



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116271079 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202210911943.4

A61K 47/68 (2017.01)

(22) 申请日 2022.07.29

A61K 31/4745 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

A61K 31/537 (2006.01)

202110875536.8 2021.07.30 CN

A61K 31/704 (2006.01)

202210239591.2 2022.03.11 CN

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 上海复旦张江生物医药股份有限公司

G01N 33/574 (2006.01)

地址 201210 上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路308号

(72) 发明人 郭青松 沈毅珺 杨彤 高贝

吴芳 孟李凯 王宝霞 张文伯

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

专利代理师 袁文正 黄益澍

(51) Int. Cl.

A61K 47/65 (2017.01)

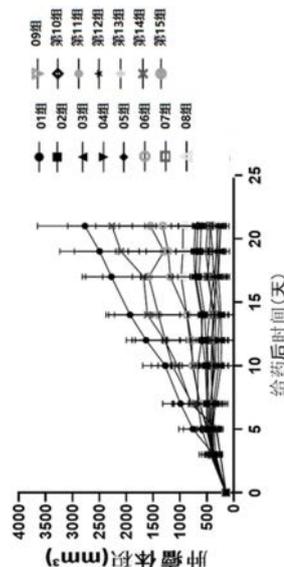
权利要求书20页 说明书55页  
序列表(电子公布) 附图7页

## (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

## (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。



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、RAN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、WAS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、FTS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、NAN和113所示。

2. 如权利要求1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、13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、33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。

3. 如权利要求1或2所述的抗DLL3抗体，其为全长抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、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。

4. 如权利要求3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。

5. 一种分离的核酸,其编码如权利要求1-4任一项所述的抗DLL3抗体。

6. 一种重组表达载体,其包含如权利要求5所述的分离的核酸;

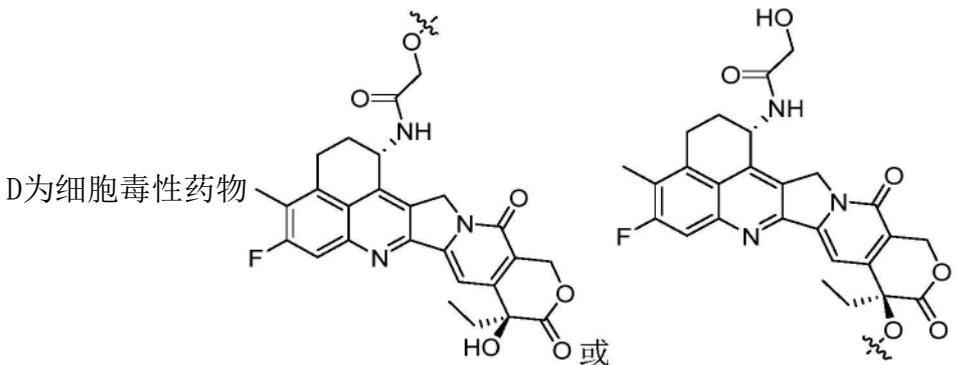
优选地,所述表达载体包含真核细胞表达载体和/或原核细胞表达载体。

7. 一种转化体,其包含如权利要求6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。

8. 一种抗体药物偶联物,其结构通式为 $Ab-(L_3-L_2-L_1-D)_m$ ;

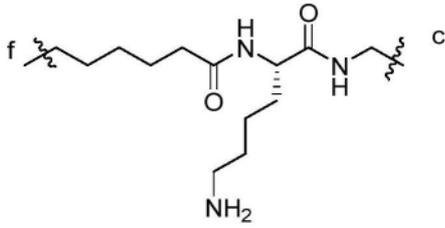
其中,Ab为抗DLL3抗体;



m为2~8;

$L_1$ 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 $L_2$ 的c端相连;





其中n独立地为1~12, c端通过羰基与L<sub>1</sub>相连, f端与所述

的L<sub>3</sub>的d端相连;



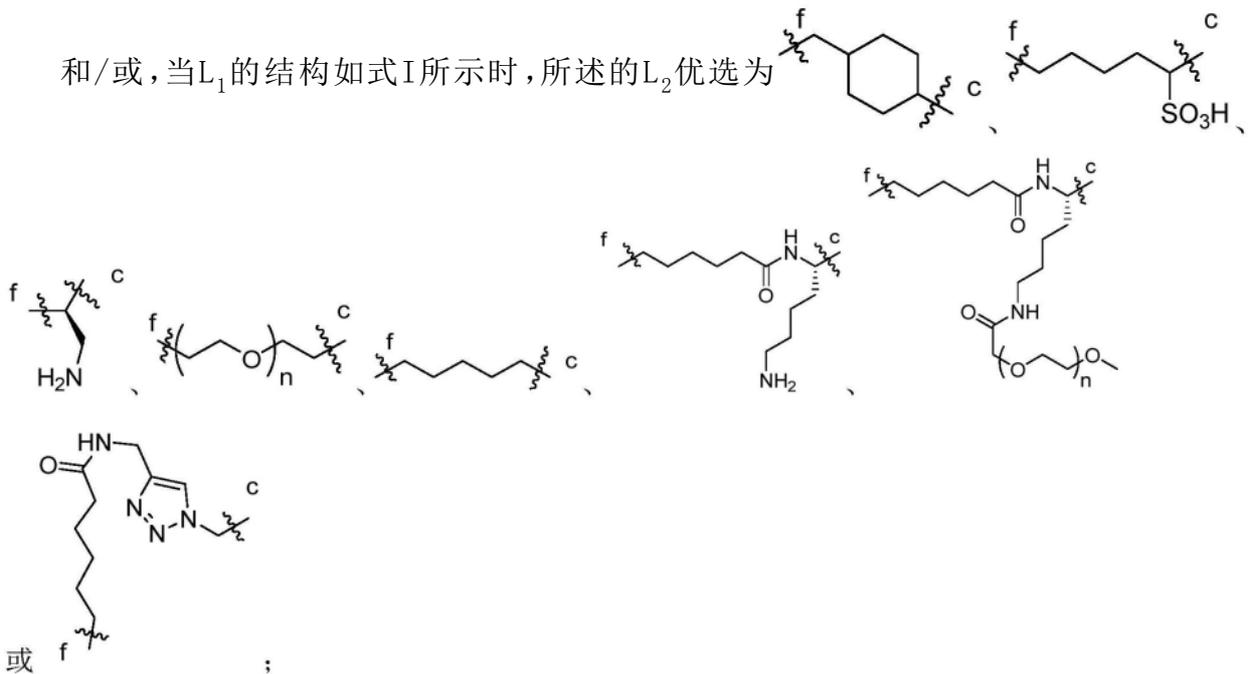
9. 如权利要求8所述的抗体药物偶联物, 其特征在于,

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;

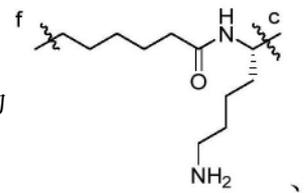
和/或, 所述的L为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基、脯氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种, 优选为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种; 更优选地, 所述的L为缬氨酸残基和/或丙氨酸残基, 所述的多为两种或三种, 所述的p为2;

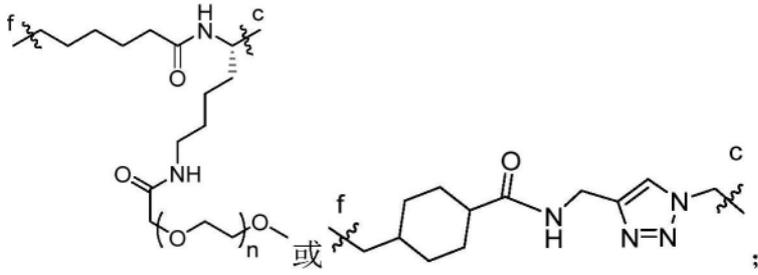
和/或, 所述的R<sup>1</sup>为被一个或多个-NR<sup>1-1</sup>R<sup>1-2</sup>取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、被一个或多个R<sup>1-3</sup>S(O)<sub>2</sub>取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、或C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基, 所述的R<sup>1-1</sup>、R<sup>1-2</sup>和R<sup>1-3</sup>分别独立地为C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>烷基;

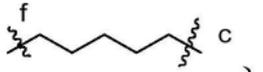
和/或, 当L<sub>1</sub>的结构如式I所示时, 所述的L<sub>2</sub>优选为

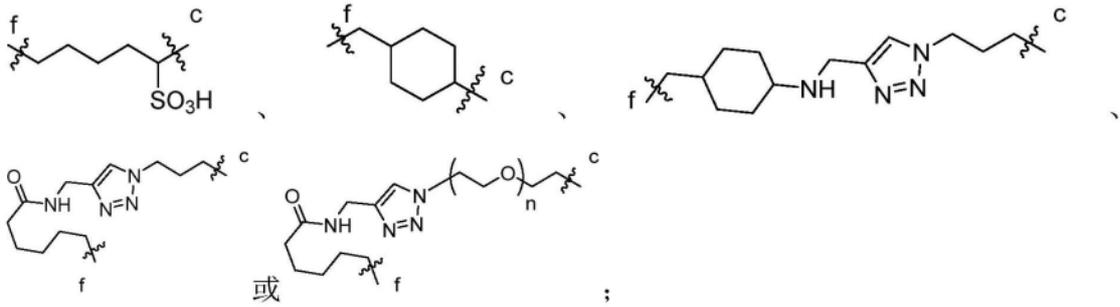


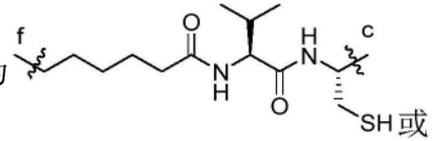
和/或, 当L<sub>1</sub>的结构如式II所示时, 所述的L<sub>2</sub>优选为

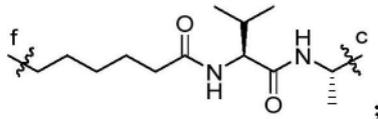




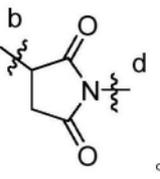
和/或,当L<sub>1</sub>的结构如式III所示时,所述的L<sub>2</sub>优选为  ;



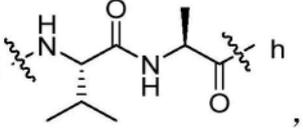
和/或,当L<sub>1</sub>的结构如式IV所示时,所述的L<sub>2</sub>优选为  或

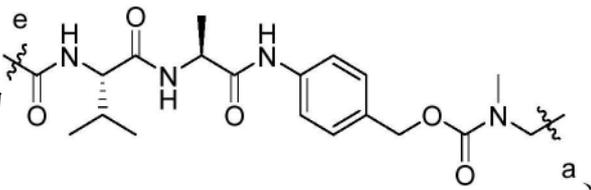


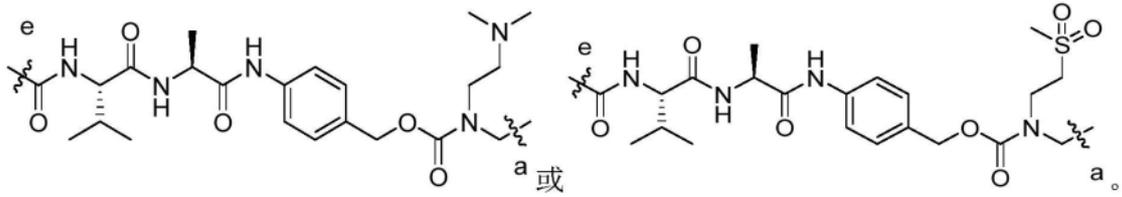
和/或,所述n独立地为8、9、10、11和12;  
和/或,所述的m为2~8的整数或非整数;

和/或,所述的L<sub>3</sub>优选为  .

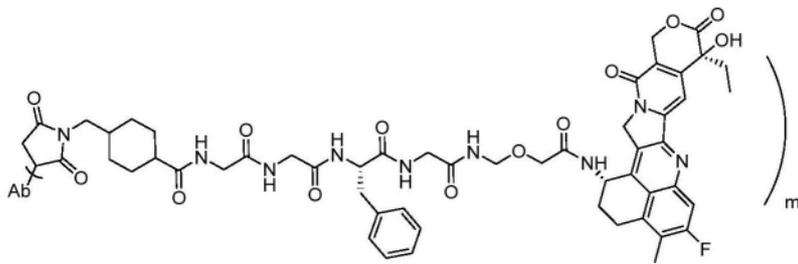
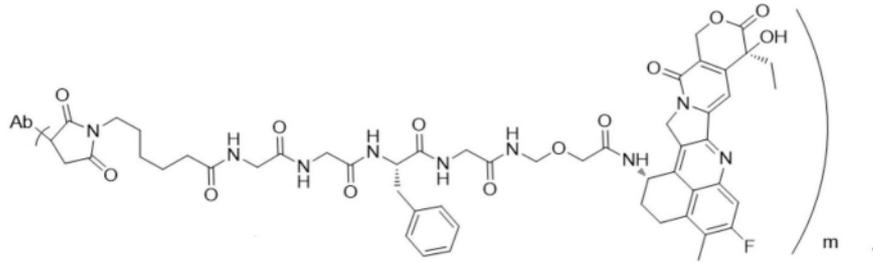
10. 如权利要求8或9所述的抗体药物偶联物,其特征在于,  
所述抗DLL3抗体结合于DLL3蛋白中EGF2结构域的抗原结合表位;

和/或,所述的(L)<sub>p</sub>为  , 其中g端通过羰基和所述的L<sub>2</sub>的c端相连;

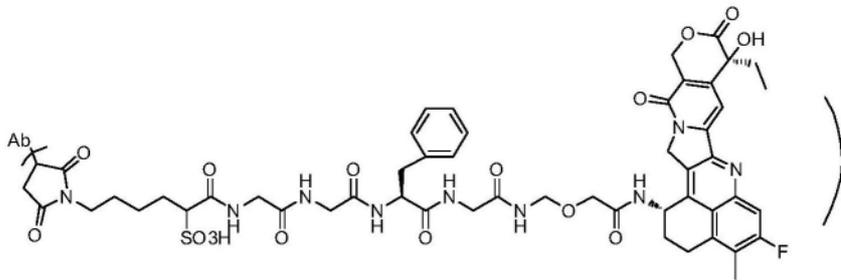
和/或,所述的式III优选为  ,



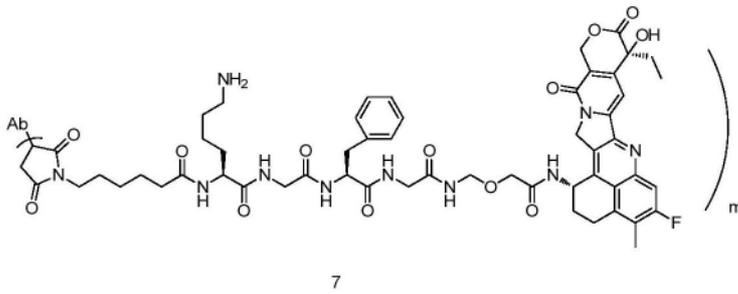
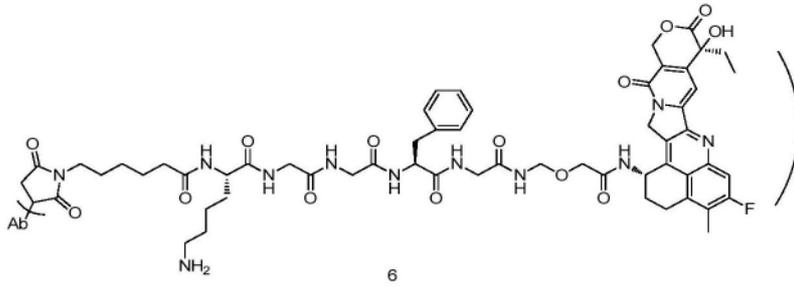
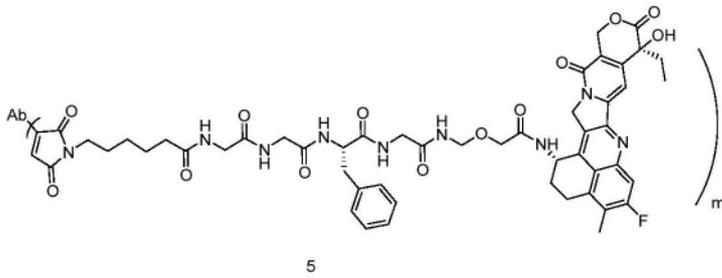
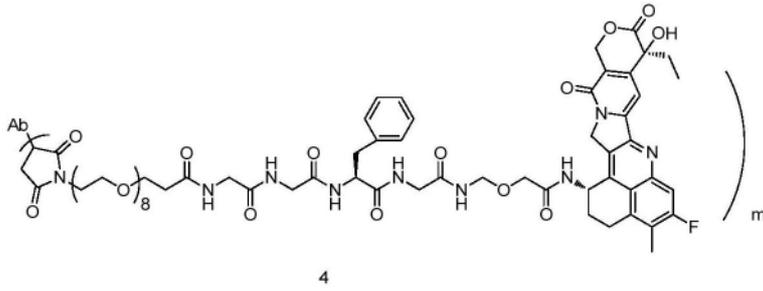
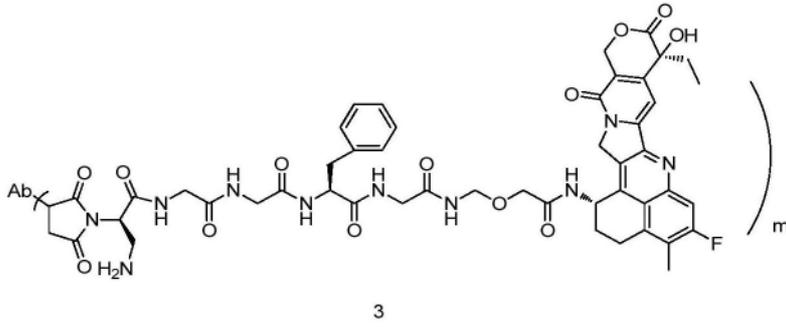
11. 如权利要求8所述的抗体药物偶联物,所述的抗体药物偶联物为如下所示的任一化合物:

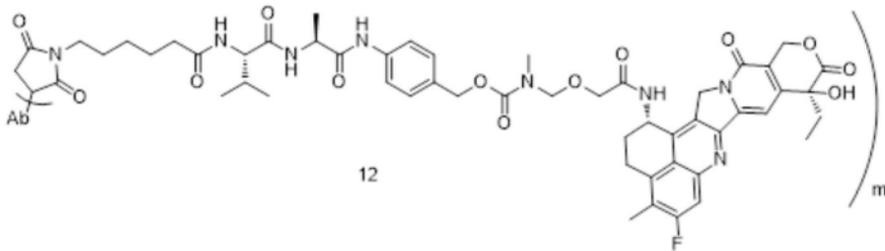
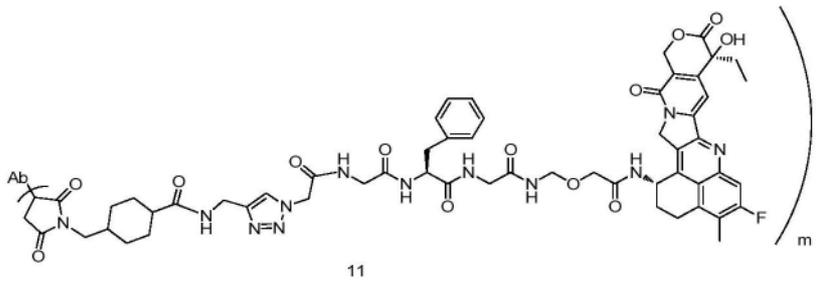
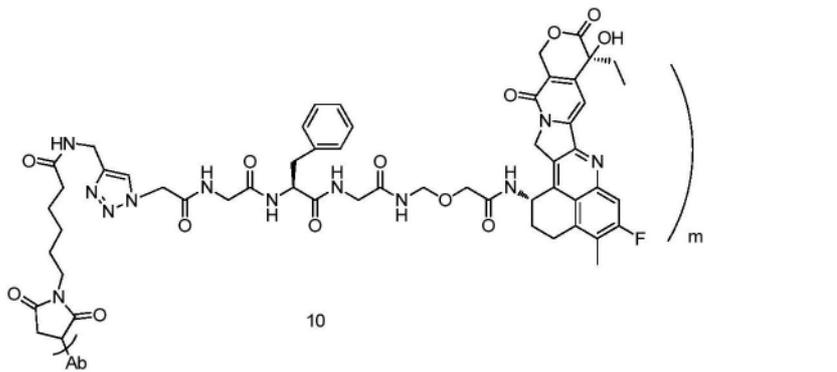
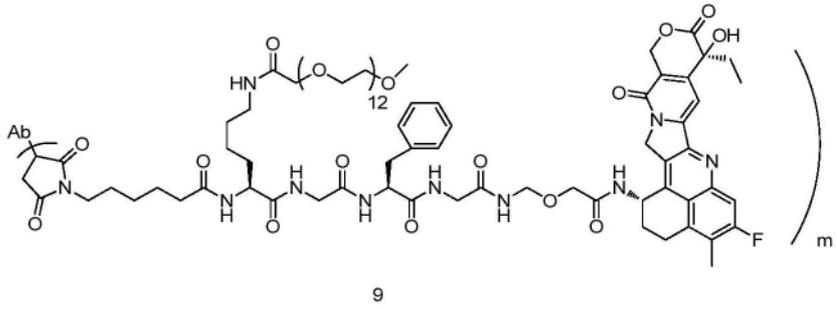
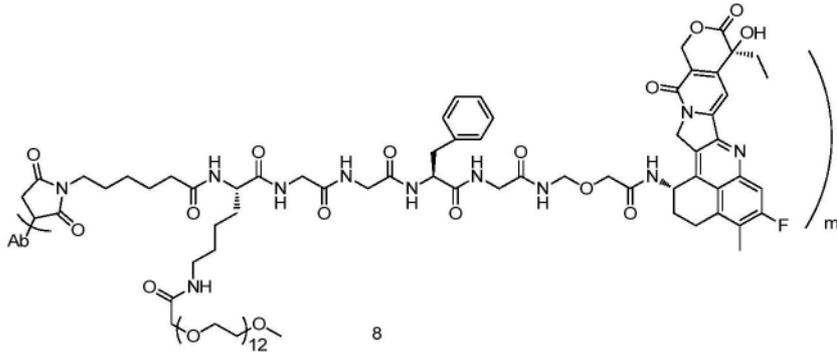


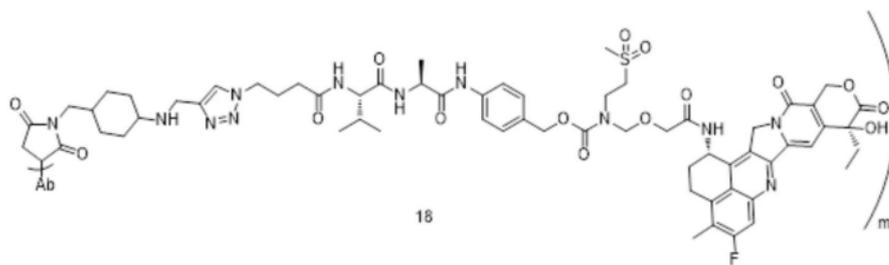
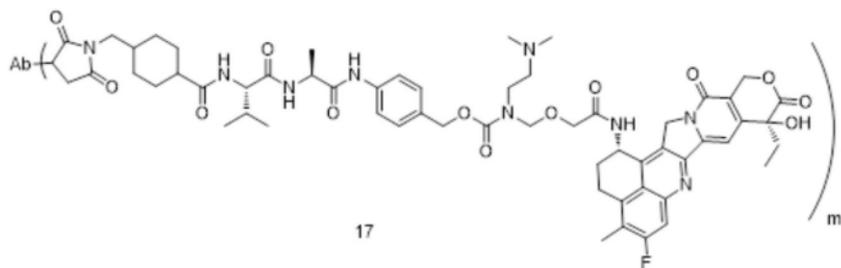
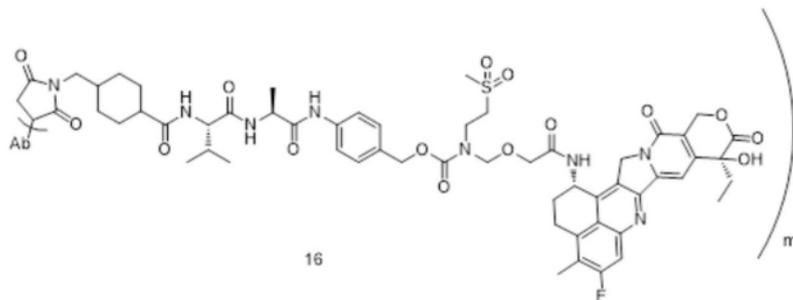
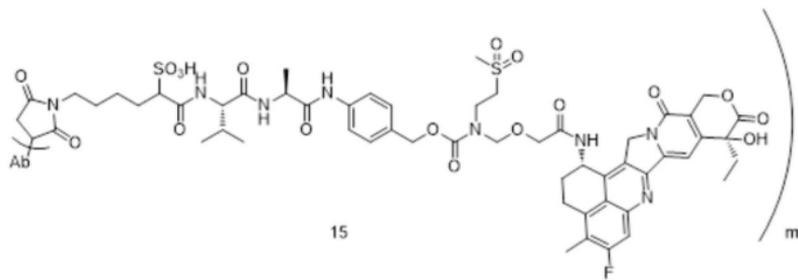
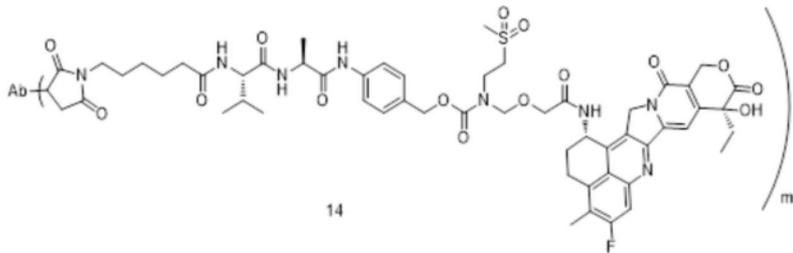
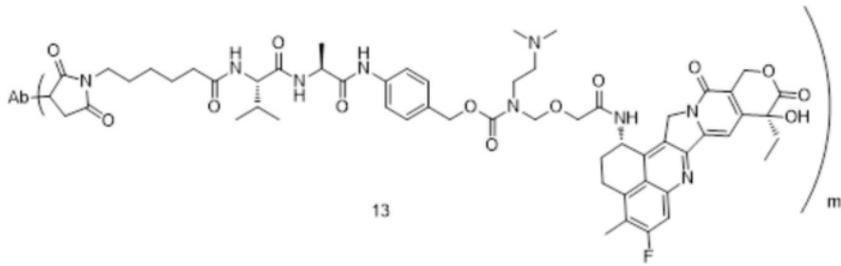
1

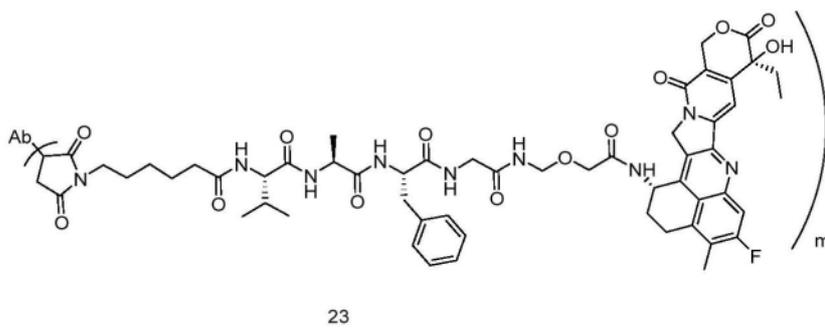
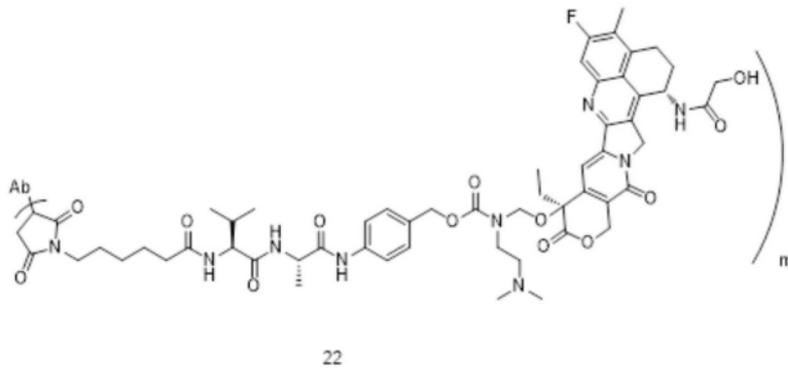
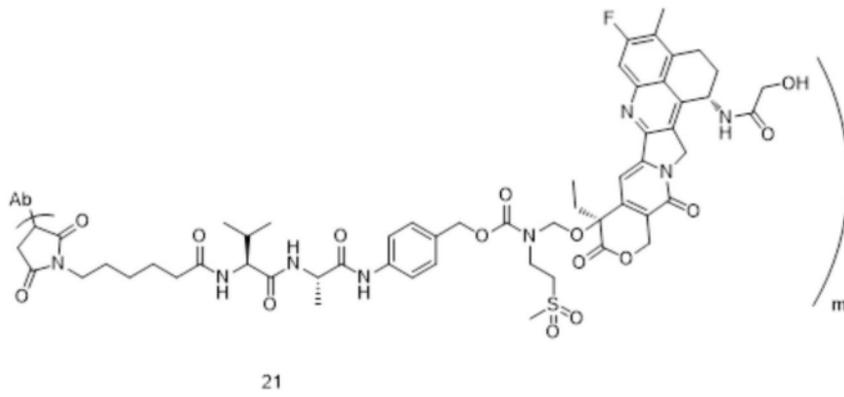
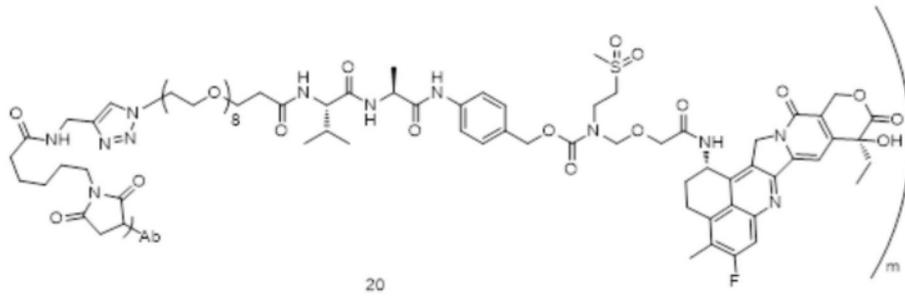
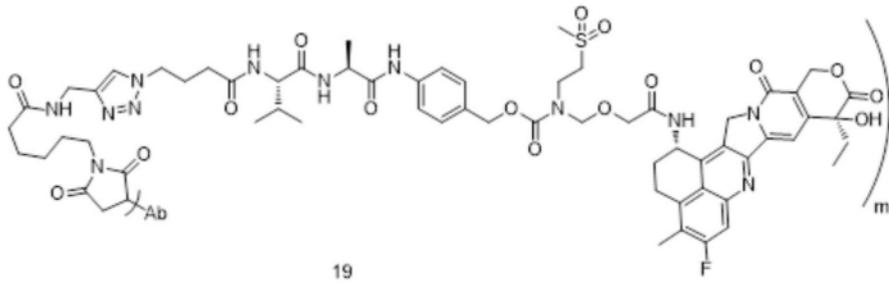


