

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491570 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.21

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.12.23

(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ DLL3, ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ И
КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СОДЕРЖАЩИЙ
АНТИТЕЛО ПРОТИВ DLL3

(31) 202111592539.7

(72) Изобретатель:

(32) 2021.12.23

Е Синь, Яо Цинцин, Цзинь Синьшэн,
Ин Хуа, Тао Вэйкан (CN)

(33) CN

(86) PCT/CN2022/141269

(74) Представитель:

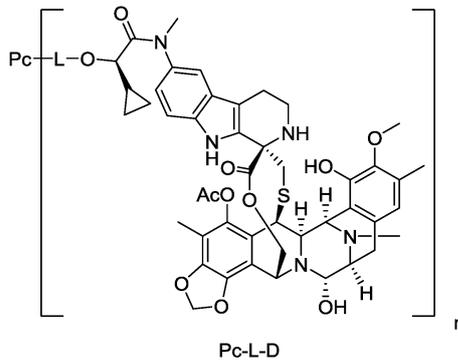
(87) WO 2023/116861 2023.06.29

Хмара М.В. (RU)

(71) Заявитель:

ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО.,
ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

(57) Антитело против DLL3 и его фармацевтическое применение, и конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий указанное антитело против DLL3. Настоящее изобретение относится к конъюгату антитела против DLL3-лекарственного средства эктеинасцидина, представленному общей формулой (Pc-L-D), где Pc представляет собой антитело против DLL3.



A1

202491570

202491570

A1

**АНТИТЕЛО ПРОТИВ DLL3, ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ И
КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СОДЕРЖАЩИЙ
АНТИТЕЛО ПРОТИВ DLL3**

5 В настоящей заявке испрашивается приоритет китайской патентной заявки (CN202111592539.7), поданной 23 декабря 2021 г.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

10 Настоящее раскрытие относится к антителу против DLL3, его конъюгату с лекарственным средством и к способу его получения. Также антитело против DLL3 или его ADC (конъюгат антитело-лекарственное средство), описанные в настоящем раскрытии, можно использовать в препарате лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства.

15

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Изложение в данном документе просто предоставляет базовую информацию, относящуюся к настоящему раскрытию, и не обязательно составляет
20 предшествующий уровень техники.

Мелкоклеточный рак легкого (SCLC) представляет собой относительно злокачественный тип рака легкого, на долю которого приходится 10%-15% всех случаев рака легкого. Опухоли мелкоклеточного рака легкого быстро растут и легко метастазируют, с пятилетней выживаемостью меньше 7%. Для лечения
25 мелкоклеточного рака легкого часто используют комбинированную химиотерапию платиной/этопозидом. Пациенты с мелкоклеточным раком легкого исходно хорошо отвечают на химиотерапию, но с очень большой вероятностью у них развиваются резистентность и рецидив. В последние годы иммунотерапевтические средства, такие как антитела против PD-L1 (лиганд 1 программируемой гибели клеток) и
30 антитела против PD1 продемонстрировали некоторую эффективность у пациентов с мелкоклеточным раком легкого, с показателем эффективности примерно 15%. До сих пор нет лекарственных средств специфичной таргетной терапии, разработанных для данного заболевания.

DLL3 представляет собой лиганд, который ингибирует Notch. При
35 нормальных условиях DLL3 локализуется в аппарате Гольджи, но в раковых клетках (таких как клетки мелкоклеточного рака легкого) DLL3 может перемещаться

на поверхность клетки и связываться с Notch цис способом, затрудняя связывание клетки с клеткой и эндоцитоз Notch в клетках-мишенях, посредством этого ингибируя путь сигнализации Notch и стимулирую рост опухолевых клеток. DLL3, главным образом, экспрессируется в опухолях нервов или нейроэндокринных
5 опухолях, включая SCLC, крупноклеточный нейроэндокринный рак, желудочно-кишечные нейроэндокринные опухоли, мелкоклеточный рак мочевого пузыря, мультиформную глиобластому, метастатический кастрационный рак простаты, меланому и тому подобное. В частности, свыше 80% случаев SCLC включают позитивную экспрессию DLL3, тогда как он не экспрессируется в нормальной
10 легочной ткани или околораковой ткани. Эта дифференциальная экспрессия делает DLL3 высокопотенциальной терапевтической мишенью для лечения SCLC.

Производные эктеинасцидина, такие как лурбинэктедин, представляют собой ингибиторы РНК-полимеразы II, которые ковалентно связываются с малой бороздкой двойных спиралей ЛНК, селективно ингибируя процесс транскрипции,
15 опосредованный РНК-полимеразой II, активированной транс способом, одновременно не влияя ни на активность РНК-полимеразы I, ни на активность митохондриальной РНК-полимеразы, ни на нормальный процесс транскрипции мРНК. РНК-полимераза II часто сверхактивируется в процессе транскрипции опухолевых клеток. Лурбинэктедин может вызывать ненормальность и апоптоз в
20 процессе митоза опухолевых клеток, в конечном счете уменьшая пролиферацию клеток. Опухолевые клетки полагаются на быстрый процесс транскрипции для пролиферации. Данные опухолевые клетки являются особенно чувствительными к лурбинэктедину, и они включают клетки SCLC, рака молочной железы с мутацией BRCA1/2, рака яичника, устойчивого к платине, сарком, вызванных хромосомными
25 транслокациями, и тому подобных.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) образуются связыванием моноклональных антител или фрагментов антител с биологически активными лекарственными средствами посредством линкеров. Они полностью объединяют специфичность антител при связывании с антигенами на
30 поверхностях нормальных клеток и опухолевых клеток, и высокую эффективность лекарственных средств (таких как цитотоксические средства), одновременно избегая таких недостатков, как низкая эффективность антител и серьезные токсические и побочные эффекты лекарственных средств. Конъюгаты антитело-лекарственное средство могут умерщвлять опухолевые клетки более точно и
35 имеют меньшее влияние на нормальные клетки, чем традиционные химиотерапевтические лекарственные средства.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее раскрытие относится к антителу против DLL3, его ADC и его
5 фармацевтическому применению. Более конкретно, согласно настоящему
раскрытию предложен целый ряд антител против DLL3 с совершенно новыми
последовательностями, а также их ADC, образованных конъюгированием с
цитотоксическими веществами (например, производными эктеинасцидина).

В некоторых воплощениях согласно настоящему раскрытию предложено
10 антитело против DLL3, содержащее переменную область тяжелой цепи и
переменную область легкой цепи, где:

i) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую
15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, где SEQ ID NO: 57
20 представлена PLYX₁YGRSYNX₂VAY, где X₁ представляет собой Y или H; X₂
представляет собой A или G; или

ii) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; HCDR2, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и HCDR3, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и
25

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; LCDR2, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и LCDR3, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

30 В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3:

переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, 30 или 31; и

35 переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3:

5 вариабельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и

10 вариабельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3:

15 вариабельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и

20 вариабельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3:

25 вариабельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и

30 вариабельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3:

35 i) вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 57, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, соответственно;

где SEQ ID NO: 57 представлена $PLYX_1YGRSYNX_2VAY$, где X_1 представляет собой Y или H; X_2 представляет собой A или G; или

ii) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, описанные в SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, описанные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21, соответственно. В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 представляет собой мышечное антитело, химерное антитело или гуманизованное антитело. В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 предпочтительно представляет собой гуманизованное антитело.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит каркасные области человеческого иммуноглобулина (FR).

В одном воплощении в вышеупомянутом антителе против DLL3:

переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; где SEQ ID NO: 57 представлена PLYX₁YGRSYNX₂VAY, где X₁ представляет собой Y или H; X₂ представляет собой A или G; и FR переменной области тяжелой цепи содержит одну или более чем одну обратную мутацию, выбранную из группы, состоящей из 1E, 49A и 94S; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и FR переменной области легкой цепи содержит обратную мутацию 43I; причем описанные выше сайты обратных мутаций указаны согласно схеме нумерации Kabat.

В одном воплощении антитело против DLL3 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и FR переменной области тяжелой цепи содержит одну или более чем одну обратную мутацию, выбранную из группы, состоящей из 1E, 27Y, 30T, 38K, 43K, 48I, 67A, 68A, 69L, 71V, 73K, 75S, 76N и 93A; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; LCDR2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и FR варибельной области легкой цепи содержит одну или более чем одну обратную мутацию, выбранную из группы, состоящей из 36L, 43S, 44F, 46G, 69A, 71Y и 85D. Описанные выше сайты обратных мутаций указаны согласно схеме нумерации Kabat.

В одном воплощении антитело против DLL3 содержит варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, где:

варибельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и FR варибельной области тяжелой цепи содержит обратные мутации 1E, 68A, 69L, 71V, 73K, 75S и 76N; и

варибельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и FR варибельной области легкой цепи содержит обратные мутации 36L, 46G, 69A, 71Y и 85D, и описанные выше сайты обратных мутаций указаны согласно схеме нумерации Kabat.

В одном конкретном воплощении антитело против DLL3 содержит варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, где:

варибельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и FR варибельной области тяжелой цепи содержит обратные мутации 1E и 94S; и

варибельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и описанные выше сайты обратных мутаций указаны согласно схеме нумерации Kabat.

В одном воплощении антитело против DLL3 содержит варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, где:

варибельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, 30 или 31; и FR

вариабельной области тяжелой цепи содержат одну или более чем одну обратную мутацию, выбранную из группы, состоящей из 1E, 49A и 94S; и

5 вариабельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и FR вариабельной области легкой цепи содержит обратную мутацию 43I. Описанные выше сайты обратных мутаций указаны согласно схеме нумерации Kabat.

10 В одном воплощении антитело против DLL3 содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

15 вариабельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и FR вариабельной области тяжелой цепи содержат одну или более чем одну обратную мутацию, выбранную из группы, состоящей из 1E, 49A и 94S; и

20 вариабельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и FR вариабельной области легкой цепи содержит обратную мутацию 43I. Описанные выше сайты обратных мутаций указаны согласно схеме нумерации Kabat.

25 В одном воплощении антитело против DLL3 содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

30 вариабельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и FR вариабельной области тяжелой цепи содержат одну или более чем одну обратную мутацию, выбранную из группы, состоящей из 1E, 49A и 94S; и

35 вариабельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и FR вариабельной области легкой цепи содержат обратную мутацию 43I. Описанные выше сайты обратных мутаций указаны согласно схеме нумерации Kabat.

В одном воплощении антитело против DLL3 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и FR переменной области тяжелой цепи содержат одну или более чем одну обратную мутацию, выбранную из группы, состоящей из 1E, 49A и 94S; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и FR переменной области легкой цепи содержат обратную мутацию 43I. Описанные выше сайты обратных мутаций указаны согласно схеме нумерации Kabat.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3:

i) переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 14, 50, 51, 52, 53 или 54; и/или

переменная область легкой цепи содержит переменную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 15, 55 или 56; или

ii) переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 12, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, или 44; и/или

переменная область легкой цепи содержит переменную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 13, 45, 46, 47, 48 или 49.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3:

i) переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 14; и/или

вариабельная область легкой цепи содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 15; или

5 ii) вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53 или 54; и/или

10 вариабельная область легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 55 или 56; или

15 iii) вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 12; и/или

вариабельная область легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 13; или

20 iv) вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44; и/или

25 вариабельная область легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48 или 49.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3:

30 i) вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 50; и/или

35 вариабельная область легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 55; или

ii) вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 43; и/или

5 вариабельная область легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 48.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3:

10 i) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и/или вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; или

15 ii) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53 и 54, и/или вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 или 56; или

 iii) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и/или вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; или

20 iv) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 43, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 и 44, и/или вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 48, 45, 46, 47 и 49.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3:

25 вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

30 вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 представляет собой фрагмент антитела, где данный фрагмент антитела представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, Fd, Fv, scFv, dsFv, диатело или доменное антитело.

35 В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит константную область легкой цепи и константную область тяжелой цепи.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит константную область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит константную область цепи λ или цепи κ .

5 В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит константную область тяжелой цепи IgG1 и константную область легкой цепи цепи κ .

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3 константная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 28,
10 и/или константная область легкой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 29.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где:

данная тяжелая цепь содержит последовательность, имеющую по меньшей
15 мере 85%-ную, 86%-ную, 87%-ную, 88%-ную, 89%-ную, 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 60, и/или данная легкая цепь содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%-ную, 86%-ную, 87%-ную, 88%-ную, 89%-ную, 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную,
20 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 61; или

данная тяжелая цепь содержит последовательность, имеющую по меньшей
мере 85%-ную, 86%-ную, 87%-ную, 88%-ную, 89%-ную, 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 58, и/или данная легкая цепь содержит
25 последовательность, имеющую по меньшей мере 85%-ную, 86%-ную, 87%-ную, 88%-ную, 89%-ную, 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную или 99%-ную идентичность с SEQ ID NO: 59.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом антителе против DLL3 тяжелая цепь содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 60, и/или
30 легкая цепь содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 61; или

тяжелая цепь содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 58, и/или легкая цепь содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 59.

В другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложено выделенное антитело против DLL3, которое конкурирует за связывание с DLL3 или его
35 эпитопом с антителом согласно любому из приведенного выше.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

5 а) антитело против DLL3, связывающееся с человеческим DLL3 или его эпитопом со значением KD, меньшим или равным 3 нМ, меньшим или равным 2 нМ, меньшим или равным 1 нМ, меньшим или равным 0,9 нМ, меньшим или равным 0,8 нМ, меньшим или равным 0,7 нМ, меньшим или равным 0,6 нМ, меньшим или равным 0,5 нМ или меньшим или равным 0,4 нМ при определении посредством Biacore;

10 б) антитело против DLL3, связывающееся с клетками H1184, экспрессирующими DLL3, с EC50 (полумаксимальная эффективная концентрация), меньшей или равной 3 нМ, EC50, меньшей или равной 2 нМ, EC50, меньшей или равной 1 нМ, EC50, меньшей или равной 0,5 нМ, EC50, меньшей или равной 0,2 нМ, EC50, меньшей или равной 0,1 нМ, EC50, меньшей или равной 0,09 нМ, EC50, меньшей или равной 0,08 нМ, EC50, меньшей или равной 0,07 нМ, EC50, меньшей или равной 0,06 нМ при определении посредством FACS (флуоресцентная сортировка клеток); и

15 в) антитело против DLL3, способное к эндоцитозу клеткой, экспрессирующей DLL3; и

20 д) антитело против DLL3, связывающееся с DLL3 или его эпитопом с EC50, меньшей или равной 0,1 нМ (меньшей или равной 0,09 нМ, меньшей или равной 0,08 нМ, меньшей или равной 0,07 нМ, меньшей или равной 0,06 нМ, меньшей или равной 0,05 нМ или меньшей или равной 0,04 нМ) при определении посредством ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ); и

25 е) антитело против DLL3, распознающее другой эпитоп DLL3, чем распознает позитивное антитело (например, BI-764532).

В другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против DLL3 согласно любому из приведенного выше.

30 В другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложен вектор, содержащий вышеупомянутую выделенную нуклеиновую кислоту.

В еще одном другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложена клетка-хозяин, содержащая вышеупомянутый вектор, или экспрессирующая антитело против DLL3 согласно любому из приведенного выше.

35 В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложен способ получения антитела, которое связывается с DLL3, включающий культивирование

вышеупомянутой клетки-хозяина при подходящих условиях для экспрессии данного антитела.

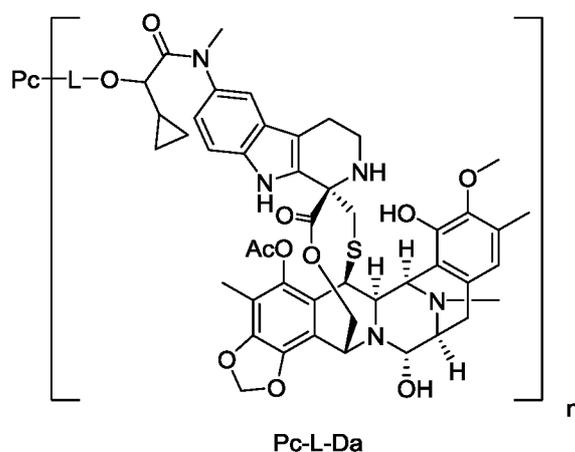
В еще одном другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложен конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль, содержащий антитело против DLL3 согласно любому из приведенного выше.

В еще одном другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложен конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль, содержащий антитело против DLL3 согласно любому из приведенного выше и лекарственное средство, где указанное лекарственное средство конъюгировано с антителом против DLL3.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом конъюгате антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из одного или более чем одного из цитоксического средства, радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, агента для визуализации, иммуномодулятора, ингибитора ангиогенеза, ингибитора пролиферации клеток, проапоптозного средства и литического фермента.

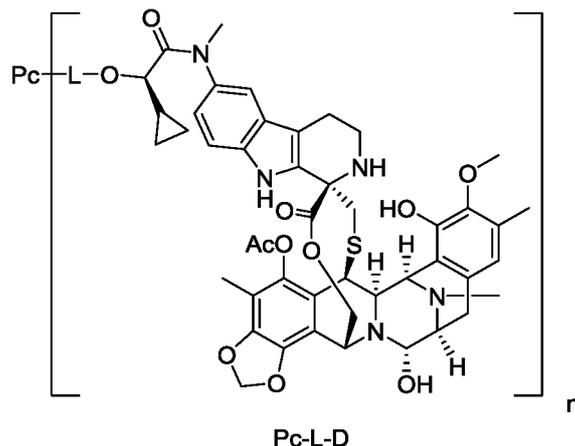
В некоторых воплощениях указанное лекарственное средство представляет собой эктеинасцидин Et-743 (трабектедин) или его производное. В некоторых воплощениях указанное лекарственное средство представляет собой производное эктеинасцидина, такое как лурбинэктедин.

В некоторых воплощениях вышеупомянутый конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль имеет структуру, представленную общей формулой (Pc-L-Da):



где: Pc представляет собой антитело против DLL3 согласно любому из вышеупомянутого; L представляет собой линкер; n равно от 1 до 10 (включая целые числа и десятичные дроби); предпочтительно n равно от 3 до 5.

В некоторых воплощениях вышеупомянутый конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, представленный общей формулой (Pc-L-D), или его фармацевтически приемлемую соль:



где: Pc представляет собой антитело против DLL3 по любому из вышеупомянутого; L представляет собой линкер; n равно от 1 до 10; предпочтительно n равно от 3 до 5.

В некоторых воплощениях в вышеупомянутом конъюгате антитело-лекарственное средство, представленном общей формулой (Pc-L-Da) или (Pc-L-D), или его фармацевтически приемлемой соли n представляет собой среднее число группировок лекарственного средства на антитело, которое может представлять собой целое число или десятичную дробь. В некоторых воплощениях n представляет собой среднее 1-10 или 1-9, или 2-10, или 2-9, или 1-8, или 2-8, или 2-7, или 2-4, или 1-4, или 1-3, или 3-8, или 3-7, или 3-6, или 3-5, или 4-7, или 4-6, или 4-5; в некоторых воплощениях n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В некоторых воплощениях в конъюгате антитело-лекарственное средство, представленном общей формулой (Pc-L-Da) или (Pc-L-D), или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из приведенного выше линкер -L- представляет собой $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, где:

L^1 выбран из группы, состоящей из -(сукцинимид-3-ил-N)-W-C(O)-, $-CH_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-$ и $-C(O)-W-C(O)-$, где W выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена и C_{1-6} алкилен- C_{3-6} циклоалкила, где C_{1-6} алкилен и C_{1-6} алкилен- C_{3-6} циклоалкил каждый независимо возможно дополнительно замещен одним или более чем

одним заместителем, выбранным из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амина, алкила, хлоралкила, дейтерированного алкила, алкокси и циклоалкила;

L^2 выбран из группы, состоящей из $-NR^4(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2C(O)-$, $-NR^4(CH_2CH_2O)_pCH_2C(O)-$, $-S(CH_2)_pC(O)-$ и химической связи, где p представляет собой целое число от 1 до 20;

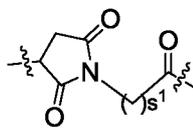
L^3 представляет собой пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислотных остатков, где данные аминокислоты выбраны из группы, состоящей из фенилаланина (F), глицина (G), валина (V), лизина (K), цитруллин, серина (S), глутаминовой кислоты (E) и аспарагиновой кислоты (D), и возможно дополнительно замещены одним или более чем одним заместителем, выбранным из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амина, алкила, хлоралкила, дейтерированного алкила, алкокси и циклоалкила;

L^4 выбран из группы, состоящей из $-NR^5(CR^6R^7)_t-$, $-C(O)NR^5-$, $-C(O)NR^5(CH_2)_t-$ и химической связи, где t представляет собой целое число от 1 до 6;

R^3 , R^4 и R^5 являются одинаковыми или разными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксилалкила;

R^6 и R^7 являются одинаковыми или разными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, галогена, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксилалкила.

В некоторых воплощениях в конъюгате антитело-лекарственное средство, представленном общей формулой (Pc-L-Da) или (Pc-L-D), или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из приведенного выше линкер $-L-$ представляет собой $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, где:



L^1 представляет собой $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, и s^1 представляет собой целое число от 2 до 8, включающее 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, но не ограничивающееся ими;

L^2 представляет собой химическую связь;

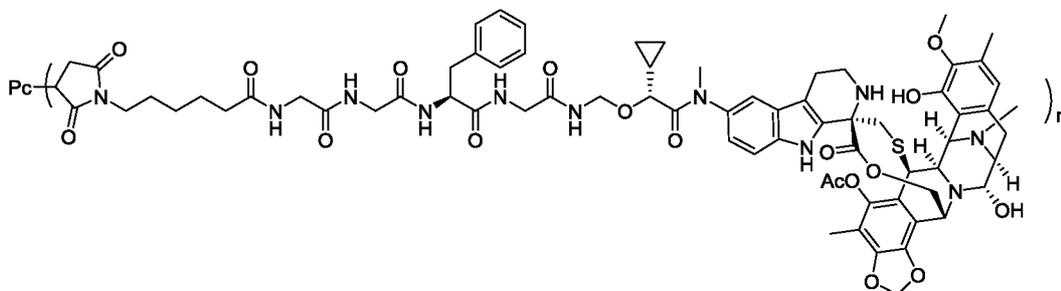
L^3 представляет собой тетрапептидный остаток; предпочтительно L^3 представляет собой тетрапептидный остаток, содержащий глицин-глицин-фенилаланин-глицин;

L^4 представляет собой $-NH(CH_2)_t-$, и t представляет собой 1 или 2;

где конец L^1 соединен с Pc.

В некоторых воплощениях в конъюгате антитело-лекарственное средство, представленном общей формулой (Pc-L-Da) или (Pc-L-D), или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из приведенного выше указанный конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую

5 структуру:



в которой:

n равно от 1 до 10;

Pc представляет собой антитело против DLL3 согласно любому из

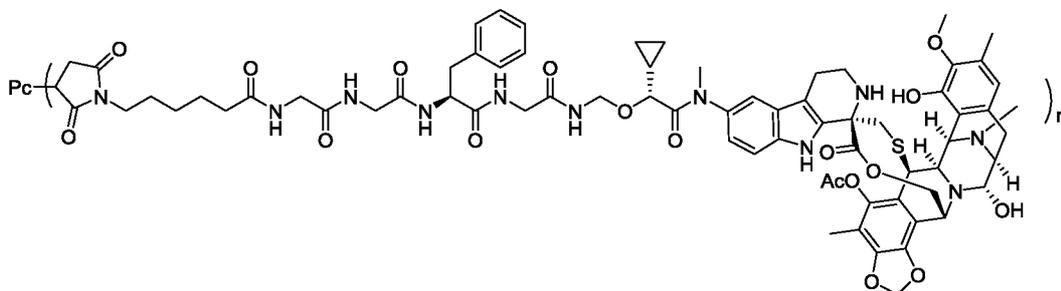
10 следующих; предпочтительно Pc представляет собой антитело против DLL3, содержащее:

тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 60, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 61; или

15 тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 58, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 59.

В некоторых воплощениях в конъюгате антитело-лекарственное средство, представленном общей формулой (Pc-L-Da) или (Pc-L-D), или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из приведенного выше указанный конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую

20 структуру:



в которой:

Pc представляет собой антитело против DLL3 согласно любому из

25 приведенного выше; предпочтительно Pc представляет собой антитело против DLL3, содержащее:

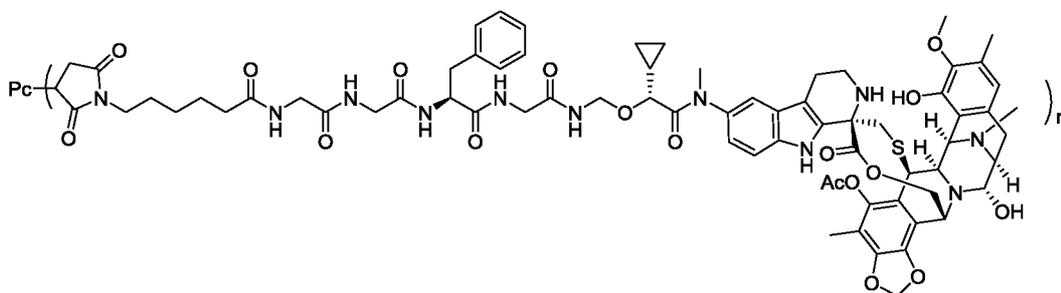
тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 60, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 61; или

тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 58, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 59;

5 n равно от 1 до 8.

В некоторых воплощениях в конъюгате антитело-лекарственное средство, представленном общей формулой (Pc-L-Da) или (Pc-L-D), или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из приведенного выше указанного конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую

10 структуру:



в которой:

15 Pc представляет собой антитело против DLL3 согласно любому из приведенного выше; предпочтительно Pc представляет собой антитело против DLL3, содержащее:

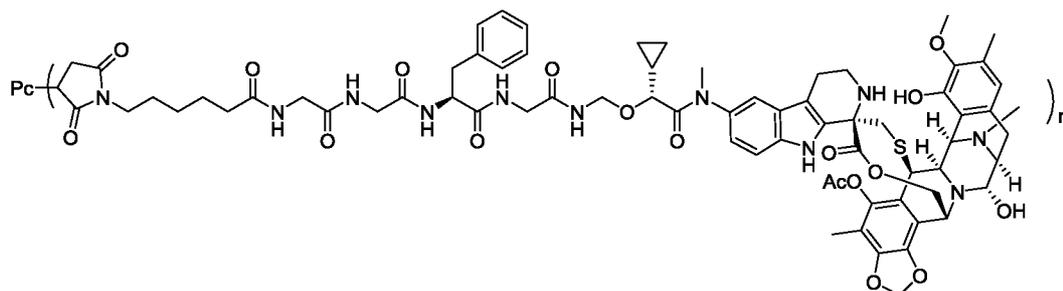
тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 60, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 61; или

20 тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 58, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 59;

n равно от 3 до 5.

В некоторых воплощениях в конъюгате антитело-лекарственное средство, представленном общей формулой (Pc-L-Da) или (Pc-L-D), или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из приведенного выше

25 указанный конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру:



в которой:

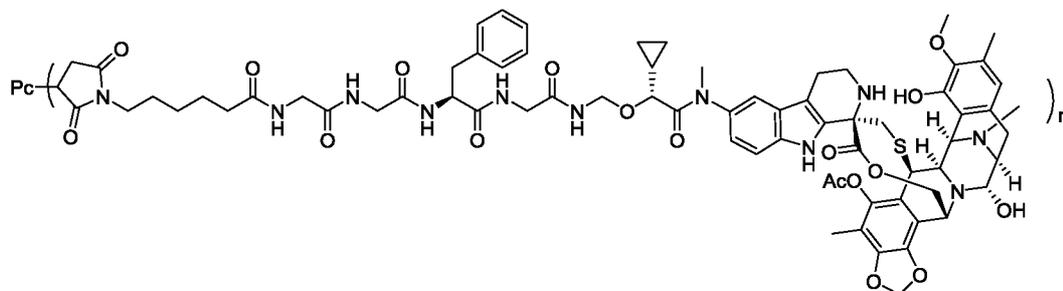
Pc представляет собой антитело против DLL3 согласно любому из приведенного выше; предпочтительно Pc представляет собой антитело против DLL3, содержащее:

тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 60, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 61; или

тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 58, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 59;

n равно от 3,73 до 4,27.

В некоторых воплощениях в конъюгате антитело-лекарственное средство, представленном общей формулой (Pc-L-Da) или (Pc-L-D), или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из приведенного выше указанный конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру:



в которой:

Pc представляет собой антитело против DLL3 согласно любому из приведенного выше; предпочтительно Pc представляет собой антитело против DLL3, содержащее:

тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 60, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 61; или

тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 58, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 59;

n равно от 3,72 до 4,88.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий восстановление антитела против DLL3 согласно любому из приведенного выше и проведение реакции конъюгирования с соединением, представленным формулой (L-D) или (L-Da), с получением конъюгата антитело-лекарственное средство согласно настоящему раскрытию.

В другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против DLL3 согласно любому из приведенного выше, конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемую соль согласно любому из приведенного выше и один или более чем один фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель. В некоторых воплощениях единичная доза фармацевтической композиции содержит 0,1-3000 мг или 1-1000 мг вышеупомянутого антитела против DLL3 или вышеупомянутого конъюгата антитело-лекарственное средство.

В другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложено применение антитела против DLL3 согласно любому из приведенного выше или конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из приведенного выше, или содержащей их фармацевтической композиции в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложено применение антитела против DLL3 согласно любому из приведенного выше или конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из приведенного выше, или вышеупомянутой фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для лечения опосредованного DLL3 заболевания или расстройства. В некоторых воплощениях указанное опосредованное DLL3 заболевание или расстройство представляет собой опухоль или рак. В некоторых воплощениях указанное опосредованное DLL3 заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство, экспрессирующее DLL3.

В другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложено применение антитела против DLL3 согласно любому из приведенного выше или конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из приведенного выше, или вышеупомянутой фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для лечения или предупреждения опухоли или рака; предпочтительно данные опухоль или рак выбраны из группы, состоящей из следующих:

рак легкого (например, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого и крупноклеточный рак легкого), плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак головы и шеи, рак мозга, нейроглиома, мультиформная глиобластома, нейробластома, рак центральной нервной системы, нейроэндокринная опухоль, 5 рак глотки, плоскоклеточная карцинома глотки, плоскоклеточная карцинома полости рта, рак носоглотки, рак пищевода, рак щитовидной железы (например, медуллярный рак щитовидной железы), злокачественная плевральная мезотелиома, рак молочной железы (например, тройной негативный рак молочной железы), рак печени, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, рак 10 желудка, желудочно-кишечный рак, рак кишечника, колоректальный рак (например, рак толстой кишки и рак прямой кишки), рак почки, светло-клеточный почечно-клеточный рак, рак яичника, рак эндометрия, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак простаты, рак яичка, рак надпочечника, глиобластома, рак кожи и меланома; более предпочтительно данная опухоль или рак представляет собой 15 мелкоклеточный рак легкого.

Более предпочтительно данная опухоль или рак представляет собой опухоль или рак, при которых экспрессируется DLL3.

В другом аспекте настоящее раскрытие дополнительно относится к способу 20 лечения и/или предупреждения опухоли или рака, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной дозы антитела против DLL3 согласно любому из приведенного выше или конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли согласно 25 любому из приведенного выше, или вышеупомянутой фармацевтической композиции; предпочтительно данная опухоль или рак представляет собой опухоль или рак, при которых экспрессируется DLL3.

В другом аспекте настоящее раскрытие дополнительно относится к способу 30 лечения или предупреждения опухоли или рака, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной дозы антитела против DLL3 согласно любому из приведенного выше, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из 35 приведенного выше, или вышеупомянутой фармацевтической композиции, где данная опухоль или рак выбраны из группы, состоящей из следующих:

рак легкого (например, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого и крупноклеточный рак легкого), плоскоклеточная карцинома головы и шеи, 35 рак головы и шеи, рак мозга, нейроглиома, мультиформная глиобластома, нейробластома, рак центральной нервной системы, нейроэндокринная опухоль,

рак глотки, плоскоклеточная карцинома глотки, плоскоклеточная карцинома полости рта, рак носоглотки, рак пищевода, рак щитовидной железы (например, медуллярный рак щитовидной железы), злокачественная плевральная мезотелиома, рак молочной железы (например, тройной негативный рак молочной железы), рак печени, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, желудочно-кишечный рак, рак кишечника, колоректальный рак (например, рак толстой кишки и рак прямой кишки), рак почки, светло-клеточный почечно-клеточный рак, рак яичника, рак эндометрия, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак простаты, рак яичка, рак надпочечника, глиобластома, рак кожи и меланома; предпочтительно данная опухоль или рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого.

В другом аспекте согласно настоящему раскрытию дополнительно предложено вышеупомянутое антитело против DLL3 или вышеупомянутый конъюгат антитело-лекарственное средство в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве лекарственного средства для лечения рака или опухоли и более предпочтительно в качестве лекарственного средства для лечения рака или опухоли, экспрессирующей DLL3.

Антитело против DLL3 и конъюгат антитело-лекарственное средство, предложенные по настоящему раскрытию, имеют хорошую аффинность в отношении антигена клеточной поверхности, могут подвергаться эффективному эндоцитозу клеткой, экспрессирующей DLL3, имеют очень сильный эффект ингибирования роста опухоли и имеют хорошую безопасность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1А – ФИГ. 1С показано связывание антител Hu6 и Hu100 с DLL3 разных видов. На ФИГ. 1А показаны результаты FACS (флуоресцентная сортировка клеток) для связывания антител Hu6 и Hu100 с клетками H1184; на ФИГ. 1В показаны результаты FACS для связывания антител Hu6 и Hu100 с клетками супоDLL3/CHO-s; на ФИГ. 1С показаны результаты FACS для связывания антител Hu6 и Hu100 с клетками ratDLL3/CHO-s.

На ФИГ. 2 показаны экспериментальные результаты для конкурентного связывания разных антител против DLL3. Данные результаты показывают то, что Hu6 и Hu100 не конкурируют с BI-764532, указывая на то, что антитела Hu6 и Hu100 связываются с другими эпитопами, чем BI-764532.

На ФИГ. 3 показаны результаты для эндоцитоза антител Hu6 и Hu100 клетками; данные результаты показывают то, что и Hu6, и Hu100 могут эндоцитироваться клетками.

5 На ФИГ. 4А – ФИГ. 4Е показаны ингибирующие рост эффекты ADC-1 и ADC-2 на разных клетках. На ФИГ. 4А показаны результаты для ингибирования роста клеток DMS53, которые на низком уровне экспрессируют DLL3, посредством ADC-1 и ADC-2; на ФИГ. 4В показаны результаты для ингибирования роста клеток H1184, которые на высоком уровне экспрессируют DLL3, посредством ADC-1 и ADC-2; на
10 ФИГ. 4С показаны результаты для ингибирования роста клеток HT-29, которые не экспрессируют DLL3, посредством ADC-1 и ADC-2; на ФИГ. 4D показаны результаты для ингибирования роста клеток U-2OS, которые не экспрессируют DLL3, посредством ADC-1 и ADC-2; на ФИГ. 4Е показаны результаты для ингибирования роста клеток CHO-K1, которые не экспрессируют DLL3, посредством ADC-1 и ADC-2.

