



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119499365 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 25

(21) 申请号 202411429697.4

(22) 申请日 2019.06.07

(30) 优先权数据

18176888.8 2018.06.09 EP

18176889.6 2018.06.09 EP

19159321.9 2019.02.26 EP

(62) 分案原申请数据

201980051335.7 2019.06.07

(71) 申请人 勃林格殷格翰国际有限公司

地址 德国殷格翰

(72) 发明人 S·希普 P·亚当

M·吉列夫斯基 R·加内桑

P·N·戈尔曼 普里扬卡·古普塔

潘卡·古普塔 J·舍尔

V·H·沃伊诺夫

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

权利要求书2页 说明书121页

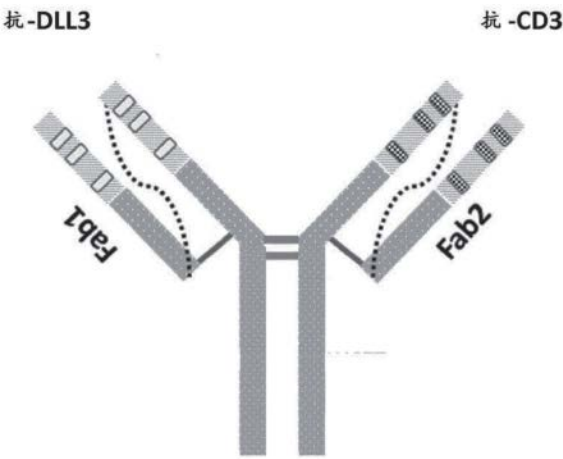
序列表(电子公布) 附图36页

(54) 发明名称

用于治疗癌症的DLL3/CD3结合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及DLL3/CD3结合蛋白。本发明亦涉及此类蛋白或其组合物的用途,尤其出于治疗目的用于癌症疾病领域中的用途。



1. 一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者给予治疗有效量的蛋白质,所述蛋白质包含与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元及与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其中该与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元选自由i)至xviii)组成的群:

i) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1(CDR1)、SEQ ID NO:2(CDR2)及SEQ ID NO:3(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:4(CDR1)、SEQ ID NO:5(CDR2)及SEQ ID NO:6(CDR3)的重链CDR;

ii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:7(CDR1)、SEQ ID NO:8(CDR2)及SEQ ID NO:9(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:10(CDR1)、SEQ ID NO:11(CDR2)及SEQ ID NO:12(CDR3)的重链CDR;

iii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:13(CDR1)、SEQ ID NO:14(CDR2)及SEQ ID NO:15(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:16(CDR1)、SEQ ID NO:17(CDR2)及SEQ ID NO:18(CDR3)的重链CDR;

iv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:19(CDR1)、SEQ ID NO:20(CDR2)及SEQ ID NO:21(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:22(CDR1)、SEQ ID NO:23(CDR2)及SEQ ID NO:24(CDR3)的重链CDR;

v) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:25(CDR1)、SEQ ID NO:26(CDR2)及SEQ ID NO:27(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:28(CDR1)、SEQ ID NO:29(CDR2)及SEQ ID NO:30(CDR3)的重链CDR;

vi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:31(CDR1)、SEQ ID NO:32(CDR2)及SEQ ID NO:33(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:34(CDR1)、SEQ ID NO:35(CDR2)及SEQ ID NO:36(CDR3)的重链CDR;

vii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:133(CDR1)、SEQ ID NO:134(CDR2)及SEQ ID NO:135(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:136(CDR1)、SEQ ID NO:137(CDR2)及SEQ ID NO:138(CDR3)的重链CDR;

viii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:139(CDR1)、SEQ ID NO:140(CDR2)及SEQ ID NO:141(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:142(CDR1)、SEQ ID NO:143(CDR2)及SEQ ID NO:144(CDR3)的重链CDR;

ix) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:145(CDR1)、SEQ ID NO:146(CDR2)及SEQ ID NO:147(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:148(CDR1)、SEQ ID NO:149(CDR2)及SEQ ID NO:150(CDR3)的重链CDR;

x) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:151(CDR1)、SEQ ID NO:152(CDR2)及SEQ ID NO:153(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:154(CDR1)、SEQ ID NO:155(CDR2)及SEQ ID NO:156(CDR3)的重链CDR;

xi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:157(CDR1)、SEQ ID NO:158(CDR2)及SEQ ID NO:159(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:160(CDR1)、SEQ ID NO:161(CDR2)及SEQ ID NO:162(CDR3)的重链CDR;

xii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:163(CDR1)、SEQ ID NO:164(CDR2)及SEQ ID NO:165(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:166(CDR1)、SEQ ID NO:167(CDR2)及SEQ ID NO:168(CDR3)的重链CDR;

xiii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:169(CDR1)、SEQ ID NO:170(CDR2)及SEQ ID NO:171(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:172(CDR1)、SEQ ID NO:173(CDR2)及SEQ ID NO:174(CDR3)的重链CDR;

xiv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:175(CDR1)、SEQ ID NO:176(CDR2)及SEQ ID NO:177(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:178(CDR1)、SEQ ID NO:179(CDR2)及SEQ ID NO:180(CDR3)的重链CDR;

xv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:181(CDR1)、SEQ ID NO:182(CDR2)及SEQ ID NO:183(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:184(CDR1)、SEQ ID NO:185(CDR2)及SEQ ID NO:186(CDR3)的重链CDR;

xvi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:187(CDR1)、SEQ ID NO:188(CDR2)及SEQ ID NO:189(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:190(CDR1)、SEQ ID NO:191(CDR2)及SEQ ID NO:192(CDR3)的重链CDR;

xvii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:193(CDR1)、SEQ ID NO:194(CDR2)及SEQ ID NO:195(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:196(CDR1)、SEQ ID NO:197(CDR2)及SEQ ID NO:198(CDR3)的重链CDR;以及

xviii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:199(CDR1)、SEQ ID NO:200(CDR2)及SEQ ID NO:201(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:202(CDR1)、SEQ ID NO:203(CDR2)及SEQ ID NO:204(CDR3)的重链CDR。

2. 如权利要求1的方法,其中该癌症为表达DLL3的肿瘤,优选地其中该癌症为SCLC、神经胶质瘤或表达DLL3的神经内分泌肿瘤。

3. 如权利要求1或2的方法,其中该蛋白质与以下组合使用:化学治疗剂、抑制血管生成的治疗活性化合物、信号转导路径抑制剂、EGFR抑制剂、免疫调节物、免疫检查点抑制剂或激素疗法药剂。

4. 如权利要求3的方法,其中该蛋白质与免疫检查点抑制剂(优选为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)组合。

5. 如权利要求4的方法,其中该抗PD-1抗体选自由PD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4及PD1-5组成的群。

用于治疗癌症的DLL3/CD3结合蛋白

[0001] 本申请是申请日为2019年6月7日、申请号为201980051335.7的中国专利申请的分案申请。

发明背景

技术领域

[0003] 本发明涉及多特异性结合蛋白,其包含对DLL3具有特异性的第一抗原结合单元及对CD3具有特异性的第二抗原结合单元。本发明亦涉及编码此类结合蛋白的核酸;用于制备此类结合蛋白的方法;表达或能够表达此类结合蛋白的宿主细胞;包含此类结合蛋白的组合物及此类结合蛋白或此类组合物的用途,尤其出于治疗目的用于癌症疾病领域的用途。

背景技术

[0004] DLL3属于Notch配位体家族的I型跨膜蛋白。DLL3主要参与体节发生,其中相比于位于细胞表面上的其他DLL家族成员DLL1及DLL4,其主要位于高基氏体且充当Notch信号传导的抑制剂。仅在过表达DLL3的癌细胞中,一些DLL3分子逃逸至细胞表面(Dylla, Molecular&Cellular Oncology 2016,第3卷,第2期)。通过使用若干方法已将DLL3鉴别为肿瘤特异性目标,例如肿瘤组织的LC/MS分析(WO 2014/125273)、RNA定序(WO 2017/021349)及免疫组织化学(Saunders等人,Sci Transl Med.2015年8月26日;7(302):302ra136;Saunders等人,AACR 2017;WO 2013/126746)分析。

[0005] DLL3表达已在神经内分泌肿瘤中有所描述,诸如大细胞神经内分泌癌(large cell neuroendocrine carcinoma;LCNEC)、小细胞肺癌(small cell lung cancer;SCLC)、神经内分泌前列腺癌、神经内分泌胰脏癌及神经胶母细胞瘤(Saunders等人,Sci Transl Med.2015年8月26日;7(302):302ra136;Saunders等人,AACR 2017)。

[0006] SCLC表示具有极高医疗需求的适应症。SCLC占肺癌诊断的13%且相比NSCLC预后较差。这些癌症的常规治疗主要包括化学疗法、放射疗法、手术或其组合,尚不存在可用的靶向疗法。尽管对化学疗法的初始响应率较高,但许多患者迅速复发化疗抗性疾病,因此不存在可用的治疗选择。尽管在过去几年这些癌症治疗已有所改善,但这些肿瘤类型的总存活率仍未改变,因此,对更具针对性及强效的疗法的需求仍未满足。

[0007] 一种靶向疗法方法由抗体药结合物(ADC)提供,然而,对于DLL3而言,此策略由于DLL3的低细胞表面表达及对化学疗法的高抵抗率而并非优选的。因为大多数患者在化学疗法治疗之后复发且由于DLL3在细胞表面上的低表达,用ADC靶向DLL3可能具有限制。另外,ADC方法常常因接头不稳定性或降解而具有由自由态药物引起的脱靶毒性。

[0008] 已尝试将DLL3靶向与其他蛋白质的靶向组合。举例而言,WO2017/021349描述一种双特异性抗体构建体,其组合与靶细胞表面上的人类DLL3结合及与T细胞表面上的人类CD3。然而,尚未证明此类方法能否成功且迄今没有SCLC及神经胶母细胞瘤以及其他表达DLL3的肿瘤的靶向疗法可供使用。

[0009] 鉴于此类癌症患者的较差前景,需要鉴别更加有效的疗法,尤其具有改善的耐受

性的有效疗法。因此,本发明之一目标为提供药理学活性剂、组合物及/或治疗方法,其相比于目前使用及/或本领域中已知的药剂、组合物及/或方法提供某些优势。这些优势包括活体内功效、改善的治疗及药理学特性、特异性增加、改善的安全概况、副作用较少、免疫原性降低,及其他有利特性,诸如改善的制备容易性或降低的商品成本、较高的稳定性/较长的半衰期、对给药方案的需求频率较少,尤其相比于本领域中已知的候选药物。

发明内容

[0010] 本发明为基于一种双特异性T细胞接合方法,其采用多特异性结合蛋白,所述多特异性结合蛋白具有与T细胞上的CD3结合的结合臂及与肿瘤细胞的细胞表面上的DLL3结合的结合臂。经由与T细胞及肿瘤细胞的同时结合,T细胞接合剂迫使在两个细胞之间形成溶细胞突触且因此选择性地重导向对靶向肿瘤细胞的T细胞活性。

[0011] 在一个方面中,本发明提供多特异性结合蛋白,其包含与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元及与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,该与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元选自由i)至xviii)组成的群:

[0012] i) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1(CDR1)、SEQ ID NO:2(CDR2)及SEQ ID NO:3(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:4(CDR1)、SEQ ID NO:5(CDR2)及SEQ ID NO:6(CDR3)的重链CDR;

[0013] ii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:7(CDR1)、SEQ ID NO:8(CDR2)及SEQ ID NO:9(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:10(CDR1)、SEQ ID NO:11(CDR2)及SEQ ID NO:12(CDR3)的重链CDR;

[0014] iii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:13(CDR1)、SEQ ID NO:14(CDR2)及SEQ ID NO:15(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:16(CDR1)、SEQ ID NO:17(CDR2)及SEQ ID NO:18(CDR3)的重链CDR;

[0015] iv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:19(CDR1)、SEQ ID NO:20(CDR2)及SEQ ID NO:21(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:22(CDR1)、SEQ ID NO:23(CDR2)及SEQ ID NO:24(CDR3)的重链CDR;

[0016] v) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:25(CDR1)、SEQ ID NO:26(CDR2)及SEQ ID NO:27(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:28(CDR1)、SEQ ID NO:29(CDR2)及SEQ ID NO:30(CDR3)的重链CDR;

[0017] vi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:31(CDR1)、SEQ ID NO:32(CDR2)及SEQ ID NO:33(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:34(CDR1)、SEQ ID NO:35(CDR2)及SEQ ID NO:36(CDR3)的重链CDR;

[0018] vii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:133(CDR1)、SEQ ID NO:134(CDR2)及SEQ ID NO:135(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:136(CDR1)、SEQ ID NO:137(CDR2)及SEQ ID NO:138(CDR3)的重链CDR;

[0019] viii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:139(CDR1)、SEQ ID NO:140(CDR2)及SEQ ID NO:141(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:142(CDR1)、SEQ ID NO:143(CDR2)及SEQ ID NO:144(CDR3)的重链CDR;

[0020] ix) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:145(CDR1)、SEQ ID

NO:146 (CDR2) 及SEQ ID NO:147 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:148 (CDR1)、SEQ ID NO:149 (CDR2) 及SEQ ID NO:150 (CDR3) 的重链CDR;

[0021] x) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:151 (CDR1)、SEQ ID NO:152 (CDR2) 及SEQ ID NO:153 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:154 (CDR1)、SEQ ID NO:155 (CDR2) 及SEQ ID NO:156 (CDR3) 的重链CDR;

[0022] xi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:157 (CDR1)、SEQ ID NO:158 (CDR2) 及SEQ ID NO:159 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:160 (CDR1)、SEQ ID NO:161 (CDR2) 及SEQ ID NO:162 (CDR3) 的重链CDR;

[0023] xii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:163 (CDR1)、SEQ ID NO:164 (CDR2) 及SEQ ID NO:165 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:166 (CDR1)、SEQ ID NO:167 (CDR2) 及SEQ ID NO:168 (CDR3) 的重链CDR;

[0024] xiii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:169 (CDR1)、SEQ ID NO:170 (CDR2) 及SEQ ID NO:171 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:172 (CDR1)、SEQ ID NO:173 (CDR2) 及SEQ ID NO:174 (CDR3) 的重链CDR;

[0025] xiv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:175 (CDR1)、SEQ ID NO:176 (CDR2) 及SEQ ID NO:177 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:178 (CDR1)、SEQ ID NO:179 (CDR2) 及SEQ ID NO:180 (CDR3) 的重链CDR;

[0026] xv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:181 (CDR1)、SEQ ID NO:182 (CDR2) 及SEQ ID NO:183 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:184 (CDR1)、SEQ ID NO:185 (CDR2) 及SEQ ID NO:186 (CDR3) 的重链CDR;

[0027] xvi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:187 (CDR1)、SEQ ID NO:188 (CDR2) 及SEQ ID NO:189 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:190 (CDR1)、SEQ ID NO:191 (CDR2) 及SEQ ID NO:192 (CDR3) 的重链CDR;

[0028] xvii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:193 (CDR1)、SEQ ID NO:194 (CDR2) 及SEQ ID NO:195 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:196 (CDR1)、SEQ ID NO:197 (CDR2) 及SEQ ID NO:198 (CDR3) 的重链CDR;以及

[0029] xviii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:199 (CDR1)、SEQ ID NO:200 (CDR2) 及SEQ ID NO:201 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:202 (CDR1)、SEQ ID NO:203 (CDR2) 及SEQ ID NO:204 (CDR3) 的重链CDR。

[0030] 在本发明的结合蛋白的一些实施方案中,与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元包含第一轻链可变域及第一重链可变域且选自由i)至xviii)组成的群:

[0031] i) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的重链可变域;

[0032] ii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的重链可变域;

[0033] iii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的重链可变域;

[0034] iv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:43的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的重链可变域;

[0035] v) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的重链可变域;

[0036] vi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的重链可变域;

[0037] vii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:205的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:206的重链可变域;

[0038] viii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:207的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:208的重链可变域;

[0039] ix) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:209的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:210的重链可变域;

[0040] x) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:211的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:212的重链可变域;

[0041] xi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:213的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:214的重链可变域;

[0042] xii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:215的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:216的重链可变域;

[0043] xiii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:217的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:218的重链可变域;

[0044] xiv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:219的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:220的重链可变域;

[0045] xv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:221的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:222的重链可变域;

[0046] xvi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:223的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:224的重链可变域;

[0047] xvii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:225的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:226的重链可变域;以及

[0048] xviii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:227的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:228的重链可变域。

[0049] 在本发明的结合蛋白的一些实施方案中,与CD3特异性结合的第二抗原结合单元选自自由i)至iii)组成的群:

[0050] i) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:55 (CDR1)、SEQ ID NO:56 (CDR2) 及SEQ ID NO:57 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:58 (CDR1)、SEQ ID NO:59 (CDR2) 及SEQ ID NO:60 (CDR3) 的重链CDR;

[0051] ii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:61 (CDR1)、SEQ ID NO:62 (CDR2) 及SEQ ID NO:63 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:64 (CDR1)、SEQ ID NO:65 (CDR2) 及SEQ ID NO:66 (CDR3) 的重链CDR;以及

[0052] iii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:96 (CDR1)、SEQ ID NO:97 (CDR2) 及SEQ ID NO:98 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:99 (CDR1)、SEQ ID NO:100 (CDR2) 及SEQ ID NO:101 (CDR3) 的重链CDR。

[0053] 在本发明的结合蛋白的一些实施方案中,与CD3特异性结合的第二抗原结合单元包含第二轻链可变域及第二重链可变域且选自由以下组成的群:

[0054] i) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:67的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:68的重链可变域;

[0055] ii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的重链可变域;以及

[0056] iii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的重链可变域。

[0057] 在本发明的一些实施方案中,与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元自其N端至C端包含:第一轻链可变域、第一轻链恒定域、第一肽接头、第一重链可变域及第一重链恒定CH1域;且与CD3特异性结合的第二抗原结合单元自其N端至C端包含:第二轻链可变域、第二轻链恒定域、第二肽接头、第二重链可变域及第二重链恒定CH1域。在本发明的一些实施方案中,第一及/或第二肽接头包含26至42个氨基酸,优选30至40个氨基酸中的任一者,34至40个氨基酸,或36至39个氨基酸,更优选地38个氨基酸。在本发明的一些实施方案中,第一接头及/或第二接头为Gly-Ser接头,其优选地包含氨基酸序列SEQ ID NO:89,更优选地该第一及第二肽接头包含相同序列。

[0058] 在一些实施方案中,本发明的结合蛋白进一步包含第一及第二Fc域,该第一Fc域共价连接至该第一抗原结合单元,且该第二Fc域共价连接至该第二抗原结合单元。

[0059] 在本发明的一些实施方案中,

[0060] i) 该第一Fc域包含在位置366处的酪氨酸(Y) [T366Y],且该第二Fc域包含在位置407处的苏氨酸(T) [Y407T],或

[0061] ii) 该第一Fc域包含在位置366处的色氨酸(W) [T366W],且该第二Fc域包含在位置366处的丝氨酸(S) [T366S]、在位置368处的丙氨酸(A) [L368A]及在位置407处的缬氨酸(V) [Y407V],或

[0062] iii) 该第二Fc域包含在位置366处的酪氨酸(Y) [T366Y],且该第一Fc域包含在位置407处的苏氨酸(T) [Y407T],或

[0063] iv) 该第二Fc域包含在位置366处的色氨酸(W) [T366W],且该第一Fc域包含在位置366处的丝氨酸(S) [T366S]、在位置368处的丙氨酸(A) [L368A]及在位置407处的缬氨酸(V) [Y407V],

[0064] 优选地该第一或该第二Fc域进一步包含在位置435处的精氨酸[H435R]及在位置436处的苯丙氨酸[Y436F]。在一些实施方案中,第一及/或第二Fc域进一步包含在位置234处的丙氨酸[L234A]及在位置235处的丙氨酸[L235A]。在一些实施方案中,第一轻链恒定域及第二轻链恒定域包含人类K或λ域。

[0065] 在优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含:与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含选自由以下组成的群的氨基酸序列:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251及SEQ ID NO:252;及与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:105。

[0066] 在另一方面中,本发明提供分离的核酸分子,其i)编码本发明的蛋白质的第一抗原结合单元及/或第二抗原结合单元,任选进一步编码第一及/或第二Fc域,或ii)编码本发明的蛋白质的第一及/或第二多肽链。本文提供的其他方面为包含本发明的核酸分子的表达载体、经此类表达载体转染的宿主细胞,及制造本发明的蛋白质的方法。

[0067] 在本发明的另一方面中,本文提供一种多特异性结合蛋白,其包含与DLL3特异性结合的第一多肽链及与CD3特异性结合的第二多肽链,其中该第一多肽链包含第一轻链、第一接头及第一重链且该第二多肽链包含第二轻链、第二接头及第二重链,优选地该第一轻链的C端经由该第一肽接头共价键结至该第一重链的N端且该第二轻链的C端经由该第二肽接头共价键结至该第二重链的N端。

[0068] 在本发明的结合蛋白的一些实施方案中,与DLL3特异性结合的第一多肽链包含轻链可变域及重链可变域,该轻链可变域及重链可变域包含如对于本文所描述的DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18的抗原结合单位所定义的CDR序列及/或VH/VL序列。在一些实施方案中,与CD3特异性结合的第二多肽链包含轻链可变域及重链可变域,该轻链可变域及重链可变域包含如对于本文所描述的CD3#1、CD3#2或CD3#3的抗原结合单位所定义的CDR序列及/或VH/VL序列。

[0069] 涉及本发明的结合蛋白的其他方面、实施方案、用途及方法将由以下本发明的实施方式及随附权利要求而变得清楚。

[0070] 本发明提供结合蛋白,其允许更高效治疗表达DLL3的癌症,诸如SCLC、神经胶质瘤或表达DLL3的神经内分泌肿瘤。

附图说明

[0071] 图1:本发明的双特异性结合蛋白的示意图

[0072] 图2:用于表位域定位(mapping)的在HEK293细胞上表达的DLL3全长蛋白质及DLL3域构建体的示意图。对于DLL3域构建体,跨膜及胞内域来源于EpCAM。

[0073] 图3A:七种例示性DLL3/CD3结合蛋白的DLL3表位域定位。例示性DLL3/CD3结合蛋白识别DLL3的近膜肽EGF4、EGF1及DSL域。y轴描绘计数,x轴描绘PE-A(藻红素信号区)。DLL3/CD3结合蛋白与表位结构域的对应关系如下:

DLL3/CD3 结合蛋白	表位结构域
DLL3#1/CD3#1	膜近侧肽
DLL3#2/CD3#1	膜近侧肽
DLL3#3/CD3#1	膜近侧肽
DLL3#3/CD3#2	膜近侧肽
DLL3#4/CD3#1	EGF4
DLL3#5/CD3#1	EGF1
DLL3#6/CD3#1	DSL

[0075] 图3B:六种例示性DLL3/CD3结合蛋白的DLL3表位域定位。例示性DLL3/CD3结合蛋白识别DLL3的EGF1、EGF3、EGF4或EGF6。y轴描绘计数,x轴描绘PE-A(藻红素信号)。DLL3/CD3

结合蛋白与表位结构域的对应关系如下：

[0076]	DLL3/CD3结合蛋白	表位结构域
	DLL3#7/CD3#1	EGF6
	DLL3#8/CD3#1	EGF4
	DLL3#9/CD3#1	EGF3
	DLL3#10/CD3#1	EGF1
	DLL3#11/CD3#1	EGF1
	DLL3#12/CD3#1	EGF1

[0077] 图3C：六种例示性DLL3/CD3结合蛋白的DLL3表位域定位。例示性DLL3/CD3结合蛋白识别DSL域，或既不识别DSL、EGF，亦不识别DLL3的近膜肽。y轴描绘计数，x轴描绘PE-A（藻红素信号）。DLL3/CD3结合蛋白与表位结构域的对应关系如下：

[0078]	DLL3/CD3结合蛋白	表位结构域
	DLL3#6/CD3#1	DSL
	DLL3#13/CD3#1	DSL
	DLL3#14/CD3#1	DSL
	DLL3#15/CD3#1	DSL
	DLL3#16/CD3#1	非DSL-非EQF1-6-非膜近侧肽
	DLL3#17/CD3#1	非DSL-非EGF1-6-非膜近侧肽
	DLL3#18/CD3#1	非DSL-非EGF1-6-非膜近侧肽

[0079] 图4：七种例示性DLL3/CD3结合蛋白与表达人类及食蟹猕猴DLL3的细胞株的结合。y轴描绘计数，x轴描绘PE-A（藻红素信号区）。

[0080] 图5：七种例示性DLL3/CD3结合蛋白与表达人类DLL1及DLL4的细胞株的结合，未检测到与人类DLL1及DLL4的结合。y轴描绘计数，x轴描绘PE-A（藻红素信号区）。

[0081] 图6A：通过流式细胞计数分析的七种例示性DLL3/CD3结合蛋白与SCLC细胞株及人类T细胞的结合。

[0082] 图6B：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对并非DSL、EGF1-6、近膜肽的肽）与SHP77细胞的结合。

[0083] 图6C：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对DSL域）与SHP77细胞的结合。

[0084] 图6D：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对EGF1域）与SHP77细胞的结合。

[0085] 图6E：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对EGF3域）与SHP77细胞的结合。

[0086] 图6F：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对EGF4域）与SHP77细胞的结合。

[0087] 图6G：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对DSL域）与SHP77细胞的结合。

[0088] 图6H：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对近膜肽域）与SHP77细胞的结合。

[0089] 图6I：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对并非DSL、EGF1-6、近膜肽的肽）与NCI-H82细胞的结合。

[0090] 图6J：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对DSL域）与NCI-H82细胞的结合。

[0091] 图6K：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对EGF1域）与NCI-H82细胞的结合。

[0092] 图6L：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对EGF3域）与NCI-H82细胞的结合。

[0093] 图6M：例示性DLL3/CD3结合蛋白（针对EGF4域）与NCI-H82细胞的结合。

- [0094] 图6N: 例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对DSL域)与NCI-H82细胞的结合。
- [0095] 图6O: 例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对近膜肽域)与NCI-H82细胞的结合。
- [0096] 图6P: 例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对并非DSL、EGF1-6、近膜肽的肽)与T细胞的结合。
- [0097] 图6Q: 例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对DSL域)与T细胞的结合。
- [0098] 图6R: 例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF1域)与T细胞的结合。
- [0099] 图6S: 例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF3域)与T细胞的结合。
- [0100] 图6T: 例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF4域)与T细胞的结合。
- [0101] 图6U: 例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF6域)与T细胞的结合。
- [0102] 图6V: 例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对近膜肽域)与T细胞的结合。
- [0103] 图7A: 将非刺激性PBMC重导向人类SCLC细胞株的七种DLL3/CD3结合蛋白在溶解细胞中的效能。
- [0104] 图7B: 将非刺激性T细胞重导向人类SHP77细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对并非DSL、EGF1-6、近膜肽的肽)在溶解细胞中的效能。
- [0105] 图7C: 将非刺激性T细胞重导向人类SHP77细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对DSL域)在溶解细胞中的效能。
- [0106] 图7D: 将非刺激性T细胞重导向人类SHP77细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF1域)在溶解细胞中的效能。
- [0107] 图7E: 将非刺激性T细胞重导向人类SHP77细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF3域)在溶解细胞中的效能。
- [0108] 图7F: 将非刺激性T细胞重导向人类SHP77细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF4域)在溶解细胞中的效能。
- [0109] 图7G: 将非刺激性T细胞重导向人类SHP77细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF6域)在溶解细胞中的效能。
- [0110] 图7H: 将非刺激性T细胞重导向人类SHP77细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对近膜肽)在溶解细胞中的效能。
- [0111] 图7I: 将非刺激性T细胞重导向人类NCI-H82细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对并非DSL、EGF1-6、近膜肽的肽)在溶解细胞中的效能。
- [0112] 图7J: 将非刺激性T细胞重导向人类NCI-H82细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对DSL域)在溶解细胞中的效能。
- [0113] 图7K: 将非刺激性T细胞重导向人类NCI-H82细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF1域)在溶解细胞中的效能。
- [0114] 图7L: 将非刺激性T细胞重导向人类NCI-H82细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF3域)在溶解细胞中的效能。
- [0115] 图7M: 将非刺激性T细胞重导向人类NCI-H82细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF4域)在溶解细胞中的效能。
- [0116] 图7N: 将非刺激性T细胞重导向人类NCI-H82细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针对EGF6域)在溶解细胞中的效能。
- [0117] 图7O: 将非刺激性T细胞重导向人类NCI-H82细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白(针

对近膜肽)在溶解细胞中的效能。

[0118] 图8:利用两种例示性DLL3/CD3结合蛋白的活体外内化。使DLL3/CD3结合蛋白与DLL3阳性SHP77细胞一起预培育2及4小时,之后与人类PBMC共同培育48小时。

[0119] 图9:两种例示性DLL3/CD3结合蛋白的药物动力学。在单次1mg/kg静脉内给药后DLL3#3/CD3#1(空心方块)及DLL3#3/CD3#2(实心方块)在雄性C57BL/6小鼠中的平均药物动力学概况。

[0120] 图10:两种例示性DLL3/CD3结合蛋白的抗肿瘤活性。y轴描绘中值肿瘤体积且x轴描绘时间。

[0121] 图11:将非刺激性PBMC重导向人类SHP77及RK0-E6细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白在溶解细胞中的效能。

[0122] 图12:在SHP77细胞存在下例示性DLL3/CD3结合蛋白对T细胞活化的效能

[0123] 图13:在SHP77细胞存在下例示性DLL3/CD3结合蛋白对T细胞脱粒的效能

[0124] 图14A:在SHP77细胞存在下,例示性DLL3/CD3结合蛋白对PBMC的干扰素分泌的效能

[0125] 图14B:在SHP77细胞存在下,例示性DLL3/CD3结合蛋白对PBMC的MCP-1分泌的效能

[0126] 图15:在SHP77细胞存在下例示性DLL3/CD3结合蛋白对T细胞增殖的效能

[0127] 图16:将非刺激性泛T细胞及原始T细胞重导向人类SHP77的例示性DLL3/CD3结合蛋白在溶解细胞中的效能。

[0128] 图17:将非刺激性CD4⁺及CD4⁺中央记忆T细胞重导向人类SHP77细胞的例示性DLL3/CD3结合蛋白在溶解细胞中的效能

[0129] 图18:将非刺激性CD4⁺及CD4⁺效应记忆T细胞重导向人类SHP77的例示性DLL3/CD3结合蛋白在溶解细胞中的效能

[0130] 图19:将非刺激性CD8⁺及CD8⁺CD45RA⁺效应记忆T细胞重导向人类SHP77的例示性DLL3/CD3结合蛋白在溶解细胞中的效能

[0131] 图20:将非刺激性CD8⁺及CD8⁺记忆T细胞重导向人类SHP77的例示性DLL3/CD3结合蛋白在溶解细胞中的效能

[0132] 图21:具有例示性DLL3/CD3结合蛋白的SHP77异种移植肿瘤组织中的T细胞浸润。

[0133] 图22:在ELISA分析中三种例示性抗-DLL3抗体与重组DLL3蛋白质的结合。y轴描绘计数,x轴描绘DLL3蛋白质的浓度。

[0134] 图23:通过流式细胞计数测定的例示性抗-DLL3抗体与DLL3阳性SCLC细胞株的结合。y轴描绘计数,x轴描绘抗-DLL3抗体的浓度。

[0135] 图24:具有5种例示性抗-DLL3抗体的SCLC组织样本的代表性染色。抗-DLL3抗体DLL3#1及DLL3#5显示,肿瘤细胞展现点状及/或分散细胞质及/或膜DLL3染色。已通过LEICA SCN400自动化扫描仪,以10×放大倍数来电子产生影像。

[0136] 图25:来自具有不同DLL3表达量的SCLC细胞株的细胞集结粒的代表性染色。Anti-DLL3抗体DLL3#5

发明详述

[0138] 所使用的术语及定义

[0139] 本发明的以上及其他方面及实施方案将由本文中的进一步描述而变得清楚,其中:

[0140] 除非另外指明或定义,否则所用全部术语均具有其在本领域中的常用含义,其对本领域技术人员将为清楚的。例如参考标准手册,诸如Sambrook等人,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”(第2版),第1-3卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989);Lewin,“Genes IV”,Oxford University Press,New York,(1990)及Roitt等人,“Immunology”(第2版),Gower Medical Publishing,London,New York(1989),以及本文中所引用之一般背景技术。此外,如本领域技术人员将清楚,除非另外指明,否则所有未特定详细描述的方法、步骤、技术及操作可以本身已知的方式进行且已以本身已知的方式进行。此外,针对实施例参照标准手册、上文所提及之一般先前技术及其中所引用的其他参考文献。

[0141] 当在本文中使用时,术语“包含(comprising)”及其变型,诸如“包含(comprises)”及“包含(comprise)”可经术语“含有”或“包括”或“具有”取代。

[0142] 除非上下文需要更加受限的解释,否则如本文所用的术语“序列”(例如,比如以下术语,“重链/轻链序列”、“抗体序列”、“可变域序列”、“恒定域序列”或“蛋白质序列”)一般应理解为包括相关氨基酸序列以及编码其的核酸序列或核苷酸序列。

[0143] 如本文所用的“抗原结合单元”是指能够结合至其特定目标或抗原且包含允许靶标结合的来源于抗体(通常存在于抗体中)的最小结构需求的多肽。因此,抗原结合单元包含至少三个轻链及三个重链CDR序列,优选至少轻链可变域及重链可变域的存在。

[0144] 抗体或免疫球蛋白的通用型结构为本领域技术人员熟知。这些分子为杂四聚体糖蛋白,通常为约150,000道尔顿,由两个相同轻(L)链及两个相同重(H)链构成且通常称为全长抗体。每个轻链通过一个二硫键共价连接至重链以形成杂二聚体,且杂四聚体分子经由杂二聚体的两个相同重链之间的共价二硫键连接形成。尽管所述轻链及重链通过一个二硫键连接于一起,但两个重链之间的二硫键数目因免疫球蛋白同型而不同。各重链及轻链亦具有有规律间隔的链内二硫桥键。每个重链在N端处具有可变域(VH),之后为三个或四个(就IgE而言)恒定域(CH1、CH2、CH3及CH4),以及在CH1与CH2之间的铰链区。各轻链具有两个结构域:N端可变域(VL)及C端恒定域(CL)。VL域非共价缔合VH域,然而CL域通常经由二硫键共价连接至CH1域。已知特定氨基酸残基在轻链可变域与重链可变域之间形成界面(Chothia等人,1985,J.Mol.Biol.186:651-663)。可变域在本文中亦称为可变区或Fv且表示通过携带抗原结合位点赋予抗体对抗原的特异性的部分。

[0145] 如本文所用的“轻链可变域”(或“轻链可变区”)及“重链可变域”(或“重链可变区”)具有相同的通式结构且每个域基本上由四个框架(FR)区组成,所述框架区的序列为广泛保守的,在本领域及下文中分别称为“框架区1”或“FR1”;“框架区2”或“FR2”;“框架区3”或“FR3”;以及“框架区4”或“FR4”;所述框架区间杂有三个高变区HVR(或CDR),其在本领域中及本文中下文分别称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;以及“互补决定区3”或“CDR3”。因此,免疫球蛋白可变域的通用结构或序列可如下表示:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。框架区采用 β -片层构型且CDR可形成连接 β -片层结构的回路。各链中的CDR通过框架区保持在其三维结构中且与来自其他链的CDR一起形成抗原结合位点。

[0146] 在本发明的上下文内,对CDR的参考为基于CCG,亦称为IMGT的定义(Lefranc MP,

Pommi éC,Ruiz M,Giudicelli V,Foulquier E,Truong L,Thouvenin-Contet V,Lefranc G.“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains.”Dev Comp Immunoi.2003年1月;27(1):55-77;Giudicelli V,Brochet X,Lefranc MP.“IMGT/V-QUEST:IMGT standardized analysis of the immunoglobulin(IG)and T cell receptor(TR) nucleotide sequences”.Cold Spring Harb Protoc.2011;2011(6):695-715)。本领域中已知的CDR的替代定义为基于Chothia(Chothia及Lesk,J.Mol.Biol.1987,196:901-917)以及卡贝特(E.A.Kabat,T.T.Wu,H.Bilofsky,M.Reid-Miller及H.Perry,Sequence of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda (1983))。

[0147] 如本申请案内使用的术语“恒定域”或“恒定区”表示除可变区以外的抗体的结构域的总和。此类恒定域及恒定区为目前先进技术所熟知且例如由Kabat等人(“Sequence of proteins of immunological interest”,US Public Health Services,NIH Bethesda,MD,公开案第91号)描述。

[0148] 抗体的“Fc部分”或“Fc域”不直接参与抗体与抗原的结合,但展现各种效应功能。“抗体的Fc部分/域”为本领域技术人员熟知的术语且界定于抗体的木瓜酶裂解的基体上。视其重链的恒定区的氨基酸序列而定,抗体或免疫球蛋白分成以下类别:IgA、IgD、IgE、IgG及IgM。根据重链恒定区,不同类别的免疫球蛋白分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。这些中的若干者可进一步分成子类(同型),例如IgG1、IgG2、IgG3及IgG4、IgA1及IgA2。抗体的Fc部分直接参与ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)及CDC(补体依赖性细胞毒性),基于补体活化、C1q结合及Fc底物结合。补体活化(complement activation;CDC)通过补体因子C1q与大多数IgG抗体子类的Fc部分的结合来启动。虽然补体系统上的抗体的影响取决于某些条件,但C1q结合为由Fc部分内的界定结合位点造成。此类结合位点为例如L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及P329(根据EU编号编号(Edelman等人,Proc Natl Acad Sci U S A.1969年5月;63(1):78-85))。这些残基中在介导IgG1中的C1q及Fc γ 底物结合方面最关键的为L234及L235(Hezareh等人,J.Virology 75(2001)12161-12168,Shields等人,(2001)JBC,276(9):6591-6604)。亚类IgG1及IgG3的抗体通常展示补充活化及C1q及C3结合,而IgG2及IgG4不活化补体系统且不结合C1q及C3。

[0149] 术语“抗体”或“抗体分子”(本文中同义使用)涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、人类抗体、人类化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、抗体片段(尤其Fv、Fab、Fab'或F(ab')₂片段)、单链抗体(尤其单链可变片段(scFv)、单链Fab片段(scFab))、小模块化免疫药物(SMIP)、结构域抗体、纳米抗体、双功能抗体。抗体可具有效应功能,诸如ADCC或CDC,其通常通过抗体的Fc部分(抗体恒定区)介导,或其可不具有效应功能,例如通过缺乏Fc部分或具有阻断、遮蔽的Fc部分,本质上免疫细胞或免疫系统组分(如补体系统)不识别或未充分识别的Fc部分。

[0150] 单克隆抗体(mAb)为氨基酸序列相同的单特异性抗体。其可通过杂交瘤技术自杂交细胞株(称为杂交瘤)制备,该杂交细胞株代表产生特异性抗体的B细胞与骨髓瘤(B细胞癌症)细胞的融合的纯系(Kohler G,Milstein C.Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.Nature 1975;256:495-7)。可替代地,

单克隆抗体可通过在宿主细胞中的重组表达制备 (Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (1997年5月). “Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells.” *J Immunol Methods* 204(1):77-87; 亦参见下文)。“重组抗体”或“重组结合蛋白”为已通过以重组方式工程改造的宿主细胞产生的抗体或结合蛋白。其任选地经分离或纯化。

[0151] 全长抗体可用诸如木瓜酶或胃蛋白酶的酶处理,以产生适用抗体片段。使用木瓜酶消化以产生两种相同的各具有单一抗原结合位点的称为“Fab”片段的抗原结合抗体片段,及残余“Fc”片段。Fab片段亦含有轻链的恒定域及重链的CH1域。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

[0152] Fab'片段与Fab片段的不同的处在于在CH1域的C端存在额外残基,其包括一或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。F(ab')₂抗体片段为由铰链区中的半胱氨酸残基连接的Fab'片段对。抗体片段的其他化学偶合亦已知。

[0153] “Fv”片段含有由一个重链可变域及一个轻链可变域的紧密非共价缔合的二聚体组成的完整抗原识别及结合位点。在此组态中,各可变域的三个CDR相互作用以界定VH-VL二聚体表面上的抗原结合位点。六个CDR共同地赋予抗体以抗原结合特异性。

[0154] “单链Fv”或“scFv”抗体片段为包含抗体的VH及VL域的单链Fv变体,其中所述域存在于单一多肽链中。单链Fv能够识别且结合抗原。scFv多肽亦可任选含有位于VH与VL域之间的多肽接头以有助于通过scFv形成抗原结合所需的三维结构(参见例如Pluckthun, 1994, *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg及Moore编, Springer-Verlag, New York, 第269-315页)。

[0155] “单链Fab”或“scFab”抗体片段为包含抗体的VL、CL、VH及CH1域的单链Fab变体,其中所述域存在于单一多肽链中。单链Fab能够识别且结合抗原。scFab多肽亦可任选含有位于CL与VH域之间的多肽接头(Hust等人, (2007) *BMC Biotechnology*)。

[0156] 为用于人类,常常需要降低治疗分子(诸如包含如本文所述的抗原结合单元的抗体或结合蛋白)的免疫原性,所述治疗分子最初来源于其他物种,如小鼠。此可通过构建嵌合抗体/结合蛋白,或通过称为“人类化”的方法完成。在此上下文中,“嵌合抗体”;或“嵌合抗原结合单元”应理解为包含与来源于不同物种(例如人类)的序列部分(例如恒定域)融合的来源于一个物种(例如小鼠)的序列部分(例如可变域)的抗体或抗原结合单元。在此上下文中,“人类化抗体”、“人类化结合蛋白”或“人类化抗原结合单元”为包含最初来源于非人类物种的可变域的抗体、蛋白质或抗原结合单元,其中已使某些氨基酸突变以制备可变域更近似于人类可变域的序列的总体序列。抗体人类化的方法为本领域中熟知的(Billetta R, Lobuglio AF. “Chimeric antibodies”. *Int Rev Immunol*. 1993;10(2-3):165-76; Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988). “Reshaping human antibodies for therapy”. *Nature*:332:323)。

[0157] “经优化抗体”或“经优化的抗原结合单元或蛋白质”为特定类型的人类化抗体或人类化抗原结合单元/蛋白,其包括免疫球蛋白氨基酸序列变体或其片段,该人类化抗体或人类化抗原结合单元/蛋白能够与预定抗原结合且包含一或多个基本上具有人类免疫球蛋白的氨基酸序列的FR及一或多个基本上具有非人类免疫球蛋白的氨基酸序列的CDR。通常称为“导入”序列的此非人类氨基酸序列通常获自“导入”抗体域、尤其可变域。一般而言,经

优化抗体至少包括插入人类重链或轻链可变域的FR之间的非人类抗体或来源于非人类抗体的CDR(或HVL)。应理解,某些小鼠FR残基对于经优化抗体的功能而言为重要的且因此某些人类生殖为序列重链及轻链可变域残基经修饰为与相应小鼠序列的那些相同。在此过程期间,亦可移除或改变非所需氨基酸,例如以避免脱酰胺、非所需电荷或亲脂性或非特异性结合。“经优化抗体”、“经优化抗体片段”或“优化”有时可称为“人类化抗体”、“人类化抗体片段”或“人类化”,或“序列经优化”。

[0158] 此外,已开发出用于基于来源于人类基因组的序列产生抗体或VH/VL域的技术,例如通过噬菌体呈现或使用转基因动物(WWW.Ablexis.com/technology-alivamab.php;WO 90/05144;D.Marks,H.R.Hoogenboom,T.P.Bonnert,J.McCafferty,A.D.Griffiths及G.Winter(1991)“By-passing immunisation.Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage.”J.Mol.Biol.,222,581-597;Knappik等人,J.Mol.Biol.296:57-86,2000;S.Carmen及L.Jermutus,“Concepts in antibody phage display”.Briefings in Functional Genomics and Proteomics 20021(2):189-203;Lonberg N,Huszar D.“Human antibodies from transgenic mice”.Int Rev Immunol.1995;13(1):65-93.;Br ü ggemann M,Taussig MJ.“Production of human antibody repertoires in transgenic mice”.Curr Opin Biotechnol.1997年8月;8(4):455-8.)。在本发明的上下文中,此类抗体或抗原结合单位或VH/VL域为“人类抗体”、“人类抗原结合单位”或“人类VH/VL域”。

[0159] 如本文所用的术语“人类抗体”、“人类抗原结合单元”或“人类VH/VL域”意欲包括具有来源于人类生殖为免疫球蛋白序列的可变(及恒定,若适用)区的抗体、抗原结合单位或VH/VL域。本发明技术的人类抗体、抗原结合单位、蛋白质或VH/VL域可包括并非由人类生殖为免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如在活体外通过随机或位点特异性突变诱发或在活体内通过体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所用的术语“人类抗体”、“人类抗原结合单元”或“人类VH/VL域”不意欲包括其中来源于另一种(哺乳动物物种)(诸如小鼠、大鼠或兔)的生殖为的CDR序列已移植于人类构架序列上的抗体。因此,如本文所用,术语“人类抗体”、“人类抗原结合单元”或“人类VH/VL域”是指以下抗体、抗原结合单元或VH/VL域:其中基本上蛋白质的每一部分(例如CDR、构架、CL、CH域(例如CH1、CH2、CH3)、铰链、VL、VH)在人类中基本上为非免疫原性的,仅有微小序列改变或变化。此类改变或变化任选且优选相对于未修饰抗体或抗原结合单位保留或降低在人类或其他物种中的免疫原性。

[0160] 因此,人类抗体、人类抗原结合单元或人类VH/VL域不同于例如嵌合或人类化抗体。应指出,人类抗体、人类抗原结合单元或人类VH/VL域可通过能够表达功能重排的人类免疫球蛋白(例如重链及/或轻链)基因的非人类动物或原核或真核生物细胞制备。

[0161] 术语“单体”是指如本文所述的抗体或多特异性蛋白质的均质形式。举例而言,对于全长抗体,单体意谓具有两条相同重链及两条相同轻链的单体抗体。在本发明的上下文中,单体意谓具有如本文所述的对DLL3具有特异性的单一抗原结合单元,及对CD3具有特异性的单一抗原结合单元的本发明的蛋白质。举例而言,本文所描述的结合蛋白的单体可具有两条链:第一链,包含具有第一抗原结合单元的单链Fab及任选存在的第一Fc域;及第二链,其包含具有第二抗原结合单元的单链Fab及任选存在的第二Fc域。

[0162] 表位为与抗体或抗原结合部分(例如本文所描述的蛋白质的抗原结合单元)结合的抗原区。术语“表位”包括能够特异性结合于抗体或抗原结合部分的任何多肽决定子。在

某些实施方案中,表位决定子包括分子的化学活性表面基团(诸如氨基酸、聚糖侧链、磷酸基或磺酰基),且在某些实施方案中,可具有特定三维结构特征,及/或特定电荷特征。构型表位与非构型表位的区别在于,在变性溶剂存在下,与前者的结合消失,但后者则不然。

[0163] 可“结合”、“结合于”、“特异性结合”或“特异性结合于”某一表位、抗原或蛋白质(或其至少一个部分、片段或表位),对某一表位、抗原或蛋白质“具有亲和力”、“具有特异性(is specific for/has specificity for)”的抗原结合分子/蛋白质(诸如免疫球蛋白、抗体、抗原结合单元或此类抗原结合分子/蛋白质的片段)称为“对”或“针对”该表位、抗原或蛋白质或相对于此类表位、抗原或蛋白质“结合”分子/蛋白质。

[0164] 如本文所用,术语“结合”及“特异性结合”是指在活体外分析中,优选在利用经纯化的野生型抗原的等离子共振分析(Malmqvist M.,“Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.”,Curr Opin Immunol.1993年4月;5(2):282-6.)中,抗体或抗原结合部分(诸如免疫球蛋白、抗体、抗原结合单元或此类抗原结合分子/蛋白质的片段)与抗原的表位的结合。抗体亲和力亦可使用动力学排斥分析(KinExA)技术(Darling,R.J.,及Brault P-A.,“Kinetic exclusion assay technology:Characterization of Molecular Interactions.”ASSAY and Drug Development Technologies.2004年12月2日(6):647-657)来测量。

[0165] 一般而言,术语“特异性”是指特定抗原结合分子/蛋白质(诸如免疫球蛋白、抗体、抗原结合单元,或此类抗原结合分子/蛋白质的片段)可结合的不同类型的抗原或表位的数目。抗原结合分子/蛋白质的特异性可基于其亲和力及/或亲合力进行测定。由抗原与抗原结合蛋白的解离平衡常数(K_D)表示的亲和力为表位与抗原结合分子/蛋白上的抗原结合位点之间的结合强度的量度; K_D 值愈小,表位与抗原结合分子之间的结合强度愈强(可替代地,亲和力亦可表示为亲和力常数(K_A),其为 $1/K_D$)。如熟练人员将清楚(例如基于本文中的其他公开内容),亲和力可以本身已知的方式进行测定,其视相关特异性抗原而定。亲合力为抗原结合分子/蛋白(诸如免疫球蛋白、抗体、抗原结合单元,或此类抗原结合分子/蛋白的片段)与相关抗原之间的结合强度的量度。亲合力与表位与抗原结合分子/蛋白上的其抗原结合位点之间的亲和力及抗原结合分子/蛋白上所存在的相关结合位点的数目两者有关。

[0166] 如本文中所使用的术语“分离”是指物质脱离其原始或原生环境(例如天然环境(若其为天然存在的))。举例而言,存在于活动物中的天然产生的聚核苷酸或多肽未经分离,但通过人类干预而与天然系统中的一些或所有共存物质分离的相同聚核苷酸或多肽经分离。所述聚核苷酸可为载体的一部分且/或所述聚核苷酸或多肽可为组合物的一部分,且仍经分离以使得此载体或组合物不为自然界中发现其的环境的一部分。举例而言,当相较于自其获得核酸、蛋白质/多肽分子的该核酸、蛋白质/多肽分子的天然生物源及/或反应介质或培养介质时,当该核酸、蛋白质/多肽分子已与至少一种其他组分,诸如另一核酸、另一蛋白质/多肽、另一生物组分或大分子或至少一种掺杂物、杂质或微量组分分离,其中该核酸、蛋白质/多肽分子通常与该至少一种其他组分缔合于该源或介质中时,该核酸、蛋白质/多肽分子视为“僵)基本上分离(形式)”。详言之,当以至少2倍,尤其至少10倍、较尤其至少100倍且高达1000倍或大于1000倍纯化核酸或蛋白质/多肽分子时,其视为“基本上分离”的。如使用适合技术,诸如适合的色谱技术,诸如聚丙烯酰胺-凝胶电泳所测定,“呈基本上分离形式”的核酸或蛋白质/多肽分子优选为基本上均质的。

[0167] 如本文所使用,术语“一致”或“一致性百分比”在两个或更多个核酸或多肽序列的情况下是指针对最大对应性比较及比对时两个或更多个序列或子序列相同或有指定百分比的核苷酸或氨基酸残基相同。为确定一致性百分比,出于最佳比较目的进行序列比对(例如为与第二氨基酸或核酸序列最佳比对,可在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入间隙)。接着比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。若第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据,则分子在该位置处一致。两个序列之间之一致性百分比为所述序列共有之一致位置数的函数(亦即,一致性% = 一致位置数/位置总数(亦即重叠位置) × 100)。在一些实施方案中,适当时,在序列内引入间隙之后,进行比较的两个序列长度相同(例如不包括延长超过比较序列的额外序列)。举例而言,当比较可变区序列时,不考虑前导序列及/或恒定域序列。对于两个序列之间的序列比较,“对应”CDR是指两个序列中相同位置的CDR(例如各序列的CDR-H1)。

[0168] 可使用数学算法实现确定两个序列之间之一致性百分比或相似性百分比。用于比较两个序列的数学算法的优选非限制性实施例为Karlin及Altschul,1990, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268的算法,如Karlin及Altschul,1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877中所修改。将此类算法并入至Altschul等人,1990,J.Mol.Biol.215:403-410的NBLAST及XBLAST程序中。BLAST核苷酸检索可用NBLAST程序(得分=100,字长=12)执行以获得与编码所关注蛋白质的核酸同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质检索可用XBLAST程序(得分=50,字长=3)执行以获得与所关注蛋白质同源的氨基酸序列。为使间隙式比对达成比较目的,可如Altschul等人,1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402中所述使用间隙式BLAST。可替代地,PSI-Blast可用于执行叠代检索,其检测分子间的远距离关系(同上)。当利用BLAST、间隙式BLAST及PSI-Blast程序时,可使用对应程序(例如XBLAST及NBLAST)的预设参数。用于比较序列的数学算法的另一个优选非限制性实施例为Myers及Miller,CABIOS(1989)的算法。将此类算法并入至ALIGN程序(2.0版)中,该ALIGN程序为GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序来比较氨基酸序列时,可使用PAM120权重残基表、间隙长度罚分12及间隙罚分4。用于序列分析的额外算法在本领域中已知且包括如Torellis及Robotti,1994,Comput.Appl.Biosci.10:3-5中所述的ADVANCE及ADAM;及Pearson及Lipman,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444-8中所述的FASTA。在FASTA内,ktup为设定检索的敏感性及速度的对照选项。若ktup=2,则通过观察比对残基对得到比较的两个序列中的类似区;若ktup=1,则检查单一比对氨基酸。对于蛋白质序列,ktup可设定为2或1,或对于DNA序列设定为1至6。若ktup未得以指定,则对于蛋白质默认值为2,且对于DNA为6。可替代地,可使用CLUSTAL W算法进行蛋白质序列比对,如Higgins等人,1996,Methods Enzymol.266:383-402所描述。

[0169] 如本文所用的术语“共价连接”意谓残基之间的直接共价键,或间接缔合,其中两个残基不直接键结但皆共价键结于中间分子或域,例如免疫球蛋白的中间域。

[0170] 术语“竞争”或“交叉竞争”在本文中可互换使用,其是指抗体分子干扰抗体分子(例如本发明的抗-DLL3抗体分子)结合至目标(例如人类DLL3)的能力。干扰结合可为直接或间接的(例如经由抗体分子或标靶的异位调节)。抗体分子能够干扰另一抗体分子结合至目标的程度且因此是否可称其竞争可使用竞争结合分析(例如FACS分析、ELISA或BIACORE分析)测定。在一些实施方案中,竞争结合分析为定量竞争分析。在一些实施方案中,当在竞

争结合分析(例如本文所描述的竞争分析)中第一抗体分子与目标的结合减少10%或更多,例如20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、55%或更多、60%或更多、65%或更多、70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多、98%或更多、99%或更多时,称第一抗-DLL3抗体分子与第二抗-DLL3抗体分子竞争结合于目标。

[0171] 在无明确叙述下且除非另外预期,否则推断当本发明技术与多肽、蛋白质、聚核苷酸或抗体有关时,预期此类的等效物或生物等效物在本发明技术的范畴内。

[0172] 如本文所用,当提及参考蛋白质、抗体、多肽、聚核苷酸或核酸时,术语“其生物等效物”意欲与“其等效物”同义,且意指那些具有最小的同源性同时仍维持所需结构或官能性。除非本文中专门叙述,否则预期本文中提及的任何核酸、聚核苷酸、多肽、蛋白质或抗体亦包括其等效物。举例而言,等效物意指至少约80%同源性或一致性且可替代地,至少约85%、或可替代地至少约90%、或可替代地至少约95%、或可替代地98%百分比同源性或一致性且展现与参考蛋白质、多肽、抗体或核酸基本上等效的生物活性。

[0173] 如本文所用,术语“可检测标记”是指可产生可检测信号(亦即物理或化学信号,包括比色、荧光、电、放射及化学发光信号)的分子、化合物或组合物,该信号可通过目视或仪器方法测量,且其指示样本中标记的存在及/或数量/浓度。

[0174] “可检测信号”可通过各种机制来产生,包括光子(包括射频、微波频率、红外频率、可见频率及紫外线频率光子)的吸收、放射及/或散射且包括但不限于比色、荧光、电、放射及化学发光信号。

[0175] 如本文所用,“表达”是指聚核苷酸转录为mRNA的过程及/或转录mRNA随后转译为肽、多肽或蛋白质的过程。若聚核苷酸衍生自基因组DNA,则表达可包括真核细胞中mRNA的剪接。基因的表达量可通过测量细胞或组织样本中mRNA或蛋白质的量来测定。

[0176] 如本文所使用,术语“生物样本”意谓来源于活细胞或与活细胞接触的样本材料。该术语意欲包括自个体分离的组织、细胞及生物流体。如本文所用,术语“组织样本”应指代在离开获得该样本的个体时保留细胞之间的截面空间关系的细胞样本。生物样本亦可获自内脏的切片或癌症。

[0177] “组织化学”及“细胞化学”为用于通过用特异性结合于分子的试剂以可在显微镜上观测的方式标记本来鉴别完整细胞的环境内的分子的技术。“免疫组织化学”及“免疫细胞化学”为使用抗体标记分子的组织化学及细胞化学的类型。

[0178] 本发明的多特异性结合蛋白

[0179] 本发明提供多特异性结合蛋白,其包含至少一个与DLL3特异性结合的抗原结合单元(第一抗原结合单元),及至少一个与CD3特异性结合的抗原结合单元(第二抗原结合单元)。此类(多特异性)结合蛋白在本文中亦称为(多特异性)结合分子或DLL3/CD3结合蛋白或DLL3/CD3结合分子。

