

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023年2月2日 (02.02.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/006084 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/109050

(22) 国际申请日: 2022年7月29日 (29.07.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
PCT/CN2021/109517
2021年7月30日 (30.07.2021) CN
202210239591.2 2022年3月11日 (11.03.2022) CN

(71) 申请人: 上海复旦张江生物医药股份有限公司 (SHANGHAI FUDAN-ZHANGJIANG BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上

海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路308号, Shanghai 201210 (CN)。

(72) 发明人: 郭青松 (GUO, Qingsong); 中国上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路308号, Shanghai 201210 (CN)。 沈毅珺 (SHEN, Yijun); 中国上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路308号, Shanghai 201210 (CN)。 杨彤 (YANG, Tong); 中国上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路308号, Shanghai 201210 (CN)。 高贝 (GAO, Bei); 中国上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路308号, Shanghai 201210 (CN)。 吴芳 (WU, Fang); 中国上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路308号, Shanghai 201210 (CN)。 孟李凯 (MENG, Likai); 中国上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路308号, Shanghai 201210 (CN)。 王宝霞 (WANG, Baoxia); 中国上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路308号, Shanghai 201210 (CN)。 张文伯

(54) Title: ANTI-DLL3 ANTIBODY AND PREPARATION METHOD THEREFOR, DRUG CONJUGATE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种抗DLL3抗体及其制备方法、其药物偶联物和应用

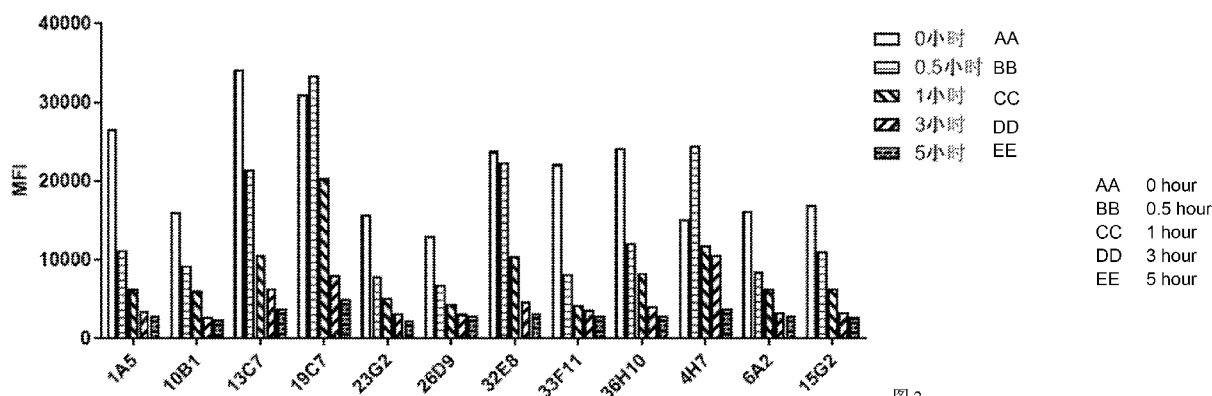


图2

(57) Abstract: Disclosed are an anti-DLL3 antibody and a preparation method therefor, a drug conjugate and application thereof. The anti-DLL3 antibody in the present invention has good internalization activity, has better binding activity with human DLL3 protein, and has strong affinity at the protein level. The antibody conjugated drug targeting DLL3 in the present invention has good druggability, biological activity, and anti-tumor activity in vitro and vivo, and can achieve an application of cytotoxic drugs in treating tumor patients comprising SCLC and having neuroendocrine characteristics.

(57) 摘要: 本发明公开了一种抗DLL3抗体及其制备方法、其药物偶联物和应用。本发明的抗DLL3抗体具有很好的内化活性、具有较佳的与人DLL3蛋白的结合活性、在蛋白水平的亲和力均较强。本发明的靶向DLL3的抗体偶联药物具有很好的成药性、生物学活性和体内外抗肿瘤活性, 其可以实现细胞毒性药物在治疗包括SCLC在内的具有神经内分泌特征的肿瘤病人中的应用。



WO 2023/006084 A1

(ZHANG, Wenbo); 中国上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路308号, Shanghai 201210 (CN)。

(74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (SHANGHAI BESHINING LAW OFFICE); 中国上海市小木桥路681号外经大厦21楼, Shanghai 200032 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种抗 DLL3 抗体及其制备方法、其药物偶联物和应用

本申请要求申请日为 2021 年 7 月 30 日的 PCT 专利申请 PCT/CN2021/109517 以及申请日为 2022 年 3 月 11 日的中国专利申请 CN2022102395912 的优先权。本申请引用上述专利申请的全文。

技术领域

本发明属于生物技术和医药领域，具体涉及一种抗 DLL3 抗体及其制备方法、其药物偶联物和应用。

背景技术

小细胞肺癌（SCLC）是肺癌中恶性程度最高的一种类型，具有进展快、转移早、易复发等特点，约占新发肺癌的 15%-20%，其发生与长期吸烟有密切关系。SCLC 主要分为局限期患者和广泛期患者，其中以广泛期患者为主，约占 SCLC 的 70%。现阶段 SCLC 的治疗主要以化疗为主，其一线化疗主要是以铂类药物为基础的联合治疗，最常用的是依托泊苷+顺铂或卡铂（EP 或 CE 方案）。指南建议无论是局限期还是广泛期，均应接受 4-6 个疗程的顺铂/卡铂的联合治疗，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%。当前 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，由此可见，二线治疗效果关乎 SCLC 患者的最终生存情况。拓扑替康单药作为二线治疗的标准疗法，其患者响应率约为 22%，患者总生存约为 8 个月；而对于耐药复发患者，其响应率仅为 4% 左右，中位生存仅 5 个月，其临床获益极其有限，存在巨大的临床未满足。综上所述，SCLC 由于存在高复发率和耐药率，并且二线治疗药物选择有限，患者生存获益有限，在治疗方面仍然面临诸多挑战，迫切需要新的治疗手段改变现有的临床未满足。目前多个研究表明 Notch 通路被抑制与 SCLC 的发生发展高度相关，其配体 DLL3 被认为是治疗 SCLC 最有潜力的靶点之一。

DLL3 是通过高通量测序所鉴定的一个非典型的 Notch 通路配体，该配体是由 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（即结构域 EGF1、EGF2、EGF3、EGF4、EGF5 和 EGF6），是 SCLC 发生与发展的重要靶标。免疫组织化显示该靶点在正常组织中几乎不表达，并且在其他肿瘤中也不表达，然而特异性地在神经内分泌肿瘤中大量表达，约 80% 的 SCLC 的肿瘤组织和癌细胞表面存在高水平的 DLL3，约 85% 复发的 SCLC 同样高表达 DLL3 蛋白，是 SCLC 的组成型表达受体。DLL3 在正常组织中不表达，而在神经内分泌肿瘤例如

SCLC 中特异性地表达, 使得其成为抗体或抗体药物偶联物 (antibody drug conjugate, ADC) 开发的靶点之一。

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 (例如参见 CN104520324A)。Rova-T 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, 该药利用表达在肿瘤细胞表面的 DLL3 识别肿瘤细胞并将细胞毒性药物 PBD 输送到肿瘤细胞内, 达到定向杀死肿瘤细胞的作用, 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, 目前已终止开发。

发明内容

本发明要解决的技术问题是针对现有技术中抗 DLL3 抗体的不足、以及针对临床上尚未成功开发出靶向 DLL3 的 ADC 药物的现状, 而提供了一种全新的抗 DLL3 抗体, 靶向 DLL3 的 ADC、其中间体、制备方法及应用。针对现有技术中缺乏靶向 DLL3 的抗体药物偶联物的缺陷, 本发明所述的抗体药物偶联物可以实现治疗包括 SCLC 在内的具有神经内分泌特征的肿瘤病人的效果。本发明主要通过以下技术手段解决上述技术问题。

本发明提供了一种抗 DLL3 抗体, 其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL); 其中,

所述 VH 包含以下的互补决定区 (CDR) 或其突变: 如 SEQ ID NO: 9、19、29、39、59、69、79、89、99 或 63 的氨基酸序列所示的 VH CDR1, 如 SEQ ID NO: 10、20、30、40、60、70、80、90、100、110 或 83 的氨基酸序列所示的 VH CDR2, 和/或, 如 SEQ ID NO: 11、21、31、41、61、71、81、91、101、111 或 93 的氨基酸序列所示的 VH CDR3;

所述 VL 包含以下的 CDR 或其突变: 如 SEQ ID NO: 12、32、42、62、72、82、92、102、112 或 103 的氨基酸序列所示的 VL CDR1, 如 GAS、GAT、TTS、NAK、YTS、RAN、WAS、FTS 或 NAN 所示的 VL CDR2, 和/或, 如 SEQ ID NO: 14、24、34、44、64、74、84、94、104、114 或 113 的氨基酸序列所示的 VL CDR3;

其中所述突变为在所述 CDR 的氨基酸序列上具有 3、2 或 1 个氨基酸插入、缺失或替换。

本申请中, 在类似“具有 3、2 或 1 个氨基酸的插入、缺失或替换”中“氨基酸突变”是指相较于原氨基酸序列而言, 变体的序列存在氨基酸的突变, 包括在原氨基酸序列的基础上发生氨基酸的插入、缺失或替换。示例性的解释是对 CDR 的突变可以包含 3 个、2 个或 1 个氨基酸的突变, 这些 CDR 之间可以任选地选择相同或不同数目的氨基酸残基进行突变, 例如可以是对 CDR1 进行 1 个氨基酸的突变, 对 CDR2 和 CDR3 不进行氨基酸

突变。

本申请中，所述突变可以包括目前如本领域技术人员公知的突变，例如在抗体的生产或者应用过程中，可能会对抗体进行的一些突变，例如对可能存在的，特别是 CDR 区的转录后修饰（Potential post-translational modifications, PTMs）的位点进行突变，包括抗体的聚集、脱酰胺基敏感（asparagine deamidation, 位点（NG, NS, NH 等）、天冬氨酸异构（DG, DP）敏感位点、N 糖基化（N-{P}S/T）敏感位点及氧化敏感位点等相关突变。

优选地，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 9、10 和 11 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 19、20 和 21 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 29、30 和 31 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 39、40 和 41 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 59、60 和 61 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 69、70 和 71 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 79、80 和 81 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 89、90 和 91 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 99、100 和 101 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 89、110 和 111 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 63、83 和 93 所示。

优选地，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 12、GAS 和 SEQ ID NO: 14 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 12、GAS 和 SEQ ID NO: 24 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 32、GAT 和 SEQ ID NO: 34 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 42、TTS 和 SEQ ID NO: 44 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 62、NAK 和 SEQ ID NO: 64 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 72、NAK 和 SEQ ID NO: 74 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 82、YTS 和 SEQ ID NO: 84 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 92、RAN 和 SEQ ID NO: 94 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的

氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 102、WAS 和 SEQ ID NO: 104 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 112、FTS 和 SEQ ID NO: 114 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 103、NAN 和 113 所示。

在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体中，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 9、10 和 11 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 12、GAS 和 SEQ ID NO: 14 所示。在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体中，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 19、20 和 21 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 12、GAS 和 SEQ ID NO: 24 所示。在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体中，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 29、30 和 31 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 32、GAT 和 SEQ ID NO: 34 所示。在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体中，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 39、40 和 41 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 42、TTS 和 SEQ ID NO: 44 所示。在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体中，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 59、60 和 61 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 62、NAK 和 SEQ ID NO: 64 所示。在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体中，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 69、70 和 71 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 72、NAK 和 SEQ ID NO: 74 所示。在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体中，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 79、80 和 81 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 82、YTS 和 SEQ ID NO: 84 所示。在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体中，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 89、90 和 91 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 92、RAN 和 SEQ ID NO: 94 所示。在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体中，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 99、100 和 101 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸

序列分别如 SEQ ID NO: 102、WAS 和 SEQ ID NO: 104 所示。在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体中，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 89、110 和 111 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 112、FTS 和 SEQ ID NO: 114 所示。在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体中，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 63、83 和 93 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 103、NAN 和 113 所示。

优选地，在所述的抗 DLL3 抗体中，所述重链可变区（VH）还包括重链可变区框架区（VH FWR），其中，所述 VH FWR 为人或鼠抗体的重链可变区框架区。在本发明的一优选实施方案中，所述 VH 可以包括如 SEQ ID NO: 15、25、35、45、65、75、85、95、105、13 或 22 或其突变所示的氨基酸序列。

优选地，在所述的抗 DLL3 抗体中，所述轻链可变区（VL）还包括轻链可变区框架区（VL FWR）；其中，所述 VL FWR 为人或鼠抗体的轻链可变区框架区。在本发明的一优选实施方案中，所述 VL 可以包括如 SEQ ID NO: 16、26、36、46、66、76、86、96、106、33 或 23 或其突变所示的氨基酸序列。

在某一优选实施方案中，所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 15 或其突变所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 16 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 25 或其突变所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 26 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 35 或其突变所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 36 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 45 或其突变所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 46 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 65 或其突变所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 66 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 75 或其突变所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 76 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 85 或其突变所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 86 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 95 或其突变所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 96 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 105 或其突变所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 106 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 13 或其突变所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 33 或其突变

所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 22 或其突变所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 23 或其突变所示的氨基酸序列。

上述突变为所述 VH 和/或 VL 的氨基酸序列上发生了一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或添加，且所述突变的氨基酸序列与所述 VH 和/或 VL 的氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性，并保持或改善了所述抗体与 DLL3 的结合；所述至少 85% 序列同一性优选为至少 90% 序列同一性，更优选为至少 95%、96%、97%、98% 序列同一性，最优选为至少 99% 序列同一性。

在本申请中，上述所列 CDR 的氨基酸序列均是按照 **kabat** 定义规则所示出的（本申请中也是按照 **kabat** 定义规则所示出的序列）。但是，本领域人员公知，在本领域中可以通过多种方法来定义抗体的 CDR，例如基于序列可变性的 **Kabat** 定义规则（参见，**Kabat** 等人，免疫学的蛋白质序列，第五版，美国国立卫生研究院，贝塞斯塔，马里兰州（1991））和基于结构环区域位置的 **Chothia** 定义规则（参见 **JMol Biol** 273:927-48,1997）。本领域技术人员应当理解的是，除非另有规定，否则术语给定抗体或其区（例如可变区）的“CDR”及“互补决定区”应了解为涵盖如通过本发明描述的上述已知方案中的任何一种界定的互补决定区。虽然本发明中请求保护的范围是基于 **kabat** 定义规则所示出的序列，但是根据其他 CDR 的定义规则所对应的氨基酸序列也应当落在本发明的保护范围内。

优选地，所述的抗 DLL3 抗体为全长抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 优选 scFv、双特异性抗体、多特异性抗体、重链抗体或单域抗体。

在某一优选实施方案中，所述的抗 DLL3 抗体为全长抗体，所述全长抗体包括重链和轻链；重链中包括的重链恒定区优选人源或小鼠源抗体重链恒定区；轻链中包括的轻链恒定区所述的抗体轻链恒定区优选人源或小鼠源抗体轻链恒定区。较佳地，所述的人源轻链恒定区为人 κ 或 λ 轻链恒定区；所述人源重链恒定区为人 IgG1、IgG2、IgG3 或者 IgG4。

在某一优选实施方案中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 17、27、37、47、67、77、87、97、107、43 或 73 或其突变所示的氨基酸序列，和/或，所述轻链包括如 SEQ ID NO: 18、28、38、48、68、78、88、98、108、53 或 109 或其突变所示的氨基酸序列。

在某一优选实施方案中，所述全长抗体中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 17 或其突变所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 18 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 27 或其突变所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 28 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 37 或其突变所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 38 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述重链包括如 SEQ ID

NO: 47 或其突变所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 48 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 67 或其突变所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 68 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 77 或其突变所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 78 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 87 或其突变所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 88 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 97 或其突变所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 98 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 107 或其突变所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 108 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 43 或其突变所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 53 或其突变所示的氨基酸序列。在某一优选实施方案中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 73 或其突变所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 109 或其突变所示的氨基酸序列。

上述的突变为所述重链和/或轻链的氨基酸序列上发生了一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或添加，且所述突变的氨基酸序列与所述重链和/或轻链的氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性，并保持或改善了所述抗体与 DLL3 的结合；所述至少 85% 序列同一性优选为至少 90% 序列同一性；更优选为至少 95%、96%、97% 或 98% 序列同一性；最优选为至少 99% 序列同一性。

本发明某一方面还提供了一种抗 DLL3 抗体，其与如上所述的抗 DLL3 抗体竞争性地与 DLL3 蛋白结合。

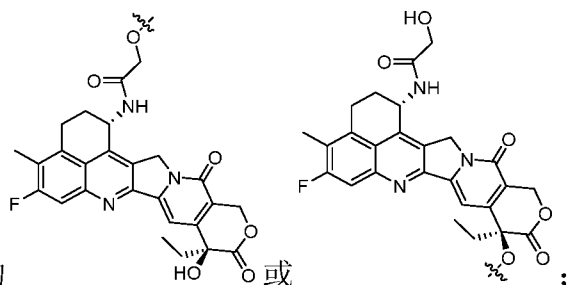
本发明某一方面还提供了一种分离的核酸，其编码如上所述的抗 DLL3 抗体。

本发明某一方面还提供了一种重组表达载体，其包含如上所述的分离的核酸。优选地，所述表达载体包含真核细胞表达载体和/或原核细胞表达载体。

本发明某一方面还提供了一种转化体，其包含如上所述的重组表达载体。优选地，所述转化体的宿主细胞为原核细胞和/或真核细胞，所述原核细胞优选 *E. coli* 细胞例如 TG1、BL21 细胞，所述真核细胞优选 HEK293 细胞或 CHO 细胞。

本发明某一方面还提供了一种抗体药物偶联物 (ADC)，其结构通式为 Ab-(L₃-L₂-L₁-D)_m；

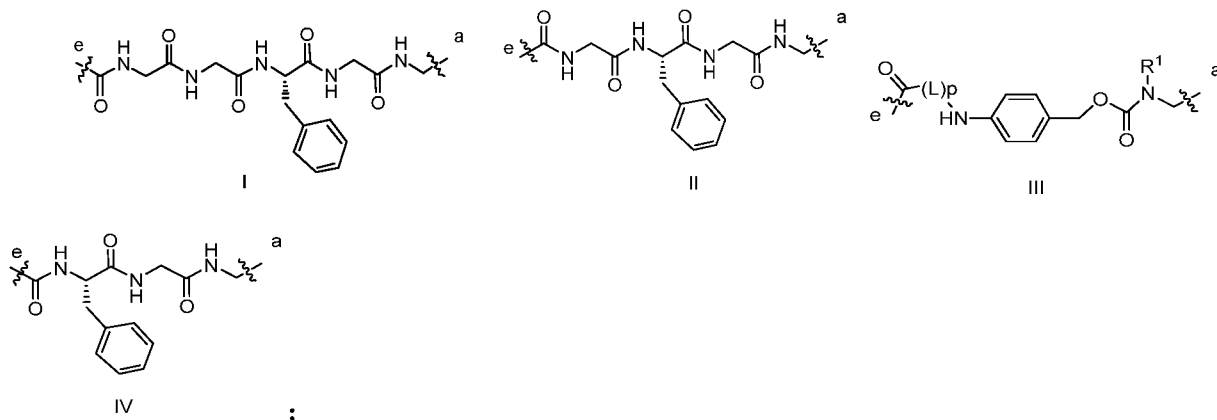
其中，Ab 为抗 DLL3 抗体；



D为细胞毒性药物

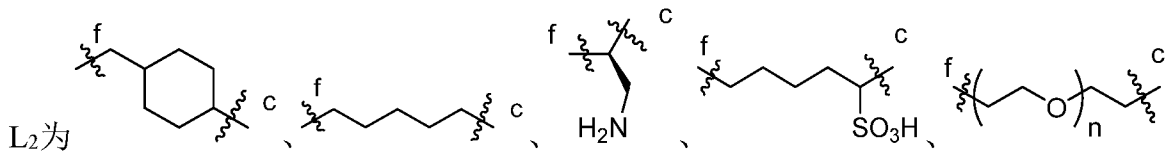
m为2~8;

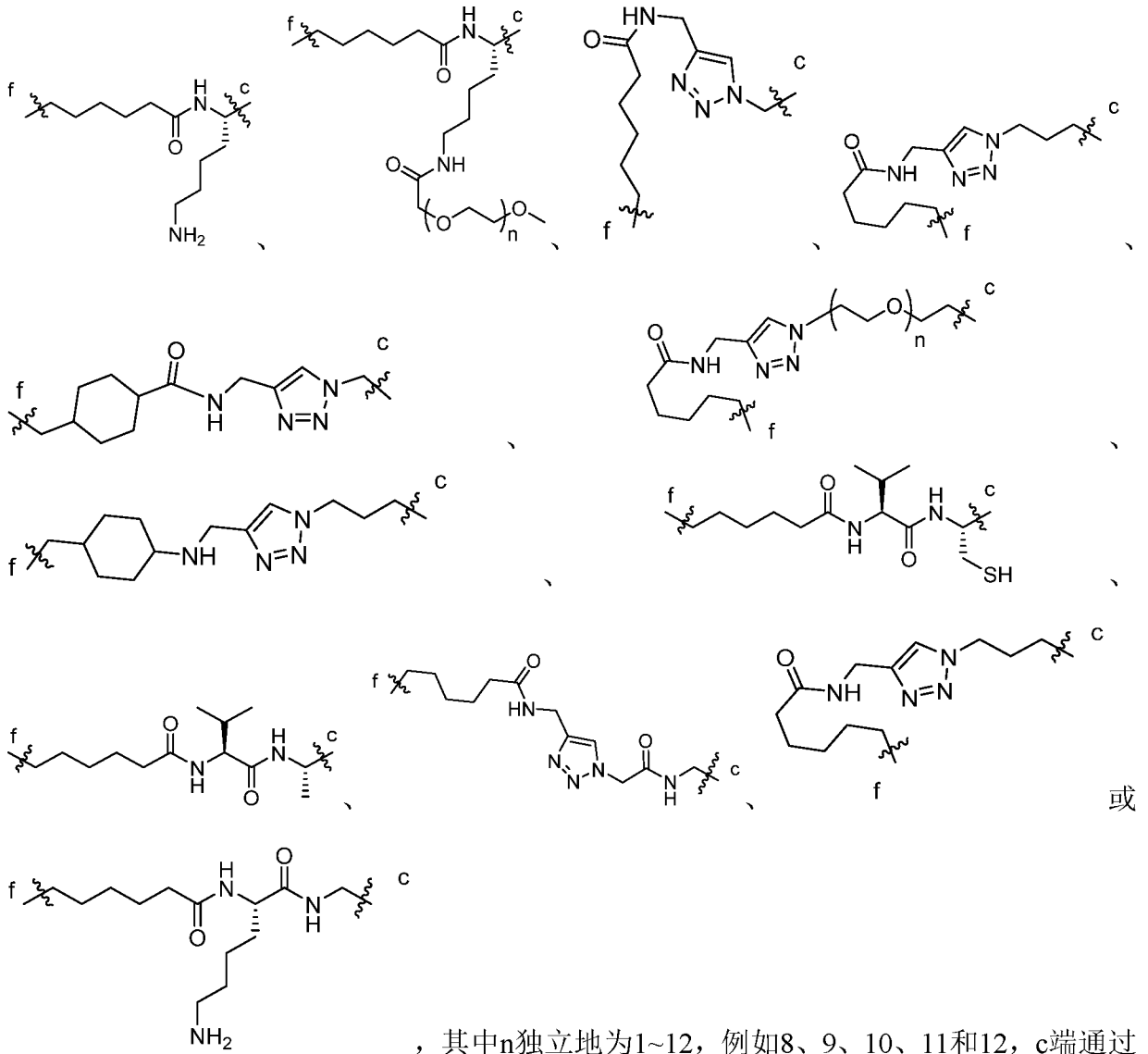
L₁的结构如式I、II、III或IV所示,其a端与所述的细胞毒性药物相连,e端和与所述的L₂的c端相连;

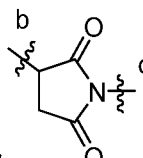
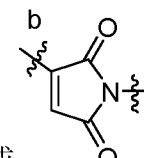


(L)_p中,L独立地为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基、谷氨酸残基、天冬氨酸残基、半胱氨酸残基、谷氨酸残基、组氨酸残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、甲硫氨酸残基、脯氨酸残基、丝氨酸残基、苏氨酸残基、色氨酸残基、酪氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种;p为2-4;

R¹为被一个或多个-NR¹⁻¹R¹⁻²取代的C₁~C₆烷基、被一个或多个R¹⁻³S(O)₂-取代的C₁~C₆烷基、C₁~C₆烷基、C₃~C₁₀环烷基、C₆~C₁₄芳基或5~14元杂芳基;所述的5~14元杂芳基中的杂原子选自N、O和S中的一种或多种,杂原子个数为1、2、3或4;所述的R¹⁻¹、R¹⁻²和R¹⁻³分别独立地为C₁~C₆烷基;





L₃为  或  ，其中b端和所述的Ab相连，d端与所述的L₂的f端相连。

在某一优选实施方案中，所述抗DLL3抗体结合DLL3蛋白中以下抗原结合表位之一：DSL结构域、N末端、EGF2结构域和EGF3-EGF6结构域。

在某一优选实施方案中，所述抗DLL3抗体优选为如上所述的抗DLL3抗体。

在某一优选实施方案中，所述抗DLL3抗体结合DLL3蛋白中EGF2结构域的抗原结合表位。

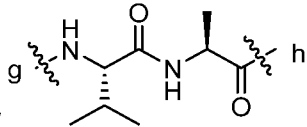
在某一优选实施方案中，所述抗DLL3抗体包含氨基酸序列如SEQ ID NO: 15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示的VL、或包含氨基酸序列如SEQ ID NO: 25所

示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL。

在某一优选实施方案中，所述抗 DLL3 抗体为具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示的轻链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的重链的抗 DLL3 抗体、或具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示的轻链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的重链的抗 DLL3 抗体。

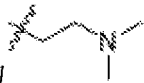
在某一优选实施方案中，所述的 L 为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基、脯氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种，优选为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种。

在某一较佳实施方案中，所述的 L 为缬氨酸残基和/或丙氨酸残基，所述的多种为两

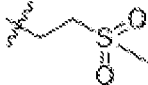
种或三种，所述的 p 为 2。更佳地，所述的(L)_p为 ，其中 g 端通过羰基和所述的 L₂ 的 c 端相连。

在某一优选实施方案中，所述的 R¹ 为被一个或多个 -NR¹⁻¹R¹⁻² 取代的 C₁~C₆ 烷基、被一个或多个 R¹⁻³S(O)₂-取代的 C₁~C₆ 烷基、或 C₁~C₆ 烷基，所述的 R¹⁻¹、R¹⁻² 和 R¹⁻³ 分别独立地为 C₁~C₄ 烷基。

在某一优选实施方案中，当所述的 R¹ 为被一个或多个 -NR¹⁻¹R¹⁻² 取代的 C₁~C₆ 烷基时，所述的 C₁~C₆ 烷基为 C₁~C₄ 烷基，优选为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基，优选为乙基；所述的多个优选为两个或三个。更佳地，所述的 R¹⁻¹ 和 R¹⁻² 各自独立地为 C₁~C₄ 烷基，优选为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基，更优选为甲基。更佳地，所述的 -NR¹⁻¹R¹⁻² 为 -N(CH₃)₂。进一步更佳地，当所述的 R¹ 为被一个 -NR¹⁻¹R¹⁻² 取代的 C₁~C₆ 烷基时，所述的被一个 -NR¹⁻¹R¹⁻² 取代的 C₁~C₆ 烷基

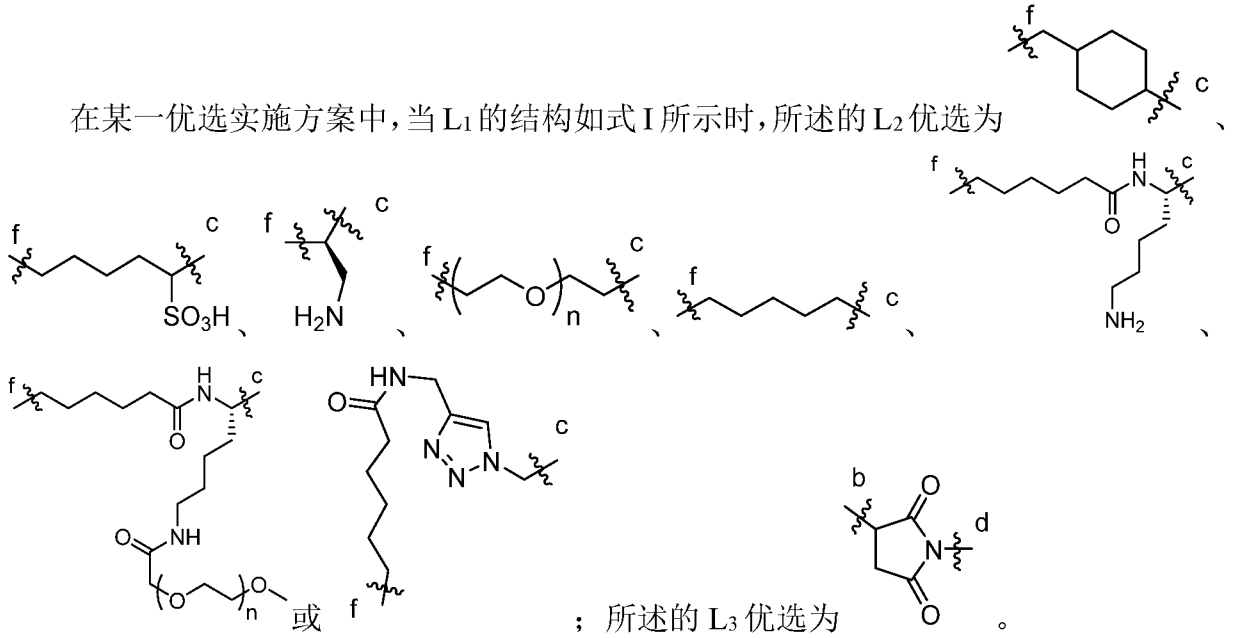
为 .

在某一优选实施方案中，当所述的 R¹ 为被一个或多个 R¹⁻³S(O)₂-取代的 C₁~C₆ 烷基时，所述的 C₁~C₆ 烷基为 C₁~C₄ 烷基，优选为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基，进一步优选为乙基；所述的多个优选为两个或三个。更佳地，所述的 R¹⁻³ 为 C₁~C₄ 烷基，优选为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基，更优选为甲基。更佳地，当所述的 R¹ 为被一个 R¹⁻³S(O)₂-取代的 C₁~C₆ 烷基时，所述的被一个

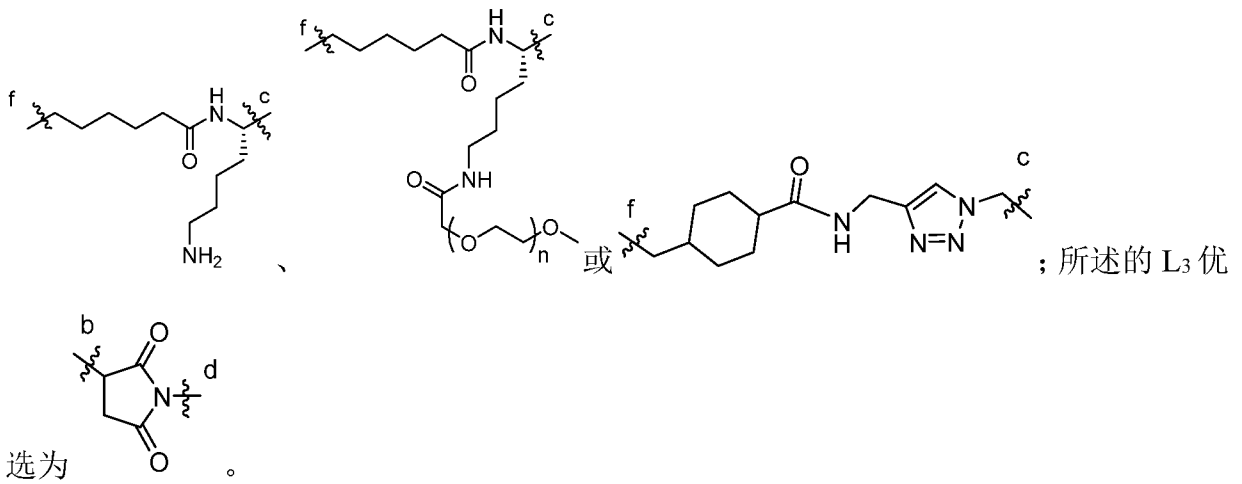
R¹⁻³S(O)₂-取代的 C₁~C₆ 烷基为 .

在某一优选实施方案中，当所述的 R¹ 为 C₁~C₆ 烷基时，所述的 C₁~C₆ 烷基为 C₁~C₄ 烷基，更优选为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基，进一步优选为甲基。

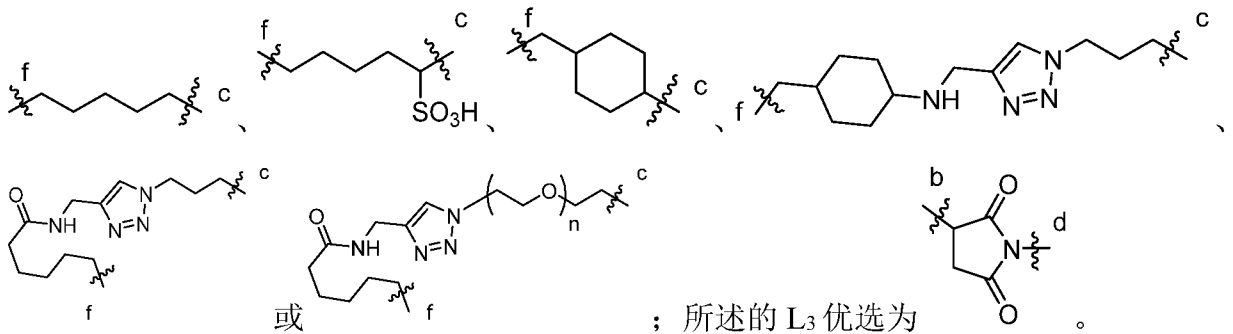
在某一优选实施方案中,当L₁的结构如式I所示时,所述的L₂优选为



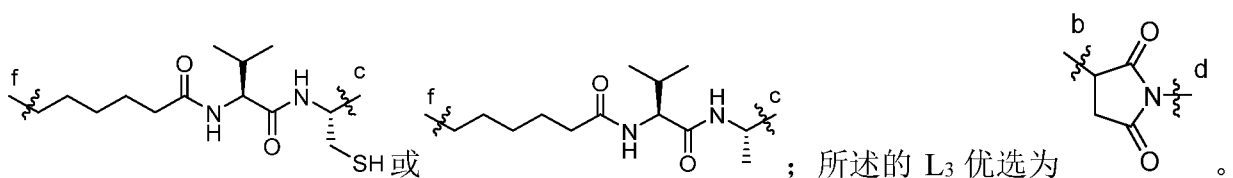
在某一优选实施方案中,当L₁的结构如式II所示时,所述的L₂优选为



在本发明一优选实施方案中,当L₁的结构如式III所示时,所述的L₂优选为

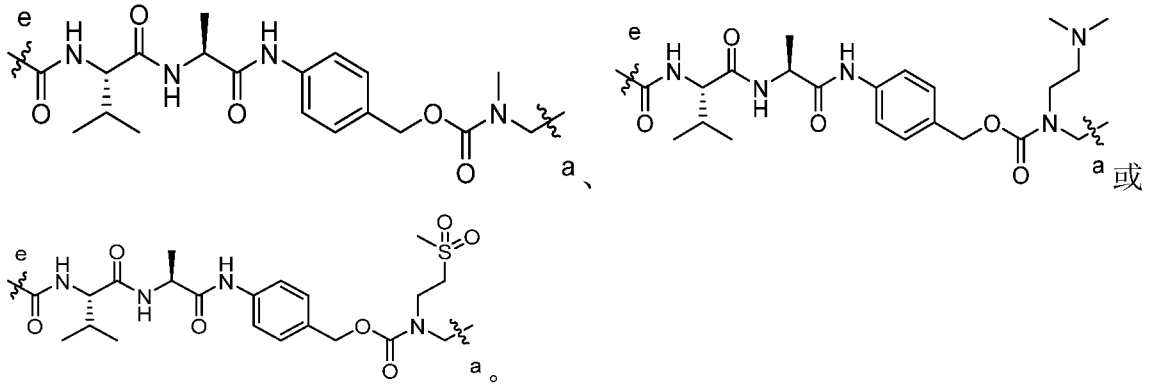


在本发明一优选实施方案中,当L₁的结构如式IV所示时,所述的L₂优选为

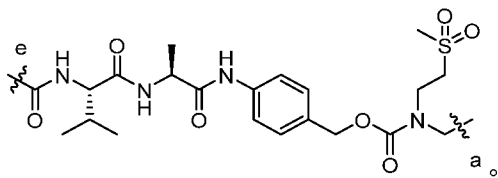


在某一优选实施方案中，L₁的结构优选为如式 I 或 III 所示。

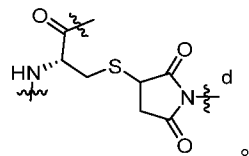
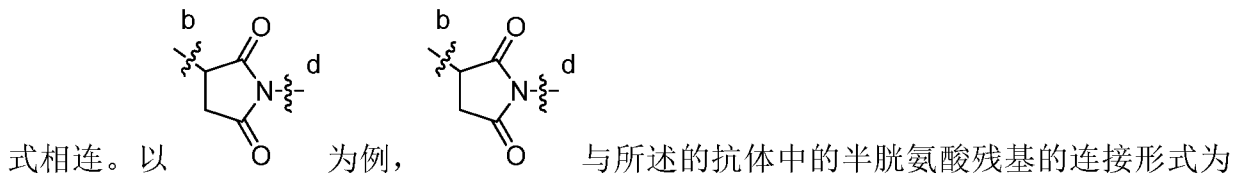
在某一优选实施方案中，所述的式 III 优选为



在某一优选实施方案中，所述的式 III 进一步优选为

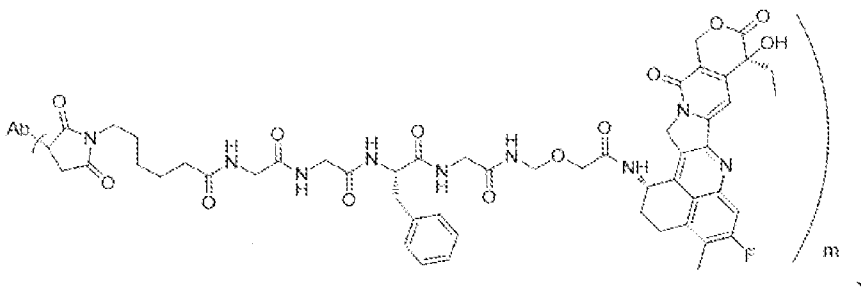


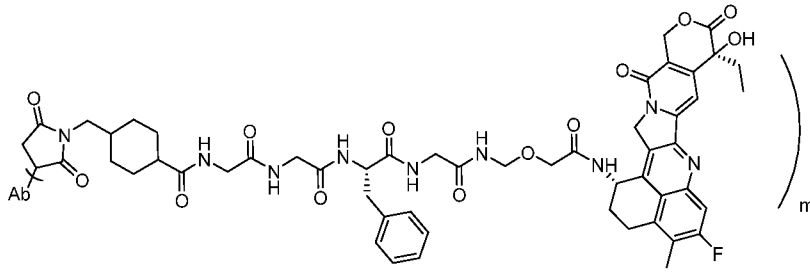
在某一优选实施方案中，所述的 L₃ 的 b 端优选为和所述的抗体上巯基以硫醚键的形式相连。以



