

抗 DLL3 抗体、其抗体-药物偶联物及其医药用途

技术领域

本披露涉及抗 DLL3 抗体、其抗体-药物偶联物及其医药用途。

5

背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

小细胞肺癌（Small Cell Lung Cancer, SCLC）属于一种比较恶性的肺癌类型，
10 占有所有肺癌病例的 10%-15%。小细胞肺癌的肿瘤生长速度快，容易转移，5 年生
存率低于 7%。对小细胞肺癌的治疗，常采用铂类/依托泊苷联用的化疗。小细胞肺
癌病人对化疗初期响应良好，但极易产生耐药和复发。近几年的免疫治疗，如 PD-L1
抗体和 PD1 抗体，对小细胞患者有一定的效果，但是有效率约为 15%。目前仍然
还没有开发出特异性的靶向治疗药物。

DLL3 是一种抑制 Notch 的配体。在正常状态下，DLL3 处于高尔基体上，在
15 癌细胞（如小细胞肺癌细胞）中，DLL3 会到细胞表面，以顺式方式结合 Notch，
阻碍细胞和细胞结合以及 Notch 在目标细胞的内存，从而抑制 Notch 信号通路，促
进肿瘤细胞的生长。DLL3 主要表达于神经或神经内分泌肿瘤，包括 SCLC、大细
胞神经内分泌癌、胃肠道神经内分泌瘤、小细胞膀胱癌、多形性胶质细胞瘤、转
移性去势性前列腺癌、黑色素瘤等。尤其是 SCLC，超过 80%的 SCLC 均表达 DLL3，
20 而在正常肺癌组织及癌旁组织中不表达。这种表达的差异性使得 DLL3 成为治疗
SCLC 的一种极具潜力的治疗靶点。

依喜替康类毒素是喜树碱衍生物，抑制拓扑异构酶 I，可选择性抑制增殖期肿
瘤细胞 DNA 复制。此外，依喜替康类毒素还具有良好的透膜性，可以穿透被杀死的
癌细胞，继续杀死旁边的癌细胞，在临床上具有明确的旁观者效应。

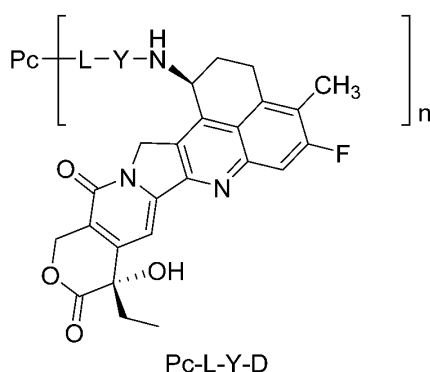
25 将抗体通过接头与具有生物活性的药物相连，获得抗体-药物偶联物(antibody
drug conjugate, ADC)。ADC 充分利用了抗体对正常细胞和肿瘤细胞表面抗原结合
的特异性和药物（如细胞毒性剂）的高效性，同时又避免了抗体的疗效偏低和药
物的毒副作用过大等缺陷。与以往传统的化疗药物相比，抗体-药物偶联物能更精
准地杀伤肿瘤细胞并降低将对正常细胞的影响。

30

发明内容

本披露涉及抗 DLL3 抗体、其抗体-药物偶联物及其医药用途。更具体的，本
披露提供多种全新序列的抗 DLL3 抗体与依喜替康类毒素偶联的 ADC。

35 在一些实施方案中，本披露提供一种抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，
其具有如通式 Pc-L-Y-D 所示的结构：



其中：

Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

- i) 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列；
 5 HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 57 的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列；

- 10 其中，SEQ ID NO: 57 如 $\text{PLYX}_1\text{YGRSYNX}_2\text{VAY}$ 所示，其中 X_1 为 Y 或 H； X_2 为 A 或 G；或

ii) 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列；和

- 15 所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列；

Y 为 $-\text{O}-(\text{CR}^a\text{R}^b)_m-\text{CR}^1\text{R}^2-\text{C}(\text{O})-$ ；其中， R^a 和 R^b 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素和 C_{1-6} 烷基；

- 20 R^1 为卤代 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基；

R^2 选自氢原子、卤代 C_{1-6} 烷基和 C_{3-6} 环烷基；

或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基；

m 为 0 至 4 的整数；

n 为 1 至 10（包括整数和小数）；

- 25 L 为接头。

在一些实施方案中，如前所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中 n 是每个抗体的平均药物模块数，可以是整数或小数。在一些实施方案中， n 为 1-10，或 2-10，或 3-10，或 4-10，或 5-10，或 6-10，或 7-10，或 8-10，或 1-9，或 2-9，或 3-9，或 4-9，或 5-9，或 6-9，或 7-9，或 1-8，或 2-8，或 3-8，或 4-8，

或 5-8, 或 6-8, 或 1-7, 或 2-7, 或 3-7, 或 4-7, 或 5-7, 或 1-6, 或 2-6, 或 3-6, 或 4-6, 或 1-5, 或 2-5, 或 3-5, 或 1-4, 或 2-4, 或 1-3。在一些实施方案中, n 为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10。

5 在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

所述重链可变区包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 24、30 或 31 的氨基酸序列; 和

10 所述轻链可变区包含: LCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列; LCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列; 和 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

15 所述重链可变区包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列; 和

所述轻链可变区包含: LCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列; LCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列; 和 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列。

20 在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

所述重链可变区包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列; 和

25 所述轻链可变区包含: LCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列; LCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列; 和 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

30 所述重链可变区包含: HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列; HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列; 和 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列; 和

35 所述轻链可变区包含: LCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列; LCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列; 和 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所

述的抗 DLL3 抗体为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体为人源化抗体。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述
5 的抗 DLL3 抗体包含人免疫球蛋白框架区（FR 区）。

在一个实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：57 的氨基酸序列；其中，SEQ ID NO：57 如 PLYX₁YGRSYNX₂VAY 所示，其中 X₁ 为 Y 或 H；X₂ 为 A 或 G；且所述重链可变区的 FR 包含选自 1E、49A 和 94S 中的一个或多个回复突变；和
10

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：25 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：26 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：27 的氨基酸序列；且所述轻链可变区的 FR 包含 43I 回复突变。上述的回复突变位点依据 Kabat 编号规则。
15

在一个实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：18 的氨基酸序列；且所述重链可变区的 FR 包含选自 1E、27Y、30T、38K、43K、48I、67A、68A、69L、71V、73K、75S、76N 和 93A 中的一个或多个回复突变；和
20

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列；且所述轻链可变区的 FR 包含选自 36L、43S、44F、46G、69A、71Y 和 85D 中的一个或多个回复突变。上述的回复突变位点依据 Kabat 编号规则。
25

在一个实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：18 的氨基酸序列；且所述重链可变区的 FR 包含 1E、68A、69L、71V、73K、75S、76N 的回复突变；和
30

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列；且所述轻链可变区的 FR 包含 36L、46G、69A、71Y 和 85D 的回复突变。上述的回复突变位点依据 Kabat 编号规则。
35

在一个具体的实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列；且所述重链可变区的 FR 包含 1E 和 94S 的回复突变；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列。上述的回复突变位点依据 Kabat 编号规则。

在一个实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 24、30 或 31 的氨基酸序列；且所述重链可变区的 FR 包含选自 1E、49A 和 94S 中的一个或多个回复突变；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列；且所述轻链可变区的 FR 包含 43I 回复突变。上述的回复突变位点依据 Kabat 编号规则。

在一个实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列；且所述重链可变区的 FR 包含选自 1E、49A 和 94S 中的一个或多个回复突变；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列；且所述轻链可变区的 FR 包含 43I 回复突变。上述的回复突变位点依据 Kabat 编号规则。

在一个实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列；且所述重链可变区的 FR 包含选自 1E、49A 和 94S 中的一个或多个回复突变；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 27 的氨

基酸序列；且所述轻链可变区的 FR 包含 43I 回复突变。上述的回复突变位点依据 Kabat 编号规则。

在一个实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

5 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列；且所述重链可变区的 FR 包含选自 1E、49A 和 94S 中的一个或多个回复突变；和

 所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列；LCDR2，
10 其包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列；且所述轻链可变区的 FR 包含 43I 回复突变。上述的回复突变位点依据 Kabat 编号规则。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

15 i) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 14、50、51、52、53 或 54 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列；和/或

 所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 15、55 或 56 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的轻链可变区；或

20 ii) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 12、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43 或 44 具有至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列；和/或

 所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 13、45、46、47、48 或 49 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的轻链可变区。

25 在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含：

 i) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 14 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列；和/或

30 所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 15 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的轻链可变区；或

 ii) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 50、51、52、53 或 54 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列；和/或

35 所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 55 或 56 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列；或

 iii) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 12 具有至少 90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列；和/或

所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 13 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列；或

iv)所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 32、33、34、35、36、37、38、39、
5 40、41、42、43 或 44 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列；和/或

所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 45、46、47、48 或 49 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所
10 述的抗 DLL3 抗体包含：

i) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 50 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列；和/或

所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 55 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列；或

15 ii) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 43 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；和/或

所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 48 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所
20 述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

i) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列，和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列；或

ii) 所述重链可变区包含选自 SEQ ID NO: 50、51、52、53 和 54 中的任一氨基酸序列，和/或所述轻链可变区包含 55 或 56 的氨基酸序列；或

25 iii) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列，和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列；或

iv) 所述重链可变区包含选自 SEQ ID NO: 43、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42 和 44 中的任一氨基酸序列，和/或所述轻链可变区包含选自 SEQ ID NO: 48、45、46、47 和 49 中的任一氨基酸序列。

30 在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含：

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 50 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 55 的氨基酸序列；或

35 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 43 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所

述的抗 DLL3 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中: 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 50 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 55 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体是抗体片段, 其中所述的抗体片段为 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab'-SH、
5 Fd、Fv、scFv、dsFv、双抗体或结构域抗体。

在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体包含轻链恒定区和重链恒定区。

在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体包含 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区。

10 在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体包含 λ 链或 κ 链的恒定区。

在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体包含 IgG1 的重链恒定区和 κ 链的轻链恒定区。

在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体包含:
15

所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 28 的序列, 和/或轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 29 的序列。

在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链和轻链, 其中:

20 所述重链包含与 SEQ ID NO: 60 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列, 和/或所述轻链包含与 SEQ ID NO: 61 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列; 或

所述重链包含与 SEQ ID NO: 58 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、
25 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列, 和/或所述轻链包含与 SEQ ID NO: 59 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列。

在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体包含:

30 所述重链包含如 SEQ ID NO: 60 所示的序列, 和/或所述轻链包含如 SEQ ID NO: 61 所示的序列; 或

所述重链包含如 SEQ ID NO: 58 所示的序列, 和/或所述轻链包含如 SEQ ID NO: 59 所示的序列。

在一些实施方案中, 前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗 DLL3 抗体具有以下特性中的至少一种:
35

a) 所述抗 DLL3 抗体与人 DLL3 或其表位结合的 KD 值 ≤ 3nM、≤ 2nM、≤

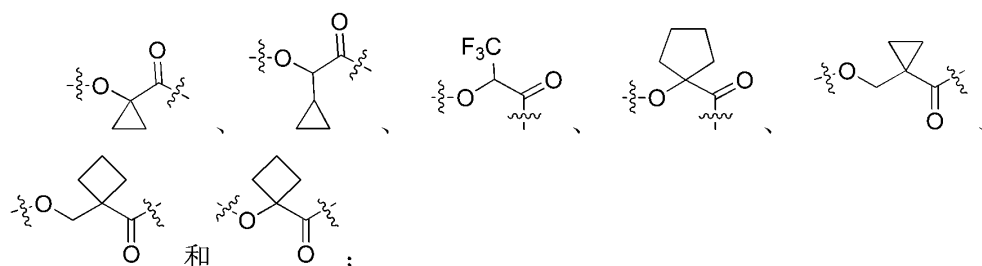
1nM、 ≤ 0.9 nM、 ≤ 0.8 nM、 ≤ 0.7 nM、 ≤ 0.6 nM、 ≤ 0.5 nM 或 ≤ 0.4 nM，所述 KD 值通过 Biacore 测定；

b) 所述抗 DLL3 抗体与表达 DLL3 的 H1184 细胞结合的 $EC_{50} \leq 3$ nM、 $EC_{50} \leq 2$ nM、 $EC_{50} \leq 1$ nM、 $EC_{50} \leq 0.5$ nM、 $EC_{50} \leq 0.2$ nM、 $EC_{50} \leq 0.1$ nM、 $EC_{50} \leq 0.09$ nM、
5 $EC_{50} \leq 0.08$ nM、 $EC_{50} \leq 0.07$ nM 或 $EC_{50} \leq 0.06$ nM，所述 EC_{50} 通过 FACS 检测；

c) 所述抗 DLL3 抗体能够被表达 DLL3 的细胞内吞；和

d) 所述抗 DLL3 抗体与 DLL3 或其表位结合 $EC_{50} \leq 0.1$ nM、 ≤ 0.09 nM、 ≤ 0.08 nM、 ≤ 0.07 nM、 ≤ 0.06 nM、 ≤ 0.05 nM、或 ≤ 0.04 nM，所述 EC_{50} 通过 ELISA 检测；

10 e) 所述抗 DLL3 抗体与阳性抗体（例如 BI-764532）识别不同的 DLL3 表位。
在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的 Y 选自：



15 其中 Y 的 O-端与 L 相连。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所

述的 Y 选自： (包括 和)；其中 Y 的 O-端与 L 相连。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的 L 为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ，其中：

20 L^1 选自 $-(\text{琥珀酰亚胺}-3\text{-基}-N)\text{-W-C(O)-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-C(O)-NR}^3\text{-W-C(O)-}$ 和 $-\text{C(O)-W-C(O)-}$ ，其中 W 选自 C_{1-6} 亚烷基、 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-6} 环烷基，其中所述的 C_{1-6} 亚烷基、 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-6} 环烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代；

25 L^2 选自 $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)-}$ 、 $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p\text{CH}_2\text{C(O)-}$ 和化学键，其中 p 为 1 至 20 的整数；

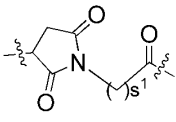
L^3 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸，并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基
30 中的一个或多个取代基所取代；

L^4 选自 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ 、 $-C(O)NR^5-$ 、 $-C(O)NR^5(CH_2)_t-$ 和化学键，其中 t 为 1 至 6 的整数；

R^3 、 R^4 和 R^5 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基；

5 R^6 和 R^7 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的 L 为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ，其中：

L^1 为 , s' 为 2 至 8 的整数；

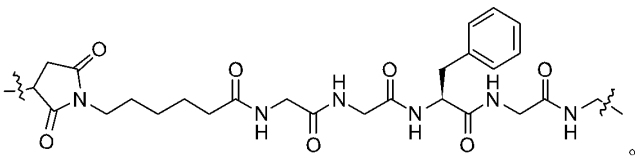
10 L^2 为化学键；

L^3 为四肽残基；优选地， L^3 为包含甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸的四肽残基；

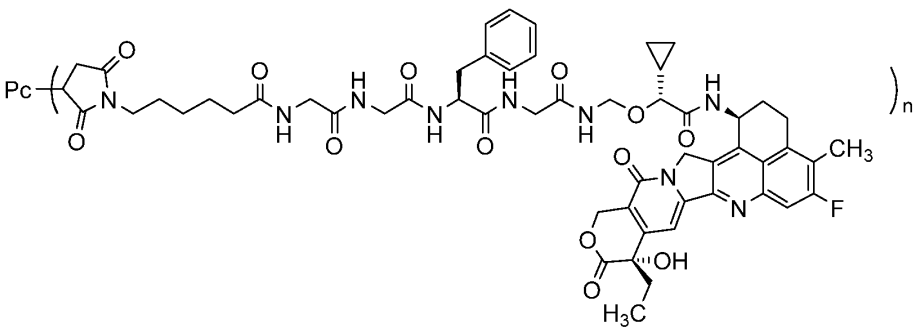
L^4 为 $-NH(CH_2)_t-$ ， t 为 1 或 2；

其中所述的 L^1 端与 Pc 相连。

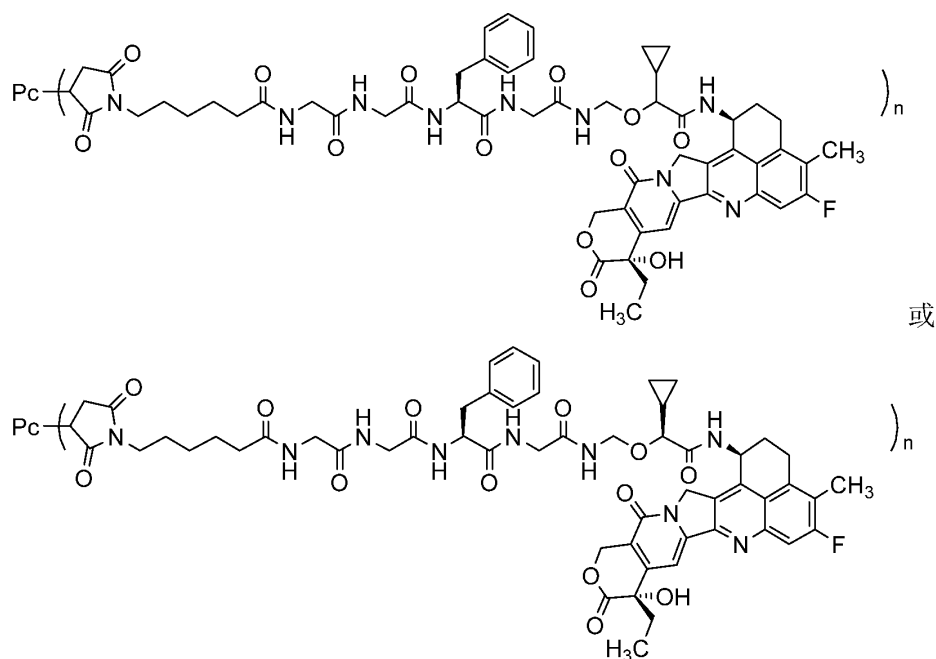
15 在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的 L 具有如下所示的结构：



在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗体-药物偶联物具有如下所示的结构：

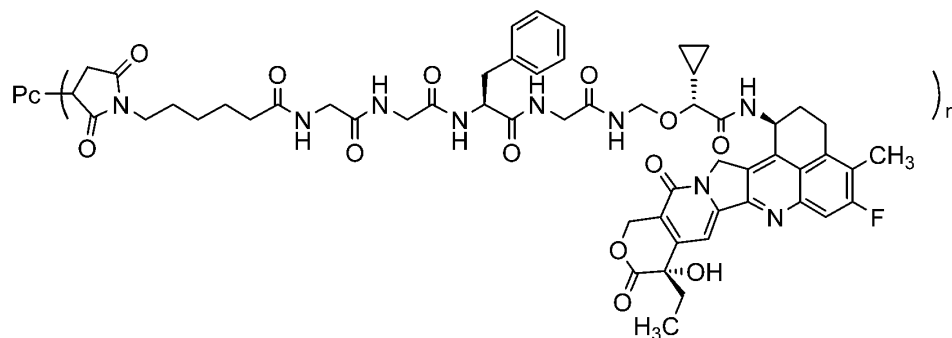


20



Pc 为如前任一所述的抗 DLL3 抗体；n 为 1 至 10。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述
5 述的抗体-药物偶联物具有选自如下所示的结构：



其中：

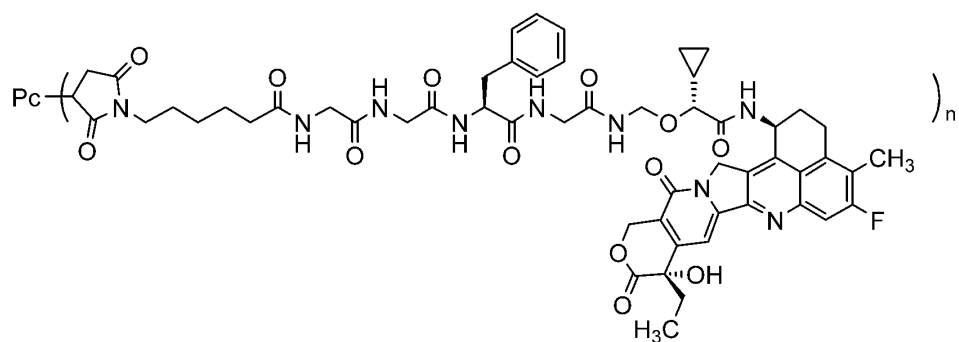
Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列；HCDR2，
10 其包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列；LCDR2，
其包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列；

15 n 为 1 至 10；优选地，n 为 3 至 8；更优选地，n 为 6 至 8。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述
述的抗体-药物偶联物具有选自如下所示的结构：



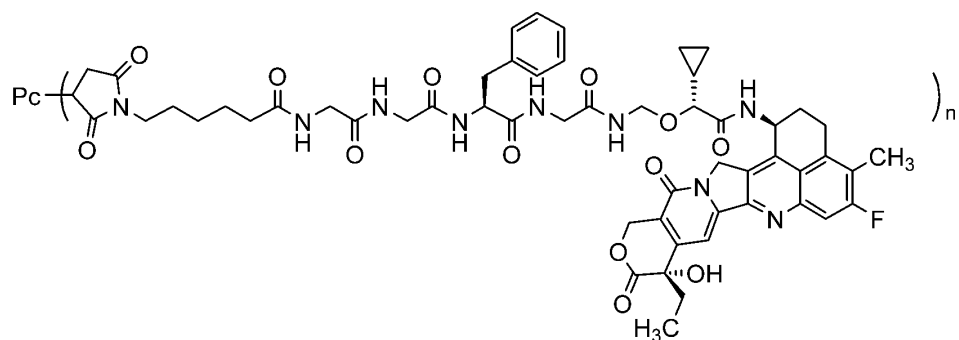
其中：

Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 50 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含
5 SEQ ID NO: 55 的氨基酸序列；

n 为 1 至 10；优选地，n 为 3 至 8；更优选地，n 为 6 至 8。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗体-药物偶联物具有选自如下所示的结构：



10 其中：

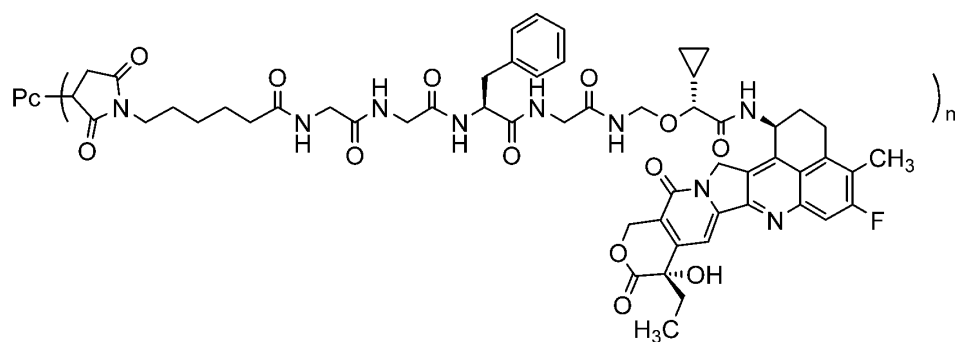
Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO:
61 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO:
15 59 的氨基酸序列；

n 为 1 至 10；优选地，n 为 3 至 8；更优选地，n 为 6 至 8。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗体-药物偶联物具有选自如下所示的结构：