[0180] 本发明人已惊讶地发现,本发明的多特异性结合蛋白在T细胞存在下诱导DLL3阳性SCLC细胞株的选择性溶解且已经在低效应物:目标细胞比率下具有活性。重要的是,本发明的结合蛋白在无DLL3阳性细胞存在下不引起T细胞活化、T细胞增殖及细胞因子分泌或DLL3阴性细胞溶解。

[0181] 为避免疑问,如本文所用的DLL3是指UniProt Q9NYJ7的人类DLL3及编码该蛋白质的核酸序列。如本文所用的CD3是指人类CD3 ϵ (UniProt P07766)及CD3 γ (Uniprot:P09693)

复合物(人类CD3 $\epsilon\gamma$ 复合物)。

[0182] 预期用双特异性T细胞接合方法靶向DLL3提供优于ADC方法的优势,因为重导向T细胞不受对化学疗法的抗性的影响且细胞表面上的低表达量对此作用模式不那么关键。T细胞接合剂为多特异性结合蛋白,其具有与T细胞上的CD3结合的结合臂及与肿瘤细胞的细胞表面上的抗原结合的结合臂。经由与T细胞及肿瘤细胞的同时结合,T细胞接合剂迫使在两个细胞之间形成溶细胞突触且因此选择性地重导向对靶向肿瘤细胞的T细胞活性。

[0183] 在一个方面中,本发明的多特异性结合蛋白包含与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元及与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其中该第一结合单元选自由i)至xviii)组成的群:

[0184] i) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1(CDR1)、SEQ ID NO:2(CDR2)及SEQ ID NO:3(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:4(CDR1)、SEQ ID NO:5(CDR2)及SEQ ID NO:6(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#1);

[0185] ii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:7(CDR1)、SEQ ID NO:8(CDR2)及SEQ ID NO:9(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:10(CDR1)、SEQ ID NO:11(CDR2)及SEQ ID NO:12(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#2);

[0186] iii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:13(CDR1)、SEQ ID NO:14(CDR2)及SEQ ID NO:15(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:16(CDR1)、SEQ ID NO:17(CDR2)及SEQ ID NO:18(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#3);

[0187] iv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:19(CDR1)、SEQ ID NO:20(CDR2)及SEQ ID NO:21(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:22(CDR1)、SEQ ID NO:23(CDR2)及SEQ ID NO:24(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#4);

[0188] v) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:25(CDR1)、SEQ ID NO:26(CDR2)及SEQ ID NO:27(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:28(CDR1)、SEQ ID NO:29(CDR2)及SEQ ID NO:30(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#5);

[0189] vi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:31(CDR1)、SEQ ID NO:32(CDR2)及SEQ ID NO:33(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:34(CDR1)、SEQ ID NO:35(CDR2)及SEQ ID NO:36(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#6);

[0190] vii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:133(CDR1)、SEQ ID NO:134(CDR2)及SEQ ID NO:135(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:136(CDR1)、SEQ ID NO:137(CDR2)及SEQ ID NO:138(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#7);

[0191] viii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:139(CDR1)、SEQ ID NO:140(CDR2)及SEQ ID NO:141(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:142(CDR1)、SEQ ID NO:143(CDR2)及SEQ ID NO:144(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#8);

[0192] ix) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:145(CDR1)、SEQ ID NO:146(CDR2)及SEQ ID NO:147(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:148(CDR1)、SEQ ID NO:149(CDR2)及SEQ ID NO:150(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#9);

[0193] x) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:151(CDR1)、SEQ ID NO:152(CDR2)及SEQ ID NO:153(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:154(CDR1)、SEQ ID NO:155(CDR2)及SEQ ID NO:156(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#10);

[0194] xi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:157(CDR1)、SEQ ID NO:158(CDR2)及SEQ ID NO:159(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:160(CDR1)、SEQ ID NO:161(CDR2)及SEQ ID NO:162(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#11);

[0195] xii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:163(CDR1)、SEQ ID NO:164(CDR2)及SEQ ID NO:165(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:166(CDR1)、SEQ ID NO:167(CDR2)及SEQ ID NO:168(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#12);

[0196] xiii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:169(CDR1)、SEQ ID NO:170(CDR2)及SEQ ID NO:171(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:172(CDR1)、SEQ ID NO:173(CDR2)及SEQ ID NO:174(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#13);

[0197] xiv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:175(CDR1)、SEQ ID NO:176(CDR2)及SEQ ID NO:177(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:178(CDR1)、SEQ ID NO:179(CDR2)及SEQ ID NO:180(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#14);

[0198] xv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:181(CDR1)、SEQ ID NO:182(CDR2)及SEQ ID NO:183(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:184(CDR1)、SEQ ID NO:185(CDR2)及SEQ ID NO:186(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#15);

[0199] xvi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:187(CDR1)、SEQ ID NO:188(CDR2)及SEQ ID NO:189(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:190(CDR1)、SEQ ID NO:191(CDR2)及SEQ ID NO:192(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#16);

[0200] xvii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:193(CDR1)、SEQ ID NO:194(CDR2)及SEQ ID NO:195(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:196(CDR1)、SEQ ID NO:197(CDR2)及SEQ ID NO:198(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#17);以及

[0201] xviii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:199(CDR1)、SEQ ID NO:200(CDR2)及SEQ ID NO:201(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:202(CDR1)、SEQ ID NO:203(CDR2)及SEQ ID NO:204(CDR3)的重链CDR(抗原结合单元DLL3#18)。

[0202] 优选地,本发明的结合蛋白的第一抗原结合单元为如上述CDR序列所定义的i)至iii)中的任一者。

[0203] 为避免疑问,本文中所列出的具体实施方案中的每一者亦可视为本发明的独立方面。

[0204] 在本发明的结合蛋白的一些实施方案中,该与CD3特异性结合的第二抗原结合单元选自由i)至iii)组成的群:

[0205] i) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:55(CDR1)、SEQ ID NO:

56 (CDR2) 及SEQ ID NO:57 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:58 (CDR1)、SEQ ID NO:59 (CDR2) 及SEQ ID NO:60 (CDR3) 的重链CDR (抗原结合单元CD3#1);

[0206] ii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:61 (CDR1)、SEQ ID NO:62 (CDR2) 及SEQ ID NO:63 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:64 (CDR1)、SEQ ID NO:65 (CDR2) 及SEQ ID NO:66 (CDR3) 的重链CDR (抗原结合单元CD3#2);以及

[0207] iii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:96 (CDR1)、SEQ ID NO:97 (CDR2) 及SEQ ID NO:98 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:99 (CDR1)、SEQ ID NO:100 (CDR2) 及SEQ ID NO:101 (CDR3) 的重链CDR (抗原结合单元CD3#3)。

[0208] 如上文所概述的第一抗原结合单位i) 至xviii) 分别称为DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17及DLL3#18,且如上文所概述的第二抗原结合单位i) 至iii) 分别称为CD3#1、CD3#2及CD3#3。本文提供序列表,其容许容易地鉴别本发明的特定抗原结合单位及全长结合蛋白的单独氨基酸序列。将概述提供于实施例2中的表1中。

[0209] 如本文所用,一般而言相对于抗原结合单位的术语“第一”及“第二”仅意欲指示这些单位为两种不同单位(因为其与不同目标抗原结合)。因此,这些术语不应理解是指代本发明的结合蛋白内单位的精确次序或序列。

[0210] 在一些实施方案中,本发明的结合蛋白包含:选自由如上文所述的各别CDR序列所定义的以下各者组成的群的第一抗原结合单元:DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17及DLL3#18及如上文所述的各别CDR序列所定义的CD3#1的第二抗原结合单元。在优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含选自由如上文所述的各别CDR序列所定义的DLL3#1、DLL3#2及DLL3#3组成的群的第一抗原结合单元及如上文所述的各别CDR序列所定义的CD3#1的第二抗原结合单元。

[0211] 在一些实施方案中,本发明的结合蛋白包含:选自由如上文所述的各别CDR序列所定义的以下各者组成的群的第一抗原结合单元:DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17及DLL3#18及如上文所述的各别CDR序列所定义的CD3#2的第二抗原结合单元。在优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含选自由如上文所述的各别CDR序列所定义的DLL3#1、DLL3#2及DLL3#3组成的群的第一抗原结合单元及如上文所述的各别CDR序列所定义的CD3#2的第二抗原结合单元。

[0212] 在一些实施方案中,本发明的结合蛋白包含:选自由如上文所述的各别CDR序列所定义的以下各者组成的群的第一抗原结合单元:DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17及DLL3#18及如上文所述的各别CDR序列所定义的CD3#3的第二抗原结合单元。在优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含选自由如上文所述的各别CDR序列所定义的DLL3#1、DLL3#2及DLL3#3组成的群的第一抗原结合单元及如上文所述的各别CDR序列所定义的CD3#3的第二抗原结合单元。

[0213] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含:与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1 (CDR1)、SEQ ID NO:2 (CDR2) 及SEQ ID NO:

3(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:4(CDR1)、SEQ ID NO:5(CDR2)及SEQ ID NO:6(CDR3)的重链CDR;以及与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:55(CDR1)、SEQ ID NO:56(CDR2)及SEQ ID NO:57(CDR3)的轻链CDR及包含氨基酸序列SEQ ID NO:58(CDR1)、SEQ ID NO:59(CDR2)及SEQ ID NO:60(CDR3)的重链CDR。

[0214] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含:与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:7(CDR1)、SEQ ID NO:8(CDR2)及SEQ ID NO:9(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:10(CDR1)、SEQ ID NO:11(CDR2)及SEQ ID NO:12(CDR3)的重链CDR;以及与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:55(CDR1)、SEQ ID NO:56(CDR2)及SEQ ID NO:57(CDR3)的轻链CDR及包含氨基酸序列SEQ ID NO:58(CDR1)、SEQ ID NO:59(CDR2)及SEQ ID NO:60(CDR3)的重链CDR。

[0215] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含:与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:13(CDR1)、SEQ ID NO:14(CDR2)及SEQ ID NO:15(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:16(CDR1)、SEQ ID NO:17(CDR2)及SEQ ID NO:18(CDR3)的重链CDR;以及与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:55(CDR1)、SEQ ID NO:56(CDR2)及SEQ ID NO:57(CDR3)的轻链CDR及包含氨基酸序列SEQ ID NO:58(CDR1)、SEQ ID NO:59(CDR2)及SEQ ID NO:60(CDR3)的重链CDR。

[0216] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含:与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1(CDR1)、SEQ ID NO:2(CDR2)及SEQ ID NO:3(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:4(CDR1)、SEQ ID NO:5(CDR2)及SEQ ID NO:6(CDR3)的重链CDR;以及与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:61(CDR1)、SEQ ID NO:62(CDR2)及SEQ ID NO:63(CDR3)的轻链CDR及包含氨基酸序列SEQ ID NO:64(CDR1)、SEQ ID NO:65(CDR2)及SEQ ID NO:66(CDR3)的重链CDR。

[0217] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含:与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:7(CDR1)、SEQ ID NO:8(CDR2)及SEQ ID NO:9(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:10(CDR1)、SEQ ID NO:11(CDR2)及SEQ ID NO:12(CDR3)的重链CDR;以及与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:61(CDR1)、SEQ ID NO:62(CDR2)及SEQ ID NO:63(CDR3)的轻链CDR及包含氨基酸序列SEQ ID NO:64(CDR1)、SEQ ID NO:65(CDR2)及SEQ ID NO:66(CDR3)的重链CDR。

[0218] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含:与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:13(CDR1)、SEQ ID NO:14(CDR2)及SEQ ID NO:15(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:16(CDR1)、SEQ ID NO:17(CDR2)及SEQ ID NO:18(CDR3)的重链CDR;以及与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:61(CDR1)、SEQ ID NO:62(CDR2)及SEQ ID NO:63(CDR3)的轻链CDR及包含氨基酸序列SEQ ID NO:64(CDR1)、SEQ ID NO:65(CDR2)及SEQ ID NO:66(CDR3)的重链CDR。

[0219] 除了如本文所阐述的CDR序列之外,本发明的结合蛋白的抗原结合单位包括免疫

球蛋白构架区 (FR) 序列。这些序列优选在人类中没有免疫原性,且因此优选为人类或人类化FR序列。适合的人类或人类化FR序列为本领域中已知的。具体优选的FR序列可取自下文所示的实施方案,其公开全部抗原结合单位且由此公开CDR序列以及FR序列。

[0220] 在本发明的结合蛋白的优选实施方案中,第一及第二结合单元各自包含来源于抗体分子的轻链可变域及重链可变域,所述轻链/重链可变域由第一抗原结合单元的DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18中的任一者的CDR序列定义且所述轻/重链可变域由第二抗原结合单元的CD3#1、CD3#2或CD3#3中的任一者的CDR序列定义。在本发明的结合蛋白的一些实施方案中,DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17、DLL3#18、CD3#1、CD3#2或CD3#3中的任一者或多者的抗原结合单位的VH及/或VL域为人类或人类化VH及/或VL域。

[0221] 在本发明的优选实施方案中,第一抗原结合单元的轻/重链可变域进一步定义如下

[0222] i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的重链可变域(抗原结合单元DLL3#1);或

[0223] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的重链可变域(抗原结合单元DLL3#2);或

[0224] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的重链可变域(抗原结合单元DLL3#3);或

[0225] iv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:43的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的重链可变域(抗原结合单元DLL3#4);或

[0226] v) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的重链可变域(抗原结合单元DLL3#5);或

[0227] vi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的重链可变域(抗原结合单元DLL3#6);或

[0228] vii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:205的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:206的重链可变域(抗原结合单元DLL3#7);或

[0229] viii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:207的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:208的重链可变域(抗原结合单元DLL3#8);或

[0230] ix) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:209的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:210的重链可变域(抗原结合单元DLL3#9);或

[0231] x) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:211的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:212的重链可变域(抗原结合单元DLL3#10);或

[0232] xi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:213的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:214的重链可变域(抗原结合单元DLL3#11);或

[0233] xii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:215的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:216的重链可变域(抗原结合单元DLL3#12);或

[0234] xiii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:217的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID

N0:218的重链可变域(抗原结合单元DLL3#13);或

[0235] xiv) 包含氨基酸序列SEQ ID N0:219的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID N0:220的重链可变域(抗原结合单元DLL3#14);或

[0236] xv) 包含氨基酸序列SEQ ID N0:221的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID N0:222的重链可变域(抗原结合单元DLL3#15);或

[0237] xvi) 包含氨基酸序列SEQ ID N0:223的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID N0:224的重链可变域(抗原结合单元DLL3#16);或

[0238] xvii) 包含氨基酸序列SEQ ID N0:225的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID N0:226的重链可变域(抗原结合单元DLL3#17);或

[0239] xviii) 包含:包含氨基酸序列SEQ ID N0:227的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID N0:228的重链可变域(抗原结合单元DLL3#18)。

[0240] 优选地,本发明的结合蛋白的第一抗原结合单元为如上述VL及VH序列所定义的i)至iii)中的任一者。

[0241] 在本发明的优选实施方案中,第二抗原结合单元的轻/重链可变域进一步定义如下

[0242] i) 包含氨基酸序列SEQ ID N0:67的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID N0:68的重链可变域(抗原结合单元CD3#1);或

[0243] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID N0:69的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID N0:70的重链可变域(抗原结合单元CD3#2);或

[0244] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID N0:102的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID N0:103的重链可变域(抗原结合单元CD3#3)。

[0245] 在一些实施方案中,本发明的结合蛋白包含选自由以下组成的群的第一及第二抗原结合单元的组合: DLL3#1/CD3#1、DLL3#2/CD3#1、DLL3#3/CD3#1、DLL3#4/CD3#1、DLL3#5/CD3#1、DLL3#6/CD3#1、DLL3#7/CD3#1、DLL3#8/CD3#1、DLL3#9/CD3#1、DLL3#10/CD3#1、DLL3#11/CD3#1、DLL3#12/CD3#1、DLL3#13/CD3#1、DLL3#14/CD3#1、DLL3#15/CD3#1、DLL3#16/CD3#1、DLL3#17/CD3#1、DLL3#18/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#2/CD3#2、DLL3#3/CD3#2、DLL3#4/CD3#2、DLL3#5/CD3#2、DLL3#6/CD3#2、DLL3#7/CD3#2、DLL3#8/CD3#2、DLL3#9/CD3#2、DLL3#10/CD3#2、DLL3#11/CD3#2、DLL3#12/CD3#2、DLL3#13/CD3#2、DLL3#14/CD3#2、DLL3#15/CD3#2、DLL3#16/CD3#2、DLL3#17/CD3#2、DLL3#18/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#3、DLL3#4/CD3#3、DLL3#5/CD3#3、DLL3#6/CD3#3、DLL3#7/CD3#3、DLL3#8/CD3#3、DLL3#9/CD3#3、DLL3#10/CD3#3、DLL3#11/CD3#3、DLL3#12/CD3#3、DLL3#13/CD3#3、DLL3#14/CD3#3、DLL3#15/CD3#3、DLL3#16/CD3#3、DLL3#17/CD3#3、DLL3#18/CD3#3,第一及第二抗原结合单元由如上文所述的抗原结合单位的CDR及/或VH及VL序列定义。在优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含选自由以下组成的群的第一及第二抗原结合单元的组合: DLL3#1/CD3#1、DLL3#2/CD3#1、DLL3#3/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#2/CD3#2、DLL3#3/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#3及DLL3#3/CD3#3,第一及第二抗原结合单元由如上文所述的抗原结合单位的CDR及/或VH及VL序列定义。

[0246] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID N0:37的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ

ID NO:38的重链可变域及(ii)与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:67的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:68的重链可变域。

[0247] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的重链可变域及(ii)与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:67的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:68的重链可变域。

[0248] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的重链可变域及(ii)与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:67的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:68的重链可变域。

[0249] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的重链可变域及(ii)与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的重链可变域。

[0250] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的重链可变域及(ii)与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的重链可变域。

[0251] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的重链可变域及(ii)与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的重链可变域。

[0252] 在一些实施方案中,本发明的结合蛋白包含i)与DLL3(例如,如上述各别CDR或VH/VL序列所定义的DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18中的任一者)特异性结合的第一抗原结合单元,其包含利用第一肽接头直接地或间接地共价连接至第一重链可变域的第一轻链可变域及/或ii)与CD3(例如,如上述各别CDR或VH/VL序列所定义的CD3#1、CD3#2或CD3#3中的任一者)特异性结合的第二抗原结合单元,其包含利用第二肽接头直接地或间接地共价连接至第二重链可变域的第二轻链可变域。

[0253] 在本发明的结合蛋白的一些实施方案中,第一及/或第二抗原结合单元进一步包含如在常规抗体分子的轻/重Fab域中的CL及CH1域,因此该第一结合单元包含a)共价连接(直接地或间接地键结)至第一CL域的VL域(例如由DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18中的任一者的轻链CDR(LCCDR)或VL序列定义)及b)共价连接(直接地或间接地键结)至第一CH1域的VH域(例如由DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18中的任一者的重链CDR(HCCDR)或VH序列定义)且/或该第二抗原结合单元包含a)共价连接(直接地或间接地键结)至第二CL域的VL域(例如由CD3#1、CD3#2或CD3#3中的任一者的LCCDR或VL序列定义)及b)共价连接(直接地或间接地键

结)至第二CH1域的VH域(例如由CD3#1、CD3#2或CD3#3中的任一者的HCCDR或VH序列定义)。

[0254] 在本发明的上下文中,CL域为抗体轻链,例如K或 λ 轻链的恒定域。K轻链的恒定区的实施例示于SEQ ID NO:87中。 λ 轻链的恒定区的实施例示于SEQ ID NO:88中。在一些实施方案中,第一及第二CL域相同,例如第一及第二CL域皆为K轻链恒定域或第一及第二CL域皆为 λ 轻链恒定域。在一些实施方案中,第一及第二CL域不同,例如第一CL域为恒定K域且第二CL域为恒定 λ 域或反过来。

[0255] 在本发明的上下文中,CH1域为抗体重链的第一恒定域。恒定CH1域的实施例示于SEQ ID NO:253中。

[0256] 在本发明的结合蛋白的优选实施方案中,本发明的结合蛋白的第一抗原结合单元(例如由如上文所概述的CDR及/或VH/VL序列定义的DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18中的任一者)自N端至C端包含:第一轻链可变域、第一CL域、第一接头肽、第一VH域及第一CH1域,且/或本发明的结合蛋白的第二结合单元(例如由如上文所概述的CDR及/或VH/VL序列定义的CD3#1、CD3#2或CD3#3中的任一者)自N端至C端包含:第二轻链可变域、第二CL域、第二接头肽、第二VH域及第二CH1域。在此实施方案中,第一及/或第二结合单元具有单链Fab的结构。对于两者而言,第一及/或第二抗原结合单元在形成单链Fab时,顺序可颠倒使得自N端至C端该抗原结合单元包含:VH-CH1-[接头肽]-VL-CL。在本发明的蛋白质的一些实施方案中,当第一及/或第二抗原结合单元包含Fab或单链Fab时,恒定域可具有相同类型(例如两个CL域为K或 λ 轻链恒定域)或不同类型(第一CL域为K且第二CL域为 λ 轻链恒定域或反过来)。

[0257] 在一个方面中,用于本发明的结合蛋白的接头包含26至42个氨基酸,例如30至40个氨基酸。在另一方面中,用于本发明的蛋白质的接头包含34至40个氨基酸,例如36至39个氨基酸,例如38个氨基酸。在一些实施方案中,接头包含序列SEQ ID NO:89、90、91、92、93、94或95中的任一者,优选地SEQ ID NO:89。

[0258] 接头序列可为天然存在的序列或非天然存在的序列。若出于治疗目的使用,接头优选在给予本发明的结合蛋白的个体中不具免疫原性。

[0259] 如W01996/34103及W01994/04678中所述,接头序列之一适用群为衍生自重链抗体的铰链区的接头。其他实施例为聚丙氨酸接头序列,诸如Ala-Ala-Ala。

[0260] 接头序列的更优选实施例为具有不同长度的Gly/Ser接头,诸如(glyxsery)z接头,包括例如(gly4ser)3、(gly4ser)5、(gly4ser)7、(gly3ser)3、(gly3ser)5、(gly3ser)7、(gly3ser2)3、(gly3ser2)5及(gly3ser2)7或SEQ ID NO:89至95中的任一者的接头。

[0261] 在本发明的结合蛋白的一些实施方案中,第一抗原结合单元的VL域(例如由DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18的轻链CDR(LCCDR)或VL序列定义)经由第一Gly/Ser接头(例如26至42个氨基酸、30至40个氨基酸、34至40个氨基酸或36至39个氨基酸中的任一者,优选地38个氨基酸的Gly/Ser接头)共价连接(例如直接键结)至第一抗原结合单元的VH域(例如由DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18的重链CDR(HCCDR)或VH序列定义);且第二抗原结合单元的VL域(例如由

CD3#1、CD3#2或CD3#3的轻链CDR (LCCDR) 或VL序列定义) 经由第二Gly/Ser接头 (例如26至42个氨基酸、30至40个氨基酸、34至40个氨基酸或36至39个氨基酸中的任一者, 优选38个氨基酸的Gly/Ser接头) 共价连接 (例如直接键结) 至第二抗原结合单元的VH域 (例如由CD3#1、CD3#2或CD3#3的重链CDR (HCCDR) 或VH序列定义)。更优选地, 第一及第二接头相同。甚至更优选地, 第一及第二接头各自包含氨基酸序列SEQ ID NO:89。

[0262] 在一些实施方案中, 本发明的结合蛋白包含: 第一单链Fab, 其形成对DLL3具有特异性的第一抗原结合单元且包含选自由以下组成的群的序列: SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:230、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239及SEQ ID NO:240; 及SEQ ID NO:71的第二单链Fab, 其形成对CD3具有特异性的第二抗原结合单元。在一优选实施方案中, 本发明的结合蛋白包含: 第一单链Fab, 其形成第一抗原结合单元, 包含序列SEQ ID NO:49; 及第二单链Fab, 其包含序列SEQ ID NO:71, 形成第二抗原结合单元。在一优选实施方案中, 本发明的结合蛋白包含: 第一单链Fab, 其形成第一抗原结合单元, 包含序列SEQ ID NO:50; 及第二单链Fab, 其包含序列SEQ ID NO:71, 形成第二抗原结合单元。在一优选实施方案中, 本发明的结合蛋白包含: 第一单链Fab, 其形成第一抗原结合单元, 包含序列SEQ ID NO:51; 及第二单链Fab, 其包含序列SEQ ID NO:71, 形成第二抗原结合单元。

[0263] 在一些实施方案中, 本发明的结合蛋白包含: 第一单链Fab, 其形成对DLL3具有特异性的第一抗原结合单元且包含选自由以下组成的群的序列: SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:230、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239及SEQ ID NO:240; 及SEQ ID NO:72的第二单链Fab, 其形成对CD3具有特异性的第二抗原结合单元。在一优选实施方案中, 本发明的结合蛋白包含: 第一单链Fab, 其形成第一抗原结合单元, 包含序列SEQ ID NO:49; 及第二单链Fab, 其包含序列SEQ ID NO:72, 形成第二抗原结合单元。在一优选实施方案中, 本发明的结合蛋白包含: 第一单链Fab, 其形成第一抗原结合单元, 包含序列SEQ ID NO:50; 及第二单链Fab, 其包含序列SEQ ID NO:72, 形成第二抗原结合单元。在一优选实施方案中, 本发明的结合蛋白包含: 第一单链Fab, 其形成第一抗原结合单元, 包含序列SEQ ID NO:51; 及第二单链Fab, 其包含序列SEQ ID NO:72, 形成第二抗原结合单元。

[0264] 在一些实施方案中, 本发明的结合蛋白包含: 第一单链Fab, 其形成对DLL3具有特异性的第一抗原结合单元且包含选自由以下组成的群的序列: SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:230、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239及SEQ ID NO:240; 及SEQ ID NO:104的第二单链Fab, 其形成对CD3具有特异性的第二抗原结合单元。在一优选实施方案中, 本发明的结合蛋白包含: 第一单链Fab, 其形成第一抗原结合单元, 包含序列SEQ ID NO:49; 及第二单链Fab, 其包含序列SEQ ID NO:104, 形成第二抗原结合单元。在一优选实施方案中, 本发明的结合蛋白包含: 第一单链Fab, 其形成第一抗原结合单元, 包含序列SEQ ID NO:50; 及第二单链Fab, 其包含序列SEQ ID NO:104, 形成第二抗原结合单元。在一优选实施

方案中,本发明的结合蛋白包含:第一单链Fab,其形成第一抗原结合单元,包含序列SEQ ID NO:51;及第二单链Fab,其包含序列SEQ ID NO:104,形成第二抗原结合单元。

[0265] 在一些实施方案中,第一抗原结合单元(例如,如上文概述的CDR及/或VH/VL序列所定义的DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18)及/或第二抗原结合单元(例如CD3#1、CD3#2或CD3#3)包含共价连接(例如直接键结)至CL域的VL域及连接于CH1域的VH域(亦即一起形成衍生自抗体的Fab片段),且该CH1域进一步共价连接(例如直接键结)至Fc域,进而形成具有一个轻链及一个重链的常规Y形抗体分子的臂。在一些实施方案中,第一及第二抗原结合单元各自形成分别共价连接(例如直接键结)至第一及第二Fc域的Fab片段,亦即第一及第二Fab片段,进而形成常规杂四聚体双特异性及二价抗体分子。

[0266] 在优选实施方案中,第一抗原结合单元(例如,如上文概述的CDR及/或VH/VL序列所定义的DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18中的任一者)及/或第二抗原结合单元(例如CD3#1、CD3#2或CD3#3中的任一者)包含单链Fab,亦即经由肽接头(例如具有26至42个氨基酸、30至40个氨基酸、34至40个氨基酸或36至39个氨基酸中的任一者,优选地38个氨基酸的Gly/Ser接头,甚至更优选SEQ ID NO:89的接头)共价连接至重链的VH-CH1域的抗体轻链(VL-CL)。在优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含:第一多肽链,其包含与DLL3(例如,如由上文各别CDR或VH/VL序列所定义的DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18中的任一者,优选地第一抗原结合单元为DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3)特异性结合的第一单链Fab及第一Fc域(此多肽链在本文中亦称为“DLL3链”);及第二多肽链,其包含与CD3(例如,如上文各别CDR或VH/VL序列所定义的CD3#1、CD3#2或CD3#3中的任一者)特异性结合的第二单链Fab及第二Fc域(此多肽链在本文中亦称为“CD3链”)。在一些实施方案中,第一及第二Fc域相同。在优选实施方案中,第一及第二Fc域不同。本发明的所得结合蛋白具有完整Fc且具有两个独立结合位点:针对DLL3的第一结合单元及针对CD3的第二结合单元。在一些实施方案中,第一抗原结合单元由单一多肽链(DLL3链)组成。在一些实施方案中,第二抗原结合单元由单一多肽链(CD3链)组成。在一些实施方案中,第一及第二抗原结合单元两者分别由单一多肽链组成。

[0267] 在一些实施方案中,本发明的蛋白质的第一抗原结合单元为通过第一多肽链(DLL3链)形成且第二抗原结合单元为通过第二多肽链(CD3链)形成。因此,在一些实施方案中,本发明的结合蛋白包含两条不同多肽链,各自包含具有不同特异性的抗原结合单元、彼此共价连接,或经由二硫键或可能经由肽接头共价连接的多肽链。在一些实施方案中,本发明的结合蛋白为双特异性二价杂二聚蛋白质,其包含两个多肽链,一条多肽链(第一多肽链或DLL3链)包含与DLL3(例如由各别CDR及/或VH/VL序列定义的DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18中的任一者)特异性结合的抗原结合单元且另一多肽链(第二多肽链或CD3链)包含与CD3(例如CD3#1、CD3#2或CD3#3中的任一者)特异性结合的抗原结合单元。

[0268] 在本发明的上下文中, Fc域例如衍生自IgG, 例如IgG₁、IgG₂或IgG₄的重链。举例而言, 本发明的Fc域为IgG₁或IgG₄的重链的Fc域且包含铰链区及两个恒定域(CH₂及CH₃)。Fc域(包括铰链区)的实施例示于SEQ ID NO:81及84中。

[0269] 除非另外规定, 否则本发明的蛋白质的氨基酸链中的氨基酸编号在本文中为根据EU编号体系((Edelman, Cunningham等人, 1969)。除非另外规定, 否则此意谓根据EU编号体系, 本文中指示的氨基酸数目对应于在相应亚型(例如IgG₁或IgG₄)的重链中的位置。

[0270] 在一些实施方案中, 本发明的蛋白质中的第一Fc域及第二Fc域各自包含一或多个氨基酸变化, 所述氨基酸变化减少第一或第二多肽链的均二聚体而非第一及第二多肽链的杂二聚体的形成。经由这些变化, 通过用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)置换来自其中一个重链的界面的一或多个小氨基酸侧链而在一个Fc域中生成“突起”。通过用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)置换大氨基酸侧链而在另一Fc域的界面上产生相同或类似尺寸的互补“空腔”。此提供一种相比于其他非所需最终产物(诸如均二聚体, 尤其具有“突起”的Fc域的均二聚体)增加杂二聚体产率的机制(参见例如Ridgway等人, Protein Eng, 1996.9(7):第617-21页; Atwell等人, JMB, 1997, 270, 26-35)。在一些实施方案中, 此类氨基酸变化为在第一Fc域的位置366处的酪氨酸(Y) [T366Y]及在第二Fc域的407位置处的苏氨酸(T) [Y407T]。在一些实施方案中, 第一Fc域包含在位置366处的丝氨酸(S) [T366S]且第二Fc域包含在位置366处的色氨酸(W) [T366W]、在位置368处的丙氨酸(A) [L368A]及在位置407处的缬氨酸(V) [Y407V]。在优选实施方案中, 第一Fc域包含在位置366处的色氨酸(W) [T366W], 且该第二Fc域包含在位置366处的丝氨酸(S) [T366S]、在位置368处的丙氨酸(A) [L368A]及在位置407处的缬氨酸(V) [Y407V]。举例而言, 根据EU编号的Fc域的位置366对应于SEQ ID NO:81的人类IgG1Fc序列中的氨基酸位置146, 其自SEQ ID NO:81中的位置146处的T改变为SEQ ID NO:82中的位置146处的W; 且根据EU编号的位置366、368及407分别对应于SEQ ID NO:81中的氨基酸位置146、148及187, 其自SEQ ID NO:81中的这些位置处的T、L及Y改变为SEQ ID NO:83中的这些位置处的S、A及V。在这些实施方案中的任一者中, 针对第一Fc域描述的氨基酸变化可位于第二Fc域中且第二Fc域的各别氨基酸变化可位于第一Fc域中。换言之, 术语“第一”及“第二”在这些实施方案中可互换。在一些实施方案中, 此类Fc域为衍生自IgG₁或IgG₄的重链的Fc域。

[0271] 在一些实施方案中, 第一Fc域除了位置366处的色氨酸(W) [T366W]之外亦包含在位置354处的半胱氨酸(C) [S354C]且第二Fc域除了位置366处的丝氨酸(S) [T366S]、位置368处的丙氨酸(A) [L368A]及位置407处的缬氨酸(V) [Y407V]之外亦包含在位置349处的半胱氨酸(C) [Y349C]。在一个方面中, 此类Fc域为衍生自IgG₄的重链的Fc域。

[0272] 在一些实施方案中, 本发明的结合蛋白中的第一Fc域或第二Fc域进一步包含一或多个氨基酸变化, 所述氨基酸变化减少Fc域与蛋白质A的结合。在一些实施方案中, 此类氨基酸变化为Fc域中之一者的位置435处的精氨酸[H435R]及位置436处的苯丙氨酸[Y436F]。两种变化来源于人类IgG3的序列(IgG3不与蛋白质A结合)。这些两种突变位于CH3域中且并入Fc域中之一者中以减少与蛋白质A的结合(参见例如Jendeborg等人, J Immunol Methods, 1997.201(1):第25-34页)。这些两种变化促进在蛋白质纯化期间包含这些变化的重链的均二聚体的移除。

[0273] 在一些实施方案中, 在本发明的结合蛋白中, 包含在位置407处的苏氨酸(T)

[Y407T]的Fc域进一步包含在位置435处的精氨酸[H435R]及在位置436处的苯丙氨酸[Y436F]。在此情况下,另一条重链包含在位置366处的酪氨酸(Y)[T366Y],但不包括在位置435及436处的两个变化。可替代地,在一些实施方案中,在本发明的蛋白质中,包含在位置366处的丝氨酸(S)[T366S]、在位置368处的丙氨酸(A)[L368A]及在位置407处的缬氨酸(V)[Y407V]的Fc域进一步包含在位置435处的[H435R]及在位置436处的苯丙氨酸[Y436F]。在此情况下,另一Fc域包含在位置366处的色氨酸(W)[T366W],但不包括在位置435及436处的两个变化。因此,包含产生如上文所述的“空腔”的氨基酸变化的Fc域亦包含减少与蛋白质A结合的氨基酸变化。包含此Fc域的均二聚体经由与蛋白质A的结合减少移除。包含“突起”的另一Fc域的均二聚体的产生因“突起”的存在而减少。

[0274] 在一些实施方案中,本发明的蛋白质的Fc域可能或可能不进一步包含YTE突变(M252Y/S254T/T256E,EU编号(Da11'Acqua,Kiener等人,2006))。已展示这些突变经由优选地提高在pH 6.0下对新生FcRn底物的结合亲和力来改善Fc域的药物动力学特性。

[0275] 在一些实施方案中,来源于IgG1的本发明的第一及/或第二Fc域亦包括“K0”突变(L234A、L235A)。在另一方面中,来源于IgG4的本发明的第一及/或第二Fc域亦包括Pro铰链突变(S228P)。

[0276] 在本发明的优选实施方案中,结合蛋白包含i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:73的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#1/CD3#1),或ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#2/CD3#1),或iii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#3/CD3#1),或iv)包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#4/CD3#1),或v)包含氨基酸序列SEQ ID NO:77的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#5/CD3#1),或vi)包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#6/CD3#1);或vii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:241的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#7/CD3#1);或viii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:242的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#8/CD3#1);或ix)包含氨基酸序列SEQ ID NO:243的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#9/CD3#1);或x)包含氨基酸序列SEQ ID NO:244的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#10/CD3#1);或xi)包含氨基酸序列SEQ ID NO:245的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#11/CD3#1);或xii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:246的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#12/CD3#1);或xiii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:247的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#13/CD3#1);或xiv)包含氨基酸序列SEQ ID NO:248的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#14/CD3#1);或xv)包含氨基酸序列SEQ ID NO:249的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#15/CD3#1),或xvi)包含氨基酸序列SEQ ID NO:250的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#16/CD3#1);或xvii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:251的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链(DLL3#17/CD3#1);或xviii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:252的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的第二多肽链

(DLL3#18/CD3#1)。优选地,第一及第二多肽链经由一或多个二硫键连接且形成类似于常规Y形抗体分子的抗体样结构(图1)。

[0277] 在另一优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含选自SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74及SEQ ID NO:75组成的群的氨基酸序列;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:79。

[0278] 在一个优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:73;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:79。

[0279] 在一个优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:74;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:79。

[0280] 在一个优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:75;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:79。

[0281] 在本发明的优选实施方案中,结合蛋白包含i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:73的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#1/CD3#2),或ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#2/CD3#2),或iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#3/CD3#2),或iv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#4/CD3#2),或v) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:77的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#5/CD3#2),或vi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#6/CD3#2);或vii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:241的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#7/CD3#2);或viii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:242的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#8/CD3#2);或ix) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:243的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#9/CD3#2);或x) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:244的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#10/CD3#2);或xi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:245的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#11/CD3#2);或xii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:246的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#12/CD3#2);或xiii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:247的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#13/CD3#2);或xiv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:248的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#14/CD3#2);或xv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:249的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#15/CD3#2),或xvi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:250的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#16/CD3#2);或xvii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:251的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#17/CD3#2);或xviii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:252的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的第二多肽链(DLL3#18/CD3#2)。优选地,第一及第二多肽链经由一或多个二硫键连接且形成类似于常规Y形抗

体分子的抗体样结构(图1)。

[0282] 在另一优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含选自自由SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74及SEQ ID NO:75组成的群的氨基酸序列;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:80。

[0283] 在一个优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:73;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:80。

[0284] 在一个优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:74;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:80。

[0285] 在一个优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:75;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:80。

[0286] 在本发明的优选实施方案中,结合蛋白包含i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:73的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#1/CD3#3),或ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#2/CD3#3),或iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#3/CD3#3),或iv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#4/CD3#3),或v) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:77的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#5/CD3#3),或vi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#6/CD3#3);或vii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:241的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#7/CD3#3);或viii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:242的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#8/CD3#3);或ix) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:243的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#9/CD3#3);或x) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:244的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#10/CD3#3);或xi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:245的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#11/CD3#3);或xii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:246的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#12/CD3#3);或xiii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:247的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#13/CD3#3);或xiv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:248的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#14/CD3#3);或xv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:249的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#15/CD3#3),或xvi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:250的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#16/CD3#3);或xvii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:251的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#17/CD3#3);或xviii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:252的第一多肽链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:105的第二多肽链(DLL3#18/CD3#3)。优选地,第一及第二多肽链经由一或多个二硫键连接且形成类似于常规Y形抗体分子的抗体样结构(图1)。

[0287] 在另一优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含选自SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74及SEQ ID NO:75组成的群的氨基酸序列;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:105。

[0288] 在一个优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:73;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:105。

[0289] 在一个优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:74;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:105。

[0290] 在一个优选实施方案中,结合蛋白包含:对DLL3具有特异性的第一多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:75;及对CD3具有特异性的第二多肽链,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:105。

[0291] 对于上述所有实施方案,应理解,通过使用术语“包含”,意欲亦包括其中各别结构域或分子“由”如所指示的氨基酸序列“组成”的实施方案。

[0292] 在另一方面中,本发明提供一种蛋白质,其包含与DLL3特异性结合的第一多肽链及与CD3特异性结合的第二多肽链,其中该第一链包含共价连接(例如直接键结)至第一接头的轻链,该第一接头自身共价连接(例如直接键结)至第一重链,且其中与CD3特异性结合的第二链包含共价连接(例如直接键结)至第二接头的第二轻链,该第二接头自身共价连接(例如直接键结)至第二重链。

[0293] 在一些实施方案中,自其N端起始,第一多肽链包含与DLL3特异性结合的第一轻链可变区、第一轻链恒定区、第一接头、对DLL3具有特异性的第一重链可变区及第一重链恒定区。在一些实施方案中,自其N端起始,第二多肽链包含与CD3特异性结合的第二轻链可变区、第二轻链恒定区、第二接头、对CD3具有特异性的第二重链可变区及第二重链恒定区。

[0294] 所得蛋白质具有略大于IgG的完整Fc且具有两个独立的结合位点(例如各结合位点对各别抗原为单价的):针对DLL3的第一结合位点及针对CD3的第二结合位点。优选地,第一及第二多肽链经由一或多个二硫键连接。因此,本发明的蛋白质为抗体样结构,具有常规全长抗体的Y形结构(参见图1)。此双特异性型式在表达及纯化之后极大地降低异质性(例如通过避免具有不同结合特异性的轻及重可变域的错配),同时维持结构内结合部分不大可能产生非所需免疫原性反应物的功能特性。此亦允许杂二聚蛋白质(例如在哺乳动物细胞中)的良好表达。

[0295] 在本发明的蛋白质的一些实施方案中,与DLL3特异性结合的第一多肽链包含第一轻链可变域及第一重链可变域,该第一轻链可变域及第一重链可变域包含选自i)至 xviii)组成的群的CDR序列:

[0296] i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1(CDR1)、SEQ ID NO:2(CDR2)及SEQ ID NO:3(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:4(CDR1)、SEQ ID NO:5(CDR2)及SEQ ID NO:6(CDR3)的重链CDR;

[0297] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:7(CDR1)、SEQ ID NO:8(CDR2)及SEQ ID NO:9(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:10(CDR1)、SEQ ID NO:11(CDR2)及SEQ ID NO:12(CDR3)的重链CDR;

[0298] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:13(CDR1)、SEQ ID NO:14(CDR2)及SEQ ID NO:15(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:16(CDR1)、SEQ ID NO:17(CDR2)及SEQ ID NO:18(CDR3)的重链CDR;

[0299] iv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:19(CDR1)、SEQ ID NO:20(CDR2)及SEQ ID NO:21(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:22(CDR1)、SEQ ID NO:23(CDR2)及SEQ ID NO:24(CDR3)的重链CDR;

[0300] v) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:25(CDR1)、SEQ ID NO:26(CDR2)及SEQ ID NO:27(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:28(CDR1)、SEQ ID NO:29(CDR2)及SEQ ID NO:30(CDR3)的重链CDR;以及vi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:31(CDR1)、SEQ ID NO:32(CDR2)及SEQ ID NO:33(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:34(CDR1)、SEQ ID NO:35(CDR2)及SEQ ID NO:36(CDR3)的重链CDR;

[0301] vii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:133(CDR1)、SEQ ID NO:134(CDR2)及SEQ ID NO:135(CDR3)的轻链CDR及包含氨基酸序列SEQ ID NO:136(CDR1)、SEQ ID NO:137(CDR2)及SEQ ID NO:138(CDR3)的重链CDR;

[0302] viii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:139(CDR1)、SEQ ID NO:140(CDR2)及SEQ ID NO:141(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:142(CDR1)、SEQ ID NO:143(CDR2)及SEQ ID NO:144(CDR3)的重链CDR;

[0303] ix) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:145(CDR1)、SEQ ID NO:146(CDR2)及SEQ ID NO:147(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:148(CDR1)、SEQ ID NO:149(CDR2)及SEQ ID NO:150(CDR3)的重链CDR;

[0304] x) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:151(CDR1)、SEQ ID NO:152(CDR2)及SEQ ID NO:153(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:154(CDR1)、SEQ ID NO:155(CDR2)及SEQ ID NO:156(CDR3)的重链CDR;

[0305] xi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:157(CDR1)、SEQ ID NO:158(CDR2)及SEQ ID NO:159(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:160(CDR1)、SEQ ID NO:161(CDR2)及SEQ ID NO:162(CDR3)的重链CDR;

[0306] xii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:163(CDR1)、SEQ ID NO:164(CDR2)及SEQ ID NO:165(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:166(CDR1)、SEQ ID NO:167(CDR2)及SEQ ID NO:168(CDR3)的重链CDR;

[0307] xiii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:169(CDR1)、SEQ ID NO:170(CDR2)及SEQ ID NO:171(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:172(CDR1)、SEQ ID NO:173(CDR2)及SEQ ID NO:174(CDR3)的重链CDR;

[0308] xiv) 包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:175(CDR1)、SEQ ID NO:176(CDR2)及SEQ ID NO:177(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:178(CDR1)、SEQ ID NO:179(CDR2)及SEQ ID NO:180(CDR3)的重链CDR;

[0309] xv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:181(CDR1)、SEQ ID NO:182(CDR2)及SEQ ID NO:183(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:184(CDR1)、SEQ ID NO:185(CDR2)及SEQ ID NO:186(CDR3)的重链CDR;

[0310] xvi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:187(CDR1)、SEQ ID NO:188(CDR2)及SEQ ID NO:

189 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:190 (CDR1)、SEQ ID NO:191 (CDR2) 及SEQ ID NO:192 (CDR3) 的重链CDR;

[0311] xvii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:193 (CDR1)、SEQ ID NO:194 (CDR2) 及SEQ ID NO:195 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:196 (CDR1)、SEQ ID NO:197 (CDR2) 及SEQ ID NO:198 (CDR3) 的重链CDR;以及

[0312] xviii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:199 (CDR1)、SEQ ID NO:200 (CDR2) 及SEQ ID NO:201 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:202 (CDR1)、SEQ ID NO:203 (CDR2) 及SEQ ID NO:204 (CDR3) 的重链CDR。

[0313] 由这些CDR序列定义的各别轻/重链可变域分别称为DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17及DLL3#18。优选地,CDR序列选自由如上文所定义的i)至iii) (DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3) 组成的群。

[0314] 在本发明的结合蛋白的优选实施方案中,该与CD3特异性结合的第二多肽链包含第二轻链可变域及第二重链可变域,该第二轻链可变域及第二重链可变域包含选自由以下组成的群的CDR序列:

[0315] i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:55 (CDR1)、SEQ ID NO:56 (CDR2) 及SEQ ID NO:57 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:58 (CDR1)、SEQ ID NO:59 (CDR2) 及SEQ ID NO:60 (CDR3) 的重链CDR;

[0316] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:61 (CDR1)、SEQ ID NO:62 (CDR2) 及SEQ ID NO:63 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:64 (CDR1)、SEQ ID NO:65 (CDR2) 及SEQ ID NO:66 (CDR3) 的重链CDR;以及

[0317] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:96 (CDR1)、SEQ ID NO:97 (CDR2) 及SEQ ID NO:98 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:99 (CDR1)、SEQ ID NO:100 (CDR2) 及SEQ ID NO:101 (CDR3) 的重链CDR。

[0318] 由这些CDR序列定义的各别轻/重链可变域分别称为CD3#1、CD3#2及CD3#3。

[0319] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i) 与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含第一轻链可变域,该第一轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:1 (CDR1)、SEQ ID NO:2 (CDR2) 及SEQ ID NO:3 (CDR3) 的轻链CDR及第一重链可变域,该第一重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:4 (CDR1)、SEQ ID NO:5 (CDR2) 及SEQ ID NO:6 (CDR3) 的重链CDR;及(ii) 与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含第二轻链可变域,该第二轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:55 (CDR1)、SEQ ID NO:56 (CDR2) 及SEQ ID NO:57 (CDR3) 的轻链CDR及第二重链可变域,该第二重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:58 (CDR1)、SEQ ID NO:59 (CDR2) 及SEQ ID NO:60 (CDR3) 的重链CDR。

[0320] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i) 与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含第一轻链可变域,该第一轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:7 (CDR1)、SEQ ID NO:8 (CDR2) 及SEQ ID NO:9 (CDR3) 的轻链CDR及第一重链可变域,该第一重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:10 (CDR1)、SEQ ID NO:11 (CDR2) 及SEQ ID NO:12 (CDR3) 的重链CDR;及(ii) 与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含第二轻链可变域,该第二轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:55 (CDR1)、SEQ ID NO:56 (CDR2) 及SEQ ID NO:

57 (CDR3) 的轻链CDR及第二重链可变域,该第二重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:58 (CDR1)、SEQ ID NO:59 (CDR2) 及SEQ ID NO:60 (CDR3) 的重链CDR。

[0321] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含 (i) 与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含第一轻链可变域,该第一轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:13 (CDR1)、SEQ ID NO:14 (CDR2) 及SEQ ID NO:15 (CDR3) 的轻链CDR及第一重链可变域,该第一重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:16 (CDR1)、SEQ ID NO:17 (CDR2) 及SEQ ID NO:18 (CDR3) 的重链CDR;及 (ii) 与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含第二轻链可变域,该第二轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:55 (CDR1)、SEQ ID NO:56 (CDR2) 及SEQ ID NO:57 (CDR3) 的轻链CDR及第二重链可变域,该第二重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:58 (CDR1)、SEQ ID NO:59 (CDR2) 及SEQ ID NO:60 (CDR3) 的重链CDR。

[0322] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含 (i) 与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含第一轻链可变域,该第一轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:1 (CDR1)、SEQ ID NO:2 (CDR2) 及SEQ ID NO:3 (CDR3) 的轻链CDR及第一重链可变域,该第一重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:4 (CDR1)、SEQ ID NO:5 (CDR2) 及SEQ ID NO:6 (CDR3) 的重链CDR;及 (ii) 与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含第二轻链可变域,该第二轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:61 (CDR1)、SEQ ID NO:62 (CDR2) 及SEQ ID NO:63 (CDR3) 的轻链CDR及第二重链可变域,该第二重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:64 (CDR1)、SEQ ID NO:65 (CDR2) 及SEQ ID NO:66 (CDR3) 的重链CDR。

[0323] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含 (i) 与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含第一轻链可变域,该第一轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:7 (CDR1)、SEQ ID NO:8 (CDR2) 及SEQ ID NO:9 (CDR3) 的轻链CDR及第一重链可变域,该第一重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:10 (CDR1)、SEQ ID NO:11 (CDR2) 及SEQ ID NO:12 (CDR3) 的重链CDR;及 (ii) 与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含第二轻链可变域,该第二轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:61 (CDR1)、SEQ ID NO:62 (CDR2) 及SEQ ID NO:63 (CDR3) 的轻链CDR及第二重链可变域,该第二重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:64 (CDR1)、SEQ ID NO:65 (CDR2) 及SEQ ID NO:66 (CDR3) 的重链CDR。

[0324] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含 (i) 与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含第一轻链可变域,该第一轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:13 (CDR1)、SEQ ID NO:14 (CDR2) 及SEQ ID NO:15 (CDR3) 的轻链CDR及第一重链可变域,该第一重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:16 (CDR1)、SEQ ID NO:17 (CDR2) 及SEQ ID NO:18 (CDR3) 的重链CDR;及 (ii) 与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含第二轻链可变域,该第二轻链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:61 (CDR1)、SEQ ID NO:62 (CDR2) 及SEQ ID NO:63 (CDR3) 的轻链CDR及第二重链可变域,该第二重链可变域具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:64 (CDR1)、SEQ ID NO:65 (CDR2) 及SEQ ID NO:66 (CDR3) 的重链CDR。

[0325] 在本发明的蛋白质的优选实施方案中,该与DLL3特异性结合的第一多肽链包含选自i) 至xviii) 组成的群的轻链可变域(第一轻链可变域)及重链可变域(第一重链可变域):

[0326] i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的重链可变域(DLL3#1);

[0327] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的重链可变域(DLL3#2) ;

[0328] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的重链可变域(DLL3#3) ;

[0329] iv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:43的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的重链可变域(DLL3#4) ;

[0330] v) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的重链可变域(DLL3#5) ;

[0331] vi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的重链可变域(DLL3#6) ;

[0332] vii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:205的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:206的重链可变域(DLL3#7) ;

[0333] viii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:207的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:208的重链可变域(DLL3#8) ;

[0334] ix) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:209的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:210的重链可变域(DLL3#9) ;

[0335] x) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:211的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:212的重链可变域(DLL3#10) ;

[0336] xi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:213的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:214的重链可变域(DLL3#11) ;

[0337] xii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:215的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:216的重链可变域(DLL3#12) ;

[0338] xiii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:217的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:218的重链可变域(DLL3#13) ;

[0339] xiv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:219的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:220的重链可变域(DLL3#14) ;

[0340] xv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:221的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:222的重链可变域(DLL3#15) ;

[0341] xvi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:223的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:224的重链可变域(DLL3#16) ;

[0342] xvii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:225的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:226的重链可变域(DLL3#17) ;以及

[0343] xviii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:227的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:228的重链可变域(DLL3#18) 。

[0344] 优选地,轻链可变域及重链可变域序列选自由如上文所定义的i)至iii) (DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3)组成的群。

[0345] 在本发明的蛋白质的优选实施方案中,该与CD3特异性结合的第二多肽链包含选自由以下组成的群的轻链可变域(第二轻链可变域)及重链可变域(第二重链可变域) :

[0346] i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:67的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:68

的重链可变域(CD3#1)；

[0347] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的重链可变域(CD3#2)；以及

[0348] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的重链可变域(CD3#3)。

[0349] 在一些实施方案中,本发明的结合蛋白包含第一及第二多肽链,该第一及第二多肽链包含选自由以下组成的清单的轻/重链可变域的CDR及/或VH及VL序列:DLL3#1/CD3#1、DLL3#2/CD3#1、DLL3#3/CD3#1、DLL3#4/CD3#1、DLL3#5/CD3#1、DLL3#6/CD3#1、DLL3#7/CD3#1、DLL3#8/CD3#1、DLL3#9/CD3#1、DLL3#10/CD3#1、DLL3#11/CD3#1、DLL3#12/CD3#1、DLL3#13/CD3#1、DLL3#14/CD3#1、DLL3#15/CD3#1、DLL3#16/CD3#1、DLL3#17/CD3#1、DLL3#18/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#2/CD3#2、DLL3#3/CD3#2、DLL3#4/CD3#2、DLL3#5/CD3#2、DLL3#6/CD3#2、DLL3#7/CD3#2、DLL3#8/CD3#2、DLL3#9/CD3#2、DLL3#10/CD3#2、DLL3#11/CD3#2、DLL3#12/CD3#2、DLL3#13/CD3#2、DLL3#14/CD3#2、DLL3#15/CD3#2、DLL3#16/CD3#2、DLL3#17/CD3#2、DLL3#18/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#3、DLL3#4/CD3#3、DLL3#5/CD3#3及DLL3#6/CD3#3、DLL3#7/CD3#3、DLL3#8/CD3#3、DLL3#9/CD3#3、DLL3#10/CD3#3、DLL3#11/CD3#3、DLL3#12/CD3#3、DLL3#13/CD3#3、DLL3#14/CD3#3、DLL3#15/CD3#3、DLL3#16/CD3#3、DLL3#17/CD3#3、DLL3#18/CD3#3。在优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含第一及第二多肽链,该第一及第二多肽链包含选自由以下组成的清单的轻/重链可变域的CDR及/或VH及VL序列:DLL3#1/CD3#1、DLL3#2/CD3#1、DLL3#3/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#2/CD3#2、DLL3#3/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#3及DLL3#3/CD3#3。

[0350] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含SEQ ID NO:37的轻链可变域及SEQ ID NO:38的重链可变域;及(ii)与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含SEQ ID NO:67的轻链可变域及SEQ ID NO:68的重链可变域。

[0351] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含SEQ ID NO:39的轻链可变域及SEQ ID NO:40的重链可变域;及(ii)与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含SEQ ID NO:67的轻链可变域及SEQ ID NO:68的重链可变域。

[0352] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含SEQ ID NO:41的轻链可变域及SEQ ID NO:42的重链可变域;及(ii)与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含SEQ ID NO:67的轻链可变域及SEQ ID NO:68的重链可变域。

[0353] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含SEQ ID NO:37的轻链可变域及SEQ ID NO:38的重链可变域;及(ii)与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含SEQ ID NO:69的轻链可变域及SEQ ID NO:70的重链可变域。

[0354] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含SEQ ID NO:39的轻链可变域及SEQ ID NO:40的重链可变域;及(ii)与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含SEQ ID NO:69的轻链可变域及SEQ ID NO:70的重链可变域。

[0355] 在一个优选实施方案中,本发明的结合蛋白包含(i)与DLL3特异性结合的第一多肽链,其包含SEQ ID NO:41的轻链可变域及SEQ ID NO:42的重链可变域;及(ii)与CD3特异性结合的第二多肽链,其包含SEQ ID NO:69的轻链可变域及SEQ ID NO:70的重链可变域。

[0356] 在本发明的一些实施方案中,第一及/或第二接头肽包含如上文所述的接头,例如

来源于铰链区的接头、聚丙氨酸接头或Gly/Ser接头,其中该接头包含26至42个氨基酸,例如30至40个氨基酸、34至40个氨基酸,或36至39个氨基酸中的任一者,优选38个氨基酸。

[0357] 在优选实施方案中,对DLL3具有特异性的第一多肽链包含以下中的任一者的氨基酸序列:SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:230、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239或SEQ ID NO:240且对CD3具有特异性的第二多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:71。

[0358] 在一些实施方案中,对DLL3具有特异性的第一多肽链包含以下中的任一者的氨基酸序列:SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:230、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239或SEQ ID NO:240且对CD3具有特异性的第二多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:72。

[0359] 在一些实施方案中,对DLL3具有特异性的第一多肽链包含以下中的任一者的氨基酸序列:SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:230、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239或SEQ ID NO:240且对CD3具有特异性的第二多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:104。