2

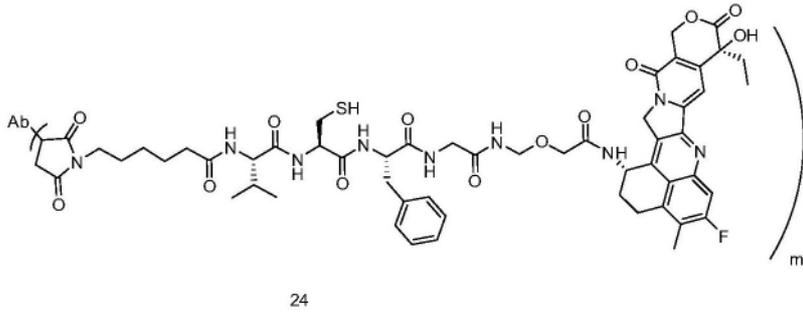








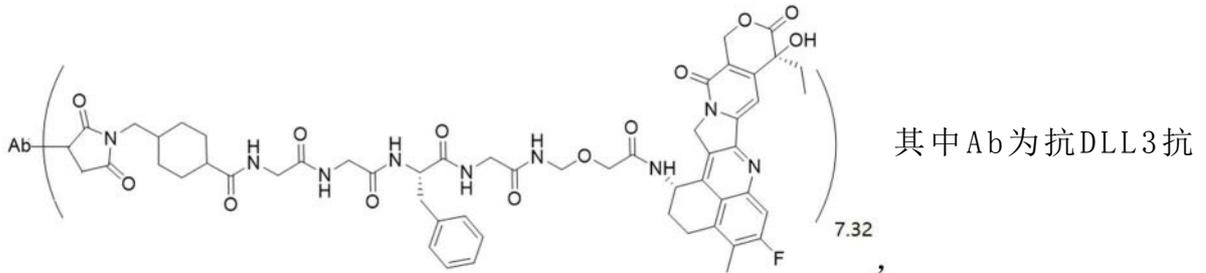
或



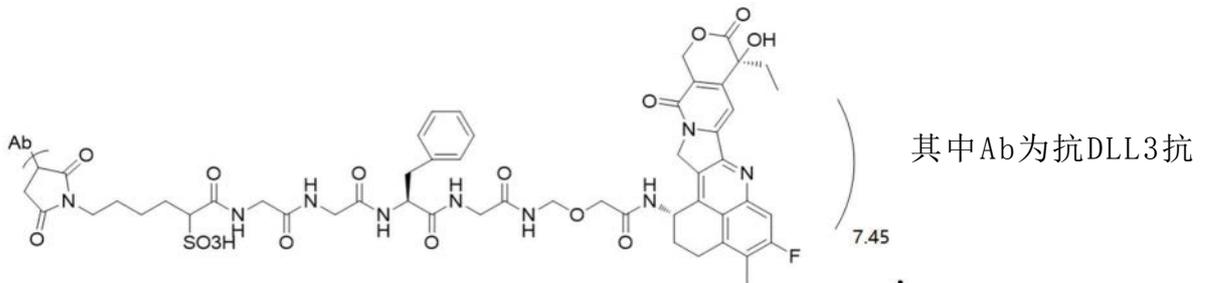
所述Ab为抗DLL3抗体,所述抗DLL3抗体为如权利要求1-4任一项所述的抗DLL3抗体、具有氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的轻链和氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的重链的抗DLL3抗体、或具有氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的轻链和氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的重链的抗DLL3抗体;

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;

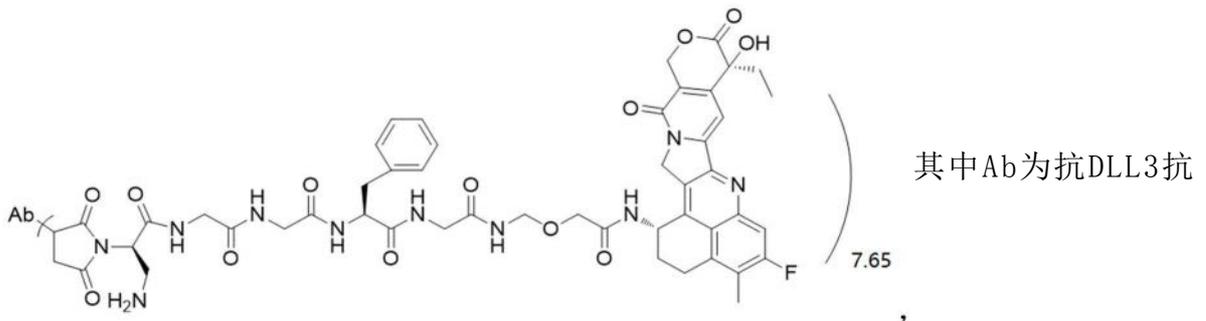
优选地,所述的抗体偶联药物为如下所示的任一化合物:



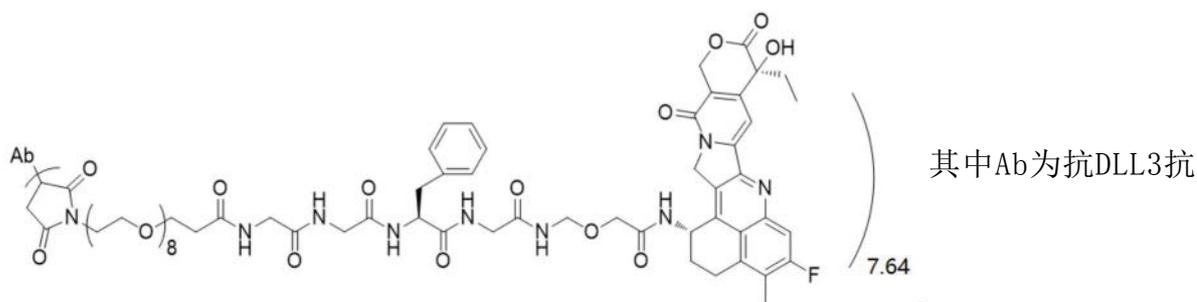
体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、



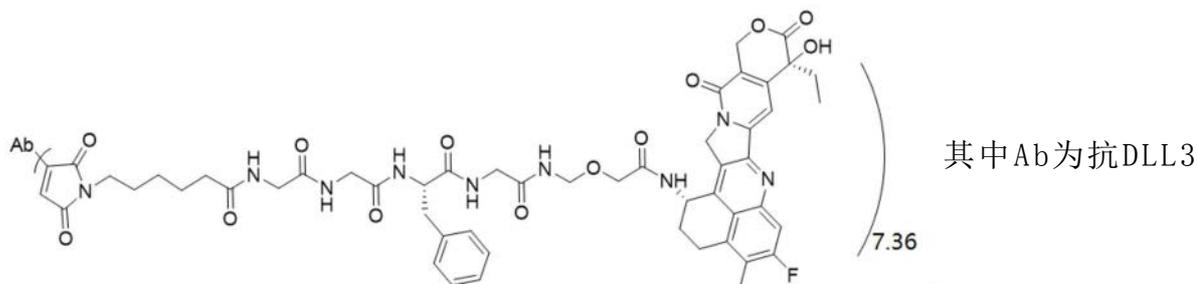
体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、



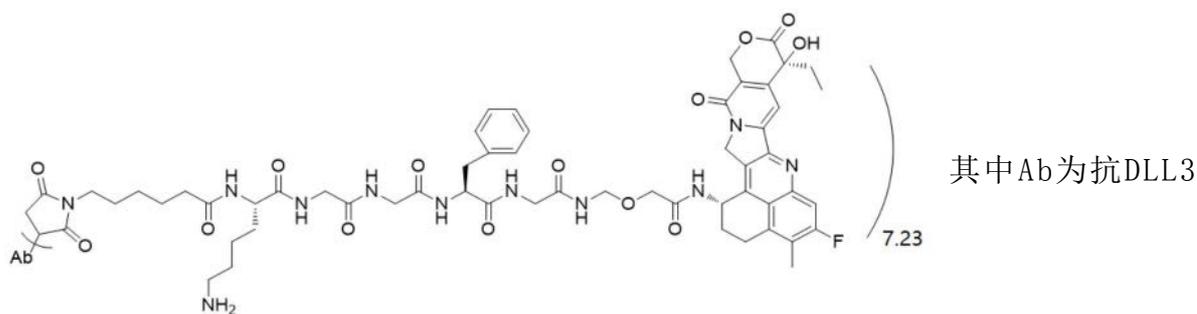
体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、



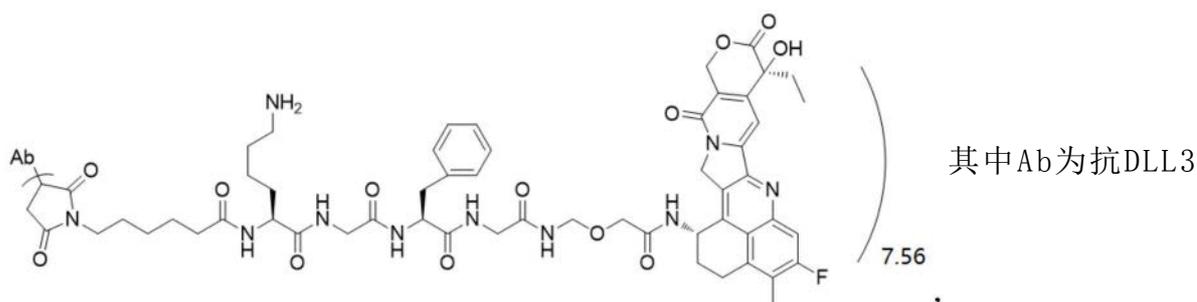
体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、



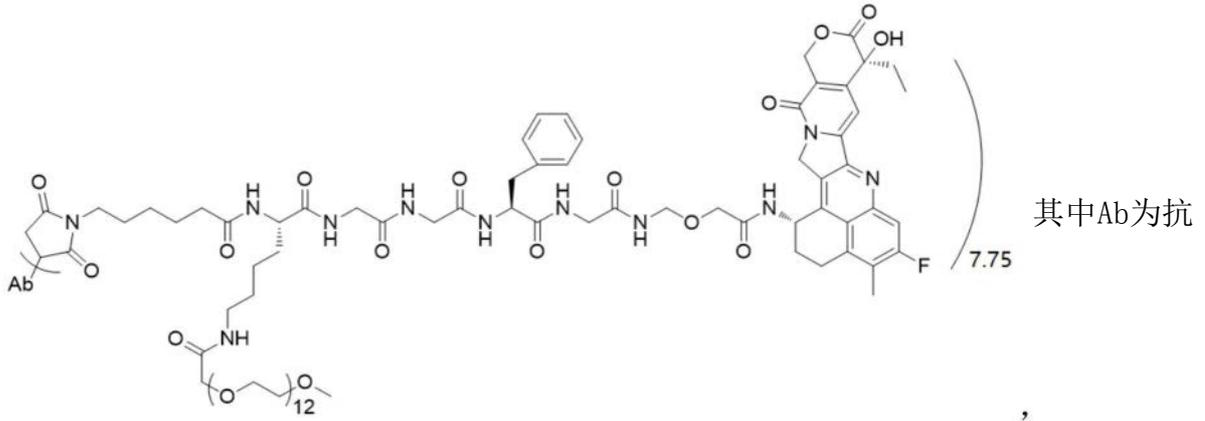
抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、



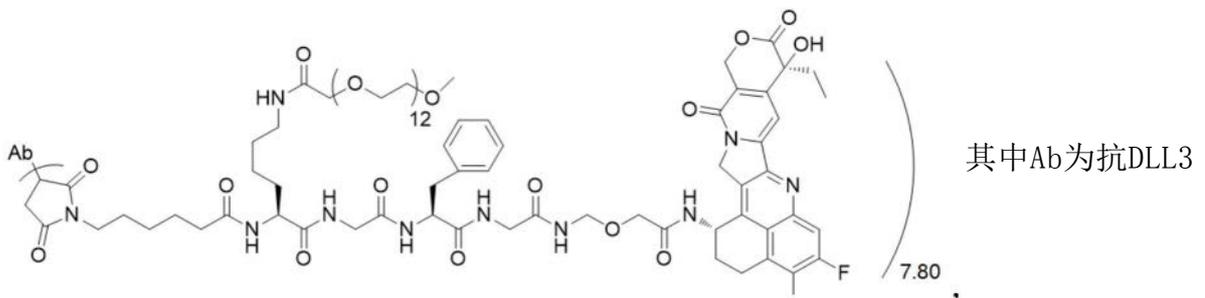
抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、



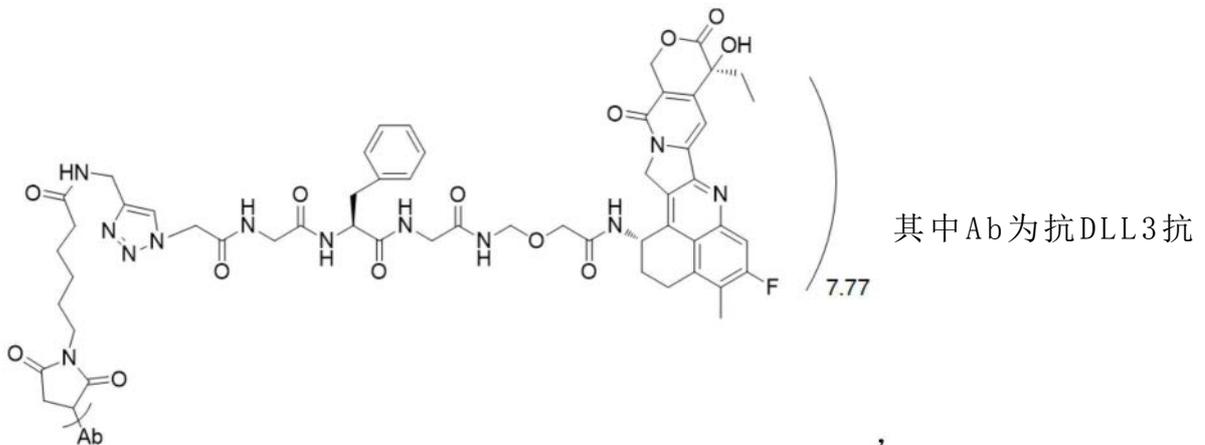
抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、



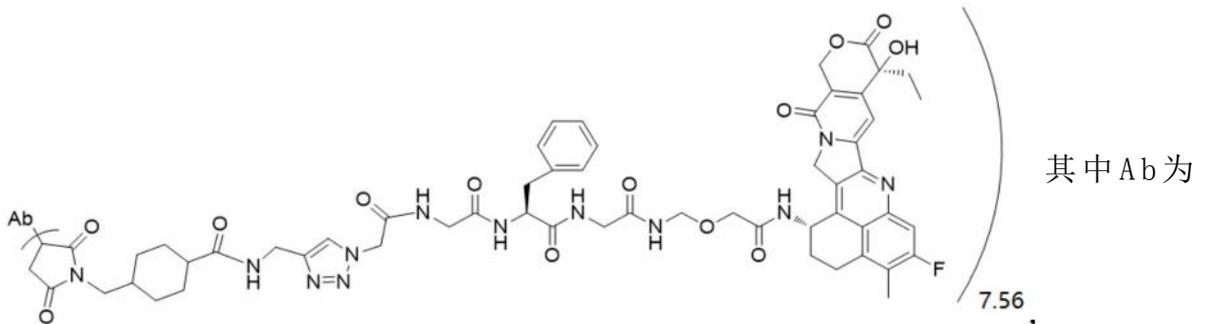
DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、



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、

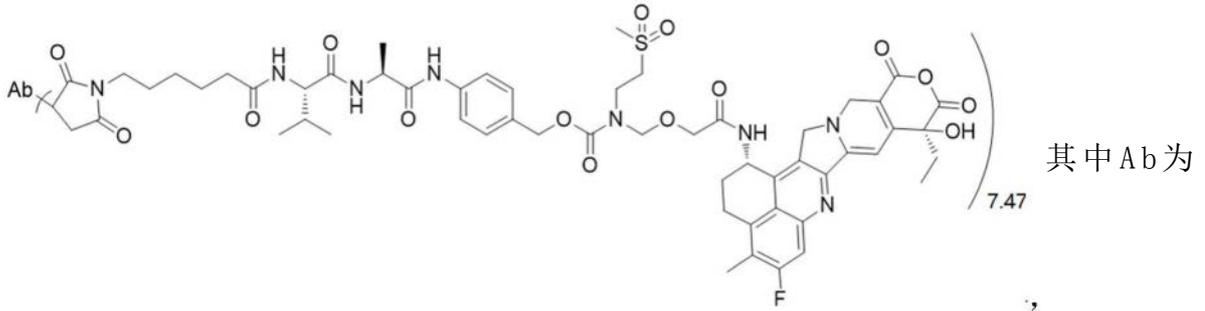


体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、

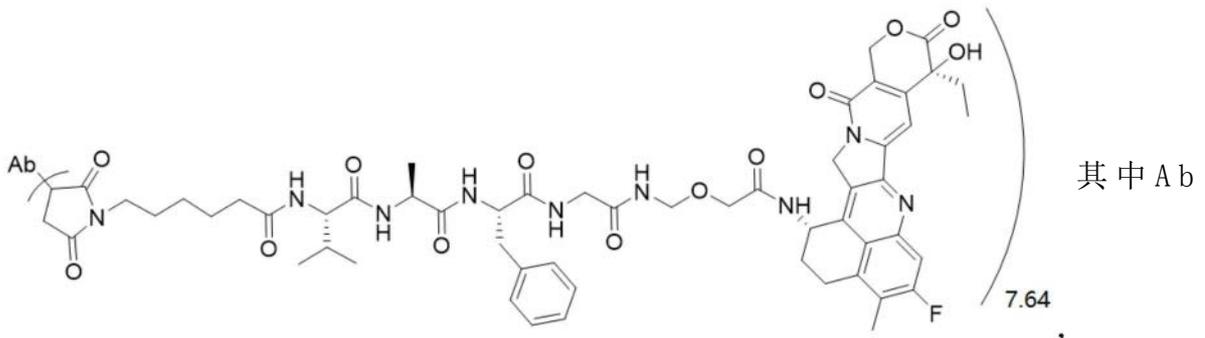


抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所

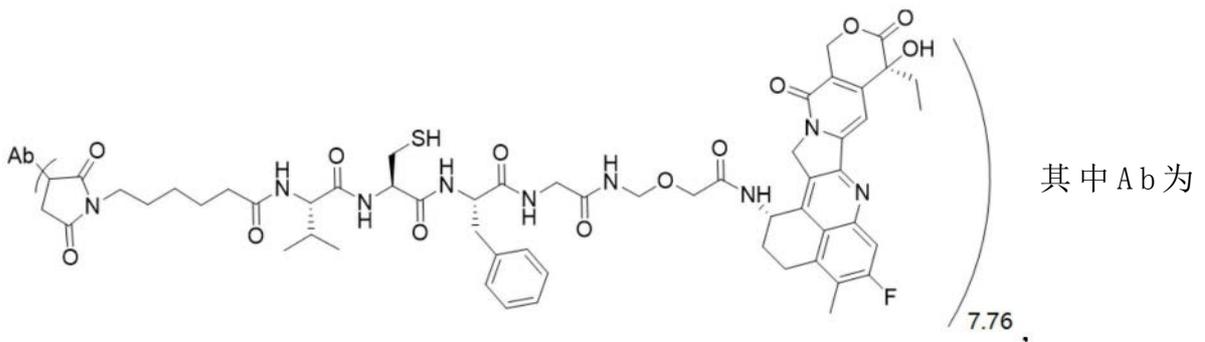
示的VL、



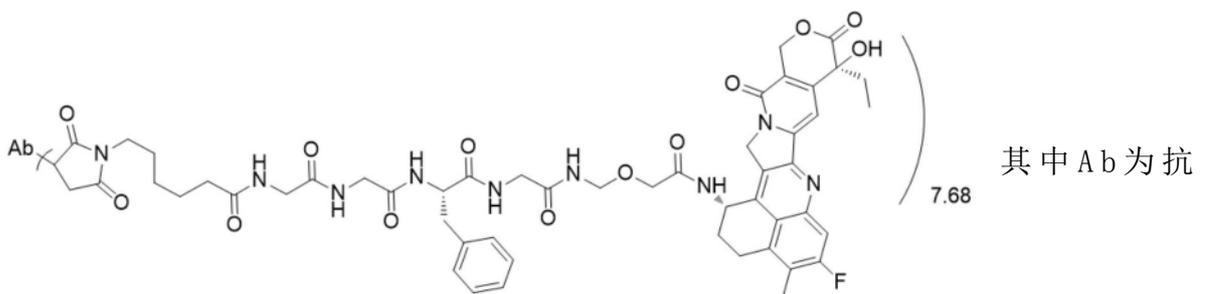
抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、



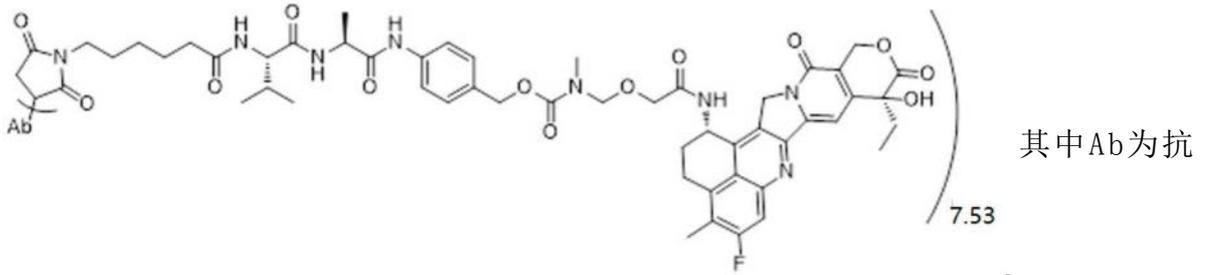
为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、



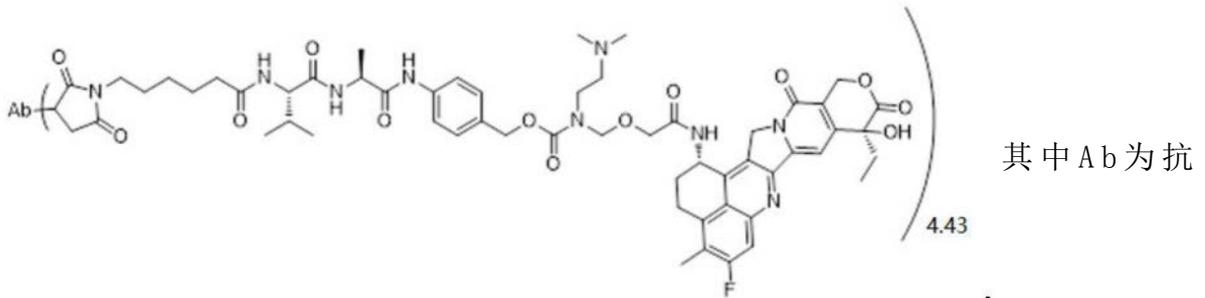
抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL、



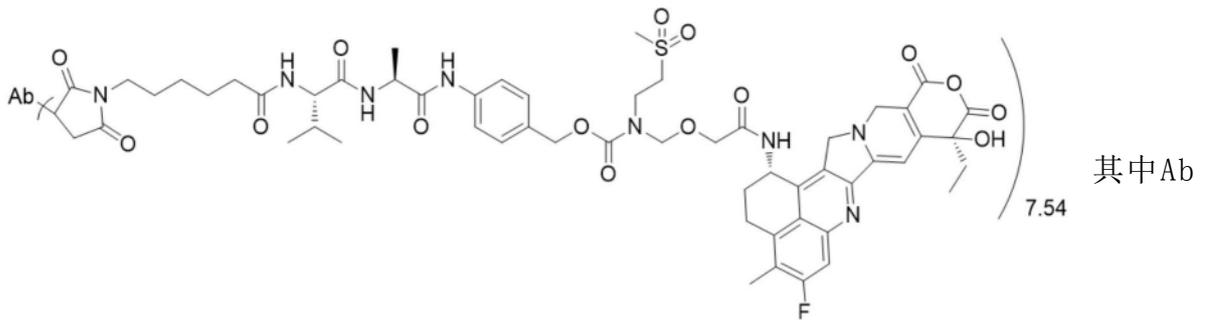
DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



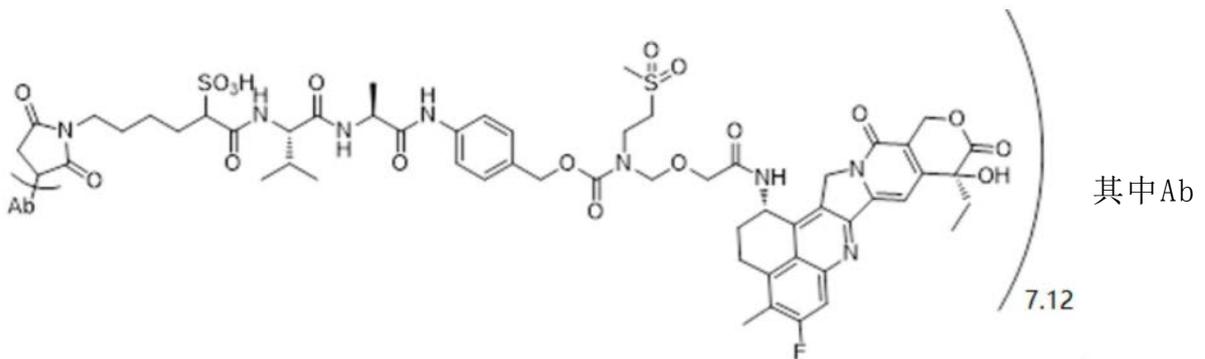
DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



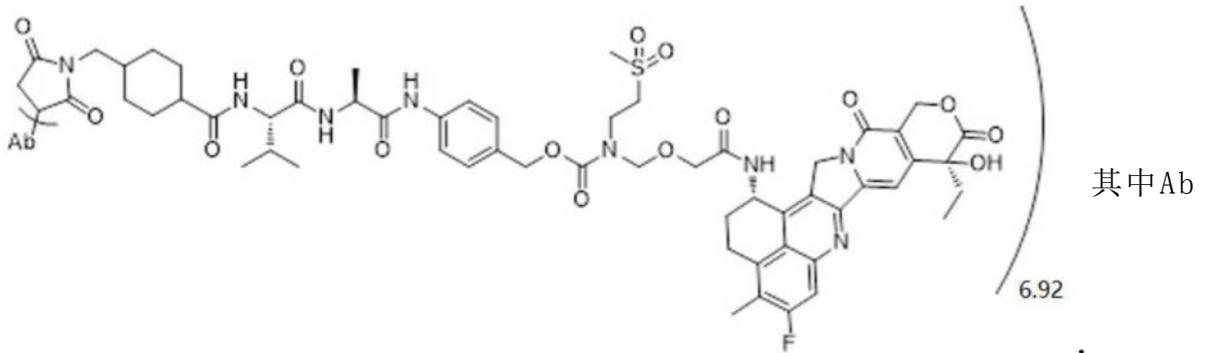
DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



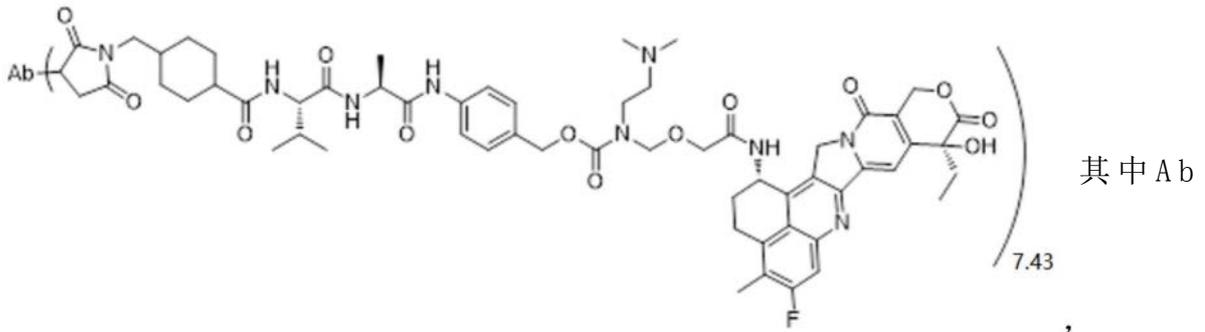
为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