15 На Фиг. 5 показаны не вовлеченные в процесс цитотоксические эффекты ADC-1 и ADC-2.

На Фиг. 6 показаны результаты для ингибирования роста подкожных ксенотрансплантатных опухолей из клеток DMS53 у мышей посредством ADC-1 и ADC-2.

20 На Фиг. 7 показаны результаты для ингибирования роста подкожных ксенотрансплантатных опухолей из клеток H1184 у мышей посредством ADC-1 и ADC-2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

25

I. Терминология

Для облегчения понимания настоящего раскрытия некоторые технические и научные термины описываются ниже. Если в данном документе конкретно не определено иначе, все используемые в данном документе технические и научные
30 термины имеют такое же значение, которое обычно понятно обычным специалистам в данной области.

Если не утверждается иное, термины, используемые в описании и формуле изобретения, имеют следующие значения.

35 Формы единственного числа, используемые в описании и формуле изобретения, включают ссылку на множественное, если контекст явно не диктует иное.

Если контекст явно не диктует иное, во всем данном описании и формуле изобретения слова «содержать», «иметь», «включать» и тому подобные следует истолковывать во включительном смысле, в отличие от исключительного или избыточного смысла.

5 Подразумевается то, что термин «и/или» включает два значения: «и» и «или». Например, подразумевается то, что фраза «А, В и/или С» охватывает
каждое из следующего: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В;
10 В и С; А (один); В (один) и С (один). При использовании в настоящем раскрытии
торгового наименования, подразумевается то, что оно включает препарат
имеющегося в продаже продукта под торговым наименованием и лекарственное
средство, и активный компонент лекарственного средства под торговым
наименованием.

Трехбуквенный и однобуквенный коды, используемые для аминокислот в
настоящем раскрытии, являются такими, как описано в J. Biol. Chem. 243, p3558
15 (1968).

Термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе и
синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и имитациям
аминокислот, которые функционируют аналогичным образом по отношению к
встречающимся в природе аминокислотам. Встречающимися в природе
20 аминокислотами являются аминокислоты, кодируемые генетическими кодами, и те
аминокислоты, которые позднее модифицируются, например, гидроксипролин, γ -
карбоксиглутаминовая кислота и О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к
соединениям, которые имеют по существу идентичную химическую структуру (т.е.
 α углерод, который связывается с водородом, карбоксилем, амино и R группой)
25 относительно встречающимся в природе аминокислотам, например, гомосерину,
норлейцину, метионина сульфоксиду и метионинметилсульфонию. Такие аналоги
имеют модифицированную R группу (например, норлейцин) или
модифицированный пептидный скелет, но сохраняют по существу идентичную
химическую структуру относительно встречающихся в природе аминокислот.
30 Имитации аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют
отличную структуру от аминокислот, но функционируют аналогичным образом с
встречающимися в природе аминокислотами.

Термин «мутация аминокислоты» включает замены аминокислот (также
известные как аминокислотные замены), делеции, вставки и модификации. Для
35 получения конечной конструкции можно делать любую комбинацию замен,
делеций, вставок и модификаций, при условии, что данная конечная конструкция

обладает желательными свойствами, такими как пониженное связывание с рецептором Fc. Делеции и вставки аминокислотной последовательности включают делеции и вставки на аминоконце и/или карбоксильном конце полипептидной цепи. Конкретными мутациями аминокислот могут быть замены аминокислот. В одном
5 воплощении мутация аминокислоты представляет собой неконсервативную замену аминокислоты, т.е. замену одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей другие структурные и/или химические свойства. Замены аминокислот включают замену аминокислотами, не встречающимися в природе, или производными 20 природных аминокислот (например, 4-гидроксипролин, 3-метилгистидин, орнитин, гомосерин и 5-гидроксилизин). Мутации аминокислот могут быть получены с
10 использованием генетических или химических способов, хорошо известных в данной области. Генетические способы могут включать сайт-направленный мутагенез, ПЦР, синтез генов и тому подобные. Рассматривается то, что для изменения групп боковых цепей аминокислот также можно использовать другие
15 способы, чем генная инженерия, такие как химическая модификация. В данном документе можно использовать разные названия для указания той же самой мутации аминокислоты. В данном документе выражение «положение плюс аминокислотный остаток» можно использовать для обозначения аминокислотного остатка в конкретном положении. Например, 366W указывает то, что
20 аминокислотным остатком в положении 366 является W. T366W указывает то, что исходный аминокислотный остаток T в положении 366 заменяется W.

Термин «антитело» используется в самом широком смысле и охватывает целый ряд структур антитела, включая моноклональные антитела, поликлональные антитела; моноспецифичные антитела, мультиспецифичные
25 антитела (например, биспецифичные антитела), полноразмерные антитела и фрагменты антител (или антигенсвязывающие фрагменты, или антигенсвязывающие группировки), но не ограничиваются ими, при условии, что они демонстрируют желательную антигенсвязывающую активность. Интактное антитело типично содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи. От N-конца до C-
30 конца каждая тяжелая цепь имеет одну переменную область (VH), также известную как переменный тяжелый домен или переменная область тяжелой цепи, с последующими тремя константными доменами (CH1, CH2 и CH3). Аналогичным образом, от N-конца до C-конца каждая легкая цепь имеет одну переменную область (VL), также известную как переменный легкий домен или
35 переменная область легкой цепи, с последующим одним константным легким доменом (константная область легкой цепи, CL).

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «полное антитело» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к антителу, которое имеет по существу аналогичную структуру со структурой природного антитела или со структурой, в которой тяжелая цепь имеет область Fc.

5 В природном интактном антителе легкая цепь содержит переменную область легкой цепи VL и константную область CL, где VL располагается на аминоконце легкой цепи, и константная область легкой цепи содержит цепь κ и цепь λ ; тяжелая цепь содержит переменную область VH и константную область (CH1, CH2 и CH3), где VH располагается на аминоконце тяжелой цепи, и константная область

10 располагается на карбоксильном конце, где CH3 является ближайшей к карбоксильному концу, и тяжелая цепь может быть любого изотипа, включая IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Термин «переменная область» или «переменный домен» антитела

15 относится к домену в тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Здесь каждая из переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL) антитела содержит четыре консервативные константные области (FR) и три области, определяющие комплементарность (CDR). Термин «область, определяющая комплементарность»

20 или «CDR» относится к области в переменном домене, которая, главным образом, способствует связыванию антигена; «каркас» или «FR» относится к остаткам переменной области, отличным от остатков CDR. VH содержит 3 CDR: HCDR1, HCDR2 и HCDR3; VL содержит 3 CDR: LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Каждый из VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, организованных от аминоконца (также

25 известного как N-конец) до карбоксильного конца (также известного как C-конец) в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Границы аминокислотных последовательностей CDR можно определять посредством целого ряда хорошо известных схем, например, схемой нумерации «Kabat» (см. Kabat et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th

30 ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), схемой нумерации «Chothia», схемой нумерации «ABM», «контактной» схемой нумерации (см. Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains [J]. 2001), схемой нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003); Front Immunol. 2018 Oct 16; 9: 2278) и тому

35 подобными. Соответствующие связи среди разных схем нумерации хорошо

известны специалистам в данной области и являются, например, такими, как показано в Таблице 1 ниже.

Таблица 1. Связи среди схем нумерации CDR

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Контактная
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

5 Если не определено иначе, схема нумерации Kabat применяется к переменным областям и последовательностям CDR в настоящем раскрытии.

Термин «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит группировку интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, однодоменные антитела, одноцепочечный Fab (scFab), диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

15 Термин «область Fc» или «область кристаллизуемого фрагмента» используется для определения C-концевой области тяжелой цепи антитела, включая природные области Fc и модифицированные области Fc. В некоторых воплощениях область Fc содержит две субъединицы, которые могут быть одинаковыми или разными. В некоторых воплощениях область Fc тяжелой цепи человеческого IgG определяется как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксильного конца. Подходящие области Fc, используемые для описанных в данном документе антител, включают области Fc человеческого IgG1, IgG2 (IgG2A и IgG2B), IgG3 и IgG4. В некоторых воплощениях границы области Fc также могут варьировать, например, посредством делеции C-концевого лизина области Fc (остаток 447 согласно схеме нумерации EU) или делеции C-концевых глицина и лизина области Fc (остатки 446 и 447 согласно схеме нумерации EU). Если не определено иначе, схема нумерации области Fc представляет собой схему нумерации EU, также известную как индекс EU.

30 Термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи в антителе происходит из конкретного источника или

вида, тогда как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из другого отличного источника или вида.

5 Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, которое сохраняет реакционную способность антитела, не являющегося человеческим, при наличии низкой иммуногенности у человека. Например, это может достигаться сохранением CDR, не являющихся человеческими, и заменой остальной части антитела его человеческими аналогами (т.е. константными областями и каркасной областью - частью переменных областей).

10 Термины «человеческое антитело», «антитело человеческого происхождения», «полностью человеческое антитело» и «полное человеческое антитело» используются взаимозаменяемо и относятся к антителам, в которых переменные и константные области представляют собой человеческие последовательности. Данный термин охватывает антитела, которые происходят от человеческих генов, но, например, имеют последовательности, в которых снижена
15 возможная иммуногенность, увеличена аффинность, устраняются цистеины или сайты гликозилирования, которые могут вызвать нежелательное сворачивание. Данный термин охватывает антитела, рекомбинантно продуцируемые в клетках, не являющихся человеческими (которые могут придавать нехарактерное для человеческих клеток гликозилирование). Данный термин также охватывает
20 антитела, которые культивировали у трансгенных мышей, содержащих локусы тяжелой и легкой цепи человеческого иммуноглобулина. Значение «человеческое антитело» конкретно исключает гуманизированные антитела, содержащие антигенсвязывающие остатки, не являющиеся человеческими.

25 Термин «аффинность» относится к общей силе нековалентного взаимодействия между одним связывающим сайтом молекулы (например, антитела) и ее связываемым лигандом (например, антигеном). Если не указано иное, «аффинность» связывания в том виде, как в данном документе используется данный термин, относится к внутреннему связыванию, которое отражает взаимодействие между членами пары связывания (например, антителом и
30 антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее лиганда Y обычно можно обозначать константой диссоциации (KD). Аффинность можно определять традиционными способами, известными в данной области, включая способы, описанные в данном документе.

35 Термин «kassoc» или «ка» в том виде, как он используется в данном документе, относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин «kdis» или «kd» относится к скорости

диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин «KD» относится к константе диссоциации, которую получают из отношения k_d к k_a (т.е. k_d/k_a) и обозначают молярной концентрацией (M). Значение KD антитела можно определять с использованием способов, хорошо известных в данной области.

5 Например, поверхностный плазмонный резонанс определяется с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore, или аффинность в растворе определяется равновесным титрованием раствора (SET).

Термин «эффекторная функция» относится к биологическим активностям, которые могут приписываться области Fc антитела (либо области Fc с природной
10 последовательностью, либо варианту аминокислотной последовательности области Fc) и могут варьировать с изотипом антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают следующие: связывание C1q и комплементзависимая цитотоксичность, связывание с рецептором Fc, антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, понижающая регуляция рецепторов
15 клеточной поверхности (например, рецепторов В-клеток) и активация В-клеток, но не ограничиваются ими.

Термин «моноклональное антитело» относится к популяции по существу гомогенных антител, то есть, аминокислотные последовательности молекул антител, содержащихся в данной популяции, являются идентичными, за
20 исключением маленького числа природных мутаций, которые могут существовать. В отличие от этого, препараты поликлональных антител обычно содержат целый ряд разных антител, имеющих разные аминокислотные последовательности в их переменных доменах, которые обычно являются специфичными в отношении разных эпитопов. Термин «моноклональное» не следует истолковывать как
25 требующее продукции антитела любым конкретным способом.

В некоторых воплощениях антитело, предложенное по настоящему раскрытию, представляет собой моноклональное антитело.

Термин «антиген» относится к молекуле или части молекулы, которая способна к связыванию таким селективно связывающим агентом, как
30 антигенсвязывающий белок (включающий, например, антитело). Антиген может иметь один или более чем один эпитоп, способный к взаимодействию с разными антигенсвязывающими белками (например, антителами).

Термин «эпитоп» относится к области или участку антигена, который способен к специфичному связыванию с антителом или его антигенсвязывающим
35 фрагментом. Эпитопы могут образоваться из непрерывных отрезков аминокислот (линейный эпитоп) или содержать несмежные аминокислоты (конформационный

эпитоп), например, приходящие в пространственную близость из-за сворачивания антигена (т.е. посредством третичного сворачивания). Различие между конформационным эпитопом и линейным эпитопом заключается в том, что в присутствии денатурирующих растворителей связывание антитела с конформационным эпитопом не может быть выявлено. Эпитоп содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Скрининг на антитела, которые связываются с конкретными эпитопами (т.е. антитела, которые связываются с идентичными эпитопами), можно проводить с использованием традиционных в данной области способов, включающих, например, аланиновое сканирование, пептидный блоттинг, анализ расщепления пептидов, вырезание эпитопа, выделение эпитопа, химическую модификацию антигена (см. Prot. Sci. 9 (2000) 487-496) и перекрестное блокирование, но не ограничивающихся ими.

Термины «антитело против DLL3» и «антитело, которое связывается с DLL3» относятся к антителу, которое способно к связыванию с DLL3 или с его эпитопом с достаточной аффинностью. В одном воплощении степень связывания антитела против DLL3 с неродственным белком составляет меньше, чем примерно 10% от связывания антитела с DLL3, которую можно измерять анализом поверхностного плазмонного резонанса BIACORE®.

Термин «способный к специфичному связыванию», «специфично связывающийся» или «связывание» означает то, что антитело способно к связыванию с определенным антигеном или его эпитопом с большей аффинностью, чем с другими антигенами или эпитопами. Обычно антитело связывается с антигеном или его эпитопом с равновесной константой диссоциации (KD) примерно 1×10^{-7} М или меньше (например, примерно 1×10^{-8} М или меньше). В некоторых воплощениях KD связывания антитела с антигеном составляет 10% или меньше (например, 1%) от KD связывания антитела с неспецифичным антигеном (например, BSA (бычий сывороточный альбумин) или казеин). KD может быть определена с использованием известных способов, например, анализа поверхностного плазмонного резонанса BIACORE®. Однако, антитело, которое специфично связывается с антигеном или его эпитопом, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, с соответствующими антигенами из других видов (гомологичных), таких как человек или обезьяны, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, суно), *Pan troglodytes* (шимпанзе, chimp) или *Callithrix jacchus* (обыкновенная игрунка, игрунка).

Термин «нуклеиновая кислота» используется в данном документе взаимозаменяемо с термином «полинуклеотид» и относится к дезоксирибонуклеотиду или рибонуклеотиду и его полимеру либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные остатки остова, или связи. Нуклеиновые кислоты являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, имеют аналогичные свойства связывания, как и эталонная нуклеиновая кислота, и метаболизируются аналогичным способом с эталонными нуклеотидами. Примеры таких аналогов включают фосфоротиоат, фосфороамидат, метилфосфонат, хиральный метилфосфонат, 2-О-метилрибонуклеотид и пептидную нуклеиновую кислоту (ПНК), но не ограничиваются ими. «Выделенная» нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонентов ее природного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая обычно содержит данную молекулу нуклеиновой кислоты, но данная молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в отличном положении от ее природного хромосомного положения. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид или слитый белок, относится к одной или более чем одной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид или слитый белок, включающей такую одну или более чем одну молекулу нуклеиновой кислоты в одном векторе или в отдельных векторах, и такая одна или более чем одна молекула нуклеиновой кислоты присутствует в одном или более чем одном положении в клетке-хозяине. Если не определено иначе, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены, связанные с вырожденностью кодонов) и комплементарные последовательности, а также прямо указанную последовательность. В частности, как подробно описано ниже, замены, связанные с вырожденностью кодонов, могут быть получены посредством получения последовательностей, в которых третье положение одного или более чем одного (или всех) выбранных кодонов заменено смешанными основаниями и/или остатками дезоксиинозина.

Термины «полипептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимеру из аминокислотных остатков, где один или более чем один аминокислотный остаток представляет собой искусственную химическую имитацию соответствующих встречающихся в природе аминокислот, а

также к полимерам встречающихся в природе аминокислот и полимерам не встречающихся в природе аминокислот. Если не определено иначе, конкретная полипептидная последовательность также неявно охватывает ее консервативно модифицированные варианты.

5 Термин «идентичность» последовательности относится к степени (процентной доле), с которой аминокислоты/нуклеиновые кислоты двух последовательностей являются идентичными в эквивалентных положениях; когда две последовательности являются оптимально выровненными, при необходимости, вводятся пробелы для достижения максимального процента
10 идентичности, и любая консервативная замена не видна как часть идентичности последовательности. Для определения процента идентичности последовательности можно осуществлять выравнивания посредством методик, известных специалистам в данной области, например, с использованием общедоступной компьютерной программы, такой как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут
15 определять подходящие параметры для измерения выравнивания, включающие любые алгоритмы, требующиеся для достижения максимального выравнивания полной длины выравниваемых последовательностей.

Термин «вектор» означает молекулу полинуклеотида, способную
20 транспортировать другой связанный с ней полинуклеотид. Одним типом вектора является «плазмида», которая относится к петле кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные отрезки ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, такой как вектор на основе аденоассетеллитного вируса (AAV или AAV2), в котором дополнительные отрезки ДНК могут быть
25 лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный репликатор, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в
30 клетку-хозяина и, посредством этого, реплицируются вместе с геномом хозяина. Термин «экспрессионный вектор» или «экспрессионная конструкция» относится к вектору, который может трансформировать клетку-хозяина и содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая управляет и/или контролирует экспрессию одной или более чем одной гетерологичной кодирующей области,
35 связанной с ней функциональным образом. Экспрессионные конструкции могут включать последовательности, которые влияют или контролируют транскрипцию и

трансляцию, и влияют на сплайсинг РНК кодирующей области, связанной с ними функциональным образом, в присутствии интрона, но не ограничиваются ими.

Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые были
5 введены экзогенные нуклеиновые кислоты, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформантов» и «трансформированные клетки», которые включают первичные трансформированные клетки и происходящее от них потомство, независимо от числа пассажей. Потомство может не быть точно таким же, как родительские клетки, в показателях содержания нуклеиновых кислот и
10 может содержать мутации. В данный документ включается мутантное потомство, которое имеет ту же самую функцию или биологическую активность, что и клетки, подвергнувшиеся скринингу или отобранные из исходно трансформированных клеток. Клетки-хозяева включают прокариотические и эукариотические клетки-хозяева, где эукариотические клетки-хозяева включают клетки млекопитающих,
15 линии клеток насекомых, растительные клетки и клетки грибов, но не ограничиваются ими. Типичные клетки-хозяева являются следующими: клетки яичника китайского хомяка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), человеческие клетки печеночно-клеточной карциномы (например, HepG2), клетки A549, клетки 3T3 и
20 клетки HEK-293, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* и *Trichoderma reesei*.

«Конъюгат антитело-лекарственное средство» (ADC) представляет собой конъюгат, полученный связыванием антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) с лекарственным средством непосредственно или посредством
25 линкера.

«Лекарственное средство (сокращается как D)» представляет собой любое вещество, имеющее биологическую или выявляемую активность (например, терапевтические средства, выявляемые метки и связывающие агенты), и пролекарства, которые метаболизируются до активного агента *in vivo*. Примеры
30 терапевтических средств включают цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, цитостатические средства и иммуномодуляторы. Химиотерапевтические средства представляют собой химические соединения, которые можно использовать для лечения рака. Репрезентативные терапевтические средства включают цитотоксины, цитотоксические средства и
35 цитостатические средства.

Цитотоксические эффекты относятся к удалению, устранению и/или умерщвлению клеток-мишеней. Цитотоксическое средство относится к средству, которое имеет цитотоксическое и/или цитостатическое влияние на клетку. Цитостатическое влияние относится к ингибированию пролиферации клеток.

5 Цитостатическое средство относится к средству, которое имеет цитостатическое влияние на клетку, ингибируя, посредством этого, рост и/или размножение конкретного поднабора клеток.

Дополнительные показательные терапевтические средства включают радиоактивные изотопы, химиотерапевтические средства, иммуномодуляторы, антиангиогенные средства, антипролиферативные средства, проапоптозные средства и литические ферменты (например, РНКазу). Данные относящиеся к

10 лекарственным средствам эпитеты не являются взаимоисключающими, и, таким образом, один или более чем один из приведенных выше терминов можно использовать для описания терапевтического средства. Например, выбранный радиоактивный изотоп также представляет собой цитотоксин. Терапевтические средства можно получать в виде фармацевтически приемлемых солей, кислот или производных любого одного из приведенных выше. В общем, конъюгаты, имеющие радиоактивный изотоп в качестве лекарственного средства, именуется радиоиммуноконъюгатами, и конъюгаты, имеющие химиотерапевтическое средство в качестве лекарственного средства, именуется хемоиммуноконъюгатами.

15 20

Примеры цитотоксических средств включают антрациклины, ауристатины, СС-1065, доластатин, дуокармицин, энедиины, гелданамицин, майтансин, пурамицин, таксаны, алкалоиды барвинка, SN-38, табулизин, гемиастерлин, эрибулин, трабектедин, лурбинэктедин и их стереоизомеры, изостеры, аналоги или производные, но не ограничиваются ими. Также можно использовать химиотерапевтические средства, растительные токсины, другие биоактивные белки, ферменты (например, ADEPT), радиоактивные изотопы и фотосенсибилизаторы (т.е. для фотодинамической терапии).

25 30

Термин «метка», при использовании в данном документе, относится к выявляемому соединению или композиции, которую конъюгируют прямо или опосредованно с антителом таким образом, чтобы получать «меченое» антитело. Данная метка может быть выявляемой сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментативной метки, могут катализировать выявляемое химическое изменение в соединении-субстрате или композиции. Радиоизотопные метки включают, например, I-131, I-123, I-125, Y-90,

35

Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 и Pd-109. Данная метка также может представлять собой невыявляемое соединение, такое как токсин.

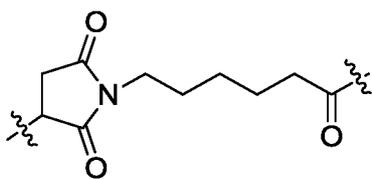
Термин «линкерное звено» или «линкер» относится к химическому структурному фрагменту или связи, которые связаны с антителом на одном конце и с лекарственным средством на другом конце, и также могут быть связаны с другими линкерами перед антителом или лекарственным средством. Присоединение линкера к антителу может осуществляться целым рядом способов, как, например, через поверхностные лизины, восстановительное связывание с окисленными углеводами, остатки цистеина, высвобождаемые посредством восстановления межцепочечных дисульфидных связей, реакционноспособные остатки цистеина, сконструированные в конкретных сайтах, и метки, содержащие глутамины – доноры ацила, или эндогенный глутамин, сделанный реакционноспособным посредством инженерии полипептидов в присутствии трансклутаминазы и амина. В данной области известен целый ряд систем связывания ADC, включая связи на основе гидразона, дисульфида и пептида.

Данный линкер может содержать один или более чем один линкерный элемент. Типичные линкерные элементы включают 6-малеимидакапроил («MC»), малеимидопропионил («MP»), валин-цитруллин («val-cit» или «vc»), аланин-фенилаланин («ala-phe»), *p*-аминобензилоксикарбонил («PAB»), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат («SPP»), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат («SMCC», также именуемый в данном документе как «MCC») и N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат («SIAB»).

Данный линкер может быть выбран из группы, состоящей из следующих элементов или их комбинации: ширилка, спейсер и аминокислотное звено. Данный линкер может быть синтезирован с использованием способов, известных в данной области, таких как способы, описанные в US20050238649A1. Линкер может быть «расщепляемым линкером», благоприятствующим высвобождению лекарственных средств в клетках. Например, можно использовать кислотолabile линкеры (например, гидразоны), протеазочувствительные (например, пептидазочувствительные) линкеры, фотолабильные линкеры, диметильные линкеры или дисульфидсодержащие линкеры (Chari et al., Cancer Research, 52: 127-131(1992); патент США № 5208020).

Линкерные элементы включают:

MC – 6-малеимидакапроил, структура которого является следующей:



Val-Cit или «vc» - валин-цитруллин (типичный дипептид в линкере, расщепляемом протеазой),

цитруллин – 2-амино-5-уреидопентановая кислота,

5 PAB - *l*-аминобензилоксикарбонил (пример «саморасщепляющихся» линкерных элементов),

Me-Val-Cit – N-метил-валин-цитруллин (где пептидная связь линкера была модифицирована для предотвращения ее расщепления катепсином B),

10 MC(PEG)6-OH – малеимидокапроил-полиэтиленгликоль (присоединяемый к цистеину антитела),

SPP – N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)валерат,

SPDP - N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтио)пропионат,

SMCC - сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат и

IT – имиотиолан, но не ограничиваются ими.

15 «L-D» представляет собой группировку линкер-лекарственное средство, образующуюся из-за присоединения лекарственного средства (D) к линкеру (L).

«Загрузка лекарственного средства», также известная как отношение лекарственного средства к антителу (DAR), относится к среднему числу молекул лекарственного средства, связанных с каждым антителом в ADC. Она может варьировать, например, от примерно 1 до примерно 10 молекул лекарственного средства, конъюгированных с каждым антителом, и в некоторых воплощениях от примерно 1 до примерно 8 молекул лекарственного средства, конъюгированных с каждым антителом, предпочтительно выбрана из группы, состоящей из 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 1-3, 3-4, 3-5, 5-6, 5-7, 5-8 и 6-8 молекул лекарственного средства, конъюгированных с каждым антителом. ADC общих формул по настоящему раскрытию включают набор конъюгатов антитело-лекарственное средство в пределах определенного интервала, как описано выше. В воплощениях настоящего раскрытия загрузка лекарственного средства может быть представлена *n* и представляет собой десятичную дробь или целое число. Загрузку лекарственного средства можно определять традиционными способами, такими как спектроскопия в УФ (ультрафиолет)/видимой области спектра, масс-спектрометрия, анализ ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), HIC

20

25

30

(гидрофобная хроматография) и ВЭЖХ-ОФ (высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой).

В одном воплощении настоящего раскрытия лекарственное средство конъюгировано с реакционноспособной группой (например, сульфгидрильной) антитела посредством линкера.

Загрузку лекарственного средства ADC можно контролировать следующими неограничивающими способами, включающими:

(1) осуществление контроля мольного отношения связывающего реактива с моноклональным антителом,

(2) осуществление контроля времени и температуры реакции, и

(3) выбор разных реактивов для реакции.

Термин «алкил» относится к насыщенной алифатической углеводородной группе с прямой цепью или разветвленной цепью, имеющей от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) атомов углерода (т.е. C₁₋₂₀ алкил). Алкил предпочтительно представляет собой алкильную группу, имеющую от 1 до 12 атомов углерода (т.е. C₁₋₁₂ алкил), более предпочтительно алкильную группу, имеющую от 1 до 6 атомов углерода (т.е. C₁₋₆ алкил). Неограничивающие примеры включают: метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *трет*-бутил, *втор*-бутил, *n*-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, *n*-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил, *n*-гептил, 2-метилгексил, 3-метилгексил, 4-метилгексил, 5-метилгексил, 2,3-диметилпентил, 2,4-диметилпентил, 2,2-диметилпентил, 3,3-диметилпентил, 2-этилпентил, 3-этилпентил, *n*-октил, 2,3-диметилгексил, 2,4-диметилгексил, 2,5-диметилгексил, 2,2-диметилгексил, 3,3-диметилгексил, 4,4-диметилгексил, 2-этилгексил, 3-этилгексил, 4-этилгексил, 2-метил-2-этилпентил, 2-метил-3-этилпентил, *n*-нонил, 2-метил-2-этилгексил, 2-метил-3-этилгексил, 2,2-диэтилпентил, *n*-децил, 3,3-диэтилгексил, 2,2-диэтилгексил и их разные изомеры с разветвленной цепью, и тому подобное. Алкил может быть замещенным или незамещенным, и, когда он является замещенным, он может быть замещен в любой доступной точке присоединения, и заместитель предпочтительно выбран из группы, состоящей из одного или более чем одного атома D, галогена, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, гидрокси, гидроксилалкила, циано, amino, нитро, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

Термин «алкилен» относится к двухвалентной алкильной группе, где данный алкил является таким, как определено выше; он имеет от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) атомов углерода (т.е. C₁₋₂₀алкилен). Данный алкилен предпочтительно представляет собой алкиленовую группу, имеющую от 1 до 12 атомов углерода (т.е. C₁₋₁₂алкилен), более предпочтительно алкиленовую группу, имеющую от 1 до 6 атомов углерода (т.е. C₁₋₆алкилен). Неограничивающие примеры включают: -CH₂-, -CH(CH₃)-, -C(CH₃)₂-, -CH₂CH₂-, -CH(CH₂CH₃)-, -CH₂CH(CH₃)-, -CH₂C(CH₃)₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂- и тому подобные. Алкилен может быть замещенным или незамещенным, и когда он является замещенным, он может быть замещен в любой доступной точке присоединения, и заместитель предпочтительно выбран из группы, состоящей из одного или более чем одного атома D, галогена, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклокси, гидроксид, гидроксидалкила, циано, amino, нитро, циклоалкила, гетероциклолила, арила и гетероарила.

Термин «алкенил» относится к алкильной группе, содержащей по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод в данной молекуле, где алкил является таким, как определено выше, и он имеет от 2 до 12 (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12) атомов углерода (т.е., C₂₋₁₂алкенил). Данный алкенил предпочтительно представляет собой алкенильную группу, имеющую от 2 до 6 атомов углерода (т.е. C₂₋₆алкенил). Неограничивающие примеры включают: этенил, пропенил, изопропенил, бутенил и тому подобные. Алкенил может быть замещенным или незамещенным, и когда он является замещенным, он может быть замещен в любой доступной точке присоединения, и заместитель предпочтительно выбран из группы, состоящей из одного или более чем одного атома D, алкокси, галогена, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклокси, гидроксид, гидроксидалкила, циано, amino, нитро, циклоалкила, гетероциклолила, арила и гетероарила.

Термин «алкинил» относится к алкильной группе, содержащей по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод в данной молекуле, где алкил является таким, как определено выше, и он имеет от 2 до 12 (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12) атомов углерода (т.е., C₂₋₁₂алкинил). Данный алкинил предпочтительно представляет собой алкинильную группу, имеющую от 2 до 6 атомов углерода (т.е. C₂₋₆алкинил). Неограничивающие примеры включают: этинил, пропирил, бутирил, пентинил, гексинил и тому подобные. Алкинил может быть замещенным или незамещенным, и когда он является замещенным, он может быть замещен в любой доступной точке присоединения, и заместитель предпочтительно

выбран из группы, состоящей из одного или более чем одного атома D, алкокси, галогена, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, гидрокси, гидроксиалкила, циано, amino, нитро, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

5 Термин «алкокси» относится к –O-(алкилу), где алкил является таким, как определено выше. Неограничивающие примеры включают: метокси, этокси, пропокси, бутокси и тому подобные. Алкокси может быть замещенным или незамещенным, и когда он является замещенным, он может быть замещен в любой доступной точке присоединения, и заместитель предпочтительно выбран из
10 группы, состоящей из одного или более чем одного атома D, галогена, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, гидрокси, гидроксиалкила, циано, amino, нитро, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

Термин «циклоалкил» относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому кольцу, образованному только атомами углерода (т.е. моноциклический циклоалкил), или к полициклической системе (т.е. полициклический циклоалкил), имеющей от 3 до 20 (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) кольцевых атомов (т.е. 3-20-членный циклоалкил). Данный циклоалкил предпочтительно представляет собой
20 циклоалкильную группу, имеющую от 3 до 12 кольцевых атомов (т.е. 3-12-членный циклоалкил), более предпочтительно циклоалкильную группу, имеющую от 3 до 8 кольцевых атомов (т.е. 3-8-членный циклоалкил), и наиболее предпочтительно циклоалкильную группу, имеющую от 3 до 6 кольцевых атомов (т.е. 3-6-членный циклоалкил).

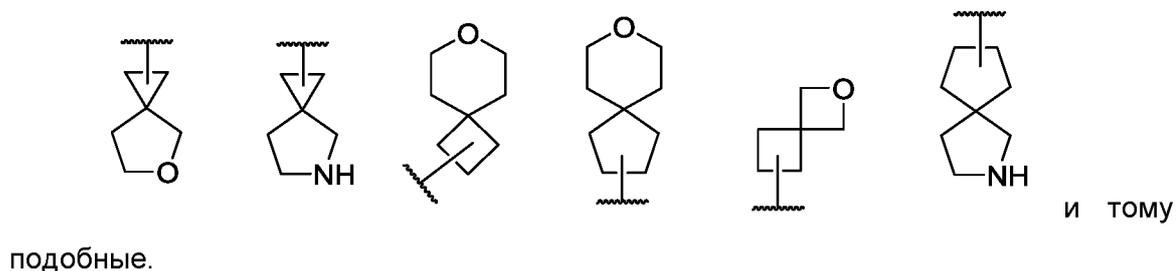
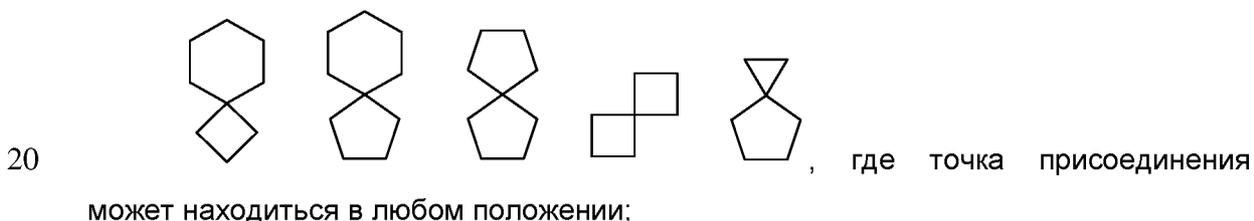
25 Неограничивающие примеры моноциклического циклоалкила включают: циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогександиенил, циклогептил, циклогептатриенил, циклооктил и тому подобные.

