抗 DLL3 抗体及应用

本发明要求 2024 年 01 月 30 日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为 202410125989.2、发明名称为“抗 DLL3 抗体及应用”的在先申请的优先权。该件在先申请的全文通过引用的方式结合于本发明中。

技术领域

本发明属于生物医药领域，具体涉及一种抗 DLL3 抗体及其用途。

背景技术

小细胞肺癌（small cell lung cancer, SCLC）是一种高侵袭性的神经内分泌恶性肿瘤，约占所有肺癌的 15%。很多病人一旦确诊，就已进入广泛期。虽然小细胞肺癌对放化疗敏感，但极易复发。依托泊苷联合卡铂或顺铂长期作为广泛期 SCLC 患者的标准一线治疗方案，其中局限期 SCLC 一线治疗的反应率为 70%-90%，广泛期 SCLC 的反应率为 50%-60%。SCLC 在一线治疗 1 年内，约有 80%的局限期患者和几乎全部的广泛期患者复发或进展，存在巨大的临床未满足。研究发现，DLL3 在超过 80%的小细胞肺癌（SCLC）患者中高表达，且 SCLC 中 DLL3 的高表达与患者的生存期呈现负相关，即 DLL3 表达量越高，患者的生存期越低。

DLL3(Delta-Like Ligand 3，DLL3)是由 619 个氨基酸组成的单次跨膜蛋白，完整结构包含 1 个 DSL 结构域、1 个胞内结构域以及 6 个表皮生长因子样结构域。该靶点在正常组织中几乎不表达，然而，特异性地在神经内分泌肿瘤中大量表达，因此 DLL3 有希望成为治疗肺癌的一个有潜力的靶点。目前有多个靶向 DLL3 靶点的药物正在开发，主要有双特异抗体、细胞治疗和 ADC 药物。如安进的 AMG 757（专利号：US2017037130A1）双特异性抗体，目前进行临床 3 期实验中，在提高中位 DOR、中位 OS 和安全性方面结果具有一定优势。Rovalpituzumab tesirine (Rova-T，专利号：US9770518B1)是艾伯维开发的第一个靶向 DLL3 靶点的 ADC 药物，也是 SCLC 在临床研究的第一个靶向治疗药物，但该药在临床 3 期研究中，因细胞毒活性药物 PBD 毒副作用太大，患者不可耐受，进而导致有效性不足，目前已终止。

为了给患者提供更多元化的治疗方案，满足患者更多样化的治疗需求，本发明获得了具有更高亲和力的 DLL3 的抗体，并且相对于 Rova-T，本发明的抗体-药物缀合物具有可更大程度上的体内外杀死肿瘤细胞的能力。

发明内容

第一方面，本发明提供了抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，包括重链可变区，所述重链可变区包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中：

（1）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.25 所示序列或与 SEQ ID NO.25 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.26 所示序列或与 SEQ ID NO.26 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.27 所示序列或与 SEQ ID NO.27 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.1 所示序列或与 SEQ ID NO.1 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.2 所示序列或与 SEQ ID NO.2 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.3 所示序列或与 SEQ ID NO.3 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.9 所示序列或与 SEQ ID NO.9 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.10 所示序列或与 SEQ ID NO.10 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.11 所示序列或与 SEQ ID NO.11 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（4）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.17 所示序列或与 SEQ ID NO.17 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.18 所示序列或与 SEQ ID NO.18 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.19 所示序列或与 SEQ ID NO.19 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或

（5）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.33 所示序列或与 SEQ ID NO.33 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.34 所示序列或与 SEQ ID NO.34 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.35 所示序列或与 SEQ ID NO.35 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

第二方面，本发明提供了抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，包括轻链可变区，所述轻链

可变区包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中：

（1）LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.28 所示序列或与 SEQ ID NO.28 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.29 所示序列或与 SEQ ID NO.29 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.30 所示序列或与 SEQ ID NO.30 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.4 所示序列或与 SEQ ID NO.4 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.5 所示序列或与 SEQ ID NO.5 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.6 所示序列或与 SEQ ID NO.6 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.12 所示序列或与 SEQ ID NO.12 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.13 所示序列或与 SEQ ID NO.13 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.14 所示序列或与 SEQ ID NO.14 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（4）LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.20 所示序列或与 SEQ ID NO.20 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.21 所示序列或与 SEQ ID NO.21 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.22 所示序列或与 SEQ ID NO.22 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或

（5）LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.36 所示序列或与 SEQ ID NO.36 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.37 所示序列或与 SEQ ID NO.37 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.38 所示序列或与 SEQ ID NO.38 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

第三方面，本发明提供了抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中：

（1）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.25 所示序列或与 SEQ ID NO.25 所示序列具有至少

80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR2的序列为SEQ ID NO.26所示序列或与SEQ ID NO.26所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR3的序列为SEQ ID NO.27所示序列或与SEQ ID NO.27所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，LCDR1的序列为SEQ ID NO.28所示序列或与SEQ ID NO.28所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，LCDR2的序列为SEQ ID NO.29所示序列或与SEQ ID NO.29所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性序列，和LCDR3的序列为SEQ ID NO.30所示序列或与SEQ ID NO.30所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列；

（2）HCDR1的序列为SEQ ID NO.1所示序列或与SEQ ID NO.1所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR2的序列为SEQ ID NO.2所示序列或与SEQ ID NO.2所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，和HCDR3的序列为SEQ ID NO.3所示序列或与SEQ ID NO.3所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，LCDR1的序列为SEQ ID NO.4所示序列或与SEQ ID NO.4所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，LCDR2的序列为SEQ ID NO.5所示序列或与SEQ ID NO.5所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性序列，和LCDR3的序列为SEQ ID NO.6所示序列或与SEQ ID NO.6所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列；

（3）HCDR1的序列为SEQ ID NO.9所示序列或与SEQ ID NO.9所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR2的序列为SEQ ID NO.10所示序列或与SEQ ID NO.10所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，和HCDR3的序列为SEQ ID NO.11所示序列或与SEQ ID NO.11所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，LCDR1的序列为SEQ ID NO.12所示序列或与SEQ ID NO.12所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，LCDR2的序列为SEQ ID NO.13所示序列或与SEQ ID NO.13所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性序列，和LCDR3的序列为SEQ ID NO.14所示序列或与SEQ ID NO.14所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列；

（4）HCDR1的序列为SEQ ID NO.17所示序列或与SEQ ID NO.17所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR2的序列为SEQ ID NO.18所示序列或与SEQ ID NO.18所示序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，和HCDR3的序列为SEQ ID NO.19所示序列或与SEQ ID NO.19所示序列具有至少80%、85%、

90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.20 所示序列或与 SEQ ID NO.20 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.21 所示序列或与 SEQ ID NO.21 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.22 所示序列或与 SEQ ID NO.22 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或

（5）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.33 所示序列或与 SEQ ID NO.33 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.34 所示序列或与 SEQ ID NO.34 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.35 所示序列或与 SEQ ID NO.35 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.36 所示序列或与 SEQ ID NO.36 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.37 所示序列或与 SEQ ID NO.37 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.38 所示序列或与 SEQ ID NO.38 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

本发明中，CDR 序列根据 Kabat 定义。

本发明所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，为鼠源、嵌合、人源化或全人抗体或抗原结合片段，优选地，本发明所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或抗原结合片段。

第四方面，本发明提供了抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区，其中：

（1）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.59 所示序列或与 SEQ ID NO.59 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.7 所示序列或与 SEQ ID NO.7 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.15 所示序列或与 SEQ ID NO.15 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（4）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.23 所示序列或与 SEQ ID NO.23 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（5）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.31 所示序列或与 SEQ ID NO.31 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（6）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.39 所示序列或与 SEQ ID NO.39 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（7）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.54 所示序列或与 SEQ ID NO.54 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或

（8）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.56 所示序列或与 SEQ ID NO.56 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

第五方面，本发明提供了抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包括轻链可变区，其中：

（1）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.59 所示序列或与 SEQ ID NO.59 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.8 所示序列或与 SEQ ID NO.8 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.16 所示序列或与 SEQ ID NO.16 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（4）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.24 所示序列或与 SEQ ID NO.24 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（5）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.32 所示序列或与 SEQ ID NO.32 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（6）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.40 所示序列或与 SEQ ID NO.40 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（7）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.55 所示序列或与 SEQ ID NO.55 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或

（8）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.57 所示序列或与 SEQ ID NO.57 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

第六方面，本发明提供了抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，其中：

（1）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.58 所示序列或与 SEQ ID NO.58 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.59 所示序列或与 SEQ ID NO.59 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.7 所示序列或与 SEQ ID NO.7 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.8 所示序列或与 SEQ ID NO.8 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.15 所示序列或与 SEQ ID NO.15 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.16 所示序列或与 SEQ ID NO.16 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（4）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.23 所示序列或与 SEQ ID NO.23 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.24 所示序列或与 SEQ ID NO.24 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（5）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.31 所示序列或与 SEQ ID NO.31 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.32 所示序列或与 SEQ ID NO.32 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（6）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.39 所示序列或与 SEQ ID NO.39 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.40 所示序列或与 SEQ ID NO.40 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（7）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.54 所示序列或与 SEQ ID NO.54 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.55 所示序列或与 SEQ ID NO.55 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或

（8）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.56 所示序列或与 SEQ ID NO.56 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.57 所示序列或与 SEQ ID NO.57 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段特异性结合人 DLL3。在一些具体实施方案中，抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段与来自不同物种的 DLL3 间

(例如人和食蟹猴 DLL3 间)保守的 DLL3 蛋白表位结合。

本发明中，所述抗原结合片段为 Fv、VHH、scFv、Fab、Fab’或（Fab’）2。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段具有 ADCC 活性。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段具有 CDC 活性。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段具有 ADCP 活性。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体为全长抗体。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体为单克隆抗体。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体为 IgM、IgD、IgG、IgA 或 IgE 型抗体。在一些具体实施方案中，抗 DLL3 抗体为 IgG 抗体。在一些更具体的实施方案中，抗 DLL3 抗体为 IgG1 抗体。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体为 IgG1、IgG2 或 IgG4 同种型的。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体包含 κ 亚型或者 λ 亚型的轻链恒定区。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体包含人 IgG1 重链恒定区和人 κ 轻链恒定区。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体包含野生型 Fc 区。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段经过工程化改造具有增强的 ADCC、CDC 和/或 ADCP 活性。在一些具体实施方案中，抗 DLL3 抗体包含经过工程改造的 Fc 区，所述经过工程改造的 Fc 区使得所述抗体具有增强的 ADCC、CDC 和/或 ADCP 效应。

在第一至第六方面的一些实施方案中，抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段经过工程化改造具有减弱的 ADCC、CDC 和/或 ADCP 活性。在一些具体实施方案中，抗 DLL3 抗体包含经过工程改造的 Fc 区，所述经过工程改造的 Fc 区使得所述抗体具有减弱的 ADCC、CDC 和/或 ADCP 效应。针对本发明针对的靶点 DLL3 以及抗体的体内应用，具有减弱的、甚至消除的 ADCC、CDC 和/或 ADCP 活性的抗体可能是有利的，因为过强的 Fc 效应可能会影响甚至消弱抗体的疗效。减弱或者消除 Fc 效应的方式是本领域中已知的，例如，1）氨基酸残基突变改造（主要减弱对相关受体的结合），2）糖基化改造，3）IgG4 型抗体改造等。

本发明中，作为非限制性实例，所述抗 DLL3 抗体的 Fc 区可包含降低 ADCC、CDC 和/或 ADCP 效应的氨基酸突变。

第七方面，本发明提供了分离的核酸分子，其编码第一方面至第六方面所述的抗 DLL3

抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，本发明提供了分离的多核苷酸的组合，所述组合包括编码本发明抗体或其抗原结合片段的轻链的多核苷酸和编码本发明抗体或其抗原结合片段的重链的多核苷酸。在一些实施方案中，所述多核苷酸可操作地连接到调控序列，调控序列可以被用所述载体转化过的宿主细胞识别。

第八方面，本发明提供了载体，其含有第七方面所述的核酸分子。

在一些实施方案中，本发明的表达载体包含本发明所述的核酸分子或者本发明所述的多核苷酸的组合，所述多核苷酸与允许其所编码的多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达的调节序列有效连接。表达载体的选择取决于宿主细胞的选择，并且可以选择以便在所选宿主细胞中具有所需的表达和调控特征。

载体中的核酸可以与一个或多个表达控制序列可操作地连接。如本文所用，“可操作地连接”意指并入遗传构建体中，使得表达控制序列有效地控制目标编码序列的表达。表达控制序列的示例包括启动子、增强子和转录终止区。启动子是由 DNA 分子的通常在转录起始点上游 100 个核苷酸内(通常在 RNA 聚合酶 II 的起始位点附近)的区域组成的表达控制序列。为了使编码序列处于启动子的控制下，必须将多肽翻译阅读框的翻译起始位点定位在启动子下游的 1 至约 50 个核苷酸之间。增强子在时间、位置和水平方面提供表达特异性。与启动子不同，增强子可以在位于距转录位点的不同距离时起作用。增强子也可位于转录起始位点的下游。当 RNA 聚合酶能够将编码序列转录成 mRNA，然后 mRNA 可以翻译成由编码序列所编码的蛋白质时，编码序列与细胞中的表达控制序列“可操作地连接”且处于表达控制序列的“控制下”。

合适的表达载体包括但不限于源自例如噬菌体、杆状病毒、烟草花叶病毒、疱疹病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、痘苗病毒、腺病毒和腺相关病毒的质粒和病毒载体。许多载体和表达系统可从诸如 Novagen(Madison,WI)、Clontech(Palo Alto,CA)、Stratagene(LaJolla,CA)和 Invitrogen Life Technologies(Carlsbad,CA)等公司商购获得。

表达载体可包括标签序列。标签序列通常表达为与编码的多肽的融合体。此类标签可以插入多肽内的任何位置，包括羧基或氨基末端。有用标签的示例包括但不限于 Fc 片段、聚组氨酸、绿色荧光蛋白(GFP)、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、c-myc、血凝素、FlagTM 标签(Kodak,NewHaven,CT)、麦芽糖 E 结合蛋白和蛋白 A。在一些实施方案中，编码 DLL3 融合多肽的核酸分子存在于含有编码 Ig 重链恒定区的一个或多个结构域的核酸的载体中，所述结构域例如，对应与人免疫球蛋白 Cγ1 链的铰链区、CH 2 区和 CH3 区的氨基酸序列（Fc 片段）。

第九方面，本发明提供了宿主细胞，其含有第七方面所述的核酸分子或第八方面所述的载体。

在一些实施方案中，宿主细胞可以为原核宿主细胞、真核宿主细胞或噬菌体。原核宿主细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。真核宿主细胞可以为如巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌，如草地粘虫等昆虫细胞，如烟草等植物细胞，如 BHK 细胞、CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施方案中，宿主细胞优选为哺乳动物细胞，更优选为 BHK 细胞、CHO 细胞、NSO 细胞或 COS 细胞。

第十方面，本发明提供了具有第一抗原结合位点以及第二抗原结合位点的双特异性抗体，其中一个抗原结合位点包含第一方面至第六方面所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段；优选地，所述双特异性抗体的第一抗原结合位点包含第一方面至第六方面所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，第二抗原结合位点包含第一方面至第六方面所述的另一种抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段；更优选地，所述双特异性抗体的第一抗原结合位点和第二抗原结合位点结合同一抗原的不同表位。

优选地，本发明的双特异性抗体为 IgG 样双特异性抗体，其中左臂为第一抗原结合位点，右臂为第二抗原结合位点。

优选地，本发明的双特异性抗体第一抗原结合位点包含第一重链和第一轻链；第二抗原结合位点包含第二重链和第二轻链。

第十一方面，本发明提供了一种双特异性抗体，其中，

（1）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1 序列为 SEQ ID NO.25 所示序列或与 SEQ ID NO.25 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 序列为 SEQ ID NO.26 所示序列或与 SEQ ID NO.26 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR3 序列为 SEQ ID NO.27 所示序列或与 SEQ ID NO.27 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1 序列为 SEQ ID NO.28 所示序列或与 SEQ ID NO.28 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 序列为 SEQ ID NO.29 所示序列或与 SEQ ID NO.29 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 LCDR3 序列为 SEQ ID NO.30 所示序列或与 SEQ ID NO.30 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；所述第二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1 序列为 SEQ ID NO.17 所示序列或与 SEQ ID NO.17 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 序列为 SEQ ID NO.18 所示序列或与 SEQ ID NO.18 所示序列具有 85%、90%、

95%、98%或99%同一性的序列，HCDR3序列为SEQ ID NO.19所示序列或与SEQ ID NO.19所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1序列为SEQ ID NO.20所示序列或与SEQ ID NO.20所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，LCDR2序列为SEQ ID NO.21所示序列或与SEQ ID NO.21所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，和LCDR3序列为SEQ ID NO.22所示序列或与SEQ ID NO.22所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列；

（2）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1序列为SEQ ID NO.25所示序列或与SEQ ID NO.25所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR2序列为SEQ ID NO.26所示序列或与SEQ ID NO.26所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR3序列为SEQ ID NO.27所示序列或与SEQ ID NO.27所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1序列为SEQ ID NO.28所示序列或与SEQ ID NO.28所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，LCDR2序列为SEQ ID NO.29所示序列或与SEQ ID NO.29所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，和LCDR3序列为SEQ ID NO.30所示序列或与SEQ ID NO.30所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列；所述第二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1序列为SEQ ID NO.1所示序列或与SEQ ID NO.1所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR2序列为SEQ ID NO.2所示序列或与SEQ ID NO.2所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR3序列为SEQ ID NO.3所示序列或与SEQ ID NO.3所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1序列为SEQ ID NO.4所示序列或与SEQ ID NO.4所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，LCDR2序列为SEQ ID NO.5所示序列或与SEQ ID NO.5所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，和LCDR3序列为SEQ ID NO.6所示序列或与SEQ ID NO.6所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列；或

（3）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1序列为SEQ ID NO.17所示序列或与SEQ ID NO.17所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR2序列为SEQ ID NO.18所示序列或与SEQ ID NO.18所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR3序列为SEQ ID NO.19所示序列或与SEQ ID NO.19所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1序列为SEQ ID NO.20所示序列或与SEQ ID NO.20所示序列具有85%、90%、95%、

98%或99%同一性的序列，LCDR2序列为SEQ ID NO.21所示序列或与SEQ ID NO.21所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，和LCDR3序列为SEQ ID NO.22所示序列或与SEQ ID NO.22所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列；所述第二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1序列为SEQ ID NO.1所示序列或与SEQ ID NO.1所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR2序列为SEQ ID NO.2所示序列或与SEQ ID NO.2所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，HCDR3序列为SEQ ID NO.3所示序列或与SEQ ID NO.3所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1序列为SEQ ID NO.4所示序列或与SEQ ID NO.4所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，LCDR2序列为SEQ ID NO.5所示序列或与SEQ ID NO.5所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，和LCDR3序列为SEQ ID NO.6所示序列或与SEQ ID NO.6所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列。

进一步地，本发明提供了一种双特异性抗体，其中，

（1）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区序列为SEQ ID NO.31所示序列或与SEQ ID NO.31所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，轻链可变区序列为SEQ ID NO.32所示序列或与SEQ ID NO.32所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列；所述第二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区序列为SEQ ID NO.23所示序列或与SEQ ID NO.23所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，轻链可变区序列为SEQ ID NO.24所示序列或与SEQ ID NO.24所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列；

（2）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区序列为SEQ ID NO.31所示序列或与SEQ ID NO.31所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，轻链可变区序列为SEQ ID NO.32所示序列或与SEQ ID NO.32所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列；所述第二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区序列为SEQ ID NO.7所示序列或与SEQ ID NO.7所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，轻链可变区序列为SEQ ID NO.8所示序列或与SEQ ID NO.8所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列；

（3）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区序列为SEQ ID NO.23所示序列或与SEQ ID NO.23所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，轻链可变区序列为SEQ ID NO.24所示序列或与SEQ ID NO.24所示序列具有85%、90%、

95%、98%或 99%同一性的序列；所述第二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区序列为 SEQ ID NO.7 所示序列或与 SEQ ID NO.7 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区序列为 SEQ ID NO.8 所示序列或与 SEQ ID NO.8 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

本发明中，所述双特异性抗体还包括恒定区序列。

本发明中，所述双特异性抗体为 IgG1 抗体。

优选地，本发明中所述的双特异性抗体在第一重链和第一轻链之间或第二重链和第二轻链之间携带 CH1-CL 链交换。

优选地，本发明中所述的双特异性抗体的 Fc 区包含降低 ADCC、CDC 和/或 ADCP 效应的氨基酸突变。

进一步优选地，本发明中所述的双特异性抗体的 Fc 区包含位于 CH3 区便于所述双特异性抗体纯化的形成杵和/或臼的氨基酸突变；进一步优选地，形成臼的突变为 Y349C, T366S, L368A 和 Y407V，形成杵的突变为 S354C、T366W。

进一步优选地，本发明提供了一种双特异性抗体，其中，

（1）所述双特异性抗体包括 2 条重链和 2 条轻链，其中重链 1 氨基酸序列如 SEQ ID NO.41 所示，重链 2 氨基酸序列如 SEQ ID NO.43 所示，轻链 1 氨基酸序列如 SEQ ID NO.46 所示，轻链 2 氨基酸序列如 SEQ ID NO.48 所示；

（2）所述双特异性抗体包括 2 条重链和 2 条轻链，其中重链 1 氨基酸序列如 SEQ ID NO.41 所示，重链 2 氨基酸序列如 SEQ ID NO.50 所示，轻链 1 氨基酸序列如 SEQ ID NO.46 所示，轻链 2 氨基酸序列如 SEQ ID NO.51 所示；

（3）所述双特异性抗体包括 2 条重链和 2 条轻链，其中重链 1 氨基酸序列如 SEQ ID NO.52 所示，重链 2 氨基酸序列如 SEQ ID NO.50 所示，轻链 1 氨基酸序列如 SEQ ID NO.53 所示，轻链 2 氨基酸序列如 SEQ ID NO.51 所示。

第十二方面，本发明提供了编码前述的双特异性抗体的核酸分子。

在一些实施方案中，本发明提供了分离的多核苷酸的组合，所述组合包括编码本发明抗体或其抗原结合片段的轻链的多核苷酸和编码本发明抗体或其抗原结合片段的重链的多核苷酸。在一些实施方案中，所述多核苷酸可操作地连接到调控序列，调控序列可以被用所述载体转化过的宿主细胞识别。

第十三方面，本发明提供了包含第十二方面所述的核酸分子的表达载体。

在一些实施方案中，本发明的表达载体包含本发明所述的核酸分子或者本发明所述的多

核苷酸的组合，所述多核苷酸与允许其所编码的多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达的调节序列有效连接。表达载体的选择取决于宿主细胞的选择，并且可以选择以便在所选宿主细胞中具有所需的表达和调控特征。

载体中的核酸可以与一个或多个表达控制序列可操作地连接。如本文所用，“可操作地连接”意指并入遗传构建体中，使得表达控制序列有效地控制目标编码序列的表达。表达控制序列的示例包括启动子、增强子和转录终止区。启动子是由 DNA 分子的通常在转录起始点上游 100 个核苷酸内(通常在 RNA 聚合酶 II 的起始位点附近)的区域组成的表达控制序列。为了使编码序列处于启动子的控制下，必须将多肽翻译阅读框的翻译起始位点定位在启动子下游的 1 至约 50 个核苷酸之间。增强子在时间、位置和水平方面提供表达特异性。与启动子不同，增强子可以在位于距转录位点的不同距离时起作用。增强子也可位于转录起始位点的下游。当 RNA 聚合酶能够将编码序列转录成 mRNA，然后 mRNA 可以翻译成由编码序列所编码的蛋白质时，编码序列与细胞中的表达控制序列“可操作地连接”且处于表达控制序列的“控制下”。

合适的表达载体包括但不限于源自例如噬菌体、杆状病毒、烟草花叶病毒、疱疹病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、痘苗病毒、腺病毒和腺相关病毒的质粒和病毒载体。许多载体和表达系统可从诸如 Novagen(Madison,WI)、Clontech(Palo Alto,CA)、Stratagene(LaJolla,CA)和 Invitrogen Life Technologies(Carlsbad,CA)等公司商购获得。

表达载体可包括标签序列。标签序列通常表达为与编码的多肽的融合体。此类标签可以插入多肽内的任何位置，包括羧基或氨基末端。有用标签的示例包括但不限于 Fc 片段、聚组氨酸、绿色荧光蛋白(GFP)、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、c-myc、血凝素、FlagTM 标签(Kodak,NewHaven,CT)、麦芽糖 E 结合蛋白和蛋白 A。在一些实施方案中，编码 DLL3 融合多肽的核酸分子存在于含有编码 Ig 重链恒定区的一个或多个结构域的核酸的载体中，所述结构域例如，对应与人免疫球蛋白 Cγ1 链的铰链区、CH 2 区和 CH3 区的氨基酸序列（Fc 片段）。

