTSYVH
SEQ ID NO:17	DLL3#3 HCCDR2	IINPGGGTTSYAQKFLG
SEQ ID NO:18	DLL3#3 HCCDR3	GEAVTGNYFYGMDV
SEQ ID NO:19	DLL3#4 LCCDR1	RASKSVSSFGYSFMH
SEQ ID NO:20	DLL3#4 LCCDR2	LASNLES
SEQ ID NO:21	DLL3#4 LCCDR3	QHSRELPWT
SEQ ID NO:22	DLL3#4 HCCDR1	VYTFTSYFMY
SEQ ID	DLL3#4	EISPTNGNSNLNERFKN

NO:23	HCCDR2	
SEQ ID NO:24	DLL3#4 HCCDR3	GGDGYLDY
SEQ ID NO:25	DLL3#5 LCCDR1	QASQDISNYLN
SEQ ID NO:26	DLL3#5 LCCDR2	DASNLET
SEQ ID NO:27	DLL3#5 LCCDR3	QQYDNLPTWT
SEQ ID NO:28	DLL3#5 HCCDR1	GFTFTGYIYH
SEQ ID NO:29	DLL3#5 HCCDR2	WINPNSGGTNYAQKFQG
SEQ ID NO:30	DLL3#5 HCCDR3	GWDY
SEQ ID NO:31	DLL3#6 LCCDR1	RASQDISNYFA
SEQ ID NO:32	DLL3#6 LCCDR2	AASTLQS
SEQ ID NO:33	DLL3#6 LCCDR3	QQLNSYPYT
SEQ ID NO:34	DLL3#6 HCCDR1	GGSISSYFWS
SEQ ID NO:35	DLL3#6 HCCDR2	RIYTSGSTNYPNPSLNS
SEQ ID NO:36	DLL3#6 HCCDR3	RGDWGGFDI
SEQ ID NO:37	DLL3#1 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNFLVWYQQKPGQAPRP LIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFALYYCQQYGD SPTFGQGTLEIK
SEQ ID NO:38	DLL3#1 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGNTFTNYMHWVRQAPGPG LEWMGIIDPSVGSKSYAQKFLGRVTIARDTSTSTVFLDLYSLRSEDTA VYFCARAGKRFGESYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:39	DLL3#2 VL	DIQMTQSPSAMSASVGDRTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKVEPL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSPY TFGQGTLEIK
SEQ ID NO:40	DLL3#2 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMHWVRQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFLGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDT AVYYCARGEAVTGNFYFGMDVWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:41	DLL3#3 VL	DIQMTQSPSAMSASVGDRTITCRASQGISNYLVWFQQKPGKAPKR LIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHDSYP YTFGQGTLEIK
SEQ ID NO:42	DLL3#3 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYVHWVRQAPGQGL EWMVIINPGGTTSYAQKFLGRVTMTRDTSTNTVYMEKLSLSEDT AVYYCARGEAVTGNFYFGMDVWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:43	DLL3#4 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSFGYSFMHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHS RELPTWTFGGGTLEIK
SEQ ID NO:44	DLL3#4 VH	QVQLQQSGTELVKPGASVKLSCKASVYFTSYFMYWVKQRPVGHGL EWIGEISPTNGNSNLNERFKNKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCTRGGDGYLDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:45	DLL3#5 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYDASNLETGVPFRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDFATYYCQQYDNL PTWTFGQGTLEIK
SEQ ID	DLL3#5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTGYIYHWRQAPGQGL

NO:46	VH	EWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDSSINTAFMELSRLLTSDDT AVYYCAAGWDYWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO:47	DLL3#6 VL	DIQLTQSPSFLSTSVGDRVTITCRASQDISNYFAWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPY TFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:48	DLL3#6 VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPAGKGLEW IGRIYTSGSTNYNPSLNSRLTMSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARRGDWGGFDIWGQGTVVTVSS
SEQ ID NO:49	DLL3#1 scFab	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNFLVWYQQKPGQAPRP LIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFALYCCQYGD SPTFTFGQGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADY EYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSEK STEGKSSGSGSEKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGNTFTNYYMHWRQAPGQGLEWMGIIDPSVGSKSYAQKFLGR VTIARDTSTSTVFLDLYSLRSEDTAVYFCARAGKRFGE SYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSC
SEQ ID NO:50	DLL3#2 scFab	DIQMTQSPSAMSASVGDRTITCRASQGISNYLAWFQQKPGK VPEPLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISSLQPEDFATYYC LQHNSSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS STLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGG SEGKSSGSGSEKSTEGKSSGSGSEKSTGGGGSQVQLVQSGAEV KKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIINP SGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARGEA VGGNYYYGMDVWGQGT TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSC
SEQ ID NO:51	DLL3#3 scFab	DIQMTQSPSAMSASVGDRTITCRASQGISNYLVWFQQKPGK APKRLIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC LQHDSYPTFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS STLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGG SEGKSSGSGSEKSTEGKSSGSGSEKSTGGGGSQVQLVQSGAEV KKPGASVKVSKASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEWMVIINP GGGTTSYAQKFLGRVTMTRDSTNTVYME LKSLRSEDTAVYYCARGEA VTNFYGGMDVWGQGT TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSC
SEQ ID NO:52	DLL3#4 scFab	DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASKSVSSFGYSFMHWYQQK PGQP KLLIYLASNLESGVPARFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAATYYC QHRELWPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS STLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGG SEGKSSGSGSEKSTEGKSSGSGSEKSTGGGGSQVQLVQSGTE LVKPGASVKLSCKASVYFTSYFMYWVKQRP GHLEWIGEISPTNGNSNLNERFKNKATLTV DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRGGDGYLDYWGQGT LLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSC
SEQ ID NO:53	DLL3#5 scFab	DIQMTQSPSSLASVGDRTVTCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPK LLIYDASNLETGVP SRFSGSGGTDFTTISLQPEDFATYYCQYDNL PTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSSTLTLSKADY

		KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGGKSSGSGSESKST EGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGF TFTGYYIHVVWRQAPGGGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMT RDSSINTAFMELSRLLTSDDTAVYYCAAGWDYWGQGLTVTSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSC
SEQ ID NO:54	DLL3#6 scFab	DIQLTQSPSFLSTSVGDRVTITCRASQDISNYFAWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGGGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPY TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGGKSSGSGSESKSTEGKS SGSGSESKSTGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISYF WSWIRQPAGKLEWIGRIYTSGSTNYPNLSLNSRLTMSVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARRGDWGGFDIWGGQTVVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS C
SEQ ID NO:55	CD3#1 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO:56	CD3#1 LCCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO:57	CD3#1 LCCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:58	CD3#1 HCCDR1	GFTFNTYAMN
SEQ ID NO:59	CD3#1 HCCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO:60	CD3#1 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:61	CD3#2 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO:62	CD3#2 LCCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO:63	CD3#2 LCCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:64	CD3#2 HCCDR1	GFTFNTYAMN
SEQ ID NO:65	CD3#2 HCCDR2	RIRSKYINYATYYADSVKD
SEQ ID NO:66	CD3#2 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:67	CD3#1 VL	EAVVTQEPSTLVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQLP RGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYFCAL WYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:68	CD3#1 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTSA
SEQ ID NO:69	CD3#2 VL	EAVVTQEPSTLVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQLP RGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYFCAL WYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:70	CD3#2 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYINYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTSA
SEQ ID	CD3#1	EAVVTQEPSTLVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQLP

NO:71	scFab	RGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYFCAL WYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECGGGGSEGKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGGGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:72	CD3#2 scFab	EA VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQLP RGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYFCAL WYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECGGGGSEGKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:73	DLL3#1 цепь	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNFLVWYQKPGQAPRP LIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFALYYCQYGD PYTFGQGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTE GKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGNT FTNYMHWVRQAPGPLEWMGIIDPSVGSKSYAQKFLGRVTIARDT STSTVFLDLYSLRSEDTAVYFCARAGKRFGEYFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
SEQ ID NO:74	DLL3#2 цепь	DIQMTQSPSAMSASVGDRTITCRASQGISNYLAWFQQKPGK VPEPL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSPY TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKS SGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTS YYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDST STVYMESSLRSEDTAVYYCARGEA VGGNYYYYGMVDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
SEQ ID NO:75	DLL3#3 цепь	DIQMTQSPSAMSASVGDRTITCRASQGISNYLVWFQQKPGKAPKR LIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHDSYP YTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE

		AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSESKSTEG KSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF TSYYVHWVRQAPGGLEWMIINPGGGTTSYAQKFLGRVTMTRDT STNTVYMELKSLRSEDNAVYYCARGEAVTGNFYFGMDVWGQGT TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG
SEQ ID NO:76	DLL3#4 цепь	DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASKSVSSFGYSFMHWYQQKPGQP PKLLIYLASNLESGVPAARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHS RELPTWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKAD YEHKVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSESK STEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQSSGTELKPGASVKLSCKASV YFTSYFMYWVKQRPGHLEWIGIEISPTNGNSNLNERFKNKATLTV DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRGGDGYLDYWGQGTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
SEQ ID NO:77	DLL3#5 цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYDASNLETGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQYDNL PTWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYE KHKVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSESKST EGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGF TFTGYYIHWVRQAPGGLEWMIINPGGGTTSYAQKFLGRVTMTRDT RDSSINTAFMELSRITSDDTAVYYCAAGWDYWGQGTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
SEQ ID NO:78	DLL3#6 цепь	DIQLTQSPSFLSTSVGDRVTITCRASQDISNYFAWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFRSGGGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPY TFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEHKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKS SGSGSESKSTGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSISSYF WSWIRQPAGKLEWIGRIYTSSTNYNPSLNSRLTMSVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARRGDWGGFDIWGQGTVVTSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDV

		SHEPVEKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:79	CD3#1 цепь	EAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQLP RGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYFCAL WYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLT PEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECSSGGGSEKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGLTVTVAASKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIK KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNRFQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:80	CD3#2 цепь	EAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQLP RGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYFCAL WYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLT PEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECSSGGGSEKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGLTVTVAASKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIK KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNRFQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:81	Fc домен* (IgG1)	<u>DKTHTCPPCP</u> APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:82	Fc W домен (IgG1, LALA)	<u>DKTHTCPPCP</u> APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:83	Fc SAV домен (IgG1, RF/LALA)	<u>DKTHTCPPCP</u> APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNRFQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:84	Fc домен (IgG4Pro)	<u>ESKYGPPCPPCP</u> APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

SEQ ID NO:85	Fc W домен (IgG4Pro)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLG
SEQ ID NO:86	Fc SAV домен (IgG4Pro, RF)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFF LVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLG
SEQ ID NO:87	константная область капша легкой цепи	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:88	константная область лямбда легкой цепи	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKAADG SPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPAEC
SEQ ID NO:89	Линкер	GGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGG
SEQ ID NO:90	Линкер	GGGGSGGGGSGGGSGGGGGGGG
SEQ ID NO:91	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGG
SEQ ID NO:92	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGG
SEQ ID NO:93	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGG
SEQ ID NO:94	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGG
SEQ ID NO:95	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGG
SEQ ID NO:96	CD3#3 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO:97	CD3#3 LCCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO:98	CD3#3 LCCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:99	CD3#3 HCCDR1	GFTFNTYAMN
SEQ ID NO:100	CD3#3 HCCDR2	RIRSKYANYATYYADSVKD
SEQ ID NO:101	CD3#3 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:102	CD3#3 VL	EAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQLP RGLIGGTNKRAPVVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYFCAL WYSNLWVFGGGTGLTVL
SEQ ID NO:103	CD3#3 HL	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYANYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSA
SEQ ID NO:104	CD3#3 scFab	EAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQLP RGLIGGTNKRAPVVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYFCAL WYSNLWVFGGGTGLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVKVAWKAADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLT PEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECGGGGSEGKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA

		SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYANYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVVTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:105	CD3#3 цепь	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQLP RGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYFCAL WYSNLWVFGGKTLTVLGGPKAAPSVTLPSPSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTPPSKQSNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECGGGGSEGKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYANYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVVTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKTHTCPPEAPEAAGGSPVFLFPPK PKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNRFTQKLSLSPG
SEQ ID NO:133	DLL3#7 LCCDR1	RASQSVNSNFLA
SEQ ID NO:134	DLL3#7 LCCDR2	GTSSRAT
SEQ ID NO:135	DLL3#7 LCCDR3	QQYGSSPWT
SEQ ID NO:136	DLL3#7 HCCDR1	GFTFSSYGMF
SEQ ID NO:137	DLL3#7 HCCDR2	VIWLDGDEDEDYVDSVKG
SEQ ID NO:138	DLL3#7 HCCDR3	VLDY
SEQ ID NO:139	DLL3#8 LCCDR1	KSSQSVLDTSNNKNYL
SEQ ID NO:140	DLL3#8 LCCDR2	WASTRES
SEQ ID NO:141	DLL3#8 LCCDR3	QHYYNSPYT
SEQ ID NO:142	DLL3#8 HCCDR1	GYTFTDYMH
SEQ ID NO:143	DLL3#8 HCCDR2	WINPNSGGTNYEQKFQG
SEQ ID NO:144	DLL3#8 HCCDR3	DAVVIPMDY
SEQ ID NO:145	DLL3#9 LCCDR1	RASQISRSYLA
SEQ ID NO:146	DLL3#9 LCCDR2	GASSRAT
SEQ ID NO:147	DLL3#9 LCCDR3	QQYGTSPIT
SEQ ID NO:148	DLL3#9 HCCDR1	GGSISSYYWS
SEQ ID NO:149	DLL3#9 HCCDR2	YRYYSGNTNYNPSLKS

SEQ ID NO:150	DLL3#9 HCCDR3	IGVAGFYFDY
SEQ ID NO:151	DLL3#10 LCCDR1	RASQSLNSIFLA
SEQ ID NO:152	DLL3#10 LCCDR2	GASSRAT
SEQ ID NO:153	DLL3#10 LCCDR3	QQYGGSMNT
SEQ ID NO:154	DLL3#10 HCCDR1	GYTFTGYMMH
SEQ ID NO:155	DLL3#10 HCCDR2	WINPNSGGTIFAQRFQG
SEQ ID NO:156	DLL3#10 HCCDR3	DFGDTVGNAFDI
SEQ ID NO:157	DLL3#11 LCCDR1	SASSSVTYIH
SEQ ID NO:158	DLL3#11 LCCDR2	RTSYLAS
SEQ ID NO:159	DLL3#11 LCCDR3	QQRSSYPRT
SEQ ID NO:160	DLL3#11 HCCDR1	GYAFSDYWIT
SEQ ID NO:161	DLL3#11 HCCDR2	DIYPGSGSTKSSEKFKN
SEQ ID NO:162	DLL3#11 HCCDR3	LYYYGSHYLDT
SEQ ID NO:163	DLL3#12 LCCDR1	SASSSVTYIH
SEQ ID NO:164	DLL3#12 LCCDR2	RTSYLAS
SEQ ID NO:165	DLL3#12 LCCDR3	QQRSSYPRT
SEQ ID NO:166	DLL3#12 HCCDR1	GYAFSDYWIT
SEQ ID NO:167	DLL3#12 HCCDR2	DIYPGSGSTKSSEKFKN
SEQ ID NO:168	DLL3#12 HCCDR3	LYYYGSYYLDT
SEQ ID NO:169	DLL3#13 LCCDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE
SEQ ID NO:170	DLL3#13 LCCDR2	KVSNRFS
SEQ ID NO:171	DLL3#13 LCCDR3	FQGSHVPYT
SEQ ID NO:172	DLL3#13 HCCDR1	GYTFTNYGVT
SEQ ID NO:173	DLL3#13 HCCDR2	WINTYSGAPTYADDFNG
SEQ ID NO:174	DLL3#13 HCCDR3	LDDYDLYYFDY
SEQ ID NO:175	DLL3#14 LCCDR1	KASQSVDYDGDSYMN
SEQ ID NO:176	DLL3#14 LCCDR2	AASTLES
SEQ ID	DLL3#14	QQSEDPWT

NO:177	LCCDR3	
SEQ ID NO:178	DLL3#14 HCCDR1	GYTFTDYIHH
SEQ ID NO:179	DLL3#14 HCCDR2	YIYPGNSYTAYNQKFKD
SEQ ID NO:180	DLL3#14 HCCDR3	SGGSAMDY
SEQ ID NO:181	DLL3#15 LCCDR1	KASQSVDDYDGD SYLN
SEQ ID NO:182	DLL3#15 LCCDR2	AASNLES
SEQ ID NO:183	DLL3#15 LCCDR3	QQSEDPRT
SEQ ID NO:184	DLL3#15 HCCDR1	GYTFTNYGMN
SEQ ID NO:185	DLL3#15 HCCDR2	WINTYTGEPTYADDFKG
SEQ ID NO:186	DLL3#15 HCCDR3	FHFSSNGDAMDN
SEQ ID NO:187	DLL3#16 LCCDR1	RASQSVSDWLA
SEQ ID NO:188	DLL3#16 LCCDR2	RASSLES
SEQ ID NO:189	DLL3#16 LCCDR3	QLYNSYSPT
SEQ ID NO:190	DLL3#16 HCCDR1	GFTFSSYWMT
SEQ ID NO:191	DLL3#16 HCCDR2	NIKEDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO:192	DLL3#16 HCCDR3	DWGYFDY
SEQ ID NO:193	DLL3#17 LCCDR1	RASENIYYSLA
SEQ ID NO:194	DLL3#17 LCCDR2	NTNSLED
SEQ ID NO:195	DLL3#17 LCCDR3	KQAYDFPLT
SEQ ID NO:196	DLL3#17 HCCDR1	GYTFISYYIH
SEQ ID NO:197	DLL3#17 HCCDR2	WIYPGDGSTNNNEKFKG
SEQ ID NO:198	DLL3#17 HCCDR3	GEGNAMDD
SEQ ID NO:199	DLL3#18 LCCDR1	RASENIYYSLA
SEQ ID NO:200	DLL3#18 LCCDR2	NANSLED
SEQ ID NO:201	DLL3#18 LCCDR3	KQAYDVPLT
SEQ ID NO:202	DLL3#18 HCCDR1	GYTFTAYFIH
SEQ ID NO:203	DLL3#18 HCCDR2	YIDPFNDDTNYNVKFKG
SEQ ID NO:204	DLL3#18 HCCDR3	GTSATLDY

SEQ ID NO:205	DLL3#7 VL	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSNFLAWYQQKPGQTPRL LIFGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP WTFGQGTKVEIR
SEQ ID NO:206	DLL3#7 VH	QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYGMFVWRQAPGKGLE WVAVIWLDGDEDEDYVDSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRVDDT AIYYCARVLDYWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO:207	DLL3#8 VL	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNKNYLVWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQHYYNSPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:208	DLL3#8 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYMHVWRQAPGG LEWMGWINPNSGGTNYEQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSD DTAVYYCTRDAVVPMDYWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO:209	DLL3#9 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSYLAFLAWYQQKPGQAPRL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSP TFGQGTREIK
SEQ ID NO:210	DLL3#9 VH	QVHLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSISSYYWSWIRQTPGKGLDW IGYRYYSGNTNYNPSLKSRTISLDMSNNQFSLKLSVTAADTAIYY CASIGVAGFYFDYWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO:211	DLL3#10 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLNSIFLAWYQQKPGQAPWLL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYGGSM NTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:212	DLL3#10 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVWRLAPGG LEWMGWINPNSGGTIFAQRVQGRVTMTRDTSISTVYMDLNRLRSD TAVYYCARDVFDYVGNAFDIWGQGTMTVTVSS
SEQ ID NO:213	DLL3#11 VL	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSPKLIWY RTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYP TFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:214	DLL3#11 VH	QVQLQQPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSDYWITWVKQRPQGGL EWIGDIYPGSGSTKSSEKFKNKATLTADTSSSKAYIQFSSLTPEDSAV YYCVSLYYYGSHYLDYWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO:215	DLL3#12 VL	QVVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSPKLIWY RTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYP TFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:216	DLL3#12 VH	QVQLQQPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSDYWITWVKQRPQGGL EWIGDIYPGSGSTKSSEKFKNRATLTADTSSSAYIQFSSLTPEDSAV YYCVSLYYYGSHYLDYWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO:217	DLL3#13 VL	DVLMTQTPLSLPVS LGDQAAISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ SPKVLIIKVSNRFGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCF QGSHPVYTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:218	DLL3#13 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGVTWVKQAPGKGLK WMGWINTYSGAPTYADDFNGRFALSLETSASTAYLQINLNKNEDETA TYFCARLDDYLDYFDYWGQGTALT VSS
SEQ ID NO:219	DLL3#14 VL	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSVYDGD SYMNWYQQKPGQ PPKLLIYAASSTLESIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQ SDEDPWTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:220	DLL3#14 VH	QIQLQQSGPELVKPGVKISCKASGYTFTDYIHWKQRPQGGLLEWI GYIYPGNSYTAYNQKFKDKATLTADNPSSTAYMQLSSLTSEDSAVY FCARSGGSAMDYWGQGTSTVTVSS
SEQ ID NO:221	DLL3#15 VL	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSVYDGD SYLNWYQQKPGQ PPKLLIYAASNLESIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQ SSEDPRTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:222	DLL3#15 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLK WMGWINTYTGPEYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINLNKNEDEMA TYFCTKHFHSSNGDAMDNDWGQGTSTVTVSS
SEQ ID	DLL3#16	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSDWLAFLAWYQQKPGKAPKF

NO:223	VL	LIYRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPADFATYYCQLYNSYS PTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:224	DLL3#16 VH	EVHLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGL EWWANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCARDWGYFDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:225	DLL3#17 VL	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQKSPQLL IYNTNSLEDGVPFRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYDF PLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO:226	DLL3#17 VH	QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFISYYIHWVKQRPQGGLW IGWIYPGDGSTNNNEKFKGKTTLTADKSSSTAYMLLSSLTSEDSAVY FCARGEGNAMDDWGQGTSTVTVSS
SEQ ID NO:227	DLL3#18 VL	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQKSPQLL IYNANSLEDGVPFRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYD VPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO:228	DLL3#18 VH	QVQLQQSGPDLVKPGASVKMSCEASGYTFTAIFYIHWVKQKPGQGL EWIGYIDPFNDNTNINVKFKGKATLTSDTSSSIAYMELSSLTSEDSF YYCARGTSATLDYWGHTTLTVSS
SEQ ID NO:229	DLL3#7 scFab	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSNFLAWYQQKPGQTPRL LIFGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGGSSP WTFGQGTKVEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSSGSGSESKSTE GKSSSGSESKSTGGGGSQVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTF SSYGMFWVRQAPGKGLEWVAVIWLDGDDDEDYVDSVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNLRVDDTAIYYCARVLDYWGQGTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SC
SEQ ID NO:230	DLL3#8 scFab	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNKNLYLVWYQQK GQPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEVAVYY CQHYYNSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSSGSG SESKSTEGKSSSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTDYYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYEQKFFQ GRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCTRDAVVPMDYWGQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:231	DLL3#9 scFab	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQISRSYLAWYQQKPGQAPRLL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGTSP TFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSSGSGSESKSTEGKS SGSGSESKSTGGGGSQVHLQESGPGLVKPSSETLSTCTVSGGSISSYY WSWIRQTPGKGLDWIGYRYYSGNTNYPNPSLKSRTISLDMNSNQFS LKLSSVTAADTAIYYCASIGVAGFYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SC
SEQ ID NO:232	DLL3#10 scFab	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLNSIFLAWYQQKPGQAPWLL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYFCQQYGGSM NTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSSGSGSESKSTEG KSSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF

		TGYMHVRLAPGQGLEWMGWINPNSGGTIFAQRFQGRVTMTRD TSISTVYMDLNRRLRSDDTAVYYCARDFGDVTGNAFDIWQGMV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:233	DLL3#11 scFab	QIVLTQSPAIMASAPGEEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSPKLWY RTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYP TFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKS SGSGSESKSTGGGGSQVQLQPPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSD YWITWVKQRPQGLEWIGDIYPGSGSTKSEKFKNKATLTADTSSSK AYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYYYGSHYLDTWGQGTLLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSC
SEQ ID NO:234	DLL3#12 scFab	QVVLQSPAIMASAPGEEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSPKLWY RTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYP TFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSESKSTEGKS SGSGSESKSTGGGGSQVQLQPPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSD YWITWVKQRPQGLEWIGDIYPGSGSTKSEKFKNRATLTADTSSST AYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYYYGSYLDTWGQGTLLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSC
SEQ ID NO:235	DLL3#13 scFab	DVLMQTPLSLPVSLGDQAAISCRSSQIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ SPKVLIIYKVSNRFSVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCF QGSHPVYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYFTNYGVTWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGAPTYADDFNGRFA LLETASTAYLQINNLKNEEDATYFCARLDDYDLYYFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:236	DLL3#14 scFab	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMWNWYQKPGQ PPKLLIYAASSTLESVIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQ SDEDPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPELVKPGVKISCKASG YFTDYIHWKQRPQGLEWIGYIYPGNSYTAYNQKFKDKATLT ADNPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSGGSAMDYWGQGTSTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSC
SEQ ID NO:237	DLL3#15 scFab	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLWNWYQKPGQ PPKLLIYAASNLESVIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQ SSEDPRTFGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSE KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASG YFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTYTGPEYADDFKGRFA

		SLETSASTAYLQINNLIKNEDEMATYFCTKHFSSNGDAMDNDWGGQTS VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:238	DLL3#16 scFab	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSDWLAWYQQKPGKAPKF LIYRASSLESGVPSRFSGSGTEFTLTISSLQPADFATYYCQLYNSYS PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEEK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTEG KSSGSGSESKSTGGGGSEVHLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDWGYFDYWGGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSC
SEQ ID NO:239	DLL3#17 scFab	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQKSPQLL IYNTNSLEDGVPFRFSGSGGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYDF PLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTE GKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFI SYIHWVKQRPQGLEWIGWIYPGDGSTNNNEKFKGKTLTADKSS STAYMLLSSLTSEDSAVYFCARGEGNAMDDWGGTSTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSC
SEQ ID NO:240	DLL3#18 scFab	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQKSPQLL IYNANSLEDGVPFRFSGSGGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYDF VPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEEK KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKST EGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQQSGPDLVKPGASVKMSCEASGY TFTA YFIHWVKQKPGQGLEWIGYIDPFNDDTNYNVKFKGKATLSD TSSSIAYMELSSLTSEDSAVYFCARGTSLTDYWGHTLTVSSASTK KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSC
SEQ ID NO:241	DLL3#7 цепь	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSNFWLAWYQQKPGQTPRL LIFGTSSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGGSSP WTFGQGTKVEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESKSTE GKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVESGGGVVQPGSRRLSCAASGFTF SSYGMFWVRQAPGKGLEWVAIVWLDGDEDEDYVDSVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLRVDDTAIYYCARVLDYWGQTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:242	DLL3#8 цепь	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNKNYLWVYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQHYYNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL

		SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSG SESKSTEGKSSGSGSEKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTDYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYEQKFQ GRVTMTRDTSISTA YMELNRLRSDDTA VYYCTRDVAVIPMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:243	DLL3#9 цепь	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQISRSYLA WYQQKPGQAPRLL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYGTSP TFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSEKSTEGKS SGSGSEKSTGGGGSQVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYY WSWIRQTPGKGLDWIGYRYYSGNTNYPNLSKSRVTISLDMSSNNQFS LKLSSVTAADTAIYYCASIGVAGFYFDYWGQGTLT VVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHNTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:244	DLL3#10 цепь	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLNSIFLA WYQQKPGQAPWLL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYGGSM NTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSEKSTEG KSSGSGSEKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TGYYMHWRVRLAPGQGLEWMGWINPNSGGTIFAQRFGGRVTMTRD TSISTVYMDLNRLRSDDTA VYYCARDFGDTVGNAFDIWGGQTMVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHNTQK SLSLSPG
SEQ ID NO:245	DLL3#11 цепь	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSPKLIWY RTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPR TFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEKSSGSGSEKSTEGKS SGSGSEKSTGGGGSQVQLQPPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSD YWITWVKQRPQGLEWIGDIYPSGSGTKSSEKFKNKATLTADTSSSK AYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYYYGSHYLDTWGQGTTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

		EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:246	DLL3#12 цепь	QVVLTPSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNPGTSPKLWIYRTSYLASEGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSEKSTEGKSSGSGSEKSTGGGGSQVQLQQPGAQFVQPGSSVKMCKASGYAFSDYWITWVKQRPQQGLEWIGDIYPGSGSTKSSSEKFKNRATLTADTSSSTAYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYYGYSYLDLDTWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:247	DLL3#13 цепь	DVLMTQTPLSLPVSLGDQAAISCRSSQSIHNSGNTYLEWYLQKPGQSPKVLIIKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSEKSTEGKSSGSGSEKSTGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNYGVTWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGAPTYADDFNGRFA LSLETSASTAYLQINNLKNEATATYFCARLDDYDLYYFDYWGQGTALTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:248	DLL3#14 цепь	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSVYDGDYSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASSTLESIGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSDEDPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSEKSTEGKSSGSGSEKSTGGGGSQIQLQQSGPELVKPGVKISCKASGYFTFDYIHWKQRPQQGLEWIGYIYPGNSYTAYNQKFKDKATLTADNPSSAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSGGSAMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:249	DLL3#15 цепь	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVYDGDYSYLNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESIGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSSEDPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSEKSTEGKSSGSGSEKSTGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPYADDFKGRFAF

		SLETSASTAYLQINNLKNEDEMATYFCTKHFHSSNGDAMDNDWGGQTS VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHT QKLSLSLSPG
SEQ ID NO:250	DLL3#16 цепь	DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQSVSDWLA WYQQKPGKAPKF LIYRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPADFATYYCQLYNSYS PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSEKSTEG KSSGSGSEKSTGGGGSEVHLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTALYCARDWGYFDYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:251	DLL3#17 цепь	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQKSPQLL IYNTNSLEDGVPFRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYDF PLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSEKSTE GKSSGSGSEKSTGGGGSQIQLQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFI SYYIHWVKQRPGQGLEWIGWIYPGDGSTNNNEKFKGKTTLTADKSS STAYMLLSSLTSEDSAVYFCARGEGNAMDDWGQTSVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPG
SEQ ID NO:252	DLL3#18 цепь	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQKSPQLL IYNANSLEDGVPFRFSGSGSGTQYSMKINNMQPEDTATYFCKQAYD VPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKADY KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSEKST EGKSSGSGSEKSTGGGGSQVQLQSGPDLVKPGASVKMSCEASGY TFTAYFIHWVKQKPGQGLEWIGYIDPFNDTNYNPKFKGKATLTS TSSSIAYMEISSITSEDSFYFCARGTSATLDYWGHTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPP SREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSP G
SEQ ID NO:253	Константная область СН1 тяжелой цепи	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSC
SEQ ID NO:254	Mouse IgG2a HC	AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGFYFPEPVTLTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVD KKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIKPKIKDVLMSLSPVITC VVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDDTLRVSALP IQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP PEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLD SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNNHTTKSFRTP GK
SEQ ID NO:255	Мышиный Каппа LC	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNRFYPKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCETHK TSTSPIVKSFNRNEC

*Подчернутая последовательность указывает шарнирную область.

Пример 3. Производство рекомбинантных белков DLL3-His человека.

Создавали клеточную линию для производства DLL3-His человека, используя HEK-293 клетки (Thermo Fisher), Lenti-X лентивирусную систему (Clontech), и плазмиду, кодирующую DLL3-His человека (DLL3 человека Номер доступа Q9NYJ7 huDLL3-His: SEQ ID NO:106). Для экспрессии, клетки культивировали и размножали при 37°C, 5% CO₂, и встряхивали при 140 об/мин. В День 0 экспрессии, клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в Expi 293 среде. В День 3 экспрессии кондиционированный культуральный супернатант собирали путем осаждения клеток центрифугированием в течение 40 мин при 4700 об/мин. К биомассе добавляли ингибиторы протеазы перед очисткой. Экспрессию подтверждали с помощью вестерн-блоттинга. Кондиционированный культуральный супернатант доводили с помощью 0,5 мМ TCEP, 0,02% CHAPS, 10 мМ имидазола. Очистку осуществляли на HisTrap Ni excel колонке и Буфере А: 50 мМ MES, 50 мМ NaCl, 0,5 мМ TCEP, 0,02% CHAPS, pH 6,5. Представляющий интерес белок элюировали в Буфере А, дополненном с применением 0,5 М Имидазола, pH 8,5, используя градиент элюирования от 20 мМ имидазола до 500 мМ имидазола. Объединенные фракции диализировали в буфере: 50 мМ MES, 50 мМ NaCl, 1 мМ TCEP, 0,02% CHAPS, 0,2 М Аргинина, 3% глицерина, pH 6,5. Очищенный материал количественно определяли с помощью масс-спектрологии и аналитического ультра-центрифугирования.

DLL3-His яванской макаки.

Создавали клеточную линию для производства DLL3-His яванской макаки, используя HEK-293 клетки (Thermo Fisher), Lenti-X лентивирусную систему (Clontech), и плазмиду, кодирующую DLL3-His яванской макаки (Супо DLL3 № доступа: XM_005589196.1 (RefSeq); DLL3-His яванской макаки: SEQ ID NO:107). Для экспрессии, клетки культивировали и размножали при 37°C, 5% CO₂, и встряхивали при 140 об/мин. В День 0 экспрессии, клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в Expi 293 среде. В День 3 экспрессии кондиционированный культуральный супернатант собирали путем осаждения клеток центрифугированием в течение 40 мин при 4700 об/мин. К биомассе добавляли ингибиторы протеазы перед очисткой. Экспрессию подтверждали с помощью вестерн-блоттинга. Кондиционированный культуральный супернатант доводили с помощью 0,5 мМ TCEP, 0,02% CHAPS, 10 мМ имидазола. Очистку осуществляли на HisTrap Ni excel колонке и Буфере А: 50 мМ MES, 50 мМ NaCl, 0,5 мМ TCEP, 0,02% CHAPS, pH 6,5. Представляющий интерес белок элюировали в Буфере А, дополненном с применением 0,5М Имидазола, pH 8,5, используя градиент элюирования от 20 мМ имидазола до 500 мМ имидазола. Объединенные фракции диализировали в буфере: 50 мМ MES, 50 мМ NaCl, 1 мМ TCEP, 0,02% CHAPS, 0,2 М Аргинин, 3% глицерин, pH 6,5. Очищенный материал количественно определяли с помощью масс-спектрологии и аналитического ультра-центрифугирования.

CD3 E+G HuFc-6xHis человека (E+G указывает на $\epsilon\gamma$ субъединицы).

Создавали клеточную линию для производства CD3 E+G HuFc-6xHis человека, используя HEK-293 клетки (Thermo Fisher), Lenti-X лентивирусную систему (Clontech), и плазмиду, кодирующую CD3 E+G HuFc-6xHis человека (CD3E человека № доступа: P07766; CD3E+G-HuFc-His человека: SEQ ID NO:108). Для экспрессии, клетки культивировали и размножали в Freestyle 293 среде, при 37°C, увлажненной 8% CO₂ среде, и встряхивании при 135 об/мин. Кондиционированный культуральный супернатант собирали в День 6 путем центрифугирования в течение 30 мин при 9300×g. Экспрессию мониторили с помощью SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга. Кондиционированный культуральный супернатант доводили с помощью 0,2 М сахарозы, 5% глицерина, 0,01% CHAPS, и 10 мМ Имидазола. После этого значение pH доводили до 7,2. Очистку осуществляли с помощью двустадийного способа: аффинную очистку, используя Ni/NTA смолу (инкубирование в течение ночи при 4°C, и элюирование с 250 мМ Имидазолом); с последующей гель-проникающей хроматографией на колонке Superdex 200 в установочном буфере PBS с 0,2М сахарозой, 5% глицерином, 0,01% CHAPS, 1 мМ TCEP, pH 7,2. Объединенный материал концентрировали, используя устройство для центрифугирования 10K MWCO PES мембран живых клеток 100 перед конечным анализом и хранением. Очищенный материал количественно определяли с помощью масс-спектрологии и аналитического ультра-центрифугирования.

CD3 E+G HuFc-6xHis яванской макаки (E+G указывает на $\epsilon\gamma$ субъединицы).

Создавали клеточную линию для производства CD3 E+G HuFc-6xHis яванской макаки, используя HEK-293 клетки (Thermo Fisher), Lenti-X лентивирусную систему (Clontech), и плазмиду, кодирующую CD3 E+G HuFc-6xHis яванской макаки (CD3E яванской макаки № доступа: Q95L15 <, CD3 E+G huFc-His яванской макаки: SEQ ID NO:109). Для экспрессии, клетки культивировали и размножали в Freestyle 293 среде, при 37°C, увлажненной 8% CO₂ среде, и встряхивании при 135 об/мин. Кондиционированный культуральный супернатант собирали в День 6 путем центрифугирования в течение 30 мин при 9300×g. Экспрессию мониторили с помощью SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга. Кондиционированный культуральный супернатант доводили с помощью 0,2 М Сахарозы, 5% глицерина, 0,01% CHAPS, и 10 мМ Имидазола. После этого значение pH доводили до 7,2. Очистку осуществляли с помощью двустадийного способа: аффинную очистку, используя Ni/NTA смолу (инкубирование в течение ночи при 4°C, и элюирование с 250 мМ Имидазолом); с последующей гель-проникающей хроматографией на колонке Superdex 200 в установочном буфере PBS с 0,2М Сахарозой, 5% глицерином, 0,01% CHAPS, 1 мМ TCEP, pH 7,2. Объ-

единенный материал концентрировали, используя устройство для центрифугирования 10K MWCO PES мембран живых клеток 100 перед конечным анализом и хранением. Очищенный материал количественно определяли с помощью масс-спектропии и аналитического ультрацентрифугирования.

Пример 4А. Определение аффинностей на основе SPR к рекомбинантным DLL3 и CD3 $\epsilon\gamma$ субъединицам и межвидовой перекрестной реактивности.

Связывающую аффинность очищенных DLL3/CD3 биспецифических конструкций для рекомбинантных DLL3-ECD человека и яванской макаки и Fc-слитых белков CD3 $\epsilon\gamma$ субъединиц человека и яванской макаки определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя прибор ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Буфер для прогонки и все разведения (за исключением тех случаев, где указано) осуществляли в PBS-T-EDTA. GLM сенсорный чип (Bio-Rad) нормировали и предварительно обрабатывали согласно рекомендациям производителя. Сенсорный чип активировали с равной смесью EDC/s-NHS в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин и иммобилизовали с белком A/G (20 мкг/мл в 10 mM ацетате pH 4,5) в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин, что приводило к получению ~ 5000 отн. ед. белка A/G на поверхности. Сенсорный чип деактивировали с 1 M этаноламин HCl в горизонтальном направлении в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин. Сенсорный чип стабилизировали в течение 18 с 0,85% фосфорной кислоты при скорости потока 100 мкл/мин 3 раза горизонтально и 3 раза вертикально. Для определения кинетики связывания с DLL3, биспецифические молекулы захватывали индивидуально на поверхности Белка A/G вертикально в течение 250 с при скорости потока 25 мкл/мин. Исходный уровень стабилизировали путем инъектирования PBS-T-EDTA в течение 60 с при скорости потока 40 мкл/мин горизонтально. Аналит (hu DLL3 или su DLL3) инъектировали горизонтально над захваченным антителом в течение 600 с при скорости потока 40 мкл/мин и диссоциации в течение 2700 с. Концентрации аналита составляли 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, и 1,25 нМ. Поверхность регенерировали путем инъектирования раствора 0,85% фосфорной кислоты в течение 18 с при скорости потока 100 мкл/мин один раз горизонтально и один раз вертикально.

Для определения кинетики связывания с CD3, hu CD3 $\epsilon\gamma$ -Fc и su CD3 $\epsilon\gamma$ -Fc (растворенные в pH 4,5 ацетате) иммобилизовали непосредственно на поверхность сенсора путем связывания амина в течение 140 с при скорости потока 30 мкл/мин вертикально. Исходный уровень стабилизировали путем инъектирования PBS-T-EDTA в течение 60 с при скорости потока 40 мкл/мин горизонтально. Аналит (биспецифическую молекулу) инъектировали горизонтально над захваченной CD3 $\epsilon\gamma$ -Fc конструкцией в течение 600 с при скорости потока 40 мкл/мин и диссоциации в течение 600 с. Концентрации аналита составляли 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ, 31,3 нМ, и 15,6 нМ или 2 мкМ, 1 мкМ, 0,5 мкМ, 0,25 мкМ, и 0,125 мкМ. Поверхность регенерировали путем инъектирования раствора 0,85% фосфорной кислоты в течение 18 с при скорости потока 100 мкл/мин один раз горизонтально и один раз вертикально.

Промежуточное пятно (взаимодействия с поверхностью сенсора) и холостое (PBS-T-EDTA) вычитали из необработанных данных. Затем сенсограммы подгоняли к 1:1 кинетической модели для обеспечения констант скорости (ka, kd), а также значения аффинности (KD) для hu DLL3 и su DLL3, и глобально подгоняли к равновесию для обеспечения значения аффинности (KD) для hu CD3 $\epsilon\gamma$ и su CD3 $\epsilon\gamma$.

DLL3/CD3 связывающие белки, описанные в настоящей заявке, продемонстрировали аффинности к DLL3 в пМ диапазоне. Аффинности к CD3 $\epsilon\gamma$ субъединице находились в нижнем нМ диапазоне. Межвидовой пробел между человеком и яванской макакой был сбалансирован. Аффинности трех иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80 или SEQ ID NO:105, соответственно) представлены в табл. 2А.

Таблица 2А

Аффинности (KD) DLL3/CD3 связывающих белков к DLL3 человека и яванской макаки и CD3 $\epsilon\gamma$ субъединице, как определено с помощью SPR анализа, и межвидовые пробелы

DLL3/CD3 Связывающий белок	Рекомб. DLL3 человека	Рекомб. DLL3 яванской макаки	Пробел аффинности KD hu/su/no DLL3	Рекомб. CD3 $\epsilon\gamma$ человека	Рекомб. CD3 $\epsilon\gamma$ яванской макаки	Пробел аффинности KD hu/su/no CD3 $\epsilon\gamma$
DLL3#3/CD3#1	< 10 пМ	< 10 пМ	1	7 нМ	8 нМ	1,1
DLL3#3/CD3#2	< 10 пМ	< 10 пМ	1	90 нМ	100 нМ	1,1
DLL3#3/CD3#3	< 10 пМ	< 10 пМ	1	68 нМ	71 нМ	1,04

Пример 4В. Определение аффинностей на основе SPR к рекомбинантному DLL3 и CD3 $\epsilon\gamma$.

Связывающую аффинность очищенных DLL3/CD3 биспецифических конструкций к рекомбинантному DLL3-ECD человека и Fc-слитому белку CD3 $\epsilon\gamma$ субъединицы человека определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя прибор ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Способ был

сходный к описанному в примере 4А, но с некоторыми отличиями, как указано ниже.

Для определения кинетики связывания с DLL3, анти-DLL3/CD3 молекулы захватывали индивидуально на поверхности Белка А/G вертикально в течение 200 секунд при скорости потока 30 мкл/мин. Исходный уровень стабилизировали путем инъектирования PBS-T-EDTA в течение 60 с при скорости потока 30 мкл/мин горизонтально. Аналит (hu DLL3) инъектировали горизонтально над захваченным антителом в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин и диссоциации в течение 1800 с. Концентрации аналита составляли 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, и 1,25 нМ. Поверхность регенерировали путем инъектирования раствора 0,85% фосфорной кислоты в течение 18 с при скорости потока 100 мкл/мин один раз горизонтально и один раз вертикально. Для определения кинетики связывания с CD3, HuCD3E_HuCD3G-Fc (растворенные в pH 4,5 ацетате) иммобилизировали непосредственно на поверхность сенсора путем связывания амина в течение 360 с при скорости потока 30 мкл/мин вертикально. Исходный уровень стабилизировали путем инъектирования PBS-T-EDTA в течение 60 с при скорости потока 30 мкл/мин горизонтально. Аналиты (все анти-DLL3/CD3 молекулы) инъектировали горизонтально над захваченным антителом в течение 600 с при скорости потока 30 мкл/мин и диссоциации в течение 1800 с. Концентрации аналита составляли 250 нМ, 83,3 нМ, 27,8 нМ, 9,3 нМ, и 3,1 нМ. Поверхность регенерировали путем инъектирования раствора 0,85% фосфорной кислоты в течение 18 с при скорости потока 100 мкл/мин один раз горизонтально и один раз вертикально.

Аффинности иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, или SEQ ID NO:252 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80, и DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:105) представлены в табл. 2В.

Таблица 2В
Аффинности (KD) DLL3/CD3 связывающих белков к DLL3 человека
и CD3 $\epsilon\gamma$ субъединице, как определено с помощью SPR анализа

DLL3/CD3 Связыва- ющий белок	Рекомб. huDLL3 человека	Рекомб. huCD3 $\epsilon\gamma$ человека
DLL3#1/ CD3#1	52 пМ	2 нМ
DLL3#2/ CD3#1	91 пМ	3 нМ
DLL3#3/ CD3#1	75 пМ	2 нМ
DLL3#3/ CD3#2	120 пМ	7 нМ
DLL3#3/ CD3#3	116 пМ	4 нМ
DLL3#4/ CD3#1	< 20 пМ	2 нМ
DLL3#5/ CD3#1	< 20 пМ	3 нМ
DLL3#6/ CD3#1	152 пМ	2 нМ
DLL3#7/ CD3#1	637 пМ	1 нМ
DLL3#8/ CD3#1	40 пМ	2 нМ
DLL3#9/ CD3#1	46 пМ	2 нМ
DLL3#10/ CD3#1	141 пМ	нд
DLL3#11/ CD3#1	37 пМ	2 нМ
DLL3#12/ CD3#1	< 20 пМ	2 нМ
DLL3#13/ CD3#1	23 пМ	3 нМ
DLL3#14/ CD3#1	60 пМ	3 нМ
DLL3#15/ CD3#1	нд	нд
DLL3#16/ CD3#1	228 пМ	2 нМ
DLL3#17/ CD3#1	< 20 пМ	2 нМ
DLL3#18/ CD3#1	< 20 пМ	3 нМ

Пример 5. Создание НЕК293 клеток, экспрессирующих внеклеточный домен и его поддомены на клеточной поверхности.