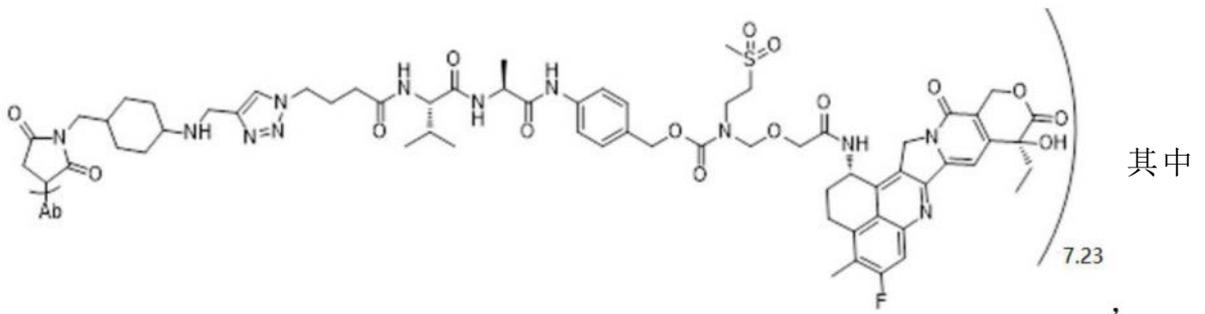
为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



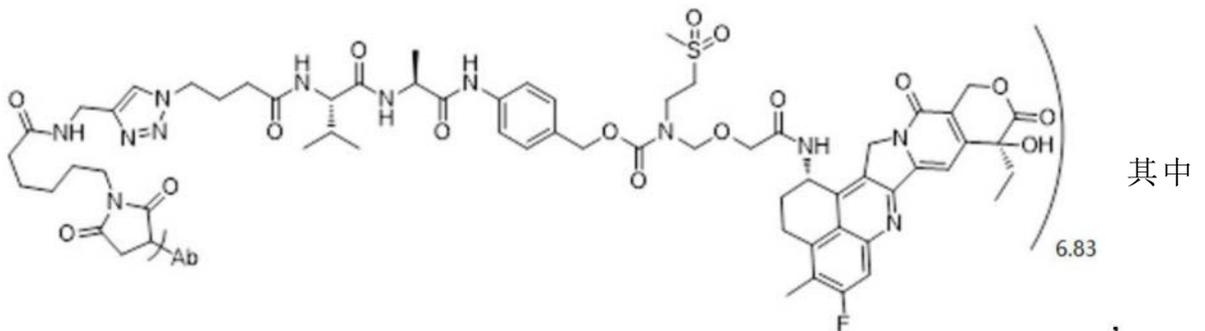
为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



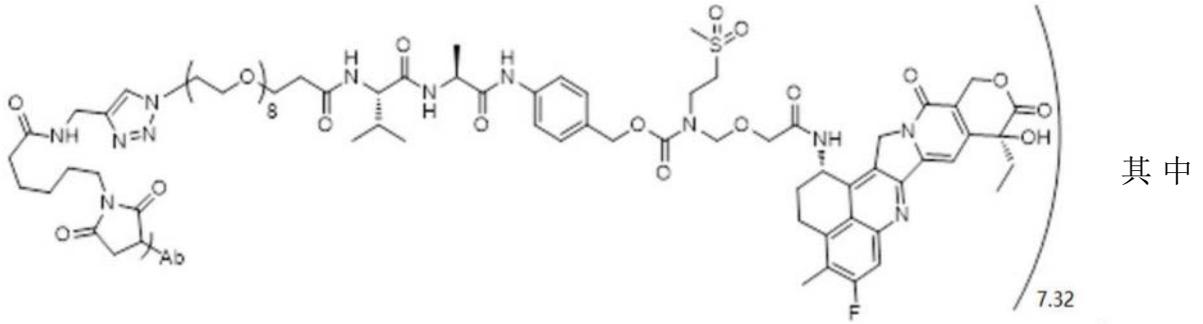
为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



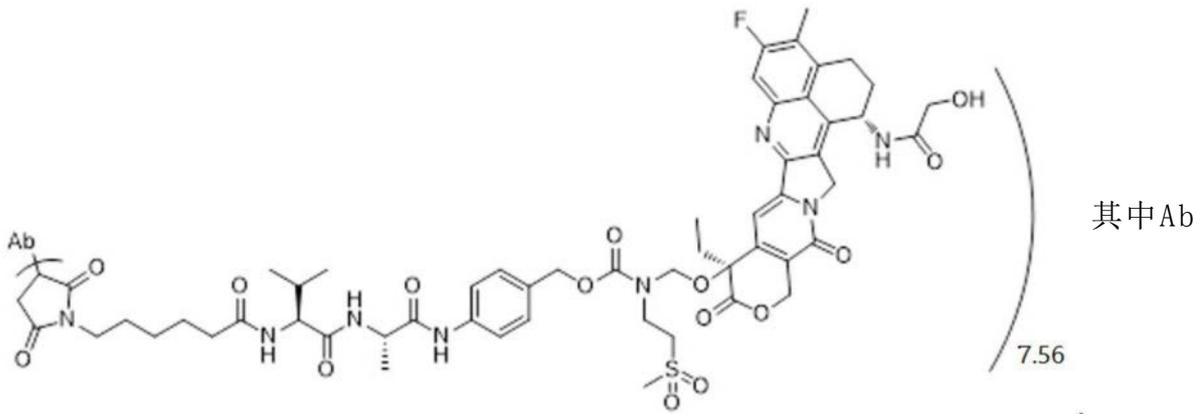
Ab为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



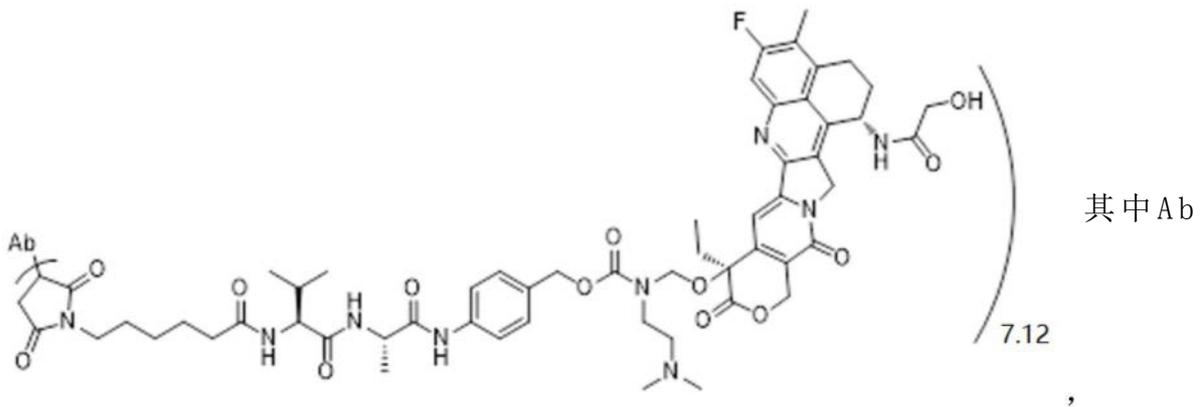
Ab为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



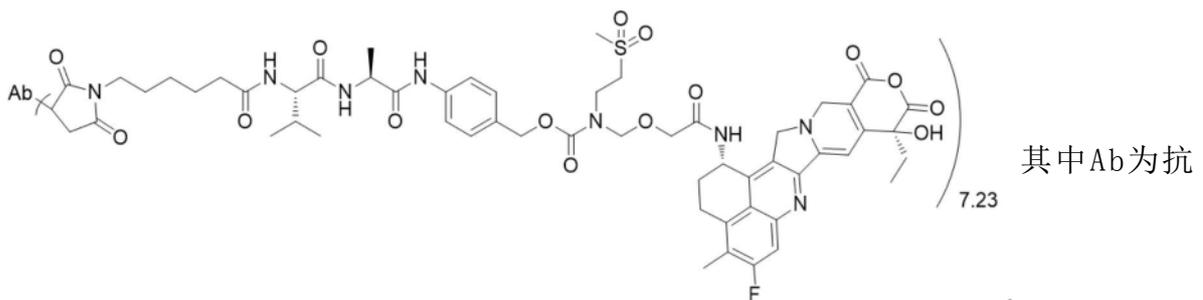
Ab为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



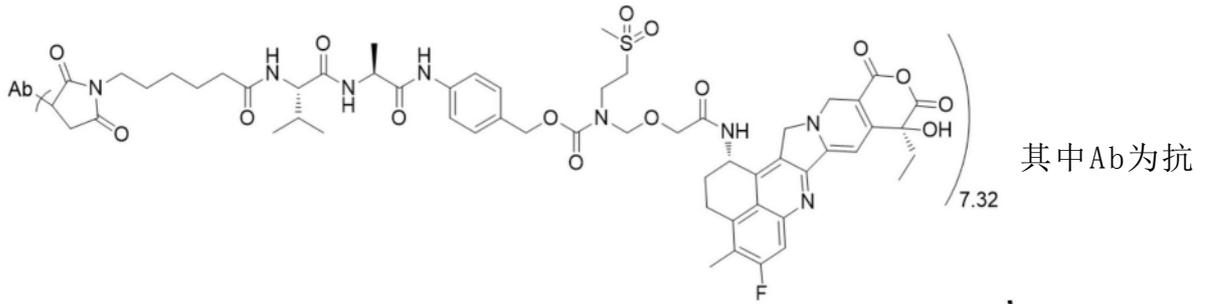
为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



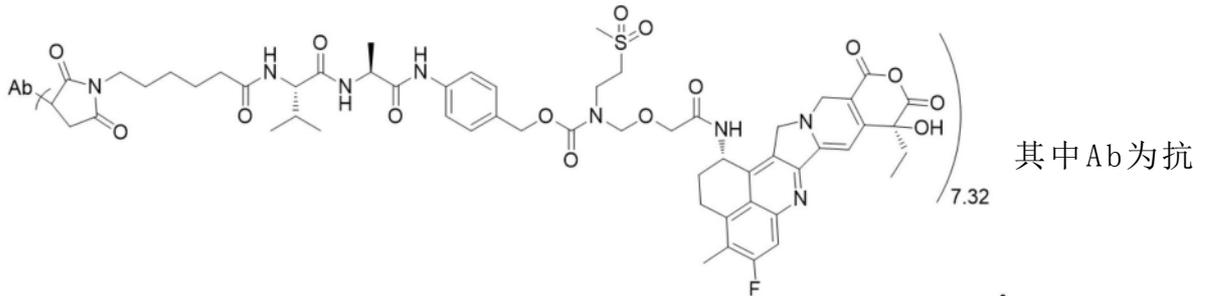
为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、



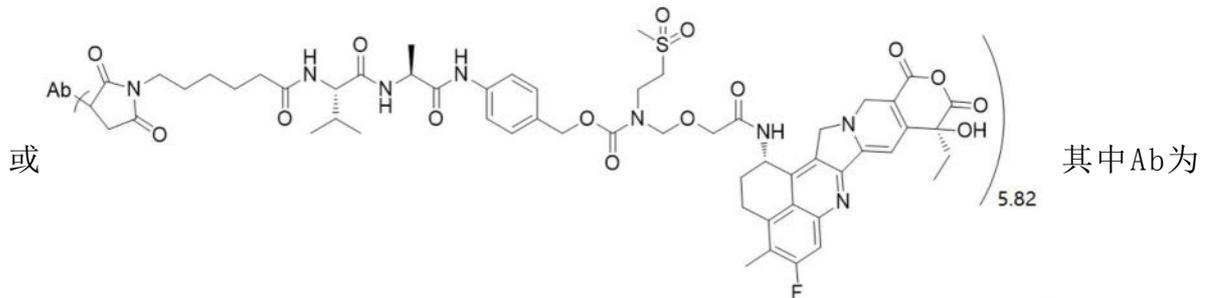
DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的轻链、



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、



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



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。

12. 一种嵌合抗原受体,其包含如权利要求1-4任一项所述的抗DLL3抗体。

13. 一种基因修饰的细胞,其特征在于,其包含如权利要求1-4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。

14. 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7所述的转化体,从培养物中获得抗DLL3抗体。

15. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-4任一项所述的抗DLL3抗体、如权利要求8-11任一项所述的抗体药物偶联物、如权利要求12所述的嵌合抗原受体、和/或如权利要求13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。

16. 如权利要求1-4任一项所述的抗DLL3抗体、如权利要求8-11任一项所述的抗体药物偶联物、如权利要求12所述的嵌合抗原受体、如权利要求13所述的基因修饰的细胞和/或如权利要求15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。

17. 一种试剂盒，其包括如权利要求1-4任一项所述的抗DLL3抗体、如权利要求8-11任一项所述的抗体药物偶联物、如权利要求12所述的嵌合抗原受体、如权利要求13所述的基因修饰的细胞和/或如权利要求15所述的药物组合物；以及任选地，说明书。

18. 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15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。

19. 一种检测DLL3的方法，其特征在于，其包括使用如权利要求1-4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。

## 一种抗DLL3抗体及其制备方法、其药物偶联物和应用

[0001] 本申请要求申请日为2021年7月30日的中国专利申请CN2021108755368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

[0002] 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

[0003] 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。

[0004] 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。

[0005] 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

[0006] 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。

[0007] 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,  
[0008] 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;

[0009] 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;

[0010] 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。

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 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。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 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,贝塞斯达,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。

[0021] 优选地,所述的抗DLL3抗体为全长抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、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。

[0022] 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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 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。

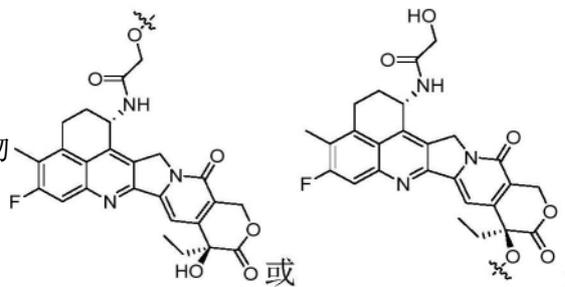
[0028] 本发明某一方面还提供了一种重组表达载体,其包含如上所述的分离的核酸。优选地,所述表达载体包含真核细胞表达载体和/或原核细胞表达载体。

[0029] 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。

[0030] 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-(L<sub>3</sub>-L<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-D)<sub>m</sub>;

[0031] 其中,Ab为抗DLL3抗体;

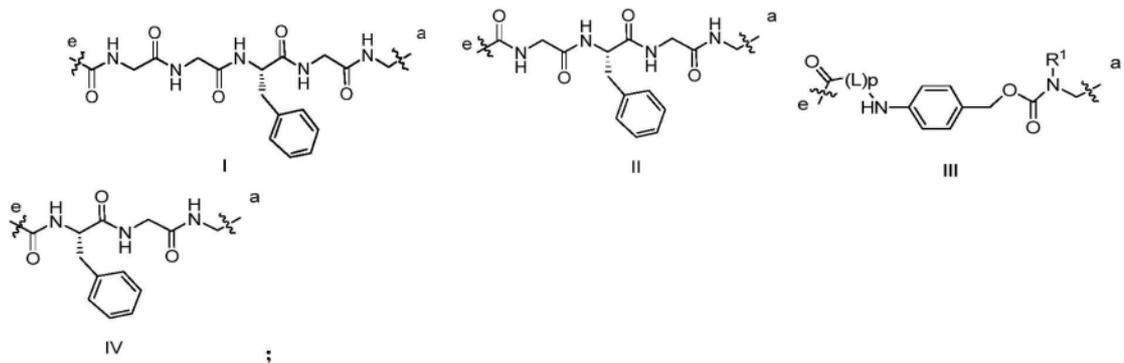
[0032] D为细胞毒性药物



[0033] m为2~8;

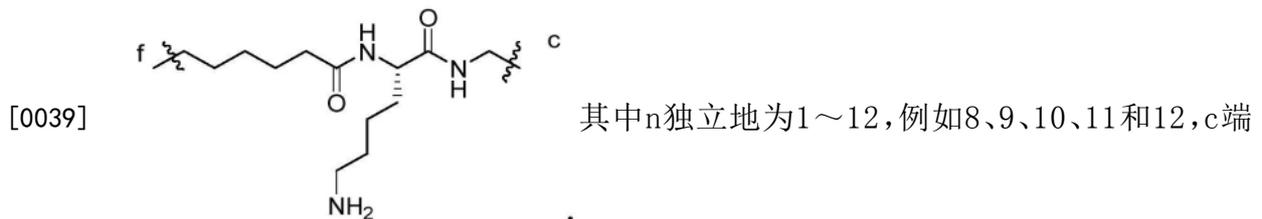
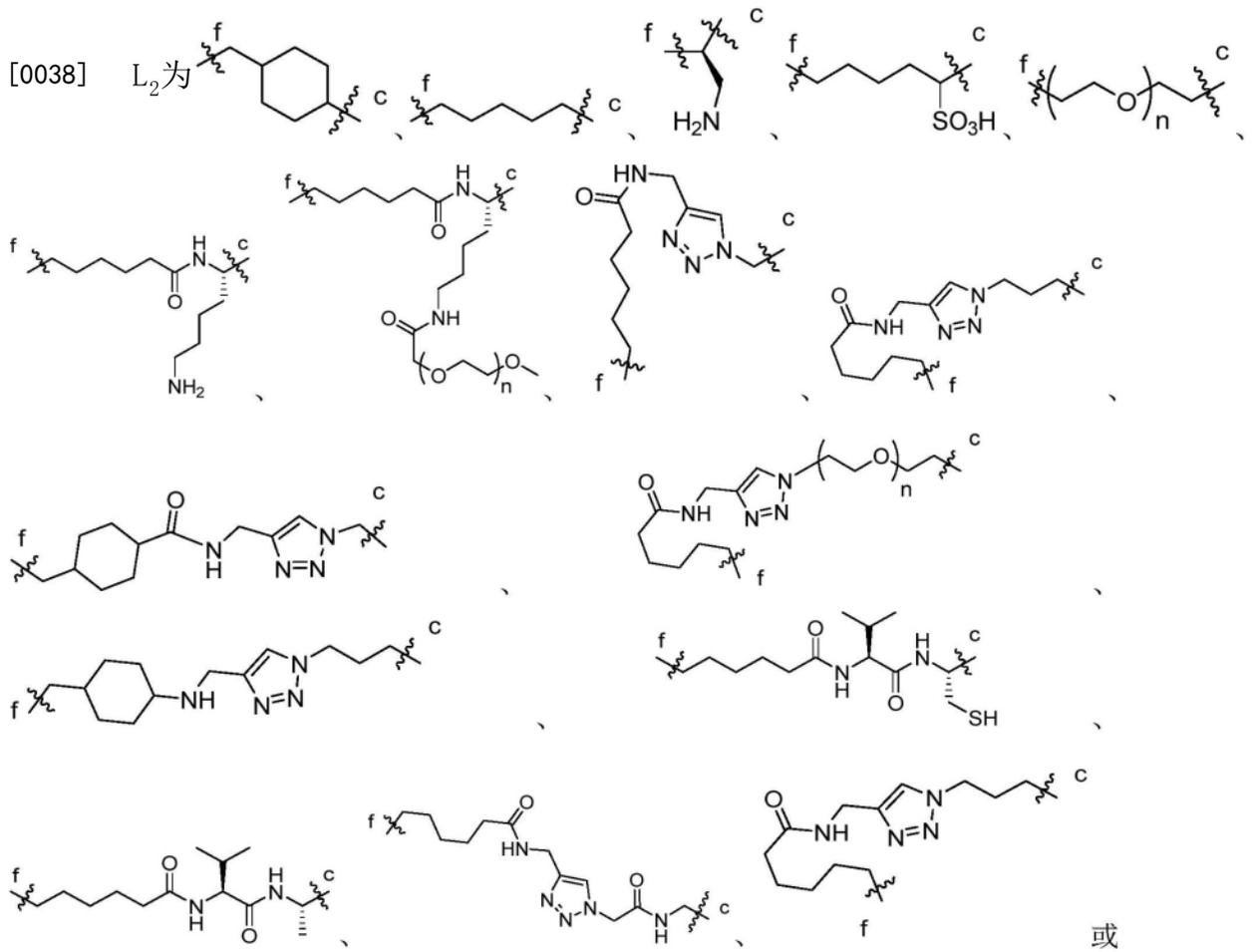
[0034] L<sub>1</sub>的结构如式I、II、III或IV所示,其a端与所述的细胞毒性药物相连,e端和与所述的L<sub>2</sub>的c端相连;

[0035]

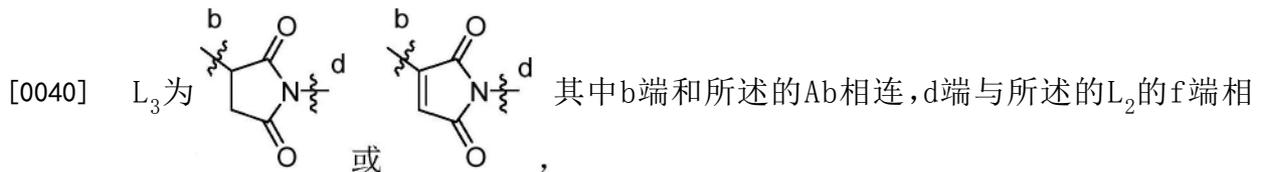


[0036] (L)<sub>p</sub>中,L独立地为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基、谷氨酸残基、天冬氨酸残基、半胱氨酸残基、谷氨酸残基、组氨酸残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、甲硫氨酸残基、脯氨酸残基、丝氨酸残基、苏氨酸残基、色氨酸残基、酪氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种;p为2-4;

[0037] R<sup>1</sup>为被一个或多个-NR<sup>1-1</sup>R<sup>1-2</sup>取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、被一个或多个R<sup>1-3</sup>S(O)<sub>2</sub>取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、C<sub>3</sub>~C<sub>10</sub>环烷基、C<sub>6</sub>~C<sub>14</sub>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R<sup>1-1</sup>、R<sup>1-2</sup>和R<sup>1-3</sup>分别独立地为C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基;



通过羰基与 $L_1$ 相连, f端与所述的 $L_3$ 的d端相连;



连。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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。

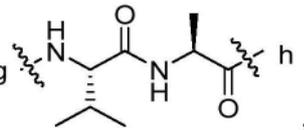
[0044] 在某一优选实施方案中, 所述抗DLL3抗体包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL、或包含氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示的VH和

氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示的VL。

[0045] 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。

[0046] 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。

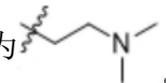
[0047] 在某一较佳实施方案中,所述的L为缬氨酸残基和/或丙氨酸残基,所述的多种为

两种或三种,所述的p为2。更佳地,所述的(L)<sub>p</sub>为g , 其中g端通过羰基

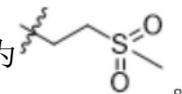
和所述的L<sub>2</sub>的c端相连。

[0048] 在某一优选实施方案中,所述的R<sup>1</sup>为被一个或多个-NR<sup>1-1</sup>R<sup>1-2</sup>取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、被一个或多个R<sup>1-3</sup>S(O)<sub>2</sub>-取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、或C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基,所述的R<sup>1-1</sup>、R<sup>1-2</sup>和R<sup>1-3</sup>分别独立地为C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>烷基。

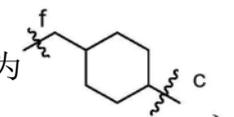
[0049] 在某一优选实施方案中,当所述的R<sup>1</sup>为被一个或多个-NR<sup>1-1</sup>R<sup>1-2</sup>取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基时,所述的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基为C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>烷基,优选为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基,优选为乙基;所述的多个优选为两个或三个。更佳地,所述的R<sup>1-1</sup>和R<sup>1-2</sup>各自独立地为C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>烷基,优选为甲基、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-NR<sup>1-1</sup>R<sup>1-2</sup>为-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。进一步更佳地,当所述的R<sup>1</sup>为被一个-NR<sup>1-1</sup>R<sup>1-2</sup>取代的

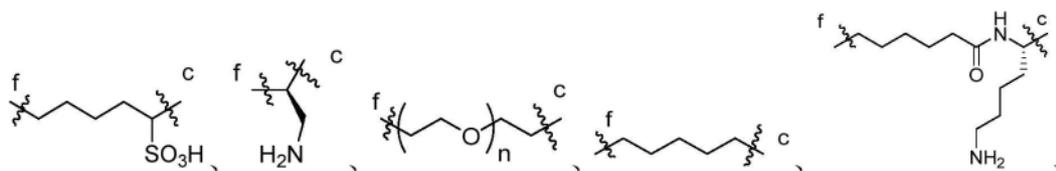
C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基时,所述的被一个-NR<sup>1-1</sup>R<sup>1-2</sup>取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基为 。

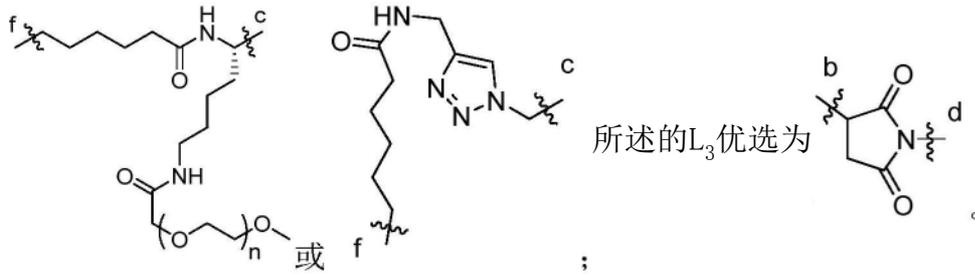
[0050] 在某一优选实施方案中,当所述的R<sup>1</sup>为被一个或多个R<sup>1-3</sup>S(O)<sub>2</sub>-取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基时,所述的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基为C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>烷基,优选为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基,进一步优选为乙基;所述的多个优选为两个或三个。更佳地,所述的R<sup>1-3</sup>为C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>烷基,优选为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基,更优选为甲基。更佳地,当所述的R<sup>1</sup>为被一个R<sup>1-3</sup>S(O)<sub>2</sub>-取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基时,所述的被一个R<sup>1-3</sup>S(O)<sub>2</sub>-取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基为

基为 。

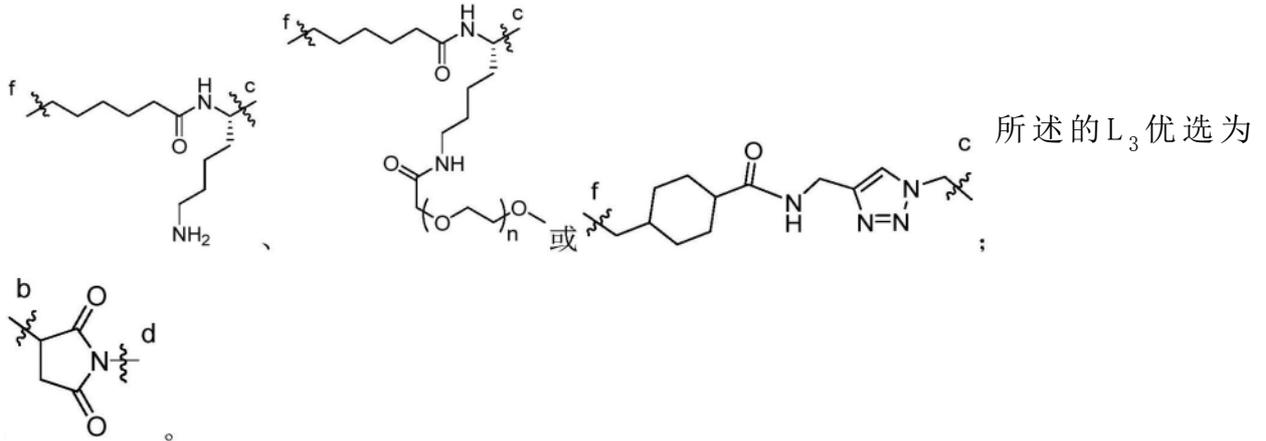
[0051] 在某一优选实施方案中,当所述的R<sup>1</sup>为C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基时,所述的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基为C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>烷基,更优选为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基,进一步优选为甲基。

[0052] 在某一优选实施方案中,当L<sub>1</sub>的结构如式I所示时,所述的L<sub>2</sub>优选为 ,

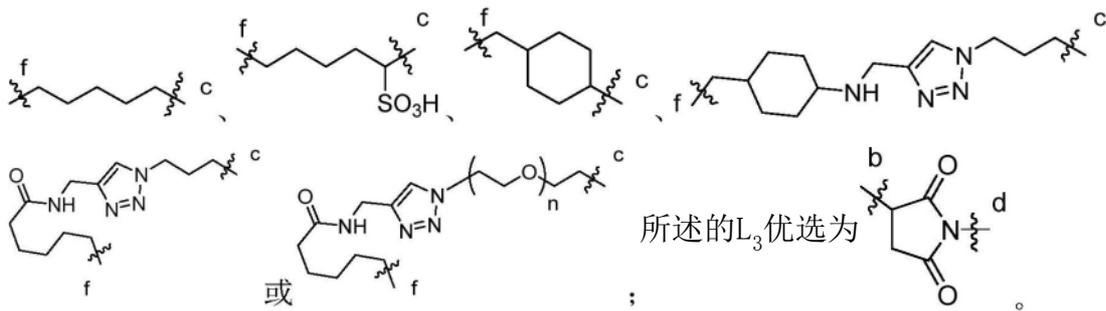




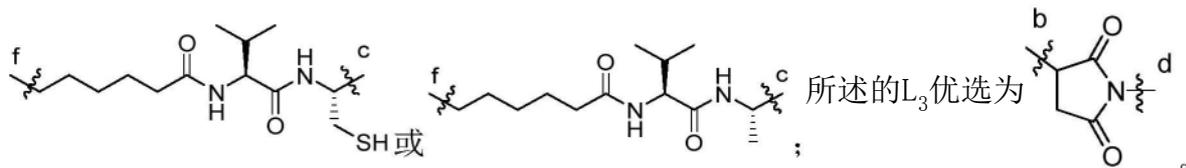
[0053] 在某一优选实施方案中,当L<sub>1</sub>的结构如式II所示时,所述的L<sub>2</sub>优选为