Полициклический циклоалкил включает: спироциклоалкил, конденсированный циклоалкил и мостиковый циклоалкил.
30

Термин «спироциклоалкил» относится к полициклической системе, в которой атом углерода (именуемый спиро атом) является общим между кольцами, которые могут содержать одну или более чем одну двойную связь в данных кольцах или может содержать в данных кольцах один или более чем один
35 гетероатом, выбранный из группы, состоящей из азота, кислорода и серы (азот возможно может быть окислен с образованием оксида азота; сера возможно может

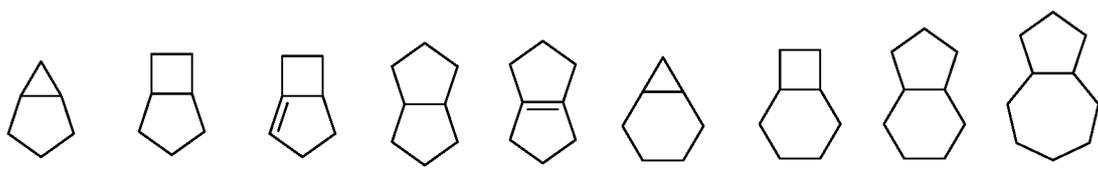
быть замещена оксо с образованием сульфоксида или сульфона, исключая –O-O-, -O-S- или –S-S-), при условии, что данная система содержит по меньшей мере одно кольцо, образованное только атомами углерода, и точка присоединения находится на данном кольце, образованном только атомами углерода; данная система имеет от 5 до 20 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) кольцевых атомов (т.е., 5-20-членный спироциклоалкил). Данный спироциклоалкил предпочтительно представляет собой спироциклоалкильную группу, имеющую от 6 до 14 кольцевых атомов (т.е., 6-14-членный спироциклоалкил), более предпочтительно спироциклоалкильную группу, имеющую от 7 до 10 кольцевых атомов (т.е., 7-10-членный спироциклоалкил). Данный спироциклоалкил включает моноспироциклоалкил и полиспироциклоалкил (например, биспироциклоалкил), предпочтительно моноспироциклоалкил или биспироциклоалкил, и более предпочтительно 3-членный/4-членный, 3-членный/5-членный, 3-членный/6-членный, 4-членный/4-членный, 4-членный/5-членный, 4-членный/6-членный, 5-членный/3-членный, 5-членный/4-членный, 5-членный/5-членный, 5-членный/6-членный, 5-членный/7-членный, 6-членный/3-членный, 6-членный/4-членный, 6-членный/5-членный, 6-членный/6-членный, 6-членный/7-членный, 7-членный/5-членный или 7-членный/6-членный моноспироциклоалкил.

Неограничивающие примеры включают:

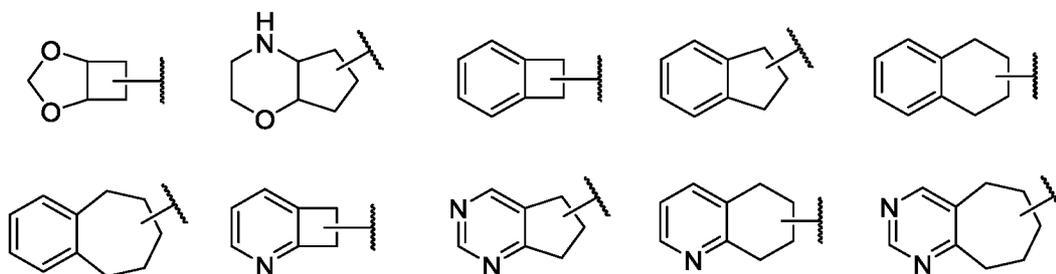


25 Термин «конденсированный циклоалкил» относится к полициклической системе, в которой два смежных атома углерода являются общими между кольцами, что формируется конденсированием моноциклической циклоалкильной группы с одной или более чем одной моноциклической циклоалкильной группой, или конденсированием моноциклической циклоалкильной группы с одним или более чем одним гетероциклом, арилом или гетероарилом, где точка

присоединения находится на моноциклической циклоалкильной группе; данная система может содержать одну или более чем одну двойную связь в кольцах и имеет от 5 до 20 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) кольцевых атомов (т.е. 5-20-членный конденсированный циклоалкил). Данный конденсированный циклоалкил предпочтительно представляет собой конденсированную циклоалкильную группу, имеющую от 6 до 14 кольцевых атомов (т.е. 6-14-членный конденсированный циклоалкил), более предпочтительно конденсированную циклоалкильную группу, имеющую от 7 до 10 кольцевых атомов (т.е. 7-10-членный конденсированный циклоалкил). Данный конденсированный циклоалкил включает бициклический конденсированный циклоалкил и полициклический конденсированный циклоалкил (например, трициклический конденсированный циклоалкил и тетрациклический конденсированный циклоалкил), предпочтительно бициклический конденсированный циклоалкил или трициклический конденсированный циклоалкил, и более предпочтительно 3-членный/4-членный, 3-членный/5-членный, 3-членный/6-членный, 4-членный/4-членный, 4-членный/5-членный, 4-членный/6-членный, 5-членный/3-членный, 5-членный/4-членный, 5-членный/5-членный, 5-членный/6-членный, 5-членный/7-членный, 6-членный/3-членный, 6-членный/4-членный, 6-членный/5-членный, 6-членный/6-членный, 6-членный/7-членный, 7-членный/5-членный или 7-членный/6-членный бициклический конденсированный циклоалкил. Неограничивающие примеры включают:



где точка присоединения может находиться в любом положении;



и тому подобные.

Термин «мостиковый циклоалкил» относится к полициклической системе, образованной только атомами углерода, в которой два атома углерода, не являющихся непосредственно связанными, являются общими между кольцами,

которые могут содержать одну или более чем одну двойную связь в кольцах и имеют от 5 до 20 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) атомов углерода (т.е. 5-20-членный мостиковый циклоалкил). Данный мостиковый циклоалкил предпочтительно представляет собой мостиковую циклоалкильную группу, имеющую от 6 до 14 атомов углерода (т.е. 6-14-членный мостиковый циклоалкил), более предпочтительно мостиковую циклоалкильную группу, имеющую от 7 до 10 атомов углерода (т.е. 7-10-членный мостиковый циклоалкил). Данный мостиковый циклоалкил включает бициклический мостиковый циклоалкил и полициклический мостиковый циклоалкил (например, трициклический мостиковый циклоалкил или тетрациклический мостиковый циклоалкил), предпочтительно бициклический мостиковый циклоалкил или трициклический мостиковый циклоалкил. Неограничивающие примеры включают:



где точка присоединения может находиться в любом положении.

Циклоалкил может быть замещенным или незамещенным, и когда он является замещенным, он может быть замещенным в любой доступной точке присоединения, и заместитель предпочтительно выбран из группы, состоящей из одного или более чем одного атома D, галогена, алкила, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклокси, гидроксид, гидроксидалкила, оксо, циано, амина, нитро, циклоалкила, гетероциклолила, арила и гетероарила.

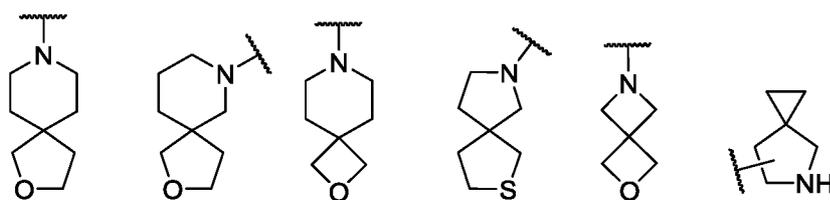
Термин «гетероциклил» относится к насыщенной или частично ненасыщенной моноциклической гетероциклической (т.е. моноциклический гетероциклил), или полициклической гетероциклической системе (т.е. полициклический гетероциклил), которая содержит в кольце(цах) по меньшей мере один (например, 1, 2, 3 или 4) гетероатома, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода и серы (азот возможно может быть окислен с образованием оксида азота; сера возможно может быть замещена оксо с образованием сульфоксида или сульфона, исключая $-O-O-$, $-O-S-$ или $-S-S-$), и имеет от 3 до 20 (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) кольцевых атомов (т.е. 3-20-членный гетероциклил). Данный гетероциклил предпочтительно представляет собой гетероциклильную группу, имеющую от 3 до 12 кольцевых атомов (т.е. 3-12-членный гетероциклил), кроме того, предпочтительно гетероциклильную группу, имеющую от 3 до 8 кольцевых атомов (т.е. 3-8-членный гетероциклил), более предпочтительно гетероциклильную группу, имеющую от 3 до

6 кольцевых атомов (т.е. 3-6-членный гетероцикл), и наиболее предпочтительно гетероциклическую группу, имеющую от 5 до 6 кольцевых атомов (т.е. 5-6-членный гетероцикл).

Неограничивающие примеры моноциклического гетероцикла включают:
5 пирролидинил, тетрагидропиранил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, тиоморфолинил, гомопиперазинил и тому подобные.

Данный полициклический гетероцикл включает спирогетероцикл, конденсированный гетероцикл и мостиковый гетероцикл.

Термин «спирогетероцикл» относится к полициклической
10 гетероциклической системе, в которой атом (именуемый спироатом) является общим между кольцами, которые могут содержать одну или более чем одну двойную связь в кольцах, и содержит в кольцах по меньшей мере один (например, 1, 2, 3 или 4) гетероатом, выбранный из группы, состоящей из азота, кислорода и серы (азот возможно может быть окислен с образованием оксида азота; сера
15 возможно может быть замещена оксо с образованием сульфоксида или сульфона, исключая –O-O-, -O-S- или –S-S-), при условии, что данная система содержит по меньшей мере одну моноциклическую гетероциклическую группу, и точка присоединения находится на данной моноциклической гетероциклической группе; данная система имеет от 5 до 20 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,
20 17, 18, 19 или 20) кольцевых атомов (т.е. 5-20-членный спирогетероцикл). Данный спирогетероцикл предпочтительно представляет собой спирогетероциклическую группу, имеющую от 6 до 14 кольцевых атомов (т.е. 6-14-членный спирогетероцикл), более предпочтительно спирогетероциклическую группу, имеющую от 7 до 10 кольцевых атомов (т.е. 7-10-членный
25 спирогетероцикл). Данный спирогетероцикл включает моноспирогетероцикл и полиспирогетероцикл (например, биспирогетероцикл), предпочтительно моноспирогетероцикл или биспирогетероцикл, и, более предпочтительно, 3-членный/4-членный, 3-членный/5-членный, 3-членный/6-членный, 4-членный/4-членный, 4-членный/5-членный, 4-членный/6-членный, 5-членный/3-членный, 5-членный/4-членный, 5-членный/5-членный, 5-членный/6-членный, 5-членный/7-членный, 6-членный/3-членный, 6-членный/4-членный, 6-членный/5-членный, 6-членный/6-членный, 6-членный/7-членный, 7-членный/5-членный или 7-членный/6-членный моноспирогетероцикл. Неограничивающие примеры включают:

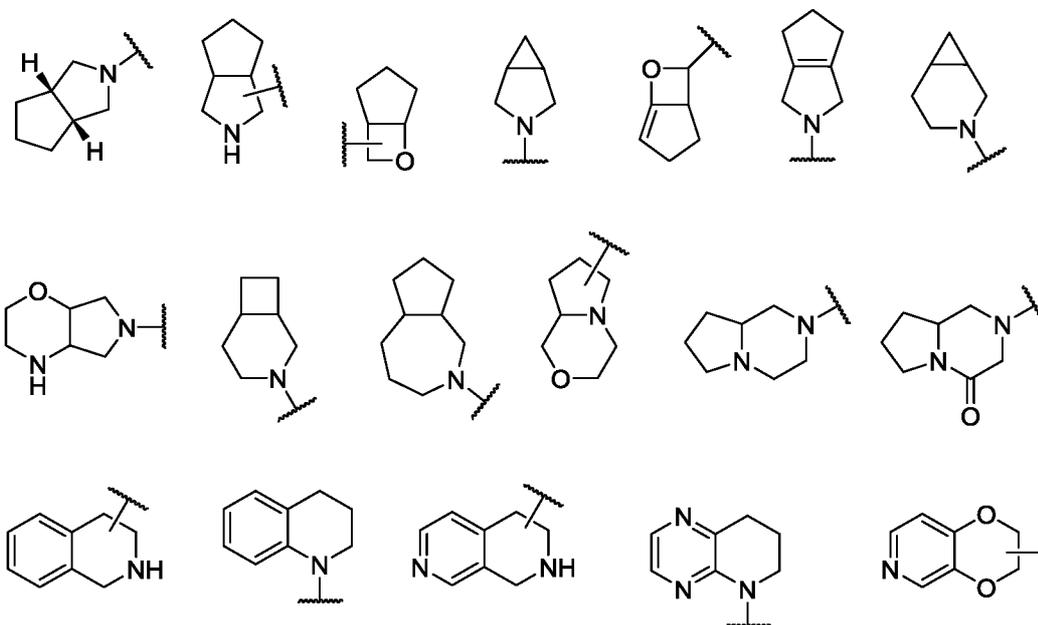


и тому

подобные.

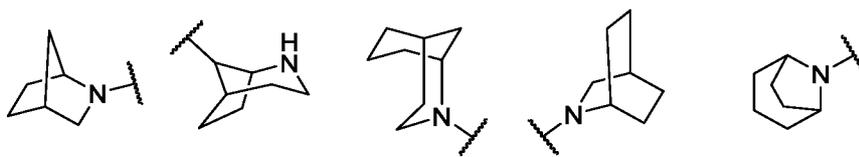
Термин «конденсированный гетероцикл» относится к полициклической гетероциклической системе, в которой два смежных атома являются общими между кольцами, которая может содержать одну или более чем одну двойную связь в кольцах и содержит в кольцах по меньшей мере один (например, 1, 2, 3 или 4) гетероатома, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода и серы (азот возможно может быть окислен с образованием оксида азота; сера возможно может быть замещена оксо с образованием сульфоксида или сульфона, исключая –O-O-, -O-S- или –S-S-); данная система образуется слиянием моноциклической гетероциклической группы с одной или более чем одной моноциклической гетероциклической группой, или слиянием моноциклической гетероциклической группы с одним или более чем одним циклоалкилом, арилом или гетероарилом, где точка присоединения находится на данной моноциклической гетероциклической группе; и данная система имеет от 5 до 20 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) кольцевых атомов (т.е. 5-20-членный конденсированный гетероцикл). Данный конденсированный гетероцикл предпочтительно представляет собой конденсированную гетероциклическую группу, имеющую от 6 до 14 кольцевых атомов (т.е. 6-14-членный конденсированный гетероцикл), более предпочтительно конденсированную гетероциклическую группу, имеющую от 7 до 10 кольцевых атомов (т.е. 7-10-членный конденсированный гетероцикл). Данный конденсированный гетероцикл включает бициклический гетероцикл и полициклический конденсированный гетероцикл (например, трициклический конденсированный гетероцикл и тетрациклический конденсированный гетероцикл), предпочтительно бициклический конденсированный гетероцикл или трициклический конденсированный гетероцикл, и, более предпочтительно, 3-членный/4-членный, 3-членный/5-членный, 3-членный/6-членный, 4-членный/4-членный, 4-членный/5-членный, 4-членный/6-членный, 5-членный/3-членный, 5-членный/4-членный, 5-членный/5-членный, 5-членный/6-членный, 5-членный/7-членный, 6-членный/3-членный, 6-членный/4-членный, 6-членный/5-членный, 6-членный/6-членный, 6-членный/7-членный, 7-членный/5-членный или 7-членный/6-

членный бициклический конденсированный гетероциклил. Неограничивающие примеры включают:



и тому подобные.

- 5 Термин «мостиковый гетероциклил» относится к полициклической гетероциклической системе, в которой два атома, не являющиеся непосредственно связанными, являются общими между кольцами, которая может содержать одну или более чем одну двойную связь в кольцах и содержит в кольцах по меньшей мере один (например, 1, 2, 3 или 4) гетероатома, выбранных из группы, состоящей
- 10 из азота, кислорода и серы (азот возможно может быть окислен с образованием оксида азота; сера возможно может быть замещена оксо с образованием сульфоксида или сульфона, исключая $-O-O-$, $-O-S-$ или $-S-S-$); данная система имеет от 5 до 20 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) кольцевых атомов (т.е. 5-20-членный мостиковый гетероциклил). Данный
- 15 мостиковый гетероциклил предпочтительно представляет собой мостиковую гетероциклильную группу, имеющую от 6 до 14 кольцевых атомов (т.е. 6-14-членный мостиковый гетероциклил), более предпочтительно мостиковую гетероциклильную группу, имеющую от 7 до 10 кольцевых атомов (т.е. 7-10-членный мостиковый гетероциклил). Согласно числу составляющих колец данный
- 20 мостиковый гетероциклил может представлять собой бициклический мостиковый гетероциклил или полициклический мостиковый гетероциклил (например, трициклический мостиковый гетероциклил и тетрациклический мостиковый гетероциклил), предпочтительно бициклический мостиковый гетероциклил или трициклический мостиковый гетероциклил. Неограничивающие примеры включают:

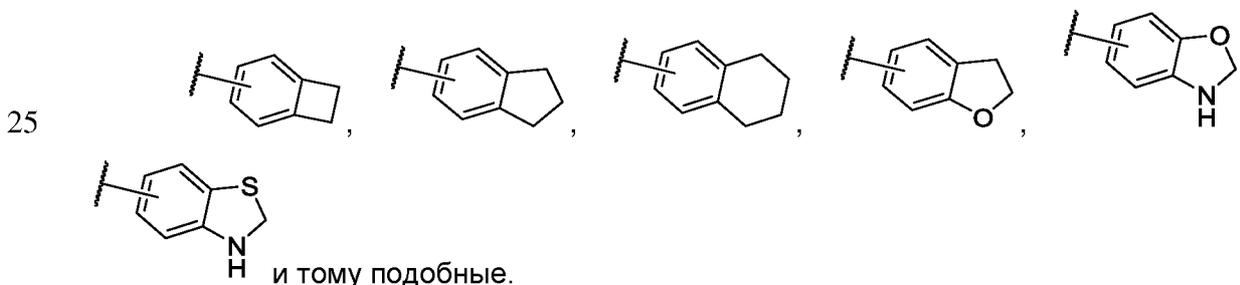


и тому

подобные.

Гетероцикл может быть замещенным или незамещенным, и когда он является замещенным, он может быть замещенным в любой доступной точке
 5 присоединения, и заместитель предпочтительно выбран из группы, состоящей из одного или более чем одного атома D, галогена, алкила, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклокси, гидроксид, гидроксидалкила, оксо, циано, амина, нитро, циклоалкила, гетероциклола, арила и гетероарила.

Термин «арил» относится к системе моноциклического ароматического
 10 кольца, образованного только атомами углерода (т.е. моноциклический арил), или полициклического ароматического кольца (т.е. полициклический арил), имеющей систему сопряженных π -электронов, которая имеет от 6 до 14 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14) кольцевых атомов (т.е. 6-14-членный арил). Данный арил предпочтительно представляет собой арильную группу, имеющую от 6 до 10
 15 кольцевых атомов (т.е. 6-10-членный арил). Данный моноциклический арил представляет собой, например, фенил. Неограничивающие примеры полициклического арила включают: нафтил, антраценил, фенантренил и тому подобные. Полициклический арил также включает арилы, образованные конденсированием фенила с одним или более чем одним гетероциклом или
 20 циклоалкилом, или конденсированием нафтила с одним или более чем одним гетероциклом или циклоалкилом, где точка присоединения находится на фениле или нафтиле, и при определенных обстоятельствах число кольцевых атомов продолжает представлять число кольцевых атомов в системе полициклического ароматического кольца; неограничивающие примеры включают:

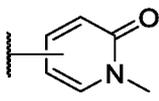


Арил может быть замещенным или незамещенным, и, когда он является замещенным, он может быть замещенным в любой доступной точке
 присоединения, и заместитель предпочтительно выбран из группы, состоящей из

одного или более чем одного атома D, галогена, алкила, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, гидроксид, гидроксидалкила, оксо, циано, амино, нитро, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

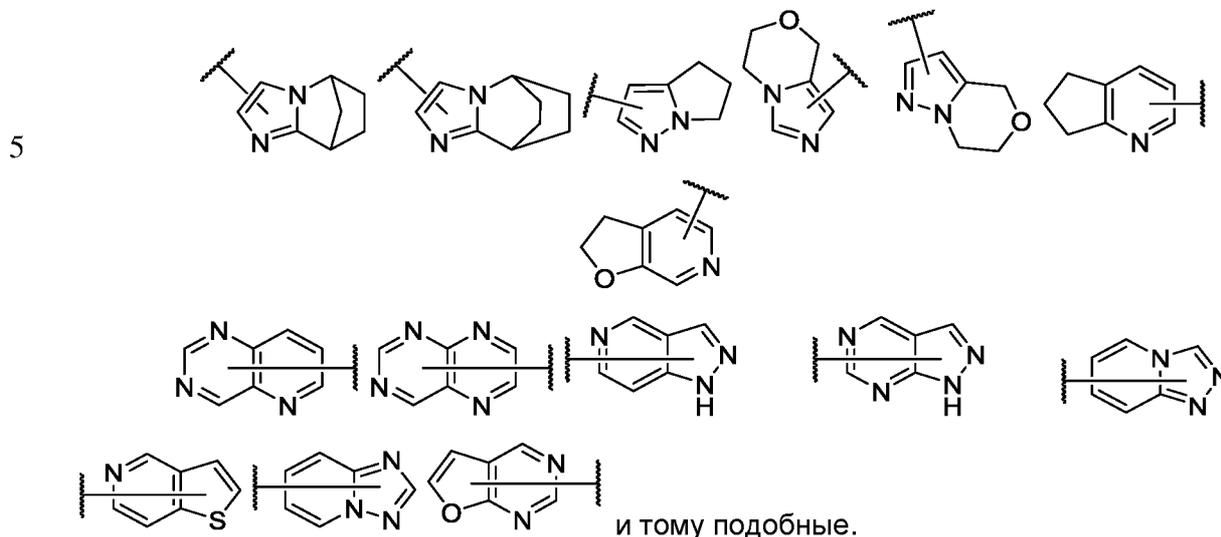
Термин «гетероарил» относится к моноциклическому гетероароматическому
 5 кольцу (т.е., моноциклический гетероарил) или к системе полициклического гетероароматического кольца (т.е., полициклический гетероарил), имеющей систему сопряженных π -электронов, которая содержит в кольце(цах) по меньшей мере один (например, 1, 2, 3 или 4) гетероатом, выбранный из группы, состоящей из азота, кислорода и серы (азот возможно может быть окислен с образованием
 10 оксида азота; сера возможно может быть замещена оксо с образованием сульфоксида или сульфона, исключая $-O-O-$, $-O-S-$ или $-S-S-$), и имеет от 5 до 14 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14) кольцевых атомов (т.е. 5-14-членный гетероарил). Данный гетероарил предпочтительно представляет собой гетероарильную группу, имеющую от 5 до 10 кольцевых атомов (т.е. 5-10-членный
 15 гетероарил), более предпочтительно гетероарильную группу, имеющую от 5 до 6 кольцевых атомов (т.е. 5-6-членный гетероарил).

Неограничивающие примеры моноциклического гетероарила включают: фуранил, тиенил, тиазолил, изотиазолил, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил, тиадиазолил, имидазолил, пиразолил, триазолил, тетразолил, фуразанил,
 20 пирролил, N-алкилпирролил, пиридинил, пиримидинил, пиридинонил, N-

алкилпиридинон (например, , пиразинил, пиридазинил и тому подобные.

Неограничивающие примеры полициклического гетероарила включают: индолил, индазолил, хинолил, изохинолил, хиноксалинил, фталазинил,
 25 бензимидазолил, бензотиенил, хиназолинил, бензотиазолил, карбазолил и тому подобные. Полициклический гетероарил также включает гетероарилы, образованные конденсированием моноциклической гетероарильной группы с одной или более чем одной арильной группами, где точка присоединения находится на ароматическом кольце, и при определенных обстоятельствах число
 30 кольцевых атомов продолжает представлять число кольцевых атомов в системе полициклического гетероароматического кольца. Данный полициклический гетероарил также включает гетероарилы, образованные конденсированием моноциклического гетероарила с одним или более чем одним из циклоалкила или гетероциклила, где точка присоединения находится на моноциклическом

гетероароматическом кольце, и при определенных обстоятельствах число кольцевых атомов продолжает представлять число кольцевых атомов в системе полициклического гетероароматического кольца. Неограничивающие примеры включают:



10 Гетероарил может быть замещенным или незамещенным, и когда он является замещенным, он может быть замещенным в любой доступной точке присоединения, и заместитель предпочтительно выбран из группы, состоящей из одного или более чем одного атома D, галогена, алкила, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, гидроксид, гидроксидалкила, циано, амина, нитро, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

15 Термин «защитная группа для аминогруппы» относится к легко удаляемой группе, которая вводится на аминогруппу для того, чтобы данная аминогруппа оставалась неизменной при прохождении реакций на других частях данной молекулы. Неограничивающие примеры включают: (триметилсилил)этоксиметил, тетрагидропиранил, *трет*-бутилоксикарбонил (Boc), бензилоксикарбонил (Cbz),
 20 флуоренилметоксикарбонил (Fmoc), аллилоксикарбонил (Alloc), триметилсилилэтоксикарбонил (Teoc), метоксикарбонил, этоксикарбонил, фталоил (Pht), *p*-толуолсульфонил (Tos), трифторацетил (Tfa), тритил (Trt), 2,4-диметоксибензил (DMB), ацетил, бензил, аллил, *p*-метоксибензил и тому подобные.

25 Термин «защитная группа для гидроксигруппы» относится к легко удаляемой группе, которая вводится на гидроксигруппу для того, чтобы блокировать или защищать данную гидроксигруппу таким образом, чтобы реакции шли на других функциональных группах данного соединения. Неограничивающие примеры включают: триметилсилил (TMS), триэтилсилил (TES), триизопропилсилил (TIPS), *трет*-бутилдиметилсилил (TBS), *трет*-

бутилдифенилсилил (TBDPS), метил, *трет*-бутил, аллил, бензил, метоксиметил (MOM), этоксиэтил, 2-тетрагидропиранил (THP), формил, ацетил, бензоил, *п*-нитробензоил и тому подобные.

5 Термин «циклоалкилокси» относится к циклоалкил-О-, где данный циклоалкил является таким, как определено выше.

Термин «гетероциклилокси» относится к гетероциклил-О-, где данный гетероциклил является таким, как определено выше.

Термин «арилокси» относится к арил-О-, где арил является таким, как определено выше.

10 Термин «гетероарилокси» относится к гетероарил-О-, где гетероарил является таким, как определено выше.

Термин «алкилтио» относится к алкил-S-, где алкил является таким, как определено выше.

15 Термин «галогеналкил» относится к алкильной группе, замещенной одним или более чем одним галогеном, где алкил является таким, как определено выше.

Термин «галогеналкокси» относится к алкокси группе, замещенной одним или более чем одним галогеном, где алкокси является таким, как определено выше.

20 Термин «дейтерированный алкил» относится к алкильной группе, замещенной одним или более чем одним атомом дейтерия, где алкил является таким, как определено выше.

Термин «гидроксиалкил» относится к алкильной группе, замещенной одной или более чем одной гидроксигруппой, где алкил является таким, как определено выше.

25 Термин «метилен» относится к $=\text{CH}_2$.

Термин «галоген» относится к фтору, хлору, бромю или йоду.

Термин «гидрокси» относится к $-\text{OH}$.

Термин «сульфгидрил» относится к $-\text{SH}$.

Термин «амино» относится к $-\text{NH}_2$.

30 Термин «циано» относится к $-\text{CN}$.

Термин «нитро» относится к $-\text{NO}_2$.

Термин «оксо» относится к $=\text{O}$.

Термин «карбонил» относится к $\text{C}=\text{O}$.

Термин «карбоксил» относится к $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$.

Термин «карбоксилатная группа» относится к $-C(O)O(\text{алкил})$, $-C(O)O(\text{циклоалкил})$, $(\text{алкил})C(O)O-$ или $(\text{циклоалкил})C(O)O-$, где алкил и циклоалкил являются такими, как определено выше.

В химических формулах сокращение «Me» относится к метилу.

5 В химических формулах сокращение «Ph» относится к фенилу.

Термин «THF» относится к тетрагидрофурану.

Термин «EtOAc» относится к этилацетату.

Термин «MeOH» относится к метанолу.

Термин «DMF» относится к N,N-диметилформамиду.

10 Термин «DIPEA» относится к диизопропилэтиламину.

Термин «TFA» относится к трифторуксусной кислоте.

Термин «MeCN» относится к ацетонитрилу.

Термин «DMA» относится к N,N-диметилацетамиду.

Термин «Et₂O» относится к диэтиловому эфиру.

15 Термин «DCE» относится к 1,2-дихлорэтану.

Термин «DIPEA» относится к N,N-диизопропилэтиламину.

Термин «NBS» относится к N-бромсукцинимиду.

Термин «NIS» относится к N-йодсукцинимиду.

Термин «Cbz-Cl» относится к бензилхлорформиату.

20 Термин «Pd₂(dba)₃» относится к трис(добензилиденацетон)дипалладию(0).

Термин «Dppf» относится к 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцену.

Термин «HATU» относится к 2-(7-бензотриазолоксид)-N,N,N',N'-тетраметилмочевины гексафторфосфату.

Термин «KHMDS» относится к калия гексаметилдисилиламиду.

25 Термин «LiHMDS» относится к лития бис(триметилсилил)амиду.

Термин «MeLi» относится к метиллитию.

Термин «n-BuLi» относится к n-бутиллитию.

Термин «NaBH(OAc)₃» относится к натрия триацетоксиборгидриду.

Термин «DCM» относится к дихлорметану.

30 Термин «DMAP» относится к 4-диметиламинопиридину.

Термин «DMBON» относится к 2,4-диметоксибензиловому спирту.

Термин «EDCl» относится к 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимиду.

Термин «MTBE» относится к метил-трет-бутиловому эфиру.

35 Термин «DMF» относится к N,N-диметилформамиду.

Термин «DMTMM» относится к 4-(4,6-диметокситриазин-2-ил)-4-метилморфолина гидрохлориду.

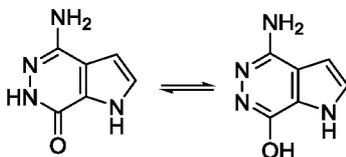
Термин «EtOAc» относится к этилацетату.

Соединения по настоящему раскрытию могут существовать в специфических стереоизомерных формах. Термин «стереоизомер» относится к изомерам, которые являются структурно идентичными, но отличаются по организации атомов в пространстве. Он включает *цис*- и *транс*- (или *Z* и *E*) изомеры, (-)- и (+)-изомеры, (*R*)- и (*S*)-энантиомеры, диастереомеры, (*D*)- и (*L*)-изомеры, таутомеры, атропизомеры, конформеры и их смеси (например, смеси рацематов и диастереомеров). В соединениях по настоящему раскрытию в заместителях могут присутствовать дополнительные асимметрические атомы. Все такие стереоизомеры и их смеси включаются в пределы объема настоящего раскрытия. Оптически активные (-)- и (+)- изомеры, (*R*)- и (*S*)-энантиомеры, и (*D*)- и (*L*)-изомеры могут быть получены хиральным синтезом, хиральными реактивами или другими традиционными методиками. Один изомер определенного соединения по настоящему раскрытию может быть получен асимметрическим синтезом или с использованием хирального вспомогательного вещества, или, когда данная молекула содержит основную функциональную группу (например, амино) или кислотную функциональную группу (например, карбоксил), диастереомерная соль образуется с использованием подходящей оптически активной кислоты или основания, с последующим разделением диастереомеров посредством традиционных способов, известных в данной области, с получением чистого изомера. Кроме того, разделение энантиомеров и диастереомеров обычно осуществляется посредством хроматографии.

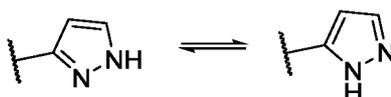
В химических структурах соединений по настоящему раскрытию связь «» указывает неопределенную конфигурацию; то есть, если в данной химической структуре существуют хиральные изомеры, связь «» может представлять собой «» или «», или включает обе конфигурации «» и «».

Соединения по настоящему раскрытию могут существовать в разных таутомерных формах, и все такие формы включаются в пределы объема настоящего раскрытия. Термин «таутомер» или «таутомерная форма» относится к структурному изомеру, который существует в равновесии и легко превращается из одной изомерной формы в другую. Он включает все возможные таутомеры; то есть, он присутствует в форме одиночного изомера или в форме смеси таутомеров в любом соотношении. Неограничивающие примеры включают: кето-енол, имин-

энамины, лактам-лактим и тому подобное. Лактам-лактим, находящийся в равновесии, представляет собой следующее:



5 Например, понятно то, что ссылка на пиразол включает любую из следующих двух структур или смесь двух таутомеров:



Все таутомерные формы попадают в пределы объема настоящего раскрытия, и номенклатура соединений не исключает любого таутомера.

10 Соединения по настоящему раскрытию включают все подходящие изотопные производные их соединений. Термин «изотопное производное» относится к соединению, в котором по меньшей мере один атом заменяется атомом, имеющим то же самое атомное число, но отличную атомную массу. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения по настоящему раскрытию, включают стабильные и радиоактивные изотопы водорода, углерода, 15 азота, кислорода, фосфора, серы, фтора, хлора, брома, йода и т.д., такие как ^2H (дейтерий, D), ^3H (тритий, T), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S , ^{34}S , ^{35}S , ^{36}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{129}I и ^{131}I ; дейтерий является предпочтительным.

20 По сравнению с недейтерированными лекарственными средствами, дейтерированные лекарственные средства имеют преимущества пониженных токсических и побочных эффектов, повышенной стабильности лекарственного средства, усиленного куративного эффекта, пролонгированных биологических периодов полувыведения и тому подобного. Подразумевается то, что все изотопные вариации соединения по настоящему раскрытию не зависимо от того, являются ли они радиоактивными или нет, включаются в пределы объема настоящего раскрытия. Каждый доступный атом водорода, связанный с атомом углерода, может быть независимо заменен атомом дейтерия, где замена дейтерия может быть частичной или полной, и частичная замена дейтерием относится к 25 замене по меньшей мере одного атома водорода по меньшей мере одним атомом дейтерия.

30 Когда положению конкретно присвоен «дейтерий» или «D», следует понимать, что относительное содержание дейтерия в данном положении по меньшей мере в 1000 раз больше, чем природное относительное содержание

ное включение дейтерия). В некоторых воплощениях относительное содержание дейтерия каждого из присвоенных атомов дейтерия по меньшей мере в 6466,7 раз больше, чем природное относительное содержание дейтерия (т.е. по меньшей мере 97%-ное включение дейтерия). В некоторых воплощениях относительное содержание дейтерия каждого из присвоенных атомов дейтерия по меньшей мере в 6600 раз больше, чем природное относительное содержание дейтерия (т.е. по меньшей мере 99%-ное включение дейтерия). В некоторых воплощениях относительное содержание дейтерия каждого из присвоенных атомов дейтерия по меньшей мере в 6633,3 раз больше, чем природное относительное содержание дейтерия (т.е. по меньшей мере 99,5%-ное включения дейтерия).

«Замещение» или «замещенный» означает то, что один или более чем один, предпочтительно от 1 до 6 и более предпочтительно от 1 до 3 атомов водорода в данной группе независимо замещено соответствующим числом заместителей. Специалисты в данной области могут определять (экспериментально или теоретически) возможные или невозможные заместители без чрезмерных усилий. Например, может быть нестабильным, когда амино или гидроксильная группа со свободным водородом связывается с атомом углерода с ненасыщенной связью (например, алкен).