Для создания стабильных НЕК293 клеток, экспрессирующих полноразмерный DLL3 человека (Uni-prot: Q9NYJ7), DLL3 яванской макаки (UPI0003AB95BD), DLL1 человека (Q00548) и DLL4 человека (Q9NR61), соответственно, соответствующую кодирующую последовательность клонировали в pCDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific) и FLAG-метку инсертировали между сигнальной последовательностью и внеклеточным доменом. Экспрессию на клеточной поверхности подтверждали путем применения анти-FLAG антитела (клон M2, Sigma) с последующим применением моноклонального анти-мышинного IgG1 (Acris). Внеклеточный домен из DLL3 состоит из различных поддоменов:

- Hu DLL3 Сигнальный пептид: ак 1-26
- Hu DLL3 N-концевой ECD домен: ак 27-175
- Hu DLL3 DSL: ак 176-215
- Hu DLL3 EGF1: ак 216-249
- Hu DLL3 EGF2: ак 274-310
- Hu DLL3 EGF3: ак 312-351
- Hu DLL3 EGF4: ак 353-389
- Hu DLL3 EGF5: ак 391-427
- Hu DLL3 EGF6: ак 429-465

Мембранный проксимальный пептид: ак 466-492.

Следующие поддомены из DLL3 экспрессировали на клеточной поверхности HEK293 клеток:

Hu DLL3 EGF1+2: Uniprot: Q9NYJ7 ак 216-310

Hu DLL3 EGF2+3: Uniprot: Q9NYJ7 ак 274-351

Hu DLL3 EGF3+4: Uniprot: Q9NYJ7 ак 312-389

Hu DLL3 EGF4+5: Uniprot: Q9NYJ7 ак 353-427

Hu DLL3 EGF5+6: Uniprot: Q9NYJ7 ак 391-465

Hu DLL3 EGF6+мембранный проксимальный пептид: Uniprot: Q9NYJ7 ак 429-492.

Для создания HEK293 клеток, экспрессирующих 6-His-мус меченные поддомены из DLL3 человека, соответствующие кодирующие последовательности клонировали в pcDNA 3.1 (Thermo Fisher Scientific). Конструкции содержали N-концевую мышиную IgG Vk лидерную последовательность, с последующей 6-Гистидин-мус меткой и соответствующий домен DLL3 человека. Для обеспечения локализации доменов DLL3 человека на клеточной поверхности, все конструкции сопровождалась Ser/Gly-Линкером, трансмембранным доменом (ак 266-288) и внутриклеточным доменом (ак 289-314) EpCAM человека (P16422). Экспрессию поддоменов подтверждали путем применения мышинных моноклональных IgG2a антител к различным доменам, как описано в WO 2013126746. Связанное моноклональное антитело обнаруживали с помощью козьего анти-мышинного IgG (F(ab')₂)-RPE (Jackson Immuno Research). Образцы измеряли с помощью проточной цитометрии. Экспрессию DLL1 и DLL4 человека подтверждали с помощью FACS анализа, используя анти-DLL1 (R&D Systems, MAB1818) и анти-DLL4 R&D Systems, MAB1506) антитела, затем путем применения PE-меченных анти-мышинных или анти-крысиных вторичных антител (см. фиг. 5, правая панель).

Таблица 3

Последовательности из различных DLL3 поддоменов, экспрессируемых на HEK293 клетках

ID	Конструкция	Последовательность
SEQ ID NO:110	FLAG-меченный Полноразмерный DLL3 человека	MVSPRMSGLLSQT VILALIFLPQTRPDYKDDDDKAGVFELQI HSFGPGPGGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEEAESP CALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVFRDAWP GTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRLAAGGPW ARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPSAPSR CGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECL EGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSATTGCLVPGPGCDGNP CANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFN GGLCVGGADPDSA YICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRN GGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANG GTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGR CYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGL RPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGHSQD AGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSV DWN RPEDVDPQGIYVISAPSIYAREVATPLFPPLHTGRAGQRQHL LFPYPSSILSVK

SEQ ID NO:111	FLAG- меченный полнораз- мерный DLL3 яванской макаки	MVSPRMSRLLSQT VILALIFIPQARPDYKDDDDKAGVFELQI HSFGPGPGPGAPRSPCSARGPCRLFFRVCLKPG LSEEAAESP CALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLLQVPPFRDAWP GTFSLIETWREELGDQIGGPAWSSLARVTRRRRLAAGGPW ARDIQRAGA WELRFSYRARCELPVGTACTRLCRPRSAPSR CGPGLRPCAPLEDECEAPPVCRAGCSLEHGFCEQPGECRCL EGWTGPLCMVPVSTSSCLGLRGPSTTTGCLVPGPGPCDGN PCANGGSCSETPGSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCF NGGLCVGGADPDSA YICHCPPGFQGSNCEKRVDRC SLQPCR NGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACAN GGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRNCRERADPCAARPCAHHG RCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGV SALPAAPP LRPGDPQRYLLPPALG LLVAAGVAGAALLLVHVRRRGHAQ DAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGPGDVPSSSVDW NRPEDVDSRGIYVISAPSIYAREVAMPLFPPLHTGRAGQRQN LLFPFPSSILSVK
SEQ ID NO:112	FLAG- меченный полнораз- мерный DLL1 человека	MGSRCALALAVLSALLCDYKDDDDKQVWSSGVFELKLQEF VNKKGLLGNRNCCRGAGPPPCACRTFFRVCLKH YQASVS PEPPCTYGSAVTPVLGVDSFSLPDGGGADSAFNSPIRFPFGFT WPGTFSLIIEALHTDSPDDLATENPERLISRLATQRHLTVGEE WSQDLHSSGRTDLKYSYRFVCEHY YGEGCSVFCRPRDDA FGHFTCGERGEKVCNPGWKGPYCTEPICLPGCDEQHGFCDK PGECKCRVGVWQGRYCDECIRYPGLHGTCQPWQCNCQE GWGGLFCNQLNYCTHHKPKNGATCTNTGQGSYTCSCR GYTGATCELGIDECDPSPCKNGGSCDLENSYSCTCPPGFY KICELSAMTCADGPCFNGGRCSDSPDGGYSCRCPVGYSGFN CEKKIDYCSSPSCNGAKCVLDGDAYLCRCQAGFSGRHCD DNVDDCASSPCANGGTCRDGVNDFSCPPGYTGRNC SAP VSRCEHAPCHNGATCHERGHRYVCECARGYGGPNCQFLLP ELPPGPAVVDL TEKLEGQGGFPWVA VCAGVILVLM LLLGC AAVVVCVRLRLQKHRPPADPCRGETETMNNLANCQREKDI SVSIIGATQIKNTNKKADFGDHSADKNGFKARYPAVDY NL VQDLKGD DTAVRDAHSKRDTKCPQGGSSGEEKGPTTLRG GEASERKRPDSGCSTSKDTKYQSVYVISEEKDECVIATEV
SEQ ID NO:113	FLAG- меченный полнораз- мерный DLL4 человека	MAAASRSASGWALLL VALWQQRAGDYKDDDDKSGVVF QLQLQEFINERGLASGRPCPGCRTFFRVCLKHFAV VSP GPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWP GTFSLIIEAWHAPGDDL RPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQN WLLDEQSTLTRLRYSYRVICSDNY YGDNCSRLCKKRNDFH GHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSK PAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEG WGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTC CRPG YTGVDCELELSECDSNPCRNGGSKDQEDGYHCLCPPGYY GLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTG SNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGT YCELHVSDCARNPCA HGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRC VRTSIDACASSPCFN RATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRC FPVGLPPSFPWVA VSLGVGLAVLLVLLGMVA VAVRQLRLR RPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQKKELEVDC GLDKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPHSDKSL GEKAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVI ATEV
SEQ ID NO:114	FLAG метка	DYKDDDDK
SEQ ID NO:115	Vk лидерная	ME TDTLLLWVLLLWVPGSTGD
SEQ ID NO:116	6His-мус метка	HHHHHHEQKLISEEDL

SEQ ID NO:117	Ser/Gly линкер	SGGGGS
SEQ ID NO:118	ErCAM трансмембранный домен	AGVIAVIVVVVIAVVAGIVVVI
SEQ ID NO:119	ErCAM внутриклеточный домен	SRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA
SEQ ID NO:120	EGF1	APLVCRAGCSPEHGFCEQPGEERCLEGTGWLCT
SEQ ID NO:121	Hu DLL3 EGF 1+2	APLVCRAGCSPEHGFCEQPGEERCLEGTGWLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCE
SEQ ID NO:122	EGF2	GPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCE
SEQ ID NO:123	Hu DLL3 EGF 2+3	GPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSA YICHCPPGFQGSNCE
SEQ ID NO:124	EGF3	SGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSA YICHCPPGFQGSNCE
SEQ ID NO:125	Hu DLL3 EGF 3+4	SGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSA YICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCE
SEQ ID NO:126	EGF4	RVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCE
SEQ ID NO:127	Hu DLL3 EGF 4+5	RVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCR
SEQ ID NO:128	EGF5	DLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCR
SEQ ID NO:129	Hu DLL3 EGF 5+6	DDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCE
SEQ ID NO:130	EGF6	RADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCE
SEQ ID NO:131	Hu DLL3 EGF6-мембранный проксимальный пептид	RADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL
SEQ ID NO:132	Мембранный проксимальный пептид	FPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL

Пример 6. Картирование домена эпитопа DLL3/CD3 связывающих белков.

Домены эпитопов определяли путем связывания DLL3/CD3 связывающих белков с рекомбинантными клеточными линиями, экспрессирующими поддомены из DLL3 (см. фиг. 2). Создание этих клеточных линий описано в примере 5. DLL3/CD3 связывающие белки продуцировали с помощью транзientной трансфекции CHO-E клеток с применением рТТ5 векторов, несущих гены, кодирующие цепи, как описано в примере 2.

Клетки, экспрессирующие поддомены из DLL3, окрашивали с двустадийно очищенными DLL3/CD3 связывающими белками при концентрации 1,6 нМ в FACS буфере (PBS/0,5%BSA/0,05% азид натрия). Связанные молекулы обнаруживали с помощью PE-конъюгированного анти-человеческого вторичного антитела (Sigma-Aldrich, № P8047). В качестве отрицательного контроля, клетки инкубировали только с вторичным антителом. Образцы измеряли с помощью проточной цитометрии. На фиг. 3А-С представлены иллюстративные связывающие агенты (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 или SEQ ID NO:252 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, и DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80), которые связываются в различными участками из DLL3. Последовательности из доменов эпитопа перечислены в примере 5, табл. 3.

Пример 7. Межвидовая перекрестная реактивность.

Межвидовую перекрестную реактивность определяли путем связывания DLL3/CD3 связывающих белков с NCI-H82 (HTB-175™) и SHP77 (ATCC®, CRL-2195™) клетками, двумя SCLC клеточными линиями, а также с рекомбинантной клеточной линией, экспрессирующей DLL3 яванской макаки (создание клеточной линии описано в примере 5).

DLL3/CD3 связывающие белки продуцировали с помощью транзientной трансфекции CHO-E кле-

ток с применением рТТ5 векторов, несущих гены, кодирующие цепи, как описано в примере 2. Клетки, экспрессирующие DLL3 человека или яванской макаки, окрашивали с применением 1,6 нМ двустадийно очищенных DLL3/CD3 связывающих белков с возрастающими концентрациями в FACS буфере (PBS/0,5%BSA/0,05% азид натрия). Связанные молекулы обнаруживали с помощью PE-конъюгированного анти-человеческого вторичного антитела (Sigma-Aldrich, № P8047). В качестве отрицательного контроля, клетки инкубировали только с вторичным антителом. Образцы измеряли с помощью проточной цитометрии. На фиг. 4 представлено связывание с клетками, экспрессирующими DLL3 человека и яванской макаки, для семи иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:74 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80, DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:76 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:77 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79 или DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:78 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79).

Пример 8. Подтверждение отсутствия связывания с DLL1 и DLL4 человека.

Отсутствие перекрестной реакционной способности к DLL1 и DLL4 человека определяли путем связывания DLL3/CD3 связывающих белков с рекомбинантными клетками, экспрессирующими DLL1 или DLL4 человека (создание клеточных линий описано в примере 5).

DLL3/CD3 связывающие белки продуцировали с помощью транзientной трансфекции CHO-E клеток с применением рТТ5 векторов, несущих гены, кодирующие цепи, как описано в примере 2.

Клетки, экспрессирующие DLL1 и DLL4, окрашивали с применением 1,6 нМ двустадийно очищенных DLL3/CD3 связывающих белков с возрастающими концентрациям в FACS буфере (PBS/0,5%BSA/0,05% азид натрия). Связанные молекулы обнаруживали с помощью PE-конъюгированного анти-человеческого вторичного антитела (Sigma-Aldrich, № P8047). В качестве отрицательного контроля, клетки инкубировали только с вторичным антителом. Образцы измеряли с помощью проточной цитометрии. Экспрессию DLL1 и DLL4 человека подтверждали с помощью FACS анализа, используя анти-DLL1 (R&D Systems, MAB1818) и анти-DLL4 R&D Systems, MAB1506) антитела, затем путем применения PE-меченных анти-мышинных или анти-крысиных вторичных антител. На фиг. 5 представлено связывание для семи иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:74 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80, DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:76 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:77 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79 или DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:78 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79) с клетками, экспрессирующими DLL1 и DLL4 человека.

Пример 9. Связывание DLL3/CD3 связывающих белков с SCLC клеточными линиями и Т-клетками.

Связывание DLL3/CD3 связывающих белков с SCLC клеточными линиями человека тестировали с помощью проточной цитометрии NCI-H82 (HTB-175TM) и SHP77 (ATCC®, CRL-2195TM). DLL3/CD3 связывающие белки продуцировали, как описано в примере 2.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) приготавливали путем центрифугирования в градиенте плотности Фиколла из обогащенных препаратов лимфоцитов (лейкоцитарные плёнки), побочного продукта банков крови, собирающих кровь для трансфузий. Все лейкоцитарные плёнки получали после информированного согласия в соответствии с Хельсинской декларацией и с разрешения кантонального этнического комитета в Австрии и PBMC приготавливали в день сбора. Следовательно, мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности Фиколла (35 мин без торможения при 1400 об/мин) и тщательно промывали с помощью PBS. Оставшиеся эритроциты удаляли путем инкубирования в течение 3 мин в ACK буфере для лизиса (Thermo Fisher Scientific, A1049201), с последующим промыванием в PBS, после этого суспендировали в среде для анализа, содержащей RPMI 1640 GlutaMAX (Gibco № 61870-010), 5% АВ сыворотку человека АВ (Gemini, GemCell № кат. 100-512 партия № H56500I) + 1% MEM-NEAA (Gibco № 11140-035), 10 мМ HEPES (Affymetrix №7365-49-9), 10 мкМ бета-меркаптоэтанол (Gibco № 21985-023) и пируват натрия (Gibco № 11360-039).

Т-клетки выделяли путем отрицательной селекции, используя Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec № 130-091-156). Вкратце, клетки ресуспендировали в 40 мкл буфера PBS/0,5% BSA (Gibco исх. № 041-94553 M)/2 мМ EDTA (Invitrogen исх. № 15575-038) на 10 млн. клеток и инкубировали с 10 мкл коктейля биотин-антитело на 10 млн. клеток в течение 5 мин при 4°C. После этого, добавляли 30 мкл буфера и 20 мкл анти-биотиновых MicroBeds/10 миллион клеток и инкубировали в течение 10 мин при 4°C. Затем смесь помещали на предварительно промытую 25LS колонку (Miltenyi Biotec № 130-042-401) в магнитное поле подходящего MACS сепаратора (Miltenyi Biotec). Проточный материал собирали и промывали в среде для анализа. Клетки (Т-клетки или SCLC клетки человека) окрашивали с возрастающими концентрациями двустадийно очищенных DLL3/CD3 связывающих белков с возрастающими концентрациями в FACS буфере (PBS/0,5%BSA/0,05% азид натрия). Связанные молекулы обнаруживали с помощью PE-конъюгированного анти-человеческого вторичного антитела (Sigma-Aldrich, № P8047).

DLL3/CD3 связывающие белки, нацеленные на DSL (DLL3#6), EGF1 (DLL3#5) или EGF4 (DLL#4) домены, проявляют более сильное связывание с SCLC клеточными линиями, экспрессирующими DLL3, по сравнению с DLL3/CD3 связывающими белками, которые нацелены на мембранный проксимальный пептид (DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3). Связывание с SHP77, NCI-H82 клетками и Т-клетками иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 или SEQ ID NO:252 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, и DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80) по отношению к различным доменам эпитопов представлено на фиг. 6A-V.

Пример 10А. Эффективность перенацеливающих нестимулированных PBMC по отношению к SCLC клеточных линий человека.

Эффективность нестимулированных PBMC по отношению к SCLC клеточным линиям определяли, используя высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH) в качестве считываемых данных для клеточного лизиса. В этом анализе, DLL3-положительные SCLC клеточные линии, SHP77 и NCI-H82, совместно культивировали с PBMC человека в качестве эффекторных клеток и возрастающими концентрациями DLL3/CD3 связывающих белков в течение 72 ч при соотношении эффектора к клетке-мишени 10:1. DLL3/CD3 связывающие белки (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, и DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80) продуцировали с помощью транзientной трансфекции CHO-E клеток с рTT5 векторами, несущими гены, кодирующие цепи, как описано в примере 2.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) приготавливали путем центрифугирования в градиенте плотности Фиколла из обогащенных препаратов лимфоцитов (лейкоцитарные плёнки), побочного продукта банков крови, собирающих кровь для трансфузий. Все лейкоцитарные плёнки получали после информированного согласия в соответствии с Хельсинской декларацией и с разрешения кантонального этнического комитета в Австрии и PBMC приготавливали в день сбора. Следовательно, мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности Фиколла (35 мин без торможения при 1400 об/мин) и тщательно промывали с помощью PBS. Оставшиеся эритроциты удаляли путем инкубирования в течение 3 мин в ACK буфере для лизиса (Thermo Fisher Scientific, A1049201), с последующим промыванием в PBS, после этого суспендировали в среде для анализа, содержащей RPMI 1640 GlutaMAX (Gibco № 61870-010), 5% АВ сыворотку человека АВ (Gemini, GemCell № кат. 100-512 партия № H56500I) + 1% MEM-NEAA (Gibco № 11140-035), 10 мМ HEPES (Affymetrix №7365-49-9), 10 мкМ бета-меркаптоэтанол (Gibco № 21985-023) и пируват натрия (Gibco № 11360-039).

После этого, клетки-мишени, SHP77 и NCI-H82, и PBMC при соотношении 1:10 инкубировали со DLL3/CD3 связывающими белками при концентрациях от 0,0001 нМ до 100 нМ в течение 72 ч.

Цитотоксическую активность определяли, используя Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (Roche), согласно инструкциям производителя. Вкратце, этот метод основан на применении высвобождения LDH из мертвых клеток или клеток с поврежденной плазматической мембраной. Супернатант культуры клеток инкубировали с реакционной смесью из набора в течение 30 мин и измеряли образование формазана в результате активности LDH на спектрофотометре при 500 нм в качестве суррогата для клеточного лизиса. Процентное значение цитотоксичности относительно контрольного максимального лизиса рассчитывали в соответствии со следующей формулой:

$$\text{Цитотоксичность (отн. контроля)} = \frac{\text{измеренное значение} - \text{фон}}{\text{максимальный лизис} - \text{минимальный лизис}}$$

Фоновое: клетки-мишени + эффекторные клетки.

Максимальный лизис: клетки-мишени + 5% Тритон X-100.

Минимальный лизис: клетки-мишени.

Используя программное обеспечение GraphPad Prism 5, процентное значение цитотоксичности относительно контрольного максимального лизиса графически представляли относительно концентраций соответствующего DLL3/CD3 связывающего белка. Кривые зависимости "доза-эффект" анализировали с применением модели четырёх-параметрического логистического уравнения для оценки сигмоидальной кривой зависимости "доза-эффект" и EC₉₀ значения рассчитывали (EC₉₀ значения представлены в табл. 4А).

На фиг. 7А представлен пример эффективности при лизисе клеток для семи иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, или SEQ ID NO:78, и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, и DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80), которые связываются с различными доменами эпитопов.

Таблица 4А

Значения EC_{90} [нМ] DLL3/CD3 связывающих белков, как измерено в 72-часовом анализе цитотоксичности с нестимулированными РВМС в качестве эффекторных клеток и SCLC клеточными линиями, NCI-H82 и SHP77 в качестве клеток-мишеней

DLL3/CD3 связывающие белки	NCI-H82	SHP77
DLL3#1/CD3#1	1,7	1,4
DLL3#2/CD3#1	2,9	3,4
DLL3#3/CD3#1	0,9	1,5
DLL3#3/CD3#2	3,9	16,5
DLL3#4/CD3#1	нет насыщения при 100 нМ	нет насыщения при 100 нМ
DLL3#5/CD3#1	нет насыщения при 100 нМ	нет насыщения при 100 нМ
DLL3#6/CD3#1	нет насыщения при 100 нМ	нет насыщения при 100 нМ

Пример 10В. Эффективность перенацеливающих нестимулированных Т-клеток по отношению к SCLC клеточным линиям человека.

Т-клетки выделяли, как описано в примере 9. После этого очищенные Т-клетки использовали в качестве эффекторных клеток в анализе цитотоксичности с SHP77 и NCI-H82 клетками в качестве клеток-мишеней, как описано в примере 10А. Кривые зависимости "доза-эффект" представлены на фиг. 7В-Н (SHP77 клетки) и фиг. 7I-О (NCI-H82 клетки). Рассчитанные значения EC_{90} представлены в табл. 4В.

На фиг. 7В-О представлены примеры эффективности при лизисе клеток для 19 иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252

Таблица 4В

Значения EC_{90} [нМ] DLL3/CD3 связывающих белков, как измерено в 72-часовом анализе цитотоксичности с очищенными Т-клетками в качестве эффекторных клеток и SCLC и NCI-H82 клеточными линиями в качестве клеток-мишеней.

DLL3/CD3 связывающие белки	NCI-H82	SHP77
DLL3#1/CD3#1	0,66	0,15
DLL3#2/CD3#1	1,51	0,16
DLL3#3/CD3#1	0,27	0,02
DLL3#3/CD3#2	2,50	3,00
DLL3#4/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#5/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#6/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#7/CD3#1	21,84	8,37
DLL3#8/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#9/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#10/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#11/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#12/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#13/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#14/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#15/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#16/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#17/CD3#1	нет активности	нет активности
DLL3#18/CD3#1	нет активности	нет активности

Пример 11. Анализ интернализации *in vitro*.

Определяли изменения эффективности DLL3/CD3 связывающих белков после предварительного инкубирования с DLL3-положительными SHP77 клетками в качестве клеток-мишеней. Если DLL3/CD3 связывающий белок интернализован, то эффективная концентрация должна снижаться с этим и, таким образом, должна снижаться кажущаяся эффективность.