[0054] 在本发明一优选实施方案中,当L<sub>1</sub>的结构如式III所示时,所述的L<sub>2</sub>优选为

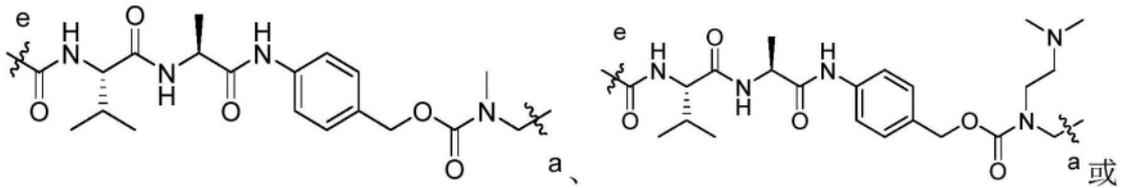


[0055] 在本发明一优选实施方案中,当L<sub>1</sub>的结构如式IV所示时,所述的L<sub>2</sub>优选为

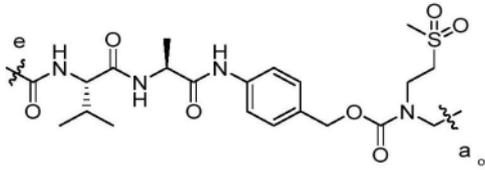


[0056] 在某一优选实施方案中,L<sub>1</sub>的结构优选为如式I或III所示。

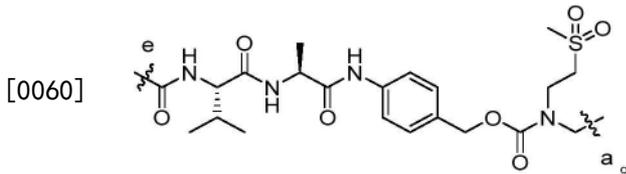
[0057] 在某一优选实施方案中,所述的式III优选为

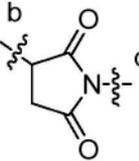
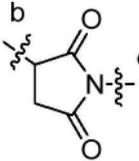


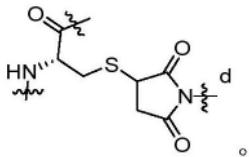
[0058]



[0059] 在某一优选实施方案中,所述的式III进一步优选为

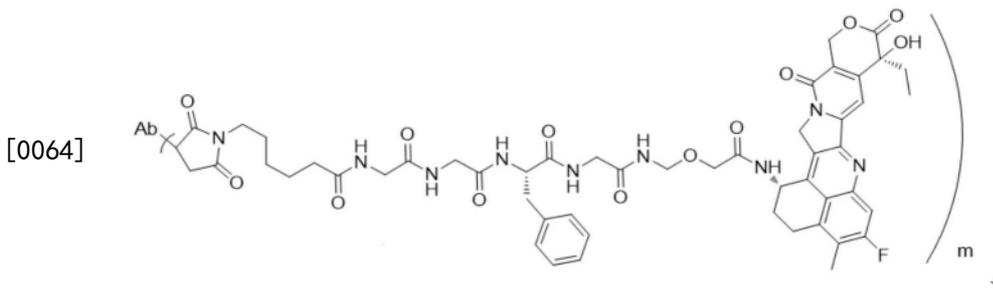


[0061] 在某一优选实施方案中,所述的L<sub>3</sub>的b端优选为和所述的抗体上巯基以硫醚键的形式相连。以  为例,  与所述的抗体中的半胱氨酸残基的连接形式为

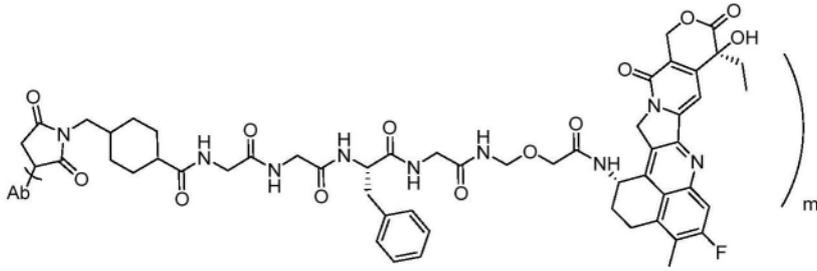


[0062] 在某一优选实施方案中,所述的m为2~8的整数,例如,2、3、4、5、6、7、8,或非整数,例如:7.68、7.53、4.43、7.12、6.92、7.43、7.23、6.83、7.32、7.56、7.54、7.47、5.82、6.78、2.28、6.32、7.45、7.65、7.64、7.36、7.75、7.80、7.77或7.76。

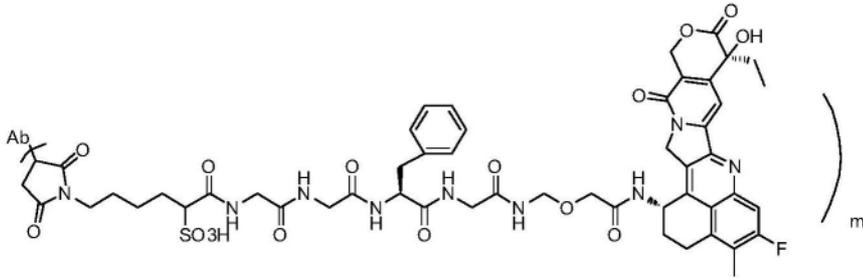
[0063] 优选地,所述的抗体药物偶联物为如下所示的任一化合物:



[0064]

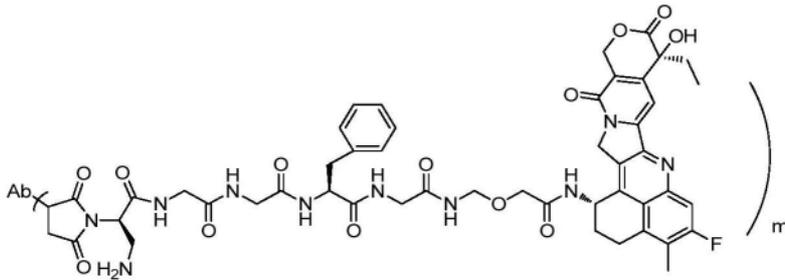


1

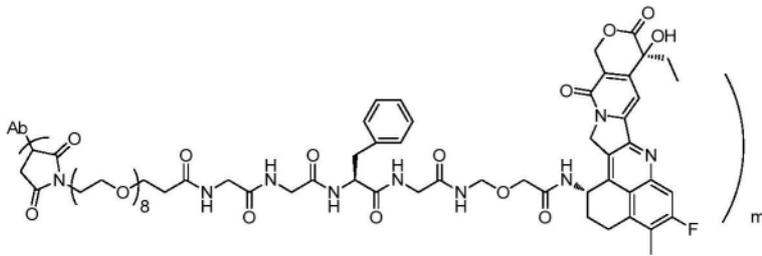


2

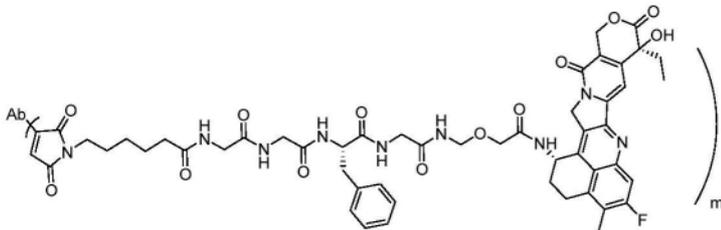
[0065]



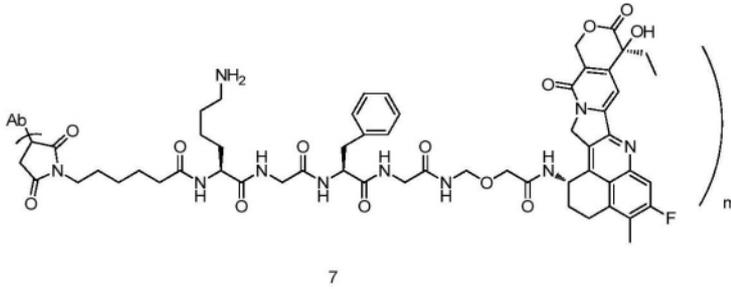
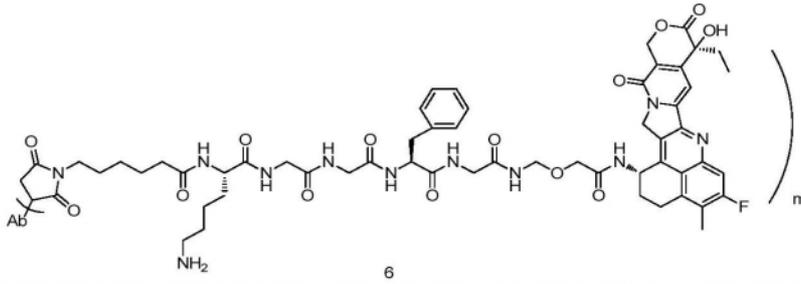
3



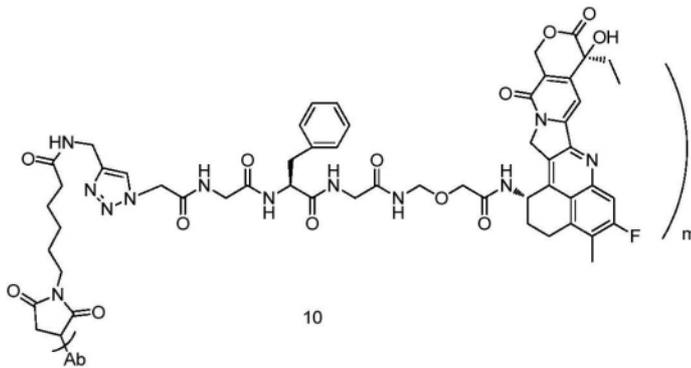
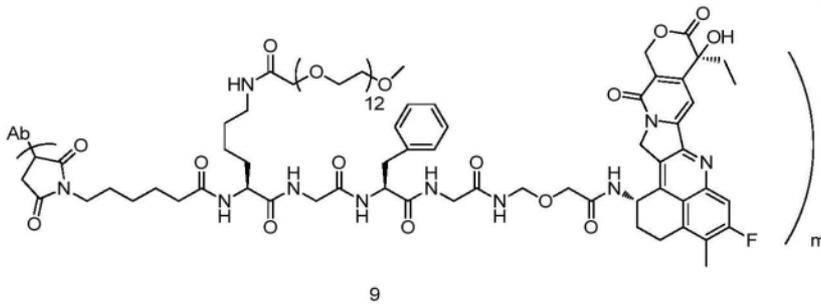
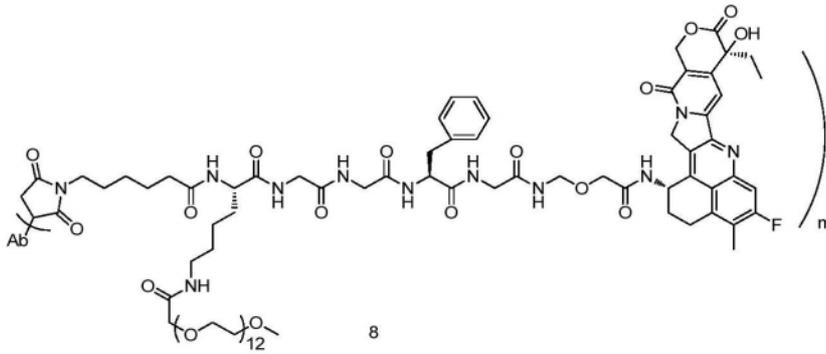
4

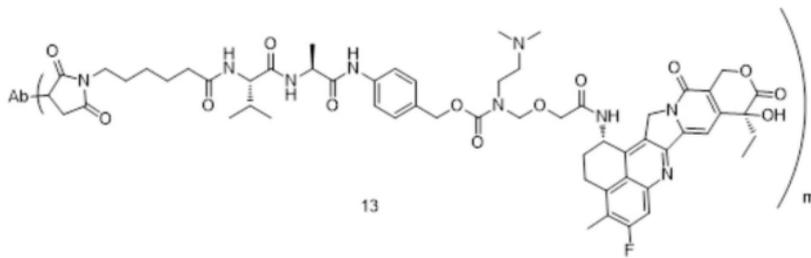
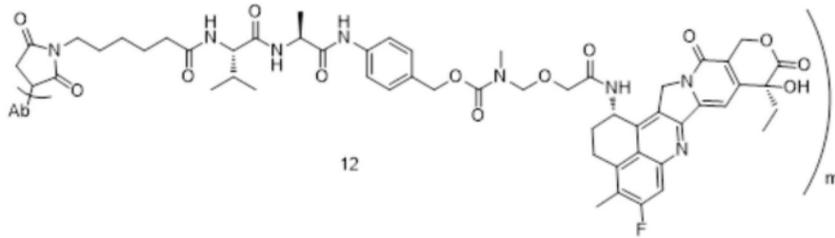
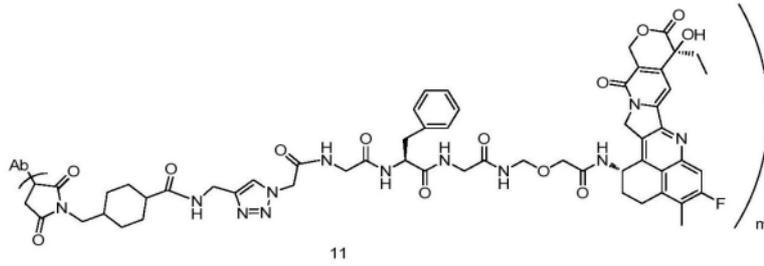


5

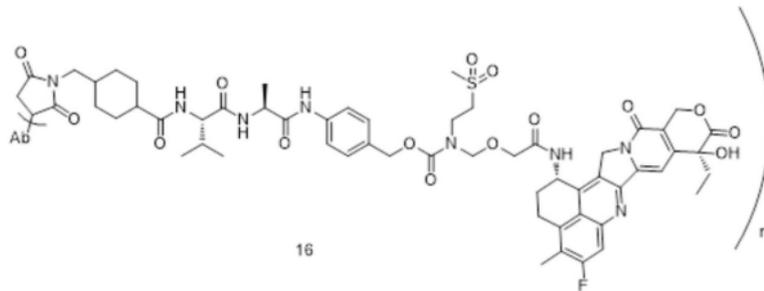
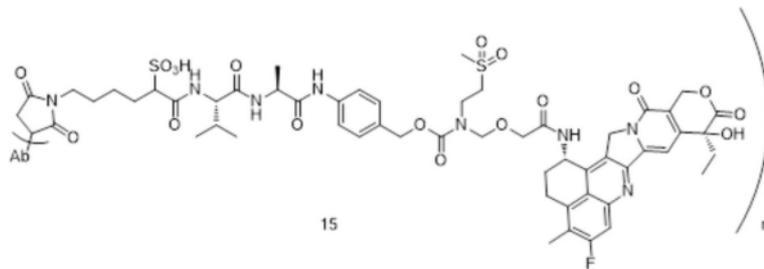
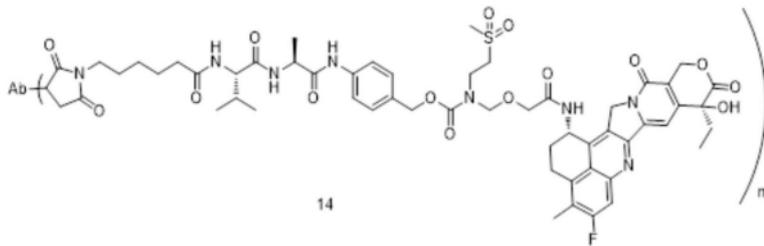


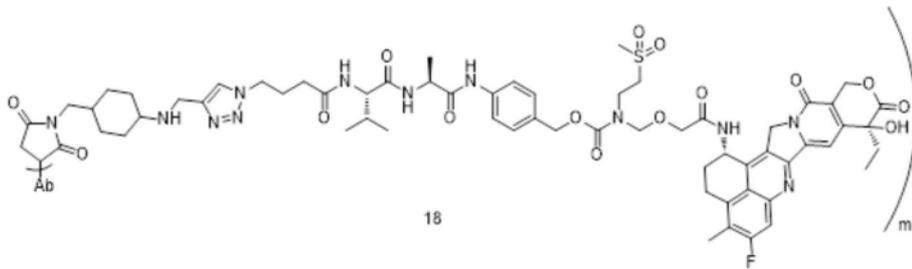
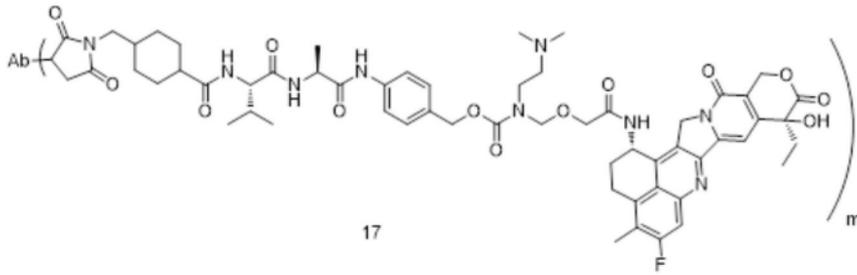
[0066]



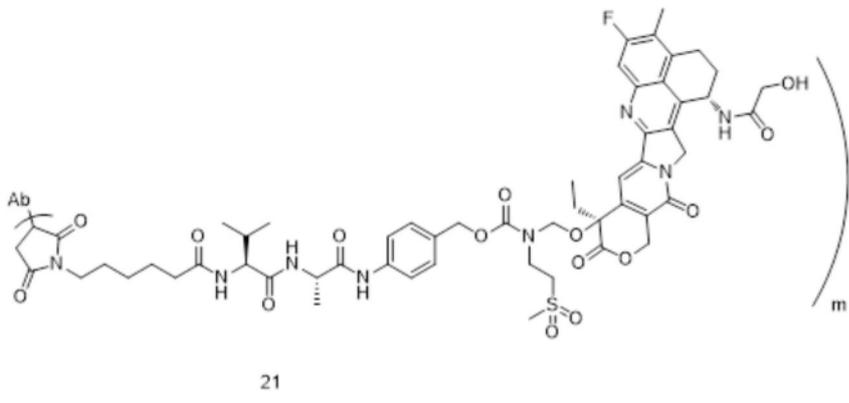
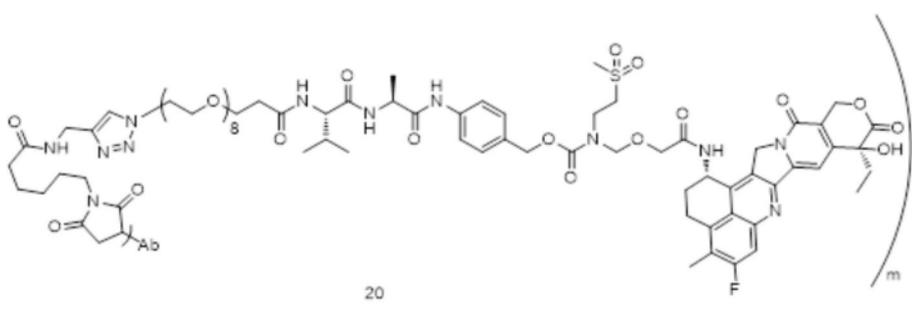
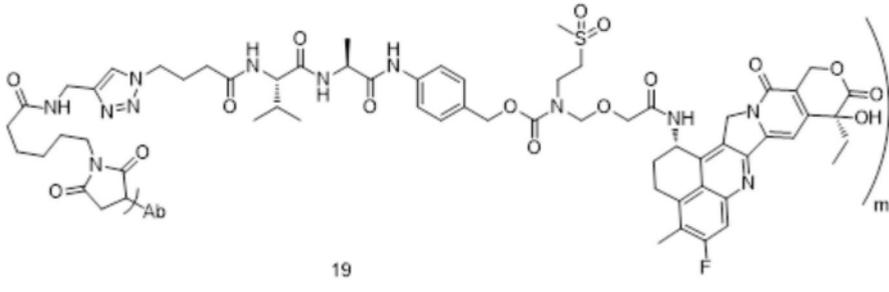


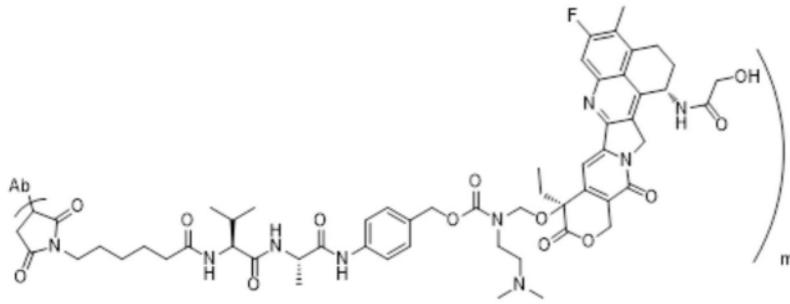
[0067]





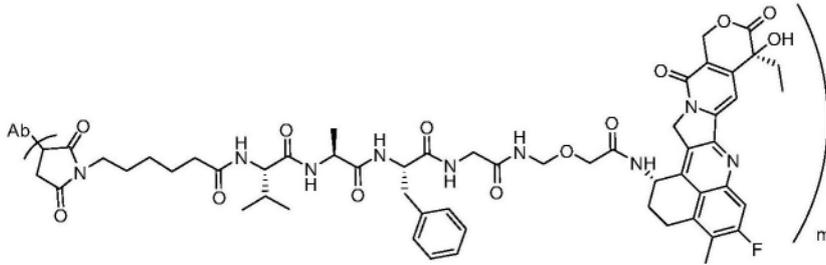
[0068]





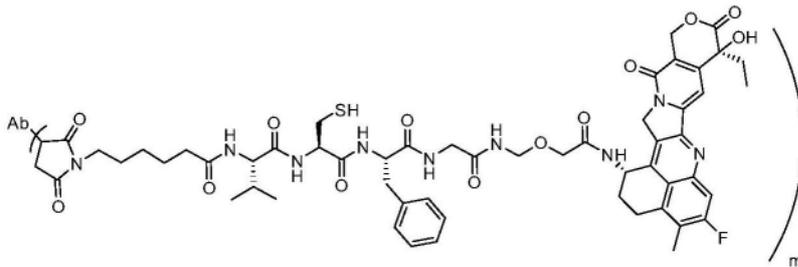
22

[0069]



23

或

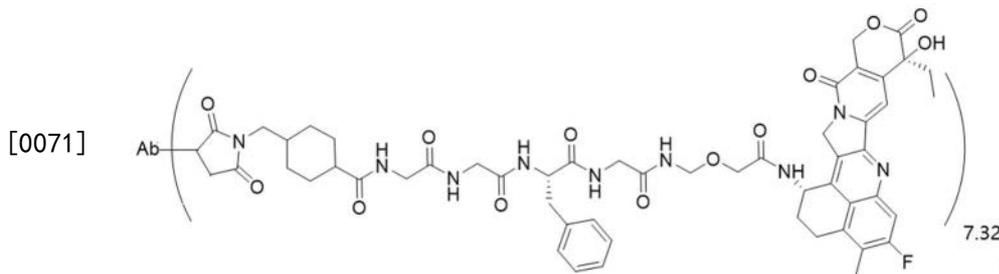


24

其中Ab为前述的抗DLL3抗体,m

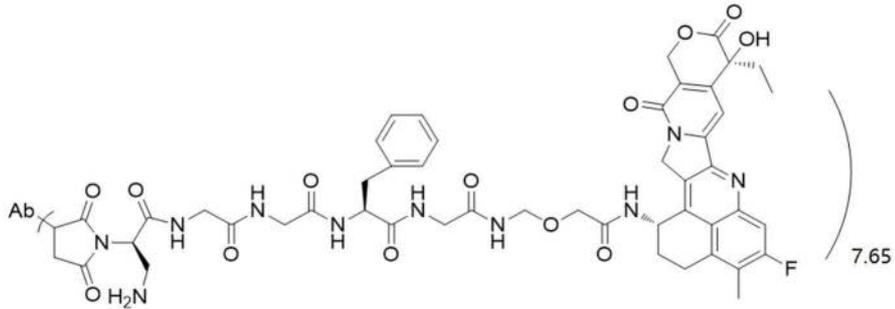
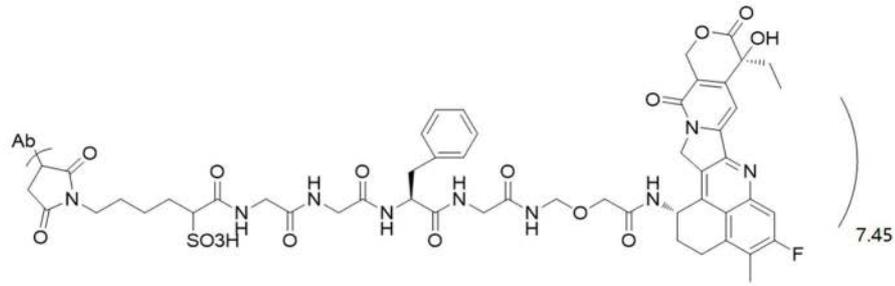
为2~8,优选为7.68、7.53、4.43、7.12、6.92、7.43、7.23、6.83、7.32、7.56、7.54、7.47、5.82、6.78、2.28、6.32、7.45、7.65、7.64、7.36、7.75、7.80、7.77或7.76。

[0070] 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:

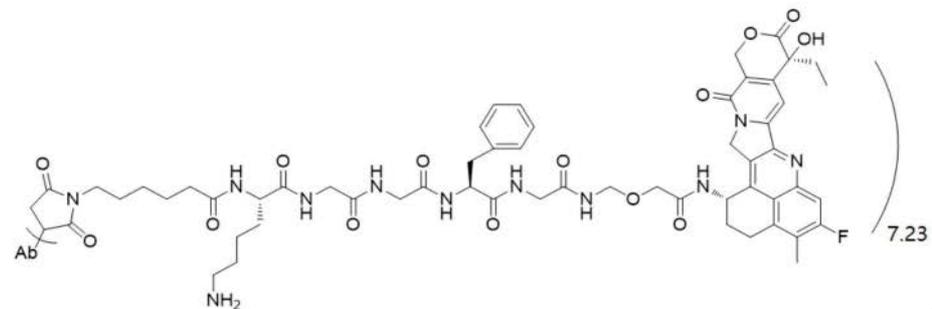
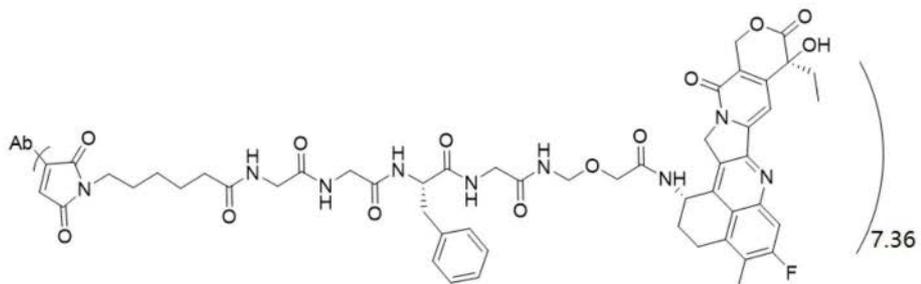
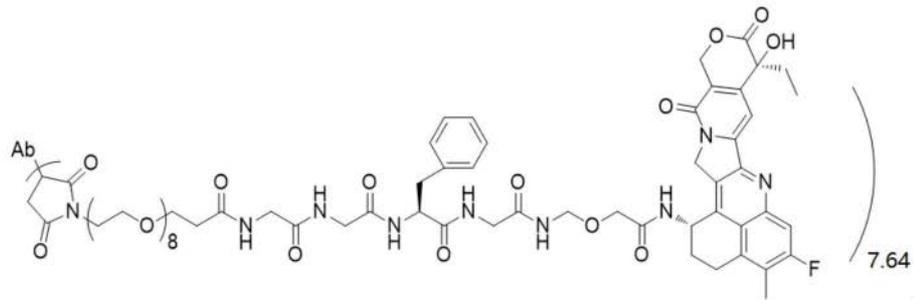


[0071]

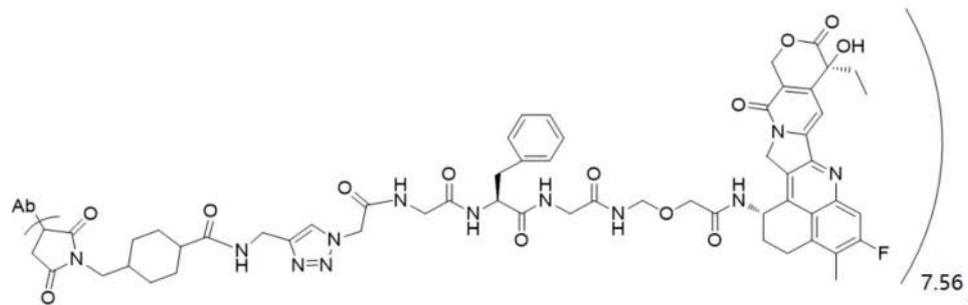
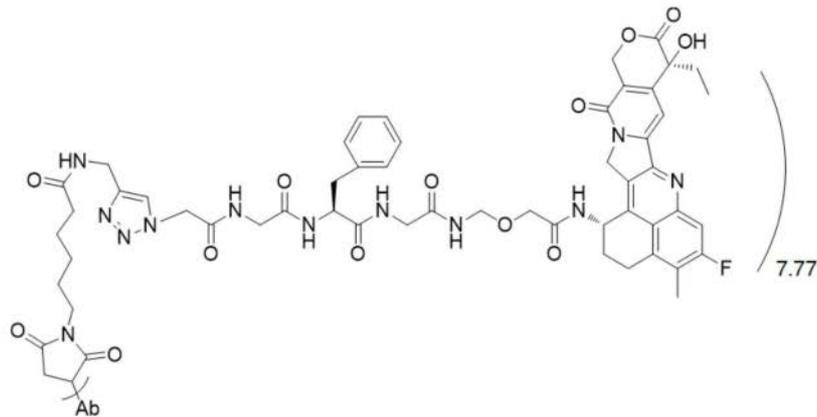
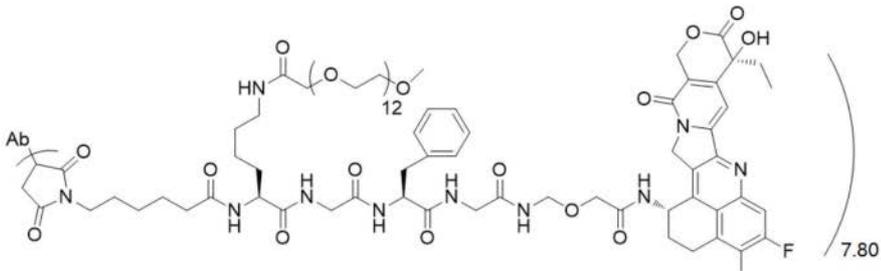
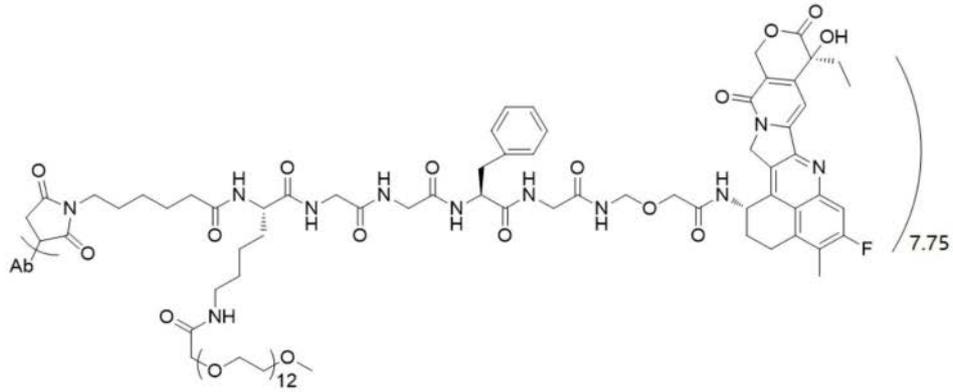
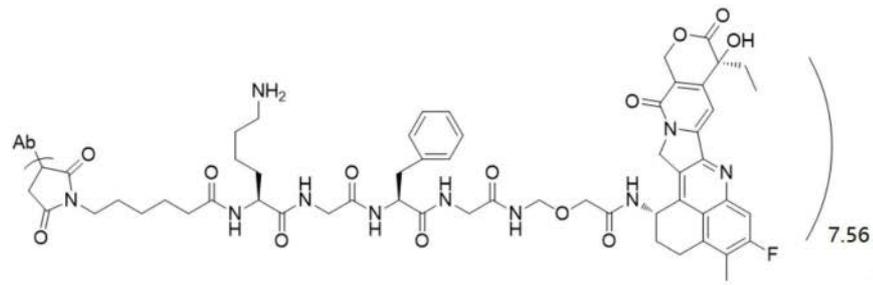
7.32