Настоящее раскрытие также включает разные дейтерированные формы конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (Pc-L-Da) или (Pc-L-D). Каждый доступный атом водорода, соединенный с атомом углерода, может быть независимо замещен атомом дейтерия. Специалисты в данной области способны синтезировать дейтерированные формы конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (Pc-L-Da) или (Pc-L-D) посредством ссылки на релевантную литературу. Имеющиеся в продаже дейтерированные исходные вещества можно использовать в получении дейтерированных форм конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (Pc-L-Da) или (Pc-L-D), или они могут быть синтезированы с использованием традиционных методик с дейтерированными реактивами, включающими дейтерированный боран, тридейтерированный боран в тетрагидрофуране, дейтерированный лития алюминия гидрид, дейтерированный йодэтан, дейтерированный йодметан и тому подобные, но не ограничивающихся ими.

Термины «возможный» или «возможно» означают то, что описанное позднее событие или обстоятельство может, но не обязательно происходит; это включает случай, где событие или обстоятельство происходит, и случай, где оно не происходит. Например, «алкил, который возможно замещен галогеном или циано»

включает случай, где данный алкил замещен галогеном или циано, и случай, где данный алкил не замещен галогеном или циано.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей одно или более чем одно соединение или его физиологически/фармацевтически приемлемые соли или пролекарства, описанные в данном документе, и другие химические компоненты, а также другие компоненты, такие как физиологически/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Подразумевается то, что фармацевтическая композиция стимулирует введение в организм и облегчает поглощение активного ингредиента таким образом, что он может оказывать его биологическую активность. Данная фармацевтическая композиция может находиться в форме стерильного инъеклируемого водного раствора. Приемлемые носители или растворители включают воду, раствор Рингера и изотоничный раствор хлорида натрия. Стерильный инъеклируемый препарат может представлять собой стерильную инъеклируемую микроэмульсию типа «масло в воде», в которой активный ингредиент растворен в масляной фазе. Например, данный активный ингредиент растворен в смеси соевого масла и лецитина. Данный масляный раствор затем добавляют в смесь воды и глицерина и обрабатывают с образованием микроэмульсии. Данную инъекцию или микроэмульсию можно локально инъектировать в кровоток субъекта в больших количествах. В качестве альтернативы, данный раствор и микроэмульсию вводят таким образом, чтобы поддерживать постоянную концентрацию в соединения по настоящему раскрытию в системе кровообращения. Для поддержания такой постоянной концентрации можно использовать устройство для непрерывной внутривенной доставки. Примером такого устройства является насос для внутривенной инъекции Deltac CADD-PLUS. TM. 5400.

Данная фармацевтическая композиция может находиться в форме стерильной инъеклируемой водной или масляной суспензии для внутримышечного и подкожного введения. Данную суспензию можно получать согласно предшествующему уровню техники с использованием подходящих диспергентов или увлажнителей и суспендирующих агентов, как описано выше. Данный стерильный инъеклируемый препарат также может представлять собой стерильную инъекцию или суспензию, полученную в парентерально приемлемом нетоксичном разбавителе или растворителе, например, раствор, полученный в 1,3-бутандиоле. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды можно с удобством использовать стерильное нелетучее масло. С этой целью можно использовать любую смесь нелетучих масел, включая синтетические

моноглицериды или диглицериды. Кроме того, при получении инъекций также можно использовать жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к солям антител или конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему раскрытию, которые являются безопасными и эффективными при введении субъекту, и которые обладают требуемой биологической активностью. В качестве примера, антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему раскрытию содержит по меньшей мере одну аминогруппу и, таким образом, может образовать соль с кислотой. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых солей включают: гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, сульфат, бисульфат, цитрат, ацетат, сукцинат, аскорбат, оксалат, нитрат, сорбат, гидрофосфат, дигидрофосфат, салицилат, гидроцитрат, тартрат, малеат, фумарат, формиат, бензоат, мезилат, этансульфонат, бензолсульфонат и *p*-толуолсульфонат.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтическом препарате, который является отличным от активного ингредиента и нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, стабилизаторы или консерванты, но не ограничиваются ими.

Термин «эксципиент» относится к добавке, помимо активного ингредиента, в фармацевтический препарат. Он также может относиться к вспомогательному веществу. Например, эксципиентами можно назвать все из связывающих веществ, наполнителей, разрыхлителей и смазок в таблетках; матричную часть в препаратах полутвердых мазей и кремов; консервантов, антиоксидантов, корригентов, отдушек, соразтворителей, эмульгаторов, солюбилизаторов, регуляторов осмотического давления, красителей и тому подобного в жидких препаратах.

«Разбавитель», также именуемый наполнителем, используется прежде всего для увеличения массы и объема таблетки. Добавление разбавителя не только обеспечивает определенный объем, но также уменьшает отклонение дозы главных ингредиентов и улучшает прессуемость лекарственного средства под давлением и тому подобное. Когда лекарственное средство в форме таблетки содержит масляные компоненты, необходимо добавлять поглотитель для поглощения масляных компонентов так, чтобы поддерживать «сухое» состояние и, таким образом, облегчать приготовление таблетки. Примеры включают крахмал, лактозу, неорганические соли кальция, микрокристаллическую целлюлозу и тому подобные.

Термин «субъект» или «индивид» включает человека и животных, не являющихся человеком. Животные, не являющиеся человеком, включают всех позвоночных (например, млекопитающие и немлекопитающие), таких как нечеловекообразные приматы (например, яванские макаки), овцы, собаки, коровы, домашняя птица, амфибии и рептилии. Если не указано, термины «пациент» и «субъект» используются в данном документе взаимозаменяемо. Термин «яванский макак (супо)» или «макак» в том виде, как он используется в данном документе, относится к *Macaca fascicularis*. В некоторых воплощениях индивид или субъект представляет собой человека.

«Введение» или «обработка», при применении к животным, человеку, экспериментальным субъектам, клеткам, ткани, органам или биологическим жидкостям, относится к контакту экзогенного лекарственного средства, терапевтического средства, диагностического средства или композиции с животными, человеком, субъектами, клетками, тканью, органами или биологическими жидкостями.

Термин «образец» относится к набору жидкостей, клеток или ткани, выделенных из субъекта, а также к жидкостям, клеткам или ткани, присутствующим у субъекта. Типичные образцы представляют собой биологические жидкости (такие как кровь; сыворотка; серозные жидкости; плазма; лимфа; моча; слюна; кистозные жидкости; слезы; секреты; мокрота; секреты слизистых секреторной ткани и органов; вагинальные секреты; асциты; жидкости в плевре, перикарде, брюшной полости, абдоминальной полости и других полостях организма; жидкости, отобранные из бронхиального лаважа; синовиальные жидкости; жидкие растворы, находящиеся в контакте с субъектом или биологическим источником, например, культуральная среда клеток и органов (включающая кондиционированную среду от клеток или органов); жидкости лаважа и тому подобные), образцы биопсии тканей, пункции, полученные при помощи тонкой иглы, хирургически вырезанные ткани, культуры органов или культуры клеток.

Термин «лечение» или «лечить» (и их грамматические вариации) относится к клиническому вмешательству в попытке изменить патологический ход заболевания у индивида, подвергающегося лечению, которое можно проводить либо для профилактики, либо по ходу клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают предупреждение появления или повторного появления заболевания, облегчение симптомов, облегчение/уменьшение любых прямых или опосредованных патологических последствий заболевания, предупреждение метастазов, уменьшение показателя прогрессирования

заболевания, уменьшение интенсивности или облегчение болезненного состояния и регрессирование или улучшение прогноза, но не ограничиваются ими. В некоторых воплощениях антитело по настоящему раскрытию используется для откладывания развития или замедления прогрессирования заболевания.

5 «Эффективное количество» обычно представляет собой достаточное количество для уменьшения тяжести и/или частоты симптомов, устранения симптомов и/или лежащих в основе причин, предупреждения появления симптомов и/или лежащих в их основе причин, и/или уменьшения интенсивности или улучшения повреждения, вызванного болезненным состоянием, или

10 ассоциированного с болезненным состоянием. В некоторых воплощениях эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество. «Терапевтически эффективное количество» представляет собой достаточное количество для

15 лечения болезненного состояния или симптома, в частности, состояния или симптома, ассоциированного с данным болезненным состоянием, или иным образом предупреждения, воспрепятствования, задержки или обращения прогрессирования болезненного состояния или любых других нежелательных

20 симптомов, ассоциированных с данным заболеванием, каким-либо образом. «Профилактически эффективное количество» представляет собой количество, которое, при введении субъекту, будет иметь заданный профилактический эффект, например, предупреждая или задерживая начало (или рецидив) болезненного

25 состояния, или уменьшая вероятность начала (или рецидива) болезненного состояния или ассоциированных симптомов. Полный терапевтический или профилактический эффект не обязательно происходит после введения одной дозы и может происходить после введения серии доз. Таким образом, терапевтически

30 или профилактически эффективное количество можно вводить в одной или более чем одной дозе. «Терапевтически эффективное количество» и «профилактически эффективное количество» может варьировать, в зависимости от целого ряда факторов, таких как болезненное состояние, возраст, пол и масса индивида, и

35 способность терапевтического средства или комбинации терапевтических средств индуцировать желательный ответ у индивида. Типичные индикаторы эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают, например, улучшенное состояние здоровья пациента.

35 II. Описание конкретных воплощений

A. Типичные антитела против DLL3

В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело, которое связывается с DLL3. В одном аспекте предложено выделенное антитело, которое связывается с DLL3. В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело, которое специфично связывается с DLL3.

5 В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

а) антитело против DLL3, связывающееся с человеческим DLL3 или его эпитопом со значением KD, меньшим или равным 3 нМ, меньшим или равным 2 нМ, меньшим или равным 1 нМ, меньшим или равным 0,9 нМ, меньшим или равным 0,8 нМ, меньшим или равным 0,7 нМ, меньшим или равным 0,6 нМ, меньшим или равным 0,5 нМ, или меньшим или равным 0,4 нМ при определении посредством Biacore;

10 б) антитело против DLL3, связывающееся с клетками H1184, экспрессирующими DLL3, с EC50, меньшим или равным 3 нМ, EC50, меньшим или равным 2 нМ, EC50, меньшим или равным 1 нМ, EC50, меньшим или равным 0,5 нМ, EC50, меньшим или равным 0,2 нМ, EC50, меньшим или равным 0,1 нМ, EC50, меньшим или равным 0,09 нМ, EC50, меньшим или равным 0,08 нМ, EC50, меньшим или равным 0,07 нМ, EC50, меньшим или равным 0,06 нМ, при определении посредством FACS; и

20 в) антитело против DLL3, способное к тому, чтобы эндоцитироваться клеткой, экспрессирующей DLL3; и

д) антитело против DLL3, связывающееся с DLL3 или его эпитопом с EC50, меньшим или равным 0,1 нМ (меньшим или равным 0,09 нМ, меньшим или равным 0,08 нМ, меньшим или равным 0,07 нМ, меньшим или равным 0,06 нМ, меньшим или равным 0,05 нМ или меньшим или равным 0,04 нМ) при определении посредством ELISA; и

е) антитело против DLL3, распознающее другой эпитоп DLL3, чем позитивное антитело (например, BI-764532).

30 В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело против DLL3, включающее группу, выбранную из группы, состоящей из следующих:

(i) HCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; (ii) HCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; (iii) HCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; (iv) LCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; (v) LCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и (vi) LCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, где SEQ

ID NO: 57 представлена PLYX₁YGRSYNX₂VAY, где X₁ представляет собой Y или H; X₂ представляет собой A или G; или

- (i) HCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; (ii) HCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; (iii) HCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (iv) LCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; (v) LCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и (vi) LCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело против DLL3, включающее группу, выбранную из группы, состоящей из следующих:

- (i) HCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; (ii) HCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; (iii) HCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; (iv) LCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; (v) LCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и (vi) LCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; или

- (i) HCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; (ii) HCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; (iii) HCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; (iv) LCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; (v) LCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и (vi) LCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; или

- (i) HCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; (ii) HCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; (iii) HCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; (iv) LCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; (v) LCDR2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и (vi) LCDR3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело против DLL3, содержащее данные HCDR в варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 14 и данные LCDR в варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 15; или

содержащее данные HCDR варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 12 и данные LCDR варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 13; или

содержащее данные HCDR варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 52 и данные LCDR варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 15; или

содержащее данные HCDR вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 53 и данные LCDR вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 15.

В некоторых воплощениях данные последовательности CDR получают согласно способам нумерации, хорошо известным в данной области, включающим
5 Kabat, Chothia, IMGT, AbM и контактный, но не ограничиваясь ими.

В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело против DLL3, содержащее:

HCDR1, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 22 или, по сравнению с SEQ ID NO: 22, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

10 HCDR2, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 23 или, по сравнению с SEQ ID NO: 23, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

HCDR3, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 24 или, по сравнению с SEQ ID NO: 24, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

15 LCDR1, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 25 или, по сравнению с SEQ ID NO: 25, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

LCDR2, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 26 или, по сравнению с SEQ ID NO: 26, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты; и

LCDR3, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 27 или, по сравнению с SEQ ID NO: 27, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты.

20 В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело против DLL3, содержащее:

HCDR1, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 22 или, по сравнению с SEQ ID NO: 22, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

25 HCDR2, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 23 или, по сравнению с SEQ ID NO: 23, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

HCDR3, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 30 или, по сравнению с SEQ ID NO: 30, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

LCDR1, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 25 или, по сравнению с SEQ ID NO: 25, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

30 LCDR2, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 26 или, по сравнению с SEQ ID NO: 26, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты; и

LCDR3, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 27 или, по сравнению с SEQ ID NO: 27, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты.

35 В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело против DLL3, содержащее:

HCDR1, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 22 или, по сравнению с SEQ ID NO: 22, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

HCDR2, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 23 или, по сравнению с SEQ ID NO: 23, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

5 HCDR3, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 31 или, по сравнению с SEQ ID NO: 31, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

LCDR1, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 25 или, по сравнению с SEQ ID NO: 25, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

10 LCDR2, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 26 или, по сравнению с SEQ ID NO: 26, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты; и

LCDR3, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 27 или, по сравнению с SEQ ID NO: 27, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты.

В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело против DLL3, содержащее:

15 HCDR1, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 16 или, по сравнению с SEQ ID NO: 16, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

HCDR2, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 17 или, по сравнению с SEQ ID NO: 17, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

20 HCDR3, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 18 или, по сравнению с SEQ ID NO: 18, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

LCDR1, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 19 или, по сравнению с SEQ ID NO: 19, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты;

LCDR2, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 20 или, по сравнению с SEQ ID NO: 20, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты; и

25 LCDR3, последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 21 или, по сравнению с SEQ ID NO: 21, которая содержит 3, 2 или 1 мутацию аминокислоты.

В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело против DLL3, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, в которых:

30 переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно; и

переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27 соответственно.

35 В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело против DLL3, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, в которых:

вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 30, соответственно; и

вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27 соответственно.

5 В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело против DLL3, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, в которых:

вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 31, соответственно; и

10 вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27 соответственно.

В одном аспекте согласно настоящему раскрытию предложено антитело против DLL3, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, в которых:

15 вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно; и

вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21 соответственно.

20 В другом аспекте вариабельная область тяжелой цепи антитела против DLL3 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 50, 51, 52, 53 или 54. В некоторых воплощениях данная последовательность имеет замену (например, консервативную замену), вставку, или делецию, но антитело против DLL3, содержащее данную последовательность, сохраняет способность к связыванию с DLL3. В некоторых воплощениях замена, вставка или делеция происходит в области вне CDR (т.е. в FR).

25 В другом аспекте вариабельная область легкой цепи антитела против DLL3 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 30 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 15, 55 или 56. В некоторых воплощениях данная последовательность имеет замену (например, консервативную замену), вставку, или делецию, но антитело против DLL3, содержащее данную последовательность, сохраняет способность к 35 связыванию с DLL3. В некоторых воплощениях замена, вставка или делеция происходит в области вне CDR (т.е. в FR).

В другом аспекте переменная область тяжелой цепи антитела против DLL3 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 12, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44. В некоторых воплощениях данная последовательность имеет замену (например, консервативную замену), вставку, или делецию, но антитело против DLL3, содержащее данную последовательность, сохраняет способность к связыванию с DLL3. В некоторых воплощениях замена, вставка или делеция происходит в области вне CDR (т.е. в FR).

В другом аспекте переменная область легкой цепи антитела против DLL3 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13, 45, 46, 47, 48 или 49. В некоторых воплощениях данная последовательность имеет замену (например, консервативную замену), вставку, или делецию, но антитело против DLL3, содержащее данную последовательность, сохраняет способность к связыванию с DLL3. В некоторых воплощениях замена, вставка или делеция происходит в области вне CDR (т.е. в FR).

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит переменную область тяжелой цепи, изложенную в любой из SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53 или 54, и/или переменную область легкой цепи, изложенную в любой из SEQ ID NO: 55, 15 или 56.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит переменную область тяжелой цепи, изложенную в любой из SEQ ID NO: 43, 12, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 или 44, и/или переменную область легкой цепи, изложенную в любой из SEQ ID NO: 48, 13, 45, 46, 47 или 49.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит переменную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 14, и/или переменную область легкой цепи, изложенную в любой из SEQ ID NO: 15.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из любой SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53 и 54, и/или переменную область легкой цепи, изложенную в любой из SEQ ID NO: 55 или 56.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит переменную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 12, и/или переменную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 13.

5 В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 43, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 и 44, и/или переменную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 48, 45, 46, 47 и 49.

10 В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит переменную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 55.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит переменную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 43, и переменную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 48.

15 В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи.

В некоторых воплощениях последовательность константной области тяжелой цепи вышеупомянутого антитела против DLL3 изложена в SEQ ID NO: 28.

20 В некоторых воплощениях последовательность константной области легкой цепи вышеупомянутого антитела против DLL3 изложена в SEQ ID NO: 29.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где:

25 тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%-ную идентичность с SEQ ID NO: 60, и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%-ную идентичность с SEQ ID NO: 61; или

30 тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%-ную идентичность с SEQ ID NO: 58, и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%-ную идентичность с SEQ ID NO: 59.

В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 60, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 61.

35 В некоторых воплощениях вышеупомянутое антитело против DLL3 содержит тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 58, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 59.

В. Структура антитела

В некоторых воплощениях предложенное в данном документе антитело представляет собой полноразмерное антитело.

5 В некоторых воплощениях предложенное в данном документе антитело представляет собой фрагмент антитела.

В одном воплощении фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH или F(ab')₂, в частности, фрагмент Fab. «Fab» представляет собой 10 одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1. «Fab» фрагмент» может быть получен папаиновым расщеплением антитела. «Fab» содержит VL, CL, VH и CH1, и также содержит область между доменами CH1 и CH2 таким образом, что может образоваться межцепочечная дисульфидная связь между двумя тяжелыми цепями двух Fab' фрагментов с образованием молекулы F(ab')₂. «Fab'-SH» представляет собой Fab' фрагмент, в котором остатки цистеина 15 константных доменов имеют свободную сульфгидрильную группу. «F(ab')₂» представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab фрагмента, связанных дисульфидной связью в шарнирной области.

В другом воплощении фрагмент антитела представляет собой диатело, триатело или тетратело. Диатела представляют собой фрагменты антитела, 20 имеющие два антигенсвязывающих сайта. Данный фрагмент содержит VH и VL, связанные в той же самой полипептидной цепи (VH-VL). Посредством применения линкера, который является слишком коротким для обеспечения образования пары между двумя доменами на той же самой цепи, данные домены принуждаются образовать пару с комплементарными доменами другой цепи, приводя, 25 посредством этого, к двум антигенсвязывающим сайтам. Два данных антигена могут быть одинаковыми или разными. В другом воплощении фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный Fab фрагмент. «Одноцепочечный Fab фрагмент» или «scFab» представляет собой полипептид, состоящий из VH, CH1, VL, CL и линкера, где данные домены и линкер имеют один из следующих 30 порядков в направлении от N-конца к C-концу: а) VH-CH1-линкер-VL-CL, б) VL-CL-линкер-VH-CH1, в) VH-CL-линкер-VL-CH1 или д) VL-CH1-линкер-VH-CL. В одном воплощении данный линкер представляет собой полипептид из по меньшей мере 30 аминокислот. В другом воплощении данный линкер представляет собой полипептид из 32-50 аминокислот. Одноцепочечный Fab фрагмент 35 стабилизируется посредством природной дисульфидной связи между CL и CH1. Кроме того, данные одноцепочечные Fab молекулы могут быть дополнительно

стабилизированы посредством образования межцепочечных дисульфидных связей посредством вставки остатков цистеина (например, положение 44 в вариательной области тяжелой цепи и положение 100 в вариательной области легкой цепи согласно нумерации Kabat).

5 В другом воплощении фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный вариательный фрагмент (scFv). «scFv» представляет собой слитый белок, содержащий по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариательную область легкой цепи, и по меньшей мере один
10 фрагмент антитела, содержащий вариательную область тяжелой цепи, где данные вариательные области легкой и тяжелой цепи смежно связываются коротким гибким полипептидным линкером и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида, и где данный scFv сохраняет специфичность интактного антитела, от которого он происходит. Если конкретно не указано, scFv может иметь вариательные области VL и VH в любом приведенном в данном
15 документе порядке; например, по отношению с N-концу и C-концу полипептида, данный scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

В другом воплощении фрагмент антитела представляет собой Fd фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1.

20 В другом воплощении фрагмент антитела представляет собой Fv фрагмент, состоящий из доменов VH и VL одной ручки антитела.

В другом воплощении фрагмент антитела представляет собой dsFv, полученный связыванием полипептидов, в которых один аминокислотный остаток каждой VH и VL заменен остатком цистеина, посредством дисульфидной связи между данными остатками цистеина. Аминокислотные остатки, замененные
25 остатками цистеина, могут быть выбраны согласно известным способам (Protein Engineering, 7:697 (1994)) на основе предсказания трехмерной структуры антитела.

В другом воплощении фрагмент антитела представляет собой однодоменное антитело. Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь вариательный домен тяжелой цепи антитела или его
30 часть, или весь вариательный домен легкой цепи антитела или его часть.

В другом воплощении фрагмент антитела представляет собой доменное антитело (dAb); см., например, патент США № 6248516. Доменные антитела (dAb) представляют собой функциональные связывающие домены антител, соответствующие вариательным областям тяжелой (VH) или легкой (VL) цепей
35 человеческих антител. dAb имеют молекулярную массу примерно 13 кДа - или меньше, чем одна десятая размера интактного антитела. dAb хорошо

экспрессируются у целого ряда хозяев, включая бактериальные, дрожжевые клеточные системы и клеточные системы млекопитающих. Кроме того, dAb являются высокостабильными и сохраняют активность даже после подвергания жестким условиям, таким как лиофилизация или тепловая денатурация. См., например, патенты США 6291158; 6582915; 6593081 и 6172197; серийный № США 2004/0110941; европейский патент 0368684; патент США 6696245; WO04/058821; WO04/003019 и WO03/002609.

В некоторых воплощениях предложенное здесь антитело представляет собой химерное антитело. В одном примере химерное антитело содержит 10 переменную область, не являющуюся человеческой (например, переменную область, происходящую от мыши, крысы, хомяка, домашнего кролика или примата, не являющегося человеком, такого как обезьяна), и человеческую константную область. В другом примере химерное антитело представляет собой антитело «с переключением класса», в котором класс или подкласс был изменен от класса или 15 подкласса родительского антитела.

В некоторых воплощениях указанное антитело представляет собой гуманизованное антитело. Типично антитела, не являющиеся человеческими, гуманизируют для уменьшения иммуногенности для человека при сохранении 20 специфичности и аффинности родительского антитела, не являющегося человеческим. Обычно гуманизованное антитело содержит одну или более чем одну переменную область, в которой CDR или их части происходят из антитела, не являющегося человеческим, и FR или их части происходят из человеческого антитела. Возможно гуманизованное антитело также будет содержать часть человеческой константной области. В некоторых воплощениях некоторые остатки 25 FR в гуманизованном антителе могут быть заменены соответствующими остатками из антитела, не являющегося человеческим (например, антитела, которое предоставляет последовательности CDR).

Обзор гуманизованных антител и способов их получения приводится, например, в Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) и 30 дополнительно описывается, например, в Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); патентах США № 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (описывающей пересадку области, определяющей специфичность (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (описывающей «изменение поверхности»); Dall' 35 Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (описывающей «перетасовку FR») и Osbourn

et al., *Methods* 36:61-68 (2005) и Klimka et al., *Br. J. Cancer* 83:252-260 (2000) (описывающей способ «направленной селекции» для перетасовки FR).

Человеческие каркасные области, которые можно использовать для гуманизации, включают каркасные области, выбранные с использованием способа «наилучшей аппроксимации» (см., например, Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасные области, происходящие от консенсусной последовательности человеческих антител конкретной подгруппы переменных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); и Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); человеческие зрелые (подвергнувшиеся соматической мутации) каркасные области или каркасные области человеческой зародышевой линии (см., например, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные посредством скрининга библиотек FR (см., например, Vasa et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) и Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)), но не ограничиваются ими.

С. Модификация антител

В некоторых воплощениях охватываются варианты аминокислотной последовательности предложенного в данном документе антитела. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены введением подходящих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или посредством пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции из и/или вставки в, и/или замены остатков в пределах аминокислотной последовательности антитела. Можно делать любую комбинацию делеций, вставок и замен с получением конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желательными характеристиками, например, связывания антигена.

а) Варианты с заменой, вставкой и делецией

В некоторых воплощениях предложены варианты антител, имеющие одну или более чем одну аминокислотную замену. Интересующие положения мутагенеза путем замен включают CDR и FR. Консервативные замены показаны в Таблице 2 под заголовком «Предпочтительная замена». Более существенные изменения приводятся в Таблице 2 под заголовком «Типичная замена» и, как дополнительно описано ниже, со ссылкой на классы боковых цепей аминокислот. В интересующее антитело можно вводить аминокислотные замены и подвергать

скринингу продукты на желательную активность, например, сохраняющееся/улучшенное связывание антитела, пониженную иммуногенность или улучшенную ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) или CDC (комплементзависимая цитотоксичность).

5

Таблица 2

Исходный остаток	Типичная замена	Предпочтительная замена
Ala(A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp(D)	Glu; Asn	Glu
Cys(C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu(E)	Asp; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu(L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys(K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met(M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Согласно свойствам обычных боковых цепей аминокислоты могут быть сгруппированы следующим образом:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 - (2) нейтральные, гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 - (3) кислотные: Asp, Glu;
 - (4) основные: His, Lys, Arg;
 - (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
 - (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.
- 15 Неконсервативные замены будут включать замену члена одного из данных классов на члена другого класса.

В некоторых воплощениях замены, вставки или делеции могут происходить в пределах одной или более чем одной CDR при условии, что такие изменения по существу не уменьшают способности антитела к связыванию антигена. Например,

в CDR могут быть сделаны консервативные изменения (например, консервативные замены, как предложено в данном документе), которые не уменьшают существенно аффинность связывания. Такие замены, например, могут находиться в CDR вне остатков, контактирующих с антигеном. В некоторых воплощениях предложенных выше вариантов последовательностей VH и VL каждая CDR является незаряженной или содержит не больше, чем 1, 2 или 3 аминокислотные замены.

Полезный способ осуществления идентификации остатков или областей антитела, которые можно использовать в качестве мишеней для мутагенеза, называется «аланиновым сканирующим мутагенезом», как описано в Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. В данном способе идентифицируют остаток или группу остатков (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, Ala или полиаланином) для определения того, подвергается ли влиянию взаимодействие антитела с антигеном. Дальнейшие замены можно вводить в положения аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к исходным заменам. Кроме того, для идентификации контактных точек между антителом и антигеном можно исследовать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело. Данные контактные остатки и соседние остатки могут служить мишенью или быть устранены в качестве кандидатов на замену. Варианты можно подвергать скринингу для определения того, имеют ли они желательные свойства.

Вставки в аминокислотную последовательность включают амино- и/или карбоксиконцевые слияния, варьирующие по длине от 1 остатка до полипептидов из 100 или больше, чем 100 остатков, и вставки внутри последовательности одиночных или многих аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие вставочные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом или полипептидом, который увеличивает период полувыведения антитела в сыворотке.

30 b) модификации области Fc

В некоторых воплощениях в область Fc предложенного в данном документе антитела может быть введена одна или более чем одна аминокислотная модификация.

В некоторых воплощениях одна или более чем одна аминокислотная модификация может уменьшать связывание Fc с рецептором Fc, например, его связывание с рецептором Fc γ , и уменьшать или устранять эффекторную функцию.

В некоторых воплощениях генетически модифицированная область Fc демонстрирует не меньше, чем 50%-ное, 80%-ное, 90%-ное или 95%-ное уменьшение в аффинности связывания в отношении рецептора Fc по сравнению с природной областью Fc. В некоторых воплощениях рецептор Fc представляет собой человеческий рецептор Fc γ , например, Fc γ RI, Fc γ RIIa или Fc γ RIIIa. В некоторых воплощениях генетически модифицированная область Fc также имеет пониженную аффинность связывания в отношении комплемента (например, C1q) по сравнению с природной областью Fc. В некоторых воплощениях генетически модифицированная область Fc имеет повышенную аффинность связывания в отношении неонатального рецептора Fc (FcRn) по сравнению с природной областью Fc; например, в область Fc вводятся мутации M252Y/S254T/T256E. В некоторых воплощениях генетически модифицированная область Fc имеет пониженные эффекторные функции, которые могут включать одно или более чем одно из следующего: пониженная комплементзависимая цитотоксичность (CDC), пониженная антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), пониженная секреция цитокинов, пониженное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, пониженное связывание с NK-клетками, пониженное связывание с макрофагами, пониженное связывание с моноцитами, пониженное связывание с полиморфоядерными клетками, пониженный апоптоз, индуцированный прямой сигнализацией, пониженное созревание дендритных клеток и пониженное примирование T-клеток, но не ограничивается ими. Для области Fc IgG₁ замены аминокислотных остатков в таких положениях, как положения 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329, могут уменьшать эффекторные функции. В некоторых воплощениях область Fc представляет собой область Fc человеческого IgG₁, и аминокислотные остатки в положениях 234 и 235 представляют собой A при нумерации согласно индексу EU. Для области Fc IgG₄ замены аминокислотного остатка в таких положениях, как положение 228, могут уменьшать эффекторные функции.

В некоторых воплощениях указанное антитело содержит одну или более чем одну аминокислотную замену, которая улучшает ADCC, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 (с использованием схемы нумерации EU) области Fc.

В некоторых воплощениях домен Fc описанного в данном документе антитела содержит мутации типа «выступ по впадину». «Выступ по впадину» представляет собой стратегию дизайна для конструирования гомодимеров тяжелой цепи антитела для гетеродимеризации (например, для эффективного

получения биспецифичных антител, мультиспецифичных антител и одноруких антител). В общем, такая технология включает введение выпуклости («выступ») на поверхности контакта первого полипептида (такого как первый домен СНЗ в тяжелой цепи первого антитела) и соответствующей полости («впадина») на поверхности контакта второго полипептида (такого как второй домен СНЗ в тяжелой цепи второго антитела) таким образом, что данная выпуклость может быть расположена в данной полости таким образом, чтобы стимулировать образование гетеродимера и препятствовать образованию гомодимера. Выпуклости конструируют посредством замены маленьких боковых цепей аминокислот в поверхности контакта первого полипептида (такого как первый домен СНЗ в тяжелой цепи первого антитела) большими боковыми цепями (например, аргинин, фенилаланин, тирозин или триптофан). Компенсаторные полости идентичного или аналогичного выпуклостям размера создают на поверхности контакта второго полипептида (такого как второй домен СНЗ в тяжелой цепи второго антитела) посредством замены больших боковых цепей аминокислот меньшими боковыми цепями (например, аланин, серин, валин или треонин). Выпуклости и полости могут быть созданы изменением нуклеиновой кислоты, кодирующей данные полипептиды (например, посредством сайтнаправленного мутагенеза) или посредством пептидного синтеза. В некоторых воплощениях модификация по типу выступа содержит аминокислотную замену T366W в одной из двух субъединиц домена Fc, и модификация по типу впадины содержит аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V в одной другой из двух субъединиц домена Fc. В некоторых воплощениях субъединица домена Fc, содержащая модификацию по типу выступа, дополнительно содержит аминокислотную замену S354C, и субъединица домена Fc, содержащая модификацию по типу впадины, дополнительно содержит аминокислотную замену Y349C. Введение двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами области Fc, таким образом, дополнительно стабилизируя данный димер (Carter, *J. Immunol. Methods* 248:7-15 (2001)).

Типичные комбинации мутаций типа «выступ во впадину» включают мутации, показанные в Таблице 3, но не ограничиваются ими.

Таблица 3

мономер Fc 1	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L368A Y407V	T394W Y407T	T394W Y407A	T366W T394S
мономер Fc 2	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A

5 Подробности относительно технологии «выступ во впадину» описываются, например, в патенте США № 5731168; патенте США № 7695936; WO 2009/089004; US 2009/0182127; Marvin and Zhu, *Acta Pharmacologica Sincia* (2005) 26(6):649-658; Kontermann, *Acta Pharmacologica Sincia* (2005) 26:1-9; Ridgway et al., *Prot Eng* 9:617-621 (1996) и Carter, *J Immunol Meth* 248:7-15 (2001).

10 С-конец области Fc может представлять собой интактный С-конец, заканчивающийся аминокислотными остатками PGK, или усеченный С-конец, например, усеченный С-конец, в котором один или два С-концевых аминокислотных остатка были удалены. В предпочтительном аспекте С-конец тяжелой цепи представляет собой усеченный С-конец, заканчивающийся PG. Таким образом, в некоторых воплощениях композиция интактных антител может содержать популяции антител со всеми удаленными остатками K447 и/или G446 + K447. В некоторых воплощениях композиция интактных антител может содержать популяции антител без удаленных остатка K447 и/или G446 + K447. В некоторых воплощениях композиция интактных антител содержит смесь антител с остатками K447 и/или остатками G446 + K447 или без них.

D. Рекомбинантный способ

20 Антитела против DLL3 могут быть получены с использованием способов генной инженерии. Для данных способов предоставляется одна или более чем одна выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая данные антитела.

25 В одном воплощении согласно настоящему раскрытию предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая вышеупомянутое антитело. Каждая из таких нуклеиновых кислот может независимо кодировать любую одну из вышеупомянутых полипептидных цепей. В другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложен один или более чем один вектор (например, экспрессионный вектор), содержащий такие нуклеиновые кислоты. В другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложена клетка-хозяин, содержащая такие нуклеиновые кислоты. В одном воплощении предложен способ получения антитела против DLL3, где данный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как предложено выше, при подходящих условиях для экспрессии и, возможно, отбор антитела из данной клетки-хозяина (или среды клетки-хозяина).

35 Для рекомбинантной продукции антитела нуклеиновую кислоту, кодирующую указанное антитело, выделяют и вставляют в один или более чем один вектор для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине.

Такие нуклеиновые кислоты можно легко выделять и секвенировать с использованием традиционных методик или продуцировать способами генной инженерии, или получать химическим синтезом.

