一种包含特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的药物组合物

技术领域

本披露属于生物技术药物制剂领域，具体涉及一种包含特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的药物组合物。

背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

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

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

CD3 是一种表达于 T 细胞上的同种型或异型二聚体抗原。功能性 CD3 由四条不同链：ε、ζ、δ 及 γ 中的两者进行二聚体结合来形成。CD3 二聚体排列包括 γ/ε、δ/ε 及 ζ/ζ。CD3 与 T 细胞受体复合物（TCR）结合且为 T 细胞活化所必需。因此，已提出使用活化 T 细胞的抗 CD3 抗体用于治疗癌症。然而，抗 CD3 抗体的给药可能会触发 T 细胞活化和相关的细胞因子释放，过度的细胞因子释放导致重度细胞因子释放综合征（CRS），其是抗 CD3 抗体在临床用药中的重要挑战。

发明内容

本披露提供了一种特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的药物组合物及其用途。

在一个方面，本披露提供一种药物组合物，包含特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体和缓冲剂。

在一个方面，本披露提供一种药物组合物，包含特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体和缓冲剂，其中：

所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体包含一条具有式 I 所示结构的第一链和一条具有式 II 所示结构的第二链，

式 I： [DLL3-VL]-[连接子 1]- [CD3-VH]- [连接子 2]- [Fc1]，

式 II： [CD3-VL]- [连接子 3]- [DLL3-VH]- [连接子 2]-[Fc2]，

所述 DLL3-VH 具有：包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 DLL3-HCDR1，包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列的 DLL3-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列的 DLL3-HCDR3；和所述 DLL3-VL 具有：包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列的 DLL3-LCDR1，包含 SEQ ID NO：50 的氨基酸序列的 DLL3-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 DLL3-LCDR3；和

所述 CD3-VH 具有：包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列的 CD3-HCDR1，包含 SEQ ID NO：57 的氨基酸序列的 CD3-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：58 的氨基酸序列的 CD3-HCDR3；和所述 CD3-VL 具有：包含 SEQ ID NO：59 的氨基酸序列的 CD3-LCDR1，包含 SEQ ID NO：60 的氨基酸序列的 CD3-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：61 的氨基酸序列的 CD3-LCDR3；

其中：式 I 和式 II 所示的结构是从 N 端至 C 端排列的；所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 是相同或不同的肽连接子；所述 Fc1 和所述 Fc2 是能够以杵臼技术相互缔合的 Fc 区结构序列；

所述缓冲剂为组氨酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂、枸橼酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂或磷酸盐缓冲剂。

在一些实施方式中，如前所述的缓冲剂为组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂、组氨酸-醋酸组氨酸缓冲剂或枸橼酸-枸橼酸钠盐缓冲剂。

在一些实施方式中，如前任一项所述的所述缓冲剂为组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 6.0；优选地，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5；更优选地，所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 4.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 4.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 5.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 5.0。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0。

在一些实施方案中，所述任一项所述的药物组合物的 pH 为 4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9 或 6.0，或者为这些点值之间的任意范围。当本披露中提及点值时，应当理解该点值包含了误差范围。这种误差范围是由于实验室环境、人员操作、仪器、方法学、测量误差等因素所致。以 pH 为例，当测值为约 5.0 时，应当理解其包含了误差范围。作为一个示例，采用工业用 pH 计测量制剂时，“约 5.0”表示 5.0±0.2（即 pH 为 4.8 至 5.2）。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为1 mg/mL至250 mg/mL。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为1 mg/mL至150 mg/mL。在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为5 mg/mL至150 mg/mL。在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为1 mg/mL至120 mg/mL。在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为1 mg/mL至100 mg/mL。在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为5 mg/mL至100 mg/mL。在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为70 mg/mL至70 mg/mL。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为70 mg/mL至150 mg/mL。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为80 mg/mL至120 mg/mL。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为90 mg/mL至110 mg/mL。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为1 mg/mL至20 mg/mL。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为1 mg/mL至10 mg/mL。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为4 mg/mL至6mg/mL。

在一些实施方案中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为约1 mg/mL。在一些实施方案中，所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为1 mg/mL。在一些实施方案中，所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为约5 mg/mL。在一些实施方案中，所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为5 mg/mL。在一些实施方案中，所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为约70 mg/mL。在一些实施方案中，所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为70 mg/mL。在一些实施方案中，所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为约100 mg/mL。在一些实施方案中，所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3的双特异性抗体的浓度为100 mg/mL。在一些实施方案中，所述的药物组合物，其中特异性结合DLL3和CD3

的双特异性抗体的浓度为约 150 mg/mL。在一些实施方案中，所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为 150 mg/mL。

在一些实施方案中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为 1 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL、6 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、45 mg/mL、50 mg/mL、55 mg/mL、60 mg/mL、65 mg/mL、70 mg/mL、75 mg/mL、80 mg/mL、85 mg/mL、90 mg/mL、95 mg/mL、100 mg/mL、105 mg/mL、110 mg/mL、120 mg/mL、130 mg/mL、140 mg/mL、150 mg/mL、160 mg/mL、170 mg/mL、180 mg/mL、190 mg/mL、200 mg/mL、210 mg/mL、220 mg/mL、230 mg/mL、240 mg/mL 或 250 mg/mL，或者为这些点值之间的任意范围。在一些实施方案中，所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为约 1 mg/mL、约 4 mg/mL、约 5 mg/mL、约 6 mg/mL、约 10 mg/mL、约 20 mg/mL、约 30 mg/mL、约 40 mg/mL、约 45 mg/mL、约 50 mg/mL、约 55 mg/mL、约 60 mg/mL、约 65 mg/mL、约 70 mg/mL、约 75 mg/mL、约 80 mg/mL、约 85 mg/mL、约 90 mg/mL、约 95 mg/mL、约 100 mg/mL、约 105 mg/mL、约 110 mg/mL、约 120 mg/mL、约 130 mg/mL、约 140 mg/mL、约 150 mg/mL、约 160 mg/mL、约 170 mg/mL、约 180 mg/mL、约 190 mg/mL、约 200 mg/mL、约 210 mg/mL、约 220 mg/mL、约 230 mg/mL、约 240 mg/mL 或约 250 mg/mL。

在一些实施方案中，如前一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂是非离子表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂选自泊洛沙姆（例如 P188）、聚山梨酯（例如聚山梨酯 20、聚山梨酯 80）、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、柯卡酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲基胺、棕榈酰胺基丙基-二甲基胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇、乙烯与丙烯二醇的共聚物等。

在一些实施方式中，如前所述表面活性剂为聚山梨酯或泊洛沙姆。在一些实施方式中，所述表面活性剂为聚山梨酯。在一些实施方式中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80 或泊洛沙姆 188（P188）。在一些实施方式中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述聚山梨酯 80 的浓度为 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL。在一些实施方案中，所述聚山梨酯 80 的浓度为 0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL。在一些实施方案中，所述聚山梨酯 80 的浓度为 0.2 mg/mL 至 0.6 mg/mL。在一些实施方案中，所述聚山梨酯 80 的浓度为 0.3 mg/mL 至 0.5

mg/mL。在一些实施方案中，所述聚山梨酯 80 的浓度为约 0.1 mg/mL。在一些实施方案中，所述聚山梨酯 80 的浓度为 0.1 mg/mL。在一些实施方案中，所述聚山梨酯 80 的浓度为约 0.4 mg/mL。在一些实施方案中，所述聚山梨酯 80 的浓度为 0.4 mg/mL。在一些实施方案中，所述聚山梨酯 80 的浓度为约 1.0 mg/mL。在一些实施方案中，所述聚山梨酯 80 的浓度为 1.0 mg/mL。在一些实施方案中，所述聚山梨酯 80 浓度为 0.01 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.15 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL、0.6 mg/mL、0.7 mg/mL、0.8 mg/mL、0.9 mg/mL 或 1.0 mg/mL，或者为这些点值之间的任意范围。在一些实施方案中，所述聚山梨酯 80 浓度为约 0.01 mg/mL、约 0.05 mg/mL、约 0.1 mg/mL、约 0.15 mg/mL、约 0.2 mg/mL、约 0.3 mg/mL、约 0.4 mg/mL、约 0.5 mg/mL、约 0.6 mg/mL、约 0.7 mg/mL、约 0.8 mg/mL、约 0.9 mg/mL 或约 1.0 mg/mL。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述泊洛沙姆 188 的浓度为 0.5 mg/mL 至 5 mg/mL。在一些实施方案中，所述泊洛沙姆 188 的浓度为 1 mg/mL 至 3 mg/mL。在一些实施方案中，所述泊洛沙姆 188 的浓度为 1.5 mg/mL 至 2.5 mg/mL。在一些实施方案中，所述泊洛沙姆 188 的浓度为 1.8 mg/mL 至 2.2 mg/mL。在一些实施方案中，所述泊洛沙姆 188 的浓度为约 2mg/mL。在一些实施方案中，所述泊洛沙姆 188 的浓度为 2mg/mL。在一些实施方案中，所述泊洛沙姆 188 浓度为 0.5 mg/mL、0.8 mg/mL、0.9 mg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL、1.6 mg/mL、1.7 mg/mL、1.8 mg/mL、1.9 mg/mL、2 mg/mL、2.1 mg/mL、2.2mg/mL、2.3 mg/mL、2.4 mg/mL、2.5 mg/mL、2.6 mg/mL、2.8 mg/mL、3 mg/mL、3.5 mg/mL、4 mg/mL、4.5 mg/mL 或 5.0 mg/mL，或者为这些点值之间的任意范围。在一些实施方案中，所述泊洛沙姆 188 浓度为约 0.5 mg/mL、约 0.8 mg/mL、约 0.9 mg/mL、约 1 mg/mL、约 1.5 mg/mL、约 1.6 mg/mL、约 1.7 mg/mL、约 1.8 mg/mL、约 1.9 mg/mL、约 2 mg/mL、约 2.1 mg/mL、约 2.2mg/mL、约 2.3 mg/mL、约 2.4 mg/mL、约 2.5 mg/mL、约 2.6 mg/mL、约 2.8 mg/mL、约 3 mg/mL、约 3.5 mg/mL、约 4 mg/mL、约 4.5 mg/mL 或约 5.0 mg/mL。