第十四方面，本发明提供了包含第十三方面所述表达载体的宿主细胞。

在一些实施方案中，宿主细胞可以为原核宿主细胞、真核宿主细胞或噬菌体。原核宿主细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。真核宿主细胞可以为如巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌，如草地粘虫等昆虫细胞，如烟草等植物细胞，如 BHK 细胞、CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施方案中，宿主细胞优选为哺乳动物细胞，更优选为 BHK 细胞、CHO 细胞、NSO 细胞或 COS 细胞。

第十五方面，本发明提供了包含前述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或前述的双特异

性抗体的抗体-药物缀合物。

优选地，所述抗体-药物缀合物通过在前述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或前述的双特异性抗体上偶联治疗剂得到。

本发明中，所述治疗剂可为抗肿瘤药物，例如，细胞毒性药物、免疫增强剂或放射性同位素。

在一些实施方案中，细胞毒性药物的类型包括微管蛋白抑制剂、DNA 拓扑异构酶抑制剂、DNA 损伤剂、抗代谢药或抗肿瘤抗生素。

在一些实施方案中，微管蛋白抑制剂包括但不限于，奥瑞斯他汀衍生物（例如 MMAE(Monomethyl auristatin E)、MMAF (Monomethyl auristatin F)）或美登素生物碱衍生物（例如 DM1、DM4、安丝菌素(Ansamitocin)、美登素(Mertansine)或海兔毒素肽(dolastatin)及其衍生物)。

在一些实施方案中，DNA 拓扑异构酶抑制剂为喜树碱类似物或 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂及其衍生物，例如， DXD、SN38、伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、22-羟基旱莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吲哚并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]咔唑-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吖啶甲酰胺二盐酸盐、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吖啶甲酰胺。

在一些实施方案中，DNA 损伤剂包括但不限于，卡奇霉素(calicheamicin)类、倍癌霉素(duocarmycin)类、安曲霉素类衍生物 PBD(pyrrolobenzodiazepine，吡咯并苯并二氮杂)。

在一些实施方案中，抗代谢药包括但不限于，甲氨蝶呤、6-巯嘌呤或 5-氟尿嘧啶。

在一些实施方案中，抗肿瘤抗生素包括但不限于，多肽类抗生素（例如放线菌素 D 或博来霉素）或蒽醌类药物（例如阿霉素或盐酸米托蒽醌）。

在一些实施方案中，免疫增强剂包括但不限于，左旋咪唑（levamisole）、匹多莫德（pidotimod）、咪喹莫特（imiquimod）、异丙肌苷、聚肌胞苷酸或聚肌尿苷酸。

在一些实施方案中，所述放射性核素为诊断用放射性核素或治疗用放射性核素。根据本发明的实施方案，所述诊断用放射性核素为 ^{68}Ga、^{64}Cu、^{18}F、^{86}Y、^{89}Zr、 ^{111}In、^{99m}Tc、^{11}C、^{123}I、^{125}I 和 ^{124}I 中的至少一种。根据本发明的实施方案，所述治疗用放射性核素为 ^{177}Lu、^{90}Y、

^{125}I、^{131}I、^{211}At、^{111}In、^{153}Sm、^{186}Re、^{188}Re、^{67}Cu、^{225}Ac、^{213}Bi、^{212}Bi 和 ^{212}Pb 中的至少一种。

在一些实施方案中，本发明所述抗体-药物缀合物具有式(I)所示结构：

$$A\text{-}(L\text{-}D)_d \qquad (I)$$

其中 A 为本发明第一方面至第六方面所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或本发明第十方面至第十一方面所述的双特异性抗体；

L 为连接子部分，一端与 A 连接，一端与治疗剂 D 连接；

d表示治疗剂与A的摩尔比(又称DAR，即药物抗体偶联比率)，选自1到12的整数或小数（如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）；

当 d 为小数时，其指每个 A 缀合的连接子-治疗剂（L-D）个数的平均数。

在一些实施方案中，A 选自抗体 22B12E5、抗体 25G10A9、抗体 31B6G8、抗体 33B10E8、抗体 44B8H2、Hab22B12E5、Hab31B6G8、Hab33B10E8、33+31、33+22 和 31+22。

在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段通过连接子与治疗剂共价连接。

在一些实施方案中，L 是可切割连接子。

在一些实施方案中，L 在细胞内条件下可被切割或微环境条件下可被切割。

在一个实施方案中，L 在小于 5.5 的 pH 下可水解。

在一些实施方案中，L 可被细胞内蛋白酶切割。

在一些实施方案中，L 是组织蛋白酶可切割连接子。

在一些实施方案中，L 包括二肽或四肽。

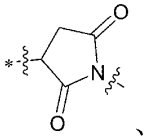
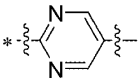
在一些实施方案中，二肽选自缬氨酸（Val）-瓜氨酸（Cit）、缬氨酸（Val）-丙氨酸（Ala），四肽选自甘氨酸（Gly）-甘氨酸（Gly）-苯丙氨酸（Phe）-甘氨酸（Gly）。

在一些实施方案中，抗体通过抗体的半胱氨酸巯基与连接子连接。

在一个实施方案中，抗体通过抗体的氨基(特别是谷氨酰胺残基的氨基)与连接子连接。

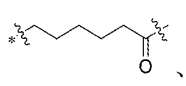
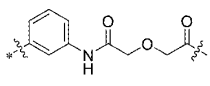
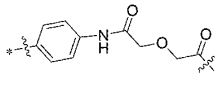
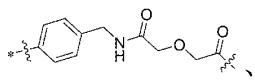
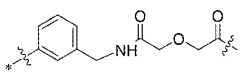
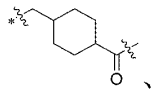
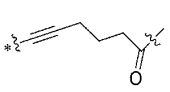
在一些实施方案中，L 是可切割连接子，包括而不限于，酸不稳定连接子(例如腙连接子)、含二硫键的连接子、肽酶敏感的连接子(例如包含氨基酸的肽连接子，例如缬氨酸和/或瓜氨酸例如瓜氨酸-缬氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸)、光不稳定连接子、二甲基连接子、硫醚连接子或经设计避免多药转运蛋白介导的抗性的亲水连接子等。

在一些实施方案中，-L-选自-L_1-L_2-L_3-L_4-，其中，L_1 为共价连接单元，其与 A 共价连接，L_2 为延伸单元，L_3 选自由 2-8 个氨基酸组成的肽残基，L_4 为键或自裂解片段。

在一些实施方案中，L_1选自、、或，其中*表示与A连接。

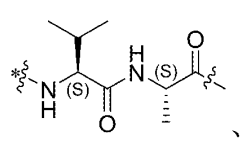
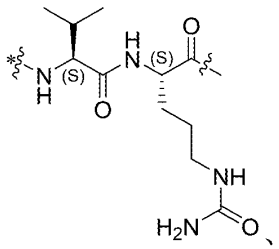
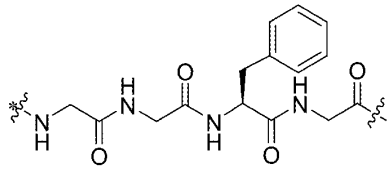
在一些实施方案中，L_2选自-L_{2a}-、-L_{2a}-C(O)-、-L_{2a}-NH-C(O)-L_{2b}-C(O)-，其中L_{2a}和L_{2b}各自独立的选自-C_1-C_6亚烷基-、-C_1-C_3亚烷基-C_3-C_6亚环烷基-、-亚乙炔基-C_1-C_6亚烷基-、-$(CH_2CH_2O)_n$-、-$(CH_2CH_2O)_nC_{1-3}$亚烷基-、-C_{1-3}亚烷基$(CH_2CH_2O)_nC_{1-3}$亚烷基-、-C_{1-3}亚烷基-O-C_{1-3}亚烷基、苯基、-苯基-C_{1-3}亚烷基-，其中n选自1-12（优选3-8，如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）的整数。

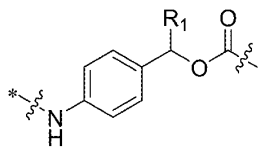
在一些实施方案中，L_2选自-L_{2a}-、-L_{2a}-C(O)-、-L_{2a}-NH-C(O)-L_{2b}-C(O)-，其中L_{2a}和L_{2b}各自独立的选自-$(CH_2)_5$-、亚苯基、-苯基-CH_2-、-CH_2-O-CH_2-。

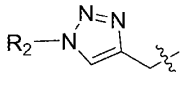
在一些实施方案中，L_2选自：、、、、、$(CH_2CH_2O)_nCH_2C(O)$-、-$(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$-、、，其中*位置与L_1连接，n的定义同上。

在一些实施方案中，L_3选自由2-8个氨基酸组成的肽残基，所述氨基酸选自苯丙氨酸、缬氨酸、丙氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、脯氨酸、瓜氨酸、天冬氨酸和甘氨酸。

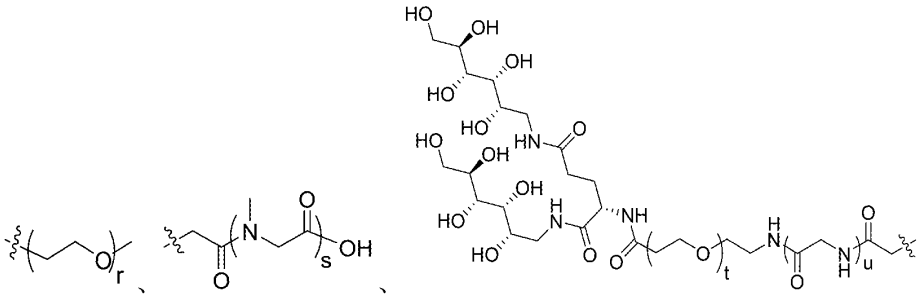
在一些实施方案中，L_3选自：

、、，其中*位置与L_2连接。

在一些实施方案中，L_4选自：键、-NCH_2-、，其中*位置与L_3连接，

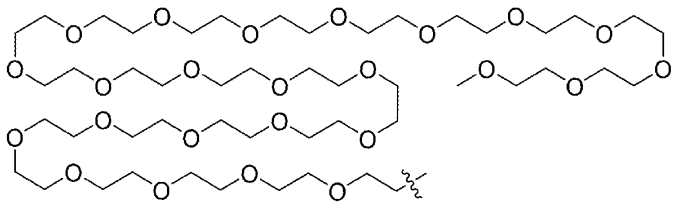
其中 R_1 选自氢、，

其中 R_2 选自：

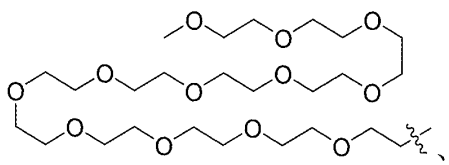


其中，r、s、t、u 各自独立的选自 1-50 的整数（如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50），r 优选 8-24 的整数。

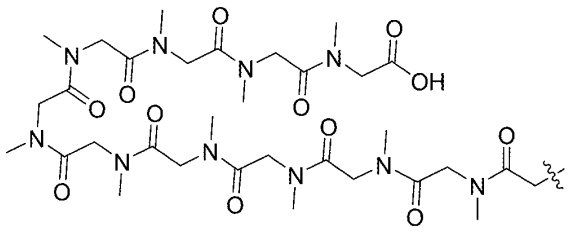
在一些实施方案中，R_2 选自下列结构：

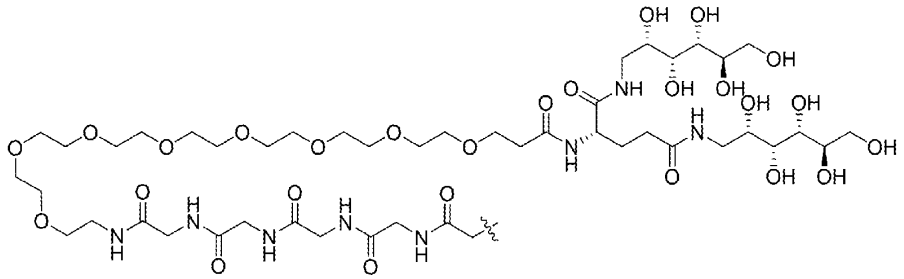


、

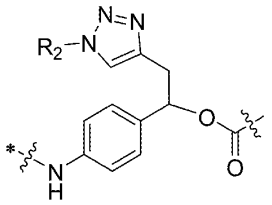
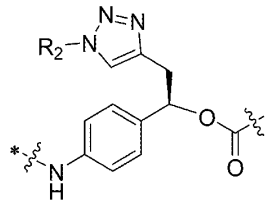
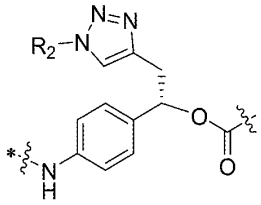


、

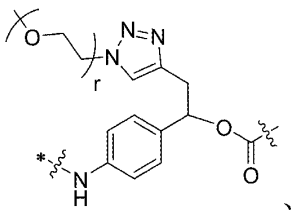
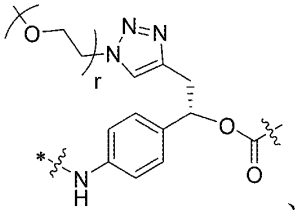
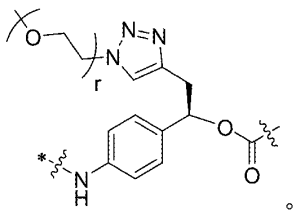




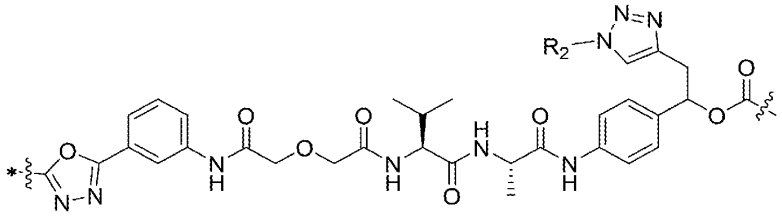
。

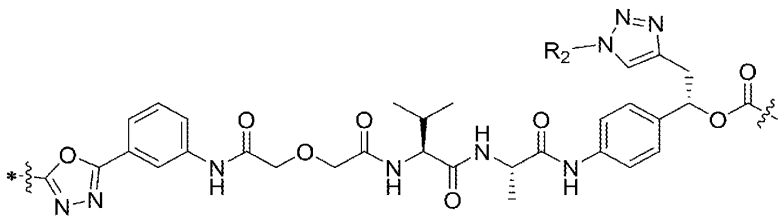
在一些实施方案中，L_4 选自 -NCH_2-、、、。

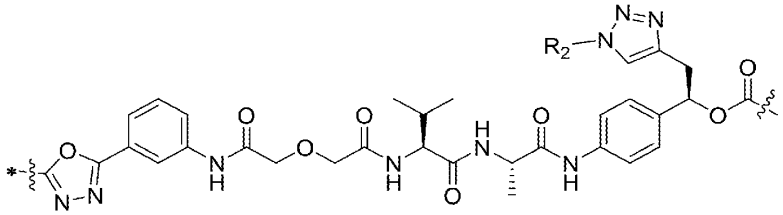
在一些实施方案中，L_4 选自：

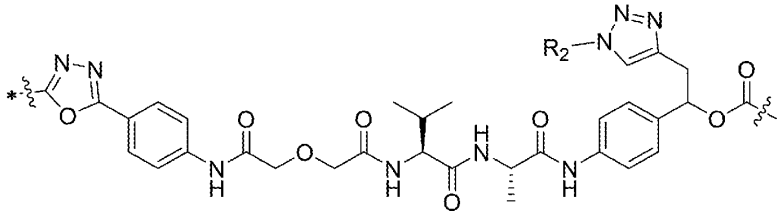
-NCH_2-、、、。

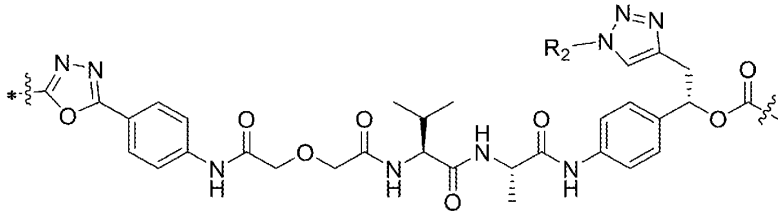
在一些实施方案中，L 选自：

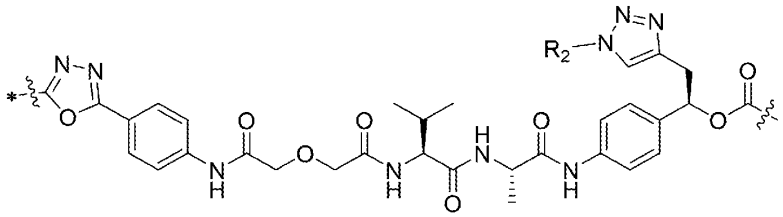




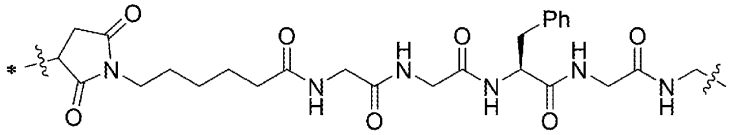








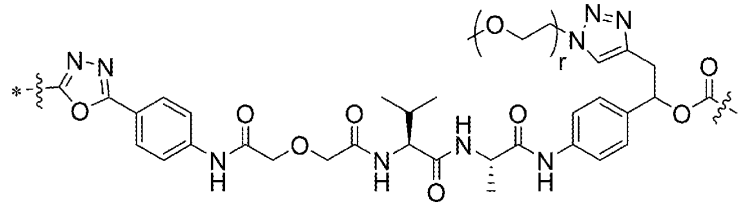
或

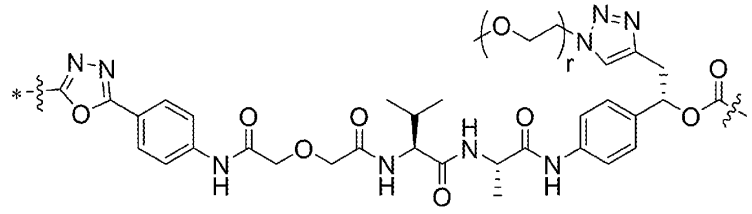


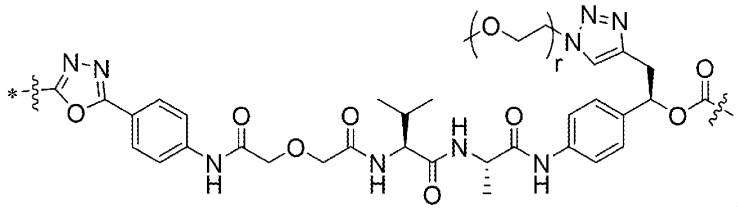
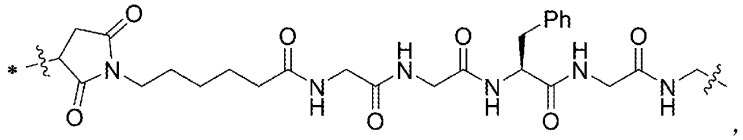
，

其中*位置与 A 连接。

在一些实施方案中，L 选自：

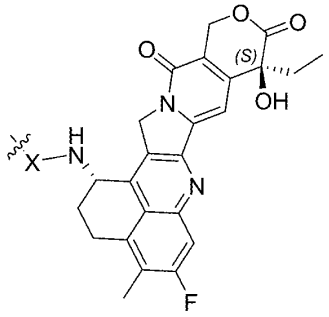


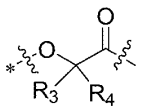


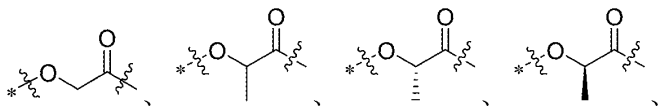
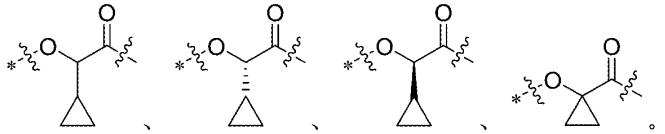

或

，

其中*位置与 A 连接。

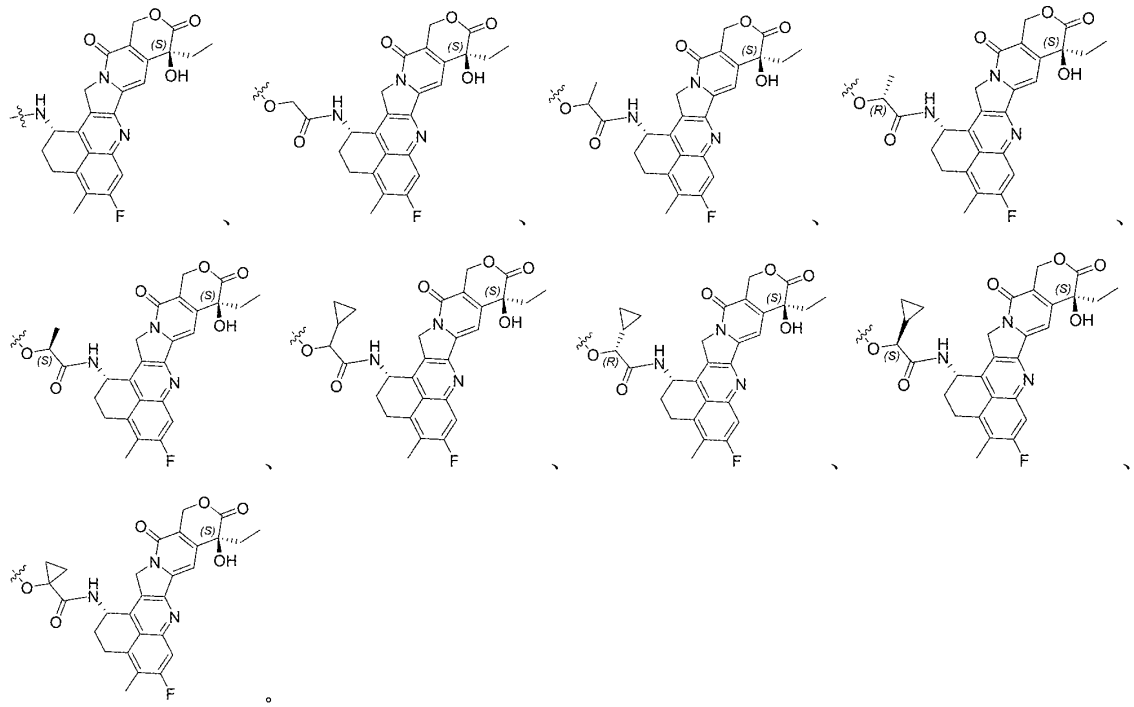
在一些实施方案中，D 选自：


，

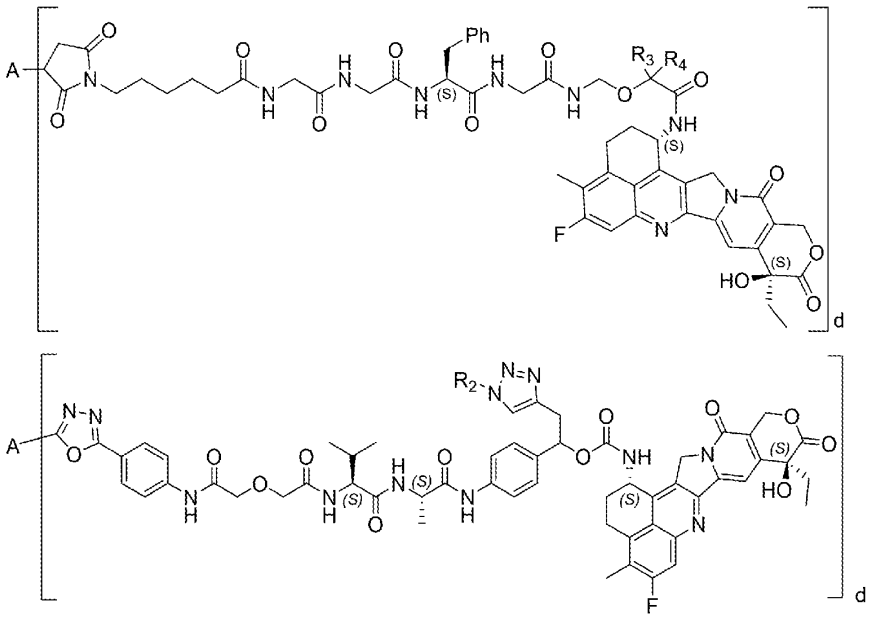
其中 X 选自键、，其中 R_3、R_4 各自独立的选自 H、C_{1-3} 烷基（优选甲基、乙基、正丙基、异丙基）、3-6 元环烷基（优选环丙烷基、环丁烷基、环戊烷基、环己烷基），或者 R_3 和 R_4 与连接其的碳原子一起形成 3-6 元环烷基（优选环丙烷基、环丁烷基、环戊烷基、环己烷基），其中*位置与 L_4 相连。