其中：

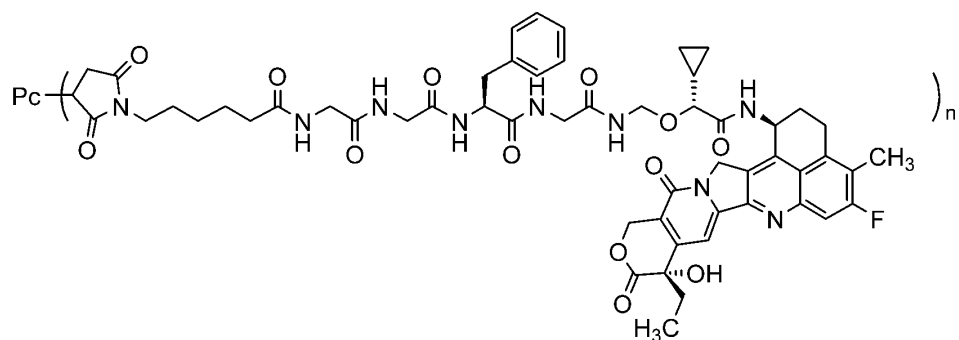
Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO:

5 61 的氨基酸序列；

n 为 1 至 10；优选地，n 为 3 至 8；更优选地，n 为 6 至 8。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗体-药物偶联物具有选自如下所示的结构：



10 其中：

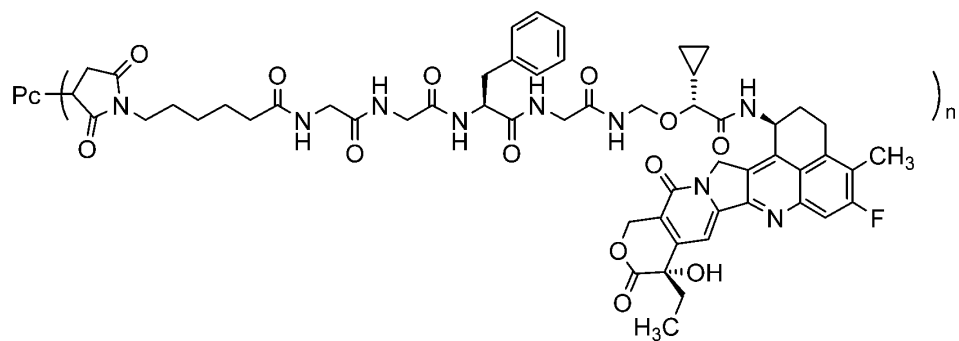
Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO:

61 的氨基酸序列；

n 为 4.43。

15 在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗体-药物偶联物具有选自如下所示的结构：



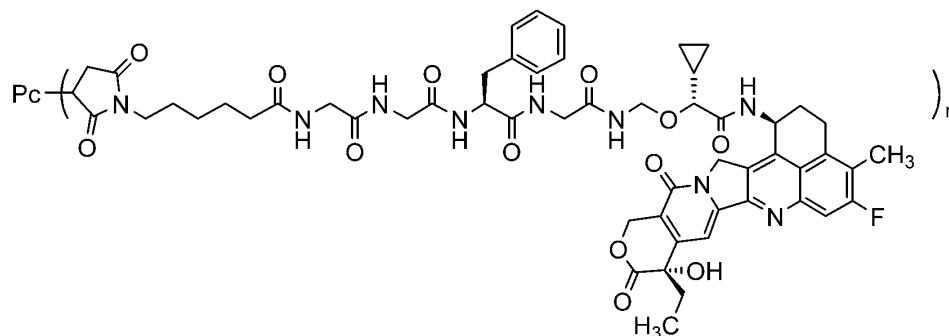
其中：

Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列；

5 n 为 7.32。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗体-药物偶联物具有选自如下所示的结构：



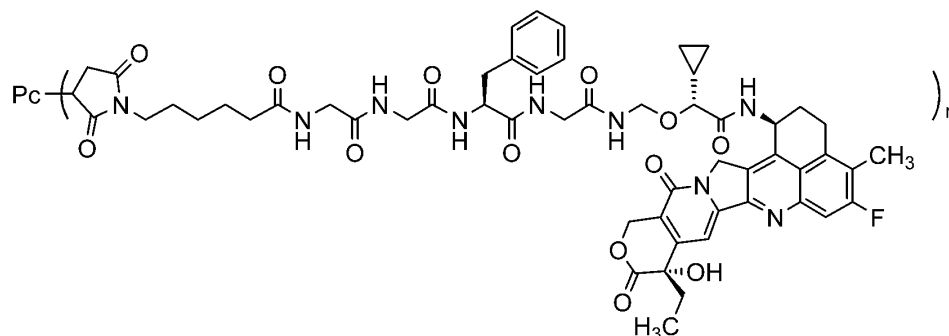
其中：

10 Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列；

n 为 6.12。

15 在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗体-药物偶联物具有选自如下所示的结构：



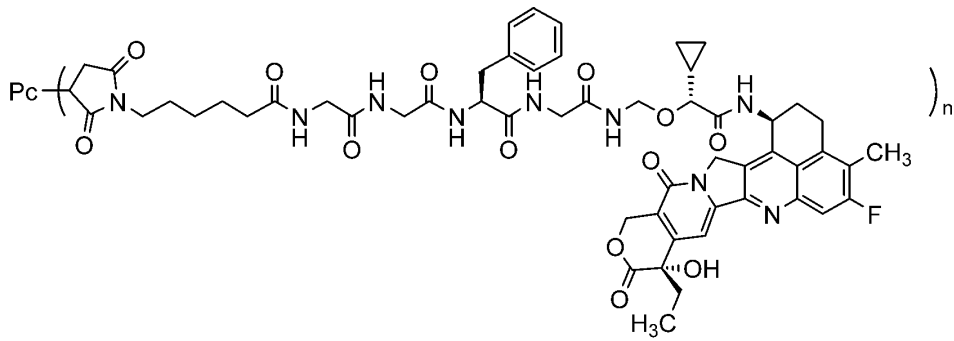
其中：

Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链和轻链，其中：

20 所述重链包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列；

n 为 3.53。

在一些实施方案中，前述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗体-药物偶联物具有选自如下所示的结构：



其中：

Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO:

5 59 的氨基酸序列；

n 为 7.43。

本披露进一步提供一种制备抗体-药物偶联物的方法，其包括将如前一项所述的抗 DLL3 抗体还原，然后与 (L-Y-D) 所示的化合物进行偶联反应，得到本披露所述的抗体-药物偶联物。

10 另一方面，本披露提供一种药物组合物，其包含如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。在一些实施方案中，所述单位剂量的药物组合物中含有 0.1-3000mg 或 1-1000mg 如前所述的抗体-药物偶联物。

15 另一方面，本披露提供如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或包含其的药物组合物作为药物的用途。在一些实施方案中，如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或包含其的药物组合物作为治疗癌症或肿瘤的药物。在一些实施方案中，如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或包含其的药物组合物作为治疗表达 DLL3 的癌症或肿瘤的药物。

20 另一方面，本披露提供如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或前述的药物组合物在制备用于治疗 DLL3 介导的疾病或病症的药物中的用途。在一些实施方案中，其中所述 DLL3 介导的疾病或病症为肿瘤或癌症。在一些实施方案中，其中所述的 DLL3 介导的疾病或病症为表达 DLL3 的疾病或病症。

25 另一方面，本披露提供如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或前述的药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤或癌症的药物中的用途；优选地，其中所述肿瘤或癌症选自：

肺癌（例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、大细胞肺癌）、头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、咽鳞癌、口腔鳞癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌（例如甲状腺髓样癌）、恶性胸膜间皮瘤、乳腺癌（例如三阴性乳腺癌）、

30

肝癌、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结直肠癌（例如结肠癌和直肠癌）、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、肾上腺癌、胶质母细胞瘤、皮肤癌和黑色素瘤；优选地，其中所述肺癌为小细胞肺癌。在一些实施方案中，所述的肿瘤或癌症为表达 DLL3 的肿瘤或癌症。

另一方面，本披露进一步涉及一种用于治疗 and/or 预防肿瘤或癌症的方法，该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效剂量的如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或前述的药物组合物。在一些实施方案中，其中所述的肿瘤或癌症为表达 DLL3 的肿瘤或癌症。

另一方面，本披露进一步涉及一种用于治疗或预防肿瘤或癌症的方法，该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效剂量的如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或前述的药物组合物；其中所述肿瘤或癌症选自：

肺癌（例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、大细胞肺癌）、头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、咽鳞癌、口腔鳞癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌（例如甲状腺髓样癌）、恶性胸膜间皮瘤、乳腺癌（例如三阴性乳腺癌）、肝癌、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结直肠癌（例如结肠癌和直肠癌）、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、肾上腺癌、胶质母细胞瘤、皮肤癌和黑色素瘤；优选地，其中所述肺癌为小细胞肺癌。

本披露提供的抗体-药物偶联物与细胞表面抗原具有良好的亲和力，可有效的被表达 DLL3 的细胞内吞，并具有很强的抑制肿瘤生长的效果，同时具有良好的安全性。

附图说明

图 1A 至图 1C 显示 Hu6 和 Hu100 抗体与不同种属的 DLL3 的结合。其中：图 1A 显示 Hu6 和 Hu100 抗体对 H1184 细胞结合的 FACS 结果；图 1B 显示 Hu6 和 Hu100 抗体对 cynoDLL3/CHO-s 细胞结合的 FACS 结果；图 1C 显示 Hu6 和 Hu100 抗体对 ratDLL3/CHO-s 细胞结合的 FACS 结果。

图 2 显示不同的抗 DLL3 抗体竞争结合实验结果。结果显示，Hu6 和 Hu100 与 BI-764532 不竞争，说明抗体 Hu6 和 Hu100 与 BI-764532 结合不同的表位。

图 3 显示 Hu6 和 Hu100 抗体被细胞内吞的结果；结果显示，Hu6 和 Hu100 均可被细胞内吞。

图 4A 至图 4B 显示 ADC-1、ADC-2 和 ADC-3 对人和猴 DLL3 细胞的结合结果。其中：图 4A 显示 ADC-1、ADC-2 和 ADC-3 对人 DLL3 细胞的结合结果；图 4B 显示 ADC-1、ADC-2 和 ADC-3 对猴 DLL3 细胞的结合结果。

图 5A 至图 5D 显示 ADC-1、ADC-2 和 ADC-3 对不同细胞的生长抑制作用。其中：图 5A 显示 ADC-1、ADC-2 和 ADC-3 对高表达 DLL3 的 H1184 细胞的生长抑制结果；图 5B 显示 ADC-1、ADC-2 和 ADC-3 对高表达 DLL3 的 DMS53 细胞的生长抑制结果；图 5C 显示 ADC-1、ADC-2 和 ADC-3 对低表达 DLL3 的 SK-MEL3 细胞的生长抑制结果；图 5D 显示 ADC-1、ADC-2 和 ADC-3 对不表达 DLL3 的 CHO-K1 细胞的生长抑制结果。

图 6 显示 ADC-1、ADC-2 和 ADC-3 的旁观者细胞毒性效应结果。

图 7 显示 ADC-1、ADC-2、ADC-4 和 ADC-5 抑制小鼠的 DMS53 细胞皮下移植肿瘤生长的结果。

图 8 显示 ADC-1 和 ADC-3 抑制小鼠的 DMS53 细胞皮下移植肿瘤生长的结果。

图 9 显示 ADC-2、ADC-3、ADC-6 和 ADC-7 抑制小鼠的 H1184 细胞皮下移植肿瘤生长的结果。

图 10A 至图 10C 显示 ADC-1、ADC-2 和 ADC-3 大鼠药代动力学结果。其中：图 10A 显示 ADC-1 大鼠药代动力学结果；图 10B 显示 ADC-2 大鼠药代动力学结果；图 10C 显示 ADC-3 大鼠药代动力学结果。

图 11 显示 ADC-2 食蟹猴药代动力学结果。

具体实施方式

一、术语

为了更容易理解本披露，以下对某些技术和科学术语进行了描述。除非在本文中另有明确定义，本文使用的全部技术和科学术语具有与本领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。

除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代，除非上下文清楚表明并非如此。

除非上下文另外清楚要求，否则在专利说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为“包括但不限于”的意义，而不是排他性或穷举性意义。

术语“和/或”，意指包含“和”与“或”两种含义。例如短语“A、B 和/或 C”旨在涵盖以下方面中的每一个：A、B 和 C；A、B 或 C；A 或 C；A 或 B；B 或 C；A 和 C；A 和 B；B 和 C；A(单独)；B(单独)；和 C(单独)。当本披露中使用商品名时，旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的药物和活性药物部分。

本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558 (1968) 中所述。

术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸，以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗

传密码编码的那些氨基酸，以及后来修饰的那些氨基酸，例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同的基本化学结构（即与氢、羧基、氨基和 R 基团结合的 α 碳）的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有修饰的 R 基团（例如，正亮氨酸）或修饰的肽骨架，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构，但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化学化合物。

术语“氨基酸突变”包括氨基酸取代（也称氨基酸替换）、缺失、插入和修饰。可以进行取代、缺失、插入和修饰的任意组合来实现最终构建体，只要最终构建体拥有期望的特性，例如降低或对 Fc 受体的结合。氨基酸序列缺失和插入包括在多肽链的氨基端和/或羧基端的缺失和插入。具体的氨基酸突变可以是氨基酸取代。在一个实施方案中，氨基酸突变是非保守性的氨基酸取代，即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化学特性的另一种氨基酸替换。氨基酸取代包括由非天然存在的氨基酸或由 20 种天然氨基酸的衍生物（例如 4-羟脯氨酸、3-甲基组氨酸、鸟氨酸、高丝氨酸、5-羟赖氨酸）替换。可以使用本领域中公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变。遗传方法可以包括定点诱变、PCR，基因合成等。预计基因工程以外的改变氨基酸侧链基团的方法，如化学修饰也可能是可用的。本文中可使用各种名称来指示同一氨基酸突变。本文中，可采用位置+氨基酸残基的方式表示特定位点的氨基酸残基，例如 366W，表示在 366 位点上的氨基酸残基为 W。T366W 则表示第 366 位点上的氨基酸残基由 W 取代了原来的 T。

术语“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）、全长抗体和抗体片段（或抗原结合片段，或抗原结合部分），只要它们展现出期望的抗原结合活性。完整抗体通常包含两条轻链和两条重链。从 N 至 C 端，每条重链具有一个可变区（VH），又称作可变重域、重链可变区，接着是三个恒定域（CH1、CH2 和 CH3）。类似地，从 N 至 C 端，每条轻链具有一个可变区（VL），又称作可变轻域，或轻链可变域，接着是一个恒定轻域（轻链恒定区、CL）。

术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文可互换使用，指具有与天然抗体结构基本类似的结构或重链具有 Fc 区的抗体。天然完整抗体轻链包括轻链可变区 VL 及恒定区 CL，VL 处于轻链的氨基末端，轻链恒定区包括 κ 链及 λ 链；重链包括可变区 VH 及恒定区（CH1、CH2 及 CH3），VH 处于重链的氨基末端，恒定区处于羧基末端，其中 CH3 最接近羧基末端，重链可属于任何同种型，包括 IgG（包括 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 亚型）、IgA（包括 IgA1 及 IgA2 亚型）、IgM 及 IgE。

术语抗体“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链中参与抗体结合抗原的域。本文中，抗体重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）各包含四个保守的框架

区（FR）和三个互补决定区（CDR）。其中，术语“互补决定区”或“CDR”指可变结构域内主要促成与抗原结合的区域；“框架”或“FR”是指除 CDR 残基之外的可变结构域残基。VH 包含 3 个 CDR 区：HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；VL 包含 3 个 CDR 区：LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。每个 VH 和 VL 由从氨基末端（也称 N 末端）排到羧基末端（也称 C 末端）按以下顺序排列的三个 CDR 和四个 FR 构成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

可以通过各种公知方案来确定 CDR 的氨基酸序列边界，例如：“Kabat”编号规则（参见 Kabat 等（1991），“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）、“Chothia”编号规则、“ABM”编号规则、“contact”编号规则（参见 Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001）和 ImMunoGenTics（IMGT）编号规则（Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77（2003）；Front Immunol. 2018 Oct 16;9:2278）等；各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的，示例性的，如下表 1 中所示。

表 1. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
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

除非另有说明，本披露中的可变区和 CDR 序列均适用 Kabat 编号规则。

术语“抗体片段”指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分与完整抗体所结合的抗原相结合。抗体片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)2、单域抗体、单链 Fab（scFab）、双抗体、线性抗体、单链抗体分子（例如 scFv）；以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

术语“Fc 区”或“片段可结晶区”用于定义抗体重链的 C 末端区域，包括天然 Fc 区和改造的 Fc 区。在一些实施方案中，Fc 区包含了相同或不同的两个亚基。在一些实施方案中，人 IgG 重链的 Fc 区定义为从 Cys226 位置处的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。用于本文所述抗体的合适 Fc 区包括人 IgG1、IgG2（IgG2A、IgG2B）、IgG3 和 IgG4 的 Fc 区。在一些实施方案中，Fc 区的边界还可以变化，例如缺失 Fc 区的 C 末端赖氨酸（根据 EU 编号系统的残基 447）或缺失 Fc 区的 C 末端甘氨酸和赖氨酸（根据 EU 编号系统的残基 446 和 447）。除非另有说明，Fc 区的编号规则为 EU 编号系统，又称作 EU 索引。

术语“嵌合抗体”指抗体中的重和/或轻链的一部分由特定的来源或物种衍生，而重和/或轻链的剩余部分由另外的不同来源或物种衍生的抗体。

术语“人源化抗体”是保留非人抗体的反应性同时在人中具有较低免疫原性的抗体。例如，可以通过保留非人 CDR 区并用其对应物（即，恒定区以及可变区的框架区部分）替换抗体的其余部分来实现。

术语“人抗体”、“人源抗体”、“全人抗体”、“完全人抗体”可以互换使用，
5 意指可变区及恒定区是人序列的抗体。该术语涵盖源自人基因但具有，例如，降低可能的免疫原性、增加亲和力、消除可能会引起不期望的折叠的半胱氨酸或糖基化位点等序列的抗体。该术语涵盖这些在非人细胞(其可能会赋予不具人细胞特征的糖基化)中重组产生的抗体。该术语亦涵盖已在含有人免疫球蛋白重链及轻链基因座的转基因小鼠中饲养的抗体。人抗体的含义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。
10

术语“亲和力”是指分子（例如，抗体）的单个结合部位与其结合配体（例如，抗原）之间非共价相互作用的总体的强度。除非另外指明，如本文所用，结合“亲和力”是指内部结合亲和力，其反映出结合对（例如，抗体与抗原）的成员之间相互作用。分子 X 对其配体 Y 的亲和力通常可以由解离常数（KD）表示。
15 亲和力可以通过本领域已知的常规方法（包括本文所述的那些方法）测量。

如本文所使用的，术语“kassoc”或“ka”指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率，术语“kdis”或“kd”指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。术语“KD”指解离常数，其获得自 kd 与 ka 的比率（即 kd/ka）并且表示为摩尔浓度（M）。可以使用本领域公知的方法测定抗体的 KD 值。例如，使用生物传感系统例如系统
20 测量表面等离子体共振，或通过溶液平衡滴定法（SET）测量溶液中的亲和力。

术语“效应子功能”指那些可归于抗体 Fc 区（天然序列 Fc 区或氨基酸序列突变的 Fc 区）且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应子功能的例子包括但不限于：C1q 结合和补体依赖性细胞毒性、Fc 受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）、吞噬作用、细胞表面受体（例如 B 细胞受体）下调；和 B
25 细胞活化。

术语“单克隆抗体”指基本上均质的抗体的群，即在该群中包含的抗体分子的氨基酸序列是相同的，除了可能少量存在的天然突变以外。相比之下，多克隆抗体制剂通常包含在其可变结构域具有不同氨基酸序列的多种不同抗体，其通常特异性针对不同表位。“单克隆”不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。
30 在一些实施方案中，本披露提供的抗体是单克隆抗体。

术语“抗原”是指能够由诸如抗原结合蛋白（包括例如抗体）的选择性结合剂结合的分子或分子部分。抗原可具有一个或多个能够与不同的抗原结合蛋白（例如抗体）相互作用的表位。

术语“表位”指能够与抗体或其抗原结合片段特异性结合的抗原上的区域（area
35 或 region）。表位可以由连续氨基酸串（线性表位）形成或包含非连续氨基酸（构象表位），例如因抗原的折叠（即通过三级折叠）而变成空间接近。构象表位和线

性表位的差别在于：在变性溶剂的存在下，不能检测到抗体对构象表位的结合。表位包含处于独特空间构象的至少 3，至少 4，至少 5，至少 6，至少 7，或 8-10 个氨基酸。筛选结合特定表位的抗体（即那些结合相同表位的）可以使用本领域例行方法来进行，例如但不限于丙氨酸扫描，肽印迹，肽切割分析，表位切除，
5 表位提取，抗原的化学修饰（见 Prot. Sci. 9（2000）487-496），和交叉阻断。

术语“抗 DLL3 抗体”和“结合 DLL3 的抗体”是指能够以足够的亲和力结合 DLL3 或其表位的抗体。在一个实施方案中，抗 DLL3 抗体与无关蛋白的结合程度小于该抗体与 DLL3 结合的至少约 10%，所述结合可通过 BIACORE®表面等离子体共振测定法测量。

10 术语“能够特异性结合”、“特异性结合”或“结合”是指相比其他抗原或表位，抗体能够以更高的亲和力结合至某个抗原或其表位。通常地，抗体以约 1×10^{-7} M 或更小（例如约 1×10^{-8} M 或更小）的平衡解离常数（KD）结合抗原或其表位。在一些实施方案中，抗体与抗原结合的 KD 为该抗体结合至非特异性抗原（例如 BSA、酪蛋白）的 KD 的 10%或更低（例如 1%）。可使用已知的方法来测量 KD，
15 例如通过 BIACORE®表面等离子体共振测定法所测量的。然而，特异性结合至抗原或其表位的抗体可能对其它相关的抗原具有交叉反应性，例如，对来自其它物种（同源）（诸如人或猴，例如食蟹猕猴（*Macaca fascicularis*）（*cynomolgus*, cyno）、黑猩猩（*Pan troglodytes*）（*chimpanzee*, chimp）或狨猴（*Callithrix jacchus*）（*commonmarmoset*, marmoset）的相应抗原具有交叉反应性。

20 术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用，并且是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。所述术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸。所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的，具有与参考核酸相似的结合特性，并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、
25 手性-甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸（PNA）。“分离的”核酸指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括在下述细胞中含有的核酸分子，所述细胞通常含有该核酸分子，但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置处。编码多肽或融合蛋白的分离的核酸指编码多肽或融合蛋白的一个或更多个核酸分子，包括在单一载体或分开的载体中的这样的一个或
30 更多个核酸分子，和存在于宿主细胞中一个或更多个位置的这样的一个或更多个核酸分子。除非另有说明，否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体（例如，简并密码子取代）和互补序列以及明确指明的序列。具体地，如下详述，简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得，在这些序列中，一个或多个所选的（或全部）密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代。

35 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，指氨基酸残基的聚合物，其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物，以及适