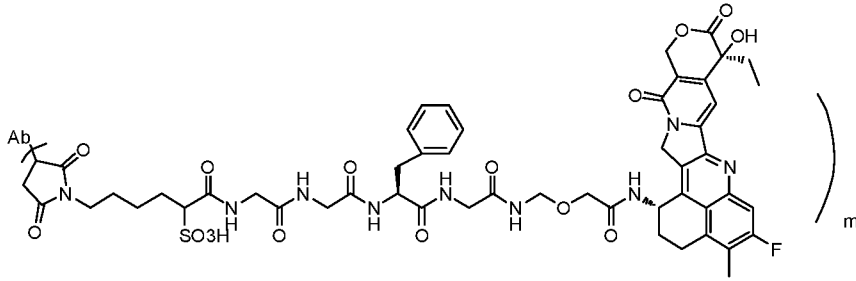
在某一优选实施方案中，所述的 m 为 2~8 的整数，例如，2、3、4、5、6、7、8，或非整数，例如：7.68、7.53、4.43、7.12、6.92、7.43、7.23、6.83、7.32、7.56、7.54、7.47、5.82、6.78、2.28、6.32、7.45、7.65、7.64、7.36、7.75、7.80、7.77 或 7.76。

优选地，所述的抗体药物偶联物为如下所示的任一化合物：

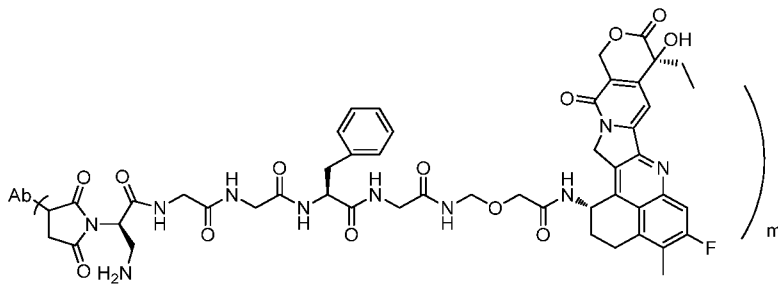




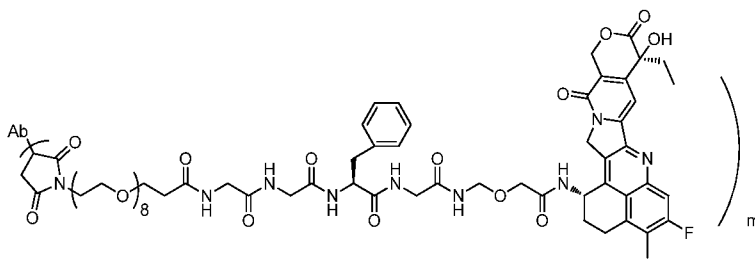
1



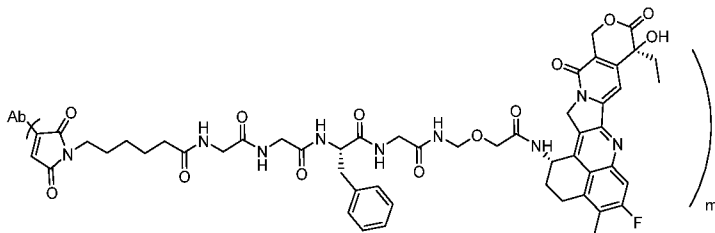
2



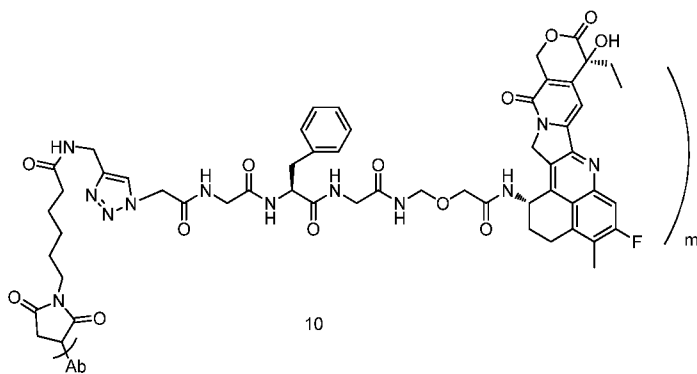
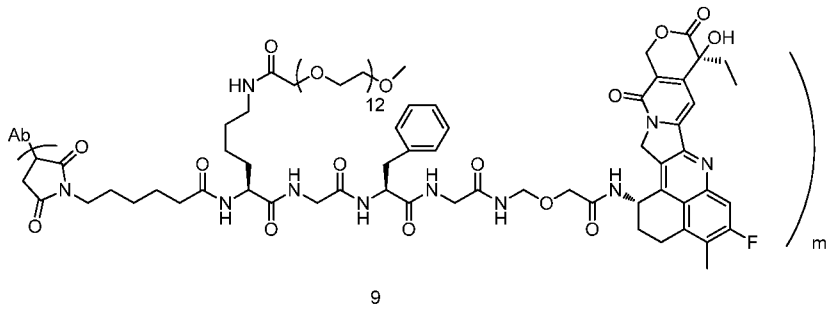
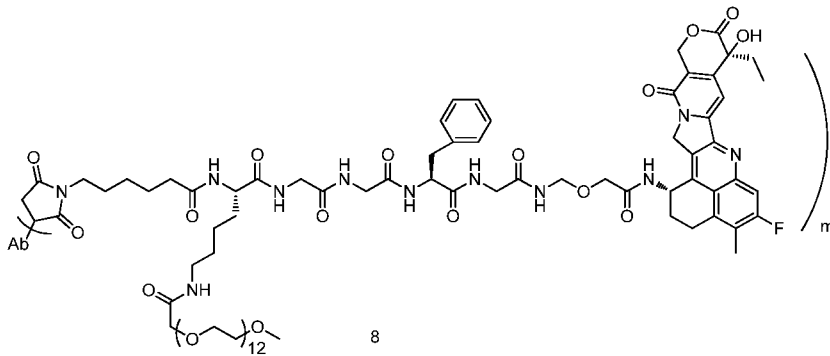
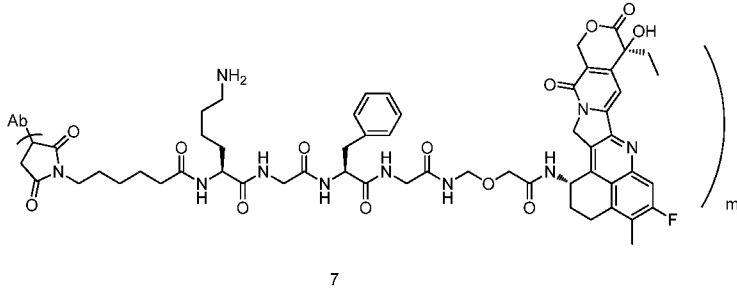
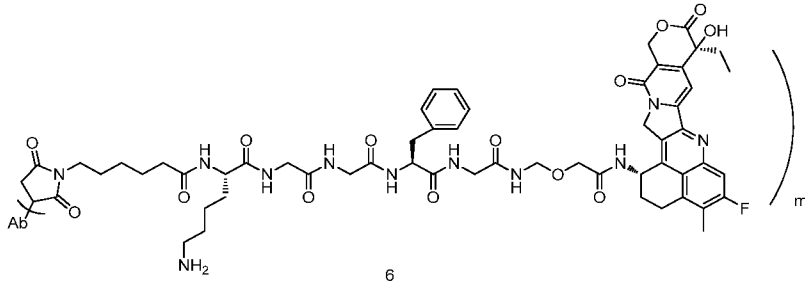
3

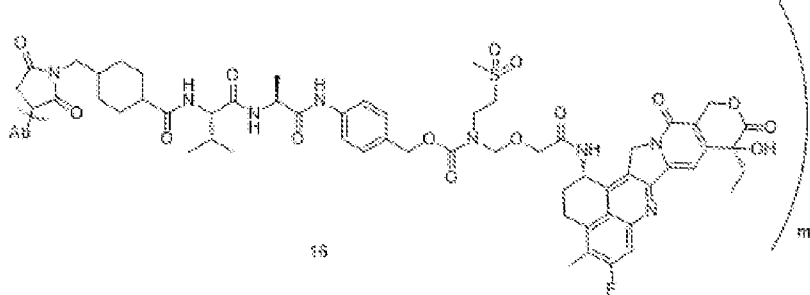
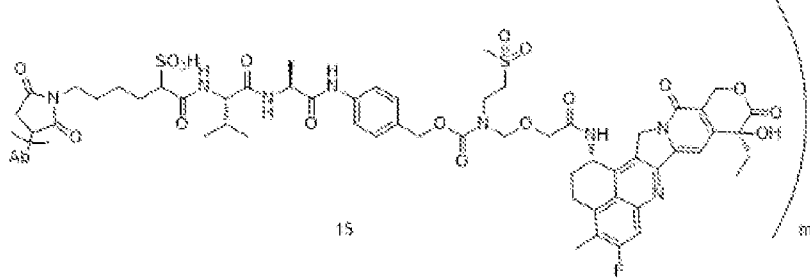
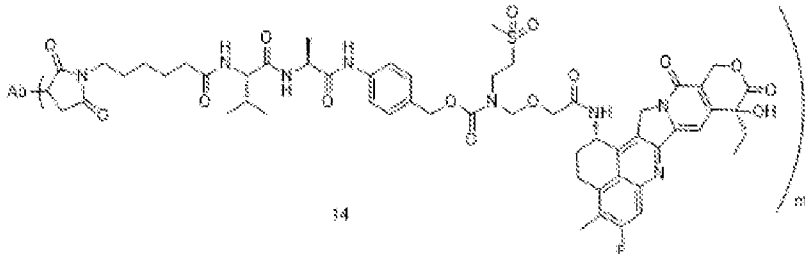
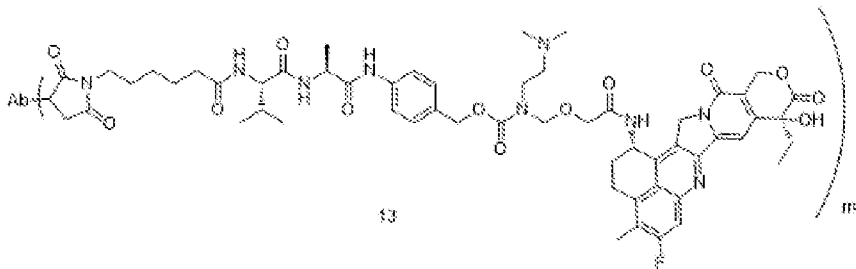
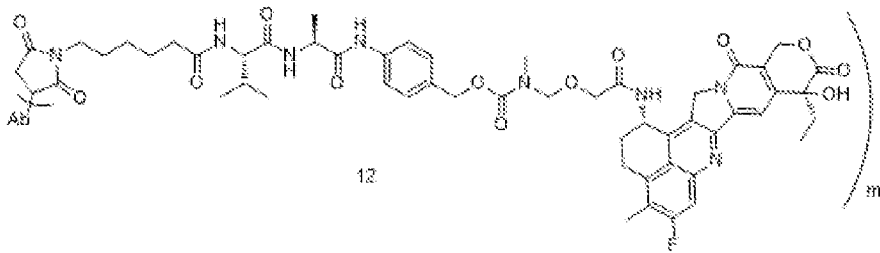
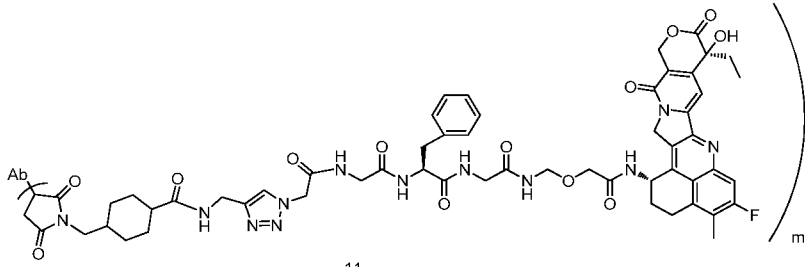


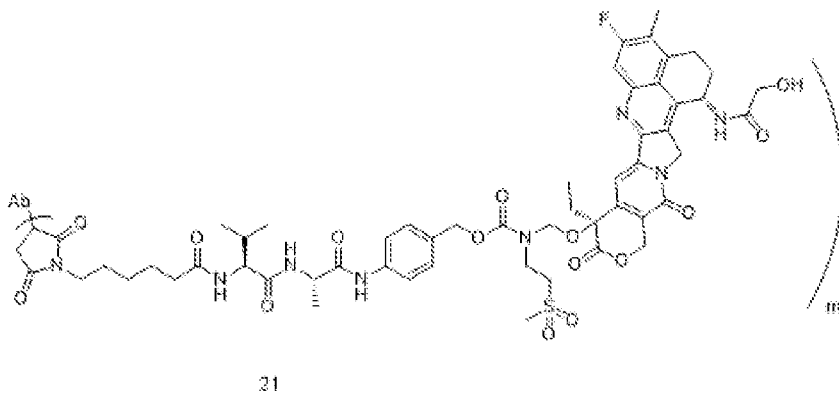
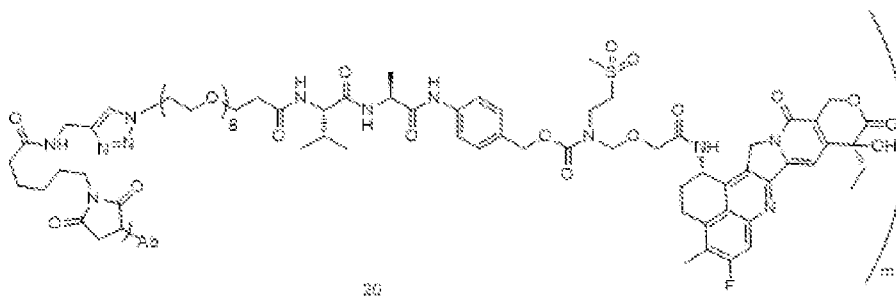
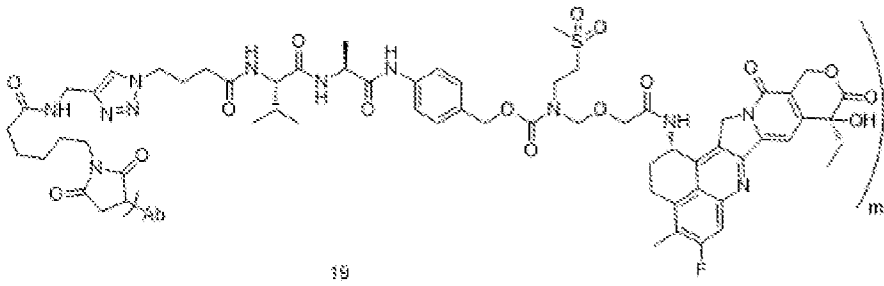
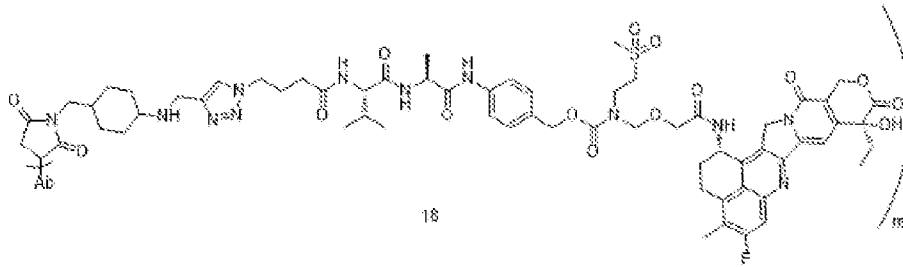
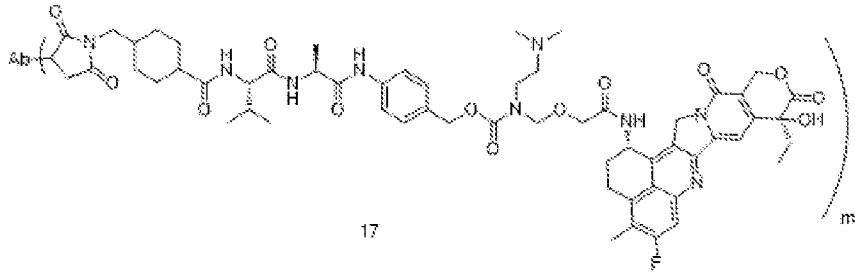
4

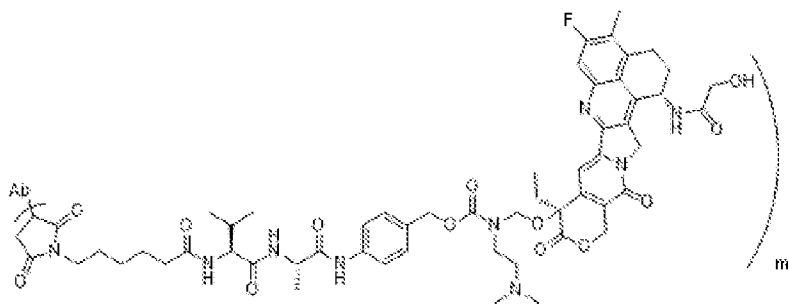


5

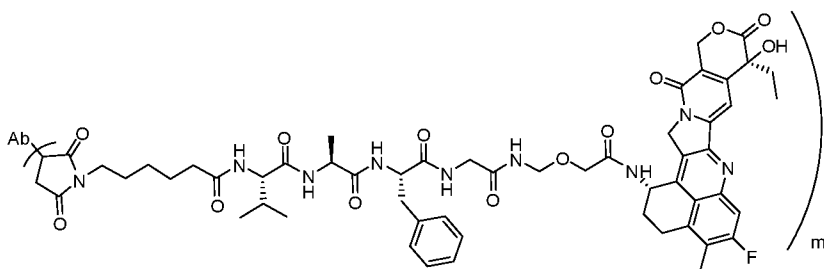






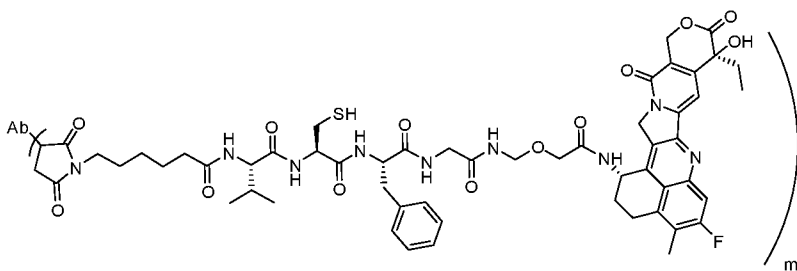


22



23

或

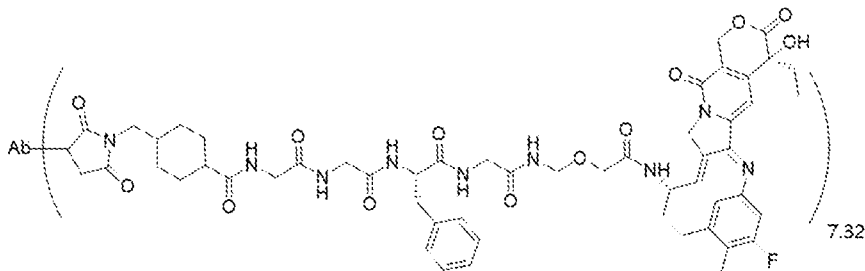


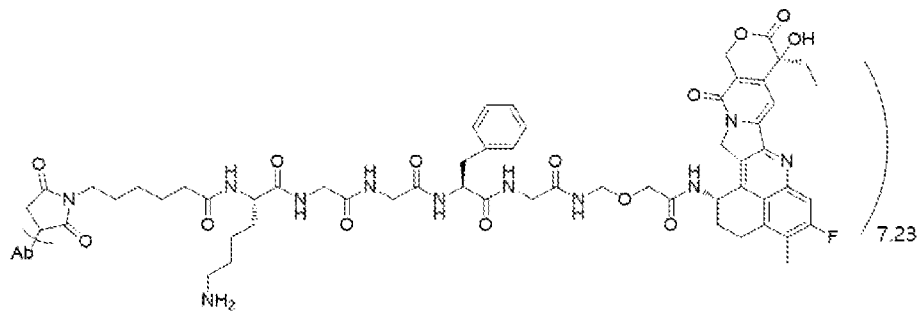
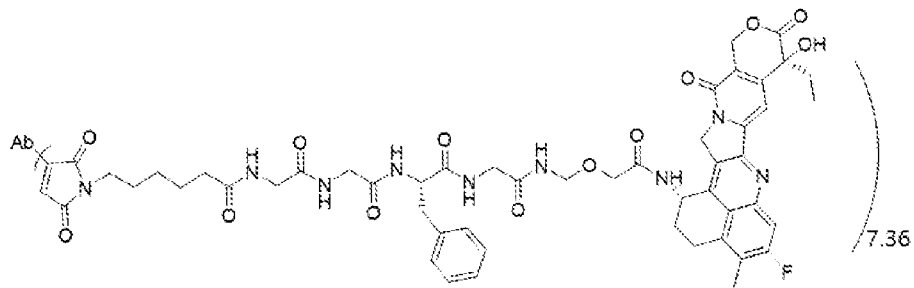
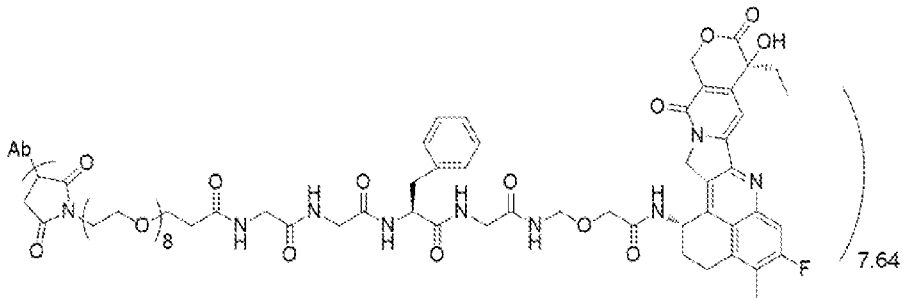
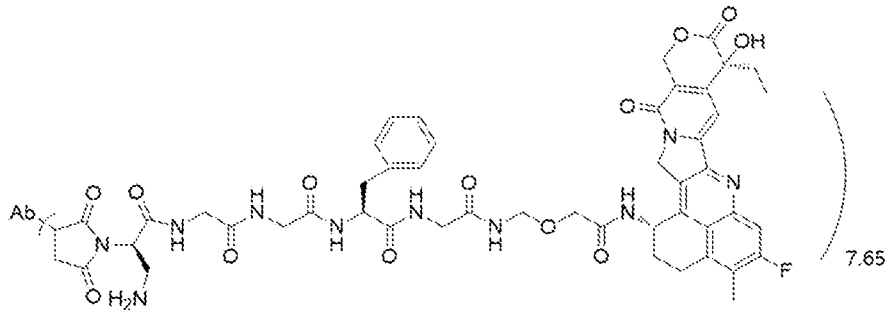
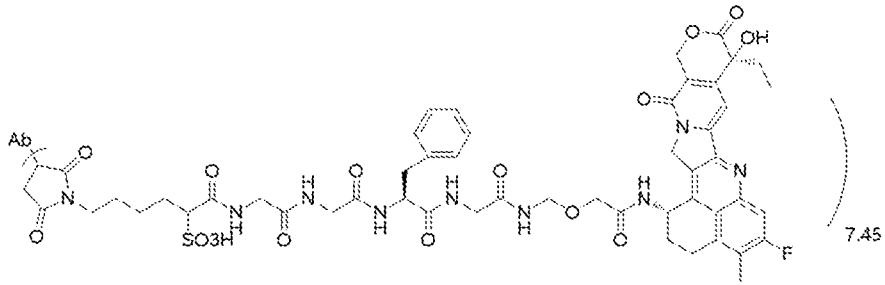
24

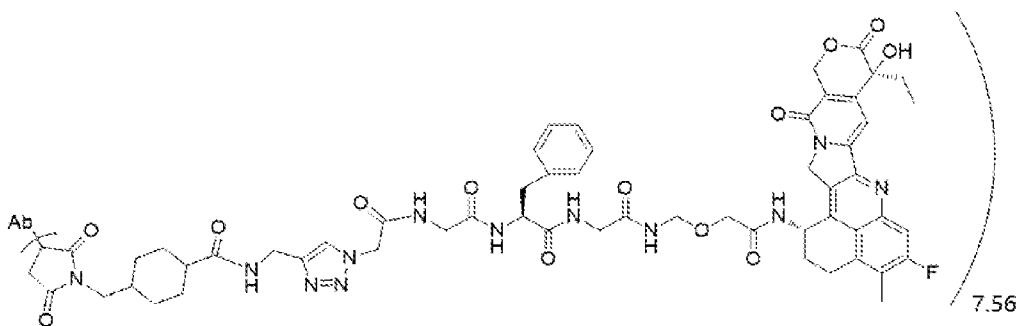
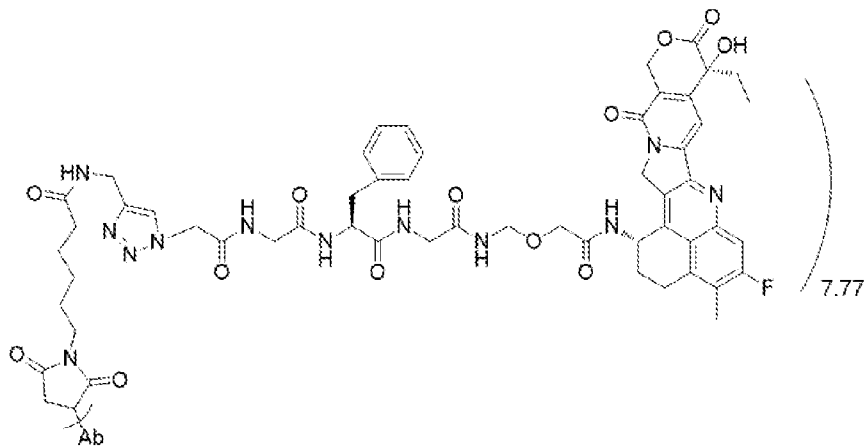
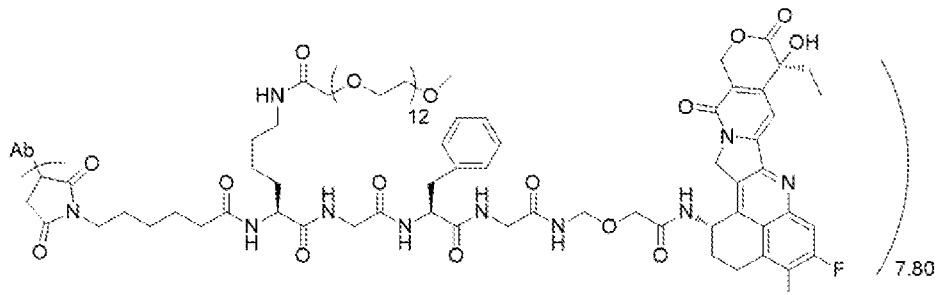
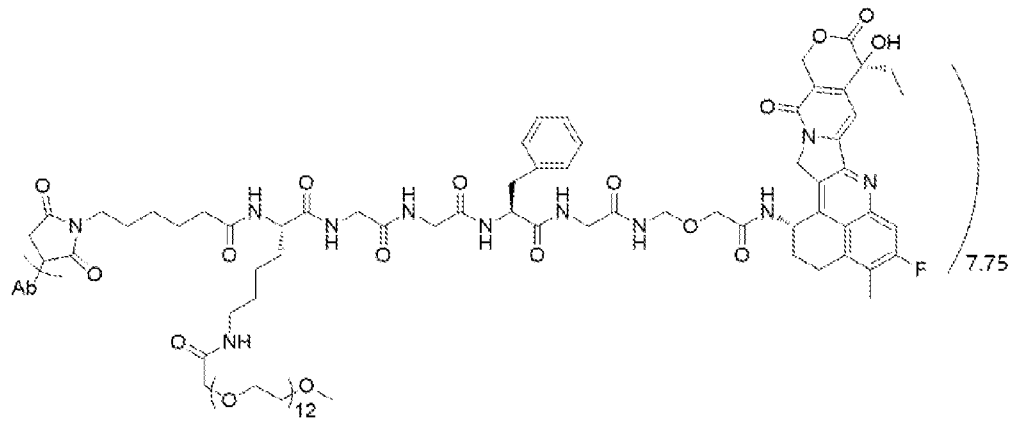
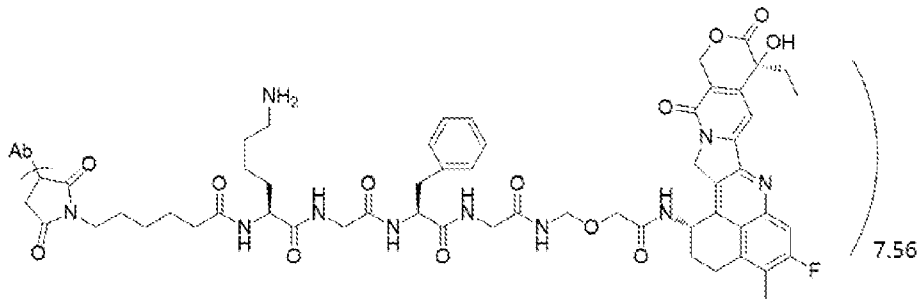
，其中 Ab 为前述的抗 DLL3

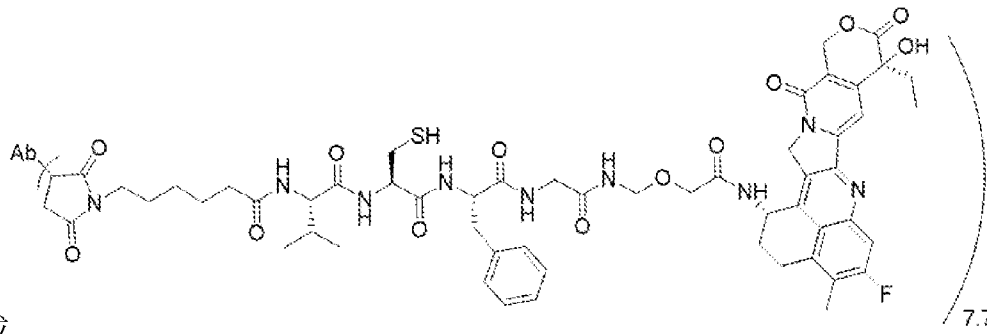
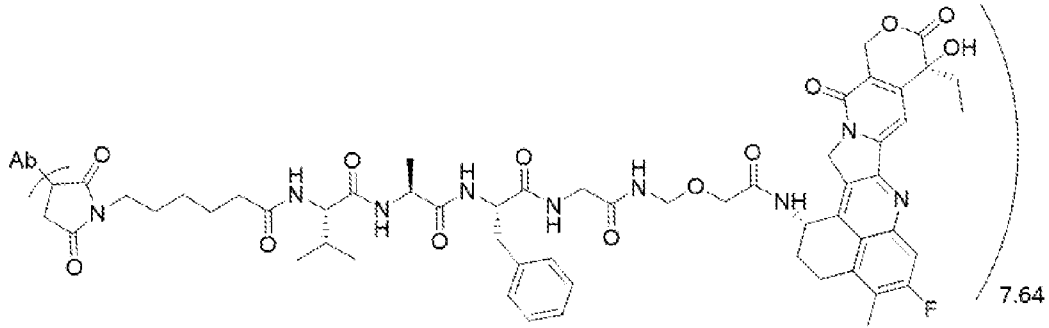
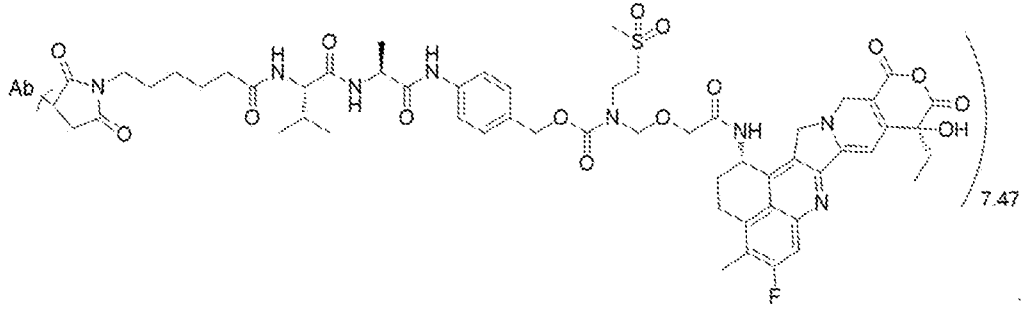
抗体，m 为 2~8，优选为 7.68、7.53、4.43、7.12、6.92、7.43、7.23、6.83、7.32、7.56、7.54、7.47、5.82、6.78、2.28、6.32、7.45、7.65、7.64、7.36、7.75、7.80、7.77 或 7.76。

在某一优选实施方案中，所述的抗体药物偶联物为如下所示的任一化合物：







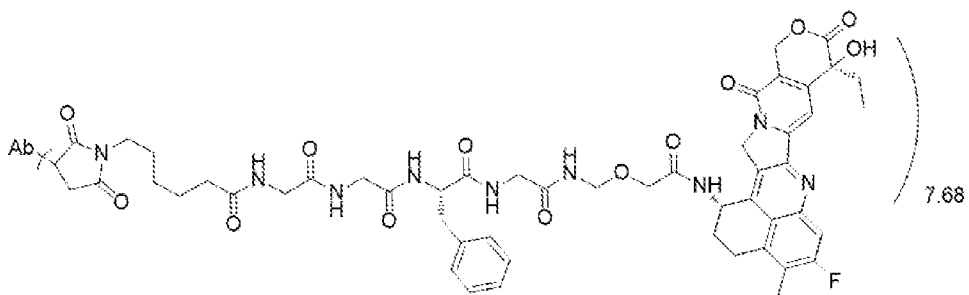


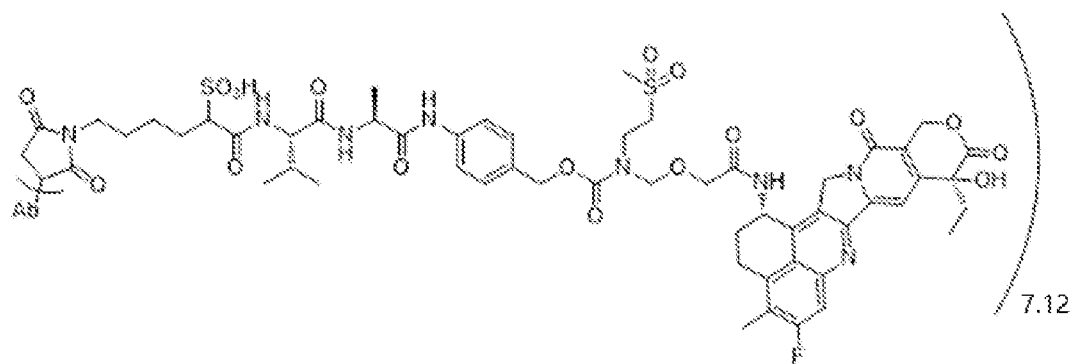
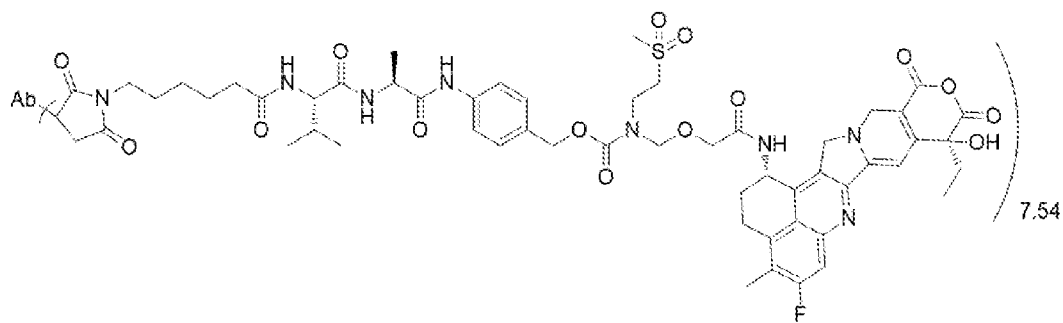
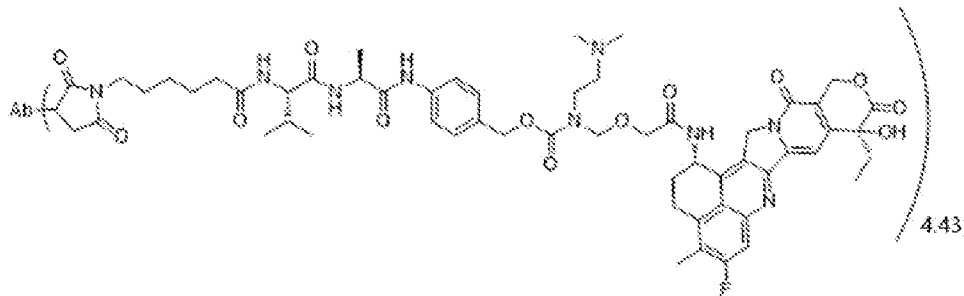
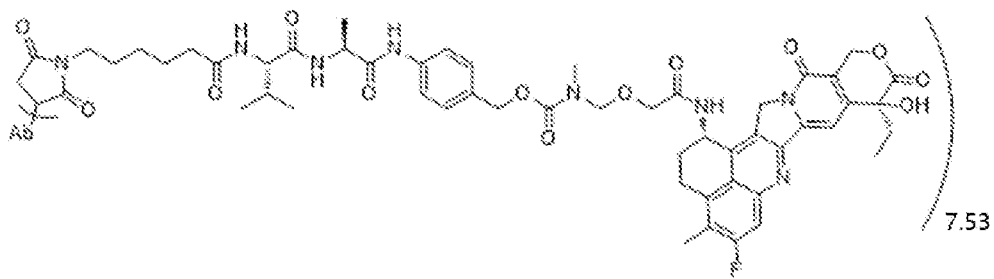
或

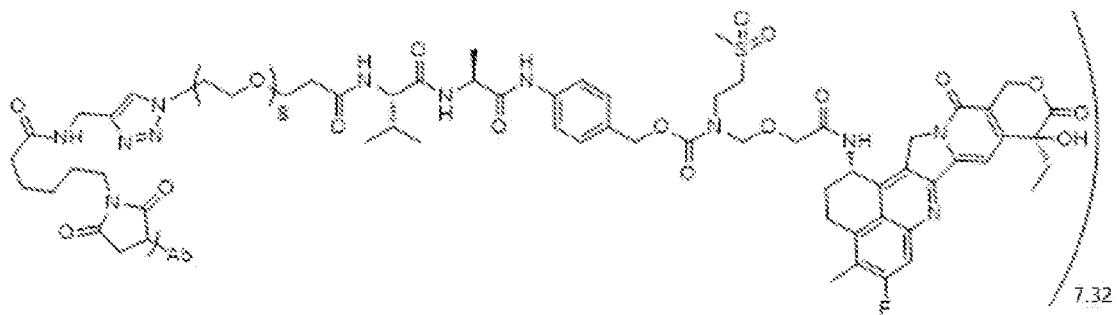
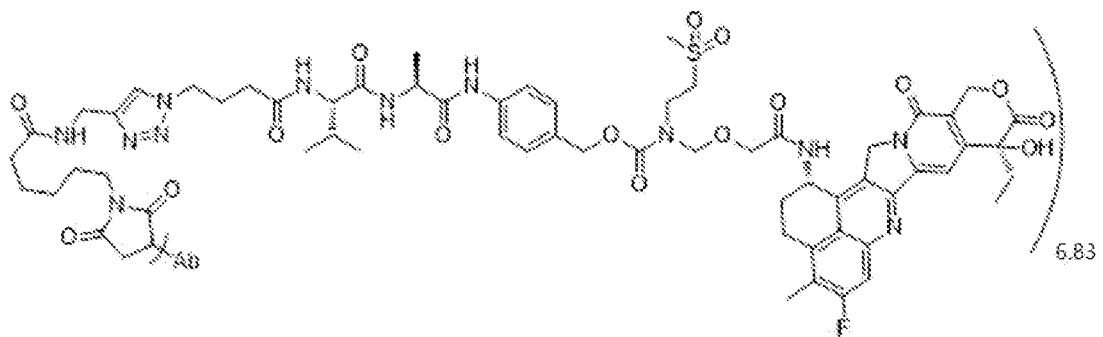
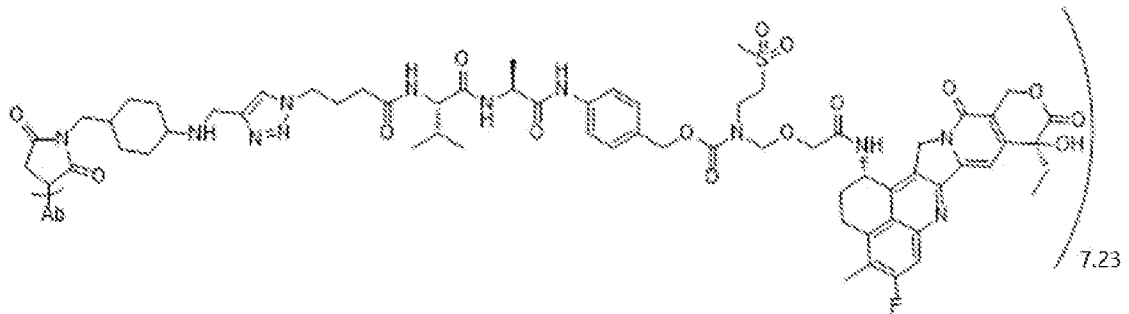
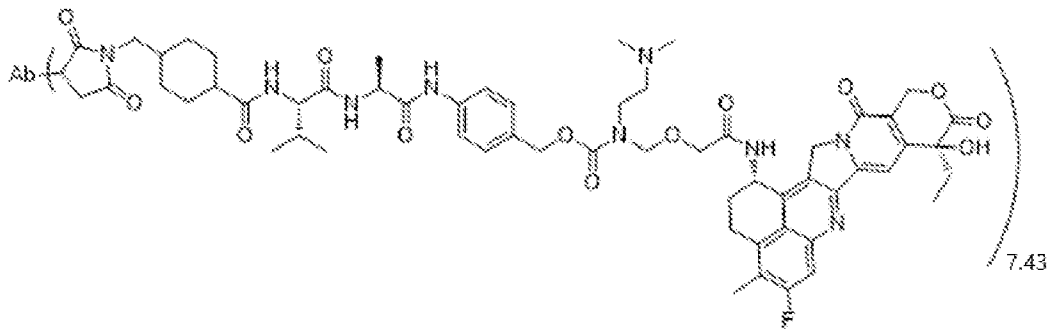
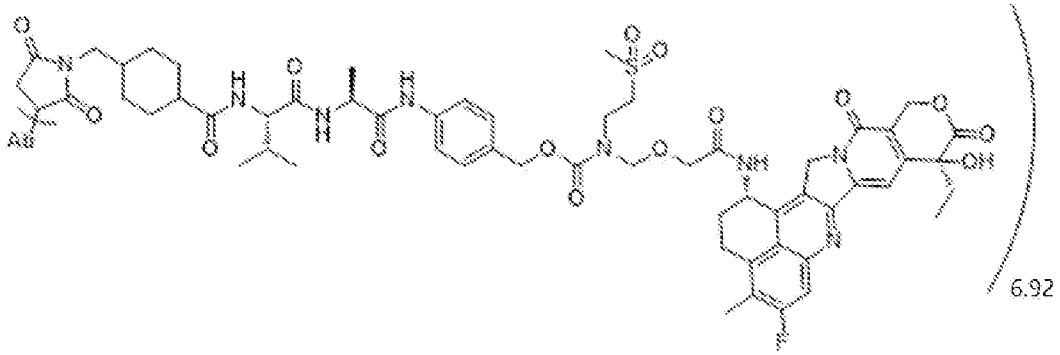
7.76, 其中 Ab