[0360] 在一个优选实施方案中,对DLL3具有特异性的第一多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:49且对CD3具有特异性的第二多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:71。

[0361] 在一个优选实施方案中,对DLL3具有特异性的第一多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:50且对CD3具有特异性的第二多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:71。

[0362] 在一个优选实施方案中,对DLL3具有特异性的第一多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:51且对CD3具有特异性的第二多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:71。

[0363] 在一个优选实施方案中,对DLL3具有特异性的第一多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:49且对CD3具有特异性的第二多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:72。

[0364] 在一个优选实施方案中,对DLL3具有特异性的第一多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:50且对CD3具有特异性的第二多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:72。

[0365] 在一个优选实施方案中,对DLL3具有特异性的第一多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:51且对CD3具有特异性的第二多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:72。

[0366] 在本发明的结合蛋白的一些实施方案中,第一及第二多肽链包含来源于IgG(例如IgG1、IgG2或IgG4)的重链的Fc域。举例而言,本发明的Fc域为IgG1或IgG4的重链的Fc域且包含铰链区及两个恒定域(CH2及CH3)。人类IgG的Fc域的实施例示于SEQ ID NO:81及84中。

[0367] 在本发明的结合蛋白的一些实施方案中,重链包含一或多个氨基酸变化。举例而言,此类氨基酸变化为第一重链的在位置366处的酪氨酸(Y) [T366Y]及第二重链的在位置407处的苏氨酸(T) [Y407T]。在一些实施方案中,第一重链包含在位置366处的丝氨酸(S) [T366S]且第二重链包含在位置366处的色氨酸(W) [T366W]、在位置368处的丙氨酸(A)

[L368A]及在位置407处的缬氨酸(V) [Y407V]。在优选实施方案中,第一重链包含在位置366处的色氨酸(W) [T366W]且第二重链包含在位置366处的丝氨酸(S) [T366S]、在位置368处的丙氨酸(A) [L368A]及在位置407处的缬氨酸(V) [Y407V]。举例而言,根据EU编号的Fc域的位置366对应于SEQ ID NO:81的人类IgG1Fc序列中的氨基酸位置146,其自SEQ ID NO:81中的位置146处的T改变为SEQ ID NO:82中的位置146处的W;且根据EU编号的位置366、368及407分别对应于SEQ ID NO:81中的氨基酸位置146、148及187,其自SEQ ID NO:81中的这些位置处的T、L及Y改变为SEQ ID NO:83中的这些位置处的S、A及V。在这些实施方案中的任一者中,针对第一重链所描述的氨基酸变化可位于第二重链中且第二重链的各别氨基酸变化可位于第一重链中。换言之,术语“第一”及“第二”在这些实施方案中可互换。在一些实施方案中,重链来源于IgG₁或IgG₄的重链。

[0368] 在一些实施方案中,本发明的蛋白质中的第一重链或第二重链进一步包含一或多个减少重链与蛋白质A结合的氨基酸变化。在一些实施方案中,此类氨基酸变化为重链中之一者的在位置435处的精氨酸[H435R]及在位置436处的苯丙氨酸[Y436F]。

[0369] 在一些实施方案中,在本发明的蛋白质中,包含在位置407处的苏氨酸(T) [Y407T]的重链进一步包含在位置435处的精氨酸[H435R]及在位置436处的苯丙氨酸[Y436F]。在此情况下,另一条重链包含在位置366处的酪氨酸(Y) [T366Y],但不包括在位置435及436处的两个变化。可替代地,在一些实施方案中,在本发明的蛋白质中,包含在位置366处的丝氨酸(S) [T366S]、在位置368处的丙氨酸(A) [L368A]及在位置407处的缬氨酸(V) [Y407V]的重链进一步包含在位置435处的精氨酸[H435R]及在位置436处的苯丙氨酸[Y436F]。在此情况下,另一条重链包含在位置366处的色氨酸(W) [T366W],但不包括在位置435及436处的两个变化。因此,包含产生如上文所述的“空腔”的氨基酸变化的重链亦包含减少与蛋白质A结合的氨基酸变化。包含这些重链的均二聚体经由与蛋白质A的减少结合移除。包含“突起”的另一重链的均二聚体的产生因“突起”的存在而减少。

[0370] 在一些实施方案中,本发明的蛋白质的重链可能或可能不进一步包含YTE突变(M252Y/S254T/T256E, EU编号(Da11'Acqua, Kiener等人, 2006))。已展示这些突变经由优选地提高在pH 6.0下对新生FcRn底物的结合亲和力来改善重链的药物动力学特性。

[0371] 在一些实施方案中,来源于IgG1的本发明的第一及/或第二重链亦包括“K0”突变(L234A、L235A)。在另一方面中,来源于IgG4的本发明的第一及/或第二重链亦包括Pro铰链突变(S228P)。

[0372] 在另一方面中,本发明的蛋白质包含对人类及食蟹猕猴DLL3的亲和力优选 $\leq 10\text{nM}$ 、更优选 $\leq 1\text{nM}$ 、甚至更优选 $\leq 0.1\text{nM}$ 、甚至更优选 $\leq 0.01\text{nM}$ 的对DLL3具有特异性的第一抗原结合单元或多肽链。如例如在实施例或熟练人员所熟知的其他方法中所描述,可使用重组DLL3-蛋白质在SPR(BIAcore)分析中测量亲和力。蛋白质包含对人类及食蟹猕猴CD3 $\epsilon\gamma$ 复合物的亲和力优选 $\leq 500\text{nM}$ 、更优选地 $\leq 100\text{nM}$ 、甚至更优选 $\leq 10\text{nM}$ 的第二抗原结合单元或多肽链。

[0373] 在另一方面中,本发明的DLL3/CD3结合蛋白不与DLL3阴性细胞结合且不与人类及DLL3旁为同源物DLL1及DLL4交叉反应,如实施例5中所示。

[0374] 在另一方面中,本发明的DLL3/CD3结合蛋白包含与DLL3蛋白质的近膜肽特异性结合的第一抗原结合单元或第一多肽链。在另一方面中,本发明的蛋白质显示与DLL3蛋白质

表达细胞的微弱结合,例如直至100nM的浓度亦未实现蛋白质与细胞表面的结合的饱和(参见例如图6)。

[0375] 在另一方面中,本发明的DLL3/CD3结合蛋白能够通过以下介导对肿瘤细胞的细胞毒性:为在表达DLL3的肿瘤细胞与T细胞之间形成溶细胞突触提供最佳空间条件,以便选择性地重导向对靶向肿瘤细胞的T细胞活性,从而导致肿瘤细胞溶解。

[0376] 可使用各种方法测量由本发明的DLL3/CD3结合蛋白介导的细胞毒性。举例而言,可使用实施例10中所描述的方法测量细胞毒性。效应细胞可为例如受刺激或未受刺激的(人类或食蟹猕猴)T细胞或其子组(例如CD4、CD8)或未受刺激的(人类或食蟹猕猴)周边血液单核细胞(PBMC)。靶细胞应至少表达(人类或食蟹猕猴)DLL3的胞外域且可为具有内源性(天然)DLL3表达的细胞,诸如人类小细胞肺癌细胞株SHP77、NCI-H82,亦可替代地表达全长DLL3或DLL3的胞外域的重组细胞。效应子:目标细胞比率(E:T)通常为约10:1,但可变化。可例如在培育48或72小时之后在LDH-释放分析中测定DLL3/CD3结合分子的细胞毒活性。用于测定细胞毒性的培育时间及读出的修改为可能的且为熟练人员已知。细胞毒性的读出系统可包含MTT/MTS分析、基于ATP的分析、基于FACS的分析、51-铬释放分析、磺酰罗丹明B(SRB)分析、比色(WST)分析、细胞群落分析、ECIS技术及生物发光分析。

[0377] 本发明的DLL3/CD3结合蛋白介导的细胞毒活性优选在基于细胞的细胞毒性分析中测量。细胞毒性由在细胞毒性分析中测量的 EC_{90} 值表示。熟练人员意识到,当使用经纯化的T细胞作为效应细胞时,预期与PBMC相比 EC_{90} 可能更低,熟练人员亦意识到,当使用受刺激的T细胞时 EC_{90} 可能甚至更低。可进一步预期,相比于在细胞表面上表达较低数量DLL3分子的细胞,当靶细胞在细胞表面上表达大量DLL3时, EC_{90} 值更低。DLL3/CD3结合蛋白的 EC_{90} 优选 ≤ 10 nM,更优选 ≤ 5 nM且甚至更优选 ≤ 1 nM。

[0378] 优选地,本发明的多特异性结合蛋白不诱导/介导DLL3阴性细胞的溶解。术语“不诱导/介导”DLL3阴性细胞的“溶解”意谓DLL3/CD3结合分子不诱导或介导超过30%、优选不超过20%、更优选不超过10%且尤其不超过5%的DLL3阴性细胞,而DLL3阳性肺癌细胞株的溶解设定为100%。此通常适用于高达1000nM的结合蛋白浓度。

[0379] 优选地,本发明的DLL3/CD3结合蛋白不被靶向细胞内化。可例如如实施例11中所描述分析内化率。优选地,在使DLL3/CD3结合蛋白与靶细胞一起预培育4小时之后,内化率(例如测量为细胞毒性降低) $\leq 50\%$,更优选地 $\leq 40\%$ 且甚至更优选 $\leq 30\%$ 。

[0380] 此外,本发明的DLL3/CD3结合蛋白示出为稳定的,其中单体含量高于95%(例如至少98%,参见实施例14),具有有利的药物动力学特性及良好的下游可制造性且进一步预期具有良好的生物分布(参见例如实施例12)。本发明的蛋白质此外具有有利的免疫原性特征(参见实施例16)且具有良好的活体外及活体内稳定性(参见例如实施例12及15)。此外,本发明的DLL3/CD3结合蛋白(例如DLL3#3/CD3#1, DLL3#3/CD3#2)在人类化活体内异种移植小鼠模型中展示有利的功效。DLL3/CD3结合蛋白诱导强烈的肿瘤消退,该肿瘤消退在DLL3/CD3结合蛋白的第一剂量之后已经开始。此外,本发明的DLL3/CD3结合蛋白以每周一次(q7d)给予0.25mg/kg的极低剂量诱导肿瘤消退,进一步支持其治疗适用性。详言之,本发明的DLL3/CD3结合蛋白仅在DLL3阳性靶细胞存在下及DLL3阴性靶细胞不存在下诱导选择性T细胞增殖、T细胞活化、T细胞脱粒及细胞因子分泌(参见实施例18),且进一步显著增加进入肿瘤组织的T细胞浸润(参见实施例20)。此外,实施例19表明DLL3/CD3结合蛋白介导CD4+以

及CD8⁺T细胞重导引的溶解。详言之,原始T细胞以及CD4⁺效应记忆细胞、CD4⁺中央记忆细胞、CD8⁺CD45RA⁺效应细胞及CD8⁺记忆细胞有助于表达DLL3的肿瘤细胞的T细胞重导引的溶解。

[0381] 本发明的另一方面提供分离的核酸分子,其编码本发明的多特异性结合蛋白的第一及/或第二抗原结合单元。在一些实施方案中,核酸分子进一步分别编码如本文所述的第一及/或第二Fc域,连接于编码第一及/或第二抗原结合单元的核酸分子的3'端的第一及/或第二Fc域。在一些实施方案中,核酸分子编码i) 第一多肽链,其包含对DLL3(例如DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17及DLL3#18中的任一者)具有特异性的第一单链Fab,及任选存在的第一Fc域及/或ii) 第二多肽链,其包含对CD3(例如CD3#1、CD3#2及CD3#3中的任一者)具有特异性的第二单链Fab及任选存在的第二Fc域。

[0382] 优选地,核酸分子包含编码以下各者中的任一者的第一单链Fab:SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:230、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239或SEQ ID NO:240及/或SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:104的第二单链Fab的核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸分子包含编码以下各者中的任一者的第一多肽链:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252及/或对CD3具有特异性的第二多肽链(其包含氨基酸序列SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:105)的核苷酸序列。

[0383] 本发明的另一方面提供含有DNA分子的表达载体,该DNA分子包含编码第一及/或第二抗原结合域(例如本发明的第一及/或第二单链Fab)的核苷酸序列。优选地,表达载体另外包含编码连接于核酸分子的第一及/或第二Fc域的核酸分子,优选DNA分子,优选地编码第一及/或第二抗原结合域(例如分别地,第一及/或第二单链Fab)的DNA分子。因此,表达载体包含:编码包含连接于第一Fc域的第一单链Fab的多肽链的核苷酸序列;及/或编码包含连接于第二Fc域的第二单链Fab的多肽链的核苷酸序列。

[0384] 在一优选实施方案中,表达载体含有DNA分子,该DNA分子包含编码本发明的第一及/或第二多肽链的核苷酸序列。在一优选实施方案中,表达载体包含核苷酸序列,该核苷酸序列编码以下中的任一者的第一多肽链:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252及/或包含SEQ ID NO:79的第二多肽链。

[0385] 在另外优选实施方案中,表达载体包含核苷酸序列,该核苷酸序列编码以下中的任一者的第一多肽链:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252及/或包含SEQ ID NO:80的第二多肽链。

[0386] 在另外优选实施方案中,表达载体包含核苷酸序列,该核苷酸序列编码以下中的任一者的第一多肽链:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252及/或包含SEQ ID NO:105的第二多肽链。

[0387] 在特定优选实施方案中,可使用两种表达载体,其中一种用于表达对DLL3具有特异性的第一多肽链,另一种用于表达对CD3具有特异性的第二多肽链,所述两种表达载体接着均可转染于宿主细胞中以供重组蛋白表达。

[0388] 优选地,表达载体将为包含可操作地连接于至少一个调节序列的该核酸分子或所述核酸分子的载体,其中此类调节序列可为启动子、强化子或终止子序列,及最佳地异源启动子、强化子或终止子序列。

[0389] 在另一方面中,本发明涉及一种宿主细胞,其具有编码本发明的对DLL3具有特异性的第一多肽链的表达载体及编码本发明的对CD3具有特异性的第二多肽链的表达载体。

[0390] 根据尤其优选实施方案,所述宿主细胞为真核生物细胞,诸如哺乳动物细胞。在另一实施方案中,此类宿主细胞为细菌细胞。其他有用细胞系酵母细胞或其他真菌细胞。

[0391] 适合的哺乳动物细胞包括例如CHO细胞、BHK细胞、HeLa细胞、COS细胞及类似细胞。然而,亦可使用两栖动物细胞、昆虫细胞、植物细胞及用于本领域以表达异源蛋白质的任何其他细胞。

[0392] 抗-DLL3抗体

[0393] DLL3一般表达在胞内膜上,包括胎脑中高基氏体的那些,且在近轴中胚层中的体节发生中起关键作用(Geffers等人,J Cell Biol.2007;178:465;Chapman等人,Hum.Mol.Genet.2011;20:905-916)。对一些肿瘤类型(包括SCLC、LCNEC及神经胶质母细胞瘤)中DLL3表达的明显诱导导致定位至细胞表面:此连同非恶性细胞中可检测细胞表面DLL3的缺少为肿瘤细胞特异性疗法及抗-DLL3抗体作为诊断及预后工具的用途提供新的机会。

[0394] 若干抗-DLL3抗体(诸如LS-c167440,Lifespan;AP21739PU-N,Acris;LS-C148700,LSBio)为可商购的。然而,这些抗体在免疫组织化学(IHC)、FACS及ELISA分析中表达不佳且未能特异性结合于在细胞,尤其肿瘤细胞上表达的DLL3蛋白质。抗-DLL3抗体亦例如在W02007111733中有所报导且建议用于神经胶质瘤患者中的诊断用途,但未展示IHC分析的资料。因此,抗-DLL3抗体作为可靠诊断工具以准确测量患者(例如肿瘤细胞/组织)中的DLL3表达及/或评估DLL3靶向疗法的功效的用途仍具挑战性。

[0395] 因此,需要鉴别替代的抗-DLL3抗体,其可用于准确及专门检测在各种分析(诸如FACS、ELISA、免疫沉淀、西方墨点法、ELISA、放射免疫分析、流式细胞计数、IHC及免疫测定分析)中任何种类的生物样本中的DLL3蛋白质表达且可用作可靠的诊断试剂。

[0396] 因此,本发明的另一方面提供抗-DLL3抗体分子,其包含

[0397] i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1(CDR1)、SEQ ID NO:2(CDR2)及SEQ ID NO:3(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:4(CDR1)、SEQ ID NO:5(CDR2)及SEQ ID NO:6(CDR3)的重链CDR;或

[0398] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:7(CDR1)、SEQ ID NO:8(CDR2)及SEQ ID NO:9(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:10(CDR1)、SEQ ID NO:11(CDR2)及SEQ ID

NO:12 (CDR3) 的重链CDR;或

[0399] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:13 (CDR1)、SEQ ID NO:14 (CDR2) 及SEQ ID NO:15 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:16 (CDR1)、SEQ ID NO:17 (CDR2) 及SEQ ID NO:18 (CDR3) 的重链CDR;或

[0400] iv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:19 (CDR1)、SEQ ID NO:20 (CDR2) 及SEQ ID NO:21 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:22 (CDR1)、SEQ ID NO:23 (CDR2) 及SEQ ID NO:24 (CDR3) 的重链CDR;或

[0401] v) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:25 (CDR1)、SEQ ID NO:26 (CDR2) 及SEQ ID NO:27 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:28 (CDR1)、SEQ ID NO:29 (CDR2) 及SEQ ID NO:30 (CDR3) 的重链CDR;或

[0402] vi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:31 (CDR1)、SEQ ID NO:32 (CDR2) 及SEQ ID NO:33 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:34 (CDR1)、SEQ ID NO:35 (CDR2) 及SEQ ID NO:36 (CDR3) 的重链CDR;或

[0403] vii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:133 (CDR1)、SEQ ID NO:134 (CDR2) 及SEQ ID NO:135 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:136 (CDR1)、SEQ ID NO:137 (CDR2) 及SEQ ID NO:138 (CDR3) 的重链CDR;或

[0404] viii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:139 (CDR1)、SEQ ID NO:140 (CDR2) 及SEQ ID NO:141 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:142 (CDR1)、SEQ ID NO:143 (CDR2) 及SEQ ID NO:144 (CDR3) 的重链CDR;或

[0405] ix) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:145 (CDR1)、SEQ ID NO:146 (CDR2) 及SEQ ID NO:147 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:148 (CDR1)、SEQ ID NO:149 (CDR2) 及SEQ ID NO:150 (CDR3) 的重链CDR;或

[0406] x) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:151 (CDR1)、SEQ ID NO:152 (CDR2) 及SEQ ID NO:153 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:154 (CDR1)、SEQ ID NO:155 (CDR2) 及SEQ ID NO:156 (CDR3) 的重链CDR;或

[0407] xi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:157 (CDR1)、SEQ ID NO:158 (CDR2) 及SEQ ID NO:159 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:160 (CDR1)、SEQ ID NO:161 (CDR2) 及SEQ ID NO:162 (CDR3) 的重链CDR;或

[0408] xii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:163 (CDR1)、SEQ ID NO:164 (CDR2) 及SEQ ID NO:165 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:166 (CDR1)、SEQ ID NO:167 (CDR2) 及SEQ ID NO:168 (CDR3) 的重链CDR;或

[0409] xiii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:169 (CDR1)、SEQ ID NO:170 (CDR2) 及SEQ ID NO:171 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:172 (CDR1)、SEQ ID NO:173 (CDR2) 及SEQ ID NO:174 (CDR3) 的重链CDR;或

[0410] xiv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:175 (CDR1)、SEQ ID NO:176 (CDR2) 及SEQ ID NO:177 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:178 (CDR1)、SEQ ID NO:179 (CDR2) 及SEQ ID NO:180 (CDR3) 的重链CDR;或

[0411] xv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:181 (CDR1)、SEQ ID NO:182 (CDR2) 及SEQ ID NO:183 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:184 (CDR1)、SEQ ID NO:185 (CDR2) 及

SEQ ID NO:186(CDR3)的重链CDR;或

[0412] xvi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:187(CDR1)、SEQ ID NO:188(CDR2)及SEQ ID NO:189(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:190(CDR1)、SEQ ID NO:191(CDR2)及SEQ ID NO:192(CDR3)的重链CDR;或

[0413] xvii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:193(CDR1)、SEQ ID NO:194(CDR2)及SEQ ID NO:195(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:196(CDR1)、SEQ ID NO:197(CDR2)及SEQ ID NO:198(CDR3)的重链CDR;或

[0414] xviii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:199(CDR1)、SEQ ID NO:200(CDR2)及SEQ ID NO:201(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:202(CDR1)、SEQ ID NO:203(CDR2)及SEQ ID NO:204(CDR3)的重链CDR。

[0415] 如上文所概述的抗体i)至xviii)分别称为DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18。本文提供序列表,其允许容易地鉴别本发明的特异性抗体的单独氨基酸序列。

[0416] 在本发明的优选实施方案中,抗体分子包含对应于DLL3#1或DLL3#5的如上文i)或v)所定义的CDR序列。

[0417] 在一些实施方案中,本发明的抗-DLL3抗体为嵌合、人类化或人类抗体分子。在一些实施方案中,抗体分子为单克隆抗体Fab、F(ab)2、Fv或scFv。在一些实施方案中,本发明的抗-DLL3抗体分子包含选自以下组成的群的重链恒定区:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA及IgE恒定区。在一些实施方案中,本发明的抗-DLL3抗体分子的轻链恒定区为K或λ。

[0418] 在一些实施方案中,本发明的抗-DLL3抗体具有重链可变域,该重链可变域包含与SEQ ID NO:38、40、42、44、46、48、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226及228中的任一者至少85%一致的氨基酸序列。优选地,抗体分子具有重链可变域,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:38、40、42、44、46、48、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226或228。

[0419] 在一些实施方案中,抗-DLL3抗体分子具有轻链可变域,该轻链可变域包含与SEQ ID NO:37、39、41、43、45、47、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225及227中的任一者至少85%一致的氨基酸序列。优选地,抗体分子具有轻链可变域,该轻链可变域包含氨基酸序列SEQ ID NO:37、39、41、43、45、47、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225或227。

[0420] 计算氨基酸序列一致性的方法为本领域中所熟知且进一步在本文中说明书的定义部分中论述。

[0421] 在一些实施方案中,抗-DLL3抗体分子具有i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的重链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的轻链可变域(DLL3#1);或ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的重链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的轻链可变域(DLL3#2);或iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的重链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的轻链可变域(DLL3#3),或iv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的重链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:43的轻链可变域(DLL3#4);或v) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的重链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的轻链可变域(DLL3#5);或vi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的

重链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的轻链可变域(DLL3#6);或vii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:205的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:206的重链可变域(DLL3#7);或viii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:207的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:208的重链可变域(DLL3#8);或ix)包含氨基酸序列SEQ ID NO:209的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:210的重链可变域(DLL3#9);或x)包含氨基酸序列SEQ ID NO:211的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:212的重链可变域(DLL3#10);或xi)包含氨基酸序列SEQ ID NO:213的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:214的重链可变域(DLL3#11);或xii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:215的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:216的重链可变域(DLL3#12);或xiii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:217的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:218的重链可变域(DLL3#13);或xiv)包含氨基酸序列SEQ ID NO:219的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:220的重链可变域(DLL3#14);或xv)包含氨基酸序列SEQ ID NO:221的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:222的重链可变域(DLL3#15);或xvi)包含氨基酸序列SEQ ID NO:223的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:224的重链可变域(DLL3#16);或xvii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:225的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:226的重链可变域(DLL3#17);或xviii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:227的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:228的重链可变域(DLL3#18)。

[0422] 在一些实施方案中,本发明的抗-DLL3抗体为小鼠单克隆抗体。在本发明的上下文中,小鼠单克隆抗体包括以下抗体:其中VH及VL自以下获得:用人类DLL3蛋白质免疫接种小鼠,之后选择以一定亲和力与人类DLL3结合的适合VH及VL序列,且接着进一步通过重组技术将此类VH及VL序列连接至来源于小鼠的恒定域(例如小鼠IgG2a);且其通过宿主细胞中的重组表达制得。本发明进一步涵盖嵌合抗体,例如包含来自不同物种的可变区及恒定区。在一些实施方案中,本发明的抗体分子为嵌合抗体,其包含如上文所述的来源于小鼠的VH及VL域且进一步包含来源于另一种物种(诸如人类、兔、大鼠、山羊、驴)的恒定域。在一些实施方案中,嵌合抗体包含来源于小鼠的VH及VL域且进一步如上文所定义人类化或序列优化且进一步包含来源于另一物种的恒定域。在一些实施方案中,嵌合抗体包含来源于包含人类IgG序列的转殖基因动物(例如小鼠)的VH及VL域,因此包含人类VH及VL序列,且进一步包含来源于另一物种的恒定域。在如上文所概述的嵌合抗体的实施方案中的任一者中,重链恒定区为小鼠、人类、兔、大鼠、山羊或驴重链区。

[0423] 在一些实施方案中,本发明的抗-DLL3抗体分子具有选自由以下组成的群的恒定域:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA及IgE恒定域。在一优选实施方案中,抗-DLL3抗体具有IgG2a的恒定域,其优选包含序列SEQ ID NO:254。在一些实施方案中,抗-DLL3抗体分子具有为K或 λ 的轻链恒定域,优选地该轻链恒定域为K轻链恒定域,其优选地包含序列SEQ ID NO:255。

[0424] 在一些实施方案中,抗-DLL3抗体分子能够结合于人类及食蟹猕猴DLL3,解离常数(KD)优选 $\leq 10\text{nM}$ 、更优选 $\leq 1\text{nM}$ 、甚至更优选 $\leq 0.1\text{nM}$ 、甚至更优选 $\leq 0.01\text{nM}$ 。亲和力(KD值)可在SPR(BIAcore)分析中使用重组DLL3蛋白质测量,如例如实施例或熟练人员所熟知的其他方法所描述。

[0425] 在一些实施方案中,抗-DLL3抗体分子不与小鼠DLL3结合。

[0426] 在一些实施方案中,抗-DLL3抗体分子能够检测组织样本(例如石蜡包埋/福尔马

林固定组织样本),诸如肿瘤组织样本或培养细胞株上的DLL3表达(例如细胞质及表面蛋白质表达)。任选地,石蜡包埋/福尔马林固定的细胞培养或组织样本进一步用表位取回器(诸如蛋白酶K)处理。

[0427] 在一些实施方案中,本发明的抗-DLL3抗体分子结合于与以下中的任一者相同的表位: DLL3#1、DLL2#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18抗体。在一些实施方案中,本发明的抗-DLL3抗体分子与以下中的任一者交叉竞争结合于人类DLL3: DLL3#1、DLL2#2、DLL3#3、DLL3#4、DLL3#5、DLL3#6、DLL3#7、DLL3#8、DLL3#9、DLL3#10、DLL3#11、DLL3#12、DLL3#13、DLL3#14、DLL3#15、DLL3#16、DLL3#17或DLL3#18抗体分子。

[0428] 本发明的另一方面提供分离的核酸分子,其编码本发明的抗-DLL3抗体分子的重链可变域及/或轻链可变域。

[0429] 优选地,核酸分子包含编码以下中的任一者的重链可变域的核苷酸序列: SEQ ID NO: 38、40、42、44、46、48、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226或228。优选地,核酸分子包含编码以下中的任一者的轻链可变域的核苷酸序列: SEQ ID NO: 37、39、41、43、45、47、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225或227。

[0430] 本发明的另一方面提供一种含有DNA分子的表达载体,该DNA分子包含编码本发明的抗-DLL3抗体分子的重链可变域及/或轻链可变域的核苷酸序列。

[0431] 优选地,表达载体另外包含分别编码连接于核酸分子的重链恒定域及/或轻链恒定域的核酸分子,优选地DNA分子,优选地分别编码重链可变域及/或轻链可变域的DNA分子。

[0432] 在具体优选实施方案中,可使用两种表达载体,其中一种用于表达重链,另一种用于表达轻链,所述两种表达载体接着均可转染于宿主细胞中以供重组蛋白表达。

[0433] 优选地,表达载体将为包含可操作地连接于至少一个调节序列的该核酸分子或所述核酸分子的载体,其中此类调节序列可为启动子、强化子或终止子序列,及最佳地异源启动子、强化子或终止子序列。

[0434] 在另一方面中,本发明涉及宿主细胞,其具有编码本发明的抗-DLL3抗体分子的重链的表达载体及编码本发明的抗-DLL3抗体分子的轻链的表达载体。

[0435] 根据尤其优选实施方案,所述宿主细胞系真核生物细胞,诸如哺乳动物细胞。在另一实施方案中,此类宿主细胞系细菌细胞。其他有用细胞系酵母细胞或其他真菌细胞。

[0436] 适合的哺乳动物细胞包括例如CHO细胞、BHK细胞、HeLa细胞、COS细胞及类似细胞。然而,亦可使用两栖动物细胞、昆虫细胞、植物细胞及用于本领域以表达异源蛋白质的任何其他细胞。

[0437] 制造及纯化方法

[0438] 本发明进一步提供制造本发明的多特异性结合蛋白的方法,所述方法一般包含以下步骤:

[0439] -在允许形成本发明的结合蛋白条件下培养宿主细胞,所述宿主细胞包含表达载体,该表达载体包含编码本发明的结合蛋白的核酸;及,

[0440] -自培养物回收由宿主细胞表达的结合蛋白;及

[0441] -任选进一步纯化及/或修饰及/或调配本发明的结合蛋白。

[0442] 本发明进一步提供制造本发明的抗-DLL3抗体的方法,所述方法通常包含以下步骤:

[0443] -在允许形成抗体分子的条件下培养宿主细胞,所述宿主细胞包含表达载体,该表达载体包含编码本发明的抗体分子的核酸;及,

[0444] -自培养物回收由宿主细胞表达的抗体分子;及

[0445] -任选进一步纯化及/或修饰及/或调配本发明的抗体分子。

[0446] 本发明的核酸可例如为包含编码序列以及调节序列及任选项选用的天然或人工内含子的DNA分子或可为cDNA分子。其可具有其初始密码子或可具有优化密码子使用,其特别适用于表达于所需宿主细胞或宿主生物体中。根据本发明之一实施方案,如上文所定义,本发明的核酸呈基本上分离的形式。

[0447] 可基于本文中给出的关于本发明的蛋白质的氨基酸序列的信息,以本身已知的方式(例如通过自动化DNA合成及/或重组DNA技术)制备或获得本发明的核酸。

[0448] 本发明的核酸通常将并入表达载体中,亦即可在转染于适合宿主细胞或其他表达系统中时提供蛋白质表达的载体。

[0449] 为制造本发明的结合蛋白或抗体,熟练技术人员可从本领域中熟知的大量表达系统中进行选择,例如Kipriyanow及Le Gall,2004综述的那些。

[0450] 表达载体包括质体、反转录病毒、黏质体、EBV源性游离基因体及类似物。选择表达载体及表达控制序列以与宿主细胞兼容。DLL3/CD3结合蛋白的编码第一抗原结合单元(例如本发明的结合蛋白的DLL3特异性单链Fab或全长DLL3链)的核苷酸序列及编码第二抗原结合单元(例如本发明的结合蛋白的CD3特异性单链Fab或全长CD3链)的核苷酸序列可插入至单独载体中。在某些实施方案中,两个DNA序列插入至相同表达载体中。编码DLL3抗体的轻链的核苷酸序列及编码DLL3抗体的重链的核苷酸序列可插入至单独载体中。在某些实施方案中,两个DNA序列插入至相同表达载体中。

[0451] 适宜载体为编码功能完全人类CH(恒定重)免疫球蛋白序列的那些,合适的限制位点经工程改造以使得可轻易插入及表达如上文所述的任何抗原结合单元,诸如单链Fab序列或任何重/轻链可变域。对于抗体重链,其可为但不限于任何IgG同型(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)或其他免疫球蛋白,包括对偶基因变异体。

[0452] 重组表达载体亦可编码信号肽,该信号肽促进由宿主细胞分泌全长CD3或DLL3链或分泌抗-DLL3抗体的轻/重链。编码蛋白质链的DNA可克隆于载体中,使得信号肽框内连接至成熟的全长链DNA的氨基端。信号肽可为免疫球蛋白信号肽或来自非免疫球蛋白蛋白质的异源信号肽。可替代地,编码本发明的蛋白质的全长链的DNA序列可能已经含有信号肽序列。

[0453] 除了编码DNA序列的DLL3/CD3链或编码DNA序列的DLL3抗体的重/轻链之外,重组表达载体通常携带调节序列,任选异源调节序列,所述调节序列包括启动子、强化子、终止及聚腺苷酸化信号及控制宿主细胞中蛋白链表达的其他表达控制组件。启动子序列的实施例(针对在哺乳动物细胞中表达所例示)为来源于CMV(诸如CMV猴病毒40(SV40)启动子/强化子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))、多瘤病毒的启动子及/或强化子,及强哺乳动物启动子,诸如天然免疫球蛋白及肌动蛋白启动子。聚腺苷酸化信号的实施例为BGH polyA、SV40晚期或早期polyA;可替代地,可使用免疫球蛋白基因的3'UTR等。

[0454] 重组表达载体亦可携带调节宿主细胞中载体复制的序列(例如复制来源)及可选标记基因。可根据本领域中熟知的转染方法(包括脂质体介导的转染、聚阳离子介导的转染、原生质体融合、显微注射、磷酸钙沉淀、电穿孔或通过病毒载体的转移)将以下各者引入宿主细胞,例如细菌细胞或高级真核生物细胞,例如哺乳动物细胞中:编码具有第一抗原结合单元(单链Fab及Fc域)或其抗原结合部分的全长链及/或具有第二抗原结合单元(单链Fab及Fc域)或其抗原结合部分的全长链的核酸分子,及包含这些DNA分子的载体。

[0455] 优选地,编码本发明的蛋白质的DLL3及CD3链的DNA分子存在于两种表达载体上,所述表达载体经共转染于宿主细胞,优选哺乳动物细胞中。

[0456] 可用作宿主以表达的哺乳动物细胞株为本领域中所熟知且尤其包括中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary;CHO)细胞、NS0、SP2/0细胞、HeLa细胞、婴儿仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人类癌细胞(例如Hep G2及A-549细胞)、3T3细胞或任何此类细胞株的衍生物/后代。可使用其他哺乳动物细胞,包括但不限于人类、小鼠、大鼠、猴及啮齿动物细胞株;或其他真核生物细胞,包括但不限于酵母菌、昆虫及植物细胞;或原核细胞,诸如细菌。

[0457] 本发明的蛋白质为通过将宿主细胞培养一段足以允许在宿主细胞中表达蛋白质的时间来制备。蛋白分子优选自培养基以分泌的多肽形式回收或若例如在无分泌信号下表达,则其可自宿主细胞溶解产物回收。有必要使用用于重组蛋白及宿主细胞蛋白的标准蛋白质纯化方法,以获得蛋白质的基本上均质的制剂方式纯化蛋白分子。借助于实施例,适用于获得本发明的蛋白分子的最先进纯化方法包括自培养基或溶解产物移除细胞及/或颗粒细胞碎片作为第一步骤。随后例如通过在免疫亲和力或离子交换管柱上分馏、乙醇沉淀、逆相HPLC、葡聚糖凝胶色谱、硅胶色谱或在阳离子交换树脂上自污染物可溶性蛋白质、多肽及核酸纯化蛋白质。作为用于获得蛋白质分子制剂的过程的最终步骤,可干燥,例如冻干经纯化的蛋白质分子,如下文治疗应用所述。

[0458] 本发明涉及结合蛋白,其具有对至少两种不同目标的结合特异性。相对于本发明,结合分子来源于抗体。用于制造结合分子的技术包括(但不限于)重组型共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白链(参见Milstein及Cuellar, Nature 305:537(1983)), WO 93/08829, 及Traunecker等人, EMBO J. 10:3655(1991)), 及“杵-臼结构(knob-in-hole)”工程改造(参见例如美国专利案第5,731,168号; Atwell等人, JMB, 1997, 270, 26-35)。本发明的结合蛋白亦可如下制备:用于制备抗体Fc-杂二聚分子的工程改造静电导向效应(WO 2009/089004A1);使两种或更多种抗体或片段交联(参见例如美国专利第4,676,980号及Brennan等人, Science, 229:81(1985));使用白氨酸拉链产生双特异性蛋白质(参见例如Kostelny等人, Immunol., 148(5):1547-1553(1992));使用用于制备双特异性抗体片段的“双功能抗体”技术(参见例如Hollinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993));及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如Gruber等人, J. Immunol., 152:5368(1994));及例如Tutt等人, J. Immunol. 147:60(1991)中所描述制备三特异性抗体。

[0459] 本文公开的组合物(例如多特异性结合蛋白及抗-DLL3抗体)及方法涵盖具有指定序列,或与指定序列基本上相同或类似的序列,例如与指定序列至少85%、90%、95%相同或更高的序列的多肽及核酸。在氨基酸序列的情形下,术语“实质上一致”在本文中用于指第一氨基酸序列含有足够或最小数目的i)与第二氨基酸序列中的所比对氨基酸残基一致或ii)为第二氨基酸序列中的所比对氨基酸残基的保守取代的氨基酸残基,使得第一及第

二氨基酸序列可具有共同结构域及/或共同功能活性。举例而言,含有常见结构域的氨基酸序列具有与参考序列,例如本文所提供的序列至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之一致性。在核苷酸序列的上下文中,术语“基本上相同”在本文中用于指代第一核酸序列含有足够或最小数目的与第二核酸序列中的所比对核苷酸一致的核苷酸,使得第一及第二核苷酸序列编码具有共同功能活性的多肽,或编码共同结构多肽结构域或共同功能多肽活性,例如具有与参考序列至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的一致性的核苷酸序列。

[0460] 本发明的核酸分子包括但不限于编码示于序列表中的多肽序列的DNA分子。另外,本发明亦涉及核酸分子,该核酸分子在高严格度结合及洗涤条件下与编码示于序列表中的多肽序列的DNA分子杂交,如W0 2007/042309中所定义。优选的分子(自mRNA视角)为具有与本文所描述的DNA分子中之一者至少75%或80%(优选至少85%,更优选地至少90%且最佳地至少95%)的同源性或序列一致性的那些分子。借助于实施例,鉴于表达真核生物细胞中的抗体,示于序列表中的DNA序列已设计成匹配真核生物细胞中的密码子使用。若需要在大肠杆菌中表达抗体,可改变这些序列以匹配大肠杆菌密码子使用。可以若干种不同方式构建本发明的DNA分子的变体,如例如W0 2007/042309中所描述。

[0461] 本发明的蛋白质可具有经修饰的N端序列,例如删除一或多个N端氨基酸,或交换例如第一N端氨基酸(例如麸氨酸与丙氨酸交换),以优化分子以通过使用某些表达系统(诸如特定载体或宿主细胞)表达,或以包涵体或可溶形式表达,或分泌于培养基或周质空间中或含在细胞内,或用于获得更加均质的产物。本发明的多肽可具有经修饰的C端序列,诸如额外的丙氨酸,及/或C端部分中或框架区中的任一者内其他定义位置处的其他氨基酸交换,如例如W02012/175741、W02011/075861或W02013/024059中所解释,以便例如进一步增强此类多肽的稳定性或降低此类多肽的免疫原性。

[0462] 为避免疑问,考虑涉及如本文所述的药物组合物、试剂盒、治疗方法、医疗用途、组合、给药方法及剂量的所有实施方案用于本文所描述的多特异性结合蛋白单独或与其他治疗剂(如下文更详细地指定)组合中的任一者。

[0463] 药物组合物;给药方法;剂量

[0464] 本发明进一步涉及用于治疗疾病(如下文更详细地指定)的药物组合物,其中此类组合物包含本发明的至少一种多特异性结合蛋白。本发明进一步涵盖使用本发明的至少一种多特异性蛋白质或如下文阐述的药物组合物治疗疾病(如下文更详细地指定)的方法,且进一步涵盖制备用于使用本发明的此类结合蛋白或药物组合物治疗此类疾病的药剂。

[0465] 视待使用的具体药物调配物或组合物而定,可以任何适合方式向有需要的患者给予本发明的结合蛋白(例如DLL3#1/CD3#1、DLL3#2/CD3#1、DLL3#3/CD3#1、DLL3#4/CD3#1、DLL3#5/CD3#1、DLL3#6/CD3#1、DLL3#7/CD3#1、DLL3#8/CD3#1、DLL3#9/CD3#1、DLL3#10/CD3#1、DLL3#11/CD3#1、DLL3#12/CD3#1、DLL3#13/CD3#1、DLL3#14/CD3#1、DLL3#15/CD3#1、DLL3#16/CD3#1、DLL3#17/CD3#1、DLL3#18/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#2/CD3#2、DLL3#3/CD3#2、DLL3#4/CD3#2、DLL3#5/CD3#2、DLL3#6/CD3#2、DLL3#7/CD3#2、DLL3#8/CD3#2、DLL3#9/CD3#2、DLL3#10/CD3#2、DLL3#11/CD3#2、DLL3#12/CD3#2、DLL3#13/CD3#2、DLL3#14/CD3#2、DLL3#15/CD3#2、DLL3#16/CD3#2、DLL3#17/CD3#2、DLL3#18/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#3、DLL3#4/CD3#3、DLL3#5/CD3#3及DLL3#6/CD3#3、DLL3#7/CD3#3、DLL3#8/CD3#3

3、DLL3#9/CD3#3、DLL3#10/CD3#3、DLL3#11/CD3#3、DLL3#12/CD3#3、DLL3#13/CD3#3、DLL3#14/CD3#3、DLL3#15/CD3#3、DLL3#16/CD3#3、DLL3#17/CD3#3、DLL3#18/CD3#3中的任一者,优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)及/或包含其的组合物。因此,本发明的结合蛋白及/或包含其的组合物可例如以以下方式以有效量或剂量给予:静脉内(i.v.)、皮下(s.c.)、肌肉内(i.m.)、腹膜内(i.p.)、经皮、经口、舌下(例如呈置放于舌头下且经由黏膜吸收至舌头下的毛细血管网中的舌下锭剂、喷雾剂或滴剂形式)、经鼻(内)(例如呈鼻用喷雾剂形式及/或以气溶胶形式)、局部、借助于栓剂、通过吸入或任何其他适合方式。结合蛋白可通过输注、食团或注射给予。在优选实施方案中,给药为通过静脉内输注或皮下注射。

[0466] 根据适合于治疗及/或缓解待治疗或缓解的疾病、病症或病状的治疗疗程来给予本发明的结合蛋白及/或包含其的组合物。临床医师一般将能够视因素而定确定适合的治疗方案,所述因素诸如待治疗或缓解的疾病、病症或病状、疾病的严重程度、其症状的严重程度、待使用的本发明的特异性结合蛋白、具体给药途径及待使用的药物调配物或组合物、患者的年龄、性别、重量、饮食、一般条件,及临床医师熟知的类似因素。一般而言,治疗方案将包含以治疗有效量或剂量给予本发明的一或多种结合蛋白,或包含其的一或多种组合物。

[0467] 一般而言,为治疗及/或缓解本文中提及的疾病、病症及病状且视待治疗的具体疾病、病症或病状、待使用的本发明的特异性结合蛋白的效能、具体给药途径及所使用的具体药物调配物或组合物而定,本发明的结合蛋白一般将呈在每千克体重0.005与20.0mg之间的量及剂量,优选在0.05与10.0毫克/千克/剂之间,连续(例如通过输注)或更优选以单次剂量(诸如一周两次、每周一次或每月一次剂量;参见以下)给予,但可显著变化,尤其视上文所提及的参数而定。因此,在一些情况下,使用小于上文给出的最小剂量可为足够的,而在其他情况下可超过上限。当给予较大量时,在一天内将其分成多个较小剂量可为可取的。

[0468] 视本发明的特异性结合蛋白及其特定药物动力学及其他特性而定,其可经每日、每两天、每三天、每四天、每五天或每六天、每周、每月一次及以类似方式给予。给药疗程可包括每周一次的长期治疗。“长期”意谓持续时间为至少两周且优选数月或数年。

[0469] 可使用任何适合的活体外分析、基于细胞的分析、活体内分析及/或本身已知的动物模型或其任何组合测试本发明的多特异性蛋白质及包含其的组合物的功效,其视所涉及的特定疾病而定。适合的分析及动物模型对本领域技术人员将为清楚的,且例如包括以下实施例中所用的分析及动物模型。

[0470] 调配物

[0471] 对于药物用途,本发明的结合蛋白可调配为药物制剂,其包含(i)本发明的至少一种结合蛋白(例如DLL3#1/CD3#1、DLL3#2/CD3#1、DLL3#3/CD3#1、DLL3#4/CD3#1、DLL3#5/CD3#1、DLL3#6/CD3#1、DLL3#7/CD3#1、DLL3#8/CD3#1、DLL3#9/CD3#1、DLL3#10/CD3#1、DLL3#11/CD3#1、DLL3#12/CD3#1、DLL3#13/CD3#1、DLL3#14/CD3#1、DLL3#15/CD3#1、DLL3#16/CD3#1、DLL3#17/CD3#1、DLL3#18/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#2/CD3#2、DLL3#3/CD3#2、DLL3#4/CD3#2、DLL3#5/CD3#2、DLL3#6/CD3#2、DLL3#7/CD3#2、DLL3#8/CD3#2、DLL3#9/CD3#2、DLL3#10/CD3#2、DLL3#11/CD3#2、DLL3#12/CD3#2、DLL3#13/CD3#2、DLL3#14/CD3#2、DLL3#15/CD3#

2、DLL3#16/CD3#2、DLL3#17/CD3#2、DLL3#18/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#3、DLL3#4/CD3#3、DLL3#5/CD3#3及DLL3#6/CD3#3、DLL3#7/CD3#3、DLL3#8/CD3#3、DLL3#9/CD3#3、DLL3#10/CD3#3、DLL3#11/CD3#3、DLL3#12/CD3#3、DLL3#13/CD3#3、DLL3#14/CD3#3、DLL3#15/CD3#3、DLL3#16/CD3#3、DLL3#17/CD3#3、DLL3#18/CD3#3中的任一者,优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)及(ii)至少一种药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂、佐剂及/或稳定剂,及(iii)任选用的一或多种其他药理学活性多肽及/或化合物。“药学上可接受”意谓当向个体给予时,相应物质不会显示任何生物或者不合需要的作用且不会以有害方式与药物组合物中所含有的其他组分(诸如药学上活性成分)中的任一者相互作用。特定实施例可见于标准手册,诸如雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版,Mack Publishing Company,USA(1990)。举例而言,本发明的结合蛋白可以对于常规抗体及抗体片段及其他药物活性蛋白质本身已知的任何方式调配及给予。因此,根据另一实施方案,本发明涉及一种药物组合物或制剂,其含有本发明的至少一种结合蛋白及至少一种药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂、佐剂及/或稳定剂,及任选用的一或多种其他药理学上活性物质,其呈冻干或以其他方式干燥的调配物或水溶液或非水溶液或悬浮液形式。

[0472] 用于非经肠给药,诸如静脉内、肌肉内、皮下注射或静脉内输注的药物制剂可例如为包含活性成分且为任选在另一溶解或稀释步骤之后,适用于输注或注射的无菌溶液、悬浮液、分散液、乳液或粉末。针对所述制剂的适合的载剂或稀释剂例如包括(但不限于)无菌水及药学上可接受的缓冲水溶液及诸如磷酸盐缓冲生理盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液及汉克氏溶液(Hank's solution)的溶液;水油;甘油;乙醇;诸如丙二醇的二醇以及矿物油、动物油及植物油,例如花生油、大豆油以及其适合的混合物。

[0473] 本发明的结合蛋白的溶液亦可含有防腐剂,诸如抗菌剂及抗真菌剂以防止微生物生长,例如对羟基苯甲酸酯(p-hydroxybenzoate/paraben)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞、乙二胺四乙酸(的碱金属盐)及其类似物。在许多情况下,将优选包括等张剂,例如,糖、缓冲剂或氯化钠。任选地,可使用乳化剂及/或分散剂。适当流动性可例如通过形成脂质体、在分散液的情况下通过维持所需粒度或通过使用表面活性剂来维持。亦可添加延迟吸收的其他试剂,例如单硬脂酸铝及明胶。可将溶液填充至注射小瓶、安瓿、输注瓶及其类似瓶中。

[0474] 在所有情况下,最终剂型在制造及储存条件下均必须为无菌、流体且稳定。无菌可注射溶液为通过将所需量的活性化合物视需要与上文列举的各种其他成分一起并入适当溶剂中,随后过滤灭菌来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选制备方法为真空干燥及冷冻干燥技术,其产生预先无菌过滤的溶液中所存在的活性成分加任何额外所需成分的粉末。

[0475] 通常,水溶液或悬浮液将为优选的。一般而言,用于治疗蛋白(诸如本发明的结合蛋白)的适合调配物为缓冲蛋白质溶液,诸如包括以下的溶液:呈适合浓度(诸如0.001至400mg/mL,优选0.005至200mg/mL,更优选地0.01至200mg/mL,更优选地1.0-100mg/mL,诸如1.0mg/mL(静脉内给药)或100mg/mL(皮下给药))的蛋白质及水性缓冲液诸如:

[0476] -磷酸盐缓冲盐水,pH 7.4,

[0477] -其他磷酸盐缓冲液,pH 6.2至pH 8.2,

[0478] -乙酸盐缓冲液,pH 3.2至pH 7.5,优选pH 4.8至pH 5.5

[0479] -组氨酸缓冲液,pH 5.5至pH 7.0,

[0480] -丁二酸盐缓冲液,pH 3.2至pH 6.6,及

[0481] -柠檬酸盐缓冲液,pH 2.1至pH 6.2,

[0482] 及任选选用的提供溶液的等张性的盐(例如NaCl)及/或糖(诸如蔗糖及海藻糖)及/或其他多元醇(诸如甘露醇及甘油)。

[0483] 此外,其他试剂,诸如清洁剂,例如0.02%Tween-20或Tween-80可包括于所述溶液中。皮下施用的调配物可包括显著较高浓度,诸如高达100mg/ml或甚至大于100mg/ml的本发明的抗体。然而,本领域技术人员将清楚,如上所给出的成分及其量仅表示一种优选选择。其替代方案及变体对本领域技术人员将直接显而易见,或可易于自以上公开内容开始进行构想。上述调配物可任选以将在溶液(例如注射用水(WFI))中重组的冻干调配物提供。

[0484] 根据本发明的另一方面,本发明的结合蛋白可与适用于给予蛋白质的装置,诸如注射器、注射笔、微型泵或其他装置组合使用。

[0485] 治疗方法

[0486] 本发明的另一方面提供一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者给予治疗有效量的本发明的结合蛋白。

[0487] 本发明的另一方面提供用于治疗癌症的方法的本发明的结合蛋白。

[0488] 本发明的另一方面为本发明的结合蛋白用于制备用于治疗癌症的药物组合物的用途。

[0489] 为避免疑问,本发明的医疗用途方面可包含如上文所述的本发明的特异性结合蛋白中的任一者(例如DLL3#1/CD3#1、DLL3#2/CD3#1、DLL3#3/CD3#1、DLL3#4/CD3#1、DLL3#5/CD3#1、DLL3#6/CD3#1、DLL3#7/CD3#1、DLL3#8/CD3#1、DLL3#9/CD3#1、DLL3#10/CD3#1、DLL3#11/CD3#1、DLL3#12/CD3#1、DLL3#13/CD3#1、DLL3#14/CD3#1、DLL3#15/CD3#1、DLL3#16/CD3#1、DLL3#17/CD3#1、DLL3#18/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#2/CD3#2、DLL3#3/CD3#2、DLL3#4/CD3#2、DLL3#5/CD3#2、DLL3#6/CD3#2、DLL3#7/CD3#2、DLL3#8/CD3#2、DLL3#9/CD3#2、DLL3#10/CD3#2、DLL3#11/CD3#2、DLL3#12/CD3#2、DLL3#13/CD3#2、DLL3#14/CD3#2、DLL3#15/CD3#2、DLL3#16/CD3#2、DLL3#17/CD3#2、DLL3#18/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#3、DLL3#4/CD3#3、DLL3#5/CD3#3及DLL3#6/CD3#3、DLL3#7/CD3#3、DLL3#8/CD3#3、DLL3#9/CD3#3、DLL3#10/CD3#3、DLL3#11/CD3#3、DLL3#12/CD3#3、DLL3#13/CD3#3、DLL3#14/CD3#3、DLL3#15/CD3#3、DLL3#16/CD3#3、DLL3#17/CD3#3、DLL3#18/CD3#3中的任一者,优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)。

[0490] 如本文中所使用,术语“癌症”意欲包括所有类型的癌肿生长或致癌过程、转移性组织或恶性转型细胞、组织或器官(无论组织病理型或侵袭阶段)。

[0491] 其生长可使用本文所描述的多特异性结合蛋白抑制的例示性癌症为任何表达DLL3的肿瘤,优选地SCLC、LCNEC、神经胶质瘤、神经胶母细胞瘤、黑素瘤或其他表达DLL3的神经内分泌肿瘤(例如神经内分泌前列腺癌或神经内分泌胰脏癌、小细胞膀胱癌)。

[0492] 神经内分泌肿瘤(NET)由分散的内分泌系统引起且可在许多不同身体区域中发生。传统地,NET已根据其原始解剖单位分类且通常具有高度侵袭性。其最常位于胃肠道、胰

脏或肺部(小细胞肺癌及大细胞神经内分泌癌)以及肾或泌尿生殖道(气囊、前列腺、卵巢、子宫颈及子宫内膜)中。NET包括胃肠道及胰岛细胞的某些肿瘤,某些胸腺及肺肿瘤,以及甲状腺的滤泡旁细胞的髓性癌。

[0493] 其生长可使用本文所描述的多特异性结合蛋白抑制的其他癌症为伪神经内分泌肿瘤(pNET),其与传统定义的神经内分泌肿瘤共享某些基因型、表达型或生物化学特征。

[0494] 在一些实施方案中,以下癌症、肿瘤及其他增生性疾病可用本发明的多特异性结合蛋白治疗:肺癌;优选SCLC、NSCLC或LCNEC;乳癌;子宫颈癌;结肠癌;结肠直肠癌;子宫内膜癌;头颈癌;肝癌(肝母细胞瘤或肝细胞癌);卵巢癌;胰脏癌;前列腺癌;皮肤癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;肾上腺癌;肾脏癌;气囊癌;子宫癌;食道癌;尿道上皮癌;脑瘤;淋巴瘤;尤文氏肉瘤;及其他神经内分泌及小蓝圆细胞肿瘤。

[0495] 在本发明之一优选实施方案中,癌症为小细胞肺癌(SCLC)或神经胶母细胞瘤。

[0496] 通过其在体内的特定位置/源表征的上述所有癌症、肿瘤、赘瘤等意谓包括原发肿瘤及自其衍生的转移性肿瘤。

[0497] 若患者具有特征在于具有高DLL3表达的癌症,则有可能该患者更可能对用本发明的结合蛋白(如本文所述)的治疗起反应。因此,在一些实施方案中,待用本发明的结合蛋白治疗的癌症为具有高DLL3表达的癌症,例如DLL3表达高于在罹患相同类型的DLL3表达癌的患者群体的癌细胞中的平均表达。

[0498] 本发明的结合蛋白可用于第一线、第二线或任何其他线治疗的情形中的治疗疗程中。

[0499] 本发明的结合蛋白可用于预防、短期或长期治疗以上所提到的疾病,其任选亦与放射疗法、一或多种额外治疗剂及/或手术组合。

[0500] 在优选实施方案中,本发明的蛋白质与PD-1拮抗剂(诸如抗PD-1抗体或抗PDL-1抗体)组合使用以用于治疗癌症。优选地,该抗PD-1抗体选自由以下组成的群:帕博利珠单抗(pembrolizumab)、纳武单抗(nivolumab)、皮立珠单抗(pidilizumab)、PD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4及PD1-5,如本文(如下表A中的序列所定义)及W02017/198741(以引用的方式并入本文中)中所述。优选地,该抗PDL-1抗体选自由阿特殊单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)及德瓦鲁单抗(durvalumab)组成的群。在尤其优选的实施方案中,本发明的结合蛋白(优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2或DLL3#3/CD3#3中的任一者)为与PD1-1组合用于治疗癌症。在尤其优选的实施方案中,本发明的结合蛋白(优选地,DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2或DLL3#3/CD3#3中的任一者)与PD1-2组合用于治疗癌症。在尤其优选的实施方案中,本发明的结合蛋白(优选地,DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)与PD1-3组合用于治疗癌症。在尤其优选的实施方案中,本发明的结合蛋白(优选地,DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)与PD1-4组合用于治疗癌症。在尤其优选的实施方案中,本发明的结合蛋白(优选地,DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)与PD1-5组合用于治疗癌症。

2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)与PD1-5组合用于治疗癌症。

[0501] 表A:抗PD1抗体PD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4、PD1-5的重链及轻链序列的氨基酸序列及SEQ ID NO.