在一些实施方案中，如前任一项所述的药物组合物，其包含糖。在一些实施方案中，所述糖选自常规组合物$(CH_2O)_n$及其衍生物，包括单糖，二糖，三糖，多糖，糖醇，还原性糖，非还原性糖等等。所述的糖可选自蔗糖，海藻糖，葡萄糖，乳糖，果糖，麦芽糖，右旋糖苷，甘油，赤藻糖醇，丙三醇，阿拉伯糖醇，sylitol，山梨糖醇，甘露醇，密二糖，松三糖，蜜三糖，甘露三糖，水苏糖，麦芽糖，乳果糖，麦芽酮糖，山梨醇，麦芽糖醇，乳糖醇，异-麦芽酮糖等。

在一些实施方式中，如前所述的糖为蔗糖、海藻糖、甘露醇或山梨糖醇。在一些实施方式中，所述糖为蔗糖。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述糖的浓度为 10 mg/mL 至 120 mg/mL。在一些实施方式中，所述糖的浓度为 30 mg/mL 至 100 mg/mL。

在一些实施方式中，所述所述糖的浓度为 64 mg/mL 至 96 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 68 mg/mL 至 92 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 72 mg/mL 至 88 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为约 30 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为约 80 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为约 100 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度非限制性实施包括 10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、35 mg/mL、37.5 mg/mL、40 mg/mL、45 mg/mL、50 mg/mL、55 mg/mL、60 mg/mL、64 mg/mL、65 mg/mL、68 mg/mL、70 mg/mL、72 mg/mL、75 mg/mL、80 mg/mL、85 mg/mL、88 mg/mL、90 mg/mL、92 mg/mL、95 mg/mL、96 mg/mL、100 mg/mL 或 120 mg/mL，以及这些点值之间的任一范围。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 30 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 80 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 100 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度非限制性实施包括约 10 mg/mL、约 20 mg/mL、约 30 mg/mL、约 35 mg/mL、约 37.5 mg/mL、约 40 mg/mL、约 45 mg/mL、约 50 mg/mL、约 55 mg/mL、约 60 mg/mL、约 64 mg/mL、约 65 mg/mL、约 68 mg/mL、约 70 mg/mL、约 72 mg/mL、约 75 mg/mL、约 80 mg/mL、约 85 mg/mL、约 88 mg/mL、约 90 mg/mL、约 92 mg/mL、约 95 mg/mL、约 96 mg/mL、约 100 mg/mL 或约 120 mg/mL。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述蔗糖的浓度为 10 mg/mL 至 120 mg/mL。在一些实施方式中，所述蔗糖的浓度为 30 mg/mL 至 100 mg/mL。在一些实施方式中，所述所述蔗糖的浓度为 64 mg/mL 至 96 mg/mL。在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为 68 mg/mL 至 92 mg/mL。在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为 72 mg/mL 至 88 mg/mL。在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为约 30 mg/mL。在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为约 80 mg/mL。在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为约 100 mg/mL。在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度非限制性实施包括 10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、35 mg/mL、37.5 mg/mL、40 mg/mL、45 mg/mL、50 mg/mL、55 mg/mL、60 mg/mL、64 mg/mL、65 mg/mL、68 mg/mL、70 mg/mL、72 mg/mL、75 mg/mL、80 mg/mL、85 mg/mL、88 mg/mL、90 mg/mL、92 mg/mL、95 mg/mL、96 mg/mL、100 mg/mL 或 120 mg/mL，以及这些点值之间的任一范围。在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为 30 mg/mL。在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为 80 mg/mL。在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度为 100 mg/mL。在一些实施方案中，所述蔗糖的浓度非限制性实施包括约 10 mg/mL、约 20 mg/mL、约 30 mg/mL、约 35 mg/mL、约 37.5 mg/mL、约 40 mg/mL、约 45 mg/mL、约 50 mg/mL、约 55 mg/mL、约 60 mg/mL、约 64 mg/mL、约 65 mg/mL、约 68 mg/mL、约 70 mg/mL、约 72 mg/mL、约 75 mg/mL、约 80 mg/mL、约 85 mg/mL、约 88 mg/mL、约 90 mg/mL、约 92 mg/mL、约 95 mg/mL、约 96 mg/mL、约 100 mg/mL 或约 120 mg/mL。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 100 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 10 mM 至 50 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 10 mM 至 30 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 15 mM 至 25 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 24 mM 至 36 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 27 mM 至 33 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 14 mM 至 22 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 16 mM 至 20 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为约 30 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为约 18 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 5mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20mM、21 mM、22 mM、23 mM、24 mM、25mM、27mM、30mM、33 mM、36 mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM 或 100mM，以及这些点值之间的任一范围。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 30 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 18 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为约 5mM、约 6 mM、约 7 mM、约 8 mM、约 9 mM、约 10mM、约 11 mM、约 12 mM、约 13 mM、约 14 mM、约 15mM、约 16 mM、约 17 mM、约 18 mM、约 19 mM、约 20mM、约 21 mM、约 22 mM、约 23 mM、约 24 mM、约 25mM、约 27mM、约 30mM、约 33 mM、约 36 mM、约 40mM、约 50mM、约 60mM、约 70mM、约 80mM、约 90mM 或约 100mM。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为 5 mM 至 100 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为 10 mM 至 50 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为 10 mM 至 30 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为 15 mM 至 25 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为 24 mM 至 36 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为 27 mM 至 33 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为 14 mM 至 22 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为 16 mM 至 20 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为约 30 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为约 18 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为 5mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20mM、21 mM、22 mM、23 mM、24 mM、25mM、27mM、30mM、33 mM、36 mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM 或 100mM，以及这些点值之间的任一范围。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为 30 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为 18 mM。在一些实施方案中，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的浓度为约 5mM、约 6 mM、

约 7 mM、约 8 mM、约 9 mM、约 10mM、约 11 mM、约 12 mM、约 13 mM、约 14 mM、约 15mM、约 16 mM、约 17 mM、约 18 mM、约 19 mM、约 20mM、约 21 mM、约 22 mM、约 23 mM、约 24 mM、约 25mM、约 27mM、约 30mM、约 33 mM、约 36 mM、约 40mM、约 50mM、约 60mM、约 70mM、约 80mM、约 90mM 或约 100mM。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含辅料；优选地，所述辅料为二水合乙二胺四乙酸二钠、DTPA(二乙烯三胺五乙酸)、盐酸精氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、氯化钠或氯化钙；更优选地，所述辅料为二水合乙二胺四乙酸二钠。本披露中乙二胺四乙酸二钠或二水合乙二胺四乙酸二钠含二水，简称 EDTA-2Na，CAS 号为：6381-92-6。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述辅料的浓度为 0.01 mg/mL 至 1 mg/mL；优选地，辅料的浓度为 0.01 mg/mL 至 0.5 mg/mL；更优选地，辅料的浓度为 0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL。在一些实施方案中，所述辅料的浓度为 0.01 mg/mL 至 0.2 mg/mL。在一些实施方案中，所述辅料的浓度为 0.01 mg/mL 至 0.12 mg/mL。在一些实施方案中，所述辅料的浓度为 0.01 mg/mL 至 0.1 mg/mL。在一些实施方案中，所述辅料的浓度为 0.09 mg/mL 至 0.11 mg/mL。在一些实施方案中，所述辅料的浓度为约 0.01 mg/mL。在一些实施方案中，所述辅料的浓度为约 0.1 mg/mL。在一些实施方案中，所述辅料的浓度为约 1 mg/mL。在一些实施方案中，所述辅料的浓度为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.08 mg/mL、0.09 mg/mL、0.1 mg/mL、0.11 mg/mL、0.12 mg/mL、0.13 mg/mL、0.14 mg/mL、0.15 mg/mL、0.2 mg/mL、 0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL、0.6 mg/mL、0.7 mg/mL、0.8 mg/mL、0.9 mg/mL 或 1 mg/mL，以及这些点值之间的任一范围。在一些实施方案中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述辅料的浓度为 0.01 mg/mL。在一些实施方案中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述辅料的浓度为 0.1 mg/mL。在一些实施方案中，如请任一项所述的药物组合物，其中所述辅料的浓度为 1 mg/mL。在一些实施方案中，所述辅料的浓度为约 0.01 mg/mL、约 0.03 mg/mL、约 0.05 mg/mL、约 0.08 mg/mL、约 0.09 mg/mL、约 0.1 mg/mL、约 0.11 mg/mL、约 0.12 mg/mL、约 0.13 mg/mL、约 0.14 mg/mL、约 0.15 mg/mL、约 0.2 mg/mL、约 0.3 mg/mL、约 0.4 mg/mL、约 0.5 mg/mL、约 0.6 mg/mL、约 0.7 mg/mL、约 0.8 mg/mL、约 0.9 mg/mL 或约 1 mg/mL。

在一些实施方案中，如前任一项所述的药物组合物，其中所述辅料为 0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述辅料为 0.01 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述辅料为0.01 mg/mL至0.2 mg/mL的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述辅料为 0.01 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方