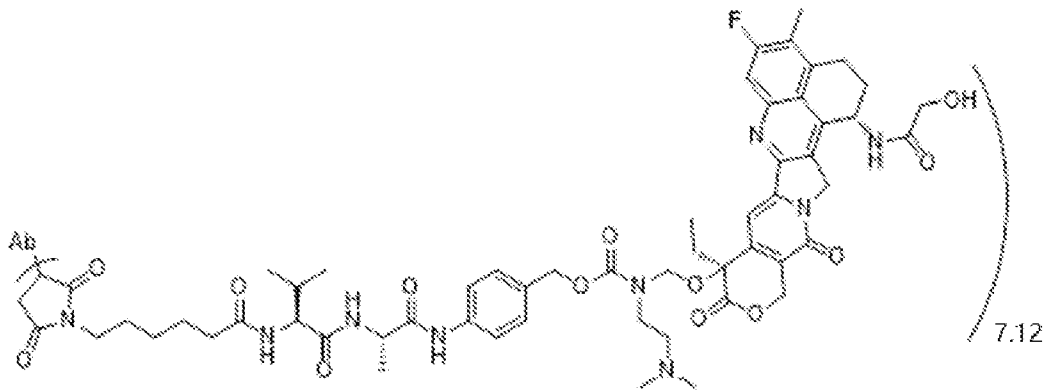
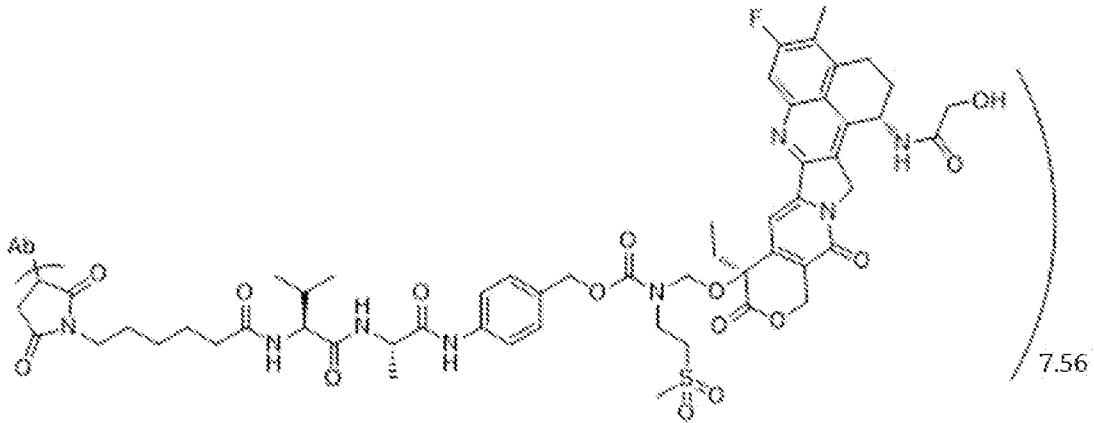
为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL；优选包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示的轻链。

在某一优选实施方案中，所述的抗体药物偶联物为如下所示的任一化合物：







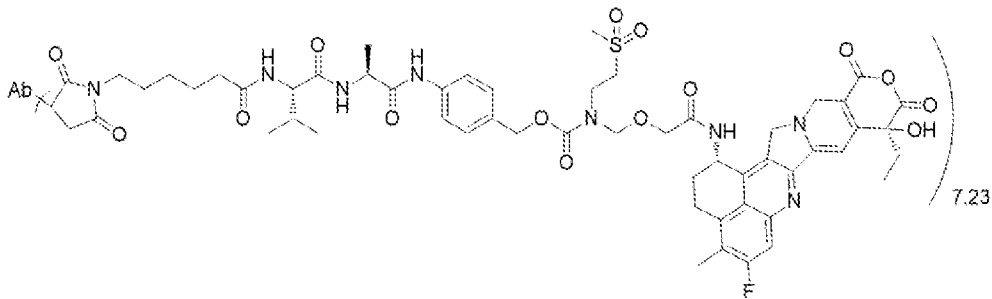


或

，其中 Ab

为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL；优选包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示的轻链。

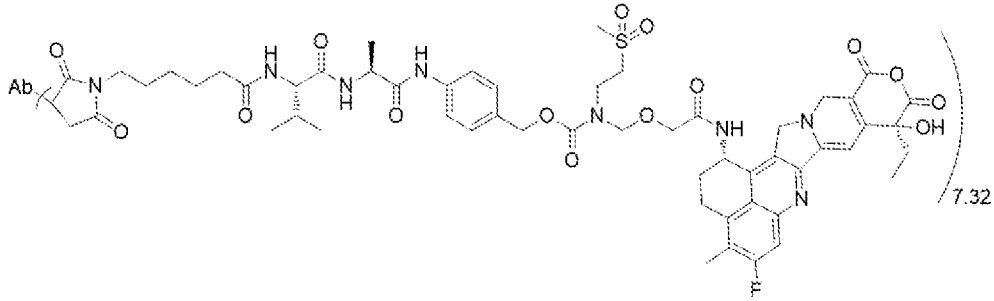
在某一优选实施方案中，所述的抗体药物偶联物为如下所示的化合物：



，其中 Ab 为

抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示的轻链。

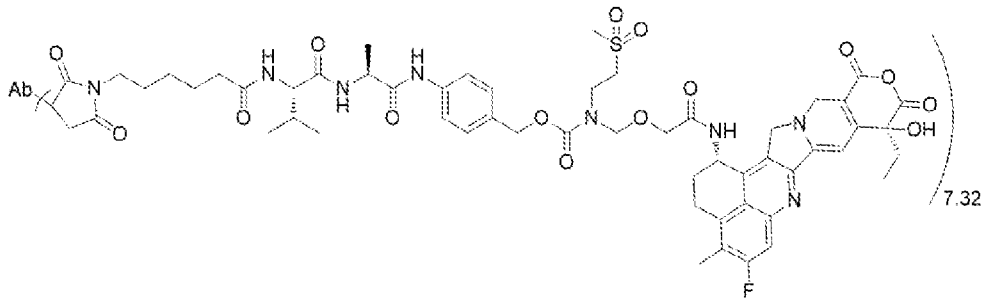
在某一优选实施方案中，所述的抗体药物偶联物为如下所示的化合物：



, 其中 Ab 为

抗 DLL3 抗体, 其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示的轻链。

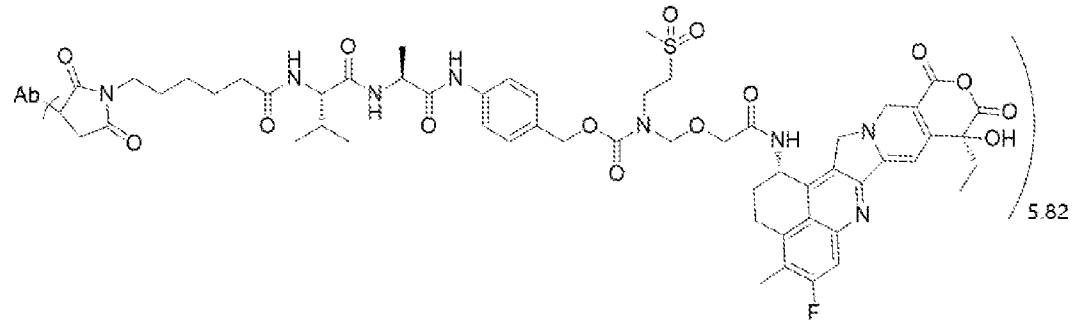
在某一优选实施方案中, 所述的抗体药物偶联物为如下所示的化合物:



, 其中 Ab 为

抗 DLL3 抗体, 其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的 VL; 优选包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 73 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 109 所示的轻链。

在某一优选实施方案中, 所述的抗体药物偶联物为如下所示的化合物:



, 其中

Ab 为抗 DLL3 抗体, 其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示的 VL; 优选包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示的轻链。

本发明某一方面还提供了一种嵌合抗原受体, 其包含如上所述的抗 DLL3 抗体。

本发明某一方面还提供了一种基因修饰的细胞, 其包含如上所述的嵌合抗原受体。优选地, 所述基因修饰的细胞为真核细胞, 优选分离的人细胞; 更优选免疫细胞如 T 细胞, 或 NK 细胞。

本发明某一方面还提供了一种抗 DLL3 抗体的制备方法，所述制备方法包括以下步骤：培养如上所述的转化体，从培养物中获得抗 DLL3 抗体。

本发明某一方面还提供了一种药物组合物，其包含如上所述的抗 DLL3 抗体、如上所述的抗体药物偶联物、如上所述的嵌合抗原受体、和/或如上所述的基因修饰的细胞。优选地，所述药物组合物为液体剂型、气体剂型、固体剂型和半固体剂型，和/或，所述药物组合物可通过口服给药、注射给药、经鼻给药、经皮给药或粘膜给药。更优选地，所述的药物组合物还包含组合治疗剂，所述的组合治疗剂包括化学治疗剂、放射治疗剂、免疫抑制剂和/或细胞毒性药物。

本发明某一方面还提供了如上所述的抗 DLL3 抗体、如上所述的抗体药物偶联物、如上所述的嵌合抗原受体、如上所述的基因修饰的细胞、和/或如上所述的药物组合物在制备治疗和/或预防 DLL3 表达异常相关疾病的药物、试剂盒和/或给药装置中的应用；或如上所述的抗 DLL3 抗体、如上所述的抗体药物偶联物、如上所述的嵌合抗原受体、如上所述的基因修饰的细胞、和/或如上所述的药物组合物在治疗和/或预防 DLL3 表达异常相关疾病中的应用。所述的 DLL3 表达异常相关疾病优选肿瘤，所述的肿瘤优选癌症，所述的癌症优选神经内分泌瘤、前列腺癌、胰腺癌和结直肠癌等内分泌瘤，更优选小细胞肺癌。

本发明某一方面还提供了一种试剂盒，其包括如上所述的抗 DLL3 抗体、如上所述的抗体药物偶联物、如上所述的嵌合抗原受体、如上所述的基因修饰的细胞、和/或如上所述的药物组合物；以及任选地，说明书。

本发明某一方面还提供了一种给药装置，所述给药装置包含：（1）用于对有需要的受试者施用如上所述的药物组合物的输注模块，以及（2）任选的药效监控模块。

本发明某一方面还提供了一种检测 DLL3 的方法，其包括使用如上所述的抗 DLL3 抗体进行检测的步骤。优选地，所述方法为非诊断和/或治疗目的。

本发明某一方面还提供了一种诊断、预防和/或治疗 DLL3 表达异常相关疾病的方法，其包括向有需要的受试者施用如上所述的抗 DLL3 抗体、如上所述的抗体药物偶联物、如上所述的基因修饰的细胞、和/或如上所述的药物组合物。所述的 DLL3 表达异常相关疾病优选肿瘤，所述的肿瘤优选癌症，所述的癌症优选神经内分泌瘤，更优选小细胞肺癌。

本发明还提供了一种抗体组（包括包含或由抗体片段或变体组成的分子），其中组内成员对应于本发明的一个、两个、三个、四个、五个，或更多个不同的抗体[例如完全抗体、Fab、F(ab)₂片段和 scFv 等]。

本发明某一方面还提供了一种抗体药物偶联物，其结构通式为 Ab-(L₅-L₄-L₃-L₂-L₁-

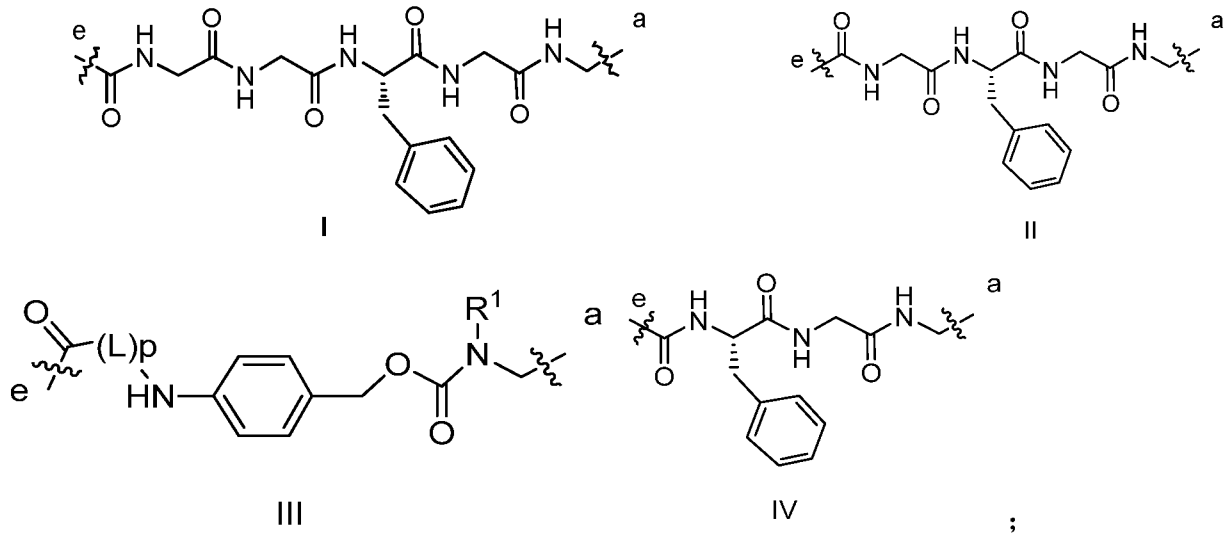
D)_m;

其中, Ab 为抗 DLL3 抗体; 所述抗 DLL3 抗体结合 DLL3 蛋白中 DSL 结构域和/或 N 末端;

D 为细胞毒性药物;

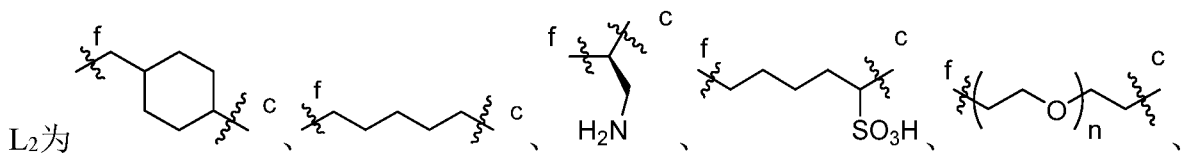
m 为 2~8;

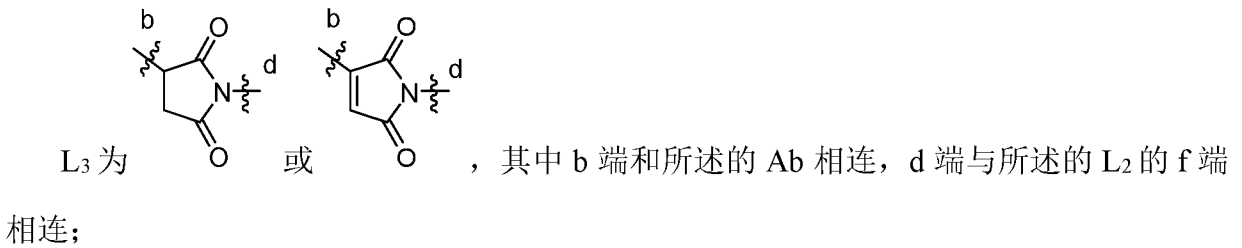
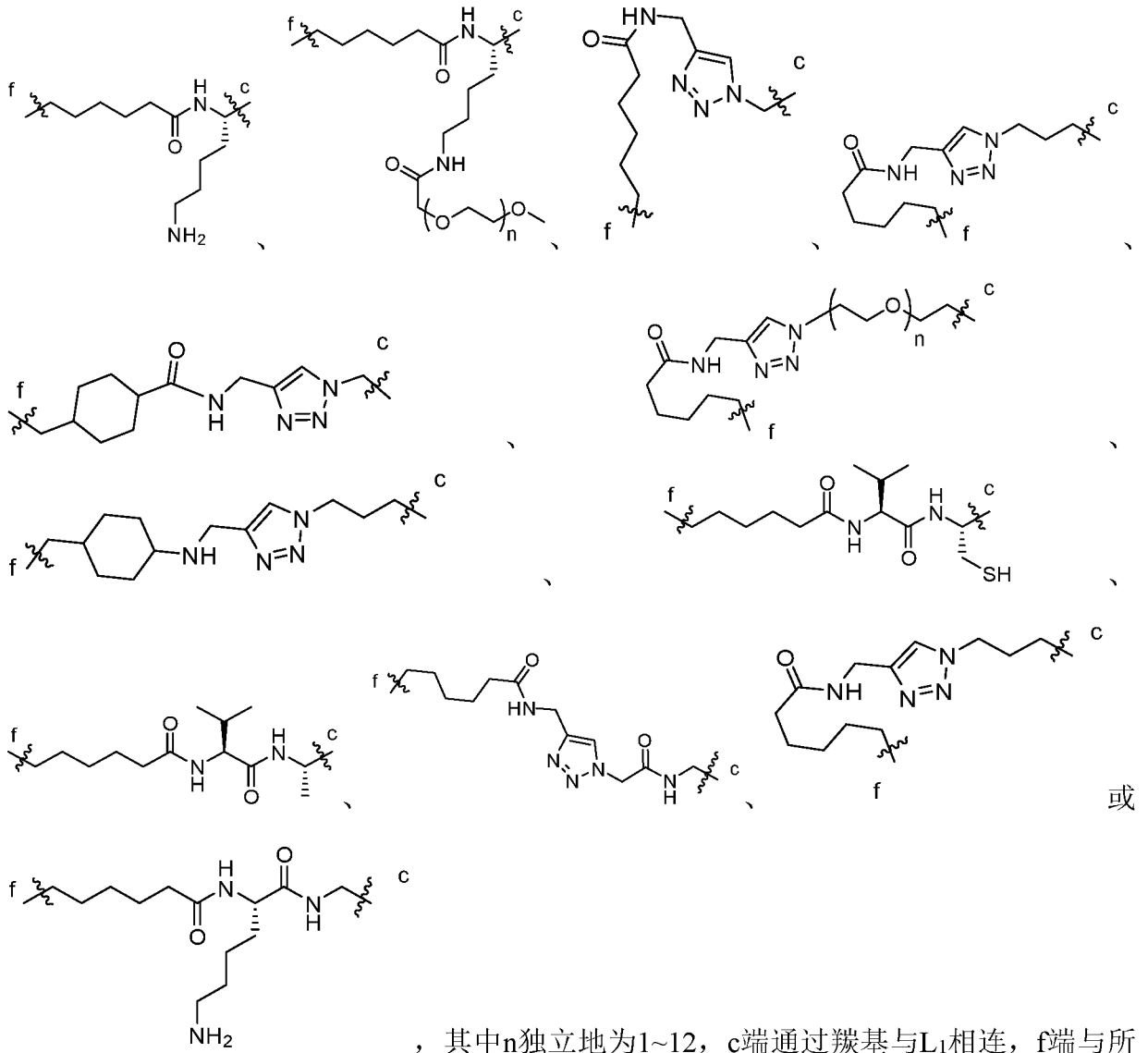
L₁ 的结构如式 I、II、III 或 IV 所示, 其 a 端与所述的细胞毒性药物相连, e 端和与所述的 L₂ 的 c 端相连;



(L)_p 中, L 独立地为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基、谷氨酸残基、天冬氨酸残基、半胱氨酸残基、谷氨酸残基、组氨酸残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、甲硫氨酸残基、脯氨酸残基、丝氨酸残基、苏氨酸残基、色氨酸残基、酪氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种; p 为 2-4;

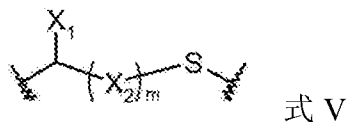
R¹ 为被一个或多个 -NR¹⁻¹R¹⁻² 取代的 C₁~C₆ 烷基、被一个或多个 R¹⁻³S(O)₂- 取代的 C₁~C₆ 烷基、C₁~C₆ 烷基、C₃~C₁₀ 环烷基、C₆~C₁₄ 芳基或 5~14 元杂芳基; 所述的 5~14 元杂芳基中的杂原子选自 N、O 和 S 中的一种或多种, 杂原子个数为 1、2、3 或 4; 所述的 R¹⁻¹、R¹⁻² 和 R¹⁻³ 分别独立地为 C₁~C₆ 烷基;





所述L₄不存在，或选自可切割接头、不可切割接头、亲水接头、预先带电荷的接头和基于二羧酸的接头；

所述L₅不存在，或为以下式V所示的化合物：



其中，X₁选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

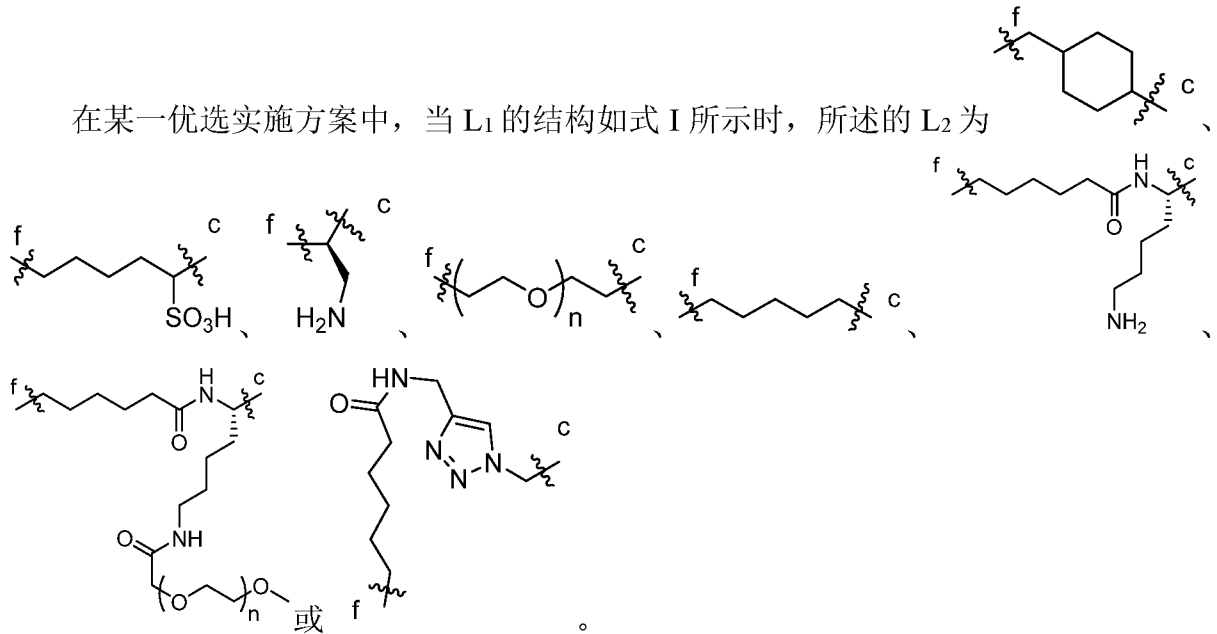
X₂ 选自烷基、环烷基和杂环基；m 为 0-5；S 为硫原子。

在某一优选实施方案中，D 为含有羟基、巯基或氨基的细胞毒性药物，例如微管抑制剂和/或拓扑异构酶抑制剂。

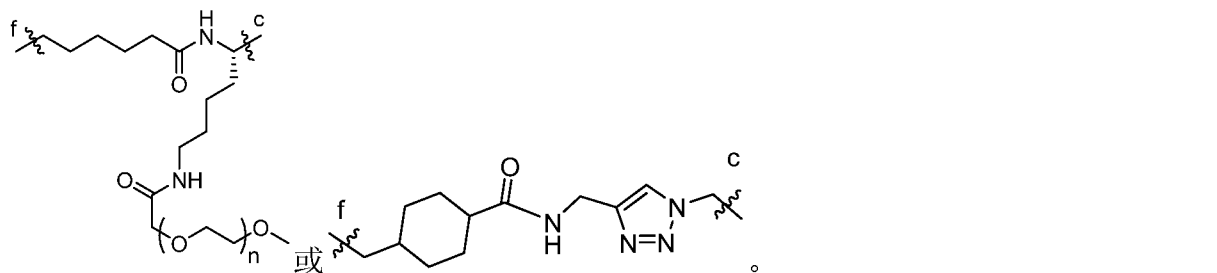
在某一优选实施方案中，所述的 L 为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基、脯氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种，优选为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种；更优选地，所述的 L 为缬氨酸残基和/或丙氨酸残基，所述的多种为两种或三种，所述的 p 为 2。

在某一优选实施方案中，所述的 R¹ 为被一个或多个 -NR¹⁻¹R¹⁻² 取代的 C₁~C₆ 烷基、被一个或多个 R¹⁻³S(O)₂-取代的 C₁~C₆ 烷基、或 C₁~C₆ 烷基，所述的 R¹⁻¹、R¹⁻² 和 R¹⁻³ 分别独立地为 C₁~C₄ 烷基。

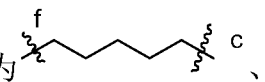
在某一优选实施方案中，当 L₁ 的结构如式 I 所示时，所述的 L₂ 为

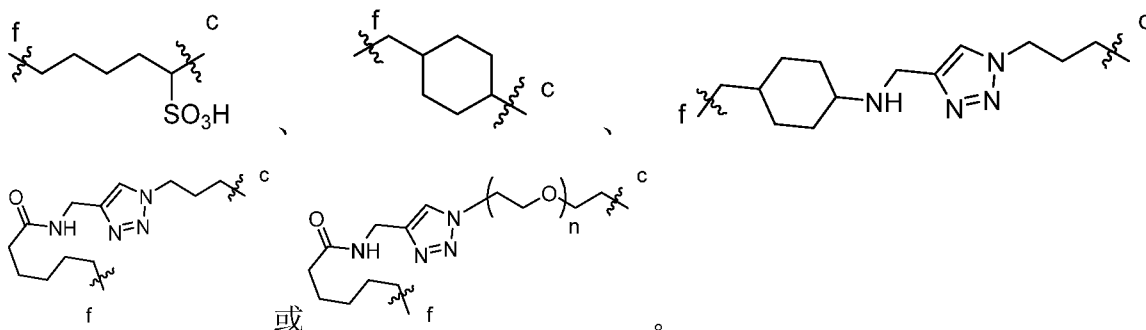


在某一优选实施方案中，当 L₁ 的结构如式 II 所示时，所述的 L₂ 为

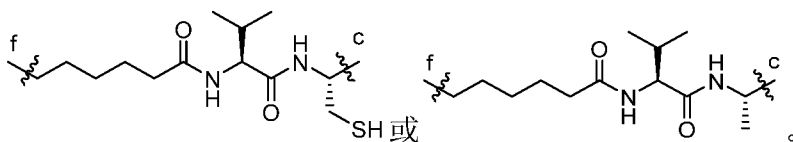


在某一优选实施方案中，当 L₁ 的结构如式 III 所示时，所述的 L₂ 为



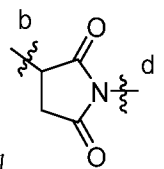


在某一优选实施方案中，当 L₁ 的结构如式 IV 所示时，所述的 L₂ 为



在某一优选实施方案中，所述 n 独立地为 8、9、10、11 和 12。

在某一优选实施方案中，所述的 m 为 2~8 的整数或非整数。



在某一优选实施方案中，所述的 L₃ 为

在某一优选实施方案中，所述 L₄ 选自 N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯 (SPP)、N-琥珀酰亚胺基 (4-碘乙酰基) 氨基苯甲酸酯 (SIAB)、N-琥珀酰亚胺基 4-(马来酰亚胺甲基) 环己烷羧酸酯 (SMCC)、6-马来酰亚胺基己酰基 (MC)、马来酰亚胺基丙酰基 (MP)、缬氨酸-瓜氨酸 (VC)、丙氨酸-苯丙氨酸 (ala-phe)、对氨基苄氧羰基 (PAB) 和 MC-VC-PAB。

在某一优选实施方案中，所述 L₅ 中，当 X₁ 为氢原子、X₂ 为烷基、m 为 1 时，式 V 所示的化合物为硫代乙酸 S-(3-巯基丙基) 酯。

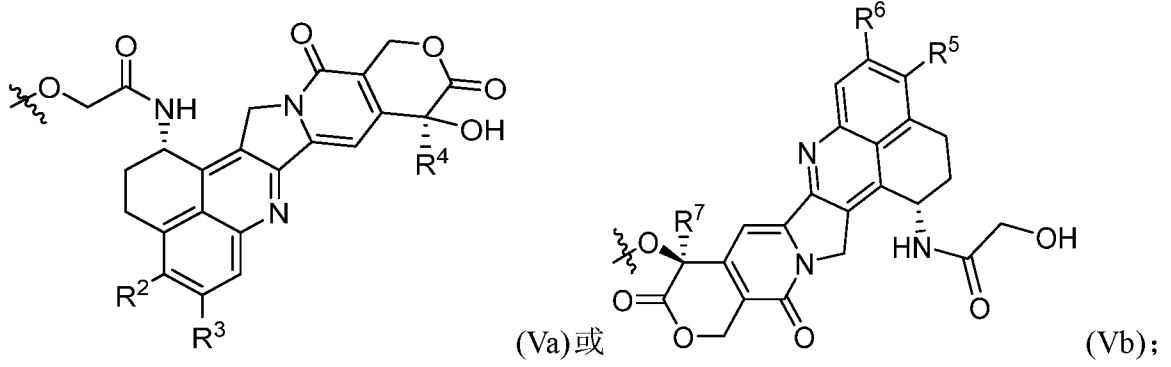
在某一优选实施方案中，D 为美登素衍生物、海兔毒素 10 衍生物、阿霉素类似物或喜树碱类似物的一种或多种。

所述美登素衍生物例如 DM1、DM3 和 DM4。

所述海兔毒素 10 衍生物例如 MMAE 和 MMAF。

所述阿霉素类似物例如多柔比星和 camsirubicin。

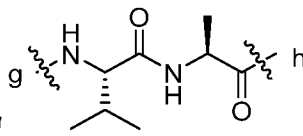
更优选地，D 为喜树碱类似物，进一步优选为如式 Va 或 Vb 所示结构的化合物：



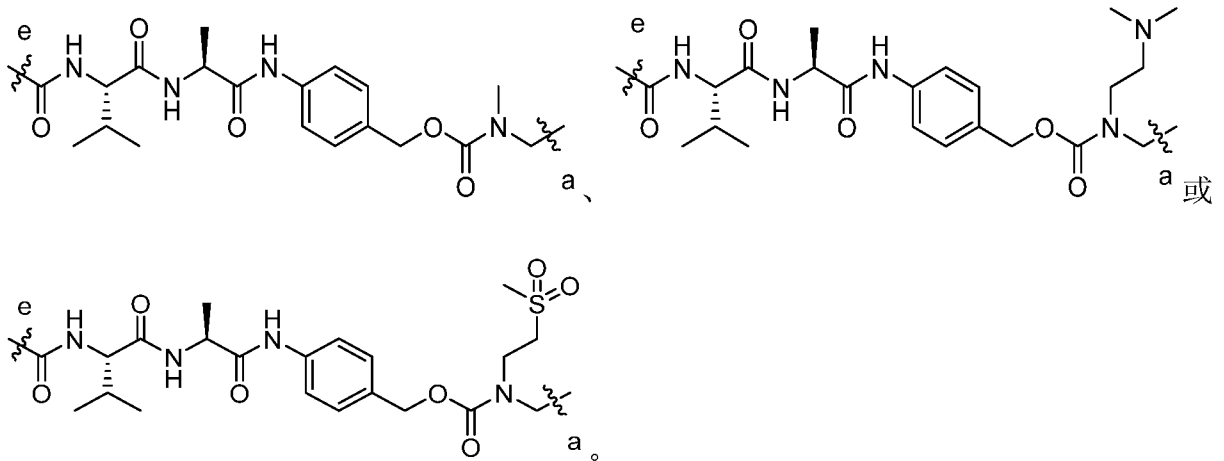
R² 和 R⁵ 分别独立地为 H、C₁-C₆ 烷基或卤素；

R³ 和 R⁶ 分别独立地为 H、C₁-C₆ 烷基或卤素；

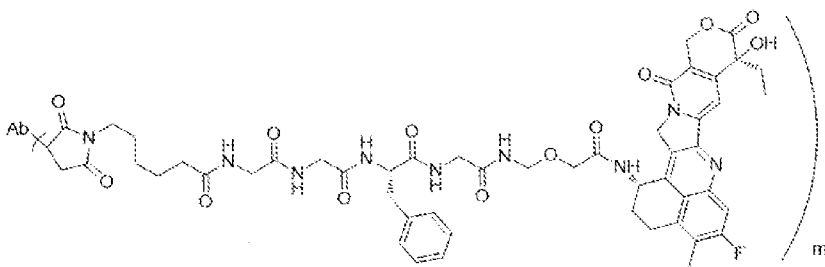
R⁴ 和 R⁷ 分别独立地为 C₁-C₆ 烷基。

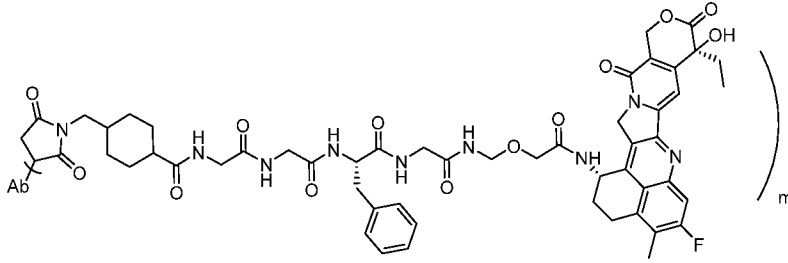
在某一优选实施方案中，所述的(L)_p为 ，其中 g 端通过羰基和所述的 L₂ 的 c 端相连。

在某一优选实施方案中，所述的式 III 为

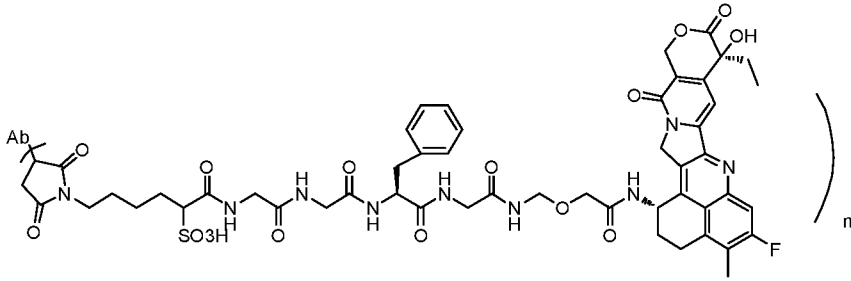


在某一优选实施方案中，所述的抗体药物偶联物为如下所示的任一化合物：

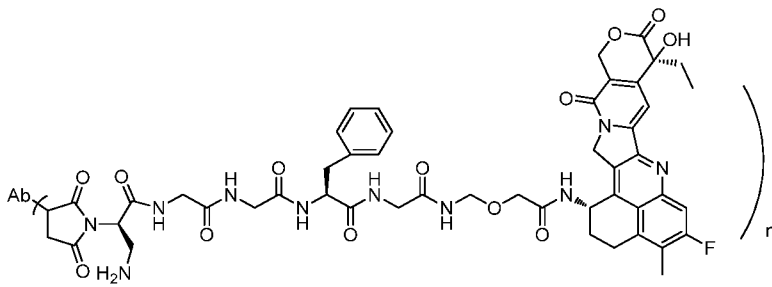




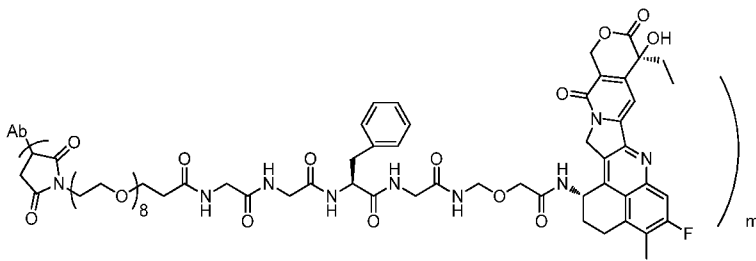
1



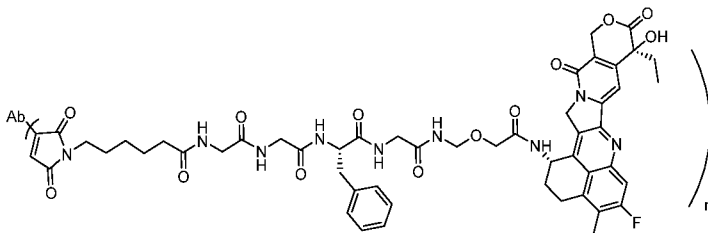
2



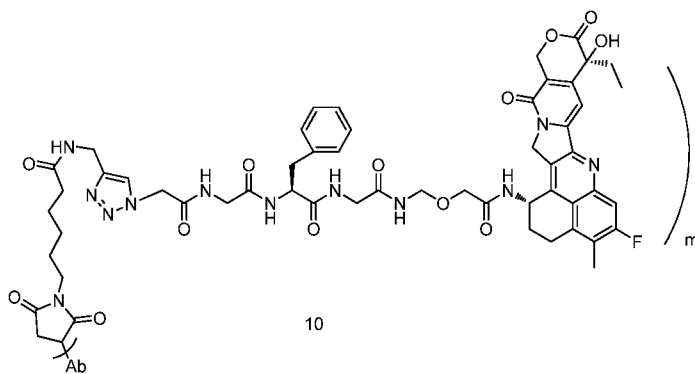
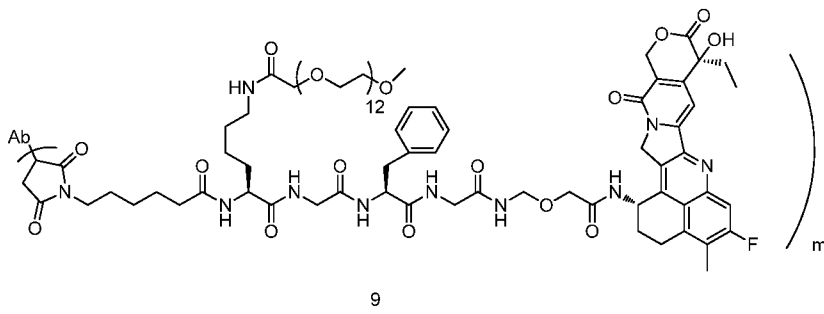
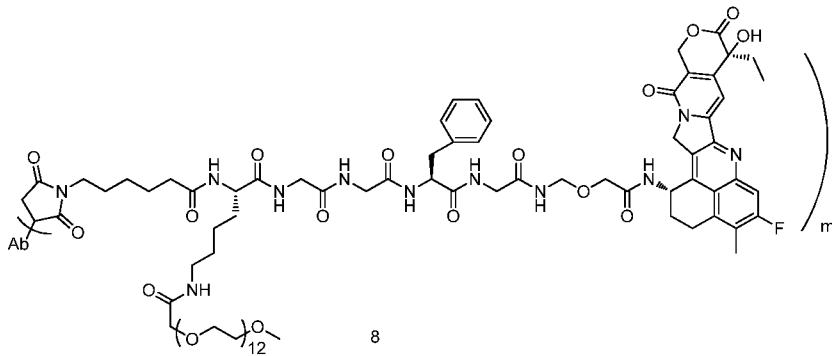
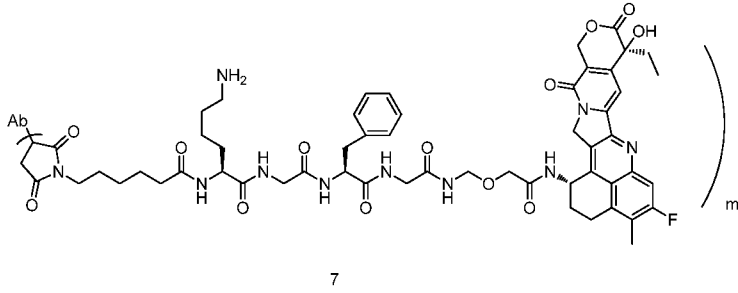
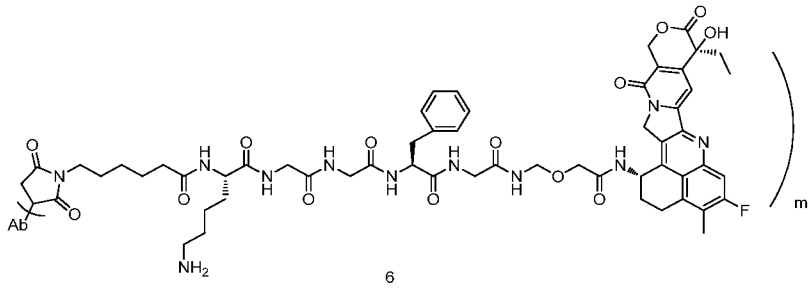
3