[0502]

SEQ ID 编号:	序列的简单 说明	序列
---------------	-------------	----

[0503]

SEQ ID NO:256	PD1-1 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWV RQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
SEQ ID NO:257	PD1-1 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID	PD1-2 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWV

[0504]

NO:258		RQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNPNNYYAMDY WGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
SEQ ID NO:259	PD1-2 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGGTDFLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:260	PD1-3 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWV RQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDY WGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

[0505]

SEQ ID NO:261	PD1-3 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:262	PD1-4 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWV RQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
SEQ ID NO:263	PD1-4 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:264	PD1-5 HC	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWV RQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

[0506]		SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
	SEQ ID NO:265	PD1-5 LC EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0507] 根据这些优选实施方案及本发明的任何其他方面,抗体PD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4及PD1-5为如W02017/198741所公开的抗体分子,且由如上文表A中所示的序列定义。

[0508] 因此,PD1-1具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:256的重链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:257的轻链;

[0509] PD1-2具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:258的重链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:259的轻链;

[0510] PD1-3具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:260的重链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:261的轻链;

[0511] PD1-4具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:262的重链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:263的轻链;且

[0512] PD1-5具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:264的重链及包含氨基酸序列SEQ ID NO:265的轻链。

[0513] 上文亦包括本发明的结合蛋白在通过向有需要的患者给予治疗有效剂量来治疗上文疾病的各种方法中的用途,以及这些结合蛋白用于制造用于治疗此类疾病的药剂的用途,以及包括本发明的此类结合蛋白的药物组合物,以及包括本发明的此类结合蛋白的药剂的制剂及/或制造,及类似者。

[0514] 与其他活性物质或治疗的组合

[0515] 本发明的结合蛋白可自行使用或与一或多种额外治疗剂组合使用,尤其与以下各者组合使用:化学治疗剂类DNA损伤剂、抑制血管生成的治疗活性化合物、信号转导路径抑制剂、EGFR抑制剂、免疫调节物、免疫检查点抑制剂、有丝分裂检查点抑制剂或激素疗法试剂。

[0516] 额外治疗剂可任选与相同药物制剂的组分同时给予,或在给予DLL3/CD3结合蛋白之前或之后给予。

[0517] 可与本发明的结合分子组合给予的细胞抑制及/或细胞毒性活性物质包括但不限于激素、激素类似物及抗激素、芳香酶抑制剂、LHRH激动剂及拮抗剂、生长因子(生长因子例如血小板衍生生长因子(PDGF)、纤维母细胞生长因子(FGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、人类表皮生长因子(HER,例如HER2、HER3、HER4)及肝细胞生长因子(HGF))的抑制剂,抑制剂为例如(抗)生长因子抗体、(抗)生长因子底物抗体及酪氨酸激酶抑制剂,诸如西妥昔单抗(cetuximab)、吉非替尼(gefitinib)、阿法替尼(afatinib)、尼达尼布(nintedanib)、伊马替尼(imatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、伯舒替尼(bosutinib)及曲妥珠单抗(trastuzumab);抗代谢物(例如诸如甲胺喋呤的抗叶酸剂、雷替曲塞(raltitrexed)、诸如5-氟尿嘧啶(5-FU)的嘧啶类似物、吉西他滨(gemcitabine)、伊立替康(irinotecan)、小红莓、TAS-102、卡培他滨(capecitabine)及吉西他滨(gemcitabine)、嘌呤及腺苷类似物,诸如巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、克拉屈滨(cladribine)及喷司他丁(pentostatin)、阿糖胞苷(ara C)、氟达拉滨(fludarabine));抗肿瘤抗生素(例如蒽环霉素);铂衍生物(例如顺铂、奥沙利铂(oxaliplatin)、卡铂);烷基化试剂(例如雌莫司汀、氮芥、美法仑(melphalan)、氯芥苯丁酸、白消安、达喀尔巴嗪(dacarbazine)、环磷酰胺、异环磷酰胺、替莫唑胺、亚硝基脲诸如卡莫司汀(carmustin)及洛莫司汀(lomustin)、噻替派)、抗有丝分裂剂(例如长春花属生物碱,诸如长春碱、长春地辛(vindesine)、长春瑞宾(vinorelbine)及长春新碱;及紫杉烷,诸如太平洋紫杉醇、多西他赛);血管生成抑制剂,包括贝伐单抗(bevacizumab)、雷莫芦单抗(ramucirumab)及阿柏西普(afibercept)、微管蛋白抑制剂;DNA合成抑制剂、PARP抑制剂、拓扑异构酶抑制剂(例如表鬼臼毒素,诸如依托泊苷(etoposide)及凡毕复(etopophos)、替尼泊甙(teniposide)、安吡啶(amsacrin)、拓扑替康(topotecan)、伊立替康(irinotecan)、米托蒽醌(mitoxantrone))、丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂(例如PDK1抑制剂、Raf抑制剂、A-Raf抑制剂、B-Raf抑制剂、C-Raf抑制剂、mTOR抑制剂、mTORC1/2抑制剂、PI3K抑制剂、PI3K α 抑制剂、双mTOR/PI3K抑制剂、STK33抑制剂、AKT抑制剂、PLK1抑制剂(诸如伏拉塞替(volasertib)、CDK的抑制剂,包括CDK9抑制剂、Aurora激酶抑制剂)、酪氨酸激酶抑制剂(例如PTK2/FAK抑制剂)、蛋白质蛋白质相互作用抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、FLT3抑制剂、BRD4抑制剂、IGF-1R抑制剂、Bcl-xL抑制剂、Bcl-2抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL抑制剂、E₁bB底物抑制剂、BCR-ABL抑制剂、ABL抑制剂、Src抑制剂、雷帕霉素类似物(例如依维莫司(everolimus)、坦罗莫司(temsirolimus)、地磷莫司(ridaforolimus)、西罗莫司(sirolimus))、雄激素合成抑制剂、雄激素底物抑制剂、DNMT抑制剂、HDAC抑制剂、ANG1/2抑制剂、CYP17抑制剂、放射性药品、免疫治疗剂,诸如免疫检查点抑制剂(例如CTLA4、PD1、PD-L1、LAG3及TIM3结合分子/免疫球蛋白,诸如伊匹单抗、纳武单抗、帕博利珠单抗)及各种化学治疗剂,诸如阿米福汀(amifostin)、阿那格雷(anagrelid)、氯膦酸盐(clodronat)、非格司亭(filgrastin)、干扰素、干扰素 α 、甲酰四氢叶酸、利妥昔单抗、丙卡巴肼、左旋咪唑、美司钠(mesna)、米托坦(mitotane)、帕米膦酸盐及吡吩姆;蛋白酶体抑制剂(诸如硼替佐米);Smac及BH3模拟物;恢复p53功能性的药剂,包括mdm2-p53拮抗剂;Wnt/ β -连环蛋白信号传导路径的抑制剂;及/或周期素依赖性激酶9抑制剂。

[0518] 尤其优选的为用本发明的结合分子与一或多种免疫治疗剂(包括抗-PD-1及抗PD-L1药剂及抗LAG3药剂)组合治疗:例示性抗PD1药剂包括但不限于抗PD-1抗体PDR-001、帕博

利珠单抗、纳武单抗、皮立珠单抗及如本文(表A)及W02017/198741所公开的PD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4及PD1-5。例示性抗PDL-1药剂包括但不限于阿特殊单抗、阿维鲁单抗(avelumab)及德瓦鲁单抗(durvalumab)。在优选实施方案中,本发明的结合分子(优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)与PD1-1组合。在优选实施方案中,使本发明的结合分子(优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)与PD1-2组合。在优选实施方案中,使本发明的结合分子(优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)与PD1-3组合。在优选实施方案中,使本发明的结合分子(优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)与PD1-4组合。在优选实施方案中,使本发明的结合分子(优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)与PD1-5组合。

[0519] 在某些实施方案中,额外治疗剂可为其他免疫治疗剂,诸如以下各者的调节物:TIM-1、TIM-3、TIM-4、PD-L2、LAG3、CTLA-4、半乳糖凝集素9、半乳糖凝集素-1、CD69、CD113、GPR56、CD48、GARP、CAECAM-1、BTLA、TIGIT、CD160、LAIR1、2B4、CEACAM、CD39、TGF β 、IL-10、Fas配位体、ICOS、B7家族(B7-1、B7-2、B7-H1(PDL-1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2(ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)或B7-H6)。

[0520] 在一些实施方案中,额外免疫治疗剂为与同源TNF底物家族成员结合的分子的TNF家族的成员,其包括CD40及CD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137、GITR、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、淋巴毒素 α /TNF β 、TNFR2、TNF α 、LT β R、淋巴毒素 α 1 β 2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY、NGFR。

[0521] 在一些实施方案中,额外治疗剂为SMAC模拟剂。SMAC模拟物为与细胞凋亡蛋白质的抑制剂(IAP)结合且具有免疫调节功能且在给予动物或人类时介导全身性细胞因子(例如IL-6、TNF α 等)及趋化激素(例如MCP-1)的化合物。在一些实施方案中,SMAC模拟剂为(i) LCL161,亦即W0 2008/016893的实施例1(第28/29页;[122])中的化合物A,或其药学上可接受的盐;(ii)称为Debio-1143的SMAC模拟剂,或其药学上可接受的盐;(iii)称为比林纳潘特(birinapant)的SMAC模拟剂,或其药学上可接受的盐;(iv)称为ASTX-660的SMAC模拟剂,或其药学上可接受的盐;或(v)称为CUDC-427的SMAC模拟剂,或其药学上可接受的盐。

[0522] 在一些实施方案中,额外的免疫治疗剂为选自(i)抑制T细胞活化的细胞因子(例如IL-6、IL-10、TGF- β 、VEGF;“免疫抑制性细胞因子”)的拮抗剂及/或(ii)刺激T细胞活化的细胞因子及/或用于刺激免疫反应,例如用于治疗增生性疾病(诸如癌症)的细胞因子(诸如IL2)的激动剂。

[0523] 在一些实施方案中,额外的免疫治疗剂为刺激T细胞活化的蛋白质的激动剂,诸如CD28、GITRL、OX40L、CD27及CD28H。

[0524] 在一些实施方案中,额外治疗剂为溶瘤病毒,包括但不限于来源于痘疮病毒、腺病毒(AdV)、单纯疱疹病毒(HSV1或HSV2)、呼肠孤病毒、黏液瘤病毒(MYXV)、脊髓灰白质炎病毒、水泡性口炎病毒(VSV)、马拉巴病毒、水痘病毒、麻疹病毒(MV)或新城鸡瘟病毒(NDV)的溶瘤病毒。

[0525] 诊断性用途

[0526] 本发明的抗-DLL3抗体分子适用于诊断及预后方法且可用于通过连接对不同抗原具有结合特异性的染料、药物或另一种分子来标记、定位或鉴别表达DLL3的细胞或组织(例如在ELISA分析、FACS分析、免疫组织学或类似分析中)。举例而言,可检测标记可与本发明的抗-DLL3抗体分子结合或特异性结合于本发明的抗体分子且与可检测标记结合的第二试剂(例如二次抗体)可用于此类诊断方法。在一些实施方案中,DLL3特异性抗体特异性结合于在细胞中(在细胞质中及/或在细胞表面处)表达的DLL3,且用于定位及/或鉴别此类细胞。在一些实施方案中,本文提供的DLL3特异性抗体用于鉴别表达DLL3的细胞或组织(例如肿瘤细胞)。

[0527] 选择本发明的抗体使得其具有高水平的表位结合特异性及与DLL3多肽的高结合亲和力。一般而言,抗体的结合亲和力愈高,在免疫检定中可进行更加严格的洗涤条件以在不移除靶多肽的情况下移除非特异性结合材料。

[0528] 因此,本文进一步提供检测生物样本中DLL3的方法。具体而言,在一个方面中,本发明提供检测样本(例如组织样本、肿瘤组织样本)中DLL3的方法,其包括

[0529] (a) 使样本与本发明的抗体接触;及

[0530] (b) 检测与DLL3结合的抗-DLL3抗体。

[0531] 生物样本可获自/分离自个体的任何组织(包括生物检体)、细胞或体液。在一优选实施方案中,样本为组织样本,优选地肿瘤组织样本。在特定实施方案中,样本为固定的(肿瘤)组织样本,优选地福尔马林固定、石蜡包埋(FFPE)的组织样本,更优选地福尔马林固定、石蜡包埋(FFPE)的肿瘤组织样本。

[0532] 样本通常分成若干部分且贴附至培养基以供微观分析,诸如显微镜载片。在样本为组织样本的情况下,若干部分可为组织切片。在一些实施方案中,连续切片取自FFPE组织样本。在一些实施方案中,连续切片取自复数个不同的FFPE组块部位,可完成此以获取切片内异质性及块内异质性。在一些实施方案中,连续切片取自复数个自相同肿瘤的不同位置获取的不同的生检样本,可进行此以获取切片内异质性及肿瘤内异质性。通常,组织样本在抗原检测之前首先经历去石蜡化、抗原擷取(例如用蛋白酶K)。组织样本可获自/分离自多种组织(例如生检),具体而言获自肿瘤的组织,所述肿瘤包括但不限于SCLC、LCNEC、神经胶质瘤、神经胶母细胞瘤、黑素瘤或其他神经内分泌肿瘤(例如神经内分泌前列腺癌或神经内分泌胰脏癌、小细胞膀胱癌)。

[0533] 可获得/分离(组织)样本的其他例示性肿瘤包括肺癌;优选SCLC、NSCLC或LCNEC;乳癌;子宫颈癌;结肠癌;结肠直肠癌;子宫内膜癌;头颈癌;肝癌(肝母细胞瘤或肝细胞癌);卵巢癌;胰脏癌;前列腺癌;皮肤癌;胃癌;睪丸癌;甲状腺癌;肾上腺癌;肾脏癌;气囊癌;子宫癌;食道癌;尿道上皮癌;脑瘤;淋巴瘤;尤文氏肉瘤(Ewing sarcoma);及其他神经内分泌(包括伪内分泌肿瘤)及小蓝圆细胞肿瘤。

[0534] 样本中DLL3检测的例示性方法为免疫细胞化学(ICC)、免疫组织化学(IHC)、西方

墨点法、流式细胞计数及/或ELISA。

[0535] 在一优选实施方案中,使用IHC检测DLL3。

[0536] 在本发明之一特定方面中,检测组织样本中DLL3的方法包含

[0537] a) 使组织样本(例如肿瘤组织,诸如SCLC、神经胶质母细胞瘤或神经内分泌肿瘤)与本发明的抗体(例如DLL3#1或DLL3#5)接触,优选地该组织样本为固定的组织样本(例如福尔马林固定及石蜡包埋)

[0538] b) 允许在该样本中形成抗体-抗原复合物;以及

[0539] c) 检测与DLL3结合的抗-DLL3抗体。

[0540] 在本发明的方法的一些实施方案中,抗-DLL3抗体为通过可检测信号检测,优选地,可检测信号为通过可检测标记来产生。在本发明的方法之一优选实施方案中,可检测信号为在IHC分析中检测。在一些实施方案中,可检测信号为在ELISA分析中,通过流式细胞计数或通过西方墨点法检测。在一些实施方案中,本文所述的方法可用于例如使用流式细胞计数检测存在于细胞(例如肿瘤细胞)的细胞表面上的DLL3。在一些实施方案中,本文所述的方法可用于使用ELISA、西方墨点法或IHC检测组织样本(例如肿瘤组织样本)中DLL3的存在。

[0541] 在一些实施方案中,可检测标记与抗-DLL3抗体直接结合且因此在抗-DLL3抗体与DLL3结合后沉积于样本上,此一般称为直接表示法。直接表示法常常可更加直接地定量,但常常缺少敏感性。在其他实施方案中,可检测标记的沉积为通过使用第二检测试剂来实现,该第二检测试剂与本发明的抗体分子特异性结合且与可检测标记(例如二次抗体)结合,此一般称为间接表示法。在一些实施方案中,特异性第二检测试剂可为物种特异性二次抗体、与半抗原结合的抗-DLL3抗体结合的抗半抗原抗体,或与生物素标记的抗-DLL3抗体结合的生物素结合蛋白。

[0542] 可与本发明的抗-DLL3抗体或与第二检测试剂结合的可检测标记包括显色、荧光、磷光、发光及放射性分子及材料、将一种物质转化为另一种物质以提供可检测差异的催化剂(诸如通过将无色物质转化为着色物质或反过来,或通过产生沉淀物或增加样本浊度)、可经由抗体-半抗原结合相互作用使用额外的可检测标记的抗体结合物检测的半抗原,及顺磁性及磁性分子或材料。

[0543] 举例而言,可检测标记可为酶,诸如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖、 β -葡萄糖醛酸苷酶及 β -内酰胺酶;荧光团,诸如荧光素、发光体、香豆素、BODIPY染料、试卤灵及若丹明;纳米颗粒,诸如量子点(美国专利第6,815,064号、第6,682,596号及第6,649,138号);金属螯合物,诸如放射性或顺磁性金属离子(Gd^{3+})的DOTA及DPTA螯合物;及脂质体,例如含有捕获的荧光分子的脂质体。

[0544] 在可检测标记包括酶的情况下,可检测基质(诸如色素原、荧光化合物或发光化合物)可与酶组合使用以产生可检测信号。显色化合物的特定实施例包括二氨基联苯胺(DAB)、4-硝基苯基磷酸盐(pNPP)、坚牢红(fast red)、溴氯吲哚基磷酸盐(BCIP)、氮蓝四唑(NBT)、BCIP/NBT、坚牢红、AP橙、AP蓝、四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-次偶氮基-二-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐](ABTS)、邻二甲氧苯胺、4-氯萘酚(4-CN)、硝苯基--D-吡喃半乳糖苷(ONPG)、邻苯二胺(OPD)、5-溴-4-氯-3-吲哚基--D-吡喃半乳糖苷(X-Gal)、甲基伞形基--D-吡喃半乳糖苷(MU-Gal)、对硝苯基--D-吡喃半乳糖苷(PNP)、5-溴-4-氯-3-吲哚基--D-葡萄

糖苷酸(X-Gluc)、3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)、品红、碘基硝基四唑鎓(INT)、四唑蓝及四唑紫。

[0545] 在一些实施例中,可检测部分为荧光团,其属于若干常见化学类别,包括香豆素、荧光素(或荧光素衍生物及类似物)、若丹明、试卤灵、发光体及花青。

[0546] 在其他实施方案中,可检测部分为可经由亮视野显微镜术检测的分子,诸如染料,包括二氨基联苯胺(DAB)、4-(二甲氨基)偶氮苯-4'-磺酰胺(DABSYL)、四甲基若丹明(DISCOVERY Purple)、N,N'-双羧基戊基-5,5'-二磺酸根基-吡啶-二羧花青(Cy5)及若丹明110(若丹明)。

[0547] 半抗原为与抗体特异性结合的小分子,但其自身将不会引发动物的免疫反应且必须首先连接至较大载体分子,诸如蛋白质以产生免疫反应。半抗原的实施例包括二-硝苯基、生物素、地高辛及荧光素。

[0548] 本文在一个方面中进一步提供将肿瘤诊断或鉴别为表达DLL3的肿瘤(表达细胞质及/或细胞表面中的DLL3)的方法,其包括使用本发明的抗-DLL3抗体(例如肿瘤组织样本)(例如DLL3#1或DLL3#5)检测个体的样本(例如使用肿瘤组织样本上的IHC)中的DLL3。在另一方面中,本文提供选择用于个体的DLL3靶向疗法的方法,其包括使用本发明的抗-DLL3抗体(例如DLL3#1或DLL3#5)(例如使用肿瘤组织样本上的IHC)检测个体的样本(例如肿瘤组织样本)中的DLL3。在另一方面中,本文提供监测个体中的治疗效果(例如DLL3靶向疗法的治疗效果)的方法,其包括使用本发明的抗-DLL3抗体(例如DLL3#1或DLL3#5)(例如使用肿瘤组织样本上的IHC)检测个体的样本(例如肿瘤组织样本)中的DLL3。

[0549] 本发明的抗-DLL3抗体分子亦可用于靶向细胞。在一些实施方案中,本文提供的DLL3特异性抗体用于通过将此类药物或细胞毒性剂连接至该DLL3抗体来将药物或细胞毒性剂递送至靶细胞(例如表达DLL3的肿瘤细胞),进而例如杀灭该靶细胞。

[0550] 试剂盒

[0551] 本发明亦涵盖试剂盒,其至少包含本发明的多特异性结合蛋白(例如DLL3#1/CD3#1、DLL3#2/CD3#1、DLL3#3/CD3#1、DLL3#4/CD3#1、DLL3#5/CD3#1、DLL3#6/CD3#1、DLL3#7/CD3#1、DLL3#8/CD3#1、DLL3#9/CD3#1、DLL3#10/CD3#1、DLL3#11/CD3#1、DLL3#12/CD3#1、DLL3#13/CD3#1、DLL3#14/CD3#1、DLL3#15/CD3#1、DLL3#16/CD3#1、DLL3#17/CD3#1、DLL3#18/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#2/CD3#2、DLL3#3/CD3#2、DLL3#4/CD3#2、DLL3#5/CD3#2、DLL3#6/CD3#2、DLL3#7/CD3#2、DLL3#8/CD3#2、DLL3#9/CD3#2、DLL3#10/CD3#2、DLL3#11/CD3#2、DLL3#12/CD3#2、DLL3#13/CD3#2、DLL3#14/CD3#2、DLL3#15/CD3#2、DLL3#16/CD3#2、DLL3#17/CD3#2、DLL3#18/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#3、DLL3#4/CD3#3、DLL3#5/CD3#3及DLL3#6/CD3#3、DLL3#7/CD3#3、DLL3#8/CD3#3、DLL3#9/CD3#3、DLL3#10/CD3#3、DLL3#11/CD3#3、DLL3#12/CD3#3、DLL3#13/CD3#3、DLL3#14/CD3#3、DLL3#15/CD3#3、DLL3#16/CD3#3、DLL3#17/CD3#3、DLL3#18/CD3#3中的任一者,优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)及任选选用的选自由用于治疗如上文所述的疾病及病症的其他药物组成的群的一或多种其他组分。

[0552] 在一个实施方案中,试剂盒包括在单位剂型中含有有效量的本发明的结合蛋白的组合物。

[0553] 本发明亦涵盖试剂盒,其至少包含本发明的多特异性结合蛋白,及选自如上文所述的用于治疗疾病及病症的其他药物组成的群的一或多种其他组分。

[0554] 在一个实施方案中,该试剂盒包括组合物,其在单位剂型中含有有效量的本发明的多特异性结合蛋白(优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)。在另一实施方案中,该试剂盒包括以下两者:在单位剂型中含有有效量的本发明的多特异性结合蛋白(优选地DLL3#1/CD3#1、DLL3#1/CD3#2、DLL3#1/CD3#3、DLL3#2/CD3#1、DLL3#2/CD3#2、DLL3#2/CD3#3、DLL3#3/CD3#1、DLL3#3/CD3#2、DLL3#3/CD3#3中的任一者)的组合物;及在单位剂型中含有有效量的PD-1拮抗剂(诸如如本文(例如表A)及W02017/198741所述的抗PD-1抗体,最佳地PD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4及PD1-5)的组合物。

[0555] 在一些实施方案中,试剂盒包含无菌容器,其含有此类组合物;这些容器可为盒、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋、泡壳包装或本领域中已知的其他合适的容器形式。此类容器可由塑料、玻璃、层压纸、金属箔片或适合于保存药剂的其他材料制成。另外,该试剂盒可包含在具有本发明的结合蛋白的第一容器中呈冻干形式的药物组合物及具有用于注射的药学上可接受的稀释剂(例如无菌水)的第二容器。药学上可接受的稀释剂可用于重组或稀释结合蛋白。

[0556] 视需要,本发明的多特异性结合蛋白连同用于向患有癌症的个体给予多特异性结合蛋白的说明书一起提供。所述说明书一般将包括关于治疗或预防癌症的组合物的用途的信息。在其他实施方案中,所述说明书包括以下中的至少一者:治疗剂的说明书、治疗或预防癌症或其症状的剂量时程及给药、注意事项、警告、适应症、不适应症、过量信息、不良反应、动物药理学、临床研究及/或参考文献。所述说明书可直接印刷在容器(若存在)上或作为施加于容器上的标签,或作为供应于容器中或与容器一起供应的独立纸片、小册子、卡片或文件夹。

[0557] 如本文所阐述,本发明进一步提供用于测定生物样本中DLL3表达的诊断方法。在一个方面中,本发明提供用于执行这些方法的试剂盒以及用于实施本发明的方法(诸如收集组织及/或执行检测分析,及/或分析结果)的说明书。

[0558] 该试剂盒包含本发明的DLL3抗体组合物(例如单克隆抗体)及使用说明书,或可替代地基本上由其组成,或又进一步由其组成。所述试剂盒适用于检测生物样本(例如任何体液或身体组织的生检)中DLL3多肽的存在。在一些实施方案中,该试剂盒可包含:一或多种能够结合样本中DLL3多肽的DLL3抗体(例如抗-DLL3抗体DLL3#1或DLL3#5);用于检测样本中DLL3多肽的构件;及任选选用的用于比较样本中DLL3多肽的信号/量与对照的构件。可标记本发明的一或多种抗-DLL3抗体。试剂盒组分(例如试剂)可包装在合适容器中。该试剂盒可进一步包含使用试剂盒检测DLL3多肽的说明书。在某些实施方案中,该试剂盒包含本发明的抗-DLL3抗体(第一抗体)及不同的第二抗体,该第二抗体与DLL3多肽或第一抗体结合且与可检测标记结合。

[0559] 试剂盒亦可包含例如缓冲剂、防腐剂或蛋白稳定剂。试剂盒可进一步包含用于检测可检测标记必需的组分,例如酶或受质。试剂盒亦可含有对照样本或一系列对照样本,其可经分析且与测试样本比较。试剂盒的各组分可密封于单独的容器内,且全部多个容器可连同用于解释使用试剂盒所进行的分析的结果的说明书一起在单一包装内。本发明的试剂

盒可含有在试剂盒容器上或中的书面产品。书面产品描述如何使用包含于试剂盒中的试剂。

[0560] 为了方便起见,这些表明试剂盒组分可以本领域技术人员惯用的方式封装。举例而言,这些表明试剂盒组分可呈溶液或呈液体分散液或类似形式提供。

实施例

[0561] 以下实施例说明本发明。这些实施例不应理解为限制本发明的范畴。

[0562] 实施例1:设计及构建CD3/DLL3结合蛋白

[0563] 本发明人已开发出多特异性结合蛋白,其结合DLL3及CD3且诱导T细胞活化,从而导致表达DLL3的肿瘤细胞的溶解。所使用的分子设计具有IgG抗体骨架及IgG样结构。其特征在于Fc中的杵臼技术以用于杂二聚杵(抗-DLL3)及臼(抗-CD3)臂。另外,结合蛋白在各臂中的轻链与相应重链之间具有柔性肽序列。因此,结合蛋白包含两个臂,一个结合于CD3,另一个结合于DLL3,各臂包含单链Fab及Fc区。

[0564] 优选地,结合分子为双特异性的及二价的(对于两个目标中的每一者为单价)。

[0565] 使用自杂交瘤及培养的单B细胞回收的高通量V基因制备识别DLL3及CD3的结合域

[0566] 为获得抗-DLL3结合子,在活体外培养来源于经DLL3免疫接种的野生型及AlivaMab人类化小鼠(Ablexis, San Francisco, CA, USA:具有人类免疫球蛋白基因座的AlivaMab基因转殖小鼠平台)的杂交瘤或单B细胞。通过AlphaLISA(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)针对对重组人类DLL3的反应性,及通过流式细胞计数针对对表达人类DLL3的SHP77细胞(ATCC®, CRL-2195TM)筛分上清液。

[0567] 随后自鉴别的阳性纯系扩增免疫球蛋白(Ig) VH及VL基因。为自杂交瘤RNA,将约 2×10^6 个来自单一纯系的细胞粒化且用作源材料。对于单一B细胞,将自单独分离的B细胞扩增的100至500个细胞用作源材料。使用RNeasy Plus(Qiagen, Hilden, Germany)分离RNA。随后根据制造商的说明书使用Smarter cDNA合成试剂盒(Clontech, Mountain View, CA)合成cDNA。为促进cDNA合成,使用oligo dT引发所有信使RNA的逆转录,之后用Smarter IIA寡核苷酸“5'加帽”。使用靶向Smarter IIA端帽的5'引子及靶向CH1中的共有区的3'引子,使用2步骤PCR扩增进行VH及VL片段之后续扩增。简言之,各50 μ l PCR反应物由20 μ M正向及反向引子混合物、25 μ l PrimeStar Max DNA聚合酶预混合物(Clontech)、2 μ l未纯化的cDNA,及21 μ l双蒸馏H₂O组成。循环程序在94°C下开始持续3min,继之以35个周期(94°C持续30秒,50°C持续1min,68°C持续1min),且在72°C下持续7min结束。用VL及VH第2轮引子进行第二轮PCR,所述引子含有“重叠”其各别pTT5母载体中的各别区域(VH及VL)的15bp互补延伸。用以下程序进行第二轮PCR:94°C持续3min;35个周期(94°C持续30秒,50°C持续1min,68°C持续1min),及在72°C下持续7min结束。

[0568] 使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech, U.S.A.)将VL基因定向克隆于pTT5huIgK载体中且将VH基因定向克隆于pTT5huIgG1K0载体中。为促进In-Fusion®HD克隆,PCR产物在In-Fusion HD克隆之前经纯化且用克隆增强剂处理。根据制造商的方案(Clontech, U.S.A.)进行克隆及转化。使少量制备的DNA(Mini-prep DNA)进行桑格定序(Sanger sequencing)以证实获得完整的V基因片段。

[0569] 使用此方法,制备Ig VH及VL基因对,其编码对DLL3具有特异性的结合域。通过用

相应的重链及轻链编码质体瞬时转染CHO-E37细胞制备重组抗体。

[0570] 重组抗体的证实筛选

[0571] 通过流式细胞计数针对与表达人类或食蟹猕猴DLL3的细胞株的结合分析含有所表达重组抗体的上清液。简言之,使细胞与重组上清液一起培育,洗涤,且用抗人类-IgG-APC检测来自上清液的结合mAb(Jackson ImmunoResearch 109-136-098)。通过以样本的中值荧光强度(MFI)除以同型对照的中值荧光强度来计算信号/背景比(S/B)(可变区对不相关蛋白质及不同恒定区主链)。

[0572] 在Biacore 400上对重组上清液进行表面等离子共振(SPR)。简言之,经由蛋白质A/G将HTP上清液中的非优化的IgG捕获于传感器表面上,在10ul/min下持续60秒。监测100nM人类DLL3与捕获IgG的结合,在30ul/min下缔合180秒,之后在HBS-EP缓冲液中解离120秒。在每个结合循环之间用甘氨酸pH 2.1进行蛋白质A/G表面的再生。将以下材料用于此分析:蛋白质试剂:以重组方式表达的人类DLL3。系统操作缓冲液:HBS-EP(10mM HEPES pH 7.4,150mM NaCl,3mM EDTA及0.005%v/v聚山梨醇酯P20)。捕获试剂:蛋白质A/G G(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA,USA),具有对所有人类IgG同型的特异性。

[0573] 选择相关纯系(Kd<300pM)以用于多特异性格式化。生成多特异性结合蛋白且进一步在机制及功能性筛分中评估(诸如如下所述的细胞结合、细胞毒性及T细胞活化)。

[0574] DLL3及CD3结合子的人类化

[0575] 如上文所述的DLL3结合子以及文献(Pessano等人,EMBO J.1985年2月;4(2):337-44;SalmerónA等人,J Immunol.1991年11月1日;147(9):3047-52)中所描述的CD3结合子的序列经人类化及/或优化。抗体的序列优化/人类化为用于工程改造在非人类物种中产生(对特异性抗原/表位)的用作治疗剂的抗体的方法,所述抗体与在人类中产生的抗体类似且藉此在保留特异性的同时消除可能存在的不良影响,诸如免疫原性。本文利用的序列优化/人类化方法为由Singh等人,2015(Singh S等人,mAbs2015:7(4):778-91)描述。简言之,电子杂交鉴别接近匹配的人类生殖为,且使用噬菌体筛选方法评估优化/人类化变体。基于结合、百分比人类评分及Epivax(潜在免疫原性的电子杂交预测工具)评分选择最终前导候选序列。

[0576] 构建结合DLL3及CD3的双特异性蛋白质

[0577] 使用常见分子生物学技术,将DLL3及CD3结合子的可变区克隆于表达载体pTT5(国家研究委员会(National Research Council),加拿大)中,以形成双特异性结合蛋白,其具有:一个DLL3特异性结合单元,该结合单元包含结合于DLL3的单链Fab及Fc区(此类结合单元在本文中亦称为“DLL3臂”或“DLL3链”);及CD3特异性结合单元,该结合单元包含结合于CD3的单链Fab及Fc区(此类结合单元在本文中亦称为“CD3臂”或“CD3链”)。DLL3及CD3臂的Fc区包括“杵”或“臼”突变(Atwell等人,JMB,1997,270,26-35)且各别链称为杵或臼链。对于多片段DNA组装,根据制造商的方案,使用Gibson组装及NEBuilder HiFi DNA组装方法(New England Biolabs,Ipswich,MA,USA)。对少量制备的DNA进行定序。

[0578] 各表达载体含有链编码基因(DLL3或CD3臂/链),亦即编码信号序列及轻链及重链的基因的真核生物启动子组件、原核生物选择标记基因的表达卡匣(诸如氨苄西林(ampicillin)、及复制起点。使这些DNA质体在氨苄西林抗性大肠杆菌菌落及培养物中繁殖且纯化。

[0579] 实施例2:结合DLL3及CD3的双特异性二价结合蛋白的表达及纯化

[0580] 通过用携带DLL3/CD3-链编码基因的pTT5载体瞬时转染CHO-E细胞来制备结合DLL3及CD3的双特异性分子。简言之,在140rpm搅拌下,37℃及5%CO₂下,于摇瓶中培育在无血清培养基中的悬浮液中生长的经转染的CHO-E细胞且保持在指数生长的条件下。在转染当天,用杵-链质体及臼-链质体,依1:3质量比,以化学方式转染细胞。随后依1至2×10⁶个细胞/毫升,接种于1L **Gibco®** FreeStyle™ CHO表达培养基 (Life Technologies, NY, US) 中。随后在环绕式振荡下培育细胞10天,一次进料200ml商业进料溶液,以供蛋白质表达。使用 **Octet®** 仪器 (Pall ForteBio, CA, US) 及portA生物传感器探针头,根据制造商的说明书,测定细胞培养上清液中的抗体力价。

[0581] 以两步法,自培养上清液纯化重组DLL3/CD3结合蛋白:首先通过蛋白质A亲和色谱法,使用MabSelect™管柱 (GE Healthcare);第二,通过阳离子交换色谱使用50HS管柱 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)。将经两步骤纯化的材料储存于50mM乙酸钠及100mM NaCl, pH 5.0纯度的最终缓冲液中且通过分析型尺寸排阻色谱、质谱分析及分析型超速离心评估样本的异质性程度。进行功能性测试的样本包含经两步骤纯化的材料,具有约99%单体含量。

[0582] 表1:本文所描述的蛋白质/抗体构建体的CDR、VH、VL、scFab、DLL3臂及CD3臂的氨基酸序列及SEQ ID NO:

[0583]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
SEQ ID NO:1	DLL3#1 LCCDR1	RASQSVSSNFLV
SEQ ID NO:2	DLL3#1 LCCDR2	GASTRAS
SEQ ID NO:3	DLL3#1 LCCDR3	QQYGDSPYT
SEQ ID NO:4	DLL3#1 HCCDR1	GNTFTNYMH
SEQ ID NO:5	DLL3#1 HCCDR2	IIDPSVGSKSYAQKFLG
SEQ ID	DLL3#1	AGKRFGESYFDY

[0584]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
NO:6	HCCDR3	
SEQ ID NO:7	DLL3#2 LCCDR1	RASQGISNYLA
SEQ ID NO:8	DLL3#2 LCCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO:9	DLL3#2 LCCDR3	LQHNSSPYT
SEQ ID NO:10	DLL3#2 HCCDR1	GYTFTSYMH
SEQ ID NO:11	DLL3#2 HCCDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG
SEQ ID NO:12	DLL3#2 HCCDR3	GEAVGGNYYYYGMDV
SEQ ID NO:13	DLL3#3 LCCDR1	RASQGISNYLV
SEQ ID NO:14	DLL3#3 LCCDR2	AVSSLYS
SEQ ID NO:15	DLL3#3 LCCDR3	LQHDSYPYT
SEQ ID NO:16	DLL3#3 HCCDR1	GYTFTSYVH
SEQ ID NO:17	DLL3#3 HCCDR2	IINPGGGTTSYAQKFLG
SEQ ID NO:18	DLL3#3 HCCDR3	GEAVTGNYFYGMDV
SEQ ID NO:19	DLL3#4 LCCDR1	RASKSVSSFGYSFMH
SEQ ID NO:20	DLL3#4 LCCDR2	LASNLES
SEQ ID NO:21	DLL3#4 LCCDR3	QHSRELPWT
SEQ ID NO:22	DLL3#4 HCCDR1	VYTFTSYFMY
SEQ ID NO:23	DLL3#4 HCCDR2	EISPTNGNSNLNERFKN
SEQ ID NO:24	DLL3#4 HCCDR3	GGDGYLDY
SEQ ID NO:25	DLL3#5 LCCDR1	QASQDISNYLN
SEQ ID NO:26	DLL3#5 LCCDR2	DASNLET
SEQ ID NO:27	DLL3#5 LCCDR3	QQYDNLPTWT
SEQ ID NO:28	DLL3#5 HCCDR1	GFTFTGYIYH
SEQ ID NO:29	DLL3#5 HCCDR2	WINPNSGGTNYAQKFQG
SEQ ID NO:30	DLL3#5 HCCDR3	GWDY

[0585]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
SEQ ID NO:31	DLL3#6 LCCDR1	RASQDISNYFA
SEQ ID NO:32	DLL3#6 LCCDR2	AASTLQS
SEQ ID NO:33	DLL3#6 LCCDR3	QQLNSYPYT
SEQ ID NO:34	DLL3#6 HCCDR1	GGSISSYFWS
SEQ ID NO:35	DLL3#6 HCCDR2	RIYTSGSTNYPNPSLNS
SEQ ID NO:36	DLL3#6 HCCDR3	RGDWGGFDI
SEQ ID NO:37	DLL3#1 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNFLVWYQQ KPGQAPRPLIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRL EPEDFALYYCQQYGDSPYTFGQGTTLEIK
SEQ ID NO:38	DLL3#1 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGNTFTNYYMHW VRQAPGPGLEWMGIIDPSVGSKSYAQKFLGRVTIARDT STSTVFLDLYSRSEDNAVYFCARAGKRFGESYFDYWG QGTLTVSS
SEQ ID NO:39	DLL3#2 VL	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLAWFQQ KPGKVPEPLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISL QPEDFATYYCLQHNSSPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:40	DLL3#2 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHW VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARGEAVGGNYYYYG MDVWGQGTTTVTVSS
SEQ ID NO:41	DLL3#3 VL	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLVWFQQ KPGKAPKRLIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPEDFATYYCLQHDSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:42	DLL3#3 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVHW VRQAPGQGLEWMVIINPGGGTTSYAQKFLGRVTMTRD TSTNTVYMELKSLRSEDNAVYYCARGEAVTGNFYFYG MDVWGQGTTTVTVSS
SEQ ID NO:43	DLL3#4 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSFGYSFMHW YQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLN IHPVEEEDAATYYCQHSRELPWTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:44	DLL3#4 VH	QVQLQQSGTELVKPGASVKLSCKASVYTFTSYFMYWV KQRPGHGLEWIGEISPTNGNSNLNERFKNKATLTVDKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRGGDGYLDYWGQGT LTVSS
SEQ ID NO:45	DLL3#5 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTCQASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYCQQYDNLPTWTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:46	DLL3#5 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTGYIHWV RQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRD SSINTAFMELSRLTSDDTAVYYCAAGWDYWGQGT LTVSS
SEQ ID NO:47	DLL3#6 VL	DIQLTQSPSFLSTSVGDRVITICRASQDISNYFAWYQQK PGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGGSGTEFTLTISLQ

[0586]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		PEDFATYYCQQLNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:48	DLL3#6 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYTSGSTNYPNPSLNSRLTMSVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARRGDWGGFDIWGQGTVV TVSS
SEQ ID NO:49	DLL3#1 scFab	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNFLVWYQQ KPGQAPRPLIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRL EPEDFALYYCQQYGDSPYTFGQGTTLLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGNTFTNYYMHWRQAPGPGLEWMGII DPSVGSKSYAQKFLGRVTIARDTSTSTVFLDLYSLRSED TAVYFCARAGKRFGEYFDYWGQGTTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:50	DLL3#2 scFab	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLAWFQQ KPGKVPEPLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISL QPEDFATYYCLQHNSSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGII NPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSE DTAVYYCARGEAVGGNYYYGMDVWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:51	DLL3#3 scFab	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLVWFQQ KPGKAPKRLIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPEDFATYYCLQHDSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEWMVIIN PGGGTTSY AQKFLGRVTMTRDTSTNTVYMEKSLRSE DTAVYYCARGEAVTGNFYFYGMDVWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:52	DLL3#4 scFab	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSFGYSFMHW YQQKPGQPPKLLIYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLN IHPVEEEDAATYYCQHSRELPTWTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK

[0587]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSG SGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQQSGTEL VKPGASVKLSCKASVYTFSTYFMYWVKQRPBGHLEWI GEISPTNGNSNLNERFKNKATLTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCTRGGDGYLDYWGQGTTTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:53	DLL3#5 scFab	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTCQASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYCQQYDNLPTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGFTFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWI NPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDSSINTAFMELSRITSD DTAVYYCAAGWDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:54	DLL3#6 scFab	DIQLTQSPSFLSTSVGDRTITCRASQDISNYFAWYQQK PGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGGGSGTEFTLTISLQ PEDFATYYCQQLNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESK STEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPAAGGLEWIGRIYTSGST NYPNPSLNSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARRGDWGGFDIWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:55	CD3#1 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO:56	CD3#1 LCCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO:57	CD3#1 LCCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:58	CD3#1 HCCDR1	GFTFNTYAMN
SEQ ID NO:59	CD3#1 HCCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO:60	CD3#1 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:61	CD3#2 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID	CD3#2	GTNKRAP

[0588]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
NO:62	LCCDR2	
SEQ ID NO:63	CD3#2 LCCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:64	CD3#2 HCCDR1	GFTFNTYAMN
SEQ ID NO:65	CD3#2 HCCDR2	RIRSKYINYATYYADSVKD
SEQ ID NO:66	CD3#2 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:67	CD3#1 VL	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:68	CD3#1 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGT LTVSA
SEQ ID NO:69	CD3#2 VL	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:70	CD3#2 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYINYATYYADSVKDRTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSW FAYWGQGT LTVSA
SEQ ID NO:71	CD3#1 scFab	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAW KADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECSGGGGSEGKSSG SGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:72	CD3#2 scFab	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAW KADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECSGGGGSEGKSSG SGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYINYATYYADSVKDRTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT L TVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

[0589]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
SEQ ID NO:73	DLL3#1 链	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNFLVWYQQ KPGQAPRPLIYGASTRASGIPDRFSGSGSGADFTLTISRL EPEDFALYYCQQYGDSPTYTFGQGTLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGNTFTNYYMHWRQAPGPGLEWMGII DPSVGSKSYAQKFLGRVTIARDTSTSTVFLDLYSLRSED TAVYFCARAGKRFGEYFDYWGQGTLLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:74	DLL3#2 链	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLAWFQQ KPGKVPEPLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSVTEFTLTISL QPEDFATYYCLQHNSSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGII NPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARGEAVGGNYYYGMDVWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFPLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:75	DLL3#3 链	DIQMTQSPSAMSASVGDRVITICRASQGISNYLVWFQQ KPGKAPKRLIYAVSSLYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPEDFATYYCLQHDSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEWMVIIN PGGGTTSYAQKFLGRVTMTRDTSTNTVYMELKSLRSE DTAVYYCARGEAVTGNYFYGMDVWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT

[0590]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:76	DLL3#4 链	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSFGYSFMHW YQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLN IHPVEEEDAATYYCQHSRELPTWTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSG SGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQSGTEL VKPGASVKLSCKASVYTFSTSYFMYWVKQRPGHGLEWI GEISPTNGNSNLNERFKNKATLTVDKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCTRGGDGYLDYWGQGTTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:77	DLL3#5 链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTCQASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYCQQYDNLPTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGFTFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWI NPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDSSINTAFMELSRLTSD DTAVYYCAAGWDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:78	DLL3#6 链	DIQLTQSPSFLSTSVGDRVTITCRASQDISNYFAWYQQK PGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGGGSGTEFTLTISLQ PEDFATYYCQQLNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF

[0591]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		PPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESK STEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPAGKGLEWIGRIYTSGST NYNPSLNSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARRGDWGGFDIWGQGT VVT VSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:79	CD3#1 链	EAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAW KADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECGGGGSEGKSSG SGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLVSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:80	CD3#2 链	EAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAW KADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECGGGGSEGKSSG SGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYINYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV

[0592]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPG
SEQ ID NO:81	Fc域* (IgG1)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
SEQ ID NO:82	Fc W域 (IgG1 , LALA)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
SEQ ID NO:83	Fc SAV域 (IgG1 , RF/LALA)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLV KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSP G
SEQ ID NO:84	Fc域 (IgG4Pro)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL G
SEQ ID NO:85	Fc W 域 (IgG4Pro)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LG
SEQ ID NO:86	Fc SAV 域 (IgG4Pro , RF)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLV SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLS LG
SEQ ID NO:87	κ轻链的恒 定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA

[0593]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:88	λ轻链的恒 定区	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVK VAWKADGSPVNTGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC
SEQ ID NO:89	接头	GGGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGS
SEQ ID NO:90	接头	GGGGSGGGGSGGSGGGSGGGGS
SEQ ID NO:91	接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO:92	接头	GGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO:93	接头	GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO:94	接头	GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGG GS
SEQ ID NO:95	接头	ggggsgggsgggsgggsgggsgggsgggsgggsgggsgggsg
SEQ ID NO:96	CD3#3 LCCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO:97	CD3#3 LCCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO:98	CD3#3 LCCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:99	CD3#3 HCCDR1	GFTFNTYAMN
SEQ ID NO:100	CD3#3 HCCDR2	RIRSKYANYATYYADSVKD
SEQ ID NO:101	CD3#3 HCCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:102	CD3#3 VL	EAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:103	CD3#3 HL	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYANYATYYADSVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSA
SEQ ID NO:104	CD3#3 scFab	EAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAW KADGSPVNTGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECSGGGGSEGKSSG SGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYANYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY

[0594]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:105	CD3#3 链	EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQLPRGLIGGTNKRAPWVPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAW KADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECGSGGGSEGKSSG SGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYANYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFCSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:133	DLL3#7 LCCDR1	RASQSVNSNFLA
SEQ ID NO:134	DLL3#7 LCCDR2	GTSSRAT
SEQ ID NO:135	DLL3#7 LCCDR3	QQYGSSPWT
SEQ ID NO:136	DLL3#7 HCCDR1	GFTFSSYGMF
SEQ ID NO:137	DLL3#7 HCCDR2	VIWLDGDDEDYVDSVKG
SEQ ID NO:138	DLL3#7 HCCDR3	VLDY
SEQ ID NO:139	DLL3#8 LCCDR1	KSSQSVLDTSNNKNYLV
SEQ ID NO:140	DLL3#8 LCCDR2	WASTRES
SEQ ID NO:141	DLL3#8 LCCDR3	QHYYNSPYT
SEQ ID NO:142	DLL3#8 HCCDR1	GYTFTDYMH
SEQ ID NO:143	DLL3#8 HCCDR2	WINPNSGGTNYEQKFQG
SEQ ID NO:144	DLL3#8 HCCDR3	DAVVIPMDY
SEQ ID NO:145	DLL3#9 LCCDR1	RASQSISRSYLA
SEQ ID NO:146	DLL3#9 LCCDR2	GASSRAT

[0595]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
SEQ ID NO:147	DLL3#9 LCCDR3	QQYGTSPIT
SEQ ID NO:148	DLL3#9 HCCDR1	GGSISSYYWS
SEQ ID NO:149	DLL3#9 HCCDR2	YRYYSNGNTNYPNPSLKS
SEQ ID NO:150	DLL3#9 HCCDR3	IGVAGFYFDY
SEQ ID NO:151	DLL3#10 LCCDR1	RASQSLNSIFLA
SEQ ID NO:152	DLL3#10 LCCDR2	GASSRAT
SEQ ID NO:153	DLL3#10 LCCDR3	QQYGGSMNT
SEQ ID NO:154	DLL3#10 HCCDR1	GYTFTGYMH
SEQ ID NO:155	DLL3#10 HCCDR2	WINPNSGGTIFAQRFQG
SEQ ID NO:156	DLL3#10 HCCDR3	DFGDTVGNAFDI
SEQ ID NO:157	DLL3#11 LCCDR1	SASSSVTYIH
SEQ ID NO:158	DLL3#11 LCCDR2	RTSYLAS
SEQ ID NO:159	DLL3#11 LCCDR3	QQRSSYPRT
SEQ ID NO:160	DLL3#11 HCCDR1	GYAFSDYWIT
SEQ ID NO:161	DLL3#11 HCCDR2	DIYPGSGSTKSSEKFKN
SEQ ID NO:162	DLL3#11 HCCDR3	LYYYGSHYLDI
SEQ ID NO:163	DLL3#12 LCCDR1	SASSSVTYIH
SEQ ID NO:164	DLL3#12 LCCDR2	RTSYLAS
SEQ ID NO:165	DLL3#12 LCCDR3	QQRSSYPRT
SEQ ID NO:166	DLL3#12 HCCDR1	GYAFSDYWIT
SEQ ID NO:167	DLL3#12 HCCDR2	DIYPGSGSTKSSEKFKN
SEQ ID NO:168	DLL3#12 HCCDR3	LYYYGSYYLDI
SEQ ID NO:169	DLL3#13 LCCDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE
SEQ ID NO:170	DLL3#13 LCCDR2	KVSNRFS
SEQ ID	DLL3#13	FQGSHPVYT

[0596]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
NO:171	LCCDR3	
SEQ ID NO:172	DLL3#13 HCCDR1	GYTFTNYGVT
SEQ ID NO:173	DLL3#13 HCCDR2	WINTYSGAPTYADDFNG
SEQ ID NO:174	DLL3#13 HCCDR3	LDDYDLYYFDY
SEQ ID NO:175	DLL3#14 LCCDR1	KASQSVDDYDGDSYMN
SEQ ID NO:176	DLL3#14 LCCDR2	AASTLES
SEQ ID NO:177	DLL3#14 LCCDR3	QQSDEDPWT
SEQ ID NO:178	DLL3#14 HCCDR1	GYTFTDYIYH
SEQ ID NO:179	DLL3#14 HCCDR2	YIYPGNSYTAYNQKFKD
SEQ ID NO:180	DLL3#14 HCCDR3	SGGSAMDY
SEQ ID NO:181	DLL3#15 LCCDR1	KASQSVDDYDGDSYLN
SEQ ID NO:182	DLL3#15 LCCDR2	AASNLES
SEQ ID NO:183	DLL3#15 LCCDR3	QQSSEDPRT
SEQ ID NO:184	DLL3#15 HCCDR1	GYTFTNYGMN
SEQ ID NO:185	DLL3#15 HCCDR2	WINTYTGEPTYADDFKG
SEQ ID NO:186	DLL3#15 HCCDR3	FHFSSNGDAMDN
SEQ ID NO:187	DLL3#16 LCCDR1	RASQSVSDWLA
SEQ ID NO:188	DLL3#16 LCCDR2	RASSLES
SEQ ID NO:189	DLL3#16 LCCDR3	QLYNSYSPT
SEQ ID NO:190	DLL3#16 HCCDR1	GFTFSSYWMT
SEQ ID NO:191	DLL3#16 HCCDR2	NIKEDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO:192	DLL3#16 HCCDR3	DWGYFDY
SEQ ID NO:193	DLL3#17 LCCDR1	RASENIYYSLA
SEQ ID NO:194	DLL3#17 LCCDR2	NTNSLED
SEQ ID NO:195	DLL3#17 LCCDR3	KQAYDFPLT

[0597]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
SEQ ID NO:196	DLL3#17 HCCDR1	GYTFISYYIH
SEQ ID NO:197	DLL3#17 HCCDR2	WIYPGDGSTNNNEKFKG
SEQ ID NO:198	DLL3#17 HCCDR3	GEGNAMDD
SEQ ID NO:199	DLL3#18 LCCDR1	RASENIYYSLA
SEQ ID NO:200	DLL3#18 LCCDR2	NANSLED
SEQ ID NO:201	DLL3#18 LCCDR3	KQAYDVPLT
SEQ ID NO:202	DLL3#18 HCCDR1	GYTFTAYFIH
SEQ ID NO:203	DLL3#18 HCCDR2	YIDPFNDDTNYNVKFKG
SEQ ID NO:204	DLL3#18 HCCDR3	GTSATLDY
SEQ ID NO:205	DLL3#7 VL	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSNFLAWYQQ KPGQTPRLLIFGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIR
SEQ ID NO:206	DLL3#7 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMFWV RQAPGKGLEWVAVIWLGDDEEDYVDSVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLRVDDTAIYYCARVLDYWGQGTLLV TVSS
SEQ ID NO:207	DLL3#8 VL	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNKNY LVWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQHYYNSPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:208	DLL3#8 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHV VRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYEQKFQGRVTMTR DTSISTAYMELNRLRSDDTAIYYCTRAVVPMDYWG QGTLLVTVSS
SEQ ID NO:209	DLL3#9 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGTSPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO:210	DLL3#9 VH	QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQ TPGKGLDWIGYRYYSNTNYPNPSLKSRTISLDMSNN QFSLKLSSVTAADTAIYYCASIGVAGFYFDYWGQGTLLV TVSS
SEQ ID NO:211	DLL3#10 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLNSIFLAWYQQ KPGQAPWLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYFCQQYGGSMNTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:212	DLL3#10 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHV VRLAPGQGLEWMGWINPNSGGTIFAQRFGGRVTMTRD TSISTVYMDLNRLRSDDTAIYYCARDFGDTVGNAFDI WGQGTMTVTVSS
SEQ ID NO:213	DLL3#11 VL	QIVLTQSPAISASPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNP GTSPKLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRME AEDAATYYCQQRSSYPRTFGGGGTKLEIK

[0598]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
SEQ ID NO:214	DLL3#11 VH	QVQLQQPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSDYWITW VKQRPQGQLEWIGDIYPGSGSTKSSEKFKNKATLTADT SSSKAYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYYYGSHYLDTWGQ GTTLTVSS
SEQ ID NO:215	DLL3#12 VL	QVVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNP GTSPKLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRME AEDAATYYCQQRSSYPRTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:216	DLL3#12 VH	QVQLQQPGAELVQPGSSVKMSCKASGYAFSDYWITWV KQRPQGQLEWIGDIYPGSGSTKSSEKFKNRATLTADTS SSTAYIQFSSLTPEDSAVYYCVSLYYYGSYYLDTWGQG TTLTVSS
SEQ ID NO:217	DLL3#13 VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDQAAISCRSSQSIVHSNGNTYLE WYLQKPGQSPKVLIIKVSNRFSQVDFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGKLEIK
SEQ ID NO:218	DLL3#13 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGVTWVK QAPGKGLKWMGWINTYSGPTYADDFNGRFALSLETS ASTAYLQINNLLKNEEDTATYFCARLDDYDLYFDYWGG GTALTVSS
SEQ ID NO:219	DLL3#14 VL	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSVSDYDGD SYMN WYQQKPGQPPKLLIYAASLTESGIPARFSGSGSGTDFTL NIHPVEEEDAATYYCQQSDEDPWTFGGGKLEIK
SEQ ID NO:220	DLL3#14 VH	QIQLVQSGPELVKPGVKISCKASGYTFTDYYIHWKQR PGQGLEWIGYIYPGNSYTAYNQKFKDKATLTADNPSST AYMQLSSLTSEDSAVYFCARSGGSAMDYWGQGSVT VSS
SEQ ID NO:221	DLL3#15 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVSDYDGD SYLN WYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTL NIHPVEEEDAATYYCQQSDEDPRTFGGGKLEIK
SEQ ID NO:222	DLL3#15 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWV KQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLET SASTAYLQINNLLKNEEDMATYFCTKHFSSNGDAMDNDW GQGSVTVSS
SEQ ID NO:223	DLL3#16 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSDWLAWYQ QKPGKAPKFLIYRASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTIS LQPADFATYYCQLYNSYSPTFGQGKVEIK
SEQ ID NO:224	DLL3#16 VH	EVHLLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFSSYWMTWV RQAPGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDWGYFDYWGGQ TLTVSS
SEQ ID NO:225	DLL3#17 VL	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQ KQGKSPQLLIYNNTNSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINS MQPEDTATYFCKQAYDFPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO:226	DLL3#17 VH	QIQLVQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFISYYIHWVK QRPQGQLEWIGWIYPGDGSTNNNEKFKGKTTLTADKS SSTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARGEGNAMDDWGQGS TVSS
SEQ ID NO:227	DLL3#18 VL	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQ KQGKSPQLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKIN NMQPEDTATYFCKQAYDVPLTFGAGTKLELK

[0599]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
SEQ ID NO:228	DLL3#18 VH	QVQLQQSGPDLVKPGASVKMSCEASGYTFTAYFIHWV KQKPGQGLEWIGYIDPFNDDTNYNVKFKGKATLTSDT SSSIAYMELSSLTSEDSSFYYCARGTSATLDYWGHGTT LTVSS
SEQ ID NO:229	DLL3#7 scFab	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSNFLAWYQQ KPGQTPRLLIFGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIRRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVESGGGVVQPGR SLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLEWVAWIWL DGDDDEDYVDSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRVDD TAIYYCARVLDYWGGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:230	DLL3#8 scFab	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNNKNY LVWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVAVYYCQHYYNSPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGK SSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYEQKFQGRVTMTRDTSISTAYM ELNRLRSDDTAVYYCTRDAVVIPMDYWGGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:231	DLL3#9 scFab	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSIIRSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGTSPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVHLQESGPGLVKPSE TLSTCTVSGGSISSYYWSWIRQTPGKGLDWIGYRYY GNTNYPNPSLKSRTISLDMNNQFSLKLSSVTAADTAI YYCASIGVAGFYFDYWGGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:232	DLL3#10 scFab	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLNSIFLAWYQQ KPGQAPWLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYFCQQYGGSMNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES

[0600]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		KSTEGKSSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTGYMHVRLAPGQGLEWMGW INPNSGGTIFAQRFQGRVTMTRDTSISTVYMDLNLRS DDTAVYYCARDFGDTVGNAFDIWGQGMVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:233	DLL3#11 scFab	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNP GTSPKLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRME AEDAATYYCQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSSGSGSESK STEGKSSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQPPGAELVQPGSS VKMSCKASGYAFSDYWITWVKQRPQGQGLEWIGDIYPG SGSTKSSEKFKNKATLTADTSSSKAYIQFSSLTPEDSAV YYCVSLYYYGSHYLDTWGQGTTTLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:234	DLL3#12 scFab	QVVLQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNP GTSPKLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRME AEDAATYYCQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSSGSGSESK STEGKSSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQPPGAELVQPGSS VKMSCKASGYAFSDYWITWVKQRPQGQGLEWIGDIYPG SGSTKSSEKFKNRATLTADTSSSTAYIQFSSLTPEDSAV YYCVSLYYYGSYYLDTWGQGTTTLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:235	DLL3#13 scFab	DVLMTQTPLSLPVSLGDQAAISCRSSQSIVHSNGNTYLE WYLQKPGQSPKVLIIKVSNRFSQVDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPE LKKPGETVKISCKASGYTFTNYGVTVWVKQAPGKGLK WMGWINTYSGPTYADDFNGRFALSLETSASTAYLQI NNLKNEDTATYFCARLDDYDLYYFDYWGQGTALTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:236	DLL3#14 scFab	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSDYDGDSYMN WYQQKPGQPPKLLIYAASLTESGIPARFSGSGSGTDFTL NIHPVEEEDAATYYCQQSDEDPWTFGGGTLEIKRTVA

[0601]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSS GSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLQQSGPEL VKPGVKISCKASGYTFTDYYIHWMKQRPQGQLEWIGY IYPGNSYTAYNQKFKDKATLTADNPSSTAYMQLSSLTS EDSAVYFCARSGGSAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:237	DLL3#15 scFab	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYLN WYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTL NIHPVEEEDAATYYCQQSSEDPRTFGGGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSS GSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPEL KKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKW MGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINN LKNEDMATYFCTKFHFSSNGDAMDNDWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:238	DLL3#16 scFab	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSDWLAWYQ QKPGKAPKFLIYRASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTIS LQPADFATYYCQLYNSYSPTFGQGKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVHLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIK EDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTALYYCARDWGYFDYWGQGTSLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO:239	DLL3#17 scFab	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQ KQGKSPQLLIYNTNSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINS MQPEDTATYFCKQAYDFPLTFGAGTKLELKRRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLQQSGPEVVKPG ASVKISCKASGYTFISYYIHVVKQRPQGQLEWIGWIYP GDGSTNNNEKFKGKTTLTADKSSSTAYMLLSSLTSEDS AVYFCARGEGNAMDDWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSC

[0602]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
SEQ ID NO:240	DLL3#18 scFab	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQ KQGKSPQLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKIN NMQPEDTATYFCKQAYDVPLTFGAGTKLELKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK KYYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGS GSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQQSGPDLV KPGASVKMSCEASGYTFTAYFIHWVKQKPGQGLEWIG YIDPFNDTNYNVKFKGKATLTSDTSSSIAYMELSSLTS EDSSFYYCARGTSATLDYWGHGTTTLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSC
SEQ ID NO:241	DLL3#7 链	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVNSNFWYQQ KPGQTPRLLIFGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYGYSSPWTFGQGTKVEIRRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVESGGGVVQPGR SLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLEWVAVIWL DGDDDEDYVDSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRVDD TAIYYCARVLDYWGGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSN TKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:242	DLL3#8 链	DIVMAQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDTSNNKNY LVWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQHYNSPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGK SSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYMHVWRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYEQKFQGRVTMTRDTSISTAYM ELNRLRSDDTAVYYCTRDVVIPMDYWGGGTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHNKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW

[0603]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:243	DLL3#9 链	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSYLAWEYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGTSPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVHLQESGPGLVKPSE TLSTCTVSGGSISSYYWSWIRQTPGKGLDWIGYRYY GNTNYPNPSLKSRTISLDMSNNQFSLKLSVTAADTAI YYCASIGVAGFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:244	DLL3#10 链	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLNSIFLAWEYQQ KPGQAPWLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYFCQQYGGSMNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSES KSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTGYYMHWRVRLAPGQGLEWMGW INPNSGGTIFAQRFQGRVTMTRDTSISTVYMDLNRRLS DDTAVYYCARDFGDTVGNAFDIWGQGMVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:245	DLL3#11 链	QIVLTQSPAISASPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNP GTSPKLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRME AEDAATYYCQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESK STEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQPPGAELVQPGSS VKMSCKASGYAFSDYWITWVKQRPQGQGLEWIGDIYPG SGSTKSSEKFKNKATLTADTSSSKAYIQFSSLTPEDSAV

[0604]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		YYCVSLYYYGSHYLDTWGQGTTTLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:246	DLL3#12 链	QVVLTSQPAIMASAPGEKVTITCSASSSVTYIHWFQQNP GTSPKLWIYRTSYLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRME AEDAATYYCQQRSSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSESK STEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQPGAEFVQPGSS VKMSCKASGYAFSDYWITWVKQRPQGGLWIGDIYPG SGSTKSSEKFKNRATLTADTSSSTAYIQFSSLTPEDSAV YYCVSLYYYGSYYLDTWGQGTTTLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:247	DLL3#13 链	DVLMTQTPLSLPVS LGDQAAISCRSSQSIVHSNGNTYLE WYLQKPGQSPKVLIIKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDLGYYCFQGSHVPYTFGGGKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPE LKKPGETVKISCKASGYTFTNYGVTWVKQAPGKGLK WMGWINTYSGAPTYADDFNGRFALSLETSASTAYLQI NNLKNE DTATYFCARLDDYDLYYFDYWGGGTALTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID	DLL3#14	DIVLTQSPASLSVSLGQRATISCKASQSVSDYDGDSYMN

[0605]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
NO:248	链	WYQQKPGQPPKLLIYAASLTESGIPARFSGSGSGTDFTL NIHPVEEEDAATYYCQQSDEDPWTFGGGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSS GSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLQQSGPEL VKPGVKISCKASGYTFTDYYIHWMKQRPQGLEWIGY IYPGNSYTAYNQKFKDKATLTADNPSSTAYMQLSSLTS EDSAVYFCARSGGSAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:249	DLL3#15 链	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYLN WYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTL NIHPVEEEDAATYYCQQSDEDPRTFGGGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSS GSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLVQSGPEL KKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKW MGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINN LKNEDMATYFCTKFHFSSNGDAMDNDWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:250	DLL3#16 链	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSDWLAWYQ QKPGKAPKFLIYRASSLESVPSRFSGSGSGTEFTLTISS LQPADFATYYCQLYNSYSPTFGQGTKEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGSE SKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSEVHLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIK EDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAE DTALYYCARDWGYFDYWGQGTSLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH

[0606]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
		KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:251	DLL3#17 链	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQ KQGKSPQLLIYNTNSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINS MQPEDTATYFCKQAYDFPLTFGAGTKLELKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSVTLTSLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGSGS ESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQIQLQQSGPEVVKPG ASVKISCKASGYTFISYYIHVWKQRPQGQLEWIGWIYP GDGSTNNNEKFKGKTTLTADKSSSTAYMLSSLTSEDS AVYFCARGEGNAMDDWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:252	DLL3#18 链	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQ KQGKSPQLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKIN NMQPEDTATYFCKQAYDVPLTFGAGTKLELKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSVTLTSLKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEGKSSGS GSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGGGSQVQLQQSGPDV KPGASVKMSCEASGYTFTAYFIHWVKQKPGQGLEWIG YIDPFNDDTNYNVKFKGKATLTSDTSSSIAYMELSSLTS EDSSFYYCARGTSATLDYWGHTTLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO:253	重链CH1的 恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID	小鼠 IgG2a	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVT

[0607]

SEQ ID 编号	序列的简 单说明	序列
NO:254	HC	LTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNL LGGPSVFIFPPKIKDVLMLSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQ ISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHGD WMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVY VLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGK TELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSY SCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO:255	小鼠 κLC	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINV KWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTK DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

[0608] *带下划线的序列表明铰链区

[0609] 实施例3:产生重组蛋白

[0610] • 人类DLL3-His

[0611] 使用HEK-293细胞(Thermo Fisher)、Lenti-X慢病毒系统(Clontech),及编码人类DLL3-His的质体(人类DLL3寄存编号Q9NYJ7huDLL3-His:SEQ ID NO:106)生成用以产生人类DLL3-His的细胞株。为了表达,在37℃,5%CO₂及140rpm振荡下培养及扩增细胞。在表达第0天,粒化细胞且再悬浮于Expi293培养基中。在表达第3天,通过在4700rpm下将细胞粒化40分钟来收集经调节的培养上清液。在纯化之前将蛋白酶抑制剂添加至生物物质。通过西方墨点法证实表达。用0.5mM TCEP,0.02%CHAPS,10mM咪唑调节经调节的培养上清液。在HisTrap Ni excel管柱及缓冲液A:50mM MES,50mM NaCl,0.5mM TCEP,0.02%CHAPS,pH 6.5上进行纯化。在补充有0.5M咪唑的缓冲液A,pH 8.5中,使用自20mM咪唑至500mM咪唑的洗脱梯度洗脱所关注蛋白质。将经汇集的级分在以下缓冲液中渗析:50mM MES,50mM NaCl,1mM TCEP,0.02%CHAPS,0.2M精氨酸,3%甘油,pH 6.5。通过质谱分析及分析型超速离心检核纯化材料。

[0612] • 食蟹猕猴DLL3-His

[0613] 使用HEK-293细胞(Thermo Fisher)、Lenti-X慢病毒系统(Clontech)及编码食蟹猕猴DLL3-His的质体(食蟹猕猴DLL3寄存编号:XM 005589196.1(RefSeq);食蟹猕猴DLL3-His:SEQ ID NO:107)生成用以制备食蟹猕猴DLL3-His的细胞株。为了表达,在37℃,5%CO₂及140rpm振荡下培养及扩增细胞。在表达第0天,粒化细胞且再悬浮于Expi 293培养基中。在表达第3天,通过在4700rpm下将细胞粒化40分钟来收集经调节的培养上清液。在纯化之前将蛋白酶抑制剂添加至生物物质。通过西方墨点法证实表达。用0.5mM TCEP,0.02%CHAPS,10mM咪唑调节经调节的培养上清液。在HisTrap Ni excel管柱及缓冲液A:50mM MES,50mM NaCl,0.5mM TCEP,0.02%CHAPS,pH 6.5上进行纯化。在补充有0.5M咪唑的缓冲液A,pH 8.5中,使用自20mM咪唑至500mM咪唑的洗脱梯度洗脱所关注蛋白质。将经汇集的级分在以下缓冲液中渗析:50mM MES,50mM NaCl,1mM TCEP,0.02%CHAPS,0.2M精氨酸,3%甘油,pH 6.5。通过质谱分析及分析型超速离心检核纯化材料。

[0614] • 人类CD3E+G HuFc-6xHis(E+G指示εγ子单元)

[0615] 使用HEK-293细胞(Thermo Fisher)、Lenti-X慢病毒系统(Clontech)及编码人类CD3E+G HuFc-6xHis的质体(人类CD3E寄存编号:P07766;人类CD3E+G-HuFc-His:SEQ ID

NO:108) 生成用以制备人类CD3E+GHuFc-6xHis的细胞株。为了表达,在37℃,潮湿的8%CO₂环境及135rpm振荡下在Freestyle 293培养基中培养及扩增细胞。在第6天通过在9300xg下离心30分钟收集经调节的培养上清液。通过SDS-PAGE及西方墨点法监测表达。用0.2M蔗糖、5%甘油、0.01%CHAPS及10mM咪唑调节经调节的培养上清液。随后将pH值调节至7.2。在两步法中进行纯化:使用Ni/NTA树脂亲和纯化(在4℃下隔夜培育,且用250mM咪唑洗脱);之后在Superdex 200管柱上在含有0.2M蔗糖、5%甘油、0.01%CHAPS、1mM TCEP,pH7.2的目标缓冲液PBS中进行尺寸排阻色谱。在最终分析及储存之前,使用10K MWC0 PES膜viva细胞100离心装置浓缩汇集的材料。通过质谱分析及分析型超速离心检核纯化材料。

[0616] • 食蟹猕猴CD3E+G HuFc-6xHis (E+G指示εγ子单元)

[0617] 使用HEK-293细胞(Thermo Fisher)、Lenti-X慢病毒系统(Clontech)及编码食蟹猕猴CD3E+G HuFc-6xHis的质体(猕猴CD3E寄存编号:Q95LI5<;食蟹猕猴CD3E+G-huFc-His:SEQ ID NO:109)生成用以制备食蟹猕猴CD3E+GHuFc-6xHis的细胞株。为了表达,在37℃,潮湿的8%CO₂环境及135rpm振荡下在Freestyle 293培养基中培养及扩增细胞。在第6天通过在9300xg下离心30分钟收集经调节的培养上清液。通过SDS-PAGE及西方墨点法监测表达。用0.2M蔗糖、5%甘油、0.01%CHAPS及10mM咪唑调节经调节的培养上清液。随后将pH值调节至7.2。在两步法中进行纯化:使用Ni/NTA树脂亲和纯化(在4℃下隔夜培育,且用250mM咪唑洗脱);之后在Superdex 200管柱上在含有0.2M蔗糖、5%甘油、0.01%CHAPS、1mM TCEP,pH7.2的目标缓冲液PBS中进行尺寸排阻色谱。在最终分析及储存之前,使用10K MWC0 PES膜viva细胞100离心装置浓缩汇集的材料。通过质谱分析及分析型超速离心检核纯化材料。

[0618] 实施例4A:基于SPR测定与重组DLL3及CD3εγ子单元的亲和力及种间交叉反应

[0619] 通过表面等离子共振 (SPR),使用ProteOn XPR36仪器(Bio-Rad)测定经纯化的DLL3/CD3双特异性构建体对人类及食蟹猕猴CD3εγ子单元的重组人类及食蟹猕猴DLL3-ECD及Fc融合蛋白的结合亲和力。在PBS-T-EDTA中获得操作缓冲液及所有稀释液(除非另有说明)。GLM传感器芯片(Bio-Rad)根据制造商的建议标准化及预调节。用EDC/s-NHS的等量混合物在水平方向上以30ul/min的流动速率活化传感器芯片300秒且用蛋白质A/G(在10mM乙酸盐pH4.5中为20ug/ml)在水平方向上以30ul/min的流动速率固定300秒,在表面上获得约5000RU蛋白质A/G。传感器芯片在水平方向用1M乙醇胺盐酸盐以30ul/min的流动速率去活化300秒。传感器芯片用0.85%磷酸以100ul/min的流动速率稳定18秒,水平方向3次及竖直方向3次。

[0620] 对于对DLL3的结合动力学测定,分别在蛋白质A/G表面上以25ul/min的流动速率竖直地捕获250秒双特异性分子。通过以40ul/min的流动速率水平地注射PBS-T-EDTA 60秒来稳定基线。以40ul/min的流动速率将分析物(hu DLL3或cy DLL3)水平注射于捕捉的抗体上600秒且解离2700秒。分析物的浓度为20nM、10nM、5nM、2.5nM及1.25nM。表面通过以100ul/min的流动速率注射0.85%磷酸18秒,水平方向一次及竖直方向一次而再生。

[0621] 对于对CD3的结合动力学测定,经由以30ul/min的流动速率竖直地胺偶合140秒将hu CD3εγ-Fc及cy CD3εγ-Fc(溶解于pH 4.5乙酸盐中)直接固定于传感器表面上。通过以40ul/min的流动速率水平地注射PBS-T-EDTA 60秒来稳定基线。以40ul/min的流动速率将分析物(双特异性分子)水平注射于CD3εγ-Fc构建体上600秒且解离600秒。分析物的浓度为

250nM、125nM、62.5nM、31.3nM及15.6nM或2 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.25 μ M及0.125 μ M。表面通过以100 μ l/min的流动速率注射0.85%磷酸18秒,水平方向一次及竖直方向一次而再生。

[0622] 自原始资料减去间点(与传感器表面的相互作用)及空白(PBS-T-EDTA)。随后相对于1:1动力学模型拟合传感器图谱以提供对hu DLL3及cy DLL3的速率常数(k_a , k_d)以及亲和力(KD)值,且相对于平衡全局拟合以提供对hu CD3 $\epsilon\gamma$ 及cy CD3 $\epsilon\gamma$ 的亲和力(KD)值。

[0623] 本文所描述的DLL3/CD3结合蛋白显示在pM范围中对DLL3的亲和力。对CD3 $\epsilon\gamma$ 子单元的亲和力处于低nM范围。平衡人类与食蟹猕猴之间的种间差异。三种例示性DLL3/CD3结合蛋白(分别包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:105的CD3链的DLL3/CD3结合蛋白)的亲和力展示于表2A中。

[0624] 表2A:如通过SPR分析所测定的DLL3/CD3结合蛋白对人类及食蟹猕猴DLL3及CD3 $\epsilon\gamma$ 子单元的亲和力(KD,及种间差异

	DLL3/CD3 结合蛋白	重组 人类DLL3	重组 食蟹猕猴 DLL3	亲和力差异 KD 人/食蟹 猕猴DLL3	重组 人类 CD3 $\epsilon\gamma$	重组 食蟹猕猴 CD3 $\epsilon\gamma$	亲和力差异KD 人/食蟹猕猴 CD3 $\epsilon\gamma$
[0625]	DLL3#3/ CD3#1	< 10 pM	< 10 pM	1	7 nM	8 nM	1.1
	DLL3#3/ CD3#2	< 10 pM	< 10 pM	1	90 nM	100 nM	1.1
	DLL3#3/ CD3#3	< 10 pM	< 10 pM	1	68 nM	71 nM	1.04

[0626] 实施例4B:基于SPR测定对重组DLL3及CD3 $\epsilon\gamma$ 的亲和力

[0627] 通过表面等离子共振 (SPR),使用ProteOn XPR36仪器 (Bio-Rad) 测定经纯化的DLL3/CD3双特异性构建体对人类CD3 $\epsilon\gamma$ 子单元的重组人类DLL3-ECD及Fc融合蛋白的结合亲和力。该方法与实施例4A相似,少量差异如下文概述。

[0628] 对于对DLL3的结合动力学测定,分别在蛋白质A/G表面上以30 μ l/min的流动速率竖直地捕获200秒抗-DLL3/CD3分子。通过以30 μ l/min的流动速率水平地注射PBS-T-EDTA 60秒来稳定基线。以30 μ l/min的流动速率将分析物(hu DLL3)水平注射于捕捉的抗体上300秒且解离1800秒。分析物的浓度为20nM、10nM、5nM、2.5nM及1.25nM。表面通过以100 μ l/min的流动速率注射0.85%磷酸18秒,水平方向一次及竖直方向一次而再生。

[0629] 对于对CD3的结合动力学测定,经由以30 μ l/min的流动速率竖直地胺偶合360秒将HuCD3E_HuCD3G-Fc(溶解于pH 4.5乙酸盐中)直接固定于传感器表面上。通过以30 μ l/min的流动速率水平地注射PBS-T-EDTA 60秒来稳定基线。以30 μ l/min的流动速率将分析物(所有抗-DLL3/CD3分子)水平注射于捕捉的抗体上600秒且解离1800秒。分析物的浓度为250nM、83.3nM、27.8nM、9.3nM及3.1nM。表面通过以100 μ l/min的流动速率注射0.85%磷酸18秒,水平方向一次及竖直方向一次而再生。

[0630] 例示性DLL3/CD3结合蛋白(包含以下的DLL3/CD3结合蛋白:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链;包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的

DLL3结合蛋白；及包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:105的CD3链的DLL3结合蛋白)的亲和力展示于2B中。

[0631] 表2B:如通过SPR分析所测定的DLL3/CD3结合蛋白对人类DLL3及CD3 $\epsilon\gamma$ 子单元的亲和力(KD)

DLL3/CD3 结合蛋白	重组 人类huDLL3	重组 人类 huCD3 $\epsilon\gamma$
DLL3#1/ CD3#1	52 pM	2 nM
DLL3#2/ CD3#1	91 pM	3 nM
DLL3#3/ CD3#1	75 pM	2 nM
DLL3#3/ CD3#2	120 pM	7 nM
DLL3#3/ CD3#3	116 pM	4 nM
DLL3#4/ CD3#1	< 20 pM	2 nM
DLL3#5/ CD3#1	< 20 pM	3 nM
DLL3#6/ CD3#1	152 pM	2 nM
DLL3#7/ CD3#1	637 pM	1 nM
DLL3#8/ CD3#1	40 pM	2 nM
DLL3#9/ CD3#1	46 pM	2 nM
DLL3#10/ CD3#1	141 pM	na
DLL3#11/ CD3#1	37 pM	2 nM

[0632]

[0633]

DLL3/CD3 结合蛋白	重组 人类huDLL3	重组 人类 huCD3 $\epsilon\gamma$
CD3#1		
DLL3#12/ CD3#1	< 20 pM	2 nM
DLL3#13/ CD3#1	23 pM	3 nM
DLL3#14/ CD3#1	60 pM	3 nM
DLL3#15/ CD3#1	na	na
DLL3#16/ CD3#1	228 pM	2 nM
DLL3#17/ CD3#1	< 20pM	2 nM
DLL3#18/ CD3#1	< 20 pM	3 nM

[0634] 实施例5:在细胞表面上产生表达胞外域及其子域的HEK293细胞

[0635] 为产生分别表达全长人类DLL3(Uniprot:Q9NYJ7)、猕猴DLL3(UPI0003AB95BD)、人类DLL1(Q00548)及人类DLL4(Q9NR61)的稳定HEK293细胞,将各别编码序列克隆于pcDNA3.1()中且将FLAG卷标插入在信号序列与胞外域之间。通过使用抗FLAG抗体(纯系M2,Sigma)继之以单克隆抗小鼠IgG1(Acris)检验在细胞表面上的表达。

[0636] DLL3的胞外域由不同子域组成:

[0637] • Hu DLL3信号肽:aa 1-26

[0638] • Hu DLL3N端ECD域:aa 27-175

[0639] • Hu DLL3DSL:aa 176-215

[0640] • Hu DLL3EGF1:aa 216-249

[0641] • Hu DLL3EGF2:aa 274-310

[0642] • Hu DLL3EGF3:aa 312-351

[0643] • Hu DLL3EGF4:aa 353-389

[0644] • Hu DLL3EGF5:aa 391-427

[0645] • Hu DLL3EGF6:aa 429-465

[0646] • 近膜肽:aa 466-492

[0647] DLL3的以下子域表达在HEK293细胞的细胞表面上:

[0648] • Hu DLL3EGF1+2:Uniprot:Q9NYJ7aa 216-310

[0649] • Hu DLL3EGF 2+3:Uniniprot:Q9NYJ7aa 274-351

[0650] • Hu DLL3EGF3+4:Uniprot:Q9NYJ7aa 312-389

[0651] • Hu DLL3EGF4+5:Uniprot:Q9NYJ7aa 353-427

[0652] • Hu DLL3EGF5+6:Uniprot:Q9NYJ7aa 391-465

[0653] • Hu DLL3EGF6+近膜肽:Uniprot:Q9NYJ7aa 429-492

[0654] 为产生表达人类DLL3的6-His-myc标记的子域的HEK293细胞,将各别编码序列克隆于pcDNA 3.1(Thermo Fisher Scientific)中。构建体含有N端小鼠IgG V_k前导序列,继之以6-Histidin-myc标签及各别人类DLL3结构域。为确保人类DLL3域的细胞表面定位,所有构建体继之以Ser/Gly-接头、人类EpCAM(P16422)的跨膜域(aa266-288)及胞内域(aa289-314)。使用对各种结构域的小鼠单克隆IgG2a抗体检验子域表达,如W0 2013126746所描述。用山羊抗小鼠IgG(F(ab')₂)-RPE(Jackson Immuno Research)检测结合的单克隆抗体。样本通过流式细胞测量术测量。人类DLL1及DLL4的表达为通过FACS分析使用抗DLL1(R&D Systems,MAB1818)及抗DLL4R&D系统MAB1506)抗体继之以经PE标记的抗小鼠或抗大鼠二级抗体证实(参见图5,右图)。

[0655] 表3:在HEK293细胞上表达的各种DLL3子域的序列

[0656]

ID	构建体	序列
SEQ ID NO:110	FLAG 标 记的人类 DLL3全长	MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPDYKDDDDKAGVFEL QIHSFGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEEA ESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFR DAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLA AGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCR PRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCE QPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSATTGCLVP GPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSG VTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEK RVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHD LDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGRDCRER ADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFP VHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPALGLLVAAGVA GAALLLVHVRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALN NLRTQEGSGDGPSSSDWNRPEDVDPQGIYVISAPSIYARE VATPLFPPLHTGRAGQRQHLLFPYPSSILSVK
SEQ ID NO:111	FLAG 标 记的食蟹 猴DLL3 全长	MVSPRMSRLLSQTVILALIFIPQARPDYKDDDDKAGVFEL QIHSFGPGPGAPRSPCSARGPCRLFFRVCLKPGLSEEA ESPCALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLLQVPFR DAWPGTFSLIETWREELGDQIGGPAWSLLARVTRRRRLA AGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCELPAVGTACTRLCR PRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPPVCRAGCSLEHGFCE QPGECRCLEGWTGPLCMVPVSTSSCLGLRGPSSTTTGCLV GPGPCDGNPCANGGSCSETPGSFECTCPRGFYGLRCEVS

[0657]

ID	构建体	序列
		GVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCE KRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEH DLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRNCRE RADPCAAARCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEF PVHPDGVSAALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVA GAALLLVHVRRRGHAQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALN NLRTQEGPGDVPSSSVDWNRPEDVDSRGIYVISAPSIYARE VAMPLFPPLHTGRAGQRQNLLFPFPSSILSVK
SEQ ID NO:112	FLAG 标 记的人类 DLL1全长	MGSRCALALAVLSALLCDYKDDDDKQVWSSGVFELKLQ EFVNKKGLLGNRNCCRGAGPPPCACRTFFRVCLKHYQA SVSPEPPCTYGSVTPVLGVDSFSLPDGGGADSAFSNPIRF PFGFTWPGTFSLIIEALHTDSPDDLATENPERLISRLATQRH LTVGEEWSQDLHSSGRTDLKYSYRFVCDEHYGEGCSVF CRPRDDAFGHFTCGERGEKVCNPGWKGPYCTEPICLPGC DEQHGFCDKPGECKCRVGWQGRYCDECIRYPGCLHGTC QQPWQCNCQEGWGGLFCNQDLNYCTHHKPKNGATCT NTGQGSYTCSCRPGYTGTATCELGIDECDPSPCKNGGSCTD LENSYSCTCPPGFYGKICELSAMTCADGPCFNGGRCSDSP DGGYSCRCPVGYSGFNCEKKIDYCSSSPCSNGAKCVDLG DAYLCRCQAGFSGRHCDDNVDDCASSPCANGGTCRDGV NDFSCTCPPGYTGRNCSAPVSRCEHAPCHNGATCHERGH RYVCECARGYGGPNCQFLLPELPPGPAVVDLTEKLEGQG GPFPPWVAVCAGVILVLMLLGCAAVVVCVRLRLQKHRPP ADPCRGETETMNNLANCQREKDISVSIIGATQIKNTNKA DFHGDHSADKNGFKARYPAVDYNLVQDLKGDDTAVRDA HSKRDTKCQPQGSSEEGKGTPTTLRGGEASERKRPDSGCS TSKDTKYQSVYVISEEKDECVIATEV
SEQ ID NO:113	FLAG 标 记的人类 DLL4全长	MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGDYKDDDDKSGV FQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVV SPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFT WPGTFSLIIEAWHAPGDDLPEALPPDALISKIAIQGSLAV GQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYGDNCSRLCKK RNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQ NGYCSKPAECLCRPGWQGRCLNECIPHNGCRHGTCSTPW QCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRS YTCTCRPGYTGVDCLELSECDNSNPCRNNGGSCKDQEDGY HCLCPPGYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGAN YACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSR MCRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCAHHGGTCHDLENGL MCTCPAGFSGRRCERTSIDACASSPCFNATCYTDLSTD TFVCNCPYGFVGSRCFVGLPPSPFWAVSLGVGLAVLL VLLGMVAVAVRQLRLRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIP AAQLKNTNQKKELEVDCGLDKSNCGKQQNHTLDYNLAP GPLGRGTMPGKFPKSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICS PRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV
SEQ ID NO:114	FLAG标签	DYKDDDDK
SEQ ID NO:115	Vk 前导序 列	METDTLLLWVLLLWVPGSTGD
SEQ ID	6His-myc	HHHHHHEQKLISEEDL

[0658]

ID	构建体	序列
NO:116	标签	
SEQ ID NO:117	Ser/Gly 接头	SGGGGS
SEQ ID NO:118	EpCAM 跨膜域	AGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVI
SEQ ID NO:119	EpCAM 胞内域	SRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA
SEQ ID NO:120	EGF1	APLVCRAAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCT
SEQ ID NO:121	Hu DLL3 EGF 1+2	APLVCRAAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTS SCLSPRGPSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSF ECTCPRGFYGLRCE
SEQ ID NO:122	EGF2	GPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCE
SEQ ID NO:123	Hu DLL3 EGF 2+3	GPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSG VTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCE
SEQ ID NO:124	EGF3	SGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNC E
SEQ ID NO:125	Hu DLL3 EGF 3+4	SGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNC EKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCE
SEQ ID NO:126	EGF4	RVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCE
SEQ ID NO:127	Hu DLL3 EGF 4+5	RVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHD LDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGRDCR
SEQ ID NO:128	EGF5	DLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGRDCR
SEQ ID NO:129	Hu DLL3 EGF 5+6	DDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGRDCRERA DPCAARPCAHHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCE
SEQ ID NO:130	EGF6	RADPCAARPCAHHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCE
SEQ ID NO:131	Hu DLL3 EGF6- 近膜肽	RADPCAARPCAHHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEF PVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL
SEQ ID NO:132	近膜肽	FPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL

[0659] 实施例6: DLL3/CD3结合蛋白的表位结构域定位

[0660] 通过DLL3/CD3结合蛋白与表达DLL3子域的重组细胞株测定表位结构域(参见图2)。这些细胞株的产生在实施例5下描述。

[0661] 通过用携带链编码基因的pTT5载体瞬时转染CHO-E细胞制备DLL3/CD3结合蛋白,如实施例2中所描述。

[0662] 用经两步骤纯化的DLL3/CD3结合蛋白在FACS缓冲液(PBS/0.5%BSA/0.05%叠氮化钠)中的1.6nM下染色表达DLL3子域的细胞。用PE结合的抗人类二次抗体(Sigma-Aldrich, #P8047)检测结合分子。作为阴性对照,仅使细胞与二次抗体一起培育。样本通过流式细胞测量术测量。图3A-C展示与DLL3的不同区结合的例示性结合子(包含以下的DLL3/CD3结合蛋白:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、

SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链,及包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的DLL3结合蛋白)。表位结构域的序列在实施例5,表3中列举。

[0663] 实施例7:种间交叉反应

[0664] 种间交叉反应为通过DLL3/CD3结合蛋白与NCI-H82 (HTB-175TM)及SHP77 (ATCC®,CRL-2195TM)细胞、两种SCLC细胞株,以及与表达猕猴DLL3的重组细胞株(描述于实施例5中的细胞株产生)的结合测定。

[0665] 通过用携带链编码基因的pTT5载体瞬时转染CHO-E细胞制备DLL3/CD3结合蛋白,如实施例2中所描述。用1.6nM经两步骤纯化的DLL3/CD3结合蛋白在FACS缓冲液(PBS/0.5% BSA/0.05%叠氮化钠)中染色表达人类或猕猴DLL3的细胞。用PE结合的抗人类二次抗体(Sigma-Aldrich,#P8047)检测结合分子。作为阴性对照,仅使细胞与二次抗体一起培育。样本通过流式细胞测量术测量。图4展示与具有七种例示性DLL3/CD3结合蛋白(包含以下的DLL3/CD3结合蛋白:SEQ ID NO:73的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链、SEQ ID NO:74的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链、SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链、SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链、SEQ ID NO:76的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链、SEQ ID NO:77的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链或SEQ ID NO:78的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链)的人类及食蟹猕猴DLL3表达细胞的结合。

[0666] 实施例8:确认不存在与人类DLL1及DLL4的结合

[0667] 通过DLL3/CD3结合蛋白与表达人类DLL1或DLL4的重组细胞(描述于实施例5中的细胞株产生)的结合测定不存在与人类DLL1及DLL4的交叉反应。

[0668] 通过用携带链编码基因的pTT5载体瞬时转染CHO-E细胞制备DLL3/CD3结合蛋白,如实施例2中所描述。

[0669] 用1.6nM经两步骤纯化的DLL3/CD3结合蛋白以在FACS缓冲液(PBS/0.5% BSA/0.05%叠氮化钠)中增加的浓度染色表达DLL1及DLL4的细胞。用PE结合的抗人类二次抗体(Sigma-Aldrich,#P8047)检测结合分子。作为阴性对照,仅使细胞与二次抗体一起培育。样本通过流式细胞测量术测量。人类DLL1及DLL4的表达为通过FACS分析使用抗DLL1(R&D Systems,MAB1818)及抗DLL4R&D Systems,MAB1506)抗体继之以经PE标记的抗小鼠或抗大鼠二级抗体证实。图5展示七种例示性DLL3/CD3结合蛋白(包含以下的DLL3/CD3结合蛋白:SEQ ID NO:73的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链、SEQ ID NO:74的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链、SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链、SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链、SEQ ID NO:76的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链、SEQ ID NO:77的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链或SEQ ID NO:78的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链)与人类DLL1及DLL4表达细胞的结合。

[0670] 实施例9:DLL3/CD3结合蛋白与SCLC细胞株及T细胞的结合

[0671] 通过NCI-H82 (HTB-175TM)及SHP77 (ATCC®,CRL-2195TM)的流式细胞计数测试DLL3/CD3结合蛋白与人类SCLC细胞株的结合。制备DLL3/CD3结合蛋白,如实施例2中所描述。

[0672] 通过Ficoll密度梯度离心,自富集淋巴球的制剂(白血球层)(收集输注用血液的血库的副产物)制备人类周边血液单核细胞(PBMC)。在根据赫尔辛基宣言获得知情同意书

之后且在奥地利的cantonal道德委员会批准下获得所有白血球层且在收集同一天制备PBMC。因此,通过Ficoll密度梯度离心(35min,在1400rpm下无减速)分离单核细胞且用PBS大量洗涤。剩余红血球通过在ACK溶解缓冲液(Thermo Fisher Scientific,A1049201)中培育3分钟移除,之后在PBS中洗涤,然后悬浮于含有RPMI 1640GlutaMAX(Gibco#61870-010)、5%人类AB血清AB(Gemini,GemCell cat#100-512LOT#H56500I)+1%MEM-NEAA(Gibco#11140-035)、10mM HEPES(Affymetrix#7365-49-9)、10 μ M β -巯基乙醇(Gibco#21985-023)及丙酮酸钠(Gibco#11360-039)的分析培养基中。

[0673] 使用盘式T细胞分离试剂盒II(Miltenyi Biotec#130-091-156)通过阴性选择分离T细胞。简言之,将细胞再悬浮于40 μ l缓冲液PBS/0.5%BSA(Gibco ref#041-94553M)/2mM EDTA(Invitrogen ref#15575-038)/10个Mio细胞且与每10个Mio细胞10 μ l生物素-抗体混合物一起在4℃下培育5min。接着,添加30 μ l缓冲液及20 μ l抗生物素MicroBeds/1千万个细胞且在4℃下培育10min。接着,在适合MACS分离器(Miltenyi Biotec)的磁场中将混合物置放于预冲洗的25LS管柱(Miltenyi Biotec#130-042-401)中。收集流过物且在分析培养基中洗涤。

[0674] 用增加浓度的经两步骤纯化的DLL3/CD3结合蛋白以在FACS缓冲液(PBS/0.5%BSA/0.05%叠氮化钠)中增加的浓度染色细胞(T细胞或人类SCLC细胞)。用PE结合的抗人类二次抗体(Sigma-Aldrich,#P8047)检测结合分子。相比于靶向近膜肽(DLL3#1、DLL3#2、DLL3#3)的DLL3/CD3结合蛋白,靶向DSL(DLL3#6)、EGF1(DLL3#5)或EGF4(DLL#4)结构域的DLL3/CD3结合蛋白展示与表达DLL3的SCLC细胞株更强的结合。对不同表位结构域的例示性DLL3/CD3结合蛋白(包含以下的DLL3/CD3结合蛋白:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链;包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的DLL3结合蛋白)与SHP77、NCI-H82细胞及T细胞的结合展示于图6A-V中。

[0675] 实施例10A:重导向非受激PBMC对人类SCLC细胞株的效能

[0676] 非受激PBMC对SCLC细胞株的效能为使用乳酸脱氢酶(LDH)释放作为细胞溶解的读数来测定。在此分析中,使DLL3阳性SCLC细胞株、SHP77及NCI-H82与作为效应细胞的人类PBMC及增加浓度的DLL3/CD3结合蛋白以10:1的效应:靶细胞比率共同培养72小时。通过用携带链编码基因的pTT5载体瞬时转染CHO-E细胞来制备DLL3/CD3结合蛋白(包含以下的DLL3/CD3结合蛋白:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链,以及包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的DLL3结合蛋白),如实施例2中所描述。

[0677] 通过Ficoll密度梯度离心,自富集淋巴球的制剂(白血球层)(收集输注用血液的血库的副产物)制备人类周边血液单核细胞(PBMC)。在根据赫尔辛基宣言获得知情同意书之后且在奥地利的cantonal道德委员会批准下获得所有白血球层且在收集同一天制备PBMC。因此,通过Ficoll密度梯度离心(35min,在1400rpm下无减速)分离单核细胞且用PBS大量洗涤。剩余红血球通过在ACK溶解缓冲液(Thermo Fisher Scientific,A1049201)中培育3分钟移除,之后在PBS中洗涤,然后悬浮于含有RPMI 1640GlutaMAX(Gibco#61870-010)、

5% 人类AB血清AB (Gemini, GemCell cat#100-512LOT#H56500I) +1% MEM-NEAA (Gibco#11140-035)、10mM HEPES (Affymetrix#7365-49-9)、10μMβ-巯基乙醇 (Gibco#21985-023) 及丙酮酸钠 (Gibco#11360-039) 的分析培养基中。

[0678] 接着,使靶细胞、SHP77及NCI-H82,以及PBMC以1:10的比率与DLL3/CD3结合蛋白在0.0001nM至100nM的浓度下一起培育72小时。

[0679] 使用细胞毒性检测试剂盒^{PLUS} (Roche),根据制造商的说明书测定细胞毒活性。简言之,此方法为基于利用自死亡或质膜损伤细胞释放LDH。使细胞培养上清液与来自试剂盒的反应混合物一起培育30分钟且在分光亮度计中在500nm下测量作为细胞溶解的替代的因LDH活性而引起的甲臞形成。根据下式计算相对于最大溶解对照细胞毒性的百分比:

$$[0680] \quad \text{细胞毒性(相对于对照)} = \frac{\text{测量值}-\text{背景}}{\text{最大溶解}-\text{最小溶解}}$$

[0681] 背景:靶细胞+效应细胞

[0682] 最大溶解:靶细胞+5% Triton X-100

[0683] 最小溶解:靶细胞

[0684] 使用GraphPad Prism 5软件,针对相应DLL3/CD3结合蛋白浓度绘制细胞毒性相对于最大溶解对照的百分比。用四参数对数公式模型分析剂量反应曲线,以评估S形剂量-反应曲线且计算EC₉₀值 (EC₉₀值展示于表4A中)。

[0685] 图7A展示与不同表位结构域结合的七种例示性DLL3/CD3结合蛋白(包含以下的DLL3/CD3结合蛋白:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:78的DLL3链,及SEQ ID NO:79的CD3链,以及包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的DLL3结合蛋白)的细胞溶解的效能实施例。

[0686] 表4A:如在非受激PBMC作为效应细胞及SCLC细胞株、NCI-H82及SHP77作为靶细胞的72小时细胞毒性分析中所测量的DLL3/CD3结合蛋白的EC₉₀值[nM]。

[0687]

DLL3/CD3结合蛋白	NCI-H82	SHP77
DLL3#1/CD3#1	1.7	1.4
DLL3#2/CD3#1	2.9	3.4
DLL3#3/CD3#1	0.9	1.5
DLL3#3/CD3#2	3.9	16.5
DLL3#4/CD3#1	在100nM下无饱和	在100nM下无饱和
DLL3#5/CD3#1	在100nM下无饱和	在100nM下无饱和
DLL3#6/CD3#1	在100nM下无饱和	在100nM下无饱和

[0688] 实施例10B:重导向非受激T细胞对人类SCLC细胞株的效能

[0689] 如实施例9中所描述分离T细胞。随后纯化的T细胞在细胞毒性分析中用作效应细胞,其中SHP77及NCI-H82细胞作为靶细胞,如实施例10A中所描述。剂量反应曲线展示于图7B-H(SHP77细胞)及图7I-O(NCI-H82细胞)中。计算的EC90值展示于表4B中。

[0690] 图7B-0展示19种例示性DLL3/CD3结合蛋白(包含以下的DLL3/CD3结合蛋白:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:

246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251、SEQ ID NO:252的DLL3链)的细胞溶解效能的实施例。

[0691] 表4B:如在利用经纯化T细胞作为效应细胞且SCLC及NCI-H82细胞株作为靶细胞的72小时细胞毒性分析中所测量的DLL3/CD3结合蛋白的 EC_{50} 值[nM]

[0692]	DLL3/CD3结合蛋白	NCI-H82	SHP77
	DLL3#1/CD3#1	0.66	0.15
	DLL3#2/CD3#1	1.51	0.16
	DLL3#3/CD3#1	0.27	0.02
	DLL3#3/CD3#2	2.50	3.00
	DLL3#4/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#5/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#6/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#7/CD3#1	21.84	8.37
	DLL3#8/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#9/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#10/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#11/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#12/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#13/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#14/CD3#1	无活性	无活性
[0693]	DLL3/CD3结合蛋白	NCI-H82	SHP77
	DLL3#15/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#16/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#17/CD3#1	无活性	无活性
	DLL3#18/CD3#1	无活性	无活性

[0694] 实施例11:活体外内化分析

[0695] 测量在与作为靶细胞的DLL3阳性SHP77细胞一起预培育之后DLL3/CD3结合蛋白的效能变化。若DLL3/CD3结合蛋白内化,则有效浓度应因此减少且因此表观效能应减少。

[0696] 制备DLL3/CD3结合蛋白,如实施例2中所描述。人类周边血液单核细胞(PBMC)如实施例10中所描述制备。

[0697] 接种SHP77靶细胞且使其与DLL3/CD3结合蛋白以0.0001至100nM的浓度一起培育2及4小时,之后添加非受激PBMC持续48小时。效应细胞与靶细胞的比率为10:1。如实施例10中所描述,使用细胞毒性检测试剂盒^{PLUS}(Roche)测定细胞毒活性。

[0698] 图8展示两种例示性DLL3/CD3结合蛋白(包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链的DLL3/CD3结合蛋白,及包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的DLL3/CD3结合蛋白)的溶解细胞效能及功效无差异。相比于未预培育的样本(0h)已观测到效能及功效。结果表明,用DLL3/CD3结合蛋白未出现显著内化。

[0699] 实施例12:小鼠PK研究

[0700] 在单次1mg/kg静脉内给药之后评估C57BL/6小鼠中DLL3/CD3结合蛋白的PK。使用DLL3捕获/CD3检测分析测定DLL3/CD3结合蛋白的血清浓度。

[0701] 简言之,雄性C57BL/6小鼠接受单次1mg/kg静脉内(IV)给药(n=3/分子)。在给药

前及给药后0.15、2、8、24、72、96、168、240及336小时收集血液样本。利用基于MSD的配位体结合分析,使用生物素标记的DLL3作为捕捉试剂及磺胺基标记的CD3作为检测试剂测量血清药物含量。根据血清浓度时间-特征曲线,使用非房室模型分析计算药物动力学(PK)参数。评估以下PK参数:AUC_{tlast}(自时间零至最后可定量时间点血清浓度-时间曲线下面积)、AUC_{inf}(外推至无穷的血清浓度-时间曲线下面积)、CL(全身清除率)、V_{ss}(稳态分布体积)及t_{1/2}(终半衰期)。

[0702] 例示性DLL3/CD3结合蛋白(包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链的DLL3/CD3结合蛋白,及包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的DLL3/CD3结合蛋白)的平均(SD)血清浓度时间-特征曲线概述于图9中。这些例示性DLL3/CD3结合蛋白的平均(SD)PK参数概述于表5中。

[0703] 表5:在单次1mg/kg静脉内给药之后在雄性C57BL/6小鼠中例示性DLL3/CD3结合蛋白的平均(SD)PK参数

[0704]	DLL3/CD3 结合蛋白	AUC _{0-last} (μg*d/mL)	AUC _{0-inf} (μg*d/mL)	CL (mL/天/kg)	V _{ss} (mL/kg)	t _{1/2} (天)
	DLL3#3/CD3#1	1180 (127)	1760 (179)	13.7 (1.48)	178 (57.7)	10.6 (4.67)
	DLL3#3/CD3#2	1260 (170)	1440 (154)	16.8 (1.74)	109 (19.5)	4.97 (0.78)

[0705] 实施例13:活体内异种移植功效研究

[0706] 使用用人类T细胞重组的人类异种移植小鼠模型进行功效研究。详言之,将人类SHP77小细胞肺癌细胞(2×10⁷)皮下注射(s.c.)于经亚致死辐射(2Gy,第1天)的雌性NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/JicTac小鼠的右背侧(第1天)中。同时,在活体外扩增人类CD3阳性T细胞(自健康人类血液供体分离)。

[0707] 人类周边血液单核细胞(PBMC)如实施例10中所描述制备。

[0708] 使用盘式T细胞分离试剂盒II(Miltenyi Biotec#130-091-156)通过阴性选择分离T细胞。简言之,将细胞再悬浮于40μl缓冲液PBS/0.5%BSA(gibco ref#041-94553M)/2mM EDTA(Invitrogen ref#15575-038)/10个Mio细胞且与每10个Mio细胞10μl生物素-抗体混合物一起在4℃下培育5min。接着,添加30μl缓冲液及20μl抗生物素MicroBeds/1千万个细胞且在4℃下培育10min。接着,在适合MACS分离器(Miltenyi Biotec)的磁场中将混合物置放于预冲洗的25LS管柱(Miltenyi Biotec#130-042-401)中。收集流过物且在分析培养基中洗涤。

[0709] 随后,使用T细胞活化/扩增试剂盒人类(Miltenyi Biotec Cat#130-091-441, Lot#5170720843)将T细胞扩增20天。简言之,抗生物素MACSiBeadTM粒子经装载有CD2生物素、CD3生物素、CD28生物素且以每个粒子2个细胞的比率转移至经纯化的T细胞且在20个单位重组IL-2(R&D#202-IL-050/CF)存在下以0.5-110⁶个细胞/毫升的密度培育20天。细胞每三天补充20个单位新鲜IL-2。在注射于动物中三天之前,用装载有CD2生物素、CD3生物素、CD28生物素的抗生物素MACSiBeadTM粒子以每4个细胞1个珠粒的比率再刺激T细胞额外三天。最后,用MACSiMAG分离器(Miltenyi Biotec)移除珠粒且在PBMC中洗涤T细胞。

[0710] 在第14天,基于肿瘤体积将动物随机分为治疗组且腹膜内(i.p.)注射2×10⁷个人类T细胞。在第17天开始治疗且在q7d给药方案中通过静脉内(i.v)快速注射将DLL3/CD3结合蛋白(包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链的DLL3/CD3结合蛋白,及包含

SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的DLL3/CD3结合蛋白)或媒剂缓冲液(50mM NaOAc,100mM NaCl,pH 5.0)给予外侧尾部静脉中。通过外部测径规测量监测肿瘤生长且使用标准半椭圆公式计算肿瘤体积。在研究结束时,通过对人类CD3免疫组织化学(IHC)染色在脾中评估人类T细胞植入。仅将在研究结束时展示人类T细胞植入的那些动物包括于统计分析中。在研究期间早期出于道德原因对达到处死准则的动物安乐死。用DLL3/CD3结合蛋白以0.25mg/kg每周一次静脉内治疗携带肿瘤的小鼠诱导显著的肿瘤消退(图10)。

[0711] 实施例14: DLL3/CD3结合蛋白的单体含量百分比

[0712] 通过分析型尺寸排阻色谱(aSEC)测定例示性DLL3/CD3结合蛋白(包含以下的DLL3/CD3结合蛋白:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链;包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的DLL3结合蛋白;及包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:105的CD3链的DLL3结合蛋白)的单体百分比(示于表6中)。在Waters (Milford, MA, USA) Acquity UPLC系统上使用蛋白质BEH SEC管柱200 Å, 1.7µm, 4.6×150mm(目录号186005225)进行aSEC。操作条件如下:流动相:50mM磷酸钠,200mM精氨酸及0.05%叠氮化钠;流动速率:0.5ml/min;运行时间:5分钟;样本负载量:10µg;峰值检测:A280nm;色谱图的自动化处理方法。

[0713] 表6:第一及第二纯化步骤之后的单体百分比

[0714]	DLL3/CD3结合蛋白	在第1纯化步骤之后的单体百分比	在第2纯化步骤之后的单体百分比
	DLL3#1/CD3#1	76.4	99.4
	DLL3#2/CD3#1	54.4	98.0
	DLL3#3/CD3#1	69.5	99.8
	DLL3#3/CD3#2	77.6	99.5
[0715]	DLL3#3/CD3#3	70.8	98.3
	DLL3#4/CD3#1	72.2	99.1
	DLL3#5/CD3#1	70.5	99.1
	DLL3#6/CD3#1	55.2	99.9
	DLL3#7/CD3#1	78.1	99.0
	DLL3#8/CD3#1	54.8	99.5
	DLL3#9/CD3#1	72.0	99.0
	DLL3#10/CD3#1	70.2	98.3
	DLL3#11/CD3#1	68.2	94.7
	DLL3#12/CD3#1	66.2	98.7
	DLL3#13/CD3#1	52.8	99.9
	DLL3#14/CD3#1	52.6	87.0
	DLL3#15/CD3#1	61.5	na
	DLL3#16/CD3#1	71.8	99.5
	DLL3#17/CD3#1	60.2	94.7
	DLL3#18/CD3#1	61.5	98.2

[0716] 实施例15A:热稳定性

[0717] 通过差示扫描热测量定 (DSC) 测定热稳定性且DLL3/CD3结合蛋白的第一熔化转变 (Tm1) 结果展示于表7中。DSC热熔融提供关于溶液中的蛋白质相对于缓冲液对照的热稳定性的信息。经由自动化毛细管DSC在60℃/小时的扫描速率下监测自20℃至110℃, 1mg/ml蛋白质于20mM柠檬酸盐, 115mM NaCl, pH 6的溶液的热去折叠及聚集。

[0718] 表7A

DLL3/CD3结合蛋白	Tm1
DLL3#3/CD3#1	64
DLL3#3/CD3#2	60
DLL3#3/CD3#3	63
DLL3#4/CD3#1	63

[0720] 实施例15B: 热稳定性

[0721] 通过热转变分析 (TSA) 测定热稳定性且DLL3/CD3结合蛋白 (包含以下的DLL3/CD3结合蛋白: SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链; 包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的DLL3结合蛋白; 及包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:105的CD3链的DLL3结合蛋白) 的第一熔化转变 (Tm1) 的结果展示于表7B中。使用QuantStudio 6Flex实时PCR系统 (Applied Biosystems, Waltham, MA), 利用SYPRO Orange (Invitrogen, Carlsbad, CA) 作为外源性荧光团采集随温度而变的荧光强度特征曲线。用40mM氯化钠及0.02%叠氮化钠将样本在10mM组氨酸, pH 6.0中稀释至0.4mg/ml。以2℃/min的速率用25℃至95℃的热斜变生成熔融曲线, 经由‘ROX’过滤器组 (Ex: 580±10nm, Em: 623±14nm) 大约每0.4℃收集资料。使用蛋白质热转变软件版本1.3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 分析资料。

[0722] 表7B

DLL3/CD3结合蛋白	Tm1 (°C)
DLL3#1/CD3#1	65.6
DLL3#2/CD3#1	65.5
DLL3#3/CD3#1	65.6
DLL3#3/CD3#2	63.0
DLL3#3/CD3#3	65.5
DLL3#4/CD3#1	65.8
DLL3#5/CD3#1	65.6
DLL3#6/CD3#1	65.8
DLL3#7/CD3#1	65.6
DLL3#8/CD3#1	65.8
DLL3#9/CD3#1	65.9
DLL3#10/CD3#1	64.6

DLL3#11/CD3#1	66.0
DLL3#12/CD3#1	65.9
DLL3#13/CD3#1	65.8
DLL3#14/CD3#1	65.9
DLL3#1 5/CD3#1	na
DLL3#16/CD3#1	65.8
DLL3#17/CD3#1	65.8
DLL3#1 8/CD3#1	65.8

[0724] 实施例16:通过Epivax电子杂交预测的免疫原性评分

[0725] 用数学算法电子杂交评估序列免疫原性。具体而言,测定DLL3/CD3结合蛋白(包含以下的DLL3/CD3结合蛋白:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链;包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的DLL3结合蛋白;及包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:105的CD3链的DLL3结合蛋白)作为免疫原性评分的测量的经EpiMatrix Treg调节的评分且使其与各种Fc序列的评分比较。这些评分将T细胞表位及Treg表位纳入考虑。免疫原性评分愈低,序列愈不可能具有免疫原性。一般而言,负评分视为免疫原性风险低,而高正评分视为可能的免疫原性的指示。如下表中所示,本文所描述的DLL3/CD3结合蛋白具有极低的免疫原性评分,表明这些结合蛋白具有免疫原性的风险较低。

[0726] 表8:DLL3/CD3结合蛋白的经调节Epivax评分

[0727]

DLL3/CD3结合蛋白	VH	VL	完整多肽链(VL-CL-接头 -VH-CH1- 铰链 -CH2-CH3)
DLL3#1 DLL3链	-36.88	-59.85	-43.31
DLL3#2 DLL3链	-46.99	31.40	-33.53
DLL3#3 DLL3链	-34.44	2.84	-35.50
DLL3#4 DLL3链	25.97	28.92	-21.93
DLL3#5 DLL3链	-59.87	-46.45	-44.95
DLL3#6 DLL3链	29.70	-14.55	-27.26
CD3#1 CD3链	-9.68	-50.52	-35.25
CD3#2 CD3链	-15.54	-50.52	-36.23
CD3#3 CD3链	-13.49	-50.52	-35.88
DLL3#7 DLL3链	-48.55	-34.92	-41.60
DLL3#8 DLL3链	-54.39	-37.79	-42.89
DLL3#9 DLL3链	35.95	-60.37	-31.83
DLL3#10 DLL3链	-33.82	-34.60	-40.73
DLL3#11 DLL3链	-24.00	26.66	-30.50
DLL3#12 DLL3链	-30.43	25.68	-31.67
DLL3#13 DLL3链	8.64	18.63	-25.96
DLL3#14 DLL3链	1.58	-10.63	-31.72
DLL3#15 DLL3链	8.93	-8.31	-29.91
DLL3#16 DLL3链	-55.14	13.98	-35.59
DLL3#17 DLL3链	11.89	12.55	-26.52
DLL3#18 DLL3链	5.82	15.85	-27.01

[0728] 表9:Fc域的经调节的EpiVax评分

[0729]

Fc蛋白质链	经调节的EpiVax评分
Fc-IgG1-WT	-25.64
Fc-IgG1-LALA	-29.83
Fc-IgG1-LALA-KNOB	-31.76
Fc-IgG1-LALA-HOLE	-18.01

[0730] 实施例17A:非特异性结合于表面

[0731] 使用高度带电荷蛋白质在基于SPR的分析中进一步测试本发明的DLL3/CD3结合蛋白的特异性。使用生物传感器技术研发非特异性结合分析以测定结合蛋白是否显著结合至不相关带电蛋白质。在此分析中,使DLL3/CD3结合蛋白通过两个SPR表面上方,一个涂布有带负电荷蛋白质(胰蛋白酶抑制剂)且一个涂布有带正电蛋白质(溶菌酶)。当蛋白质显示与这些表面的显著非特异性结合时,结合的原因可能为在候选物上存在带正电荷或带负电荷表面片。蛋白质的非特异性结合可转变为不佳药物动力学(PK)及生物分布,且亦可在下游可制造性上有影响。

[0732] 在Biacore T200上进行实验。在25℃下,在由10×HBS-EP制备的1×HBS-EP缓冲液中执行稀释、表面制备及结合实验。固定方案与结合实验的流动速率皆为5uL/min。