用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另外说明，否则特定的多肽序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体。

术语序列“同一性”指两条序列的氨基酸/核酸在等价位置相同的程度（百分比）；当对两条序列进行最佳比对时，必要时引入间隙以获取最大的同一性百分比，且5 并不将任何保守性取代视为序列同一性的一部分。为测定序列同一性百分比，比对可以通过本领域技术已知的技术来实现，例如使用公开可得到的计算机软件，诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign（DNASTAR）软件。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数，包括在所比较的序列全长上达成最大比对所需的任何算法。

10 术语“载体”意指能够转运与其连接的另一多核苷酸的多核苷酸分子。一种类型的载体是“质粒”，其是指环状双链 DNA 环，其中可以连接附加的 DNA 区段。另一种类型的载体是病毒载体，例如腺相关病毒载体（AAV 或 AAV2），其中另外的 DNA 区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其他载体15 （例如，非附加型哺乳动物载体）可以在引入宿主细胞中后整合到宿主细胞的基因组中，从而与宿主基因组一起复制。术语“表达载体”或“表达构建体”是指可对宿主细胞进行转化，且含有指导和/或控制与其可操作地连接的一个或多个异源编码区的表达的核酸序列的载体。表达构建体可以包括但不限于影响或控制转录、翻译且在存在内含子时影响与其可操作地连接的编码区的 RNA 剪接的序列。

20 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用，并且指已经导入外源核酸的细胞，包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”，其包括原代的经转化的细胞及其衍生的后代，而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同，可以含有突变。本文中包括这样的突变体后代，其与初始转化细胞中筛选或选择的细胞具有相同的功能25 或生物学活性。宿主细胞包括原核和真核宿主细胞，其中真核宿主细胞包括但不限于哺乳动物细胞、昆虫细胞系植物细胞和真菌细胞。示例性的宿主细胞如下：中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、NSO、SP2 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾（BHK）细胞、猴肾细胞（COS）、人肝细胞癌细胞（例如，HepG2）、A549 细胞、3T3 细胞和 HEK-293 细胞、巴氏毕赤酵母（*Pichia pastoris*）、芬兰毕赤酵母（*Pichia finlandica*）、30 白色念珠菌（*Candida albicans*）、黑曲霉（*Aspergillus niger*）、米曲霉（*Aspergillus oryzae*）、里氏木霉（*Trichoderma reesei*）。

“抗体-药物偶联物”（antibody drug conjugate, ADC），是将抗体（或其抗原结合片段）直接或通过接头与药物相连后得到的偶联物。

“药物（Drug，缩写：D）”是任何具有生物或可检测活性的物质（例如治疗35 剂、可检测标记、结合剂等）和在体内代谢成活性剂的前药。治疗剂的实例包括细胞毒性剂、化学治疗剂、细胞生长抑制剂和免疫调节剂。化学治疗剂是可用于

治疗癌症的化学化合物。代表性治疗剂包括细胞毒素、细胞毒性剂和细胞生长抑制剂。

细胞毒性效应是指缺失、消除和/或杀死目标细胞。细胞毒性剂是指对细胞具有细胞毒性和/或细胞生长抑制效应的药剂。细胞生长抑制效应是指抑制细胞增殖。
5 细胞生长抑制剂是指对细胞具有细胞生长抑制效应、由此抑制细胞的特定亚组的生长和/或扩增的药剂。

额外代表性治疗剂包括放射性同位素、化学治疗剂、免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂、促细胞凋亡剂和细胞裂解酶(例如, RNase)。这些药物描述词并不互斥, 且因此, 可使用一个或多个上述术语描述治疗剂。例如, 所选放射性同
10 位素也是细胞毒素。治疗剂可制备为上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。通常, 具有放射性同位素作为药物的偶联物被称为放射性免疫偶联物, 具有化学治疗剂作为药物的被称为化学免疫偶联物。

细胞毒性剂的实例包括, 但不限于, 依喜替康、蒽环霉素、奥里斯他汀、CC-1065、尾海兔素(dolastatin)、多卡米星、烯二炔、格尔德霉素(geldanamycin)、
15 美登素(maytansine)、嘌呤霉素、紫杉烷、长春花生物碱、SN-38、微管溶素(tubulysin)、hemiasterlin、艾日布林、Trabectedin、Lurbinectedin 和其立体异构体、等排物、类似物或衍生物。也可使用化学治疗剂、植物毒素、其他生物活性蛋白质、酶(即, ADEPT)、放射性同位素、光敏剂(即, 用于光动力学治疗)。

术语“标记”当本文中使用时是指直接或间接缀合至抗体以便生成“标记的”
20 抗体的可检测化合物或组合物。标记可以是自身可检测(例如, 放射性同位素标记或荧光标记), 或在酶促标记的情况下, 标记可催化底物化合物或组合物可检测的化学变化。放射性同位素标记包括, 例如, I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、和 Pd-109。标记也可以是不可检测的实体, 诸如毒素。

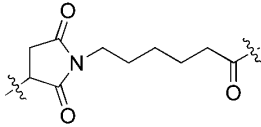
术语“接头单元”、“接头”是指一端与抗体连接而另一端与药物相连的化学结构片段或键, 也可以连接其他接头后再与抗体或药物相连。接头衔接至抗体
25 可以多种方式完成, 诸如经由表面赖氨酸、还原性偶联至氧化碳水化合物、通过还原链间二硫键释放的半胱氨酸残基、在特定位点处改造的反应性半胱氨酸残基、和含有酰基供体谷氨酰胺的标签或通过转谷氨酰胺酶和胺存在下, 对多肽改造,
30 使其具有反应性的内源性谷氨酰胺。多种 ADC 连接系统是本领域已知的, 包括基于脲-、二硫化物-和肽-的连接。

接头可以包含一种或多种接头元件。示例性的接头元件包括 6-马来酰亚氨基己酰基(“MC”)、马来酰亚氨基丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”或
“vc”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苄氧羰基(“PAB”)、N-琥珀酰亚氨基
35 氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(“SPP”)、N-琥珀酰亚氨基 4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1 羧酸酯(“SMCC”, 在本文中也称作“MCC”)和 N-琥珀酰亚氨基(4-碘-

乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)。

接头可以选自以下的元件或其组合：延伸物、间隔物和氨基酸单元。可以通过本领域已知方法合成接头，诸如 US20050238649A1 中所记载的。接头可以是便于在细胞中释放药物的“可切割接头”。例如，可使用酸不稳定接头（例如脲）、蛋白酶敏感（例如肽酶敏感）接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari 等, Cancer Research 52: 127-131(1992)；美国专利 No.5,208,020)。

接头元件包括但不限于：



MC=6-马来酰亚氨基己酰基，结构如下：

Val-Cit 或 “vc” =缬氨酸-瓜氨酸(蛋白酶可切割接头中的示例二肽)，

瓜氨酸=2-氨基-5-脲基戊酸，

PAB=对氨基苄氧羰基(“自我牺牲”接头元件的示例)，

Me-Val-Cit=N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(其中接头肽键已经修饰以防止其受到组织蛋白酶 B 的切割)，

MC(PEG)6-OH=马来酰亚氨基己酰基-聚乙二醇(可附着于抗体半胱氨酸)，

SPP=N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯，

SPDP=N-琥珀酰亚氨基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯，

SMCC=琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯，

IT=亚氨基硫烷。

“L-D”是药物(D)连接至接头(L)产生的接头-药物部分。

“载药量”，也称药物抗体比例(Drug-to-Antibody Ratio, DAR)，即 ADC 中每个抗体所偶联的药物的平均数量。其可在例如每个抗体偶联约 1 至约 10 个药物的范围内，并且在某些实施例中，在每个抗体偶联约 1 至约 8 个药物的范围内，优选自 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 1-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 5-6, 5-7, 5-8 和 6-8 的范围。本披露的 ADC 通式包括前述一定范围内的抗体-药物偶联物的集合。在本披露的实施方案中，载药量可表示为 n，是小数或整数。可用常规方法如 UV/可见光光谱法、质谱、ELISA 试验、HIC 和 RP-HPLC 测定载药量。

本披露的一个实施方案中，药物通过接头偶联在抗体的反应性基团（如巯基）上。

可以用以下非限制性方法控制 ADC 的载药量，包括：

- (1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比，
- (2) 控制反应时间和温度，
- (3) 选择不同的反应试剂。

术语“烷基”指饱和的直链或带有支链的脂肪族烃基，其具有 1 至 20 个（例

如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个) 碳原子 (即 C_{1-20} 烷基)。所述烷基优选具有 1 至 12 个碳原子的烷基 (即 C_{1-12} 烷基), 更优选具有 1 至 6 个碳原子的烷基 (即 C_{1-6} 烷基)。非限制性的实例包括: 甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基, 及其各种支链异构体等。烷基可以是取代的或非取代的, 当被取代时, 其可以在任何可使用的连接点被取代, 取代基优选选自 D 原子、卤素、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个。

术语“亚烷基”指二价烷基, 其中烷基如上所定义, 其具有 1 至 20 个 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个) 碳原子 (即 C_{1-20} 亚烷基)。所述亚烷基优选具有 1 至 12 个碳原子的亚烷基 (即 C_{1-12} 亚烷基), 更优选具有 1 至 6 个碳原子的亚烷基 (即 C_{1-6} 亚烷基)。非限制性的实例包括: $-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH(CH_2CH_3)-$ 、 $-CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2C(CH_3)_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 等。亚烷基可以是取代的或非取代的, 当被取代时, 其可以在任何可使用的连接点被取代, 取代基优选选自氖原子、卤素、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个。

术语“烯基”指分子中含有至少一个碳碳双键的烷基, 其中烷基的定义如上所述, 其具有 2 至 12 个 (例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个) 碳原子 (即 C_{2-12} 烯基)。所述烯基优选具有 2 至 6 个碳原子的烯基 (即 C_{2-6} 烯基)。非限制性的实例包括: 乙烯基、丙烯基、异丙烯基、丁烯基等。烯基可以是取代的或非取代的, 当被取代时, 其可以在任何可使用的连接点被取代, 取代基优选选自氖原子、烷氧基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个。

术语“炔基”指分子中含有至少一个碳碳三键的烷基, 其中烷基的定义如上

所述, 其具有 2 至 12 个 (例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个) 碳原子 (即 C_{2-12} 炔基)。所述炔基优选具有 2 至 6 个碳原子的炔基 (即 C_{2-6} 炔基)。非限制性的实例包括: 乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基等。炔基可以是取代的或非取代的, 当被取代时, 其可以在任何可使用的连接点被取代, 取代基
5 优选选自氘原子、烷氧基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个。

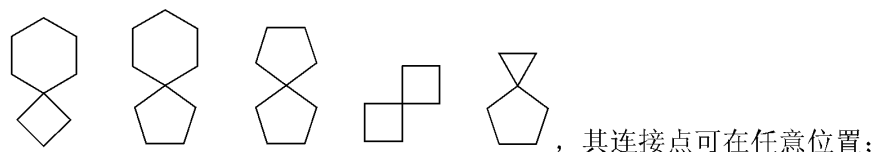
术语“烷氧基”指-O-(烷基), 其中烷基的定义如上所述。非限制性的实例包括: 甲氧基、乙氧基、丙氧基和丁氧基等。烷氧基可以是取代的或非取代的, 当
10 被取代时, 其可以在任何可使用的连接点被取代, 取代基优选选自氘原子、卤素、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个。

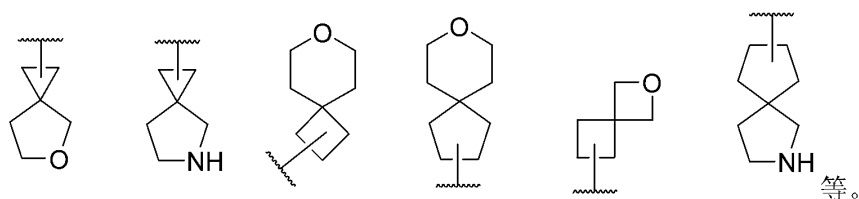
术语“环烷基”指饱和或部分不饱和的单环全碳环 (即单环环烷基) 或多环系统 (即多环环烷基), 其具有 3 至 20 个 (例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、
15 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个) 环原子 (即 3 至 20 元环烷基)。所述环烷基优选具有 3 至 12 个环原子的环烷基 (即 3 至 12 元环烷基), 更优选具有 3 至 8 个环原子的环烷基 (即 3 至 8 元环烷基), 最优选具有 3 至 6 个环原子的环烷基 (即 3 至 6 元环烷基, C_{3-6} 环烷基)。

所述的单环环烷基, 非限制性的实例包括: 环丙基、环丁基、环戊基、环戊
20 烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基和环辛基等。

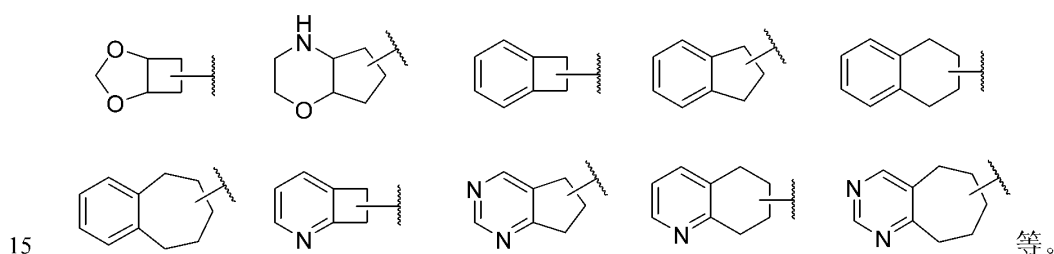
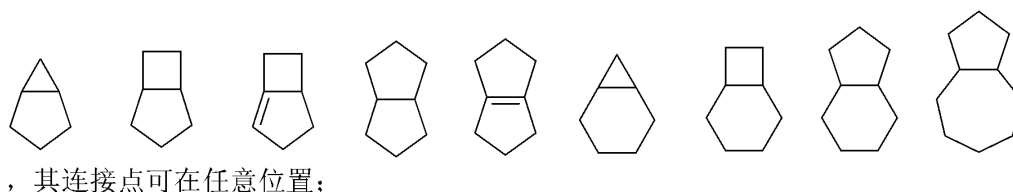
所述的多环环烷基包括: 螺环烷基、稠环烷基和桥环烷基。

术语“螺环烷基”指环之间共用一个碳原子 (称螺原子) 的多环系统, 其环内可以含有一个或多个双键, 或其环内可以含有一个或多个选自氮、氧和硫的杂原子 (所述的氮可任选被氧化, 即形成氮氧化物; 所述的硫可任选被氧代, 即形成亚砷或砷, 但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-), 条件是至少含有一个全碳环且连接
25 点在该全碳环上, 其具有 5 至 20 个 (例如 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个) 环原子 (即 5 至 20 元螺环烷基)。所述螺环烷基优选具有 6 至 14 个环原子的螺环烷基 (即 6 至 14 元螺环烷基), 更优选具有 7 至 10 个环原子的螺环烷基 (即 7 至 10 元螺环烷基)。所述螺环烷基包括单螺环
30 烷基和多螺环烷基 (如双螺环烷基等), 优选单螺环烷基或双螺环烷基, 更优选 3 元/4 元、3 元/5 元、3 元/6 元、4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/3 元、5 元/4 元、5 元/5 元、5 元/6 元、5 元/7 元、6 元/3 元、6 元/4 元、6 元/5 元、6 元/6 元、6 元/7 元、7 元/5 元或 7 元/6 元单螺环烷基。非限制性的实例包括:

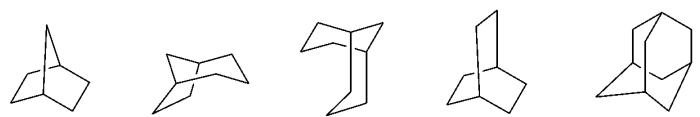




术语“稠环烷基”指环之间共享毗邻的两个碳原子的多环系统，其为单环烷基与一个或多个单环烷基稠合，或者单环烷基与杂环基、芳基或杂芳基中的一个或多个稠合，其中连接点在单环环烷基上，其环内可以含有一个或多个双键，且具有5至20个（例如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个）环原子（即5至20元稠环烷基）。所述稠环烷基优选具有6至14个环原子的稠环烷基（即6至14元稠环烷基），更优选具有7至10个环原子的稠环烷基（即7至10元稠环烷基）。所述稠环烷基包括双环稠环烷基和多环稠环烷基（如三环稠环烷基、四环稠环烷基等），优选双环稠环烷基或三环稠环烷基，更优选3元/4元、3元/5元、3元/6元、4元/4元、4元/5元、4元/6元、5元/3元、5元/4元、5元/5元、5元/6元、5元/7元、6元/3元、6元/4元、6元/5元、6元/6元、6元/7元、7元/5元或7元/6元双环稠环烷基。非限制性的实例包括：



术语“桥环烷基”指环之间共用两个不直接连接的碳原子的全碳多环系统，其环内可以含有一个或多个双键，且具有5至20个（例如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个）碳原子（即5至20元桥环烷基）。所述桥环烷基优选具有6至14个碳原子的桥环烷基（即6至14元桥环烷基），更优选具有7至10个碳原子的桥环烷基（即7至10元桥环烷基）。所述桥环烷基包括双环桥环烷基和多环桥环烷基（如三环桥环烷基、四环桥环烷基等），优选双环桥环烷基或三环桥环烷基。非限制性的实例包括：



其连接点可在任意位置。

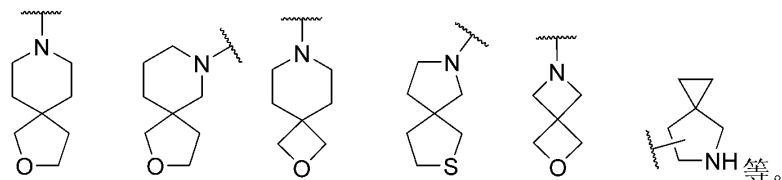
环烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，其可以在任何可使用的连接点被取代，取代基优选选自 D 原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氧代基、氰基、氨基、硝基、环5 烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个。

术语“杂环基”指饱和或部分不饱和的单环杂环（即单环杂环基）或多环杂环系统（即多环杂环基），其环内至少含有一个（例如 1、2、3 或 4 个）选自氮、氧和硫的杂原子（所述的氮可任选被氧化，即形成氮氧化物；所述的硫可任选被氧化，即形成亚砷或砷，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-），且具有 3 至 20 个（例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个）环原子（即 3 至 20 元杂环基）。所述杂环基优选具有 3 至 12 个环原子的杂环基（即 3 至 12 元杂环基）；进一步优选具有 3 至 8 个环原子的杂环基（即 3 至 8 元杂环基）；更优选具有 3 至 6 个环原子的杂环基（即 3 至 6 元杂环基）；最优选具有 5 或 6 个环原子的杂环基（即 5 或 6 元杂环基）。

15 所述的单环杂环基，非限制性的实例包括：吡咯烷基、四氢吡喃基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基和高哌嗪基等。

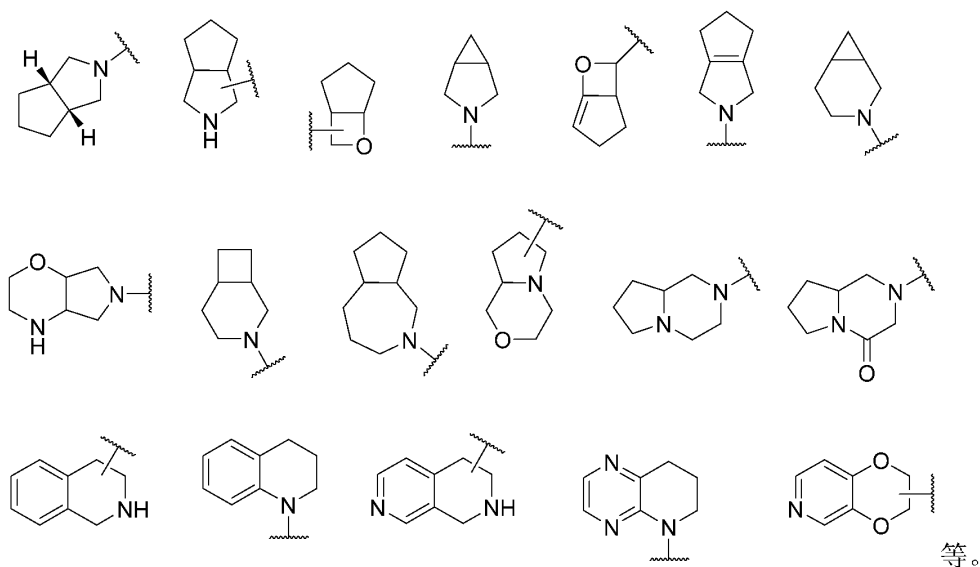
所述的多环杂环基包括螺杂环基、稠杂环基和桥杂环基。

术语“螺杂环基”指环之间共用一个原子（称螺原子）的多环杂环系统，其环内可以含有一个或多个双键，且其环内至少含有一个（例如 1、2、3 或 4 个）选自氮、氧和硫的杂原子（所述的氮可任选被氧化，即形成氮氧化物；所述的硫可任选被氧代，即形成亚砷或砷，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-），条件是至少含有一个单环杂环基且连接点在该单环杂环基上，其具有 5 至 20 个（例如 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个）环原子（即 5 至 20 元螺杂环基）。所述螺杂环基优选具有 6 至 14 个环原子的螺杂环基（即 6 至 14 元螺杂环基），更优选具有 7 至 10 个环原子的螺杂环基（即 7 至 10 元螺杂环基）。所述螺杂环基包括单螺杂环基和多螺杂环基（如双螺杂环基等），优选单螺杂环基或双螺杂环基，更优选 3 元/4 元、3 元/5 元、3 元/6 元、4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/3 元、5 元/4 元、5 元/5 元、5 元/6 元、5 元/7 元、6 元/3 元、6 元/4 元、6 元/5 元、6 元/6 元、6 元/7 元、7 元/5 元或 7 元/6 元单螺杂环基。非限制性的实例包括：

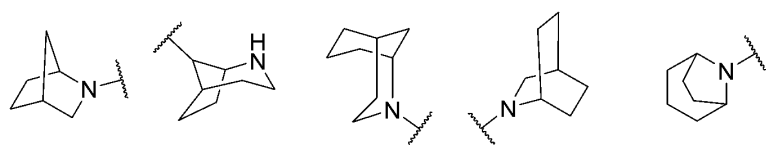


术语“稠杂环基”指环之间共享毗邻的两个原子的多环杂环系统，其环内可以含有一个或多个双键，且其环内至少含有一个（例如 1、2、3 或 4 个）选自氮、

氧和硫的杂原子（所述的氮可任选被氧化，即形成氮氧化物；所述的硫可任选被氧化，即形成亚砷或砷，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-），其为单环杂环基与一个或多个单环杂环基稠合，或者单环杂环基与环烷基、芳基或杂芳基中的一个或多个稠合，其中连接点在单环杂环基上，且具有 5 至 20 个（例如 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个）环原子（即 5 至 20 元稠杂环基）。所述稠杂环基优选具有 6 至 14 个环原子的稠杂环基（即 6 至 14 元稠杂环基），更优选具有 7 至 10 个环原子的稠杂环基（即 7 至 10 元稠杂环基）。所述稠杂环基包括双环和多环稠杂环基（如三环稠杂环基、四环稠杂环基等），优选双环稠杂环基或三环稠杂环基，更优选 3 元/4 元、3 元/5 元、3 元/6 元、4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/3 元、5 元/4 元、5 元/5 元、5 元/6 元、5 元/7 元、6 元/3 元、6 元/4 元、6 元/5 元、6 元/6 元、6 元/7 元、7 元/5 元或 7 元/6 元双环稠杂环基。非限制性的实例包括：