5 Подходящие клетки-хозяева для клонирования или осуществления экспрессии вектора, кодирующего антитело, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в данном документе. Например, его можно продуцировать в бактерии, в частности, когда не нужны гликозилирование и эффекторные функции Fc. После экспрессии оно может быть выделено из клеточной пасты бактерий в растворимой фракции и может быть дополнительно
10 очищено.

Е. Анализы

Предложенный в данном документе полипептид или конъюгат может быть идентифицирован, подвергнут скринингу или охарактеризован на их
15 физические/химические характеристики и/или биологические активности посредством целого ряда анализов, известных в данной области. В одном аспекте активность полипептида или конъюгата по настоящему раскрытию анализируют, например, известными способами, такими как ELISA (твёрдофазный иммуноферментный анализ), вестерн-блоттинг и тому подобные.

20

Ф. Способ лечения и путь введения

Любые из вышеупомянутых антител против DLL3, содержащих их конъюгатов антитело-лекарственное средство или их фармацевтически приемлемых солей, предложенных в данном документе, можно использовать для
25 лечения заболевания.

В одном аспекте в настоящем раскрытии предложено применение антитела против DLL3, содержащего его конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства. В некоторых воплощениях в настоящем раскрытии предложено применение
30 антитела против DLL3, содержащего его конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения опухоли или рака. В некоторых воплощениях данная опухоль или рак включает следующие: рак легкого (например, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого и крупноклеточный рак легкого), плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак головы и шеи, рак мозга, нейроглиома, мультиформная глиобластома, нейробластома, рак центральной
35

нервной системы, нейроэндокринная опухоль, рак глотки, плоскоклеточная карцинома глотки, плоскоклеточная карцинома полости рта, рак носоглотки, рак пищевода, рак щитовидной железы (например, медуллярный рак щитовидной железы), злокачественная плевральная мезотелиома, рак молочной железы (например, тройной негативный рак молочной железы), рак печени, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, желудочно-кишечный рак, рак кишечника, колоректальный рак (например, рак толстой кишки и рак прямой кишки), рак почки, светло-клеточный почечно-клеточный рак, рак яичника, рак эндометрия, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак простаты, рак яичка, рак надпочечника, глиобластома, рак кожи и меланома, но не ограничивается ими; предпочтительно данная опухоль или рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого.

В некоторых воплощениях в настоящем раскрытии предложено применение антитела против DLL3, содержащего его конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с DLL3.

В одном таком воплощении указанное применение дополнительно включает введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства (например, одного, двух, трех, четырех, пяти или шести дополнительных терапевтических средств).

В еще одном другом аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против DLL3 или его конъюгат с лекарственным средством, например, для любого из приведенных выше фармацевтических применений или способов лечения. В одном воплощении данная фармацевтическая композиция содержит любой из предложенных в данном документе полипептидов или конъюгатов с лекарственным средством и фармацевтически приемлемый носитель. В другом воплощении данная фармацевтическая композиция также содержит по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

Антитело против DLL3 или его конъюгат с лекарственным средством по настоящему раскрытию можно использовать одни или в комбинации с другими средствами для лечения. Например, антитело по настоящему раскрытию можно вводить совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством.

Антитело против DLL3 или его конъюгат с лекарственным средством по настоящему раскрытию можно вводить любым подходящим способом, включающим парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение и, если

требуется для локального лечения, введение в область поражения. Парентеральная инфузия включает внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Введение может осуществляться любым подходящим путем, например, посредством инъекции, такой как внутривенная или подкожная инъекция, отчасти в зависимости от того, является ли введение кратковременным или долговременным. В данном документе рассматриваются разные схемы введения, включающие однократное введение или многократные введения во многие моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию, но не ограничивающиеся ими.

Антитело против DLL3 или его конъюгат с лекарственным средством по настоящему раскрытию будут приготовлены, введены и применены способом, согласующимся с надлежащей медицинской практикой. Рассматриваемые в данном контексте факторы включают конкретное расстройство, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние индивидуального пациента, причину расстройства, место доставки данного средства, способ введения, время введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело против DLL3 или его конъюгат с лекарственным средством может быть приготовлено совместно с одним или более чем одним средством. Эффективное количество таких дополнительных агентов зависит от количества, присутствующего в фармацевтической композиции, типа расстройства или лечения и других факторов. Они обычно используются в тех же самых дозировках и с использованием таких же путей введения, как описано в данном документе, или примерно от 1% до 99% от описанных в данном документе дозировок, или в других дозировках, и посредством любого пути, эмпирически/клинически определенного как подходящий.

Для предупреждения или лечения заболевания подходящая дозировка антитела против DLL3 или его конъюгата с лекарственным средством по настоящему раскрытию (при использовании одиночно или в комбинации с одним или более чем одним другим дополнительным терапевтическим средством) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа терапевтической молекулы, тяжести и течения заболевания, того, вводится ли данная терапевтическая молекула для предупредительных или терапевтических целей, предыдущей терапии, клинической истории пациента, ответа на терапевтическую молекулу и решения лечащего врача. Данную терапевтическую молекулу подходящим образом вводят пациенту за одну обработку или серию обработок.

Г. Продукт

В другом аспекте настоящего раскрытия предложен продукт (например, коробка с лекарственным средством), содержащий полезные вещества для лечения, предупреждения и/или диагностики приведенных выше расстройств.

5 Данный продукт содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш в упаковке, находящиеся на контейнере или ассоциированные с контейнером. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, мешки с в.в. (внутривенный) раствором и тому подобное. Данный контейнер может быть образован из целого ряда материалов, таких как стекло или пластмасса.

10 Данный контейнер содержит антитело против DLL3 или его конъюгат с лекарственным средством по настоящему раскрытию, одни или в комбинации с другой композицией. Данный контейнер может иметь стерильный порт доступа (например, данный контейнер может быть мешком с внутривенным раствором или флаконом с пробкой). По меньшей мере одно активное средство в данной
15 композиции представляет собой антитело против DLL3 или его конъюгат с лекарственным средством по настоящему раскрытию. На этикетке или листке-вкладыше в упаковке указано то, что данная композиция используется для лечения выбранного состояния.

Кроме того, данный продукт может содержать: (а) первый контейнер, содержащий антитело против DLL3 или его конъюгат с лекарственным средством;
20 и (б) второй контейнер, содержащий композицию, где данная композиция содержит дополнительное цитотоксическое средство или иное терапевтическое средство.

Альтернативно или дополнительно данный продукт может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер. С коммерческой и пользовательской точки зрения он может
25 дополнительно содержать другие материалы, по необходимости, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

ПРИМЕРЫ

30 Настоящее раскрытие дополнительно описано ниже со ссылкой на примеры, но данные примеры не предназначены для того, чтобы ограничивать объем настоящего изобретения.

Экспериментальные способы без конкретных условий, указанных в
35 примерах или примерах испытаний по настоящему раскрытию, обычно проводили при традиционных условиях или условиях, рекомендованных изготовителем

исходных веществ или имеющихся в продаже продуктов. См. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Greene Publishing Association, Wiley Interscience, NY. Реактивы без указания конкретного происхождения представляют собой имеющиеся в продаже традиционные реактивы.

I. Получение антител

Пример 1: получение антигенов DLL3, белков для выявления и штаммов стабильно трансфицированных клеток

10 Клетки яичника китайского хомяка CHO-s (Invitrogen, R80007) трансфицировали генами DLL3 других видов и человеческими генами DLL1 и DLL4 для конструирования штаммов клеток CHO-s, экспрессирующих белки DLL3 из других видов для последующего скрининга и идентификации антител. Аминокислотные последовательности родственных белков были следующими:

15 Человеческий полноразмерный белок DLL3 (Uniprot, Q9NYJ7):

MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARLP
 CRLFFRVCLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFR
 DAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWEL
 RFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPE
 20 HGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCA
 NGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHC
 PPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAG
 RACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVCA
 ACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALL
 25 LVHVRRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSSVDWNRPED
 VDPQGIYVISAPSIYAREVATPLFPPLHTGRAGQRQHLLFPYPSSILSVK

SEQ ID NO: 1

Полноразмерный белок DLL3 яванского макака (Uniprot, A0A2K5WSR4):

MVSPRMSRLLSQTIVILALIFIPQARPAGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARGP
 30 CRLFFRVCLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLLQVPFRD
 AWPGTFSLIETWREELGDQIGGPAWSLLARVTRRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRF
 SYRARCELPAVGTACTRLCRPRSAPSRGPGLRPCAPLEDECEAPPVCRAGCSLEHG
 FCEQPGECRCLEGWTGPLCMVPVSTSSCLGLRGPSSSTTTGCLVPGPGPCDGNPCAN
 GGSCSETPGSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCP
 35 PGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGR
 ACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRNCRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVCA

CAPGYMGARCEFPVHPDGVSALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLL
 VHVRRRGHAQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGPGDVPSSSSVDWNRPEDV
 DSRGIYVISAPSIYAREVAMPLFPPLHTGRAGQRQNLLFPFPSSILSVK

SEQ ID NO: 2

5 Крысиный полноразмерный белок DLL3 (Uniprot, O88671):

MVSLQVSSLPQTLILAFLLPQALPAGVFELQIHSFGPGPGTTPRSPCNARGPC
 RLFFRVCLKPGVSQEAESLCALGAALSTSGPVYTEQPGVPAALSLPDGLVRVPFLDA
 WPGTFSLIETWREQLGERAAGPAWNLLARVAGRRRLAAGAPWARDVQRTGAWELHF
 SYRARCEPPAVGAACARLCRSRSAPSRGPGLRPCTPFPEDECEAPRESLTVCRAGCS
 10 PEHGYCEEPDECHCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLNSRVSGPAGTGCLLPGPGPCDGNP
 CANGGSCSETPGSFECACPRGFYGPRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGEDPDSAYV
 CHCPPAFQGSNCERRVDRCSLQPCQNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDLDD
 CAGRACANGGTCVEGGGARRCSCALGFGGRDCRERADPCASRPCAHGGRCYAHFS
 GLVCACAPGYMGVRCEFAVRPDGADAVPAAPRGLRQADSQRFLPPALGLLAAAALA
 15 GAALLLIHVRRRGPRDGTGTRLLSGTREPSVHTLDPALNNLRLQDGAGDGPTSSADWN
 HPEDGDSRSIYVIPAPSIYAREA

SEQ ID NO: 3

Мышиный полноразмерный белок DLL3 (Uniprot, O88516):

MVSLQVSPLSQTILILAFLLPQALPAGVFELQIHSFGPGPLGTTPRSPCNARGPC
 20 RLFFRVCLKPGVSQEATESLCALGAALSTSVPVYTEHPGESAAALPLPDGLVRVPFRDA
 WPGTFSLVIETWREQLGEHAGGPAWNLLARVVGRRRLAAGGPWARDVQRTGTWELH
 FSYRARCEPPAVGAACARLCRSRSAPSRGPGLRPCTPFPEDECEAPSVCRPGCSPEH
 GYCEEPDECRCLGWTGPLCTVPVSTSSCLNSRVPGPASTGCLLPGPGPCDGNPCAN
 GGSCSETSGSFECACPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGEDPDSAYVCHC
 25 PPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCQNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDLDCAG
 RACANGGTCVEGGGSRRCSCALGFGGRDCRERADPCASRPCAHGGRCYAHFSGLVC
 ACAPGYMGVRCEFAVRPDGADAVPAAPRGLRQADPQRFLPPALGLLVAAGLAGAALL
 VIHVRRRGPGQDTGTRLLSGTREPSVHTLDPALNNLRLQDGAGDGPSSSADWNHPED
 GDSRSIYVIPAPSIYAREDWLIQVLF

30 SEQ ID NO: 4

Человеческий полноразмерный белок DLL1 (Uniprot, O00548):

MGSRCALALAVLSALLCQVWSSGVFELKLQEFVNKKGLLGNRNCCRGGAGPP
 PCACRTFFRVCLKHYQASVSPEPPCTYGSAVTPVLGVDSFSLPDGGGADSAFNSPIRF
 PFGFTWPGTFSLIIEALHTDSPDDLATENPERLISRLATQRHLTVGEEWSQDLHSSGRT
 35 DLKYSYRFVCDHEHYGEGCSVFCRPRDDAFGHFTCGERGEKVCNPGWKGPYCTEPIK
 LPGCDEQHGFCDKPGECKCRVGWQGRYCDECIRYPGCLHGTCQQPWQCNCQEGW

GGLFCNQDLNYCTHHKPCNGATCTNTGQGSYTCSCRPGYTGATCELGIDECDPSPC
 KNGGSCTDLENSYSCTCPPGFYGGKICELSAMTCADGPCFNGGRCSDSPDGGYSCRCP
 VGYSGFNCEKKIDYCSSSPCSNGAKCVDLGDAYLCRCQAGFSGRHCCDDNVDDCASSP
 CANGGTCDRGVNDFSCCTPPGYTGRNCSAPVSRCEHAPCHNGATCHERGHRYVCEC
 5 ARGYGGPNCQFLLPELPPGPAVVDLTEKLEGQGGPFPWVAVCAGVILVLMLLLGC
 AAVVVCVRLRLQKHRPPADPCRGETETMNNLANCQREKDISVSIIGATQIKNTNKKADFHGD
 HSADKNGFKARYPAVDYNLVQDLKGDDTAVRDAHSKRDTKCQPQSSGEEKGTPTTL
 RGGEASERKRPDSGCSTSKDTKYQSVYVISEEKDECVIATEV

SEQ ID NO: 5

10 Человеческий полноразмерный белок DLL4 (Uniprot, Q9NR61):
 MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGLASGRPCEP
 GCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFT
 WPGTFSLIIEAWHAPGDDLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYS
 YRVICSDNYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCH
 15 EQNGYCSKPAECLCRPGWQGRCLNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCD
 QDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYCTCRPGYTGVDCELELSECDNSNPCRNGGS
 CKDQEDGYHCLCPPGYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNF
 TGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCA
 HGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFNCRATCYTDLSTDTFVCNC
 20 PYGFVGSRCFEPVGLPPSFPWVAVSLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSRE
 AMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQQKELEVDCGLDKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGR
 GTMPGKFPHSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATE
 V

SEQ ID NO: 6

25

1.1. Конструирование клеточных штаммов, высокоэкспрессирующих DLL3, DLL1 и DLL4

30 Плазмиду лентивирусного экспрессионного вектора pCDH, содержащую
 SEQ ID NO: 1-6 (синтезированы GENEWIZ), наряду с лентивирусным упаковочным
 вектором pVSVG или pCMV, трансфицировали в клетки 293T (Клеточный банк
 Китайской академии наук, GNHu17) с использованием Lipofectamine 3000
 (Invitrogen, L3000015). Супернатанты среды, содержащей вирус, отбирали,
 фильтровали и подвергали ультрацентрифугированию. После отбрасывания
 супернатантов осуществляли ресуспендирование в 0,2 мл стерильного PBS
 35 (фосфатно-солевой буферный раствор). Концентрированные вирусы затем
 использовали для инфицирования клеток яичника китайского хомяка CHO-s

(Invitrogen, R80007), DMS53 (ATCC (Американская коллекция типовых клеточных культур), CRL-2062) и H82 (ATCC, HTB-175). После двух-трех недель скрининга с пуромицином проводили сортировку одиночных клеток FACS. Отобранные штаммы моноклональных клеток размножали и криоконсервировали.

5

1.2. Получение антигенов

Последовательности человеческого DLL3 (Uniprot, Q9NYJ7), DLL3 яванского макака (Uniprot, A0A2K5WSR4) и мышиноного DLL3 (Uniprot, O88516) использовали в качестве матриц для конструирования слитых белков ECD (внеклеточный домен) DLL3, содержащих разные метки, и данные слитые белки клонировали в векторы рТТ5. После экспрессии клетками 293Е получали антигены. Аминокислотные последовательности родственных белков были следующими:

1) His-hDLL3(ECD):

METDTTTTLLWVLLLWVPGSTGHHHHHHHHHHGGGGGSGGGGSAGVFELQIHSE
15 GPPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPG
APAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRLAA
GGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRGPGPLRPCAPLE
DECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATT
GCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNG
20 GLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRA
GFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAAR
PCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL

SEQ ID NO: 7

Примечание: последовательность сигнального пептида выделена пунктирной линией; His метка и линкер подчеркнуты одной линией; а внеклеточная область DLL3 подчеркнута двумя линиями.

2) Fc-hDLL3(ECD):

METDTTTTLLWVLLLWVPGSTGEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD
30 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSAGVFELQIHSEFGPGPGAPRSPCS
ARLPCRLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQV
PFRDAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRLAAGGPWARDIQRAGA
35 WELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRGPGPLRPCAPLEDECEAPLVCRAGC
SPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGN

PCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYI
CHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDD
CAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFS
GLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL

5

SEQ ID NO: 8

Примечание: последовательность сигнального пептида выделена пунктирной линией; Fc метка и линкер подчеркнуты одной линией; а внеклеточная область DLL3 подчеркнута двумя линиями.

3) hDLL3(ECD)-strep twin:

10

METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARLPCRLF
FRVCLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWP
GTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYR
ARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCE
QPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGS
CSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGF
QGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACA
NGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVCACAP
GYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLWSHPQFEKGGGSGGGSGGSA
WSHPQFEK

15

20

SEQ ID NO: 9

Примечание: последовательность сигнального пептида выделена пунктирной линией; внеклеточная область DLL3 подчеркнута двумя линиями; а strep twin метка подчеркнута один раз.

4) cynoDLL3(ECD)-strep twin:

25

METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARGPCRLF
FRVCLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLLQVPFRDAWP
GTFSLIETWREELGDQIGGPAWSLLARVTRRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYR
ARCELPAVGTACTRLCRPRSAPSRCPGLRPCAPLEDECEAPPVCRAGCSLEHGFCE
QPGECRCLEGWTGPLCMVPVSTSSCLGLRGPSTTTGCLVPGPGPCDGNPCANGGS
CSETPGSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGF
QGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACA
NGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRNCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVCACAP
GYMGARCEFPVHPDGVSAALPAAPPGLRPGDPQRYLWSHPQFEKGGGSGGGSGGSA
WSHPQFEK

30

35

SEQ ID NO: 10

Примечание: последовательность сигнального пептида выделена пунктирной линией; внеклеточная область DLL3 подчеркнута двумя линиями; a strep twin метка подчеркнута один раз.

5) mouDLL3(ECD)-strep twin:

5 METDTLLLWVLLLVPGSTGAGVFELQIHSFGPGPLGTPRSPCNARGPCRLF
FRVCLKPGVSQEATESLCALGAALSTSVPVYTEHPGESAAALPLPDGLVVRVFRDAWP
GTFSLVIETWREQLGEHAGGPAWNLLARVVGRRRLAAGGPWARDVQRTGTWELHFS
YRARCEPPAVGAACARLCRSRSAPSRCGPGLRPCTPFPECEAPSVCRPGCSPEHGY
CEEPDECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLNSRVPGPASTGCLLPGPGPCDGNPCANGG
10 SCSETSGSFECACPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGEDPDSAYVCHCPP
GFQGSNCEKRVDRCSLQPCQNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRA
CANGGTCVEGGGSRRCSCALGFGRDCRERADPCASRPCAHGGRCYAHFSGLVACAC
APGYMGVRCFAVRPDGADAVPAAPRGLRQADPQRFLWSHPQFEKGGGSGGGSGG
SAWSHPQFEK

15

SEQ ID NO: 11

Примечание: последовательность сигнального пептида выделена пунктирной линией; внеклеточная область DLL3 подчеркнута двумя линиями; a strep twin метка подчеркнута один раз.

20 **Пример 2: получение мышинных моноклональных антител против человеческого DLL3**

1. Иммунизация

Моноклональные антитела против человеческого DLL3 получали иммунизацией мышей. Лабораторные мыши SJL, самки, в возрасте 6-8 недель (Shanghai SLAC Laboratory Animal Co., Ltd., номер лицензии на разведение животных: SCXK(Shanghai)2017-0005). Среда для содержания: SPF (не содержащие специфических патогенов). Приобретенных мышей содержали в лабораторном окружении в течение 1 недели с циклом 12/12 часов света/темноты при температуре 20-25°C с влажностью 40-60%. Акклиматизированных мышей иммунизировали согласно следующей схеме.

30

Схема иммунизации:

Иммунизирующим антигеном для первой группы мышей был His-hDLL3(ECD) (SEQ ID NO: 7). Перекрестные иммунизации проводили с использованием адъювантов TiterMax® Gold Adjuvant (Sigma кат. № T2684) и Thermo Imject® Alum (Thermo кат. № 77161). Отношение антигена к адъюванту TiterMax® Gold Adjuvant составляло 1:1, и отношение антигена к адъюванту Thermo

35

Imject® Alum составляло 3:1. Доза для первой иммунизации составляла 50 мкг/мышь/иммунизацию, и доза для бустерной иммунизации составляла 25 мкг/мышь/иммунизацию. Антиген эмульгировали до инокуляции. Инокуляции осуществляли в сутки 0, 7, 14 и 21. Кровь отбирали в сутки 7 и 21, и сыворотку мышей анализировали на титр антител посредством ELISA. После 4-ой иммунизации мышей, у которых титр антител в сыворотке был высоким и имел тенденцию к выходу на плато, отбирали для слияния спленоцитов. Бустерные иммунизации проводили за 3 суток до слияния спленоцитов; каждой мыши внутрибрюшинно (в.б.) инъецировали 25 мкг раствора антигена, приготовленного в нормальном солевом растворе.

Иммунизирующими антигенами для второй группы мышей были DLL3 CHO-s и Fc-hDLL3(ECD) (SEQ ID NO: 8), и иммунизации поочередно проводили клеточными и белковыми антигенами. Перед первой иммунизацией клетками DLL3 CHO-s каждой мыши заранее внутрибрюшинно инъецировали 0,1 мл TiterMax® Gold Adjuvant (Sigma кат. № T2684), и через пол часа каждой мыши внутрибрюшинно инъецировали 0,1 мл жидкости с клетками, разведенной нормальным физиологическим раствором до концентрации 10^8 /мл. Клетки хорошо перемешивали при помощи пипетки, и затем осуществляли инокуляцию в сутки 0, 14, 28 и 42. Для антигена Fc-hDLL3(ECD) перекрестные иммунизации проводили с использованием адъювантов TiterMax® Gold Adjuvant (Sigma кат. № T2684) и Thermo Imject® Alum (Thermo кат. № 77161). Отношение антигена к адъюванту TiterMax® Gold Adjuvant составляло 1:1, и отношение антигена к адъюванту Thermo Imject® Alum составляло 3:1. Доза для первой иммунизации составляла 50 мкг/мышь/иммунизацию, и доза для бустерной иммунизации составляла 25 мкг/мышь/иммунизацию. Для hDLL3-Fc иммунизации проводили в сутки 7, 21, 35 и 49. Кровь отбирали в сутки 14, 35 и 49, и сыворотку мышей анализировали на титр антител посредством ELISA. После 8-ой иммунизации мышей, у которых титр антител в сыворотке был высоким и имел тенденцию к выходу на плато, отбирали для слияния спленоцитов. Бустерные иммунизации проводили за 3 суток до слияния спленоцитов; каждой мыши внутрибрюшинно (в.б.) инъецировали 50 мкг раствора белкового антигена hDLL3-Fc, приготовленного в физиологическом растворе.

2. Слияние спленоцитов

Лимфоциты селезенки и миеломные клетки – клетки Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™) - сливали, следуя оптимизированной методике электрослияния, с получением гибридомных клеток.

Образующиеся гибридомные клетки ресуспендировали в полной среде (среда IMDM, содержащей 20% FBS (фетальная телячья сыворотка), 1× НАТ и 1× OPI) при плотности 3-4 × 10⁵ /мл и высевали в 96-луночный планшет в объеме 150 мкл/лунку. После 3-4 суток инкубации при 37°C с 5% CO₂ супернатант удаляли, и добавляли полную среду HT (среда IMDM, содержащая 20% FBS, 1× HT и 1× OPI) в объеме 200 мкл/лунку. После 3 суток культивирования при 37°C с 5% CO₂ осуществляли скрининг и анализы.

3. Скрининг гибридомных клеток и определение последовательности антител

На основе плотности роста гибридомных клеток супернатант культуры гибридомы анализировали с использованием способа ELISA со связыванием с белком DLL3 и способа FACS со связыванием с клетками DLL3 CHO-s. Клоны, которые связываются с человеческим белком DLL3, белком DLL3 обезьяны и клетками DLL3 CHO-s, но не с клетками CHO-s дикого типа, отбирали и криоконсервировали, размножали, консервировали и субклонировали от одного до двух раз, пока не были получены одиночные клоны клеток. Посредством эксперимента по скринингу, приведенного выше, получали гибридомные клоны mAb100 и mAb6.

Гибридомные клоны размножали, и выделяли РНК. Осуществляли амплификацию обратной транскрипцией (ПЦР-ОТ (полимеразная цепная реакция, сопряженная с обратной транскрипцией)) с использованием вырожденного праймера мышинового Ig, и, наконец, получали последовательности варибельной области антител.

Варибельная область тяжелой цепи mAb6:

EVQLQQSGPVLV^KPGASVKMSCKASGYFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGIINP
 YSGVTIYNHKFKGKATLTVDKSSNTAYMELNSLTSEDSAVYYCARQDSLLDYAMDYWG
 QGTSVTVSS

SEQ ID NO: 12

Варибельная область легкой цепи mAb6:

DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHASQGISGNMGWLQQKPGKSFKGLIYHGANL
 EDGVPSRFSGSGSGADYSLTISSESEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 13

Вариабельная область тяжелой цепи mAb100:

EVQLVESGGGLV^KPGGSLKLS^{CA}ASGFTFSD^{SGMH}WIRQAPEKGLEWVAYISS
GSSTIHYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCASPLYYYGRSYNAVAY
 5 WGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 14

Вариабельная область легкой цепи mAb100:

DIQMNQSPSSLSASLGDITIT^{CHASQNIN}VWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASDLHT
 GVPSRFSGSGSGTGF^{TLT}ISSLQPED^{IATYYC}QQGQSYPLTFGGG^TKLEIK

10

SEQ ID NO: 15

Таблица 4. Последовательности CDR мышиных антител H6 и H100

Антитело	Название	Последовательность	№
mAb6	HCDR1	DYYMN	SEQ ID NO: 16
	HCDR2	IINPYSGVTIYNHKFKG	SEQ ID NO: 17
	HCDR3	QDSLDDYAMDY	SEQ ID NO: 18
	LCDR1	HASQGISGNMG	SEQ ID NO: 19
	LCDR2	HGANLED	SEQ ID NO: 20
	LCDR3	VQYAQFPYT	SEQ ID NO: 21
mAb100	HCDR1	DSGMH	SEQ ID NO: 22
	HCDR2	YISSGSSTIHYADTVKG	SEQ ID NO: 23
	HCDR3	PLYYYGRSYNAVAY	SEQ ID NO: 24
	LCDR1	HASQNINWLS	SEQ ID NO: 25
	LCDR2	KASDLHT	SEQ ID NO: 26
	LCDR3	QQGQSYPLT	SEQ ID NO: 27

Примечание: аминокислотные остатки CDR VH/VL определяли и аннотировали с использованием схемы нумерации Kabat.

15 Вариабельные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи мышиных антител клонировали в векторные плазмиды рТТ 5, содержащие константную область тяжелой цепи человеческого IgG1, изложенную в SEQ ID NO: 28, и константную область легкой цепи κ, изложенную в SEQ ID NO: 29, и клетки HEK293 трансфицировали полученными в результате плазмидами с получением химерных антител против DLL3 M6CHI и M100CHI.

20 Константная область тяжелой цепи человеческого IgG1:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS^{GVHTF}
 PAVLQSSGLYSLSSV^{TV}PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK^{TISKAK}GQPREP
 25 QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TPPVLD}SDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQ^{QGNV}FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 28

Константная область человеческой легкой цепи κ:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

SEQ ID NO: 29

Пример 3: гуманизация мышинных моноклональных антител против DLL3

10 Посредством сравнения с базой данных Kabat генов зародышевой линии
 15 переменных областей тяжелой и легкой цепи человеческих антител отбирали в
 качестве матриц гены зародышевой линии переменных областей тяжелой и
 легкой цепи с высокой гомологией, и CDR мышинных антител пересаживали на
 соответствующие человеческие матрицы с образованием последовательностей
 20 переменной области, структурированных как FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-
 FR4. Аминокислоты в переменных областях подвергали обратной мутации, с
 последующей рекомбинацией с константными областями (например, константной
 областью тяжелой цепи человеческого IgG1, изложенной в SEQ ID NO: 28, и
 константной областью человеческой легкой цепи κ, изложенной в SEQ ID NO: 29), с
 получением полноразмерных антител.

20 Для антитела mAb6 матрица легкой цепи человеческой зародышевой линии
 представляла собой IGKV1-16*01, и матрицы тяжелой цепи человеческой
 зародышевой линии представляли собой IGHV1-3*01, IGHV7-4-1*02 и IGHV3-73*01.
 Для антитела H100 матрица легкой цепи человеческой зародышевой линии
 представляла собой IGKV1-27*01, и матрица тяжелой цепи человеческой
 25 зародышевой линии представляла собой IGHV3-11*01.

Кроме того, аминокислотный остаток в положении 4 HCDR3 переменной
 области тяжелой цепи mAb100 (PLYYYGRSYNAVAY (SEQ ID NO: 24)) мутировали
 от Y до H, или аминокислотный остаток в положении 11 мутировали от A до G с
 получением новой HCDR3: PLYHYGRSYNAVAY (SEQ ID NO: 30) или
 30 PLYYYGRSYNGVAAY (SEQ ID NO: 31).

Таблица 5. Матрицы гуманизации и соответствующие точечные мутации для
 антител mAb6 и mAb100

		VL		VH	
hAb6	VL1	Прививка (IGKV1-16*01) + F36L, S46G		VH1	Прививка (IGHV1-3*01) + Q1E, R71V, T73K

	VL2	Прививка (IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y	VH2	Прививка (IGHV1-3*01) + Q1E, I69L, R71V, T73K, S76N
	VL3	Прививка (IGKV1-16*01) + F36L, A43S, P44F, S46G, T69A, F71Y	VH3	Прививка (IGHV1-3*01) + Q1E, M48I, V67A, I69L, R71V, T73K, S76N
	VL4	Прививка (IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y, T85D	VH4	Прививка (IGHV1-3*01) + Q1E, I69L, R71V, T73K, S76N, Q43K
	VL5	Прививка (IGKV1-16*01)	VH5	Прививка (IGHV7-4-1*02) + Q1E, L71V, T73K, F69L
			VH6	Прививка (IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N
			VH7	Прививка (IGHV3-73*01) + F27Y, S30T, I69L, R71V, D73K, T93A
			VH8	Прививка (IGHV1-3*01)
			VH9	Прививка (IGHV7-4-1*02)
			VH10	Прививка (IGHV3-73*01)
			VH11	Прививка (IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N, R38K
			VH12	Прививка (IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N, V68A
			VH13	Прививка (IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N, R38K, V68A
hAb100	VL1	Прививка (IGKV1-27*01)	VH1	Прививка (IGHV3-11*01) + Q1E, R94S
	VL2	Прививка (IGKV1-27*01) + V43I	VH2	Прививка (IGHV3-11*01) + Q1E, S49A, R94S
			VH3	Прививка (IGHV3-11*01) + Q1E, S49A, R94S, Y98H
			VH4	Прививка (IGHV3-11*01) + Q1E, S49A, R94S, A100eG
			VH5	Прививка (IGHV3-11*01)

Примечание: беря A100G в таблице в качестве примера, она представляет мутацию A в положении 100E согласно нумерации Kabat до G.

Полученные последовательности переменных областей гуманизированного антитела были следующими:

5 VH1 hAb6 (Q1E, R71V, T73K)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARQDSLDDYAMDYW
 GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 32

10 VH2 hAb6 (Q1E, I69L, R71V, T73K, S76N)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDY~~Y~~MNWVRQAPGQRLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRVTLTVDK~~S~~ANTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYW
 GGGTTVTVSS

SEQ ID NO: 33

5 VH3 hAb6 (Q1E, M48I, V67A, I69L, R71V, T73K, S76N)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDY~~Y~~MNWVRQAPGQRLEWIGIINP
YSGVTIYNHKFKGRATLTVDK~~S~~ANTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWG
 QGGTTVTVSS

SEQ ID NO: 34

10 VH4 hAb6 (Q1E, Q43K, I69L, R71V, T73K, S76N)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDY~~Y~~MNWVRQAPGKRLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRVTLTVDK~~S~~ANTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYW
 GGGTTVTVSS

SEQ ID NO: 35

15 VH5 hAb6 (Q1E, L71V, T73K, F69L)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDY~~Y~~MNWVRQAPGGGLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRFVLSVDK~~S~~SVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWG
 QGGTTVTVSS

SEQ ID NO: 36

20 VH6 hAb6 (Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDY~~Y~~MNWVRQAPGGGLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRFVLSVDK~~S~~SNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWG
 GGGTTVTVSS

SEQ ID NO: 37

25 VH7 hAb6 (F27Y, S30T, I69L, R71V, D73K, T93A)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGYTFIDY~~Y~~MNWVRQASGKGLEWVGIINP
YSGVTIYNHKFKGRFTLSVDK~~S~~SKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCAARQDSLLDYAMDYWG
 QGGTTVTVSS

SEQ ID NO: 38

30 hAb6VH8 (прививка IGHV1-3*01)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDY~~Y~~MNWVRQAPGQRLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWG
 GGGTTVTVSS

SEQ ID NO: 39

35 hAb6VH9 (прививка IGHV7-4-1*02)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWG
 QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 40

5 hAb6VH10 (прививка IGHV3-73*01)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSDYYMNWVRQASGKGLEWVGIINP
YSGVTIYNHKFKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRQDSLLDYAMDYWG
 QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 41

10 hAb6VH11 (Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N, R38K)
EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVVKQAPGQGLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRFVLSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYW
 GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 42

15 hAb6VH12 (Q1E, V68A, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N)
EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYW
 GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 43

20 hAb6VH13 (Q1E, R38K, V68A, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N)
EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVVKQAPGQGLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYW
 GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 44

25 VL1 hAb6 (F36L, S46G)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWLQKPKGKAPKGLIYHGAN
LEDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 45

30 VL2 hAb6 (F36L, S46G, T69A, F71Y)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWLQKPKGKAPKGLIYHGAN
LEDGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 46

35 VL3 hAb6 (F36L, A43S, P44F, S46G, T69A, F71Y)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWLQKPKGKSFKGLIYHGAN
LEDGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 47

VL4 hAb6 (F36L, S46G, T69A, F71Y, T85D)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWLQQKPGKAPKGLIYHGAN
LEDGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFADDYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 48

5 hAb6VL5 (прививка IGKV1-16*01)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWFQQKPGKAPKSLIYHGANL
EDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 49

VH1 hAb100 (Q1E, R94S)

10 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVSYISS
GSSTIHYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGRSYNAVAY
 WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 50

VH2 hAb100 (Q1E, S49A, R94S)

15 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVAYISS
GSSTIHYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGRSYNAVAY
 WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 51

VH3 hAb100 (Q1E, S49A, R94S, Y98H)

20 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVAYISS
GSSTIHYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYHYGRSYNAVAY
 WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 52

VH4 hAb100 (Q1E, S49A, R94S, A100eG)

25 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVAYISS
GSSTIHYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGRSYNGVAY
 WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 53

VH5 hAb100 (прививка IGHV3-11*01)

30 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVSYISS
GSSTIHYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPLYYYGRSYNAVAY
 WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 54

VL1 hAb100 (прививка IGKV1-27*01)

35 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASDL
HTIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 55

VL2 hAb100 (V43I)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCHASQNINVWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASDLH
IGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGTKVEIK

5

SEQ ID NO: 56.