[0733] 为制备用于非特异性结合实验的表面,使用胺偶合试剂盒根据制造说明书将鸡蛋

白溶菌酶及来自大豆 (glycine max/soybean) 的胰蛋白酶抑制剂手动偶合至S系列CM5芯片,其中表面密度为3000-5000RU。

[0734] 在1X HBS-EP缓冲液中以1 μ M制备样本。将样本注射在活化表面上,进行10min缔合及10min解离。使用2.0.1版Biacore T200控制软件收集数据使用3.0版Biacore T200评估软件分析。

[0735] DLL3/CD3结合蛋白不与这些高度带电荷表面结合。表10A展示不存在两种例示性DLL3/CD3结合蛋白与两种高度带电荷蛋白质-胰蛋白酶抑制剂及溶菌酶的结合。

[0736] 表10A:

DLL3/CD3结合蛋白	非特异性结合	
	溶菌酶(正)	胰蛋白酶抑制剂(负)
DLL3#3/CD3#1	无	无
DLL3#3/CD3#2	无	无

[0738] 实施例17B:非特异性结合于表面

[0739] 在基于SPR的分析中,使用高度带电荷的蛋白质进一步测试DLL3/CD3结合蛋白(包含以下的DLL3/CD3结合蛋白:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251或SEQ ID NO:252的DLL3链及SEQ ID NO:79的CD3链;包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:80的CD3链的DLL3结合蛋白;及包含SEQ ID NO:75的DLL3链及SEQ ID NO:105的CD3链的DLL3结合蛋白)的特异性,如实施例17a所描述,进行10min缔合及15min解离。结果展示于表10B中。

[0740] 表10B:低RU数目指示不与不相关带电荷蛋白质显著结合

[0741]

DLL3/CD3结合蛋白	非特异性结合(RU)	
	溶菌酶(正)	胰蛋白酶抑制剂(负)
DLL3#1/CD3#1	4	1
DLL3#2/CD3#1	7	2
DLL3#3/CD3#1	54	85
DLL3#3/CD3#2	44	36
DLL3#3/CD3#3	17	28
DLL3#4/CD3#1	16	37
DLL3#5/CD3#1	4	0
DLL3#6/CD3#1	6	0
DLL3#7/CD3#1	9	3
DLL3#8/CD3#1	39	18
DLL3#9/CD3#1	15	27
DLL3#10/CD3#1	25	12
DLL3#11/CD3#1	11	13
DLL3#12/CD3#1	8	9
DLL3#13/CD3#1	11	3
DLL3#14/CD3#1	18	6
DLL3#15/CD3#1	na	na
DLL3#16/CD3#1	6	0
DLL3#17/CD3#1	15	8
DLL3#18/CD3#1	23	81

[0742] 实施例18:在DLL3阳性及DLL3阴性肿瘤细胞存在下诱导溶解、T细胞活化、T细胞脱粒、T细胞增殖及细胞因子分泌

[0743] 如实施例9中所描述纯化PBMC。为测定T细胞活化、T细胞脱粒及细胞因子分泌,如实施例10B中所描述设置利用PBMC及DLL3阳性SHP77或DLL3阴性RK0-E6细胞作为靶细胞的细胞毒性分析。如实施例10A中所描述测定通过将T细胞重导向人类SHP77或RK0-E6细胞实现的细胞溶解效能。为测定T细胞活化,且对T细胞脱粒细胞离心及用对CD4 (BD#550630)、CD8 (BD#557834)、CD25 (BD#340907)的抗体染色,随后使用固定/渗透溶液 (BD#554714)透化细胞且用对穿孔素 (BioLegend#308120)及颗粒酶B (BD#560221)的抗体染色且通过流动式细胞测量术测量。通过U-PLEX生物标记第1组(hu)分析 (MSD, #K15067L-2, 试剂盒)测定上清液中的细胞因子含量。

[0744] 为测定T细胞的增殖,用5 μ M细胞TraceTMCFSE (Invitrogen, C34554)标记PBMC且用抗CD3抗体 (BioLegend目录号:317336)对T细胞染色。随后,使经标记的PBMC与SHP77或RK0-E6细胞以10:1的比率及增加浓度的DLL3/CD3结合蛋白一起培育6天。

[0745] 图11-15展示在SHP77或R0-E6细胞及DLL3/CD3结合蛋白存在下,对T细胞重导引的SHP77或RK0-E6细胞溶解的诱导(图11)及对剂量依赖型T细胞活化(图12)、T细胞脱粒(图13)、细胞因子分泌(图14A:干扰素 γ ;14B:MCP-1)及T细胞增殖(图15)的诱导。

[0746] 实施例19:将T细胞亚群复位向至SHP77细胞

[0747] 如实施例10a中所描述分离PBMC。随后,使用以下试剂及方案分离T细胞亚群:

[0748] 表11:用于分离T细胞子组的试剂及方案

[0749]

T细胞亚群	所使用试剂及方案
原始T细胞	Miltenyi Biotech;#130-097-095
CD4 ⁺ T细胞	Miltenyi Biotech;#130-096-533
CD4 ⁺ 效应记忆T细胞	Miltenyi Biotech;#130-094-125
CD4 ⁺ 中央记忆T细胞	Miltenyi Biotech;#130-094-302
CD8 ⁺ T细胞	Miltenyi Biotech;#130-096-495
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ 效应T细胞	Miltenyi Biotech;#130-094-485
CD8 ⁺ 记忆T细胞	Miltenyi Biotech;#130-094-412

[0750] 图16-20展示DLL3/CD3结合蛋白对人类SHP77细胞重导向Pan T细胞(图16)、原始T细胞(图16)、CD4⁺T细胞(图17,18)、CD4⁺效应记忆T细胞(图18)、CD4⁺中央记忆T细胞(图17)、CD8⁺T细胞(图19,20)、CD8⁺CD45RA⁺效应T细胞(图19)、CD8⁺记忆T细胞(图20)的效能。

[0751] 实施例20:具有例示性DLL3/CD3结合蛋白的SHP77异种移植肿瘤组织中的T细胞浸润

[0752] 制备在实施例13中所描述的研究中来自小鼠的剩余肿瘤组织,固定在福尔马林中且包埋于石蜡中。随后,制备组织切片且对T细胞上的CD3表达染色(2GV6Ventana)。具有例示性DLL3/CD3结合蛋白的SHP77异种移植肿瘤组织中的T细胞浸润显示于图21中。使用表12中的评分定量异种移植肿瘤组织中的CD3表达。

[0753] 表12:针对浸润性CD3阳性T细胞的定量评分

[0754]

评分	描述
0	在切片平面中无CD3+细胞
1	有稀少的分散细胞或小簇,大多数在基质中
2	有稀少的分散细胞或小簇,在基质及边缘中
3	在基质、上皮及边缘中低细胞数目或簇
4	在基质及边缘中中度细胞数目或簇;低数目上皮内细胞
5	在基质及边缘中高细胞数目或簇;低数目上皮内细胞

[0755] 实施例21:产生抗-DLL3抗体

[0756] 为获得抗-DLL3结合子,在活体外培养来源于经DLL3免疫接种的野生型及AlivaMab人类化小鼠(Ablexis,San Francisco,CA,USA:具有人类免疫球蛋白基因座的AlivaMab基因转殖小鼠平台)的杂交瘤或单B细胞。通过AlphaLISA(PerkinElmer,Waltham,MA,USA)针对对重组人类DLL3的反应性,及通过流式细胞计数针对对表达人类DLL3的SHP-77细胞(ATCC®,CRL-2195TM)筛分上清液。

[0757] 随后自鉴别的阳性纯系扩增免疫球蛋白(Ig) VH及VL基因。为自杂交瘤RNA,将约2×10⁶个来自单一纯系的细胞粒化且用作源材料。对于单一B细胞,将自单独分离的B细胞扩增的100至500个细胞用作源材料。使用RNeasy Plus(Qiagen,Hilden,Germany)分离RNA。随后根据制造商的说明书使用Smarter cDNA合成试剂盒(Clontech,Mountain View,CA)合成cDNA。为促进cDNA合成,使用oligodT引发所有信使RNA的逆转录,之后用Smarter IIA寡核苷酸“5′加帽”。使用靶向Smarter IIA端帽的5′引子及靶向CH1中的共有区的3′引子,使用2步骤PCR扩增进行VH及VL片段之后续扩增。简言之,各50μl PCR反应物由20μM正向及反向引

子混合物、25 μ l PrimeStar Max DNA聚合酶预混合物(Clontech)、2 μ l未纯化的cDNA,及21 μ l双蒸馏H₂O组成。循环程序在94℃下开始持续3min,继之以35个周期(94℃持续30秒,50℃持续1min,68℃持续1min),且在72℃下持续7min结束。用VL及VH第2轮引子进行第二轮PCR,所述引子含有“重叠”其各别pTT5母载体中的各别区域(VH及VL)的15bp互补延伸。用以下程序进行第二轮PCR:94℃持续3min;35个周期(94℃持续30秒,50℃持续1min,68℃持续1min),及在72℃下持续7min结束。

[0758] 使用In-Fusion® HD克隆试剂盒(Clontech, U.S.A.)将VL基因定向克隆于pTT5huIgK载体中且将VH基因定向克隆于pTT5huIgG1K0载体中。为促进In-Fusion® HD克隆,PCR产物在In-Fusion HD克隆之前经纯化且用克隆增强剂处理。根据制造商的方案(Clontech, U.S.A.)进行克隆及转化。使少量制备的DNA进行桑格定序以证实获得完整的V基因片段。

[0759] 使用此方法,制备Ig VH及VL基因对,其编码对DLL3具有特异性的结合域。通过用相应的重链及轻链编码质体瞬时转染CHO-E37细胞制备重组抗体。

[0760] 重组抗体的证实筛选

[0761] 通过流式细胞计数针对与表达人类DLL3的细胞株的结合分析含有所表达重组抗体的上清液。简言之,使细胞与重组上清液一起培育,洗涤,且用抗人类-IgG-APC检测来自上清液的结合mAb(Jackson ImmunoResearch109-136-098)。通过以样本的中值荧光强度(MFI)除以同型对照的中值荧光强度来计算信号/背景比(S/B)。

[0762] 在Biacore 400上对重组上清液进行表面等离子共振(SPR)。简言之,经由蛋白质A/G将HTP上清液中的非优化的IgG捕获于传感器表面上,在10 μ l/min下持续60秒。监测100nM人类DLL3与捕获IgG的结合,在30 μ l/min下缔合180秒,之后在HBS-EP缓冲液中解离120秒。在每个结合循环之间用甘氨酸pH 2.1进行蛋白质A/G表面的再生。将以下材料用于此分析:蛋白质试剂:以重组方式表达的人类DLL3。系统操作缓冲液:HBS-EP(10mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA及0.005% v/v聚山梨醇酯P20)。捕获试剂:蛋白质A/G,对所有人类IgG同型均具有特异性。

[0763] 选择相关纯系(K_d<300pM)且如下所述在各种检测分析中进一步评估。

[0764] 实施例22:抗-DLL3抗体与重组人类DLL3蛋白质的结合

[0765] 在ELISA中进行抗体结合。简言之,在4℃下以2 μ g/ml的浓度涂布抗-DLL3抗体隔夜。在洗涤之后,在室温下用阻断缓冲液(Gibco, Gibco#043-90309A)阻断培养盘一小时,之后洗涤且以增加浓度与重组DLL3蛋白质一起培育。为了检测,使结合DLL3蛋白质与多克隆抗-DLL3抗体(R&D Systems, AB4315)继之以SULFO-TAG标记的抗山羊抗体(R32AG-1)一起培育一小时。在Sector imager 6000(MSD)中通过使用读取缓冲区(MSD)定量结合的抗体。图22展示三种例示性抗-DLL3抗体与重组蛋白的结合。相比于靶向EGF4(DLL3#4)或EGF1结构域(DLL3#5)的抗-DLL3抗体,靶向近膜肽结构域(DLL3#3)的抗-DLL3抗体展示与重组DLL3蛋白质的更强结合。

[0766] 实施例23:抗-DLL3抗体与SCLC细胞株的结合

[0767] 用在FACS缓冲液(PBS/0.5% BSA/0.05%叠氮化钠)中浓度增加的抗-DLL3抗体染色细胞(T细胞或人类SCLC细胞)。通过FACS分析用PE结合的抗小鼠二次抗体(Jackson Immuno Research, 115-116-072)检测结合分子。相比于靶向C端肽(DLL3#1、

DLL3#2、DLL3#3)的抗-DLL3抗体,靶向DSL (DLL3#6)、EGF1 (DLL3#5)或EGF4 (DLL3#4)结构域的抗-DLL3抗体展示与表达DLL3的SCLC细胞株的更强结合,如图23中所示。

[0768] 实施例24: (IHC)

[0769] 根据制造商的说明书,使用Ventana Discovery ultra (Ventana Medical Systems, Inc, Arizona) 以20μg/ml浓度对DLL3mRNA阳性SCLC样本测试抗-DLL3抗体。简言之,对福尔马林固定,石蜡包埋的组织及切片(4μm)进行IHC,其中用抗-DLL3抗体染色。使用RUO Discovery Universal方案在Ventana Discovery Ultra平台上进行IHC分析。使用蛋白酶K作为表位摄取优化抗-DLL3抗体染色12分钟。培育抗-DLL3抗体60分钟,继之以抗小鼠HQ检测系统及抗H0 HRP两种12分钟。对与测试载片相同地处理的各组织切片进行阴性对照(IgG抗体)。

[0770] 人类SCLC细胞株SHP77用作阳性对照。使用Leica SCN400组织学扫描仪 (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK) 采集完整组织切片的数字影像。

[0771] 具有例示性抗-DLL3抗体的人类SCLC样本的免疫组织化学分析显示于图24中。

[0772] 实施例25:测定在SCLC细胞株上的表达量

[0773] 使用QIFIKIT (K0078; Dako) 定量抗-DLL3抗体的细胞表面表达。简言之,用抗-DLL3抗体 (DL309, WO 2011/093097) 或不相关抗体 (同型对照) 以5μg/ml标记SCLC细胞株 (SHP77、NCI-H82及NCI-H2286)。在单独小瓶中。随后,提供于试剂盒中的细胞及珠粒与荧光素结合的抗小鼠二级抗体平行标记。在BD CantoII Fluorocytometer中测量样本且因此,荧光与细胞及珠粒上结合抗-DLL3抗体的数目相关。表12展示在三种SCLC细胞株的细胞表面上表达的DLL3分子。

[0774] 表13:在SCLC细胞株的细胞表面上表达的DLL3分子

[0775]	SCLC细胞株	细胞表面DLL3分子/细胞
	SHP77 (ATCC®, CRL-2195™)	2061
	NCI-H82 (HTB-175™)	824
	NCI-H2286	129

[0776] 实施例26:测定IHC方案对SCLC细胞株块的敏感性

[0777] 为评估IHC方案的敏感性,处理SCLC细胞株 (SHP77、NCI-H82及NCI-H2286) (如医院中的组织) 且固定于福尔马林中且随后包埋于石蜡中。

[0778] 根据ATCC说明书培养SCLC细胞株。自培养板刮擦细胞且固定于福尔马林中且随后添加至溶解的Histogel (Thermo Fisher scientific, HG-4000-012) 中且在4℃下培育隔夜,继之以在常规病变实验室中进行的标准石蜡包埋程序。简言之,在包埋石蜡 (roti-Plast, #6642.5) 中之前在乙醇及异丙醇中培育细胞块。进行细胞小球块的切片且用如实施例24中所描述的方案染色切片。展示于图25中的结果显示,利用抗-DLL3抗体DLL3#5的IHC方案能够检测具有极低DLL3表达的细胞。

[0779] 综上所述,本发明包括但不限于以下技术方案:

[0780] 1、一种蛋白质,其包含与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元及与CD3特异性结合的第二抗原结合单元,其中该与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元选自i)至xviii)组成的群:

[0781] i) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1 (CDR1)、SEQ ID NO:2

(CDR2) 及SEQ ID NO:3 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:4 (CDR1)、SEQ ID NO:5 (CDR2) 及SEQ ID NO:6 (CDR3) 的重链CDR;

[0782] ii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:7 (CDR1)、SEQ ID NO:8 (CDR2) 及SEQ ID NO:9 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:10 (CDR1)、SEQ ID NO:11 (CDR2) 及SEQ ID NO:12 (CDR3) 的重链CDR;

[0783] iii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:13 (CDR1)、SEQ ID NO:14 (CDR2) 及SEQ ID NO:15 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:16 (CDR1)、SEQ ID NO:17 (CDR2) 及SEQ ID NO:18 (CDR3) 的重链CDR;

[0784] iv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:19 (CDR1)、SEQ ID NO:20 (CDR2) 及SEQ ID NO:21 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:22 (CDR1)、SEQ ID NO:23 (CDR2) 及SEQ ID NO:24 (CDR3) 的重链CDR;

[0785] v) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:25 (CDR1)、SEQ ID NO:26 (CDR2) 及SEQ ID NO:27 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:28 (CDR1)、SEQ ID NO:29 (CDR2) 及SEQ ID NO:30 (CDR3) 的重链CDR;

[0786] vi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:31 (CDR1)、SEQ ID NO:32 (CDR2) 及SEQ ID NO:33 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:34 (CDR1)、SEQ ID NO:35 (CDR2) 及SEQ ID NO:36 (CDR3) 的重链CDR;

[0787] vii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:133 (CDR1)、SEQ ID NO:134 (CDR2) 及SEQ ID NO:135 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:136 (CDR1)、SEQ ID NO:137 (CDR2) 及SEQ ID NO:138 (CDR3) 的重链CDR;

[0788] viii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:139 (CDR1)、SEQ ID NO:140 (CDR2) 及SEQ ID NO:141 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:142 (CDR1)、SEQ ID NO:143 (CDR2) 及SEQ ID NO:144 (CDR3) 的重链CDR;

[0789] ix) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:145 (CDR1)、SEQ ID NO:146 (CDR2) 及SEQ ID NO:147 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:148 (CDR1)、SEQ ID NO:149 (CDR2) 及SEQ ID NO:150 (CDR3) 的重链CDR;

[0790] x) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:151 (CDR1)、SEQ ID NO:152 (CDR2) 及SEQ ID NO:153 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:154 (CDR1)、SEQ ID NO:155 (CDR2) 及SEQ ID NO:156 (CDR3) 的重链CDR;

[0791] xi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:157 (CDR1)、SEQ ID NO:158 (CDR2) 及SEQ ID NO:159 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:160 (CDR1)、SEQ ID NO:161 (CDR2) 及SEQ ID NO:162 (CDR3) 的重链CDR;

[0792] xii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:163 (CDR1)、SEQ ID NO:164 (CDR2) 及SEQ ID NO:165 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:166 (CDR1)、SEQ ID NO:167 (CDR2) 及SEQ ID NO:168 (CDR3) 的重链CDR;

[0793] xiii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:169 (CDR1)、SEQ ID NO:170 (CDR2) 及SEQ ID NO:171 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:172 (CDR1)、SEQ ID NO:173 (CDR2) 及SEQ ID NO:174 (CDR3) 的重链CDR;

[0794] xiv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:175 (CDR1)、SEQ ID

NO:176 (CDR2) 及SEQ ID NO:177 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:178 (CDR1)、SEQ ID NO:179 (CDR2) 及SEQ ID NO:180 (CDR3) 的重链CDR;

[0795] xv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:181 (CDR1)、SEQ ID NO:182 (CDR2) 及SEQ ID NO:183 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:184 (CDR1)、SEQ ID NO:185 (CDR2) 及SEQ ID NO:186 (CDR3) 的重链CDR;

[0796] xvi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:187 (CDR1)、SEQ ID NO:188 (CDR2) 及SEQ ID NO:189 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:190 (CDR1)、SEQ ID NO:191 (CDR2) 及SEQ ID NO:192 (CDR3) 的重链CDR;

[0797] xvii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:193 (CDR1)、SEQ ID NO:194 (CDR2) 及SEQ ID NO:195 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:196 (CDR1)、SEQ ID NO:197 (CDR2) 及SEQ ID NO:198 (CDR3) 的重链CDR;以及

[0798] xviii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:199 (CDR1)、SEQ ID NO:200 (CDR2) 及SEQ ID NO:201 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:202 (CDR1)、SEQ ID NO:203 (CDR2) 及SEQ ID NO:204 (CDR3) 的重链CDR。

[0799] 2、如技术方案1的蛋白质,其中该与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元包含第一轻链可变域及第一重链可变域且选自由i)至xviii)组成的群:

[0800] i) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的重链可变域;

[0801] ii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的重链可变域;

[0802] iii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的重链可变域;

[0803] iv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:43的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的重链可变域;

[0804] v) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的重链可变域;

[0805] vi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的重链可变域;

[0806] vii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:205的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:206的重链可变域;

[0807] viii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:207的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:208的重链可变域;

[0808] ix) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:209的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:210的重链可变域;

[0809] x) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:211的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:212的重链可变域;

[0810] xi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:213的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:214的重链可变域;

[0811] xii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:215的轻链可变域及

包含氨基酸序列SEQ ID NO:216的重链可变域;

[0812] xiii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:217的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:218的重链可变域;

[0813] xiv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:219的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:220的重链可变域;

[0814] xv) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:221的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:222的重链可变域;

[0815] xvi) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:223的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:224的重链可变域;

[0816] xvii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:225的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:226的重链可变域;以及

[0817] xviii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:227的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:228的重链可变域。

[0818] 3、如技术方案1或2的蛋白质,其中该与CD3特异性结合的第二抗原结合单元选自由i) -iii) 组成的群:

[0819] i) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:55 (CDR1)、SEQ ID NO:56 (CDR2) 及SEQ ID NO:57 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:58 (CDR1)、SEQ ID NO:59 (CDR2) 及SEQ ID NO:60 (CDR3) 的重链CDR;

[0820] ii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:61 (CDR1)、SEQ ID NO:62 (CDR2) 及SEQ ID NO:63 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:64 (CDR1)、SEQ ID NO:65 (CDR2) 及SEQ ID NO:66 (CDR3) 的重链CDR;以及

[0821] iii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:96 (CDR1)、SEQ ID NO:97 (CDR2) 及SEQ ID NO:98 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:99 (CDR1)、SEQ ID NO:100 (CDR2) 及SEQ ID NO:101 (CDR3) 的重链CDR。

[0822] 4、如技术方案1至3中任一项的蛋白质,其中该与CD3特异性结合的第二抗原结合单元包含第二轻链可变域及第二重链可变域,该第二轻链可变域及第二重链可变域选自由i) 至iii) 组成的群:

[0823] i) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:67的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:68的重链可变域;

[0824] ii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的重链可变域;以及

[0825] iii) 包含以下的抗原结合单元:包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:103的重链可变域。

[0826] 5、如技术方案1至4中任一项的蛋白质,其中

[0827] i) 该与DLL3特异性结合的第一抗原结合单元自其N端至C端,包含第一轻链可变域、第一轻链恒定域、第一肽接头、第一重链可变域及第一重链恒定CH1域;且

[0828] ii) 该与CD3特异性结合的第二抗原结合单元自其N端至C端,包含第二轻链可变域、第二轻链恒定域、第二肽接头、第二重链可变域及第二重链恒定CH1域。

[0829] 6、如技术方案5的蛋白质,其中该第一及/或第二肽接头包含26至42个氨基酸,优

选地30至40个氨基酸、34至40个氨基酸,或36至39个氨基酸中的任一者,更优选地38个氨基酸。

[0830] 7、如技术方案5或6的蛋白质,其中该第一接头及/或第二接头为Gly-Ser接头,其优选地包含氨基酸序列SEQ ID NO:89,更优选地该第一及第二肽接头包含相同序列。

[0831] 8、如技术方案5至7中任一项的蛋白质,其进一步包含第一及第二Fc域,该第一Fc域共价连接至该第一抗原结合单元,且该第二Fc域共价连接至该第二抗原结合单元。

[0832] 9、如技术方案8的蛋白质,其中

[0833] i) 该第一Fc域包含在位置366处的酪氨酸(Y) [T366Y],且该第二Fc域包含在位置407处的苏氨酸(T) [Y407T],或

[0834] ii) 该第一Fc域包含在位置366处的色氨酸(W) [T366W],且该第二Fc域包含在位置366处的丝氨酸(S) [T366S]、在位置368处的丙氨酸(A) [L368A]及在位置407处的缬氨酸(V) [Y407V],或

[0835] iii) 该第二Fc域包含在位置366处的酪氨酸(Y) [T366Y],且该第一Fc域包含在位置407处的苏氨酸(T) [Y407T],或

[0836] iv) 该第二Fc域包含在位置366处的色氨酸(W) [T366W],且该第一Fc域包含在位置366处的丝氨酸(S) [T366S]、在位置368处的丙氨酸(A) [L368A]及在位置407处的缬氨酸(V) [Y407V],

[0837] 优选地其中该第一或该第二Fc域进一步包含在位置435处的精氨酸[H435R]及在位置436处的苯丙氨酸[Y436F]。

[0838] 10、如技术方案9的蛋白质,其中该第一及/或该第二Fc域进一步包含在位置234处的丙氨酸[L234A]及在位置235处的丙氨酸[L235A]。

[0839] 11、如技术方案5至10中任一项的蛋白质,其中该第一轻链恒定域及该第二轻链恒定域包含人类K或λ域。

[0840] 12、一种蛋白质,其包含:与DLL3特异性结合的第一多肽链,该第一多肽链包含选自以下组成的群的氨基酸序列:SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:246、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251及SEQ ID NO:252;及与CD3特异性结合的第二多肽链,该第二多肽链包含氨基酸序列SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:105。

[0841] 13、一种分离的核酸分子,其编码如技术方案1至5中任一项的蛋白质的第一抗原结合单元及/或第二抗原结合单元,其任选进一步编码第一及/或第二Fc域。

[0842] 14、一种分离的核酸分子,其编码如技术方案12的第一及/或第二多肽链。

[0843] 15、一种表达载体,其包含如技术方案13或14的核酸分子。

[0844] 16、一种宿主细胞,其通过如技术方案15的表达载体转染。

[0845] 17、一种制造如技术方案1至12中任一项的蛋白质的方法,其包括

[0846] i) 在允许表达如技术方案1至12中任一项的蛋白质的条件下培育如技术方案16的宿主细胞;及,

[0847] ii) 回收该蛋白质;及任选

[0848] iii) 进一步纯化及/或修饰及/或调配该蛋白质。

[0849] 18、一种蛋白质,其包含与DLL3特异性结合的第一多肽链及与CD3特异性结合的第二多肽链,其中该第一多肽链包含第一轻链、第一接头及第一重链,且该第二多肽链包含第二轻链、第二接头及第二重链,优选地其中该第一轻链的C端经由该第一肽接头共价连接至该第一重链的N端,且其中该第二轻链的C端经由该第二肽接头共价连接至该第二重链的N端。

[0850] 19、如技术方案18的蛋白质,其中该与DLL3特异性结合的第一多肽链包含轻链可变域及重链可变域,其包含选自i)至xviii)组成的群的CDR序列:

[0851] i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1 (CDR1)、SEQ ID NO:2 (CDR2) 及SEQ ID NO:3 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:4 (CDR1)、SEQ ID NO:5 (CDR2) 及SEQ ID NO:6 (CDR3)的重链CDR;

[0852] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:7 (CDR1)、SEQ ID NO:8 (CDR2) 及SEQ ID NO:9 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:10 (CDR1)、SEQ ID NO:11 (CDR2) 及SEQ ID NO:12 (CDR3)的重链CDR;

[0853] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:13 (CDR1)、SEQ ID NO:14 (CDR2) 及SEQ ID NO:15 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:16 (CDR1)、SEQ ID NO:17 (CDR2) 及SEQ ID NO:18 (CDR3)的重链CDR;

[0854] iv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:19 (CDR1)、SEQ ID NO:20 (CDR2) 及SEQ ID NO:21 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:22 (CDR1)、SEQ ID NO:23 (CDR2) 及SEQ ID NO:24 (CDR3)的重链CDR;

[0855] v) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:25 (CDR1)、SEQ ID NO:26 (CDR2) 及SEQ ID NO:27 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:28 (CDR1)、SEQ ID NO:29 (CDR2) 及SEQ ID NO:30 (CDR3)的重链CDR;

[0856] vi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:31 (CDR1)、SEQ ID NO:32 (CDR2) 及SEQ ID NO:33 (CDR3)的轻链CDR及包含氨基酸序列SEQ ID NO:34 (CDR1)、SEQ ID NO:35 (CDR2) 及SEQ ID NO:36 (CDR3)的重链CDR;

[0857] vii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:133 (CDR1)、SEQ ID NO:134 (CDR2) 及SEQ ID NO:135 (CDR3)的轻链CDR及包含氨基酸序列SEQ ID NO:136 (CDR1)、SEQ ID NO:137 (CDR2) 及SEQ ID NO:138 (CDR3)的重链CDR;

[0858] viii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:139 (CDR1)、SEQ ID NO:140 (CDR2) 及SEQ ID NO:141 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:142 (CDR1)、SEQ ID NO:143 (CDR2) 及SEQ ID NO:144 (CDR3)的重链CDR;

[0859] ix) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:145 (CDR1)、SEQ ID NO:146 (CDR2) 及SEQ ID NO:147 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:148 (CDR1)、SEQ ID NO:149 (CDR2) 及SEQ ID NO:150 (CDR3)的重链CDR;

[0860] x) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:151 (CDR1)、SEQ ID NO:152 (CDR2) 及SEQ ID NO:153 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:154 (CDR1)、SEQ ID NO:155 (CDR2) 及SEQ ID NO:156 (CDR3)的重链CDR;

[0861] xi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:157 (CDR1)、SEQ ID NO:158 (CDR2) 及SEQ ID NO:159 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:160 (CDR1)、SEQ ID NO:161 (CDR2) 及

SEQ ID NO:162(CDR3)的重链CDR;

[0862] xii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:163(CDR1)、SEQ ID NO:164(CDR2)及SEQ ID NO:165(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:166(CDR1)、SEQ ID NO:167(CDR2)及SEQ ID NO:168(CDR3)的重链CDR;

[0863] xiii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:169(CDR1)、SEQ ID NO:170(CDR2)及SEQ ID NO:171(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:172(CDR1)、SEQ ID NO:173(CDR2)及SEQ ID NO:174(CDR3)的重链CDR;

[0864] 包含氨基酸序列SEQ ID NO:175(CDR1)、SEQ ID NO:176(CDR2)及SEQ ID NO:177(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:178(CDR1)、SEQ ID NO:179(CDR2)及SEQ ID NO:180(CDR3)的重链CDR;

[0865] xiv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:181(CDR1)、SEQ ID NO:182(CDR2)及SEQ ID NO:183(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:184(CDR1)、SEQ ID NO:185(CDR2)及SEQ ID NO:186(CDR3)的重链CDR;

[0866] xv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:187(CDR1)、SEQ ID NO:188(CDR2)及SEQ ID NO:189(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:190(CDR1)、SEQ ID NO:191(CDR2)及SEQ ID NO:192(CDR3)的重链CDR;

[0867] xvi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:193(CDR1)、SEQ ID NO:194(CDR2)及SEQ ID NO:195(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:196(CDR1)、SEQ ID NO:197(CDR2)及SEQ ID NO:198(CDR3)的重链CDR;以及

[0868] xvii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:199(CDR1)、SEQ ID NO:200(CDR2)及SEQ ID NO:201(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:202(CDR1)、SEQ ID NO:203(CDR2)及SEQ ID NO:204(CDR3)的重链CDR。

[0869] 20、如技术方案18或19的蛋白质,其中该与CD3特异性结合的第二多肽链包含轻链可变域及重链可变域,其包含选自由i)至iii)组成的群的CDR序列:

[0870] i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:55(CDR1)、SEQ ID NO:56(CDR2)及SEQ ID NO:57(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:58(CDR1)、SEQ ID NO:59(CDR2)及SEQ ID NO:60(CDR3)的重链CDR;

[0871] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:61(CDR1)、SEQ ID NO:62(CDR2)及SEQ ID NO:63(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:64(CDR1)、SEQ ID NO:65(CDR2)及SEQ ID NO:66(CDR3)的重链CDR;以及

[0872] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:96(CDR1)、SEQ ID NO:97(CDR2)及SEQ ID NO:98(CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:99(CDR1)、SEQ ID NO:100(CDR2)及SEQ ID NO:101(CDR3)的重链CDR。

[0873] 21、如技术方案18至20中任一项的蛋白质,其中该与DLL3特异性结合的第一多肽链包含轻链可变域及重链可变域,其选自由i)至xviii)组成的群:

[0874] i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的重链可变域;

[0875] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的重链可变域;

[0876] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的重链可变域;

[0877] iv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:43的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的重链可变域;

[0878] v) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的重链可变域;

[0879] vi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的重链可变域;

[0880] vii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:205的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:206的重链可变域;

[0881] viii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:207的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:208的重链可变域;

[0882] ix) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:209的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:210的重链可变域;

[0883] x) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:211的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:212的重链可变域;

[0884] xi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:213的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:214的重链可变域;

[0885] xii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:215的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:216的重链可变域;

[0886] xiii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:217的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:218的重链可变域;

[0887] xiv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:219的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:220的重链可变域;

[0888] xv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:221的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:222的重链可变域;

[0889] xvi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:223的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:224的重链可变域;

[0890] xvii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:225的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:226的重链可变域;以及

[0891] xviii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:227的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:228的重链可变域。

[0892] 22、如技术方案19至22中任一项的蛋白质,其中该与CD3特异性结合的第二多肽链包含轻链可变域及重链可变域,其选自由i) -iii)组成的群:

[0893] i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:67的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:68的重链可变域;

[0894] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的重链可变域;以及

[0895] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:102的轻链可变域及包含氨基酸序列SEQ ID NO:

103的重链可变域。

[0896] 23、如技术方案18至22中任一项的蛋白质,其中该第一及/或第二肽接头包含26至42个氨基酸,优选地30至40个氨基酸、34至40个氨基酸或36至39个氨基酸中的任一者,更优选地38个氨基酸。

[0897] 24、如技术方案23的蛋白质,其中该第一接头及/或第二接头为Gly-Ser接头,其优选地包含氨基酸序列SEQ ID NO:89,更优选地该第一及第二肽接头包含相同序列。

[0898] 25、如技术方案18至24中任一项的蛋白质,其中

[0899] i) 该第一重链包含在位置366处的酪氨酸(Y) [T366Y],且该第二重链包含在位置407处的苏氨酸(T) [Y407T],或

[0900] ii) 该第一重链包含在位置366处的色氨酸(W) [T366W],且该第二重链包含在位置366处的丝氨酸(S) [T366S]、在位置368处的丙氨酸(A) [L368A]及在位置407处的缬氨酸(V) [Y407V],或

[0901] iii) 该第二重链包含在位置366处的酪氨酸(Y) [T366Y],且该第一重链包含在位置407处的苏氨酸(T) [Y407T],或

[0902] iv) 该第二重链包含在位置366处的色氨酸(W) [T366W],且该第一重链包含在位置366处的丝氨酸(S) [T366S]、在位置368处的丙氨酸(A) [L368A]及在位置407处的缬氨酸(V) [Y407V],

[0903] 优选地其中该第一或该第二重链进一步包含在位置435处的精氨酸[H435R]及在位置436处的苯丙氨酸[Y436F]。

[0904] 26、如技术方案25的蛋白质,其中该第一及/或该第二重链进一步包含在位置234处的丙氨酸[L234A]及在位置235处的丙氨酸[L235A]。

[0905] 27、如技术方案18至26中任一项的蛋白质,其中该第一轻链及该第二轻链包含人类K或λ域。

[0906] 28、如技术方案1至12或18至27中任一项的蛋白质,其用于药物。

[0907] 29、一种药物组合物,其包含如技术方案1至12或18至27中任一项的蛋白质及药学上可接受的载剂。

[0908] 30、一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者给予治疗有效量的如技术方案1至12或18至27中任一项的蛋白质。

[0909] 31、一种如技术方案1至12或18至27中任一项的蛋白质的用途,其用于制备用于治疗癌症的药物组合物。

[0910] 32、如技术方案1至12或18至27中任一项的蛋白质,其用于治疗癌症的方法。

[0911] 33、如技术方案30的方法、如技术方案31的用途或如技术方案32所用的蛋白质,其中该癌症为表达DLL3的肿瘤,优选地其中该癌症为SCLC、神经胶质瘤或表达DLL3的神经内分泌肿瘤。

[0912] 34、如技术方案30或33的方法、如技术方案31或33的用途或如技术方案32或33所用的蛋白质,其中该蛋白质与以下组合使用:化学治疗剂、抑制血管生成的治疗活性化合物、信号转导路径抑制剂、EGFR抑制剂、免疫调节物、免疫检查点抑制剂或激素疗法药剂。

[0913] 35、如技术方案34的方法、用途或所用的蛋白质,其中该蛋白质与免疫检查点抑制剂(优选为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)组合。

[0914] 36、如技术方案35的方法、用途或所用的蛋白质,其中该抗PD-1抗体选自由PD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4及PD1-5组成的群。

[0915] 37、一种抗-DLL3抗体分子,其包含

[0916] i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1 (CDR1)、SEQ ID NO:2 (CDR2) 及SEQ ID NO:3 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:4 (CDR1)、SEQ ID NO:5 (CDR2) 及SEQ ID NO:6 (CDR3)的重链CDR;或

[0917] ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:7 (CDR1)、SEQ ID NO:8 (CDR2) 及SEQ ID NO:9 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:10 (CDR1)、SEQ ID NO:11 (CDR2) 及SEQ ID NO:12 (CDR3)的重链CDR;或

[0918] iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:13 (CDR1)、SEQ ID NO:14 (CDR2) 及SEQ ID NO:15 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:16 (CDR1)、SEQ ID NO:17 (CDR2) 及SEQ ID NO:18 (CDR3)的重链CDR;或

[0919] iv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:19 (CDR1)、SEQ ID NO:20 (CDR2) 及SEQ ID NO:21 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:22 (CDR1)、SEQ ID NO:23 (CDR2) 及SEQ ID NO:24 (CDR3)的重链CDR;或

[0920] v) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:25 (CDR1)、SEQ ID NO:26 (CDR2) 及SEQ ID NO:27 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:28 (CDR1)、SEQ ID NO:29 (CDR2) 及SEQ ID NO:30 (CDR3)的重链CDR;或

[0921] vi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:31 (CDR1)、SEQ ID NO:32 (CDR2) 及SEQ ID NO:33 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:34 (CDR1)、SEQ ID NO:35 (CDR2) 及SEQ ID NO:36 (CDR3)的重链CDR;或

[0922] vii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:133 (CDR1)、SEQ ID NO:134 (CDR2) 及SEQ ID NO:135 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:136 (CDR1)、SEQ ID NO:137 (CDR2) 及SEQ ID NO:138 (CDR3)的重链CDR;或

[0923] viii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:139 (CDR1)、SEQ ID NO:140 (CDR2) 及SEQ ID NO:141 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:142 (CDR1)、SEQ ID NO:143 (CDR2) 及SEQ ID NO:144 (CDR3)的重链CDR;或

[0924] ix) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:145 (CDR1)、SEQ ID NO:146 (CDR2) 及SEQ ID NO:147 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:148 (CDR1)、SEQ ID NO:149 (CDR2) 及SEQ ID NO:150 (CDR3)的重链CDR;或

[0925] x) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:151 (CDR1)、SEQ ID NO:152 (CDR2) 及SEQ ID NO:153 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:154 (CDR1)、SEQ ID NO:155 (CDR2) 及SEQ ID NO:156 (CDR3)的重链CDR;或

[0926] xi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:157 (CDR1)、SEQ ID NO:158 (CDR2) 及SEQ ID NO:159 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:160 (CDR1)、SEQ ID NO:161 (CDR2) 及SEQ ID NO:162 (CDR3)的重链CDR;或

[0927] xii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:163 (CDR1)、SEQ ID NO:164 (CDR2) 及SEQ ID NO:165 (CDR3)的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:166 (CDR1)、SEQ ID NO:167 (CDR2) 及SEQ ID NO:168 (CDR3)的重链CDR;或

[0928] xiii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:169 (CDR1)、SEQ ID NO:170 (CDR2) 及SEQ ID NO:171 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:172 (CDR1)、SEQ ID NO:173 (CDR2) 及SEQ ID NO:174 (CDR3) 的重链CDR;或

[0929] xiv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:175 (CDR1)、SEQ ID NO:176 (CDR2) 及SEQ ID NO:177 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:178 (CDR1)、SEQ ID NO:179 (CDR2) 及SEQ ID NO:180 (CDR3) 的重链CDR;或

[0930] xv) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:181 (CDR1)、SEQ ID NO:182 (CDR2) 及SEQ ID NO:183 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:184 (CDR1)、SEQ ID NO:185 (CDR2) 及SEQ ID NO:186 (CDR3) 的重链CDR;或

[0931] xvi) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:187 (CDR1)、SEQ ID NO:188 (CDR2) 及SEQ ID NO:189 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:190 (CDR1)、SEQ ID NO:191 (CDR2) 及SEQ ID NO:192 (CDR3) 的重链CDR;或

[0932] xvii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:193 (CDR1)、SEQ ID NO:194 (CDR2) 及SEQ ID NO:195 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:196 (CDR1)、SEQ ID NO:197 (CDR2) 及SEQ ID NO:198 (CDR3) 的重链CDR;或

[0933] xviii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:199 (CDR1)、SEQ ID NO:200 (CDR2) 及SEQ ID NO:201 (CDR3) 的轻链CDR;及包含氨基酸序列SEQ ID NO:202 (CDR1)、SEQ ID NO:203 (CDR2) 及SEQ ID NO:204 (CDR3) 的重链CDR。

[0934] 38、如技术方案37的抗-DLL3抗体分子,其中该抗体分子为单克隆、嵌合、人类化或人类抗体分子。

[0935] 39、如技术方案37或38的抗-DLL3抗体分子,其中该抗体分子为Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv或scFv。

[0936] 40、如技术方案37至39中任一项的抗-DLL3抗体分子,其中重链恒定区选自由以下组成的群:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA及IgE恒定区。

[0937] 41、如技术方案37至40中任一项的抗-DLL3抗体分子,其中该轻链恒定区为K或λ。

[0938] 42、一种检测生物样本中的DLL3的方法,其包括

[0939] (a) 使该样本与如技术方案37至41中任一项的抗-DLL3抗体接触;

[0940] (b) 允许在该样本中形成抗体-抗原复合物;及

[0941] (c) 检测该抗-DLL3抗体。

[0942] 43、如技术方案42的方法,其中该抗-DLL3抗体为通过可检测信号检测,优选地该信号为通过免疫细胞化学 (ICC)、免疫组织化学 (IHC)、西方墨点法、流式细胞计数及/或ELISA检测。

[0943] 44、如技术方案42或43中任一项的方法,其中该生物样本为组织样本,优选地为固定组织样本,更优选地为福尔马林固定及石蜡包埋组织样本。

[0944] 45、如技术方案44的方法,其中该抗-DLL3抗体为通过IHC检测。

[0945] 46、如技术方案42至45中任一项的方法,其中该组织样本为肿瘤组织样本,更优选地选自自由以下组成的群的肿瘤分离的肿瘤组织样本:SCLC、LCNEC、神经胶质瘤、神经胶质母细胞瘤、黑素瘤或其他神经内分泌肿瘤。