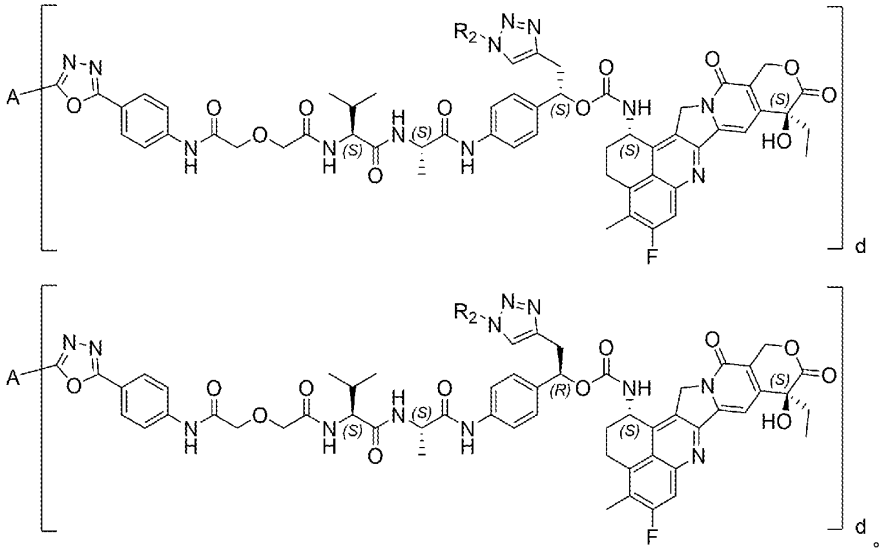
在一些实施方案中，X 选自键、、。

在一些实施方案中，D 选自：

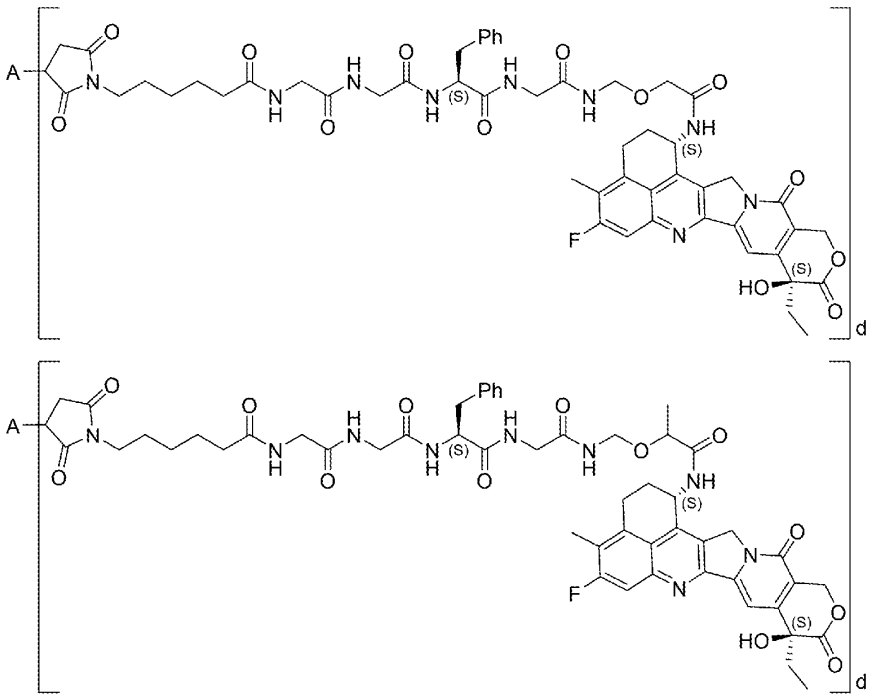


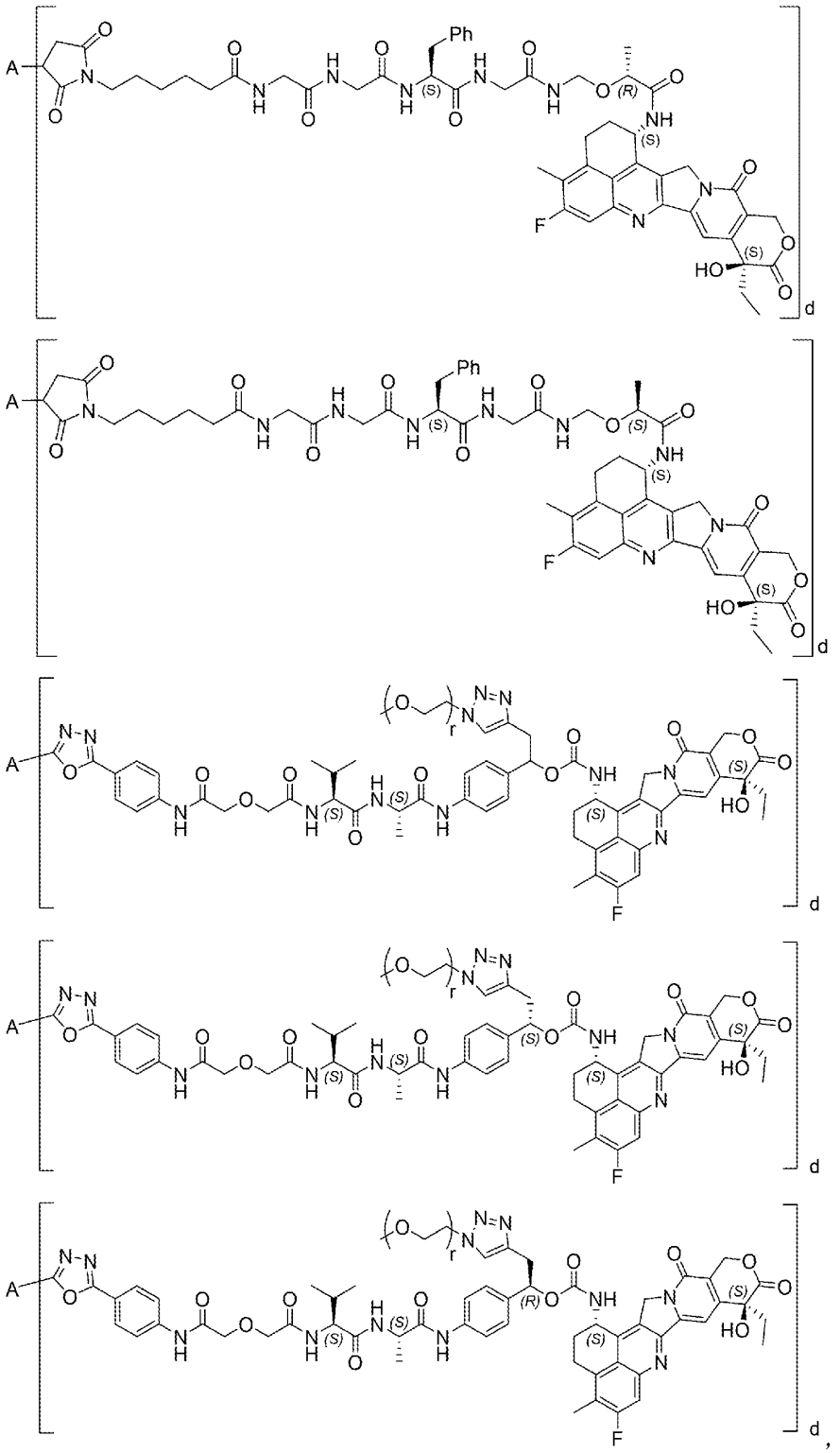
在一些实施方案中，式 I 的抗体-药物缀合物，其具有如下所示结构：





在一些实施方案中，式 I 的抗体-药物缀合物，其具有如下所示结构：





其中 r 选自 1-50 整数，优选 8-24 的整数，优选 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24。

在一些实施方案中，式 I 的抗体-药物缀合物中，A 选自 Hab33B10E8。

第十六方面，本发明提供了包含第一方面至第六方面所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段的融合蛋白。

本发明所述融合蛋白的实例包括 Fab 融合蛋白、Fc 融合蛋白与单链抗体（scFv）融合蛋白等，根据效应蛋白（例如细胞因子）所融合的部位不同而命名。

第十七方面，本发明提供了包含前述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段、前述双特异性抗体、前述抗体-药物缀合物或前述融合蛋白的药物组合物。

本发明中，第十七方面所述的药物组合物还包括药学可接受的载体。

第十八方面，本发明提供了前述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段、前述双特异性抗体或前述抗体-药物缀合物、前述融合蛋白或前述药物组合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的应用。

在一些实施方案中，肿瘤为肿瘤细胞表面表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤。

在一些实施方案中，肿瘤为肿瘤细胞表面高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 60%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 70%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 80%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 90%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 95%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 98%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 99%的肿瘤细胞表达 DLL3。

在一些实施方案中，所述肿瘤为实体瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为血液肿瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为恶性肿瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为癌症。

在一些实施方案中，所述肿瘤为肺癌，更优选为小细胞肺癌。

第十九方面，本发明提供了治疗个体中的肿瘤，特别是肿瘤细胞表面表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤的方法，所述方法包括给予所述个体治疗有效量的前述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段、前述双特异性抗体、前述抗体-药物缀合物、前述融合蛋白或前述药物组合物。

在一些实施方案中，肿瘤为肿瘤细胞表面表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤。

在一些实施方案中，肿瘤为肿瘤细胞表面高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤。在一些实施

方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 60%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 70%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 80%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 90%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 95%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 98%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 99%的肿瘤细胞表达 DLL3。

在一些实施方案中，所述肿瘤为实体瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为血液肿瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为恶性肿瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为癌症。

在一些实施方案中，所述肿瘤为肺癌，更优选为小细胞肺癌。

第二十方面，本发明提供了治疗有效量的前述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段、前述双特异性抗体、前述抗体-药物缀合物、前述融合蛋白或前述药物组合物，用于治疗个体中的肿瘤，特别是肿瘤细胞表面表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤的。

在一些实施方案中，肿瘤为肿瘤细胞表面表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤。

在一些实施方案中，肿瘤为肿瘤细胞表面高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 60%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 70%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 80%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 90%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 95%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 98%的肿瘤细胞表达 DLL3。在一些实施方案中，高表达 DLL3（DLL3+）的肿瘤是指肿瘤细胞群体中至少 99%的肿瘤细胞表达 DLL3。

在一些实施方案中，所述肿瘤为实体瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为血液肿瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为恶性肿瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为癌症。

在一些实施方案中，所述肿瘤为肺癌，更优选为小细胞肺癌。

附图说明

图 1　嵌合抗体与可溶性人源 DLL3 蛋白的结合实验结果。

图 2　嵌合抗体与可溶性食蟹猴 DLL3 蛋白的结合实验结果。

图 3　嵌合抗体与可溶性小鼠 DLL3 蛋白的结合实验结果。

图 4A　嵌合抗体与可溶性人源 DLL1 蛋白的结合实验结果。

图 4B　嵌合抗体与可溶性人源 DLL4 蛋白的结合实验结果。

图 5A　嵌合抗体与人 DLL3-B(Ala 176-Leu 492)截断体蛋白的结合实验结果。

图 5B　嵌合抗体与人 DLL3-C(Ser 312-Leu 492)截断体蛋白的结合实验结果。

图 5C　嵌合抗体表位识别结果。

图 6A　嵌合抗体-药物缀合物的杀伤 SHP77 细胞的实验结果。

图 6B　嵌合抗体-药物缀合物的杀伤 NCI-H82 细胞的实验结果。

图 7　嵌合抗体-药物缀合物抑制 NCI-H82 荷瘤小鼠移植瘤的生长。

图 8　嵌合抗体-药物缀合物抑制 SHP77 荷瘤小鼠移植瘤的生长。

图 9　DLL3 双表位抗体分子结构示例。

图 10A 双表位抗体与可溶性人源 DLL3 蛋白的结合实验结果。

图 10B 双表位抗体与可溶性食蟹猴 DLL3 蛋白的结合实验结果。

图 10C 双表位抗体与可溶性小鼠 DLL3 蛋白的结合实验结果。

图 11　双表位抗体 DLL3 抗体-药物缀合物的杀伤实验结果。

图 12A 人源化抗体与可溶性人源 DLL3 蛋白的结合实验结果。

图 12B 人源化抗体与可溶性食蟹猴 DLL3 蛋白的结合实验结果。

图 12C 人源化抗体与可溶性小鼠 DLL3 蛋白的结合实验结果。

图 13　人源化 DLL3 抗体-药物缀合物的杀伤实验结果。

图 14　人源化抗体-药物缀合物抑制 NCI-H82 荷瘤小鼠移植瘤的生长。

图 15　人源化抗体-药物缀合物抑制 SHP77 荷瘤小鼠移植瘤的生长。

图 16　化合物 82 的单晶衍射图。

发明详细描述

定义

除非另有定义，本文使用的所有科技术语具有本领域普通技术人员所理解的相同含义。

关于本领域的定义及术语，专业人员具体可参考 Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。

尽管本发明的广义范围所示的数字范围和参数近似值，但是具体实施例中所示的数值尽可能准确的进行记载。然而，任何数值本来就必然含有一定的误差，其是由它们各自的测量中存在的标准偏差所致。另外，本文公开的所有范围应理解为涵盖其中包含的任何和所有子范围。例如记载的“1 至 10”的范围应认为包含最小值 1 和最大值 10 之间(包含端点)的任何和所有子范围；也就是说，所有以最小值 1 或更大起始的子范围，例如 1 至 6.1，以及以最大值 10 或更小终止的子范围，例如 5.5 至 10。另外，任何称为“并入本文”的参考文献应理解为以其整体并入。

本文所使用的术语“对象”或“个体”是指哺乳动物，如人类，但也可以是其它动物，如野生动物，家畜或实验动物(如猩猩、猴子、大鼠、小鼠、兔子、豚鼠、土拨鼠、地松鼠等)。

本文所使用的术语“抗原”是抗体可选择性与之结合的预定的靶标。抗原的实例包括但不限于多肽、糖、核酸、脂质、半抗原或其它天然存在的化合物或合成化合物。

广义而言，“抗体”可以指能够经由至少一个位于免疫球蛋白分子的可变区中的抗原识别位点特异性结合到靶标的免疫球蛋白分子，因此涵盖完整抗体/全长抗体、抗体单链或抗体的任何抗原结合片段(也称为“抗原结合部分”)。当“抗体”和“抗原结合片段/抗原结合部分”出现在同一语境下时，“抗体”可以理解为相对于“抗原结合片段/抗原结合部分”的完整体，二者共同对应于广义的抗体概念。

术语“抗 DLL3 抗体”或“与 DLL3 结合的抗体”包括能够以足够的亲和力结合 DLL3，使得抗体在靶向 DLL3 时可用作诊断剂和/或治疗剂的抗体。在一些实施方案中，抗 DLL3 抗体与无关的非 DLL3 蛋白结合的程度小于与 DLL3 结合的约 10%，例如通过荧光激活细胞分选(FACS)分析或免疫测定法（例如放射免疫测定法（RIA））测定。对于与 DLL3 “特异性结合”或对 DLL3 “具有特异性”的抗体，在某些实施方案中，与 DLL3 结合的抗体的解离常数(KD)小于或等于 500nM、100nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM 或 0.1nM。在一些实施方案中，抗 DLL3 抗体与来自不同物种的 DLL3 间(例如人和食蟹猴 DLL3 间)保守的 DLL3 蛋白表位结合。

“全长抗体”系指包含通过二硫键而互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的蛋白。每条重链包含一重链可变区(缩写为 VH)和一重链恒定区。该重链恒定区包含三个域(domain)，CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包含一轻链可变区(缩写为 VL)和一轻链恒定区。该轻链恒定区包含一

个域，CL。VH 和 VL 区域还可再细分为具有高可变性的多个区，被称为互补决定区(CDR)，其间散布有更为保守的被称为框架区(FR)的多个区域。每个 VH 和 VL 均由三个 CDR 和四个 FR 构成，按照以下顺序从氨基端至羧基端排布：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的这些可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主的组织或因子结合，包括免疫系统的各种细胞(如效应细胞)和经典补体系统的第一成分(Clq)。全长抗体可以是任何种类的抗体，例如 IgD、IgE、IgG、IgA 或 IgM(或上述的子类)，但抗体不需要属于任何特定的类别。根据重链的恒定域的抗体氨基酸序列，可以将免疫球蛋白指定为不同的类别。通常，免疫球蛋白有五种主要的类别：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，而且这些类别中有几个可以再被进一步区分成子类(同型)，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定域分别称为α、δ、ε、γ、以及μ。不同类别的免疫球蛋白的子单元结构和三维结构是公知的。嵌合或人源化抗体也涵盖在根据本发明的抗体中。本领域技术人员公知，互补决定区(CDR，通常有 CDR1、CDR2 及 CDR3)是可变区中对抗体的亲和力和特异性影响最大的区域。VH 或 VL 的 CDR 氨基酸序列有多种常见的定义方式，例如 Kabat 定义、IMGT 定义，Chothia 定义等。对于给定抗体的可变区氨基酸序列，通常可以根据不同定义方式来确定 VH 和 VL 氨基酸序列中的 CDR 氨基酸序列。在本发明的实施方案中，利用 Kabat 定义 CDR 氨基酸序列。对于给定抗体的可变区氨基酸序列，可以通过多种方式分析可变区氨基酸序列的中 CDR 氨基酸序列。

术语“鼠源抗体”是指一种抗体，其来源于免疫接种过的小鼠的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，筛选出既能无限增殖又能分泌抗体的鼠杂交融合细胞，进而进行筛选、制备和纯化获得的抗体，鼠源抗体一般具有免疫原性，因此后续需要对其作人源化处理。

术语“人源化抗体”意指将源自另一哺乳动物物种，诸如小鼠种系的 CDR 序列嫁接到人框架序列上获得的抗体。为了保留结合亲和力，可以修饰骨架(称为 FR)区段的一些残基。通过本领域技术人员已知的技术可以制备根据本发明的人源化抗体或其片段；

术语“嵌合抗体”系指以下抗体，其中的可变区序列来自一物种而恒定区序列来自另一物种，例如可变区序列来自小鼠抗体而恒定区序列来自人抗体的抗体。通过使用基因重组技术可以制备根据本发明的嵌合抗体或其片段。例如，所述嵌合抗体可以通过克隆重组 DNA 来生产，所述重组 DNA 包含启动子和编码根据本发明的非人尤其是鼠单克隆抗体可变区的序列、以及编码人抗体恒定区的序列。由这种重组基因编码的本发明嵌合抗体将是，例如，鼠-人嵌合体，该抗体的特异性由来源于鼠 DNA 的可变区确定，并且其同种型由来源于人 DNA 的恒定区来确定。

术语“单克隆抗体”指由基本同质的抗体群体获得的抗体，即，除了可能在少量个体中存在自然发生的突变以外，组成群体的各个抗体是相同的。

本文所使用的术语“抗原结合片段”或“抗原结合部分”或“抗原结合区”可互换使用，是指包含与抗原相互作用并赋予结合剂其针对抗原的特异性和亲和力的氨基酸残基的抗体的部分，尤其是指抗体片段如 Fv、Fab、$F(ab')_2$ 或 Fab’，任选包含加半寿期的化学修饰片段，所述化学修饰例如添加聚(亚烷基)二醇如聚乙二醇(“聚乙二醇化，PEG 化”)(被称为 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、$F(ab')_2$-PEG 或 Fab’-PEG 的聚乙二醇化片段)(“PEG”为聚乙二醇)，所述片段具有 DLL3 结合活性。优选地，所述抗原结合片段将由其来源抗体的重链或轻链可变链的部分序列构成或者包含它们，所述部分序列足以保留与其来源抗体相同的结合特异性和充分的亲和力，这种抗原结合片段将包含最少 5 个氨基酸，优选其来源的抗体序列的 10、15、25、50 和 100 个连续氨基酸。抗原结合片段的实例包括但不限于：(1)Fab 片段，其可以是具有 VL-CL 链和 VH-CH1 链的单价片段；(2)$F(ab')_2$ 片段，其可以是具有两个 Fab'片段的二价片段，该两个 Fab'片段由铰链区的二硫桥(即 Fab'的二聚物)连接；(3)具有抗体的单臂的 VL 和 VH 域的 Fv 片段；(4)由 VH 结构域组成的 VHH 片段。

术语“单链抗体(scFv)指是由 VH 域和 VL 域经由肽连接子连接的单一多肽链。$(scFv)_2$ 包含两个由肽连接子连接的 VH 域和两个 VL 域，该两个 VL 域是经由二硫桥与该两个 VH 域组合。

术语“Fc 片段”、“Fc 区”、“Fc 结构域”、“Fc 部分”或类似的术语是指抗体重链恒定区的一部分，包括铰链区(hinge)、恒定区的 CH2 片段和 CH3 片段。可以对抗 DLL3 抗体的 Fc 区进行工程化改造或修饰，包括效应功能相关的改造，以例如降低或消除抗体依赖的细胞毒性(ADCC)和/或依赖补体的细胞毒性(CDC)，这可通过在抗体的 Fc 区引入一个或更多个氨基酸取代/突变来实现。

如本文所用术语“特异性结合”是指两个分子之间的非随机结合反应，例如抗体与抗原表位的结合。

术语“双特异性抗体”是指同时具有两种抗原表位结合能力的抗体。两种抗原表位可以在不同抗原上，也可是在同一抗原上。双特异性抗体可以具有多种结构构型。例如，双特异性抗体可以由两个 Fc 片段以及分别与其融合的两个抗原结合片段组成，其结构与天然抗体相似，区别在于两个臂结合不同的抗原靶标或表位，也称为 IgG 样双特异性抗体；而非 IgG 样双特异性抗体一般使用 scFv 片段或者 Fab 片段作为基本模块，通过利用经过适当改造的肽链连接物，scFv 片段或者 Fab 片段可以形成二聚体、三聚体、四聚体、五聚体甚至更高阶的寡聚体。

通常，为了制备单克隆抗体或其功能片段，尤其是鼠源的单克隆抗体或其功能片段，可以参考尤其描述在手册“Antibodies”中的技术(Harlow and Lane，Antibodies：A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory，Cold Spring Harbor NY，pp.726，1988)或者参考 Kohler 和 Milstein 描述的从杂交瘤细胞制备的技术(Nature，256：495-497，1975)。

在描述涉及氨基酸或核酸序列突变的一些实施方案时，本发明使用“XaaaY”的限定方式（例如 L234A 等），其中“aaa”代表氨基酸或碱基的序列位置（在存在具体参考序列时，“aaa”代表在该参照序列中的残基顺序位置；或者也可以按照本领域通行的位置编号方式，例如 EU 编号系统等），“X”代表“aaa”处原有的氨基酸或碱基，“Y”代表“aaa”处变化后的氨基酸或碱基。作为实例，当描述人重链恒定区的 L234A 突变时，是指按照人重链恒定区的 EU 编号系统，第 234 位的亮氨酸（L）被突变为丙氨酸（A）。

术语“分离的”生物组分（例如核酸、蛋白质（包括抗体）或细胞器）已经与所述组分天然存在的环境（例如细胞）中的其他生物组分（即，其他染色体和额外染色体 DNA 和 RNA、蛋白质和细胞器）基本分离或被纯化。已经被“分离”的核酸和蛋白质包括用标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸和蛋白质以及化学合成的核酸。

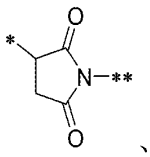
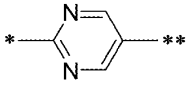
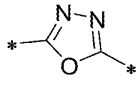
“表达载体”是包括一个或多个表达控制序列的载体，“表达控制序列”是控制和调节另一 DNA 序列的转录和/或翻译的 DNA 序列。

术语“抗体药物偶联物”或“抗体偶联药物”（ADC）是指将靶向配体如抗体(如单克隆抗体)、抗体片段通过连接子或接头与具有生物活性的生物活性分子相连。

术语“连接子-药物化合物”或“接头-药物化合物”（linker-drug）是指“抗体-药物偶联物”中由连接子和生物活性化合物组成的部分结构。

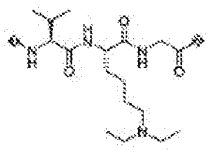
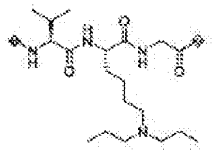
术语“连接子”是指一端与抗体连接而另一端与细胞毒性药物连接的化学结构片段，用 L 表示；在本发明的某些实施方式中，“连接子”由“连接子-药物化合物”连接抗体形成；在本发明的另一些实施方式中，“连接子”的一部分先与抗体连接，另一部分与生物活性化合物连接后，再通过连接子不同部分之间的共价连接形成连接子。本发明中的连接子包含与抗体连接的共价连接单元、延伸单元、肽残基以及任选的自裂解片段。