案中，所述辅料为 0.01 mg/mL 至 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述辅料为 0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述辅料为 0.09 mg/mL 至 0.11 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述辅料为约 0.01 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述辅料为约 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述辅料为约 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述乙二胺四乙酸二钠的浓度为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.08 mg/mL、0.09 mg/mL、0.1 mg/mL、0.11 mg/mL、0.12 mg/mL、0.13 mg/mL、0.14 mg/mL、0.15 mg/mL、0.2 mg/mL、 0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL、0.6 mg/mL、0.7 mg/mL、0.8 mg/mL、0.9 mg/mL 或 1 mg/mL，以及这些点值之间的任一范围。在一些实施方案中，所述辅料为 0.01 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述辅料为 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述辅料为 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述乙二胺四乙酸二钠的浓度为约 0.01 mg/mL、约 0.03 mg/mL、约 0.05 mg/mL、约 0.08 mg/mL、约 0.09 mg/mL、约 0.1 mg/mL、约 0.11 mg/mL、约 0.12 mg/mL、约 0.13 mg/mL、约 0.14 mg/mL、约 0.15 mg/mL、约 0.2 mg/mL、 约 0.3 mg/mL、约 0.4 mg/mL、约 0.5 mg/mL、约 0.6 mg/mL、约 0.7 mg/mL、约 0.8 mg/mL、约 0.9 mg/mL 或约 1 mg/mL。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体中：

所述 DLL3-VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示的氨基酸序列，和所述 DLL3-VL 包含如 SEQ ID NO：42 所示的氨基酸序列；和

所述 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：62 的氨基酸序列，和所述 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：63 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体中：

所述 DLL3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：33 所示，和所述 DLL3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：42 所示；和

所述 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：62 所示，和所述 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：63 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，其中所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构，和所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体中所述 Fc1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：64 所示；和所述 Fc2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：65 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体中所述 Fc1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：66 所示；和所述 Fc2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：67 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体中，所述的连接子 1、连接子 2 和连接子 3 均为本领域已知的肽连接子，只要双特异性抗体能够展现出期望的抗原结合活性。例如，肽连接子可以是包含 1-50 或 3-20 个氨基酸残基的柔性肽。在一些实施方案中，所述肽连接子的长度为 1-15 个氨基酸残基。在一些实施方案中，所述连接子 1 具有如序列通式(GGGS)nGm 所示的结构，其中 n 是 1-5，优选为 1、2 或 3；m 为 1-10，优选为 4、5、6、7 或 8。在一些实施方案中，所述连接子 1 的序列为 GGGSGGGG（SEQ ID NO：68）。在一些实施方案中，所述连接子 2 具有序列通式 Gm 所示的结构，其中 m 为 1-10，优选为 1-5，更优选为 1、2 或 3。在一些实施方案中，连接子 2 的序列为 G（SEQ ID NO：69）。在一些实施方案中，所述连接子 3 具有如序列通式(GGGGS)nGm 所示的结构，其中 n 是 1-5，优选为 1、2 或 3；m 为 1-10，优选为 4、5、6、7 或 8。在一些实施方案中，连接子 3 的序列为 GGGGSGGGG（SEQ ID NO：70）。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体中所述的连接子 1、连接子 2 和连接子 3 相同或不同，氨基酸序列各自独立地选自 SEQ ID NO：68、SEQ ID NO：69 和 SEQ ID NO：70。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体中所述的连接子 1、连接子 2 和连接子 3 的氨基酸序列依次为 SEQ ID NO：68、SEQ ID NO：69 和 SEQ ID NO：70。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体中：

式 I 即链 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：71 所示，和式 II 即链 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：72 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 250 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 0.5 mg/mL 至 5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）10 mg/mL 至 120 mg/mL 的糖，和

（d）5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 6.0。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 250 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 0.5 mg/mL 至 5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）10 mg/mL 至 120 mg/mL 的糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 6.0。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 0.5 mg/mL 至 5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，和

（d）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂、组氨酸-醋酸组氨酸缓冲剂或枸橼酸-枸橼酸钠盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 0.5 mg/mL 至 5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂、组氨酸-醋酸组氨酸缓冲剂或枸橼酸-枸橼酸钠盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 1 mg/mL 至 3 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，和

（d）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 1 mg/mL 至 3 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）70 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.2 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 1 mg/mL 至 3 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，和

（d）10 mM 至 30 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）70 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.2 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 1 mg/mL 至 3 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 30 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）80 mg/mL 至 120 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.3 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 1.5 mg/mL 至 2.5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，和

（d）15 mM 至 25 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）80 mg/mL 至 120 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.3 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 1.5 mg/mL 至 2.5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）15 mM 至 25 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 250 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）10 mg/mL 至 120 mg/mL 的糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 6.0。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，和

（e）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）70 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.2 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 30 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）80 mg/mL 至 120 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.3 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）15 mM 至 25 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 250 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.5 mg/mL 至 5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）10 mg/mL 至 120 mg/mL 的糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 6.0。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）1 mg/mL 至 3 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）70 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）1 mg/mL 至 3 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 30 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）80 mg/mL 至 120 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）1.5 mg/mL 至 2.5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）15 mM 至 25 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）约 100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）约 80 mg/mL 的蔗糖，

（d）约 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）约 30 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）约 100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）约 80 mg/mL 的蔗糖，

（d）约 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e)约 30 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂;所述药物组合物的 pH 为约 5.0。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）80 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e)30 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂;所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）约 100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）约 80 mg/mL 的蔗糖，

（d）约 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）约 18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）80 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e)18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂;所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）约 100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）约 80 mg/mL 的蔗糖，

（d）约 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e)约 18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂;所述药物组合物的 pH 为约 5.0。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）80 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.0。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）约 100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）约 80 mg/mL 的蔗糖，和

（d）约 30 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）80 mg/mL 的蔗糖，和

（d）30 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）约 100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）约 80 mg/mL 的蔗糖，和

（d）约 18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）80 mg/mL 的蔗糖，和

（d）18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）约 100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）约 80 mg/mL 的蔗糖，和

（d）约 18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.0。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）80 mg/mL 的蔗糖，和

（d）18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.0。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）约 100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）约 2 mg/mL 的泊洛沙姆 188，

（c）约 80 mg/mL 的蔗糖，

（d）约 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）约 18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）100 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）2 mg/mL 的泊洛沙姆 188，

（c）80 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）约 70 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）约 2 mg/mL 的泊洛沙姆 188，

（c）约 80 mg/mL 的蔗糖，

（d）约 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e)约 18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂;所述药物组合物的 pH 为约 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）70 mg/mL 的特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）2 mg/mL 的泊洛沙姆 188，

（c）80 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a)1 mg/mL 至 20 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 0.5 mg/mL 至 5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）10 mg/mL 至 120 mg/mL 的糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 6.0；

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a)1 mg/mL 至 10 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b)0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 0.5 mg/mL 至 5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂、组氨酸-醋酸组氨酸缓冲剂或枸橼酸-枸橼酸钠盐缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a)1 mg/mL 至 10 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）4 mg/mL 至 6 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.2 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 1 mg/mL 至 3 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 30 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）4 mg/mL 至 6mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.3 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）15 mM 至 25 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）约 5mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）约 80 mg/mL 的蔗糖，

（d）约 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e)约 18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂;所述药物组合物的 pH 为约 5.0。

在一些实施方式中，如前任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）5mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）80 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.0。

本领域技术人员应当理解，当参考数值范围、截止值或特定值使用时，“约”可以表示在1个或多于1个标准偏差之内。或者，“约”可以表示相差最高达20%的范围（即±20%）。由于本文所用的许多数值是通过实验确定的，因此本领域的技

术人员应当理解，此类确定可以在不同实验之间有差异并且通常在不同实验之间有差异。由于这种内在差异，认为本文所用的值不应受到过度限制。因此，术语“约”用于涵盖与指定值相差±20%或更小的变化、±10%或更小的变化、±5%或更小的变化、±1%或更小的变化、±0.5%或更小的变化、或者±0.1%或更小的变化。

在一个方面，本披露提供一种制备冻干制剂的方法，其中包括将如前任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。

在一个方面，本披露提供一种冻干制剂，所述制剂通过如前所述的方法获得的。

在一个方面，本披露提供的如前任一项所述的药物组合物，其为皮下注射制剂、静脉注射制剂、腹腔注射制剂或肌肉注射制剂。在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液，其为皮下注射制剂。

在一些实施方案中，如前任一项所述的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液，其适用于皮下注射、静脉注射、腹腔注射或肌肉注射。在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液，其适用于皮下注射。

在一些实施方案中，如前任一项所述的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液，其用于制备皮下注射、静脉注射、腹腔注射或肌肉注射的药物。在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液，其用于制备皮下注射的药物。

本披露还提供用作药物的如前任一项所述的药物组合物，或如前任一项所述的冻干制剂，或如前任一项所述的注射制剂。在一些实施方案中，所述药物用于治疗肿瘤或癌症。

本披露还提供一种治疗肿瘤或癌症的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如前任一项所述的药物组合物，或如前任一项所述的冻干制剂，或如前任一项所述的注射制剂。

在一个方面，本披露提供如前任一项所述的组合物，或如前任一项所述的冻干制剂，或前任一项所述的注射制剂在制备用于治疗肿瘤或癌症的药物中的用途。

在一些实施方式中，如前任一项所述的肿瘤或癌症选自：肺癌、小细胞肺癌、大细胞肺癌、头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、咽鳞癌、口腔鳞癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌、恶性胸膜间皮瘤、乳腺癌、肝癌、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结肠癌、结肠直肠癌、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、皮肤癌、黑色素瘤、大细胞肺癌、三阴性乳腺癌和淋巴瘤。