DLL3/CD3 связывающие белки продуцировали, как описано в примере 2. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (РВМС) приготавливали, как описано в примере 10.

SHP77 клетки-мишени высеивали и инкубировали с DLL3/CD3 связывающие белки при концентрациях от 0,0001 до 100 нМ в течение 2 и 4 ч перед добавлением нестимулированных РВМС в течение 48 ч. Соотношение эффектора к клетке-мишени составляло 10:1. Цитотоксическую активность определяли, используя Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (Roche), как описано в примере 10.

На фиг. 8 представлено отсутствие отличий для специфической активности и эффективности лизиса

клеток для двух иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, и DLL3/CD3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80). Специфическую активность и эффективность наблюдали по сравнению с предварительно неинкубированными образцами (0 ч). Результаты свидетельствуют о том, что не происходит существенной интернализации со DLL3/CD3 связывающими белками.

Пример 12. Исследование PK у мышей.

Оценивали PK для DLL3/CD3 связывающих белков у C57BL/6 мышей после введения единичной дозы 1 мг/кг в/в. Определение концентрации DLL3/CD3 связывающих белков в сыворотке, используя анализ DLL3 захвата/CD3 обнаружения.

Вкратце, самцы C57BL/6 мышей получали однократную внутривенную дозу (в/в) 1 мг/кг (n = 3 на молекулу). Образцы крови собирали перед введением дозы и 0,15, 2, 8, 24, 72, 96, 168, 240 и 336 ч после введения дозы. Измеряли уровни лекарственных средств в сыворотке с применением анализа связывания лиганда на основе MSD, используя биотинилированный DLL3 в качестве реагента захвата и сульфохмеченный CD3 в качестве реагента обнаружения. Фармакокинетические (PK) параметры рассчитывали на основании профилей концентрации в сыворотке в динамике, используя некомпартментный анализ. Оценивали следующие PK параметры: AUC_{last} (площадь под кривой концентрации в сыворотке в зависимости от времени от нулевого момента времени до последней количественно определяемой временной точки), AUC_{inf} (площадь под кривой концентрации в сыворотке в зависимости от времени, экстраполированная до бесконечности), CL (системный клиренс), V_{ss} (объем распределения в равновесном состоянии) и t_{1/2} (конечное время полужизни). Средние (СО) профили концентрация в зависимости от времени для иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, и DLL3/CD3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80) обобщены на фиг. 9. Средние (СО) PK параметры для этих иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков обобщены в табл. 5.

Таблица 5

Средние (СО) PK параметры иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков у самцов C57BL/6 мышей после однократной внутривенной дозы 1 мг/кг

DLL3/CD3 связывающие белки	AUC _{0-last} (мкг*д/мл)	AUC _{0-inf} (мкг*д/мл)	CL (мл/день/кг)	V _{ss} (мл/кг)	t _{1/2} (дни)
DLL3#3/CD3#1	1180 (127)	1760 (179)	13,7 (1,48)	178 (57,7)	10,6 (4,67)
DLL3#3/CD3#2	1260 (170)	1440 (154)	16,8 (1,74)	109 (19,5)	4,97 (0,78)

Пример 13. Исследование эффективности на ксенотрансплантате в условиях *in vivo*.

Исследования эффективности осуществляли с применением модели ксенотрансплантата человека у мышей, восстановленного с помощью Т-клеток человека. Подробное, клетки SHP77 мелкоклеточного рака легких человека (2×10^7) инъецировали подкожно (п/к) в правый дорсальный бок сублетально облученных (2 Гр, день -1) самок NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/JicTac мышей (День 1). Параллельно, CD3 положительные Т-клетки человека (выделенные из человеческой крови здоровых доноров) размножали *in vitro*.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) готовили, как описано в примере 10.

Т-клетки выделяли путем отрицательной селекции, используя Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec № 130-091-156). Вкратце, клетки ресуспендировали в 40 мкл буфера PBS/0,5% BSA (gibco исх. № 041-94553 M)/2 mM EDTA (Invitrogen исх. № 15575-038) на 10 млн. клеток и инкубировали с 10 мкл коктейля биотин-антитело на 10 млн. клеток в течение 5 мин при 4°C. После этого, добавляли 30 мкл буфера и 20 мкл анти-биотиновых MicroBeds/10 миллион клеток и инкубировали в течение 10 мин при 4°C. Затем смесь помещали на предварительно промытую 25LS колонку (Miltenyi Biotec № 130-042-401) в магнитное поле подходящего MACS сепаратора (Miltenyi Biotec). Проточный материал собирали и промывали в среде для анализа. После этого Т-клетки размножали, используя набор для активации/размножения Т-клеток людей (Miltenyi Biotec № кат. 130-091-441, Партия № 5170720843) в течение 20 дней. Вкратце, анти-биотиновые MACSiBead™ частицы загружали с применением CD2-, CD3-, CD28 биотина и переносили в очищенные Т-клетки при соотношении 2 клетки на частицу и инкубировали в присутствии 20 единиц рекомбинантного IL-2 (R&D#202-IL-050/CF) при плотности 0,5-1 10⁶ клеток/мл в течение 20 дней. Клетки дополняли с применением 20 Единиц свежего IL-2 каждые три дня. За три дня до инъекции животным, Т-клетки повторно стимулировали с применением анти-биотиновых MACSiBead™ частиц, загруженных с помощью CD2-, CD3-, CD28 биотина при соотношении 1 шарик на 4 клетки дополнительно в течение трех дней. В завершение, шарики удаляли с помощью MACSiMAG

сепаратора (Miltenyi Biotec) и Т-клетки промывали в РВМС.

В День 14, животных рандомизировали в группы для лечения на основе объема опухоли и 2×10^7 Т-клеток человека инъецировали внутривенно (в/в). Лечение начинали в День 17 и DLL3/CD3 связывающий белок (DLL3/CD3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, и DLL3/CD3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80) или буфер-наполнитель (50 mM NaOAc, 100 mM NaCl, pH 5,0) вводили в виде схемы дозирования q7d путем внутривенных (в/в) болюсных инъекций в латеральную хвостовую вену. За ростом опухоли наблюдали с помощью наружных измерений штангенциркулем и объемы опухолей рассчитывали, используя стандартную геми-эллипсоидную формулу. Привитые Т-клетки человека оценивали в селезенке с помощью иммуногистохимического (ИHC) окрашивания для CD3 человека после окончания исследования. В статистический анализ включали только тех животных, которые продемонстрировали привитые Т-клетки человека на момент окончания исследования. Животных, достигавших критерия умертвления, подвергали эвтаназии раньше во время исследования по этическим соображениям. Лечение мышей, несущих опухоль, с применением DLL3/CD3 связывающих белков только один раз в неделю в/в в дозе 0,25 мг/кг индуцировало существенную регрессию опухоли (фиг. 10).

Пример 14. Процентное содержание мономера для DLL3/CD3 связывающих белков.

Процент мономера определяли для иллюстративных DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, или SEQ ID NO:252 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80, и DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:105) с помощью аналитической гель-проникающей хроматографии (aSEC) (показано в табл. 6). aSEC прогоняли на Waters (Milford, MA, USA) Acquity UPLC системе, используя Protein BEH SEC колонку 200 Å, 1,7 мкм, 4,6×150 мм (№ кат. 186005225). Условия прогона были следующими: подвижная фаза: 50 mM фосфат натрия, 200 mM Аргинин и 0,05% Азид натрия; скорость потока: 0,5 мл/мин; время прогона: 5 мин; загружаемое количество образца: 10 мкг; обнаружение пика: A280 нм; метод автоматизированной обработки хроматограмм.

Таблица 6

Процент мономера после первой и второй стадии очистки

DLL3/CD3 связывающие белки	Процент мономера после первой стадии очистки	Процент мономера после второй стадии очистки
DLL3#1/CD3#1	76,4	99,4
DLL3#2/CD3#1	54,4	98,0
DLL3#3/CD3#1	69,5	99,8
DLL3#3/CD3#2	77,6	99,5
DLL3#3/CD3#3	70,8	98,3
DLL3#4/CD3#1	72,2	99,1
DLL3#5/CD3#1	70,5	99,1
DLL3#6/CD3#1	55,2	99,9
DLL3#7/CD3#1	78,1	99,0
DLL3#8/CD3#1	54,8	99,5
DLL3#9/CD3#1	72,0	99,0
DLL3#10/CD3#1	70,2	98,3
DLL3#11/CD3#1	68,2	94,7
DLL3#12/CD3#1	66,2	98,7
DLL3#13/CD3#1	52,8	99,9
DLL3#14/CD3#1	52,6	87,0
DLL3#15/CD3#1	61,5	нд
DLL3#16/CD3#1	71,8	99,5
DLL3#17/CD3#1	60,2	94,7
DLL3#18/CD3#1	61,5	98,2

Пример 15А. Термостабильность.

Термостабильность определяли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) и результаты перевода первого плавления (T_m) DLL3/CD3 связывающих белков представлены в табл. 7. DSC температурные расплавы предоставляют информацию относительно температурной стабильности белка в растворе относительно буферного контроля. Температурное разворачивание и агрегацию 1 мг/мл раствора белков в 20 mM цитрате, 115 mM NaCl, pH 6 мониторили от 20°C до 110°C при скорости сканирования 60°C/ч с помощью автоматизированной капиллярной DSC.

Таблица 7А

DLL3/CD3 связывающие белки	Tm1
DLL3#3/CD3#1	64
DLL3#3/CD3#2	60
DLL3#3/CD3#3	63
DLL3#4/CD3#1	63

Пример 15В. Термостабильность.

Термостабильность определяли с помощью анализа теплового сдвига (TSA) и результаты переводов первого плавления (Tm1) DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 или SEQ ID NO:252 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80, и DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:105) представлены в табл. 7В. Получали профиль интенсивности флуоресценции в зависимости от температуры, используя систему ПЦР в реальном времени QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems, Waltham, MA) с SYPRO Orange (Invitrogen, Carlsbad, CA) в качестве внешнего флуорофора. Образец разводили до 0,4 мг/мл в 10 мМ гистидина, pH 6,0 с 40 мМ хлоридом натрия и 0,02% азидом натрия. Кривую плавления генерировали с помощью термальной рампы от 25°C до 95°C со скоростью 2°C/мин, данные собирали приблизительно каждые 0,4°C через набор фильтров 'ROX' (Ex: 580 ±10 нм, Em: 623 ±14 нм). Данные анализировали с помощью Protein Thermal Shift Software версия 1.3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

Таблица 7В

DLL3/CD3 связывающие белки	Tm1 (°C)
DLL3#1/CD3#1	65,6
DLL3#2/CD3#1	65,5
DLL3#3/CD3#1	65,6
DLL3#3/CD3#2	63,0
DLL3#3/CD3#3	65,5
DLL3#4/CD3#1	65,8
DLL3#5/CD3#1	65,6
DLL3#6/CD3#1	65,8
DLL3#7/CD3#1	65,6
DLL3#8/CD3#1	65,8
DLL3#9/CD3#1	65,9
DLL3#10/CD3#1	64,6
DLL3#11/CD3#1	66,0
DLL3#12/CD3#1	65,9
DLL3#13/CD3#1	65,8
DLL3#14/CD3#1	65,9
DLL3#15/CD3#1	нд
DLL3#16/CD3#1	65,8
DLL3#17/CD3#1	65,8
DLL3#18/CD3#1	65,8

Пример 16. Предсказанные оценки иммуногенности *in silico* с помощью EpiVax.

Иммуногенность последовательностей оценивали *in silico* с применением математического алгоритма. Специфически, определяли EpiMatrix Treg-adjusted Scores (EpiVax Inc., Providence RI) в качестве показателей оценки иммуногенности, для DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 или SEQ ID NO:252 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80, и DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:105) и по сравнению с оценками различных Fc последовательностей. Эти оценки принимали во внимание эпитопы Т-клеток и эпитопы Трег. Чем ниже оценка иммуногенности, тем меньше вероятность того, что последовательность будет иммуногенной. В целом, отрицательная оценка рассматривается как низкий риск иммуногенности, в то время как высокая положительная оценка рассматривается как указание потенциальной

иммуногенности. Как показано в таблицах ниже, DLL3/CD3 связывающие белки, описанные в настоящей заявке, имеют очень низкие оценки иммуногенности, указывая на то, что риск быть иммуногенными является очень низким для этих связывающих белков.

Таблица 8

Скорректированная оценка EpiVax для DLL3/CD3 связывающих белков

DLL3/CD3 связывающие белки	VH	VL	Полноразмерная полипептидная цепь (VL-CL-линкер-VH-CH1-шарнир-CH2-CH3)
DLL3#1 DLL3 цепь	-36,88	-59,85	-43,31
DLL3#2 DLL3 цепь	-46,99	31,40	-33,53
DLL3#3 DLL3 цепь	-34,44	2,84	-35,50
DLL3#4 DLL3 цепь	25,97	28,92	-21,93
DLL3#5 DLL3 цепь	-59,87	-46,45	-44,95
DLL3#6 DLL3 цепь	29,70	-14,55	-27,26
CD3#1 CD3 цепь	-9,68	-50,52	-35,25
CD3#2 CD3 цепь	-15,54	-50,52	-36,23
CD3#3 CD3 цепь	-13,49	-50,52	-35,88
DLL3#7 DLL3 цепь	-48,55	-34,92	-41,60
DLL3#8 DLL3 цепь	-54,39	-37,79	-42,89
DLL3#9 DLL3 цепь	35,95	-60,37	-31,83
DLL3#10 DLL3 цепь	-33,82	-34,60	-40,73
DLL3#11 DLL3 цепь	-24,00	26,66	-30,50
DLL3#12 DLL3 цепь	-30,43	25,68	-31,67
DLL3#13 DLL3 цепь	8,64	18,63	-25,96
DLL3#14 DLL3 цепь	1,58	-10,63	-31,72
DLL3#15 DLL3 цепь	8,93	-8,31	-29,91
DLL3#16 DLL3 цепь	-55,14	13,98	-35,59
DLL3#17 DLL3 цепь	11,89	12,55	-26,52
DLL3#18 DLL3 цепь	5,82	15,85	-27,01

Таблица 9

Скорректированная оценка EpiVax Fc доменов

Цепь Fc белка	Скорректированная оценка EpiVax
Fc-IgG1-WT	-25,64
Fc-IgG1-LALA	-29,83
Fc-IgG1-LALA-KNOB	-31,76
Fc-IgG1-LALA-HOLE	-18,01

Пример 17А. Неспецифическое связывание с поверхностями.

Специфичность DLL3/CD3 связывающих белков согласно изобретению дополнительно тестировали в анализе на основе SPR, используя высокозаряженные белки. Разрабатывали анализ неспецифического связывания, используя технологию биосенсора для определения того, имеют ли связывающие белки существенное связывание с неродственными заряженными белками. В этом анализе, DLL3/CD3 связывающие белки пропускали над двумя SPR поверхностями, одна покрыта с применением отрицательно заряженного белка (ингибитор трипсина), а другая покрыта с применением положительно заряженного белка (лизосим). Если белок проявляет существенное неспецифическое связывание с этими поверхностями, то, вероятно, что причиной связывания является присутствие положительно или отрицательно заряженных участков поверхности на кандидате. Неспецифическое связывание белков может приводить к плохой фармакокинетике (ПК) и биораспределению и также может иметь последующее отрицательное влияние на обрабатываемость. Эксперимент осуществляли на Biacore T200. Разведение, приготовление поверхности, и эксперименты связывания осуществляли при 25°C в 1X HBS-EP буфер, приготовленном из 10X HBS-EP. Скорость потока как для протокола иммобилизации, так и для эксперимента по связыванию, составляла 5 мкл/мин. Для приготовления поверхности для эксперимента неспецифического связывания, лизосим белка куриных яиц и ингибитор трипсина из сои (Glycine max) связывали вручную с сериями S CM5 чипа с плотностью поверхности 3000-5000 ЕО, используя набор иммобилизации по аминокислотной группе в соответствии с инструкциями производителя.

Образцы приготавливали при концентрации 1 мкМ в 1X HBS-EP буфере. Образцы инъецировали над активированными поверхностями с 10 мин ассоциацией и 10 мин диссоциацией. Данные собирали, используя Biacore T200 Control Software версия 2.0.1, и анализировали, используя Biacore T200 Evaluation Software версия 3.0.

DLL3/CD3 связывающие белки не связываются с этими высокозаряженными поверхностями. В табл. 10А показано отсутствие связывания с двумя высокозаряженными белками, ингибитором трипсина

и лизоцимом, с двумя иллюстративными DLL3/CD3 связывающими белками.

Таблица 10А

DLL3/CD3 Связывающий белок	Неспецифическое связывание	
	Лизоцим (положительные)	Ингибитор трип. (отрицательные)
DLL3#3/CD3#1	Нет	Нет
DLL3#3/CD3#2	Нет	Нет

Пример 17В. Неспецифическое связывание с поверхностями.

Специфичность DLL3/CD3 связывающих белков (DLL3/CD3 связывающие белки, включающие DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251 или SEQ ID NO:252, и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:79, DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:80, и DLL3 связывающий белок, включающий DLL3 цепь согласно SEQ ID NO:75 и CD3 цепь согласно SEQ ID NO:105) в дальнейшем тестировали в анализе на основе SPR, используя высокозаряженные белки, как описано в примере 17а, с 10 мин ассоциации и 15 мин диссоциации. Результаты представлены в табл. 10В.

Таблица 10В

Низкое число ЕО указывает на отсутствие существенного связывания с неродственными заряженными белками

DLL3/CD3 Связывающий белок	Неспецифическое связывание (ЕО)	
	Лизоцим (положительные)	Ингибитор трип. (отрицательные)
DLL3#1/CD3#1	4	1
DLL3#2/CD3#1	7	2
DLL3#3/CD3#1	54	85
DLL3#3/CD3#2	44	36
DLL3#3/CD3#3	17	28
DLL3#4/CD3#1	16	37
DLL3#5/CD3#1	4	0
DLL3#6/CD3#1	6	0
DLL3#7/CD3#1	9	3
DLL3#8/CD3#1	39	18
DLL3#9/CD3#1	15	27
DLL3#10/CD3#1	25	12
DLL3#11/CD3#1	11	13
DLL3#12/CD3#1	8	9
DLL3#13/CD3#1	11	3
DLL3#14/CD3#1	18	6
DLL3#15/CD3#1	нд	нд
DLL3#16/CD3#1	6	0
DLL3#17/CD3#1	15	8
DLL3#18/CD3#1	23	81

Пример 18. Индукция лизиса, активации Т-клеток, дегрануляции Т-клеток, пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов в присутствии DLL3-положительных и DLL3-отрицательных опухолевых клеток.

РВМС очищали, как описано в примере 9. Для определения активации Т-клеток, дегрануляции Т-клеток и секреция цитокинов, осуществляли исследование цитотоксичности с РВМС и DLL3-положительными SHP77 или DLL3-отрицательными RKO-Е6 клетками в качестве клеток-мишеней, как описано в примере 10В. Эффективность лизиса клеток путем перенацеливания Т-клеток на SHP77 человека или RKO-Е6 клетки определяли, как описано в примере 10А. Для определения активации Т-клеток, и дегрануляции Т-клеток, клетки центрифугировали и окрашивали с применением антител к CD4 (BD #550630), CD8 (BD #557834), CD25 (BD#340907), после этого клетки пермеабилizировали, используя раствор для фиксации/пермеабилизации (BD #554714), и окрашивали с применением антител к перфори-ну (BioLegend #308120) и гранзиму Б (BD #560221), и измеряли с помощью проточной цитометрии. Уровни цитокинов в супернатантах определяли с помощью анализов U-PLEX Biomarker Group 1 (hu) (MSD, #K15067L-2, Kit).

Для определения пролиферации Т-клеток, РВМС метили с помощью 5 мкМ Cell Trace™ CFSE (Invitrogen, C34554) и Т-клетки окрашивали с применением антитела к CD3 (BioLegend кат. №: 317336). После этого меченные РВМС инкубировали с SHP77 или RKO-Е6 клетками при соотношении 10:1 и возрастающими концентрациями DLL3/CD3 связывающего белка в течение 6 дней.

На фиг. 11-15 показано индукцию перенаправленного Т-клетками лизиса SHP77 или RKO-Е6 клеток (фиг. 11) и индукцию дозозависимой активации Т-клеток (фиг. 12), дегрануляции Т-клеток (фиг. 13),

секреции цитокинов (фиг. 14А: гамма-интерферона; 14В: MCP-1), и пролиферации Т-клеток (фиг. 15) в присутствии SHP77 или RO-E6 клеток и DLL3/CD3 связывающего белка.

Пример 19. Перенацеливание поднаборов Т-клеток с SHP77 клетками.

РВМС выделяли, как описано в примере 10а. После этого поднаборы Т-клеток выделяли с применением следующих реагентов и протоколов.

Таблица 11

Реагенты и протоколы для выделения поднаборов Т-клеток	
Поднабор Т-клеток	Используемые реагенты и протоколы
Интактные Т-клетки	Miltenyi Biotech; № 130-097-095
CD4 ⁺ Т-клетки	Miltenyi Biotech; № 130-096-533
CD4 ⁺ Эффекторные Т-клетки памяти	Miltenyi Biotech; № 130-094-125
CD4 ⁺ Центральные Т-клетки памяти	Miltenyi Biotech; № 130-094-302
CD8 ⁺ Т-клетки	Miltenyi Biotech; № 130-096-495
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Эффекторные Т-клетки	Miltenyi Biotech; № 130-094-485
CD8 ⁺ Т-клетки памяти	Miltenyi Biotech; № 130-094-412

На фиг. 16-20 представлена эффективность перенацеливания Пан Т-клеток (фиг. 16), интактных Т-клеток (фиг. 16), CD4⁺ Т-клеток (фиг. 17, 18), CD4⁺ эффекторных Т-клеток памяти (фиг. 18), CD4⁺ центральных Т-клеток памяти (фиг. 17), CD8⁺ Т-клеток (фиг. 19, 20), CD8⁺CD45RA⁺ эффекторных Т-клеток (фиг. 19), CD8⁺ Т-клеток памяти (фиг. 20) по отношению к SHP77 клеткам для DLL3/CD3 связывающего белка.

Пример 20. Инфильтрация Т-клеток в SHP77 ксенотрансплантат опухолевой ткани с применением иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка.

Приготавливали оставшиеся опухолевые ткани от мышей в исследовании, описанном в примере 13, фиксировали в формалине и заливали в парафин. После этого приготавливали срезы тканей и окрашивали для определения CD3 экспрессии на Т-клетках (2GV6 Ventana). Инфильтрация Т-клеток в опухолевую ткань SHP77 ксенотрансплантата с применением иллюстративного DLL3/CD3 связывающего белка представлена на фиг. 21. Оценку в табл. 12 использовали для количественного определения CD3 экспрессии в ксенотрансплантате опухолевой ткани.