[0946] 47、一种检测DLL3的试剂盒,其包含如技术方案37至41中任一项的抗体,及使用说

说明书。

抗-DLL3

抗-CD3

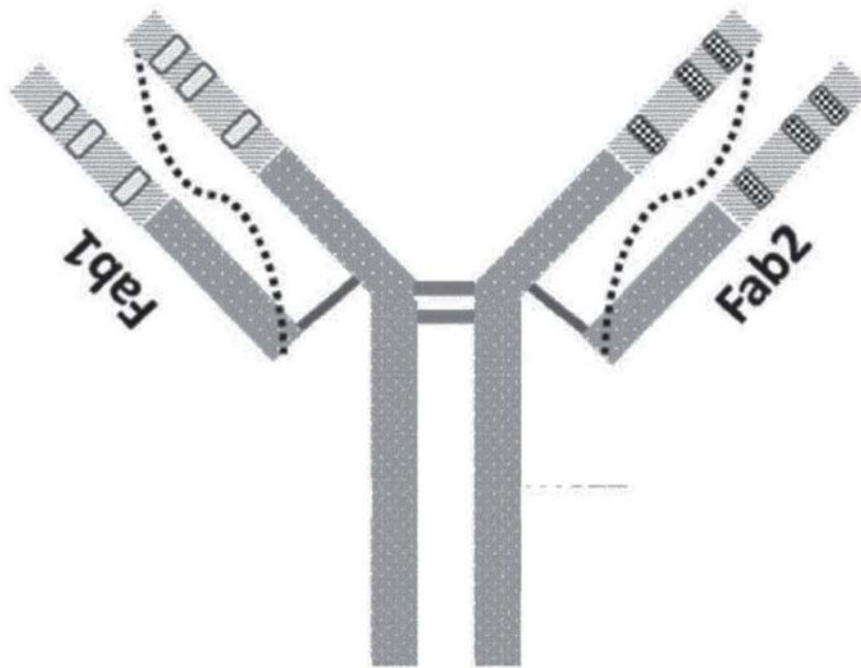


图1

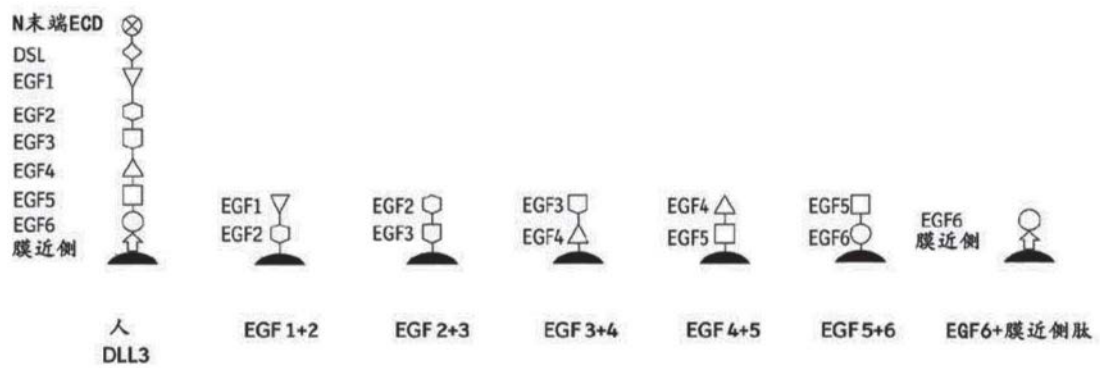


图2

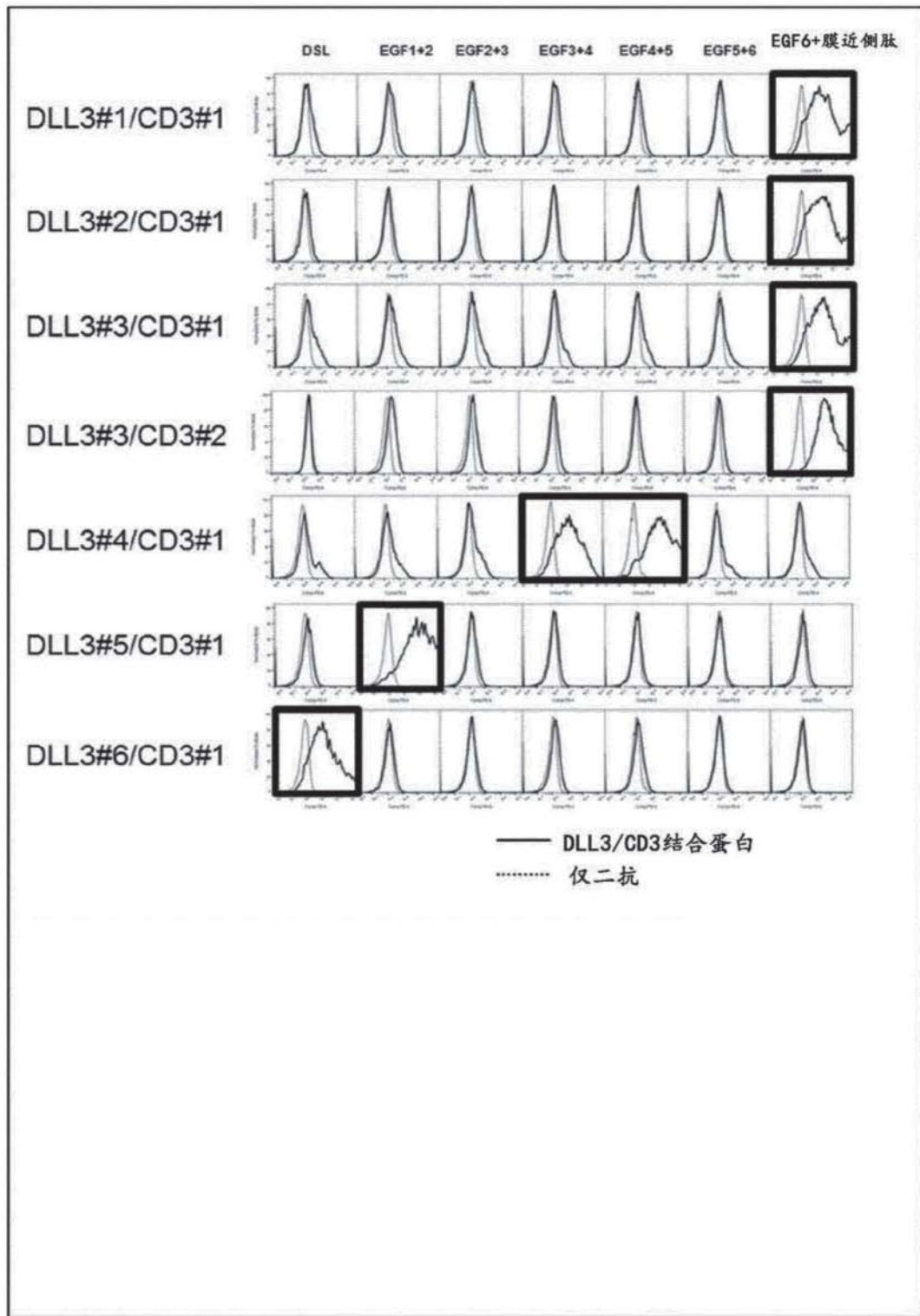


图3A

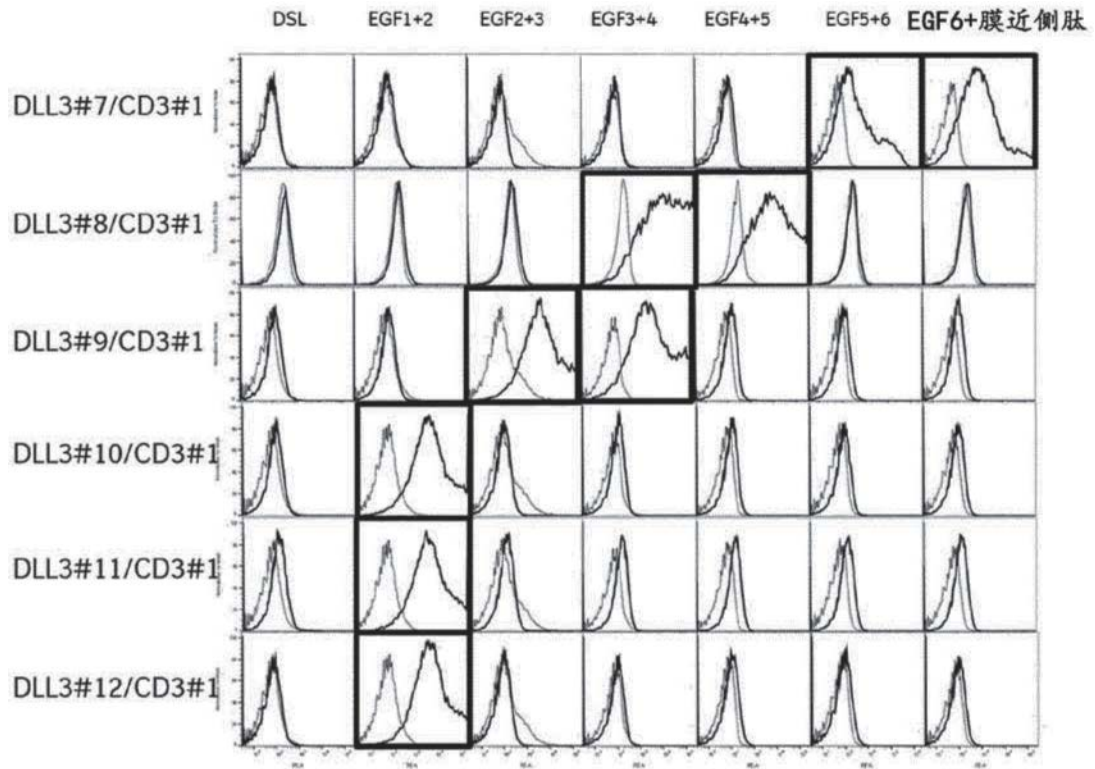


图3B

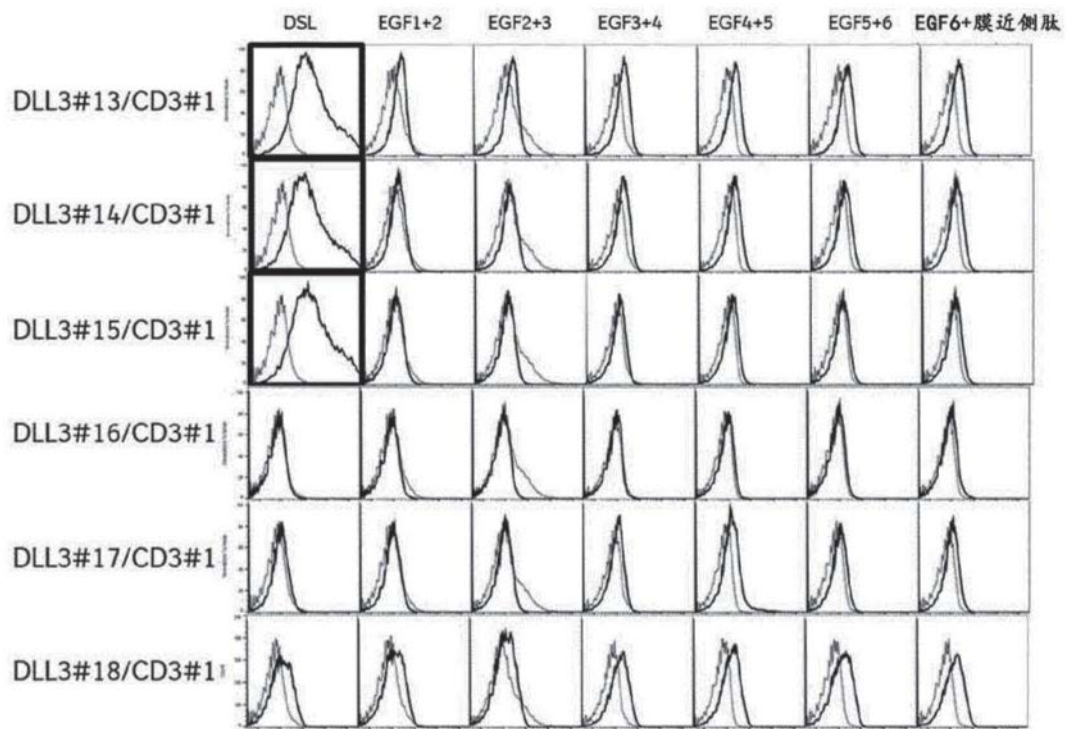


图3C

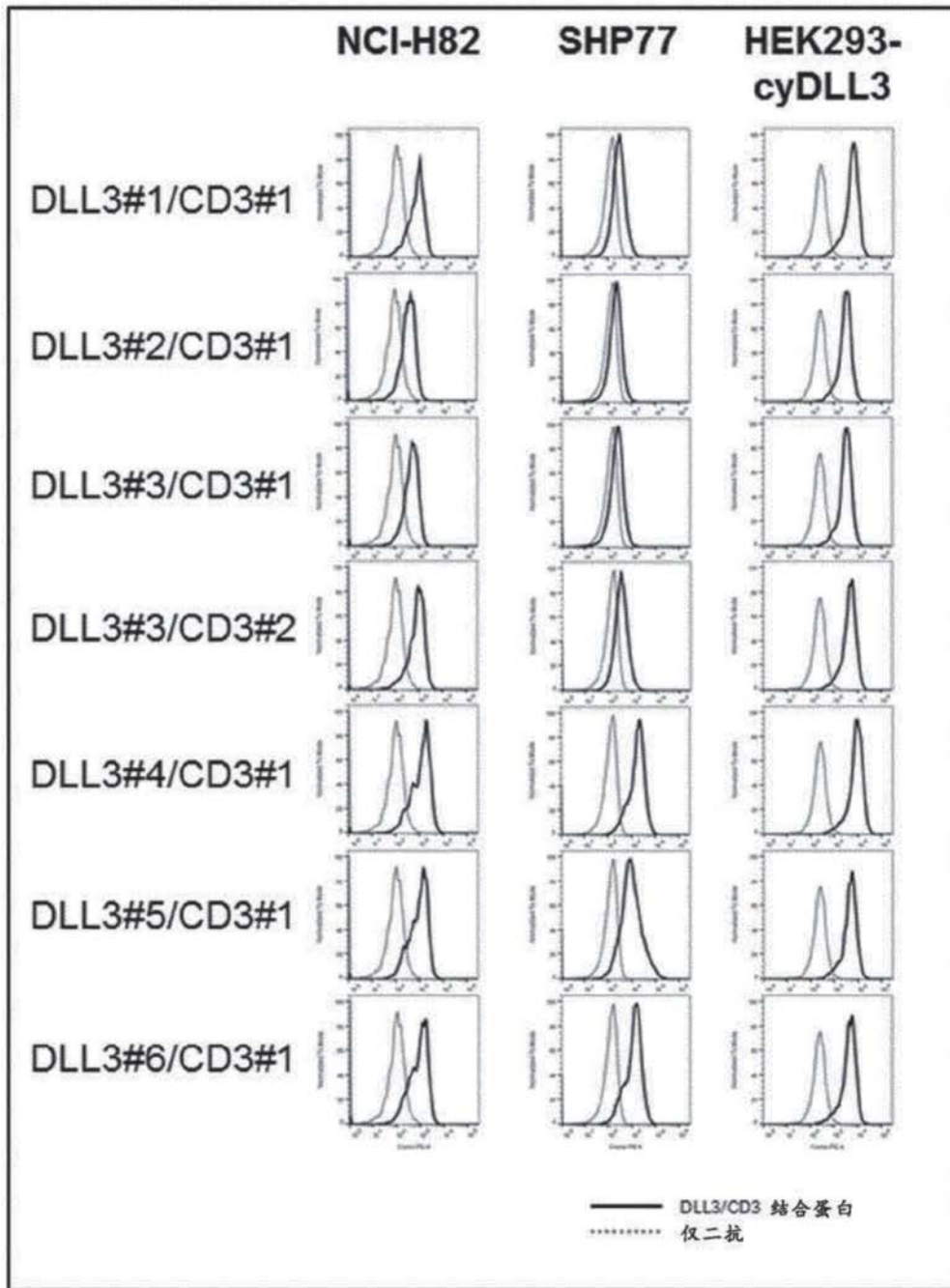


图4

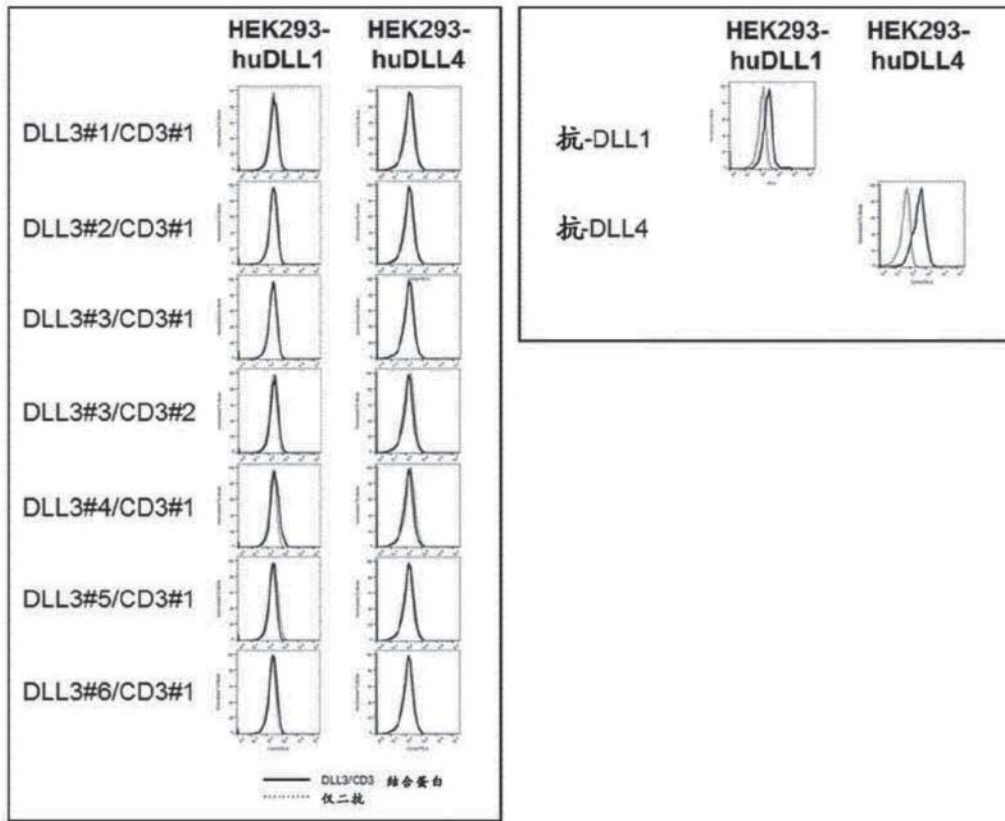


图5

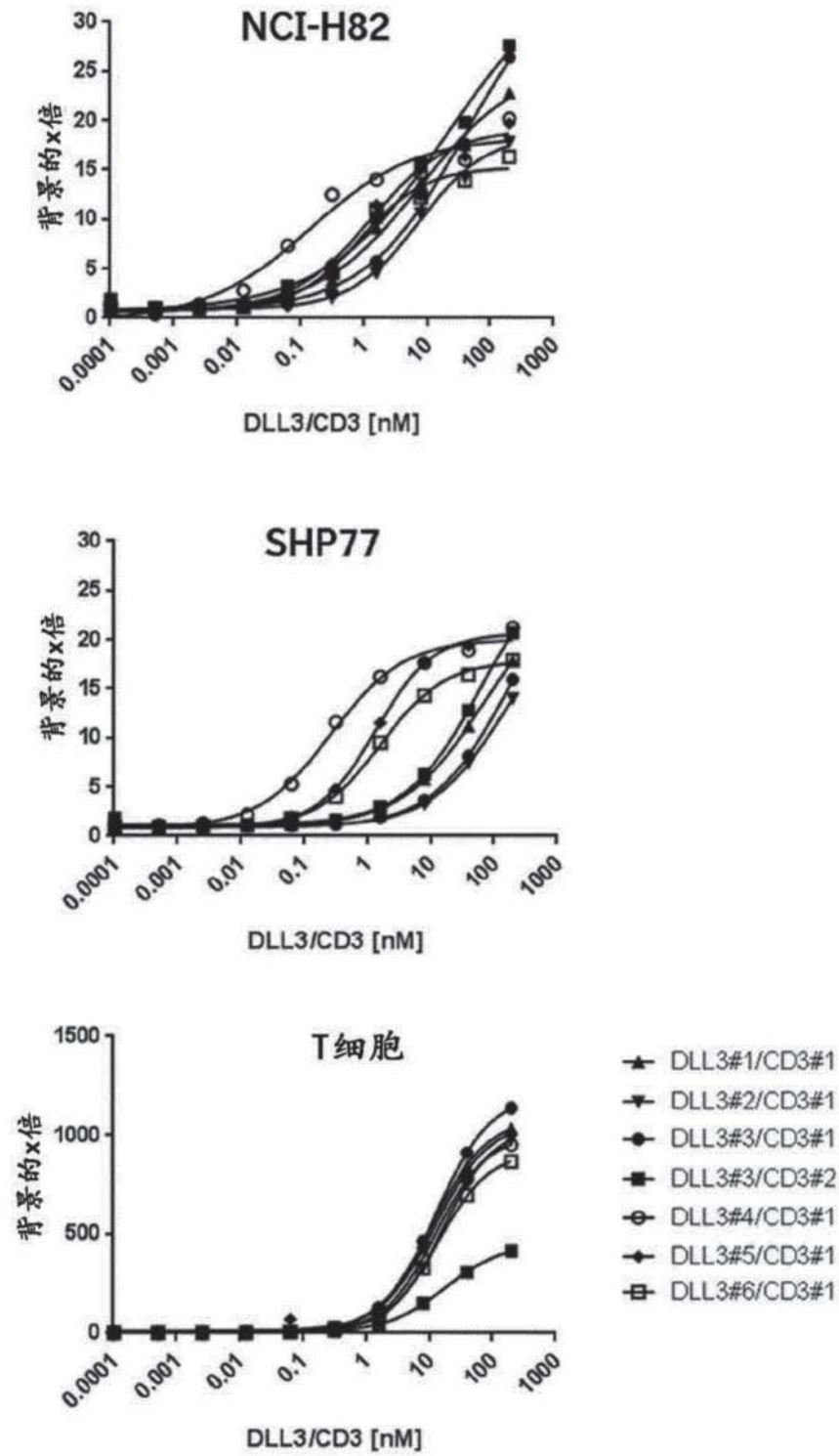


图6A

非DSL-非EGF1-6-非膜近侧肽

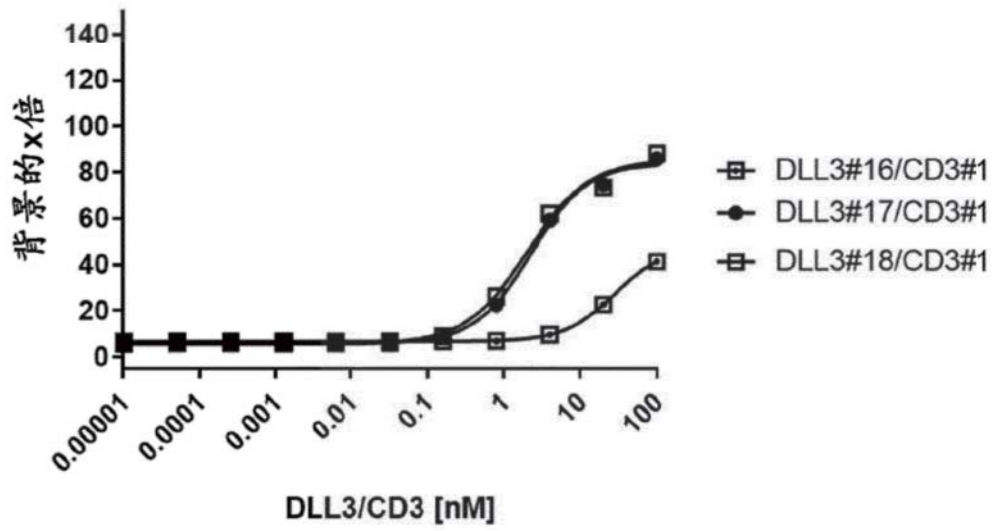


图6B

DSL

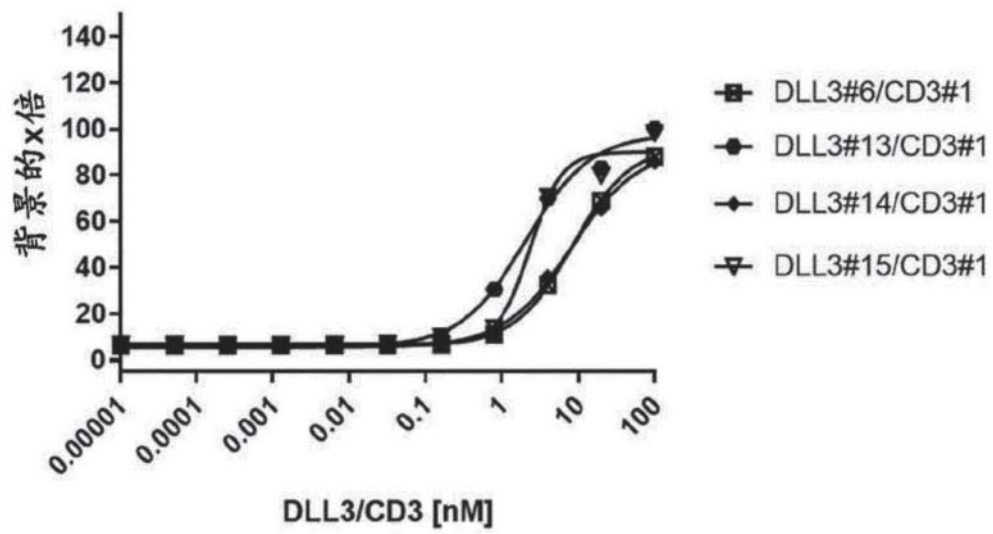


图6C

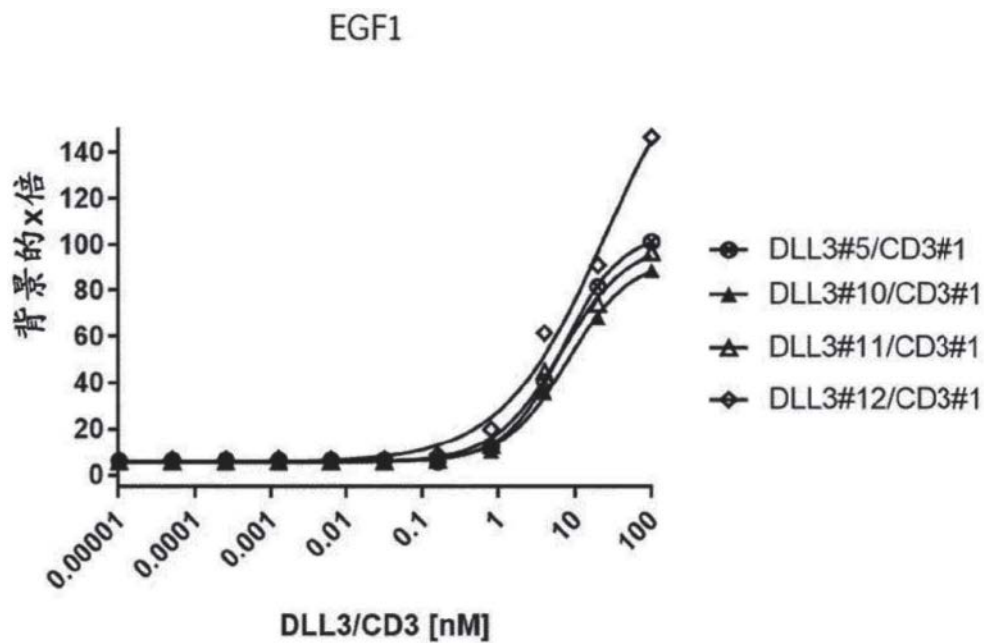


图6D

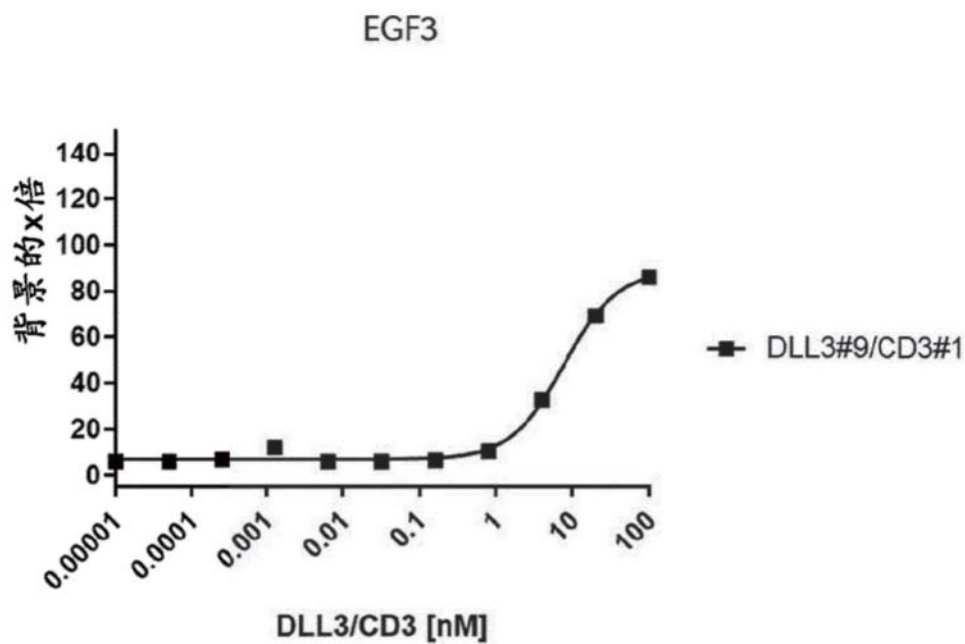


图6E

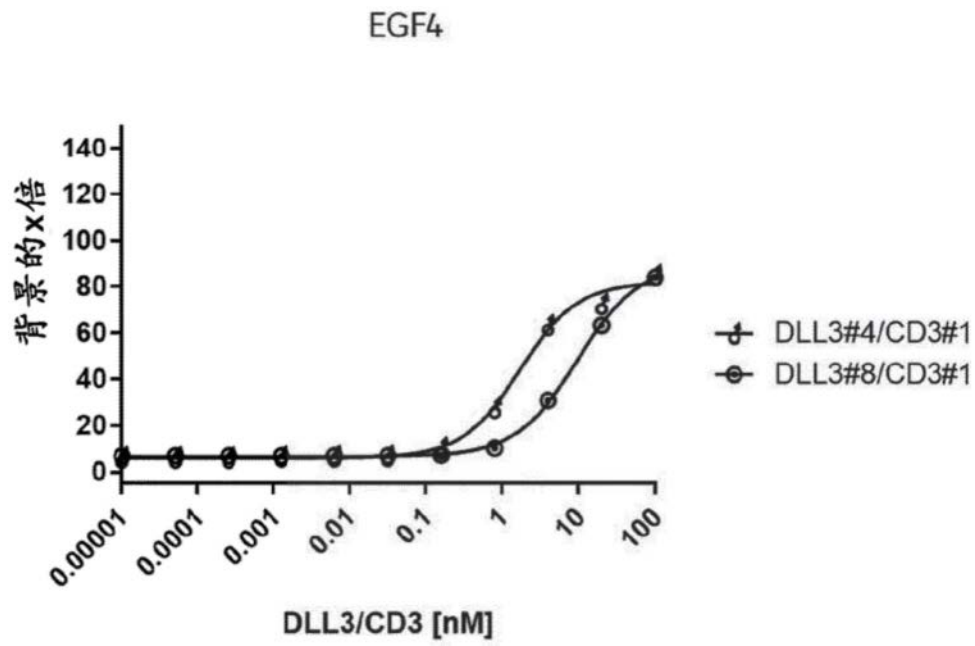


图6F

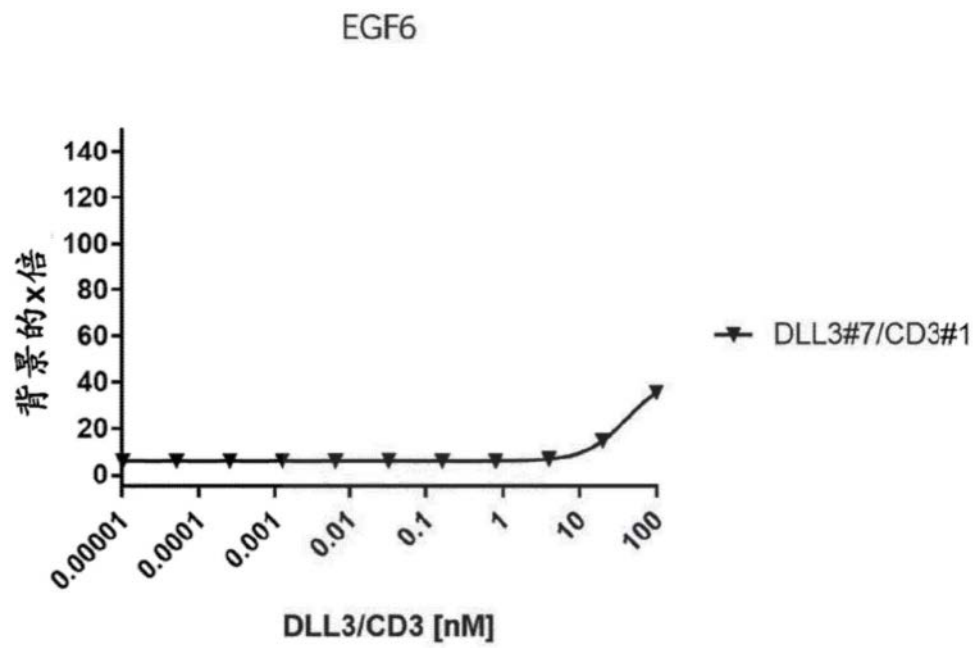


图6G

膜近侧肽

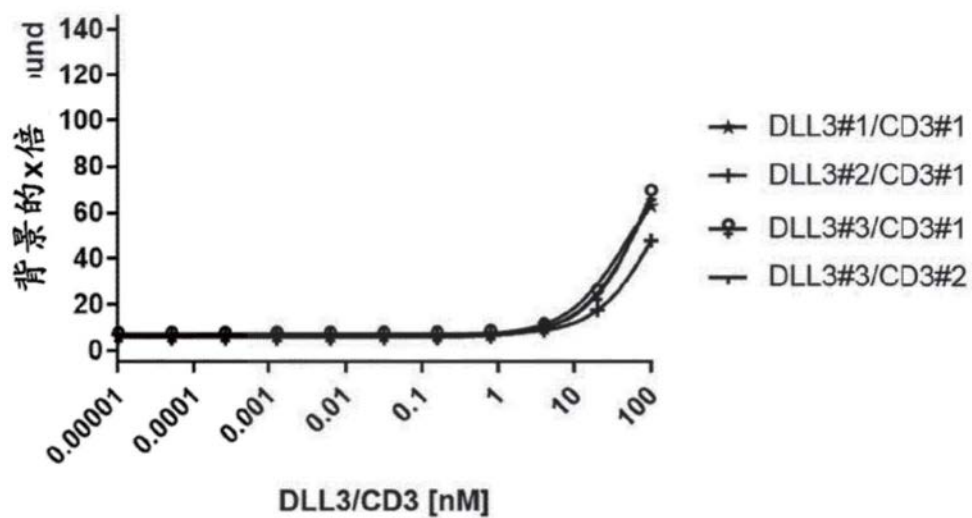


图6H

非DSL-非EGF1-6-非膜近侧肽

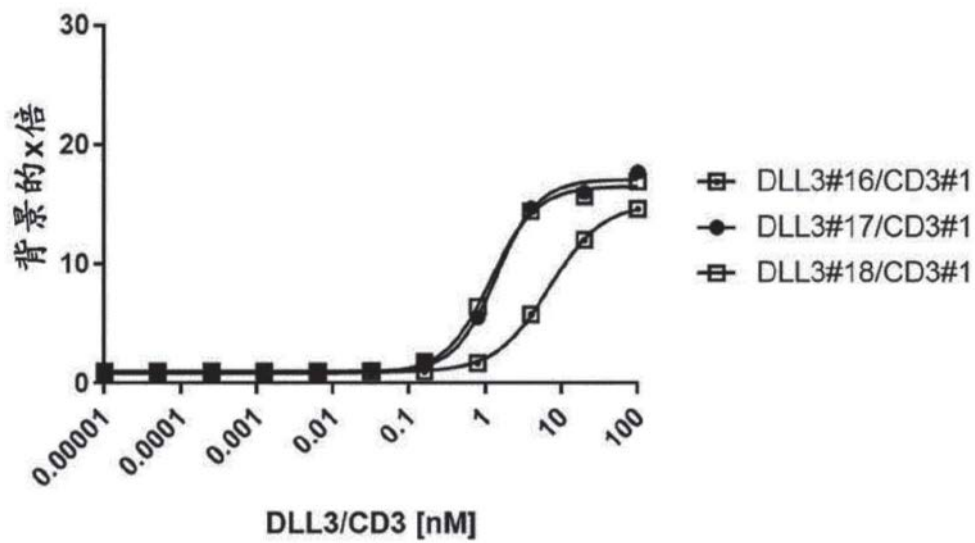


图6I

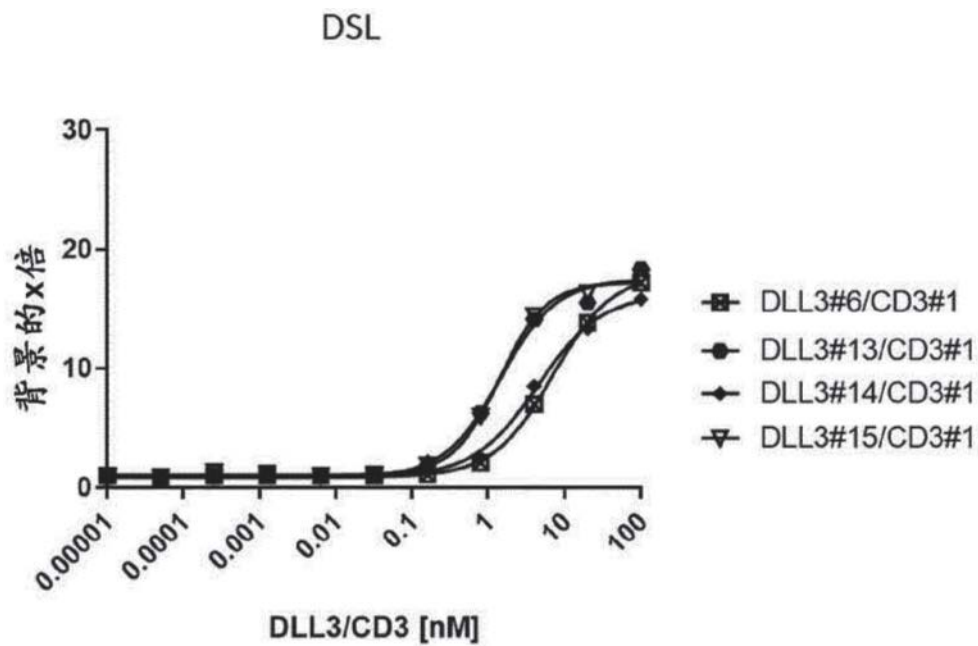


图6J

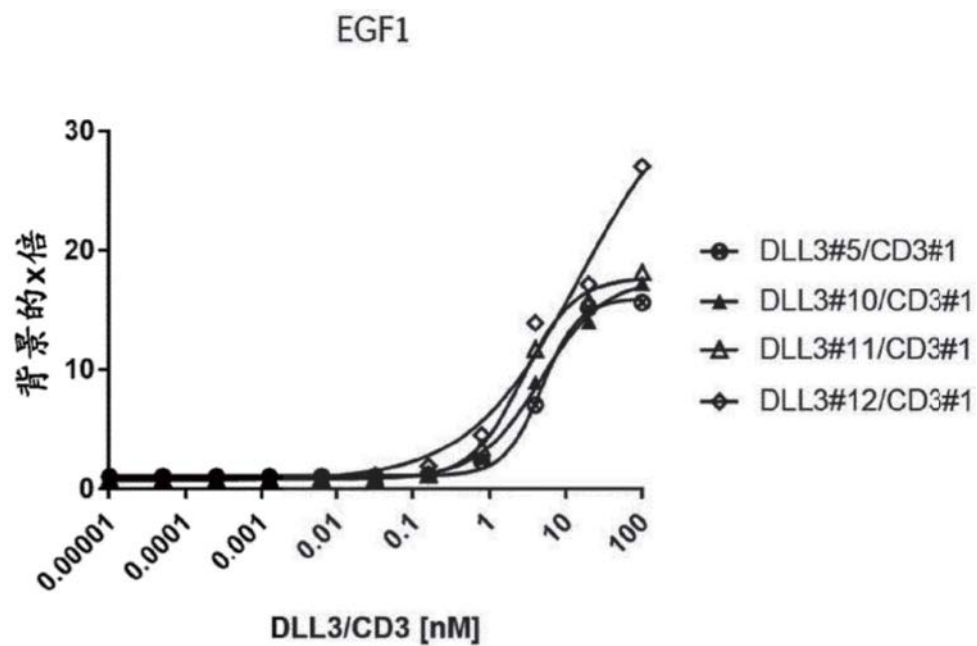


图6K

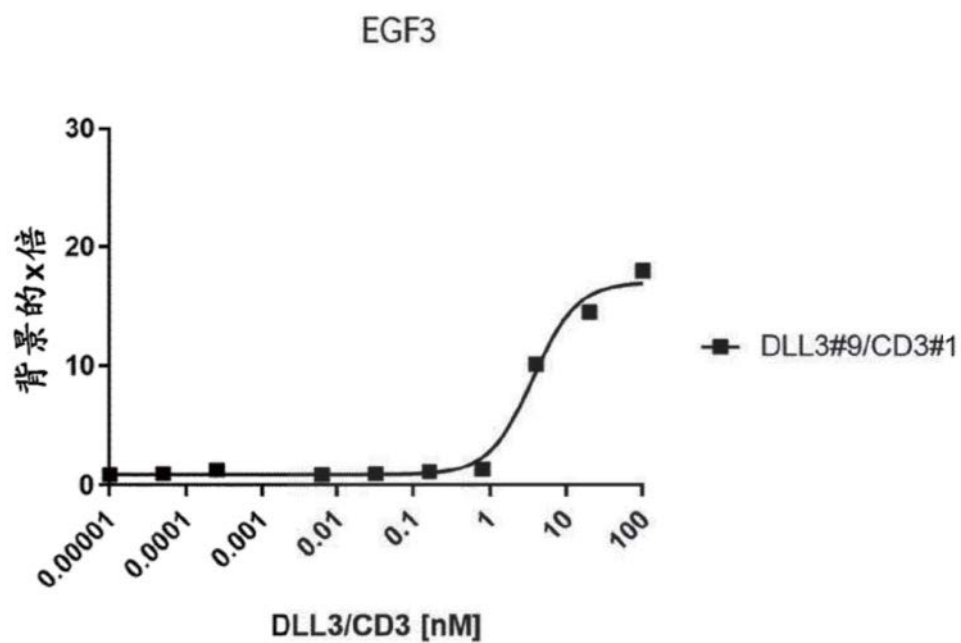


图6L

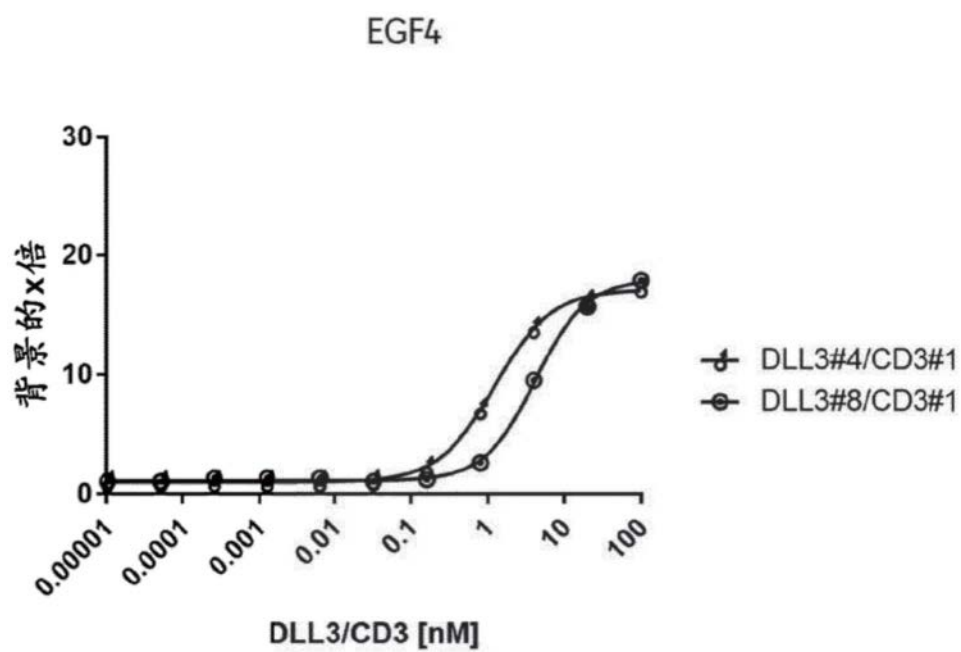


图6M

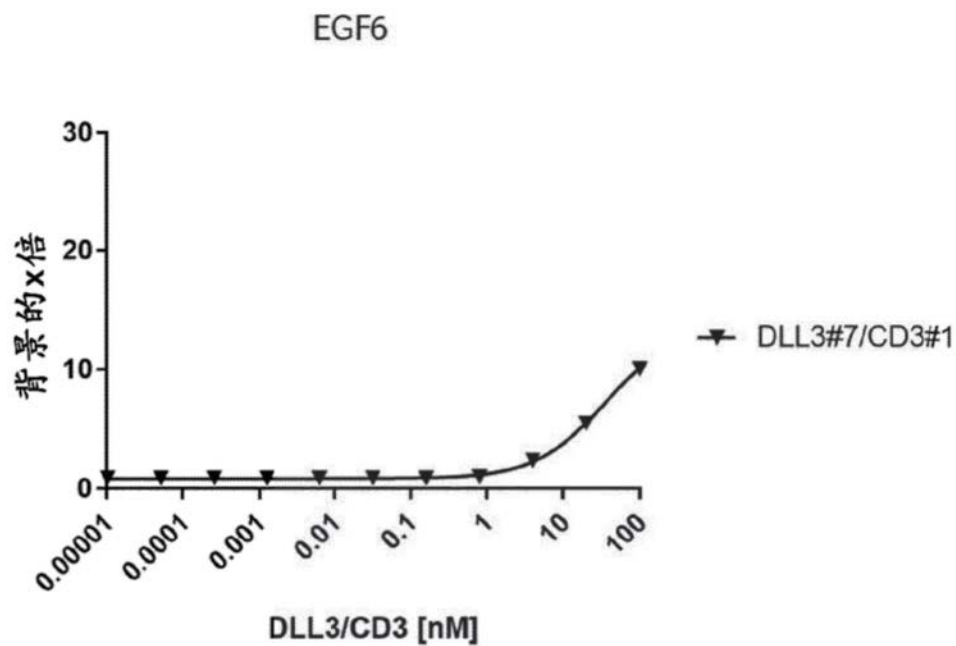


图6N

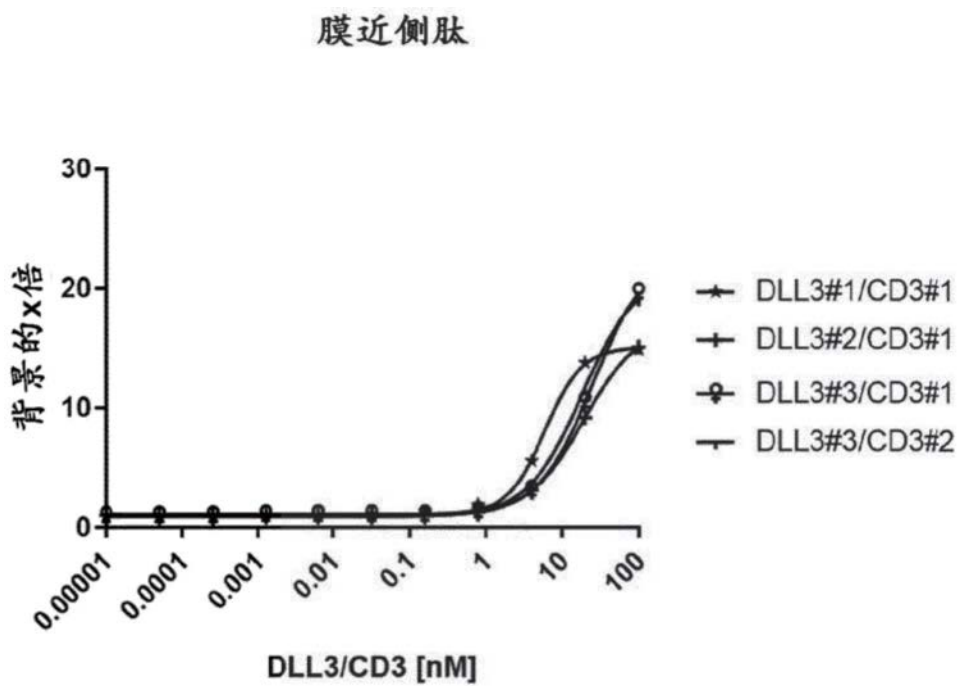


图60

非DSL-非EGF1-6-非膜近侧肽

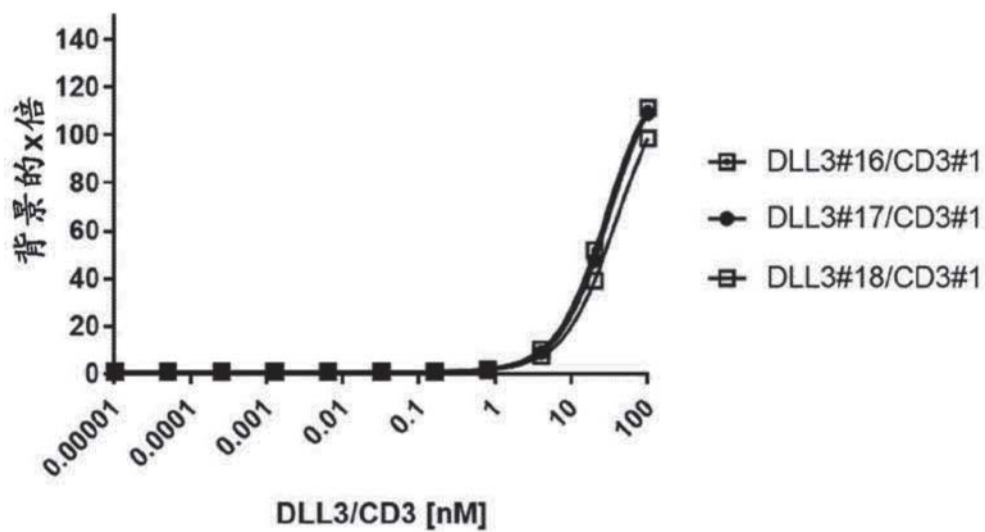


图6P

DSL

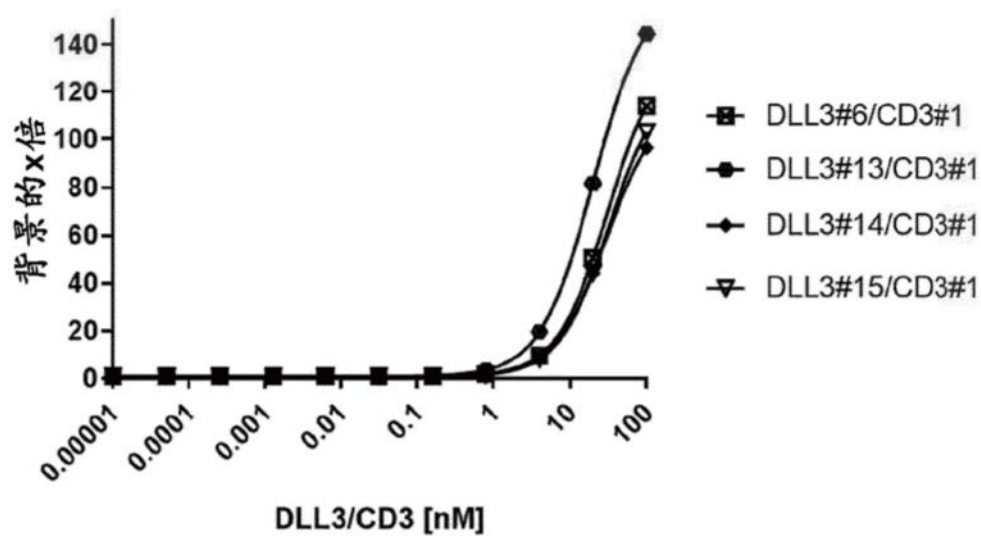


图6Q

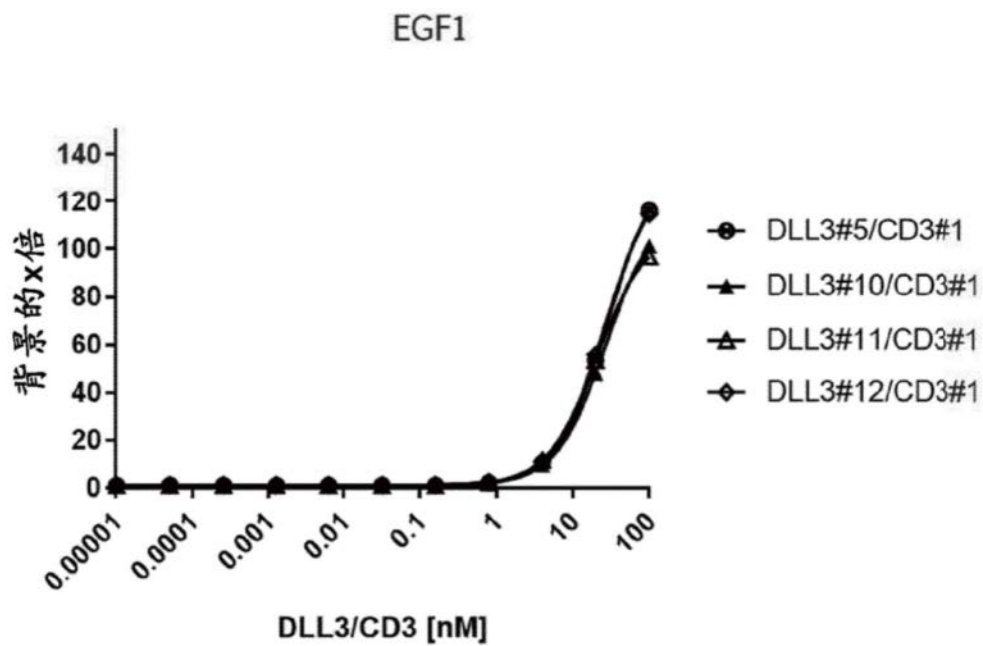


图6R

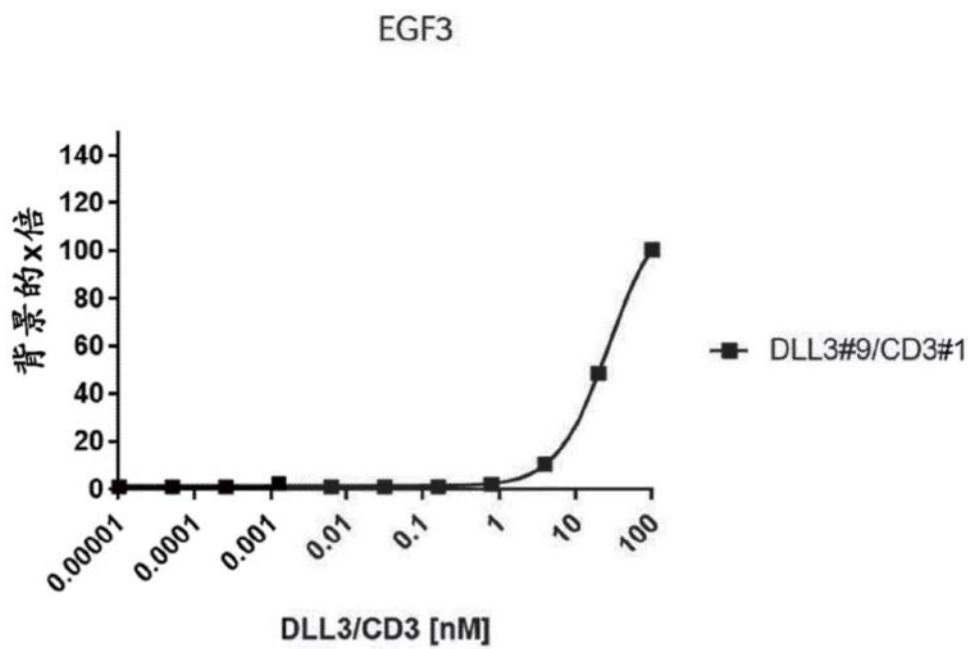


图6S

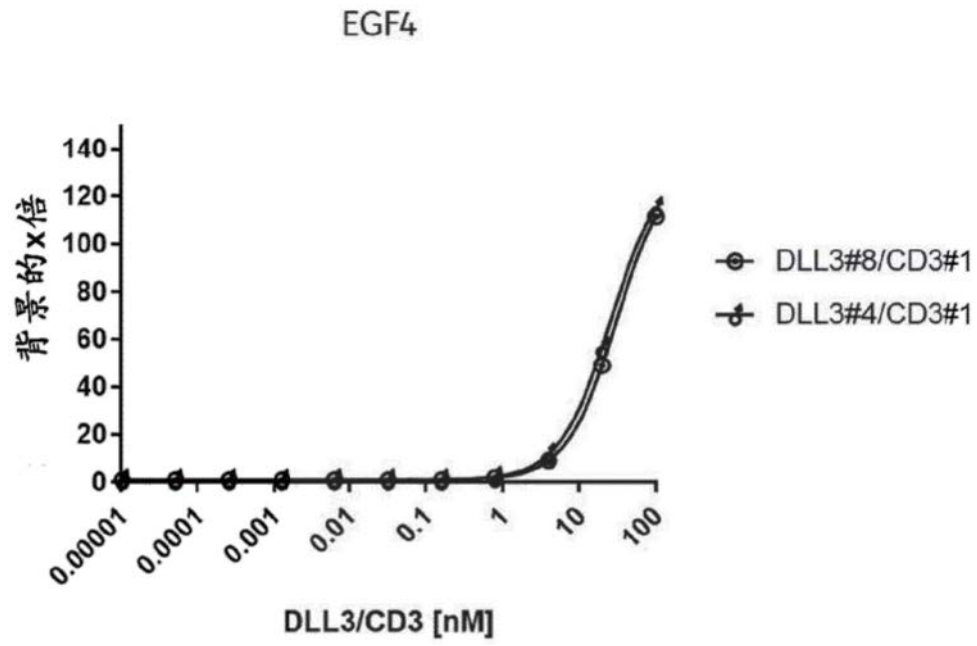


图6T

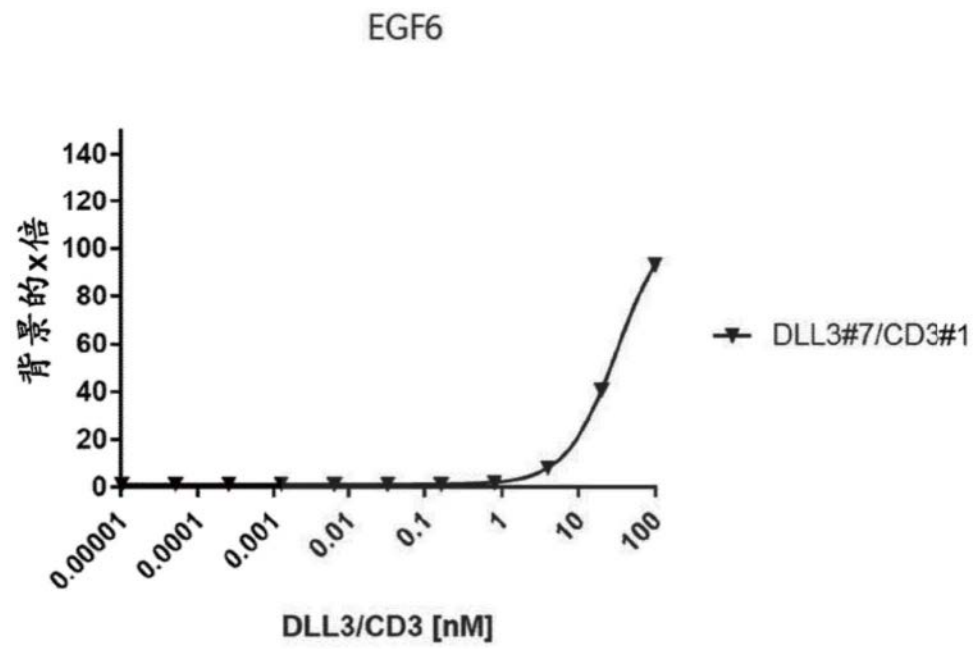


图6U

膜近侧肽

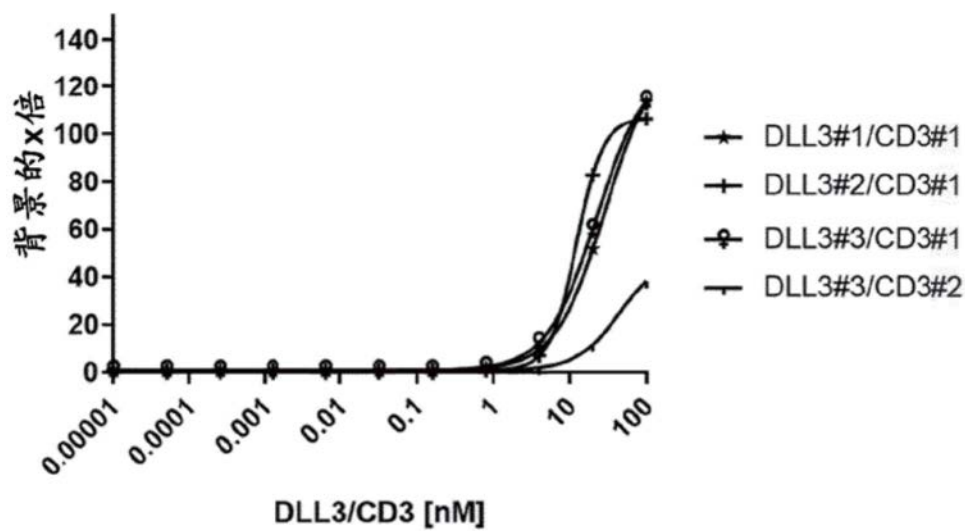


图6V

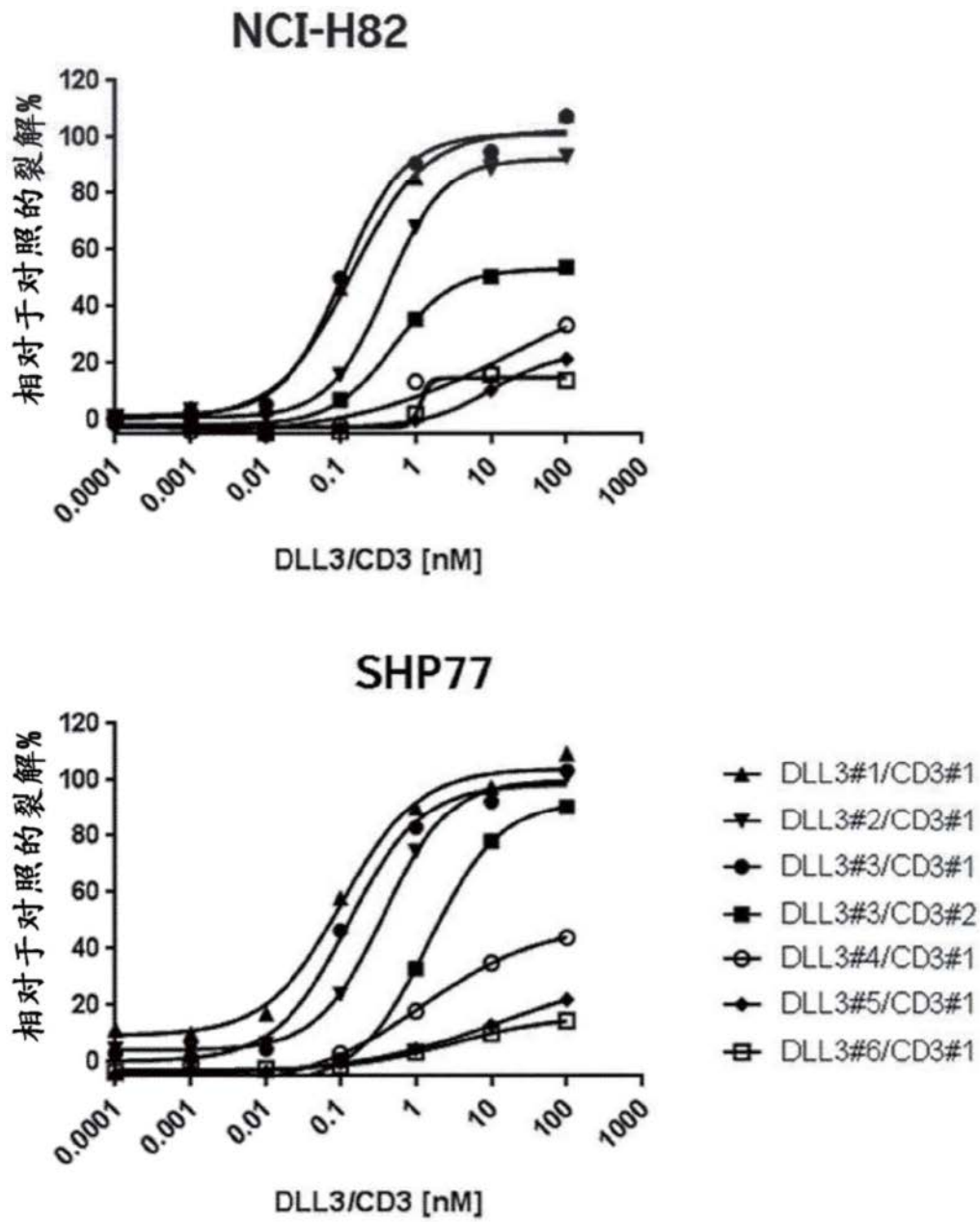


图7A

非DSL-非EGF1-6-非膜近侧肽