Примечание: CDR подчеркнуты одной линией, и сайты мутаций подчеркнуты двумя линиями.

Таблица 6. Общие формулы CDR антитела hAb100

Название	Последовательность	№ последовательности
HCDR1	DSGMH	SEQ ID NO: 22
HCDR2	YISSGSSTIHADTVKG	SEQ ID NO: 23
HCDR3	PLYX ₁ YGRSYNX ₂ VAY	SEQ ID NO: 57
LCDR1	HASQNINWLS	SEQ ID NO: 25
LCDR2	KASDLHT	SEQ ID NO: 26
LCDR3	QQGQSYPLT	SEQ ID NO: 27

10

X₁ представляет собой Y или H; X₂ представляет собой A или G.

Типичные комбинации варибельной области тяжелой и легкой цепи для гуманизированных антител были следующими:

Таблица 7. Гуманизированные антитела mAb6

Варибельная область	VL1	VL2	VL3	VL4
VH1	hAb6L1H1	hAb6L2H1	hAb6L3H1	hAb6L4H1
VH2	hAb6L1H2	hAb6L2H2	hAb6L3H2	hAb6L4H2
VH3	hAb6L1H3	hAb6L2H3	hAb6L3H3	hAb6L4H3
VH4	hAb6L1H4	hAb6L2H4	hAb6L3H4	hAb6L4H4
VH5	hAb6L1H5	hAb6L2H5	hAb6L3H5	hAb6L4H5
VH6	hAb6L1H6	hAb6L2H6	hAb6L3H6	hAb6L4H6
VH7	hAb6L1H7	hAb6L2H7	hAb6L3H7	hAb6L4H7
VH11	hAb6L1H11	hAb6L2H11	hAb6L3H11	hAb6L4H11
VH12	hAb6L1H12	hAb6L2H12	hAb6L3H12	hAb6L4H12
VH13	hAb6L1H13	hAb6L2H13	hAb6L3H13	hAb6L4VH13

15 Примечание: hAb6L1H1 указывает то, что указанное антитело содержит варибельную область тяжелой цепи hAb6VH1 и варибельную область легкой цепи hAb6VL1, и что последовательность константной области тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 28, и последовательность константной области легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 29. Это применимо к другим.

Таблица 8. Гуманизированные антитела mAb100

Варибельная область	VL1	VL2
---------------------	-----	-----

VH1	hAb100L1H1	hAb100L2H1
VH2	hAb100L1H2	hAb100L2H2
VH3	hAb100L1H3	hAb100L2H3
VH4	hAb100L1H4	hAb100L2H4

Примечание: hAb100L1H1 указывает то, что указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи hAb100VH1 и переменную область легкой цепи hAb100VL1, и что последовательность константной области тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 28, и последовательность константной области легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 29. Это применимо к другим.

Приведенные выше антитела клонировали, экспрессировали и очищали, и посредством анализа связывания белка (Пример испытаний 1), анализа связывания клетки (Пример испытаний 2) и Biacore (Пример испытаний 4) наконец отбирали гуманизированные антитела с хорошей активностью. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи типичных гуманизированных антител были следующими:

Тяжелая цепь Hu6 (также известного как hAb6L4H12):

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGGLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSSLDYAMDYWG
 15 QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL
 20 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Примечание: в данной последовательности переменная область подчеркнута, и константная область выделена курсивом.

SEQ ID NO: 58

Легкая цепь Hu6 (также известного как hAb6L4H12):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCASQGIGSNMGWLQKPKGKAPKGLIYHGAN
 25 LEDGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Примечание: в данной последовательности переменная область подчеркнута, и константная область выделена курсивом.

SEQ ID NO: 59

Тяжелая цепь Hu100 (также известного как hAb100L1H1):

EVQLVESGGGLV~~KPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVS~~YISS
GSSTIHYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGRSYNAVAY
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 5 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK~~

10 Примечание: в данной последовательности переменная область подчеркнута, и константная область выделена курсивом.

SEQ ID NO: 60

Легкая цепь Hu100 (также известного как hAb100L1H1):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC~~ASQNINVWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASDLHTGVP~~
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGT~~KVEIKRTVAAPS~~VFIFP
 15 PSDEQLKSGTASV~~VCLLN~~FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS
STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Примечание: в данной последовательности переменная область подчеркнута, и константная область выделена курсивом.

SEQ ID NO: 61.

20 Молекула позитивного контроля, использованная в настоящем раскрытии, представляла собой BI-764532 (сконструирована посредством ссылки на WO2019234220A1), и негативный контроль представлял собой C25. Их последовательности были следующими:

Тяжелая цепь BI-764532:

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKV~~SCKASGYTFTSY~~VHWVRQAPGQGLEWMVIIN
PGGGTTSYAQKFLGRVTMTRDTS~~TNTVY~~MELKSLRSED~~TAVYYC~~ARGEAVTGNFYFY
GMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK~~
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
 30 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDS~~DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Примечание: в данной последовательности переменная область подчеркнута, и константная область выделена курсивом.

35 SEQ ID NO: 62

Легкая цепь BI-764532:

DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLVWFQQKPGKAPKRLIYAVSSL
YSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHDSYPYTFGQGTKLEIK *RTVAAP*
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5 Примечание: в данной последовательности переменная область подчеркнута, и константная область выделена курсивом.

SEQ ID NO: 63

Тяжелая цепь C25:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNSWIGWFRQAPGQGLEWIGDIYP
10 GGGYTNYNEIFK GKATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSRGI PGYAMDYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
15 *REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD*
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 64

Легкая цепь C25:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMSCKSSQSLNSGDQKNYLTWYQQKPGKAPKLL
20 IYWASTGESGVPSRFSGSGSGTDFFTISLQPEDIATYYCQNDYSYPWTFGQGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 65.

25 Примечание: в данной последовательности переменная область подчеркнута, и константная область выделена курсивом.

II. Получение соединений

30 Экспериментальные способы без указанных в примерах настоящего раскрытия конкретных условий обычно проводили при традиционных условиях или условиях, рекомендованных изготовителем исходных веществ или имеющихся в продаже продуктов. Реактивы без указания конкретного происхождения представляют собой имеющиеся в продаже традиционные реактивы.

35 Структуры данных соединений определяли спектроскопией ядерного магнитного резонанса (ЯМР) или масс-спектрометрией (МС). Анализы ЯМР проводили на приборе для ядерного магнитного резонанса Bruker AVANCE-400 с диметилсульфоксидом-D6 (*DMSO-d6*), хлороформом-D (CDCl_3) и метанолом-D4

(CD₃OD) в качестве растворителей и тетраметилсиланом (TMS) в качестве внутреннего стандарта. Химические сдвиги приводятся в единицах 10⁻⁶ (млн⁻¹).

Анализы МС проводили на масс-спектрометре FINNIGAN LCQAd (ЭРИ) (электрораспылительная ионизация) (Thermo, модель: Finnigan LCQ advantage
5 MAX).

Анализы СВЭЖХ (сверхэффективная жидкостная хроматография) проводили на системе жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии Waters Acquity UPLC SQD.

Анализы ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200DAD (хроматографическая колонка Sunfire C18 150 × 4,6 мм) и высокоэффективном жидкостном хроматографе Waters 2695-2996 (хроматографическая колонка Gemini C18 150 × 4,6 мм).
10

Анализы УФ-ВЭЖХ проводили на работающем в ультрафиолетовой области спектрофотометре Thermo nanodrop2000.
15

Используемые пластинки с силикагелем для тонкослойной хроматографии представляли собой пластинки с силикагелем Yantai Huanghai HSGF254 или Qingdao GF254. Пластинки с силикагелем, используемые в анализах тонкослойной хроматографией (ТСХ), имели толщину слоя от 0,15 мм до 0,2 мм, а пластинки, используемые для разделения и очистки тонкослойной хроматографией, имели толщину слоя от 0,4 мм до 0,5 мм.
20

На стадиях колоночной хроматографии в качестве носителя обычно использовали силикагель Yantai Huanghai от 200 до 300 меш.

Известные исходные вещества по настоящему раскрытию можно синтезировать с использованием следующих способов, известных в данной области, или они могут быть приобретены у ABCR GmbH & Co.KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc, Chembee Chemicals и т.д.
25

В данных примерах реакции проводили в атмосфере аргона или атмосфере азота, если не указано иное.

Атмосфера аргона или атмосфера азота означает то, что реакционная колба соединяется с баллоном, содержащим примерно 1 л газообразного аргона или азота.
30

Атмосфера водорода означает то, что реакционная колба соединяется с баллоном, содержащим примерно 1 л газообразного водорода.

Реакции гидрогенизации под давлением проводили с использованием гидрогенизатора Parr 3916EKX и гидрогенизатора Qinglan QL-500 или гидрогенизатора HC2-SS.

5 Реакции гидрогенизации обычно включали 3 цикла вакуумирования и заполнения водородом.

Микроволновые реакции проводили с использованием микроволнового реактора CEM Discover-S 908860.

В данных примерах растворы в реакциях представляли собой водные растворы, если не определено иначе.

10 В данных примерах температура реакции представляла собой комнатную температуру, которая варьировала от 20°C до 30°C, если не определено иначе.

15 Получение PBS буфера с pH 6,5 в данных Примерах: 8,5 г KH_2PO_4 , 8,56 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5,85 г NaCl и 1,5 г EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) добавляли в колбу, и добавляли растворитель для получения 2 л; их все растворяли при помощи ультразвука и хорошо встряхивали для получения желательного буфера.

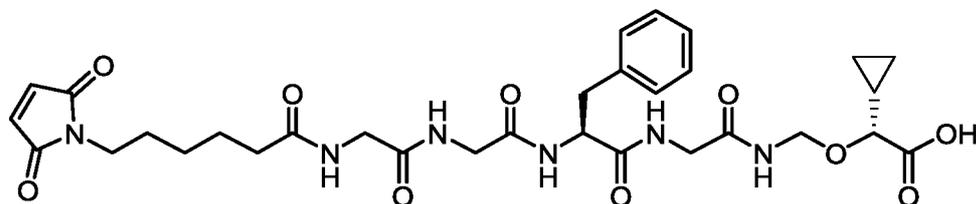
20 Система элюентов, используемая в очистке соединений колоночной хроматографией, и разработка систем растворителей, используемых в анализах тонкослойной хроматографией, включают: А: систему дихлорметана и изопропанола, В: систему дихлорметана и метанола и С: систему петролейного эфира и этилацетата. Отношение объемов растворителей корректируется, в зависимости от полярности соединения или посредством добавления малого количества триэтиламина и кислотного или основного реактива.

25 Некоторые из соединений по настоящему раскрытию характеризовали посредством Q-TOF (количественная времяпролетная) ЖХ/МС (жидкостная хроматография/масс-спектрометрия). Анализы Q-TOF ЖХ/МС проводили с использованием квадрупольного времяпролетного масс-спектрометра с точным определением массы Agilent 6530 и сверхэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1290-Infinity (Agilent Poroshell 300SB-C8, хроматографическая колонка 5 мкм, 2,1 × 75 мм).

35 Группировки лекарственного средства конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему раскрытию могут быть выбраны из цитотоксических лекарственных средств, известных в данной области. Типичные лекарственные средства представляют собой производные эктеинасцидина, описанные в WO2021218896A1 (заявка № PCT/CN2021089838), которая включается в данный документ посредством ссылки во всей ее полноте.

Схемы синтеза для типичных конъюгатов антитело-лекарственное средство в настоящем раскрытии были следующими.

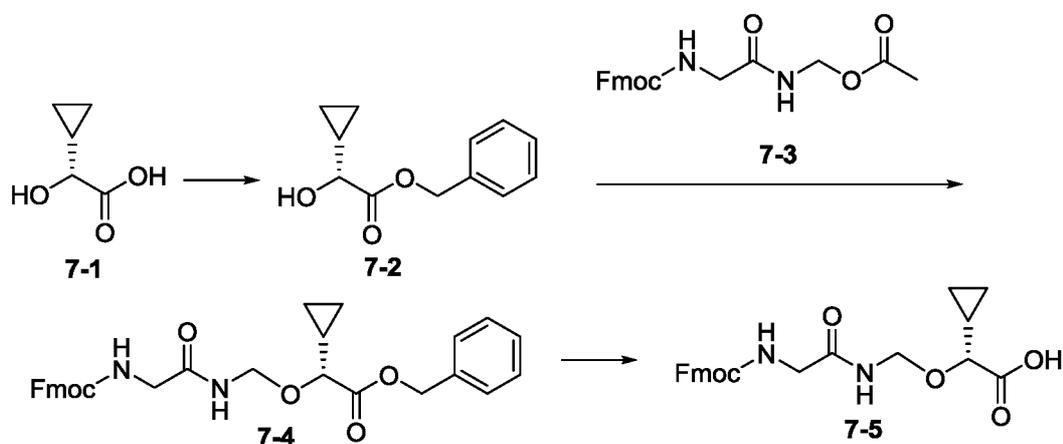
Пример 4-1. Синтез Соединения 7 (линкер)



7

Стадия 1

5



Соединение **7-1** (1,3 г, полученное с использованием способа, раскрытого в WO2013106717A1) растворяли в 50 мл ацетонитрила, и последовательно добавляли карбонат калия (6,2 г), бензилбромид (1,35 мл) и тетрабутиламмония йодид (415 мг). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре, фильтровали, концентрировали и очищали колоночной хроматографией на силикагеле с петролейным эфиром/этилацетатом в качестве проявляющего растворителя с получением соединения **7-2**.

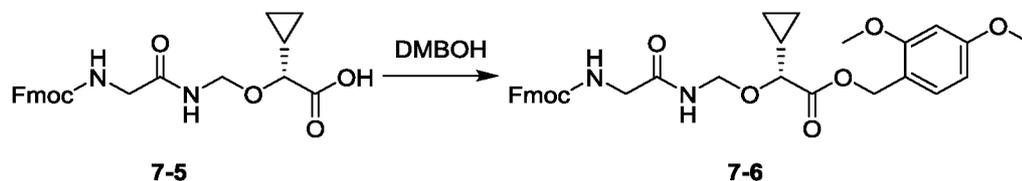
15 Соединения **7-2** (121 мг) и **7-3** (180 мг) добавляли в реакционную колбу, и добавляли 4 мл тетрагидрофурана. В атмосфере азота данную смесь охлаждали до примерно 0°C в бане со льдом-водой. Добавляли *трет*-бутоксид калия (109 мг, 0,98 ммоль), данную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 40 мин. Добавляли 10 мл ледяной воды, и проводили экстракцию
20 этилацетатом (20 мл × 2) и хлороформом (10 мл × 5). Органические фазы объединяли и концентрировали. Образующийся остаток растворяли в 4 мл диоксана. Добавляли 2 мл воды, и добавляли бикарбонат натрия (49,2 мг, 0,586 ммоль) и 9-флуоренилметилхлорформиат (126 мг, 0,49 ммоль). Данную смесь

перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Добавляли 20 мл воды, и проводили экстракцию этилацетатом (10 мл × 3). Органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (20 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле с петролейным эфиром/этилацетатом в качестве проявляющего раствора с получением соединения **7-4**, МС m/z (ЭРИ): 515,0 [M+1]⁺.

Соединение **7-4** (20 мг, 0,038 ммоль) растворяли в 4,5 мл смеси растворителей тетрагидрофурана и этилацетата (об.:об. равно 2:1), и добавляли палладий на углеводе (12 мг, 10%-ная загрузка, на основе сухого вещества). Данную систему три раза продували газообразным водородом, и данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Данную реакционную смесь фильтровали через целит, и остаток на фильтре промывали этилацетатом. Фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта соединения **7-5**, указанного в заголовке (13 мг). Данный продукт непосредственно использовали на следующей стадии без очистки.

МС m/z (ЭРИ): 424,9 [M+1].

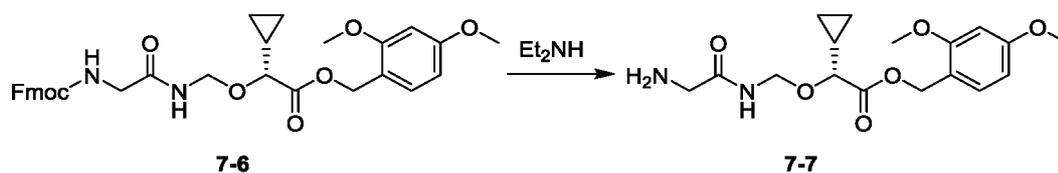
Стадия 2



Соединение **7-5** (8,00 г, 18,9 ммоль, 1 экв.) помещали в 250 мл трехгорлую колбу, и добавляли сухой дихлорметан (100 мл) в атмосфере азота. Смесь перемешивали для растворения данного соединения, охлаждали до 0°C и последовательно добавляли 4-диметиламинопиридин (250 мг, 2,05 ммоль), 2,4-диметоксибензиловый спирт (4,45 г, 26,5 ммоль) и 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид (5,04 г, 28,6 ммоль). Данную смесь перемешивали при 0°C в течение 4 ч. Данную реакционную смесь гасили водой (50 мл), нагревали до комнатной температуры и дважды экстрагировали метил-*трет*-бутиловым эфиром (100 мл). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали досуха при пониженном давлении с получением неочищенного продукта - соединения **7-6** (13,1 г).

МС расч.: 574,2, обнаруженное: 575,0 [M+H]⁺.

Стадия 3

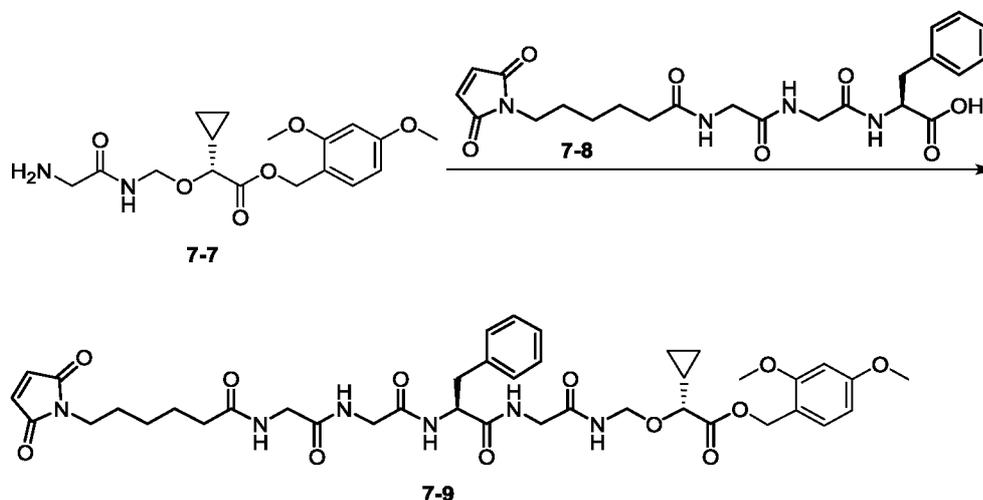


5 Неочищенный продукт – соединение 7-6 (13,1 г) помещали в 500 мл реакционную колбу, и добавляли DCM (160 мл). Смесь перемешивали для растворения данного соединения, и добавляли диэтиламин (80 мл). Данную смесь оставляли реагировать при комнатной температуре (15-18°C) в течение 3 ч. Данную реакционную смесь концентрировали досуха при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, и данный неочищенный продукт разделяли посредством колоночной хроматографии на силикагеле. Желательную фракцию собирали и упаривали досуха (температура воды меньше 35°C) с получением соединения 7-7 в виде масла (5,47 г, выход: 82,2% за два этапа).

10 МС расч.: 352,2, обнаруженное: 353,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

15

Стадия 4

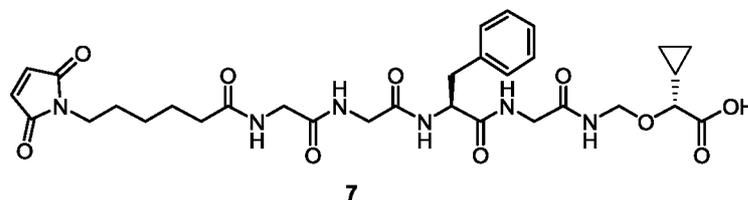
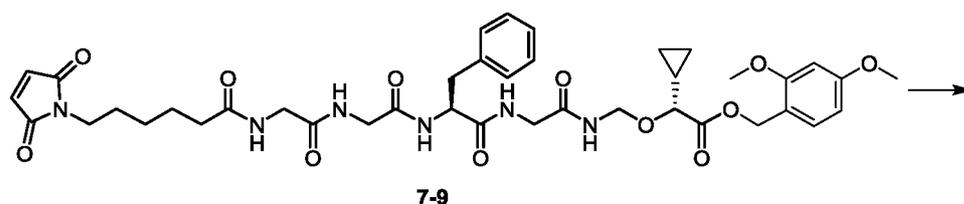


15 Соединение 7-7 (4,36 г, 12,4 ммоль) и соединение 7-8 (7,03 г, 14,9 ммоль, 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)гексаноил)глицилглицил-L-фенилаланин, полученный с использованием способа в Примере 73 в патентной заявке
20 “EP2907824B1”) помещали в 250 мл реакционную колбу, и добавляли сухой N,N-диметилформамид (50 мл) в атмосфере азота. Смесь перемешивали для растворения данных соединений, охлаждали до 0°C и добавляли 4-(4,6-диметокситриазин-2-ил)-4-метилморфолина гидрохлорид (4,80 г, 16,3 ммоль).

Данную смесь нагревали до 18°C и перемешивали в течение 1 ч. Данную реакционную смесь охлаждали в бане со льдом-водой, гасили водой (150 мл) и дважды экстрагировали этилацетатом (300 мл). Органические фазы объединяли, один раз промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали досуха при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле с получением нечистого бледно-желтого твердого вещества **7-9** (6,02 г). Указанное твердое вещество очищали растиранием с метил-*трет*-бутиловым эфиром (60 мл) с получением соединения **7-9** (5,08 г) в виде беловатого твердого вещества (выход: 50,8%).

МС расч.: 806,4, обнаруженное: 807,2 [M+H]⁺.

Стадия 5



Соединение **7-9** (150 мг, 0,186 ммоль) помещали в 50 мл одностороннюю колбу, и добавляли сухой дихлорметан (6 мл) и анизол (60 мг, 0,558 ммоль) в атмосфере азота. Данную смесь перемешивали и охлаждали до 0°C, и добавляли дихлоруксусную кислоту (0,24 мл, 2,9 ммоль). Субстрат растворяли, и данную смесь оставляли реагировать при 0°C в течение 3-4 ч. Данную реакционную смесь растирали с метил-*трет*-бутиловым эфиром (18 мл) при 0°C в течение 30 мин. Продукт растирания фильтровали, и остаток на фильтре сушили при пониженном давлении. Указанное твердое вещество растирали с метил-*трет*-бутиловым эфиром (18 мл) при комнатной температуре в течение 30 мин. Продукт растирания фильтровали, и остаток на фильтре сушили при пониженном давлении с получением соединения **7** (120 мг, 0,183 ммоль, выход: 98%).

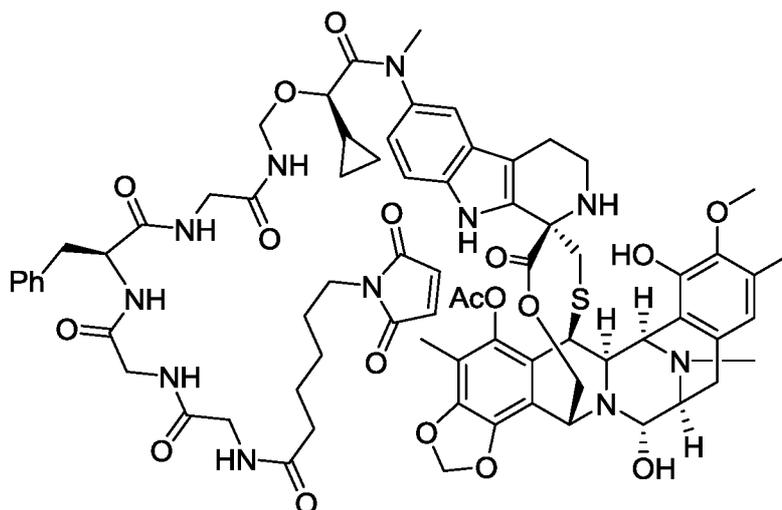
¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d⁶) δ 12.56 (brs, 1H), 8.50 (t, J = 6,8 Гц, 1H), 8.28 (t, J = 6,0 Гц, 1H), 8.20-8.05 (m, 2H), 8.00 (t, J = 5,6 Гц, 1H), 7.30-7.15 (m, 5H), 6.99 (s, 2H),

4.65-4.40 (m, 3H), 3.80-3.55 (m, 7H), 3.45 (d, J = 7,6 Гц, 2H), 3.10-3.00 (m, 1H), 2.85-2.75 (m, 1H), 2.11 (t, J = 7,6 Гц, 2H), 1.55-1.40 (m, 4H), 1.25-1.15 (m, 2H), 1.05-0.95 (m, 1H), 0.55-0.40 (m, 2H), 0.40-0.30 (m, 2H).

МС расч.: 656,3, обнаруженное: 679,2 [M+Na]⁺.

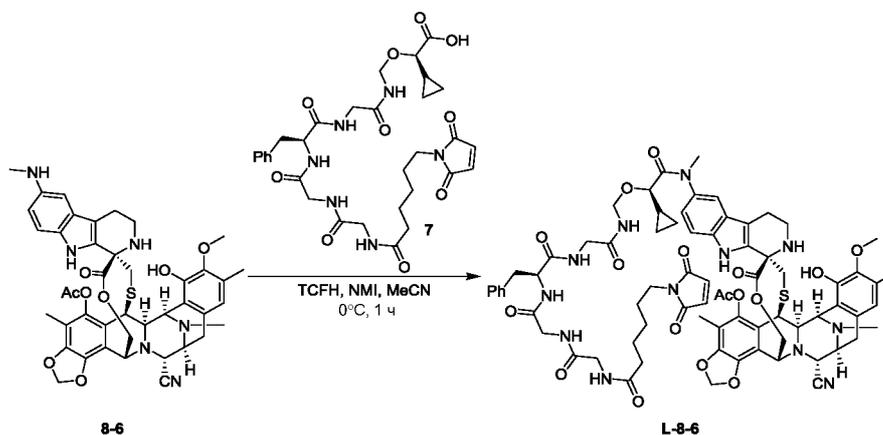
5

Пример 4-2. Синтез L-9



L-9

Стадия 1



10

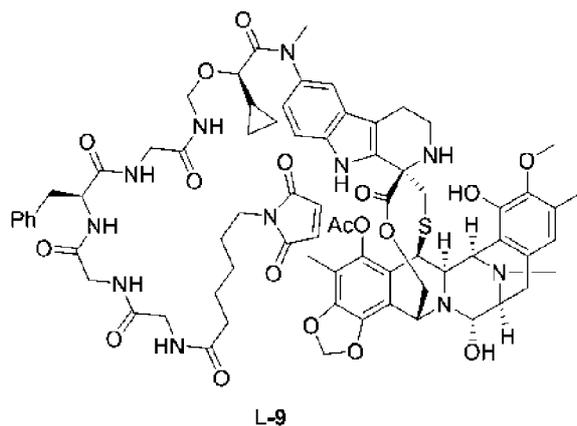
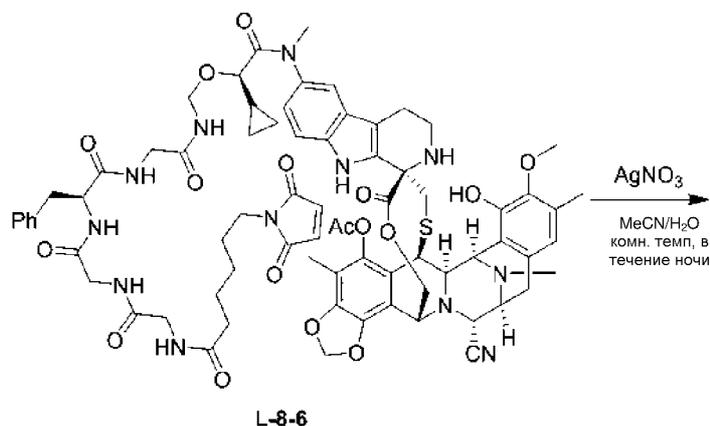
Соединение **8-6** (50 мг, 0,063 ммоль, синтезированное с использованием способа, описанного в Примере 8 в WO2021218896A1) и соединение **7** (85 мг, 0,13 ммоль) взвешивали в реакционной колбе, и данную систему помещали в атмосферу азота. Добавляли раствор N-метилимидазола (21 мг, 0,25 ммоль) в сухом MeCN (4 мл). Данную систему охлаждали в бане со льдом-водой, и добавляли по каплям раствор TCFH (45 мг, 0,16 ммоль, хлор-N,N,N',N'-тетраметилформаидиния гексафторфосфат) в сухом MeCN (1 мл). Данную смесь

15

оставляли реагировать в бане со льдом-водой в течение 80 мин. Образец отбирали для анализа ЖХ-МС, и результат показал то, что исходные вещества полностью расходовались. Данную реакционную смесь фильтровали с использованием воронки с песчаной основой при пониженном давлении. Остаток на фильтре промывали сухим MeCN. Фильтраты объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, и данный неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (метанол/дихлорметан – 1:25) с получением **L-8-6** в виде белого твердого вещества (примерно 83 мг, выход: 92,22%).

10 МС расч.: 1430,6, обнаруженное: 1431,4 [M+H].

Стадия 2



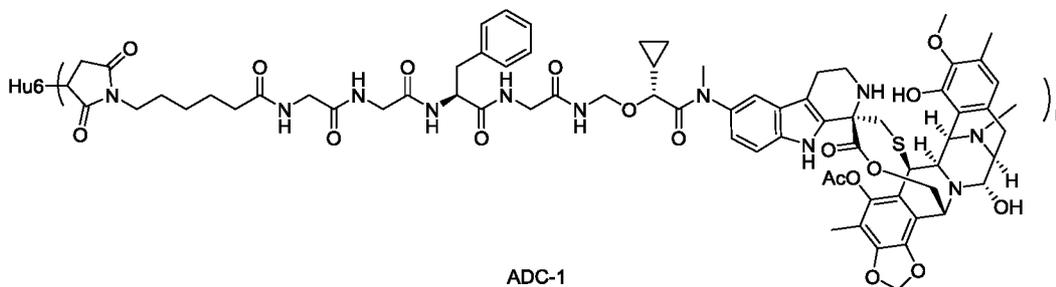
15 Соединение **L-8-6** (81 мг, 0,057 ммоль) взвешивали и растворяли в сухом MeCN (7 мл). Добавляли раствор AgNO₃ (781 мг, 4,60 ммоль) в воде (4,7 мл). Данную смесь оставляли реагировать в темноте при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 21 ч. Образец отбирали для анализа ЖХ/МС, и результат продемонстрировал то, что исходные вещества полностью

потреблялись. В данную реакционную смесь добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 (11,7 мл) и насыщенный раствор NaCl (11,7 мл). Данную смесь энергично перемешивали в течение 30 мин и фильтровали через целит. Фильтрат экстрагировали ($\text{MeOH}/\text{CHCl}_3 - 1/10, 20 \text{ мл} \times 3$). Органические фазы объединяли, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали досуха при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, и данный неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением **L-9** в виде белого твердого вещества (примерно 52 мг, выход: 64,6%).

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7.32-7.18 (m, 7H), 6.97 (d, $J = 8,4$ Гц, 1H), 6.75 (s, 2H), 6.66 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.07 (s, 1H), 5.23 (d, $J = 11,2$ Гц, 1H), 4.77 (s, 1H), 4.62-4.56 (m, 4H), 4.50 (dd, $J = 6,0, 8,4$ Гц, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.18 (d, $J = 10,8$ Гц, 1H), 3.87-3.55 (m, 12H), 3.45 (t, $J = 6,8$ Гц, 2H), 3.27 (s, 3H), 3.22-3.17 (m, 2H), 3.05-2.88 (m, 3H), 2.79 (d, $J = 15,2$ Гц, 1H), 2.65-2.59 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.24 (t, $J = 7,6$ Гц, 2H), 2.12 (d, $J = 15,9$ Гц, 1H), 2.03 (s, 4H), 1.63-1.50 (m, 4H), 1.31-1.23 (m, 2H), 1.01-0.95 (m, 1H), 0.44-0.22 (m, 3H), 0.09-0.14 (m, 1H).

III. Получение ADC

Пример 5-1. Получение ADC-1

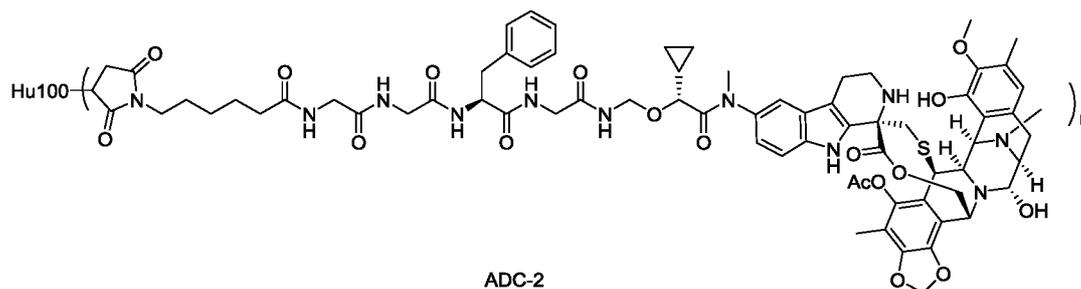


В водный раствор антитела **Hu6** в PBS (pH 6,5, 0,05 М водный раствор PBS; 10,0 мг/мл, 3,6 мл, 243,1 нмоль) добавляли при 37°C полученный водный раствор трис(2-карбоксиитил)фосфина (ТСЕР гидрохлорид) (10 мМ, 67,5 мкл, 675 нмоль). Данную смесь встряхивали на шейкере с водной баней при 37°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Данную реакционную смесь охлаждали до 25°C в водной бане. Соединение **L-9** (3,46 мг, 2431 нмоль) растворяли в 170 мкл DMSO (диметилсульфоксид), и данный раствор добавляли в приведенную выше реакционную смесь. Образующуюся смесь встряхивали на шейкере с водной баней при 25°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Данную реакционную смесь обессоливали и очищали с использованием колонки с гелем Sephadex G25 (элюционная фаза: pH 6,5, 0,05 М водный раствор PBS) с получением указанного в

заголовке продукта **ADC-1** в PBS (2,83 мг/мл, 16,0 мл), и данный продукт хранили при 4°C.