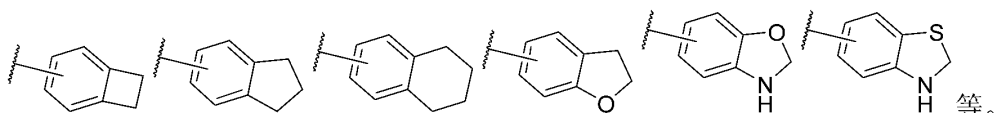
术语“桥杂环基”指环之间共用两个不直接连接的原子（例如氮、氧和硫）的多环杂环系统，其环内可以含有一个或多个双键，并且其环内至少含有一个（例如 1、2、3 或 4 个）选自氮、氧和硫的杂原子（所述的氮可任选被氧化，即形成氮氧化物；所述的硫可任选被氧化，即形成亚砷或砷，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-），其具有 5 至 20 个（例如 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个）环原子（即 5 至 20 元桥杂环基）。所述桥杂环基优选具有 6 至 14 个环原子的桥杂环基（即 6 至 14 元桥杂环基），更优选具有 7 至 10 个环原子的桥杂环基（即 7 至 10 元桥杂环基）。根据组成环的数目可以分为双环桥杂环基和多环桥杂环基（如三环桥杂环基、四环桥杂环基等），优选双环桥杂环基或三环桥杂环基。非限制性的实例包括：



等。

杂环基可以是取代的或非取代的，当被取代时，其可以在任何可使用的连接点被取代，取代基优选选自氘原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氧代基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个。

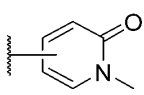
术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的单环全碳芳环（即单环芳基）或多环芳环系统（即多环芳基），其具有 6 至 14 个（例如 6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 个）环原子（即 6 至 14 元芳基）。所述芳基优选具有 6 至 10 个环原子的芳基（即 6 至 10 元芳基）。所述的单环芳基，例如苯基。所述的多环芳基，非限制性的实例包括：萘基、蒽基、菲基等。所述多环芳基还包括苯基与杂环基或环烷基中的一个或多个稠合，或萘基与杂环基或环烷基中的一个或多个稠合，其中连接点在苯基或萘基上，并且在这种情况下，环原子个数继续表示多环芳环系统中的环原子个数，非限制性的实例包括：



芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，其可以在任何可使用的连接点被取代，取代基优选选自 D 原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氧代基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个。

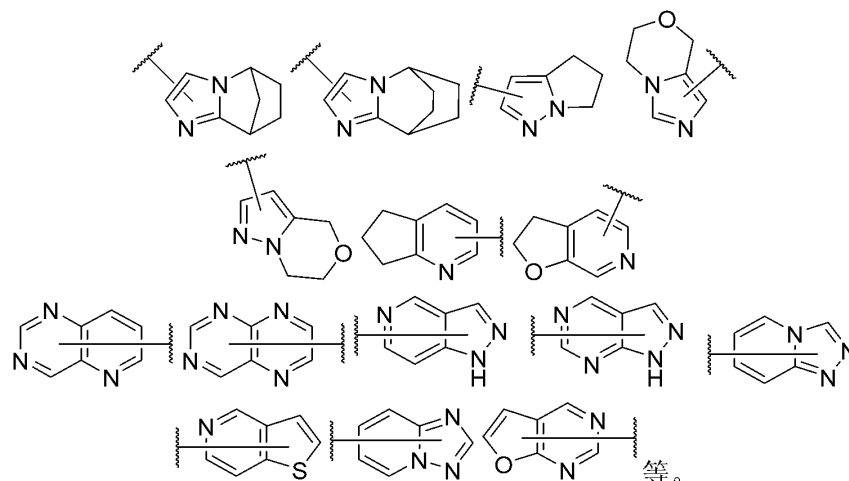
术语“杂芳基”指具有共轭的 π 电子体系的单环杂芳环（即单环杂芳基）或多环杂芳环系统（即多环杂芳基），其环内至少含有一个（例如 1、2、3 或 4 个）选自氮、氧和硫的杂原子（所述的氮可任选被氧化，即形成氮氧化物；所述的硫可任选被氧化，即形成亚砷或砷，但不包括 -O-O-、-O-S- 或 -S-S-），其具有 5 至 14 个（例如 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 个）环原子（即 5 至 14 元杂芳基）。所述杂芳基优选具有 5 至 10 个环原子的杂芳基（即 5 至 10 元杂芳基），更优选具有 5 或 6 个环原子的杂芳基（即 5 或 6 元杂芳基）。

所述的单环杂芳基，非限制性的实例包括：呋喃基、噻吩基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、噻二唑基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、呋喃基、吡咯基、N-烷基吡咯基、吡啶基、嘧啶基、吡啶酮基、N-烷基吡

啶酮（如  等）、吡嗪基、哒嗪基等。

所述的多环杂芳基，非限制性的实例包括：吲哚基、吲唑基、喹啉基、异喹啉基、喹啉基、喹啉基、酞嗪基、苯并咪唑基、苯并噻吩基、喹唑啉基、苯并噻唑基、

- 咪唑基等。所述多环杂芳基还包括单环杂芳基与一个或多个芳基稠合，其中连接点在芳香环上，并且在这种情况下，环原子个数继续表示多环杂芳环系统中的环原子个数。所述多环杂芳基还包括单环杂芳基与环烷基或杂环基中的一个或多个稠合，其中连接点在单环杂芳环上，并且在这种情况下，环原子个数继续表示多环杂芳环系统中的环原子个数。非限制性的实例包括：



- 杂芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，其可以在任何可使用的连接点被取代，取代基优选选自氘原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个。

- 术语“氨基保护基”是指为了使分子其它部位进行反应时氨基保持不变，在氨基上引入的易于脱去的基团。非限制性的实例包括：(三甲基硅)乙氧基甲基、四氢吡喃基、叔丁氧羰基 (Boc)、苄氧羰基 (Cbz)、苄甲氧羰基 (Fmoc)、烯丙氧羰基 (Alloc)、三甲基硅乙氧羰基 (Teoc)、甲氧羰基、乙氧羰基、邻苯二甲酰基 (Phth)、对甲苯磺酰基 (Tos)、三氟乙酰基 (Tfa)、三苯甲基 (Trt)、2,4-二甲氧基苄基 (DMB)、乙酰基、苄基、烯丙基、对甲氧苄基等。

- 术语“羟基保护基”是指在羟基上引入的易于脱去的基团，用于阻断或保护羟基而在化合物的其它官能团上进行反应。非限制性的实例包括：三甲基硅基 (TMS)、三乙基硅基 (TES)、三异丙基硅基 (TIPS)、叔丁基二甲基硅基 (TBS)、叔丁基二苯基硅基 (TBDPS)、甲基、叔丁基、烯丙基、苄基、甲氧基甲基 (MOM)、乙氧基乙基、2-四氢吡喃基 (THP)、甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、对硝基苯甲酰基等。

术语“环烷基氧基”指环烷基-O-，其中环烷基如上所定义。

术语“杂环基氧基”指杂环基-O-，其中杂环基如上所定义。

术语“芳基氧基”指芳基-O-，其中芳基如上所定义。

术语“杂芳基氧基”指杂芳基-O-，其中杂芳基如上所定义。

术语“烷基硫基”指烷基-S-, 其中烷基如上所定义。

术语“卤代烷基”指烷基被一个或多个卤素取代, 其中烷基如上所定义。

术语“卤代烷氧基”指烷氧基被一个或多个卤素取代, 其中烷氧基如上所定义。

5 术语“氘代烷基”指烷基被一个或多个氘原子取代, 其中烷基如上所定义。

术语“羟烷基”指烷基被一个或多个羟基取代, 其中烷基如上所定义。

术语“甲叉基”指=CH₂。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

术语“羟基”指-OH。

10 术语“巯基”指-SH。

术语“氨基”指-NH₂。

术语“氰基”指-CN。

术语“硝基”指-NO₂。

术语“氧代”或“氧代基”指“=O”。

15 术语“羰基”指 C=O。

术语“羧基”指-C(O)OH。

术语“羧酸酯基”指-C(O)O(烷基)、-C(O)O(环烷基)、(烷基)C(O)O-或(环烷基)C(O)O-, 其中烷基和环烷基如上所定义。

化学式中简称“Me”为甲基。

20 化学式中简称“Ph”为苯基。

术语“THF”指四氢呋喃。

术语“EtOAc”指乙酸乙酯。

术语“MeOH”指甲醇。

术语“DMF”指 N,N-二甲基甲酰胺。

25 术语“DIPEA”指二异丙基乙胺。

术语“TFA”指三氟乙酸。

术语“MeCN”指乙腈。

术语“DMA”指 N,N-二甲基乙酰胺。

术语“Et₂O”指乙醚。

30 术语“DCE”指 1,2 二氯乙烷。

术语“DIPEA”指 N,N-二异丙基乙胺。

术语“NBS”指 N-溴代琥珀酰亚胺。

术语“NIS”指 N-碘代丁二酰亚胺。

术语“Cbz-Cl”指氯甲酸苄酯。

35 术语“Pd₂(dba)₃”指三(二亚苄基丙酮)二钯。

术语“Dppf”指 1,1'-双二苯基膦二茂铁。

术语“HATU”指 2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯。

术语“KHMDs”指六甲基二硅基胺基钾。

术语“LiHMDs”指双三甲基硅基胺基锂。

术语“MeLi”指甲基锂。

5 术语“n-BuLi”指正丁基锂。

术语“NaBH(OAc)₃”指三乙酰氧基硼氢化钠。

术语“DCM”指二氯甲烷。

术语“DMAP”指 4-二甲氨基吡啶。

术语“DMBOH”指 2,4-二甲氧基苯酚。

10 术语“EDCI”指 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺。

术语“MTBE”指甲基叔丁基醚。

术语“DMF”指 N,N-二甲基甲酰胺。

术语“DMTMM”指 4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐。

术语“EtOAc”指乙酸乙酯。

15 本披露的化合物可以存在特定的立体异构体形式。术语“立体异构体”是指结构相同但原子在空间中的排列不同的异构体。其包括顺式和反式（或 *Z* 和 *E*）异构体、(-)-和(+)-异构体、(*R*)-和(*S*)-对映异构体、非对映异构体、(*D*)-和(*L*)-异构体、互变异构体、阻转异构体、构象异构体及其混合物（如外消旋体、非对映异构体的混合物）。本披露化合物中的取代基可以存在另外的不对称原子。所有这些立体异构体以及它们的混合物，均包括在本披露的范围内。可以通过手性合成、手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的(-)-和(+)-异构体、(*R*)-和(*S*)-对映异构体以及(*D*)-和(*L*)-异构体。本披露某化合物的一种异构体，可以通过不对称合成或者手性助剂来制备，或者，当分子中含有碱性官能团（如氨基）或酸性官能团（如羧基）时，与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐，然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分，得到纯的异构体。此外，对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过色谱法完成。

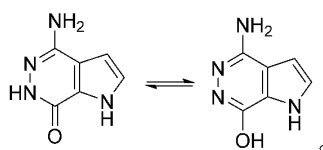
20

25

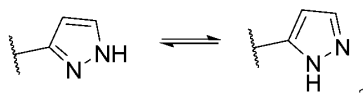
本披露所述化合物的化学结构中，键“/”表示未指定构型，即如果化学结构中存在手性异构体，键“/”可以为“”或“”，或者同时包含“”和“”两种构型。

30 本披露的化合物可以以不同的互变异构体形式存在，并且所有这样的形式包含在本披露的范围内。术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指平衡存在并且容易从一种异构形式转化为另一种异构形式的结构异构体。其包括所有可能的互变异构体，即以单一异构体的形式或以所述互变异构体的任意比例的混合物的形式存在。非限制性的实例包括：酮-烯醇、亚胺-烯胺、内酰胺-内酰亚胺等。

35 内酰胺-内酰亚胺的平衡如下所示：



如当提及吡唑基时，应理解为包括如下两种结构中的任何一种或两种互变异构体的混合物：



5 所有的互变异构形式在本披露的范围内，且化合物的命名不排除任何互变异构体。

本披露的化合物包括其化合物的所有合适的同位素衍生物。术语“同位素衍生物”是指至少一个原子被具有相同原子序数但原子质量不同的原子替代的化合物。可引入到本披露化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、氯、溴和碘等的稳定和放射性的同位素，例如分别为 ^2H （氘，D）、 ^3H （氚，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 和 ^{131}I 等，优选氘。

相比于未氘代药物，氘代药物有降低毒副作用、增加药物稳定性、增强疗效、延长药物生物半衰期等优势。本披露的化合物的所有同位素组成的变换，无论放射性与否，都包括在本披露的范围之内。与碳原子连接的各个可用的氢原子可独立地被氘原子替换，其中氘的替换可以是部分或完全的，部分氘的替换是指至少一个氢被至少一个氘替换。

当一个位置被特别地指定为“氘”或“D”时，该位置应理解为氘的丰度比氘的天然丰度（其为 0.015%）大至少 1000 倍（即至少 15% 的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 1000 倍（即至少 15% 的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 2000 倍（即至少 30% 的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 3000 倍（即至少 45% 的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 3340 倍（即至少 50.1% 的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 3500 倍（即至少 52.5% 的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 4000 倍（即至少 60% 的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 4500 倍（即至少 67.5% 的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 5000 倍（即至少 75% 的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 5500 倍（即至少 82.5% 的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大

至少 6000 倍（即至少 90%的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 6333.3 倍（即至少 95%的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 6466.7 倍（即至少 97%的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 6600 倍（即至少 99%的氘掺入）。在一些实施方案中，每个被指定的氘原子的氘的丰度比氘的天然丰度大至少 6633.3 倍（即至少 99.5%的氘掺入）。

“取代”或“取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选 1 至 6 个，更优选 1 至 3 个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下（通过实验或理论）确定可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和键的碳原子（如烯）结合时可能是不稳定的。

本披露还包括各种氘化形式的式（Pc-L-Y-D）抗体-药物偶联物。与碳原子连接的各个可用的氢原子可独立地被氘原子替换。本领域技术人员能够参考相关文献合成氘化形式的式（Pc-L-Y-D）抗体-药物偶联物。在制备氘代形式的式（Pc-L-Y-D）抗体-药物偶联物时可使用市售的氘代起始物质，或它们可使用常规技术采用氘代试剂合成，氘代试剂包括但不限于氘代硼烷、三氘代硼烷四氢呋喃溶液、氘代氢化锂铝、氘代碘乙烷和氘代碘甲烷等。

“任选地”或“任选”是指随后所描述的事件或环境可以但不必然发生，其包括该事件或环境发生或不发生两种情形。例如“任选地（任选）被卤素或者氰基取代的烷基”包括烷基被卤素或者氰基取代的情形和烷基不被卤素和氰基取代的情形。

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可接受的溶媒和溶剂有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射，将注射液或微乳注入受试者的血流中。或者，按可保持本披露化合物恒定循环浓度的方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度，可使用连续静脉内递药装置。这种装置的示例是 Deltec CADD-PLUS. TM. 5400 型静脉注射泵。

药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术，用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液，例如 1,3-丁二醇中制备的溶液。此外，可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬

浮介质。为此目的，可使用包括合成甘油单或二酯在内的任何调和固定油。此外，脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”是指本披露的抗体-药物偶联物的盐，这类盐用于受试者时具有安全性和有效性，且具有应有的生物活性。作为一个示例，本披露抗体-药物偶联物至少含有一个氨基，因此可以与酸形成盐，可药用盐的非限制性示例包括：盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。

术语“药学上可接受的载体”指药学配制剂中与活性成分不同的，且对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、稳定剂或防腐剂。

术语“赋形剂”是在药物制剂中除活性成分以外的附加物，也可称为辅料。如片剂中的粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂；半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分；液体制剂中的防腐剂、抗氧化剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持“干燥”状态，以利于制成片剂。如淀粉、乳糖、钙的无机盐、微晶纤维素等。

术语“受试者”或“个体”包括人类和非人类动物。非人动物包括所有脊椎动物（例如哺乳动物和非哺乳动物）例如非人灵长类（例如，食蟹猴）、羊、狗、牛、禽、两栖动物和爬行动物。除非指出时，否则所述术语“患者”或“受试者”在本文中可互换地使用。如本文所使用的，术语“食蟹猴（cyno）”或“食蟹猴（cynomolgus）”是指食蟹猴（*Macaca fascicularis*）。在某些实施方案中，个体或受试者是人。

“施用”或“给予”，当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。

术语“样本”是指从受试者分离的流体、细胞、或组织的采集物，以及存在于受试者体内的流体、细胞或组织。示例性样本为生物流体，诸如血液、血清和浆膜液、血浆、淋巴液、尿液、唾液、囊液、泪液、排泄物、痰、分泌组织和器官的粘膜分泌物、阴道分泌物、腹水、胸膜、心包、腹膜、腹腔和其它体腔的流体、由支气管灌洗液收集的流体、滑液、与受试者或生物来源接触的液体溶液，例如细胞和器官培养基（包括细胞或器官条件培养基）、灌洗液等，组织活检样本、细针穿刺、手术切除的组织、器官培养物或细胞培养物。

“治疗（treatment 或 treat）”和“处理”（及其语法变型）指试图改变所治疗

个体的病理过程的临床干预，并且可以为了预防或者在临床病理学的过程期间实施。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或再发生，减轻症状，减轻/减少疾病的任何直接或间接病理后果，预防转移，降低疾病进展速率，改善或减轻疾病状态，和消退或改善的预后。在一些实施方案中，使用本披露的抗体来延迟疾病的形成或减缓疾病的进展。

“有效量”一般是足以降低症状的严重程度及/或频率、消除这些症状及/或潜在病因、预防症状及/或其潜在病因出现及/或改良或改善由疾病状态引起或与其相关的损伤的量。在一些实施方案中，有效量是治疗有效量或预防有效量。“治疗有效量”是足以治疗疾病状态或症状、尤其与该疾病状态相关的状态或症状，或者以其他方式预防、阻碍、延迟或逆转该疾病状态或以任何方式与该疾病相关的任何其他不理想症状的进展的量。“预防有效量”是当给予受试者时将具有预定预防效应，例如预防或延迟该疾病状态的发作（或复发），或者降低该疾病状态或相关症状的发作（或复发）可能性的量。完全治疗或预防效未必在给予一个剂量之后便发生，可能在给予一系列剂量之后发生。因而，治疗或预防有效量可以一次或多次给予的方式给予。“治疗有效量”和“预防有效量”可取决于多种因素变化：诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重，以及治疗剂或治疗剂组合在个体中引发期望的应答的能力。有效治疗剂或治疗剂组合的示例性指标包括例如患者改善的健康状况。

二、具体实施方式的描述

A. 抗体药物偶联物中抗体的结构

在某些实施方案中，本文中提供的抗体是全长抗体。

在某些实施方案中，本文中提供的抗体是抗体片段。

在一个实施方案中，抗体片段是 Fab、Fab'、Fab'-SH 或 F(ab')₂ 片段，特别是 Fab 片段。“Fab”，其是由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段。“Fab 片段”可以是抗体经木瓜蛋白酶裂解产生的。“Fab'”含有 VL、CL 以及 VH 和 CH1，还含有 CH1 和 CH2 结构域之间的区域，以使得在两个 Fab' 片段的两条重链之间可以形成链间二硫键，以形成 F(ab')₂ 分子。“Fab'-SH”是其中恒定区的半胱氨酸残基具有游离巯基的 Fab' 片段。“F(ab')₂”包含在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段。

在另一个实施方案中，抗体片段是双抗体，三抗体或四抗体。双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段，该片段在同一条多肽链（VH-VL）中包含相连的 VH 和 VL。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对，迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对，从而产生两个抗原结合位点，两个抗原可以是相同或不同的。

在另一个实施方案中，抗体片段是单链 Fab 片段。“单链 Fab 片段”或“scFab”是由 VH，CH1，VL，CL 和接头组成的多肽，其中所述各结构域和所述接头在 N

端至 C 端方向具有以下顺序之一：a) VH-CH1-接头-VL-CL，b) VL-CL-接头-VH-CH1，c) VH-CL-接头-VL-CH1 或 d) VL-CH1-接头-VH-CL。在一个实施方案中，所述接头是具有至少 30 个氨基酸的多肽。在另一个实施方案中，所述接头是具有 32 至 50 个氨基酸之间的多肽。所述单链 Fab 片段经由 CL 和 CH1 之间的天然二硫键而被稳定化。另外，通过插入半胱氨酸残基（例如在重链可变区中的位置 44 和轻链可变区中的位置 100，根据 Kabat 编号）产生链间二硫键，这些单链 Fab 分子可以进一步被稳定化。

在另一个实施方案中，抗体片段是单链可变片段（scFv）。“scFv”是包含至少一个含有轻链可变区的抗体片段和至少一个含有重链可变区的抗体片段的融合蛋白，其中轻链可变区和重链可变区通过短的柔性肽接头连续连接，能够表达为单链多肽，并且其中 scFv 保持其所源自的完整抗体的特异性。除非特别指出，否则在本文中 scFv 可以以任何一种顺序具有 VL 和 VH 可变区，例如相对于多肽的 N 端和 C 端，scFv 可以包含 VL-接头-VH 或可以包含 VH-接头-VL。

在另一个实施方案中，抗体片段是由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段。

在另一个实施方案中，抗体片段是由抗体的单臂的 VH 和 VL 结构域组成的 Fv 片段。

在另一个实施方案中，抗体片段是 dsFv，dsFv 是通过将其中每个 VH 和 VL 中的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的多肽经由半胱氨酸残基之间的二硫键相连而获得的。可以按照已知方法（Protein Engineering.7:697(1994)）基于抗体的三维结构预测来选择被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基。

在另一个实施方案中，抗体片段是单域抗体，单域抗体是包含抗体的整个或部分重链可变域或整个或部分轻链可变域的抗体片段。

在另一个实施方案中，抗体片段是结构域抗体（domain antibody, dAb）；参见例如美国专利 No.6,248,516。结构域抗体(dAb)为抗体的功能结合结构域，其对应于人抗体的重(VH)或轻(VL)链的可变区。dAB 具有约 13kDa 的分子量、或者为小于完整抗体大小十分之一。dAB 良好地表达于包括细菌、酵母和哺乳动物细胞体系的各种宿主中。此外，即使经历严厉条件下，例如冻干或者热变性，dAb 高度稳定和保持活性。参见例如，美国专利 6,291,158；6,582,915；6,593,081；6,172,197；美国系列 No.2004/0110941；欧洲专利 0368684；美国专利 6,696,245；WO04/058821；WO04/003019 和 WO03/002609。

在某些实施方案中，本文中提供的抗体是嵌合抗体。在一个例子中，嵌合抗体包含非人可变区（例如自小鼠、大鼠、仓鼠、家兔、或非人灵长类，诸如猴衍生的可变区）和人恒定区。在又一个例子中，嵌合抗体是“类转换的”抗体，其中类或亚类已经自亲本抗体的类或亚类改变。