本发明中所述连接子-药物化合物与所述抗体通过本领域常规的偶联方式进行连接，包括：赖氨酸偶联、轻重链间还原性二硫键偶联和定向偶联。本发明优选通过轻重链间还原性二硫键偶联，即轻重链间二硫键位点（重链之间的两个位点，重点与轻链之间的两个位点）中的一个或多个被还原后形成的硫醇基（半胱氨酸残基的硫原子）反应进行连接。在本发明中，

连接子 L 与抗体的连接部分以 L_1 表示，其由连接子化合物中的 L_1'基团与抗体反应形成，例如 、或者 ，其中*表示与抗体的巯基相连接，**表示与间隔子相连接。

术语"延伸单元"意指连接子 L 中的共价连接单元和多肽序列之间的连接基团，其可以为任意的二价有机基团，如化学键、C_{1-10} 亚烷基、C_{2-10} 亚烯基、C_{2-10} 亚炔基、C_{3-10} 环烷基、C_{6-12} 芳基、5-12 元杂芳基、5-12 元杂环基或它们中两种以上基团的组合；所述 C_{1-10} 亚烷基、C_{2-10} 亚烯基、C_{2-10} 亚炔基、C_{3-10} 环烷基、C_{6-12} 芳基、5-12 元杂芳基、5-12 元杂环基或它们中两种以上基团的组合并任选地被羰基、O、S、N 原子间隔；所述 C_{1-10} 亚烷基、C_{2-10} 亚烯基、C_{2-10} 亚炔基、C_{3-10} 环烷基、C_{6-12} 芳基、5-12 元杂芳基、5-12 元杂环基可以任选被 C_{1-6} 烷基、C_{3-6} 环烷基、卤素原子、卤代 C_{1-6} 烷基取代；优选地，延伸单元包含亲水片段取代或插入；优选地，延伸单元如 L_2 所定义。

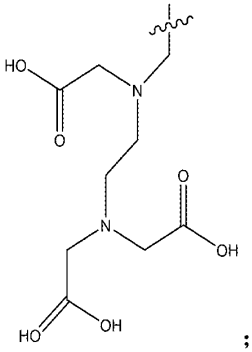
术语"肽残基"是本领域公知的，选自包含 2 至 8 个任选取代的蛋白质氨基酸或非蛋白质氨基酸、L 型或 D 型氨基酸残基的二价肽基团，每一个所述氨基酸残基相同或不同，彼此独立地选自以下的氨基酸的残基：丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、天门冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)、甲硫氨酸(Met)、天冬酰胺(Asn)、脯氨酸(Pro)、谷氨酰胺(Gln)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、瓜氨酸(Cit)、戊氨酸(Nva)、正亮氨酸(Nle)或上述氨基酸的类似物。本发明中的肽残基可以包含取代或衍生的氨基酸残基，例如 CN115279417A 定义的侧链氨基被特定取代的氨基酸残基，如：

、。

术语"自裂解片段"是本领域公知的，如本领域常规使用的对氨基苄醇碳酸酯片段，在本发明的具体实施方式中，所述"自裂解片段"包含"亲水片段"的修饰。

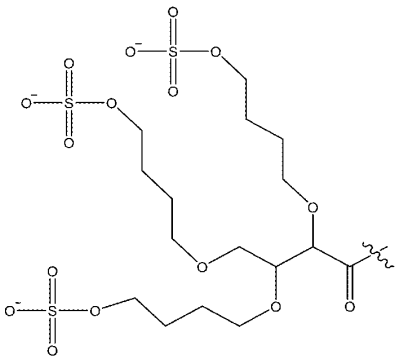
术语"亲水片段"是本领域公知的，所述亲水片段可以包含聚乙二醇基团，如端基为甲氧基的聚乙二醇基团，或通过聚乙二醇基团进一步连接其他亲水片段。所述亲水片段还可以包括聚氨基酸片段，如聚甘氨酸或聚肌氨酸，所述聚氨基酸片段可以与聚乙二醇基团组合。所

述亲水片段还可以是单糖、二糖或寡糖，所述单糖、二糖或寡糖可以为链状分子或环状分子的糖，并且可以包含糖胺、糖酸或磷酸糖。优选地，所述糖基团与聚乙二醇片段或聚氨基酸片段组合；还优选地，通过多价的连接基团引入至少两个糖基团，如基于天冬氨酸、谷氨酸或赖氨酸的连接基团。还可以包含多羧酸基团、多磺酸基团或螯合基团等；所述多羧酸基团的结构如：



；

所述多磺酸基团的结构如：



；

所述螯合基团例如可以为 DOTA 基团或 NOTA 基团。

本文使用的术语“药物组合物”其表示组合在一起以实现某种特定目的的至少一种药物以及任选地可药用载体或辅料的组合。在某些实施方案中，所述药物组合物包括在时间和/或空间上分开的组合，只要其能够共同作用以实现本发明的目的。例如，所述药物组合物中所含的成分(例如根据本发明的抗体、核酸分子、核酸分子组合和/或缀合物)可以以整体施用于个体，或者分开施用于个体。当所述药物组合物中所含的成分分开地施用于个体时，所述成分可以同时或依次施用于个体。优选地，所述可药用载体是水、缓冲水溶液、等渗盐溶液如PBS(磷酸盐缓冲液)、葡萄糖、甘露醇、右旋葡萄糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、纤维素、碳酸镁、0.3％甘油、透明质酸、乙醇或聚亚烷基二醇如聚丙二醇、甘油三酯等。所用可药用载体的类型尤其依赖于根据本发明的组合物是否配制为用于口服、鼻、皮内、皮下、肌内或静脉施用。根据本发明的组合物可包含润湿剂、乳化剂或缓冲液物质作为添加剂。根据本发明的

药物组合物或者药物制剂可通过任何适宜的途径施用，例如可口服、鼻、皮内、皮下、肌内或静脉内施用。

本文使用的术语“治疗有效量”或“有效量”是指足以显示其对于所施用个体益处的剂量。施用的实际量，以及施用的速率和时间过程会取决于所治疗者的自身情况和严重程度。治疗的处方(例如对剂量的决定等)最终是全科医生及其它医生的责任并依赖其做决定，通常考虑所治疗的疾病、患者个体的情况、递送部位、施用方法以及对于医生来说已知的其它因素。

EC_{50}值主要是指：指在特定暴露时间后，能达到50%最大生物效应对应的药物、抗体或者毒素等的浓度。药学中除了用于表征体外实验中（in vitro）激动剂（agonist）的激活能力外，还可用于表示达到体内（in vivo）最大生物效应一半时所需的血药浓度。在一些文献中，EC50也用于表征某化合物在细胞水平的效力(包括激动和拮抗)，可以通过ELISA等方法测定EC50值。

本文使用的术语“融合蛋白”在一般语境中是由至少两个结构域组成的蛋白，各结构域不是天然状态下相关联的，由单独的基因编码，各个基因相连接，作为一个整体被转录和翻译，产生单个蛋白。在本发明的技术背景下，包含抗体或抗原结合片段的“融合蛋白”指利用基因工程技术将抗体或抗原结合片段与另外的生物活性蛋白融合所得的产物，这类抗体融合蛋白兼具抗体的抗原结合能力以及与抗体融合的生物活性蛋白的独特生物学特性；例如与白蛋白结合片段融合，可以延长抗体的体内半衰期。

本文所用术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指人工构建的融合多肽，该融合多肽一般包括抗原结合区(例如抗体或其抗原结合部分)、跨膜结构域、共刺激结构域和细胞内信号传导结构域。CAR能够利用单克隆抗体的抗原结合特性以非MHC限制性的方式将T细胞和其它免疫细胞的特异性和反应性重定向至所选择的靶标。本发明中，所述抗原结合区可使用本发明所述抗体或双特异抗体的ScFv形式。

关于氨基酸或核酸序列的术语“同一性/同源性/一致性”被定义为经过序列比对和引入空位后，氨基酸或核苷酸序列变体中相同的残基的百分比，如果需要，达到最大百分比的同一性。用于比对的方法和计算机程序在本领域内是公知的。

本文所用术语“肿瘤”是指由异常细胞生长形成的赘生物或实体病变。肿瘤可以是良性的、恶变前的或恶性的。

本文所用术语“恶性肿瘤”是指或描述哺乳动物的生理条件，其典型的特征在于不受调控的细胞生长。示例性恶性肿瘤包括：癌、实体瘤、黑素瘤肉瘤、血液肿瘤、生殖细胞瘤和胚细胞瘤。恶性肿瘤的更多具体实例包括：多发性骨髓瘤、肾癌，包括小细胞肺癌、非小细胞

肺癌、肺腺癌和肺鳞癌的肺癌，膀胱癌，乳腺癌，宫颈癌，结肠癌，包括胃肠癌的胃癌，前列腺癌，胰腺癌，腹膜癌，肝细胞癌，成胶质细胞瘤，卵巢癌，肝癌，尿路癌，肝细胞瘤，直肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜或子宫癌，唾液腺癌，鳞状细胞癌(例如，鳞状上皮细胞癌)，外阴癌，甲状腺癌，肛门癌，阴茎癌，黑素瘤和 B 细胞淋巴瘤，脑癌及头颈癌以及相关转移灶。

本文所用术语“血液肿瘤”是指由于异常细胞的生长增殖不受控制引起的，在多数情况下这些不正常的细胞的起源部位是骨髓，这也正是血液细胞产生的地方。示例性血液肿瘤包括各类白血病、多发性骨髓瘤以及恶性淋巴瘤。血液肿瘤的更多具体实例包括：急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性髓细胞性白血病(CML)、毛细胞性白血病(HCL)、T 细胞幼淋巴细胞性白血病、大颗粒淋巴细胞白血病、幼年型粒-单核细胞白血病、B 细胞幼淋巴细胞性白血病、伯基特白血病和成人 T 细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、原发性巨球蛋白血症(Waldenström macroglobulinemia)、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞瘤、结外边缘区 B 细胞淋巴瘤、MALT 淋巴瘤、结内边缘区 B 细胞淋巴瘤(NMZL)、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、纵隔(胸腺)大 B 细胞淋巴瘤、血管内大 B 细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、B 细胞慢性淋巴细胞性淋巴瘤、经典霍奇金淋巴瘤、结节性淋巴细胞为主型霍奇金淋巴瘤、成人 T 细胞淋巴瘤、结外鼻型 NK/T 细胞淋巴瘤、肠病型 T 细胞淋巴瘤、肝脾 T 细胞淋巴瘤、母细胞 NK 细胞淋巴瘤、蕈样真菌病、赛谢综合征、原发性皮肤 CD30 阳性 T 细胞淋巴增生病、原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤、淋巴瘤样丘疹病、血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤、非特指型外周 T 细胞淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤。

本文所用术语“实体瘤”是指可通过临床检查如 X 线摄片、CT 扫描、B 超或触诊扪及到的有形肿块。临床上诊治过的实体瘤分恶性和良性两种。恶性实体瘤包括：儿童霍奇金淋巴瘤：淋巴细胞为主型、结节硬化型、混合细胞型、淋巴细胞消减型；儿童非霍奇金淋巴瘤：前淋巴母细胞淋巴瘤、小无裂细胞淋巴瘤(伯基特/非伯基特淋巴瘤)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤等；儿童肾脏肿瘤：肾母细胞瘤(Wilms 瘤)、肾透明细胞癌、肾横纹肌样瘤、肾透明细胞肉瘤、肾原始神经外胚叶瘤等；儿童神经母细胞瘤：神经母细胞瘤、节细胞神经母细胞瘤、节细胞神经瘤；儿童颅外生殖细胞瘤：成熟畸胎瘤、未成熟畸胎瘤、内胚窦瘤(卵黄囊瘤)、精原细胞瘤、无性细胞瘤、绒毛膜上皮癌、胚胎癌等；骨肉瘤及软骨肉瘤；儿童横纹肌肉瘤：胚胎型、腺泡型、多形型等；儿童软组织肉瘤：纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、脂肪肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、淋巴管肉瘤、恶性神经鞘瘤、腺泡状软组织肉

瘤、上皮样肉瘤、透明细胞肉瘤、恶性黑色素瘤、滑膜肉瘤、促纤维增生性小圆细胞瘤等；尤文氏家族肉瘤：尤文氏肉瘤、原始神经外胚叶瘤；儿童肝脏肿瘤：肝母细胞瘤(胚胎型、胎儿型、未分化型)、肝细胞癌；视网膜母细胞瘤；其他肿瘤：后颅窝髓母细胞瘤、鼻咽癌、甲状腺乳头状癌、胸腺瘤、肺母细胞瘤、胰母细胞瘤、胰岛细胞瘤、回盲部类癌、间皮瘤等。良性实体瘤包括：淋巴管瘤、血管瘤、甲状舌管囊肿等。

具体实施方式

实施例 1. 抗人 DLL3 单克隆抗体的获得

使用重组人 DLL3 蛋白（购自 Acro，货号 DL3-H52H4）免疫健康的 BALB/c 小鼠，初次免疫后，每隔 14 天进行加强免疫，共免疫 4 次。通过流式细胞仪检测小鼠血清效价，选择血清抗体滴度高的小鼠进行细胞融合。融合前 3 天通过尾静脉注射重组人 DLL3 蛋白进行冲击免疫。融合当天对小鼠进行安乐死，无菌环境下取出小鼠脾脏制备成单细胞悬液，将 SP2/0 细胞与脾细胞按 1:1 的比例混合，采用电融合的方法进行融合。将融合后的细胞铺在 96 孔细胞培养板中，置 37℃，5%CO_2 培养箱中培养，通过 HAT 培养液进行筛选。

根据细胞生长情况，10 天左右进行通过 ELISA 法检测杂交瘤上清液。使用重组人 DLL3 蛋白进行初步筛选。对阳性克隆进行人 DLL3（购自 Acro，货号 DL3-H525x）、食蟹猴 DLL3（购自 Acro，货号 DL3-C52H3)或鼠 DLL3（购自 Acro，货号 DL3-M52H9)或人 DLL3-B（购自 Acro，货号 DL3-H52Hy）或人 DLL3-C（购自 Acro，货号 DL3-H52Hz） 蛋白的复筛。选取具有高亲和力的 5 株（22B12E5、25G10A9、31B6G8、33B10E8、44B8H2）杂交瘤细胞用于测序。通过提取 5 株细胞的 RNA、反转录及 PCR 扩增，最终获得鼠源抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列，结果如下：

22B12E5

重链 CDR1：DYNMY SEQ ID NO.1

重链 CDR2：YIDPYNGVTGFNQKFKG SEQ ID NO.2

重链 CDR3：GQGGYYIDYAMDY SEQ ID NO.3

重链可变区序列 SEQ ID NO.7

EIQLQQSGPGLVNPGTSVKVSCKASGYSFTDYNMYWVKQSHGRSLEWIGYIDPYNGVTGFNQKFKGKATLTVDKSSSTAFMHLNSLTSEDSAVYYCSRGQGGYYIDYAMDYWGQGTSVTVSS

轻链 CDR1：RASQDIGDTLA SEQ ID NO.4

轻链 CDR2：ATSNLDS SEQ ID NO.5

轻链 CDR3：LQYAISPYT SEQ ID NO.6

轻链可变区序列 SEQ ID NO.8

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGDTLAWLQQEPDGTIKRLIYATSNLDSGVPKRFSGSRSGSDFSLTISSLESEDFVHYYCLQYAISPYTFGGGTKLEIK

25G10A9

重链 CDR1：TYGMS SEQ ID NO.9

重链 CDR2：TIHSDGGDTYYPDSVKG SEQ ID NO.10

重链 CDR3：QTGPWLLTY SEQ ID NO.11

重链可变区序列 SEQ ID NO.15

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFRTYGMSWVRQTPDKRLELVATIHSDGGDTYYPDSVKGRFTISRDSAKNTLYLQMSSLKSEDTAVYYCARQTGPWLLTYWGQGTLVTVSA

轻链 CDR1：KASQAVNTAVA SEQ ID NO.12

轻链 CDR2：WASTRHT SEQ ID NO.13

轻链 CDR3：QQHYSTPYT SEQ ID NO.14

轻链可变区序列 SEQ ID NO.16

DIVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCKASQAVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGAGTDYSLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPYTFGGGTKLEIK

31B6G8

重链 CDR1：NYGMK SEQ ID NO.17

重链 CDR2：WINTYTGEPTYADDFKG SEQ ID NO.18

重链 CDR3：FSDYGGFDY SEQ ID NO.19

重链可变区序列 SEQ ID NO.23

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMKWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARFSDYGGFDYWGQGTTLTVSS

轻链 CDR1：KASQSVSNDVA SEQ ID NO.20

轻链 CDR2：YASNRYT SEQ ID NO.21

轻链 CDR3：QQDYSSPFT SEQ ID NO.22

轻链可变区序列 SEQ ID NO.24

NIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPFTFGSGTKLEIK

33B10E8

重链 CDR1：DYYMK SEQ ID NO.25

重链 CDR2：AFNLNNGDTFYNQKFKG SEQ ID NO.26

重链 CDR3：DVYGYGDY SEQ ID NO.27

重链可变区序列 SEQ ID NO.31

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGAFNLNNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDVYGYGDYWGQGTSVTVSS

轻链 CDR1：RASKSVSTSGYSYMH SEQ ID NO.28

轻链 CDR2：LASNLDS SEQ ID NO.29

轻链 CDR3：QHSRELPYT SEQ ID NO.30

轻链可变区序列 SEQ ID NO.32

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLDSGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIK

44B8H2

重链 CDR1：NYWMH SEQ ID NO.33

重链 CDR2：AIYPGNSNTAYNQKFKG SEQ ID NO.34

重链 CDR3：DGYYGFAY SEQ ID NO.35

重链可变区序列 SEQ ID NO.39

EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTNYWMHWMKQRPGQGLEWIGAIYPGNSNTAYNQKFKGKAKLTAITSASSAYMELSSLTNEDSAVYYCTRDGYYGFAYWGQGTLVTVSA

轻链 CDR1：KASQNVGTNVA SEQ ID NO.36

轻链 CDR2：SASYRYS SEQ ID NO.37

轻链 CDR3：QQYKNYPYT SEQ ID NO.38

轻链可变区序列 SEQ ID NO.40

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKSGQFPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYKNYPYTFGGGTKLEIK

注：上述抗体序列中，下划线为 CDR 序列（**根据 kabat 编号系统确定并注释**）。

实施例 2. Fortebio 检测嵌合抗体与重组人 DLL3 蛋白的亲和力

将实施例 1 中获得的鼠源抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列构建成人鼠嵌合抗体，恒定区采用 hIgG1/Kappa，Fc 序列引入 L234A/L235A/P329A/P331S(根据 Kabat 的 EU 索引编号)氨基酸突变。

使用 ProA 生物传感器，将 DLL3 嵌合抗体固定在生物传感器上，至 0.3 nm 的结合响应阈值。在 120 s 基线步骤后，将传感器分别浸入用 0.02%PBST 缓冲液稀释的重组人 DLL3 蛋白中，蛋白起始浓度为 100 nM，3 倍浓度梯度稀释，设置 7 个梯度。结合和解离时间分别为 120 s 和 300 s。根据结合曲线由分析软件，回归计算出抗原抗体的亲和力数据。所有抗体均表现出与 Rovalpituzumab（购自百英，B717301)相当的亲和力，结果如表 1 所示。

表 1：Fortebio 检测嵌合抗体与重组人 DLL3 蛋白的亲和力

样品	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD (M)
22B12E5	4.32E+05	8.01E-04	1.85E-09
25G10A9	1.75E+05	3.34E-04	1.91E-09
31B6G8	4.95E+05	4.10E-04	8.29E-10
33B10E8	4.03E+05	2.08E-04	5.16E-10
44B8H2	1.65E+05	6.79E-04	4.11E-09
Rovalpituzumab	4.12E+05	3.34E-04	8.10E-10

实施例 3. 抗体与人、猴及鼠 DLL3 蛋白结合的交叉反应性

为确定抗体的物种交叉反应能力，采用 ELISA 方法测定抗体与重组人 DLL3 蛋白、食蟹猴 DLL3 及鼠 DLL3 蛋白的亲和力，将重组人、食蟹猴、鼠 DLL3 蛋白稀释至终浓度为 0.5 μg/ml，分别铺到 96 孔酶标板 4℃过夜，次日弃上清，封闭完成后加入 4 倍梯度稀释的抗体（0-17.1 nM），经过二抗孵育后通过 TMB 显色液显色 10 min，加入 2 M 的 HCl 终止反应后，酶标仪读取 450 nm 的吸光度值。结果通过 GraphPad 拟合后所得亲和力如图 1、2、3 及表 2 所示。结果显示 5 个嵌合抗体与人及食蟹猴 DLL3 蛋白的亲和力与 Rovalpituzumab 的结合能力相当。25G10A9 与鼠的 DLL3 蛋白弱结合，其余嵌合抗体与鼠 DLL3 蛋白的结合能力与 Rovalpituzumab 相当。

表 2 嵌合抗体与人、猴及鼠 DLL3 蛋白的结合能力

抗体名称	人 EC50 值（nM）	食蟹猴 EC50 值（nM）	鼠 EC50 值（nM）
Rovalpituzumab	0.007758	0.007513	0.006276
22B12E5	0.009154	0.01233	0.01269
25G10A9	0.01907	0.04857	0.4199
31B6G8	0.007426	0.009731	0.006999

33B10E8	0.007555	0.00597	0.007059
44B8H2	0.009004	0.01602	0.008797

实施例 4. 嵌合抗体与人 DLL1、人 DLL4 蛋白的交叉反应性

将获得的嵌合抗体通过 ELISA 方法检测其对人 DLL1（购自 Acro，货号 DL1-H52H8）、人 DLL4（购自 Acro，货号 DL4-H5227）蛋白的结合能力，将人 DLL1 和人 DLL4 蛋白稀释至终浓度为 0.5 μg/ml，分别铺到 96 孔酶标板，封闭后加入 4 倍梯度稀释的抗体（0-17.1 nM）室温反应 1 h，弃去上清，使用 PBST（1‰的 Tween20)洗涤 5 次，加入的 HRP 标记的羊抗人的二抗，室温孵育 1 h，洗涤后加入 TMB 显色液显色 10 min，加入 2 M 的 HCl 终止反应后，酶标仪读取 450 nm 的吸光度值，结果如图 4A-4B 显示，5 个嵌合抗体与人 DLL1 和人 DLL4 的蛋白均无明显交叉反应。

实施例 5 嵌合抗体的表位检测

5.1 ELISA 检测嵌合抗体识别表位

采用 ELISA 方法测定嵌合抗体与不同 DLL3 截断体的结合能力，将人 DLL3-B 、人 DLL3-C 蛋白分别稀释至 0.5 μg/ml 包被酶标板；封闭完成后加入 4 倍梯度稀释的抗体（0-17.1 nM），二抗孵育 1 h 后洗板显色读数，结果通过 GraphPad 拟合后所得亲和力数据如图 5A-5B 及表 3 所示。结果表明，嵌合抗体 31B6G8 及 Rovalpituzumab 可以与 DLL3-B 结合，不与 DLL3-C 蛋白结合，说明 31B6G8 与 Rovalpituzumab 的表位有可能一致。嵌合抗体 22B12E5、33B10E8、44B8H2、25G10A9 与 DLL3-B、DLL3-C 蛋白均结合，说明与 Rovalpituzumab 识别的表位不一致。

表 3. ELISA 检测嵌合抗体与 DLL3-B、DLL3-C 蛋白亲和力的 EC_{50} 值

抗体名称	人 DLL3-B 蛋白结合 EC_{50} 值（nM）	人 DLL3-C 蛋白结合 EC_{50} 值（nM）
Rovalpituzumab	0.01221	ND
22B12E5	0.007697	0.00745
25G10A9	0.3483	0.9799
31B6G8	0.01267	ND
33B10E8	0.0069	0.006246
44B8H2	0.004884	0.009031

5.2 Octet 表位配对检测抗体识别表位

为进一步确定抗体的表位分类，我们通过 Octet 表位配对检测嵌合抗体 22B12E5、33B10E8、

31B6G8 及 Rovalpituzumab 的抗原表位分类。将人 DLL3 蛋白以 5 μg/ml 负载在 HIS1K 传感器上，接着分别暴露于第一抗体及第二抗体中。通过第二抗体结合信号判定两个抗体是否识别同一表位，使用 ForteBio 的数据分析软件 7.0 处理数据。结果如图 5C 所示，22B12E5、33B10E8 与 Rovalpituzumab 的识别表位完全不同，31B6G8 与 Rovalpituzumab 识别的表位一致。22B12E5、33B10E8、31B6G8 识别表位互不相同。

实施例 6 嵌合抗体与 NCI-H82 细胞的结合

使用人小细胞肺癌细胞株 NCI-H82 评估嵌合抗体与细胞表面 DLL3 的结合能力。细胞以 2×10^6/ml 的密度，100 μl/孔接种于 96 孔板中。加入 137 nM 的抗体，4℃孵育 1 h。加入山羊抗人二抗，4℃避光标记 45 min，收集细胞清洗后通过流式细胞仪读取细胞的荧光强度。实验结果如表 4 所示；结果表明：嵌合抗体可以结合 NCI-H82 上表达的 DLL3 蛋白，且读值均高于 Rovalpituzumab。