Загрузку лекарственного средства каждой партии ADC-1 рассчитывали с использованием способа HIC (гидрофобная хроматография), и значение DAR составляло: n равно 3,73-4,27.

Пример 5-2. Получение ADC-2



В водный раствор антитела **Hu100** в PBS (рН 6,5, 0,05 М водный раствор PBS; 10,0 мг/мл, 4,0 мл, 270,1 нмоль) добавляли при 37°C полученный водный раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР гидрохлорид) (10 мМ, 75,1 мкл, 751 нмоль). Данную смесь встряхивали на шейкере с водной баней при 37°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Данную реакционную смесь охлаждали до 25°C в водной бане. Соединение **L-9** (3,84 мг, 2701 нмоль) растворяли в 190 мкл DMSO, и данный раствор добавляли в приведенную выше реакционную смесь. Образующуюся смесь встряхивали на шейкере с водной баней при 25°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Данную реакционную смесь обессоливали и очищали с использованием колонки с гелем Sephadex G25 (элюционная фаза: рН 6,5, 0,05 М водный раствор PBS) с получением указанного в заголовке продукта **ADC-2** в PBS (3,52 мг/мл, 16,0 мл), и данный продукт хранили при 4°C.

Загрузку лекарственного средства каждой партии ADC-2 рассчитывали с использованием способа HIC, и значение DAR составляло: n равно 3,72-4,88.

Анализ загрузки лекарственного средства маточных растворов ADC

ADC называют конъюгаты антитело-лекарственное средство. Их механизм в лечении заболеваний заключается в том, что они доставляют лекарственные средства в клетки посредством нацеливания антител, умерщвляя, посредством этого, клетки или ингибируя рост клеток. Загрузка лекарственного средства играет решающую роль в эффективности лекарственного средства.

В настоящем раскрытии использовали способ HIC для анализа загрузки лекарственного средства, и данный способ, в основном, является следующим:

Реактивы и приборы:

Сульфат аммония: произведенный Sinopharm, 500 мг/бутыль;
 5 изопропиловый спирт: уровня качества для ЖХ, 4 л/бутыль, произведенный Thermo Fisher; безводный натрия дигидрофосфат: произведенный Sinopharm, 500 мг/бутыль.

Высокоэффективный жидкостный хроматограф: Agilent 1260.

Получение растворов:

10 Подвижная фаза А (50 мМ раствор безводного натрия дигидрофосфата, pH 7,0):

1000 мл очищенной воды отмеряли с использованием мерного цилиндра, и добавляли 6,49 г твердого безводного натрия дигидрофосфата; после хорошего перемешивания данного раствора и корректировки pH до 7,0 его фильтровали
 15 перед применением и хранили при 2-8°C в течение 14 суток.

Подвижная фаза В (2 М сульфат аммония, растворенный в 50 мМ растворе безводного натрия дигидрофосфата, pH 7,0): 264,3 г твердого сульфата аммония добавляли в полученный 50 мМ раствор безводного натрия дигидрофосфата; после хорошего перемешивания данного раствора его фильтровали перед
 20 применением и хранили при 2-8°C в течение 14 суток.

Подвижная фаза С (IPA): 1 л изопропилового спирта.

Голое антитело и тестируемые образцы (концентрация 1 мг/мл, примерно 200 мкл), подлежащие инъекции.

Условия хроматографии:

25 Хроматографическая колонка: TSKgel Butyl-NPR, 4,6 мм ×10 см 2,5 мкм;

Температура колонки: 30°C;

Детектор DAD (диодно-матричный детектор); длина волны выявления 280 нм (370 нм);

30 Температура в камере образца: 4°C; скорость тока: 0,5 мл/мин; объем инъекции: 40 мкл; хроматографический градиент: А% (исходно 35% - 15 мин 75% - 20 мин 75%), С% (исходно 5% - 15 мин 25% - 20 мин 25%).

Таблица 9. Пропорции подвижной фазы

Время (мин)	Подвижная фаза А%	Подвижная фаза В%	Подвижная фаза С%
0	35	60	5
15	75	0	25
20	75	0	25
21	35	60	5

31	35	60	5
----	----	----	---

Анализ данных:

Посредством сравнения спектров образцов и голого антитела локализовали DAR0, DAR2, DAR4, DAR6 и DAR8. Затем интегрировали спектры тестируемых образцов, и значения DAR рассчитывали на основе площади пика. Формула расчета является следующей:

$$\text{DAR} = \frac{\sum(\text{число связанных молекул лекарственного средства} \times \text{процент площадь пика})}{\text{общая площадь пиков}}$$

Ниже активность антител и ADC по настоящему раскрытию подтверждали с использованием биохимических анализов.

Пример испытаний 1: анализ связывания ELISA на уровне белка

Стрептавидин (abcam, ab136200, 1 мкг/мл) переносили в планшеты в объеме 100 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. Данный планшет 3 раза промывали 250 мкл раствора PBST (PBS, содержащий 0,1% Tween 20) на лунку. Данный планшет блокировали 250 мкл 5% молока на лунку при 37°C в течение 2 ч. Данный планшет 3 раза промывали 250 мкл раствора PBST на лунку. Добавляли биотинилированный антиген DLL3 (1 мкг/мл) (SEQ ID NO: 9), и данный планшет инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Данный планшет 3 раза промывали 250 мкл раствора PBST на лунку. Готовили антитела Hu6, Hu100, BI-764532 и C25 (негативное антитело) (максимальная концентрация 100 нМ, серийно разведенные в 4 раза), и инкубацию проводили при 37°C в течение 1 ч. Данный планшет 6 раз промывали 250 мкл раствора PBST на лунку. Рабочие концентрации человеческого IgG (H+L)-HRP (Jackson, 109-035-003, разведение 1:4000) добавляли в объеме 100 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Данный планшет 6 раз промывали 250 мкл раствора PBST на лунку. Добавляли раствор субстрата TMB (тетраметилбензидин) (KPL, 5120-0077) в объеме 100 мкл/лунку, и обеспечивали развитие окрашивания при комнатной температуре в течение 5-10 мин. Добавляли 1 М H₂SO₄ в объеме 100 мкл/лунку для остановки развития окрашивания, и получали показания микропланшет-ридера (Molecular Devices, VERSA max) при 450 нм.

Таблица 10. Активность связывания белка антител

Антитело	E _{max} (значение ОП)	EC ₅₀ (нМ)
Hu100	2,05	0,05
Hu6	2,13	0,04

Данные результаты показывают то, что: оба антитела Hu6 и Hu100 имеют превосходные способности к связыванию с DLL3.

5 Пример испытаний 2: анализ связывания FACS на уровне клеток

Клетки клеточных линий мелкоклеточного рака легкого, экспрессирующие DLL3, H1184 (ATCC, кат. № CRL-5858), DLL3/H82, cynoDLL3/CHO-s и RatDLL3/CHO-s суспендировали в количестве 1×10^6 /мл в буфере FACS (1% BSA + PBS, pH 7,4), и суспензии клеток добавляли в 96-луночный круглодонный планшет (Corning, 3795) в объеме 100 мкл/лунку. Данный планшет центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, и супернатант удаляли. Добавляли разные концентрации тестируемых антител в объеме 100 мкл/лунку. Данный планшет инкубировали в темноте в холодильнике при 4°C в течение 1 ч. После 3 промывок посредством центрифугирования при 300 g добавляли рабочие концентрации APC против Fc человеческого IgG (Biolegend, 410712) или конъюгированный с PE (фикоэритрин) F(ab')₂ козы против человеческого IgG (Invitrogen, H10104). Планшет инкубировали в темноте в холодильнике при 4°C в течение 40 мин. После 3 промывок посредством центрифугирования при 300 g измеряли среднее геометрическое интенсивности флуоресценции на проточном цитометре Invitrogen, и рассчитывали значения EC₅₀ антител при связывании с клетками, экспрессирующими DLL3. Результаты показаны в Таблице 11-1, Таблице 11-2, Таблице 11-3 и на ФИГ. 1А – ФИГ. 1С.

Таблица 11-1. Активность антител при связывании с DLL3, экспрессируемом клетками.

Клетка	H1184		cynoDLL3/CHO-s		RatDLL3/CHO-s	
	E _{max}	EC ₅₀ (нМ)	E _{max}	EC ₅₀ (нМ)	E _{max}	EC ₅₀ (нМ)
Hu6	2073	0,06	1762	0,32	2112	1,42
Hu100	2112	0,15	2075	0,55	Нет связывания	
BI-764532	1625	3,94	963	3,42	Нет связывания	

Таблица 11-2. Активность антител при связывании с клетками DLL3/H82, экспрессирующими человеческий DLL3

Антитело	E _{max}	EC ₅₀ (нМ)
M100CHI	13513	0,25
hAb100L1H1	14315	0,24
hAb100L1H2	14807	0,30
hAb100L1H3	14865	0,25
hAb100L1H4	14908	0,22

hAb100L2H1	14409	0,29
hAb100L2H2	14821	0,16
hAb100L2H3	14785	0,30
hAb100L2H4	13159	0,32

Таблица 11-3. Активность антител при связывании с клетками H1184

Антитело	E _{max}	EC ₅₀ (нМ)
M6CHI	3367	0,14
hAb6L2H2	2193	0,06
hAb6L4H4	2312	0,06
hAb6L2H5	2486	0,06
hAb6L2H6	2422	0,05
hAb6L2H7	2196	0,07
hAb6L2H11	1959	0,04
hAb6L2H12	2145	0,10
hAb6L2H13	2105	0,10
hAb6L4H6	2004	0,17
hAb6L4H11	2188	0,07
hAb6L4H12	2131	0,05
hAb6L4H13	2118	0,09

Данные результаты демонстрируют то, что: все антитела в настоящем раскрытии могут специфично связываться с DLL3, экспрессируемым клетками, и среди них Hu6 демонстрировало относительно высокие способности к связыванию с клетками, экспрессирующими DLL3 разных видов. Hu100 демонстрировало превосходные способности к связыванию с клетками, экспрессирующими DLL3 человека и яванского макака, но Hu100 не связывалось с клетками, экспрессирующими крысиный DLL3. BI-764532 демонстрировало лишь способности к связыванию с клетками, экспрессирующими DLL3 человека и яванского макака, и его активность связывания была слабее, чем активность связывания Hu6 и Hu100.

Пример испытаний 3: анализы связывания DLL1 и DLL4

Стабильно трансфицированные человеческие клетки DLL1/CHO-s и человеческие клетки DLL4/CHO-s суспендировали в количестве 1×10^6 /мл в буфере FACS (содержащем 1% BSA и PBS, pH 7,4), и добавляли данные суспензии клеток в 96-луночный круглодонный планшет (Corning, 3795) в объеме 100 мкл/лунку. Данный планшет центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, и супернатант удаляли. Тестируемые антитела добавляли в объеме 100 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в темноте в холодильнике при 4°C в течение 1 ч.

После 3 промывок посредством центрифугирования при 300 g добавляли рабочие концентрации конъюгированного с PE вторичного антитела F(ab')₂ козы против Fc человеческого IgG (Invitrogen, H10104). Планшет инкубировали в темноте в холодильнике при 4°C в течение 40 мин. После 3 промывок посредством центрифугирования при 300 g измеряли среднее геометрическое интенсивности флуоресценции на проточном цитометре Invitrogen.

Данные результаты показывают то, что ни антитело Hu6, ни Hu100 не связывается с человеческим DLL1 или DLL4.

10 **Пример испытаний 4: анализ аффинности антител Biacore**

Тестируемые антитела аффинно захватывали с использованием биосенсорного чипа с белком A (кат. № 29127556, Cytiva) в течение 18 секунд, и затем давали протекать над поверхностью чипа следующим антигенам: человеческий DLL3 (ACRO, DLL3-H52H4), DLL3 яванского макака (KACTUS, DLL-RM103) и мышинный DLL3 (KACTUS, DLL-MM103) в течение 180 секунд, с последующими 600 секундами диссоциации. Сигналы реакции выявляли в реальном времени с использованием прибора Biacore 8K (Cytiva) с получением кривых ассоциации и диссоциации. После диссоциации в каждом экспериментальном цикле биосенсорный чип промывали и регенерировали 10 mM раствором глицина-соляной кислоты (pH 1,5) (кат. № BR-1003-54, Cytiva). Аппроксимировали к данным модель 1:1. Результаты показаны в Таблице 12-1, Таблице 12-2 и Таблице 12-3.

Таблица 12-1. Аффинность антител

Антиген \ Антитело	Hu6 KD (M)	Hu100 KD (M)
Человеческий DLL3	5,94E-10	4,71E-10
DLL3 яванского макака	1,31E-09	1,11E-09
Мышиный DLL3	6,52E-09	Нет связывания

25 Таблица 12-2. Аффинность антител в отношении человеческого DLL3

Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
M100CHI	1,03E+06	5,46E-04	5,28E-10
hAb100L1H1	8,58E+05	3,74E-04	4,36E-10
hAb100L1H2	7,81E+05	3,65E-04	4,67E-10
hAb100L1H3	8,32E+05	3,52E-04	4,24E-10
hAb100L1H4	3,48E+05	2,54E-04	7,29E-10

hAb100L2H1	5,72E+05	6,29E-04	1,10E-09
hAb100L2H2	8,48E+05	3,70E-04	4,37E-10
hAb100L2H3	4,04E+05	2,68E-04	6,64E-10
hAb100L2H4	6,52E+05	6,55E-04	1,00E-09

Таблица 12-3. Аффинность антител в отношении человеческого DLL3

Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
M6CHI	9,65E+05	6,57E-04	6,81E-10
hAb6L1H1	7,98E+05	2,25E-03	2,81E-09
hAb6L1H2	7,87E+05	1,73E-03	2,19E-09
hAb6L1H3	8,12E+05	2,24E-03	2,76E-09
hAb6L2H1	7,09E+05	1,55E-03	2,19E-09
hAb6L2H2	7,04E+05	1,16E-03	1,64E-09
hAb6L2H3	6,95E+05	1,39E-03	2,01E-09
hAb6L3H1	7,15E+05	1,44E-03	2,02E-09
hAb6L3H2	7,16E+05	1,14E-03	1,59E-09
hAb6L3H3	7,18E+05	1,35E-03	1,88E-09
hAb6L4H4	7,43E+05	1,08E-03	1,45E-09
hAb6L2H5	8,10E+05	7,84E-04	9,69E-10
hAb6L2H6	8,63E+05	7,56E-04	8,77E-10
hAb6L2H7	6,70E+05	2,05E-03	3,06E-09
hAb6L2H11	2,06E+06	7,49E-04	3,63E-10
hAb6L2H12	1,98E+06	9,13E-04	4,61E-10
hAb6L2H13	2,10E+06	8,03E-04	3,82E-10
hAb6L4H6	1,91E+06	8,11E-04	4,24E-10
hAb6L4H11	2,14E+06	6,72E-04	3,14E-10
hAb6L4H12	2,06E+06	8,05E-04	3,91E-10
hAb6L4H13	2,16E+06	6,95E-04	3,22E-10

5 Данные результаты показывают то, что гуманизированные и химерные антитела mAb100 и mAb6 могут специфично связываться с человеческим DLL3 с относительно высокой аффинностью. Антитело Hu6 демонстрировало относительно высокую аффинность в отношении DLL3 человека, яванского макака и мыши; Hu100 демонстрировало относительно высокую аффинность в отношении DLL3 человека и яванского макака, но не связывалось с мышинным DLL3.

10

Пример испытаний 5: анализ конкурентного связывания эпитопов антител

15 Антитело BI-764532 (1 мкг/мл) переносили на планшет в объеме 100 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. Данный планшет 3 раза промывали 250 мкл раствора PBST на лунку. Планшет

блокировали 250 мкл 5% молока на лунку при 37°C в течение 2 ч. Данный планшет 3 раза промывали 250 мкл раствора PBST на лунку. Добавляли биотинилированный DLL3-стрептавидин (0,1 мкг/мл, SEQ ID NO: 9). Готовили конкурентные антитела BI-764532, Hu6 и Hu100 (максимальная концентрация 100 мкг/мл, серийно разведенные в 4 раза), и проводили инкубацию при 37°C в течение 1 ч. Планшет 6 раз промывали 250 мкл раствора PBST на лунку. Добавляли стрептавидин-пероксидазу (разведение 1:2000) (Jackson Immuno Research, 016-030-084) в объеме 100 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Планшет 6 раз промывали 250 мкл раствора PBST на лунку. Добавляли раствор субстрата TMB (KPL, 5120-0077) в объеме 100 мкл/лунку, и давали развиваться окрашиванию при комнатной температуре в течение 5-10 мин. Добавляли 1 М H₂SO₄ в объеме 100 мкл/лунку для остановки развития окрашивания, и получали показания микропланшет-ридера при 450 нм. Результаты показаны на ФИГ. 2.

Данные результаты показывают, что не было конкуренции между антителами Hu6, Hu100 и BI-764532, что свидетельствует о том, что антитела Hu6 и Hu100 связываются с эпитопами, отличными от эпитопов, с которыми связывается BI-764532.

Пример испытаний 6: анализ эндоцитозной активности антител против DLL3

DT3C представляет собой рекомбинантно экспрессируемый слитый белок, и он образуется слиянием фрагмента А дифтерийного токсина (только группировка токсина) и фрагмента 3С стрептококка группы G (группировка, связывающая IgG). Данный белок может иметь высокую аффинность в отношении группировки IgG антитела, поступает в клетки при эндоцитозе антитела и высвобождает токсичный DT под действием внутриклеточной протеазы фурина. DT может ингибировать активность рибозилирования EF2-АДФ, блокируя процесс трансляции белка и, наконец, вызывая гибель клетки. DT3C, который не поступает в клетку, не имеет активности, умерщвляющей клетку. Активность эндоцитоза антител оценивали на основе умерщвления клеток.

Экспериментальная методика

а. Суспензию клеток DMS53/DLL3 готовили в свежей среде для культивирования клеток RPMI1640 (GE, SH30809.01), содержащей 20% FBS, и добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток в количестве 2000

клеток/50 мкл/лунку, причем вертикальные ряды 1 и 12 содержали только 50 мкл среды и не содержали клеток. Данный планшет инкубировали при 37°C с 5%-ным диоксидом углерода в течение 16 ч.

5 б. Получали 4× раствор DT3C (9600 нМ, экспрессирован и очищен Shanghai Panchao Biotechnology Co., Ltd.) в бессывороточной среде и фильтровали с использованием 0,22 мкм фильтра. Получали 4× раствор антитела (1600 нМ) в бессывороточной среде. 80 мкл раствора DT3C и 80 мкл раствора антитела смешивали в соотношении 1:1 по объему, и данную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

10 с. Данную смесь серийно 5-кратно разводили бессывороточной средой для 9 концентраций, причем 10-ая точка представляла собой чистую среду.

d. 50 мкл разведения антитела добавляли к клеткам, и данный планшет инкубировали в инкубаторе в течение трех суток.

15 е. CTG (люминисцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®, Promega, G7573) добавляли в объеме 50 мкл/лунку. Данный планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин, и хемилюминисценцию измеряли на Victor 3.

Данные результаты показаны в Таблице 13 ниже и на ФИГ. 3.

Таблица 13. Умерщвление клеток, вызванное эндоцитозом антител

Антитело	IC50 (нМ)	Imax
Hu6	0,56	87,16
Hu100	1,47	86,13
BI-764532	3,27	86,51

20

Данные результаты показывают, что оба антитела, Hu6 и Hu100, могут эндоцитозироваться клетками.

25 **Пример испытаний 7: анализ токсичности ADC для клеток с разными уровнями экспрессии DLL3**

Экспериментальная методика была следующей:

30 а. Суспензию клеток готовили в свежей среде для культивирования клеток, содержащей 10% FBS, и добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток (Corning, 3903) в объеме 135 мкл/лунку, причем вертикальные ряды 1 и 12 содержали 135 мкл среды и не содержали клеток. Данный планшет инкубировали при 37°C с 5%-ным диоксидом углерода в течение 16 ч.

б. Рабочие растворы образцов ADC (10×) для первой лунки готовили в PBS, и с данной концентрацией в качестве исходной концентрации осуществляли

серийное разведение PBS в соответствующее число раз. 10× растворы ADC добавляли в объеме 15 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали при 37°C с 5%-ным диоксидом углерода в течение 6 суток.

5 с. CTG (Promega, G7573) добавляли в объеме 70 мкл/лунку. Данный планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин, и хемилюминисценцию измеряли на Victor 3. Данные обрабатывали с использованием GraphPad Prism5, и абсцисса представляет концентрацию антитела или ADC, а ордината представляет интенсивность света.

10 Плотности переноса в планшеты для разных клеток, концентрации рабочего раствора для первой лунки (10×) и кратности разведения показаны в Таблице 14.

Таблица 14. Плотности посева клеток и концентрации рабочего раствора для первой лунки

Клетка	Среда	Число клеток на лунку	Концентрация (нМ)	Серийное разведение
DMS53	RPMI1640+20%FBS+1 × GlutaMAX	1000	6400	2,5-кратное разведение, 14 концентраций
H1184	RPMI1640+5%FBS	1000	800	5-кратное разведение, 9 концентраций
HT-29	МакКоя 5A +10% FBS	500	6400	2,5-кратное разведение, 15 концентраций
U-2 OS	МакКоя 5A +10% FBS	500	6400	2,5-кратное разведение, 15 концентраций
CHO-K1	DMEM/F12(1:1)+10% FBS	500	40000	2,5-кратное разведение, 17 концентраций

Клетки, использованные в данном анализе, были следующими:

15 DMS53 (+), приобретенные в ATCC, CRL-2062;

H1184 (+++), приобретенные в ATCC, CRL-5858;

U-2OS (-), приобретенные в ATCC, HTB-96,

HT-29 (-), приобретенные в ATCC, HTB-38;

CHO-K1 (-), приобретенные в ATCC, CCL-61.

20 «+» указывает уровень экспрессии DLL3, «-» указывает то, что DLL3 не экспрессируется.

Результаты показаны в Таблице 15 и на ФИГ. 4А – ФИГ. 4Е.

Таблица 15. Ситотоксическая активность ADC в отношении клеток с разными уровнями экспрессии DLL3

ADC	DMS53 (+)		H1184 (+++)	
	IC50 (нМ)	I _{max} (%)	IC50 (нМ)	I _{max} (%)
ADC-1	8,27	99,37	0,11	99,56
ADC-2	13,12	99,37	0,11	99,71

Данные результаты показывают, что ADC-1 и ADC-2 обладают относительно сильной цитотоксической активностью в отношении клеток-мишеней: они могут умерщвлять экспрессирующие DLL3 DMS53 и H1184, но не могут умерщвлять DLL3-негативные клетки U-2OS, HT-29 и CHO-K1.

Пример испытаний 8: анализ активности неспецифического цитолиза

Клетки DMS53/DLL3^{high} (клетки DMS53, стабильно трансфицированные DLL3) и U-2OS (ATCC, HTB-96) культивировали с использованием RPMI1640 плюс 20% FBS плюс 1× GlutaMax и среды Маккоя 5A + 10% FBS соответственно. Данные клетки трипсинизировали, нейтрализовали свежей средой и центрифугировали при 1000 об./мин в течение 3 мин. Супернатант отбрасывали, и клетки ресуспендировали в RPMI1640 плюс 20% FBS плюс 1× GlutaMax. После подсчета клеток плотность клеток DMS53/DLL3^{high} корректировали до 9×10^4 клеток/мл, и плотность клеток U-2OS корректировали до 3×10^4 клеток/мл. 500 мкл клеток DMS53/DLL3^{high} и 500 мкл клеток U-2OS добавляли в каждую из соответствующих лунок 12-луночного планшета. 500 мкл клеток U-2OS и 500 мкл среды RPMI1640 плюс 20% FBS плюс 1× GlutaMax добавляли в соответствующие лунки 12-луночного планшета. Данные планшеты инкубировали при 37°C с 5%-ным диоксидом углерода в течение 24 ч. Готовили 40× промежуточные растворы (200 нМ) образцов. 25 мкл каждого из приведенных выше образцов ADC отбирали и добавляли в соответствующие лунки 12-луночных планшетов. Создавали контрольную группу с растворителем. Данные планшеты культивировали при 37°C с 5%-ным диоксидом углерода в течение 6 суток. Клетки в 12-луночных планшетах трипсинизировали и нейтрализовали свежей средой. 20 мкл клеток отбирали, и добавляли 20 мкл трипанового синего. Данные клетки подсчитывали. Клетки центрифугировали при 1000 об./мин в течение 3 мин, и супернатант отбрасывали. Данные клетки один раз промывали 100 мкл буфера FACS, центрифугировали при 1500 об./мин в течение 3 мин, и супернатант отбрасывали. Клетки

ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS, и добавляли 2 мкг/мл позитивного антитела против DLL3. Данную суспензию инкубировали на льду в течение 60 мин. Клетки один раз промывали буфером FACS, центрифугировали при 1500 об./мин в течение 3 мин, и добавляли вторичное антитело против APC против Fc человеческого IgG (100×). Клетки инкубировали в течение 30 мин и один раз промывали буфером FACS. 200 мкл буфера FACS добавляли для ресуспендирования клеток, и данную суспензию анализировали FACS. Данные проточной цитометрии анализировали с использованием FlowJo с получением доли DMS53/DLL3high, и рассчитывали общее количество DMS53/DLL3high и U-2OS. Данные строили на графике с использованием GraphPad Prism5, причем абсцисса представляет разные образцы, и ордината представляет расчетное число клеток. Результаты показаны на ФИГ. 5.

Данные результаты показывают то, что ADC-1 и ADC-2 имеют значимые неспецифические цитотоксические эффекты.

15

Биологические оценки активности *in vivo*

Пример испытаний 9: оценка эффективности *in vivo* мышинной модели CDX клеток DMS53

200 мкл клеток мелкоклеточного рака легкого человека DMS53 (5×10^6 клеток, содержащих 50% матригеля/мышь; ATCC, CRL-2062) подкожно инокулировали в правый бок каждой мыши Balb/c. Через 21 сутки после инокуляции, когда объем опухоли составлял примерно 200 мм^3 , мышей, которые имели избыточную массу тела и имели опухоли, которые были либо слишком большими, либо слишком маленькими, исключали. Данных мышей рандомизировали в группы из 8 согласно объему опухоли, и введение начинали в эти сутки. ADC вводили внутривентриально в дозе 1,8 мг/кг один раз в неделю, и всего осуществляли 2 введения. Объем опухоли и массу тела измеряли дважды в неделю, и записывали данные. Данные записывали с использованием статистической программы Excel: средние значения рассчитывали с использованием avg; значения SD рассчитывали с использованием STDEV; значения SEM рассчитывали с использованием STDEV/SQRT (число животных на группу); графики получали с использованием программы GraphPad Prism, и статистический анализ данных проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа или однофакторного дисперсионного анализа.

Объем опухоли (V) рассчитывали с использованием формулы: $V = 1/2 \times L_{\text{длинное}} \times L_{\text{короткое}}^2$

Относительный показатель пролиферации опухоли T/C (%) = $(T - T_0)/(C - C_0) \times 100\%$, где T и C представляют объемы опухолей группы обработки и контрольной группы в конце эксперимента; T_0 и C_0 представляют объемы опухолей в начале эксперимента.

Показатель ингибирования роста опухоли TGI (%) = $1 - T/C$ (%).

Данные результаты показаны в Таблице 16 и на ФИГ. 6.

Таблица 16. Эффективность ADC против ксенотрансплантатов опухолей DMS53 у голых мышей, несущих опухоли

ADC	TGI в сутки 18 (%)
ADC-1	56,71
ADC-2	58,71

Данные результаты показывают то, что при дозе 1,8 мг/кг и ADC-1, и ADC-2 могут в значительной степени ингибировать рост подкожных ксенотрансплантатов опухолей клеток DMS53.

Пример испытаний 10: оценка эффективности *in vivo* в мышинной модели CDX с клетками H1184

200 мкл клеток человеческого мелкоклеточного рака легкого NCI-H1184 (5×10^6 клеток, содержащих 50% матригеля; ATCC, CRL-5858) подкожно инокулировали в правый бок каждой мыши NDG. Через 18 суток после инокуляции, когда объем опухоли составлял 180 мм^3 , мышей, которые имели избыточную массу тела и имели опухоли, которые были либо слишком большими, либо слишком маленькими, исключали. Данных мышей рандомизировали в группы из 8 согласно объему опухоли, и введение начинали в эти сутки. ADC инъецировали внутрибрюшинно в дозе 1,8 мг/кг. ADC вводили один раз в неделю, и осуществляли 3 введения. Объем опухоли и массу тела измеряли дважды в неделю, и записывали данные.

Данные записывали с использованием статистической программы Excel: средние значения рассчитывали с использованием avg; значения SD рассчитывали с использованием STDEV; значения SEM рассчитывали с использованием STDEV/SQRT (число животных на группу); графики получали с использованием программы GraphPad Prism, и статистический анализ данных проводили с

использованием двухфакторного дисперсионного анализа или однофакторного дисперсионного анализа.

Объем опухоли (V) рассчитывали с использованием формулы: $V = 1/2 \times L_{\text{длинное}} \times L_{\text{короткое}}^2$

5 Относительный показатель пролиферации опухоли T/C (%) = $(T - T_0)/(C - C_0) \times 100\%$, где T и C представляют объемы опухолей группы обработки и контрольной группы в конце эксперимента; T_0 и C_0 представляют объемы опухолей в начале эксперимента.

Показатель ингибирования роста опухоли TGI (%) = $1 - T/C$ (%).

10 Данные результаты показаны в Таблице 17 и на ФИГ. 7.

Таблица 17. Эффективность ADC против ксенотрансплантатов опухолей H1184 у голых мышей, несущих опухоль

ADC	TGI в сутки 18 (%)
ADC-1	109
ADC-2	107

15 Данные результаты показывают то, что в дозе 1,8 мг/кг и ADC-1, и ADC-2 могут существенно ингибировать рост ксенотрансплантатов опухолей H1184.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против DLL3, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, в котором:

i) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27;

где SEQ ID NO: 57 представлена PLYX₁YGRSYNX₂VAY, где X₁ представляет собой Y или H; X₂ представляет собой A или G; или ii) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

предпочтительно,

переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, 30 или 31; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

2. Антитело против DLL3 по п. 1, представляющее собой мышиное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело.

3. Антитело против DLL3 по п. 1 или 2, в котором:

i) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с SEQ ID NO: 50, 14, 51, 52, 53 или 54; и/или

переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с SEQ ID NO: 55, 15 или 56; или

ii) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с SEQ ID NO: 43, 12, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 или 44; и/или

переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%-ную идентичность с SEQ ID NO: 48, 13, 45, 46, 47 или 49;

предпочтительно,

i) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53 и 54, и/или переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 или 56; или

ii) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 43, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 и 44, и/или переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 48, 45, 46, 47 и 49; или

iii) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и/или переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; или

iv) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и/или переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

более предпочтительно,

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; или

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

4. Антитело против DLL3 по любому из пп. 1-3, где указанное антитело против DLL3 представляет собой фрагмент антитела; предпочтительно указанный фрагмент антитела представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, Fd, Fv, scFv, dsFv, диатело или доменное антитело.

5. Антитело против DLL3 по любому из пп. 1-3, содержащее константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, где предпочтительно константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и/или константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

6. Антитело против DLL3 по п. 5, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где:

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%-ную идентичность с SEQ ID NO: 60, и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%-ную идентичность с SEQ ID NO: 61; или

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%-ную идентичность с SEQ ID NO: 58, и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%-ную идентичность с SEQ ID NO: 59;

предпочтительно

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; или

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

7. Антитело против DLL3 по любому из пп. 1-6, имеющее по меньшей мере одно из следующих свойств:

а) антитело против DLL3, связывающееся с человеческим DLL3 или его эпитопом со значением KD, меньшим или равным 3 нМ, меньшим или равным 2 нМ, меньшим или равным 1 нМ, при определении посредством Biacore;

б) антитело против DLL3, связывающееся с клетками H1184, экспрессирующими DLL3, с EC₅₀, меньшей или равной 3 нМ при определении посредством FACS (флуоресцентная сортировка клеток);

с) антитело против DLL3, способное к эндоцитозу клеткой, экспрессирующей DLL3; и

д) антитело против DLL3, связывающееся с DLL3 или его эпитопом с EC_{50} , меньшей или равной 0,1 нМ, при определении посредством ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

8. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против DLL3 по любому из пп. 1-7.

9. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 8.

10. Способ получения антитела против DLL3, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 9 в условиях, подходящих для экспрессии указанного антитела.

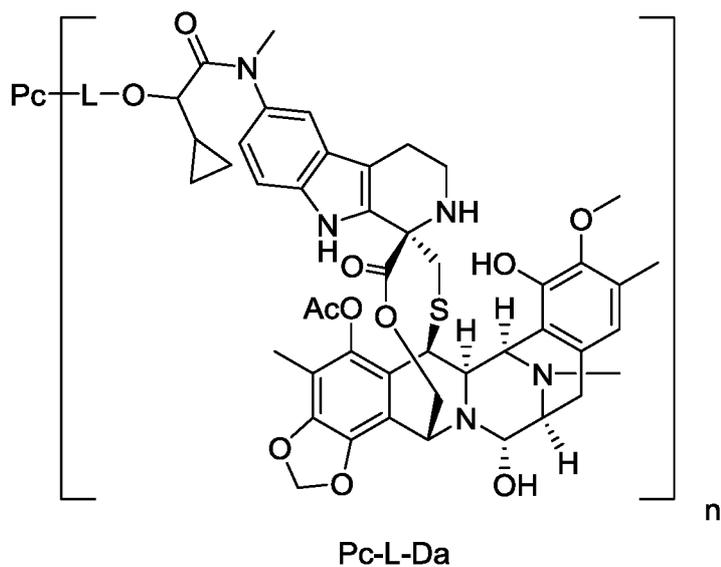
11. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль, содержащий:

антитело против DLL3 по любому из пп. 1-7 и

лекарственное средство;

где предпочтительно указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из одного или более чем одного из цитоксического средства, радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, агента для визуализации, иммуномодулятора, ингибитора ангиогенеза, ингибитора пролиферации клеток, проапоптозного средства и литического фермента.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль по п. 11, имеющий структуру, представленную общей формулой (Pc-L-Da):



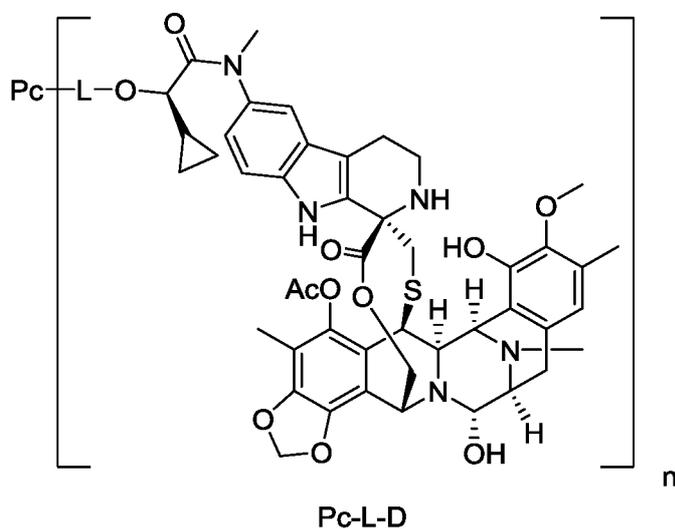
в которой:

Pc представляет собой антитело против DLL3 по любому из пп. 1-7;

L представляет собой линкер;

n равно от 1 до 10; предпочтительно n равно от 3 до 5.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль по п. 11 или 12, имеющий структуру, представленную общей формулой (Pc-L-D):



в которой:

Pc представляет собой антитело против DLL3 по любому из пп. 1-7;

L представляет собой линкер;

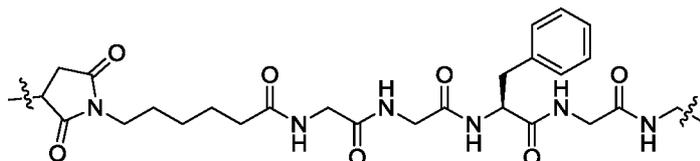
n равно от 1 до 10; предпочтительно n равно от 3 до 5.