在某些实施方案中，抗体是人源化抗体。通常，将非人抗体通过人源化以降低对人的免疫原性，同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地，人源化

抗体包含一个或多个可变区，其中 CDR 或其部分衍生自非人抗体，而 FR 或其部分衍生自人抗体。任选地，人源化抗体还会包含人恒定区的一部分。在一些实施方案中，可将人源化抗体中的一些 FR 残基用来自非人抗体（例如提供 CDR 序列的抗体）的相应残基替代。

5 人源化抗体及其生成方法综述于如 Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)，并且进一步记载于如 Riechmann 等, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen 等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 美国专利 No.5,821,337, 7,527,791, 6,982,321 和 7,087,409; Kashmiri 等, *Methods* 36:25-34 (2005)(描述了特异性决定区(SDR)嫁接); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991)
10 (描述了“再表面”(resurfacing)); Dall'Acqua 等, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述了“FR 改组”); 和 Osbourn 等, *Methods* 36:61-68 (2005)和 Klimka 等, *Br. J. Cancer* 83:252-260 (2000) (描述了 FR 改组的“引导选择”方法)。

可以用于人源化的人框架区包括但不限于：使用“最佳拟合(best-fit)”方法选择的框架区（见例如 Sims 等, *J.Immunol.* 151:2296 (1993)）；衍生自轻链可变
15 区或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区(见例如 Carter 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 和 Presta 等, *J.Immunol.*, 151:2623 (1993)); 人成熟的（体细胞突变的）框架区或人种系框架区（见例如 Almagro and Fransson, *Front.Biosci.* 13:1619-1633 (2008) ）；和通过筛选 FR 文库获得的框架区（见例如 Baca 等, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 和 Rosok 等, *J. Biol. Chem.*
20 271:22611-22618 (1996)）。

B. 抗体药物偶联物中抗体的修饰

在某些实施方案中，涵盖本文中提供的抗体偶联物中抗体的氨基酸序列变体。例如，可以期望改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。可以通过将合适的
25 修饰引入编码抗体的核苷酸序列中，或者通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如对抗体的氨基酸序列内的残基的删除、和/或插入、和/或替代。可以进行删除、插入、和替代的任何组合以得到最终的构建体，只要最终的构建体拥有期望的特征，例如抗原结合。

a) 替代、插入和删除变体

在某些实施方案中，提供了具有一处或多处氨基酸替代的抗体变体。替代诱
30 变感兴趣的位点包括 CDR 和 FR。保守替代在表 2 中在“优选的替代”的标题下显示。更实质的变化在表 2 中在“示例性替代”的标题下提供，并且如下文参照氨基酸侧链类别进一步描述的。可以将氨基酸替代引入感兴趣的抗体中，并且对产物筛选期望的活性，例如保留/改善的抗原结合，降低的免疫原性，或改善的 ADCC 或 CDC。

35

表 2

原始残基	示例性替代	优选的替代
------	-------	-------

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; 正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸; 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; 正亮氨酸	Leu

依照常见的侧链特性，氨基酸可以如下分组：

- 5
- (1) 疏水性的：正亮氨酸，Met，Ala，Val，Leu，Ile；

(2) 中性，亲水性的：Cys，Ser，Thr，Asn，Gln；

(3) 酸性的：Asp，Glu；

(4) 碱性的：His，Lys，Arg；

(5) 影响链取向的残基：Gly，Pro；

(6) 芳香族的：Trp，Tyr，Phe。

非保守替代会需要用这些类别之一的成员替换另一个类别的成员。

10

在某些实施方案中，替代、插入或缺失可以在一个或多个 CDR 内发生，只要此类变化不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如，可以对 CDR 做出保守变化（例如保守替代，如本文中提供的），其不实质性降低结合亲和力。此类变化可以例如在 CDR 中的抗原接触残基外部。在上文提供的变体 VH 和 VL 序列的某些实施方案中，每个 CDR 是未改变的，或者含有不超过 1、2 或 3 处氨基酸替代。

15

一种可用于鉴定抗体中可以作为诱变靶位的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”，如由 Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085 所描述的。在这种方法中，鉴定一个残基或残基组（例如带电荷的残基，诸如 Arg、Asp、His、Lys 和 Glu），并且用中性或带负电荷的氨基酸(例如，Ala 或聚丙氨酸)替换以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对初始替代显示功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的替代。此外，可通过研究抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定

20

抗体与抗原间的接触点。这些接触残基及邻近残基可以作为替代候选物被打靶或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

氨基酸序列插入包括在氨基和/或羧基端融合长度范围为 1 个残基至 100 或更多个残基的多肽，和单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N 端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的 N 或 C 端与酶或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

b) Fc 区修饰

在某些实施方案中，可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文所提供的抗体的 Fc 区中。

10 在一些实施方案中，所述一个或多个氨基酸修饰可减少 Fc 与 Fc 受体的结合，例如其与 $\text{Fc}\gamma$ 受体的结合，并且降低或消除效应子功能。在一些实施方案中，改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比，对 Fc 受体的结合亲和力下降 50%、80%、90% 或 95% 以上。在一些实施方案中，所述 Fc 受体是人 $\text{Fc}\gamma$ 受体，例如 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 。在一些实施方案中，改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比，对补体，如 C1q 的结合亲和力也降低。在 15 一些实施方案中，改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比，对新生儿 Fc 受体 (FcRn) 的结合亲和力增强；比如在 Fc 区引入 M252Y/S254T/T256E 突变。在一些实施方案中，改造的 Fc 区具有降低的效应子功能，所述降低的效应子功能可以包括但不限于以下中的一个或多个：降低的补体依赖性细胞毒性 (CDC)、降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、降低的抗体依赖性细胞吞噬 (ADCP)、减少的细胞因子分泌、减少的免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取、减少的与 NK 细胞的结合、减少的与巨噬细胞的结合、减少的与单核细胞的结合、减少的与多形核细胞的结合、减少的直接信号传导诱导性细胞凋亡、降低的树突细胞成熟或减少的 T 细胞引发。对于 IgG_1 Fc 区，在 238、265、269、270、297、327 和 329 等位置的氨基酸残基取代可降低的效应子功能。在一些实施方案中，所述 Fc 区是人 IgG_1 Fc 区，并且在 234 和 235 位置的氨基酸残基为 A，编号依据为 EU 索引。对于 IgG_4 Fc 区，在 228 等位置的氨基酸残基取代可降低的效应子功能。

在某些实施方案中，抗体包含具有改善 ADCC 的一处或多处氨基酸替代，例如在 Fc 区的位置 298、333、和/或 334 (采用 EU 编号系统) 的替代。

30 在某些实施方案中，本文中的抗体的 Fc 域包含“杵臼”突变。“杵臼”是一种用于工程化改造抗体重链同二聚体进行异二聚化 (例如为了有效生成双特异性抗体，多特异性抗体，或独臂抗体) 的设计策略。一般地，此类技术牵涉在第一多肽 (诸如第一抗体重链中的第一 CH3 域) 的界面处引入隆起 (“杵”) 和在第二多肽 (诸如第二抗体重链中的第二 CH3 域) 的界面对应处引入空腔 (“臼”)，使得隆起能安置在空腔中从而促进异二聚体形成，并阻碍同二聚体形成。通过将来自第一多肽 (诸如第一抗体重链中的第一 CH3 域) 的界面的较小氨基酸侧链用

较大侧链（例如精氨酸，苯丙氨酸，酪氨酸或色氨酸）替换来构建隆起。通过将较大氨基酸侧链用较小侧链（例如丙氨酸，丝氨酸，缬氨酸，或苏氨酸）替换在第二多肽（诸如第二抗体重链中的第二 CH3 域）的界面中创建与隆起相同或相似尺寸的补偿性空腔。可以通过改变编码多肽的核酸（例如通过位点特异性诱变）或通过肽合成来生成隆起和空腔。在一些实施方案中，杆修饰包含 Fc 域的两个亚基之一中的氨基酸替代 T366W，而白修饰包含 Fc 域的两个亚基之中的另一中的氨基酸替代 T366S、L368A 和 Y407V。在一些实施方案中，Fc 域的包含杆修饰的亚基另外包含氨基酸替代 S354C，而且 Fc 域的包含白修饰的亚基另外包含氨基酸替代 Y349C。引入这两个半胱氨酸残基导致形成 Fc 区的两个亚基之间的二硫桥，如此进一步稳定二聚体（Carter, *J. Immunol. Methods* 248:7-15 (2001)）。杆白突变的例示性组合包括但不限于表 3 中所述。

表 3

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

关于杆白技术的细节描述于例如美国专利 No.5,731,168；美国专利 No.7,695,936；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 等, *Prot Eng* 9:617-621 (1996)；和 Carter, *J Immunol Meth* 248:7-15 (2001)。

Fc 区的 C 末端可以是以氨基酸残基 PGK 结束的完整 C 末端；也可以是截短的 C 末端，例如在所述截短的 C 末端中已经去除了一个或两个 C 末端氨基酸残基。在一个优选的方面中，重链的 C 末端是以 PG 结束的截短的 C 末端。因此，在一些实施方案中，完整抗体的组合物可以包括去除了所有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方案中，完整抗体的组合物可以包括没有去除 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方案中，完整抗体的组合物包含带有和不带有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体混合物。

C. 重组方法

抗 DLL3 抗体可以使用重组方法来产生。对于这些方法，提供编码抗体的一个或多个分离的核酸。

在一个实施方案中，本披露提供了编码如前所述的抗体的分离的核酸。此类核酸可以给自独立的编码前述的任一多肽链。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的一种或多种载体（例如表达载体）。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的宿主细胞。在一个实施方案中，提供制备抗 DLL3 抗体的方法，其中所述方法包括，在适合表达的条件下，培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细

胞，如上文所提供的，和任选地从宿主细胞（或宿主细胞培养基）回收所述抗体。

为了重组产生抗体，将编码抗体的核酸分离并插入一个或更多个载体中，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可以使用常规程序容易地分离和测序，或者通过重组方法产生或通过化学合成获得。

5 用于克隆或表达编码抗体的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，可在细菌中产生，特别是当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。在表达后，可以在可溶级分中从细菌细胞糊状物分离，并且可进一步纯化。

D. 测定

10 本文提供的抗体药物偶联物可以通过本领域已知的多种测定法对其物理/化学特征和/或生物学活性进行鉴定、筛选或表征。在一个方面中，例如通过已知方法如 ELISA、蛋白印迹法等，测试本披露的抗体药物偶联物活性。

E. 治疗方法与施用途

本文提供的前述任何抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐可用于治疗疾病。

15 在一个方面，本披露提供抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途。在一些实施方案中，本披露提供的抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗肿瘤或癌症的药物中的用途。在一些实施方案中，所述的其中所述的肿瘤或癌症包括但不限于肺癌（例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、大细胞肺癌）、头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、
20 多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、咽鳞癌、口腔鳞癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌（例如甲状腺髓样癌）、恶性胸膜间皮瘤、乳腺癌（例如三阴性乳腺癌）、肝癌、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结直肠癌（例如结肠癌和直肠癌）、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、肾上腺癌、胶质母细胞瘤、皮肤癌和黑色素瘤；优选地，其中所述肺癌为小细胞肺癌。

25 在一些实施方案中，本披露提供的抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗 DLL3 相关的疾病的药物中的用途。

在一个此类实施方案中，所述用途进一步包括向受试者施用治疗有效量的至少一种另外的治疗剂（例如一种、两种、三种、四种、五种或六种另外的治疗剂）。

30 在又一个的方面，提供包含所述抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的药物组合物，例如，其用于以上任何制药用途或治疗方法。在一个实施方案中，药物组合物包含本文提供的任何多肽或药物偶联物和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中，药物组合物还包含至少一种另外的治疗剂。

35 本披露的抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐可单独使用或与其他试剂联合用于治疗。例如，本披露的抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐可与至少一种另外的治疗剂共同施用。

本披露的抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐可通过任何合适的手段施用，包括肠胃外、肺内和鼻内，并且如果需要局部治疗，则病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何适当的途径，例如，通过注射，诸如静脉内或皮下注射，这部分取决于施用是短期的还是长期的。本文考虑多种给药时间方案，包括但不限于，单次或在多个时间点多次施用，推注施用和脉冲输注。

本披露的抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐将以符合良好医疗实践的方式配制、给药和施用。在此背景下考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的起因、试剂的递送部位、施用方法、施用时间安排以及医学从业者已知的其他因素。抗 DLL3 抗体或其药物偶联物可以与一种或更其它试剂一起配制。此类其它试剂的有效量取决于药物组合物中存在的量、病症或治疗的类型以及其它因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用路径使用，或以本文所述剂量的约 1 至 99% 使用，或以其它剂量使用，并通过经验/临床确定为合适的任何途径使用。

为了预防或治疗疾病，本披露的抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐（当单独使用或与一种或更多种其他另外的治疗剂组合使用时）的适当的剂量将取决于待治疗的疾病的类型，治疗分子的类型，疾病的严重性和病程，是为预防还是治疗目的施用，之前的治疗，患者的临床病史和对治疗分子的响应，和主治医师的判断。治疗分子恰当地以一次或经过一系列治疗施用于患者。

F. 制品

在本披露的另一方面中，提供一种制品（如药盒），所述制品包含可用于治疗、预防和/或诊断上述病症的材料。该制品包含容器和在容器上或与容器联合的标签或包装插页（package insert）。合适的容器包括，例如，瓶子、管形瓶、注射器、IV 溶液袋等。容器可以自各种材料诸如玻璃或塑料形成。

容器单独装有本披露的抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐、或与另一种组合物组合。容器可具有无菌的存取口（例如，容器可以是具有塞子的静脉内溶液袋或管形瓶）。组合物中的至少一种活性试剂是本披露的抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐。标签或包装插页指示使用该组合物是来治疗选择的病况。

此外，制品可以包含：(a) 其中装有抗 DLL3 抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的第一容器；和 (b) 其中装有组合物的第二容器，其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他方面的治疗剂。

备选地，或另外地，制品可进一步包含第二（或第三）容器，所述第二（或第三）容器包含药学上可接受的缓冲液。从商业和用户立场，它可进一步包括所需的其它材料，包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

实施例

以下结合实施例进一步描述本披露，但这些实施例并非限制本发明的范围。

本披露实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，
5 或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的
的常规试剂。

一、抗体的制备

实施例 1：DLL3 抗原及检测用蛋白和稳转细胞株的制备

将不同种属的 DLL3 基因和人 DLL1、DLL4 基因转染中国仓鼠卵巢细胞 CHO-s
细胞（Invitrogen，R80007），构建表达不同种属的 DLL3 蛋白的 CHO-s 细胞株，
10 用于后续抗体的筛选和鉴定。相关蛋白氨基酸序列如下：

人 DLL3 全长蛋白（Uniprot，Q9NYJ7）：

MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSAR
LPCRLFFRVCLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLL
QVPFRDAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDI
15 QRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEA
PLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSATTGCL
VPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNNG
LCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCR
CRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERA
20 DPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGL
RPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPSV
HALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSVVDWNRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREVATPLF
PPLHTGRAGQRQHLLFPYPSSILSVK

SEQ ID NO: 1

25 食蟹猴 DLL3 全长蛋白（Uniprot，A0A2K5WSR4）：

MVSPRMSRLLSQTIVILALIFIPQARPAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSAR
GPCRLFFRVCLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLL
QVPFRDAWPGTFSLIETWREELGDQIGGPAWSLLARVTRRRRLAAGGPWARDI
QRAGAWELRFSYRARCELPVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEA
30 PPVCRAGCSLEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCMVPVSTSSCLGLRGPSSTTTGC
LVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPGSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNNG
GLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRC
RCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRNCRER
ADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGVSALPAAPP
35 LRPDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRRGHAQDAGSRLLAGTPEPS
VHALPDALNNLRTQEGPDVPSSSVVDWNRPEDVDSRGIYVISAPSIYAREVAMP
LFPPLHTGRAGQRQNLLFPFPSSILSVK

SEQ ID NO: 2

大鼠 DLL3 全长蛋白（Uniprot，O88671）：

MVSLQVSSLPQTLILAFLLPQALPAGVFELQIHSFGPGPGPTPRSPCNARGP
CRLFFRVCLKPGVVSQEAESLALGAALSTSGPVYTEQPGVPAAALSLPDGLVR
VPFLDAWPGTFSLIETWREQLGERAAGPAWNLLARVAGRRRLAAGAPWARDV
QRTGAWELHFSYRARCEPPAVGAACARLCRSRSAPSRCGPGLRPCTPFDECEA
5 PRESLTVCRAGCSPEHGYCEEPDECHCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLNSRVSGPAG
TGCLLPGPGPCDGNPCANGGSCSETPGSFECACPRGFYGPRCEVSGVTCADGPC
FNGGLCVGGEDPDSAYVCHCPPAFQGSNCERRVDRCSLQPCQNGGLCLDLGHA
LRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGARRCSCALGFGGRDC
RERADPCASRPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGVRCEFAVRPDGADAVPAA
10 PRGLRQADSQRFLPPALGLLAAAALAGAALLIHVRRRGPRDGTGTRLLSGTR
EPSVHTLPDALNNLRLQDGAGDGPTSSADWNHPEDGDSRSIYVIPAPSIYAREA
SEQ ID NO: 3

小鼠 DLL3 全长蛋白 (Uniprot, O88516):

MVSLQVSPLSQTLILAFLLPQALPAGVFELQIHSFGPGPGLGTPRSPCNARGP
15 CRLFFRVCLKPGVVSQEAATESLALGAALSTSVPVYTEHPGESAAAALPLPDGLVRV
PFRDAWPGTFSLVETWREQLGEHAGGPAWNLLARVVGRRRRLAAGGPWARDV
QRTGTWELHFSYRARCEPPAVGAACARLCRSRSAPSRCGPGLRPCTPFDECEA
PSVCRPGCSPEHGYCEEPDECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLNSRVPGPASTGCL
LPGPGPCDGNPCANGGSCSETSGSFECACPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGG
20 LCVGGEDPDSAYVCHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCQNGGLCLDLGHALRCR
CRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGSRRCSALGFGGRDCRERA
DPCASRPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGVRCEFAVRPDGADAVPAAPRGL
RQADPQRFLPPALGLLVAAGLAGAALLVIHVRRRGPGQDTGTRLLSGTREPSV
HTLPDALNNLRLQDGAGDGPSSSADWNHPEDGDSRSIYVIPAPSIYAREDWLIQ
25 VLF

SEQ ID NO: 4

人 DLL1 全长蛋白 (Uniprot, O00548):

MGSRCALALAVLSALLCQVWSSGVFELKLQEFVNKKGLLGNRNCCRGGA
GPPPCACRTFFRVCLKHYQASVSPEPPCTYGSVTPVLGVDSFSLPDGGGADSAF
30 SNPIRFPFGFTWPGTFSLIEALHTDSPDDLATENPERLISRLATQRHLTVGEEWSQ
DLHSSGRTDLKYSYRFVCDEHYYGEGCSVFCRPRDDAFGHFTCGERGEKVCNP
GWKGPYCTEPICLPGCDEQHGFCDKPGECKCRVGWQGRYCDECIRYPGCLHGT
CQQPWQCNCQEGWGGGLFCNQDLNYCTHHKPKNGATCTNTGQGSYTCSCR
GYTGATCELGIDECDPSPCKNGGSCTDLENSYSCTCPPGFYKICELSAMTCAD
35 GPCFNGGRCSDSPDGGYSCRCPVGYSGFNCEKKIDYCSSSPCSNGAKCVDLGDA
YLCRCQAGFSGRHCDDNVDDCASSPCANGGTCRDGVNDFSCTCPGYTGRNC
SAPVSRCEHAPCHNGATCHERGHRYVCECARGYGGPNCQFLPELPPGPAVVDL
TEKLEGQGGPFPPWVAVCAGVILVLMLLGCAAVVVCVRLRLQKHRPPADPCRG
ETETMNNLANCQREKDISVSIIGATQIKNTNKKADFHGDHSADKNGFKARYPAV
40 DYNLVQDLKGDDTAVRDAHSKRDTKCQPQGSSEEEKGTPTTLRGGEASERKRP

DSGCSTSKDTKYQSVYVISEEKDECVIATEV

SEQ ID NO: 5

人 DLL4 全长蛋白 (Uniprot, Q9NR61):

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPC
5 EPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQL
PFNFTWPGTFSLLIEAWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQ
TSTLRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWT
GEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTP
WQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGV
10 DCELELSECDSNPCRNGGSKDQEDGYHCLCPPGYGLHCEHSTLSCADSPCFN
GGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRM
CRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCAHHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVR
TSIDACASSPCFNATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFEPVGLPPSFPWVAVS
LGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLK
15 NTNQKKELEVDCGLDKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPKSDKSL
GEKAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV

SEQ ID NO: 6。

1.1 高表达 DLL3、DLL1 和 DLL4 细胞株构建

包含 SEQ ID NO: 1-6 的 pCDH 慢病毒表达载体质粒(由 GENEWIZ 公司合成),
20 pCDH 质粒分别与 pVSVG, pCMV 慢病毒包装载体用 Lipofectamine
3000(Invitrogen, L3000015)转染试剂转染至 293T 细胞(中科院细胞库, GNHu17)
中, 收集含有病毒的培养基上清, 过滤并进行超高速离心, 弃去上清后, 用 0.2mL
无菌 PBS 重悬。使用浓缩后的病毒分别感染中国仓鼠卵巢细胞 CHO-s (Invitrogen,
R80007), DMS53 (ATCC, CRL-2062)和 H82 (ATCC, HTB-175), 经嘌呤霉素筛选
25 两至三周, 再进行 FACS 单细胞分选。将挑选出的单克隆细胞株扩大培养, 冻存。

1.2 抗原的制备

以人 DLL3 (Uniprot, Q9NYJ7)、食蟹猴 DLL3 (Uniprot, A0A2K5WSR4)
和小鼠 DLL3 (Uniprot, O88516) 序列为模板, 设计含有不同标签的 DLL3 ECD
融合蛋白, 分别克隆到 pTT5 载体上, 经 293E 细胞表达后, 获得抗原。相关蛋白
30 氨基酸序列如下:

1) His-hDLL3(ECD):

METDTLLLWVLLLWVPGSTGHHHHHHHHHHHGGGGGSGGGGSAGVFELQI
HSEFGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPV
YTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLA
35 RVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPS
RCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGEERCLEGTGPLCTVPV
STSSCLSPRGPSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLR
CEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQP
CRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGA

HRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL

SEQ ID NO: 7

注：点划线为部分信号肽序列，单划线部分为 his 标签和连接子，双划线部分为 DLL3 胞外区。

2) Fc-hDLL3(ECD):

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSAGVELQIHSGFGPGPGAPRSPCSARLPCRLLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPERDAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSA
10 PSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGA
15 RCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL

SEQ ID NO: 8

注：点划线部分为信号肽序列，单划线部分为 Fc 标签和连接子，双划线部分为 DLL3 胞外区。

3) hDLL3(ECD)-strep twin:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGVFELQIHSGFGPGPGAPRSPCSARLPCRLLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPERDAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSA
25 PSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL
30 WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

35

SEQ ID NO: 9

注：点划线部分为信号肽序列，双划线部分为 DLL3 胞外区，单划线部分为 strep twin 标签。

4) cynoDLL3(ECD)-strep twin:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGVFELQIHSGFGPGPGAPRSPCSARGPCR