表 4. 嵌合抗体与 NCI-H82 细胞表面 DLL3 结合实验

抗体名称	读值(137 nM)
Rovalpituzumab	27,548
22B12E5	45,543
25G10A9	40,812
31B6G8	33,179
33B10E8	55,086
44B8H2	50,692

实施例 7 抗 DLL3 抗体内吞活性检测

采用 FACS 法测定 DLL3 嵌合抗体的内吞速率，使用 SHP77 细胞株评估嵌合抗体诱导细胞表面 DLL3 的内吞能力。细胞以 2×10^6/ml 的密度，100 μl/孔接种于 96 孔板。加入终浓度为 34.2 nM 的抗体，4℃孵育 1 h。FACS 缓冲液清洗细胞后分别放入 4℃、37℃条件下孵育 2h。加入山羊抗人二抗，4℃避光标记 45 min，收集细胞清洗后通过流式细胞仪读取细胞的荧光强度。计算内化比率：即[（4℃的读值-阴性对照读值）-（37℃的读值-阴性对照读值）]/（4℃的读值-阴性对照读值）×100%。

计算所得抗体 2 h 内吞比率如表 5 所示。结果表明，嵌合抗体有较好的内吞活性。

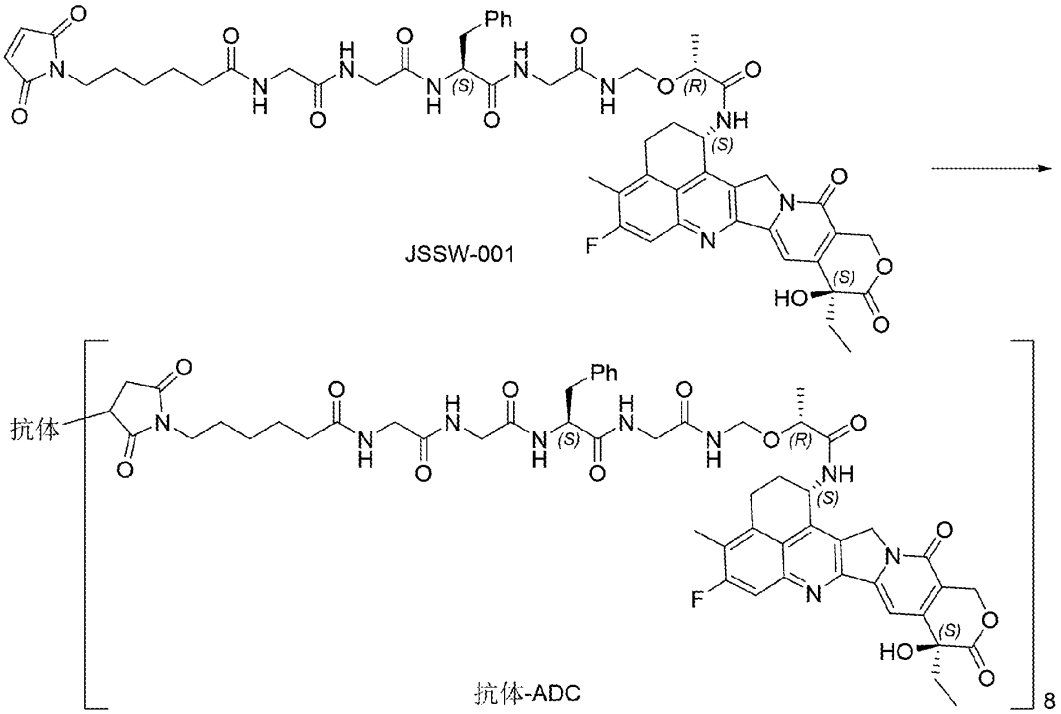
表 5. 嵌合抗体 2 h 内吞比率

抗体名称	内吞比率
Rovalpituzumab	54.20%

22B12E5	52.36%
25G10A9	33.13%
31B6G8	60.63%
33B10E8	71.74%
44B8H2	63.80%

实施例 8　DLL3 抗体-药物缀合物与表达人 DLL3 细胞的结合

采用半胱氨酸偶联法将 JSSW-001（上海皓元生物医药科技有限公司）与嵌合抗体 22B12E5、31B6G8-ADC、33B10E8、44B8H2 及 Rovalpituzumab 进行偶联分别得到 22B12E5-ADC、31B6G8-ADC、33B10E8-ADC（以下实施例中也简称为 Cab33-ADC）、44B8H2-ADC 和 Rova-ADC（阳性对照）。方法步骤包括：以 1:10 的抗体及 TCEP 的摩尔比向 DLL3 嵌合抗体及 Rovalpituzumab 中添加 TCEP（百灵威科技有限公司），37℃孵育 2 h。向上述溶液中以 1:12 的抗体及毒素的摩尔比添加 JSSW-001（上海皓元生物医药科技有限公司），25℃下反应 30 min。接下来，以 1:14 的摩尔比添加 N-乙基马来酰亚胺（百灵威科技有限公司），室温下反应 20 min，终止偶联反应。将上述抗体-药物偶联物使用 AKTA 纯化仪通过亲和层析纯化，得到偶联后的抗体-药物缀合物（ADC）分子，将其交换至 PBS 缓冲液中。通过 SEC\LC-MS 等检测 Rova-ADC、22B12E5-ADC、31B6G8-ADC、33B10E8-ADC、44B8H2-ADC 均正常偶联了 JSSW-001 分子，偶联所得 ADC 的游离小分子含量低于 0.0015%、SEC 纯度大于 95%，偶联的 DAR 值均约为 8。偶联所得 ADC 的 DAR 值、游离小分子含量等均符合要求。



使用癌细胞株 NCI-H82 评估抗体-药物缀合物与细胞表面 DLL3 的结合能力。细胞以 2×10^6/ml 的密度，100 μl/孔接种于 96 孔板中。加入 137 nM 的 抗体，4℃孵育 1 h。加入山羊抗人二抗，4℃避光标记 45 min，收集细胞清洗后通过流式细胞仪读取细胞的荧光强度。结果如表 6 所示。DLL3 抗体-药物缀合物结合 NCI-H82 细胞表面 DLL3 的能力与对应嵌合抗体结合 NCI-H82 细胞表面 DLL3 的能力基本一致，除 31B6G8-ADC 外皆优于 Rova-ADC。

表 6. DLL3 抗体-药物缀合物与 NCI-H82 细胞结合实验

DLL3 抗体-药物缀合物名称	读值(137 nM)
Rova-ADC	40,535
22B12E5-ADC	51,565
31B6G8-ADC	28,797
33B10E8-ADC	57,123
44B8H2-ADC	43,563

实施例 9 ADC 样品体外细胞毒性评价

选择 DLL3 高表达的小细胞肺癌 SHP77 及 NCI-H82 细胞作为体外活性检测用细胞株，观察不同抗体-药物缀合物对细胞杀伤的量效情况。将细胞以 2×10^4/ml 的密度，50 μl/孔接种于 96 孔板中。加入 3 倍梯度稀释的抗体终浓度为 0-400 nM，共同孵育六天后加入 Cell Titer Glo® Luminescent Cell Viability Assay Reagent，室温振荡 10 min 混匀，酶标仪读取数据

后以不加药全细胞组的存活率作为100％进行数据处理，存活率=（试验组/空白对照组）× 100%，并计算 IC_{50}，结果见图 6A-6B 和表 7。结果表明，本发明公开的 ADC 对 DLL3 高表达细胞均具有明显的体外细胞杀伤作用，33B10E8、22B12E5 的体外细胞毒活性相对最强。

表 7. DLL3 抗体-药物缀合物的杀伤实验

抗体-药物缀合物名称	SHP77 细胞的 IC_{50} 值（nM）	NCI-H82 细胞的 IC_{50} 值（nM）
22B12E5-ADC	4.788	1.053
31B6G8-ADC	105.7	74.43
33B10E8-ADC	2.34	2.903
44B8H2-ADC	6.578	39.04

实施例 10 DLL3 抗体-药物缀合物的动物体内生物学活性

10.1 ADC 药物在 NCI-H82 模型中的体内抗肿瘤活性

在肿瘤异种移植模型中评估了嵌合抗体 ADC 分子 31B6G8-ADC（图 7 和表 8 中简称 31B6G8）、22B12E5-ADC（图 7 和表 8 中简称 22B12E5）、33B10E8-ADC（图 7 和表 8 中简称 33B10E8）和 Rova-ADC（图 7 和表 8 中简称 PC(ROVA)）的单一治疗功效。将 1×10^6 个 NCI-H82 人小细胞肺癌细胞接种到 Nu/nu 小鼠中。当肿瘤体积达到 100-150 mm^3 时，通过静脉注射 2 mg/kg 的 31B6G8-ADC、22B12E5-ADC、33B10E8-ADC 和 Rova-ADC 以及 0.9%氯化钠注射液对照（0.9%INJ NS），共给药一次。试验终点计算肿瘤体积。计算公式: 肿瘤体积 (mm^3)=1/2×(a×b^2) (其中 a 表示长径,b 表示短径)，与溶剂组相比，各组均能抑制肿瘤生长，22B12E5-ADC（$P<0.05$）能显著抑制移植瘤的体积。详见图 7 和表 8。

表 8. DLL3-ADC(嵌合抗体)给药 19 天各组肿瘤参数表

组别	DAR	剂量（mg/kg）	给药方式	肿瘤体积 (mm^3)		TGI%
				D0	D19	
0.9%INJ NS	--	--	i.v	140.8± 56.9	2,315.4± 1,026.9	--
31B6G8	6.6	2		144.3± 37.0	1,143.8± 497.6	54.0
22B12E5	7.6			144.2± 31.4	595.6± 172.1*	79.2
33B10E8	6.4			146.9± 33.7	838.5± 650.3	68.2
PC(ROVA)	7.9			148.8± 35.2	925.6± 738.0	64.3

10.2 ADC 药物在 SHP77 模型中的体内抗肿瘤活性

在肿瘤异种移植模型中评估了嵌合抗体 ADC 分子 31B6G8-ADC(图 8 和表 9 中简称 31B6G8)、22B12E5-ADC(图 8 和表 9 中简称 22B12E5)、33B10E8-ADC(图 8 和表 9 中简称 33B10E8)、44B8H2-ADC(图 8 和表 9 中简称 44B8H2)和 Rova-ADC（图 8 和表 9 中简称 PC(ROVA)）的单一治疗功效。将 1×10^7 个 SHP77 细胞接种到 NCG 小鼠中。当肿瘤体积达到 100-150 mm^3 时，通过静脉注射 1 mg/kg 的 31B6G8-ADC、22B12E5-ADC、33B10E8-ADC、44B8H2-ADC 和 Rova-ADC 以及 0.9%氯化钠注射液对照，共给药一次。考察 DLL3-ADC 体内抗肿瘤作用。试验终点，与溶剂组相比，31B6G8-ADC 组造成 63.8%的肿瘤抑制及 726.9±237.8 的肿瘤体积，22B12E5-ADC 组造成 76.4%的肿瘤抑制及 519.3±156.8 的肿瘤体积，33B10E8-ADC 组造成 79.5%的肿瘤抑制及 466.7±115.9 的肿瘤体积，44B8H2-ADC 组造成 57.3%的肿瘤抑制及 834.7±150.5 的肿瘤体积，Rova-ADC（阳性对照）组造成 23.0%的肿瘤抑制及 1408.7±183.6 的肿瘤体积。除 Rova-ADC（阳性对照）外，其他各组（$P<0.05$）能显著抑制移植瘤的体积。详见图 8 和表 9。

表 9. DLL3-ADC(嵌合抗体)给药 19 天各组肿瘤参数表

组别	DAR	剂量（mg/kg）	给药方式	肿瘤体积 (mm^3)		TGI%
				D0	D18	
0.9%INJ NS	--	--	i.v	125.3± 19.7	1,793.0± 346.2	--
PC(ROVA)	7.9	1mpk(D0);		124.2± 24.0	1,408.7± 183.6	23.0
31B6G8	6.6			123.9± 22.7	726.9± 237.8***	63.8
22B12E5	7.6			125.1± 21.1	519.3± 156.8***	76.4
33B10E8	6.4			125.0± 19.5	466.7± 115.9***	79.5
44B8H2	7.2			123.1± 28.1	834.7± 150.5***	57.3

实施例 11 DLL3 双表位抗体的获得

通过表位分析 22B12E5、31B6G8、33B10E8 结合不同的表位，使用它们的可变区构建双表位分子，采用对称的 1:1 结构形式。抗体重链部分采用杵臼技术产生两条不同序列的重链，轻链部分应用 Crossmab 技术产生两条不同的轻链。恒定区采用 hIgG1/Kappa，Fc 序列引入 L234A/L235A/P329A/P331S(根据 Kabat 的 EU 索引编号)氨基酸突变。最终产生 33B10E8+22B12E5（33+22）、31B6G8+22B12E5（31+22）、33B10E8+31B6G8（33+31）两两组合，产生三个双表位抗体分子，抗体结构如图 9，序列如表 10 所示。

表 10. 双互补表位抗体的序列

33+31-HC1（重链 1 氨基酸序列，SEQ ID NO.41）	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGAFNLNNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDVYGYGDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO.31) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO.42)
33+31-HC2（重链 2 氨基酸序列，SEQ ID NO.43）	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMKWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARFSDYGGFDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO.23) ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO.44) DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO.45)
33+31-LC1（轻链 1 氨基酸序列，SEQ ID NO.46）	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLDSGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO.32) RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO.47)
33+31-LC2（轻链 2 氨基酸序列，SEQ ID NO.48）	NIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPFTFGSGTKLEIK(SEQ ID NO.24) SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC(SEQ ID NO.49)
33+22-HC1（重链 1 氨	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGAFNLNNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDVYGYGDYWGQGTSVTVSS(SEQ

基酸序列，SEQ ID NO.41）	ID NO.31) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO.42)
33+22-HC2（重链 2 氨基酸序列，SEQ ID NO.50）	EIQLQQSGPGLVNPGTSVKVSCKASGYSFTDYNMYWVKQSHGRSLEWIGYIDPYNGVTGFN QKFKGKATLTVDKSSSTAFMHLNSLTSEDSAVYYCSRGQGGYYIDYAMDYWGQGTSVTVSS(S EQ ID NO.7) ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO.44) DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAASIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO.45)
33+22-LC1（轻链 1 氨基酸序列，SEQ ID NO.46）	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLDSGVPA RFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO.32) RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO.47)
33+22-LC2（轻链 2 氨基酸序列，SEQ ID NO.51）	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGDTLAWLQQEPDGTIKRLIYATSNLDSGVPKRFSG SRSGSDFSLTISSLESEDFVHYYCLQYAISPYTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO.8) SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC(SEQ ID NO.49)
31+22-HC1（重链 1 氨基酸序列，SEQ ID NO.52）	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMKWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYA DDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARFSDYGGFDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO.23) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP

	KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO.42)
31+22-HC2（重链 2 氨基酸序列，SEQ ID NO.50）	EIQLQQSGPGLVNPGTSVKVSCKASGYSFTDYNMYWVKQSHGRSLEWIGYIDPYNGVTGFNQKFKGKATLTVDKSSSTAFMHLNSLTSEDSAVYYCSRGQGGYYIDYAMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO.7) ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO.44) DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO.45)
31+22-LC1（轻链 1 氨基酸序列，SEQ ID NO.53）	NIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPFTFGSGTKLEIK(SEQ ID NO.24) RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO.47)
31+22-LC2（轻链 2 氨基酸序列，SEQ ID NO.51）	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGDTLAWLQQEPDGTIKRLIYATSNLDSGVPKRFSGSRSGSDFSLTISSLESEDFVHYYCLQYAISPYTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO.8) SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEQ ID NO.49)

实施例 12 DLL3 双表位抗体亲和力检测

首先，采用 ELISA 方法测定双表位抗体与重组人、食蟹猴及鼠 DLL3 蛋白的亲和力，分别将 DLL3 蛋白稀释至 5 μg/m 包被酶标板；封闭完成后加入 4 倍梯度稀释的抗体（0-13.4 nM），经过二抗孵育后显色读数，结果通过 GraphPad 拟合后所得亲和力如图 10A-10C 及表 11 所示。

表 11. ELISA 检测双互补表位抗体亲和力的 EC_{50} 值

抗体名称	人 EC50（nM）	鼠 EC50（nM）	食蟹猴 EC50（nM）
33+31	0.007506	0.01032	0.02714
33+22	0.007027	0.01087	0.03657
Rovalpituzumab	0.008867	0.01337	0.01488

接下来我们通过 Fortebio 来检测双表位抗体的亲和力，实验方法同实施例 2，结果如表 12 所示，上述结果表明所有双表位抗体的亲和力与 Rovalpituzumab 相当或更优。

表 12：Fortebio 检测双表位抗体与人 DLL3 蛋白的亲和力

样品	KD (M)	ka(1/Ms)	kd(1/s)
31+22	8.14E-11	1.43E+06	1.16E-04
33+31	1.33E-10	1.49E+06	1.98E-04
33+22	<1.0E-12	9.53E+05	<1.0E-07
Rovalpituzumab	1.33E-10	7.34E+05	9.78E-05

实施例 13 双表位抗体与表达人 DLL3 细胞的结合

采用 SHP77 细胞评估双表位抗体与细胞表面 DLL3 的结合能力。细胞以 2×10^6/ml 的密度，100 μl/孔接种于 96 孔板中。加入 137 nM 的抗体，4℃孵育 1 h。加入山羊抗人二抗，4℃避光标记 45 min，收集细胞清洗后通过流式细胞仪读取细胞的荧光强度。实验结果如表 13 所示，结果表明，双表位抗体与高表达 DLL3 细胞的结合能力优于对照分子 Rovalpituzumab。

表 13. 双表位抗体与细胞表面 DLL3 蛋白结合检测

抗体名称	读值(137 nM)
Rovalpituzumab	28,373
31+22	34,752
33+31	43,130
33+22	44,134

实施例 14 双表位抗体的内吞活性

采用 FACS 法测定 DLL3 双表位抗体的内吞速率，使用 SHP77 细胞评估双表位抗体诱导细胞表面 DLL3 的内吞能力。细胞以 2×10^6/ml 的密度，100 μl/孔接种于 96 孔板中，加入 34.2 nM 抗体，4℃孵育 1 h。FACS 缓冲液清洗细胞后分别放入 4℃，37℃条件下孵育 2h，加入山

羊抗人二抗，4℃避光标记 45 min，收集细胞清洗后通过流式细胞仪读取细胞的荧光强度。计算内化比率[（4℃的读值-阴性对照读值）-（37℃的读值-阴性对照读值）]/（4℃的读值-阴性对照读值）×100%。

计算所得抗体 2h 内吞比率如表 14 所示。结果表明，双表位抗体有较好的内吞活性，同时，31+22 内吞能力优于 33+31、33+22 及 Rovalpituzumab。

表 14. DLL3 双表位抗体 2 h 内吞实验

抗体名称	与 SHP77 细胞结合的内吞速率（%）
Rovalpituzumab	54.20%
31+22	70.34%
33+31	53.80%
33+22	64.26%

实施例 15　DLL3 双表位抗体-药物缀合物的细胞毒性研究

采用半胱氨酸偶联法将 JSSW-001（上海皓元生物医药科技有限公司）与双表位抗体进行偶联，方法同实施例 8，分别得到 33+31ADC、31+22ADC 和 33+22ADC，偶联的 DAR 值为 8。选择 DLL3 高表达的 SHP77 细胞作为体外活性检测用细胞株，方法同实施例 9，酶标仪读取数据后以不加药全细胞组的存活率作为 100%进行数据处理并计算 EC_{50}，结果见图 11 和表 15。结果表明，双表位 ADC 对 DLL3 高表达细胞 SHP77 具有明显的体外细胞杀伤作用，EC_{50} 值达到 pM 级别。

表 15.　DLL3 抗体-药物缀合物的杀伤实验

抗体-药物缀合物名称	EC_{50} 值（pM）
33+31ADC	449.7
31+22ADC	60.05
33+22ADC	36.27

实施例 16　DLL3 抗体人源化

使用 Discovery Studio 和 Schrödinger Antibody Modeling 进行同源建模。通过结构模拟与理性设计，获得与鼠源抗体框架区最接近的人源框架区。将轻链和重链的 CDR 分别移植到匹配的人源轻链和重链基因的框架序列上，即获得人源化抗体 Hab31B6G8、Hab33B10E8、Hab22B12E5。然后通过 Discovery Studio 和 Schrödinger Antibody Modeling 构建 3D 模型，分析是否存在任何将小鼠氨基酸取代为人氨基酸的框架位置影响结合和/或 CDR 构象的位点，进行回复突变，所得序列见表 16。

表 16. 具有 VH 回复突变的序列（CDR 编号为 kabat 编号方式）

Hab22B12E5-VH(SEQ ID NO.54)	重链 CDR1:DYNMY SEQ ID NO.1 重链 CDR2:YIDPYNGVTGFNQKFKG SEQ ID NO.2 重链 CDR3: GQGGYYIDYAMDY SEQ ID NO.3 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMYWVRQAPGQRLEWMGYIDPYNGVTGFNQKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGQGGYYIDYAMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO.54)
Hab22B12E5-VL(SEQ ID NO.55)	轻链 CDR1：RASQDIGDTLA SEQ ID NO.4 轻链 CDR2：ATSNLDS SEQ ID NO.5 轻链 CDR3：LQYAISPYT SEQ ID NO.6 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGDTLAWFQQKPGKAPKRLIYATSNLDSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYAISPYTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO.55)
Hab31B6G8-VH(SEQ ID NO.56)	重链 CDR1：NYGMK SEQ ID NO.17 重链 CDR2：WINTYTGEPTYADDFKG SEQ ID NO.18 重链 CDR3：FSDYGGFDY SEQ ID NO.19 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMKWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARFSDYGGFDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO.56)
Hab31B6G8-VL(SEQ ID NO.57)	轻链 CDR1：KASQSVSNDVA SEQ ID NO.20 轻链 CDR2：YASNRYT SEQ ID NO.21 轻链 CDR3：QQDYSSPFT SEQ ID NO.22 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLIYYASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYSSPFTFGSGTKLEIK(SEQ ID NO.57)
Hab33B10E8-VH(SEQ ID NO.58)	重链 CDR1：DYYMK SEQ ID NO.25 重链 CDR2：AFNLNNGDTFYNQKFKG SEQ ID NO.26 重链 CDR3：DVYGYGDY SEQ ID NO.27 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMKWVRQAPGQRLEWMGAFNLNNGDTFYNQKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDVYGYGDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO.58)
Hab33B10E8	轻链 CDR1：RASKSVSTSGYSYMH SEQ ID NO.28

-VL(SEQ ID NO.59)	轻链 CDR2：LASNLDS SEQ ID NO.29 轻链 CDR3：QHSRELPYT SEQ ID NO.30 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO.59)

实施例 17 人源化抗 DLL3 抗体亲和力检测

将实施例 16 中获得的人源化抗体可变区与人 IgG1/Kappa 恒定区构建成完整抗体表达纯化。其中 Fc 序列引入 L234A/L235A/P329A/P331S(根据 Kabat 的 EU 索引编号)氨基酸突变。采用 Fortebio 检测人源化抗体与人 DLL3 蛋白的亲和力，方法同实施例 2，根据结合曲线由分析软件，回归计算出抗原抗体的亲和力数据，结果如表 17 所示。

表 17：Fortebio 检测人源化抗体与人 DLL3 蛋白的亲和力

样品	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Full R^2
Hab31B6G8	6.15E-10	5.97E+05	3.67E-04	0.9977
Hab33B10E8	6.10E-10	4.66E+05	2.84E-04	0.9988
Hab22B12E5	1.13E-09	4.45E+05	5.01E-04	0.9983

接下来，通过 ELISA 检测人源化抗体与重组人、食蟹猴及小鼠 DLL3 蛋白的亲和力，结果通过 GraphPad 拟合后所得亲和力如图 12A-12C 及表 18 所示。

表 18. ELISA 检测人源化抗体亲和力的 EC_{50} 值

抗体名称	人 EC50（nM）	鼠 EC50（nM）	食蟹猴 EC50（nM）
Hab22B12E5	0.01877	0.03569	0.02832
Hab33B10E8	0.008329	0.0116	0.01394
Hab31B6G8	0.009	0.01622	0.05172
Rovalpituzumab	0.008867	0.01337	0.01488

上述结果表明，Hab33B10E8 及 Hab31B6G8 人源化抗体表现出与 Rovalpituzumab 基本相当的亲和力。

实施例 18 人源化抗体与表达人 DLL3 细胞的结合

使用 SHP77/NCI-H82 细胞评估人源化抗体与细胞表面 DLL3 的结合能力。细胞以 2×10^6/ml 的密度，100 μl/孔接种于 96 孔板中。加入 66.7 nM 的抗体，4℃孵育 1 h。加入山羊抗人二抗，4℃避光标记 45 min，收集细胞清洗后通过流式细胞仪读取细胞的荧光强度。实验结果表 19 所示，结果表明，人源化抗体可以结合细胞系上表达的 DLL3 蛋白。其中 Hab33B10E8 抗体识别细胞表面 DLL3 的亲和力优于对照分子 Rovalpituzumab。