在一些实施方式中，如前任一项所述的肿瘤或癌症是实体瘤。

在一些实施方式中，如前任一项所述的肿瘤或癌症是肺癌。

在一些实施方式中，如前任一项所述的肿瘤或癌症是小细胞肺癌。

在一些实施方案中，如前任一项所述的治疗肿瘤或癌症的方法，其进一步包括使用第二治疗剂。在一些实施方案中，所述第二治疗剂包括抗肿瘤药剂、放射疗法、抗体药物缀合物、双特异性抗体、与抗肿瘤药剂缀合的双特异性抗体、免疫检查点抑制剂或其组合。

在一些实施方案中，如前所述的治疗肿瘤或癌症的方法，其中所述的第二治疗剂与本披露任一项所述的双特异性抗体制剂同时施用、序贯施用或分开施用。

本披露提供的双特异性抗体制剂，具有治疗活性、安全性、药物代谢动力学特性和成药性（如稳定性）好的特点。

附图说明

图 1 显示 DLL3-CD3 双特异性抗体的 Format3 的结构示意图。

图 2A 显示双特异性抗体与 DLL1 结合的实验结果。结果显示，本披露的 DLL3-CD3 双特异性抗体不结合 DLL1。

图 2B 显示双特异性抗体与 DLL4 结合的实验结果。结果显示，本披露的 DLL3-CD3 双特异性抗体不结合 DLL4。

图 3 显示双特异性抗体对细胞的杀伤作用实验结果。结果显示，本披露的双特异性抗体对不表达 DLL3 的 H460 细胞无杀伤作用。

图 4A 显示双特异性抗体对 T 细胞的激活的实验结果，结果显示本披露的双特异性抗体在表达 DLL3 的 DLL3/H82 细胞存在时，具有明显的激活 T 细胞的作用。

图 4B 显示，当存在不表达 DLL3 的阴性细胞 H460 时，本披露的双特异性抗体不会激活 T 细胞。

图 5A 显示双特异性抗体的细胞因子释放的实验结果，结果显示，在 H1184 细胞存在的情况下，本披露的双特异性抗体刺激 PBMC 细胞分泌的 IFNγ 的含量非常低。

图 5B 显示，在 H1184 细胞存在的情况下，本披露的双特异性抗体刺激 PBMC 细胞分泌的 IL-6 的含量非常低。

具体实施方式

术语

本文所用的术语只是为了描述实施方案的目的，并非旨在进行限制。除非另外定义，本文所用的全部技术术语和科学术语具有与本披露所属领域的普通技术人员通常所理解的相同意义。

除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不仅限于”的意义。除非另有说明，“包含”包括了“由……组成”。

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

术语“和/或”，例如“X 和/或 Y”应当理解为意指“X 和 Y”或“X 或 Y”并且应当被用来提供对两种含义或任一含义的明确支持。

除非被指定为来自非人物种(例如，“小鼠 DLL3”、“小鼠 DLL3 片段”、“猴 DLL3”、“猴 DLL3 片段”等)，否则如本文使用的“DLL3”和“DLL3 片段”是指众所周知的人 DLL3 蛋白或其片段。

除非被指定为来自非人物种(例如，“小鼠 CD3”、“小鼠 CD3 片段”、“猴 CD3”、“猴 CD3 片段”等)，否则如本文使用的“CD3”和“CD3 片段”是指众所周知的人 CD3 蛋白或其片段。

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

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

术语“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体），全长抗体和抗体片段（或抗原结合片段，或抗体片段，或抗原结合部分），只要它们展现出期望的抗原结合活性。根据上下文，技术人员能够确定“抗体”所指的具体含义。

“天然抗体”指天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 抗体是约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白，由二硫键结合的两条轻链和两条重链构成。从 N 端至 C 端，每条重链具有一个可变区（VH，又称作可变重域、重链可变区），接着是三个恒定域（CH1、CH2 和 CH3）。类似地，从 N 端至 C 端，每条轻链具有一个可变区（VL，又称作可变轻域，或轻链可变域），接着是一个恒定轻域（轻链恒定区、CL）。术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文可互换使用，指具有与天然抗体结构基本类似的结构或具有含有如本文所限定的 Fc 区的重链的抗体。

术语“双特异性抗体”指能够对两个不同抗原或同一抗原的至少两个不同抗原表位特异性结合的抗体（包括抗体或其抗原结合片段，如单链抗体）。现有技术已公开了各种结构的双特异性抗体，根据 IgG 分子的完整性可分为 IgG 样双特异性抗体和抗体片段型双特异性抗体；根据抗原结合区域的数量，可分为二价、三价、四价或更多价的双特异性抗体，根据结构左右是否对称，可分为对称结构双特异性抗体和不对称结构双特异性抗体。其中，基于抗体片段的双特异性抗体，例如缺乏 Fc 片段的 Fab 片段，其通过将 2 个或多个 Fab 片段结合在一个分子中形成双特异性抗体，其具有较低的免疫原性，且分子量小，具有较高的肿瘤组织渗透性，该类型的典型的抗体结构如 F（ab）2、scFv-Fab、（scFv）2-Fab 等双特异性抗体；IgG 样双特异性抗体（例如具有 Fc 片段），这类抗体相对分子量较大，Fc 片段有助于抗体后期的纯化，并提高其溶解性、稳定性，Fc 部分还可能会与受体 FcRn 结合，增加抗体血清半衰期，典型的双特异性抗体结构模型如 KiH、CrossMAb、Triomab quadroma、FcΔAdp、ART-Ig、BiMAb、Biclonics、BEAT、DuoBody、Azymetric、XmAb、2：1 TCBs、1Fab-IgG TDB、FynomAb、two-in-one/DAF、scFv-Fab-IgG、DART-Fc、LP- DART、CODV-Fab-TL、HLE-BiTE、F（ab）2- CrossMAb、IgG-（scFv）2、Bs4Ab、DVD-Ig、Tetravalent- DART-Fc、（scFv）4-Fc、CODV-Ig、mAb2、F（ab）4- CrossMAb 等双特异性抗体（参见 Aran F. Labrijn 等，Nature Reviews Drug Discovery volume 18，pages585–608（2019）；Chen S1 等，J Immunol Res. 2019 Feb 11；2019：4516041）。

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

表 1. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact

HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

除非另有说明，本披露实施方案中的可变区和 CDR 序列均适用“Kabat”编号规则。

术语“抗体片段”或“抗原结合片段”指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分保留了完整抗体的抗原结合能力。抗体片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、$F(ab')_2$、单域抗体、单链 Fab（scFab）、双抗体、线性抗体、单链抗体分子（例如 scFv）；以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

术语“Fc 区”或“片段可结晶区”用于定义抗体重链的 C 末端区域，包括天然 Fc 区和改造的 Fc 区。在一些实施方式中，Fc 区包含了相同或不同的两个亚基。在一些实施方式中，人 IgG 重链的 Fc 区定义为从 Cys226 位置处的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。用于本文所述抗体的合适天然序列 Fc 区包括人 IgG1、IgG2（IgG2A、IgG2B）、IgG3 和 IgG4。除非另有说明，Fc 区的编号规则为 EU 索引。

术语“嵌合”抗体指抗体中的重和/或轻链的一部分自特定的来源或物种衍生，而重和/或轻链的剩余部分自不同来源或物种衍生的抗体。

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

术语“亲和力”是指分子（例如，抗体）的单个结合部位与其结合配体（例如，抗原）之间非共价相互作用的总体的强度。除非另外指明，如本文所用，“结合亲和力”是指内部结合亲和力，其反映出结合对（例如，抗体与抗原）的成员之间 1:1 相互作用。分子 X 对其配体 Y 的亲和力通常可以由平衡解离常数（KD）表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法（包括本文所述的那些）测量。术语“kassoc”或“ka”指特定抗体-抗原相互作用的缔合（association）速率，而如本文所使用的术语“kdis”或“kd”意在是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所使用的，术语“KD”指平衡解离常数，其获得自 kd 与 ka 的比率（即 kd/ka）并且表示为摩尔浓度（M）。可以使用本领域已知的方法测定抗体的 KD 值，例如表面等离子体共振法、ELISA 或溶液平衡滴定法（SET）。

术语“单克隆抗体”指基本上均质的抗体的群，即在该群中包含的抗体分子的氨基酸序列是相同的，除了可能少量存在的天然突变以外。相比之下，多克隆抗体

制剂通常包含在其可变结构域具有不同氨基酸序列的多种不同抗体，其通常特异性针对不同表位。在一些实施方式中，本披露提供的抗体是单克隆抗体。

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

术语“表位”指能够与抗体或其抗原结合片段特异性结合的抗原上的区域（area或region）。表位可以由连续氨基酸（线性表位）形成或包含非连续氨基酸（构象表位），例如因抗原的折叠（即通过蛋白质性质的抗原的三级折叠）而使得非连续的氨基酸在空间上得以接近。构象表位和线性表位的差别在于：在变性溶剂的存在下，抗体对构象表位的结合丧失。表位包含处于独特空间构象的至少3，至少4，至少5，至少6，至少7，或8-10个氨基酸。筛选结合特定表位的抗体（即那些结合相同表位的）可以使用本领域例行方法来进行，例如但不限于丙氨酸扫描，肽印迹（见Meth. Mol. Biol. 248（2004）443-463），肽切割分析，表位切除，表位提取，抗原的化学修饰（见 *Prot. Sci.* 9（2000）487-496），和交叉阻断（见“Antibodies”，Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)）。

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

术语“不结合”是指抗原结合分子不能够以上述特异性结合的方式结合至某个抗原或其表位。例如，当抗体以约1×10^{-6}M或更大的平衡解离常数（KD）结合抗原或其表位。