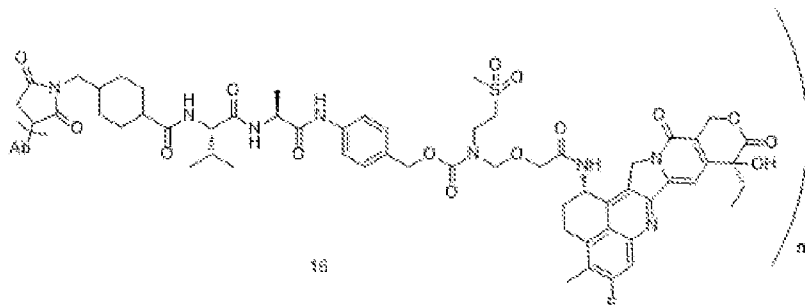
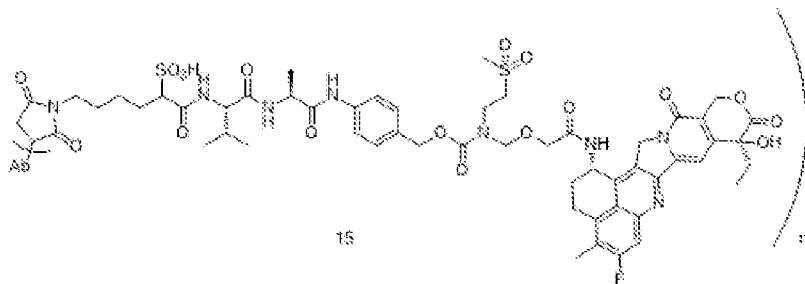
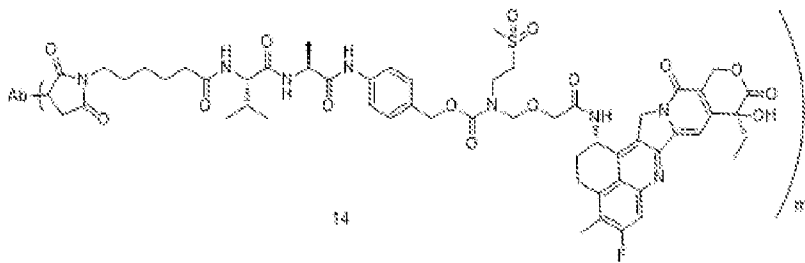
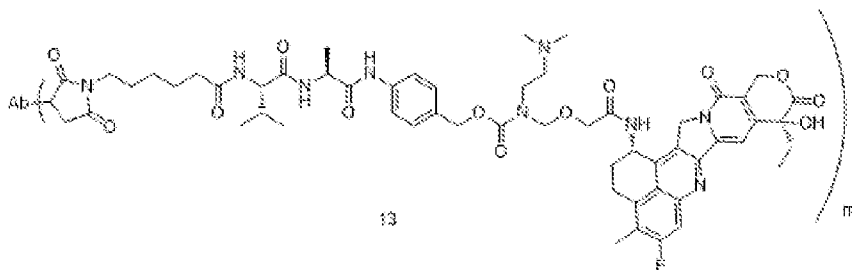
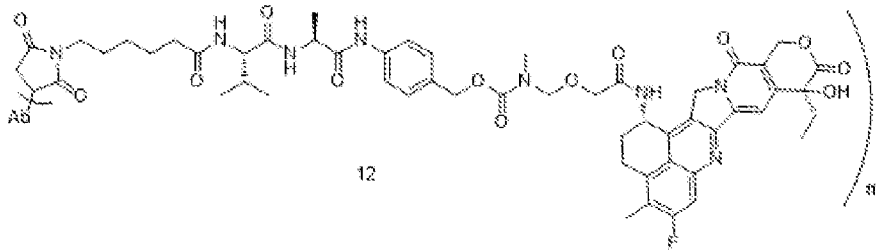
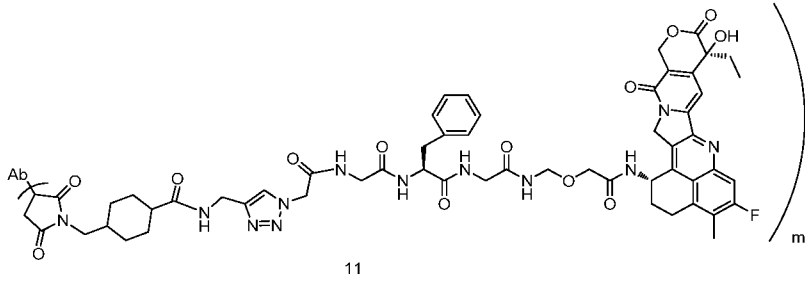


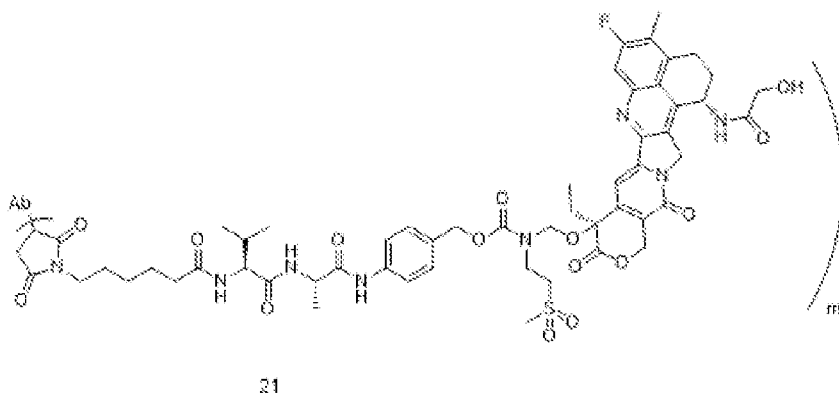
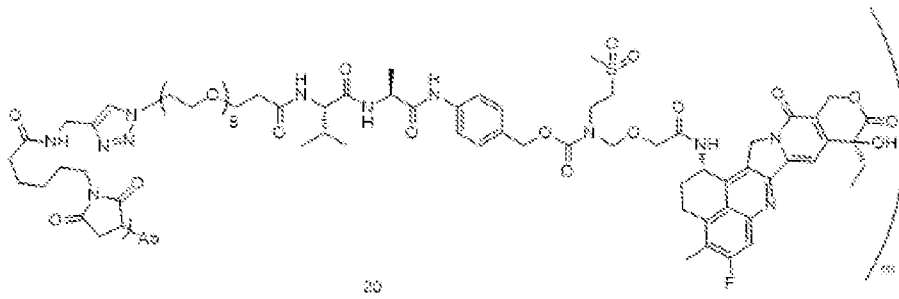
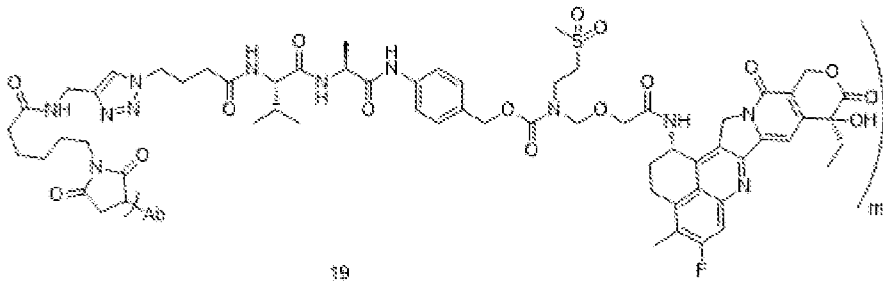
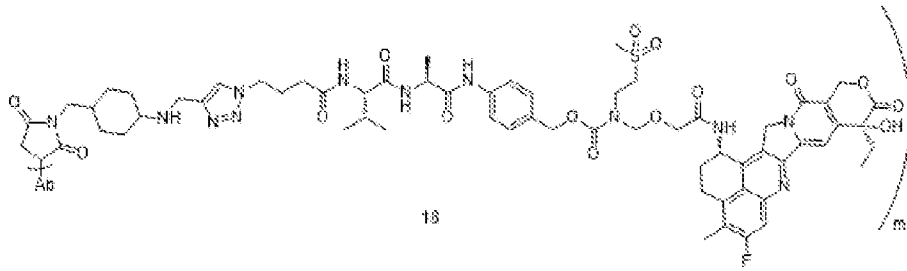
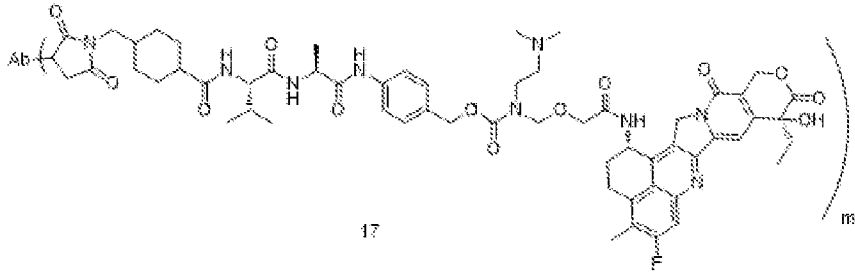
4

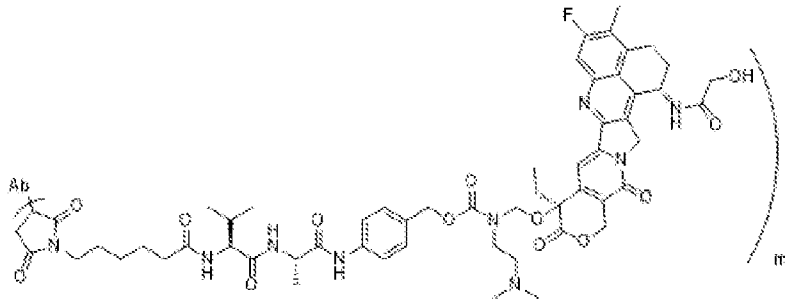


5

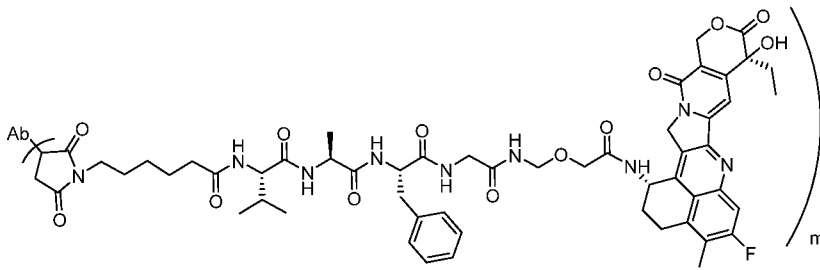






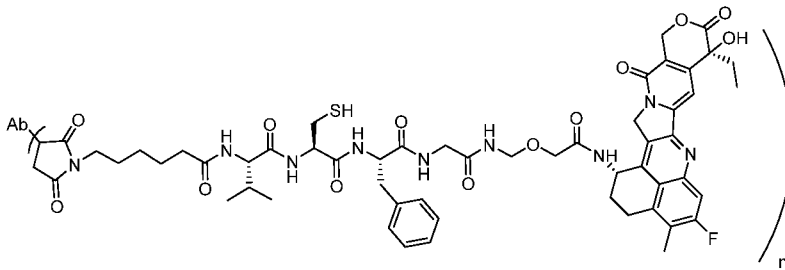


22



23

或

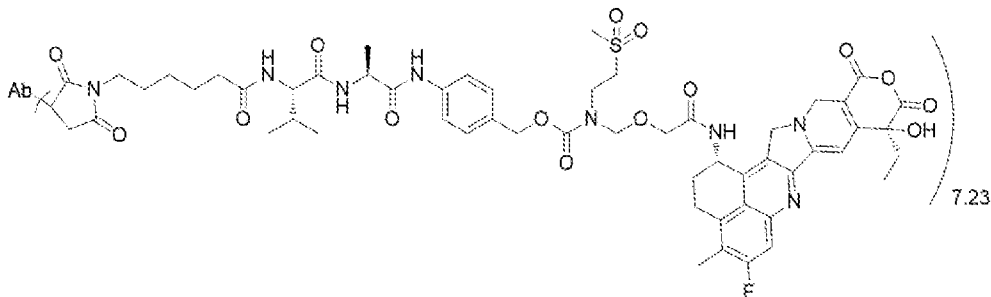


24

所述抗 DLL3 抗体为具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示的轻链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的重链的抗 DLL3 抗体、或具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示的轻链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的重链的抗 DLL3 抗体；

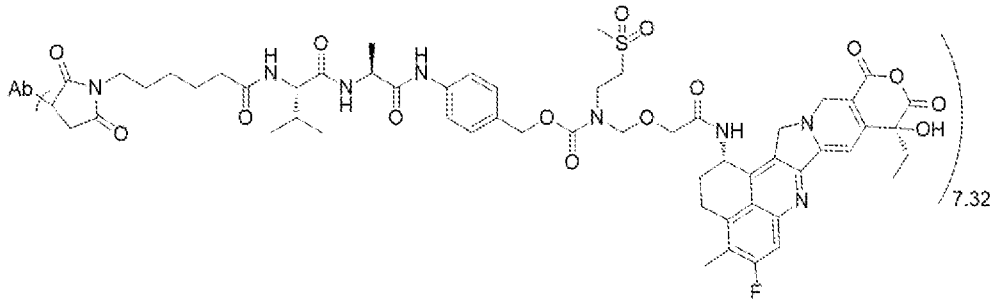
所述的 m 为 7.23 或 7.32。

优选地，所述的抗体药物偶联物为如下所示的任一化合物：



，其中 Ab 为抗

DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示的轻链或



，其中 Ab 为抗

DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示的轻链。

本发明某一方面还提供了一种如本发明所述抗体药物偶联物的制备方法，所述制备方法包括以下步骤：将过量溶解在 DMSO 的连接基-药物偶联物滴加进含抗 DLL3 抗体的缓冲液中，得所述抗体药物偶联物。

本发明某一方面还提供了一种药物组合物，其包含如本发明所述的抗体药物偶联物。

优选地，所述药物组合物为液体剂型、气体剂型、固体剂型或半固体剂型，和/或，所述药物组合物可通过口服给药、注射给药、经鼻给药、经皮给药或粘膜给药。

更优选地，所述的药物组合物还包含组合治疗剂，所述的组合治疗剂包括化学治疗剂、放射治疗剂、免疫抑制剂和/或细胞毒性药物。

本发明某一方面还提供了如本发明所述的抗体药物偶联物和/或如本发明所述的药物组合物在制备治疗和/或预防 DLL3 表达异常相关疾病的药物、试剂盒和/或给药装置中的应用；

所述的 DLL3 表达异常相关疾病优选肿瘤，所述的肿瘤优选癌症，所述的癌症优选神经内分泌瘤，更优选小细胞肺癌。

本发明某一方面还提供了一种试剂盒，其包括如本发明所述的抗体药物偶联物和/或如本发明所述的药物组合物；以及任选地，说明书。

本发明某一方面还提供了一种给药装置，其特征在于，所述给药装置包含：（1）用于对有需要的受试者施用如本发明所述的抗体药物偶联物和/或如本发明所述的药物组合物的输注模块，以及（2）任选的药效监控模块。

本发明某一方面还提供了一种检测 DLL3 的方法，其特征在于，其包括使用如本发明所述的抗体药物偶联物进行检测的步骤。优选地，所述检测 DLL3 的方法为非诊断和/或治疗目的。

本发明某一方面还提供了一种诊断、预防和/或治疗 DLL3 表达异常相关疾病的方法，其包括向有需要的受试者施用如本发明所述的抗体药物偶联物和/或如本发明所述的药物组合物。

本发明中，所述的偶联反应的条件和操作可为本领域该偶联反应常规的条件和操作。

本发明中， m 表示细胞毒性药物分子与Ab的摩尔比（又称DAR，即药物抗体偶联比率）， m 可为整数或小数，优选地理解为是：单克隆抗体分子与细胞毒性药物偶联后得到的抗体药物偶联物中的药物分子与单克隆抗体分子的摩尔比的平均值，一般可以采用疏水层析（Hydrophobic-Interaction Chromatography, HIC），聚丙烯酰胺-SDS凝胶电泳（SDS-PAGE, electrophoresis），液相质谱（liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS）等方式测定得到。

本发明中，术语“ C_1 ~ C_6 烷基”单独或组合地表示含有1至6个、特别是1至4个碳原子的饱和的直链或支链烷基基团，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基，“ C_1 ~ C_6 烷基”优选为甲基或乙基。

本发明的抗体可利用该领域广为周知的技术制备，例如杂交瘤方法、重组DNA技术、噬菌体展示技术、合成技术或该等技术的组合、或该领域已知的其它技术。

本文所用术语“选择性”或“特异性”指这样的事实：所述公开的拮抗剂不显示对除DLL3之外的物质的显著结合，除了在某些特殊情况下：其中补充拮抗剂使其具有另外的、与DLL3特异性结合部分不同的特异性（例如，双特异性或双官能分子，其中所述分子设计用于结合或行使两种功能，其中至少一种是特异性结合DLL3）。

如本文所述的“抗体分子”或“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，即含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。因此，术语抗体不仅涵盖完整抗体分子，还包括所述抗体的片段以及所述抗体和抗体片段的变体（包括衍生物）。在本文中所述术语抗体分子例如包括但非限于单链Fv(scFv)，Fab片段，Fab'片段，F(ab')₂，二硫键连接的Fv(sdFv)，Fv，及完整抗体或全长抗体。术语“单链Fv”或“scFv”是指一种多肽，其包含与抗体VH结构域连接的抗体的VL结构域。免疫特异性结合DLL3的抗体可以与其它抗原发生交叉反应。优选地，免疫特异性结合DLL3的抗体与其它抗原不发生交叉反应。免疫特异性结合DLL3的抗体可以例如通过免疫测定或其它本领域技术人员已知的方法鉴别。“完整抗体”或“全长抗体”指包含两条重链（H）和两条轻链（L）的蛋白，所述重链和轻链通过二硫键相互连接，所述蛋白包含：（1）就重链而言，包含重链可变区（本文缩写为“VH”）和含有三个结构域CH1、CH2、CH3的重链恒定区；和（2）就轻链而言，包含轻链可变区（本文缩写为“VL”）和含有一个结构域CL的轻链恒定区。本发明的抗体包括但非限于单克隆，多特异性，人或嵌合抗体，单链抗体，Fab片段，F(ab')₂片段，抗独特型（抗-Id）抗体（包括例如本发明抗体的抗-Id抗体），和上述任何抗体的表位结合片段。本发明的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白的任何类型（例如IgG，IgE，IgM，IgD，IgA和IgY），类别（例如IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgA1和IgA2）或亚

类。本发明的抗体可为一种单克隆抗体或者多克隆抗体，所述的单克隆抗体优选鼠抗人单克隆抗体。本发明的抗体可为超人源化抗体或者双抗体。

本申请中，所述的“重链抗体”指的是只包含一个重链可变区（VHH）和两个常规的CH2与CH3区的抗体，又称为HCAbs。

“单域抗体”，又称为“纳米抗体”，指的是从重链抗体中克隆出来的VHH结构，是已知的可结合目标抗原的最小单位。

本发明中所述的“有90%、95%、98%或99%以上的同源性”的氨基酸序列是通过对前述序列中所示的氨基酸序列进行插入、缺失或者替换获得，所述的替换可为：例如，对序列进行计算机结构模拟分析，对可能存在的、特别是CDR区的转录后修饰（Potential post-translational modifications, PTMs）位点分析，包括抗体的聚集、脱酰胺基敏感（asparagine deamidation, 位点（NG, NS, NH等）、天冬氨酸异构（DG, DP）敏感位点、N糖基化（N- $\{P\}$ S/T）敏感位点及氧化敏感位点等分析和替换。

“KD”指获得自Kd（具体结合分子-靶蛋白相互作用的解离速率）与Ka（具体结合分子-靶蛋白相互作用的结合速率）之比（或Kd/Ka，以摩尔浓度（M）表示）的解离常数。可使用本领域充分建立的方法测定KD值。测定结合分子的KD的优选方法是通过使用表面等离子共振，例如生物传感器系统，如Biacore™(GE Healthcare Life Sciences)系统。

术语“治疗”或它的同等表达当用于例如癌症时，指用来减少或消除患者体内癌细胞数目或减轻癌症的症状的程序或过程。癌症或另外的增生性障碍的“治疗”不一定指癌细胞或其它障碍会实际上被消除，细胞或障碍的数目会实际上被减少或者癌症或其它障碍的症状会实际上被减轻。通常，即使只具有低的成功可能性也会进行治疗癌症的方法，但是考虑到患者的病史和估计的生存预期，其仍然被认为诱导总体有益的作用过程。

术语“药学上可接受的载体”是指能够递送本发明有效量活性物质、不干扰活性物质的生物活性并且对宿主或者患者无毒副作用的任何制剂或载体介质代表性的载体包括水、油、蔬菜和矿物质、膏基、洗剂基质、软膏基质等。这些基质包括悬浮剂、增粘剂、透皮促进剂等。它们的制剂为化妆品领域或局部药物领域的技术人员所周知。

在不违背本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。

本发明所用试剂和原料均市售可得。

本发明的积极进步效果在于：本发明的抗DLL3抗体具有很好的内化活性、具有较佳的与人DLL3蛋白的结合活性、在蛋白水平的亲和力均较强。本发明的抗体偶联药物具有很好的成药性、生物学活性和体内外抗肿瘤活性，其可以实现细胞毒性药物在治疗

包括 SCLC 在内的具有神经内分泌特征的肿瘤病人中的应用。

附图说明

图 1 为 pV81 载体的图谱。

图 2 显示了实施例 4 中抗体的内化结果。

图 3 显示了嵌合抗体与 hDLL3 的结合活性的量效曲线。

图 4 显示了嵌合抗体与 hDLL1（左侧）、hDLL4（右侧）的结合活性的量效曲线。

图 5 显示了嵌合抗体与小鼠（左侧）、猴 DLL3（右侧）的结合活性的量效曲线。

图 6 显示了不同 ADC 候选物处理 DLL3 靶细胞 6 天的细胞毒活性量效图。

图 7 显示了 ADC 药物在 NCI-H82 模型中的体内抗肿瘤情况。

具体实施方式

表 a. 缩写词说明

DMEM	基础培养基
HAT	筛选培养基
PEI	聚醚酰亚胺
MOI	感染复数
GFP	绿色荧光蛋白
SPF	无特定病原体动物
PBST	含吐温的磷酸缓冲盐溶液
HRP	辣根过氧化物酶
TMB	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
PBS	磷酸缓冲盐溶液
APC	别藻蓝蛋白

下面通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之内。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。

实施例 1. 特异性靶向 hDLL3 的单克隆抗体 FDA027 和 FDA031 的制备

本发明中选取了高亲和力并特异性靶向 hDLL3 的单克隆抗体 FDA027 和 FDA031，其中 FDA027 具有如 SEQ ID NO: 1 所示的轻链氨基酸序列和如 SEQ ID NO: 2 所示的重链氨基酸序列，FDA031 具有如 SEQ ID NO: 3 所示的轻链氨基酸序列和如 SEQ ID NO: 4 所示的重链氨基酸序列。

FDA027 轻重链核苷酸序列通过全基因合成（苏州金唯智）方式获得，通过 EcoR I（购于 NEB，R3104S）和 Hind III（购于 NEB，R3101S）双酶切分别单独构建至 pV81

载体中（如图 1），通过连接转化至 Trans 1-T1 感受态细胞（购自全式金，CD501）中，从中挑取克隆进行测序确认，培养扩增阳性克隆进行质粒中量抽提，获得抗体轻链真核表达质粒 FDA027-L/pV81 和抗体重链真核表达质粒 FDA027-H/pV81，轻重链真核表达质粒质量比为 1.5:1，通过电击转化至已适应悬浮生长的 CHO 细胞中（购于 ATCC），将电击后细胞以 2000-5000 个细胞/孔接种至 96 孔板中，培养 3 周后使用 HTRF 法（均相时间分辨荧光）按照试剂盒（购于 Cisbio, 62HFCPEG）的说明书测定表达量，挑选表达量最高的 cell pool（细胞池）扩增至 125 ml 摇瓶中（培养体积 30 ml），37°C，5.0%CO₂，130 r/min 震荡培养，3 天后扩至 1000 ml 摇瓶中（培养体积 300 ml），37°C，5.0%CO₂，130 r/min 震荡培养，第四天开始隔天流加起始培养体积 5-8%的补料培养基，培养至 10-12 天结束培养，收获液 9500 r/min 离心 15min，去除细胞沉淀，收集上清液，再用 0.22 μm 滤膜过滤处理，处理好的样品使用 MabSelect 亲和层析柱（购于 GE 公司）进行纯化，最终得到较高纯度的抗 DLL3 抗体 FDA027。FDA031 采用与 FDA027 相同的操作方法制备得到。

实施例 2. 人 hDLL3 过表达载体及稳转细胞株的制备

采用人 DLL3 表达质粒 pCMV3-DLL3-t1（购自北京义翘，HG20010-UT）转化大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1（购自全式金，CD501）用于转染表达质粒的扩增。转化过程参考感受态细胞的使用说明书。从转化平板上挑取单克隆至培养基中扩增过夜，6000r/min 离心 20min，收集菌液用于质粒抽提，采用质粒中量抽提试剂盒（购自 MN，产品编号：DP117），按照说明书步骤提取质粒 DNA。

选取生长状态良好的对数增长期的 HEK293 细胞（购自中科院细胞库），新鲜培养基 DMEM 中添加 10%胎牛血清稀释细胞至 5×10^5 个细胞/ml 密度，2ml/孔接种于 6 孔培养板，培养箱内（37°C、5% CO₂）培养。次日，转染试剂 lipofectamin3000（购自 Thermo，L3000-008）转染质粒 pCMV3-DLL3-t1 至 HEK293 细胞，操作按照 lipofectamin3000 转染试剂盒的说明书进行。转染 48hr 后，细胞以每孔 1 个的接种密度接种于 96 孔培养板并加入包含 200μg/ml 潮霉素 B（购自 Thermo，10687010）的新鲜培养基进行培养，每 3 到 4 天更换包含潮霉素 B 的新鲜培养基，获得稳定表达 hDLL3 的稳转单克隆细胞。流式细胞术检测筛选表达 hDLL3 的 HEK293 细胞，PBS 稀释检测抗体 goat anti-hDLL3-PE（购自 R&D，FAB4315P）至 10μg/ml，加入 100μl 到 5×10^5 个待测细胞中 4°C 孵育 1hr。接着加入 1ml 含有 2%胎牛血清的 PBS 重悬细胞，1500r/min 离心 5min 后弃上清，重复操作两次。加入 1ml PBS 重悬细胞，用 CytoFLEX 进行检测（购自 Beckman），人 DLL3 表达阳性率大于 85%为阳性克隆，HEK293-DLL3 稳转细胞株构建成功。

采用上述相同方法稳定转染了含有不同 hDLL3 结构域的 HEK293 过表达细胞株，分别为不含 N-末端的 hDLL3（其序列如 SEQ ID NO: 5 所示）过表达细胞株，不含 N-末端和 DSL 结构域的 hDLL3（其序列如 SEQ ID NO: 6 所示）过表达细胞株，不含 N-末端、DSL 和 EGF1 结构域的 hDLL3（其序列如 SEQ ID NO: 7 所示）过表达细胞株，不含 N-末端、DSL 和 EGF1 和 EGF2 结构域的 hDLL3（其序列如 SEQ ID NO: 8 所示）过表达细胞株。

SEQ ID NO: 5

GKPIPPLLGLDSTSGARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGC
SPEHGFCEQPGEERCLEGTGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSET
PRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSL
QPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGG
RDCRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDP
QRYLSGGGGSGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKKRMAKYEKAIEKEMGEMHRELNA

SEQ ID NO: 6

GKPIPPLLGLDSTSGAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGEERCLEGTGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGP
SATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGG
ADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCA
GRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVACAPGYM
GARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLSGGGGSGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKKRMAKY
EKAIEKEMGEMHRELNA

SEQ ID NO: 7

GKPIPPLLGLDSTSGGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCF
NGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRC
EHLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLV
CACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLSGGGGSGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVI
SRKKRMAKYEKAIEKEMGEMHRELNA

SEQ ID NO: 8

GKPIPPLLGLDSTSGSVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSL
QPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGG

RDCRERADPCAARPCAHHGGRCYAHFSGSLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDP
 QRYLSGGGGSGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA

注：下划线为 V5 标签，斜体部分为胞内序列

实施例 3. 杂交瘤单克隆抗体的制备和抗体的筛选

3-1. 免疫接种和血清效价检测

选择 6 只 6 周龄 SPF 级 Balb/C 雌性健康小鼠（购自上海吉辉实验动物饲养有限公司），随机分为 A、B 两组，间隔两周进行一次免疫重组的 DLL3 蛋白（购自 ACRO，DL3-H5255），首次免疫使用弗氏完全佐剂，随后的免疫使用弗氏非完全佐剂。在第 35 天、49 天对小鼠进行眼眶采血，通过 ELISA 和流式细胞术（FACS）常规方法检测小鼠免疫血清效价。

ELISA 检测方法：PBS 稀释 DLL3 蛋白至浓度为 1 μ g/ml，100 μ l/孔加入到 96 孔酶标板 4 $^{\circ}$ C 过夜，第二天弃去板孔上清液，每孔加入 200 μ l 含有 2% 的牛奶的 PBS 溶液进行封闭，2hr 后弃去封闭液并加入 200 μ l 的 PBST（1% 的 Tween20）洗涤板孔 3 次，之后将待检血清预稀释 100 倍后作为起始浓度，3 倍梯度稀释 11 个浓度，每孔 100 μ l 加入到酶标板中，室温反应 1hr 后弃去板孔上清，加入 200 μ l 的 PBST（1% 的 Tween20）洗涤 5 次，加入 100 μ l 的 HRP 标记的羊抗鼠的二抗（Jackson，1:10000），室温孵育 1hr 后弃去上清，每孔加入 200 μ l 的 PBST（1% 的 Tween20）洗涤 7 次。每孔加入 100 μ l 的 TMB 显色液显色 10min，加入 2M 的 HCl 终止反应后，酶标仪读取 450nm 的吸光度值（购自 biotek，Elx808）。

FACS 检测方法：96 孔 V 型微孔板（购自 axygen，wipp02280）中每孔加入 3 \times 10⁵ 个 HEK293-DLL3 稳转细胞或内源表达细胞 SHP-77（购自 ATCC），1500r/min 离心 1min，弃上清。将免疫血清用 PBS 按 1:50 稀释后，4 倍梯度稀释 8 个浓度，50 μ L/孔加入至微孔板中，冰上孵育 30min 后，每孔加入 150 μ L PBS 重悬细胞，1500r/min 离心 1min，重复操作 2 次。加入 APC 标记的羊抗鼠 IgG（Jackson，货号 115-605-164，PBS 1:800 稀释），每孔 50 μ L，冰上孵育 30min。每孔加入 150 μ L PBS 重悬细胞，1500r/min 离心 1min，重复操作 2 次，用 CytoFLEX 进行检测（购自 Beckman）。经检测后，挑选效价最高且连续两次免疫血清效价趋于平稳的小鼠融合，在融合前 3 天用 DLL3 蛋白腹腔注射进行一次冲击免疫。

3-2. 杂交瘤融合筛选与克隆化

取冲击免疫的 Balb/C 小鼠脾脏制备细胞悬液，通过电融合方法，将脾细胞与 SP2/0 细胞（购于中科院细胞库，TCM42）进行融合，融合后将杂交瘤细胞按 2 \times 10⁴ 个细胞每

孔铺至 96 孔板中,并用 HAT 培养基进行筛选,7 天后取孔板上清分别进行 ELISA 检测,方法如实施例 3-1 所述,对 ELISA 阳性的细胞再用 FACS 检测方法分别检测过表达 DLL3 的 293 细胞系与 SHP-77 内源细胞系。对细胞结合阳性的克隆进行有限稀释,重复 2 次,稀释的克隆采用实施例 3-1 的 ELISA 和 FACS 方法检测确认阳性克隆。经过 2 次有限稀释后检测的阳性克隆杂交瘤被扩培用于抗体的生产纯化和抗体表达基因的测序。

3-3. 杂交瘤抗体生产纯化

为了产生 mg 量的抗体用于功能表征,将挑选的杂交瘤细胞以 2.5×10^5 /mL 的密度接种至含 250mL 杂交瘤无血清培养基(购自源培生物, H630KJ)的细胞培养瓶中, 37°C 下 130r/min 摇瓶培养,待细胞活率降至 30%左右,离心收获细胞上清液。使用 Protein G 介质纯化小鼠单克隆抗体并通过透析方法将抗体置换至 PBS pH7.2 缓冲液中。通过微量分光光度计(购自杭州奥盛仪器, Nano-300)测定吸光度来确定抗体浓度和纯度。

实施例 4. 抗体内吞活性的分析

采用实施例 3-1 所述的 FACS 的检测方法,使用 SHP-77 的细胞,检测实施例 3-3 中获得的杂交瘤抗体的内吞活性。检测方法简述如下,分装 6 份 5×10^5 个 SHP-77 细胞于 96 孔 V 型微孔板中, 1500r/min 离心 1min, 弃上清。加入饱和的 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的待检测抗体,每孔加入 $200\mu\text{L}$, 冰上孵育 30min。然后每孔加入 $150\mu\text{L}$ PBS, 1500r/min 离心 1min, 弃上清, 重复操作 4 次。用 $200\mu\text{L}$ 的 PBS 重悬, 各取出 1 份放入 37°C 细胞培养箱中分别放置 5hr、3hr、1hr、0.5hr、15min, 余下的最后一份细胞放置在冰上, 待孵育时间结束, 所有样品细胞均置于 4°C , 1500r/min 离心 1min 弃上清, 加入 APC 标记的羊抗鼠 IgG(Jackson, 货号 109-605-098, PBS 1:800 稀释), 每孔加入 $50\mu\text{L}$, 冰上孵育 30min, 接着每孔加入 $150\mu\text{L}$ PBS 重悬细胞, 1500r/min 离心 1min, 弃上清, 重复操作 4 次进行清洗。最后每孔加入 $100\mu\text{L}$ PBS 重悬细胞, 用 CytoFLEX 进行检测(购自 Beckman), 检测荧光值统计见下表 1, 图 2 给出了实施例 3 的 3-3 所得抗体的内化结果, 结果表明实施例 3 的 3-3 获得的抗体具有很好的内化活性。

表 1. 流式细胞术检测抗体内化的荧光值

内化时间克隆 编号	0H	15min	0.5hr	1hr	3hr	5hr
1A5	39334.4	24860.8	13904	11750.3	5350.2	5480.6
10B1	22388.8	17304.5	19086.3	15787.2	6162.2	7109.8
13C2	40198.1	33166.9	22021.9	16956.4	7614.7	6044.5
19C7	29555.7	25554.6	26322.5	23874.2	9128.7	7171.3
23G2	20311.3	16356.9	11603.9	8657.5	4893.1	3850.2
26D9	15316.2	12430.3	9031.7	7359.9	3952.6	4776.8
32E8	32069.3	24327.6	15060.5	10887.7	6062.4	4386.1
33F11	27557.5	21296.3	10625.1	8360.1	5239.7	4382.6
36H10	36015.8	28811.1	21143.3	16580.6	7308.9	5094.1
4H7	15373.2	12694.3	8278.5	9924.5	4994.2	4438.4
6A2	20254.7	16360.5	12564.4	9985.2	5141.1	3758.6

15G2	20327.3	17705.2	13404.6	11890.3	6312.2	4728.7
------	---------	---------	---------	---------	--------	--------

实施例 5. 杂交瘤抗体表达基因序列的获取

每个克隆收集 2×10^5 个杂交瘤细胞（来源于实施例 3-2）用于 RNA 的抽提，细胞 300 g（此实施例中为转速单位，下同）离心 5 min 后弃上清，加 250 μ L Trizol（购自 TAKARA，T9108）裂解液裂解杂交瘤细胞，接着加入 50 μ L 的氯仿涡旋震荡混匀至乳浊液，室温静置 5 min，12000g，4 $^{\circ}$ C 离心 15 min，吸取上清至新的 Rnase-free 的 1.5 ml 离心管中，加入 125 μ L 的异丙醇充分混匀后室温静置 10 min。12000g，4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 可见沉淀，弃上清，加入 250 μ L 的 75% 乙醇，轻轻上下颠倒混匀 12000g，4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 吸弃上清，室温干燥沉淀 10 min。接着分别加入 20 μ L 的 Rnase-free 水溶解沉淀 30 min，溶解后用移液枪混匀，并测定浓度。根据 RNA 浓度采用 PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒（购自 TAKARA，RR036A）将待测克隆的 RNA 反转录为 cDNA。合成抗体轻链和重链特异性引物，通过 PCR 的方法获取抗体轻链和重链序列，采用 Universal DNA 纯化回收试剂盒（购自天根生化科技，DP214-03）对扩增片段进行凝胶回收，接着与 pMD18T 载体（购自 TAKARA，6011）4 $^{\circ}$ C 连接 30 min。取 5 μ L 连接产物加入 50 μ L TG-1（Lucigen 公司）感受态细胞中，轻轻混匀后 42 $^{\circ}$ C 热击 90 s，热击后冰上孵育 3 min，加入 1 mL 无抗性 2 YT 液体培养基（购自生工，A507019-0250），置于 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 的摇床 1 h 后，取 100 μ L 菌液均匀的涂布在 Amp 抗性（购自生工，A600469-0005）的 2 YT 固体平板上，37 $^{\circ}$ C 倒置培养 14-16 h。挑单克隆送生工测序。得到测序结果后用 Vector NTI，Vbase2 软件分析测序结果，获得具有较好结合活性及内吞活性的抗体的氨基酸序列，所得结果见表 2。