1 LFFRVCLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLLQVPF
2 RDAWPGTFSLIETWREELGDOIGGPAWSLLARVTRRRRLAAGGPWARDIQRAG
3 AWELRFSYRARCELPVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPPVCR
4 AGCSLEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCMVPVSTSSCLGLRGPSSTTTGCLVPGP
5 GPCDGNPCANGGSCSETPGSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCV
6 GGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRA
7 GFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRNCRERADPC
8 AARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGVSAAPPGLRPG
9 DPQRYLWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

10

SEQ ID NO: 10

注：点划线部分为信号肽序列，双划线部分为 DLL3 胞外区，单划线部分为 strep twin 标签。

5) mouDLL3(ECD)-strep twin:

1 METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGVFELQIHSFGPGPLGTPRSPCNARGPCR
2 LFFRVCLKPGVSQEATESLCALGAALSTSVPVYTEHPGESAAALPLDGLVRVPE
3 RDAWPGTFSLVETWREQLGEHAGGPAWNLLARVVGRRRLAAGGPWARDVQR
4 TGTWELHFSYRARCEPPAVGAACARLCRSRSAPSRCGPGLRPCTPFPECEAPSV
5 CRPGCSPEHGYCEEPDECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLNSRVPGPASTGCLLP
6 PGPCDGNPCANGGSCSETSGSFECACPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLC
7 VGGEDPDSAYVCHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCQNGGLCLDLGHALRCRCR
8 AGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGSRRCSALGFGGRDCRERADP
9 CASRPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGVRCEFAVRPDGADAVPAAPRGLRQ
10 ADPQRFLWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

25

SEQ ID NO: 11

注：点划线部分为信号肽序列，双划线部分为 DLL3 胞外区，单划线部分为 strep twin 标签。

实施例 2：小鼠抗人 DLL3 单克隆抗体的制备

1. 免疫

30 抗人 DLL3 单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用 SJL 小鼠，雌性，6-8 周龄（上海斯莱克实验动物有限公司，动物生产许可证号：SCXK（沪）2017-0005）。饲养环境：SPF 级。小鼠购进后，实验室环境饲养 1 周，12/12 小时光/暗周期调节，温度 20-25℃；湿度 40-60%。将已适应环境的小鼠按以下方案免疫。

免疫方案：

35 第一组小鼠的免疫抗原为 His-hDLL3(ECD) (SEQ ID NO: 7)。用 TiterMax® Gold Adjuvant (Sigma Cat No. T2684) 与 Thermo Imject® Alum (Thermo Cat No. 77161) 佐剂交叉免疫。抗原与佐剂 TiterMax® Gold Adjuvant 比例为 1:1，抗原与佐剂 Thermo Imject® Alum 比例为 3:1，50μg/只/次(首次免疫)，25μg/只/次（加强

免疫)。抗原乳化后进行接种，免疫时间为 0、7、14、21 天。于第 7、第 21 天取血，用 ELISA 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在第 4 次免疫以后，选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前 3 天加强免疫，腹膜内 (i.p.) 注射 25μg/只的生理盐水配制的抗原溶液。

- 5 第二组小鼠的免疫抗原为 DLL3 CHO-s 和 Fc-hDLL3(ECD) (SEQ ID NO: 8)，免疫方式为细胞和蛋白抗原交替免疫。首次免疫 DLL3 CHO-s 细胞前，提前用 TiterMax® Gold Adjuvant (Sigma Cat No. T2684) 0.1mL/只注射小鼠腹膜内，半小时后每只小鼠腹膜内注射 0.1mL 用生理盐水稀释至 10⁸/mL 浓度的细胞液。细胞吹散均匀后进行接种，时间为第 0、14、28、42 天。Fc-hDLL3(ECD)抗原用 TiterMax®
- 10 Gold Adjuvant (Sigma Cat No. T2684) 与 Thermo Imject® Alum (Thermo Cat No. 77161) 佐剂交叉免疫。抗原与佐剂 TiterMax® Gold Adjuvant 比例为 1:1，抗原与佐剂 Thermo Imject® Alum 比例为 3:1，50μg/只/次(首次免疫)，25μg/只/次 (加强免疫)。hDLL3- Fc 免疫时间为 7、21、35、49 天。于第 14、35、49 天取血，用 ELISA 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在第 8 次免疫以后，选择血清中抗体滴
- 15 度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前 3 天加强免疫，腹膜内 (i.p.) 注射 50μg/只的生理盐水配制的 hDLL3-Fc 蛋白抗原溶液。

2. 脾细胞融合

采用优化的电融合方法将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 细胞 (ATCC® CRL-8287™) 进行融合得到杂交瘤细胞。

- 20 融合的杂交瘤细胞以 3-4×10⁵/mL 的密度用完全培养基 (含 20% FBS、1×HAT、1×OPI 的 IMDM 培养基) 重悬，150μL/孔种于 96 孔板中。37℃，5%CO₂ 孵育 3-4 天后，去除上清，加入 200μL/孔的 HT 完全培养基 (含 20%FBS、1×HT 和 1×OPI 的 IMDM 培养基)，37℃，5%CO₂ 培养 3 天后进行筛选检测。

3. 杂交瘤细胞筛选及抗体序列测定

- 25 根据杂交瘤细胞生长密度，用结合 DLL3 蛋白的 ELISA 方法和结合 DLL3 CHO-s 细胞 FACS 方法进行杂交瘤培养上清检测。选择结合人 DLL3 蛋白，猴 DLL3 蛋白以及 DLL3 CHO-s 细胞，同时不结合野生型 CHO-s 细胞的克隆及时进行冻存、扩增、保种和一到二次亚克隆直至获得单细胞克隆。通过以上实验筛选得到杂交瘤克隆 mAb100 和 mAb6。

- 30 将杂交瘤克隆扩培养，提取 RNA，利用 mouse-Ig 的简并引物进行反转录扩增 (RT-PCR)，最后得到抗体的可变区序列。

mAb6 重链可变区：

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDY~~Y~~MNWVKQSHGKSLEWIG
IINPYSGVTIYNHKFKGKATLTVDKSSNTAYMELNSLTSEDSAVYYCARQDSLLD
35 YAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 12

mAb6 轻链可变区：

DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHASQGISGNMGWLQKPKGSFKGLIYHG
ANLEDGVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 13

5 mAb100 重链可变区：
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPEKGLEWVAY
ISSGSSTIHYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCASPLYYYGR
SYNAVAYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 14

10 mAb100 轻链可变区：
DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQKPGNIPKLLIYKAS
DLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 15。

表 4. 鼠源抗体的 CDR 序列

抗体	名称	序列	编号
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

15 注：VH/VL 的 CDR 的氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定并注释。

将鼠抗体的重链可变区和轻链可变区分别克隆到包含 SEQ ID NO: 28 所示的人 IgG1 重链恒定区和 SEQ ID NO: 29 所示的 κ 轻链恒定区的 pTT 5 载体质粒，然后转染 HEK293 细胞，得到了抗 DLL3 的嵌合抗体 M6CHI 和 M100CHI。

20 人 IgG1 重链恒定区：
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
25 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 28

人κ轻链恒定区:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG

5 EC

SEQ ID NO: 29。

实施例 3：鼠源抗 DLL3 单克隆抗体的人源化

通过比对 Kabat 人类抗体轻重链可变区种系基因数据库，分别挑选同源性高的
10 重、轻链可变区种系基因作为模板，将鼠源抗体的 CDR 分别嫁接（graft）到相应
的人源模板中，形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列。
并对可变区的氨基酸进行回复突变，再与恒定区重组（示例性的，与 SEQ ID NO:
28 所示的人 IgG1 重链恒定区和 SEQ ID NO: 29 所示的人 κ 轻链恒定区），获得
全长抗体。

15 mAb6 抗体的人种系轻链可变区 FR1, FR2, FR3 模板为 IGKV1-16*01, 轻链
FR4 区模板为 IGKJ4*01, 人种系重链可变区 FR1, FR2, FR3 模板为 IGHV1-3*01、
IGHV7-4-1*02 或 IGHV3-73*01, 重链 FR4 区模板为 IGHJ6*01。mAb100 抗体的人
种系轻链可变区 FR1, FR2, FR3 模板为 IGKV1-27*01, 轻链 FR4 区模板为
IGKJ4*01, 人种系重链可变区 FR1, FR2, FR3 模板为 IGHV3-11*01, 重链 FR4
20 区模板为 IGHJ6*01。

此外，将 mAb100 重链可变区的 HCDR3: PLYYYGRSYNAVAY (SEQ ID NO:
24)中的第 4 位氨基酸残基由 Y 突变为 H,第 11 位由 A 突变为 G,获得新的 HCDR3:
PLYHYGRSYNAVAY (SEQ ID NO: 30)和 PLYYYGRSYNGVAY (SEQ ID NO:
31)。

25 表 5. mAb6 和 mAb100 抗体的人源化模板及相应点突变

	VL		VH	
hAb6	VL1	Graft (IGKV1-16*01) + F36L, S46G	VH1	Graft(IGHV1-3*01) + Q1E, R71V, T73K
	VL2	Graft(IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y	VH2	Graft(IGHV1-3*01) + Q1E, I69L, R71V, T73K, S76N
	VL3	Graft(IGKV1-16*01) + F36L, A43S, P44F, S46G, T69A, F71Y	VH3	Graft(IGHV1-3*01) + Q1E, M48I, V67A, I69L, R71V, T73K, S76N
	VL4	Graft(IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y, T85D	VH4	Graft(IGHV1-3*01) + Q1E, Q43K, I69L, R71V, T73K, S76N
	VL5	Graft (IGKV1-16*01)	VH5	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K

			VH6	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N
			VH7	Graft(IGHV3-73*01) + F27Y, S30T, I69L, R71V, D73K, T93A
			VH8	Graft(IGHV1-3*01)
			VH9	Graft(IGHV7-4-1*02)
			VH10	Graft(IGHV3-73*01)
			VH11	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, R38K, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N
			VH12	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, V68A, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N
			VH13	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, R38K, V68A, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N
hAb100	VL1	Graft(IGKV1-27*01)	VH1	Graft(IGHV3-11*01) + Q1E, R94S
	VL2	Graft(IGKV1-27*01) + V43I	VH2	Graft(IGHV3-11*01) + Q1E, S49A, R94S
			VH3	Graft(IGHV3-11*01) + Q1E, S49A, R94S, Y98H
			VH4	Graft(IGHV3-11*01) + Q1E, S49A, R94S, A100EG
			VH5	Graft(IGHV3-11*01)

注：以表中的 A100EG 为例，表示 kabat 编号下的第 100E 位的 A 突变为 G。

获得的人源化抗体可变区的序列如下：

hAb6 VH1（Q1E, R71V, T73K）

5 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSED~~TAVYYCARQDSL~~
DYAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 32

hAb6 VH2（Q1E, I69L, R71V, T73K, S76N）

10 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRVTLTVDKSANTAYMELSSLRSED~~TAVYYCARQDSL~~
LDYAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 33

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

15 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWI
GIINPYSGVTIYNHKFKGRATLTVDKSANTAYMELSSLRSED~~TAVYYCARQDSL~~
LDYAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 34

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

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGKRLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRVTLSVDKSANTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSL
LDYAMDYWGQGTTTVTVSS

5

SEQ ID NO: 35

hAb6 VH5 (Q1E, F69L, L71V, T73K)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFVLSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSSL
DYAMDYWGQGTTTVTVSS

10

SEQ ID NO: 36

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

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFVLSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSSL
DYAMDYWGQGTTTVTVSS

15

SEQ ID NO: 37

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGYTFTDYYMNWVRQASGKGLEWV
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFTLSVDKSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCARQDSL
LDYAMDYWGQGTTTVTVSS

20

SEQ ID NO: 38

hAb6VH8 (Graft IGHV1-3*01)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSSL
DYAMDYWGQGTTTVTVSS

25

SEQ ID NO: 39

hAb6VH9 (Graft IGHV7-4-1*02)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSSL
YAMDYWGQGTTTVTVSS

30

SEQ ID NO: 40

hAb6VH10 (Graft IGHV3-73*01)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMNWVRQASGKGLEWVG
IINPYSGVTIYNHKFKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRQDSSL
YAMDYWGQGTTTVTVSS

35

SEQ ID NO: 41

hAb6VH11 (Q1E, R38K, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGQGLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFVLSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSSL
DYAMDYWGQGTTTVTVSS

40

SEQ ID NO: 42

hAb6VH12 (Q1E, V68A, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLL
DYAMDYWGQGTTTVTVSS

5

SEQ ID NO: 43

hAb6VH13 (Q1E, R38K, V68A, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGQGLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLL
DYAMDYWGQGTTTVTVSS

10

SEQ ID NO: 44

hAb6 VL1 (F36L, S46G)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWLQQKPGKAPKGLIYHG
ANLEDGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEI
K

15

SEQ ID NO: 45

hAb6 VL2 (F36L, S46G, T69A, F71Y)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWLQQKPGKAPKGLIYHG
ANLEDGVPSRFSGSGSGADYTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEI
K

20

SEQ ID NO: 46

hAb6 VL3 (F36L, A43S, P44F, S46G, T69A, F71Y)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWLQQKPGKSFKGLIYHG
ANLEDGVPSRFSGSGSGADYTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEI
K

25

SEQ ID NO: 47

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWLQQKPGKAPKGLIYHG
ANLEDGVPSRFSGSGSGADYTLTISLQPEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEI
K

30

SEQ ID NO: 48

hAb6VL5 (Graft IGKV1-16*01)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWFQQKPGKAPKSLIYHG
ANLEDGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEI
K

35

SEQ ID NO: 49

hAb100 VH1 (Q1E,R94S)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVS
YISSGSSTIHYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGR
SYNAVAYWGQGTTTVTVSS

SEQ ID NO: 50

hAb100 VH2 (Q1E, S49A, R94S)
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVAY
ISSGSSTIHYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGR
5 SYNNAVAYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 51

hAb100 VH3 (Q1E, S49A, R94S,Y98H)
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVAY
ISSGSSTIHYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYHYGR
10 SYNNAVAYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 52

hAb100 VH4 (Q1E, S49A, R94S, A100EG)
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVAY
ISSGSSTIHYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGR
15 SYNGVAYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 53

hAb100VH5 (Graft IGHV3-11*01)
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVSY
ISSGSSTIHYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPLYYYGR
20 SYNNAVAYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 54

hAb100 VL1(Graft IGKV1-27*01)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKVPKLLIYKA
SDLHTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGTKVEIK
25

SEQ ID NO: 55

hAb100 VL2 (V43I)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKIPKLLIYKA
SDLHTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGTKVEIK
30

SEQ ID NO: 56。

注：单划线部分为 CDR 区，双划线处为突变位点。

表 6. hAb100 抗体的 CDR 区的通式

名称	序列	序列号
HCDR1	DSGMH	SEQ ID NO: 22
HCDR2	YISSGSSTIHYADTVKG	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

其中，X₁ 为 Y 或 H；X₂ 为 A 或 G。

示例性的人源化抗体的重、轻链可变区组合如下：

表 7. mAb6 的人源化抗体

可变区	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

注：hAb6L1H1 表示该抗体包含重链可变区 hAb6VH1 和轻链可变区 hAb6VL1，且其重链恒定区的序列为 SEQ ID NO：28，轻链恒定区的序列为 SEQ ID NO：29，其他类推。

5

表 8. mAb100 的人源化抗体

可变区	VL1	VL2
VH1	hAb100L1H1	hAb100L2H1
VH2	hAb100L1H2	hAb100L2H2
VH3	hAb100L1H3	hAb100L2H3
VH4	hAb100L1H4	hAb100L2H4

注：hAb100L1H1 表示该抗体包含重链可变区 hAb100VH1 和轻链可变区 hAb100VL1，且其重链恒定区的序列为 SEQ ID NO：28，轻链恒定区的序列为 SEQ ID NO：29，其他类推。

分别克隆、表达、纯化上述抗体，经蛋白结合实验（测试例 1）、细胞结合实验（测试例 2）、Biacore（测试例 4），最终选出活性较好的人源化抗体。示例性的人源化抗体的重、轻链氨基酸序列如下：

Hu6（也称 hAb6L4H12）重链：
EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGIIN
PYSGVTIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYA
MDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN*
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVHLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
OPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

注：序列中下划线部分为可变区，斜体部分为恒定区。

SEQ ID NO: 58

Hu6（也称 hAb6L4H12）轻链：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCHASQGISGNMGWLQOKPGKAPKGLIYHGANL
EDGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKEIKRT
5 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

注：序列中下划线部分为可变区，斜体部分为恒定区。

SEQ ID NO: 59

Hu100（也称 hAb100L1H1）重链：

EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVSYISSG
SSTIHYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGRSYN
AVAYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
15 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

注：序列中下划线部分为可变区，斜体部分为恒定区。

SEQ ID NO: 60

Hu100（也称 hAb100L1H1）轻链：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCHASQNINVLWSWYQOKPGKVPKLLIYKASDL
HTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGTKEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
25 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

注：序列中下划线部分为可变区，斜体部分为恒定区。

SEQ ID NO: 61。

本披露中使用的阳性对照抗体为 BI-764532（参照 WO2019234220A1 构建），
阴性对照为 C25（其中 VH/VL 序列来自专利 US6114143A），其序列分别如下：

30 BI-764532 重链：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEWMVIIN
PGGGTTSYAQKFLGRVTMTRDSTNTVYMELKSLRSEDVAVYYCARGEAVTG
NYFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
35 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

注：序列中下划线部分为可变区，斜体部分为恒定区。

SEQ ID NO: 62

BI-764532 轻链：

DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLVWFQQKPGKAPKRLIYAVSSL
 5 YSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHDSYPYTFGQGKLEIKRTV
 AAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

注：序列中下划线部分为可变区，斜体部分为恒定区。

SEQ ID NO: 63

10 C25 重链：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNSWIGWFRQAPGQGLEWIGDIYP
 GGGYTNYN EIFK GKATMTADTSTNTAYMELSSLRSED TAVYYCSR GIPGYAMDY
 WGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
 15 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 64

20 C25 轻链：

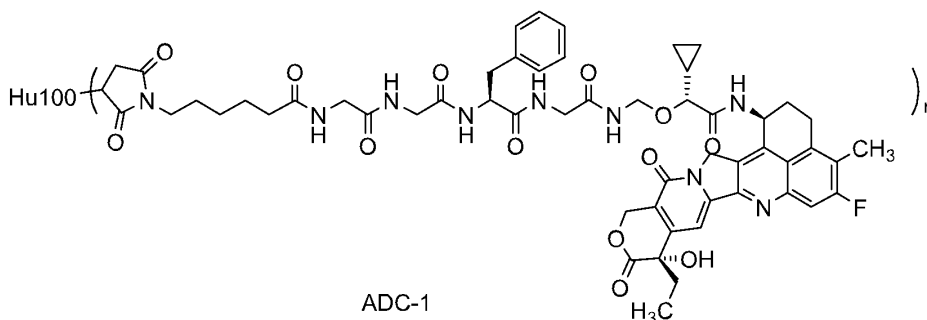
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMSCKSSQSLLNSGDQKNYLTWYQQKPGKAPKLLI
 YWASTGESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYCQNDYSYPWTFGQGTK
 VEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 25 ESVTEQDSKDSTYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 65。

注：序列中下划线部分为可变区，斜体部分为恒定区。

二、ADC 的制备

实施例 4. ADC-1 的制备



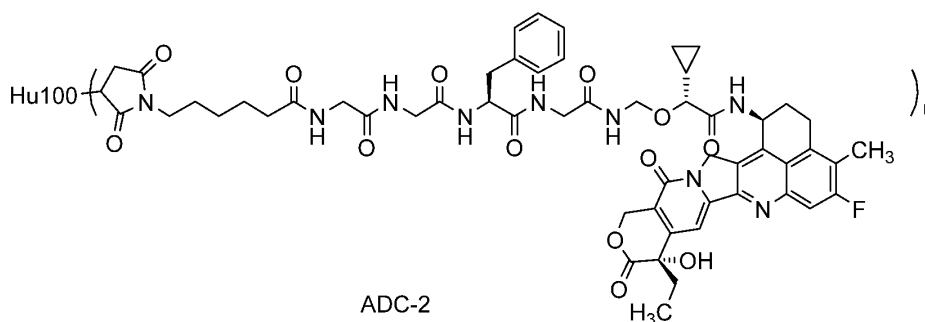
30 在 37 °C 条件下，向抗体 **Hu100** 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液；10.0 mg/mL，3mL，203 nmol) 加入配制好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP.HCl) 的水溶液 (10 mM，50.7μL，507 nmol)，置于水浴振荡器，于 37°C 下振

荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25℃。

将化合物 **9-A** (2.18mg, 2030 nmol, 参照专利申请 WO2020063676A1 中的实施例 9 制备)溶解于 150 μ L 二甲亚砜中，逐滴加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25℃下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到标题产物 **ADC-1** 的 PBS 缓冲液(1.61 mg/mL, 15.1 mL)，于 4℃冷冻储存。

RP-HPLC 计算平均值：n=4.43。

实施例 5. ADC-2 的制备



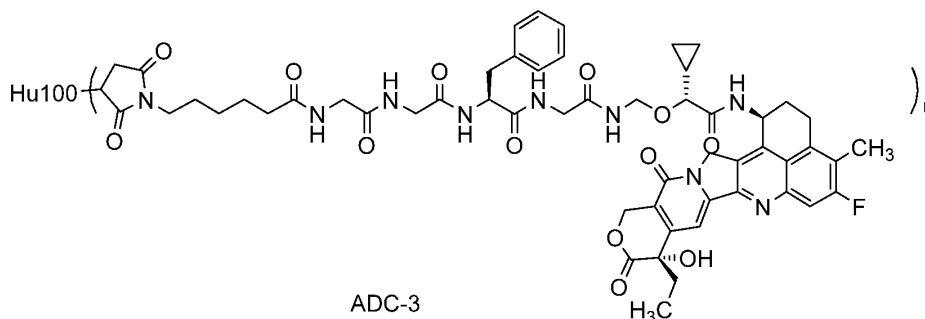
10

在 37 °C 条件下，向抗体 **Hu100** 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液；10.0 mg/mL, 3 mL, 203 nmol)加入配制好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP.HCl)的水溶液(10 mM, 121.7 μ L, 1217 nmol)，置于水浴振荡器，于 37℃下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25℃。

15 将化合物 **9-A** (3.27 mg, 3042 nmol)溶解于 150 μ L 二甲亚砜中，逐滴加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25℃下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到标题产物 **ADC-2** 的 PBS 缓冲液(1.42 mg/mL, 15.8 mL)，于 4℃冷冻储存。