表 19. 人源化抗体与细胞表面 DLL3 结合实验

人源化抗体名称	SHP77 读值 (66.7 nM)	NCI-H82 读值 (66.7 nM)
Hab22B12E5	21,605	22,839
Hab31B6G8	23,445	23,134
Hab33B10E8	41,350	35,480
Rovalpituzumab	26,848	29,781

实施例 19 人源化抗体的内吞活性检测

采用 FACS 法测定 DLL3 人源化抗体的内吞速率，使用人小细胞肺癌细胞株 SHP77 和 NCI-H82 评估人源化抗体诱导细胞表面 DLL3 的内吞能力。细胞以 2×10^6/ml 的密度，100 μl/孔接种于 96 孔板，加入终浓度为 34.2 nM 的抗体，4℃孵育 1 h。FACS 缓冲液清洗细胞后分别放入 4℃、37℃条件下孵育 2 h。加入山羊抗人二抗，4℃避光标记 45 min，收集细胞清洗后通过流式细胞仪读取细胞的荧光强度。计算内化比率，[（4℃的读值-阴性对照读值）-（37℃的读值-阴性对照读值）]/（4℃的读值-阴性对照读值）×100%。

计算所得抗体 2 h 内吞比率如表 20 所示。结果表明，在 SHP77 细胞上 Hab33B10E8 内吞活性优于 Rovalpituzumab，在 NCI-H82 细胞上 Hab33B10E8、Hab22B12E5 内吞活性优于 Rovalpituzumab。

表 20. 人源化抗体 2 h 内吞实验

人源化抗体名称	与 SHP77 细胞结合的内吞速率（%）	与 NCI-H82 细胞结合的内吞速率（%）
Hab33B10E8	81.68%	83.36%
Hab31B6G8	62.45%	60.55%
Hab22B12E5	72.87%	72.14%
Rovalpituzumab	73.20%	63.20%

实施例 20 人源化 ADC 样品的体外细胞毒性评价

基于实施例 8 相同的方法采用采用半胱氨酸偶联法将 JSSW-001（上海皓元生物医药科技有限公司）与人源化抗体 Hab22B12E5、Hab31B6G8 和 Hab33B10E8 进行偶联，分别得到

Hab22B12E5-ADC、Hab31B6G8-ADC 和 Hab33B10E8-ADC。选择 DLL3 高表达的小细胞肺癌细胞株 SHP77 进行体外活性检测，观察不同抗体-药物缀合物对细胞杀伤的量效情况，将细胞以 2×10^4/ml 的密度，50 μl/孔接种于 96 孔板中。加入 3 倍梯度稀释的抗体终浓度为 0-400 nM。共同孵育六天后加入 Cell Titer Glo ® Luminescent Cell Viability Assay Reagent，室温振荡 10 分钟混匀，酶标仪读取数据后以不加药全细胞组的存活率作为 100%进行数据处理并计算 IC_{50}，结果见图 13 及表 21，结果表明，人源化的 ADC 对 DLL3 高表达细胞均具有明显的体外细胞杀伤作用，Hab33B10E8-ADC、Hab22B12E5-ADC 的体外细胞毒活性相对最强。

表 21. DLL3 抗体-药物缀合物的杀伤实验

抗体-药物缀合物名称	EC_{50} 值（nM）
Rova-ADC	NA
Hab22B12E5-ADC	69.03
Hab31B6G8-ADC	853.4
Hab33B10E8-ADC	41.65

注：NA 代表未拟合出 EC_{50} 值。

实施例 21 DLL3 人源化抗体-药物缀合物的动物体内生物学活性

21.1 人源化 ADC 样品对人小细胞肺癌 NCI-H82 细胞移植瘤药效试验

在肿瘤异种移植模型中评估了 Hab22B12E5-ADC 、Hab33B10E8-ADC 及 Rova-ADC（阳性对照）的单一治疗功效。将 1×10^6 个 NCI-H82 人小细胞肺癌细胞接种到 NU/NU 小鼠中。在移植的第 12 天，通过静脉注射 2 mg/kg 的 Hab22B12E5-ADC 、Hab33B10E8-ADC 及 Rova-ADC（阳性对照），0.9%氯化钠注射液对照，单次注射。考察 DLL3-ADC（人源化抗体）体内抗肿瘤作用。

试验终点，与溶剂组相比，Hab22B12E5-ADC 组造成 48.3%的肿瘤抑制及 966.0± 377.1 的肿瘤体积，Hab33B10E8-ADC 组造成 86.3%的肿瘤抑制及 351.1± 216.8 的肿瘤体积，Rova-ADC（阳性对照）组造成 74.0%的肿瘤抑制及 599.1± 495.6 的肿瘤体积。与溶剂组相比，各组均能显著抑制移植瘤的体积（$P<0.05$）,其中 Hab33B10E8-ADC 抑瘤效果优于对照 Rova-ADC 分子详见图 14 和表 22。

表 22. DLL3-ADC(人源化抗体)给药 14 天各组肿瘤参数表

组别	DAR	剂量（mg/kg）	给药方式	肿瘤体积 (mm^3)		TGI%
				D0	D14	
0.9%INJ NS	--	--	i.v	130.4± 41.6	1750± 531.4	--
Hab22B12E5-ADC	8	2mg/kg(D0)		128.7± 39.2	966.0± 377.1*	48.3
Hab33B10E8-ADC				128.6± 38.5	351.1±216.8***	86.3
Rova-ADC（阳参）#				137.5± 57.7	599.1± 495.6**	74.0

#Rova-ADC（阳参）的 DAR 为 7.9

21.2 人源化 ADC 样品对人小细胞肺癌 SHP77 细胞移植瘤药效试验

在肿瘤异种移植模型中评估了 Hab22B12E5-ADC、Hab31B6G8-ADC、Hab33B10E8-ADC、和嵌合抗体 33B10E8-ADC(Cab33-ADC)及 Rova-ADC（阳参）的单一治疗功效。将 1×10^7 个 SHP77 人小细胞肺癌细胞接种到 NCG 小鼠中。在移植的第 6 天，通过静脉注射 1 mg/kg 的 Hab22B12E5-ADC、Hab31B6G8-ADC、Hab33B10E8-ADC、Cab33-ADC 及 Rova-ADC（阳性对照），0.9%氯化钠注射液对照，单次注射。考察 DLL3-ADC（人源化抗体）体内抗肿瘤作用。

与溶剂组相比，Hab22B12E5-ADC 组造成 65.9%的肿瘤抑制及 459.1± 160.4 的肿瘤体积，Hab31B6G8-ADC 组造成 100.6%的肿瘤抑制及 101.8±20.5 的肿瘤体积，Hab33B10E8-ADC 组造成 91.0%的肿瘤抑制及 201.7±102.5 的肿瘤体积，Cab33-ADC （嵌合）组造成 85.7%的肿瘤抑制及 255.1± 60.8 的肿瘤体积，Rova-ADC（阳性对照）组减小了肿瘤生长，造成 50.8%的肿瘤抑制及 613.7± 252.1 的肿瘤体积。与溶剂组相比，各组（$P<0.05$）均能显著抑制移植瘤的体积。所有分子都优于对照 Rova-ADC。详见图 15 和表 23。

表 23. DLL3-ADC(人源化抗体)给药 14 天各组肿瘤参数表

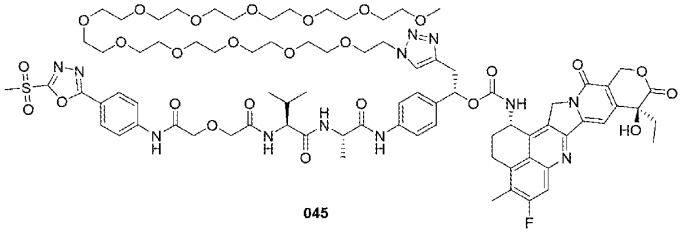
组别	DAR	剂量（mg/kg）	给药方式	肿瘤体积 (mm^3)		TGI%
				D0	D14	
0.9%INJ NS	--	--	i.v	109.1± 24.3	1139.5± 362.1	--
Hab22B12E5-ADC	8	1mg/kg(D0)		107.7± 19.1	459.1± 160.4**	65.9
Hab31B6G8-ADC				107.8± 18.5	101.8±20.5***	100.6
Hab33B10E8-ADC				108.6± 17.8	201.7±102.5***	91.0
Rova-ADC（阳参）#				106.3± 13.9	613.7± 252.1*	50.8
Cab33-ADC（嵌合）##				107.6± 18.1	255.1± 60.8***	85.7

#Rova-ADC（阳参）的 DAR 为 7.9

##Cab33-ADC 的 DAR 为 6.4

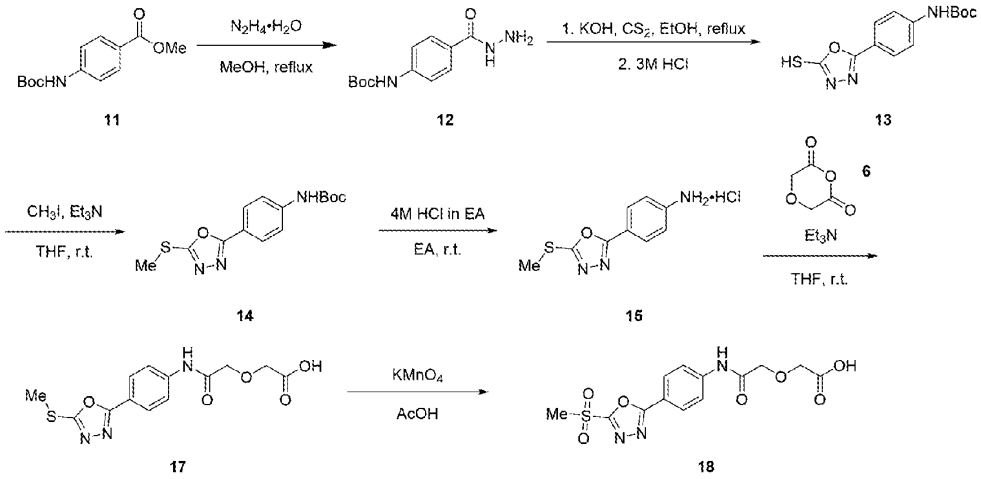
实施例 22：抗体药物偶联物（ADC）Hab33B10E8-045 的制备

22.1 化合物 045 的制备



045

1、中间体化合物 18 的制备



将化合物 **11** (47.5 g, 189 mmol)和甲醇(250 mL)加入反应瓶中，室温下缓慢加入 80％水合肼(35.4 g，567 mmol)，升温至 70 ℃回流反应 6 小时结束。冷却后析出白色晶体，抽滤，甲醇(20 mL×3)洗涤剩余固体，得白色固体 **12**（47.47 g，产率 100%）。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 252.1，实验值 252.2。

将化合物 **12** (47.4 g, 189 mmol)、氢氧化钾(12.7 g, 227 mmol)和乙醇(400 mL)加入反应瓶中，室温搅拌溶解。缓慢加入二硫化碳(17 g, 283 mmol) 后升温至 100 ℃回流反应 5 小时结束。减压移去溶剂后加入水(50 mL)，用稀盐酸调 pH 为 6，用二氯甲烷萃取（100 mL×3），合并有机相，用饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩，残余物通过硅胶色谱纯化，得到化合物 **13**（49.9 g，产率 90%）。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 294.1，实验值 294.3。

在反应瓶中加入化合物 **13** (5.86 g，20 mmol)、三乙胺(2.42 g，24 mmol)和四氢呋喃(36 mL)，向上述反应液中加入碘甲烷(3.12 g，22 mmol)。在 25 ℃ 下搅拌反应 1.5 小时后反应结束，减压移去溶剂，残余物通过硅胶色谱纯化，得到化合物 **14**（4.05 g，产率 66%）。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 308.1，实验值 308.2。

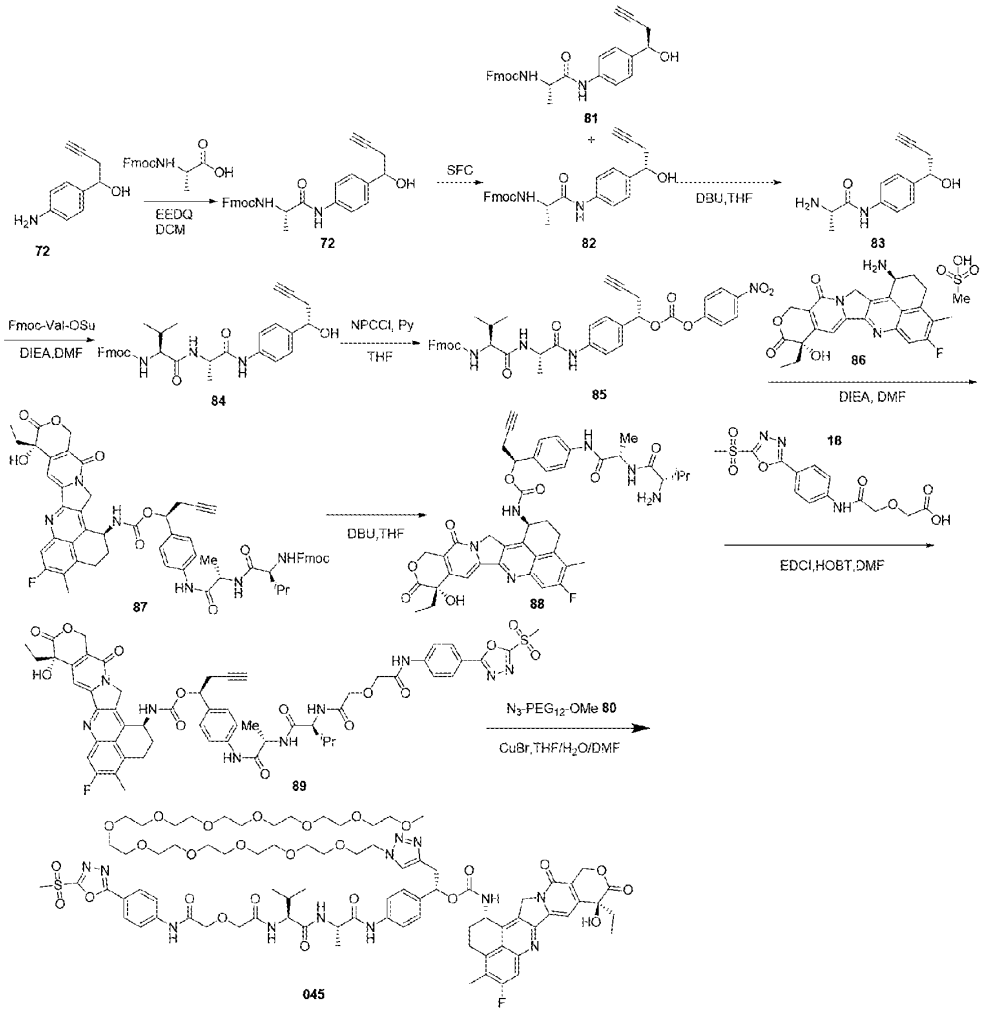
将化合物 **14** (3.3 g, 10.6 mmol)和乙酸乙酯(20 mL)加入反应瓶中，在 25 ℃下滴加氯化氢

乙酸乙酯溶液(2.7 mL, 4 M)，继续反应 6 小时，减压移去溶剂后得到粗产物 **15**，直接投下一步反应。

将粗产物 **15**、二甘醇酐 **6** (1.35 g, 11.7 mmol)、三乙胺(2.14 g, 21.2 mmol)和四氢呋喃(30 mL)加入反应瓶中，25 ℃反应 1.5 小时，减压移去溶剂，残余物加入乙醚，抽滤后用水和乙醚洗涤，得化合物 **17**（3.4 g，产率 99%）。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 324.1，实验值 324.2。

将化合物 **17** (3.4 g, 10.5 mmol)和冰醋酸(20 mL)加入反应瓶中，待溶解后，在 0℃加入高锰酸钾(2.48 g, 15.7 mmol)，恢复至 25 ℃反应 1 小时，加入饱和亚硫酸钠溶液至溶液变为无色，用乙酸乙酯萃取（100 mL×3），合并有机相，用饱和食盐水洗，无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩，残余物通过硅胶色谱纯化，得到化合物 **18**（2.4 g，产率 65%）。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 356.0，实验值 356.0。

2、化合物 045 的制备



0 摄氏度下，将 1-(4-氨基苯基)-3-丁炔-1-醇(4997 mg, 31 mmol)、N-芴甲氧羰基-L-丙氨酸

(9651 mg, 31 mmol)、EEDQ(11498 mg, 46.5 mmol)和超干 DCM (90 mL)加入反应瓶。反应 3h 后，减压移去溶剂，残余物中加入 500 mL MTBE 打浆，得到化合物 **72** (9007 mg，产率 64%, *dr* =1:1)。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 455.2，实验值 455.2。

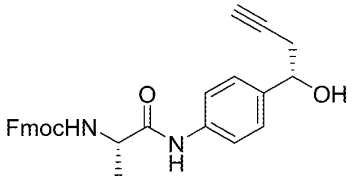
中间体 **72** (保留时间 13.55 min，16.29 min)的手性拆分：将化合物 **72**(50 g)经 SFC 拆分得到 **81** (19 g，保留时间 13.55 min)和 **82** (20 g，保留时间 16.29 min)。SFC 拆分方法：柱型号：DAICEL CHIRALCEL OD(250mm-50mm,10um)；流动相：A：CO_2，B：CO_2-ACN/i-PrOH(O.1% NH_3H_2O)；等度洗脱：B in A for 50%；流速：200mL/min；检测仪：PDA；柱温：25 ºC；背压：100 Bar；

HPLC 方法：仪器信息：Thermo 液相色谱仪（ADC-U3000-01）；色谱柱：CHIRALPAK®ID（4.6*150 mm，5 μm）；柱温：25℃；进样盘温度：25℃；流动相：A：10 mM NH_4FA；B：ACN； 流速：0.8 mL/min；检测波长：254 nm；进样体积：2 μl；

梯度条件：

Time(min)	A%	B%
0	40.0	60.0
30.000	40.0	60.0

经 X-RAY 确认，化合物 **82** 的结构及构型如下：其单晶衍射图参见图 16：



82

0 摄氏度下，将 **82** (3632 mg, 8 mmol)，90 mL THF (市售)加入反应瓶。搅拌并缓慢加入 DBU (1215 mg, 8 mmol)，反应半小时后移至室温。TLC 监测原料消失后，减压移去溶剂，残余物通过硅胶色谱纯化（DCM/MeOH 95:5），得到化合物 **83** (1707 mg，产率 92%)。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 233.1，实验值 233.2。

将化合物 **83** (1624 mg, 7 mmol)、Fmoc-Val-OSu(362 mg, 8.4 mmol)和 N,N-二甲基甲酰胺(150 mL)加入反应瓶，搅拌并缓慢滴加 DIEA (1158 uL, 7 mmol)，25 ℃反应 12 小时，减压移去溶剂，加入 50 mL EA 和 50 mL PE 打浆，析出白色固体，重复三次，得到化合物 **84**。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 554.3，实验值 554.4。

将化合物 **84**(1661 mg, 3 mmol)、氯甲酸对硝基苯酯(1206 mg, 6 mmol)和 THF(150 mL)加入反应瓶，搅拌并滴加 Py (474 uL, 6 mmol)，65 ℃反应 1 小时，减压移去溶剂，残余物通过硅胶色谱纯化（DCM/MeOH 98:2），得到化合物 **85**（1831 mg，产率 85%）。MS(ESI) : $(M+H)^+$

计算值 719.8，实验值 719.9。

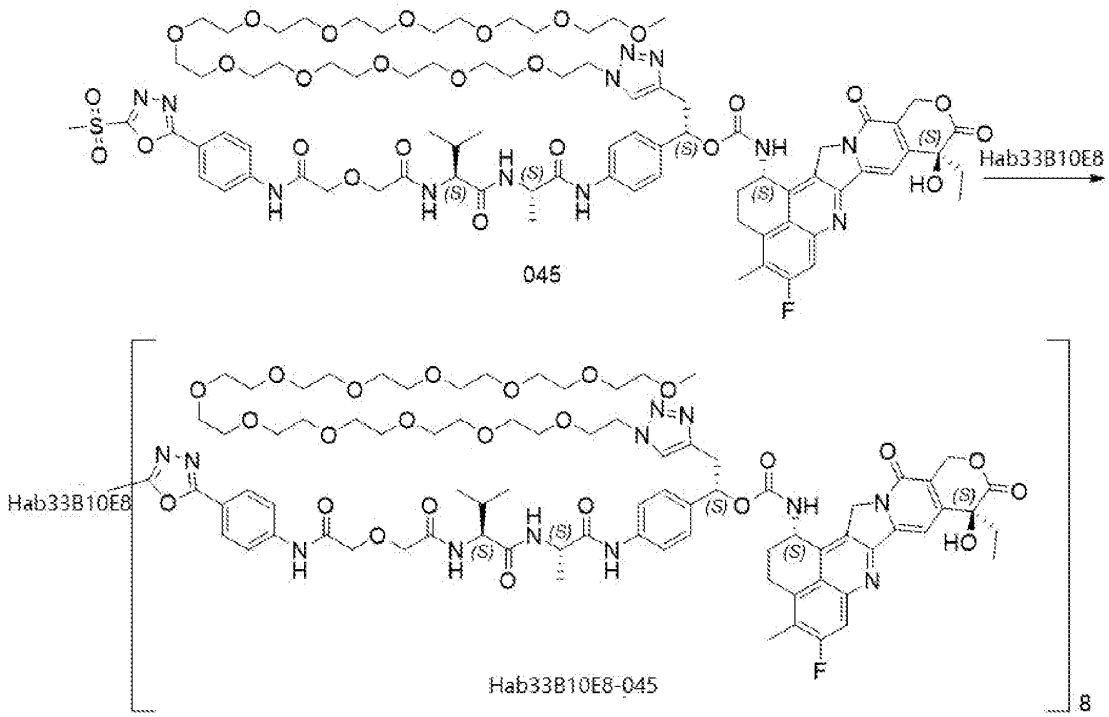
将化合物 **85** (1436 mg, 2 mmol)、依喜替康甲磺酸盐 **86** (1168.2 mg, 2.2 mmol)和 N,N-二甲基甲酰胺(100 mL)加入反应瓶，搅拌并缓慢滴加 DIEA (695 uL, 4 mmol)，25 ℃反应 20 小时，减压移去溶剂，残余物通过硅胶色谱纯化（DCM/MeOH 95:5），得到化合物 **87**（1664 mg，产率 82%）。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 1015.4，实验值 1015.1。

0 摄氏度下，将 **87** (1522 mg, 1.5 mmol)，40 mL THF (市售)加入反应瓶。搅拌并缓慢加入 DBU (228 mg, 1.5 mmol)，反应半小时后移至室温继续反应 40 分钟，直至 TLC 原料消失。将反应液真空浓缩除去 THF，加入 15 mL DCM 和 300 mL PE，产生大量黄绿色固体，布氏漏斗滤出固体 **88** (1177 mg，产率 99%)。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 793.3，实验值 793.6。

将化合物 **88** (1031 mg, 1.3 mmol)、**18** (554 mg, 1.56 mmol)、EDCI (498 mg, 2.6 mmol) 、HOBT (263 mg, 1.95 mmol)和 N,N-二甲基甲酰胺(20 mL)加入反应瓶，25 ℃反应 1 小时，减压移去溶剂，残余物通过 C18 纯化（60% ACN/0.05% 甲酸 in H_2O），冻干得到化合物 **89**（1322mg，产率 90%）。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 1130.4，实验值 1130.7。

将化合物 **89** (903 mg, 0. 8 mmol)、化合物 **80** (702 mg, 1.2 mmol)、三(3-羟丙基三唑甲基)胺(34.7 mg, 0.08 mmol)和溴化亚铜(11.4 mg, 0.08 mmol)加入反应瓶，换氮气三次，加入 THF/DMF/H_2O(3.5 mL: 0.6 mL: 0.4 mL)，25 ℃反应 0.5 小时，残余物通过 C18 制备纯化（62% ACN/0.05% 甲酸 in H_2O），得到化合物 **045**（1276 mg，产率 93%）。MS(ESI) : $(M+H)^+$ 计算值 1715.7，实验值 1716.2。^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 10.71 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.48 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 3H), 8.09 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.42 – 7.36 (m, 3H), 6.61 (s, 1H), 6.02 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 5.55 (s, 2H), 5.38 -5.26 (m, 3H), 4.55 – 4.47 (m, 3H), 4.46 – 4.41 (m, 1H), 4.36 (q, *J* = 15.6 Hz, 2H), 4.28 (s, 2H), 3.80 (s, 5H), 3.62 – 3.55 (m, 36H), 3.52 – 3.47 (m, 9H), 3.44 – 3.36 (m, 2H), 3.30 -2.29 (m, 1H), 3.19 – 3.09 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.28 – 2.19 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.17 – 2.10 (m,1H), 2.04 – 1.89 (m, 2H), 1.42 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.02 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.98 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H)。