表 2. 所得抗体轻、重链各 CDR 和可变区的氨基酸序列编号（采用 kabat 编码）

抗体	重链 CDR1 (VH CDR1)	重链 CDR2 (VH CDR2)	重链 CDR3 (VH CDR3)	轻链 CDR1 (VL CDR1)	轻链 CDR2 (VL CDR2)	轻链 CDR3 (VL CDR3)	重链可变区 (VH)	轻链可变区 (VL)
1A5	SEQ ID NO: 9 GYTFTES A	SEQ ID NO: 10 INPNNG GI	SEQ ID NO: 11 GSSYYR DYFDY	SEQ ID NO: 12 ENVGTY V	GAS	SEQ ID NO: 14 GQSYSY PLT	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
33F11	SEQ ID NO: 19 GYTFTE NT	SEQ ID NO: 20 INPRNGV T	SEQ ID NO: 21 TNTYYR DYFDY	SEQ ID NO: 12 ENVGTY V	GAS	SEQ ID NO: 24 GQTYTY PLT	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
23G2	SEQ ID NO: 29 GYTFD YA	SEQ ID NO: 30 IVSTDSG KT	SEQ ID NO: 31 ARNPYY DYDGYA MDY	SEQ ID NO: 32 DHINN W	GAT	SEQ ID NO: 34 QQYWSI PYT	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36
32E8	SEQ ID NO: 39 GFSLSTS GMG	SEQ ID NO: 40 IWWDDV K	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42 SSVNSSS	TTS	SEQ ID NO: 44 HQFHRS PFT	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46

			ARIAEVT GQVGLH YAMDY					
13C2	SEQ ID NO: 49 GFAFSSY D	SEQ ID NO: 50 ISSGGSY T	SEQ ID NO: 51 ASPLLGL RFAY	SEQ ID NO: 52 TGAVTTI NY	GTN	SEQ ID NO: 54 ALYYSN HWV	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 56
19C7	SEQ ID NO: 59 GYTFTY YVM	SEQ ID NO: 60 INPYND GT	SEQ ID NO: 61 ARWLLR EYAMDY	SEQ ID NO: 62 DNIHNY	NAK	SEQ ID NO: 64 QHFWST PWT	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 66
26D9	SEQ ID NO: 69 GYTFTT YV	SEQ ID NO: 70 INPYND DT	SEQ ID NO: 71 ARWGLT GTGDYY AMDY	SEQ ID NO: 72 GNVHNY	NAK	SEQ ID NO: 74 QHFWTT PWT	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 76
10B1	SEQ ID NO: 79 FTFSNYT	SEQ ID NO: 80 FSSGGSY T	SEQ ID NO: 81 SRDRRS DGYYHL YAMDY	SEQ ID NO: 82 QDISHY	YTS	SEQ ID NO: 84 QQGYTL PLT	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 86
36H1 0	SEQ ID NO: 89 GYTFTD YN	SEQ ID NO: 90 IYPFNGG I	SEQ ID NO: 91 ARLNWE GY	SEQ ID NO: 92 QDINSY	RAN	SEQ ID NO: 94 LQYAEFP YT	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 96
4H7	SEQ ID NO: 99 GFNFKD YY	SEQ ID NO: 100 IDPENG NA	SEQ ID NO: 101 ASEDAY YPFAY	SEQ ID NO: 102 QSLLYSS NQKNY	WAS	SEQ ID NO: 104 QQYYSY RT	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 106
6A2	SEQ ID NO: 89 GYTFTD YN	SEQ ID NO: 110 IYPYNG GT	SEQ ID NO: 111 ARSDPY YTMDY	SEQ ID NO: 112 QSVNND	FTS	SEQ ID NO: 114 QQDHNS PYT	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 33
15G2	SEQ ID NO: 63 GYSFTD YN	SEQ ID NO: 83 IDPYYG GT	SEQ ID NO: 93 ARGGNN YGDY	SEQ ID NO: 103 ENIYYYS	NAN	SEQ ID NO: 113 NANKQA YDVPWT	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23

实施例 6. 嵌合抗体的构建和制备及结合活性检测

对以上实施例 5 中得到的具有较好结合活性及内吞活性的杂交瘤克隆重链可变区序列进行基因合成, 并通过同源重组的方式克隆到含有人源抗体 IgG1 重链恒定区氨基酸序列的 pFUSEss-CHIg-hG1 载体 (购自 InvivoGen, 货号 pfusess-hchg1) 中, 获得嵌合抗体重链表达载体。克隆的轻链可变区序列采用相同的方法同源重组分别克隆到含有人源抗体 Kappa 轻链恒定区氨基酸序列 CL 的 pFUSE2ss-CLIg-hk 载体 (购自 InvivoGen, 货号 pfuse2ss-hclk) 中, 获得嵌合抗体轻链表达载体。构建所得嵌合抗体的轻重链全长对应的氨基酸序列编号如表 3-1 所示。收集生长状态良好的对数增长期的 293F 细胞接种至 250mL 细胞培养瓶中并在 50mL 培养基中培养, PEI 共转染轻重链表达质粒各 25 μ g。收集转染后培养第 7 天的细胞上清, 离心并使用 0.45 μ m 滤器过滤, Protein A 介质纯化抗体并通过透析方法将抗体置换至 PBS pH7.2 缓冲液中。微量分光光度计 (购自杭州奥盛仪

器，Nano-300)测定吸光度来确定抗体浓度。通过 ELISA 的方法，检测获得的嵌合抗体与人 DLL3 蛋白的结合活性(结果如图 3 和表 3-2 所示)，ELISA 检测方法如实施例 3-1 所述。由图 3 可知，所获得的嵌合抗体均具有较佳的与人 DLL3 蛋白的结合活性。

表 3-1. 嵌合抗体的轻重链全长氨基酸序列编号

嵌合抗体	重链全长	轻链全长
ch1A5	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
ch33F11	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28
ch23G2	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38
ch32E8	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48
ch13C2	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58
ch19C7	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 68
ch26D9	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 78
ch10B1	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88
ch36H10	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 98
ch4H7	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 108
ch6A2	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 53
ch15G2	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 109

表 3-2. 嵌合抗体与人 DLL3 蛋白的结合活性

嵌合抗体	EC50 (ng/mL)
FDA027	10.84*
FDA031	23.35
ch32E8	8.828
ch1A5	9.213
ch33F11	9.546
ch23G2	9.406
ch4H7	11.48
ch19C7	8.658
ch6A2	13.13
ch36H10	15.88
ch10B1	16.77
ch26D9	11.78
ch13C2	394.8
ch15G2	8.526

实施例 7. 嵌合抗体竞争分析及结合表位分析

将实施例 6 中获得的嵌合抗体分别标记 Biotin，通过 ELISA 方法检测抗体互相竞争结合的活性。检测方法简述如下，PBS 稀释 DLL3 蛋白的浓度至 1 μ g/ml，铺到 384 孔酶标板(购自 Corning, 3700) 40 过夜，第二天弃去板孔上清，使用 80 μ l 3%的牛奶(溶解于 PBS)进行封闭 2hr，使用 80 μ l 的 PBST (1%的 Tween20)洗涤 3 次，之后将未标记的嵌合抗体分别预稀释至 100 μ g/ml，然后 3 倍梯度稀释 11 个浓度点，每孔 25 μ l 加入到已经封闭结束的酶标板中，室温反应 1hr，之后弃去板孔上清，使用 80 μ l 的 PBST (1%的 Tween20)洗涤 5 次后加入 25 μ l 的 Biotin 标记的嵌合抗体室温孵育 1hr，再次弃去上

清，使用 80 μ l 的 PBST (1%的 Tween20) 洗涤板孔 5 次。最后用 HRP 标记的链霉亲和素二抗 1: 5000 (购自金斯瑞, M00091) 室温孵育 1hr, 弃上清, 使用 80 μ l 的 PBST (1%的 Tween20) 洗涤 7 次。加入 25 μ l 的 TMB 显色液显色 10min, 加入 2M 的 HCl 终止反应后, 酶标仪 (购自 biotek, Elx808) 读取 450nm 的吸光度值。

为了确定抗体具体结合的区域, 将按照实施例 2 所述的含有不同 hDLL3 结构域的 HEK293 过表达细胞株 (对应序列为: SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8) 通过 FACS 检测嵌合抗体与这四种细胞的结合能力, 确定抗体的结合区域。简言之: 将 5×10^5 个 DSL、EGF1、EGF2、EGF3 的过表达细胞于 96 孔 V 型微孔板中, 1500r/min 离心 1min, 弃上清。加入饱和的 1 μ g/ml 的待检测抗体, 每孔 200 μ L, 冰上孵育 30min。然后每孔加入 150 μ L PBS, 1500r/min 离心 1min, 弃上清, 重复洗板 4 次。加入 APC 标记的羊抗人 IgG (Jackson, PBS 1:800 稀释), 每孔 50 μ L, 冰上孵育 30min。用 PBS 洗板 4 次后每孔加入 100 μ L PBS 重悬细胞, 用 CytoFLEX 进行检测 (购自 Beckman), 所得结果表明: 抗体 ch1A5、ch33F11 以及 ch32E8 结合至 DLL3 的 EGF2 结构域, FDA031、ch13C2 和 ch15G2 抗体结合至 DLL3 的 N 末端, FDA027 结合至 DLL3 的 DSL 结构域, 其余抗体均结合 DLL3 的 EGF3 至 EGF6 的结构域中, 从而得出 ch15G2 的结合表位为 N 端结构域; ch32E8、ch1A5 和 ch33F11 的结合表位是 EGF2 结构域; ch36H10、ch6A2、ch19C7、ch26D9、ch23G2、ch10B1 和 ch4H7 的结合表位为 EGF3-EGF6 结构域。

实施例 8. 抗体与人 DLL1, DLL4 蛋白及鼠、猴 DLL3 细胞结合的交叉反应性

将实施例 6 中获得的嵌合抗体通过 ELISA 方法检测其对 hDLL1 (购自 Acro, DL1-H52H8), DLL4 (购自 Acro, DL4-H5227) 蛋白的结合能力, ELISA 的检测方法, 分别将 DLL1 和 DLL4 蛋白用 PBS 稀释至终浓度为 1 μ g/ml, 分别铺到 384 孔酶标板 (购自 corning, 3700) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次日弃去板孔上清, 使用 80 μ l 3%的牛奶 (溶解于 PBS) 进行封闭 2hr, 使用 80 μ l 的 PBST (1%的 Tween20) 洗涤板孔 3 次, 之后将待检嵌合抗体、FDA027 和 FDA031 分别稀释至 20 μ g/ml, 3 倍梯度稀释 11 个浓度点, 每孔 25 μ l 加入到已经封闭结束的酶标板中, 室温反应 1hr, 弃去上清, 使用 80 μ l 的 PBST (1%的 Tween20) 洗涤 5 次, 每孔加入 25 μ l 的 HRP 标记的羊抗人的二抗 (Jackson, 1:10000), 室温孵育 1hr, 弃上清, 使用 80 μ l 的 PBST (1%的 Tween20) 洗涤 7 次。加入 25 μ l 的 TMB 显色液显色 10min, 加入 2M 的 HCl 终止反应后, 酶标仪读取 450nm 的吸光度值 (购自 biotek, Elx808), 结果 (见图 4) 显示, 12 个候选抗体与 hDLL1 和 hDLL4 的蛋白均无明显交叉, 其中 36H10、4H7 抗体与 hDLL1 在高浓度 (20 μ g/mL) 下有较弱的交叉反应; 6A2 抗体与 hDLL4 在高浓度 (20 μ g/mL) 下有一定的交叉反应。

为了检测抗体对鼠、猴 DLL3 的交叉反应能力,本研究采用鼠 DLL3 表达质粒 pCMV3-mDLL3 (购自北京义翘, MG58052-UT) 和猴 DLL3 表达质粒 pCMV3-rheDLL3 (购自北京义翘, CG90919-UT) 构建过表达细胞株。过表达细胞的构建方法如实施例 2-3 所述。通过流式细胞术检测嵌合抗体与这两个细胞的结合能力,确定抗体的物种交叉反应能力。将构建得到的 5×10^5 个鼠 DLL3 细胞 Mouse-DLL3、猴 DLL3 细胞 Rhesus-DLL3 分别接种于 96 孔 V 型微孔板 (购自 Axygen, wipp02280) 中, 1500r/min 离心 1min, 弃上清。嵌合抗体、FDA027 和 FDA031 预稀释至 50 μ g/ml, 4 倍梯度稀释 8 个浓度点, 分别加入不同浓度的待检测抗体, 每孔 200 μ L, 冰上孵育 30min。然后每孔加入 150 μ L PBS, 1500r/min 离心 1min, 弃上清, 重复洗板 4 次。加入 APC 标记的羊抗人 IgG (Jackson, PBS 1:800 稀释), 每孔 50 μ L, 冰上孵育 30min。用 PBS 洗板 4 次后每孔加入 100 μ L PBS 重悬细胞, 用 CytoFLEX 进行检测 (Beckman), 所得结果 (如图 5 所示) 显示除 ch32E8、ch13C2 和 ch15G2 不识别猴、鼠 DLL3 之外, 其余 9 个抗体均能与鼠、猴 DLL3 结合。

实施例 9. 抗体与人 DLL3 蛋白结合的亲和力检测

为了检测抗体对人 DLL3 蛋白结合的亲和力, 本研究通过使用 BLI 的方法检测固化的抗体与游离的 DLL3 的结合动力学曲线, 检测的方法参照仪器 (供应商: Fortebio, 设备型号: Octet 96e) 的使用说明进行, 简言之, 先用 Loading Buffer/Sample dilution buffer (1 \times PBS, pH7.4, with 0.1%BSA and 0.02% Tween-20) 对 AMC 传感器平衡 60s, 得到 Baseline 1。将待测抗体用 Loading Buffer 稀释成 10 μ g/ml 的浓度与平衡后的传感器进行结合, 结合后的传感器再次用 Loading Buffer 进行再平衡, 得到 Baseline 2。然后把载有抗体的传感器至于用样品稀释液稀释为 100 到 3.13 nM 的人 DLL3 ,His tag (供应商: acrobiosystems, 产品目录号: DL3-H52H4) 中结合 90s, 得到抗体与蛋白的结合曲线。然后将结合有抗原的传感器再次置于 Sample Dilution Buffer 中解离 180s, 得到解离曲线。通过结合与解离曲线分别计算抗体与蛋白结合的 k-on, k-off 值, 并计算 KD 值, 所得结果 (见表 4) 显示。结果可知, 这些嵌合抗体在蛋白水平的亲和力均较强。

表 4. 抗体与人 DLL3 蛋白结合的亲和力

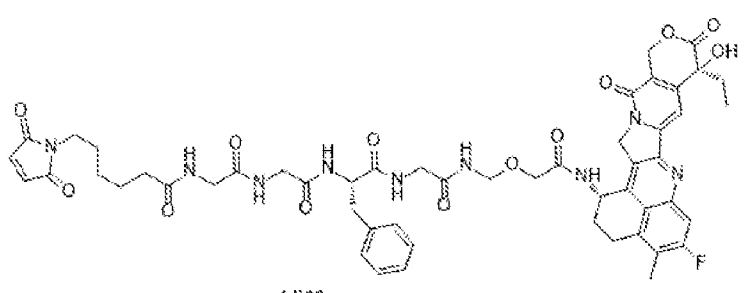
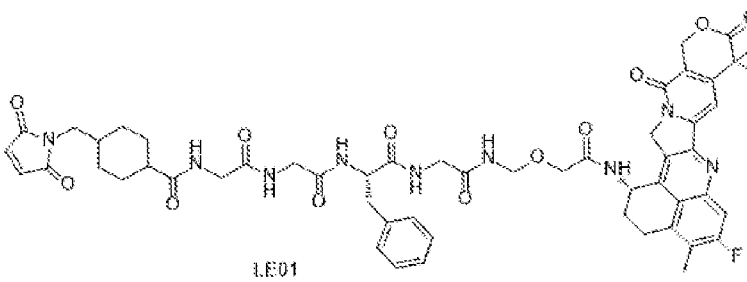
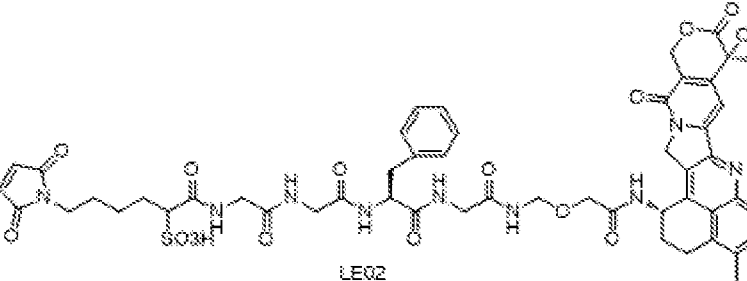
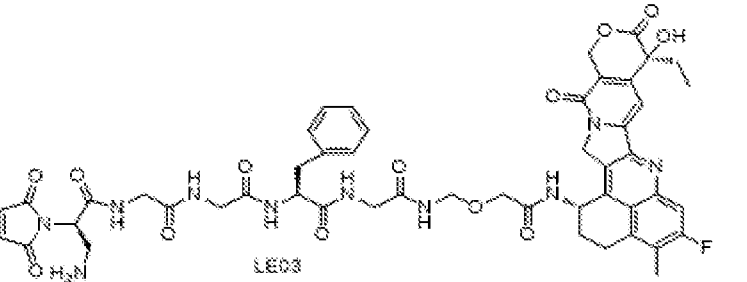
抗体名称	KD (M)	kon(1/Ms)	Koff(1/s)
ch1A5	5.97E-11	1.24E+06	7.40E-05
ch33F11	5.21E-11	1.21E+06	6.31E-05
ch23G2	1.58E-11	1.76E+06	2.79E-05
ch13C2	5.37E-09	2.23E+05	1.20E-03
ch32E8	9.00E-11	1.49E+06	1.34E-04
ch19C7	7.39E-10	1.30E+06	9.62E-04
ch26D9	3.81E-11	1.73E+06	6.58E-05
ch10B1	2.04E-10	1.37E+06	2.79E-04

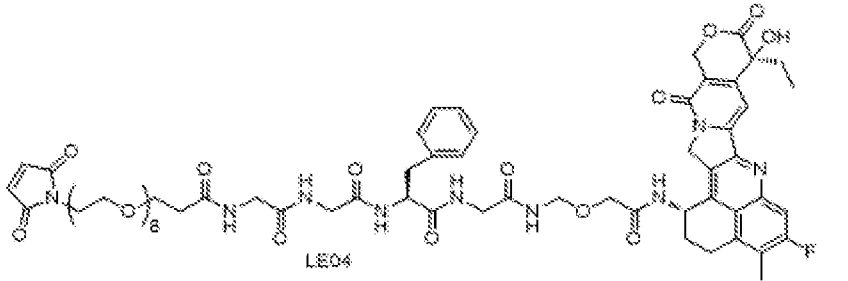
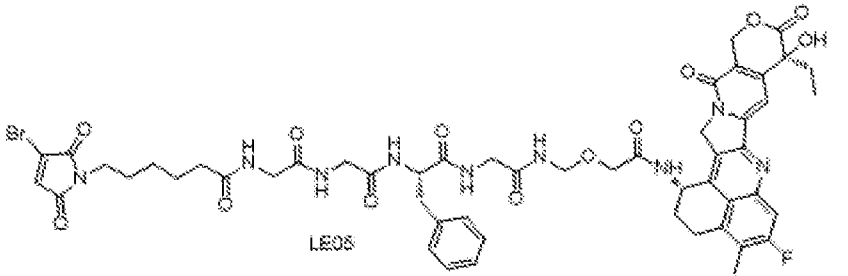
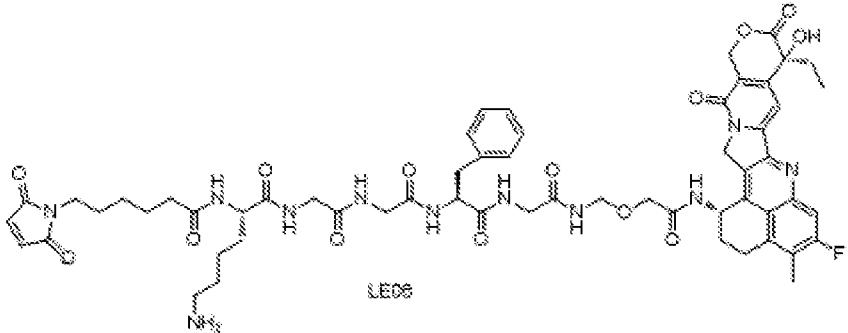
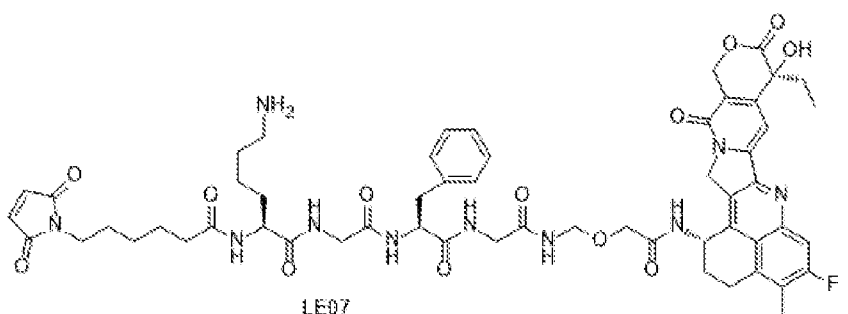
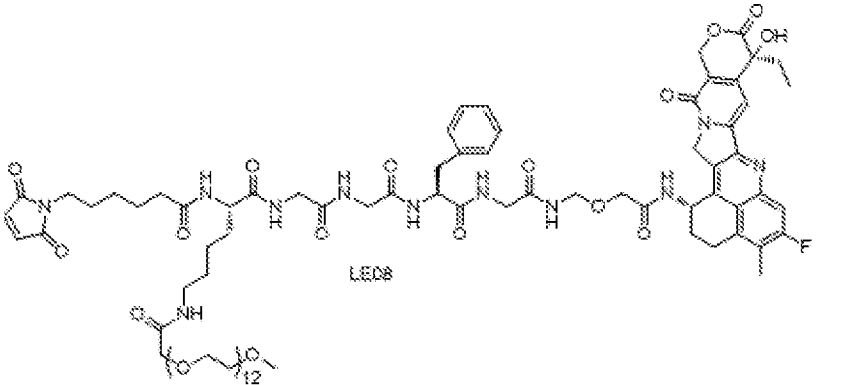
ch36H10	9.91E-11	1.69E+06	1.68E-04
ch4H7	1.04E-10	1.07E+06	1.11E-04
ch6A2	4.66E-10	1.47E+06	6.84E-04
ch15G2	7.02E-11	1.72E+06	1.21E-04

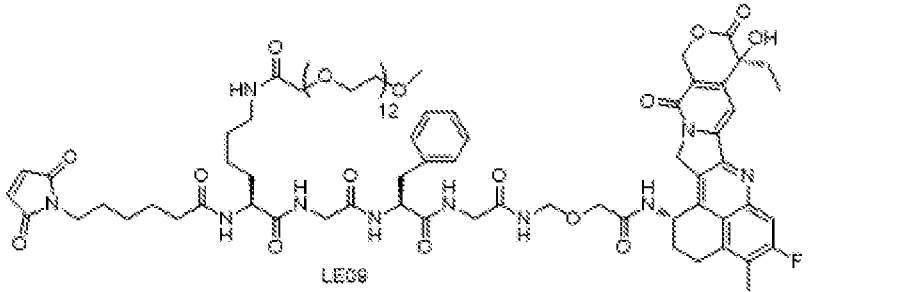
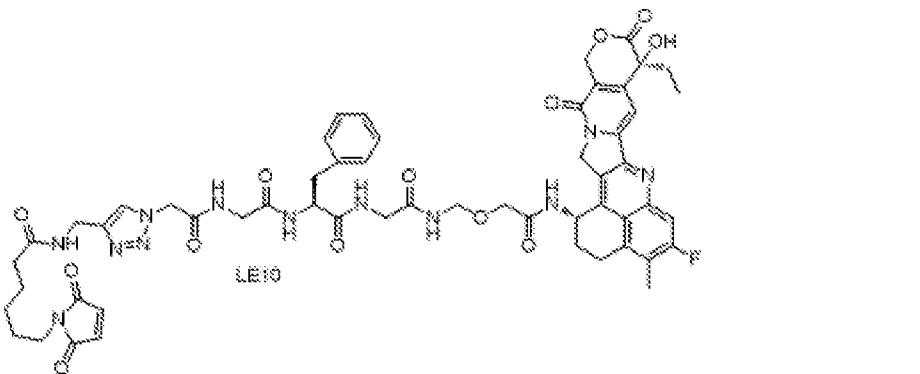
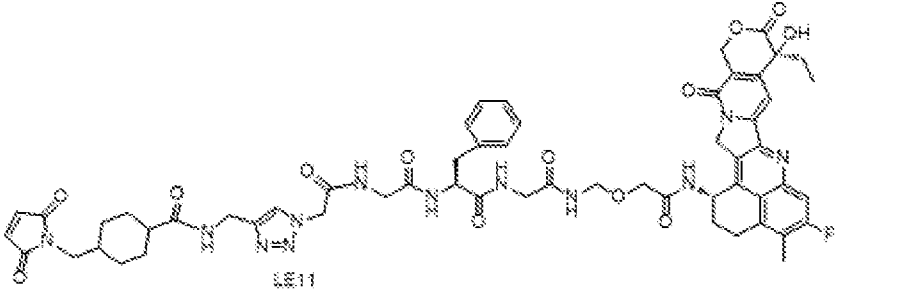
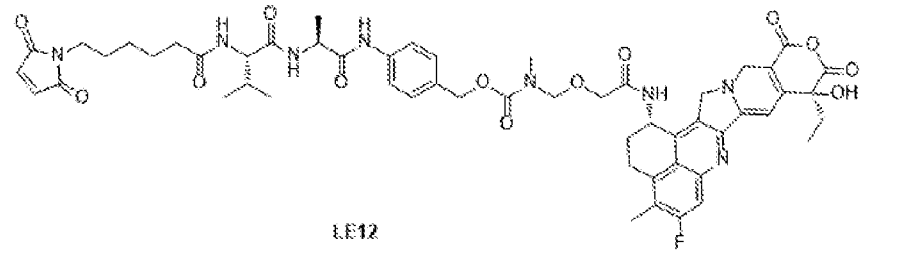
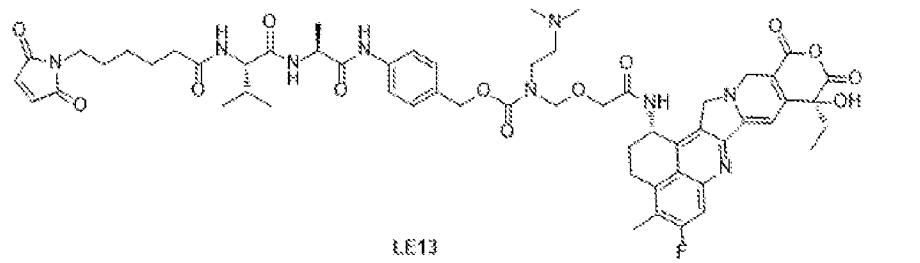
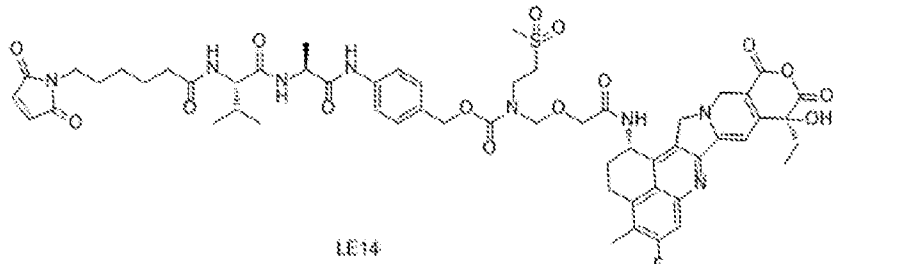
实施例 10. 连接基药物偶联物的制备

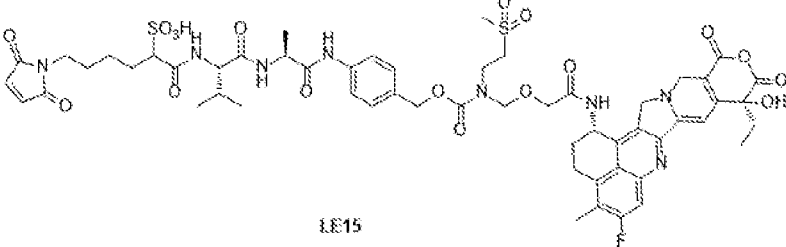
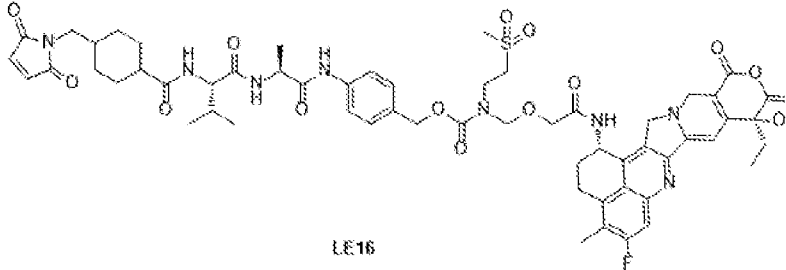
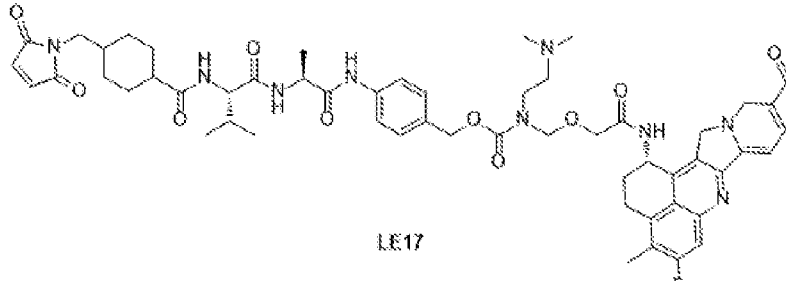
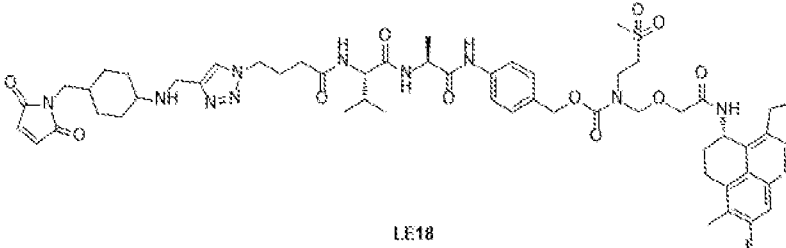
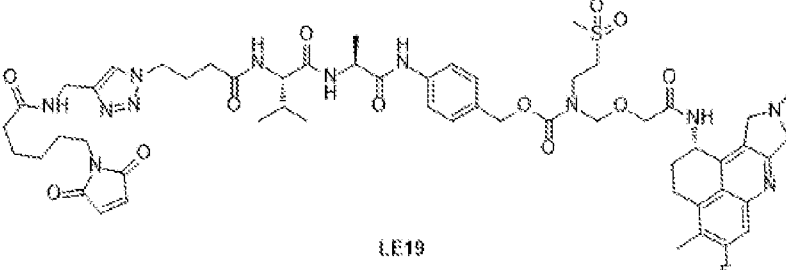
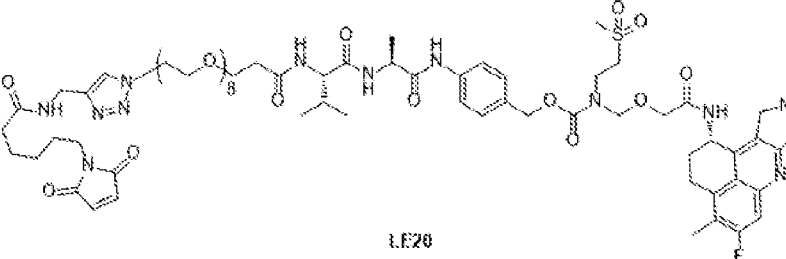
本发明所用的连接基药物偶联物 LE00 和 LE01-LE24 结构如表 5 所示, 其中 LE00 (GGFG-Dxd) 参照 WO2015146132A 报道的方法合成而得, LE01-LE24 参照 WO2020259258A1 报道的方法合成而得。

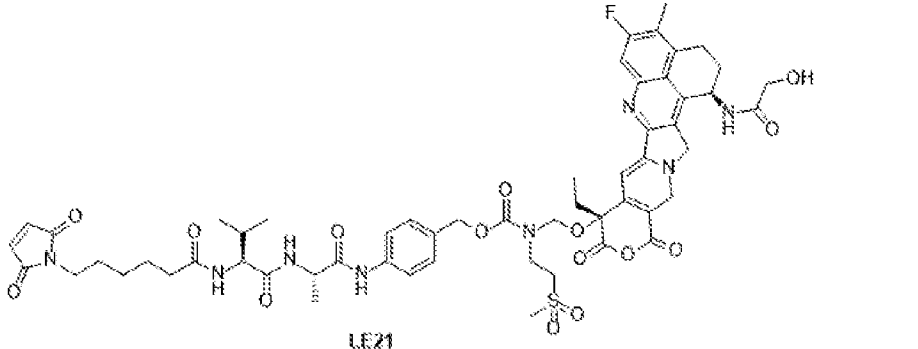
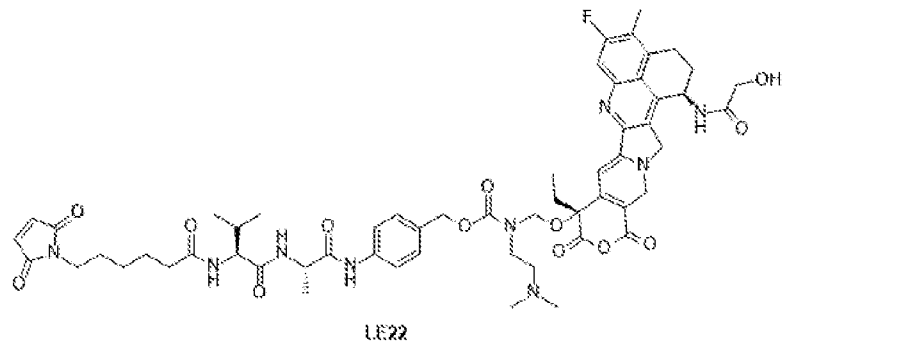
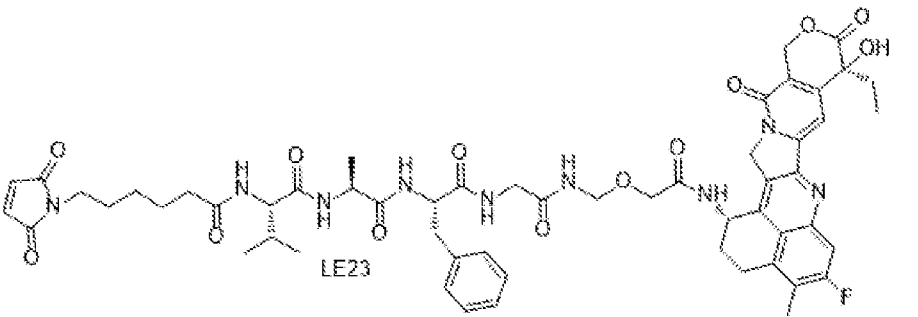
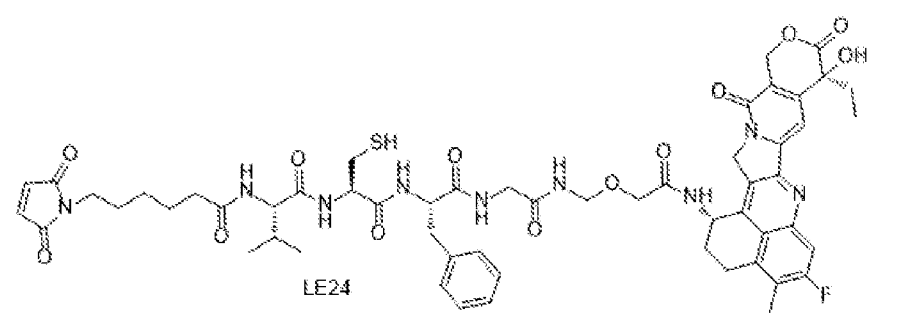
表 5. 连接基药物偶联物结构

连接基药物偶联物	参照合成方法
 <p>LE00</p>	WO2015146132A 1 实施例 7
 <p>LE01</p>	WO2020259258A 1 实施例 1
 <p>LE02</p>	WO2020259258A 1 实施例 2
 <p>LE03</p>	WO2020259258A 1 实施例 2

 <p>LE04</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 2</p>
 <p>LE05</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 2</p>
 <p>LE06</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 2</p>
 <p>LE07</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 2</p>
 <p>LE08</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 2</p>

 <p>LE9</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 4</p>
 <p>LE10</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 4</p>
 <p>LE11</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 4</p>
 <p>LE12</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 6</p>
 <p>LE13</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>
 <p>LE14</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>

 <p style="text-align: center;">LE15</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>
 <p style="text-align: center;">LE16</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>
 <p style="text-align: center;">LE17</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>
 <p style="text-align: center;">LE18</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>
 <p style="text-align: center;">LE19</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>
 <p style="text-align: center;">LE20</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>

 <p>LE21</p>	WO2020259258A 1 实施例 8
 <p>LE22</p>	WO2020259258A 1 实施例 8
 <p>LE23</p>	WO2020259258A 1 实施例 5
 <p>LE24</p>	WO2020259258A 1 实施例 5

实施例 11. 抗体与连接基药物偶联物偶联制备 ADC

将上述实施例1和6获得的不同抗DLL3抗体分别使用G25脱盐柱将其置换至50 mM PB/1.0 mM EDTA缓冲液中 (pH 7.0)，加入12当量TECP，于37 °C搅拌2个hr，以使抗体链间二硫键完全打开，随后使用磷酸将还原后的抗体溶液pH调至6.0，并将水浴温度降至25 °C，以备偶联反应。将按照实施例10方法制备得到的连接基药物偶联用DMSO溶解，从中吸取12当量连接基-药物偶联物逐滴分别加至上述还原后的抗DLL3的抗体溶液

中，样品均按照最高DAR制备（即过量偶联），观察各偶联反应发生时沉淀的产生情况，并补加DMSO至其终浓度为10%（v/v），25℃搅拌反应0.5个hr，反应完成后，使用0.22 μm膜过滤样品。使用切向流超滤系统纯化去除未偶联小分子，缓冲液为50 mM PB/1.0 mM EDTA溶液（pH 6.0），纯化后添加终浓度6%蔗糖放置于-20℃冰箱中保存。使用UV法分别在280 nm和370 nm下测定其吸光度值，计算DAR值，其结果如表6所示。结果表明ch1A5、ch33F11、ch32E8、ch13C2、FDA027、FDA031、ch15G2以及ch4H7抗体与LE14均可正常偶联，ch33F11与LE01-LE11、LE23及LE24均可正常偶联，ch1A5与LE00、LE12、LE13、LE15、LE16、LE17、LE18、LE19、LE20、LE21及LE22均可正常偶联，偶联所得ADC的DAR值、游离D_{xd}含量等均符合预期要求。而ch19C7、ch23G2、ch6A2、ch26D9这四个抗体与LE14偶联时其ADC样品在离心浓缩时有明显的絮状沉淀现象，导致收集的量较少，表明其偶联成药性不可行，而ch36H10和ch10B1两个抗体偶联所得的ADC样品DAR值分别为1.89和1.90，两者杂质含量均很高，特别是ch36H10的小分子残留高达49.35%，表明偶联失败。