L^3 представляет собой тетрапептидный остаток; предпочтительно L^3 представляет собой тетрапептидный остаток, содержащий глицин-глицин-фенилаланин-глицин;

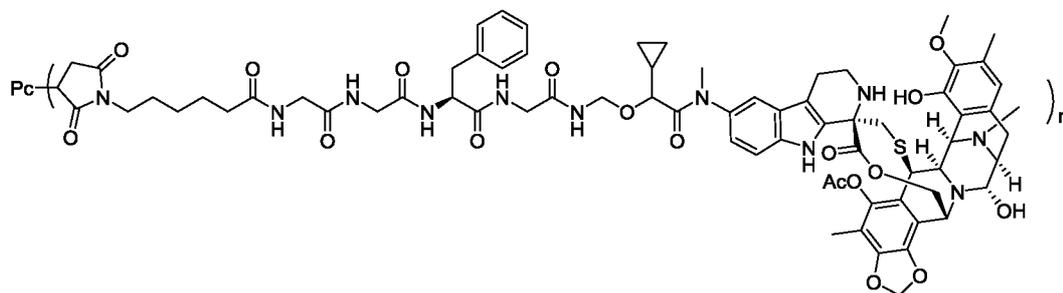
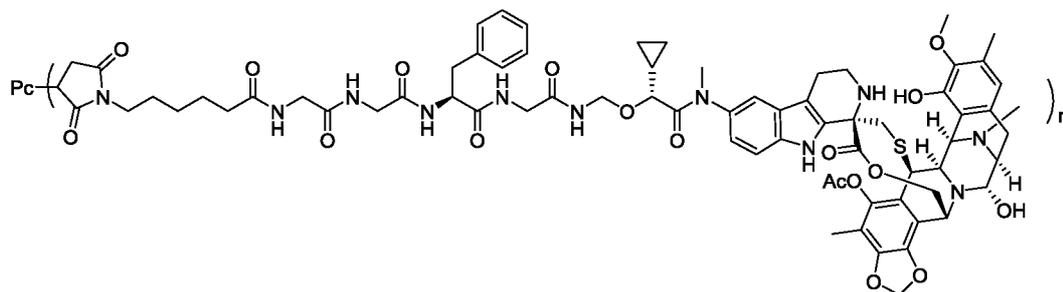
L^4 представляет собой $-NH(CH_2)_t-$, и t равен 1 или 2;

где конец L^1 соединен с Pc;

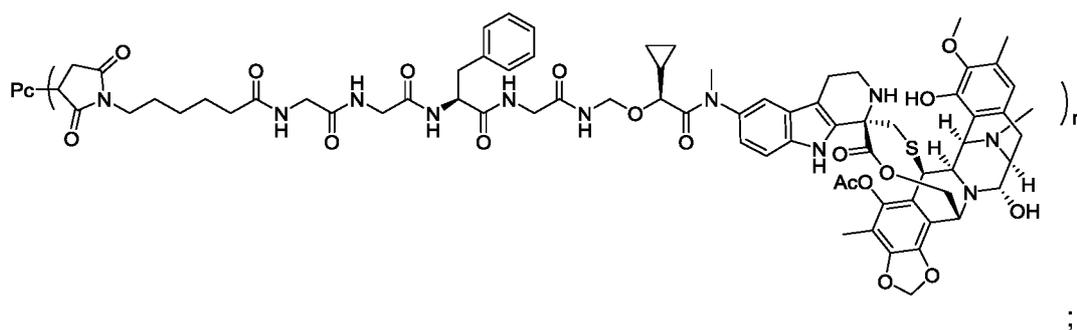
более предпочтительно указанный линкер представлен следующей структурой:



15. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 11-14, где указанный конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из следующего:

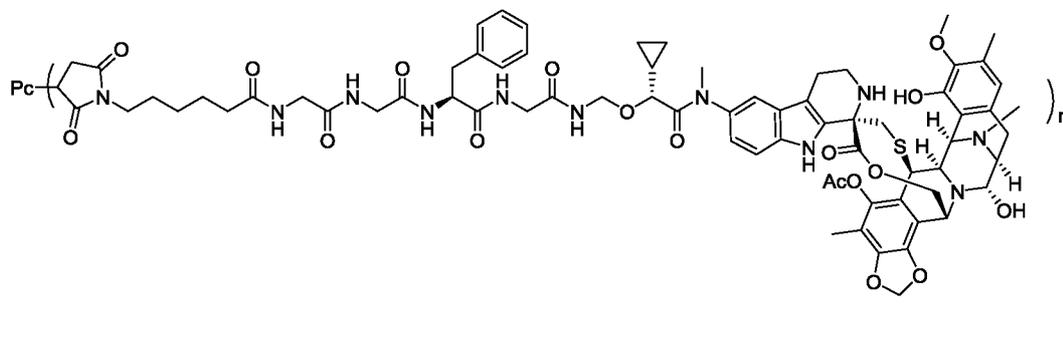


ИЛИ



где:

Pc представляет собой антитело против DLL3 по любому из пп. 1-7; n равно от 1 до 10; предпочтительно указанный конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру:



в которой

Pc представляет собой антитело против DLL3 по п. 6;

где n равно от 1 до 8; более предпочтительно n равно от 3 до 5.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая:

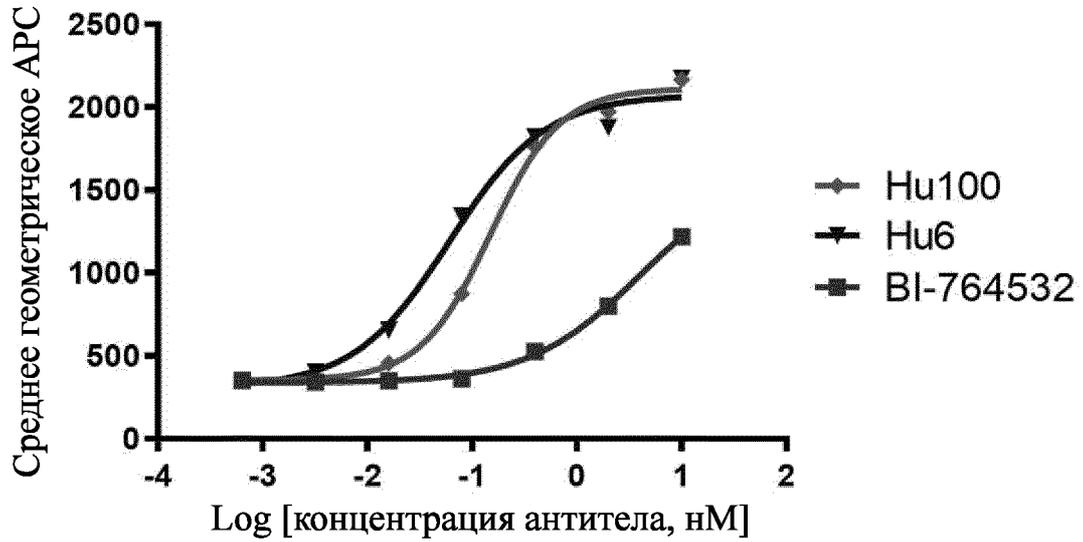
антитело против DLL3 по любому из пп. 1-7 или конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп. 11-15 и

один или более чем один фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

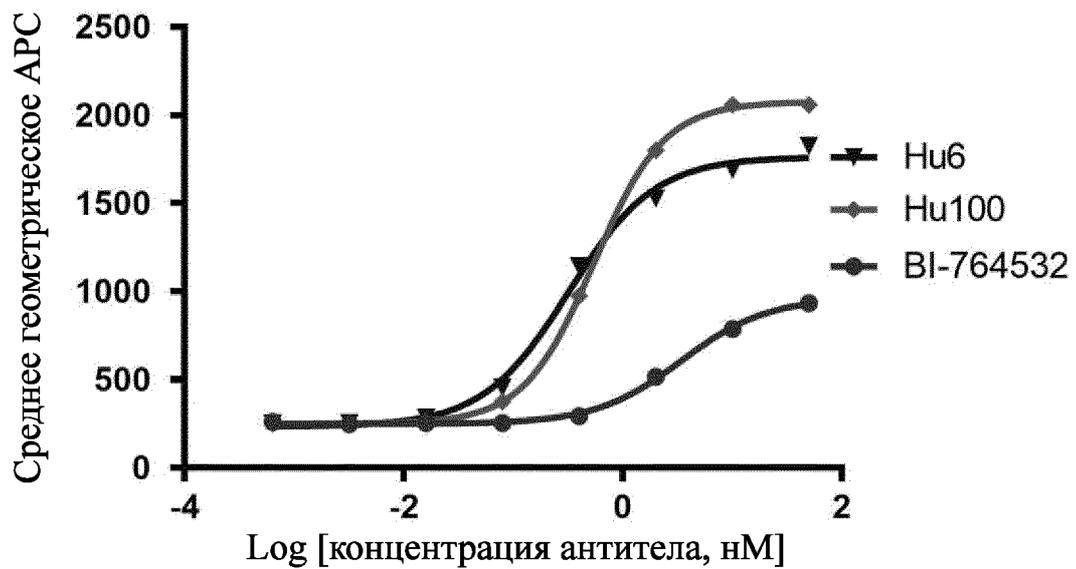
17. Применение антитела против DLL3 по любому из пп. 1-7 или конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 11-15, или фармацевтической композиции по п. 16 для получения лекарственного средства для лечения опухоли или рака, где предпочтительно опухоль или рак выбраны из группы, состоящей из следующих:

рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, крупноклеточный рак легкого, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак головы и шеи, рак мозга,

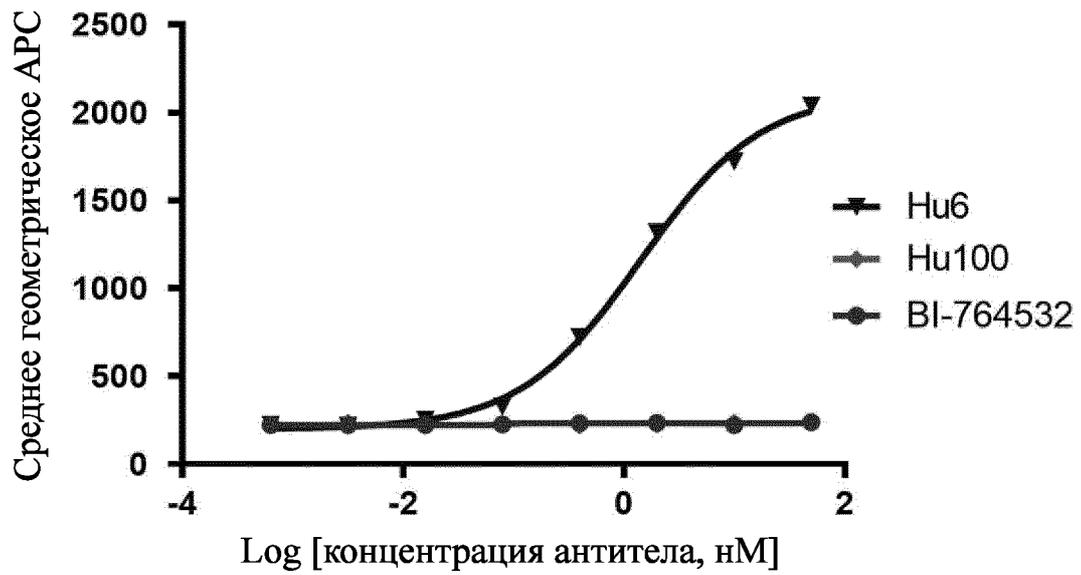
нейроглиома, мультиформная глиобластома, нейробластома, рак центральной нервной системы, нейроэндокринная опухоль, рак глотки, плоскоклеточная карцинома глотки, плоскоклеточная карцинома полости рта, рак носоглотки, рак пищевода, рак щитовидной железы, медуллярный рак щитовидной железы, злокачественная плевральная мезотелиома, рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы, рак печени, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, желудочно-кишечный рак, рак кишечника, колоректальный рак, рак почки, светло-клеточный почечно-клеточный рак, рак яичника, рак эндометрия, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак простаты, рак яичка, рак надпочечника, глиобластома, рак кожи и меланома; более предпочтительно данная опухоль или раковое заболевание представляет собой мелкоклеточный рак легкого.



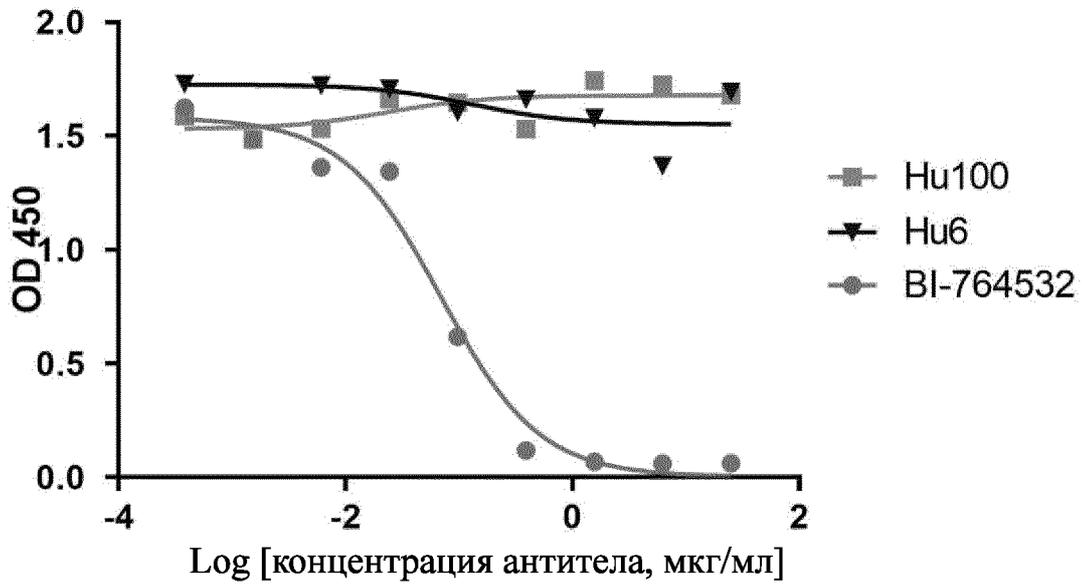
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

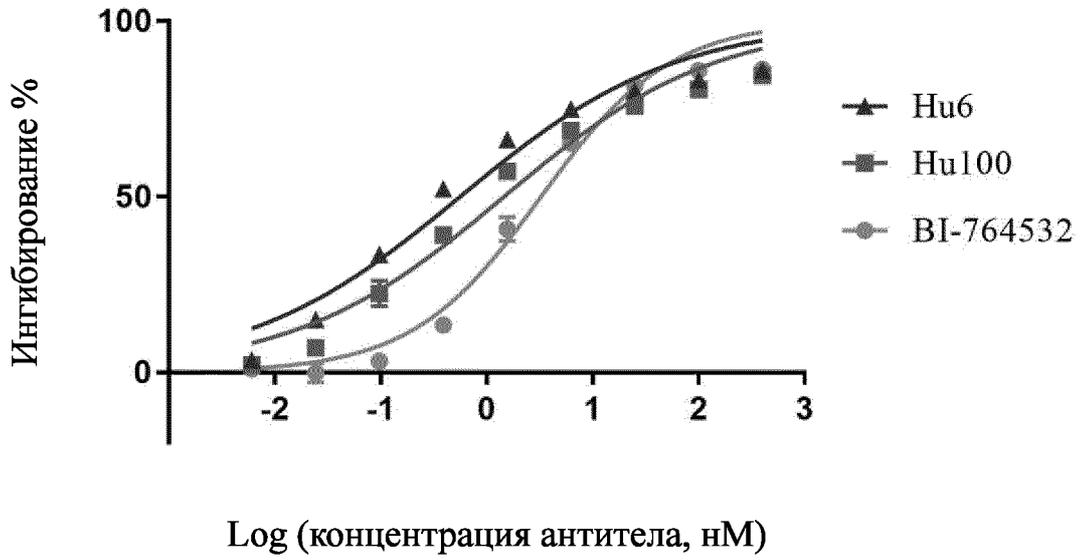


ФИГ. 1С

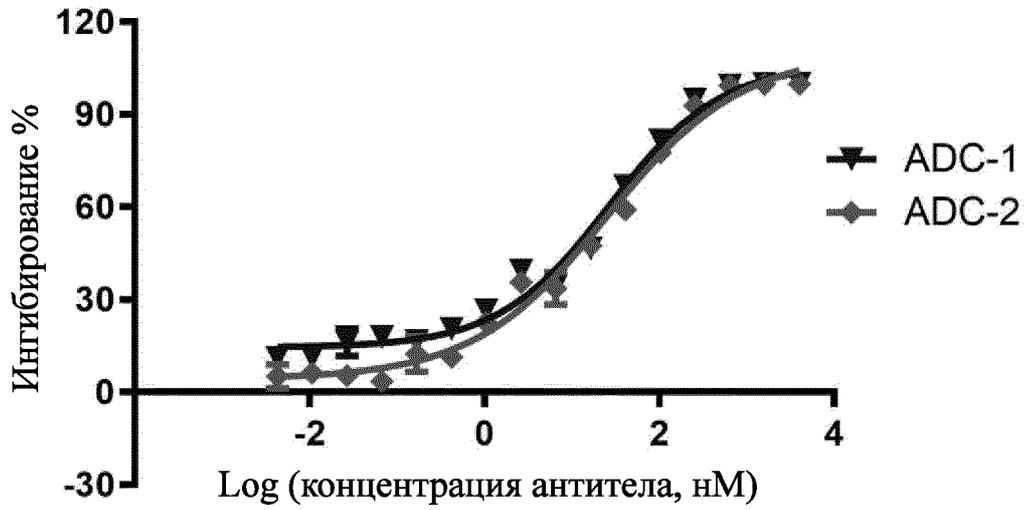


ФИГ. 2

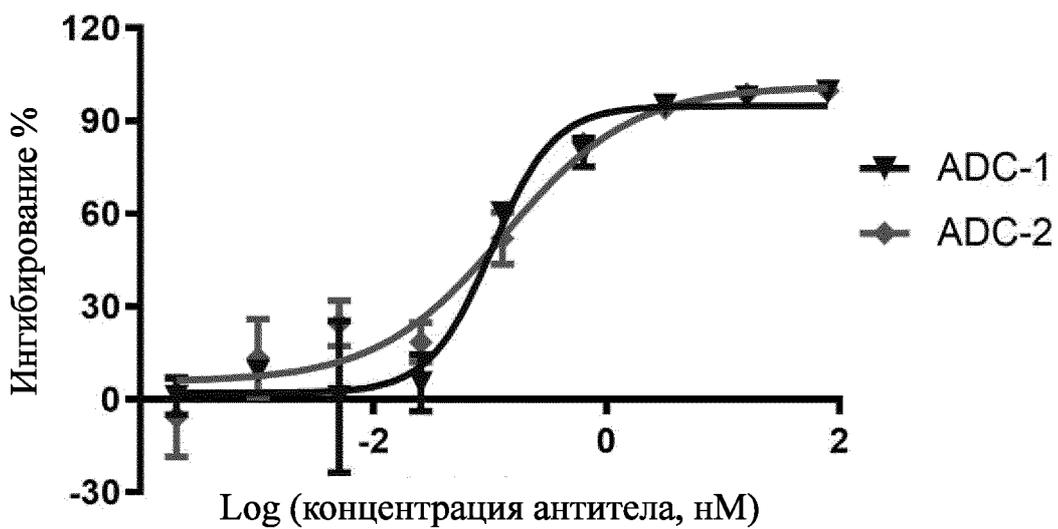
3



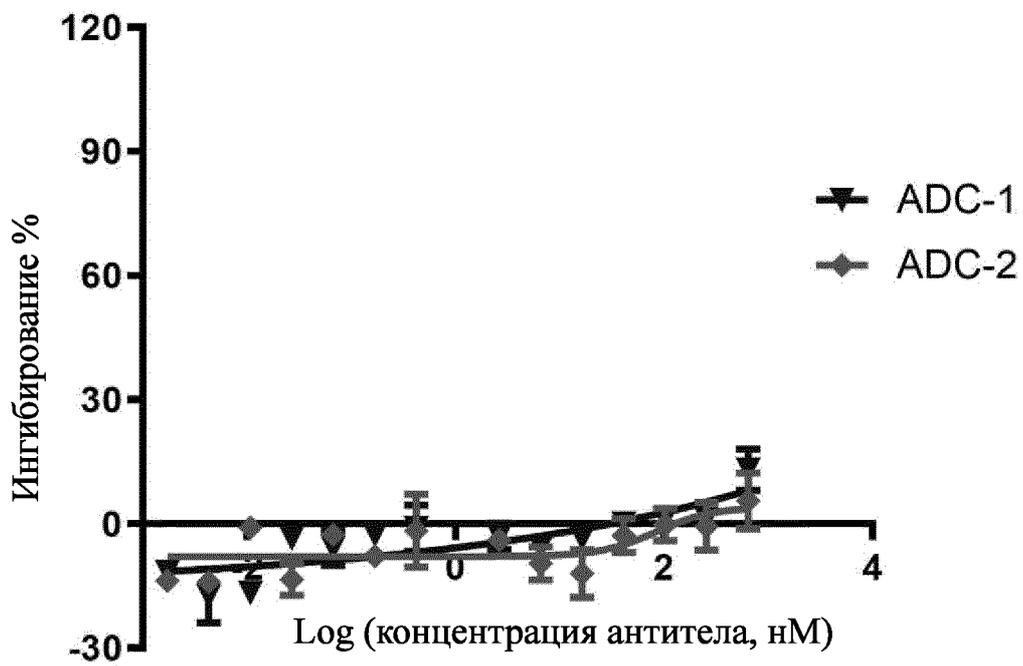
ФИГ. 3



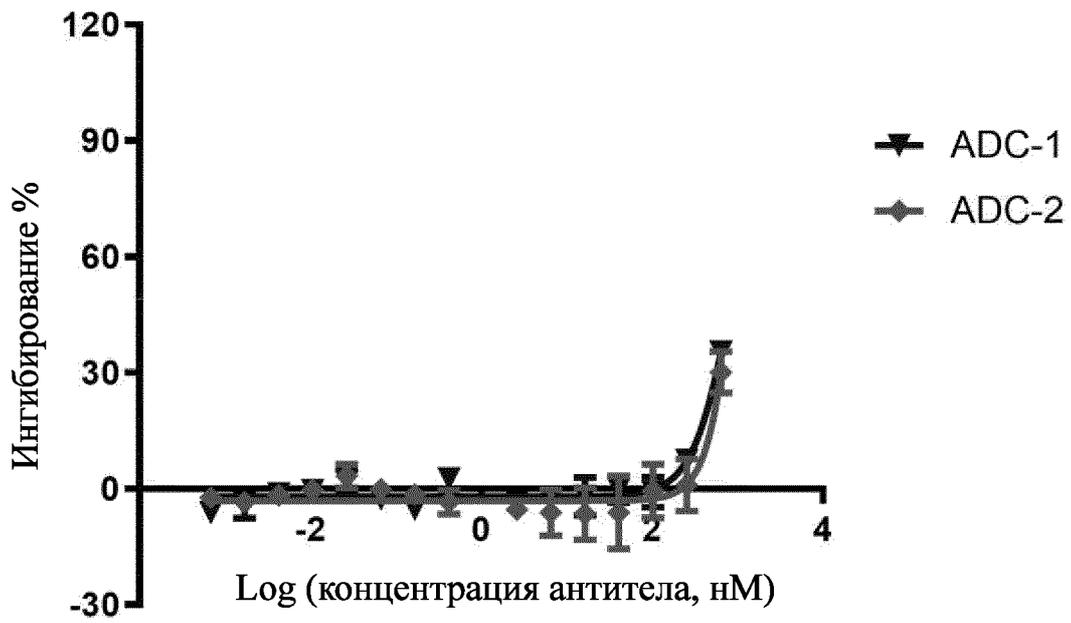
ФИГ. 4А



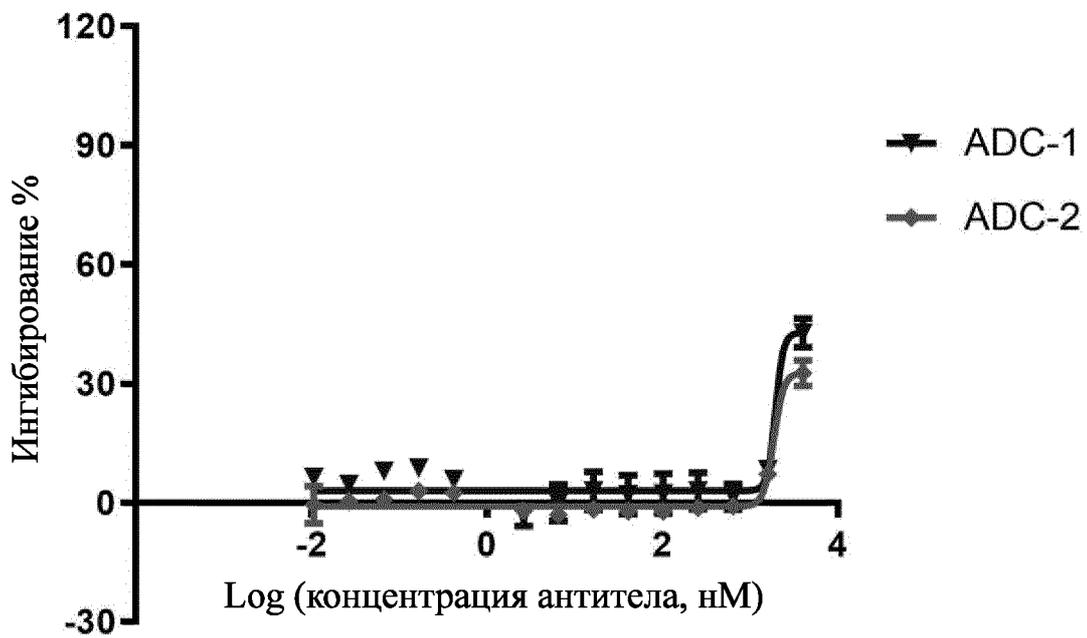
ФИГ. 4В



ФИГ. 4С

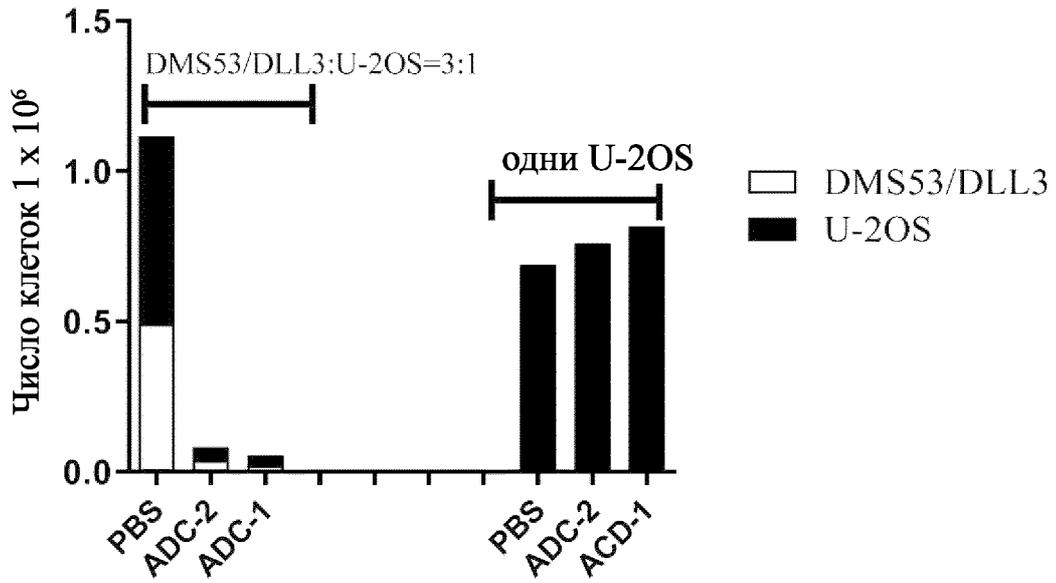


ФИГ. 4D

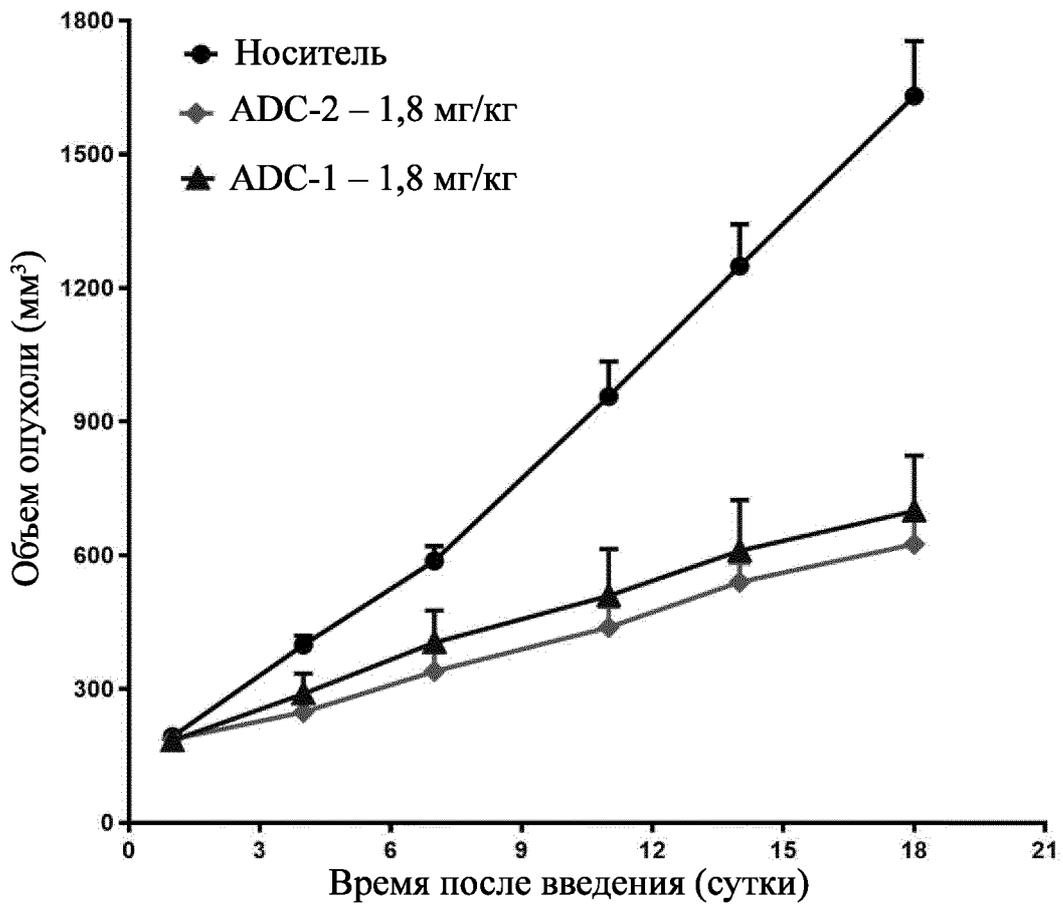


ФИГ. 4E

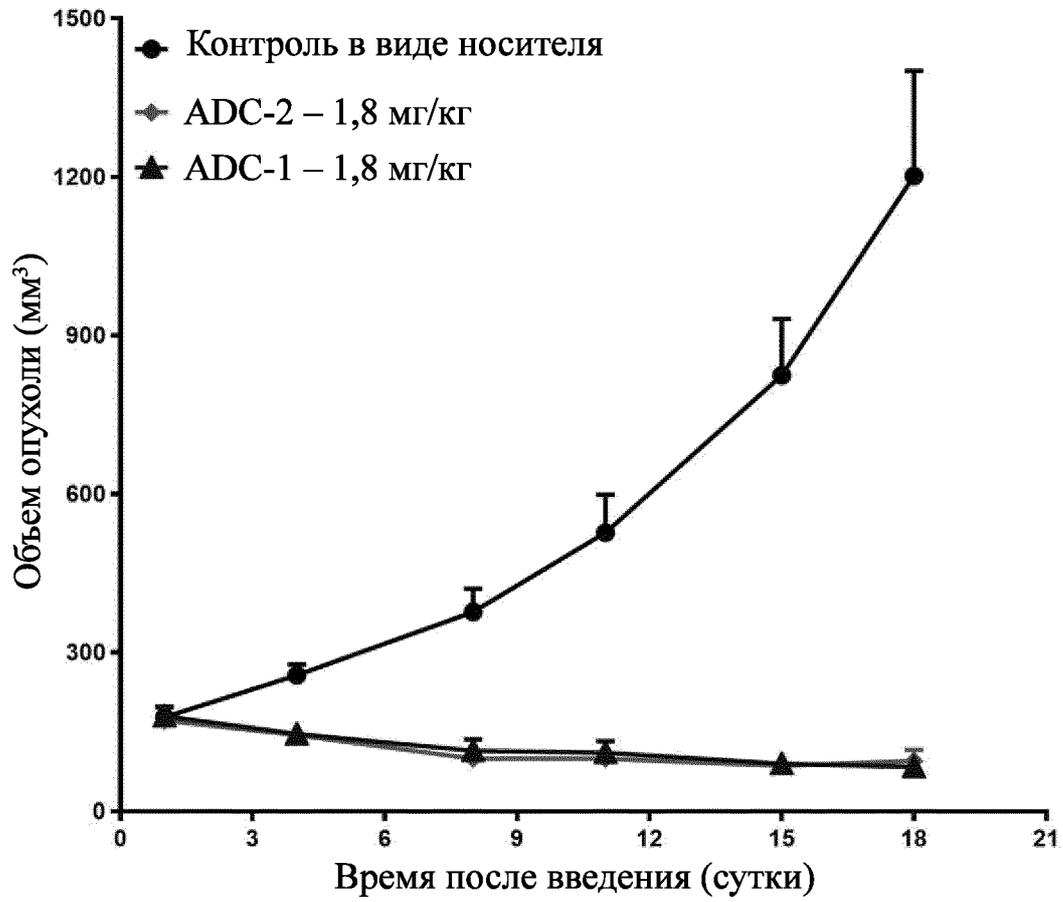
6



ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7