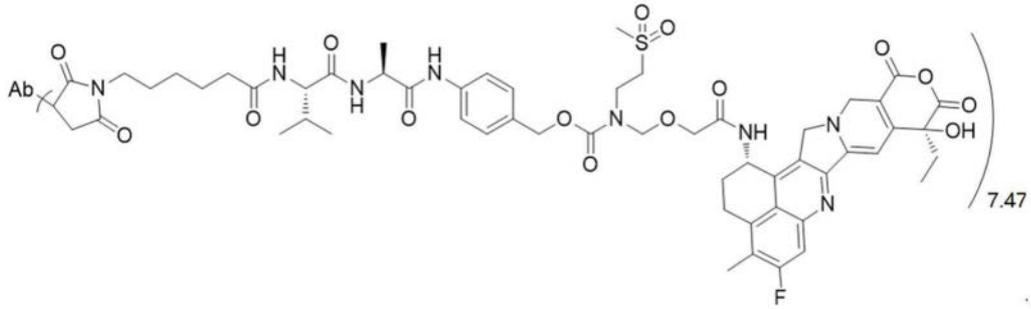


[0072]

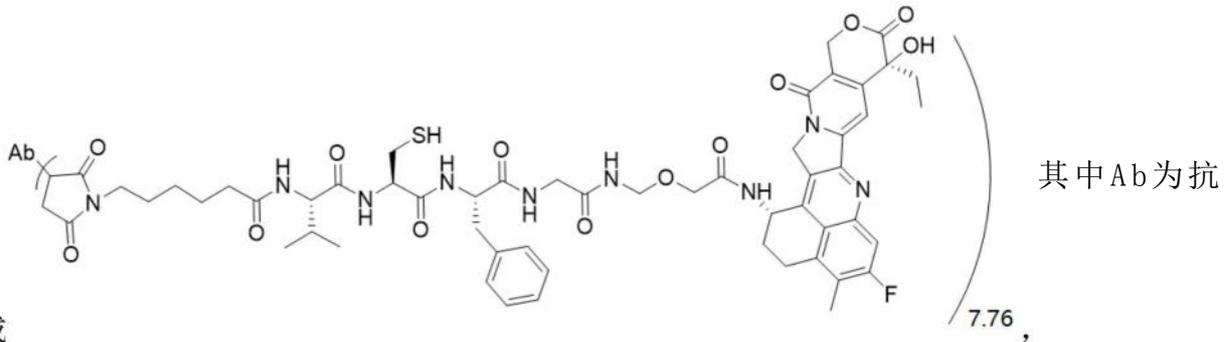
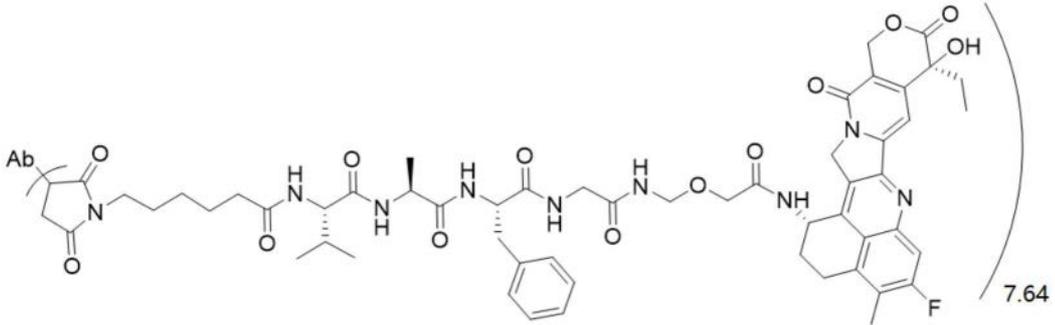


[0073]





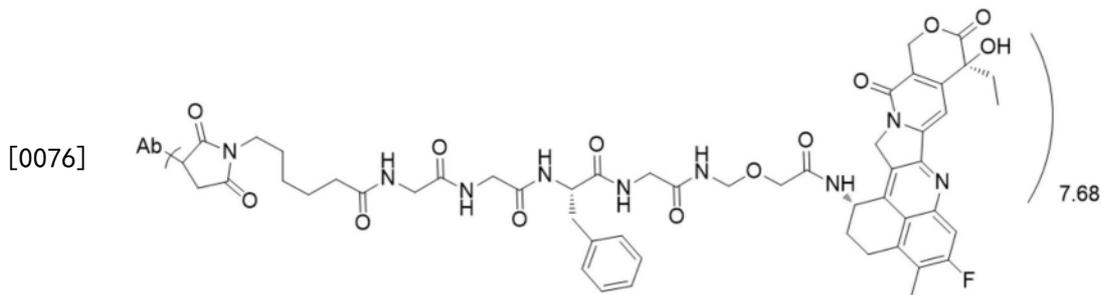
[0074]



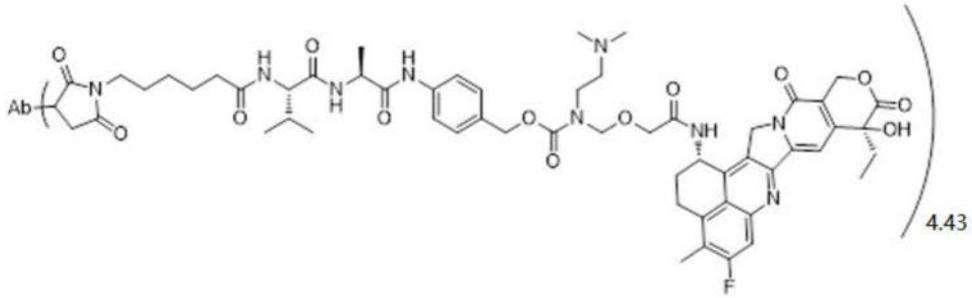
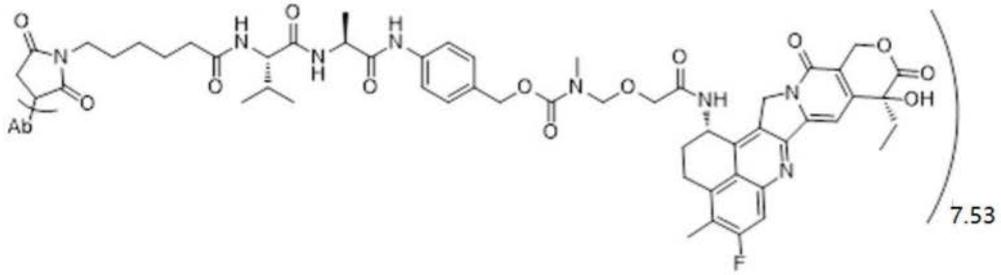
或

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。

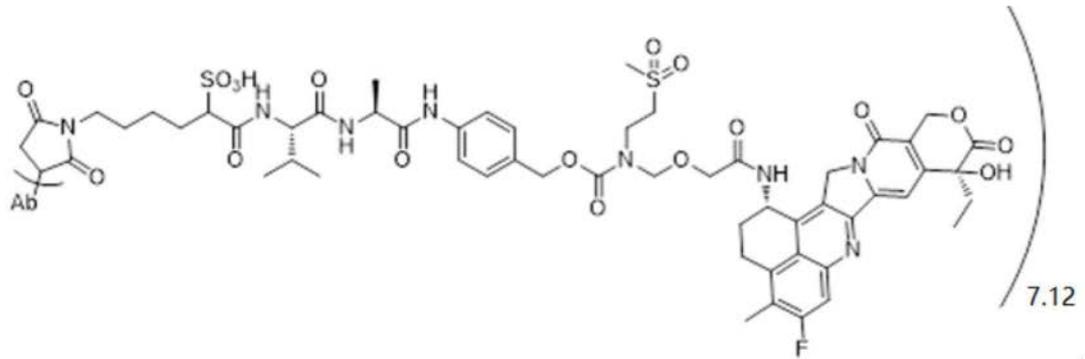
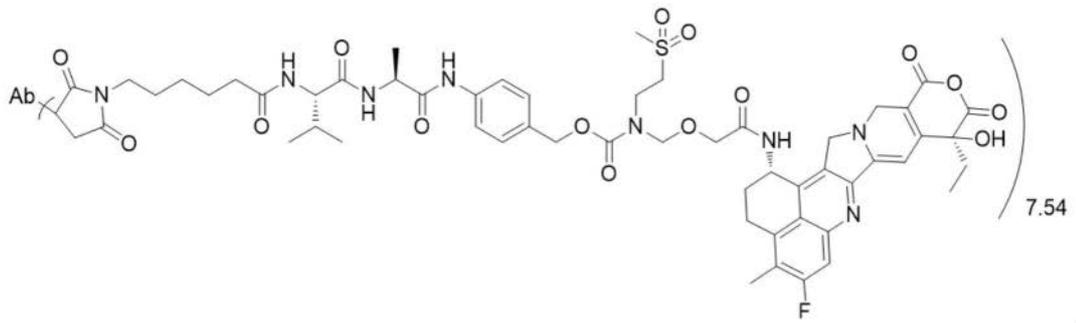
[0075] 在某一优选实施方案中,所述的抗体药物偶联物为如下所示的任一化合物:

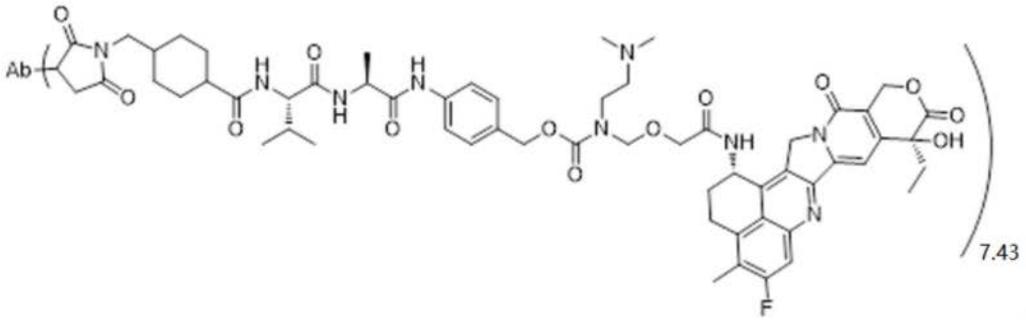
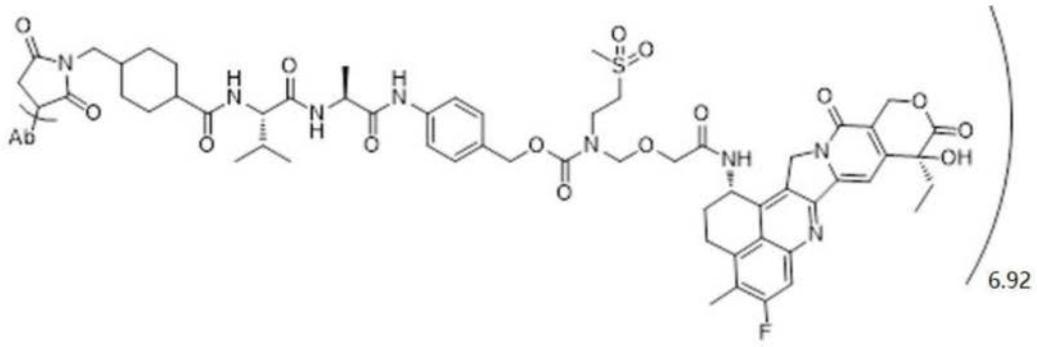


[0076]

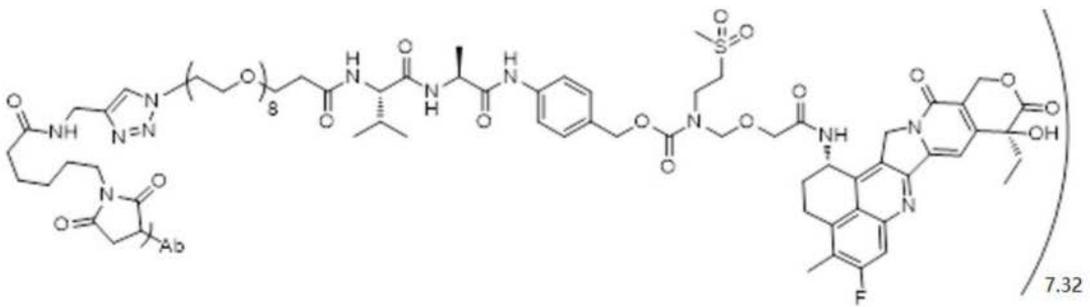
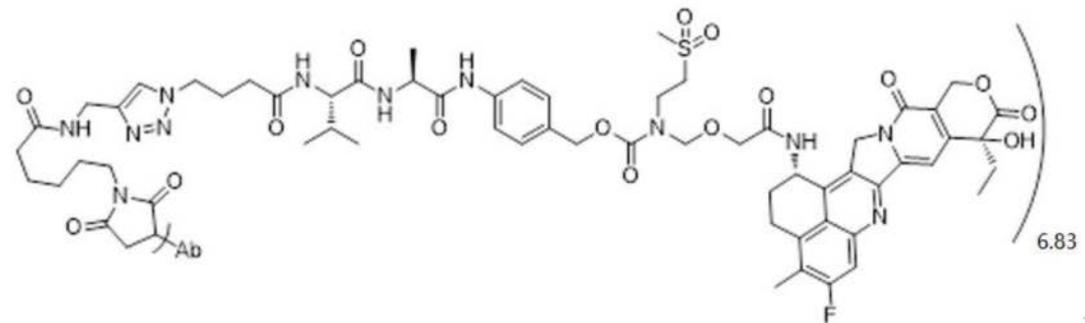
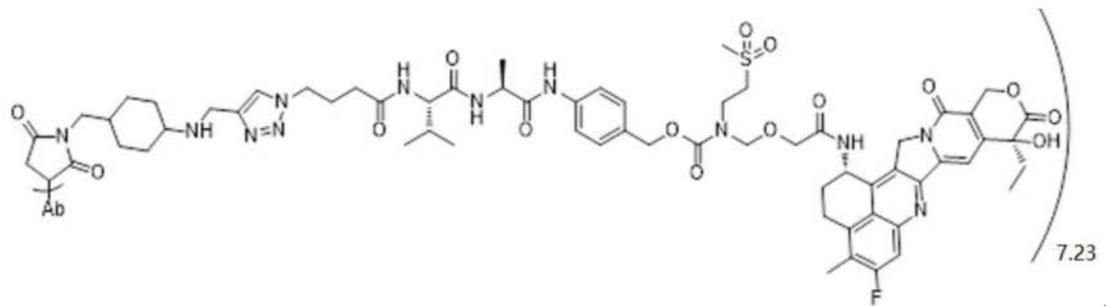


[0077]

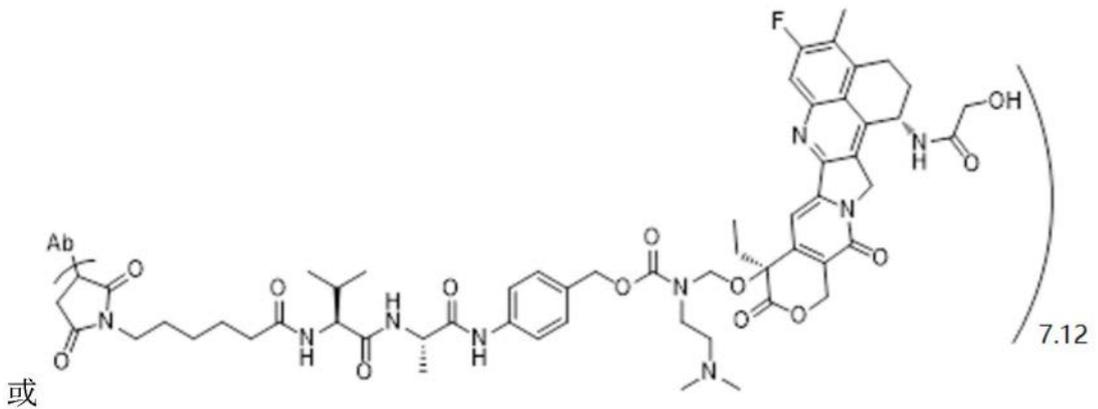
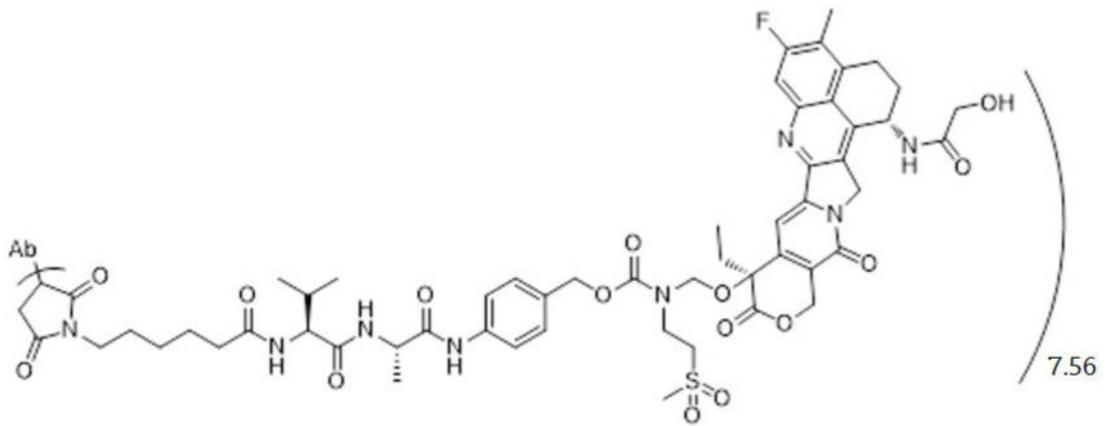




[0078]

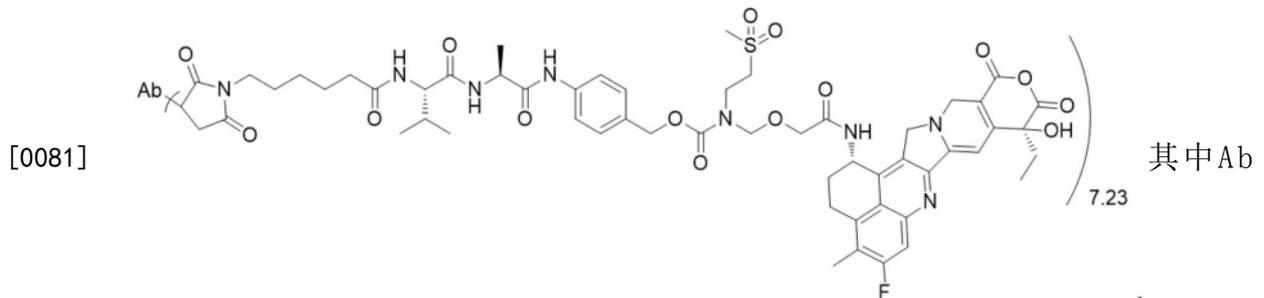


[0079]



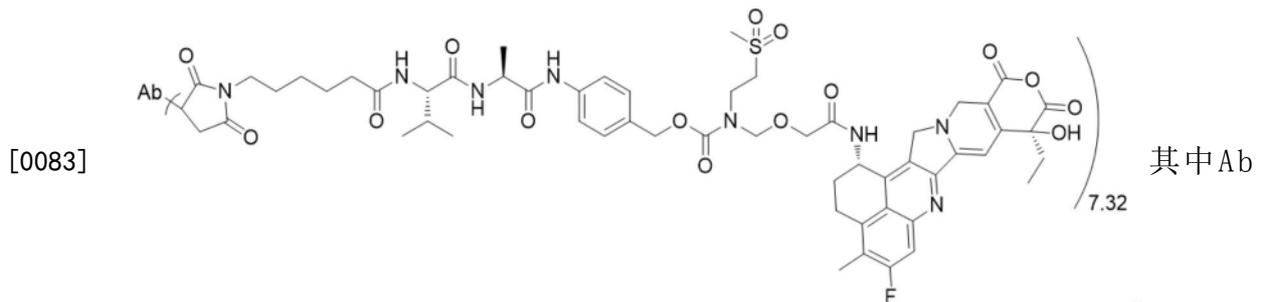
其中Ab为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的VH和氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的VL;优选包含氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示的轻链。

[0080] 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:



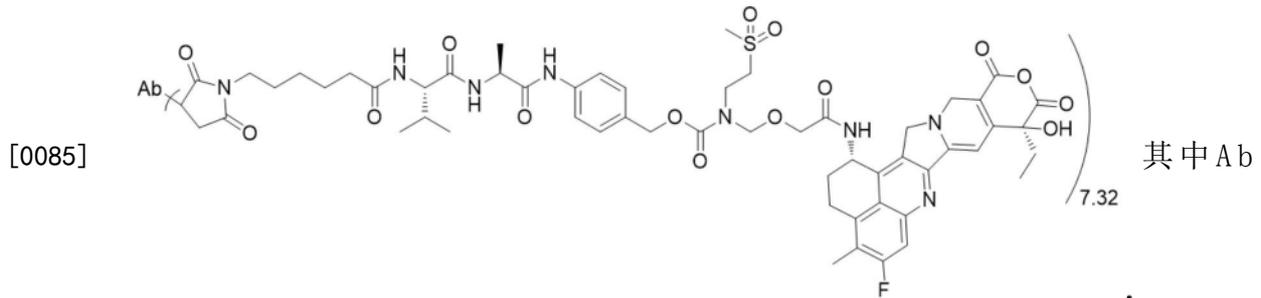
为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的轻链。

[0082] 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:



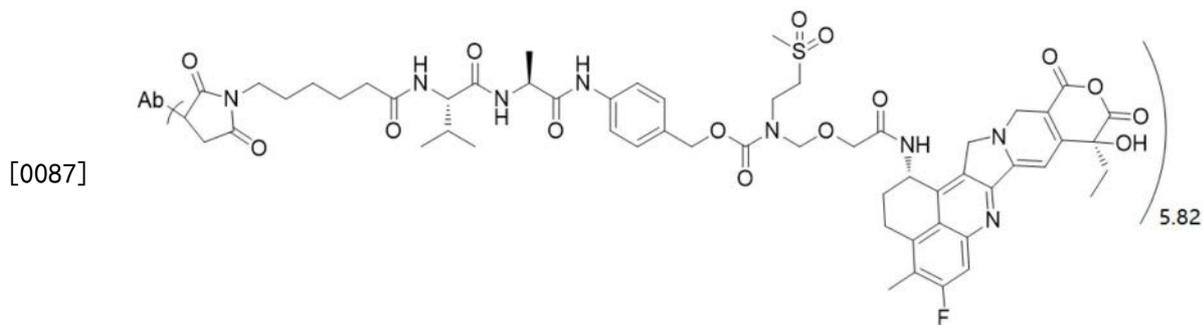
为抗DLL3抗体,其包含氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的轻链。

[0084] 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:



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。

[0086] 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。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 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。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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)<sub>2</sub>片段和scFv等]。

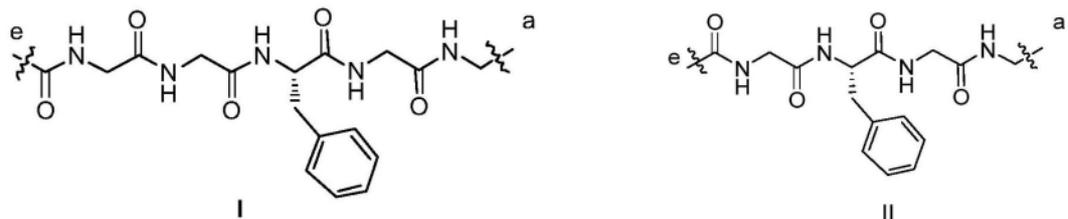
[0098] 本发明某一方面还提供了一种抗体药物偶联物，其结构通式为Ab-(L<sub>5</sub>-L<sub>4</sub>-L<sub>3</sub>-L<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-D)<sub>m</sub>；

[0099] 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；

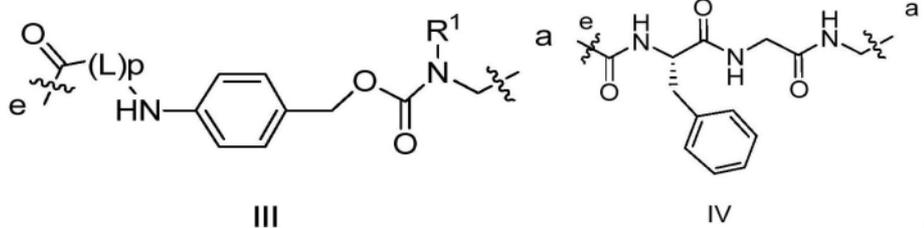
[0100] D为细胞毒性药物；

[0101] m为2~8；

[0102] L<sub>1</sub>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L<sub>2</sub>的c端相连；



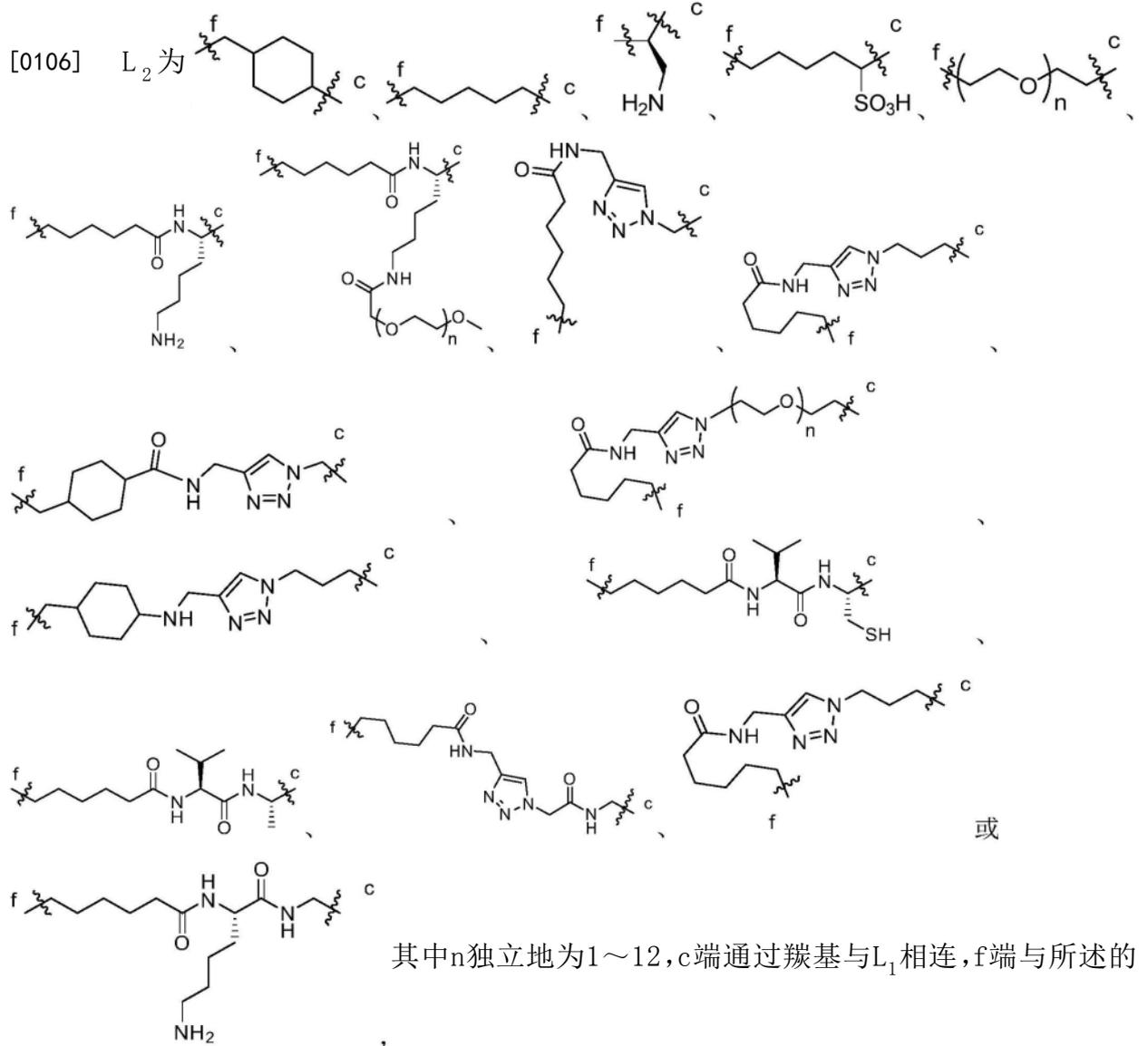
[0103]