Таблица 12

Оценивание для количественного определения инфильтрации CD3-положительных Т-клеток

Оценка	Описание
0	нет CD3 ⁺ клетки в плоскости среза
1	редко встречающиеся клетки или небольшие кластеры, главным образом в строме
2	редко встречающиеся клетки или небольшие кластеры, в строме и крае
3	небольшое число клеток или кластеров в строме, эпителии и крае
4	умеренное число клеток или кластеров в строме и крае; небольшое число внутриэпителиальных клеток
5	большое число клеток или кластеров в строме и крае; небольшое число внутриэпителиальных клеток

Пример 21. Получение антител к DLL3.

Для получения анти-DLL3 связывающих агентов, гибридомы или единичные В-клетки, имеющие происхождение из иммунизированных DLL3 мышей дикого типа и AlivaMab гуманизированных мышей (Ablexis, San Francisco, CA, USA: платформа трансгенных мышей AlivaMab с локусами иммуноглобулинов человека) культивировали *in vitro*. Супернатанты подвергали скринингу для определения реакционной способности по отношению к рекомбинантному DLL3 человека, с помощью AlphaLISA (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), и по отношению к SHP-77 клеткам (ATCC®, CRL-2195TM), экспрессирующим DLL3 человека, с помощью проточной цитометрии.

После этого гены VH и VL иммуноглобулина (Ig) амплифицировали из идентифицированных положительных клонов. Для выделения РНК из гибридом, приблизительно 2×10^6 клеток из единичных клонов осаждали центрифугированием и использовали в качестве банка клеток. Для единичных В-клеток, 100-500 клеток размножали из отдельно выделенных В клеток, используемых в качестве банка клеток. РНК выделяли, используя RNeasy Plus (Qiagen, Hilden, Germany). После этого синтезировали кДНК, используя набор для синтеза кДНК Smarter (Clontech, Mountain View, CA) в соответствии с инструкциями производителя. Для облегчения синтеза кДНК, олиго-dT использовали для примирования обратной транскрипции всех матричных РНК с последующим "5' кэпированием" с Smarter ПА олигонуклеотидом. Осуществляли последующую амплификацию VH и VL фрагментов, используя 2-стадийную ПЦР амплификацию, используя 5' праймеры, нацеленные на Smarter ПА кэп, и 3' праймеры, нацеленные на консен-

сусные области в СН1. Вкратце, каждая 50 мкл ПЦР реакция состояла из смесей 20 мкМ прямого и обратного праймера, 25 мкл премикса ДНК полимеразы PrimeStar Max (Clontech), 2 мкл неочищенной кДНК, и 21 мкл дважды перегнанной H₂O. Цикл программы начинали при 94°C в течение 3 мин, затем осуществляли 35 циклов (94°C в течение 30 с, 50°C в течение 1 мин, 68°C в течение 1 мин), и заканчивали при 72°C в течение 7 мин. Второй этап ПЦР осуществляли с VL и VH праймерами 2-ого этапа, содержащими 15 по комплементарных удлинений, которые "перекрывают" соответствующие области в их соответствующем рТТ5 материнском векторе (VH и VL). Второй этап ПЦР осуществляли с помощью следующей программы: 94°C в течение 3 мин; 35 циклов (94°C в течение 30 с, 50°C в течение 1 мин, 68°C в течение 1 мин), и заканчивали при 72°C в течение 7 мин.

In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech, U.S.A.) использовали для прямого клонирования VL гена в рТТ5 huIgK вектор и гена VHV рТТ5 huIgG1KO вектор. Для облегчения In-Fusion® HD Cloning, ПЛР продукты очищали и обрабатывали с применением Cloning Enhancer перед In-Fusion HD Cloning. Клонирование и трансформацию осуществляли в соответствии с протоколом производителя (Clontech, U.S.A.). Мини-пригот. ДНК подвергали секвенированию по Сенгеру для подтверждения того, что были получены полные фрагменты V-гена. Используя эту методологию, были приготовлены пары VH и VL генов Ig, кодирующие связывающие домены со специфичностью к DLL3. Рекомбинантные антитела продуцировали с помощью транзientной трансфекции CHO-E37 клеток с применением соответствующих плазмид, кодирующие тяжелую и легкую цепь.

Подтверждающий скрининг рекомбинантных антител.

Супернатанты, содержащие экспрессированные рекомбинантные антитела, анализировали с помощью проточной цитометрии относительно связывания с клеточными линиями, экспрессирующими DLL3 человека. Вкратце, клетки инкубировали с рекомбинантными супернатантами, промывали, и связанные mAb из супернатантов обнаруживали с помощью анти-человеческих-IgG-APC (Jackson ImmunoResearch 109-136-098). Отношения сигнал/фон (S/B) рассчитывали путем деления средней интенсивности флуоресценции (MFI) образца на соответствующие значения для изотипного контроля. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) на Biacore 400 осуществляли на рекомбинантных супернатантах. Вкратце, неоптимизированные IgG в НТР супернатантах захватывали с помощью Белок А/Г на поверхность сенсора в течение 60 секунд при 10 мкл/мин. Связывание 100 нМ DLL3 человека с захваченными IgG мониторили в течение 180 с ассоциации при 30 мкл/мин, с последующей диссоциацией в течение 120 с в HBS-EP буфере. Регенерацию поверхности Белка А/Г осуществляли с применением глицина pH 2,1 между каждым циклом связывания. В этом анализе использовали следующие материалы: Белковый реагент: рекомбинантно экспрессируемый DLL3 человека. Системный прогоночный буфер: HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, и 0,005% об./об. полисорбат P20). Захватывающий реагент: Белок А/Г, со специфичностью ко всем изотипам IgG человека.

Представляющие интерес клоны (с Kd < 300 пМ) отбирали и дополнительно оценивали в различных анализах обнаружения, как описано ниже.

Пример 22. Связывание антител к DLL3 с рекомбинантным DLL3 белком человека.

Связывание антител осуществляли в ELISA. Вкратце, антитела к DLL3 покрывали при концентрации 2 мкг/мл при 4°C в течение ночи. После промывки планшеты блокировали с применением блокирующего буфера (Gibco, Gibco № 043-90309A) в течение одного часа при комнатной температуре, с последующей промывкой и инкубацией с рекомбинантным DLL3 белком при возрастающих концентрациях. Для определения связывания DLL3 белок инкубировали с поликлональным антителом к DLL3 (R&D Systems, AB4315), после этого с SULFO-TAG меченным антикозным антителом (R32AG-1) в течение одного часа. Связанное антитело количественно определяли с помощью буфера считывания (MSD) в устройстве формирования изображений Sector 6000 (MSD). На фиг. 22 представлено связывание с тремя иллюстративными антителами к DLL3 с рекомбинантным белком. Антитело к DLL3, нацеленное на мембранный проксимальный пептидный домен (DLL3#3), проявляет более сильное связывание с рекомбинантным DLL3 белком, по сравнению с антителами к DLL3, которые нацелены на EGF4(DLL3#4) или EGF1 домен (DLL3#5).

Пример 23. Связывание антител к DLL3 с SCLC клеточными линиями.

Клетки (Т-клетки или SCLC клетки человека) окрашивали с применением возрастающих концентраций антител к DLL3 с возрастающими концентрациями в FACS буфере (PBS/0,5%BSA/0,05% азид натрия). Связанные молекулы обнаруживали с применением PE-конъюгированного антимишиного вторичного антитела (Jackson Immuno Research, 115-116-072) с помощью FACS анализа. Антитела к DLL3, нацеленные на DSL (DLL3#6), EGF1 (DLL3#5) или EGF4 (DLL3#4) домены, проявляют более сильное связывание с SCLC клеточными линиями, экспрессирующими DLL3, по сравнению с антителами к DLL3, которые нацелены на С-концевой пептид (DLL3#1, DLL3#2, DLL3#3), как показано на фиг. 23.

Пример 24. (ИНС).

Антитела к DLL3 тестировали на DLL3 мРНК положительном SCLC образце при концентрации 20 мкг/мл, используя Ventana Discovery ultra (Ventana Medical Systems, Inc, Arizona) согласно инструкциям производителя. Вкратце, ИНС осуществляли на зафиксированных в формалине залитых парафином

тканях и срезах (4 мкм), которые окрашивали с применением антител к DLL3. ИHC анализ осуществляли на Ventana Discovery Ultra платформе, используя RUO Discovery Universal протокол. Окрашивание с применением антител к DLL3 оптимизировали с помощью Протеинкиназы К в качестве Исправителя Эпитопа в течение 12 мин. Антитело к DLL3 инкубировали в течение 60 мин, с последующим применением антимишину HQ системы обнаружения и анти HQ HRP обоих в течение 12 мин. Отрицательные контроли (IgG антитело) осуществляли для каждого среза ткани, леченного идентично тестируемым срезам.

SCLC клеточную линию человека SHP77 использовали в качестве положительного контроля. Цифровые изображения срезов цельных тканей получали с помощью Leica SCN400 гистологического сканера (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK).

Иммуногистохимический анализ образца SCLC человека с иллюстративными антителами к DLL3 представлен на фиг. 24.

Пример 25. Определение уровней экспрессии на SCLC клеточных линиях.

Экспрессия антител к DLL3 на клеточной поверхности количественно определяли, используя QI-FIKIT (K0078; Dako). Вкратце, SCLC клеточные линии (SHP77, NCI-H82 и NCI-H2286) метили с применением антитела к DLL3 (DL309, WO 2011/093097) или нерелевантного антитела (изотипный контроль) при концентрации 5 мкг/мл. В отдельном флаконе. Затем, клетки и шарики, обеспеченные в наборе, метили параллельно с применением конъюгированных с флуоресцеином антимишинных вторичных антител. Образцы измеряли на BD CantoII Fluorocytometer и следовательно, флуоресценция коррелирует с количеством связанных антител к DLL3 на клетках и на шариках. В табл. 12 представлены DLL3 молекулы, экспрессируемые на клеточной поверхности трех SCLC клеточных линий.

Таблица 13

DLL3 молекулы, экспрессируемые на клеточной поверхности SCLC клеточных линий

SCLC клеточная линия	DLL3 молекулы на клеточной поверхности/ клетке
SHP77 (ATCC®, CRL-2195 TM)	2061
NCI-H82 (HTB-175 TM)	824
NCI-H2286	129

Пример 26. Определение чувствительности в ИHC протоколе на блоках SCLC клеточной линии.

Для оценки чувствительности ИHC протокола, SCLC клеточные линии (SHP77, NCI-H82 и NCI-H2286) обрабатывали подобно тканям в больницах и фиксировали в формалине и затем заливали в парафин.

SCLC клеточные линии культивировали в соответствии с инструкциями ATCC. Клетки соскабливали от планшета и фиксировали в формалине и затем добавляли к солиобилизованному Histogel (Thermo Fisher scientific, HG-4000-012) и инкубировали в течение ночи при 4°C, после этого осуществляли стандартную процедуру заливки в парафин, осуществляемую в обычной патологоанатомической лаборатории. Вкратце, клеточный блок инкубировали в этаноле и пропаноле перед заливкой в парафин (roti-Plast, № 6642.5). Осуществляли срезы блоков клеточного осадка после центрифугирования и срезы окрашивали согласно протоколу, как описано в примере 24. Результаты, представленные на фиг. 25, демонстрируют, что ИHC протокол с применением антитела к DLL3 DLL3#5 способен обнаруживать клетки с очень низкой экспрессией DLL3.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, включающий первую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с дельта-подобным белком 3 (DLL3), и вторую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с CD3, где указанную первую антигенсвязывающую единицу, которая специфически связывается с DLL3, выбирают из группы, включающей I) - III):

I) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3);

II) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3); и

III) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3);

и в котором указанная вторая антигенсвязывающая единица, специфически связывающаяся с CD3, выбрана из группы, включающей I) - III):

I) антигенсвязывающую единицу, включающую CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) и SEQ ID NO:57 (CDR3), и CDR тя-

лот, предпочтительно любое количество из 30-40 аминокислот, 34-40 аминокислот или 36-39 аминокислот, более предпочтительно 38 аминокислот.

8. Белок по п.6 или 7, где указанный первый пептидный линкер и/или второй пептидный линкер представляет собой Gly-Ser линкер, предпочтительно включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, более предпочтительно указанный первый и второй пептидный линкер включают ту же самую последовательность.

9. Белок по одному из пп.6-8, включающий:

I) первый одноцепочечный Fab, формирующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и второй одноцепочечный Fab, формирующий вторую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71; или

II) первый одноцепочечный Fab, формирующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, и второй одноцепочечный Fab, формирующий вторую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71; или

III) первый одноцепочечный Fab, формирующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, и второй одноцепочечный Fab, формирующий вторую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71; или

IV) первый одноцепочечный Fab, формирующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и второй одноцепочечный Fab, формирующий вторую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72; или

V) первый одноцепочечный Fab, формирующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, и второй одноцепочечный Fab, формирующий вторую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72; или

VI) первый одноцепочечный Fab, формирующий первую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, и второй одноцепочечный Fab, формирующий вторую антигенсвязывающую единицу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

10. Белок по одному из пп.6-9, дополнительно включающий первый и второй Fc домены, где указанный первый Fc домен ковалентно связан с указанной первой антигенсвязывающей единицей, и указанный второй Fc домен ковалентно связан с указанной второй антигенсвязывающей единицей.

11. Белок по п.10, где:

I) указанный первый Fc домен включает тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], и указанный второй Fc домен включает треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

II) указанный первый Fc домен включает триптофан (W) в положении 366 [T366W], и указанный второй Fc домен включает серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V], или

III) указанный второй Fc домен включает тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], и указанный первый Fc домен включает треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

IV) указанный второй Fc домен включает триптофан (W) в положении 366 [T366W], и указанный первый Fc домен включает серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V],

предпочтительно где указанный первый или указанный второй Fc домен дополнительно включает аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F].

12. Белок по п.11, где указанный первый и/или указанный второй Fc домен дополнительно включает аланин в положении 234 [L234A] и в положении 235 [L235A].

13. Белок по одному из пп.6-12, где первый константный домен легкой цепи и второй константный домен легкой цепи включают каппа или лямбда домены человека.

14. Белок, включающий:

I) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, или

II) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, или

III) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, или

IV) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, или

кислотную последовательность SEQ ID NO:73, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80, или

V) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80, или

VI) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80, или

VII) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, или

VIII) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, или

IX) первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105.

15. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая первую антигенсвязывающую единицу белка по одному из пп.1-9.

16. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая первую полипептидную цепь белка по п.14.

17. Экспрессионный вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по п.15 или 16.

18. Клетка-хозяин, трансфектированная двумя экспрессионными векторами, первым экспрессионным вектором, кодирующим первую полипептидную цепь, любую из SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74 или SEQ ID NO:75, и другим экспрессионным вектором, кодирующим вторую полипептидную цепь SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80 или SEQ ID NO:105.

19. Способ получения белка по п.14, включающий:

I) культивирование клетки-хозяина по п.18 в условиях, предоставляющих возможность экспрессии белка по п.14; и

II) восстановление белка.

20. Способ по п.19, дополнительно включающий очистку, модификацию или разработку рецептуры белка.

21. Связывающий белок, включающий первую полипептидную цепь, которая специфически связывается с DLL3, и вторую полипептидную цепь, которая специфически связывается с CD3, где указанная первая полипептидная цепь включает первую легкую цепь, первый пептидный линкер, и первую тяжелую цепь, и указанная вторая полипептидная цепь включает вторую легкую цепь, второй пептидный линкер, и вторую тяжелую цепь, где С-конец указанной первой легкой цепи ковалентно связан с N-концом указанной первой тяжелой цепи с помощью указанного первого пептидного линкера и где С-конец указанной второй легкой цепи ковалентно связан с N-концом указанной второй тяжелой цепи с помощью указанного второго пептидного линкера, где указанная первая полипептидная цепь, которая специфически связывается с DLL3, включает переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, включающий последовательности CDR, выбранные из группы, включающей I) - III):

I) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) и SEQ ID NO:3 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) и SEQ ID NO:6 (CDR3);

II) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 (CDR1), SEQ ID NO:8 (CDR2) и SEQ ID NO:9 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 (CDR1), SEQ ID NO:11 (CDR2) и SEQ ID NO:12 (CDR3);

III) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 (CDR1), SEQ ID NO:14 (CDR2) и SEQ ID NO:15 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 (CDR1), SEQ ID NO:17 (CDR2) и SEQ ID NO:18 (CDR3);

и где указанная вторая полипептидная цепь, которая специфически связывается с CD3, включает переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, включающий последовательности CDR, выбранные из группы, включающей I) - III):

I) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:55 (CDR1), SEQ ID NO:56 (CDR2) и SEQ ID NO:57 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:58 (CDR1), SEQ ID NO:59 (CDR2) и SEQ ID NO:60 (CDR3);

II) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:61 (CDR1), SEQ ID NO:62 (CDR2) и SEQ ID NO:63 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:64 (CDR1), SEQ ID NO:65 (CDR2) и SEQ ID NO:66 (CDR3); и

III) CDR легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:96 (CDR1), SEQ ID NO:97 (CDR2) и SEQ ID NO:98 (CDR3), и CDR тяжелой цепи, включающие аминокислотные

вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; и указанная вторая полипептидная цепь, которая специфически связывается с CD3, содержит вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70.

28. Белок по одному из пп.21-27, где:

I) указанная первая тяжелая цепь включает тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], и указанная вторая тяжелая цепь включает треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

II) указанная первая тяжелая цепь включает триптофан (W) в положении 366 [T366W], и указанная вторая тяжелая цепь включает серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V], или

III) указанная вторая тяжелая цепь включает тирозин (Y) в положении 366 [T366Y], и указанная первая тяжелая цепь включает треонин (T) в положении 407 [Y407T], или

IV) указанная вторая тяжелая цепь включает триптофан (W) в положении 366 [T366W], и указанная первая тяжелая цепь включает серин (S) в положении 366 [T366S], аланин (A) в положении 368 [L368A] и валин (V) в положении 407 [Y407V],

предпочтительно где указанная первая или указанная вторая тяжелая цепь дополнительно включает аргинин в положении 435 [H435R] и фенилаланин в положении 436 [Y436F].

29. Белок по п.28, где указанная первая и/или указанная вторая тяжелая цепь дополнительно включает аланин в положении 234[L234A] и в положении 235 [L235A].

30. Белок по одному из пп.21-29, где указанная первая легкая цепь и указанная вторая легкая цепь включают каппа или лямбда домен человека.

31. Белок по одному из пп.21-30, в котором:

I) указанная первая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с DLL3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и указанная вторая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с CD3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71; или

II) указанная первая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с DLL3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, и указанная вторая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с CD3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71; или

III) указанная первая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с DLL3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, и указанная вторая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с CD3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71; или

IV) указанная первая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с DLL3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и указанная вторая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с CD3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72; или

V) указанная первая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с DLL3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, и указанная вторая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с CD3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72; или

VI) указанная первая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с DLL3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, и указанная вторая полипептидная цепь содержит scFab, специфически связывающийся с CD3, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

32. Фармацевтическая композиция, которая включает белок по одному из пп.1-14 или 21-31 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Применение белка по одному из пп.1-14 или 21-31 для приготовления фармацевтической композиции для лечения DLL3 экспрессирующего рака.

34. Применение по п.33, где рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого (SCLC), глиобластому или DLL3 экспрессирующую нейроэндокринную опухоль.

35. Применение по п.33 или 34, где указанный белок применяют в комбинации с химиотерапевтическим агентом, терапевтически активным соединением, которое ингибирует ангиогенез, ингибитором пути передачи сигналов, ингибитором рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), иммуномодулятором, иммуномодулятором иммунной контрольной точки или агентом для гормональной терапии.

36. Применение по п.35, где указанный белок применяют в комбинации с иммуномодулятором иммунной контрольной точки, предпочтительно антитело к белку программируемой смерти-1 (анти-PD-1), или антитело к лиганду программируемой смерти-1 (анти-PD-L1).

37. Применение по п.36, где антитело к PD-1 выбирают из группы, включающей:

I) антитело, имеющее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID

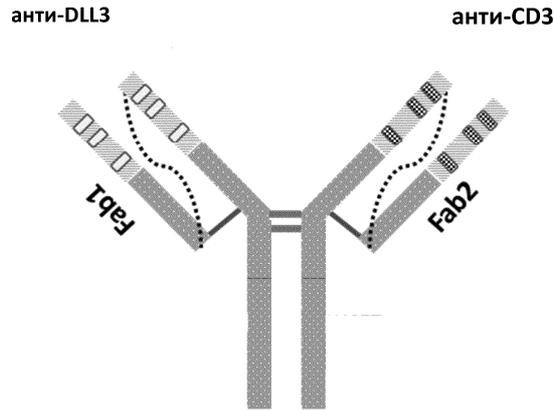
NO:256, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:257,

II) антитело, имеющее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:258, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:259,

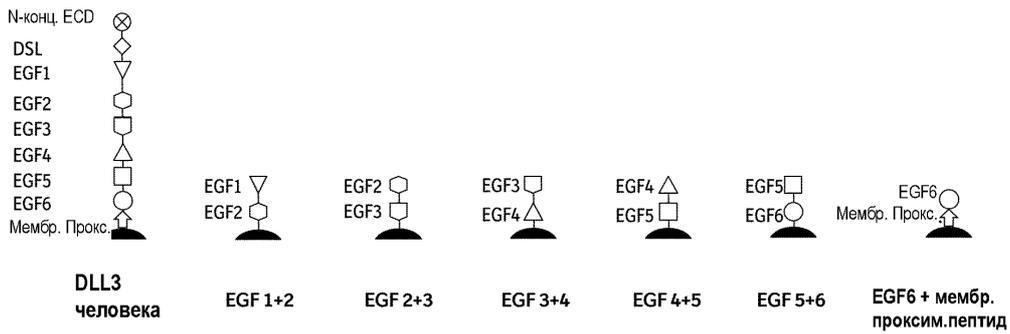
III) антитело, имеющее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:260, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:261,

IV) антитело, имеющее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:262, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:263,

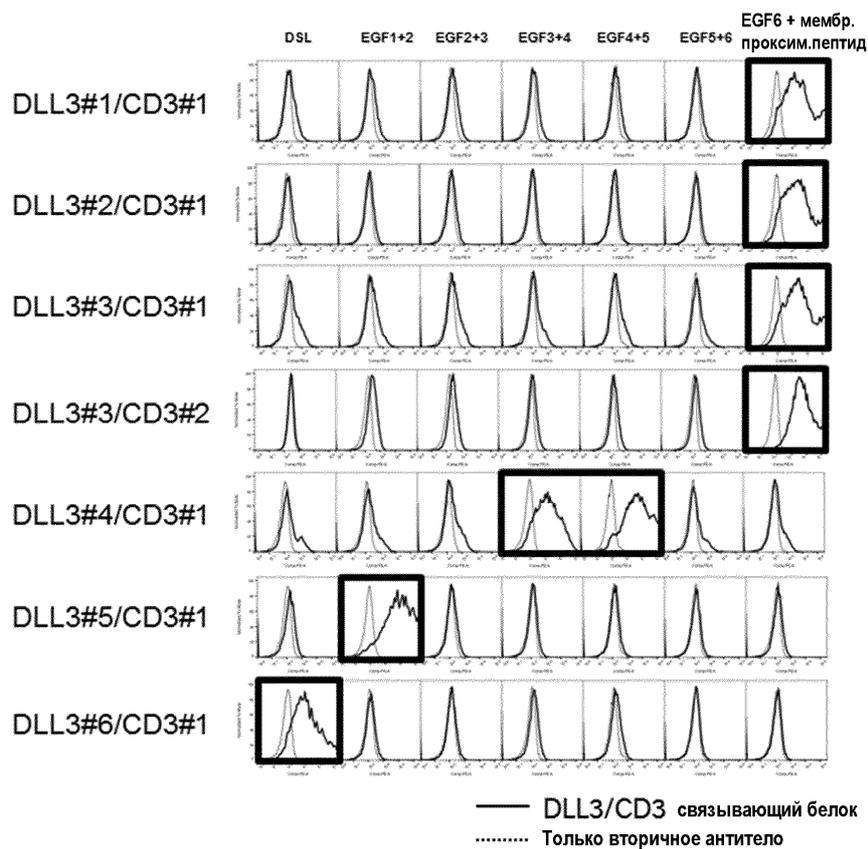
V) антитело, имеющее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:264, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:265.