22.2 抗体药物偶联物（ADC）Hab33B10E8-045 的制备



使用磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)将抗体 Hab33B10E8 浓度调整为 10 g/L，将换液后抗体溶液放入离心管，加入 10.0 当量 5 mM TCEP (Adamas-beta, Ltd.)，在 37°C 下反应 1 小时，使抗体链间二硫键被还原成巯基。随后，加入 20mM 溶于 DMSO 的化合物 045 的溶液(每个抗体对应 12 当量的 045)。在 25°C 下反应 1 小时。偶联完溶液经由超滤膜包（Cobetter, Ltd.）移除残留连接子毒素，储存至 PBS 溶液 pH 7.4。通过反相色谱测得每个抗体平均载药量约为 8。

实施例 23：酶联免疫吸附法测定 Hab33B10E8-045 的结合活性实验

采用 ELISA 方法测定抗体与重组人 DLL3 蛋白的亲和力，将人 DLL3 蛋白（恺佧生物，货号：DLL-HM103）稀释至终浓度为 0.1 μg/ml，分别铺到 96 孔酶标板 4℃过夜，次日弃上清，封闭完成后加入 4 倍梯度稀释的抗体（0-100 nM），经过二抗孵育后通过 TMB 显色液显色 10 min，加入 2 M 的 HCl 终止反应后，酶标仪读取 450 nm 的吸光度值，计算 EC_{50}。结果如表 24 所示，Hab33B10E8-045 与人 DLL3 蛋白的亲和力与未偶联前 Hab33B10E8 的结合能力基本相当。

表 24. 酶联免疫吸附法测定 Hab33B10E8-045 的结合活性实验

编号	EC50(nM)	Emax
Hab33B10E8	0.001873	2.5
Hab33B10E8-045	0.006276	2.5

实施例 24：Hab33B10E8-045 体外细胞毒性

以 DLL3 阳性细胞株 NCI-H82、SHP77、NCI-H526、NCI-H209 和 DLL3 阴性细胞株 A431 、NCI-H69 评价 Hab33B10E8-045 介导的体外细胞毒性。收获细胞，用梯度稀释的 Hab33B10E8-045 培养，然后在 37℃孵育。使用 CTL Plus 在 6 天后测定生存能力。在 EnVision 2105（PerkinElmer）上读取和分析，以确定 IC_{50}（半最大抑制浓度）值。

实验过程：将检测细胞调整细胞密度为 6.7×10^4/mL，并以每孔 75μL 接种到 96 孔板中，置 37℃，5% CO_2 培养箱中培养过夜。加入 5 倍梯度稀释的 Hab33B10E8-045（0-100 nM）共 9 个浓度梯度，每孔 75μL 加入到细胞中。空白对照为对应细胞的培养基。每个浓度设置 2 个复孔。细胞放在 37℃，5% CO_2 培养箱中培养 6 天后，加入 50μL CTL Plus（厂家：碧云天，货号：C0068XL）发光试剂，在室温下避光孵育 10 min。在酶标仪 EnVision 2105 进行化学发光检测。数据分析整理：以空白对照为零杀伤对照，计算抑制率公式如下：抑制率（%）=（1-试验组/空白对照组）× 100%。用 GraphPad Prism 处理和分析数据计算 IC_{50}。结果如表 25 所示。结果表明，Hab33B10E8-045 对 DLL3 阳性细胞株具有良好的体外细胞毒性。

表 25. Hab33B10E8-045 体外细胞毒性

细胞系	IC_{50} (nM)
NCI-H82	4.4
SHP77	36.56
NCI-H526	16.71
NCI-H209	1.07
NCI-69	>100
A431	>100

实施例 25：Hab33B10E8-045 在人小细胞肺癌 SHP77 异种移植瘤小鼠模型中药效学评价

从 DLL3-阳性细胞株 SHP77 取 10^7 个细胞分别接种于 nu/nu 裸鼠的右前肢腋下(每组 7 只)。当小鼠平均肿瘤体积到达 100 mm^3 左右，将小鼠分别随机分组，给药方式是单次静脉注射。分组当天设定为第 0 天，给药开始于第 0 天。肿瘤接种后，常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低(体重每周测量 2 次)情况，眼睛、皮毛及其它异常情况。肿瘤体积计算公式: 肿瘤体积(mm^3)=1/2×(a×b^2)(其中 a 表示长径,b 表示短径),试验药物药效学评价如表 26。

表 26. 试验药物在肺癌移植异种移植 SHP-P77 小鼠模型中药效学评价

组别	剂 量 (mg/kg)	平均肿瘤体积瘤(Day 0)[a]	平均肿瘤体积瘤(Day 22)[a]	TGI(%)[b]	*P* value vs 对照组 [c]
溶媒对照(生理盐水)	-	104.1±15.0	2932.5±443.9	-	-
Hab33B10E8-045	1	104.1±14.5	158.3±82.4	98.1	< 0.0001

注:a.数据以“平均值土标准误差”表示；b. TGI % = [1 - (Ti –T0) / (Ci-C0)] ×l00 其中 T0 及 C0 分别是给药组及溶媒对照组分组当天(Day 0)平均肿瘤体积，Ti 及 Ci 分别是给药组及溶媒对照组 Day 22 时的平均肿瘤体积；c.与溶媒对照组肿瘤体积相比;

与溶媒对照组相比，本发明的 ADC 在 1 mg/kg 剂量下显著抑制 SHP-77 模型的肿瘤生长，肿瘤生长抑制率(TGI)为 98.1%；治疗组无动物死亡及显著动物体重降低，未见明显的药物毒性反应，治疗期间小鼠对本发明 ADC 耐受性良好。

实施例 26：Hab33B10E8-045 在人小细胞肺癌 NCI-H526 及 NCI-H69 异种移植瘤小鼠模型中药效学评价

从 DLL3-阳性细胞株 NCI-H526 取 10^7 个细胞分别接种于 nu/nu 裸鼠的右前肢腋下(每组 3 只)。当小鼠平均肿瘤体积到达 160 mm^3(1~2 组)左右，将小鼠分别随机分组给药，给药方式是单次静脉注射。分组当天设定为第 0 天，给药开始于第 0 天。肿瘤接种后，常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低(体重每周测量 2 次)情况，眼睛、皮毛及其它异常情况。肿瘤体积计算公式: 肿瘤体积(mm^3)=1/2×(a×b^2)(其中 a 表示长径,b 表示短径)。试验药物药效学评价如表 27。

表 27. 试验药物在人小细胞肺癌移植异种移植 NCI-H526 小鼠模型中药效学评价

组别	剂 量 (mg/kg)	平均肿瘤体积(Day 0)[a]	平均肿瘤体积 (Day 21)[a]	TGI(%)[b]
溶媒对照(生理盐水)	-	160.4±40.5	970.0±589.8	-
Hab33B10E8-045	3	162.7±21.1	57.3±49.7	113.0

从 DLL3-阳性细胞株 NCI-H69 取 10^7 个细胞分别接种于 nu/nu 裸鼠的右前肢腋下(每组 3 只)。当小鼠平均肿瘤体积到达 140mm^3(1~2 组)左右，将小鼠分别随机分组给药，给药方式是单次静脉注射。分组当天设定为第 0 天，给药开始于第 0 天。肿瘤接种后，常规监测包括了

肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低(体重每周测量 2 次)情况，眼睛、皮毛及其它异常情况。肿瘤体积计算公式: 肿瘤体积(mm^3)=1/2×(a×b^2)(其中 a 表示长径,b 表示短径)。试验药物药效学评价如表 28。

表 28. 试验药物在人小细胞肺癌移植异种移植 NCI-H69 小鼠模型中药效学评价

组别	剂 量 (mg/kg)	平均肿瘤体积(Day 0)[a]	平均肿瘤体积 (Day 14)[a]	TGI(%)[b]
溶媒对照(生理盐水)	-	137.1±59.1	908.4±54.3	-
Hab33B10E8-045	3	142.7±53.2	323.7±244.6	76.5

在 NCI-H526 和 NCI-H69 模型中，与溶媒对照组相比，本发明的 ADC 在 3mg/kg 剂量下均显著抑制 NCI-H526 和 NCI-H69 模型的肿瘤生长，肿瘤生长抑制率(TGI)分别为 113.0%、76.5%；各治疗组无动物死亡及显著动物体重降低，未见明显的药物毒性反应，治疗期间小鼠对本发明 ADC 耐受性良好。

实施例 27：评估 ADC 在食蟹猴体内的毒代动力学和耐受性

选择食蟹猴(雌，2 只)，每 2 周间隔（总共 3 次剂量）以 10、30 和 30 mg/kg 的剂量水平静脉内给予 Hab33B10E8-045（5 mg/mL，30 分钟注射完成）。研究期间评估的参数包括一般观察、体重、摄食量、体温、心电图（II 导联）、临床病理（血液学、血生化、凝血）以及大量组织的宏观和微观检查。毒代动力学样品分别在每次给药完成后的 0、24、72、120、336 和 504h 收集。采用 MesoScale Discovery (MSD)电化学发光平台(总单抗、总 ADC)和 LC-MS/MS(游离依喜替康)对 TK 样品进行分析。实验表明，Hab33B10E8-045 耐受性良好，MTD 为 30mg/kg，可能存在更高的 MTD。在剂量考察中，注射 10、30、30 mg/kg Hab33B10E8-045 后，食蟹猴一般观察未见异常，体重、体温、凝血、尿液分析中未观察到任何毒理学异常。所有变化在每次给药前均可恢复。Hab33B10E8-045 在食蟹猴中耐受性良好，表现出稳定的药代动力学特征。

表 29. Hab33B10E8-045 在食蟹猴体内的毒代动力学和耐受性

测试 ADC	临床观察	血液学	血生化
Hab33B10E8-045	未有异常	WBC; Lymph; LYM; RET%↓;	CK↓;

权 利 要 求 书

1、抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，包括重链可变区，所述重链可变区包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中：

（1）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.25 所示序列或与 SEQ ID NO.25 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.26 所示序列或与 SEQ ID NO.26 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.27 所示序列或与 SEQ ID NO.27 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.1 所示序列或与 SEQ ID NO.1 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.2 所示序列或与 SEQ ID NO.2 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.3 所示序列或与 SEQ ID NO.3 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.9 所示序列或与 SEQ ID NO.9 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.10 所示序列或与 SEQ ID NO.10 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.11 所示序列或与 SEQ ID NO.11 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（4）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.17 所示序列或与 SEQ ID NO.17 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.18 所示序列或与 SEQ ID NO.18 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.19 所示序列或与 SEQ ID NO.19 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或

（5）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.33 所示序列或与 SEQ ID NO.33 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.34 所示序列或与 SEQ ID NO.34 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.35 所示序列或与 SEQ ID NO.35 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

2、抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，包括轻链可变区，所述轻链可变区包括 LCDR1、

LCDR2 和 LCDR3，其中：

（1）LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.28 所示序列或与 SEQ ID NO.28 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.29 所示序列或与 SEQ ID NO.29 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.30 所示序列或与 SEQ ID NO.30 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.4 所示序列或与 SEQ ID NO.4 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.5 所示序列或与 SEQ ID NO.5 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.6 所示序列或与 SEQ ID NO.6 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.12 所示序列或与 SEQ ID NO.12 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.13 所示序列或与 SEQ ID NO.13 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.14 所示序列或与 SEQ ID NO.14 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（4）LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.20 所示序列或与 SEQ ID NO.20 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.21 所示序列或与 SEQ ID NO.21 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.22 所示序列或与 SEQ ID NO.22 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或

（5）LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.36 所示序列或与 SEQ ID NO.36 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.37 所示序列或与 SEQ ID NO.37 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.38 所示序列或与 SEQ ID NO.38 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

3、抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中：

（1）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.25 所示序列或与 SEQ ID NO.25 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.26 所示序列或与

SEQ ID NO.26 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.27 所示序列或与 SEQ ID NO.27 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.28 所示序列或与 SEQ ID NO.28 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.29 所示序列或与 SEQ ID NO.29 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.30 所示序列或与 SEQ ID NO.30 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.1 所示序列或与 SEQ ID NO.1 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.2 所示序列或与 SEQ ID NO.2 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.3 所示序列或与 SEQ ID NO.3 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.4 所示序列或与 SEQ ID NO.4 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.5 所示序列或与 SEQ ID NO.5 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.6 所示序列或与 SEQ ID NO.6 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.9 所示序列或与 SEQ ID NO.9 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.10 所示序列或与 SEQ ID NO.10 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.11 所示序列或与 SEQ ID NO.11 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.12 所示序列或与 SEQ ID NO.12 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.13 所示序列或与 SEQ ID NO.13 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.14 所示序列或与 SEQ ID NO.14 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（4）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.17 所示序列或与 SEQ ID NO.17 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.18 所示序列或与 SEQ ID NO.18 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.19 所示序列或与 SEQ ID NO.19 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.20 所示序列或与 SEQ ID NO.20

所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.21 所示序列或与 SEQ ID NO.21 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.22 所示序列或与 SEQ ID NO.22 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或

（5）HCDR1 的序列为 SEQ ID NO.33 所示序列或与 SEQ ID NO.33 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 的序列为 SEQ ID NO.34 所示序列或与 SEQ ID NO.34 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 的序列为 SEQ ID NO.35 所示序列或与 SEQ ID NO.35 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR1 的序列为 SEQ ID NO.36 所示序列或与 SEQ ID NO.36 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 的序列为 SEQ ID NO.37 所示序列或与 SEQ ID NO.37 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性序列，和 LCDR3 的序列为 SEQ ID NO.38 所示序列或与 SEQ ID NO.38 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

4、权利要求 1-3 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段为鼠源、嵌合、人源化或全人抗体或抗原结合片段，优选地，所述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或抗原结合片段。

5、权利要求 1-4 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区，其中：

（1）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.31 所示序列或与 SEQ ID NO.31 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，或所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.58 所示序列或与 SEQ ID NO.58 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.7 所示序列或与 SEQ ID NO.7 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，或所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.54 所示序列或与 SEQ ID NO.54 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.15 所示序列或与 SEQ ID NO.15 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（4）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.23 所示序列或与 SEQ ID NO.23 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，或所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.56

所示序列或与 SEQ ID NO.56 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或

（5）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.39 所示序列或与 SEQ ID NO.39 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

6、权利要求 1-4 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包括轻链可变区，其中：

（1）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.32 所示序列或与 SEQ ID NO.32 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，或所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.59 所示序列或与 SEQ ID NO.59 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.8 所示序列或与 SEQ ID NO.8 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，或所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.55 所示序列或与 SEQ ID NO.55 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.16 所示序列或与 SEQ ID NO.16 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（4）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.24 所示序列或与 SEQ ID NO.24 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，或所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.57 所示序列或与 SEQ ID NO.57 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（5）所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.40 所示序列或与 SEQ ID NO.40 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

7、权利要求 1-4 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，其中：

（1）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.31 所示序列或与 SEQ ID NO.31 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.32 所示序列或与 SEQ ID NO.32 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.58 所示序列或与 SEQ ID NO.58 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.59

所示序列或与 SEQ ID NO.59 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.7 所示序列或与 SEQ ID NO.7 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.8 所示序列或与 SEQ ID NO.8 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.54 所示序列或与 SEQ ID NO.54 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.55 所示序列或与 SEQ ID NO.55 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.15 所示序列或与 SEQ ID NO.15 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.16 所示序列或与 SEQ ID NO.16 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（4）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.23 所示序列或与 SEQ ID NO.23 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.24 所示序列或与 SEQ ID NO.24 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.56 所示序列或与 SEQ ID NO.56 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.57 所示序列或与 SEQ ID NO.57 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（5）所述重链可变区序列为 SEQ ID NO.39 所示序列或与 SEQ ID NO.39 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，所述轻链可变区序列为 SEQ ID NO.40 所示序列或与 SEQ ID NO.40 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

8、权利要求 1-7 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗原结合片段为 Fv、VHH、scFv、Fab、Fab’或（Fab’）$_2$。

9、权利要求 1-7 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗 DLL3 抗体为全长抗体。

10、权利要求 9 所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗 DLL3 抗体是 IgG 抗体，优选地，所述抗 DLL3 抗体是 IgG1 抗体。

11、权利要求 10 所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗 DLL3 抗体的 Fc 区包含降低 ADCC、CDC 和/或 ADCP 效应的氨基酸突变。

12、权利要求 11 所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述氨基酸突变为选自下组突变的一个或多个氨基酸突变：L234A、L235A、P329A 和 P331S。

13、编码权利要求 1-12 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段的核酸分子。

14、包含权利要求 13 所述的核酸分子的表达载体。

15、包含权利要求 14 所述表达载体的宿主细胞。

16、一种双特异性抗体，具有第一抗原结合位点以及第二抗原结合位点，其中一个抗原结合位点包含权利要求 1-12 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段。

17、一种双特异性抗体，具有第一抗原结合位点以及第二抗原结合位点，其中一个抗原结合位点包含权利要求 1-12 任一项所述的一种抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，另一个抗原结合位点包含权利要求 1-12 任一项所述的另一种抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段。

18、权利要求 17 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的第一抗原结合位点和第二抗原结合位点结合同一抗原的不同表位。

19、权利要求 18 所述的双特异性抗体，其特征在于，

（1）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1 序列为 SEQ ID NO.25 所示序列或与 SEQ ID NO.25 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 序列为 SEQ ID NO.26 所示序列或与 SEQ ID NO.26 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 序列为 SEQ ID NO.27 所示序列或与 SEQ ID NO.27 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1 序列为 SEQ ID NO.28 所示序列或与 SEQ ID NO.28 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 序列为 SEQ ID NO.29 所示序列或与 SEQ ID NO.29 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 LCDR3 序列为 SEQ ID NO.30 所示序列或与 SEQ ID NO.30 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；所述第二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1 序列为 SEQ ID NO.17 所示序列或与 SEQ ID NO.17 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 序列为 SEQ ID NO.18 所示序列或与 SEQ ID NO.18 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 序列为 SEQ ID NO.19 所示序列或与 SEQ ID NO.19 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1 序列为 SEQ ID NO.20 所示序列或与 SEQ ID NO.20 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同

一性的序列，LCDR2 序列为 SEQ ID NO.21 所示序列或与 SEQ ID NO.21 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 LCDR3 序列为 SEQ ID NO.22 所示序列或与 SEQ ID NO.22 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1 序列为 SEQ ID NO.25 所示序列或与 SEQ ID NO.25 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 序列为 SEQ ID NO.26 所示序列或与 SEQ ID NO.26 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 序列为 SEQ ID NO.27 所示序列或与 SEQ ID NO.27 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1 序列为 SEQ ID NO.28 所示序列或与 SEQ ID NO.28 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 序列为 SEQ ID NO.29 所示序列或与 SEQ ID NO.29 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 LCDR3 序列为 SEQ ID NO.30 所示序列或与 SEQ ID NO.30 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；所述第二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1 序列为 SEQ ID NO.1 所示序列或与 SEQ ID NO.1 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 序列为 SEQ ID NO.2 所示序列或与 SEQ ID NO.2 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 序列为 SEQ ID NO.3 所示序列或与 SEQ ID NO.3 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1 序列为 SEQ ID NO.4 所示序列或与 SEQ ID NO.4 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 序列为 SEQ ID NO.5 所示序列或与 SEQ ID NO.5 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 LCDR3 序列为 SEQ ID NO.6 所示序列或与 SEQ ID NO.6 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；或

（3）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1 序列为 SEQ ID NO.17 所示序列或与 SEQ ID NO.17 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 序列为 SEQ ID NO.18 所示序列或与 SEQ ID NO.18 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 序列为 SEQ ID NO.19 所示序列或与 SEQ ID NO.19 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1 序列为 SEQ ID NO.20 所示序列或与 SEQ ID NO.20 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 序列为 SEQ ID NO.21 所示序列或与 SEQ ID NO.21 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 LCDR3 序列为 SEQ ID NO.22 所示序列或与 SEQ ID NO.22 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；所述第

二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区中，HCDR1 序列为 SEQ ID NO.1 所示序列或与 SEQ ID NO.1 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，HCDR2 序列为 SEQ ID NO.2 所示序列或与 SEQ ID NO.2 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 HCDR3 序列为 SEQ ID NO.3 所示序列或与 SEQ ID NO.3 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区中，LCDR1 序列为 SEQ ID NO.4 所示序列或与 SEQ ID NO.4 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，LCDR2 序列为 SEQ ID NO.5 所示序列或与 SEQ ID NO.5 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，和 LCDR3 序列为 SEQ ID NO.6 所示序列或与 SEQ ID NO.6 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列。

20、权利要求 19 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述双特异性抗体为 IgG 样双特异性抗体，其中左臂为第一抗原结合位点，右臂为第二抗原结合位点。

21、权利要求 20 所述的双特异性抗体，其中，

（1）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区序列为 SEQ ID NO.31 所示序列或与 SEQ ID NO.31 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区序列为 SEQ ID NO.32 所示序列或与 SEQ ID NO.32 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；所述第二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区序列为 SEQ ID NO.23 所示序列或与 SEQ ID NO.23 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区序列为 SEQ ID NO.24 所示序列或与 SEQ ID NO.24 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（2）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区序列为 SEQ ID NO.31 所示序列或与 SEQ ID NO.31 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区序列为 SEQ ID NO.32 所示序列或与 SEQ ID NO.32 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；所述第二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区序列为 SEQ ID NO.7 所示序列或与 SEQ ID NO.7 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区序列为 SEQ ID NO.8 所示序列或与 SEQ ID NO.8 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；

（3）所述第一抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区序列为 SEQ ID NO.23 所示序列或与 SEQ ID NO.23 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列，轻链可变区序列为 SEQ ID NO.24 所示序列或与 SEQ ID NO.24 所示序列具有 85%、90%、95%、98%或 99%同一性的序列；所述第二抗原结合位点包括重链可变区和轻链可变区，其

中重链可变区序列为SEQ ID NO.7所示序列或与SEQ ID NO.7所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列，轻链可变区序列为SEQ ID NO.8所示序列或与SEQ ID NO.8所示序列具有85%、90%、95%、98%或99%同一性的序列。

22、权利要求20-21任一项所述的双特异性抗体，其特征在于，所述双特异性抗体为IgG1抗体；优选地，在所述双特异性抗体的Fc区包含降低ADCC、CDC和/或ADCP效应的氨基酸突变；和/或便于所述双特异性抗体纯化的形成杵和/或臼的氨基酸突变；优选地，所述的双特异性抗体在第一重链和第一轻链之间或第二重链和第二轻链之间携带CH1-CL链交换；优选地，所述的双特异性抗体的Fc区包含位于CH3区便于所述双特异性抗体纯化的形成杵和/或臼的氨基酸突变；进一步优选地，形成臼的突变为Y349C, T366S, L368A 和 Y407V，形成杵的突变为S354C、T366W。

23、权利要求22所述的双特异性抗体，其中：

（1）所述双特异性抗体包括2条重链和2条轻链，其中重链1氨基酸序列如SEQ ID NO.41所示，重链2氨基酸序列如SEQ ID NO.43所示，轻链1氨基酸序列如SEQ ID NO.46所示，轻链2氨基酸序列如SEQ ID NO.48所示；

（2）所述双特异性抗体包括2条重链和2条轻链，其中重链1氨基酸序列如SEQ ID NO.41所示，重链2氨基酸序列如SEQ ID NO.50所示，轻链1氨基酸序列如SEQ ID NO.46所示，轻链2氨基酸序列如SEQ ID NO.51所示；

（3）所述双特异性抗体包括2条重链和2条轻链，其中重链1氨基酸序列如SEQ ID NO.52所示，重链2氨基酸序列如SEQ ID NO.50所示，轻链1氨基酸序列如SEQ ID NO.53所示，轻链2氨基酸序列如SEQ ID NO.51所示。

24、编码权利要求16-23任一项所述的双特异性抗体的核酸分子。

25、包含权利要求24所述的核酸分子的表达载体。

26、包含权利要求25所述表达载体的宿主细胞。

27、包含权利要求1-12任一项所述的抗DLL3抗体或其抗原结合片段或权利要求16-23任一项所述的双特异性抗体的抗体-药物缀合物。

28、权利要求27所述的抗体-药物缀合物，其特征在于，所述抗体-药物缀合物通过在权利要求1-12任一项所述的抗DLL3抗体或其抗原结合片段或权利要求16-23任一项所述的双特异性抗体上偶联治疗剂得到。

29、权利要求28所述的抗体-药物缀合物，其特征在于，所述治疗剂选自细胞毒性药物、免疫增强剂或放射性同位素组成的组；优选地，所述治疗剂为选自微管蛋白抑制剂、DNA拓