术语“抗原结合模块”指特异性结合目标抗原的多肽分子。具体的抗原结合模块包括抗体的抗原结合域，例如包含重链可变区和轻链可变区。术语“特异性结合CD3的抗原结合模块”是指能够以足够的亲和力结合CD3或其表位的模块，使得含有该模块的分子可用作靶向CD3的诊断剂和/或治疗剂。例如，特异性结合CD3的抗原结合模块具有以下的平衡解离常数（KD）：<约10nM，其是通过表面等离子体共振测定法测量的。抗原结合模块包括如本文定义的抗体片段，例如Fab，经替换的Fab或scFv。

术语“连接子”指连接两个多肽片段的连接单元。在本文中，同一结构式中出现的连接子可以是相同或不同的。连接子可以是肽连接子，其包含一个或多个氨基酸，典型的包含约 1-30 个、2-24 个或 3-15 个氨基酸。应用于本文的连接子可以是相同或不同的。当“-”出现在结构式中，其表示两侧的单元直接通过共价键连接。

“Tm”是溶解变性温度（内源荧光）。当蛋白质变性（加热或变性剂作用）时，三级结构打开，芳香族氨基酸微环境发生变化，导致发射荧光光谱改变。本披露中，Tm1 是指荧光变化到最大值的一半时的温度。

“Tonset”是变性起始温度。意指蛋白质开始变性时的温度，即荧光值开始变化时的温度。

“Tagg”是聚集起始温度。通过静态光散射，在 266nm 和 473nm 两个波长下检测聚集体，监测到样品开始聚集时的温度。Tagg 266 指的是 266nm 下监测到聚集起始温度。

应当理解，尽管本公开中没有提供具体的编码核苷酸序列，技术人员根据密码子规则和宿主密码子偏好性，能够在氨基酸序列的基础上确定对应的编码核苷酸序列。

术语“融合”或“连接”是指部件（例如抗原结合模块和 Fc 结构域）直接地或经由连接子共价连接。

术语“载体”意指能够转运与其连接的另一多核苷酸的多核苷酸分子。一种类型的载体是“质粒”，其是指环状双链 DNA 环，其中可以连接附加的 DNA 区段。另一种类型的载体是病毒载体，例如腺相关病毒载体（AAV 或 AAV2），其中另外的 DNA 区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其他载体（例如，非附加型哺乳动物载体）可以在引入宿主细胞中后整合到宿主细胞的基因组中，从而与宿主基因组一起复制。术语“表达载体”或“表达构建体”是指适用于对宿主细胞进行转化且含有指导及/或控制（连同宿主细胞一起）与其可操作地连接的一个或多个异源编码区的表达的核酸序列的载体。表达构建体可以包括但不限于影响或控制转录、翻译且在存在内含子时影响与其可操作地连接的编码区的 RNA 剪接的序列。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。

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

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

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

“治疗（treatment 或 treat）”和“处理”（及其语法变型）指试图施加至所治疗个体的临床干预，并且可以为了预防目的、或者在临床病理学的过程期间进行实施。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发，减轻症状，减轻/减少疾病的任何直接或间接病理后果，预防转移，降低疾病进展速率，改善或减轻疾病状态，和消退或改善的预后。

术语“复发(recurrence)”、“复发(relapse)”“复发(relapsed)”是指癌症或疾病在疾病消失的临床评估之后的恢复。远处癌转移或局部复发的诊断可视为复发。

“有效量”一般是足以降低症状的严重程度及/或频率、消除这些症状及/或潜在病因、预防症状及/或其潜在病因出现及/或改良或改善由疾病状态引起或与其相关的损伤的量。在一些实施例中，有效量是治疗有效量或预防有效量。

“治疗有效量”是足以治疗疾病状态或症状、尤其与该疾病状态相关的状态或症状，或者以其他方式预防、阻碍、延迟或逆转该疾病状态或以任何方式与该疾病相关的任何其他不理想症状的进展的量。

“预防有效量”是当给予受试者时将具有预定预防效应，例如预防或延迟该疾病状态的发作（或复发），或者降低该疾病状态或相关症状的发作（或复发）可能性的量。完全治疗或预防效未必在给予一个剂量之后便发生，可能在给予一系列剂量之后发生。因而，治疗或预防有效量可以一次或多次给予的方式给予。“治疗有效量”和“预防有效量”可取决于多种因素变化：诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重，以及治疗剂或治疗剂组合在个体中引发期望的应答的能力。有效治疗剂或治疗剂组合的示例性指标包括例如受试者改善的健康状况。

“缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受 pH 变化的缓冲剂。将 pH 控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、枸橼酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酰甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

“组氨酸缓冲剂”是包含组氨酸的缓冲剂。组氨酸缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸组氨酸，组氨酸-醋酸组氨酸，组氨酸-磷酸组氨酸，组氨酸-硫酸组氨酸等缓

冲剂，优选组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂可由组氨酸与盐酸配制而成，或者由组氨酸与盐酸组氨酸配制而成。

“枸橼酸盐缓冲剂”是包括枸橼酸根离子的缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的实例包括枸橼酸-枸橼酸钠、枸橼酸-枸橼酸钾、枸橼酸-枸橼酸钙、枸橼酸-枸橼酸镁等。优选的枸橼酸盐缓冲剂是枸橼酸-枸橼酸钠。

“琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸根离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠盐、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。优选的琥珀酸盐缓冲剂是琥珀酸-琥珀酸钠盐。示例性的，所述的琥珀酸-琥珀酸钠可由琥珀酸与氢氧化钠配制而成，或由琥珀酸与琥珀酸钠盐配制而成。

“磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸根离子的缓冲剂。磷酸盐缓冲剂的实例包括柠檬酸-磷酸氢二钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾、磷酸氢二钠-枸橼酸等。优选的磷酸盐缓冲剂是柠檬酸-磷酸氢二钠。

“醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠、组氨酸-醋酸组氨酸、醋酸-醋酸钾、醋酸-醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选的醋酸盐缓冲剂是醋酸-醋酸钠。

“泊洛沙姆(poloxamer)”是 α-氢-ω-羟基聚(氧乙烯)a-聚(氧丙烯)b-聚(氧乙烯)a 嵌段共聚物。由环氧丙烷和丙二醇反应，形成聚氧丙烯二醇，然后加入环氧乙烷形成嵌段共聚物。其中，a 为氧乙烯的单元数，b 为氧丙烯的单元数。泊洛沙姆的实施例包括但不限于泊洛沙姆 188(P188 或 PF68)。具体地，泊洛沙姆 188，在共聚物中氧乙烯单元(a)为 75～85，氧丙烯单元(b)为 25～30，氧乙烯(EO)含量 79.9%～83.7%，平均分子量为 7680～9510。

“冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或液体或溶液制剂经真空冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

本披露所述的药物组合物能够达到一种稳定的效果：其中的抗体在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的药物组合物，优选地，药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术，可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

稳定的制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂：在冷藏温度（2-8° C）保存至少 1 个月、至少 3 个月、优选 6 个月、更优选 1 年，且甚至更优选地多达 2 年。另外，稳定的液体制剂包括这样的液体制剂：其在包括 25° C 的温度保存包括 1 个月、3 个月或 6 个月在内的时段后表现出期望的特征。还包括 40° C 的温度保存包括 4 周、1 个月、3 个月或 6 个月在内的时段后表现出期望的特征。稳定性的典型的例子：通过 SEC-HPLC 测得，通常不超过约 10%、优选不超过约 5%的抗体发生聚集或降解。通过视觉分析，制剂是淡黄色近无色澄明液体或者无色澄明液体，或澄清至稍微乳白色。所述制剂的浓度、pH、重量、分子渗透压具有不超过

±10%变化，优选不超过±5%的变化。所述制剂通常形成不超过约 10%、优选不超过约 5%的聚集。

如果在目检颜色和/或澄清度后，或者通过 UV 光散射、尺寸排阻色谱法(SEC)和动态光散射（DLS）测得，抗体没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法（其确定蛋白三级结构）和通过 FTIR 光谱法（其确定蛋白二级结构）来评价。

如果抗体没有显示出显著的化学改变，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式的蛋白，可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短（通过诸如尺寸排阻色谱法和 CE-SDS 等方法来评价）、氧化（通过诸如与质谱法或 MALDI/TOF/MS 结合的肽谱法等方法来评价）、脱酰胺作用（通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价）和异构化（通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等来评价）。

如果抗体在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的生物活性”。

取代、插入和删除变体

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

表 2. 氨基酸的取代

原始残基	示例性取代	优选的取代
Ala(A)	Val；Leu；Ile	Val
Arg(R)	Lys；Gln；Asn	Lys
Asn(N)	Gln；His；Asp,Lys；Arg	Gln
Asp(D)	Glu；Asn	Glu
Cys(C)	Ser；Ala	Ser
Gln(Q)	Asn；Glu	Asn
Glu(E)	Asp；Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn；Gln；Lys；Arg	Arg
Ile(I)	Leu；Val；Met；Ala；Phe；正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸；Ile；Val；Met；Ala；Phe	Ile

Lys(K)	Arg；Gln；Asn	Arg
Met(M)	Leu；Phe；Ile	Leu
Phe(F)	Trp；Leu；Val；Ile；Ala；Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr；Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp；Phe；Thr；Ser	Phe
Val(V)	Ile；Leu；Met；Phe；Ala；正亮氨酸	Leu

依照常见的侧链特性，氨基酸可以如下分组:

(1) 疏水性的：正亮氨酸，Met，Ala，Val，Leu，Ile；

(2) 中性，亲水性的：Cys，Ser，Thr，Asn，Gln；

(3) 酸性的：Asp，Glu；

(4) 碱性的：His，Lys，Arg；

(5) 影响链取向的残基：Gly，Pro；

(6) 芳香族的：Trp，Tyr，Phe。

非保守取代会是指用一个类别的成员替换另一个类别的成员。

一类取代变体涉及取代亲本抗体（例如人源化或人抗体）的一个或多个 CDR 残基。一般地，经选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体会具有某些生物学特性（例如升高的亲和力，降低的免疫原性）的改变（例如改善），和/或会基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。一种示例性的取代变体是亲和力成熟的抗体，可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(如本文所述的那些技术)，便利地产生所述抗体。简言之，将一个或多个 CDR 残基突变，并将变体抗体在噬菌体上展示，并对其筛选特定的生物学活性（例如结合亲和力）。可以对 CDR 做出改变（例如取代），例如以改善抗体亲和力。可以对 CDR“热点”，即在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子所编码的残基，和/或接触抗原的残基做出此类改变，同时对所得的变体 VH 或 VL 测试结合亲和力。在亲和力成熟的一些实施方案中，通过多种方法（例如易错 PCR、链改组、或寡核苷酸指导的诱变）的任一种，将多样性引入所选择用于成熟的可变基因中。然后，创建次级文库。然后，筛选文库以鉴定具有期望的亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及 CDR 定向的方法，其中将几个 CDR 残基（例如一次 4-6 个残基）随机化。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性鉴定涉及抗原结合的 CDR 残基。

在某些实施方案中，取代、插入或缺失可以在一个或多个 CDR 内发生，只要此类变化不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如，可以对 CDR 做出保守变化（例如保守取代，如本文中提供的），其不实质性降低结合亲和力。在上文提供的变

体 VH 和 VL 序列的某些实施方案中，每个 CDR 是未改变的，或者含有不超过 1、2 或 3 处氨基酸取代。

一种可用于鉴定抗体中可以作为诱变靶位的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”。在这种方法中，鉴定一个残基或残基组（例如带电荷的残基，诸如 Arg、Asp、His、Lys 和 Glu），并且替换为中性或带负电荷的氨基酸（例如，Ala 或聚丙氨酸），以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对初始取代显示功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的取代。此外，可通过研究抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原间的接触点。这些接触残基及邻近残基可以作为取代候选物被打靶或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

氨基酸序列插入包括：在氨基和/或羧基端融合 1 个残基或长度为 100 或更多个残基的多肽；和单个或多个氨基酸残基的序列内插入。在末端插入的例子包括具有 N 端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括，在抗体的 N 或 C 端融合有酶（或延长抗体的血清半衰期的多肽）的融合物。

Fc 区的改造

在一个方面，本披露的双特异性抗体的 Fc 区包含一个或多个氨基酸取代，所述一个或多个氨基酸取代减少其与 Fc 受体的结合，例如其与 Fcγ 受体的结合，并且降低或消除效应子功能。天然 IgG Fc 区，具体地是 IgG_1 Fc 区或 IgG_4 Fc 区，可能导致本披露的双特异性抗体靶向表达 Fc 受体的细胞，而不是表达抗原的细胞。本披露改造的 Fc 区表现出降低的对 Fc 受体的结合亲和力和/或降低的效应子功能。在一些实施方案中，改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比，对 Fc 受体的结合亲和力下降 50%、80%、90%或 95%以上。在一些实施方案中，所述的 Fc 受体是 Fcγ 受体。在一些实施方案中，所述 Fc 受体是人 Fcγ 受体，例如 FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIB、FcγRIIIa。在一些实施方案中，改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比，对补体，如 C1q 的结合亲和力也降低。在一些实施方案中，改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比，对新生儿 Fc 受体（FcRn）的结合亲和力不降低。在一些实施例中，改造的 Fc 区具有降低的效应子功能，所述降低的效应子功能可以包括但不限于以下中的一个或多个：降低的补体依赖性细胞毒性（CDC）、降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）、降低的抗体依赖性细胞吞噬（ADCP）、减少的细胞因子分泌、减少的免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取、减少的与 NK 细胞的结合、减少的与巨噬细胞的结合、减少的与单核细胞的结合、减少的与多形核细胞的结合、减少的直接信号传导诱导性细胞凋亡、降低的树突细胞成熟或减少的 T 细胞引发。对于 IgG1 Fc 区，在 238、265、269、270、297、327 和 329 等位置的氨基酸残基取代可降低的效应子功能。在一些实施方案中，所述 Fc 区是人 IgG1 Fc 区，并且在 234 和 235 位置的氨基酸残基为 A，编号依据为 EU 索引。对于 IgG_4 Fc 区，在 228 等位置的氨基酸残基取代可降低的效应子功能。

当双特异性抗体包含与 Fc 区的两个亚基融合的不同结合模块，可能导致不期望的同源二聚化。为了提高产率和纯度，因此在本披露的双特异性抗体的 Fc 区中引入促进异源二聚化的修饰将是有利的。在一些实施方式中，本披露的 Fc 区包含根据杵臼（knob-into-hole，KIH）技术的改造，该方法涉及在第一亚基的界面处引入凸起结构（knob）以及在第二亚基的界面处引入孔结构（hole）。使得所述凸起结构可以定位在孔结构中，促进异源二聚体的形成并抑制同源二聚体的产生。凸起结构是通过用较大侧链（例如酪氨酸或色氨酸）取代来自第一亚基的界面的小氨基酸侧链而构建的。而孔结构是通过用较小的氨基酸侧链（例如丙氨酸或苏氨酸）取代大氨基酸侧链而在第二亚基的界面中创建的。凸起结构和孔结构通过改变编码多肽的核酸来制备，可选的氨基酸取代如下表所示：

表 3. KIH 突变组合

第一亚基	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A
第二亚基	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L368A Y407V	T394W Y407T	T394W Y407A	T366W T394S

除了杵臼技术外，用于修饰重链的 CH3 结构域以实现异源二聚化的其他技术也是本领域中已知的，例如 WO1996027011A1、WO1998050431、EP1870459、WO2007110205、WO2009089004、WO2010129304、WO201190754、WO2011143545、WO2012058768、WO2013157954 和 WO2013096291。

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

重组方法

双特异性抗体可以使用重组方法来产生。对于这些方法，提供编码双特异性抗体的一个或更多个分离的核酸。

在天然抗体、天然抗体片段或具有同源二聚体重链的双特异性抗体的情况下，需要两个核酸，一个用于轻链或其片段，一个用于重链或其片段。此类核酸编码

包含抗体 VL 的氨基酸序列和/或包含抗体 VH 的氨基酸序列（例如抗体的轻链和/或重链）。这些核酸可以在相同的表达载体上或在不同的表达载体上。

在具有异二聚体重链的双特异性抗体的情况下，需要例如四个核酸，一个用于第一轻链，一个用于包含第一异源单体 Fc 区多肽的第一重链，一个用于第二轻链，并且一个用于包含第二异源单体 Fc 区多肽的第二重链。这四个核酸可包含在一个或更多个核酸分子或表达载体中，通常这些核酸位于两个或三个表达载体上，即一个载体可包含这些核酸中的多于一个。

在一个实施方案中，本披露提供了编码如前所述的抗体的分离的核酸。此类核酸可以独立地编码前述的任一多肽链。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的一种或多种载体（例如表达载体）。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的宿主细胞。在一个实施方案中，提供制备双特异性抗体的方法，其中所述方法包括，在适合抗体表达的条件下，培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从宿主细胞（或宿主细胞培养基）回收所述抗体。

为了重组产生双特异性抗体，将编码蛋白的核酸分离并插入一个或更多个载体中，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可以使用常规程序容易地分离和测序（例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针），或者通过重组方法产生或通过化学合成获得。

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

除了原核生物以外，真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是用于编码抗体的载体的合适的克隆或表达宿主，包括真菌和酵母菌株，其糖基化途径已经“人源化”，导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。适于表达（糖基化）抗体的合适的宿主细胞也可源自多细胞生物体（无脊椎动物和脊椎动物）；无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株，其可与昆虫细胞联合使用，特别是用于草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）细胞的转染；还可利用植物细胞培养物作为宿主，例如 US5959177、US 6040498、US6420548、US 7125978 和 US6417429；也可将脊椎动物细胞用作宿主，例如适应于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系。适宜的哺乳动物宿主细胞系的其它例子是经 SV40 转化的猴肾 CVl 系（COS-7）；人胚肾系（293 或 293T 细胞）；幼仓鼠肾细胞（BHK）；小鼠塞托利（sertoli）细胞（TM4 细胞）；猴肾细胞（CV1）；非洲绿猴肾细胞（VERO-76）；人宫颈癌细胞（HELA）；犬肾细胞（MDCK）；水牛鼠（buffalo rat）肝细胞（BRL3A）；人肺细胞（W138）；人肝细胞（Hep G2）；小鼠乳房肿瘤（MMT 060562）；TRI 细胞；MRC 5 细胞；和 FS4 细胞。其它适宜的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，包括 DHFR-CHO 细胞；以及骨髓瘤细胞系，如 Y0、NS0 和

Sp2/0。关于适合产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如 Yazaki，P. 和 Wu，A.M.，*Methods in Molecular Biology*，Vol.248，Lo，B.K.C.（编），Humana Press，Totowa，NJ (2004)，第 255-268 页。

实施例与测试例

以下结合实施例和测试例进一步描述本披露，但这些实施例和测试例并非限制着本披露的范围。本披露实施例和测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