表 6. 不同抗体偶联 LE14 制备 ADC 样品成药性评价

ADC 名称	浓度 (g/L)	体积 (mL)	总量 (mg)	聚合物比例 (%)	DAR	杂质百分比	游离 D _{xd} 含量 (%)	回收率
ch1A5-LE00	6.42	4.1	26.32	4.5	7.68	2.53	0.45	86.23%
ch33F11-LE01	4.78	4.2	20.07	3.2	7.32	3.23	0.32	88.23%
ch33F11-LE02	5.43	3.8	20.63	2.8	7.45	1.24	0.46	87.12%
ch33F11-LE03	6.43	5.6	36.00	4.2	7.65	0.78	0.78	84.53%
ch33F11-LE04	4.56	3.4	15.50	3.4	7.64	0.32	0.12	83.67%
ch33F11-LE05	5.12	4.2	21.5	4.3	7.36	4.32	0.35	89.43%
ch33F11-LE06	4.68	4.3	20.12	2.9	7.23	5.43	0.23	88.5%
ch33F11-LE07	5.32	5.2	27.66	2.7	7.56	0.89	1.32	86.53%
ch33F11-LE08	5.89	4.6	27.09	3.5	7.75	1.45	0.87	88.04%
ch33F11-LE09	6.76	5.3	33.83	4.6	7.80	2.34	1.45	84.65%
ch33F11-LE10	6.23	3.9	24.30	0.8	7.77	3.24	2.32	83.4%
ch33F11-LE11	5.68	4.1	23.29	2.3	7.56	3.56	1.43	87.6%
ch1A5-LE12	5.63	3.8	21.4	5.2	7.53	3.52	1.23	88.0%
ch1A5-LE13	4.58	4.3	19.69	3.82	4.43	2.32	1.32	85.3%
ch1A5-LE15	6.52	3.6	23.47	0.7	7.12	3.5	0.32	88.5%
ch1A5-LE16	5.83	2.7	15.74	5.23	6.92	4.38	0.65	82.3%
ch1A5-LE17	4.86	2.6	12.64	1.62	7.43	5.62	1.57	88%
ch1A5-LE18	5.38	3.5	18.83	2.35	7.23	1.36	0.57	89.3%
ch1A5-LE19	6.21	4.2	26.08	1.83	6.83	5.62	1.23	82.3%
ch1A5-LE20	4.32	3.3	14.26	3.62	7.32	4.51	0.78	88.2%
ch1A5-LE21	4.25	3.5	14.88	2.45	7.56	2.38	0.56	83.1%
ch1A5-LE22	5.86	4.1	24.02	1.53	7.12	6.21	0.83	76.3%
ch33F11-LE23	5.23	4.3	22.49	1.23	7.64	3.87	0.12	87.8%
ch33F11-LE24	4.76	3.8	18.09	1.34	7.76	6.32	0.24	86.5%
ch1A5-LE14	6.89	3.5	24.12	4.2	7.54	2.47	0.57	85.2%
ch33F11-LE14	5.90	4.2	24.78	13.5	7.47	4.33	0.26	77.7%
ch32E8-LE14	6.59	4.0	26.36	3.2	5.82	26.50	2.27	81.8%
ch4H7-LE14	5.46	2.5	13.65	3.0	6.78	14.23	1.10	73.8%

ch19C7-LE14	2.14	3.1	6.63	1.5	2.28	19.19	1.72	30.6%
ch23G2-LE14	5.13	3.8	19.49	0.7	6.32	12.41	1.08	70.7%
ch6A2-LE14	1.44	4.0	5.76	0.6	1.41	63.69	18.26	58.1%
ch36H10-LE14	6.43	4.0	25.72	2.9	1.89	72.01	49.35	79.3%
ch10B1-LE14	5.96	4.0	23.84	11.2	1.90	50.53	1.38	74.6%
FDA027-LE14	5.83	4.2	24.49	0.8	7.23	23.1	0.56	85.3%
FDA031-LE14	6.23	4.1	25.54	1.2	7.32	12.3	0.32	83.1%
ch13C2-LE14	6.23	3.8	23.67	2.3	7.12	5.87	1.35	79.1%
ch26D9-LE14	4.32	2.8	12.1	5.6	6.32	32.1	7.83	68%
Ch15G2-LE14	5.12	2.9	14.85	3.2	7.32	12.3	5.63	72%

实施例 12. ADC 样品体外细胞毒活性评价

选择经 DLL3 稳定转染高表达的 HEK293 细胞作为实验体外活性检测用细胞株，观察不同的抗体药物偶联物对细胞杀伤的量效情况。每孔 2000 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中，培养 20~24 小时；将按照实施例 11 方法制备的抗体药物偶联物配制成 80、20、5、1.25、0.3125、0.0781、0.0195、0.00488 和 0.000488 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 共 9 个浓度梯度的供试品溶液，取稀释好的供试品溶液 100 μl /孔加入到接种细胞的培养板内，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱培养 144 小时后加入 CellTiter-Glo $^{\circledR}$ Luminescent Cell Viability Assay Reagent (50 μl / 孔)，500rpm 室温振荡 10 分钟混匀，SpectraMaxL 酶标仪读取数据 (OD570nm, 2s 间隔读数) 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 IC₅₀，结果见图 6 和表 7。

表 7. 候选抗体的 ADC 体外杀伤 DLL3/HEK293 细胞的 IC₅₀ 值与最大杀伤率统计汇总

样品名称	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	最大杀伤率 (%)
ch1A5-LE00	0.321	96.3
ch33F11-LE01	0.432	95.4
ch33F11-LE02	0.564	97.3
ch33F11-LE03	0.375	95.2
ch33F11-LE04	0.453	94.8
ch33F11-LE05	0.532	96.2
ch33F11-LE06	0.383	95.7
ch33F11-LE07	0.432	95.2
ch33F11-LE08	0.634	96.8
ch33F11-LE09	0.563	94.3
ch33F11-LE10	0.276	96.7
ch33F11-LE11	0.364	93.1
ch1A5-LE12	0.412	94.8
ch1A5-LE13	0.337	96.3
ch1A5-LE15	0.432	95.2
ch1A5-LE16	0.386	96.5
ch1A5-LE17	0.254	93.5
ch1A5-LE18	0.227	95.6
ch1A5-LE19	0.521	97.2
ch1A5-LE20	0.632	95.4

ch1A5-LE21	0.534	92.7
ch1A5-LE22	0.432	97.1
ch33F11-LE23	0.369	93.6
ch33F11-LE24	0.463	96.5
ch36H10-LE14	0.695	96.9
ch32E8-LE14	0.225	96.8
ch1A5-LE14	0.277	96.6
ch19C7-LE14	8.69	88.4
ch23G2-LE14	0.303	96.8
ch33F11-LE14	0.377	98.3
ch6A2-LE14	0.992	96.2
ch10B1-LE14	0.46	97.6
ch4H7-LE14	0.718	96.9
ch13C2-LE14	2.72	97.9
ch15G2-LE14	0.385	90.5
ch26D9-LE14	0.563	95.6
FDA031-LE14	0.389	95.2
FDA027-LE14	0.087 ¹	95.1 ²

¹和²：均为平均值。

表 7 的实验结果表明，除了 ch19C7-LE14 和 ch13C2-LE14 体外细胞毒活性相对较弱之外，本发明公开的 ADC 对 DLL3 阳性细胞均具有明显的体外细胞杀伤作用，FDA027-LE14 的体外细胞毒活性相对最强，同时 FDA027-LE14 的体外活性 IC₅₀ 最优。本发明公开的各 ADC 的 IC₉₀ 值与 FDA027-LE14 相比无较大差异。

实施例 13. ADC 药物在 NCI-H82 模型中的体内抗肿瘤活性

选择 6-8 周大的雌性 Balb/c nude 小鼠（购自上海灵畅生物科技有限公司）右侧背部皮下注射溶于 200ul Matrigel 的 5×10^6 人源小细胞肺癌细胞（NCI-H82），待肿瘤生长至平均体积 140mm³ 左右时，根据肿瘤大小和小鼠体重随机分成 15 组，1-13 组每组 8 只动物，分别为溶媒空白对照组，ch1A5-LE14、ch33F11-LE14、ch23G2LE14、ch32E8-LE14，FDA031-LE14 以及 FDA027-LE14 偶联物各两个剂量组即分别为 2.5mg/kg 和 5.0mg/kg，每周静脉给药一次，共给药 3 次。14-15 组每组 6 只动物，分别为对照组 Lurbinectedin 和盐酸拓扑替康，分别为 0.18mg/kg 和 1.8mg/kg，Lurbinectedin 组每周静脉给药一次，共给药 3 次，盐酸拓扑替康组每周腹腔给药二次，第 1、2 天连续给药，共给药 3 次。每周三次测量实验动物体重和肿瘤体积并观察实验过程中动物生存状态。结果如图 7 和表 8 所示，溶媒空白对照组（01 组）小鼠在结束给药后时第 21 天平均肿瘤体积为 2773mm³，FDA027-LE14(2.5mg/kg, 第 12 组)治疗组在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 486mm³，FDA027-LE14(5mg/kg, 第 13 组)治疗组在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 305mm³。测试药 2.5 mg/kg 的 ch1A5-LE14 治疗组（02 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为

607mm³，测试药 5 mg/kg 的 ch1A5-LE14 治疗组（03 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 245mm³。测试药 2.5 mg/kg 的 ch33F11-LE14 治疗组（04 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 715mm³，测试药 5 mg/kg 的 ch33F11-LE14 治疗组（05 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 293mm³。测试药 2.5 mg/kg 的 ch23G2-LE14 治疗组（06 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 1322mm³，测试药 5 mg/kg 的 ch23G2-LE14 治疗组（07 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 441mm³。测试药 2.5 mg/kg 的 ch32E8-LE14 治疗组（08 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 945mm³，测试药 5 mg/kg 的 ch32E8-LE14 治疗组（09 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 433mm³。FDA031-LE14（2.5mg/kg，第 10 组）治疗组在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 564mm³，FDA031-LE14（5mg/kg，第 11 组）治疗组在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 245mm³。0.18mg/kg 对照组 Lurbinectedin（购自中科创越药业有限公司，批号 000039-87-CE013BA-a1）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 2268mm³，1.8mg/kg 对照组盐酸拓扑替康（购自萨恩化学技术（上海）有限公司，批号 R3URR4E）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 1553mm³。实验结果显示上述治疗组（特别是 ch1A5-LE14）均具有较好的体内抗肿瘤活性，同时除了对照组盐酸拓扑替康所有实验小鼠无死亡情况，无体重减轻情况，表明各测试药物具有很好的安全性。

表 8. ADC 药物在 NCI-H82 模型中的体内抗肿瘤情况

分组	观察天数									
	0	3	5	7	10	12	14	17	19	21
平均肿瘤体积/立方毫米										
01	143	375	762	993	1280	1633	1932	2277	2498	2773
02	143	351	472	503	500	523	540	650	622	607
03	143	373	395	338	235	228	238	285	266	245
04	143	409	505	500	530	580	610	724	738	715
05	143	379	401	376	287	294	264	350	320	293
06	143	354	506	628	768	784	869	1181	1220	1322
07	143	408	411	408	390	398	358	485	450	441
08	143	398	479	646	752	814	875	979	949	945
09	143	393	448	433	343	345	334	382	392	433
10	143	391	506	561	570	521	496	628	594	564
11	143	393	434	433	361	396	382	311	279	245
12	143	333	368	393	425	405	386	466	518	486
13	143	361	448	472	478	496	454	375	304	305
分组	观察天数									
	0	3	5	7	9	11	14	16	18	21
14	144	319	/	794	1049	1285	1607	1679	2100	2268
15	143	328	/	777	1140	1276	1403	1583	1300	1553
分组	观察天数									
	0	3	5	7	10	12	14	17	19	21
标准偏差										
01	12	52	92	117	92	131	140	193	262	313
02	12	38	50	58	99	95	115	173	162	148

03	143	373	395	338	235	228	238	285	266	245
04	14	44	41	67	71	84	85	112	119	113
05	13	48	48	40	37	46	34	57	52	55
06	10	49	80	121	143	163	184	251	263	286
07	15	66	59	81	106	107	95	116	111	103
08	11	51	70	122	170	182	222	238	242	251
09	12	53	53	46	48	45	36	41	42	52
10	15	54	76	85	110	99	101	139	129	115
11	16	46	57	102	145	172	167	65	38	32
12	16	46	43	57	71	76	69	83	81	76
13	10	42	88	127	169	182	167	93	52	35
分组	观察天数									
	0	3	5	7	9	11	14	16	18	21
14	13	35	/	128	147	224	315	313	355	369
15	8	42	/	153	227	252	367	590	518	588

实施例 14. ADC 药物在 NCI-H209 模型中的体内抗肿瘤活性

选择 6-8 周大的雌性 Balb/c nude 小鼠右侧后背部皮下注射溶于 200ul Matrigel 的 1×10^7 人源小细胞肺癌细胞 (NCI-H209)，待肿瘤生长至平均体积 150mm^3 左右时，根据肿瘤大小和小鼠体重随机分成 7 组，每组 6 只动物，分别为溶媒空白对照组，ch1A5-LE14、和 FDA027-LE14 偶联物各三个剂量组即分别为 1.5mg/kg、2.5mg/kg 和 5.0mg/kg，单次给药。每周三次测量实验动物体重和肿瘤体积并观察实验过程中动物生存状态。结果如下表 9 所示，溶媒空白对照组（第 1 组）小鼠在结束给药后时平均肿瘤体积为 2006mm^3 ，1.5mg/kg 的 FDA027-LE14 治疗组（第 5 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 0mm^3 ，2.5mg/kg 的 FDA027-LE14 治疗组（第 6 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 0mm^3 ，5mg/kg 的 FDA027-LE14 治疗组（第 7 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 0mm^3 。1.5mg/kg 的 ch1A5-LE14 治疗组（第 2 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 0mm^3 ，2.5mg/kg 的 ch1A5-LE14 治疗组（第 3 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 0mm^3 ，5mg/kg 的 ch1A5-LE14 治疗组（第 4 组）在结束给药后第 21 天平均肿瘤体积为 0mm^3 。实验结果显示 FDA027-LE14 和 ch1A5-LE14 具有较好的体内抗肿瘤活性，同时所有实验小鼠无死亡情况，无体重减轻情况，表明测试药物具有很好的安全性。

表 9. ADC 药物在 NCI-H209 模型中的体内抗肿瘤活性

分组	观察天数									
	0	3	5	7	9	12	14	16	19	21
	平均肿瘤体积/立方毫米									
1	158	348	535	809	1040	1207	1367	1506	1745	2006
2	158	117	39	7	0	0	0	0	0	0
3	158	109	29	8	0	0	0	0	0	0
4	157	93	26	0	0	0	0	0	0	0
5	157	105	30	7	0	0	0	0	0	0
6	157	103	28	0	0	0	0	0	0	0

7	158	93	25	0	0	0	0	0	0	0
	标准偏差									
1	6	7	41	77	90	96	106	110	145	139
2	6	14	6	5	0	0	0	0	0	0
3	7	13	2	4	0	0	0	0	0	0
4	5	9	3	0	0	0	0	0	0	0
5	8	8	2	5	0	0	0	0	0	0
6	4	9	2	0	0	0	0	0	0	0
7	6	14	2	0	0	0	0	0	0	0

实施例 15. ADC 药物在小鼠中的毒性评价

选择 KM 品系的小鼠进行毒性评价，根据小鼠体重随机分成 4 组，每组 10 只小鼠雌雄各半，每组尾静脉注射 600ul 的 ch1A5-LE14 偶联物，按剂量分别为 200mg/kg、400mg/kg、500 mg/kg 和 640 mg/kg，单次给药，给药后 14 天内观察 ch1A5-LE14 偶联物引起的毒性反应情况，研究结果表明 200mg/kg 组仅有一只动物体重在 D3 天有所下降后恢复并增长，其他动物在整个实验过程中呈现增长趋势，临床观察除 200mg/kg 组动物无异常，其余组的小鼠给药后当天出现被毛蓬松并很快恢复正常，在观察期 14 天结束时，所有动物健存无濒死及死亡发生，结果表明本发明的偶联物在小鼠体内具有良好的耐受，最大耐受剂量可达 640 mg/kg。在另一个评价 ch1A5-LE14 偶联物在 KM 小鼠体内的毒性研究中，其腹腔注射剂量分别为 410mg/kg、512 mg/kg、640 mg/kg、800 mg/kg 和 1000 mg/kg，各组动物或可见被毛蓬松、弓背、活动减少、蜷缩成团、腹泻、软便及肛周污秽等症状，在 1000 mg/kg 组中有 5 只小鼠（每组共 10 只小鼠）死亡，800 mg/kg 组中有一只小鼠在 14 天观察期内，连续三次体重下降超过 30%，根据动物福利该动物做安乐处理，其他组未见动物死亡，结果进一步表明本发明的偶联物在小鼠体内具有非常不错的耐受性。

实施例 16. ADC 药物在大鼠中的毒性评价

选择 SD 大鼠尾静脉注射本发明的 ch1A5-LE14 偶联物以此评价 ch1A5-LE14 在大鼠体内的耐受剂量，根据大鼠体重随机分成 3 组，每组 8 只雌雄各半，一组给药 100mg/kg，每周给药一次，共给药 3 次，一组单次给药 300mg/kg，同时设立空白对照组，其给药体积按大鼠体重为 10ul/g，最后一次给药完成后观察 12 天。末次给药 12 天观察期结束后，整个实验过程中各组未出现动物濒死或死亡情况；高剂量 300mg/kg 组给药后所有动物出现被毛蓬松，100mg/kg 组动物给药后无异常情况；高剂量 300mg/kg 组给药后体重有所下降，D7 天之后所有存活动物体重均呈恢复趋势；观察期结束后所有动物作安乐处理进行大体检查，脏器未发现异常情况。大鼠体内毒性研究结果进一步表明本发明的偶联物在大鼠体内同样具有非常不错的耐受剂量。

虽然以上描述了本发明的具体实施方式，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，在不背离本发明的原理和实质的前提下，可以对这些实施方式做出多种变更或修改。因此，本发明的保护范围由所附权利要求书限定。

权利要求

1. 一种抗 DLL3 抗体，其特征在于，其包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）；其中，

所述 VH 包含以下的互补决定区（CDR）：如 SEQ ID NO: 9、19、29、39、59、69、79、89、99 或 63 的氨基酸序列所示的 VH CDR1，如 SEQ ID NO: 10、20、30、40、60、70、80、90、100、110 或 83 的氨基酸序列所示的 VH CDR2，和，如 SEQ ID NO: 11、21、31、41、61、71、81、91、101、111 或 93 的氨基酸序列所示的 VH CDR3；

所述 VL 包含以下的 CDR：如 SEQ ID NO: 12、32、42、62、72、82、92、102、112 或 103 的氨基酸序列所示的 VL CDR1，如 GAS、GAT、TTS、NAK、YTS、RAN、WAS、FTS 或 NAN 所示的 VL CDR2，和，如 SEQ ID NO: 14、24、34、44、64、74、84、94、104、114 或 113 的氨基酸序列所示的 VL CDR3。

2. 如权利要求 1 所述的抗 DLL3 抗体，其特征在于，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 9、10 和 11 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 19、20 和 21 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 29、30 和 31 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 39、40 和 41 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 59、60 和 61 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 69、70 和 71 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 79、80 和 81 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 89、90 和 91 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 99、100 和 101 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 89、110 和 111 所示；或，所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 63、83 和 93 所示；

所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 12、GAS 和 SEQ ID NO: 14 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 12、GAS 和 SEQ ID NO: 24 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 32、GAT 和 SEQ ID NO: 34 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 42、TTS 和 SEQ ID NO: 44 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL

CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 62、NAK 和 SEQ ID NO: 64 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 72、NAK 和 SEQ ID NO: 74 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 82、YTS 和 SEQ ID NO: 84 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 92、RAN 和 SEQ ID NO: 94 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 102、WAS 和 SEQ ID NO: 104 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 112、FTS 和 SEQ ID NO: 114 所示；或，所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 103、NAN 和 113 所示。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗 DLL3 抗体,其特征在於,所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 9、10 和 11 所示,以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 12、GAS 和 SEQ ID NO: 14 所示;或,

所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 19、20 和 21 所示,以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 12、GAS 和 SEQ ID NO: 24 所示;或,

所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 29、30 和 31 所示,以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 32、GAT 和 SEQ ID NO: 34 所示;或,

所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 39、40 和 41 所示,以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 42、TTS 和 SEQ ID NO: 44 所示;或,

所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 59、60 和 61 所示,以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 62、NAK 和 SEQ ID NO: 64 所示;或,

所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 69、70 和 71 所示,以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 72、NAK 和 SEQ ID NO: 74 所示;或,

所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 79、80 和 81 所示,以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 82、YTS 和 SEQ ID NO: 84 所示;或,

所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 89、90 和 91 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 92、93 和 SEQ ID NO: 94 所示；或，

所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 99、100 和 101 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 102、103 和 SEQ ID NO: 104 所示；或，

所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 89、110 和 111 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 112、113 和 SEQ ID NO: 114 所示；或，

所述 VH 包含的 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 63、83 和 93 所示，以及所述 VL 包含的 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 103、113 和 113 所示。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的抗 DLL3 抗体，其特征在于，所述重链可变区（VH）还包括重链可变区框架区（VH FWR），和/或，所述轻链可变区（VL）还包括轻链可变区框架区（VL FWR）；其中，所述 VH FWR 为人或鼠抗体的重链可变区框架区，所述 VL FWR 为人或鼠抗体的轻链可变区框架区；

优选地：

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 15、25、35、45、65、75、85、95、105、113 或 22 所示的氨基酸序列；和/或，所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 16、26、36、46、66、76、86、96、106、113 或 23 所示的氨基酸序列；

更优选地：

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列；或

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列；或

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列；或

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列；或

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 65 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 66 所示的氨基酸序列；或

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 75 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO:

76 所示的氨基酸序列；或

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 85 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列；或

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 95 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 96 所示的氨基酸序列；或

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 105 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 106 所示的氨基酸序列；或

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列；或

所述 VH 包括如 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包括如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的抗 DLL3 抗体，其为全长抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 优选 scFv、重链抗体或单域抗体，和/或，其为单克隆抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

6. 如权利要求 5 所述的抗 DLL3 抗体，其为全长抗体，所述全长抗体包括重链和轻链；其中，所述重链包括如 SEQ ID NO: 17、27、37、47、67、77、87、97、107、43 或 73 所示的氨基酸序列，和/或，所述轻链包括如 SEQ ID NO: 18、28、38、48、68、78、88、98、108、53 或 109 所示的氨基酸序列；

优选地：

所述重链包括如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列；或

所述重链包括如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列；或

所述重链包括如 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列；或

所述重链包括如 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列；或

所述重链包括如 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 68 所示的氨基酸序列；或

所述重链包括如 SEQ ID NO: 77 所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 78 所示的氨基酸序列；或

所述重链包括如 SEQ ID NO: 87 所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO:

88 所示的氨基酸序列；或

所述重链包括如 SEQ ID NO: 97 所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 98 所示的氨基酸序列；或

所述重链包括如 SEQ ID NO: 107 所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 108 所示的氨基酸序列；或

所述重链包括如 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列；或

所述重链包括如 SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸序列，且所述轻链包括如 SEQ ID NO: 109 所示的氨基酸序列。

7. 一种分离的核酸，其编码如权利要求 1-6 任一项所述的抗 DLL3 抗体。

8. 一种重组表达载体，其包含如权利要求 7 所述的分离的核酸；

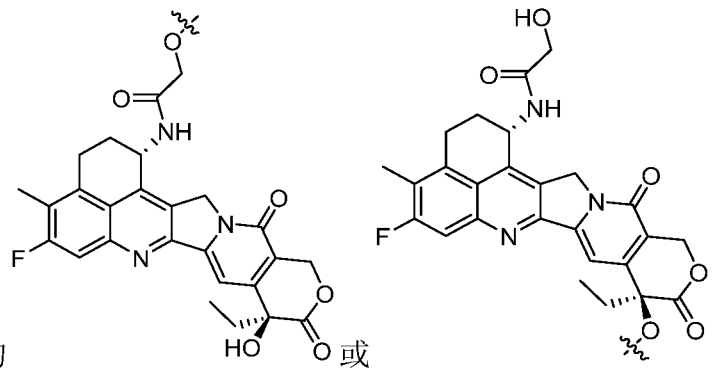
优选地，所述表达载体包含真核细胞表达载体和/或原核细胞表达载体。

9. 一种转化体，其包含如权利要求 8 所述的重组表达载体；

优选地，所述转化体的宿主细胞为原核细胞和/或真核细胞，所述原核细胞优选 *E. coli* 细胞例如 TG1、BL21 细胞，所述真核细胞优选 HEK293 细胞或 CHO 细胞。

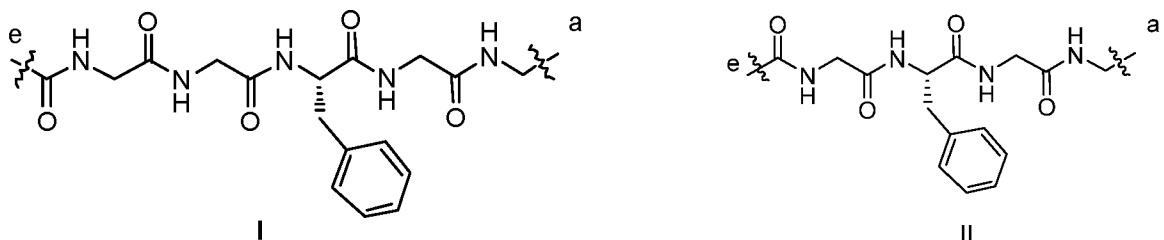
10. 一种抗体药物偶联物，其结构通式为 Ab-(L₃-L₂-L₁-D)_m；

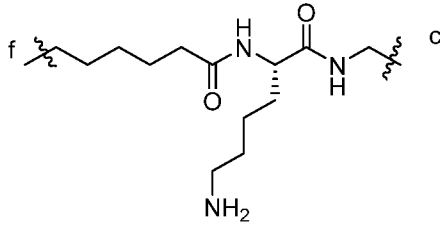
其中，Ab 为抗 DLL3 抗体；



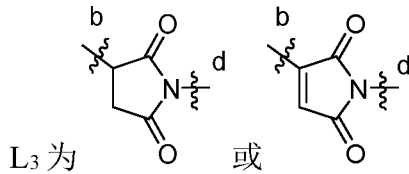
m 为 2~8；

L₁ 的结构如式 I、II、III 或 IV 所示，其 a 端与所述的细胞毒性药物相连，e 端和与所述的 L₂ 的 c 端相连；





，其中n独立地为1~12，c端通过羰基与L₁相连，f端与所述的L₃的d端相连；



L₃为 或 ，其中b端和所述的Ab相连，d端与所述的L₂的f端相连。

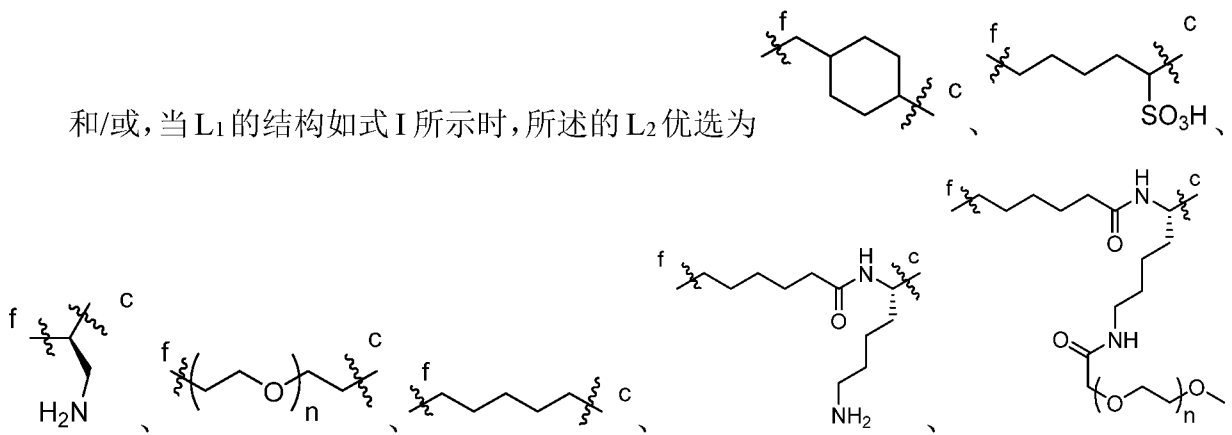
11. 如权利要求10所述的抗体药物偶联物，其特征在于，

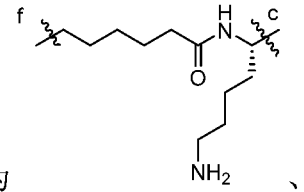
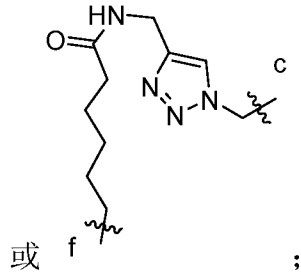
所述抗DLL3抗体结合DLL3蛋白中以下抗原结合表位中的一个或多个：DSL结构域、N末端、EGF2结构域和EGF3-EGF6结构域；

和/或，所述的L为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基、脯氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种，优选为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种；更优选地，所述的L为缬氨酸残基和/或丙氨酸残基，所述的多种为两种或三种，所述的p为2；

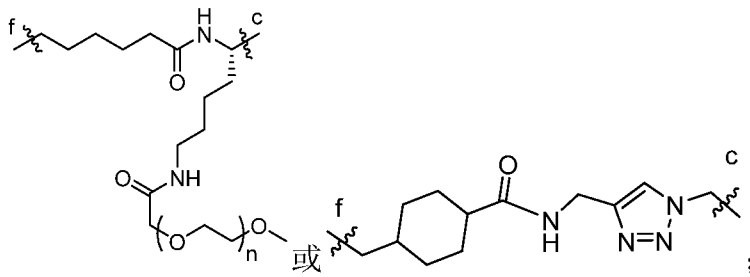
和/或，所述的R¹为被一个或多个-NR¹⁻¹R¹⁻²取代的C₁~C₆烷基、被一个或多个R¹⁻³S(O)₂-取代的C₁~C₆烷基、或C₁~C₆烷基，所述的R¹⁻¹、R¹⁻²和R¹⁻³分别独立地为C₁~C₄烷基；

和/或，当L₁的结构如式I所示时，所述的L₂优选为

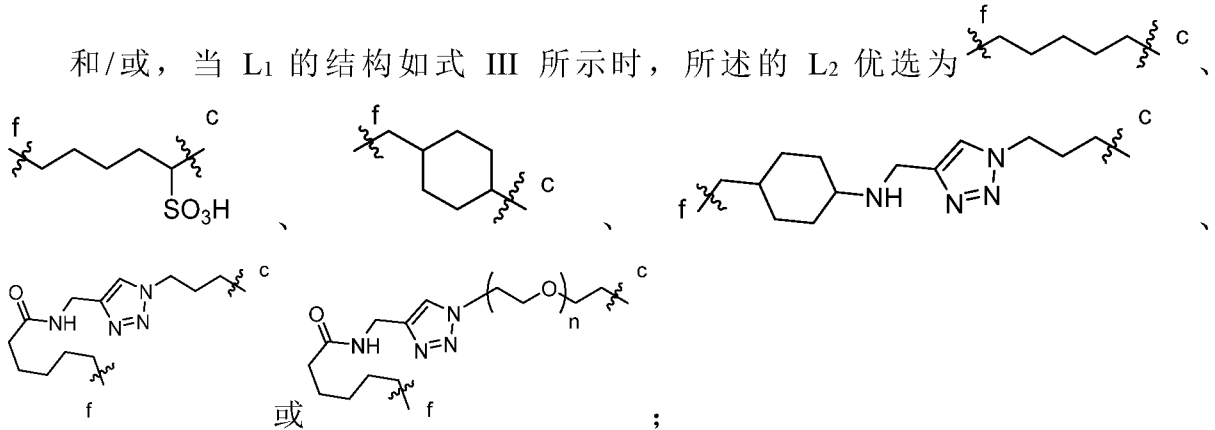




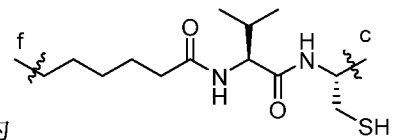
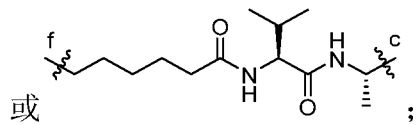
和/或，当 L₁ 的结构如式 II 所示时，所述的 L₂ 优选为



和/或，当 L₁ 的结构如式 III 所示时，所述的 L₂ 优选为

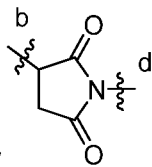


和/或，当 L₁ 的结构如式 IV 所示时，所述的 L₂ 优选为



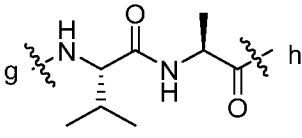
和/或，所述 n 独立地为 8、9、10、11 和 12；

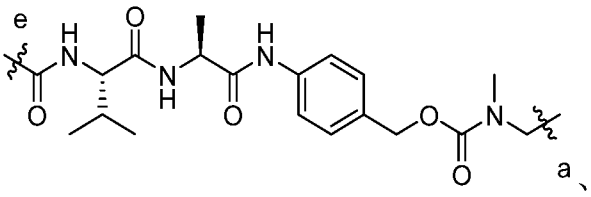
和/或，所述的 m 为 2~8 的整数或非整数；

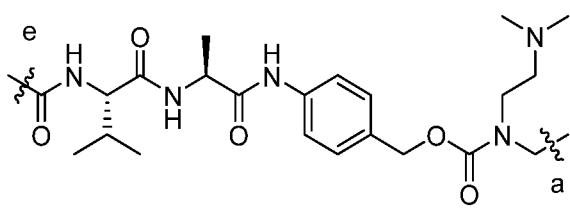
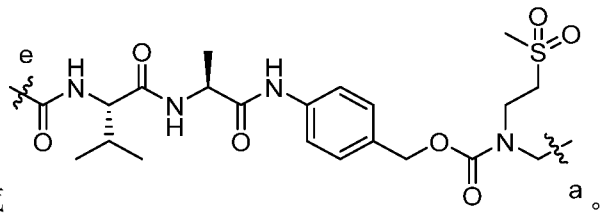


和/或，所述的 L₃ 优选为

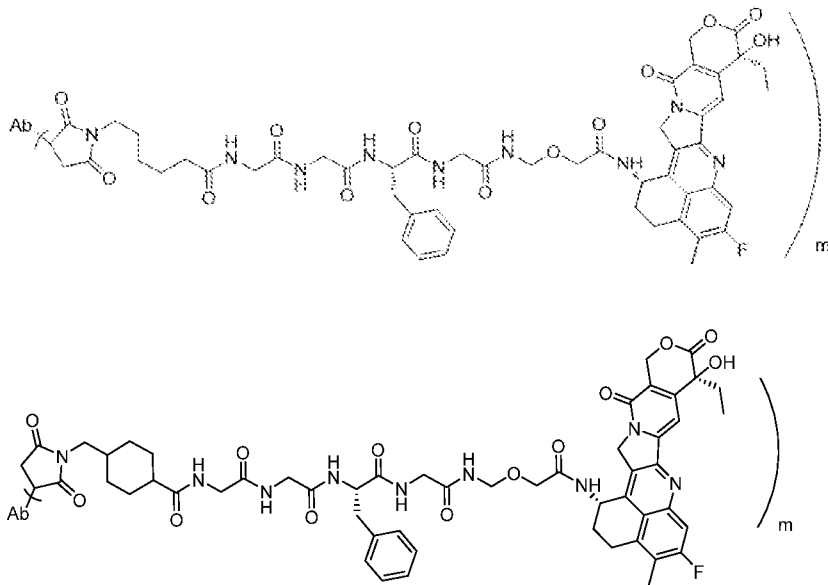
12. 如权利要求 10 或 11 所述的抗体药物偶联物，其特征在于，
 所述抗 DLL3 抗体结合于 DLL3 蛋白中 EGF2 结构域的抗原结合表位；

和/或，所述的(L)_p为 ，其中 g 端通过羰基和所述的 L₂ 的 c 端
 相连；

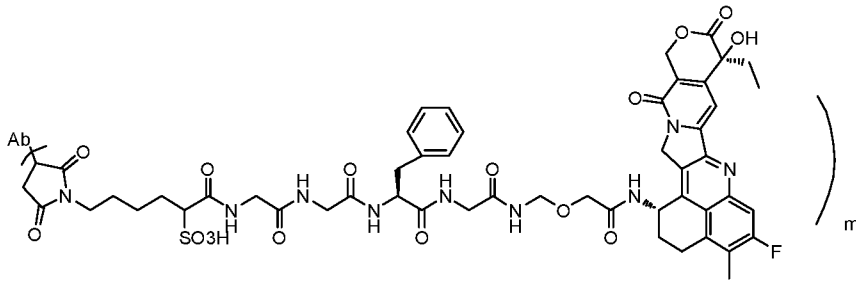
和/或，所述的式 III 优选为 、

 或 。

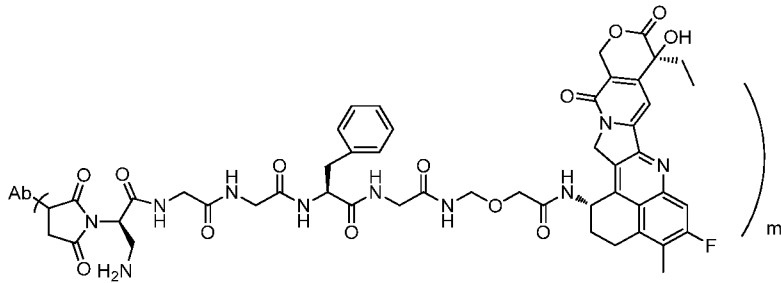
13. 如权利要求 10 所述的抗体药物偶联物，所述的抗体药物偶联物为如下所示的任一化合物：