扑异构酶抑制剂、DNA 损伤剂、抗代谢药或抗肿瘤抗生素的细胞毒性药物；更优选地，所述治疗剂为选自 DXD、SN38、伊立替康、伊立替康盐酸盐、喜树碱、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氯-10-羟基喜树碱、22-羟基旱莲木碱、拓扑替康、勒托替康、贝洛替康、依喜替康、硅基高喜树碱(homosilatecan)、6,8-二溴-2-甲基-3-[2-(D-吡喃木糖基氨基)苯基]-4(3H)-喹唑啉酮、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(苯基甲基)-(2E)-2-丙烯酰胺、2-氰基-3-(3,4-二羟基苯基)-N-(3-羟基苯基丙基)-(E)-2-丙烯酰胺、12-β-D-吡喃葡萄糖基-12,13-二氢-2,10-二羟基-6-[[2-羟基-1-(羟基甲基)乙基]氨基]-5H-吲哚并[2,3-a]吡咯并[3,4-c]咔唑-5,7(6H)-二酮、N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吖啶甲酰胺二盐酸盐或 N-[2-(二甲基氨基)乙基]-4-吖啶甲酰胺的 DNA 拓扑异构酶抑制剂。

30、权利要求 29 所述的抗体-药物缀合物，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段通过连接子与治疗剂缀合，所述连接子可为可裂解连接子或不可裂解连接子。

31、权利要求 27 所述的抗体-药物缀合物，其具有式(I)所示结构：

$A\text{-}(L\text{-}D)_d$ (I)

其中 A 为权利要求 1-12 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，或权利要求 16-23 任一项所述的双特异性抗体；

L 为连接子部分，一端与 A 连接，一端与治疗剂 D 连接；

d 表示治疗剂与 A 的平均摩尔比(又称 DAR，即药物抗体偶联比率)，选自 1 到 12 的整数或小数（如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）；当 d 为小数时，其指每个 A 缀合的连接子-治疗剂（L-D）个数的平均数。

32、权利要求 29 所述的抗体-药物缀合物，其中，A 选自抗体 22B12E5、抗体 25G10A9、抗体 31B6G8、抗体 33B10E8、抗体 44B8H2、Hab22B12E5、Hab31B6G8、Hab33B10E8、33+31、33+22 和 31+22；

其中抗体 22B12E5 具有重链可变区序列 SEQ ID NO.7 和轻链可变区序列 SEQ ID NO.8；

其中抗体 25G10A9 具有重链可变区序列 SEQ ID NO.15 和轻链可变区序列 SEQ ID NO.16；

其中抗体 31B6G8 具有重链可变区序列 SEQ ID NO.23 和轻链可变区序列 SEQ ID NO.24；

其中抗体 33B10E8 具有重链可变区序列 SEQ ID NO.31 和轻链可变区序列 SEQ ID NO.32；

其中抗体 44B8H2 具有重链可变区序列 SEQ ID NO.39 和轻链可变区序列 SEQ ID NO.40；

其中抗体 Hab22B12E5 具有重链可变区序列 SEQ ID NO.54 和轻链可变区序列 SEQ ID NO.55；

其中抗体 Hab31B6G8 具有重链可变区序列 SEQ ID NO.56 和轻链可变区序列 SEQ ID NO.57；

其中抗体 Hab33B10E8 具有重链可变区序列 SEQ ID NO.58 和轻链可变区序列 SEQ ID NO.59；

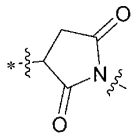
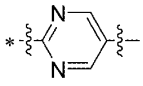
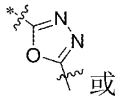
其中抗体 33+31 具有 SEQ ID NO.41 的重链 1、SEQ ID NO.43 的重链 2、SEQ ID NO.46 的轻链 1 和 SEQ ID NO.48 的轻链 2；

其中抗体 33+22 具有 SEQ ID NO.41 的重链 1、SEQ ID NO.50 的重链 2、SEQ ID NO.46 的轻链 1 和 SEQ ID NO.51 的轻链 2；

其中抗体 31+22 具有 SEQ ID NO.52 的重链 1、SEQ ID NO.50 的重链 2、SEQ ID NO.53 的轻链 1 和 SEQ ID NO.51 的轻链 2。

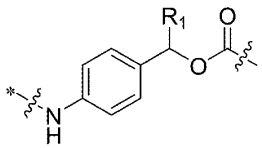
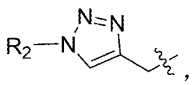
33、权利要求 31-32 任一项所述的抗体-药物缀合物，其中，-L-选自-L_1-L_2-L_3-L_4-，其中，L_1 为共价连接单元，其与 A 共价连接，L_2 为延伸单元，L_3 选自由 2-8 个氨基酸组成的肽残基，L_4 为键或自裂解片段。

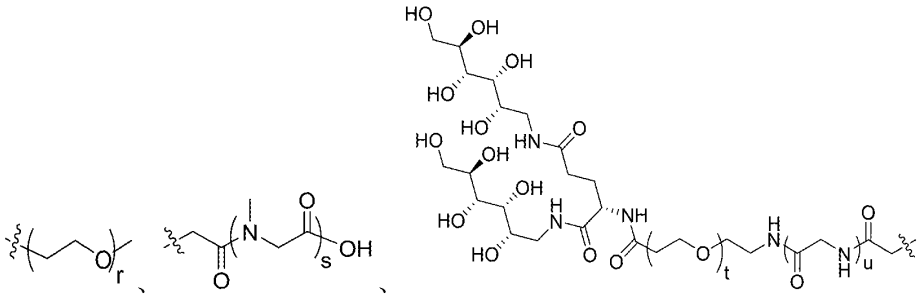
34、权利要求 33 所述的抗体-药物缀合物，其中，

L_1 选自 、、或，其中*表示与 A 连接；

L_2 选自-L_{2a}-、-L_{2a}-C(O)-、-L_{2a}-NH-C(O)-L_{2b}-C(O)-，其中 L_{2a} 和 L_{2b} 各自独立的选自-C_1-C_6 亚烷基-、-C_1-C_3 亚烷基-C_3-C_6 亚环烷基-、-亚乙炔基-C_1-C_6 亚烷基-、-$(CH_2CH_2O)_n$-、-$(CH_2CH_2O)_nC_{1-3}$ 亚烷基-、-C_1-C_3 亚烷基$(CH_2CH_2O)_n$-C_1-C_3 亚烷基-、-C_1-C_3 亚烷基-O-C_1-C_3 亚烷基、苯基、-苯基-C_1-C_3 亚烷基-，其中 n 选自 1-12（优选 3-8，如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）的整数；

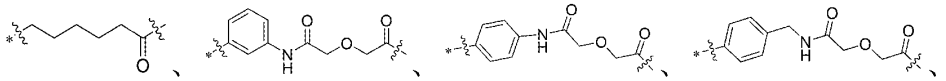
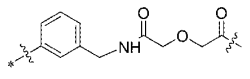
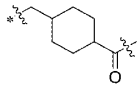
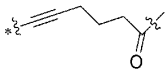
L_3 选自由 2-8 个氨基酸组成的肽残基，所述氨基酸选自苯丙氨酸、缬氨酸、丙氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、脯氨酸、瓜氨酸、天冬氨酸和甘氨酸；

L_4 选自：键、-NCH_2-、，其中 R_1 选自氢、，其中 R_2 选自：



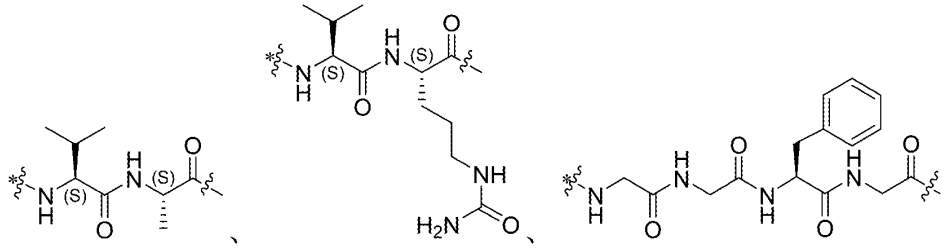
其中，r、s、t、u 各自独立的选自 1-50 的整数（如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50）。

35、权利要求 33-34 任一所述的抗体-药物缀合物，其中，

L_2 选自：、、$(CH_2CH_2O)_nCH_2C(O)$-、-$(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$-、、，其中*位置与 L_1 连接，n 的定义同权利要求 34。

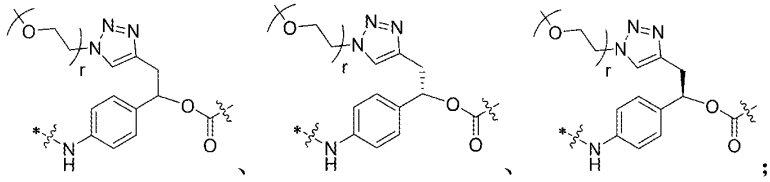
36、权利要求 33-35 任一所述的抗体-药物缀合物，其中，

L_3选自：

，其中*位置与 L_2 连接。

37、权利要求 33-36 任一项所述的抗体-药物缀合物，其中，

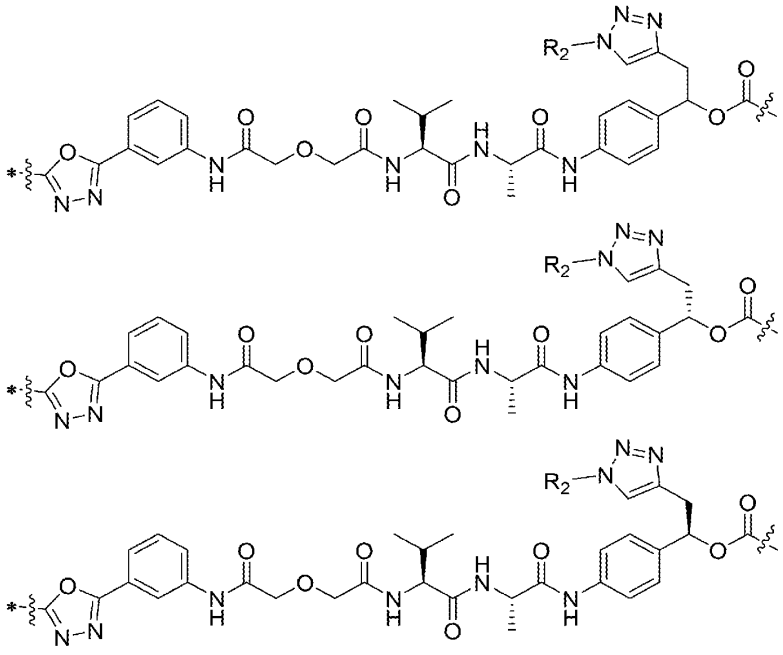
L_4 选自：

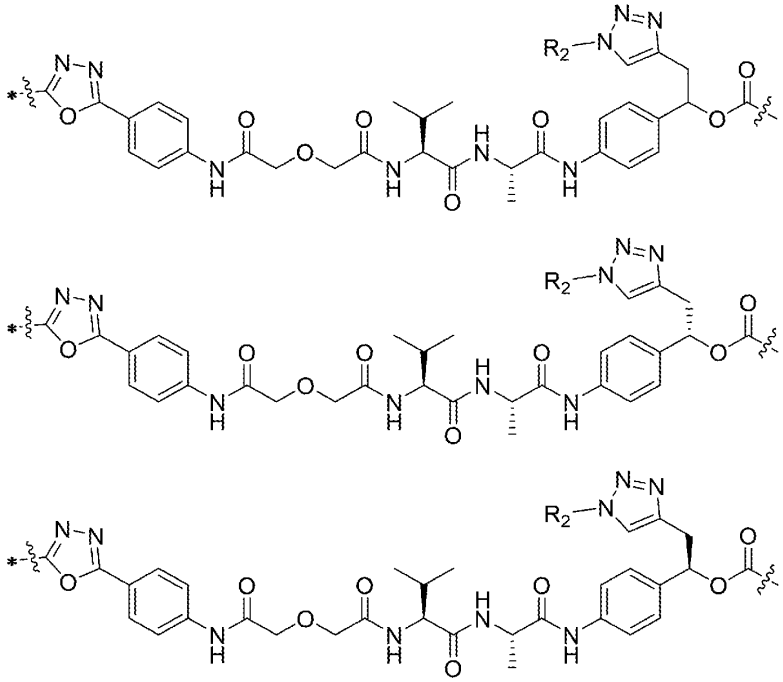
-NCH_2-、；

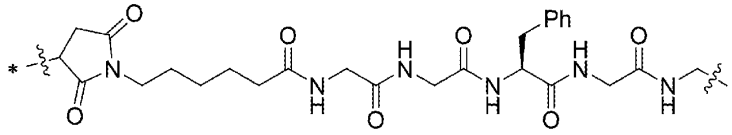
其中，r 选自 1-50 的整数（如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、

16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50）。

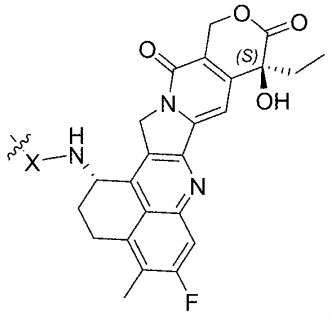
38、权利要求 34 所述的抗体-药物缀合物，其中 L 选自：

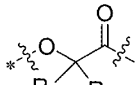




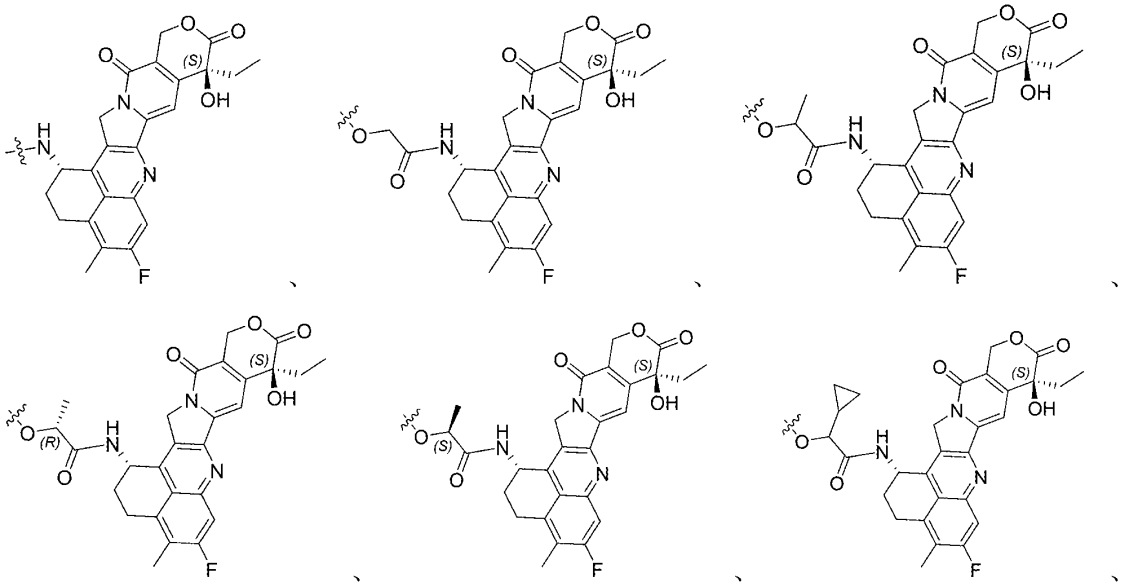

，其中*表示与 A 连接。

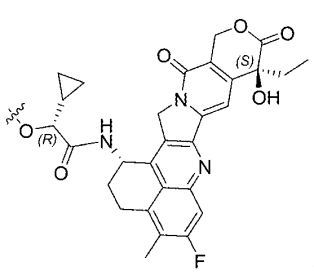
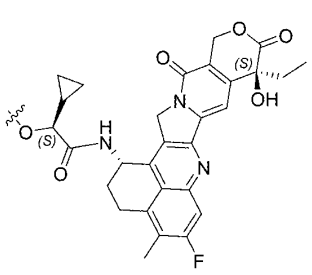
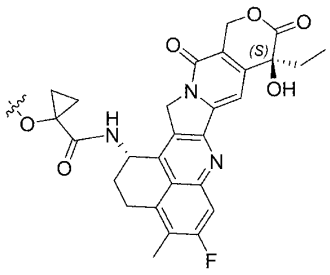
39、权利要求 33-38 任一项所述的抗体-药物缀合物，其中 D 选自：


，

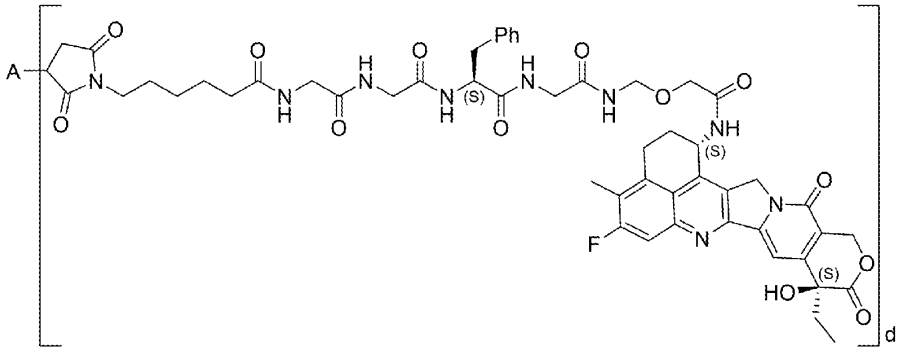

其中 X 选自键、 ，其中 R_3、R_4 各自独立的选自 H、C_{1-3} 烷基（优选甲基、乙基、正丙基、异丙基）、3-6 元环烷基（优选环丙烷基、环丁烷基、环戊烷基、环己烷基），或者 R_3 和 R_4 与连接其的碳原子一起形成 3-6 元环烷基（优选环丙烷基、环丁烷基、环戊烷基、环己烷基），其中*位置与 L_4 相连。

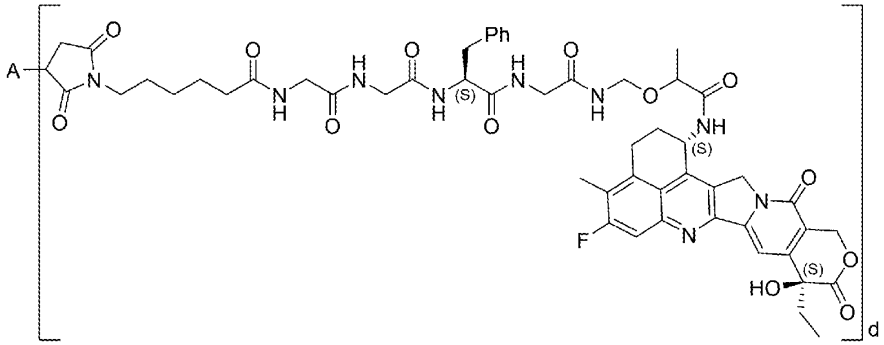
40、权利要求 33-39 任一项所述的抗体-药物缀合物，其中 D 选自：

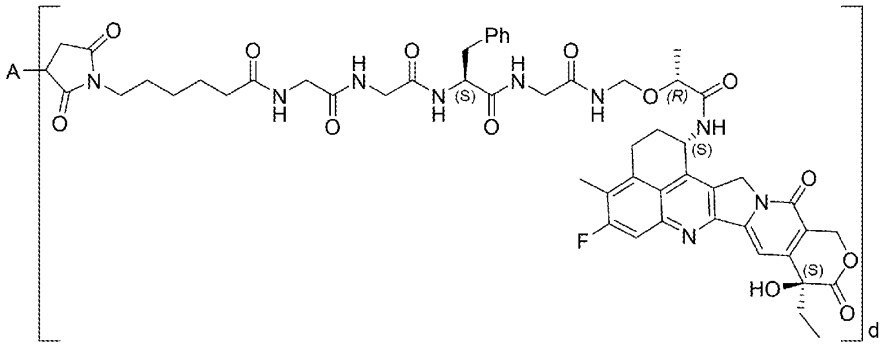


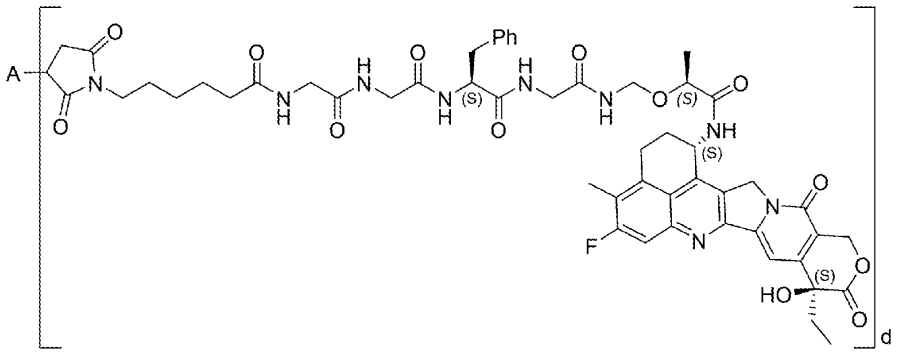

、

、

。

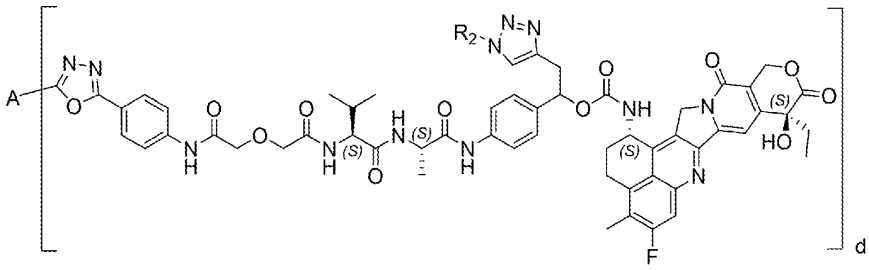
41、权利要求 27-40 任一项所述的抗体-药物缀合物，其选自以下结构：

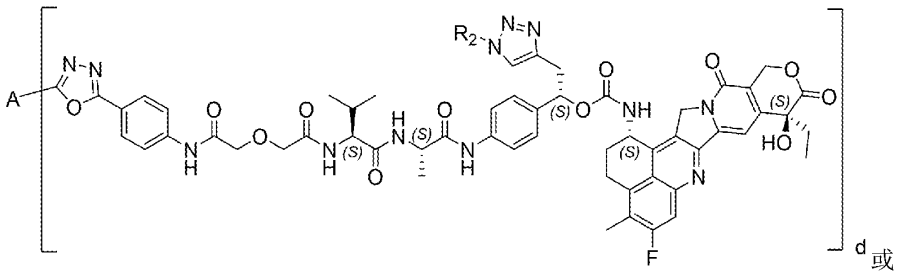




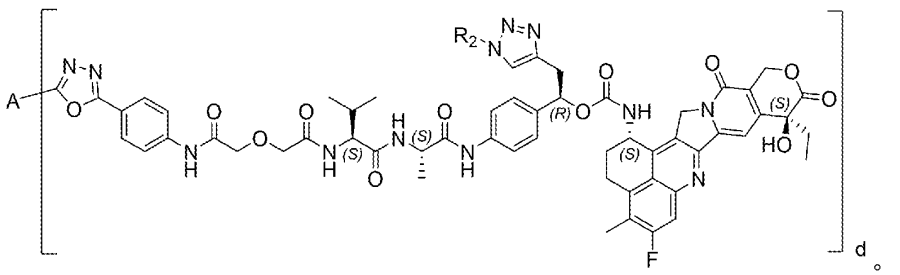








或



。

42、包含权利要求 1-12 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段的融合蛋白。

43、包含权利要求 1-12 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，或权利要求 16-23 任一项所述的双特异性抗体的嵌合抗原受体多肽（CAR）。

44、一种基因修饰的细胞，其特征在于，所述细胞表达权利要求 43 所述嵌合抗原受体(CAR)多肽，所述细胞选自自体或异体的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、NK-T 细胞、MAIT 细胞、造血干细胞、胚胎干细胞、诱导多能干细胞、红细胞。

45、包含权利要求 1-12 任一项所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段、权利要求 16-23 任一项所述的双特异性抗体或权利要求 27-41 任一项所述的抗体-药物缀合物、权利要求 42 所述的融合蛋白的药物组合物、权利要求 43 所述的嵌合抗原受体多肽或表达其的核酸分子或权利要求 44 所述的基因修饰的细胞。

46、权利要求1-12任一项所述的抗DLL3抗体或其抗原结合片段、权利要求16-23任一项所述的双特异性抗体、权利要求27-41任一项所述的抗体-药物缀合物、权利要求42所述的融合蛋白、权利要求43所述的嵌合抗原受体多肽或表达其的核酸分子、权利要求44所述的基因修饰的细胞或权利要求45所述的药物组合物在制备用于治疗个体肿瘤的药物中的应用；优选地，所述肿瘤为肿瘤细胞表面表达DLL3（DLL3+）的肿瘤；更优选地，所述肿瘤为DLL3高表达相关的实体瘤或血液瘤，进一步优选地，所述肿瘤为肺癌；更优选地，所述肿瘤为小细胞肺癌。