Фиг. 1

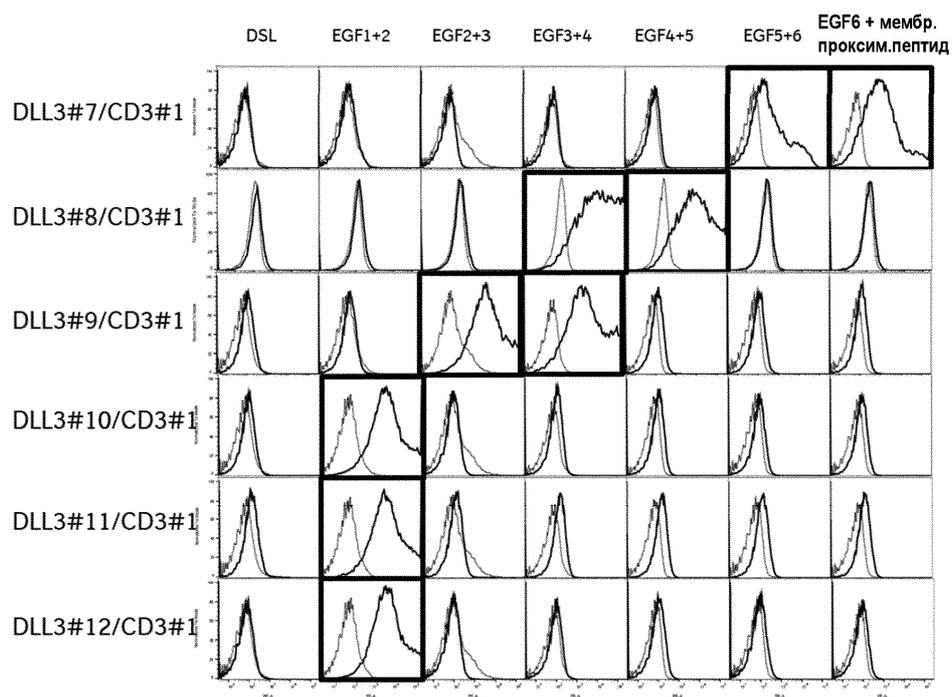


Фиг. 2



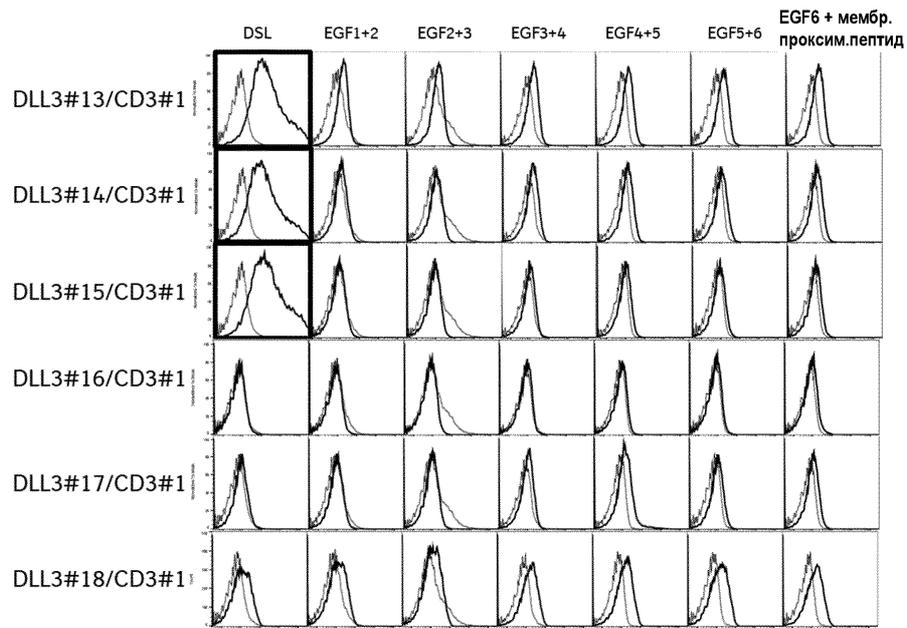
DLL3/CD3 связывающие белки	Домен эпитопа
DLL3#1/CD3#1	Мембранный проксимальный пептид
DLL3#2/CD3#1	Мембранный проксимальный пептид
DLL3#3/CD3#1	Мембранный проксимальный пептид
DLL3#3/CD3#2	Мембранный проксимальный пептид
DLL3#4/CD3#1	EGF4
DLL3#5/CD3#1	EGF1
DLL3#6/CD3#1	DSL

Фиг. 3А



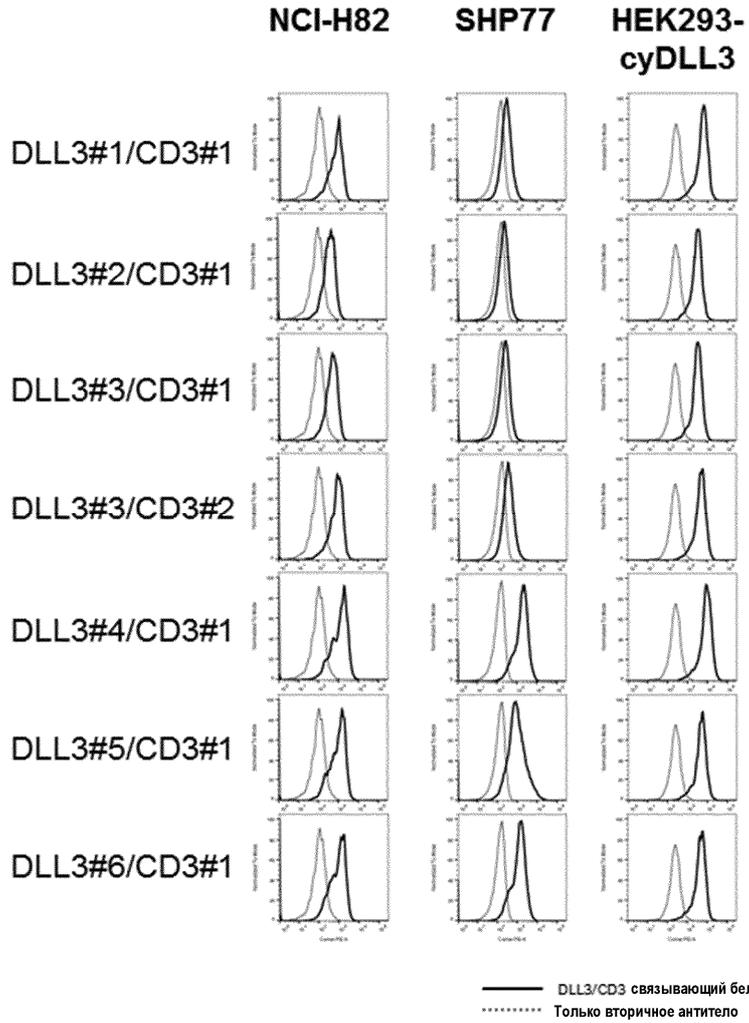
DLL3/CD3 связыв. белки	Домен эпитопа
DLL3#7/CD3#1	EGF6
DLL3#8/CD3#1	EGF4
DLL3#9/CD3#1	EGF3
DLL3#10/CD3#1	EGF1
DLL3#11/CD3#1	EGF1
DLL3#12/CD3#1	EGF1

Фиг. 3В

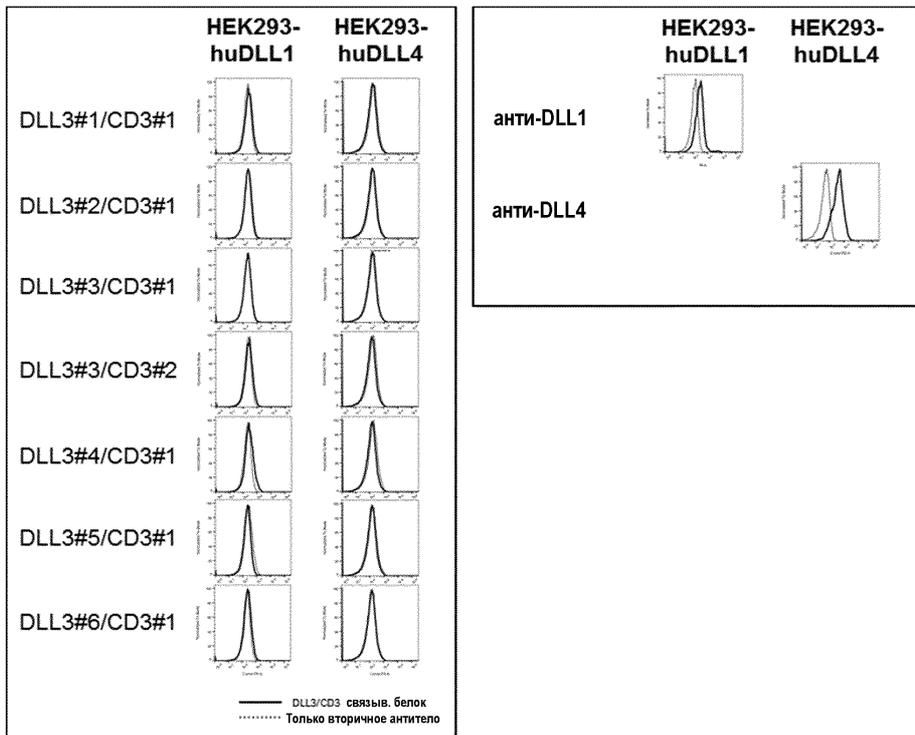


DLL3/CD3 связыв. белки	Домен эпитопа
DLL3#6/CD3#1	DSL
DLL3#13/CD3#1	DSL
DLL3#14/CD3#1	DSL
DLL3#15/CD3#1	DSL
DLL3#16/CD3#1	He-DSL-не-EGF1-6-немембранный проксимальный пептид
DLL3#17/CD3#1	He-DSL-не-EGF1-6-немембранный проксимальный пептид
DLL3#18/CD3#1	He-DSL-не-EGF1-6-немембранный проксимальный пептид

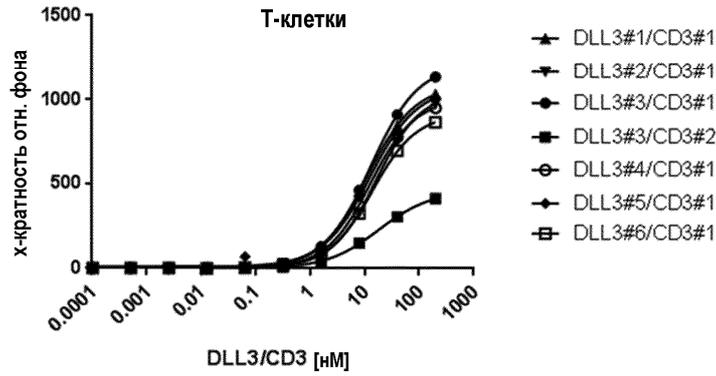
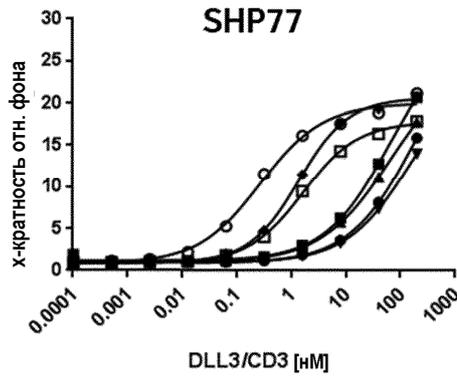
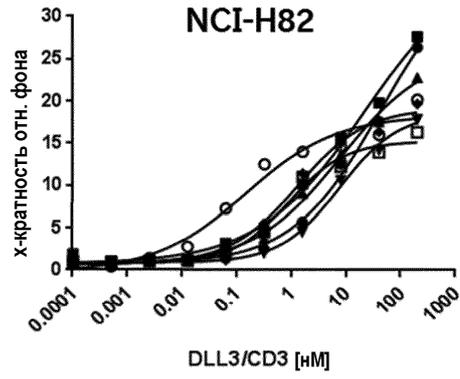
Фиг. 3С