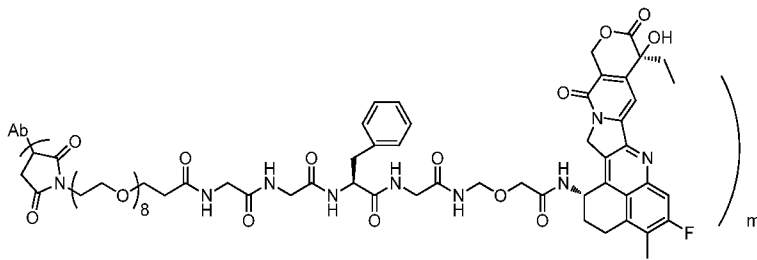
1



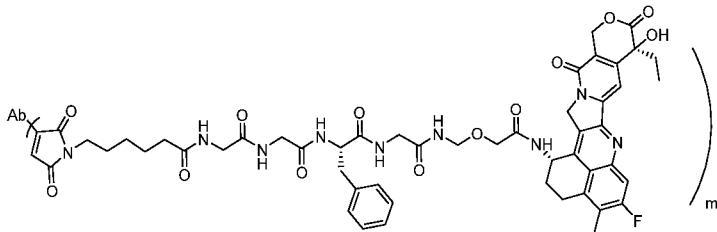
2



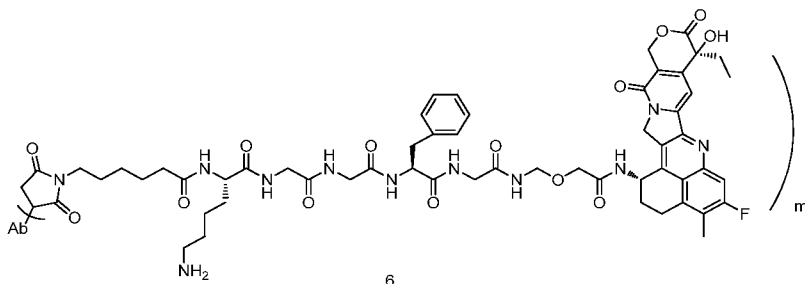
3



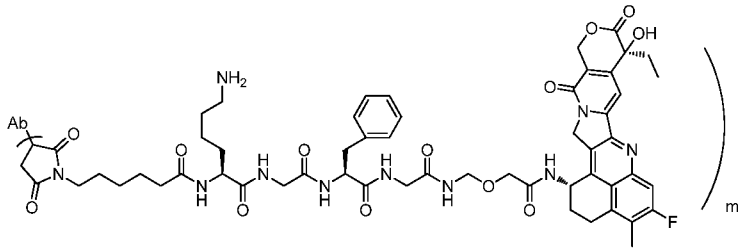
4



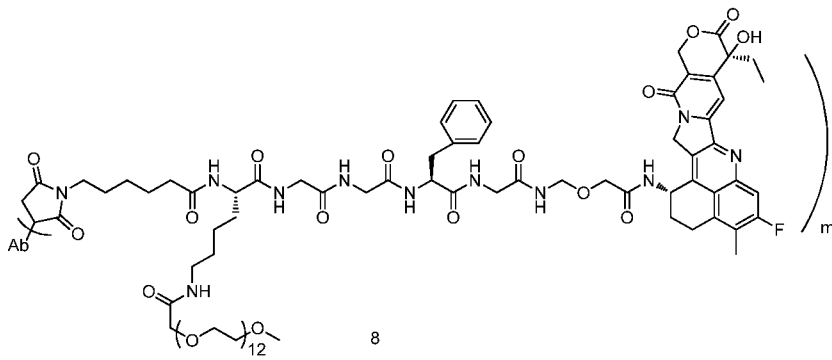
5



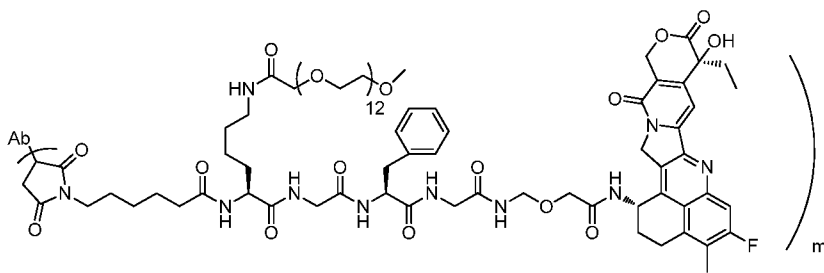
6



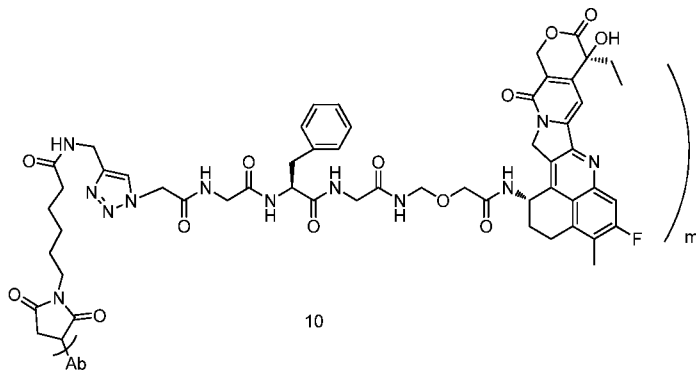
7



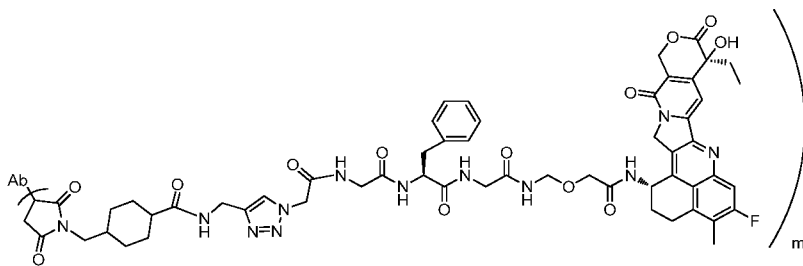
8



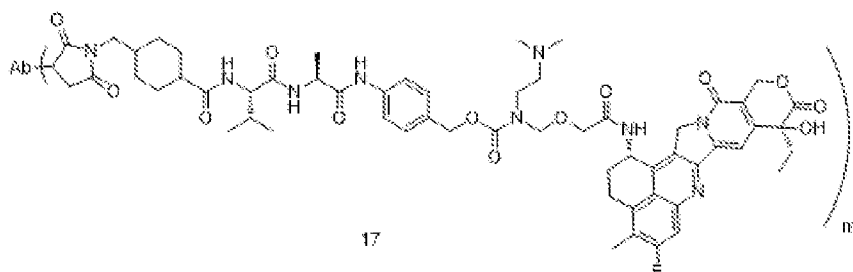
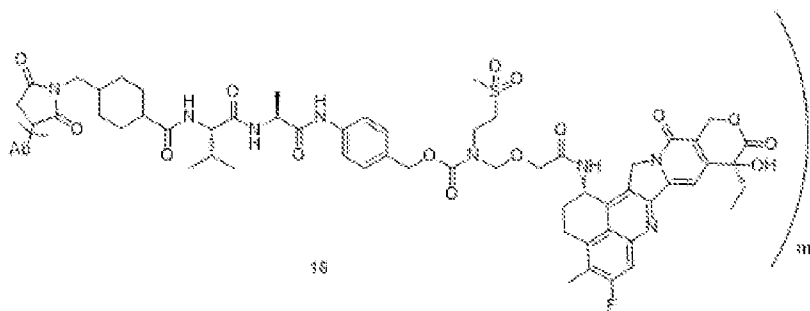
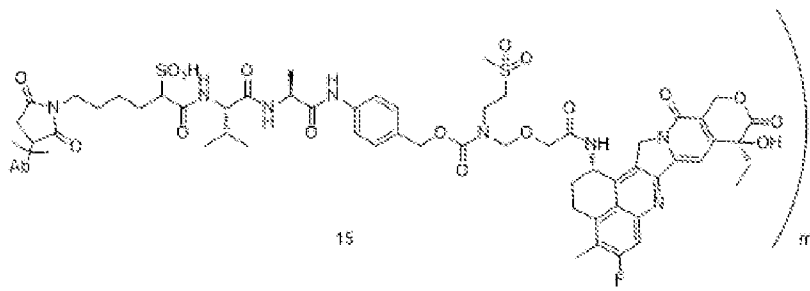
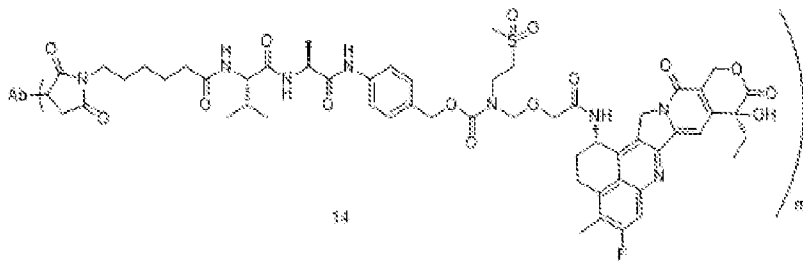
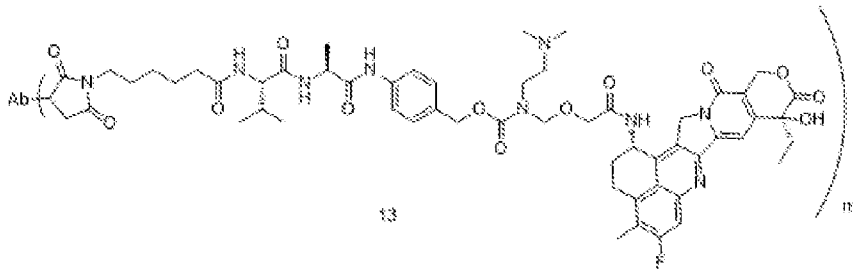
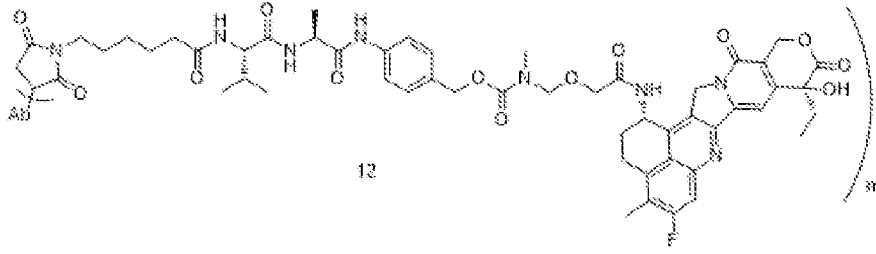
9

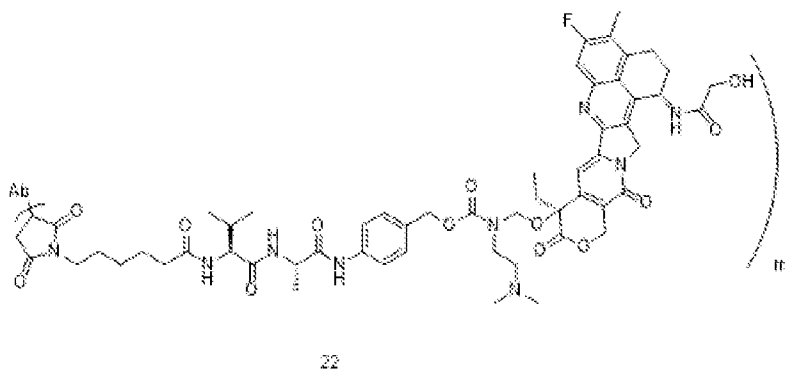
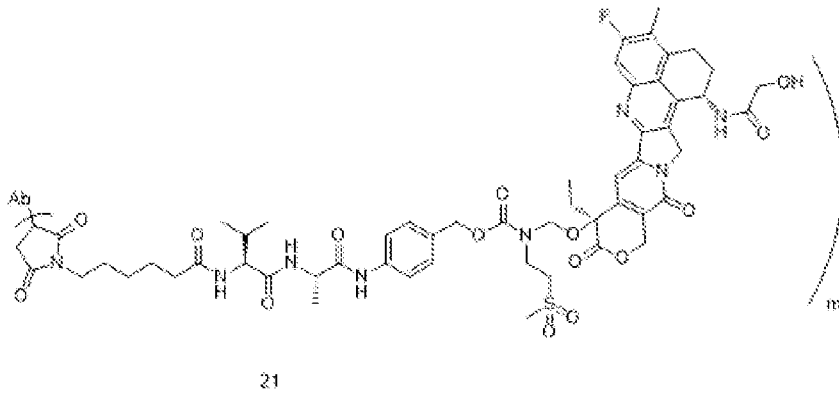
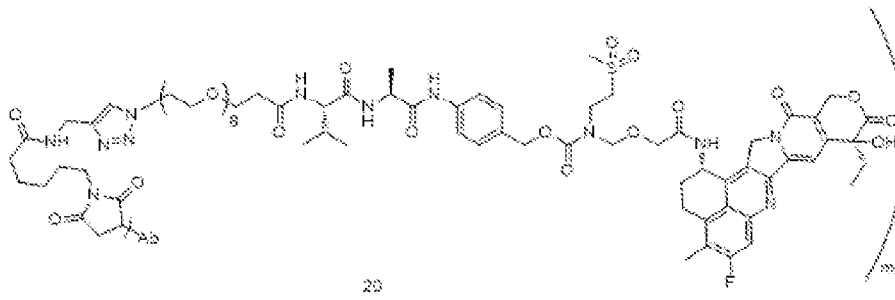
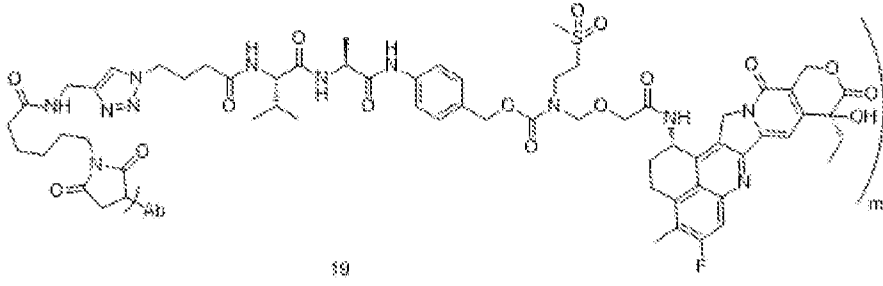
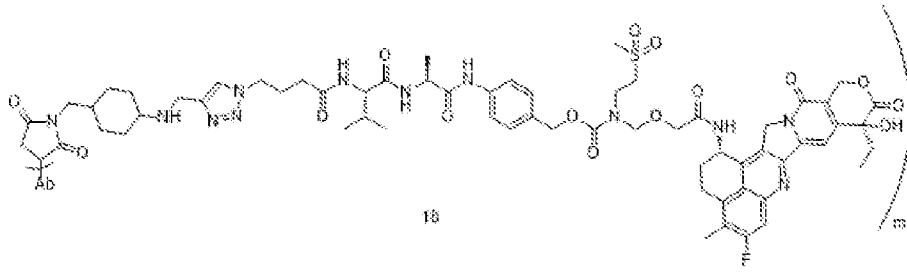


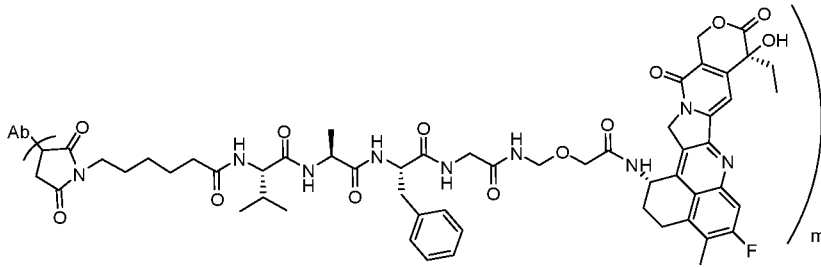
10



11

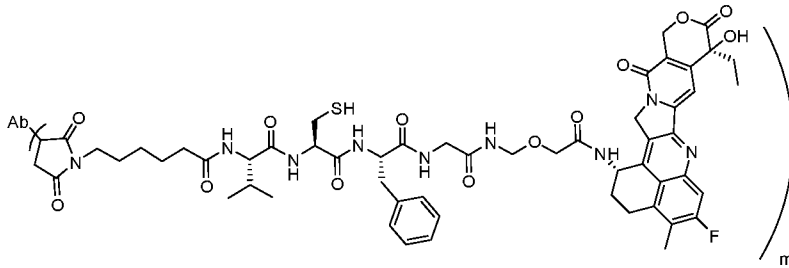






23

或

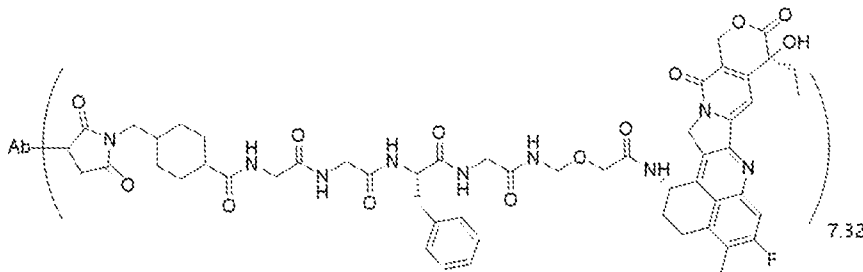


24

所述 Ab 为抗 DLL3 抗体，所述抗 DLL3 抗体为如权利要求 1-6 任一项所述的抗 DLL3 抗体、具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示的轻链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的重链的抗 DLL3 抗体、或具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示的轻链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的重链的抗 DLL3 抗体；

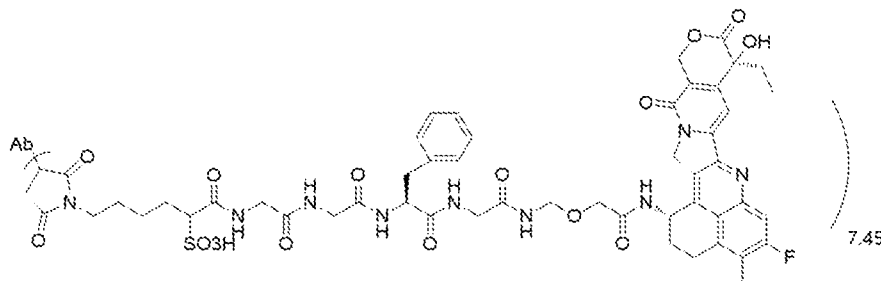
所述的 m 为 7.68、7.53、4.43、7.12、6.92、7.43、7.23、6.83、7.32、7.56、7.54、7.47、5.82、6.78、2.28、6.32、7.45、7.65、7.64、7.36、7.75、7.80、7.77 或 7.76；

优选地，所述的抗体偶联药物为如下所示的任一化合物：



7.32，其中 Ab 为抗 DLL3

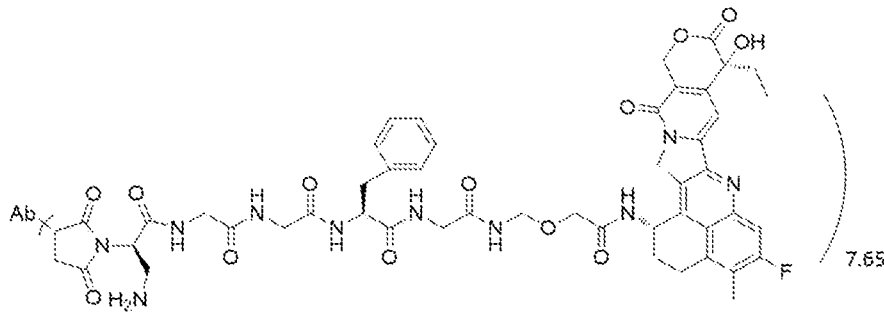
抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL、



7.45，其中 Ab 为抗 DLL3 抗

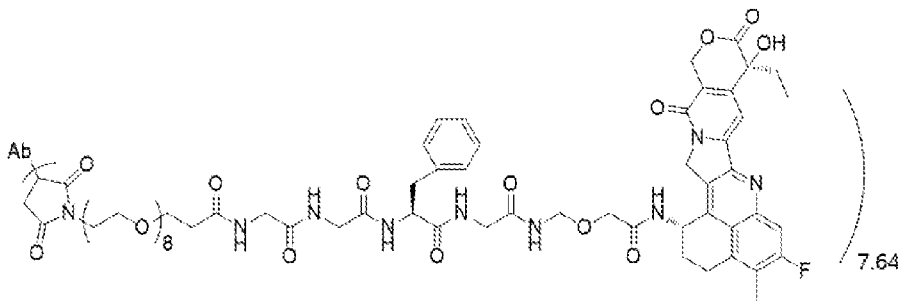
体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所

示的 VL、



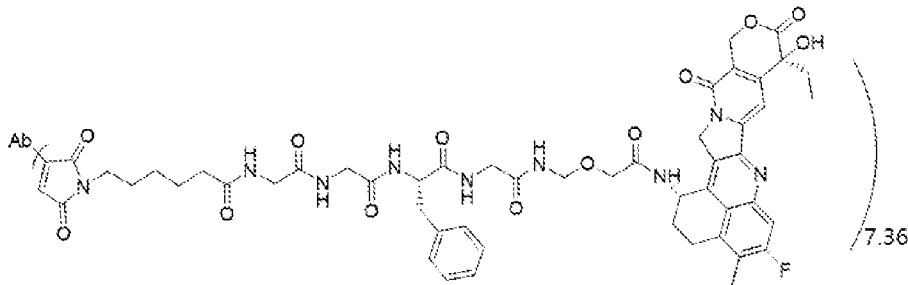
7.65, 其中 Ab 为抗 DLL3 抗

体, 其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL、



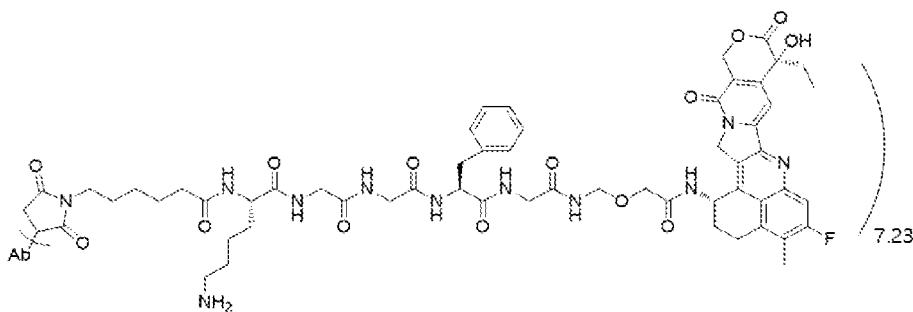
7.64, 其中 Ab 为抗 DLL3

抗体, 其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL、



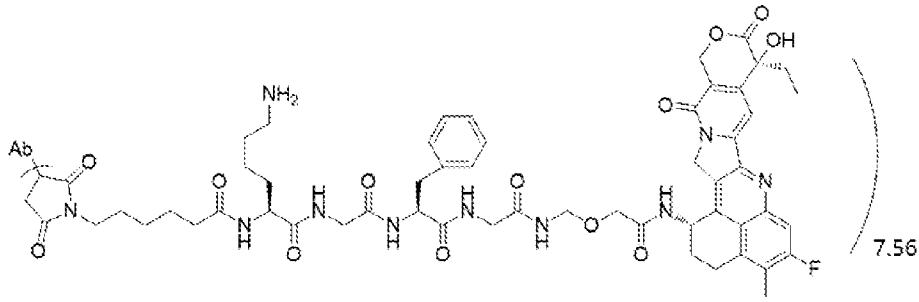
7.36, 其中 Ab 为抗 DLL3

抗体, 其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL、

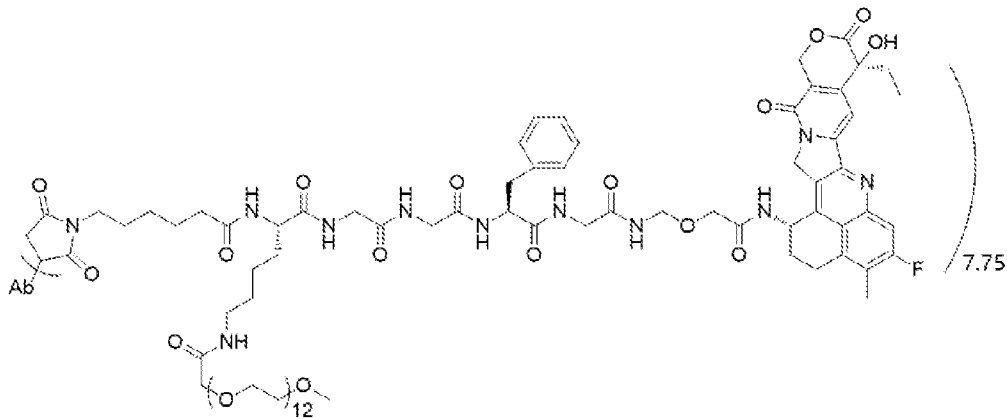


7.23, 其中 Ab 为抗 DLL3

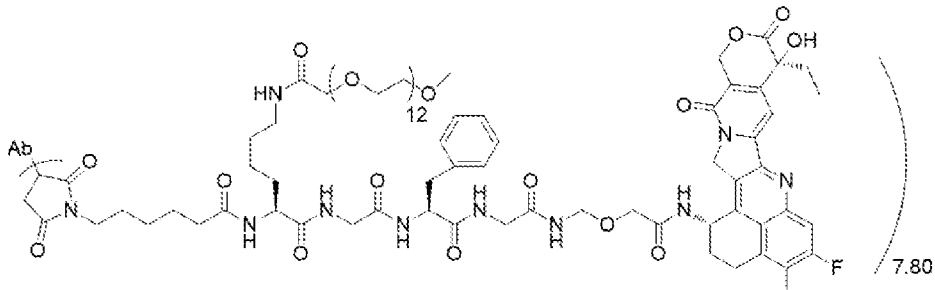
抗体, 其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL、



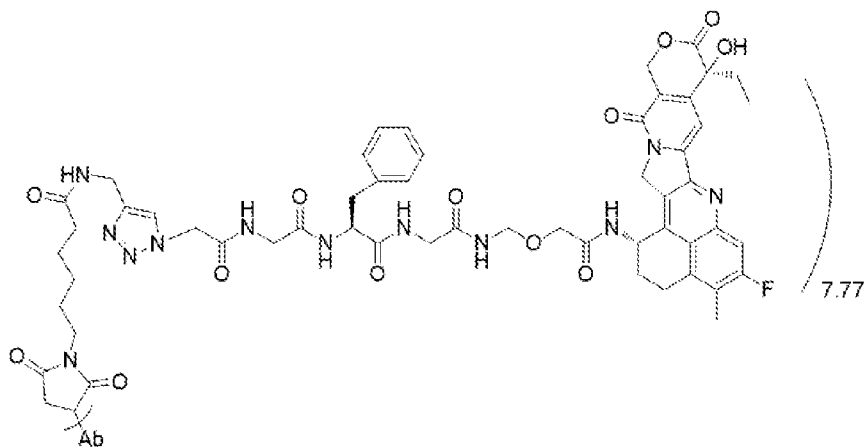
，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL、



，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL、

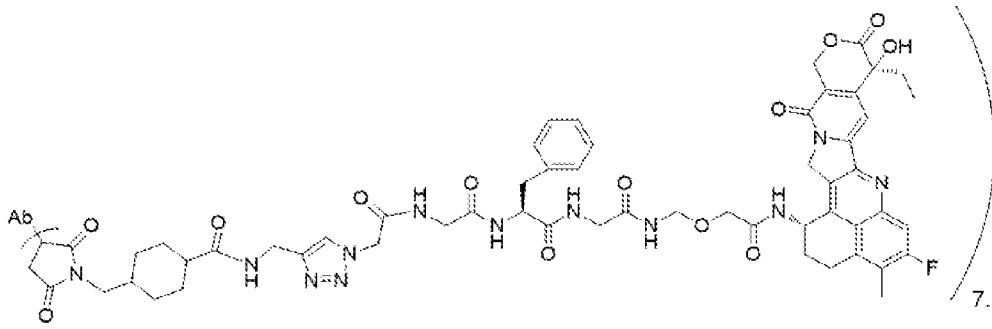


，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL、



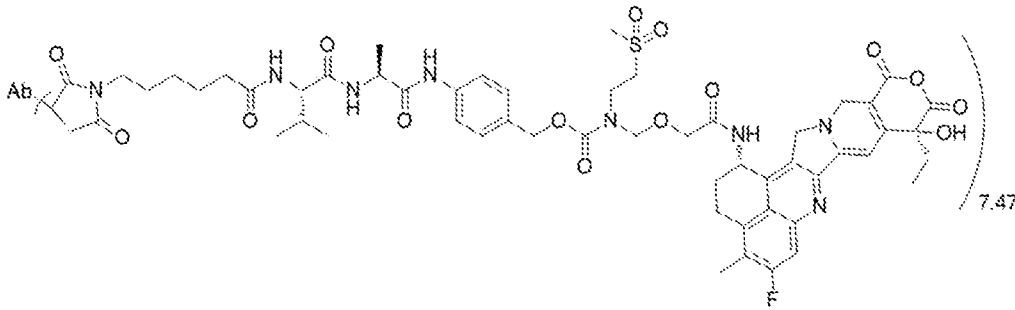
，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所

示的 VL、



7.56, 其中 Ab 为抗

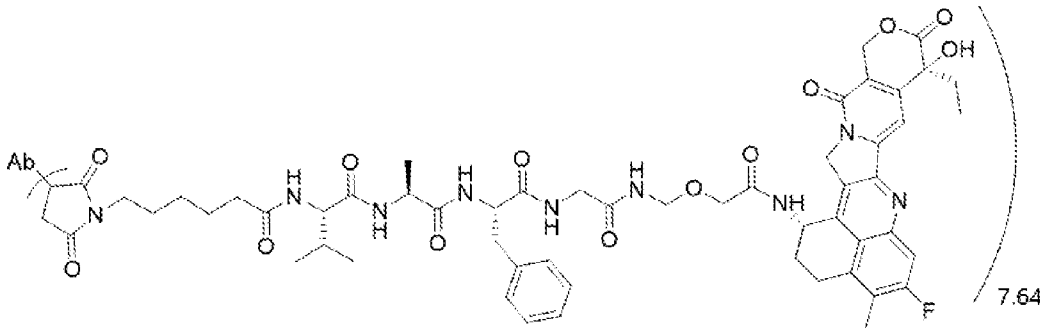
DLL3 抗体, 其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL、



7.47

, 其中 Ab 为抗

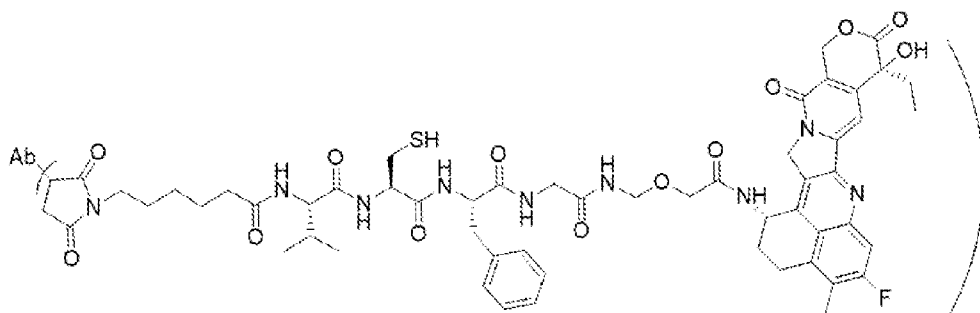
DLL3 抗体, 其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL、



7.64

, 其中 Ab 为

抗 DLL3 抗体, 其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL、

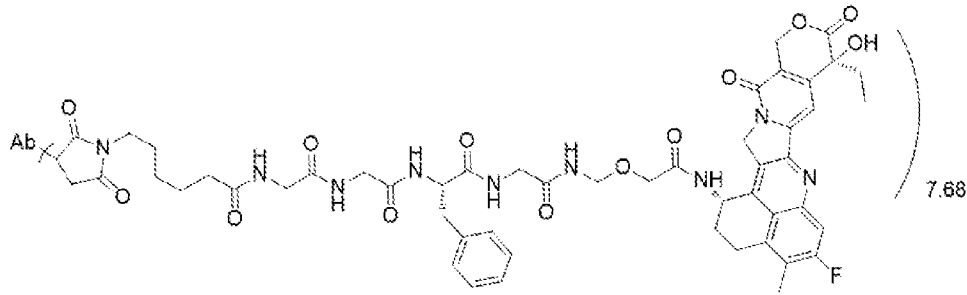


7.76

, 其中 Ab 为抗

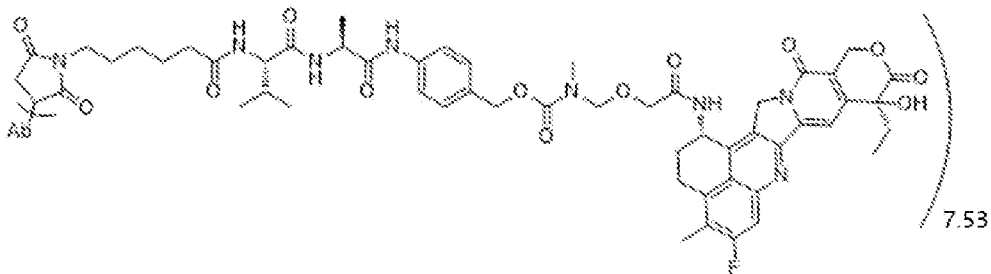
DLL3 抗体, 其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:

26 所示的 VL、



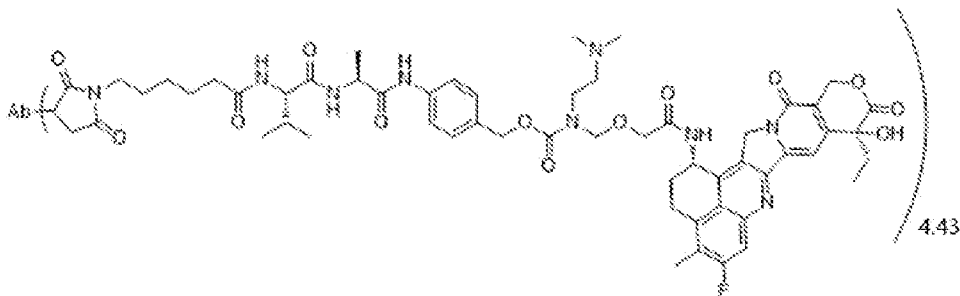
，其中 Ab 为抗

DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL、



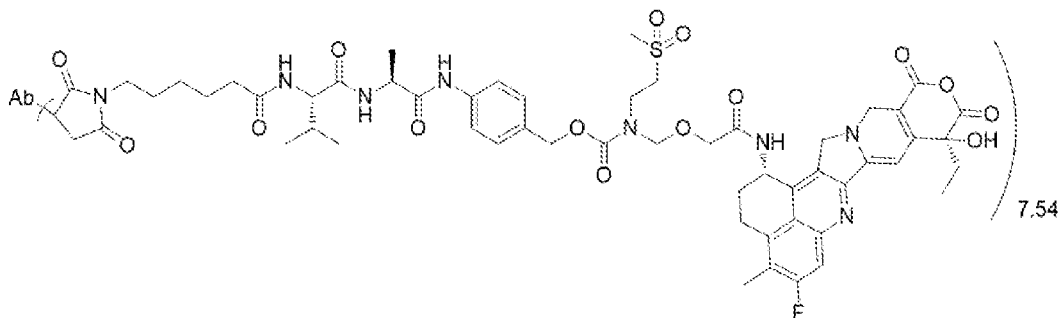
，其中 Ab 为抗

DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL、



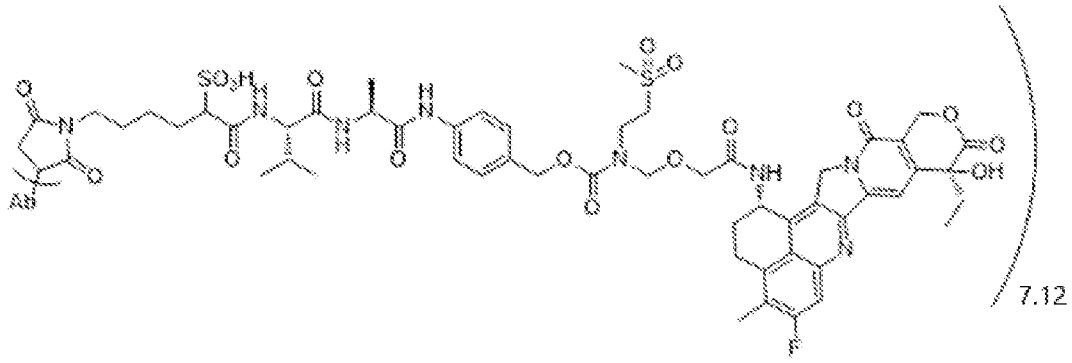
，其中 Ab 为抗

DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL、

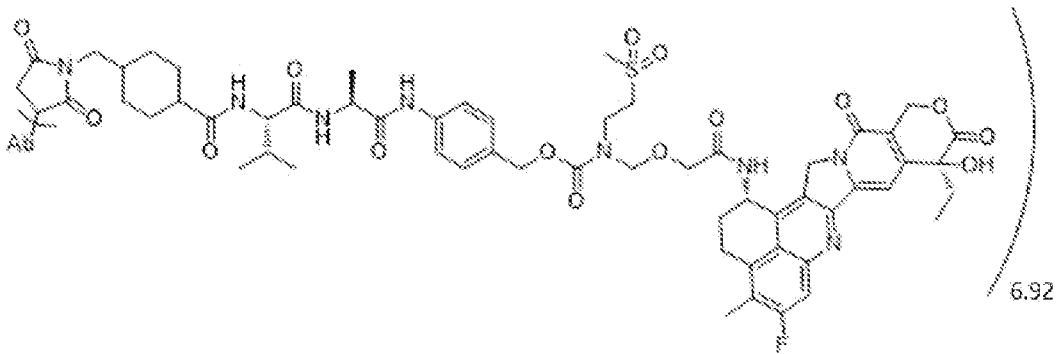


，其中 Ab

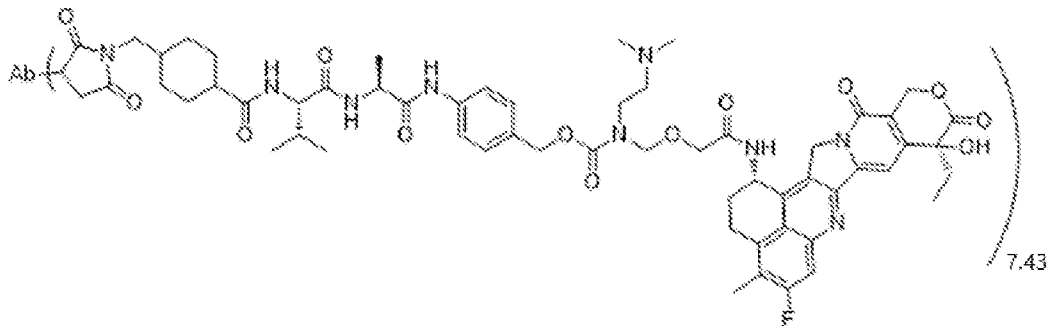
为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL、



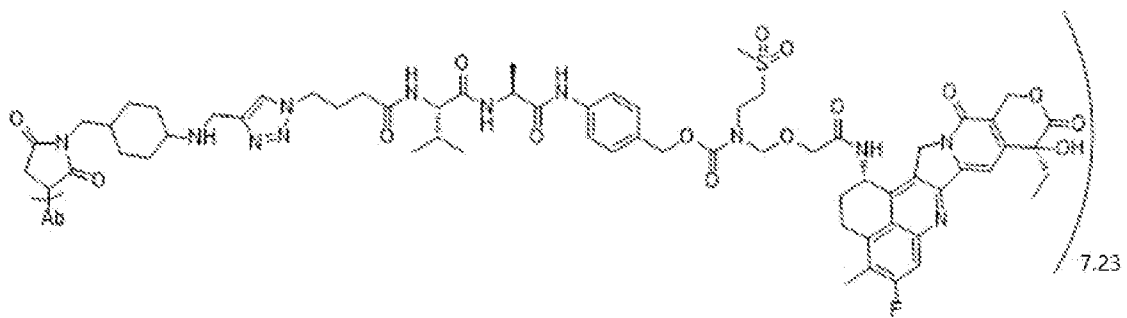
，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL、