20 RP-HPLC 计算平均值：n=7.32。

实施例 6. ADC-3 的制备



在 37 °C 条件下，向抗体 **Hu100** 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS

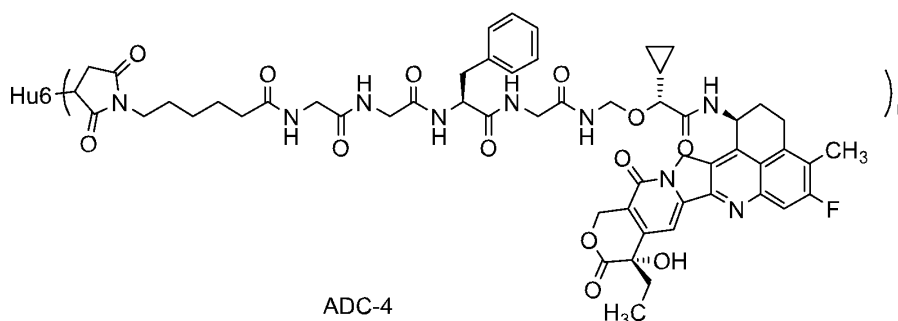
缓冲水溶液：10.0 mg/mL，6.5 mL，440 nmol)加入配制好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP.HCl)的水溶液(10 mM，159.4 μ L，1594 nmol)，置于水浴振荡器，于 37℃ 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25℃。

将化合物 **9-A** (5.66 mg，5265 nmol)溶解于 330 μ L 二甲亚砜中，逐滴加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25℃ 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到标题产物 **ADC-3** 的 PBS 缓冲液(2.72 mg/mL，19.2 mL)，于 4℃ 冷冻储存。

RP-HPLC 计算平均值：n=6.12。

10

实施例 7. ADC-4 的制备

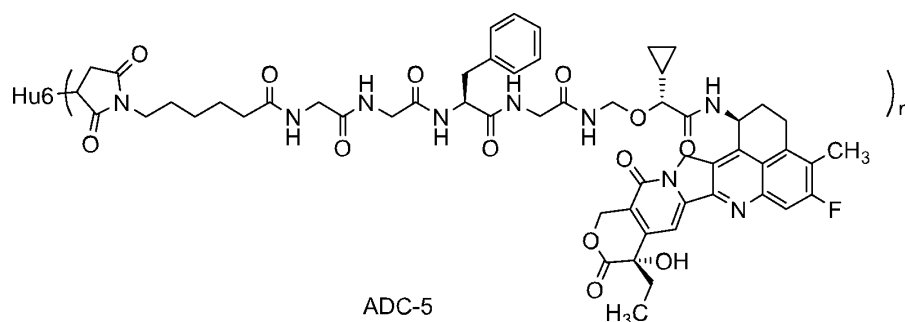


在 37 °C 条件下，向抗体 **Hu6** 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液：10.0 mg/mL，76 mL，5140 nmol)加入配制好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP.HCl)的水溶液(10 mM，1.14 mL，11.4 μ mol)，置于水浴振荡器，于 37℃ 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25℃。

将化合物 **9-A** (49.0mg，45.6 μ mol)溶解于 3.8 mL 二甲亚砜中，逐滴加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25℃ 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到标题产物 **ADC-4** 的 PBS 缓冲液(4.07 mg/mL，167 mL)，于 4℃ 冷冻储存。

RP-HPLC 计算平均值：n=3.53。

实施例 8. ADC-5 的制备

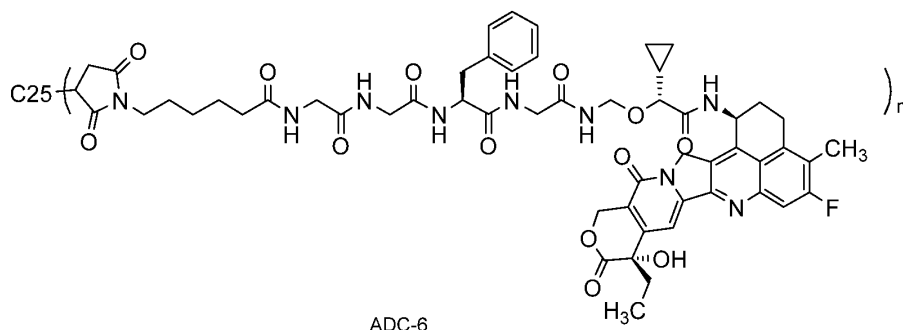


在 37 °C 条件下, 向抗体 **Hu6** 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 68 mL, 4595 nmol) 加入配制好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP.HCl) 的水溶液 (10 mM, 2.74 mL, 27.4 μ mol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 **9-A** (82.75 mg, 77.04 μ mol) 溶解于 3.4 mL 二甲亚砜中, 逐滴加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到标题产物 **ADC-5** 的 PBS 缓冲液 3.12 mg/mL, 174.1 mL), 于 4 °C 冷冻储存。

RP-HPLC 计算平均值: $n=7.43$ 。

实施例 9.ADC-6 的制备

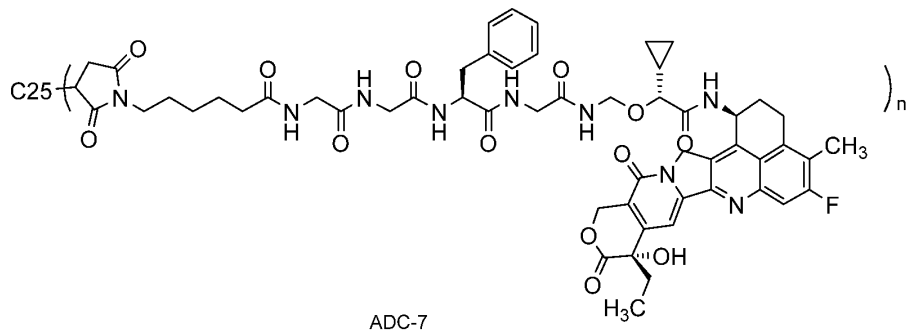


在 37 °C 条件下, 向抗体 **C25** 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液; 10.0 mg/mL, 1.6 mL, 108 nmol) 加入配制好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP.HCl) 的水溶液 (10 mM, 35.6 μ L, 356 nmol), 置于水浴振荡器, 于 37 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 **9-A** (1.39 mg, 1.294 μ mol) 溶解于 80 μ L 二甲亚砜中, 逐滴加入到上述反应液中, 置于水浴振荡器, 于 25 °C 下振荡反应 3 小时, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到标题产物 **ADC-6** 的 PBS 缓冲液 (1.06 mg/mL, 12.3 mL), 于 4 °C 冷冻储存。

RP-HPLC 计算平均值: $n=6.76$ 。

实施例 10.ADC-7 的制备



在 37 °C 条件下，向抗体 **C25** 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液；10.0 mg/mL，1.6 mL，108 nmol) 加入配制好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP.HCl) 的水溶液 (10 mM，64.8 μL，648 nmol)，置于水浴振荡器，于 37 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 **9-A** (1.74 mg，1.62 μmol) 溶解于 80 μL 二甲亚砜中，逐滴加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到标题产物 **ADC-7** 的 PBS 缓冲液 (1.03 mg/mL，11.9 mL)，于 4 °C 冷冻储存。

RP-HPLC 计算平均值：n=7.75。

ADC 原液药物载药量分析

ADC 是一种抗体-药物偶联物，其治疗疾病的机理是依赖抗体的靶向性将药物运送到细胞中，进而将细胞杀死或抑制细胞生长。药物的载药量对药效起着决定性的作用。

本披露采用 RP-HPLC 法分析药物载药量，过程基本如下：

试剂和仪器：

三氟乙酸 (TFA)：sigma 生产，100 mL/瓶；乙腈：LC 级，4 L/瓶，Thermo Fisher 生产；DTT：sigma 生产，1g/瓶。

高效液相色谱仪：Agilent 1200。

溶液配制：

1) 0.25M DTT 溶液：

配制示例：取 DTT 5.78 mg，加入 150 μL 纯化水充分溶解后，配得 0.25M DTT 溶液，-20°C 保存。

2) 流动相 A (0.1% TFA 水溶液)：

配制示例：量筒量取 1000 mL 纯化水，加入 1 mL TFA，充分混匀后使用，2-8°C 保存 14 天。

3) 流动相 B (0.1% TFA 乙腈溶液):

配制示例: 量筒量取 1000 mL 乙腈, 加入 1 mL TFA , 充分混匀后使用, 2-8℃ 保存 14 天。

裸抗体和供测试样品 (浓度为 1 mg/mL, 约 200μL), 加入 4 μ LDTT 还原, 37 度水浴 1 小时, 结束后取出到内插管中, 待进样使用。

色谱条件:

色谱柱: Agilent PLRP-S 1000A 8μm 4.6*250 mm; 柱温: 80℃;

DAD 检测器: 检测波长 280 nm; 样品室温度: 4℃; 流速: 1 mL/分;

进样量为: 40 μL;

10 色谱梯度见表 9-1:

表 9-1

时间 (分)	流动相 A %	流动相 B %
0	80.0	20.0
5.00	64.0	36.0
32.00	40.0	60.0
32.10	80.0	20.0
45.00	80.0	20.0

数据分析:

通过样品与裸抗体的谱图比对, 区分出轻重链的位置, 然后对检测样品的谱图进行积分, 计算出 DAR 值。 计算公式如下所示:

表 9-2

名称	连接药物数
LC	0
LC+1	2
HC	0
HC+1	2
HC+2	4
HC+3	6

LC 峰面积总和=LC 峰面积+LC+1 峰面积

HC 峰面积总和=HC 峰面积+HC+1 峰面积+ HC+2 峰面积+ HC+3 峰面积

LC DAR=Σ (连接药物数*峰面积百分比)/ LC 峰面积总和

20 HC DAR=Σ (连接药物数*峰面积百分比)/ HC 峰面积总和

DAR= LC DAR+ HC DAR

以下用生化测试方法验证本披露的抗体及ADC的活性。

测试例 1：ELISA 检测抗体的蛋白水平结合实验

将链酶亲和素(abcam, ab136200, 1μg/mL)包板, 100μL/孔, 4℃过夜。用 PBST 溶液(PBS 含 0.1%吐温 20)250μL/孔, 洗板 3 次。5%牛奶封闭, 250μL/孔, 37℃封闭 2 小时。用 PBST 溶液 250μL/孔, 洗板 3 次。加入生物素化的 DLL3 抗原(1μg/mL) (SEQ ID NO: 9), 37℃孵育 1 小时。使用 PBST 溶液 250μL/孔, 洗板 3 次。配制抗体 Hu6, Hu100(最高浓度 100 nM, 4 倍梯度稀释), 37℃孵育 1 小时。使用 PBST 溶液 250μL/孔, 洗板 6 次。加入工作浓度的 human IgG (H+L)-HRP (Jackson, 109-035-003, 1: 4000 稀释) 抗体, 100μL/孔, 37℃孵育 1 小时。使用 PBST 溶液 250μL/孔, 洗板 6 次。加入 TMB (KPL, 5120-0077)显色液 100μL/孔, 室温显色 5-10 分钟。加入 1M H₂SO₄, 100μL /孔, 中止显色, 酶标仪(Molecular Devices, VERSA max) 450nm 读数。

表 10. 抗体对蛋白的结合活性

抗体	E _{max} (OD 值)	EC ₅₀ (nM)
Hu100	2.05	0.05
Hu6	2.13	0.04

结果显示：抗体 Hu6 和 Hu100 均对 DLL3 具有优异的结合能力。

测试例 2：FACS 检测抗体细胞水平的结合实验

将表达 DLL3 的小细胞肺癌细胞系 H1184 (ATCC, 货号 CRL-5858)、DLL3/H82、cynoDLL3/CHO-s 和 RatDLL3/CHO-s 细胞用 FACS 缓冲液 (1%BSA + pH 7.4 PBS) 制备成 1×10⁶/mL 的细胞悬液, 100μL/孔加入 96 孔圆底板 (Corning, 3795) 中。300g 离心 5 分钟, 去除上清。加入不同浓度待测抗体, 100μL/孔。放于 4℃冰箱中避光孵育 1 小时。300g 离心洗涤 3 次后, 加入工作浓度的 APC 抗人 IgG Fc (BioLegend, 410712) 或者 PE F(ab')₂-羊抗人 IgG (invitrogen, H10104), 放于 4℃冰箱中避光孵育 40 分钟。300g 离心洗涤 3 次后, 在 Invitrogen 流式细胞仪上检测几何平均数荧光强度, 计算抗体对表达 DLL3 的细胞的结合 EC₅₀ 值。结果见表 11-1、表 11-2、表 11-3 和图 1A 至图 1C。

表 11-1. 抗体与细胞表达的 DLL3 的结合活性

细胞	H1184		cynoDLL3/CHO-s		RatDLL3/CHO-s	
抗体	E _{max}	EC ₅₀ (nM)	E _{max}	EC ₅₀ (nM)	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
Hu6	2073	0.06	1762	0.32	2112	1.42
Hu100	2112	0.15	2075	0.55	不结合	
BI-764532	1625	3.94	963	3.42	不结合	

表 11-2. 抗体与表达人 DLL3 的 DLL3/H82 细胞的结合活性

抗体	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
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

表 11-3. 抗体与 H1184 细胞的结合活性

抗体	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
M6CHI	3367	0.14
hAb6L2H2	2193	0.06
hAb6L4H4	2312	0.06
hAb6L2H5	2486	0.06
hAb6L2H6	2422	0.05
hAb6L2H7	2196	0.07
hAb6L2H6	1699	0.04
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

结果显示：本披露中的抗体均能与细胞表达的 DLL3 特异性结合，其中，Hu6 与表达不同种属的 DLL3 细胞均具有较高的结合能力。Hu100 对表达人和食蟹猴的 DLL3 的细胞均具有优异的结合能力，但 Hu100 不结合表达大鼠 DLL3 的细胞。BI-764532 仅与表达人和食蟹猴 DLL3 的细胞具有结合能力，且其结合活性比 Hu6 和 Hu100 弱。

10 **测试例 3：FACS 检测抗体对 DLL1 和 DLL4 细胞的结合实验**

将稳转人 DLL1/CHO-s 和人 DLL4/CHO-s 细胞用 FACS 缓冲液（包含 1%BSA 和 pH7.4 PBS）制备成 1×10⁶/mL 的细胞悬液，100μL/孔加入 96 孔圆底板（Corning, 3795）中。300g 离心 5 分钟，去除上清。加入待检测的抗体，100μL/孔，放于 4℃ 冰箱中避光孵育 1 小时。300g 离心洗涤 3 次后，加入工作浓度的 PE F(ab')₂-羊抗人 IgG Fc 二抗(invitrogen, H10104)，放于 4℃ 冰箱中避光孵育 40 分钟。300g 离心洗涤 3 次后，在 Invitrogen 流式细胞仪上检测几何平均数荧光强度。

结果显示：抗体 Hu6 和 Hu100 均不结合人 DLL1 和 DLL4。

测试例 4：Biacore 检测抗体亲和力实验

用 Protein A 生物传感芯片(Cat. # 29127556, Cytiva)亲和捕获待测抗体 18 秒，然后于芯片表面流经抗原人 DLL3（ACRO, DLL3-H52H4），猴 DLL3（KACTUS, DLL-RM103）和小鼠 DLL3（KACTUS, DLL-MM103）180 秒，然后解离 600 秒。

5 用 Biacore 8K(Cytiva)仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后，用 10 mM 甘氨酸-盐酸溶液（pH 1.5）(Cat. # BR-1003-54, Cytiva)将生物传感芯片洗净再生。数据拟合模型采用 1:1 Model。结果见表 12-1、表 12-2 和表 12-3。

表 12-1. 抗体亲和力

抗体 抗原	Hu6 KD (M)	Hu100 KD (M)
人 DLL3	5.94E-10	4.71E-10
猴 DLL3	1.31E-09	1.11E-09
小鼠 DLL3	6.52E-09	不结合

10

表 12-2. 抗体与人 DLL3 的亲和力

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	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

表 12-3. 抗体与人 DLL3 的亲和力

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	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

结果显示,mAb100 和 mAb6 的人源化抗体和嵌合抗体可特异性结合人 DLL3,且亲和力较高。其中抗体 Hu6 与人、猴和小鼠的 DLL3 均具有较高的亲和力;Hu100 与人和猴 DLL3 具有较高的亲和力,但不结合小鼠的 DLL3。

5

测试例 5：抗体的表位竞争结合实验

将 BI-764532 抗体(1μg/mL)包板, 100μL/孔, 4℃过夜。PBST 溶液 250μL/孔, 洗板 3 次。5%牛奶封闭, 250μL/孔, 37℃ 封闭 2 小时。PBST 溶液 250μL/孔, 洗板 3 次。加入生物素化的 DLL3-Strep(0.1μg/mL, SEQ ID NO: 9)。配制竞争抗体, 10 BI-764532、Hu6 和 Hu100 (最高浓度 100μg/mL, 4 倍梯度稀释), 37℃ 孵育 1 小时。PBST 溶液 250μL/孔,洗板 6 次。加入链霉亲和素-过氧化物酶(1:2000 稀释)(Jackson Immuno Research, 016-030-084), 100μL/孔, 37℃ 孵育 1 小时。PBST 溶液 250μL/孔, 洗板 6 次。加入 TMB(KPL, 5120-0077)显色液 100μL/孔, 室温显色 5-10min。加入 1M H₂SO₄, 100μL /孔, 中止显色, 酶标仪 450nm 读数。结果如图 2 所示。

15 结果显示, 抗体Hu6和Hu100与BI-764532之间不竞争, 说明抗体Hu6和Hu100与BI-764532结合的表位不同。

测试例 6：抗 DLL3 抗体的内吞活性检测

DT3C 是重组表达的融合蛋白, 由白喉毒素的片段 A (仅毒素部分) 和 G 群链球菌的 3C 片段 (IgG 结合部分) 融合而成, 该蛋白能够与抗体的 IgG 部分高度亲和, 在抗体被内吞时一同进入细胞, 在胞内弗林蛋白酶的作用下, 释放出具有毒性的 DT, DT 能够抑制 EF2-ADP 核糖基化的活性, 阻断蛋白翻译过程, 最终导致细胞死亡。而未进入细胞的 DT3C 则不具有杀伤细胞的活性。根据对细胞杀伤情况评价抗体的被细胞内吞的活性。

25 实验步骤

a. 用含 20% FBS 的新鲜细胞培养基 RPMI1640 (GE, SH30809.01) 制取 DMS53/DLL3 细胞悬液, 以 2000 个细胞/50μL/孔加入 96 孔细胞培养板中, 第 1

- 和 12 列不铺细胞只加入 50μL 的培养基，5%二氧化碳 37℃ 16 小时培养。
- b. 用无血清培养基配制成 4×浓度的 DT3C（9600nM，由上海磐超生物科技有限公司表达纯化）溶液，并使用 0.22μm 滤器过滤。用无血清培养基配制 4×浓度的抗体(1600nM)，将 80μL DT3C 溶液和 80μL 抗体溶液按照 1:1 的体积混匀，室
- 5 温下静置孵育 30 分钟。
- c. 用无血清培养基 5 倍梯度稀释该混合物，共 9 个浓度，第 10 个点为纯培养基。
- d. 取 50μL 稀释好的抗体加入细胞中，培养箱中孵育三天。
- e. 每孔加入 50μL CTG（CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay，
- 10 Promega，G7573），室温下避光孵育 10 分钟，Victor3 上读取化学发光。
- 结果见下表 13 和图 3。

表 13. 抗体的内吞引起的细胞杀伤

抗体	IC ₅₀ （nM）	Imax
Hu6	0.56	87.16
Hu100	1.47	86.13
BI-764532	3.27	86.51

结果显示：抗体 Hu6 和 Hu100 均可被细胞内吞。

15 **测试例 7：FACS 检测 ADC 的细胞水平的结合实验**

- 将表达 DLL3 的 hDLL3/CHO-s 和 cynoDLL3/CHO-s 细胞用 FACS 缓冲液（1%BSA + pH 7.4 PBS）制备成 1×10⁶/mL 的细胞悬液，100μL/孔加入 96 孔圆底板（Corning，3795）中。300g 离心 5 分钟，去除上清。加入不同浓度待测 ADC，100μL/孔。放于 4℃冰箱中避光孵育 1 小时。300g 离心洗涤 3 次后，加入工作浓度的
- 20 的 APC 抗人 IgG Fc (BioLegend，410712) 或者 PE F(ab')₂-羊抗人 IgG (invitrogen, H10104)，放于 4℃冰箱中避光孵育 40 分钟。300g 离心洗涤 3 次后，在 Invitrogen 流式细胞仪上检测几何平均数荧光强度，计算抗体对表达 DLL3 的细胞的结合 EC₅₀ 值。结果见表 14、图 4A 和图 4B。

表 14. 抗体与细胞表达的 DLL3 的结合活性

细胞	hDLL3/CHO-s		CynoDLL3/CHO-s	
	E _{max}	EC ₅₀ (nM)	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
ADC-1	472	0.34	697	0.47
ADC-2	468	0.40	686	0.47
ADC-3	464	0.34	679	0.45

- 25 结果显示：本披露中的 ADC 均能与细胞表达的人和猴 DLL3 特异性结合，其中随着 DAR 值增加，ADC 的结合基本无影响。

测试例 8：Biacore 检测 ADC 亲和力实验

用 Protein A 生物传感芯片(Cat. # 29127556，Cytiva)亲和捕获待测抗体 18 秒，

然后于芯片表面流经抗原人 DLL3 (ACRO, DLL3-H52H4) 和猴 DLL3 (KACTUS, DLL-RM103) 180 秒, 然后解离 600 秒。用 Biacore 8K(Cytiva)仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后, 用 10 mM 甘氨酸-盐酸溶液 (pH 1.5) (Cat. # BR-1003-54, Cytiva)将生物传感芯片洗净再生。数据拟合模型采用 1:1 Model。结果见表 15。

表 15. ADC 对不同种属 DLL3 的亲合力

ADC	抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
ADC-1	hDLL3	1.22E+06	3.49E-04	2.87E-10
	mac DLL3	2.88E+05	4.09E-04	1.42E-09
ADC-2	hDLL3	1.45E+06	2.96E-04	2.04E-10
	mac DLL3	2.92E+05	3.54E-04	1.21E-09
ADC-3	hDLL3	1.27E+06	3.42E-04	2.69E-10
	mac DLL3	2.43E+05	3.87E-04	1.60E-09

结果显示: 本披露中的 ADC 均能与人和猴 DLL3 蛋白特异性结合。其中随着 DAR 值增加, ADC 的结合基本无影响。

测试例 9: ADC 对不同 DLL3 表达水平细胞毒性实验

实验步骤如下:

- a. 用含 10% FBS 的新鲜细胞培养基制取细胞悬液, 以每孔 135μL 加入到 96 孔细胞培养板 (Corning, 3903) 中, 第 1 和第 12 列不铺细胞, 只加入 135μL 的培养基, 5%二氧化碳 37℃培养 16 小时。
- b. ADC 样品用 PBS 配制成首孔工作液(10×浓度), 以此为首浓度, 用 PBS 按相应的倍数进行梯度稀释。每孔加入 15μL 的 10×浓度 ADC 溶液, 5%二氧化碳 37℃培养 6 天。
- c. 每孔加入 70μL CTG (Promega, G7573), 室温下避光孵育 10 分钟, Victor3 上读取化学发光, 用 GraphPad Prism5 对数据处理, 以抗体或 ADC 浓度为 X 轴, 光强度值为 Y 轴作图。

不同细胞的铺板密度、首孔工作液浓度(10×浓度), 稀释倍数见表 16。

表 16. 细胞的铺板密度和首孔工作液浓度

细胞	培养基	每孔细胞数 (个)	浓度 (10×, nM)
H1184	RPMI1640+5%FBS	2000	2560
DMS53	RPMI1640+20%FBS+1× GlutaMAX	1000	6400
SK-MEL3	McCoy's 5A +15% FBS	1000	6400
CHO-K1	DMEM/F12(1:1)+10%FBS	500	6400