一、特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的制备

实施例 1. DLL3 抗原及检测用蛋白和稳转细胞株的制备

1.1 高表达 DLL3 的细胞株构建

包含 SEQ ID NO: 1-2 的 pCDH 慢病毒表达载体质粒（由 GENEWIZ 公司合成），pCDH 质粒分别与 pVSVG，pCMV 慢病毒包装载体用 Lipofectamine 3000(Invitrogen, L3000015)转染试剂转染至 293T 细胞(中科院细胞库, GNHu17)中，收集含有病毒的培养基上清，过滤并进行超高速离心，弃去上清后，用 0.2mL 无菌 PBS 重悬。使用浓缩后的病毒分别感染中国仓鼠卵巢细胞 CHO-s（Invitrogen, R80007），DMS53(ATCC, CRL-2062)和 H82(ATCC, HTB-175)，经嘌呤霉素（puromycin）筛选两至三周，再进行 FACS 单细胞分选。将挑选出的单克隆细胞株扩大培养，冻存，以便后续实验。

包含表达 LUC 和 GFP 基因的 pCDH-CMV-MCS-EF1-puro 慢病毒表达载体质粒（由 GENEWIZ 公司合成），pCDH 质粒分别与 pVSVG，pCMV 慢病毒包装载体用 Lipofectamine 3000(Invitrogen, L3000015)转染试剂转染至 293T 细胞(中科院细胞库, GNHu17)中，收集含有病毒的培养基上清，过滤并进行超高速离心，弃去上清后，用 0.2mL 无菌 PBS 重悬。使用浓缩后的病毒分别感染 SHP77（ATCC, CRL-2195），H1184(ATCC，CRL-5858)，H460(中国科学院细胞库，TCHu205)经嘌呤霉素（puromycin）筛选两至三周，再进行 FACS 单细胞分选。将挑选出的单克隆细胞株扩大培养，冻存，以便后续实验。

使用的相关蛋白序列如下：

1.人 DLL3 全长蛋白（SEQ ID NO: 1）：

MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSAR
LPCRLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLL
QVPFRDAWPGTFSFIIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARD
IQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECE
APLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGC
LVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNG

GLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRC
RCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRER
ADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPP
GLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGHSQDAGSRLLAGTPE
PSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSVDWNRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREVA
TPLFPPLHTGRAGQRQHLLFPYPSSILSVK

2. 食蟹猴 DLL3 全长蛋白（SEQ ID NO: 2）：

MVSPRMSRLLSQTVILALIFIPQARPAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSAR
GPCRLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLL
QVPFRDAWPGTFSLIIETWREELGDQIGGPAWSLLARVTRRRRLAAGGPWARDI
QRAGAWELRFSYRARCELPAVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEA
PPVCRAGCSLEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCMVPVSTSSCLGLRGPSSTTTGC
LVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPGSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNG
GLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRC
RCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRNCRER
ADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGVSALPAAPP
GLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGHAQDAGSRLLAGTP
EPSVHALPDALNNLRTQEGPGDVPSSSVDWNRPEDVDSRGIYVISAPSIYAREV
AMPLFPPLHTGRAGQRQNLLFPFPSSILSVK

3. 大鼠 DLL3 全长蛋白（SEQ ID NO: 3）：

MVSLQVSSLPQTLILAFLLPQALPAGVFELQIHSFGPGPGPGTPRSPCNARG
PCRLFFRVCLKPGVSQEAAESLCALGAALSTSGPVYTEQPGVPAAALSLPDGLV
RVPFLDAWPGTFSLIIETWREQLGERAAGPAWNLLARVAGRRRLAAGAPWAR
DVQRTGAWELHFSYRARCEPPAVGAACARLCRSRSAPSRCGPGLRPCTPFPDEC
EAPRESLTVCRAGCSPEHGYCEEPDECHCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLNSRVSG
PAGTGCLLPGPGPCDGNPCANGGSCSETPGSFECACPRGFYGPRCEVSGVTCAD
GPCFNGGLCVGGEDPDSAYVCHCPPAFQGSNCERRVDRCSLQPCQNGGLCLDL
GHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGARRCSCALGFGG
RDCRERADPCASRPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGVRCEFAVRPDGADA
VPAAPRGLRQADSQRFLLPPALGLLAAAALAGAALLLIHVRRRGPGRDTGTRL
LSGTREPSVHTLPDALNNLRLQDGAGDGPTSSADWNHPEDGDSRSIYVIPAPSIY
AREA

4. 小鼠 DLL3 全长蛋白（SEQ ID NO: 4）：

MVSLQVSPLSQTLILAFLLPQALPAGVFELQIHSFGPGPGLGTPRSPCNARG
PCRLFFRVCLKPGVSQEATESLCALGAALSTSVPVYTEHPGESAAALPLPDGLV
RVPFRDAWPGTFSLVIETWREQLGEHAGGPAWNLLARVVGRRRLAAGGPWAR
DVQRTGTWELHFSYRARCEPPAVGAACARLCRSRSAPSRCGPGLRPCTPFPDEC

EAPSVCRPGCSPEHGYCEEPDECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLNSRVPGPAST
GCLLPGPGPCDGNPCANGGSCSETSGSFECACPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCF
NGGLCVGGEDPDSAYVCHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCQNGGLCLDLGHA
LRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGSRRCSCALGFGGRDC
RERADPCASRPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGVRCEFAVRPDGADAVPA
APRGLRQADPQRFLLPPALGLLVAAGLAGAALLVIHVRRRGPGQDTGTRLLSG
TREPSVHTLPDALNNLRLQDGAGDGPSSSADWNHPEDGDSRSIYVIPAPSIYARE
DWLIQVLF

5. 人 DLL1 全长蛋白（SEQ ID NO: 5）：

MGSRCALALAVLSALLCQVWSSGVFELKLQEFVNKKGLLGNRNCCRGGA
GPPPCACRTFFRVCLKHYQASVSPEPPCTYGSAVTPVLGVDSFSLPDGGGADSA
FSNPIRFPFGFTWPGTFSLIIEALHTDSPDDLATENPERLISRLATQRHLTVGEEW
SQDLHSSGRTDLKYSYRFVCDEHYYGEGCSVFCRPRDDAFGHFTCGERGEKVC
NPGWKGPYCTEPICLPGCDEQHGFCDKPGECKCRVGWQGRYCDECIRYPGCLH
GTCQQPWQCNCQEGWGGLFCNQDLNYCTHHKPCKNGATCTNTGQGSYTCSC
RPGYTGATCELGIDECDPSPCKNGGSCTDLENSYSCTCPPGFYGKICELSAMTC
ADGPCFNGGRCSDSPDGGYSCRCPVGYSGFNCEKKIDYCSSSPCSNGAKCVDL
GDAYLCRCQAGFSGRHCDDNVDDCASSPCANGGTCRDGVNDFSCTCPPGYTG
RNCSAPVSRCEHAPCHNGATCHERGHRYVCECARGYGGPNCQFLLPELPPGPA
VVDLTEKLEGQGGPFPWVAVCAGVILVLMLLLGCAAVVVCVRLRLQKHRPPA
DPCRGETETMNNLANCQREKDISVSIIGATQIKNTNKKADFHGDHSADKNGFK
ARYPAVDYNLVQDLKGDDTAVRDAHSKRDTKCQPQGSSGEEKGTPTTLRGGE
ASERKRPDSGCSTSKDTKYQSVYVISEEKDECVIATEV

6. 人 DLL4 全长蛋白（SEQ ID NO: 6）：

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRP
CEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPL
QLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLD
EQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPG
WTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTC
STPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGY
TGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADS
PCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGP
SRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCAHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRR
CEVRTSIDACASSPCFNRATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCEFPVGLPPSFPW
VAVSLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIP

AAQLKNTNQKKELEVDCGLDKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPH SDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV。

1. 2 抗原的制备

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

1. His-hDLL3(ECD)（SEQ ID NO: 7）：

METDTLLLWVLLLWVPGSTGHHHHHHHHHHGGGGGSGGGGSAGVFELQ IHSFGPGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGP VYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIIETWREELGDQIGGPAWSLL ARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRS APSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCT VPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGF YGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRC SLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEG GGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYM GARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL

注：点划线为信号肽序列，单划线为 his 标签和连接子，双划线为 DLL3 胞外区。

2. Fc-hDLL3(ECD)（SEQ ID NO: 8）：

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSA GVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAA LSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIIETWREELGDQIGG PAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTR LCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGW TGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFEC TCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCE KRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANG GTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVCAC APGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL

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

3. hDLL3(ECD)-strep twin（SEQ ID NO: 9）：

METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSARLPCR
LFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVP
FRDAWPGTFSFIIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQR
AGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPL
VCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVP
GPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLC
VGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCR
AGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADP
CAARPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLR
PGDPQRYLWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

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

4. cynoDLL3(ECD)-strep twin（SEQ ID NO: 10）：

METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSARGPCR
LFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLLQVPF
RDAWPGTFSLIIETWREELGDQIGGPAWSLLARVTRRRRLAAGGPWARDIQRA
GAWELRFSYRARCELPAVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPPV
CRAGCSLEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCMVPVSTSSCLGLRGPSSTTTGCLVP
GPGPCDGNPCANGGSCSETPGSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLC
VGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCR
AGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRNCRERADP
CAARPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGVSALPAAPPGLR
PGDPQRYLWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

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

5. mouDLL3(ECD)-strep twin（SEQ ID NO: 11）：

METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGVFELQIHSFGPGPGLGTPRSPCNARGPCR
LFFRVCLKPGVSQEATESLCALGAALSTSVPVYTEHPGESAAALPLPDGLVRVP
FRDAWPGTFSLVIETWREQLGEHAGGPAWNLLARVVGRRRLAAGGPWARDV
QRTGTWELHFSYRARCEPPAVGAACARLCRSRSAPSRCGPGLRPCTPFPDECEA
PSVCRPGCSPEHGYCEEPDECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLNSRVPGPASTGCL
LPGPGPCDGNPCANGGSCSETSGSFECACPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGG
LCVGGEDPDSAYVCHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCQNGGLCLDLGHALRCR
CRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGSRRCSCALGFGGRDCRERA
DPCASRPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGVRCEFAVRPDGADAVPAAPRG
LRQADPQRFLWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