，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL、

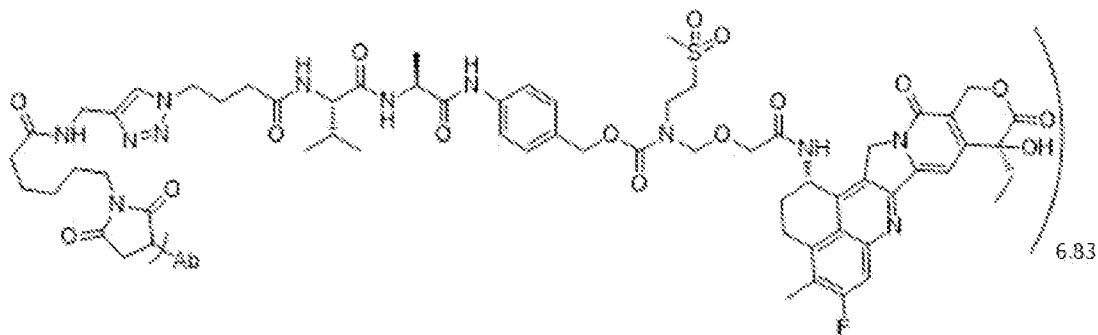


，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL、

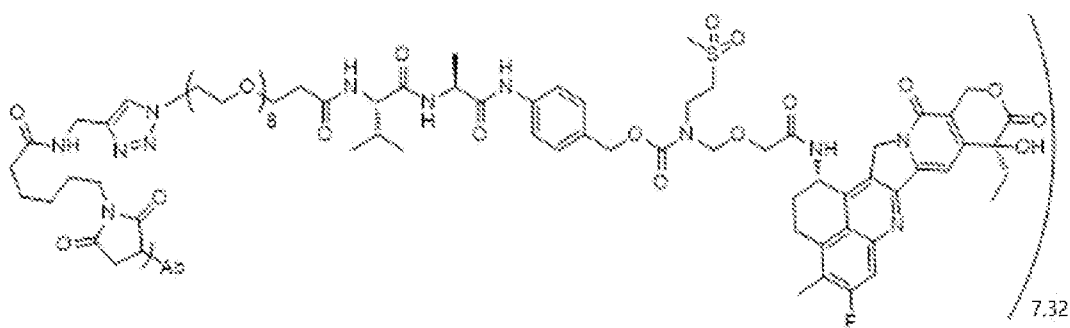


，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如

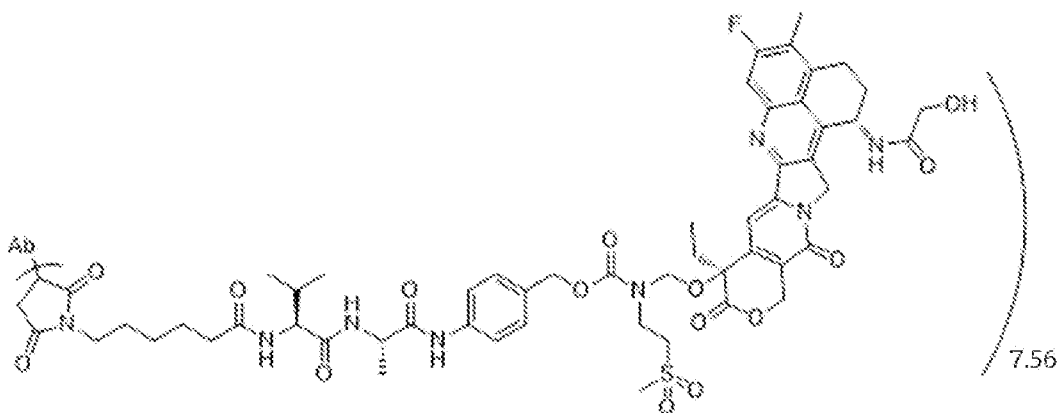
SEQ ID NO: 16 所示的 VL、



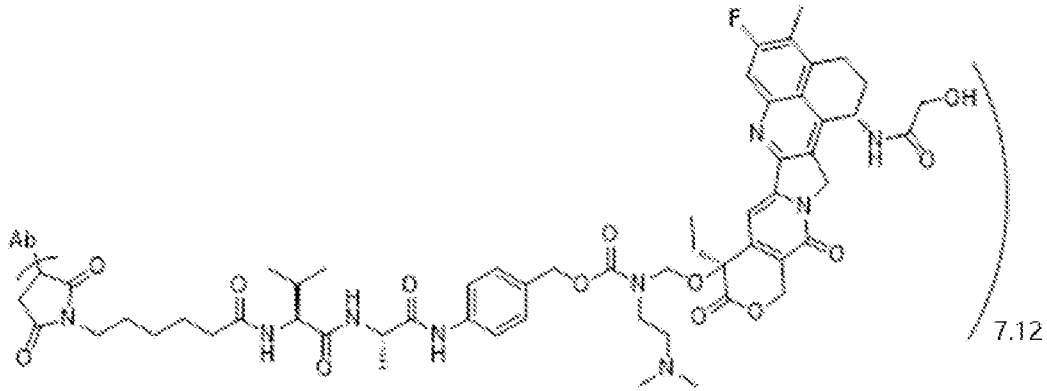
，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL、



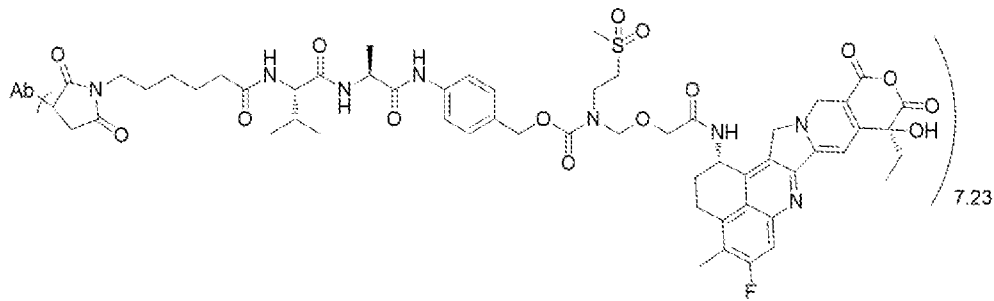
，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL、



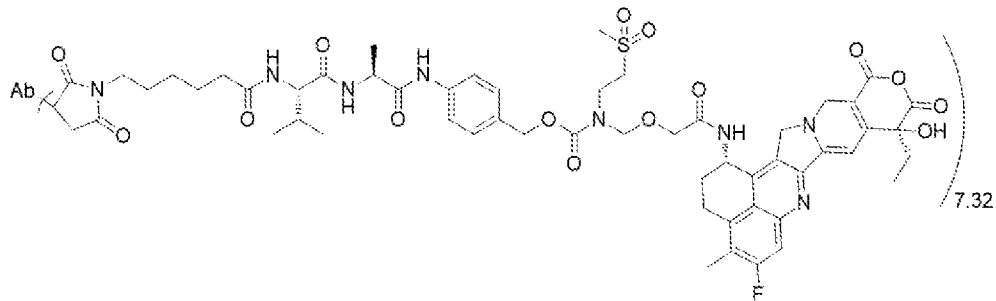
，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL、



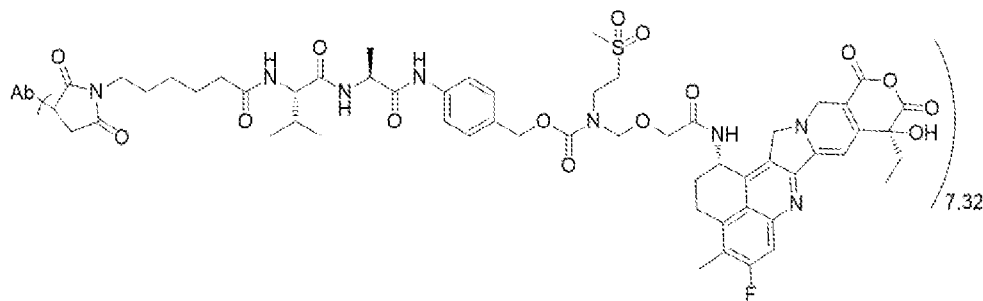
,其中 Ab 为抗 DLL3 抗体,其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL、



,其中 Ab 为抗 DLL3 抗体,其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示的轻链、

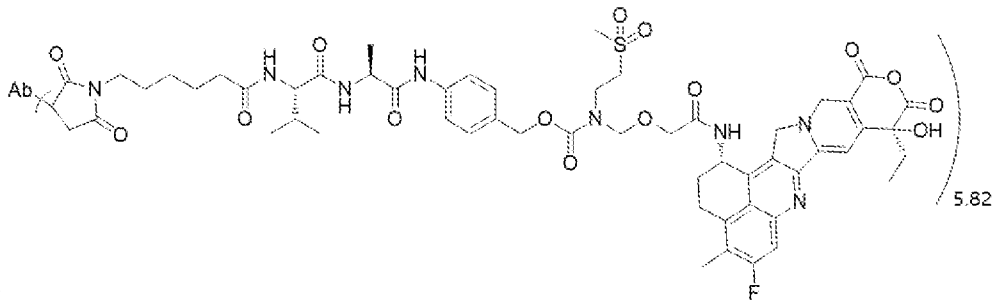


,其中 Ab 为抗 DLL3 抗体,其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示的轻链、



,其中 Ab 为抗 DLL3 抗体,其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:

23 所示的 VL



或 5.82，其中 Ab 为抗 DLL3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示的 VH 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示的 VL。

14. 一种嵌合抗原受体，其包含如权利要求 1-6 任一项所述的抗 DLL3 抗体。

15. 一种基因修饰的细胞，其特征在于，其包含如权利要求 1-6 任一项所述的抗 DLL3 抗体；优选地，所述基因修饰的细胞为真核细胞，优选分离的人细胞；更优选免疫细胞如 T 细胞，或 NK 细胞。

16. 一种抗 DLL3 抗体的制备方法，所述制备方法包括以下步骤：培养如权利要求 9 所述的转化体，从培养物中获得抗 DLL3 抗体。

17. 一种药物组合物，其包含如权利要求 1-6 任一项所述的抗 DLL3 抗体、如权利要求 10-13 任一项所述的抗体药物偶联物、如权利要求 14 所述的嵌合抗原受体、和/或如权利要求 15 所述的基因修饰的细胞；

优选地，所述药物组合物为液体剂型、气体剂型、固体剂型或半固体剂型，和/或，所述药物组合物可通过口服给药、注射给药、经鼻给药、经皮给药或粘膜给药；

更优选地，所述的药物组合物还包含组合治疗剂，所述的组合治疗剂包括化学治疗剂、放射治疗剂、免疫抑制剂和/或细胞毒性药物。

18. 如权利要求 1-6 任一项所述的抗 DLL3 抗体、如权利要求 10-13 任一项所述的抗体药物偶联物、如权利要求 14 所述的嵌合抗原受体、如权利要求 15 所述的基因修饰的细胞和/或如权利要求 17 所述的药物组合物在制备治疗和/或预防 DLL3 表达异常相关疾病的药物、试剂盒和/或给药装置中的应用；

所述的 DLL3 表达异常相关疾病优选肿瘤，所述的肿瘤优选癌症，所述的癌症优选神经内分泌瘤更优选小细胞肺癌。

19. 一种试剂盒，其包括如权利要求 1-6 任一项所述的抗 DLL3 抗体、如权利要求 10-13 任一项所述的抗体药物偶联物、如权利要求 14 所述的嵌合抗原受体、如权利要求 15 所述的基因修饰的细胞和/或如权利要求 17 所述的药物组合物；以及任选地，说明书。

20. 一种给药装置，其特征在于，所述给药装置包含：（1）用于对有需要的受试者

施用权利要求 17 所述的药物组合物的输注模块，以及 (2) 任选的药效监控模块。

21. 一种检测 DLL3 的方法，其特征在于，其包括使用如权利要求 1-6 任一项所述的抗 DLL3 抗体进行检测的步骤；优选地，所述方法为非诊断和/或治疗目的。

22. 一种诊断、预防和/或治疗 DLL3 表达异常相关疾病的方法，其包括向有需要的受试者施用如权利要求 1-6 任一项所述的抗 DLL3 抗体、如权利要求 10-13 任一项所述的抗体药物偶联物、如权利要求 14 所述的嵌合抗原受体、如权利要求 15 所述的基因修饰的细胞和/或如权利要求 17 所述的药物组合物。

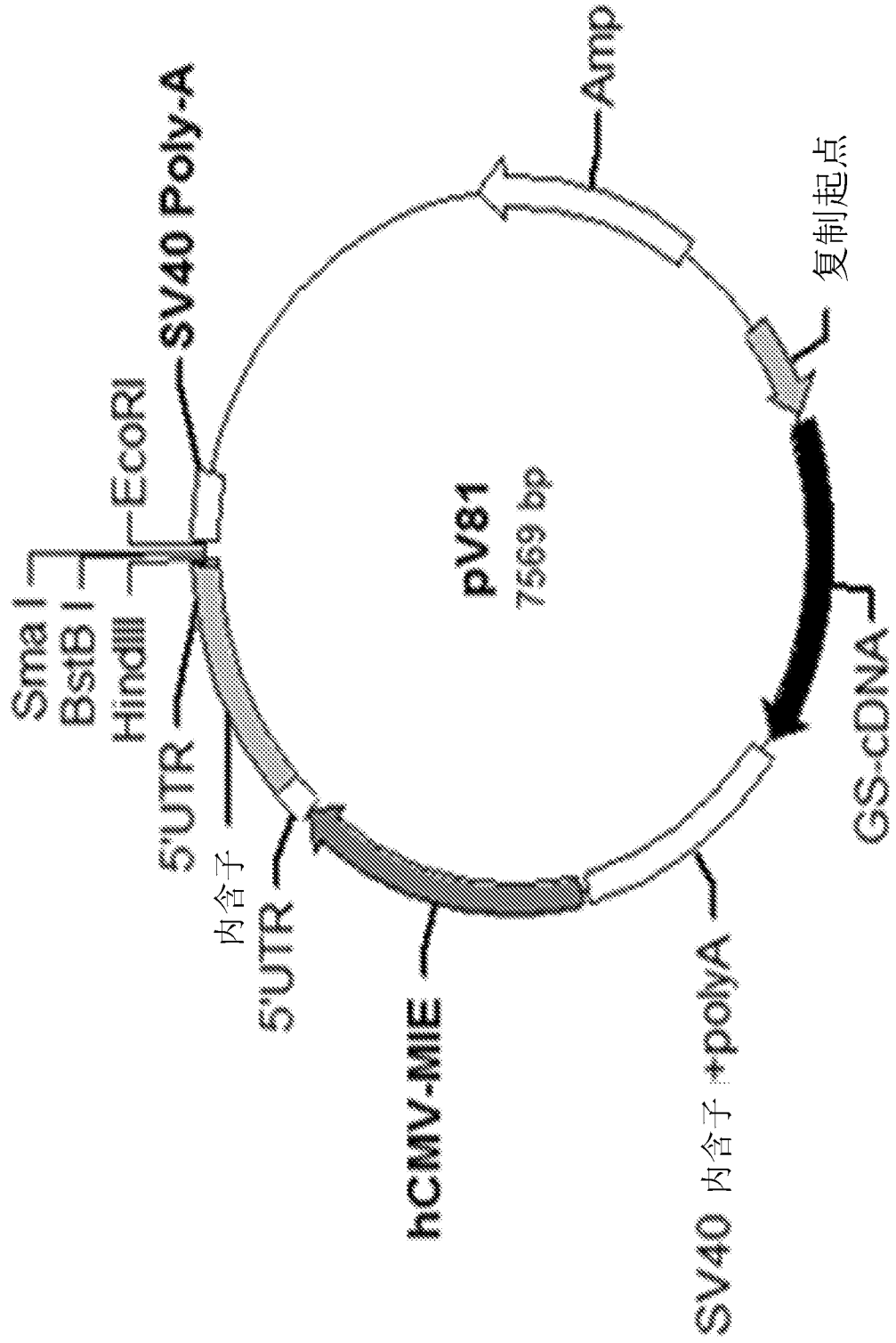


图 1

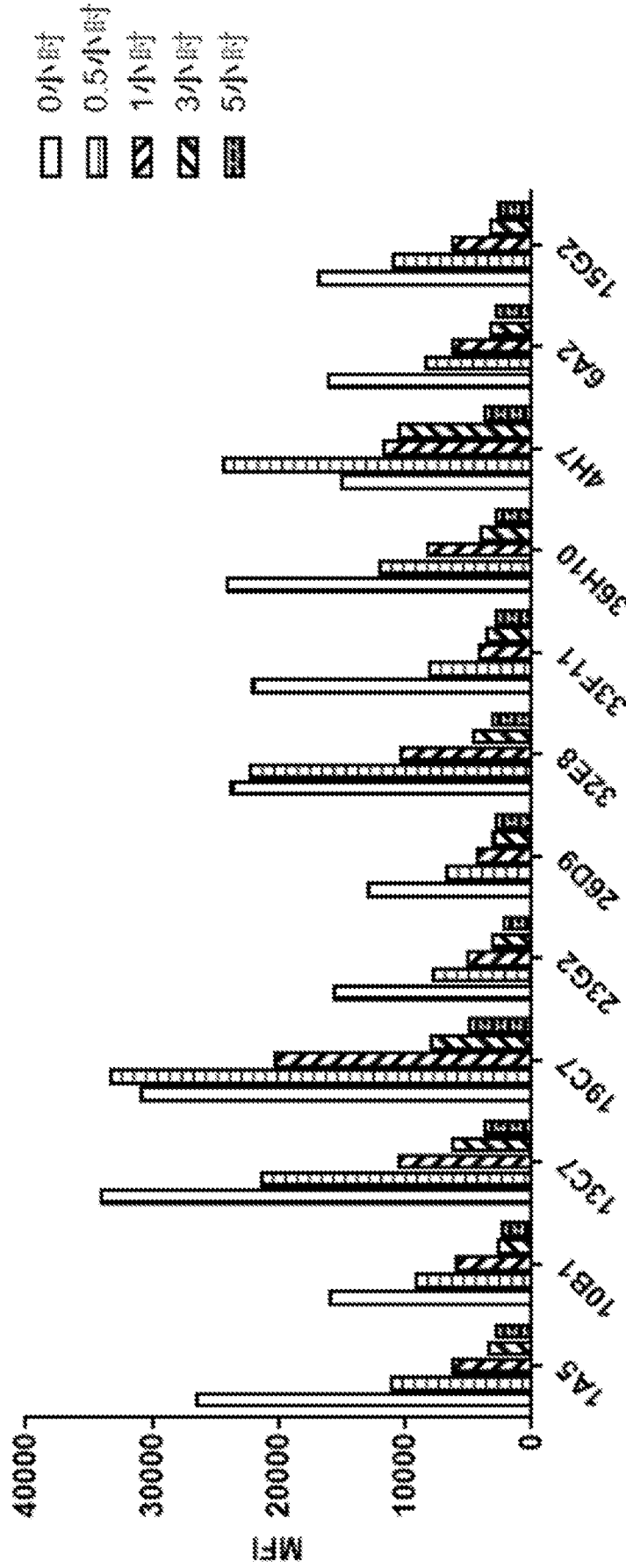


图 2

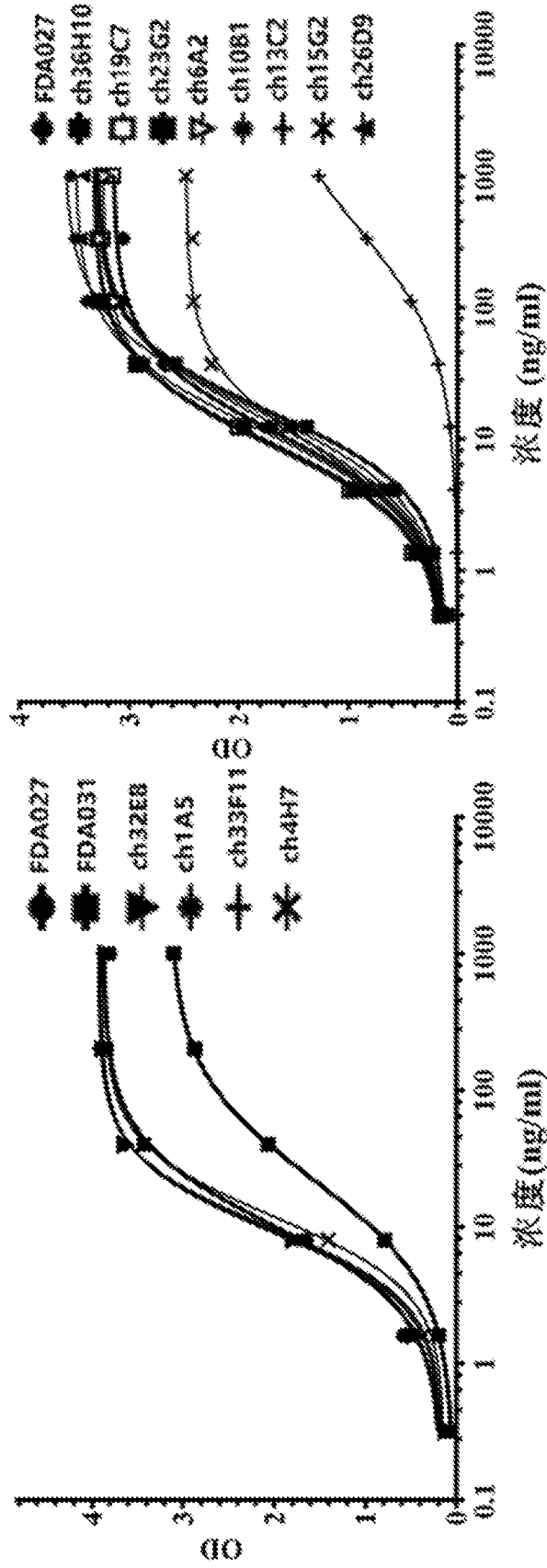


图 3

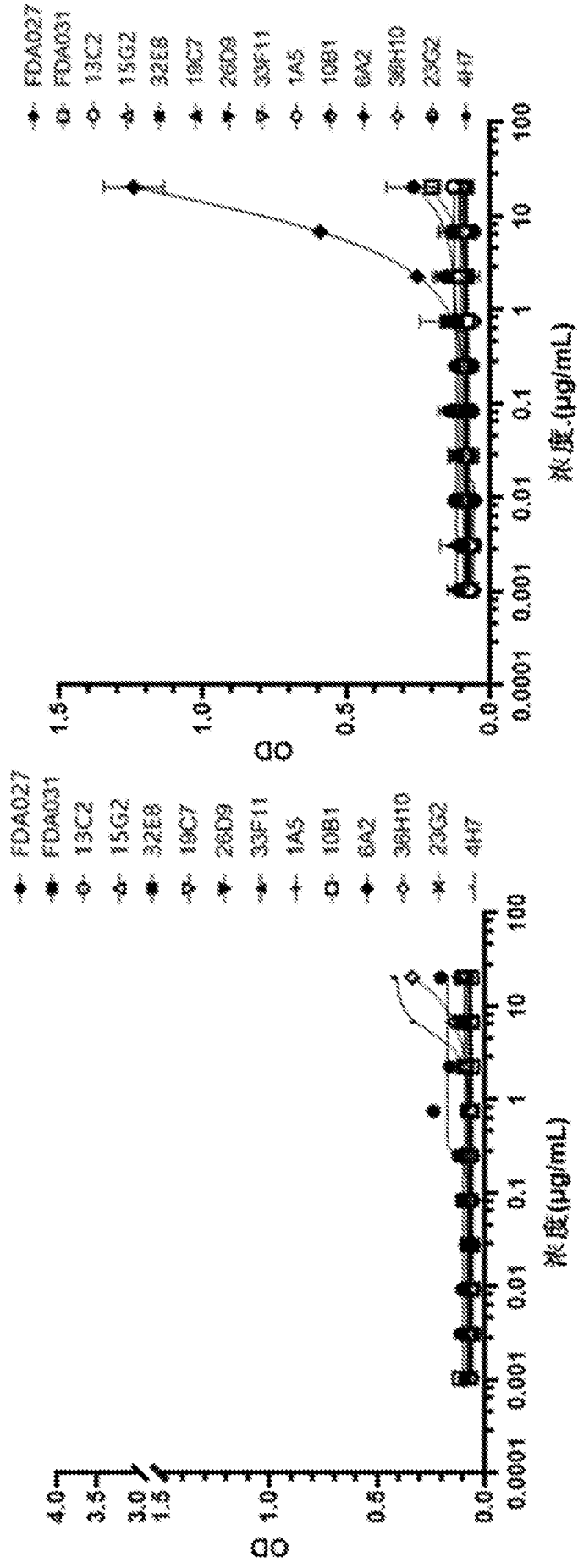


图 4

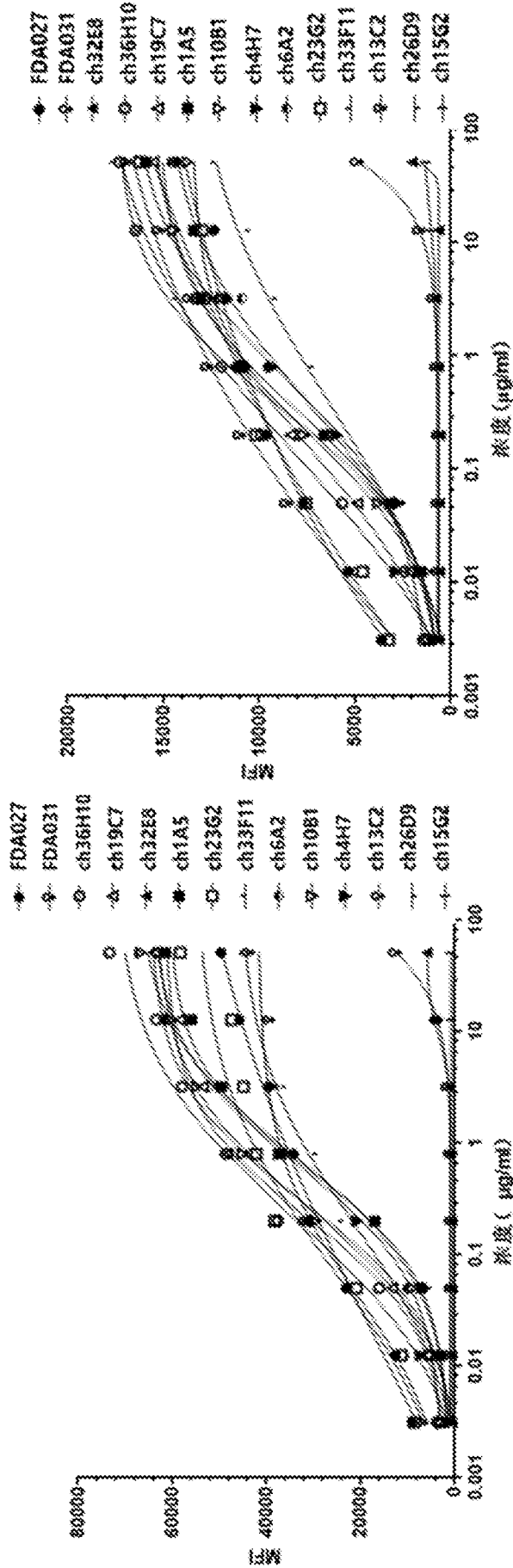


图 5

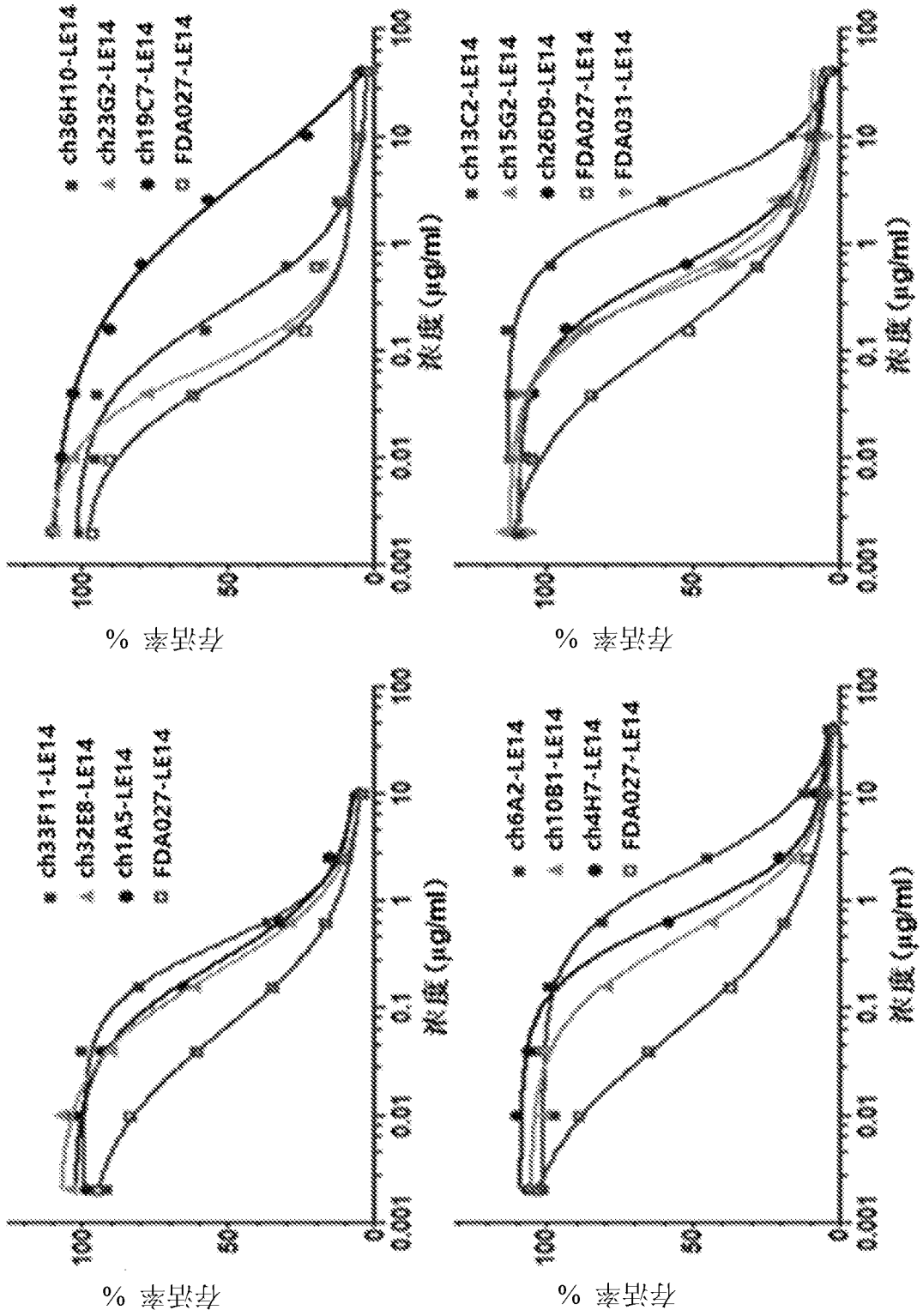


图 6

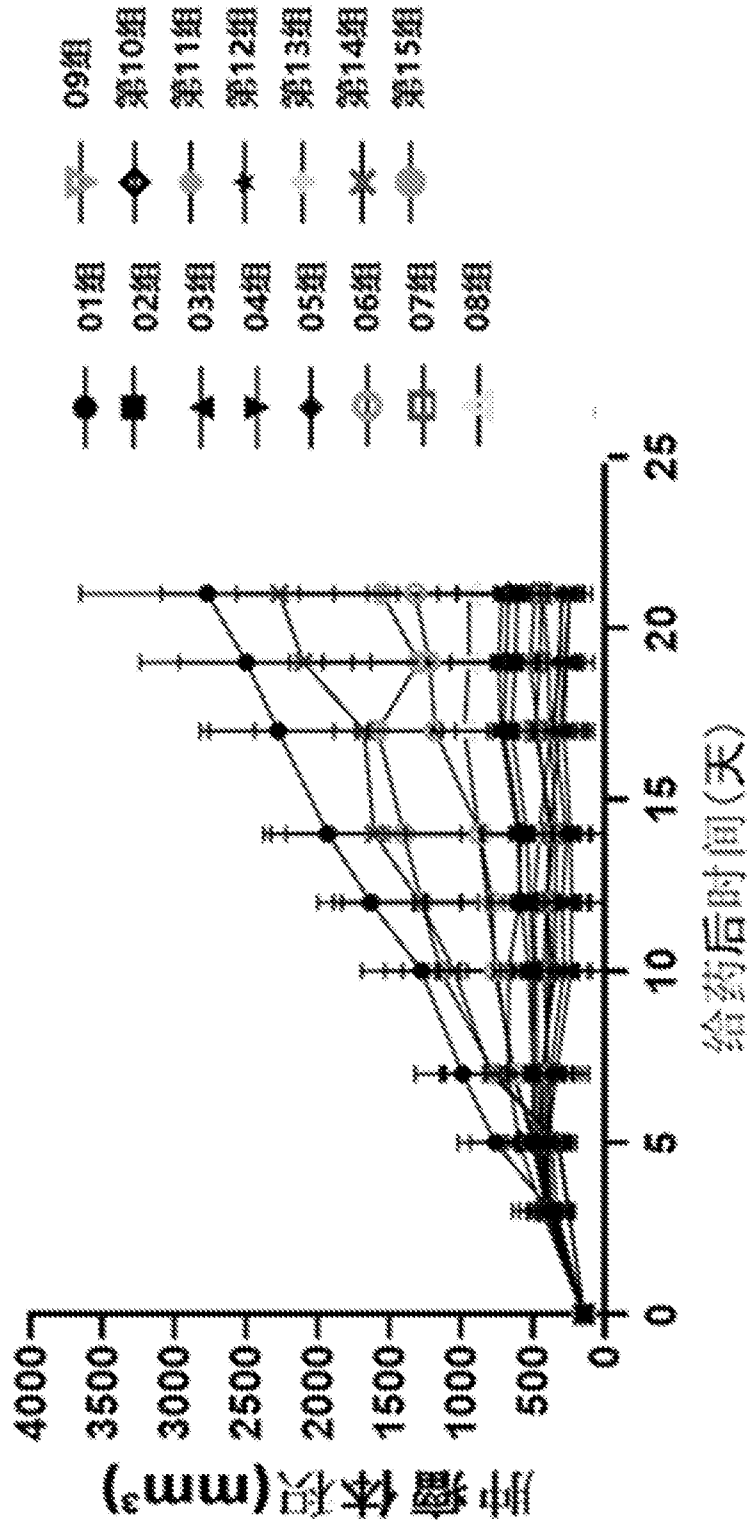


图7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/109050

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A61K A61P G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; CJFD; WPABS; DWPI; EPTXT; USTXT; WOTXT; CNKI; 万方; WANFANG; ISI Web of Science; GenBank; 中国专利生物序列检索系统; Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; STN; 上海复旦张江生物医药, 郭青松, δ样蛋白3, 抗体, 单抗, 单克隆抗体, 小细胞肺癌, 抗体偶联药物, SHANGHAI FUDAN-ZHANGJIANG BIOPHARMACEUTICAL, Guoqingsong, DLL3, antibody, mAb, monoclonal antibody, SCLC, ADC, 序列11-18、19-28、29-38、39-48、53、59-68、60-78、70-88、89-98、99-109、110-114, Sequences 11-18, 19-28, 29-38, 39-48, 53, 59-68, 60-78, 70-88, 89-98, 99-109, and 110-114		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 108136015 A (ABBVIE STEMCENTRX LLC.) 08 June 2018 (2018-06-08) description, paragraphs [0008]-[0020]	1-21
A	US 2019225685 A1 (ABBVIE STEMCENTRX LLC.) 25 July 2019 (2019-07-25) entire document	1-21
A	CN 112584860 A (PHANES THERAPEUTICS INC.) 30 March 2021 (2021-03-30) entire document	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 20 October 2022		Date of mailing of the international search report 27 October 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
 - [1] The actually submitted sequence table is an XML file in the standard ST.26; and a statement explaining that the sequence table does not exceed the scope disclosed by the submitted international application is attached.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **21、 22**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claim 21 relates to a method for detecting DLL3. The technical solution relates to a diagnostic method implemented on a human or animal body, belonging to the subject matter as defined in PCT Rule 39.1(iv) that does not warrant a search conducted by the searching authority.
 - [2] The reasonably expected amendment for claim 21 is as follows: a method for detecting DLL3, characterized by comprising a step of using the anti-DLL3 antibody according to any one of claims 1-6 to perform detection. The method does not aim at the purpose of diagnosis and/or treatment.
 - [3] Claim 22 relates to a method for diagnosing, preventing, and/or treating diseases associated with abnormal DLL3 expression. The technical solution relates to a diagnostic and treatment method implemented on a human or animal body, belonging to the subject matter as defined in PCT Rule 39.1(iv) that does not warrant a search conducted by the searching authority.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/109050

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108136015	A	08 June 2018	PH	12018500380	A1	03 September 2018
				KR	20180041717	A	24 April 2018
				EP	3337517	A2	27 June 2018
				TW	201718026	A	01 June 2017
				AU	2016308365	A1	15 March 2018
				JP	2018529656	A	11 October 2018
				US	2018243435	A1	30 August 2018
				ZA	201801401	B	28 August 2019
				CA	2996165	A1	23 February 2017
				MX	2018002166	A	12 September 2018
				WO	2017031458	A2	23 February 2017
				BR	112018003269	A2	25 September 2018
				HK	1257056	A1	11 October 2019
				WO	2017031458	A3	06 April 2017
				AR	105781	A1	08 November 2017
				SG	11201801367	A1	28 March 2018
				ID	201808212	A	03 August 2018
				VN	59666	A	25 October 2018
				IN	201817010118	A	06 July 2018
				EP	3337517	A4	17 April 2019

US	2019225685	A1	25 July 2019	None			

CN	112584860	A	30 March 2021	WO	2019217145	A1	14 November 2019
				KR	20210008367	A	21 January 2021
				AU	2019267349	A1	29 October 2020
				US	2021047399	A1	18 February 2021
				EP	3790586	A1	17 March 2021
				BR	112020021280	A2	26 January 2021
				CA	3097193	A1	14 November 2019
				JP	2021528047	A	21 October 2021
				SG	11202009772	A1	27 November 2020
				IN	202047052239	A	11 December 2020
				EP	3790586	A4	19 January 2022
				WO	2019217145	A8	23 January 2020

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K C12N A61K A61P G01N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;CNTXT;CJFD;WPABS;DWPI;EPTXT;USTXT;WOTXT;CNKI;万方;ISI Web of Science;GenBank;中国专利生物序列检索系统;STN;上海复旦张江生物医药, 郭青松, δ样蛋白3, 抗体, 单抗, 单克隆抗体, 小细胞肺癌, 抗体偶联药物, SHANGHAI FUDAN-ZHANGJIANG BIO-PHARMACEUTICAL, Guoqingsong, DLL3, antibody, mAb, monoclonal antibody, SCLC, ADC, 序列11-18、19-28、29-38、39-48、53、59-68、60-78、70-88、89-98、99-109、110-114</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 108136015 A (艾伯维施特姆森特克斯有限责任公司) 2018年6月8日 (2018 - 06 - 08) 说明书第[0008]-[0020]段</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2019225685 A1 (ABBVIE STEMCENTRX LLC) 2019年7月25日 (2019 - 07 - 25) 全文</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112584860 A (东莞凡恩世生物医药有限公司) 2021年3月30日 (2021 - 03 - 30) 全文</td> <td>1-21</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 108136015 A (艾伯维施特姆森特克斯有限责任公司) 2018年6月8日 (2018 - 06 - 08) 说明书第[0008]-[0020]段	1-21	A	US 2019225685 A1 (ABBVIE STEMCENTRX LLC) 2019年7月25日 (2019 - 07 - 25) 全文	1-21	A	CN 112584860 A (东莞凡恩世生物医药有限公司) 2021年3月30日 (2021 - 03 - 30) 全文	1-21
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
A	CN 108136015 A (艾伯维施特姆森特克斯有限责任公司) 2018年6月8日 (2018 - 06 - 08) 说明书第[0008]-[0020]段	1-21												
A	US 2019225685 A1 (ABBVIE STEMCENTRX LLC) 2019年7月25日 (2019 - 07 - 25) 全文	1-21												
A	CN 112584860 A (东莞凡恩世生物医药有限公司) 2021年3月30日 (2021 - 03 - 30) 全文	1-21												
国际检索实际完成的日期	2022年10月20日	国际检索报告邮寄日期	2022年10月27日											
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	授权官员	夏文静 电话号码 (86-512) 88996514											

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:
- [1] 实际提交的序列列表是ST. 26标准的XML文件;附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 21、22
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
 - [1] 权利要求21涉及检测DLL3的方法，该技术方案为在人体或动物体上实施的诊断方法，属于PCT细则39.1(iv)定义的不要求检索单位检索的主题。
 - [2] 针对权利要求21合理预期的修改如下：一种检测DLL3的方法，其特征在于，包括使用如权利要求1-6任一项所述的抗DLL3抗体进行检测的步骤，所述方法为非诊断和/或治疗目的。
 - [3] 权利要求22涉及诊断、预防和/或治疗DLL3表达异常相关疾病的方法，该技术方案为在人体或动物体上实施的诊断、治疗方法，属于PCT细则39.1(iv)定义的不要求检索单位检索的主题。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/109050

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	108136015	A	2018年6月8日	PH	12018500380	A1	2018年9月3日
				KR	20180041717	A	2018年4月24日
				EP	3337517	A2	2018年6月27日
				TW	201718026	A	2017年6月1日
				AU	2016308365	A1	2018年3月15日
				JP	2018529656	A	2018年10月11日
				US	2018243435	A1	2018年8月30日
				ZA	201801401	B	2019年8月28日
				CA	2996165	A1	2017年2月23日
				MX	2018002166	A	2018年9月12日
				WO	2017031458	A2	2017年2月23日
				BR	112018003269	A2	2018年9月25日
				HK	1257056	A1	2019年10月11日
				WO	2017031458	A3	2017年4月6日
				AR	105781	A1	2017年11月8日
				SG	11201801367	A1	2018年3月28日
				ID	201808212	A	2018年8月3日
				VN	59666	A	2018年10月25日
				IN	201817010118	A	2018年7月6日
				EP	3337517	A4	2019年4月17日
US	2019225685	A1	2019年7月25日	无			
CN	112584860	A	2021年3月30日	WO	2019217145	A1	2019年11月14日
				KR	20210008367	A	2021年1月21日
				AU	2019267349	A1	2020年10月29日
				US	2021047399	A1	2021年2月18日
				EP	3790586	A1	2021年3月17日
				BR	112020021280	A2	2021年1月26日
				CA	3097193	A1	2019年11月14日
				JP	2021528047	A	2021年10月21日
				SG	11202009772	A1	2020年11月27日
				IN	202047052239	A	2020年12月11日
				EP	3790586	A4	2022年1月19日
				WO	2019217145	A8	2020年1月23日