实验使用的细胞如下：
H1184 (+++)购于 ATCC，CRL-5858；
DMS53 (++)购于 ATCC，CRL-2062；
SK-MEL3 (+)购于 ATCC，HTB-69；
5 CHO-K1 (-)购于 ATCC，CCL-61。
其中“+”表示 DLL3 的表达量，“-”表示不表达 DLL3。
结果见表 17 和图 5A 至图 5D。

表 17. ADC 对不同 DLL3 表达量细胞的杀伤活性

ADC	H1184(+++)		DMS53(++)		SK-MEL3 (+)		CHO-K1	
	IC ₅₀ (nM)	Imax(%)	IC ₅₀ (nM)	Imax(%)	IC ₅₀ (nM)	Imax(%)	IC ₅₀ (nM)	Imax(%)
ADC-1	0.60	97.01	19.20	93.66	133.72	82.81	>600	11.13
ADC-2	0.16	97.97	11.06	95.03	33.68	87.81	>600	54.03
ADC-3	0.28	97.69	14.31	93.54	59.61	87.29	>600	25.43

结果显示，ADC-1，ADC-2 和 ADC-3 有较强的靶细胞杀伤活性，可杀伤表达
10 DLL3 的 SK-MEL3，DMS53 和 H1184，但对 DLL3 阴性的 CHO-K1 细胞无杀伤。

测试例 10：旁观杀伤活性实验

DMS53/DLL3high（稳转 DLL3 的 DMS53 细胞）和 U-2OS（ATCC，HTB-96）
细胞分别用 RPMI1640+20%FBS+1×Glutamax 和 McCoy's 5A+10%FBS 培养，细
15 胞用胰酶消化，新鲜培养基中和，1000rpm 离心 3 分钟。弃上清，细胞用
RPMI1640+20%FBS+1×Glutamax 重悬。细胞计数后，将 DMS53/DLL3high 细胞
密度调整为 9×10⁴个/mL，将 U-2OS 细胞密度调整为 3×10⁴个/mL。12 孔板对应孔
中每孔加入 500μL 的 DMS53/DLL3high 细胞和 500μL 的 U-2OS 细胞。12 孔板对
应孔中加入 500μL 的 U-2OS 细胞和 500μL 的 RPMI1640+20%FBS+1×Glutamax 培
20 养液。5%二氧化碳 37℃培养 24 小时。将样品配制成 40×浓度的中间溶液(200nM)。
各取 25μL ADC 样品加入到 12 孔板相应孔中。设置溶剂对照组。5%二氧化碳 37℃
培养 6 天。12 孔板中的细胞用胰酶消化，新鲜培养基中和，取 20μL 的细胞加入
20μL 的台盼蓝，计数。细胞 1000rpm 离心 3 分钟，弃上清。细胞用 100μL 的 FACS
缓冲液洗一遍，1500rpm 离心 3 分钟，弃上清。用 100μL 的 FACS 缓冲液重悬，
25 加入 2μg/mL 的抗 DLL3 的阳性抗体，冰上孵育 60 分钟。FACS 缓冲液洗 1 遍，
1500rpm 离心 3 分钟，加入二抗 APC anti-human IgG Fc（100x）孵育 30 分钟，FACS
缓冲液洗 1 遍。加入 200μLFACS 缓冲液重悬细胞，用 FACS 检测。用 FlowJo 对
流式数据进行分析得到 DMS53/DLL3high 比例并计算出 DMS53/DLL3high 及
U-2OS 的总数量。用 GraphPad Prism5 对数据作图，以不同样品为 X 轴，计算得

到的细胞数为 Y 轴作图，结果见图 6。

结果显示 ADC-1，ADC-2 和 ADC-3 具有明显的旁观者细胞毒性效应。

体内活性生物学评价

- 5 **测试例 11-1：DMS53 细胞 CDX 小鼠模型体内药效评价**
- 将人小细胞肺癌DMS53细胞（5×10⁶ 个，含50% matrigel/只；ATCC，CRL-2062）200μL/只，接种Balb/c右肋部皮下。接种7天后，待肿瘤体积在~220mm³后去除体重、肿瘤过大和过小的，按肿瘤体积将小鼠随机，每组8只，当天开始给药。通过腹腔注射ADC，剂量为1.5mg/kg，每周给药1次，共给药2次。第2次给药后停止给
- 10 药，继续观察肿瘤生长情况。每周测量2次瘤体积和体重，记录数据。使用Excel统计软件记录数据：平均值以avg计算；SD值以STDEV计算；SEM值以STDEV/SQRT（每组动物数）计算；采用GraphPad Prism软件作图，采用Two-way ANOVA或One-way ANOVA对数据进行统计学分析。
- 肿瘤体积（V）计算公式为： $V=1/2\times L_{长}\times L_{短}^2$
- 15 相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)=(T-T_0)/(C-C_0)\times 100\%$ ，其中 T、C 为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤体积；T₀、C₀为实验开始时的肿瘤体积。
- 抑瘤率 $TGI(\%)=1-T/C(\%)$ 。
- 结果见表 18 和图 7。

表 18. ADC 对荷瘤裸鼠 DMS53 移植瘤的疗效

ADC	剂量 (mg/kg)	第 16 天 TGI(%)	第 24 天 TGI(%)
ADC-1	1.5	122	92
ADC-2	1.5	155	124
	0.5	138	100
ADC-4	1.5	134	100
ADC-5	1.5	155	125
	0.5	133	92

- 20 结果显示在 1.5mpk 剂量下，ADC-1 和 ADC-4 均能显著抑制 DMS53 细胞皮下移植肿瘤的生长。在 0.5mpk 和 1.5mpk 剂量下，ADC-2 和 ADC-5 均能显著抑制 DMS53 细胞皮下移植肿瘤的生长。
- 25 **测试例 11-2：DMS53 细胞 CDX 小鼠模型体内药效评价**
- 将人小细胞肺癌DMS53细胞（5×10⁶ 个，含30% matrigel/只；ATCC，CRL-2062）200μL/只，接种Balb/c右肋部皮下。接种15天后，待肿瘤体积在~180mm³后去除体重、肿瘤过大和过小的，按肿瘤体积将小鼠随机，每组8只，当天开始给药。通过腹腔注射ADC，剂量为1.5mg/kg或0.5mg/kg，每周给药1次，共给药2次。第2次给药后停止给药，继续观察肿瘤生长情况。每周测量2次瘤体积和体重，记录数据。
- 30 使用Excel统计软件记录数据：平均值以avg计算；SD值以STDEV计算；SEM值以

STDEV/SQRT（每组动物数）计算；采用GraphPad Prism软件作图，采用Two-way ANOVA或One-way ANOVA对数据进行统计学分析。

肿瘤体积（V）计算公式为： $V=1/2\times L_{\text{长}}\times L_{\text{短}}^2$

相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)=(T-T_0)/(C-C_0)\times 100\%$ ，其中 T、C 为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤体积；T₀、C₀为实验开始时的肿瘤体积。

抑瘤率 $TGI(\%)=1- T/C(\%)$ 。

结果见表 19 和图 8。

表 19. ADC 对荷瘤裸鼠 DMS53 移植瘤的疗效

ADC	剂量 (mg/kg)	第 15 天 TGI(%)
ADC-1	1.5	70
ADC-3	1.5	103
	0.5	68

结果显示在 ADC-3 在 0.5mpk 和 1.5mpk 剂量下，ADC-1 在 1.5mpk 剂量下，均能显著抑制 DMS53 细胞皮下移植肿瘤的生长。

测试例 12：NCI-H1184 细胞 CDX 小鼠模型体内药效评价

将NCI-H1184细胞（6×10⁶个，含50%MatrixGel/只；ATCC，CRL-5858）200μL/只，接种于80只NDG小鼠右肋部皮下，接种13天后，待肿瘤体积平均在~185 mm³后去除体重、肿瘤过大和过小的，按肿瘤体积将小鼠随机分为7组，每组9只，当天开始给药，如表19所示。通过腹腔注射抗体，共21天。每周测2次瘤体积，称体重，记录数据。使用Excel统计软件记录数据：平均值以avg计算；SD值以STDEV计算；SEM值以STDEV/SQRT（每组动物数）计算；采用GraphPad Prism软件作图，采用Two-way ANOVA或One-way ANOVA对数据进行统计学分析。

肿瘤体积（V）计算公式为： $V=1/2\times L_{\text{长}}\times L_{\text{短}}^2$

相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)=(T-T_0)/(C-C_0)\times 100\%$ ，其中 T、C 为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤体积；T₀、C₀为实验开始时的肿瘤体积。

抑瘤率 $TGI(\%)=1- T/C(\%)$ 。

结果见表 20 和图 9。

表 20. ADC 对荷瘤裸鼠 H1184 移植瘤的疗效

ADC	剂量 (mg/kg)	第 21 天 TGI(%)
ADC-2	1.5	101
ADC-3	1.5	91
ADC-6	1.5	39
ADC-7	1.5	40

结果显示，ADC-2 和 ADC-3 均能显著抑制 NCI-H1184 肿瘤的生长。

测试例 13：大鼠 PK 研究

SD 大鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司）中研究 ADC 分子的单剂量药代动力学。

静脉注射 ADC 分子 3 mg/kg (n=4/组)，给药后 5 min、8 h、1d、2d、4d、7d、10d、14d、21d 和 28d，于大鼠眼底静脉取血。收集的血液样本在室温下置放半小时至凝集，然后 4℃ 下 1000g 离心 15 分钟，收集血清。进行生物分析测量采用 HTRF 的方法进行大鼠血清样品的测定，生物素标记 DLL3 捕捉单抗，生物素标记抗毒素抗体捕捉毒素。通过标准品的四参数模型曲线进行待测品含量的定量分析。药代参数使用 WinNonlin 软件（6.4）的标准非房室模型进行分析。实验结果如表 21 和图 10A 至图 10C。

表 21.ADC 分子的大鼠药代动力学

参数	ADC-1		ADC-2		ADC-3	
	总抗体	完整 ADC	总抗体	完整 ADC	总抗体	完整 ADC
T _{1/2} (天)	11.7 ± 0.6	8.4 ± 0.3	7.4 ± 1.2	7.2 ± 0.7	10.6 ± 1.4	7.5 ± 0.5
AUC 0-t (µg/mL*h)	6826	4904	5340	4618	6165	4475
C _{max} (µg/mL)	43	45.4	38.2	39.5	54.6	52
CL (mL/天/kg)	8.9	13.7	12.6	14.5	10	15

结果显示，ADC 分子在体内测定的总抗体和完整 ADC 的 AUC 相似，可见三个 ADC 分子的完整 ADC 结构均稳定。

测试例 14：猴 PK 研究

食蟹猴（苏州西山中科实验动物有限公司）中研究 ADC 分子的单剂量药代动力学。

静脉注射 ADC 分子 10 mg/kg (n=3/组)，给药后 5 min、8 h、1d、1.5d、2d、3d、4d、7d、10d、14d、21d 和 28d。收集的血液样本在室温下置放半小时至凝集，然后进行离心(4 ℃，2600 g，10 min)，取上层血清，立即放置-60℃ 贮存。收集血清进行生物分析测量采用 DELFIA 的方法进行血清样品的测定，通过标准品的四参数模型曲线进行待测品含量的定量分析。药代参数使用 WinNonlin 软件（6.4）的标准非房室模型进行分析。实验结果如表 22 和图 11。

表 22.ADC 分子的猴药代动力学

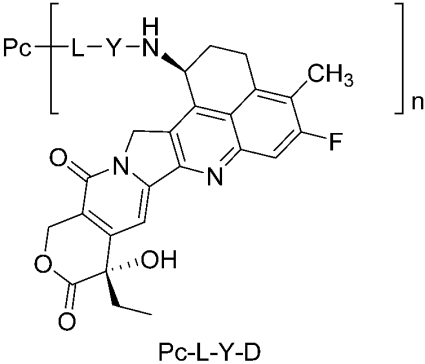
参数	总抗体	完整 ADC
T _{1/2} (天)	9.9 ± 1.1	8.5 ± 0.1

AUC 0-t (μg/mL*h)	27405	25702
Cmax (μg/mL)	294.81	304.94
CL (mL/天/kg)	7.88	8.59

结果显示，静脉给予食蟹猴 ADC-2 10mpk，总抗体和完整 ADC 的半衰期分别为 9.9±1.1 天、8.5±0.1 天；总抗体和完整 ADC 的 AUC 分别为 27405μg/mL*h，25702μg/mL*h。总抗体和完整 ADC 在食蟹猴体内的半衰期基本一致，完整 ADC 与总抗体的 AUC 比值为 94%，ADC-2 在食蟹猴体内稳定性较好。

权利要求书

1. 一种抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其具有如通式 Pc-L-Y-D 所示的结构：



5

其中：

Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

i) 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：57 的氨基酸序列；和

10

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：25 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：26 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：27 的氨基酸序列；

其中，SEQ ID NO：57 如 PLYX₁YGRSYNX₂VAY 所示，其中 X₁ 为 Y 或 H；X₂ 为 A 或 G；或

15

ii) 所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：18 的氨基酸序列；和

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列；

20

优选地，

所述重链可变区包含：HCDR1，其包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列；HCDR2，其包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列；和 HCDR3，其包含 SEQ ID NO：24、30 或 31 的氨基酸序列；和

25

所述轻链可变区包含：LCDR1，其包含 SEQ ID NO：25 的氨基酸序列；LCDR2，其包含 SEQ ID NO：26 的氨基酸序列；和 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：27 的氨基酸序列；

Y 为 -O-CR¹R²-C(O)-，其中，R¹ 为卤代 C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基；R² 选自氢原

子、卤代 C₁₋₆ 烷基和 C₃₋₆ 环烷基；或者，R¹ 和 R² 与其相连接的碳原子一起形成 C₃₋₆ 环烷基；

n 为 1 至 10；

L 为接头。

5

2. 根据权利要求 1 所述抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体；优选为人源化抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中
10 所述的抗 DLL3 抗体包含：

i) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 50、14、51、52、53 或 54 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；和/或

所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 55、15 或 56 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；或

15 ii) 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 43、12、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42 或 44 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；和/或

所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 48、13、45、46、47 或 49 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；

优选地，

20 i) 所述重链可变区包含选自 SEQ ID NO: 50、51、52、53 和 54 中的任一氨基酸序列，和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 55 或 56 的氨基酸序列；或

ii) 所述重链可变区包含选自 SEQ ID NO: 43、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42 和 44 中的任一氨基酸序列，和/或所述轻链可变区包含选自 SEQ ID NO: 48、45、46、47 和 49 中的任一氨基酸序列；或

25 iii) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列，和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列；或

iv) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列，和/或所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列；

更优选地，

30 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 50 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 55 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 43 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列。

35 4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗 DLL3 抗体是抗体片段；优选地，其中所述抗体片段为 Fab、Fab'、

F(ab')₂、Fab'-SH、Fd、Fv、scFv、dsFv、双抗体或结构域抗体。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链恒定区和轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 28 的氨基酸序列，和/或所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 5 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的抗 DLL3 抗体包含重链和轻链，其中：

10 所述重链包含与 SEQ ID NO: 60 具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链包含与 SEQ ID NO: 61 具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列；或

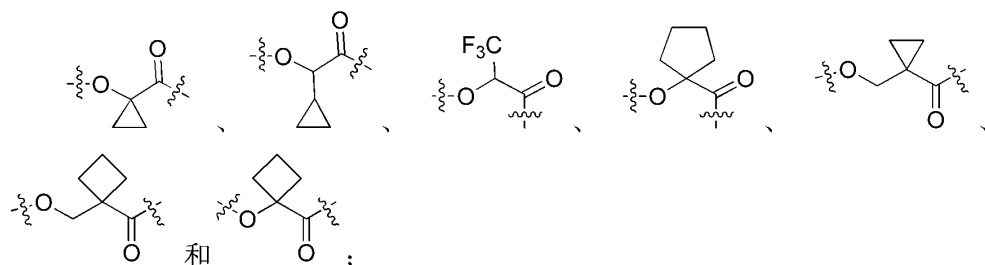
所述重链包含与 SEQ ID NO: 58 具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链包含与 SEQ ID NO: 59 具有至少 85% 序列同一性的氨基酸序列；

优选地，

15 所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列。

20 7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的 Y 选自：



其中 Y 的 O-端与 L 相连。

25 8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述的 L 为 -L¹-L²-L³-L⁴-，其中：

L¹ 选自 -(琥珀酰亚胺-3-基-N)-W-C(O)-、-CH₂-C(O)-NR³-W-C(O)- 和 -C(O)-W-C(O)-，其中 W 为 C₁₋₆ 亚烷基或 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基，其中所述的 C₁₋₆ 亚烷基或 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基各自独立地任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代；

L² 选自 -NR⁴(CH₂CH₂O)_pCH₂CH₂C(O)-、-NR⁴(CH₂CH₂O)_pCH₂C(O)- 和化学键，其中 p 为 1 至 20 的整数；

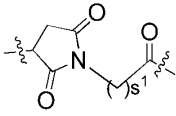
L^3 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基, 其中所述的氨基酸选自苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸, 并任选进一步被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代;

5 L^4 选自 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ 、 $-C(O)NR^5$ 、 $-C(O)NR^5(CH_2)_t-$ 和化学键, 其中 t 为 1 至 6 的整数;

R^3 、 R^4 和 R^5 相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

10 R^6 和 R^7 相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

优选地,

L^1 为 , s^1 为 2 至 8 的整数;

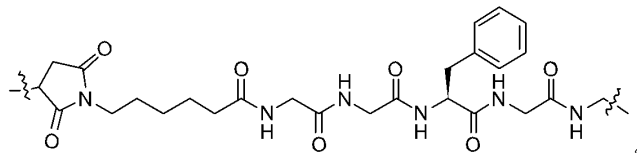
L^2 为化学键;

15 L^3 为四肽残基; 优选地, L^3 为包含甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸的四肽残基;

L^4 为 $-NH(CH_2)_t-$, t 为 1 或 2;

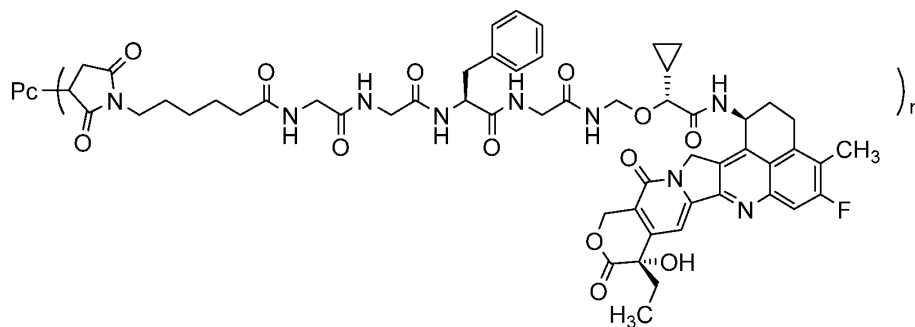
其中所述的 L^1 端与 Pc 相连;

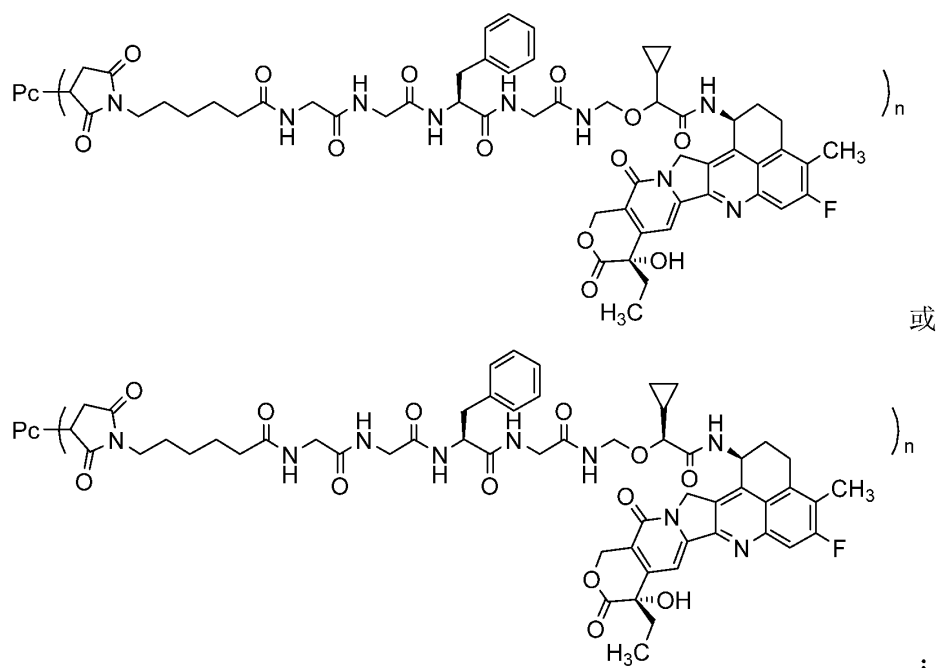
更优选地, 所述的 L 为以下结构所示:



20

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中所述的抗体-药物偶联物具有如下所示的结构:

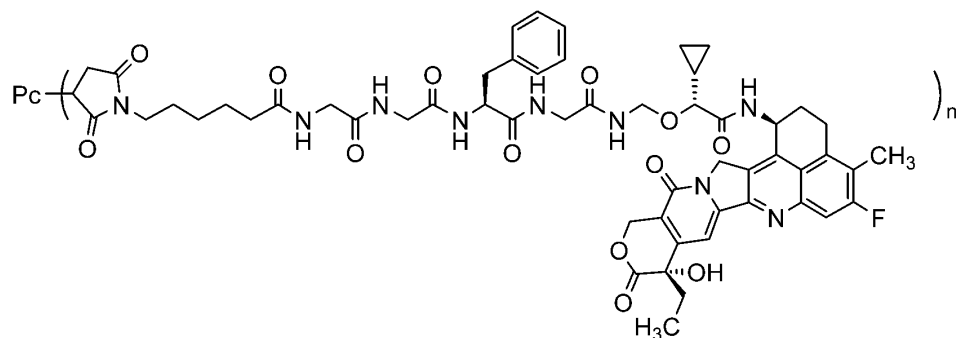




其中：

Pc 为如权利要求 1 所述的抗 DLL3 抗体；n 为 1 至 10；

5 优选地，所述抗体-药物偶联物具有如下所示的结构：



其中：

Pc 为抗 DLL3 抗体，其包含重链和轻链，其中：

所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO:

10 61 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO:

59 的氨基酸序列；

n 为 3 至 8；更优选地，n 为 6 至 8。

15 10. 一种药物组合物，其包含：

权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

11. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或权利要求 10 所述的药物组合物在制备用于治疗肿瘤或癌症的药物中的用途；优选地，其中所述肿瘤或癌症选自：

- 5 肺癌、头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、咽鳞癌、口腔鳞癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌、甲状腺髓样癌、恶性胸膜间皮瘤、乳腺癌、三阴性乳腺癌、肝癌、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结直肠癌、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、
- 10 睾丸癌、肾上腺癌、胶质母细胞瘤、皮肤癌和黑色素瘤；更优选地，其中所述肺癌为小细胞肺癌。