[0104] (L)<sub>p</sub>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;

[0105] R<sup>1</sup>为被一个或多个-NR<sup>1-1</sup>R<sup>1-2</sup>取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、被一个或多个R<sup>1-3</sup>S(O)<sub>2</sub>-取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、C<sub>3</sub>~C<sub>10</sub>环烷基、C<sub>6</sub>~C<sub>14</sub>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R<sup>1-1</sup>、R<sup>1-2</sup>和R<sup>1-3</sup>分别独立地为C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基;



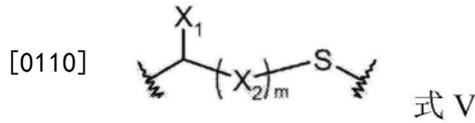
L<sub>3</sub>的d端相连;



连;

[0108] 所述L<sub>4</sub>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;

[0109] 所述L<sub>5</sub>不存在,或为以下式V所示的化合物:



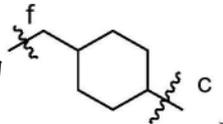
[0111] 其中, X<sub>1</sub>选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基;

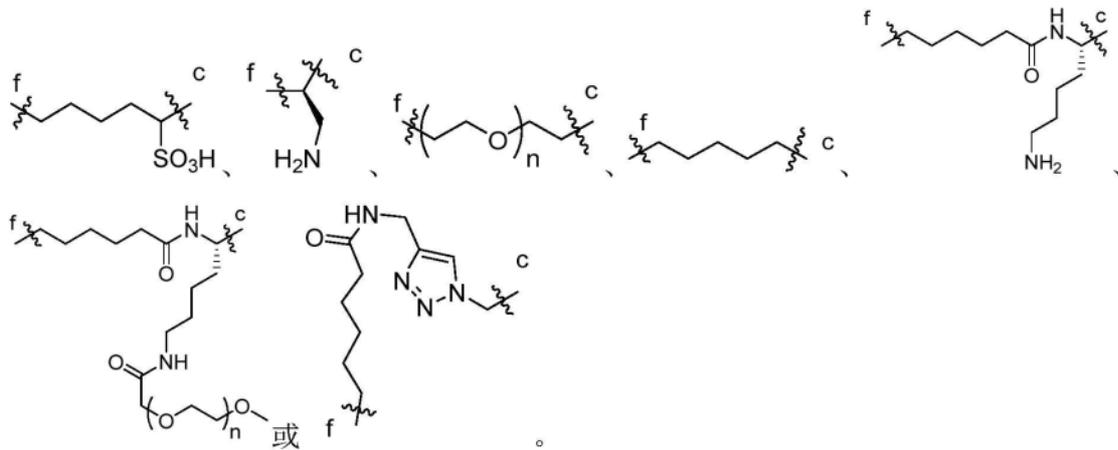
[0112] X<sub>2</sub>选自烷基、环烷基和杂环基; m为0-5; S为硫原子。

[0113] 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。

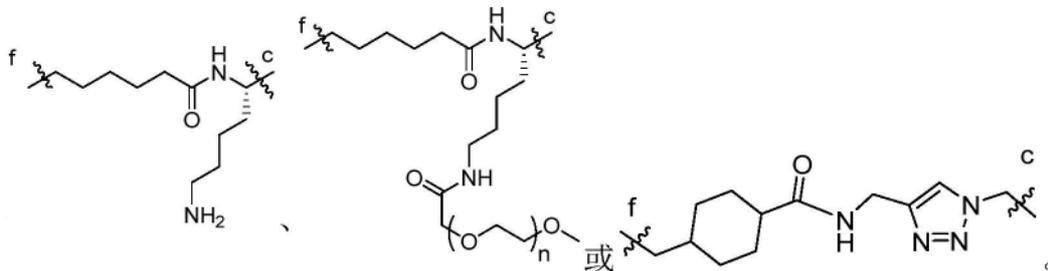
[0114] 在某一优选实施方案中, 所述的L为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基、脯氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种, 优选为苯丙氨酸残基、丙氨酸残基、甘氨酸残基和缬氨酸残基中的一种或多种; 更优选地, 所述的L为缬氨酸残基和/或丙氨酸残基, 所述的多种为两种或三种, 所述的p为2。

[0115] 在某一优选实施方案中, 所述的R<sup>1</sup>为被一个或多个-NR<sup>1-1</sup>R<sup>1-2</sup>取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、被一个或多个R<sup>1-3</sup>S(O)<sub>2</sub>-取代的C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、或C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基, 所述的R<sup>1-1</sup>、R<sup>1-2</sup>和R<sup>1-3</sup>分别独立地为C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>烷基。

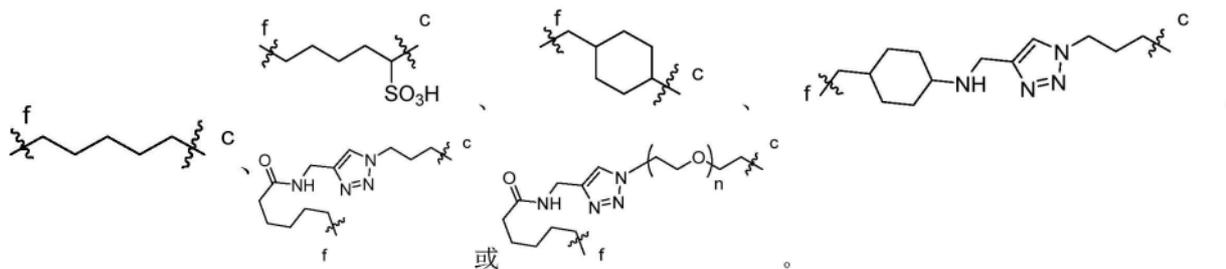
[0116] 在某一优选实施方案中, 当L<sub>1</sub>的结构如式I所示时, 所述的L<sub>2</sub>为 



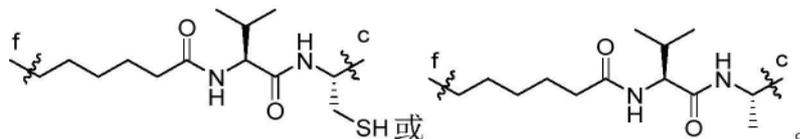
[0117] 在某一优选实施方案中, 当L<sub>1</sub>的结构如式II所示时, 所述的L<sub>2</sub>为



[0118] 在某一优选实施方案中, 当L<sub>1</sub>的结构如式III所示时, 所述的L<sub>2</sub>为

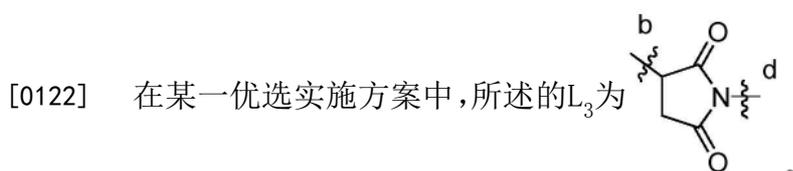


[0119] 在某一优选实施方案中,当 $L_1$ 的结构如式IV所示时,所述的 $L_2$ 为



[0120] 在某一优选实施方案中,所述 $n$ 独立地为8、9、10、11和12。

[0121] 在某一优选实施方案中,所述的 $m$ 为2~8的整数或非整数。



[0123] 在某一优选实施方案中,所述 $L_4$ 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。

[0124] 在某一优选实施方案中,所述 $L_5$ 中,当 $X_1$ 为氢原子、 $X_2$ 为烷基、 $m$ 为1时,式V所示的化合物为硫代乙酸S-(3-羰基丙基)酯。

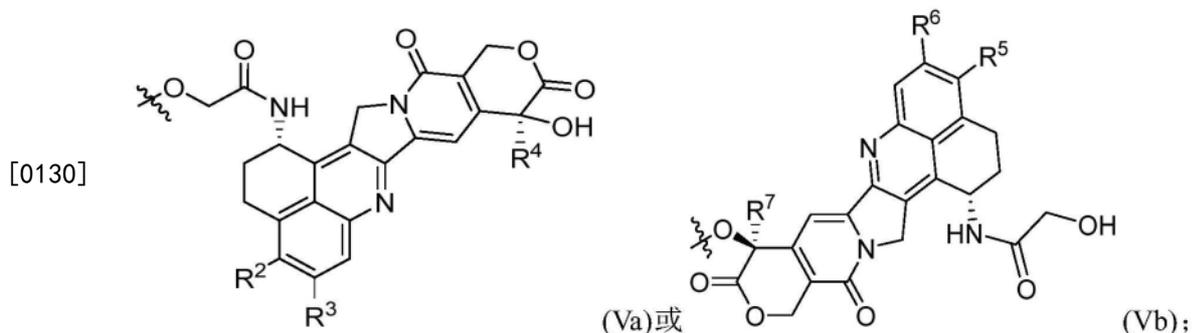
[0125] 在某一优选实施方案中, $D$ 为美登素衍生物、海兔毒素10衍生物、阿霉素类似物或喜树碱类似物的一种或多种。

[0126] 所述美登素衍生物例如DM1、DM3和DM4。

[0127] 所述海兔毒素10衍生物例如MMAE和MMAF。

[0128] 所述阿霉素类似物例如多柔比星和cansirubicin。

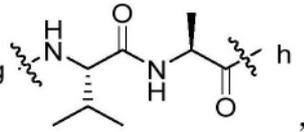
[0129] 更优选地, $D$ 为喜树碱类似物,进一步优选为如式Va或Vb所示结构的化合物:



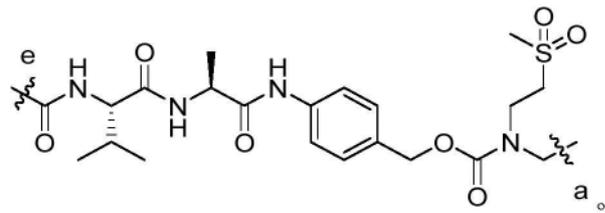
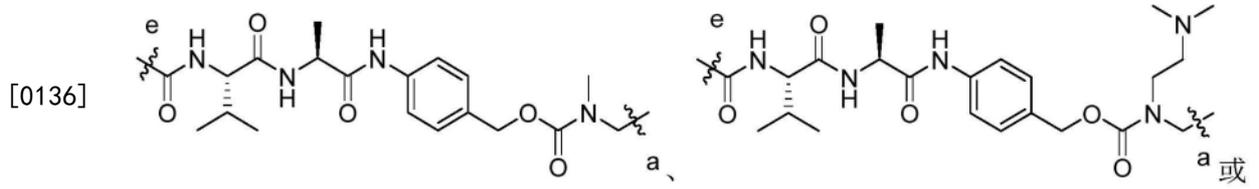
[0131]  $R^2$ 和 $R^5$ 分别独立地为H、 $C_1$ - $C_6$ 烷基或卤素;

[0132]  $R^3$ 和 $R^6$ 分别独立地为H、 $C_1$ - $C_6$ 烷基或卤素;

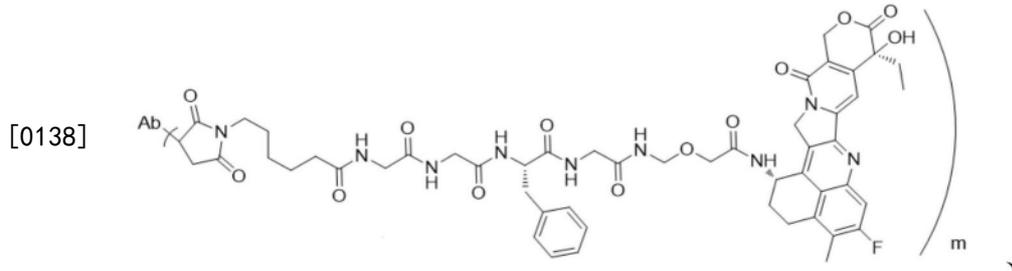
[0133]  $R^4$ 和 $R^7$ 分别独立地为 $C_1$ - $C_6$ 烷基。

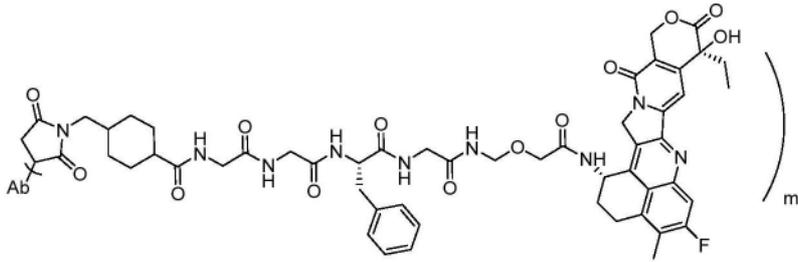
[0134] 在某一优选实施方案中,所述的(L)<sub>p</sub>为  , 其中g端通过羰基和所述的L<sub>2</sub>的c端相连。

[0135] 在某一优选实施方案中,所述的式III为

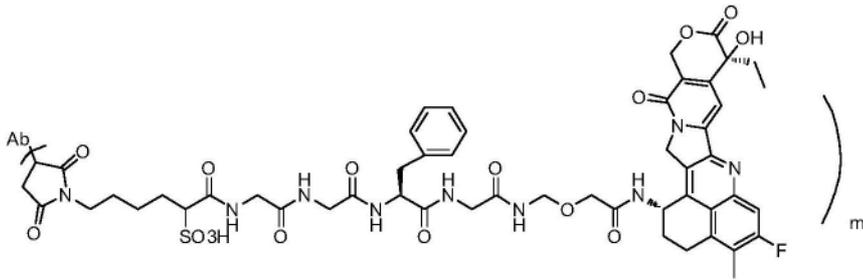


[0137] 在某一优选实施方案中,所述的抗体药物偶联物为如下所示的任一化合物:



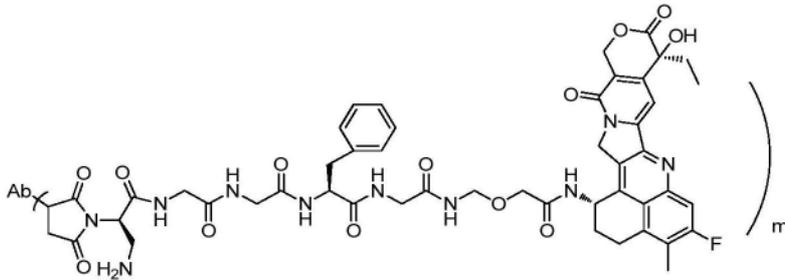


1

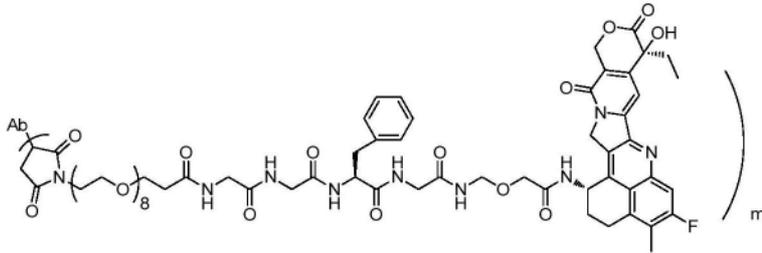


2

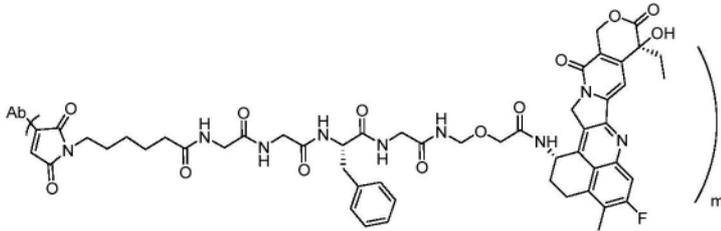
[0139]



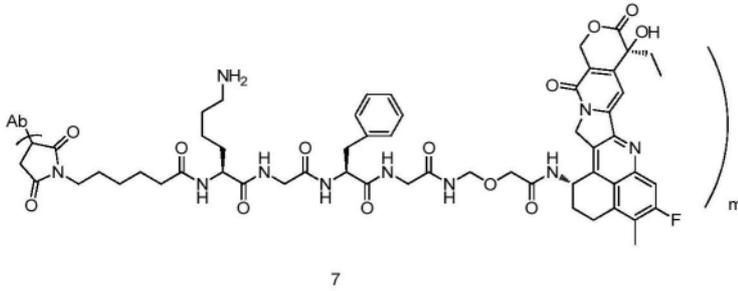
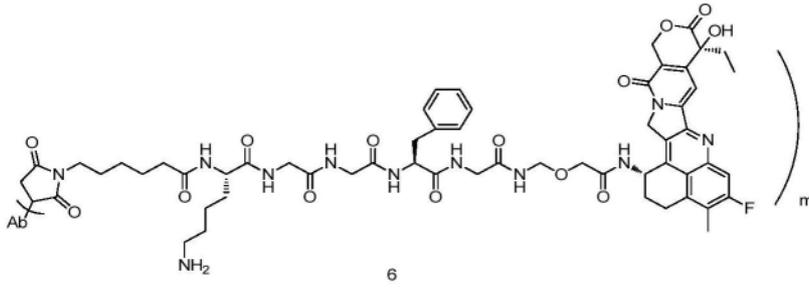
3



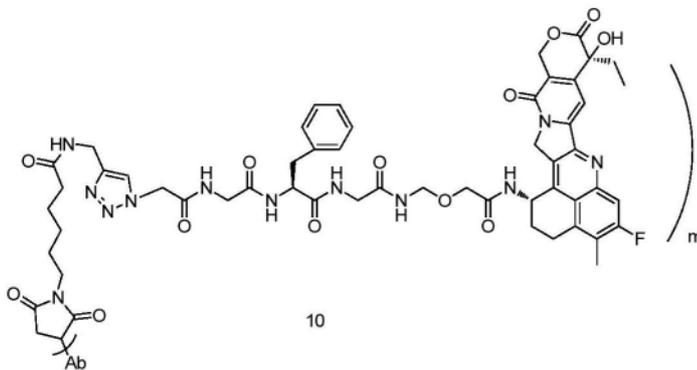
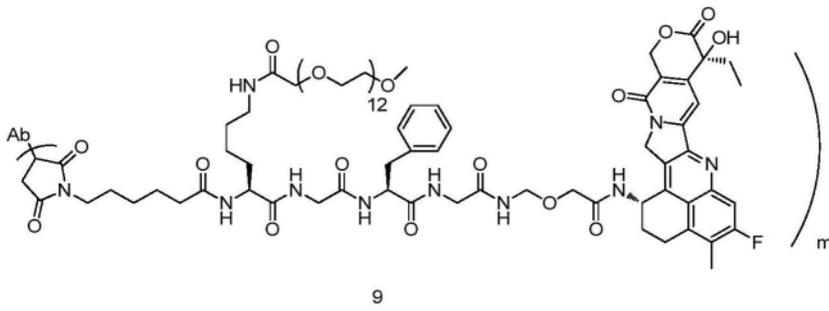
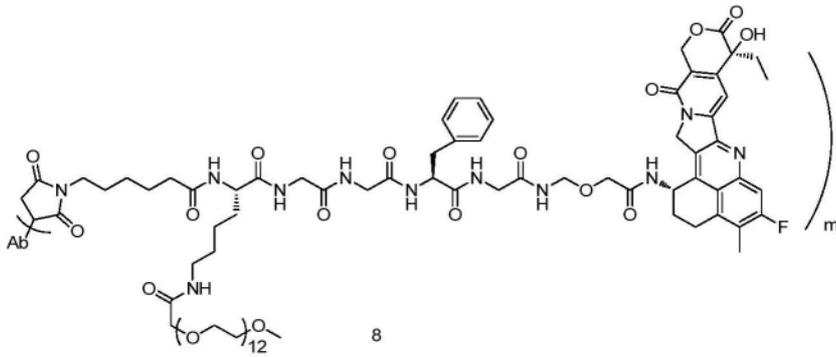
4

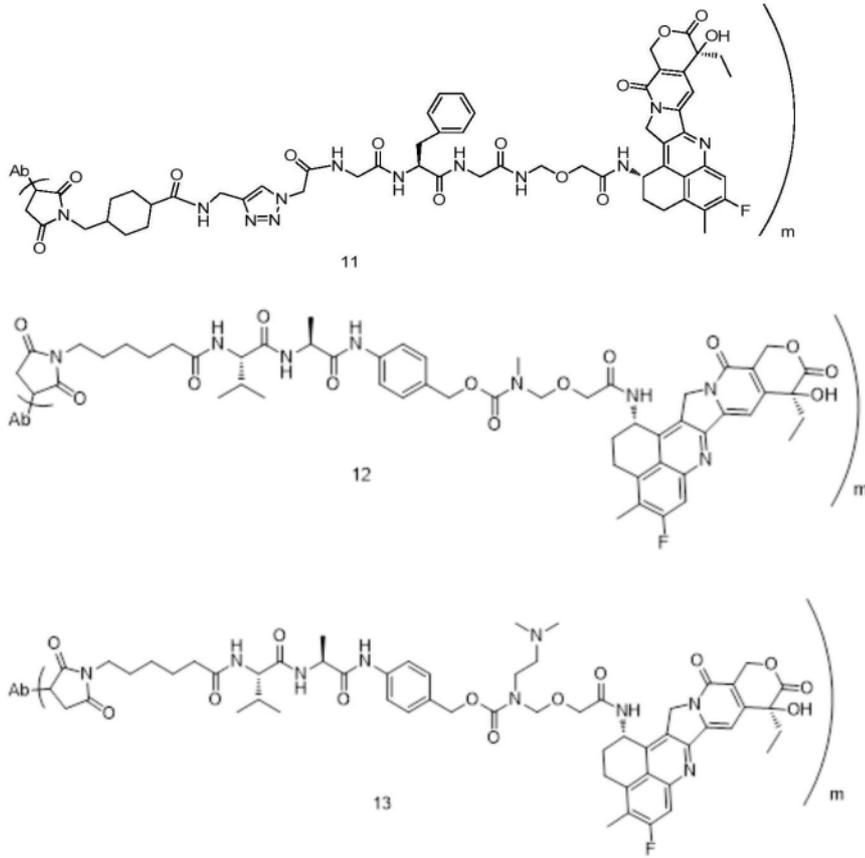


5

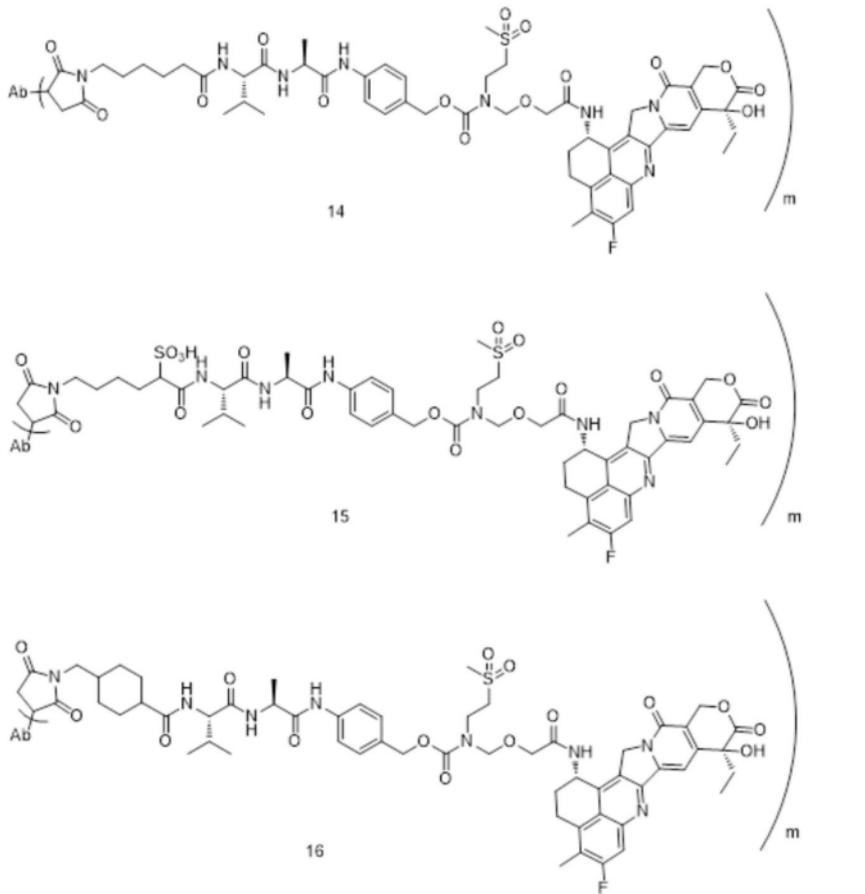


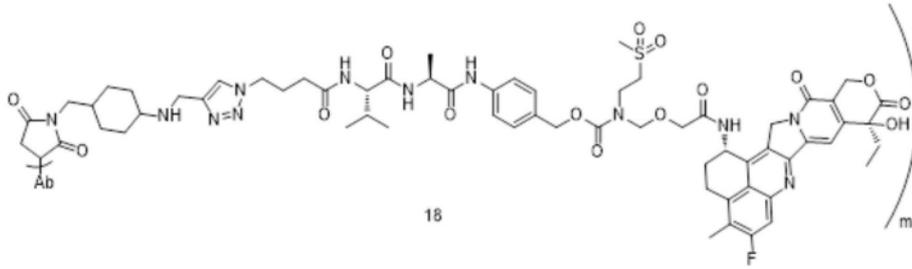
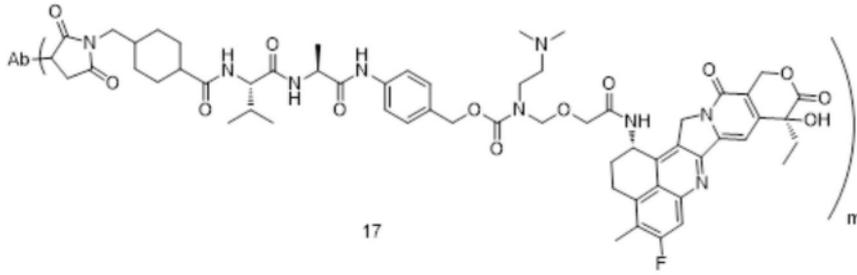
[0140]



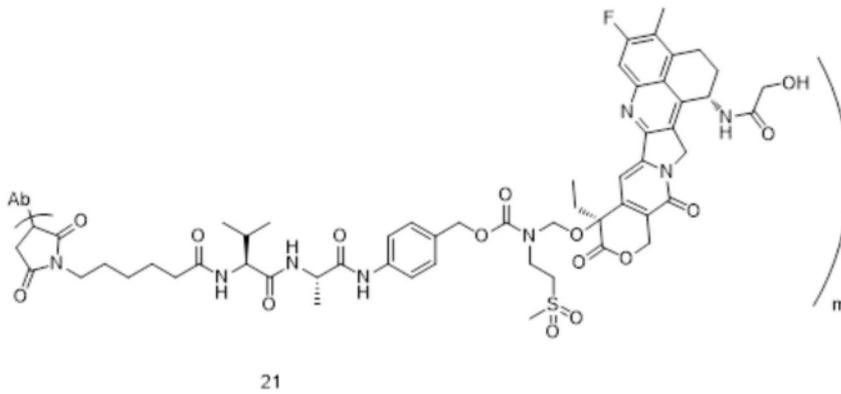
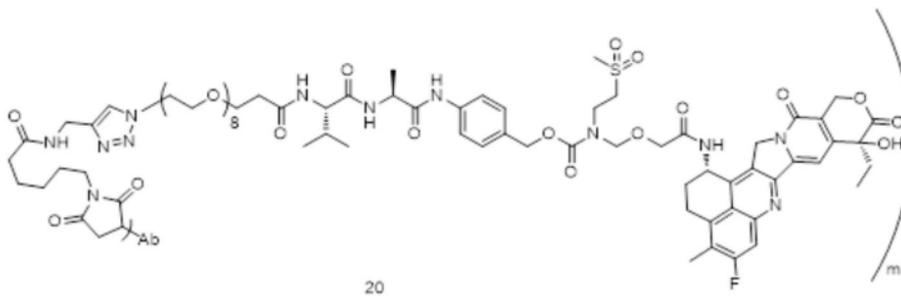
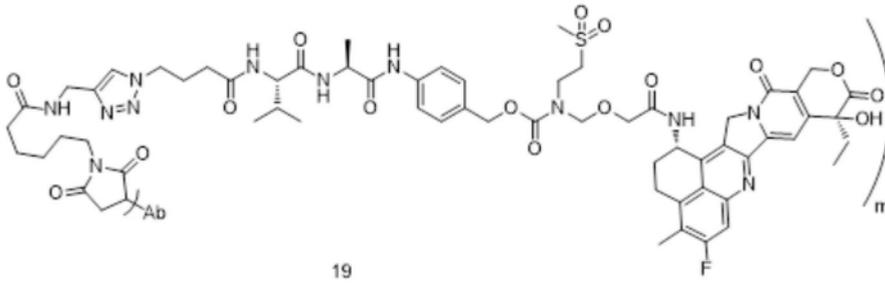


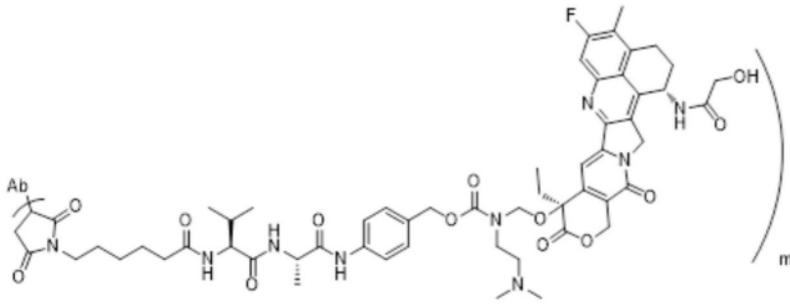
[0141]