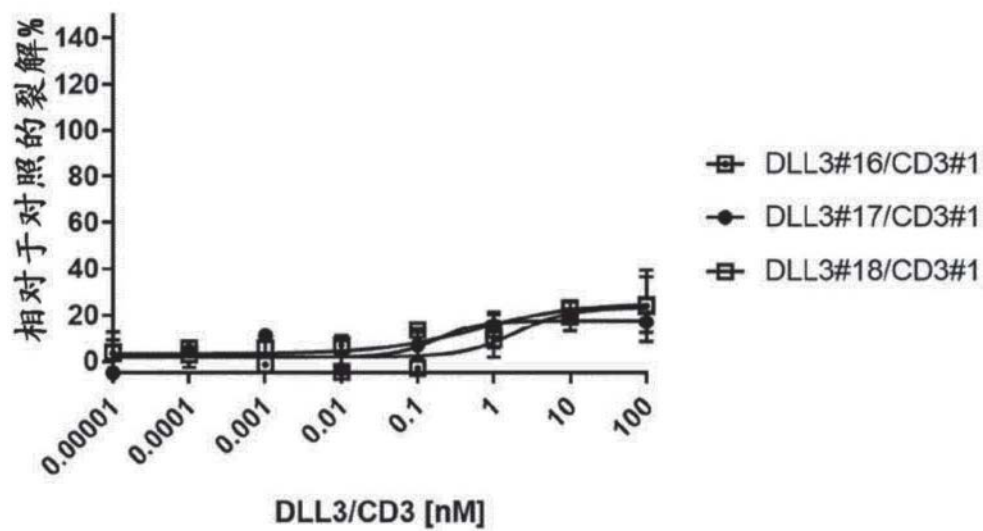


图7B

DSL

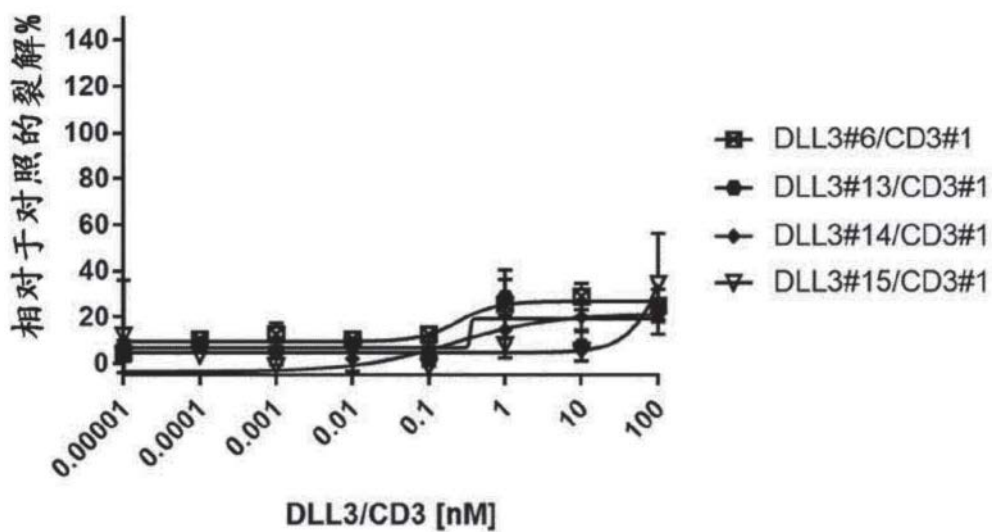


图7C

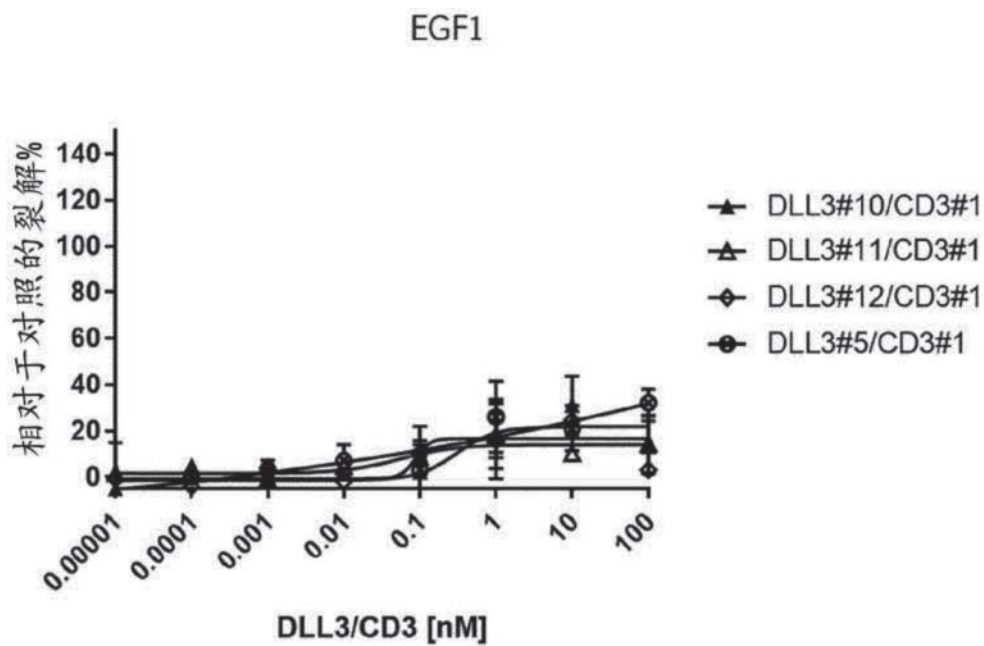


图7D

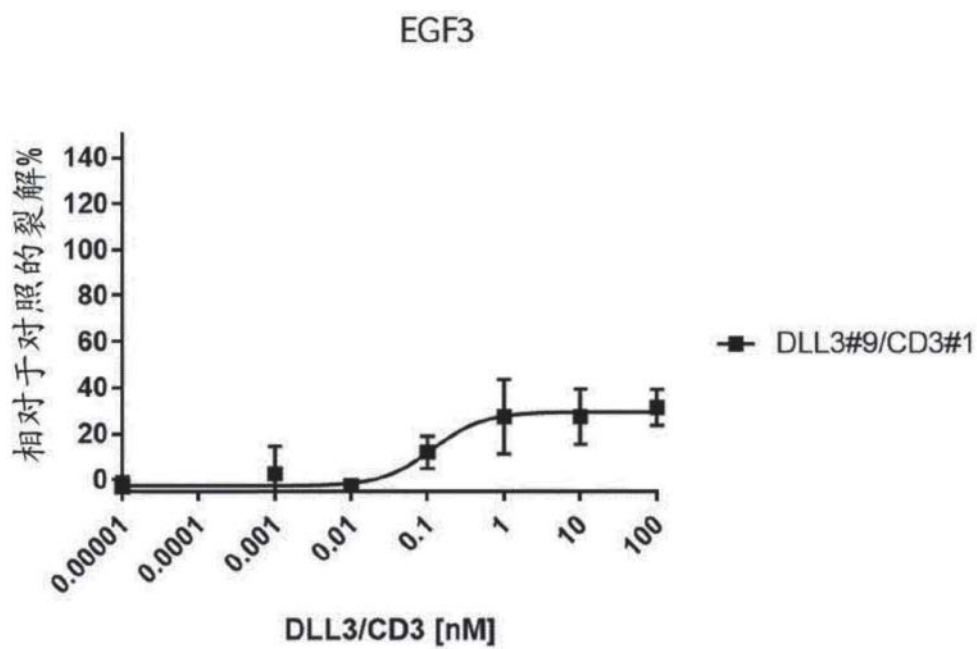


图7E

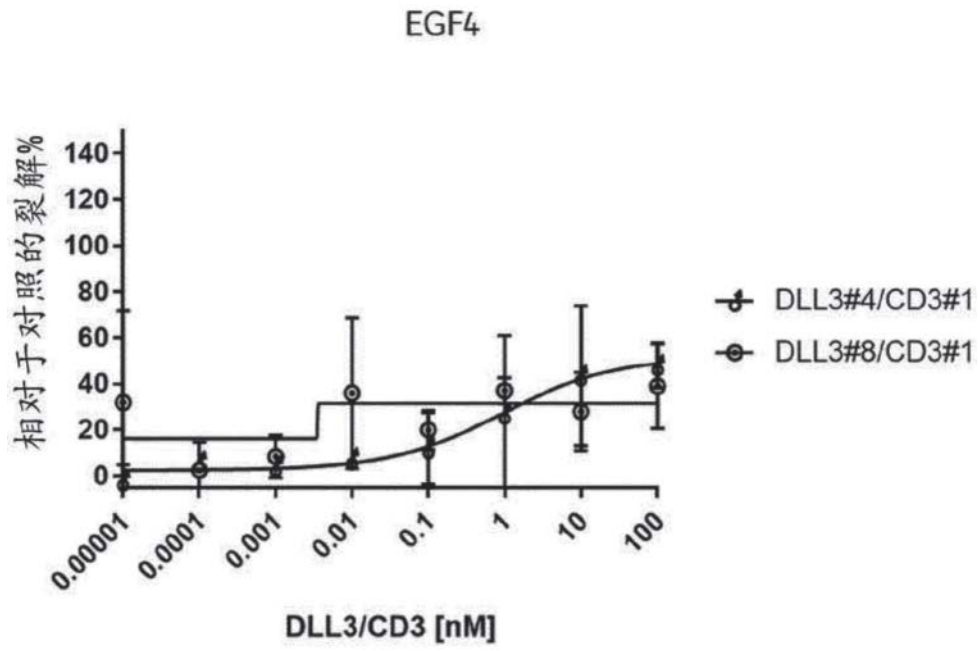


图7F

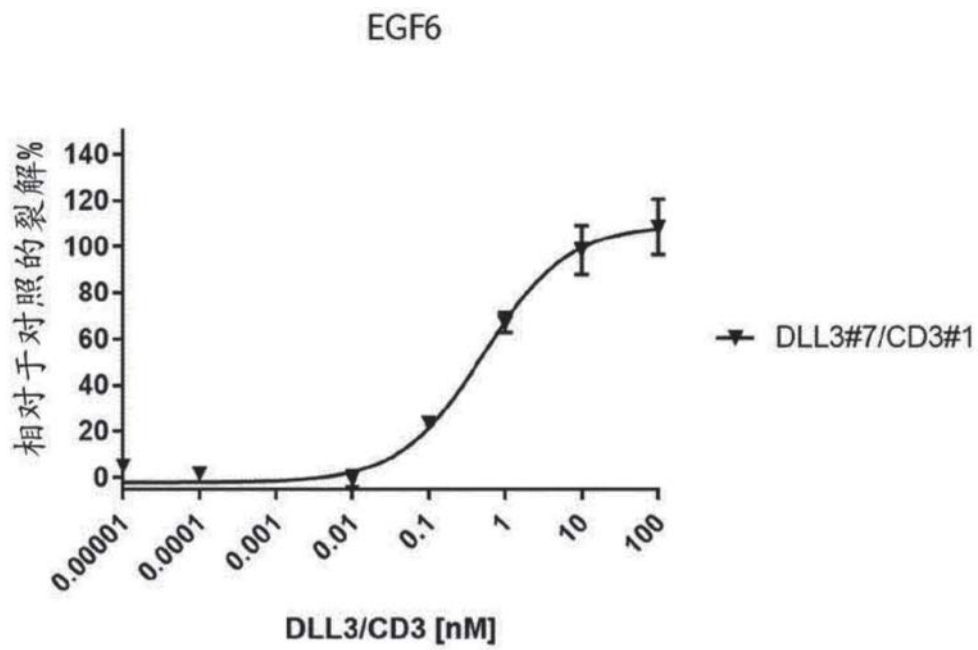


图7G

膜近侧肽

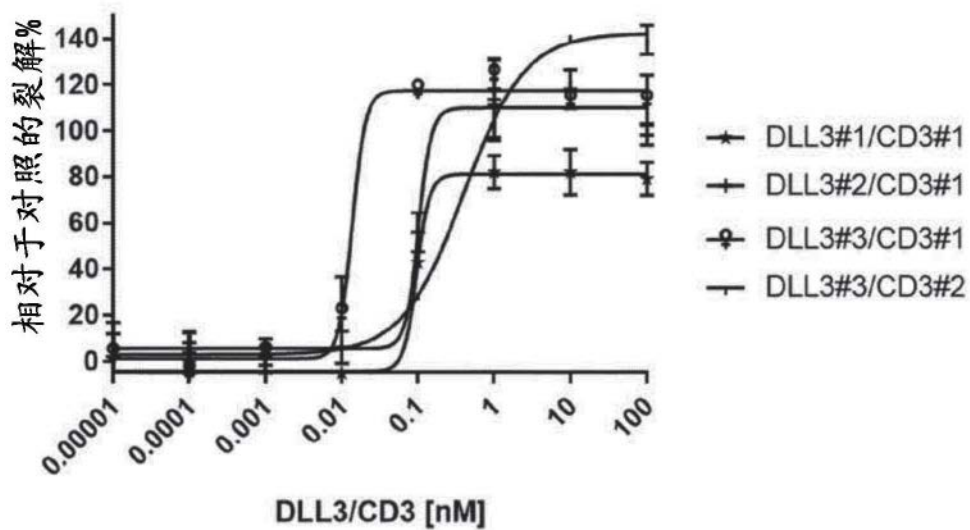


图7H

非DSL-非EGF1-6-非膜近侧肽

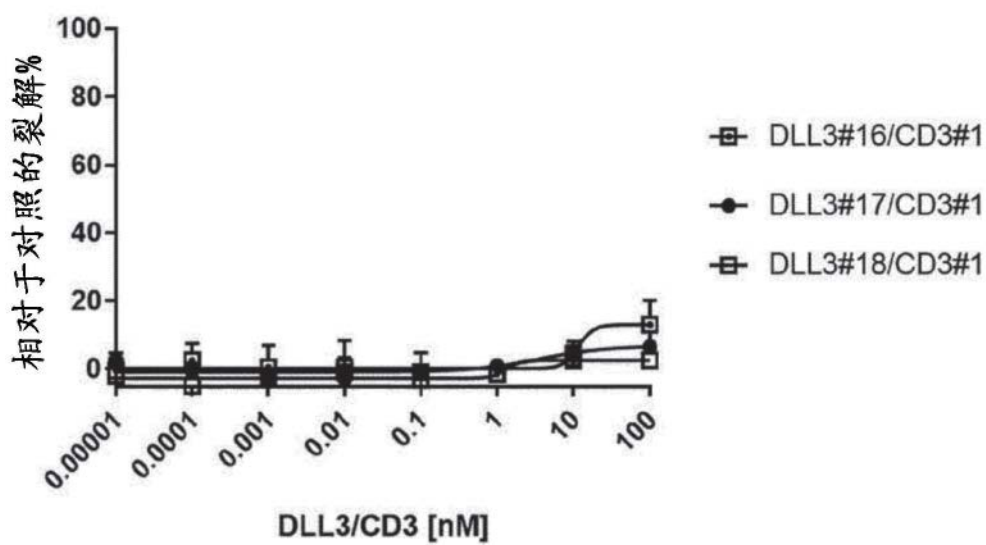


图7I

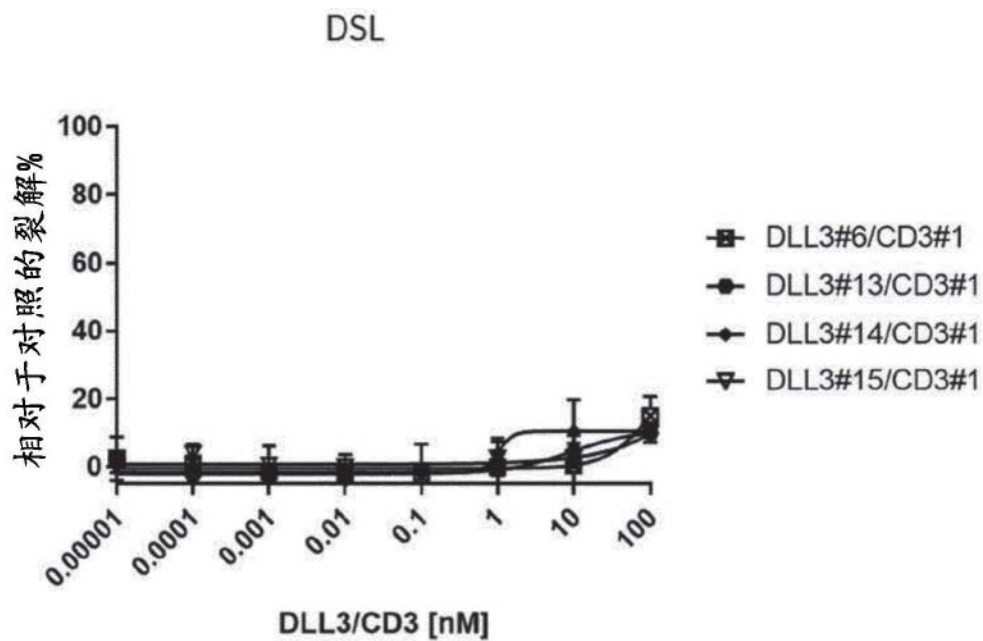


图7J

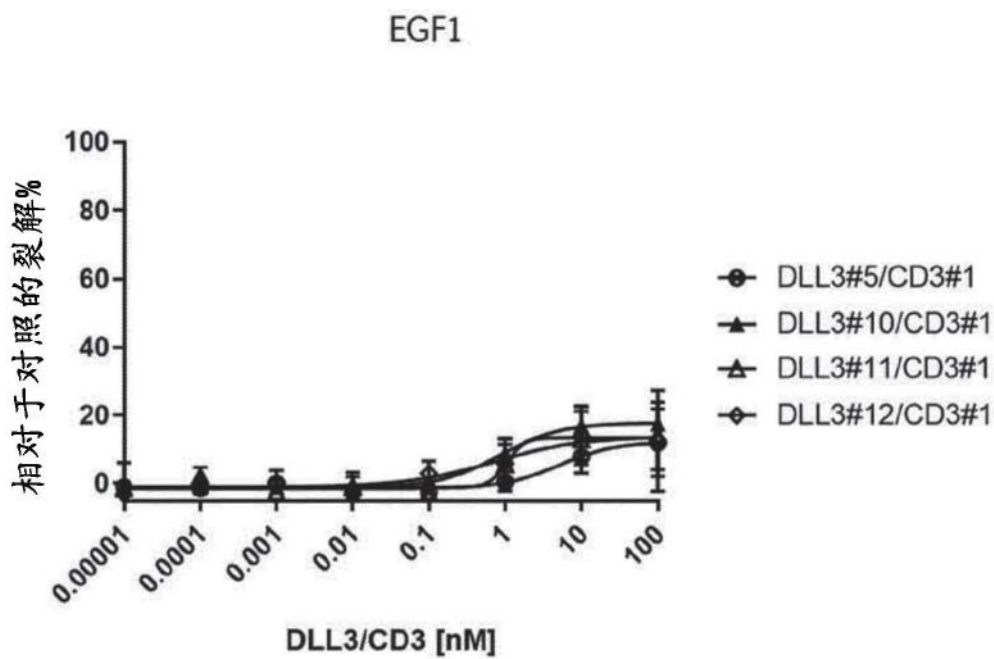


图7K

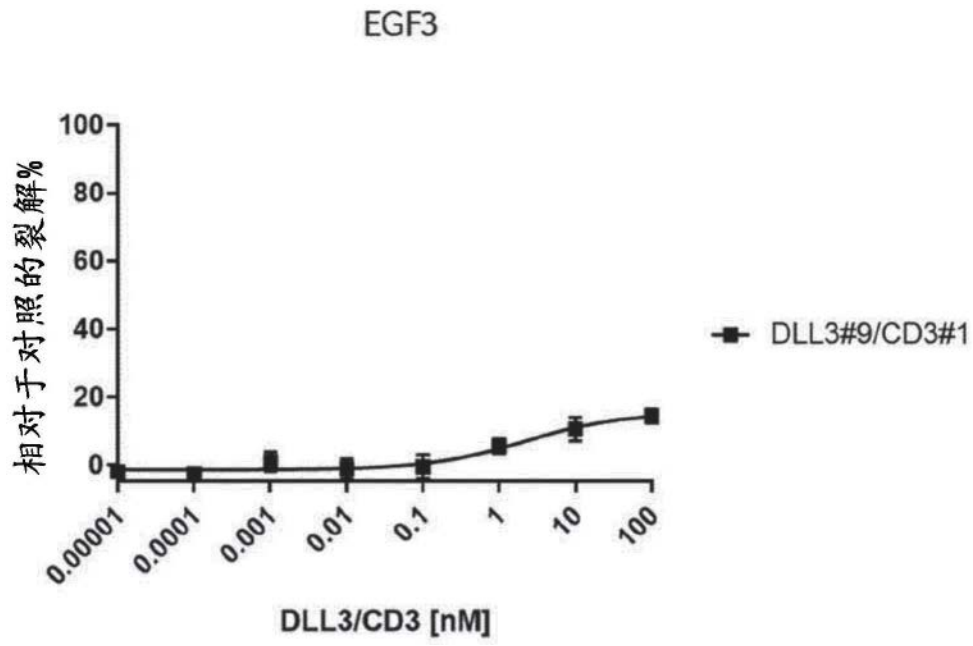


图7L

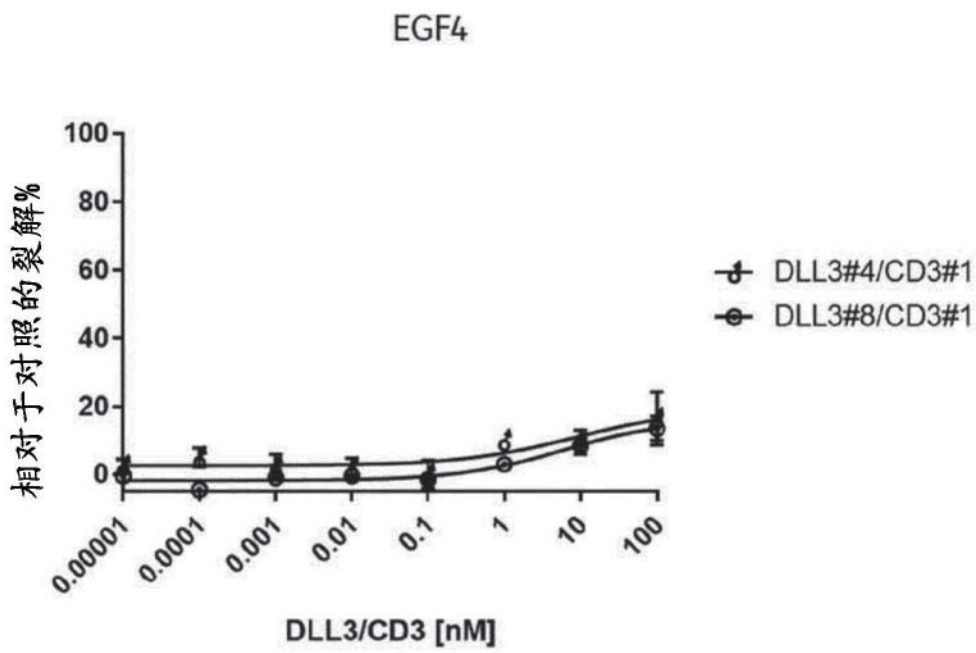


图7M

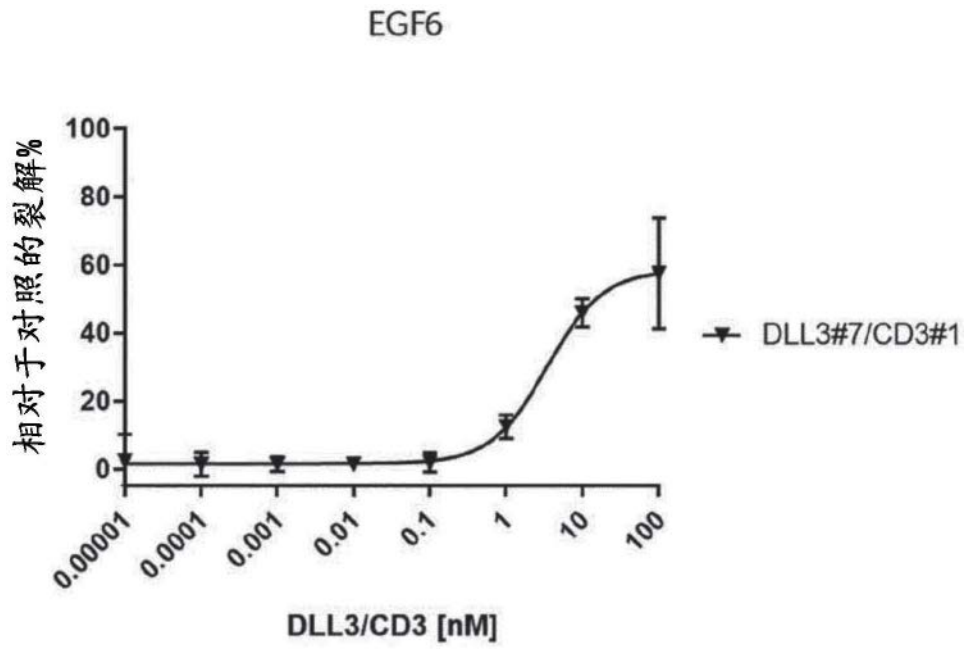


图7N

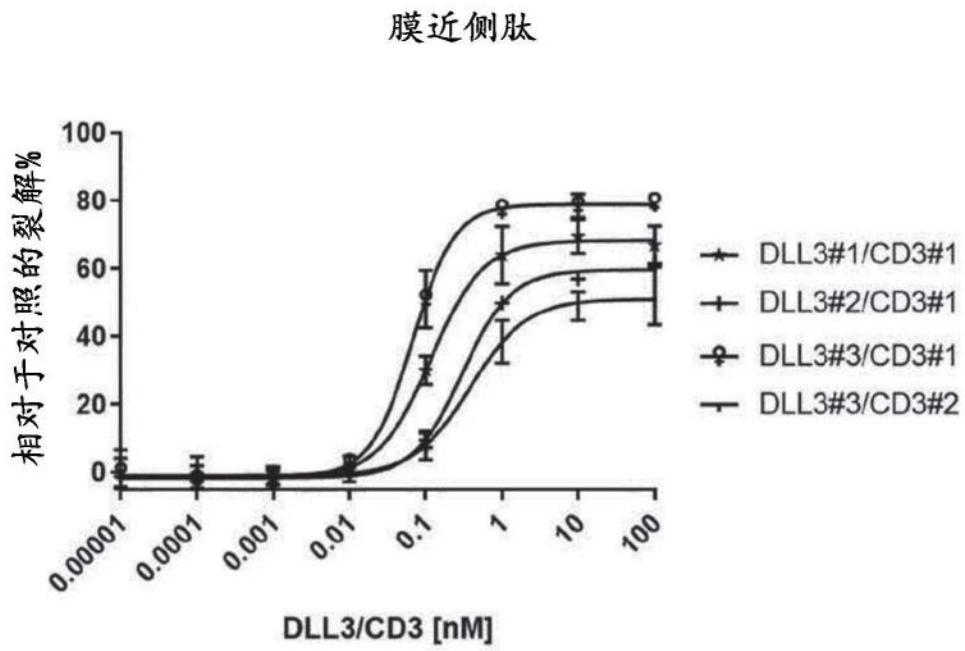


图7O

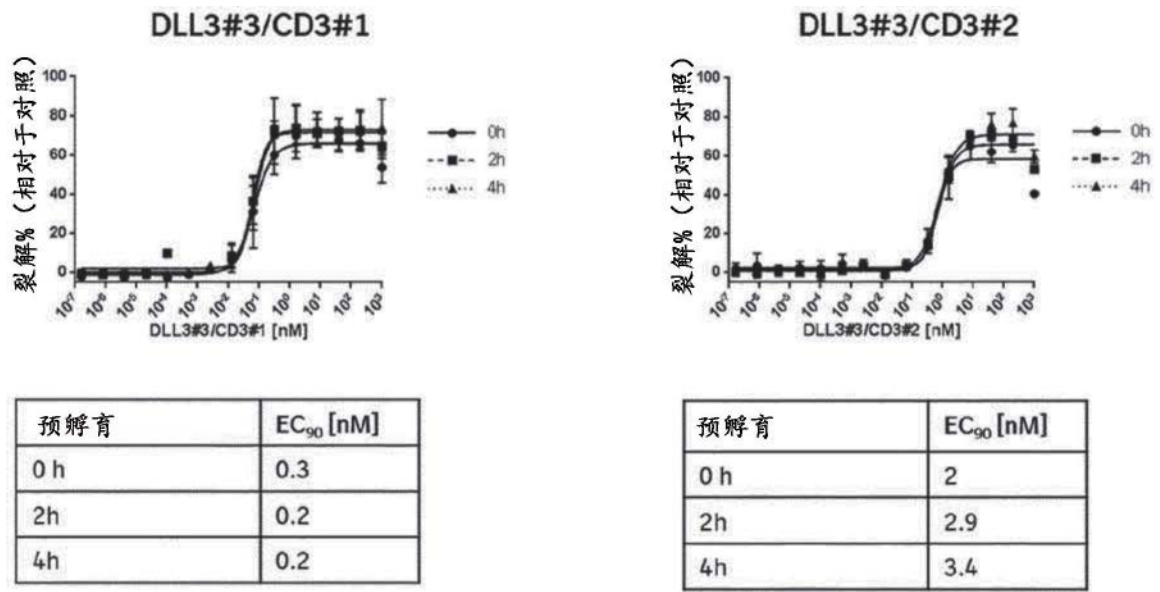


图8

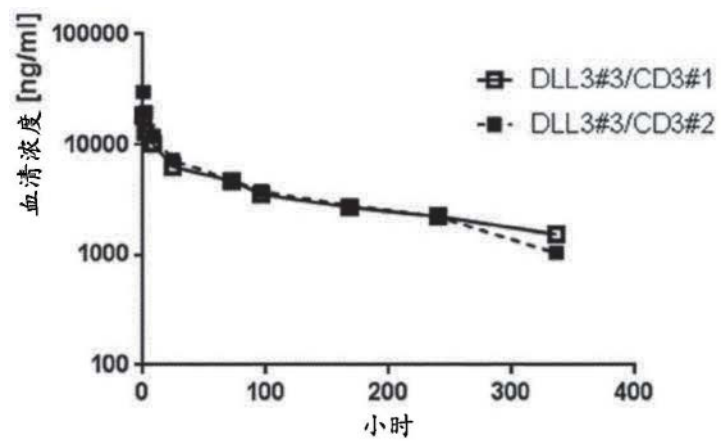


图9

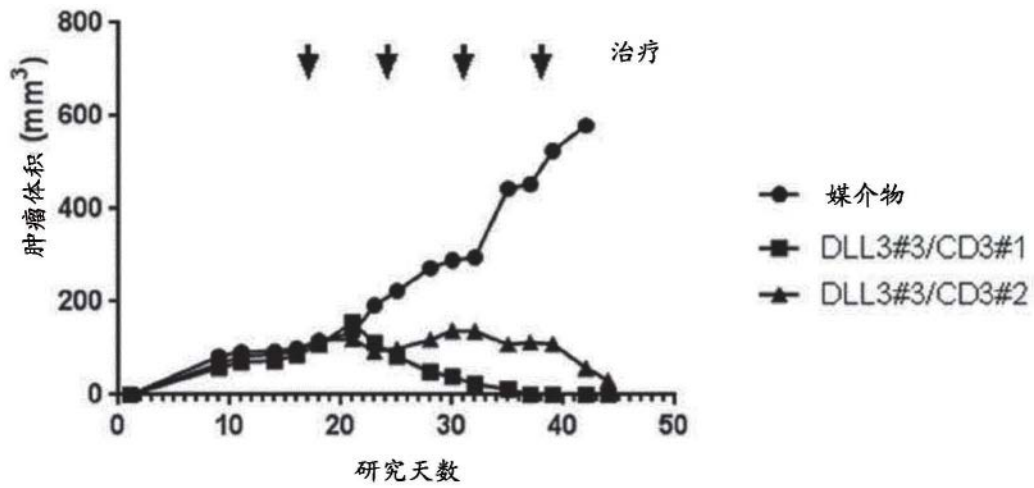


图10

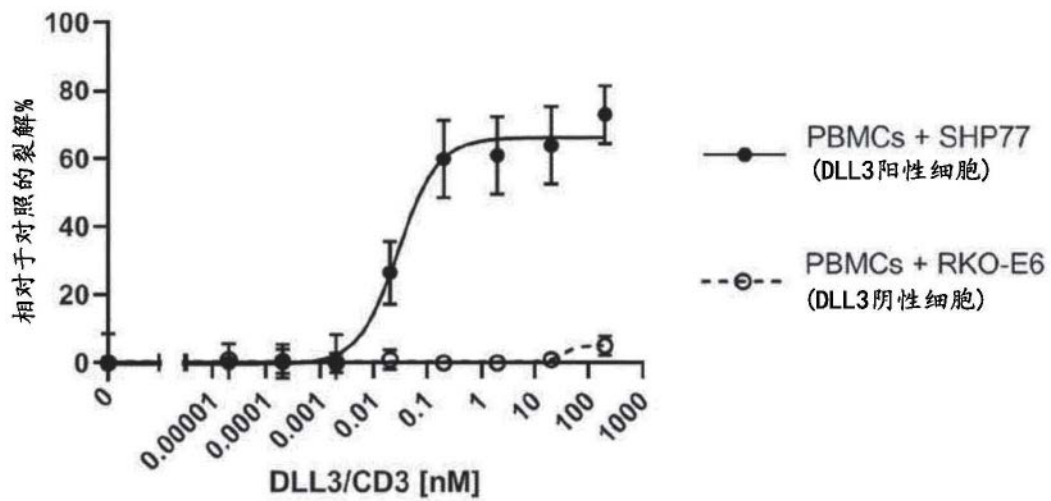


图11

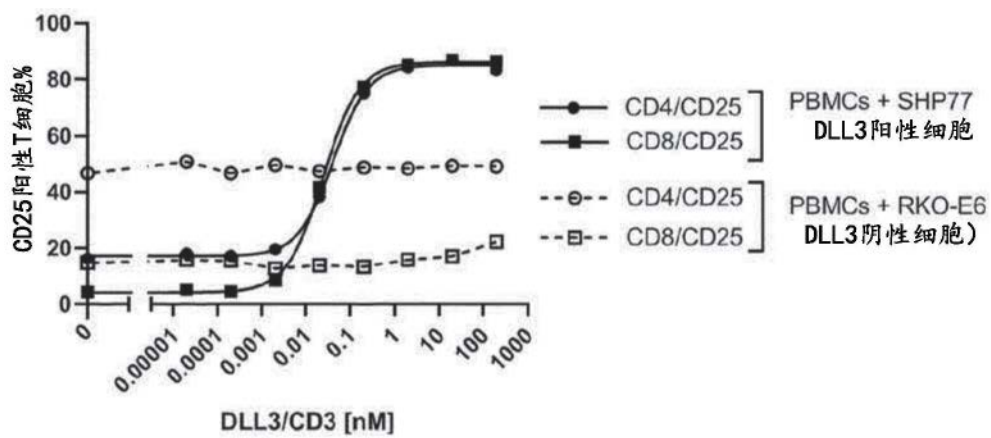


图12

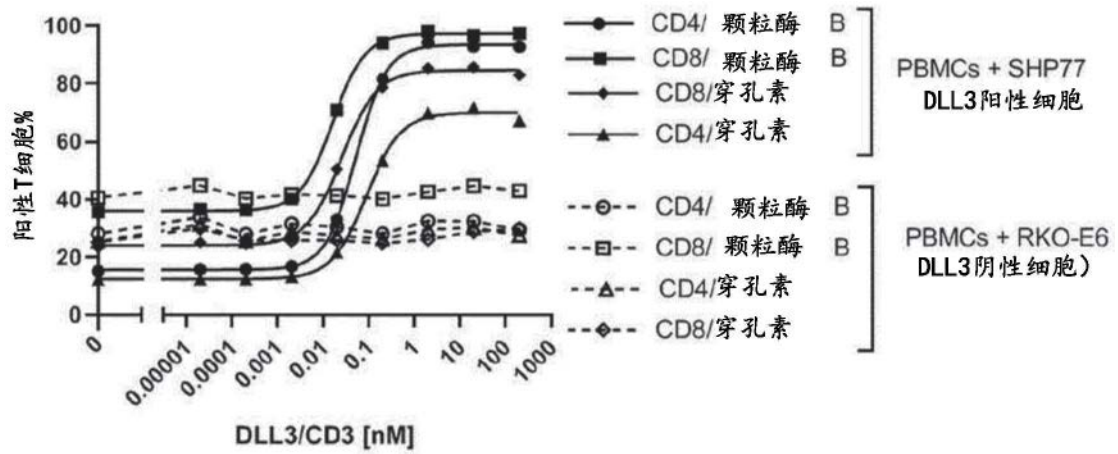


图13

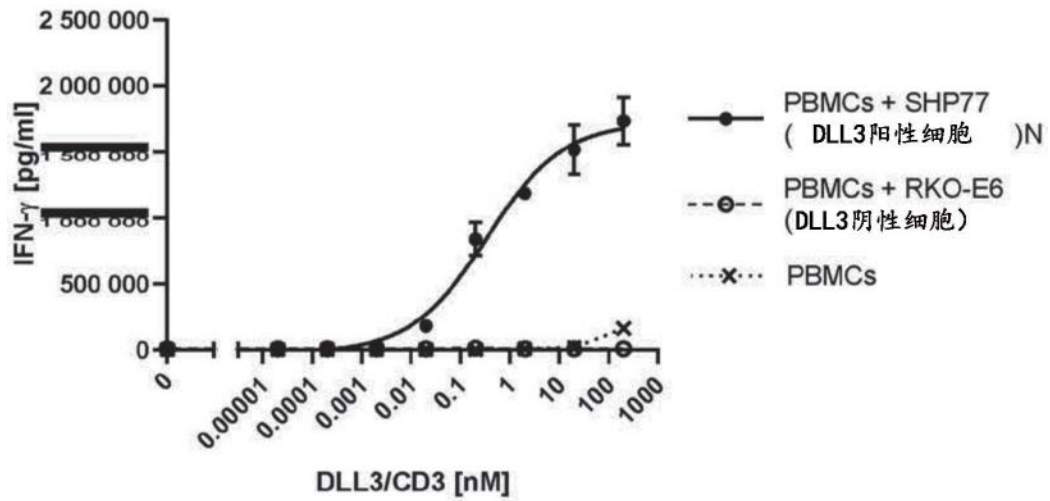


图14A

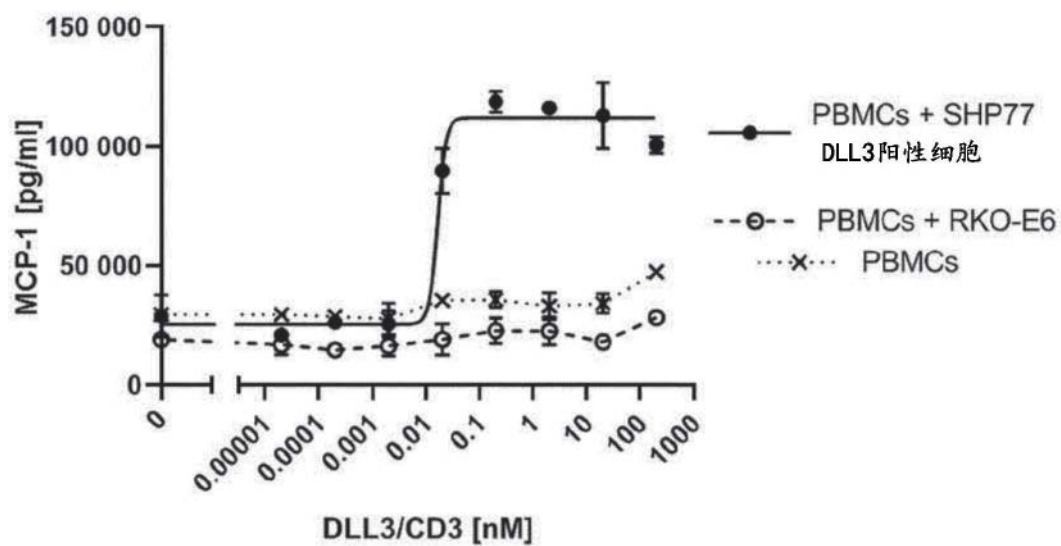


图14B

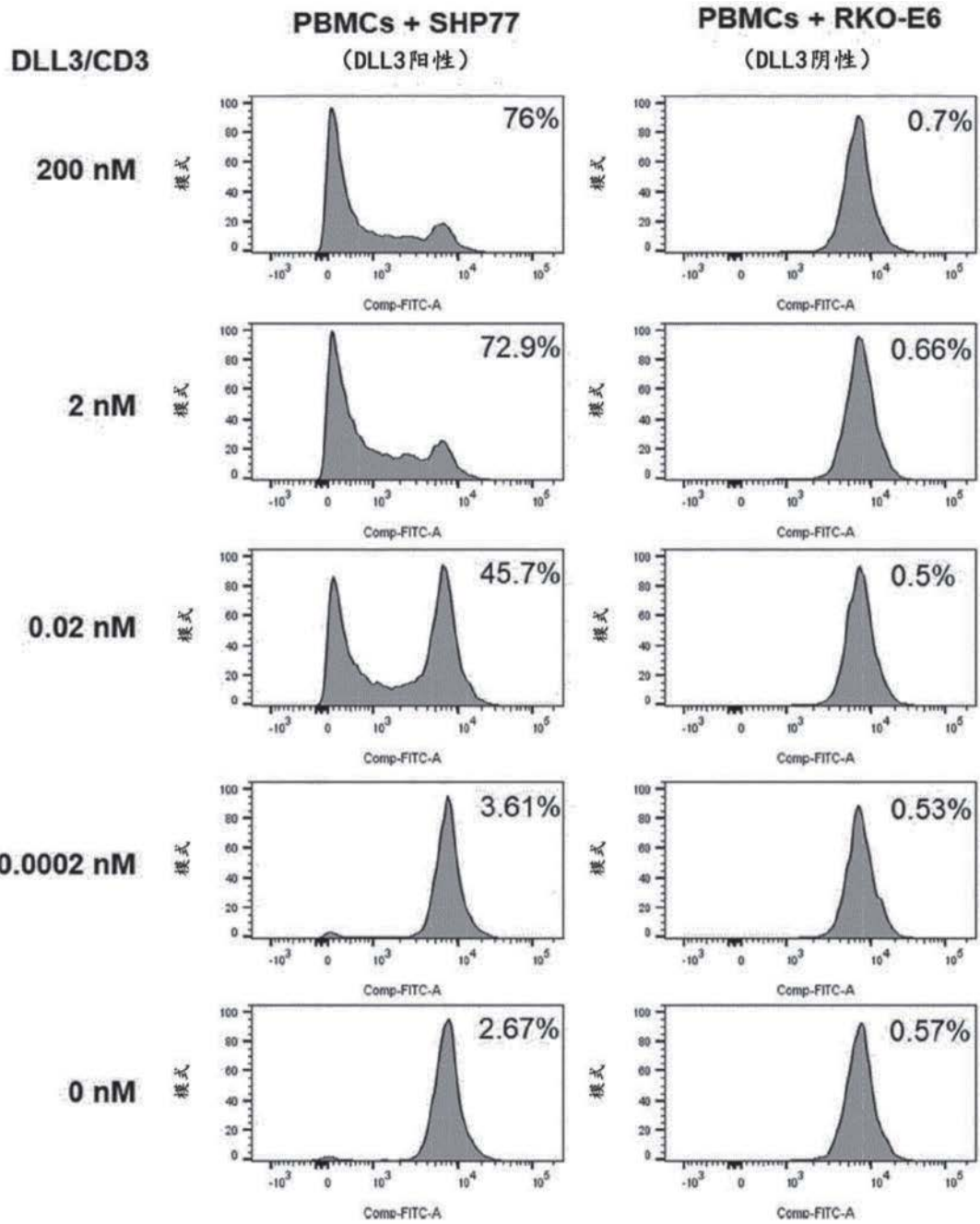


图15

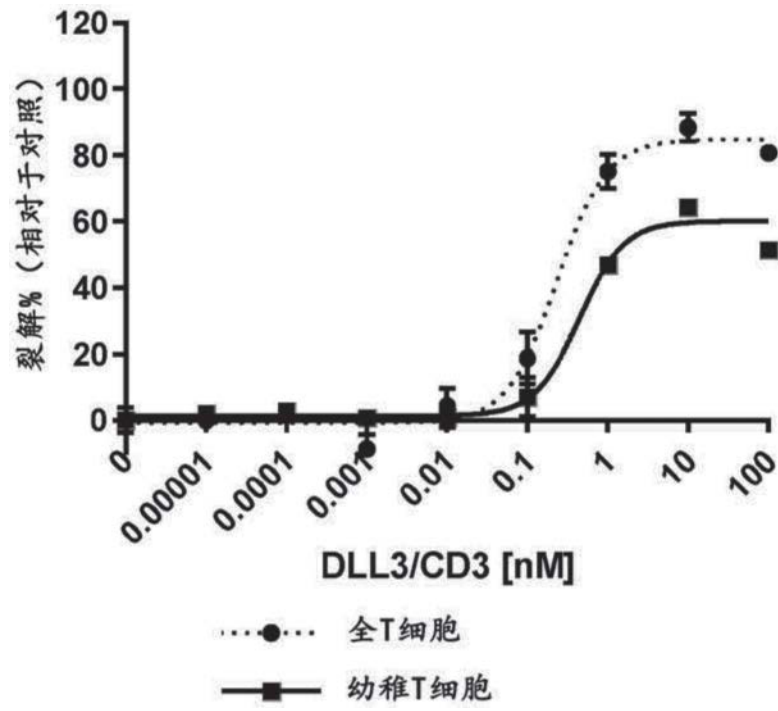


图16

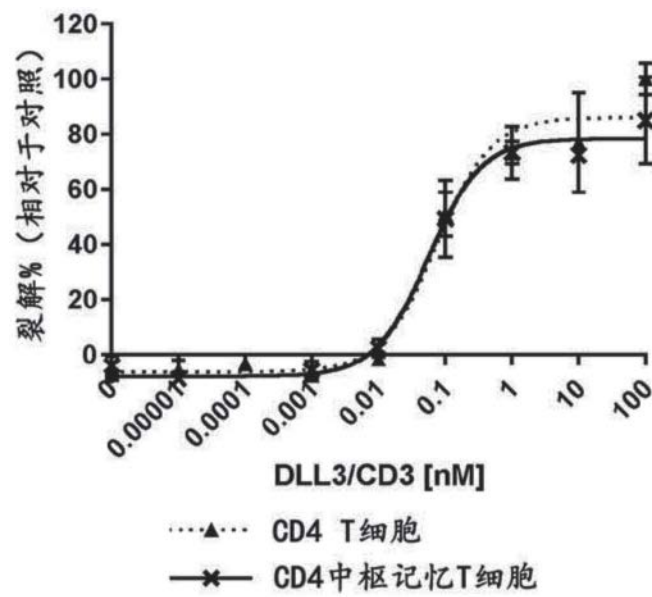


图17

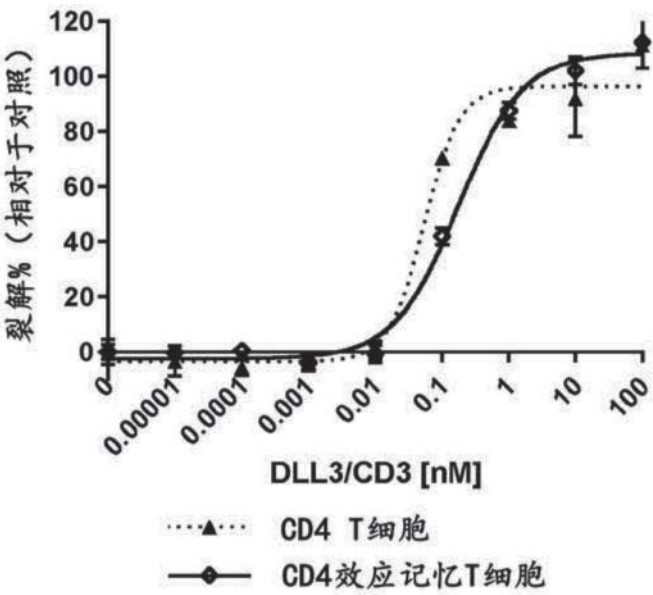


图18

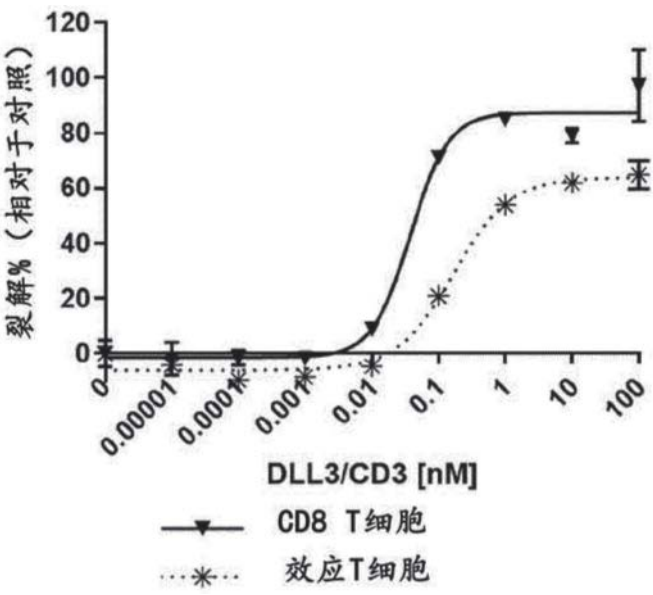


图19

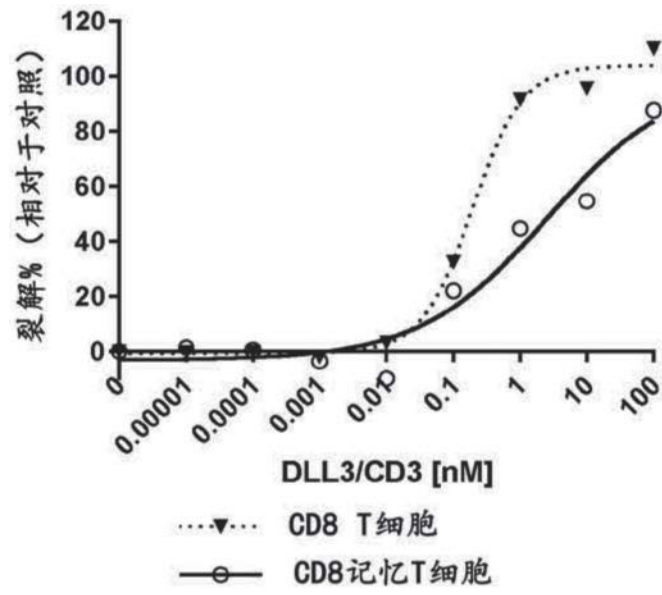


图20

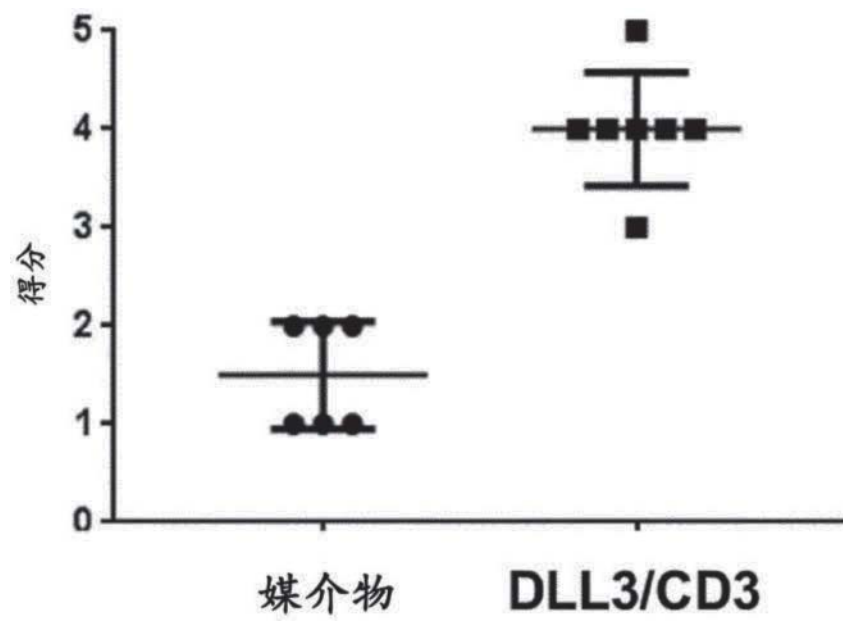


图21

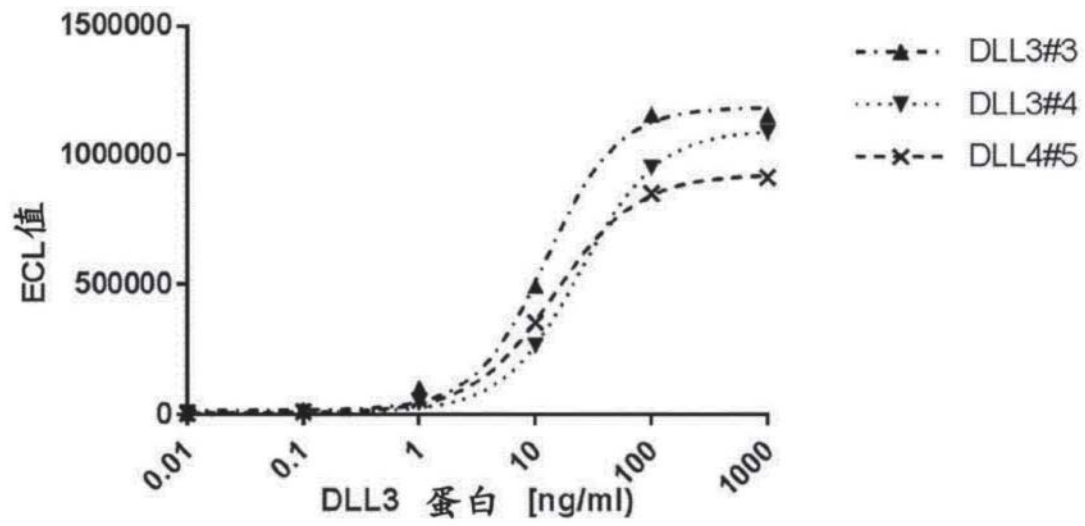


图22

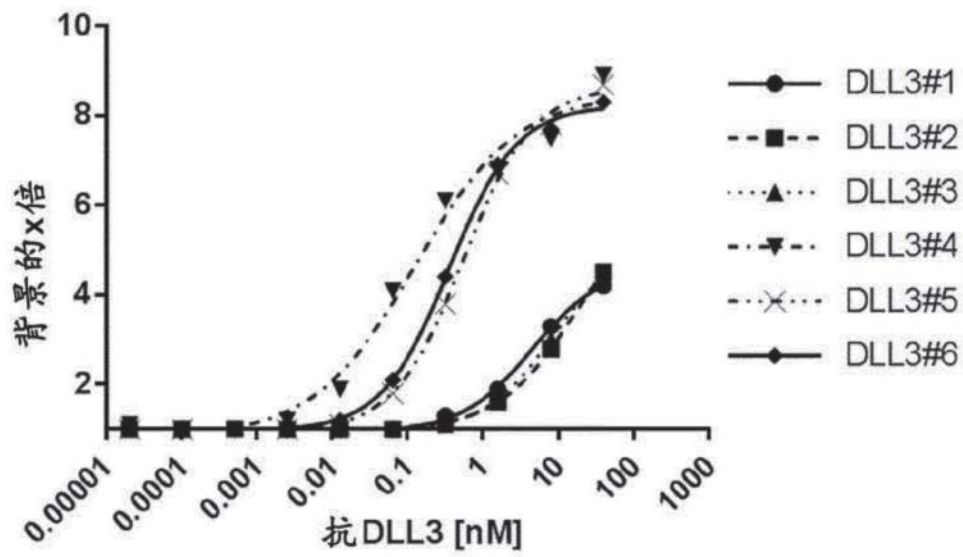


图23

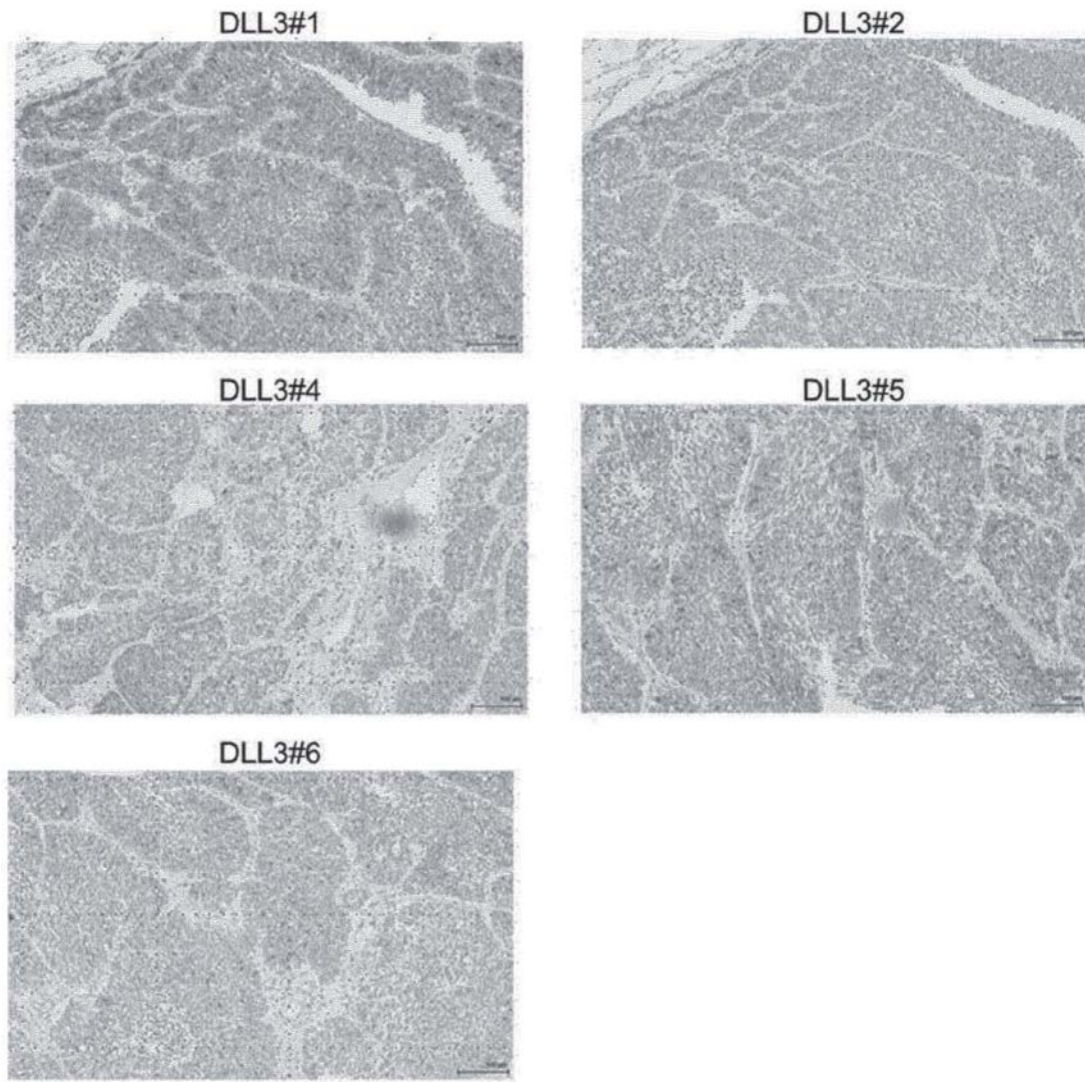


图24

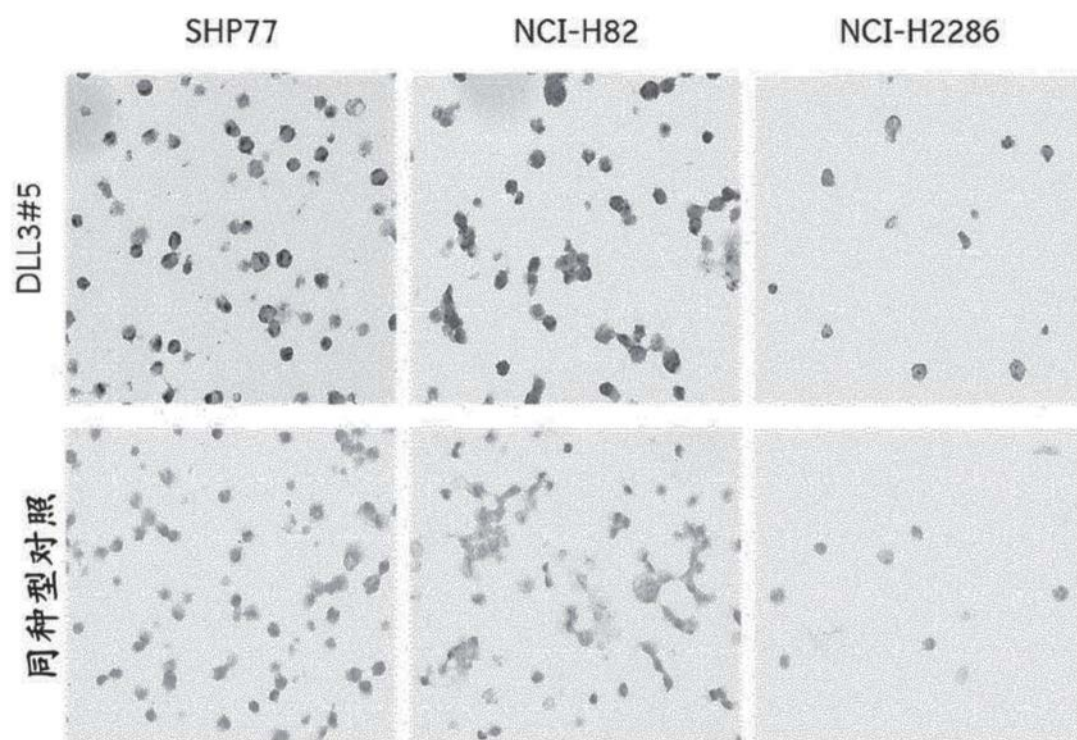


图25