Фиг. 4

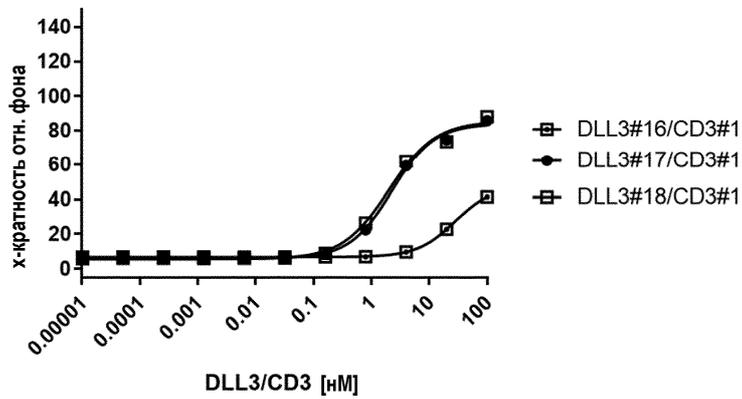


Фиг. 5



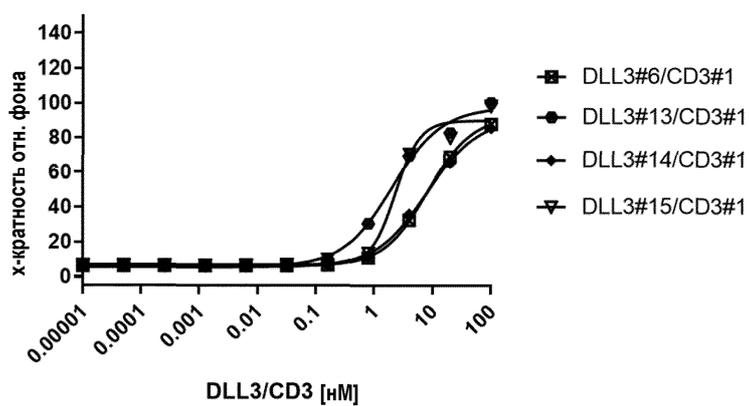
Фиг. 6А

не-DSL-не-EGF1-6-немебранный проксимальный пептид



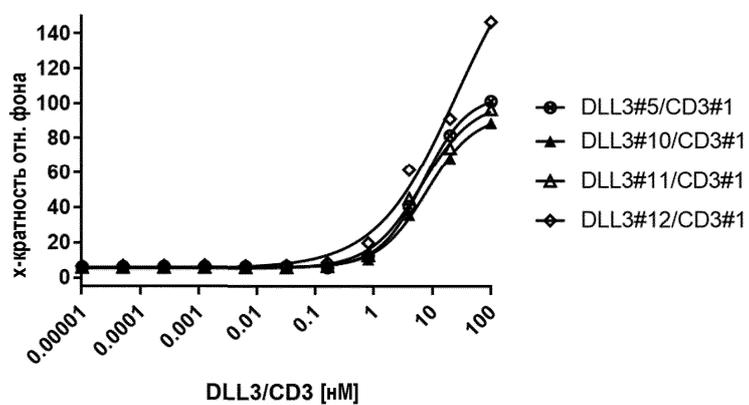
Фиг. 6В

DSL



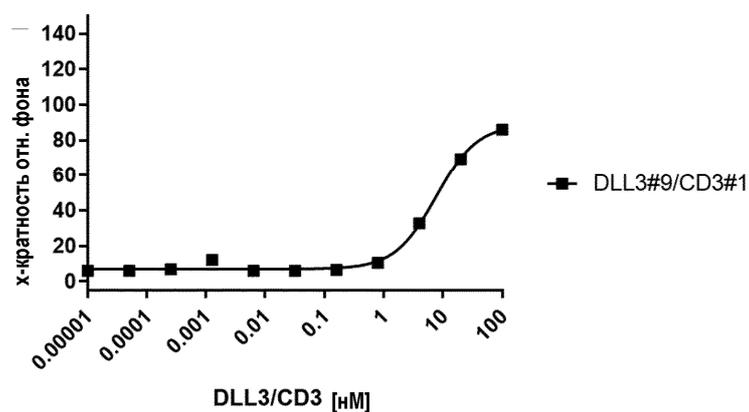
Фиг. 6С

EGF1



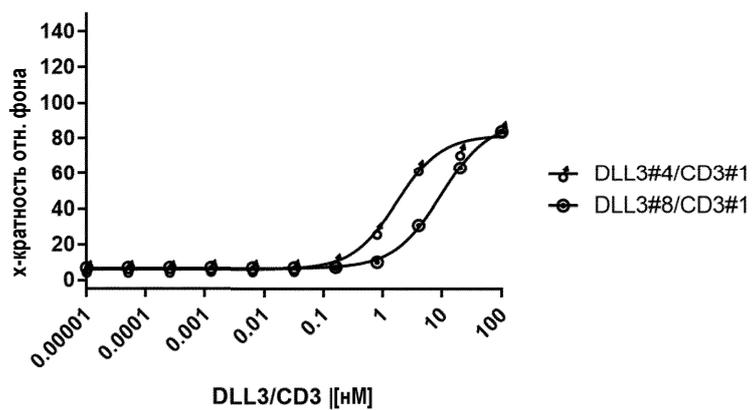
Фиг. 6D

EGF3



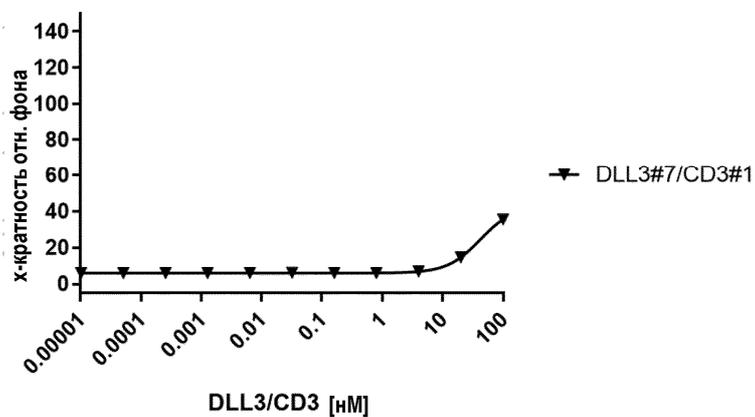
Фиг. 6E

EGF4



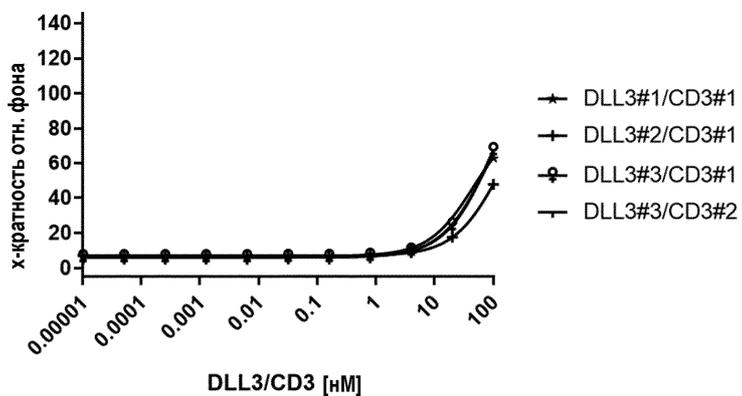
Фиг. 6F

EGF6



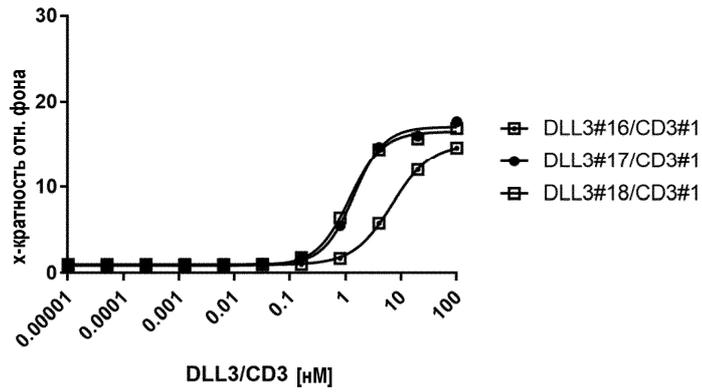
Фиг. 6G

мембранный проксимальный пептид



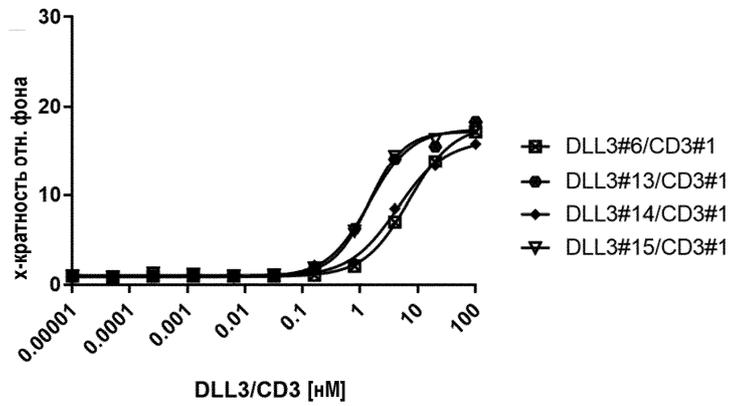
Фиг. 6H

не-DSL-не-EGF1-6-не мембранный проксимальный пептид



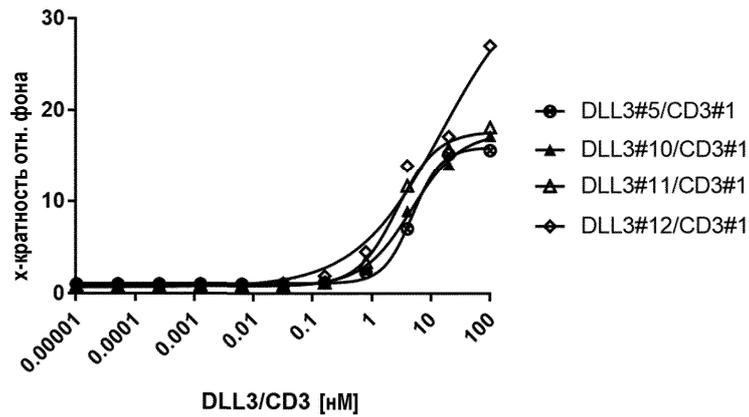
Фиг. 6I

DSL



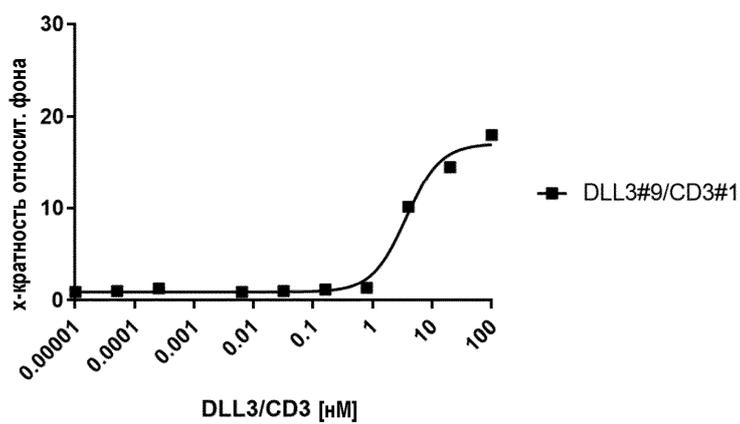
Фиг. 6J

EGF1



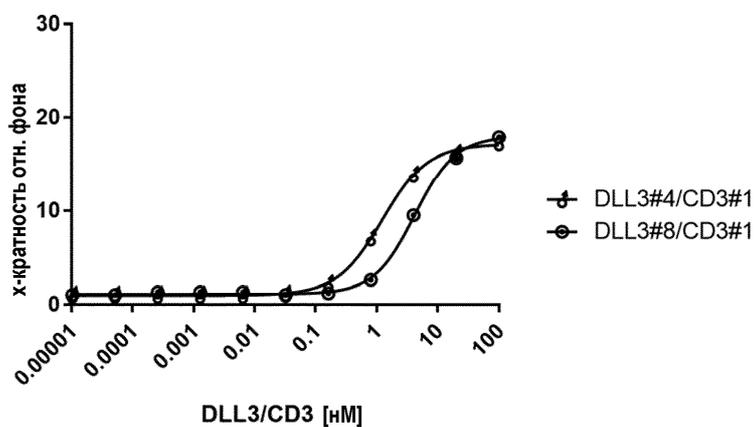
Фиг. 6K

EGF3



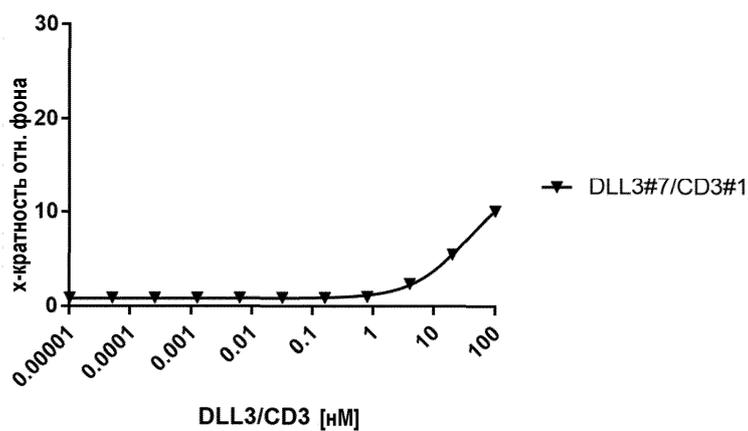
Фиг. 6L

EGF4



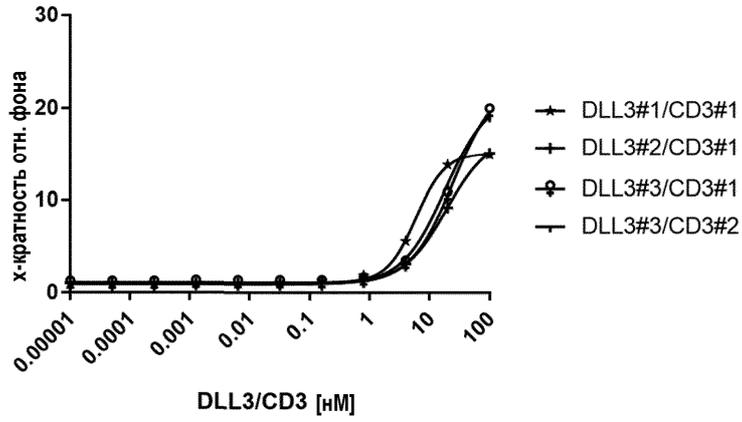
Фиг. 6M

EGF6



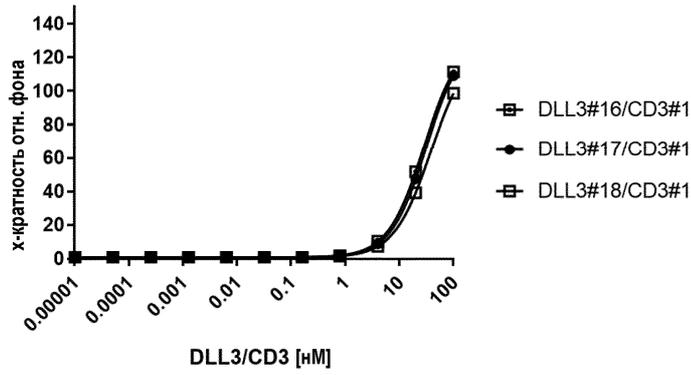
Фиг. 6N

мембранный проксимальный пептид



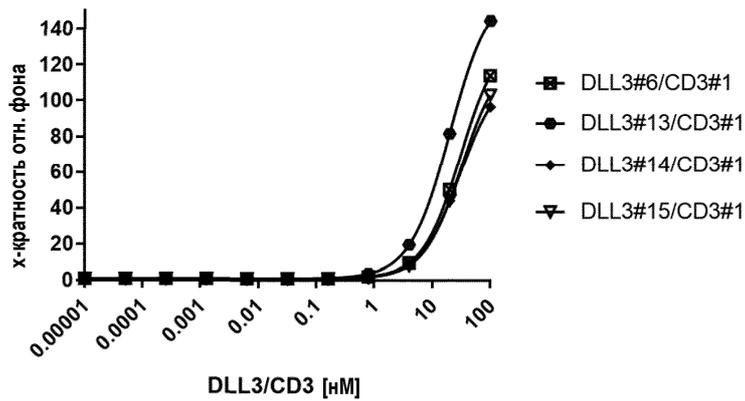
Фиг. 6O

не-DSL-не-EGF1-6-немебранный проксимальный пептид



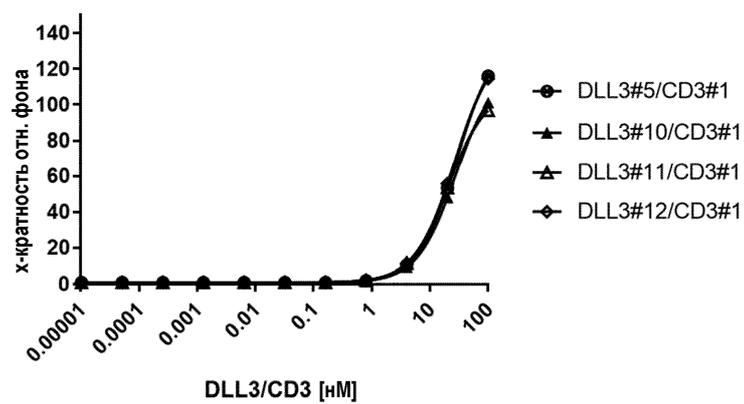
Фиг. 6P

DSL



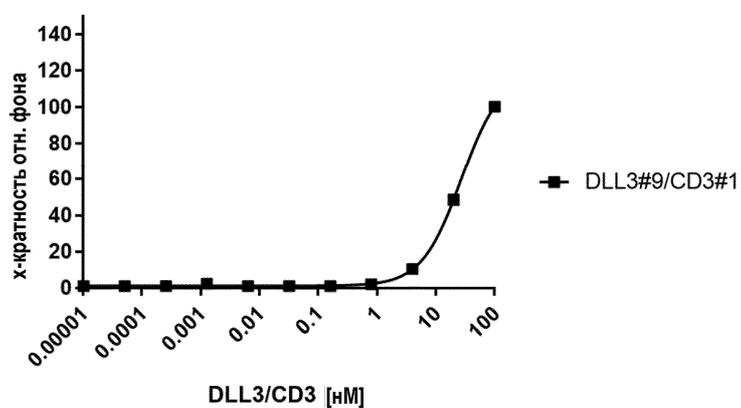
Фиг. 6Q

EGF1



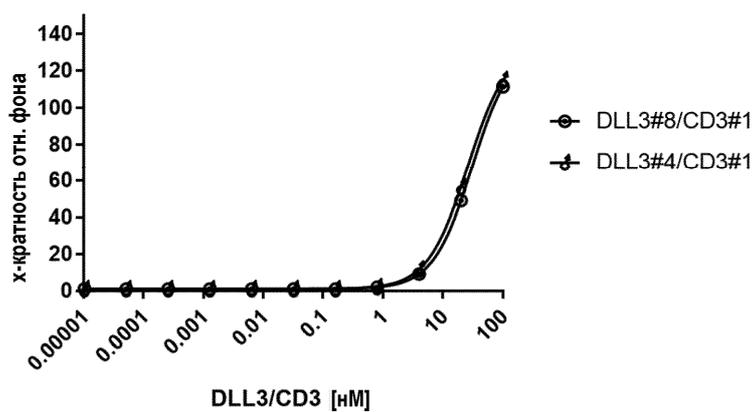
Фиг. 6R

EGF3



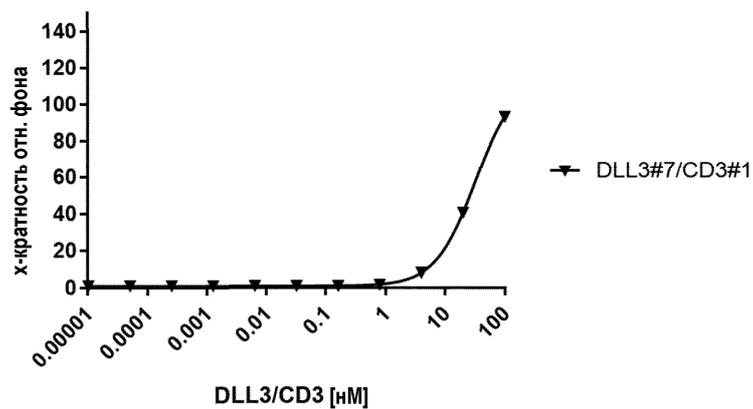
Фиг. 6S

EGF4



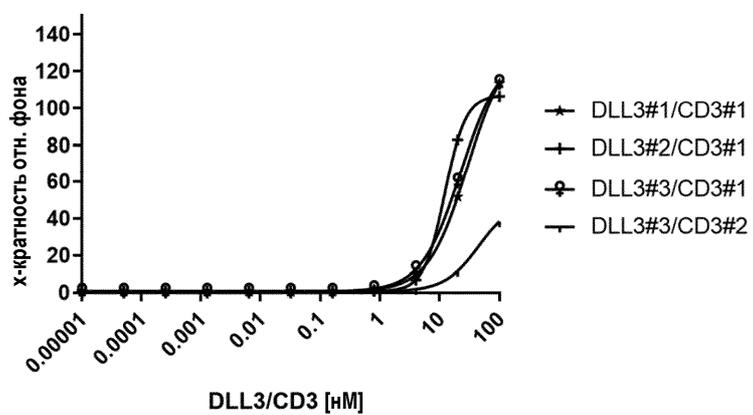
Фиг. 6T

EGF6

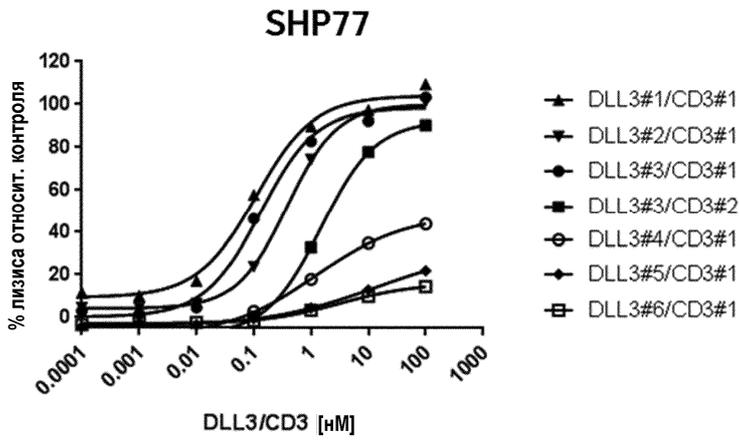
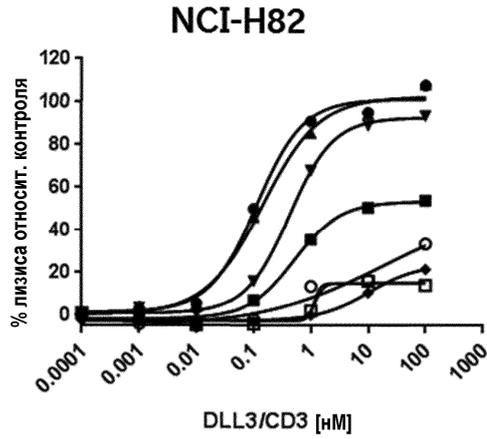