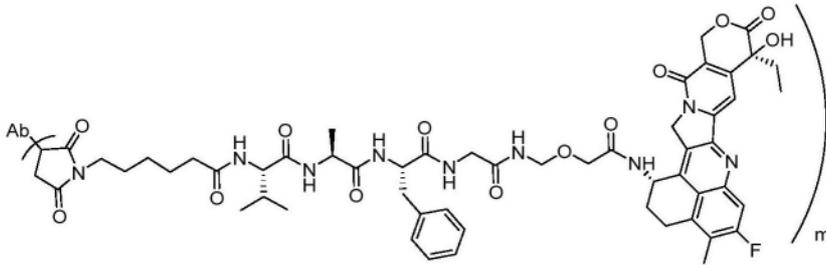
[0142]





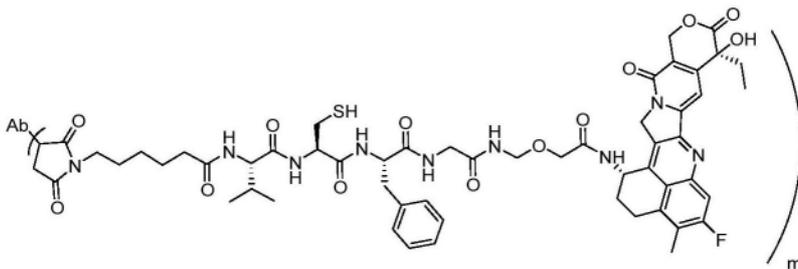
22

[0143]



23

或



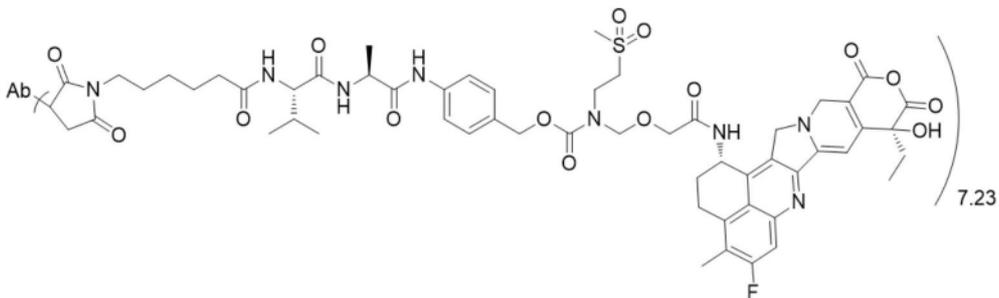
24

[0144] 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；

[0145] 所述的m为7.23或7.32。

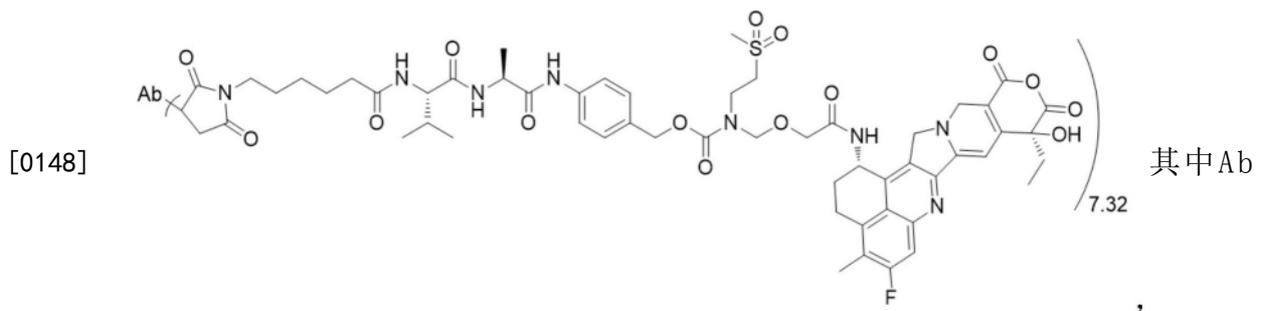
[0146] 优选地,所述的抗体药物偶联物为如下所示的任一化合物:

[0147]



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



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。

[0149] 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。

[0150] 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。

[0151] 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。

[0152] 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。

[0153] 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;

[0154] 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。

[0155] 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。

[0156] 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。

[0157] 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。

[0158] 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。

[0159] 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。

[0160] 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。

[0161] 本发明中, 术语“C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>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<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基”优选为甲基或乙基。

[0162] 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。

[0163] 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)。

[0164] 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')<sub>2</sub>, 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')<sub>2</sub> 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。

[0165] 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。

[0166] “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。

[0167] 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前述序列表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。

[0168] “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。

[0169] 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。

[0170] 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。

[0171] 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。

[0172] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0173] 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

[0174] 图1为pV81载体的图谱。

[0175] 图2显示了实施例4中抗体的内化结果。

[0176] 图3显示了嵌合抗体与hDLL3的结合活性的量效曲线。

[0177] 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。

[0178] 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。

[0179] 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。

[0180] 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

[0181] 表a. 缩写词说明

[0182]

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

[0183] 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中。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。

[0184] 实施例1. 特异性靶向hDLL3的单克隆抗体FDA027和FDA031的制备

[0185] 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。

[0186] 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125ml摇瓶中(培养体积30ml),37℃,5.0%CO<sub>2</sub>,130r/min震荡培养,3天后扩至1000ml摇瓶中(培养体积300ml),37℃,5.0%CO<sub>2</sub>,130r/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9500r/min离心15min,去除细胞沉淀,收集上清液,再用0.22μm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。

[0187] 实施例2. 人hDLL3过表达载体及稳转细胞株的制备

[0188] 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。

[0189] 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 $5 \times 10^5$ 个细胞/ml密度,2ml/孔接种于6孔培养板,培养箱内(37℃、5%CO<sub>2</sub>)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10 $\mu$ g/ml, 加入100 $\mu$ l到5 $\times$ 10<sup>5</sup>个待测细胞中4 $^{\circ}$ 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。

[0190] 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。

[0191] SEQ ID NO:5

[0192] GKPIPNLLGLDSTSGARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLSGGGGSGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA

[0193] SEQ ID NO:6

[0194] GKPIPNLLGLDSTSGAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLSGGGGSGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA

[0195] SEQ ID NO:7

[0196] GKPIPNLLGLDSTSGGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLSGGGGSGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA

[0197] SEQ ID NO:8

[0198] GKPIPNLLGLDSTSGSVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLSGGGGSGAGVIAVIVVVVIAIVAGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA

[0199] 注: 下划线为V5标签, 斜体部分为胞内序列

[0200] 实施例3. 杂交瘤单克隆抗体的制备和抗体的筛选

[0201] 3-1. 免疫接种和血清效价检测

[0202] 选择6只6周龄SPF级Ba1b/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。

[0203] ELISA检测方法:PBS稀释DLL3蛋白至浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ , $100\mu\text{l}$ /孔加入到96孔酶标板 $4^{\circ}\text{C}$ 过夜,第二天弃去板孔上清液,每孔加入 $200\mu\text{l}$ 含有2%的牛奶的PBS溶液进行封闭,2hr后弃去封闭液并加入 $200\mu\text{l}$ 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 $100\mu\text{l}$ 加入到酶标板中,室温反应1hr后弃去板孔上清,加入 $200\mu\text{l}$ 的PBST(1%的Tween20)洗涤5次,加入 $100\mu\text{l}$ 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 $200\mu\text{l}$ 的PBST(1%的Tween20)洗涤7次。每孔加入 $100\mu\text{l}$ 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)。

[0204] FACS检测方法:96孔V型微孔板(购自axygen,wipp02280)中每孔加入 $3\times 10^5$ 个HEK293-DLL3稳转细胞或内源表达细胞SHP-77(购自ATCC), $1500\text{r}/\text{min}$ 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, $50\mu\text{L}$ /孔加入至微孔板中,冰上孵育30min后,每孔加入 $150\mu\text{L}$  PBS重悬细胞, $1500\text{r}/\text{min}$ 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 $50\mu\text{L}$ ,冰上孵育30min。每孔加入 $150\mu\text{L}$  PBS重悬细胞, $1500\text{r}/\text{min}$ 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。

[0205] 3-2. 杂交瘤融合筛选与克隆化

[0206] 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 $2\times 10^4$ 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用于抗体的生产纯化和抗体表达基因的测序。

[0207] 3-3. 杂交瘤抗体生产纯化

[0208] 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 $2.5\times 10^5/\text{mL}$ 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, $37^{\circ}\text{C}$ 下 $130\text{r}/\text{min}$ 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。

[0209] 实施例4. 抗体内吞活性的分析

[0210] 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 $5\times 10^5$ 个SHP-77细胞于96孔V型微孔板中, $1500\text{r}/\text{min}$ 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, $1500\text{r}/\text{min}$ 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 $37^{\circ}\text{C}$ 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 $4^{\circ}\text{C}$ , $1500\text{r}/\text{min}$ 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, $1500\text{r}/\text{min}$ 离心1min,弃上

清,重复操作4次进行清洗。最后每孔加入100 $\mu$ 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。

[0211] 表1.流式细胞术检测抗体内化的荧光值

编号	内化时间克隆					
	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

[0213] 实施例5.杂交瘤抗体表达基因序列的获取

[0214] 每个克隆收集 $2 \times 10^5$ 个杂交瘤细胞(来源于实施例3-2)用于RNA的抽提,细胞300g(此实施例中为转速单位,下同)离心5min后弃上清,加250 $\mu$ L Trizol(购自TAKARA,T9108)裂解液裂解杂交瘤细胞,接着加入50 $\mu$ l的氯仿涡旋震荡混匀至乳浊液,室温静置5min,12000g,4 $^{\circ}$ C离心15min,吸取上清至新的Rnase-free的1.5ml离心管中,加入125 $\mu$ l的异丙醇充分混匀后室温静置10min。12000g,4 $^{\circ}$ C离心10min可见沉淀,弃上清,加入250 $\mu$ l的75%乙醇,轻轻上下颠倒混匀12000g,4 $^{\circ}$ C离心10min吸弃上清,室温干燥沉淀10min。接着分别加入20 $\mu$ l的Rnase-free水溶解沉淀30min,溶解后用移液枪混匀,并测定浓度。根据RNA浓度采用PrimeScript<sup>TM</sup> 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30min。取5 $\mu$ L连接产物加入50 $\mu$ L LTG-1(Lucigen公司)感受态细胞中,轻轻混匀后42 $^{\circ}$ C热击90s,热击后冰上孵育3min,加入1mL无抗性2YT液体培养基(购自生工,A507019-0250),置于37 $^{\circ}$ C 220r/min的摇床1h后,取100 $\mu$ L菌液均匀的涂布在Amp抗性(购自生工,A600469-0005)的2YT固体平板上,37 $^{\circ}$ C倒置培养14-16h。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。

[0215] 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	重链	重链	轻链	轻链	轻链	重链可变区(VH)	轻链可变区(VL)
	CDR1(VH CDR1)	CDR2(VH CDR2)	CDR3(VH CDR3)	CDR1(VL CDR1)	CDR2(VL CDR2)	CDR3(VL CDR3)		
[0216]								

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 GYTFTTE 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 GYTFTD YA	SEQ ID NO: 30 IVSTDSG KT	SEQ ID NO: 31 ARNPYY DYDGYA MDY	SEQ ID NO: 32 DHINNW	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 ARIAEVT GQVGLH YAMDY	SEQ ID NO: 42 SSVNSSS	TTS	SEQ ID NO: 44 HQFHRS PFT	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46
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 QHFWSW 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 QHFWTW 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 DGYHYL 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 IDPENGN A	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: 113	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 ENIYYSS	NAN	SEQ ID NO: 113 NANKQA YDVPWT	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23

[0217]

[0218] 实施例6. 嵌合抗体的构建和制备及结合活性检测

[0219] 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-hchgl)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-hcl)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 $\mu$ g。收集转染后培养第7天的细胞上清,离心并使用0.45 $\mu$ 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。

[0220] 表3-1. 嵌合抗体的轻重链全长氨基酸序列编号

[0221]

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

[0222] 表3-2. 嵌合抗体与人DLL3蛋白的结合活性

[0223]

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

[0224] 实施例7. 嵌合抗体竞争分析及结合表位分析

[0225] 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 $\mu$ 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 $\mu$ l 3%的牛奶(溶解于PBS)进行封闭2hr,使用80 $\mu$ 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 $\mu$ g/ml,然后3倍梯度稀释11个浓度点,每孔25 $\mu$ 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 $\mu$ l的PBST(1%的Tween20)洗涤5次后加入25 $\mu$ l的Biotin标记的嵌合抗体室温孵育1hr,再次弃去上清,使用80 $\mu$ 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 $\mu$ l的PBST(1%的Tween20)洗涤7次。加入25 $\mu$ 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。

[0226] 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 $\times$ 10<sup>5</sup>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 $\mu$ g/ml的待检测抗体,每孔200 $\mu$ L,冰上孵育30min。然后每孔加入150 $\mu$ 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 $\mu$ L,冰上孵育30min。用PBS洗板4次后每孔加入100 $\mu$ 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。

[0227] 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

[0228] 将实施例6中获得的嵌合抗体通过ELISA方法检测其对人DLL1(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 $\mu$ 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 $\mu$ l 3%的牛奶(溶解于PBS)进行封闭2hr,使用80 $\mu$ 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 $\mu$ g/ml,3倍梯度稀释11个浓度点,每孔25 $\mu$ 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 $\mu$ l的PBST(1%的Tween20)洗涤5次,每孔加入25 $\mu$ 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 $\mu$ l的PBST(1%的Tween20)洗涤7次。加入25 $\mu$ 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 $\mu$ g/mL)下有较弱的交叉反应;6A2抗体与hDLL4在高浓度(20 $\mu$ g/mL)下有一定的交叉反应。

[0229] 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 $\times$ 10<sup>5</sup>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 $\mu$ 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 $\mu$ L, 冰上孵育30min。然后每孔加入150 $\mu$ 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 $\mu$ L, 冰上孵育30min。用PBS洗板4次后每孔加入100 $\mu$ 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。

[0230] 实施例9. 抗体与人DLL3蛋白结合的亲和力检测

[0231] 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 $\mu$ 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3.13nM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。

[0232] 表4. 抗体与人DLL3蛋白结合的亲和力

[0233]

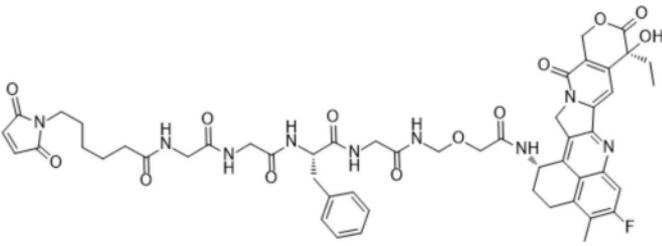
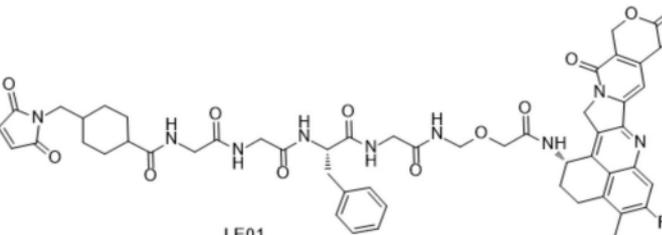
抗体名称	KD (M)	kon (1/Ms)	Koff (1/s)
ch1A5	5.97E-11	1.24E+06	7.40E-05
ch33F11	5.21E-11	1.21E+06	6.31E-05
ch23G2	1.58E-11	1.76E+06	2.79E-05
ch13C2	5.37E-09	2.23E+05	1.20E-03
ch32E8	9.00E-11	1.49E+06	1.34E-04
ch19C7	7.39E-10	1.30E+06	9.62E-04
ch26D9	3.81E-11	1.73E+06	6.58E-05
ch10B1	2.04E-10	1.37E+06	2.79E-04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

[0234] 实施例10. 连接基药物偶联物的制备

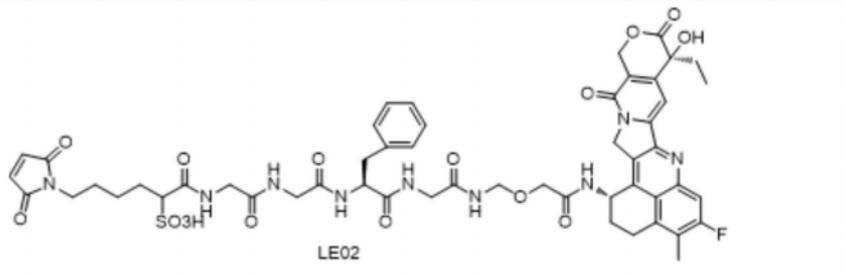
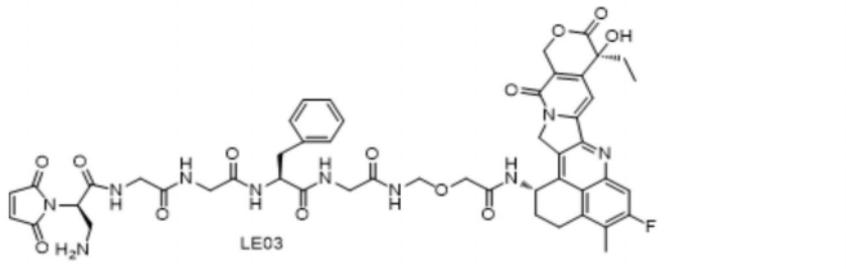
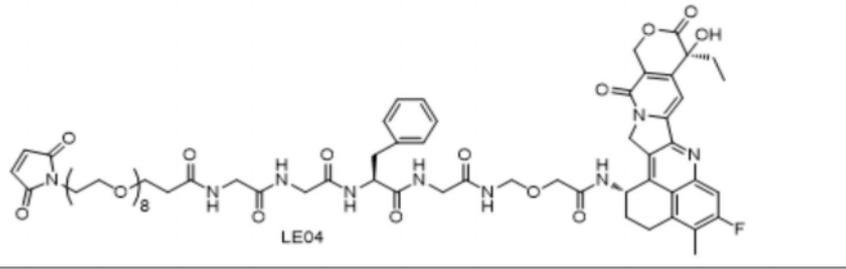
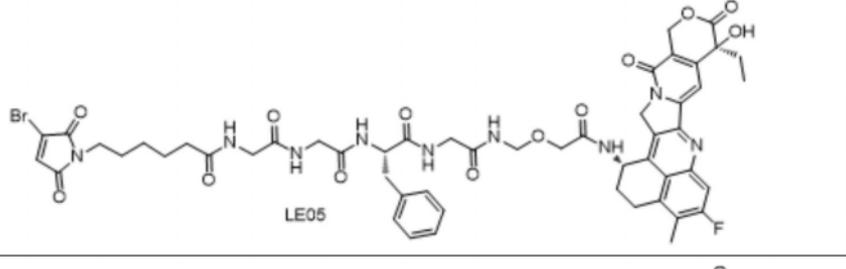
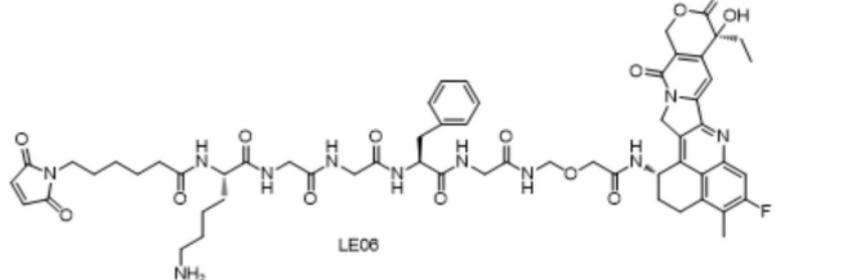
[0235] 本发明所用的连接基药物偶联物LE00和LE01-LE24结构如表5所示, 其中LE00 (GGFG-Dxd) 参照W02015146132A报道的方法合成而得, LE01-LE24参照W02020259258A1报道的方法合成而得。

[0236] 表5. 连接基药物偶联物结构

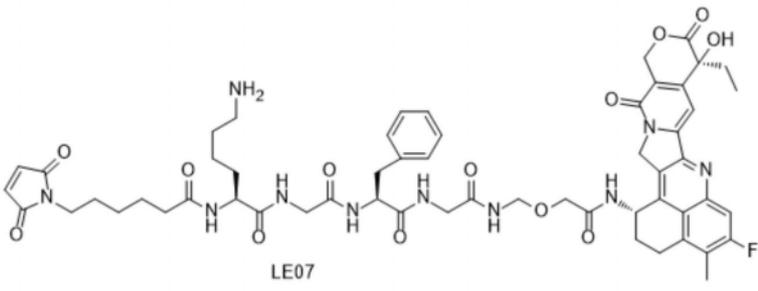
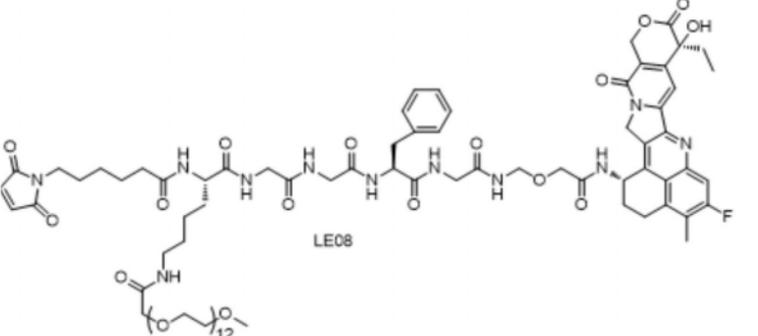
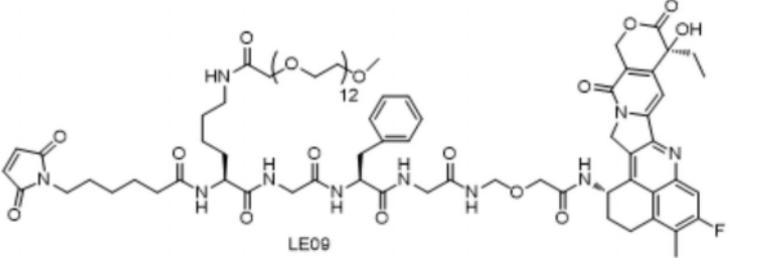
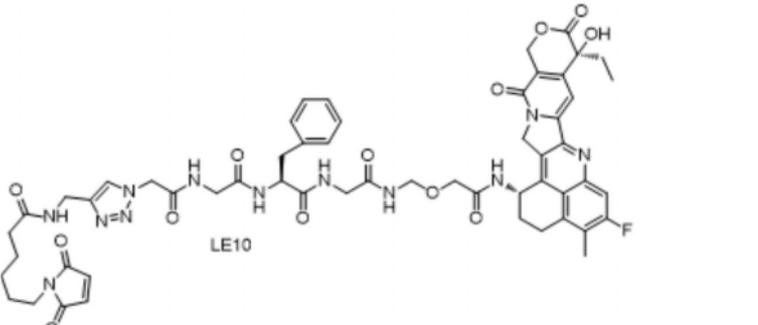
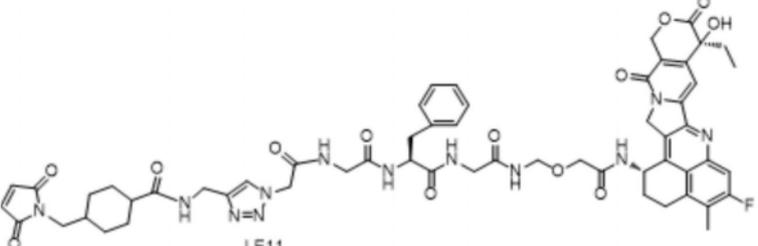
[0237]

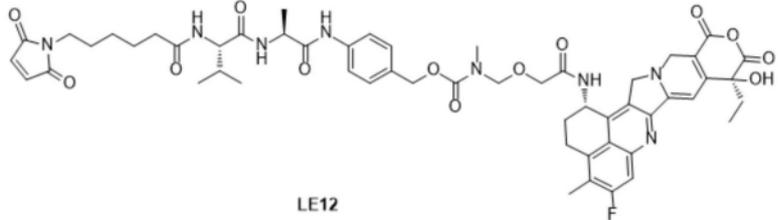
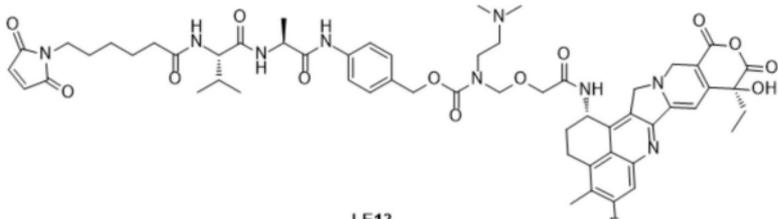
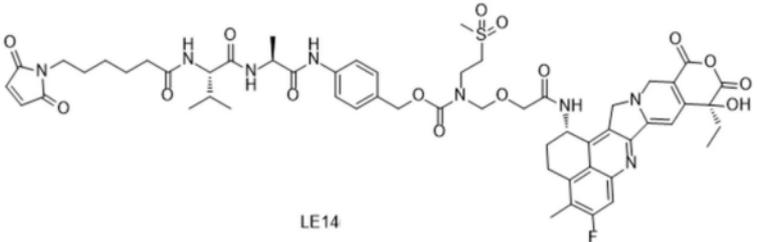
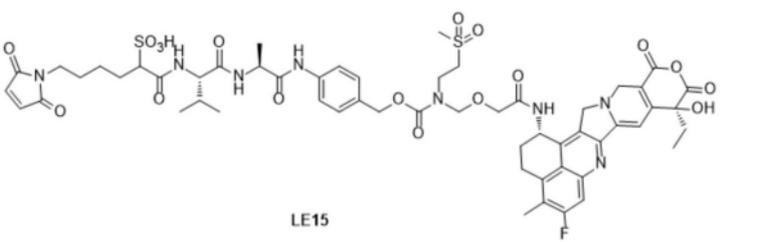
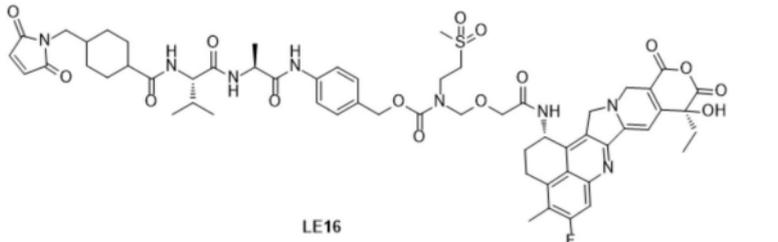
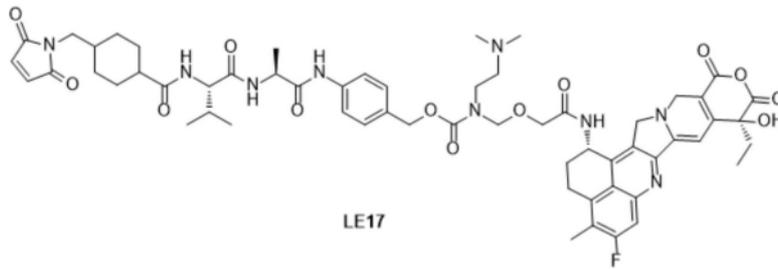
连接基药物偶联物	参照合成方法
 <p>LE00</p>	WO2015146132A 1 实施例 7
 <p>LE01</p>	WO2020259258A 1 实施例 1

[0238]

 <p>Chemical structure of LE02: A long-chain molecule consisting of a succinimide ring connected to a chain of amide linkages. The chain includes a sulfonamide group (-SO<sub>3</sub>H), a benzamide group, and a complex heterocyclic system with a fluorine atom and a hydroxyl group.</p>	WO2020259258A 1 实施例 2
 <p>Chemical structure of LE03: Similar to LE02, but the sulfonamide group is replaced by a primary amine group (-NH<sub>2</sub>).</p>	WO2020259258A 1 实施例 2
 <p>Chemical structure of LE04: Similar to LE02, but the succinimide ring is part of a polyether chain with a repeating unit of 8 units.</p>	WO2020259258A 1 实施例 2
 <p>Chemical structure of LE05: Similar to LE02, but the succinimide ring has a bromine atom at the 2-position.</p>	WO2020259258A 1 实施例 2
 <p>Chemical structure of LE06: Similar to LE02, but the succinimide ring has a primary amine group (-NH<sub>2</sub>) at the 2-position.</p>	WO2020259258A 1 实施例 2

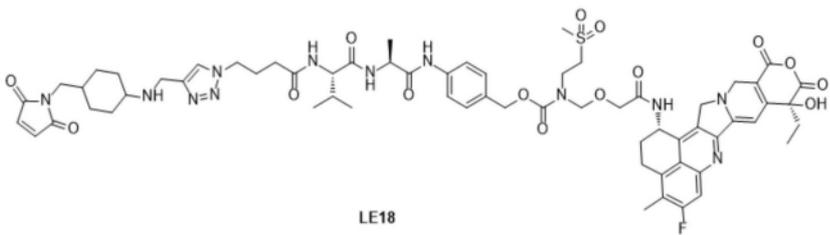
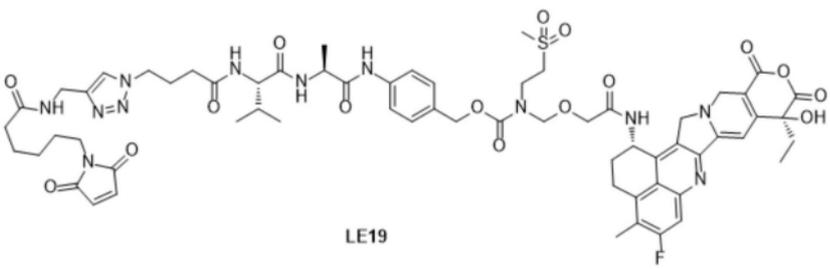
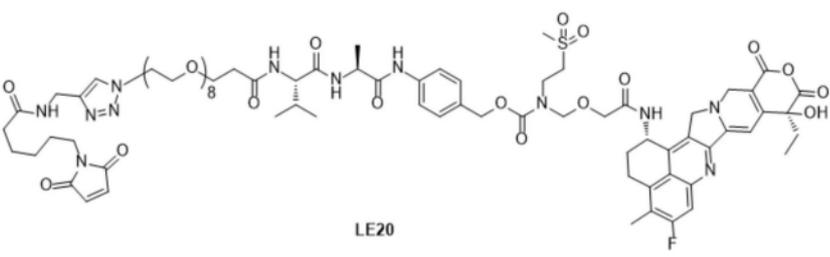
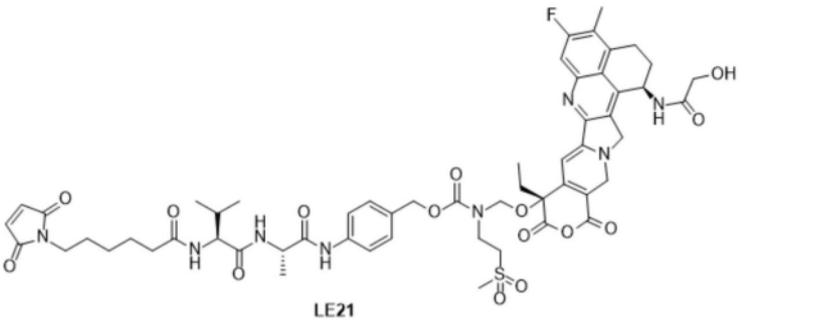
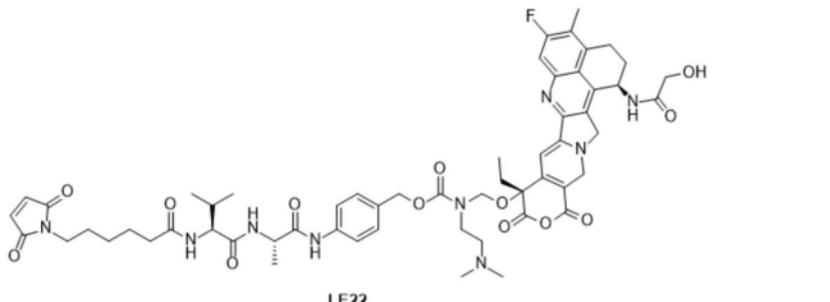
[0239]

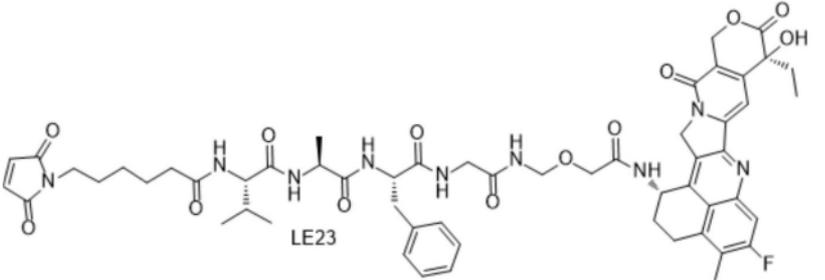
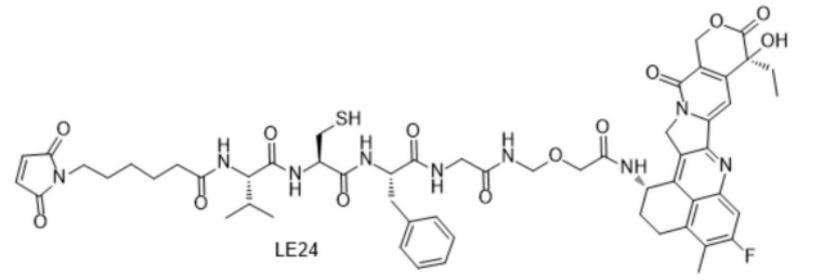
 <p style="text-align: center;">LE07</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 2</p>
 <p style="text-align: center;">LE08</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 2</p>
 <p style="text-align: center;">LE09</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 4</p>
 <p style="text-align: center;">LE10</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 4</p>
 <p style="text-align: center;">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>LE15</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>
 <p>LE16</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>
 <p>LE17</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>

[0240]

[0241]

 <p>LE18</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>
 <p>LE19</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>
 <p>LE20</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 7</p>
 <p>LE21</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 8</p>
 <p>LE22</p>	<p>WO2020259258A 1 实施例 8</p>

[0242]	 <p style="text-align: center;">LE23</p>	WO2020259258A 1 实施例 5
[0242]	 <p style="text-align: center;">LE24</p>	WO2020259258A 1 实施例 5

[0243] 实施例11. 抗体与连接基药物偶联物偶联制备ADC

[0244] 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50mM PB/1.0mM 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°C搅拌反应0.5个hr, 反应完成后, 使用0.22μm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50mM PB/1.0mM EDTA溶液 (pH 6.0), 纯化后添加终浓度6%蔗糖放置于-20°C冰箱中保存。使用UV法分别在280nm和370nm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Dxd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。

[0245] 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 Dxd 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%
[0246] 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%

[0247] 实施例12. ADC样品体外细胞毒活性评价

[0248] 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 $\mu\text{l}$ /孔加入到接种细胞的培养板内,置于37 $^{\circ}\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$ 培养箱培养144小时后加入CellTiter-Glo $^{\text{®}}$  Luminescent Cell Viability Assay Reagent (50 $\mu\text{l}$ /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。

[0249] 表7. 候选抗体的ADC体外杀伤DLL3/HEK293细胞的IC<sub>50</sub>值与最大杀伤率统计汇总

[0250]

样品名称	IC <sub>50</sub> (μg/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 <sup>1</sup>	95.1 <sup>2</sup>
-------------	--------------------	-------------------

[0251] <sup>1</sup>和<sup>2</sup>:均为平均值。

[0252] 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。

[0253] 实施例13.ADC药物在NCI-H82模型中的体内抗肿瘤活性

[0254] 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)右侧后背部皮下注射溶于200ul Matrigel的 $5 \times 10^6$ 人源小细胞肺癌细胞(NCI-H82),待肿瘤生长至平均体积140mm<sup>3</sup>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2773mm<sup>3</sup>,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486mm<sup>3</sup>,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305mm<sup>3</sup>。测试药2.5mg/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607mm<sup>3</sup>,测试药5mg/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245mm<sup>3</sup>。测试药2.5mg/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715mm<sup>3</sup>,测试药5mg/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293mm<sup>3</sup>。测试药2.5mg/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1322mm<sup>3</sup>,测试药5mg/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441mm<sup>3</sup>。测试药2.5mg/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945mm<sup>3</sup>,测试药5mg/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433mm<sup>3</sup>。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564mm<sup>3</sup>,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245mm<sup>3</sup>。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2268mm<sup>3</sup>,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1553mm<sup>3</sup>。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。

[0255] 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

[0257] 实施例14. ADC药物在NCI-H209模型中的体内抗肿瘤活性

[0258] 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 $1 \times 10^7$ 人源小细胞肺癌细胞(NCI-H209),待肿瘤生长至平均体积 $150\text{mm}^3$ 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 $1.5\text{mg/kg}$ 、 $2.5\text{mg/kg}$ 和 $5.0\text{mg/kg}$ , 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 $2006\text{mm}^3$ ,  $1.5\text{mg/kg}$ 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 $0\text{mm}^3$ ,  $2.5\text{mg/kg}$ 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 $0\text{mm}^3$ ,  $5\text{mg/kg}$ 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 $0\text{mm}^3$ 。 $1.5\text{mg/kg}$ 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 $0\text{mm}^3$ ,  $2.5\text{mg/kg}$ 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 $0\text{mm}^3$ ,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 $0\text{mm}^3$ 。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。

[0259] 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

[0261] 实施例15.ADC药物在小鼠中的毒性评价

[0262] 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、500mg/kg和640mg/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640mg/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、512mg/kg、640mg/kg、800mg/kg和1000mg/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1000mg/kg组中有5只小鼠(每组共10只小鼠)死亡,800mg/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。

[0263] 实施例16.ADC药物在大鼠中的毒性评价

[0264] 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。

[0265] 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。

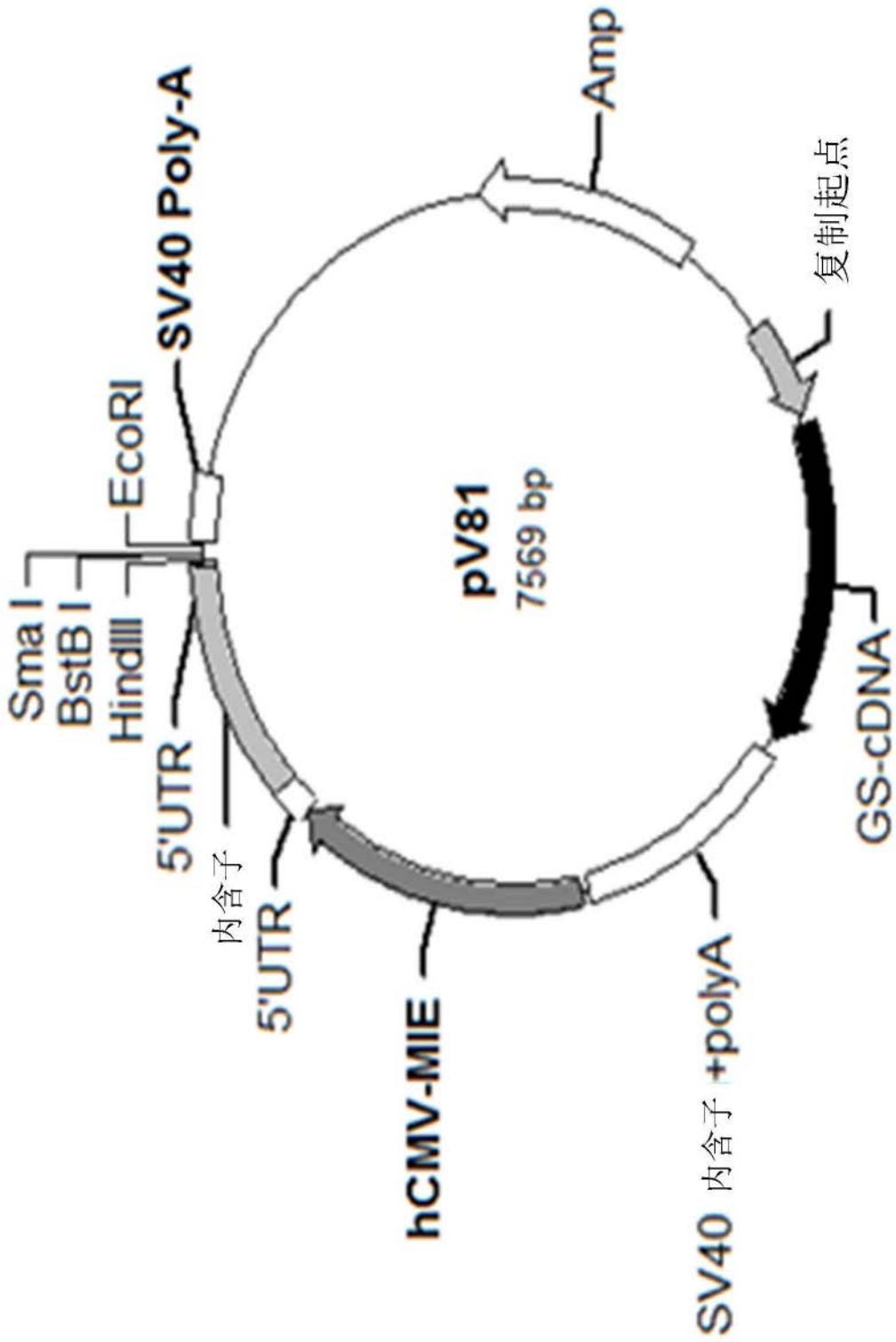


图1

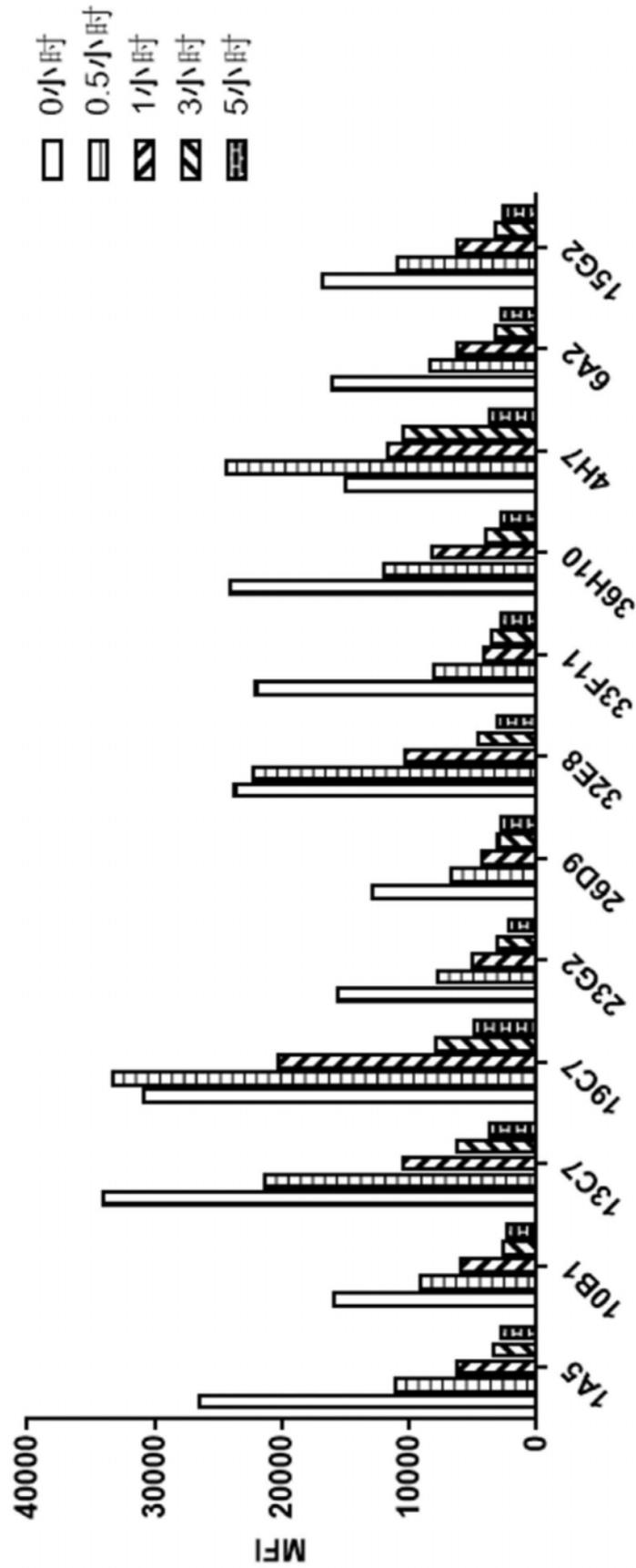


图2

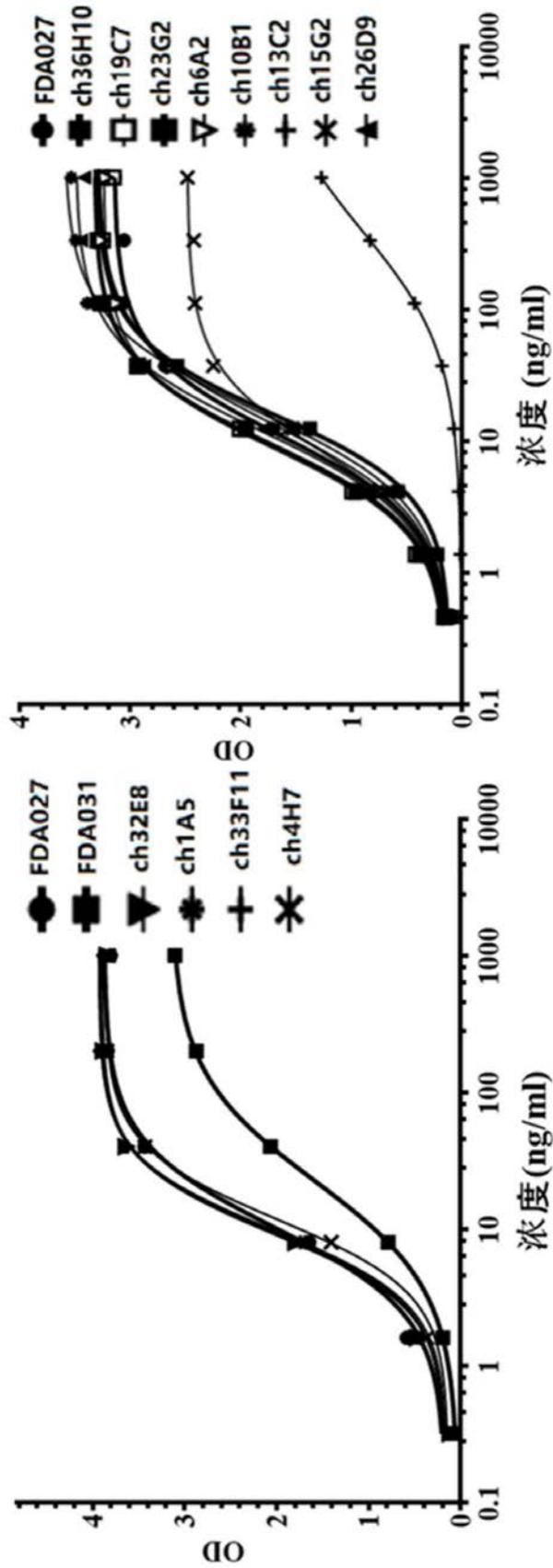


图3

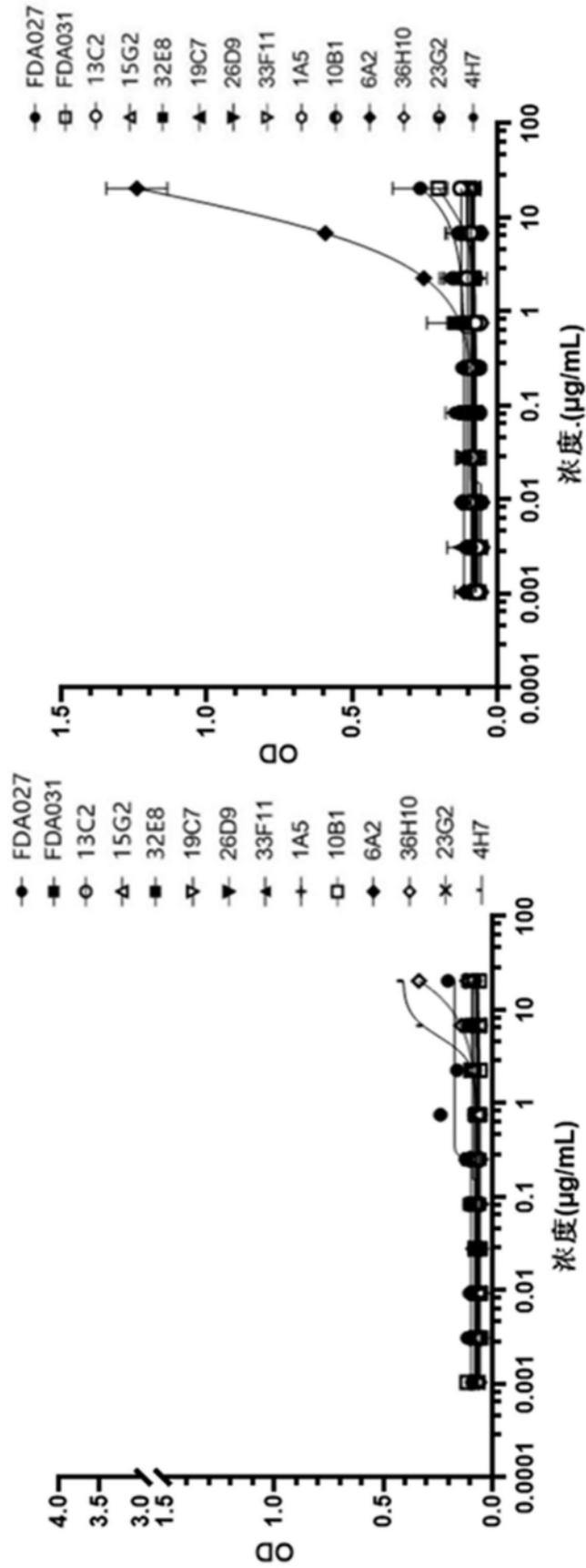


图4

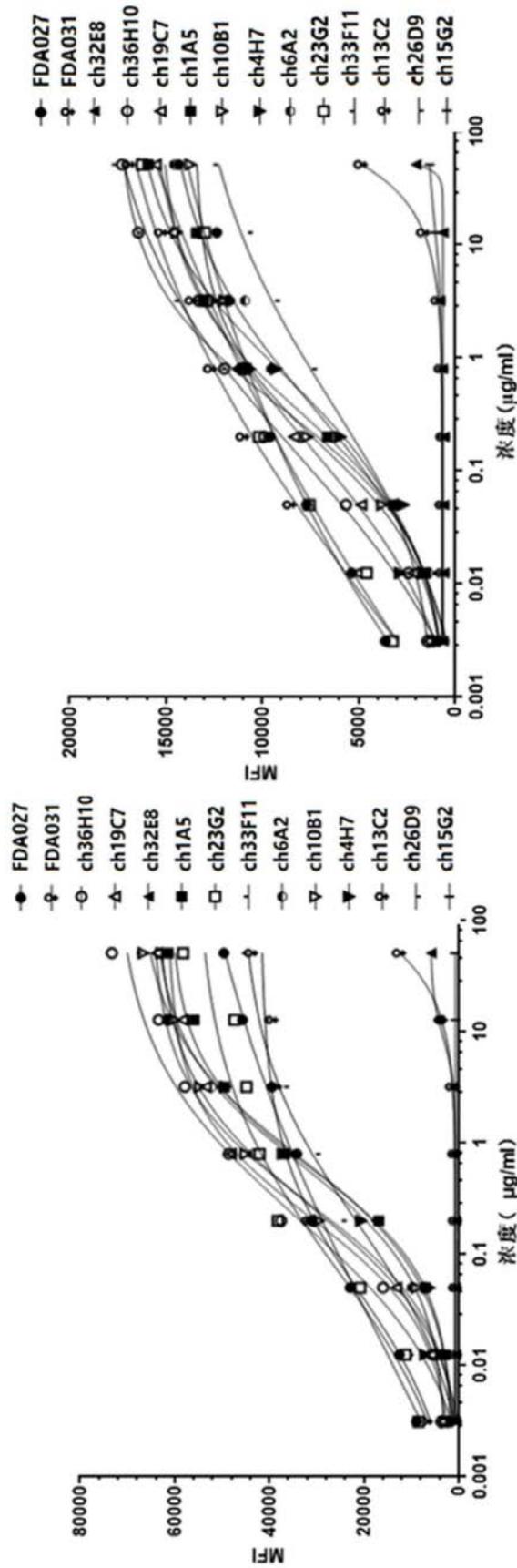


图5

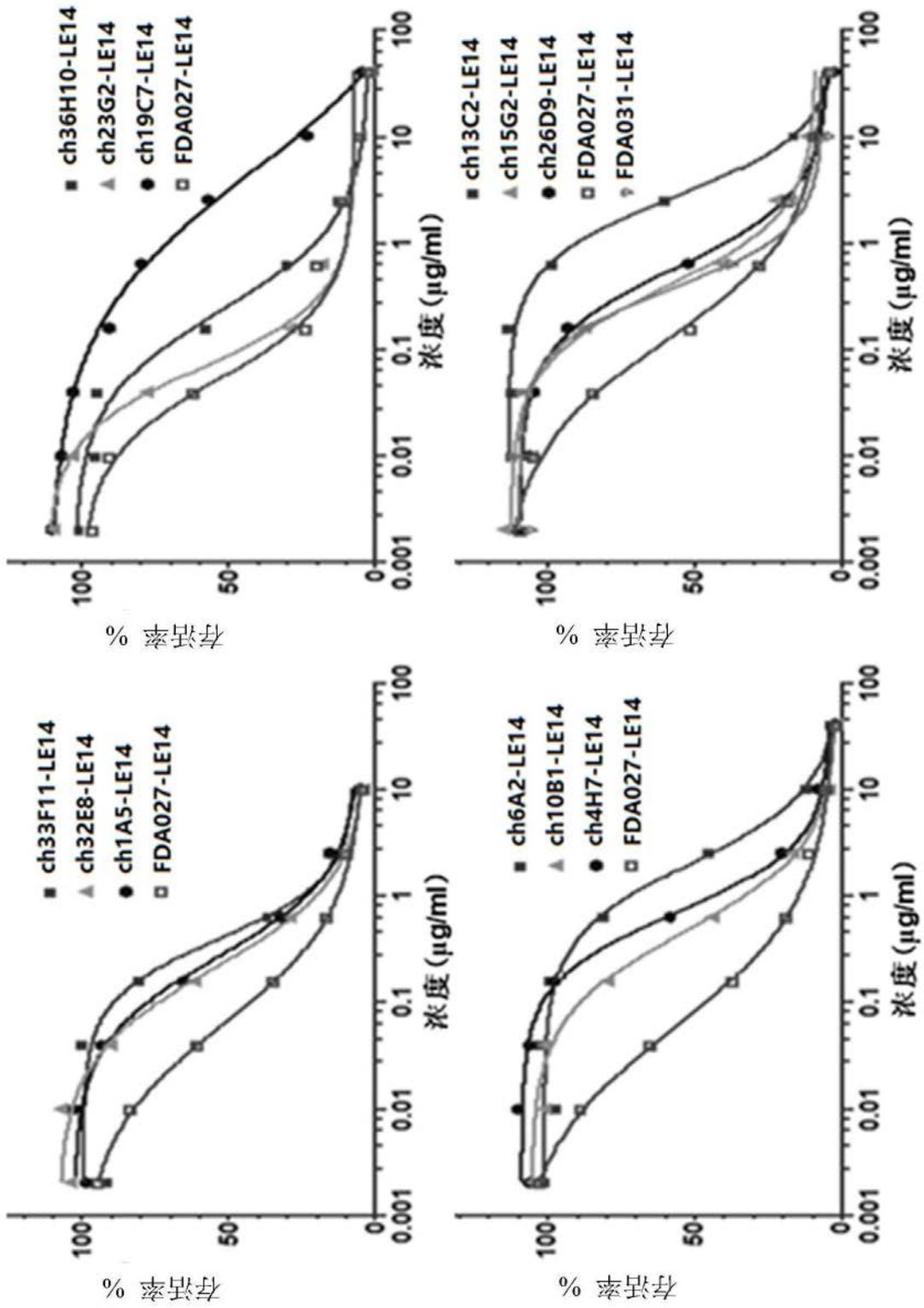


图6

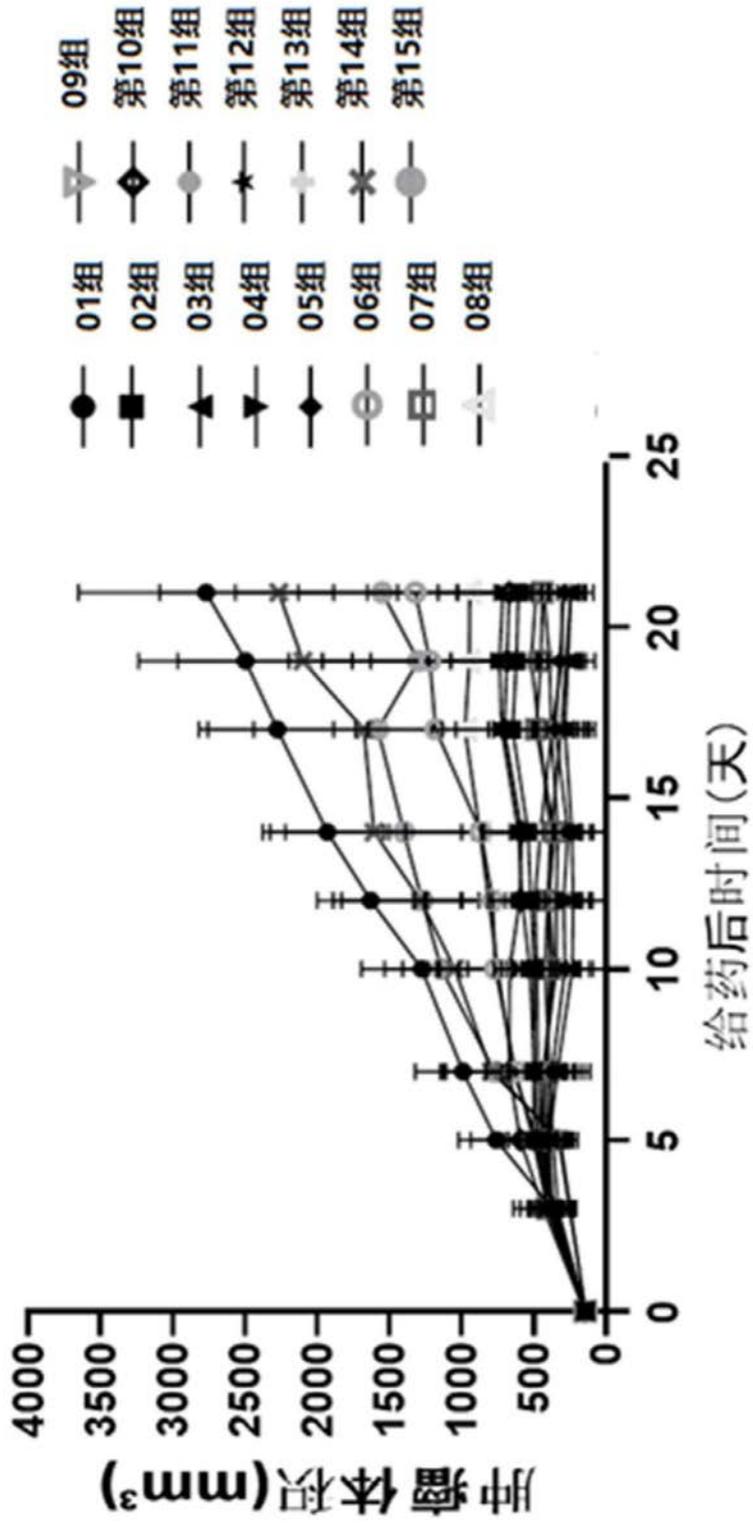


图7