Фиг. 6U

мембранный проксимальный пептид

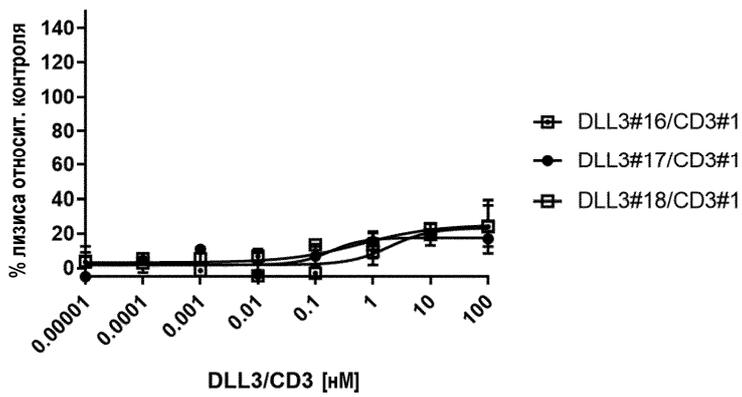


Фиг. 6V



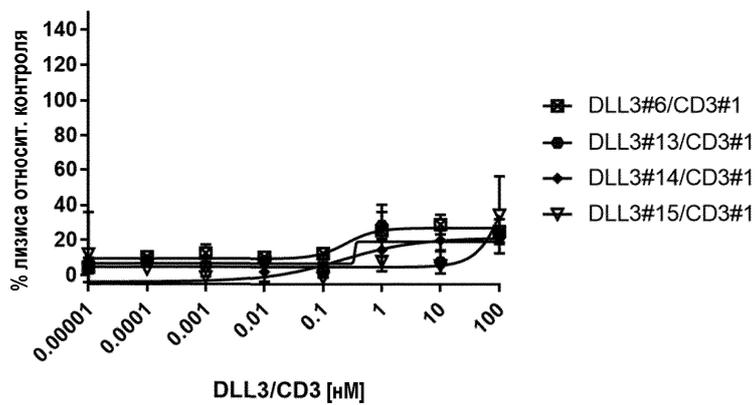
Фиг. 7А

не-DSL-не-EGF1-6-не-мембранный проксимальный пептид



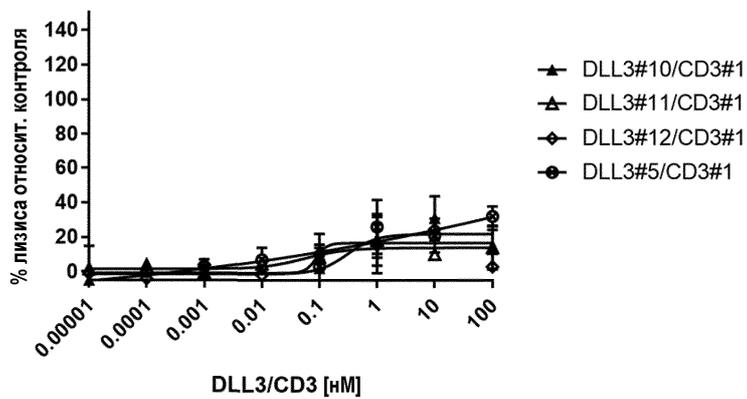
Фиг. 7В

DSL



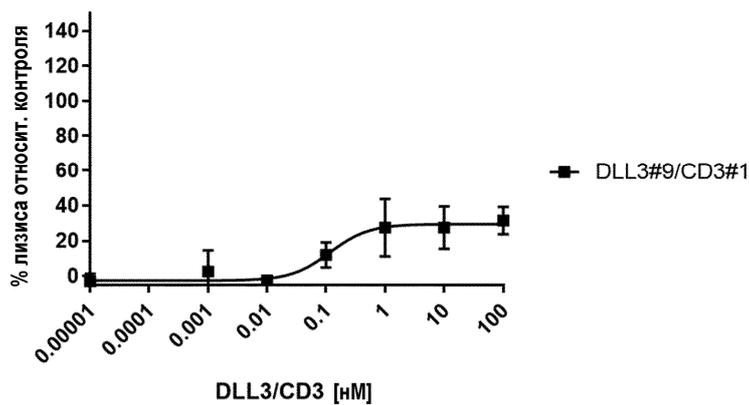
Фиг. 7С

EGF1



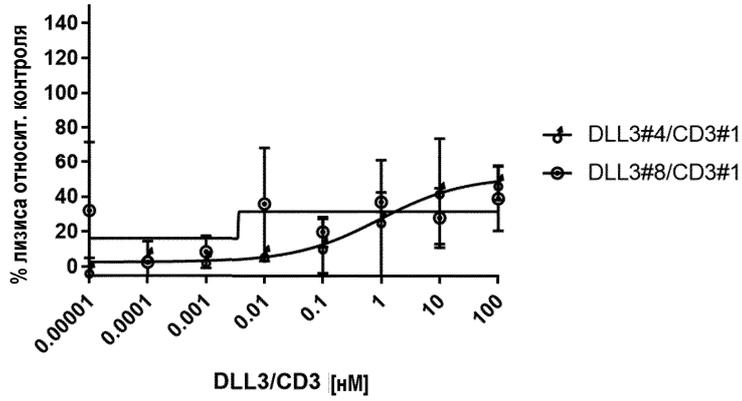
Фиг. 7D

EGF3



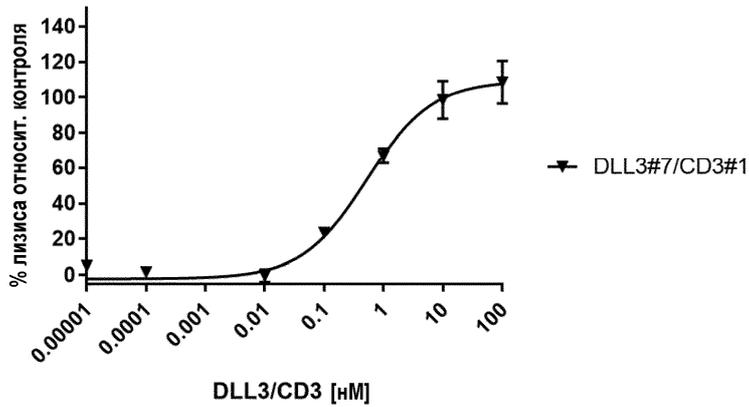
Фиг. 7E

EGF4



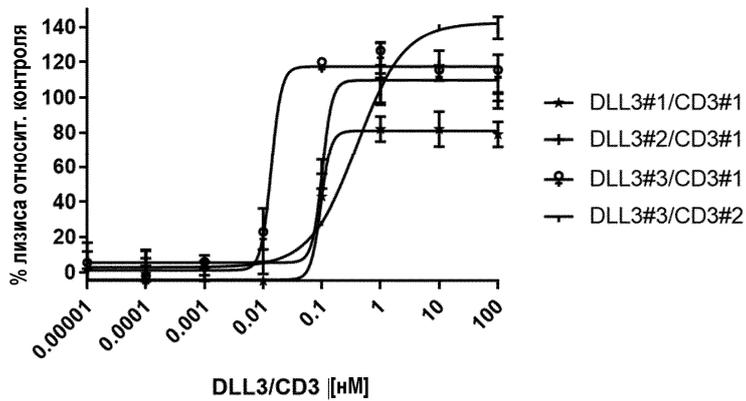
Фиг. 7F

EGF6



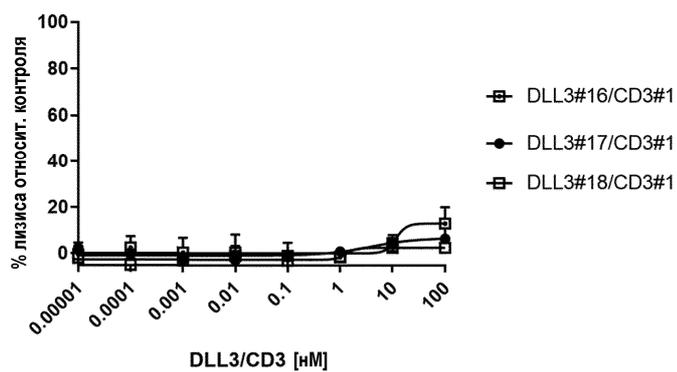
Фиг. 7G

мембранный проксимальный пептид



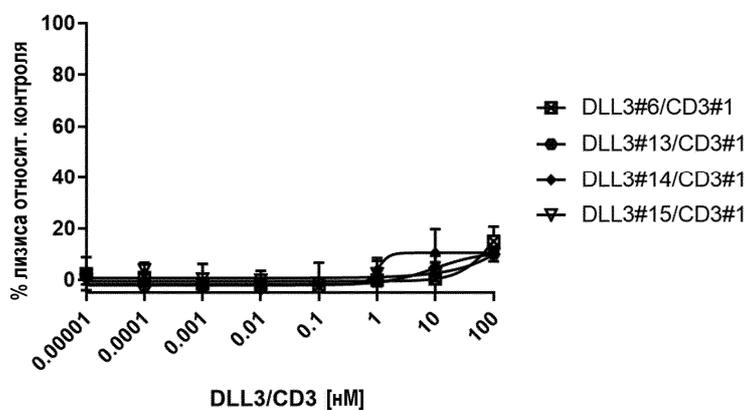
Фиг. 7H

не-DSL-не-EGF1-6-не мембранный проксимальный пептид



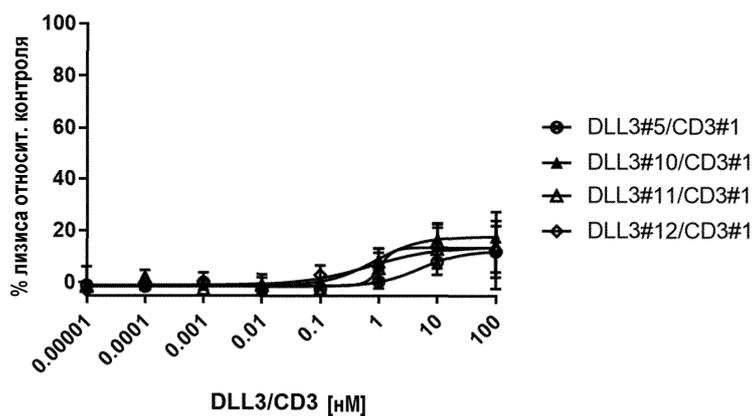
Фиг. 7I

DSL



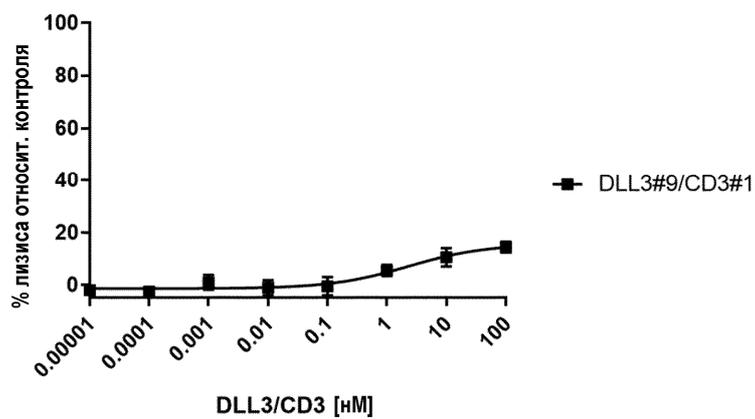
Фиг. 7J

EGF1



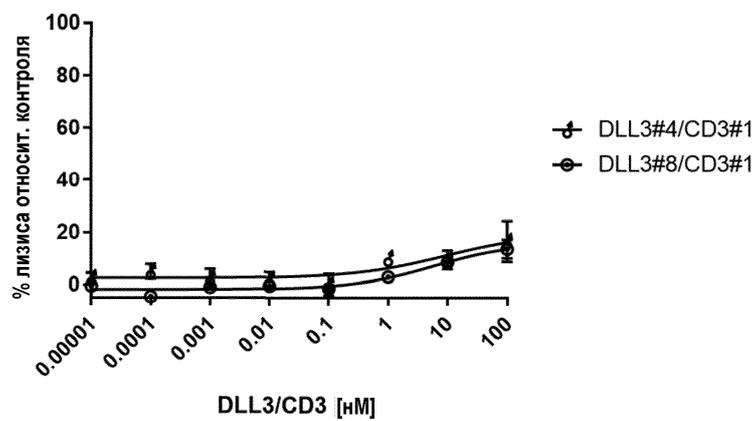
Фиг. 7K

EGF3



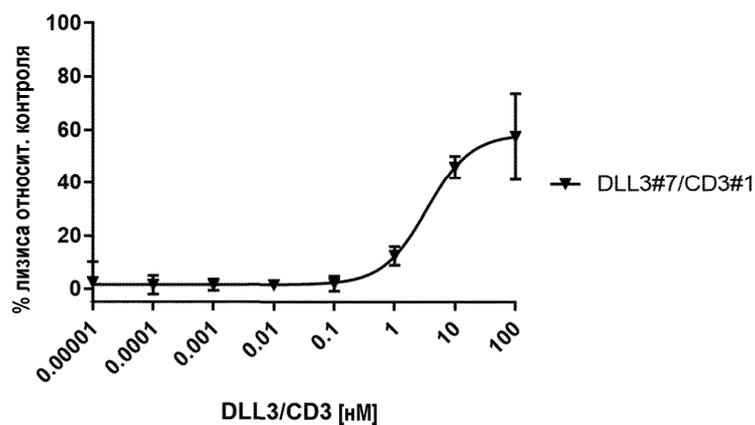
Фиг. 7L

EGF4



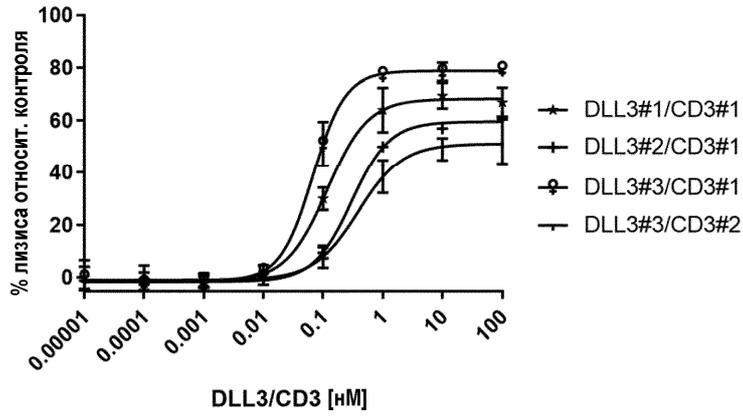
Фиг. 7M

EGF6

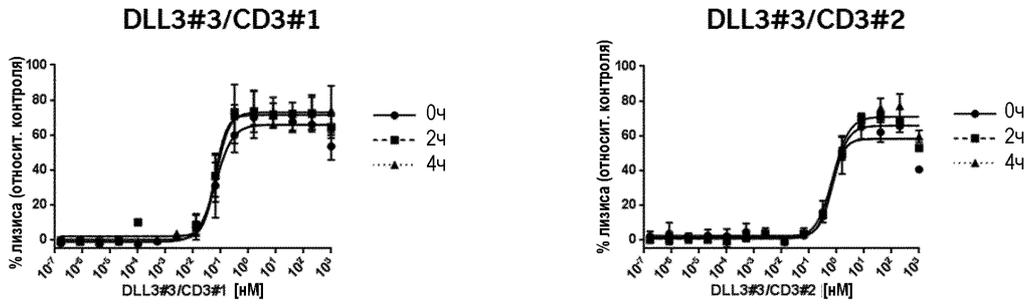


Фиг. 7N

мембранный проксимальный пептид



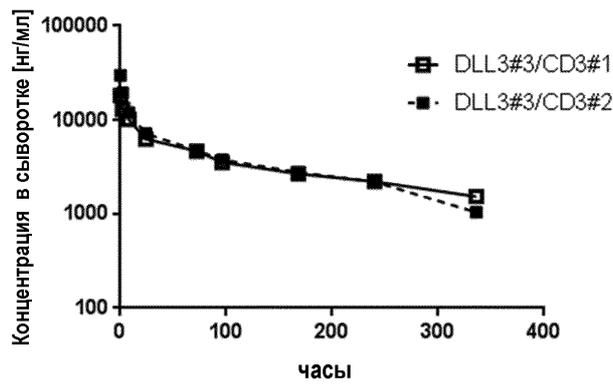
Фиг. 7О



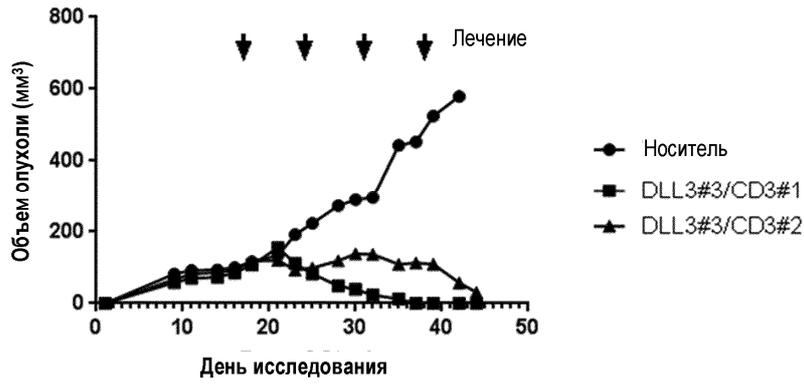
Преинкубация	EC ₅₀ [нМ]
0ч	0.3
2ч	0.2
4ч	0.2

Преинкубация	EC ₅₀ [нМ]
0ч	2
2ч	2.9
4ч	3.4

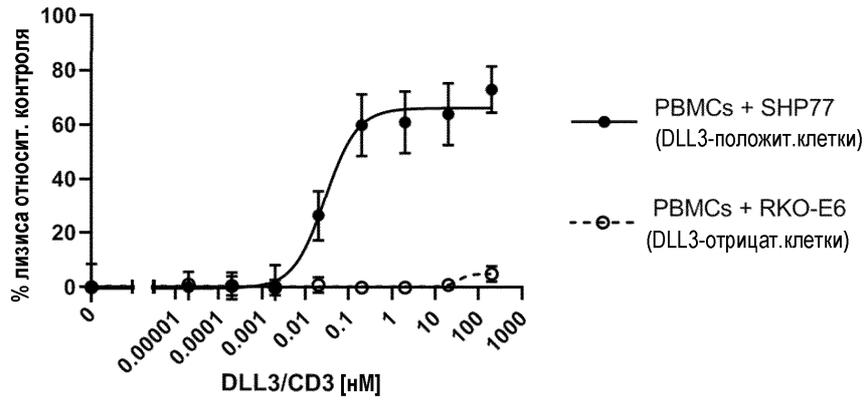
Фиг. 8



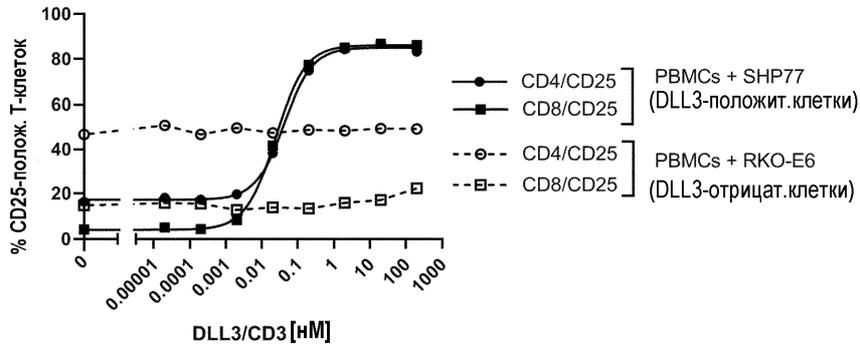
Фиг. 9



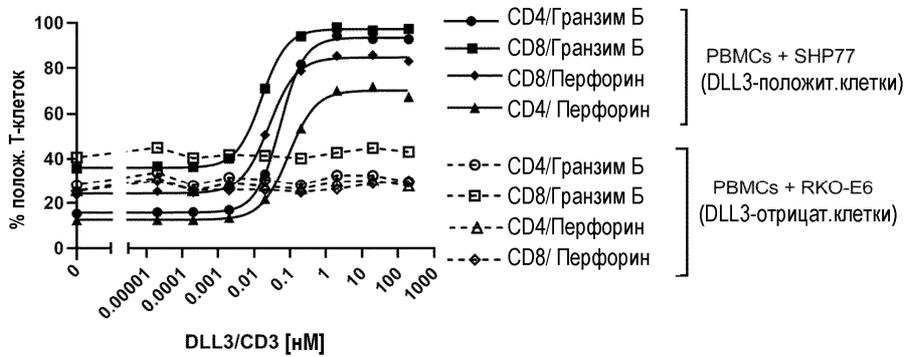
Фиг. 10



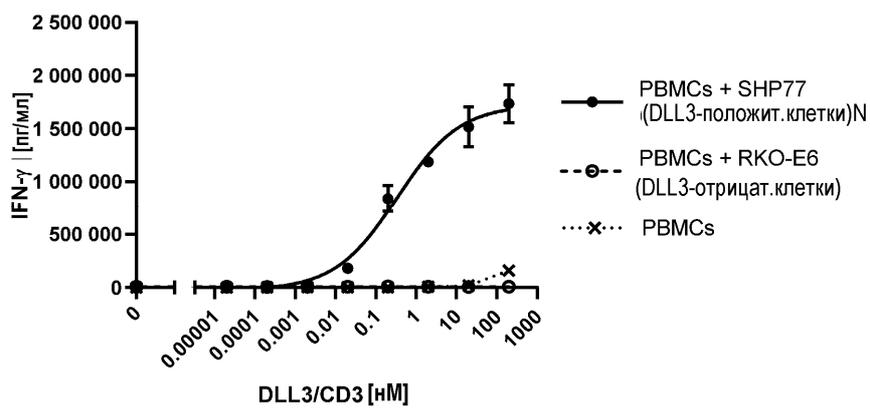
Фиг. 11



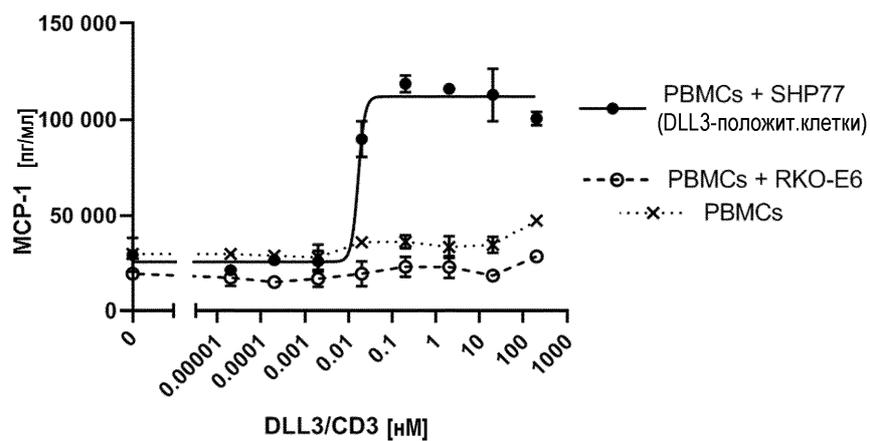
Фиг. 12



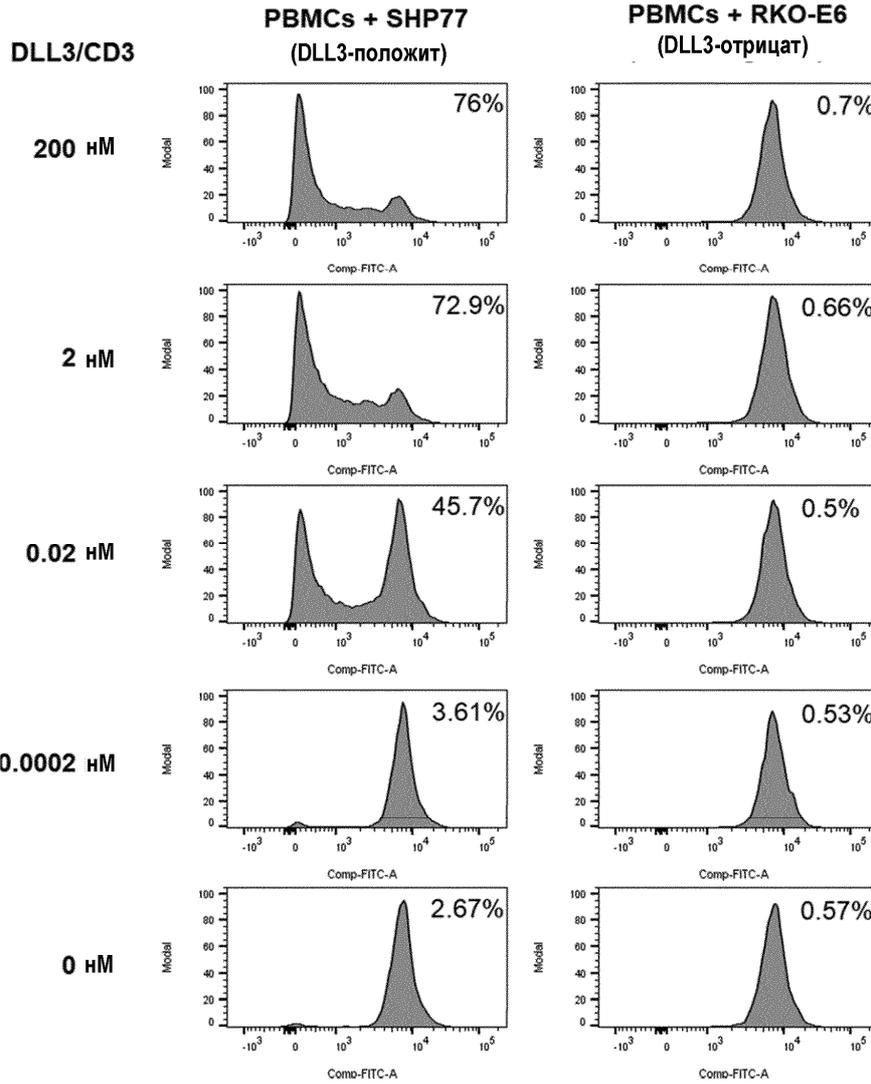
Фиг. 13



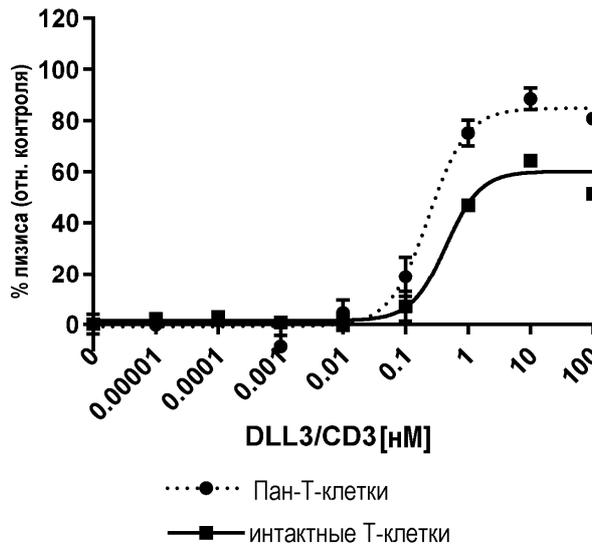
Фиг. 14А



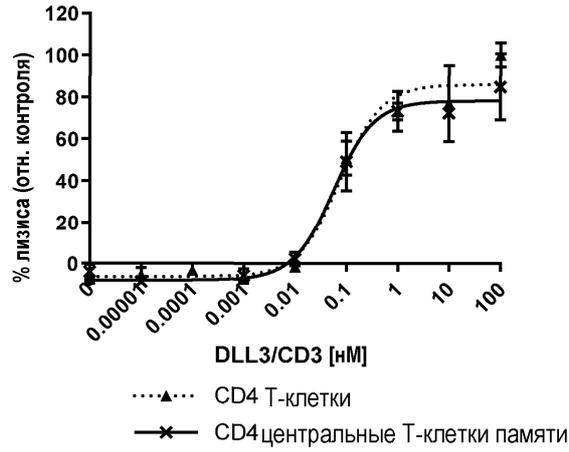
Фиг. 14В



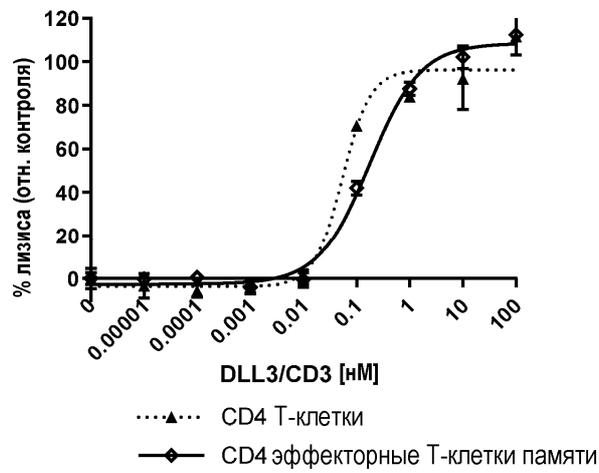
Фиг. 15



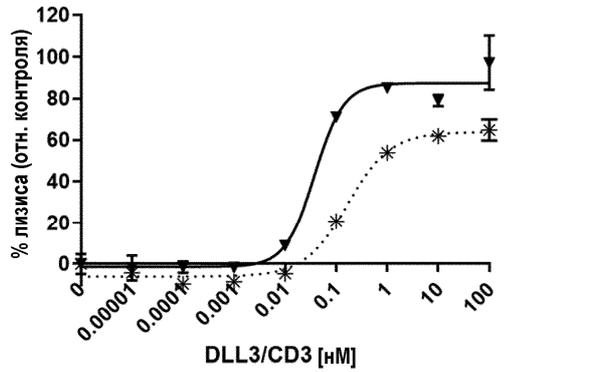
Фиг. 16



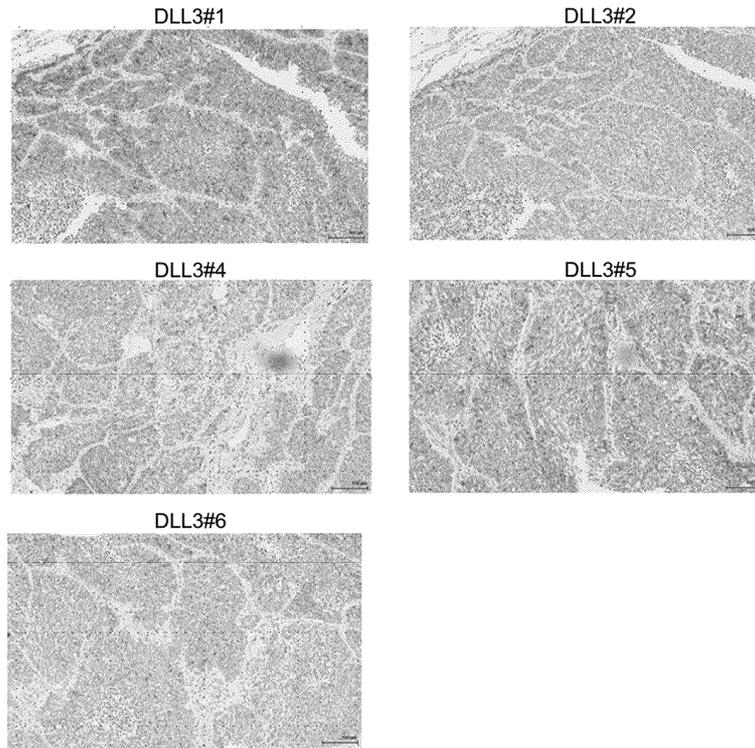
Фиг. 17



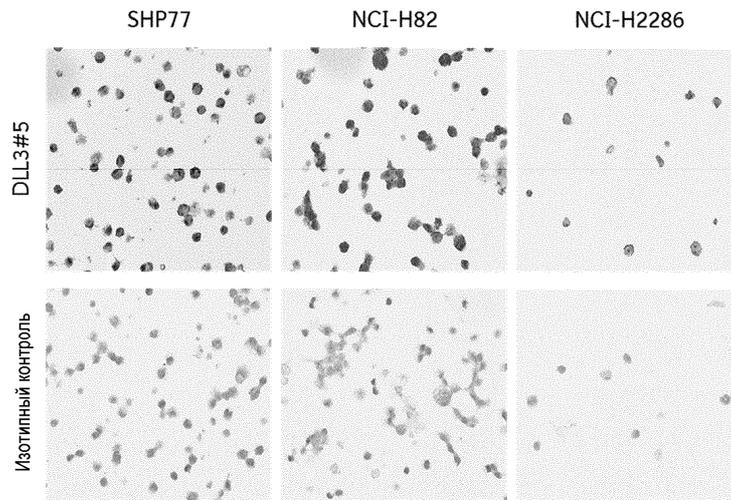
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 24



Фиг. 25