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

实施例 2. 抗人 DLL3 抗体的制备

通过杂交瘤技术制备针对人 DLL3 的单克隆抗体，免疫方式如下：

第一组，以 His-hDLL3(ECD)（SEQ ID NO：7）为免疫原，用 TiterMax® Gold Adjuvant（Sigma Cat No. T2684）与 Thermo Imject® Alum（Thermo Cat No. 77161）佐剂交叉免疫。抗原与佐剂（TiterMax® Gold Adjuvant）比例为 1:1，抗原与佐剂（Thermo Imject® Alum）比例为 3:1，50μg/只/次(首次免疫)，25μg/只/次（加强免疫）。用 ELISA 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。

第二组小鼠的免疫抗原为 DLL3-CHO-s 细胞和 Fc-hDLL3(ECD)（SEQ ID NO：8），免疫方式为细胞和蛋白抗原交替免疫。细胞免疫按照每只小鼠腹膜内注射 0.1mL 生理盐水稀释至 10^8/mL 浓度的细胞液。Fc-hDLL3(ECD)抗原用 TiterMax® Gold Adjuvant（Sigma Cat No. T2684）与 Thermo Imject® Alum（Thermo Cat No. 77161）佐剂交叉免疫。抗原与佐剂（TiterMax® Gold Adjuvant）比例为 1:1，抗原与佐剂（Thermo Imject® Alum）比例为 3:1，50μg/只/次(首次免疫)，25μg/只/次（加强免疫）。用 ELISA 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。

采用优化的电融合方法将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 细胞（ATCC® CRL-8287™）进行融合得到杂交瘤细胞。根据杂交瘤细胞生长密度，用结合 DLL3 蛋白的 ELISA 方法和结合 DLL3 CHO-s 细胞 FACS 方法进行杂交瘤培养上清检测。选择结合人 DLL3 蛋白，猴 DLL3 蛋白以及 DLL3 CHO-s 细胞，同时不结合野生型 CHO-s 细胞的克隆及时进行冻存扩增保种和一到二次亚克隆直至获得单细胞克隆。通过以上实验筛选得到杂交瘤克隆 mAb6。

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

mAb6 重链可变区（SEQ ID NO: 12）：

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGIINPYSGVTIYNHKFKGKATLTVDKSSNTAYMELNSLTSEDSAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTSVTVSS

mAb6 轻链可变区（SEQ ID NO: 13）：

DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHASQGISGNMGWLQQKPGKSFKGLIYHGANLEDGVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKLEIK

表 4. 抗体的 CDR

抗体	名称	序列	序列编号
mAb6	HCDR1	DYYMN	SEQ ID NO：14
	HCDR2	IINPYSGVTIYNHKFKG	SEQ ID NO：15
	HCDR3	QDSLLDYAMDY	SEQ ID NO：16
	LCDR1	HASQGISGNMG	SEQ ID NO：17

	LCDR2	HGANLED	SEQ ID NO：18
	LCDR3	VQYAQFPYT	SEQ ID NO：19

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

将鼠抗体的重链可变区和轻链可变区分别克隆到包含 SEQ ID NO: 20 所示的人 IgG1 重链恒定区和 SEQ ID NO: 21 所示的 κ 轻链恒定区的 pTT5 载体质粒，然后转染 HEK293 细胞，得到了抗 DLL3 的嵌合抗体 M6CHI。

人 IgG1 重链恒定区（SEQ ID NO：20）：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

人 κ 轻链恒定区（hκ）（SEQ ID NO：21）：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC。

实施例 3. 抗 DLL3 单克隆抗体的人源化

通过比对 Kabat 人类抗体重轻链可变区种系基因数据库，分别挑选同源性高的重、轻链可变区种系基因作为模板，将鼠源抗体的 CDR 分别嫁接（graft）到相应的人源模板中，形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列。并对可变区的某些氨基酸进行氨基酸取代，再与恒定区重组（示例性的，与 SEQ ID NO：20 所示的人 IgG1 重链恒定区和 SEQ ID NO：21 所示的人 κ 轻链恒定区），获得全长的人源化抗体。

mAb6 抗体的人种系轻链模版为 IGKV1-16*01 或 IGKV3-20*02 和 IGKJ4*01，人种系重链模版为 IGHV1-3*01、IGHV7-4-1*02 或 IGHV3-73*01 和 IGHJ6*01。任选地，对人源化抗体的轻链可变区上第 1、36、42、43、44、46、52、56、69、71、79、85 和/或 94 位的氨基酸残基进行取代；和/或对人源化抗体的重链可变区上第 1、27、30、38、43、48、67、68、69、71、73、75、76、93、56、58 和/或 5 位的氨基酸残基进行取代。

表 5. mAb6 鼠源抗体的人源化模板及相应点突变

hu **VL**		hu **VH**	
VL1	Graft (IGKV1-16*01) + F36L, S46G	VH1	Graft(IGHV1-3*01) + Q1E, R71V, T73K

VL2	Graft(IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y	VH2	Graft(IGHV1-3*01) + Q1E, I69L, R71V, T73K, S76N
VL3	Graft(IGKV1-16*01) + F36L, A43S, P44F, S46G, T69A, F71Y	VH3	Graft(IGHV1-3*01) + Q1E, M48I, V67A, I69L, R71V, T73K, S76N
VL4	Graft(IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y, T85D	VH4	Graft(IGHV1-3*01) + Q1E, Q43K，I69L, R71V, T73K, S76N
VL5	Graft (IGKV1-16*01)	VH5	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, L71V, T73K, F69L
VL6	Graft(IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y, T85D +D56E	VH6	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N
VL7	Graft(IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y, T85D +D56S	VH7	Graft(IGHV3-73*01) + F27Y, S30T, I69L, R71V, D73K,T93A
VL8	Graft(IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y, T85D +F94Y, D56E	VH8	Graft(IGHV1-3*01)
VL9	Graft(IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y, T85D +F94Y, D1N, A52R, D56E	VH9	Graft(IGHV7-4-1*02)
VL10	Graft(IGKV3-20*02)+ Y36L,Q42K,L46G,T69A ,F71Y,E79Q,V85D + D56E	VH10	Graft(IGHV3-73*01)
VL11	Graft(IGKV3-20*02) + D56E	VH11	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, R38K, F69L, L71V, T73K,V75S, S76N
		VH12	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, V68A, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N，
		VH13	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N ， R38K,V68A

		VH14	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N，-V68A +I58T
		VH15	Graft(IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N，-V68A +V56S, V5Q
FR4	IGKJ4*01	FR4	IGHJ6*01

注：表中的氨基酸位置按照为 kabat 编号，F36L 表示依照 Kabat 编号系统，将 36 位 F 突变为 L 下同。

获得的 hu6 人源化抗体可变区的序列如下：

hu6 VH1(SEQ ID NO: 22)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGIINPYSGVTIYNHKFKGRVTIT**V**D**K**SASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6 VH2(SEQ ID NO:23)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGIINPYSGVTIYNHKFKGRVT**L**T**V**D**K**SA**N**TAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6 VH3(SEQ ID NO: 24)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEW**I**GIINPYSGVTIYNHKFKGR**A**T**L**T**V**D**K**SA**N**TAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6 VH4(SEQ ID NO: 25)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPG**K**RLEWMGIINPYSGVTIYNHKFKGRVT**L**T**V**D**K**SA**N**TAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6 VH5(SEQ ID NO: 26)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGIINPYSGVTIYNHKFKGRFV**L**S**V**D**K**SVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6 VH6(SEQ ID NO: 27)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGIINPYSGVTIYNHKFKGRFV**L**S**V**D**K**S**SN**TAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6 VH7(SEQ ID NO: 28)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGYTFTDYYMNWVRQASGKGLEWV
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFTLSVDKSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCARQDS
LLDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6VH8(SEQ ID NO: 29) (Graft IGHV1-3*01)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEW
MGIINPYSGVTIYNHKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDS
LLDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6VH9(SEQ ID NO: 30) (Graft IGHV7-4-1*02)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLL
DYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6VH10(SEQ ID NO: 31) (Graft IGHV3-73*01)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMNWVRQASGKGLEWV
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRQDSL
LDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6VH11 (SEQ ID NO: 32)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGQGLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFVLSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSL
LDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6VH12(SEQ ID NO: 33)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSL
LDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6VH13(SEQ ID NO:34)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGQGLEWM
GIINPYSGVTIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSL
LDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6VH14(SEQ ID NO: 35)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPYSGVTTYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSL
LDYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6VH15(SEQ ID NO: 36)

EVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWM
GIINPYSGSTIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLL
DYAMDYWGQGTTVTVSS

hu6 VL1(SEQ ID NO: 37)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGW**L**QQKPGKAPK**G**LIYH GANLEDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKV EIK

hu6 VL2 (SEQ ID NO: 38)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGW**L**QQKPGKAPK**G**LIYH GANLEDGVPSRFSGSGSG**A**D**Y**TLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKV EIK

hu6 VL3 (SEQ ID NO: 39)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGW**L**QQKPGK**SF**K**G**LIYHG ANLEDGVPSRFSGSGSG**A**D**Y**TLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVE IK

hu6 VL4 (SEQ ID NO: 40)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGW**L**QQKPGKAPK**G**LIYH GANLEDGVPSRFSGSGSG**A**D**Y**TLTISSLQPEDFA**D**YYCVQYAQFPYTFGGGTKV EIK

hu6VL5 (SEQ ID NO: 41) (Graft IGKV1-16*01)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWFQQKPGKAPKSLIYHG ANLEDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEI K

hu6VL6(SEQ ID NO: 42)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGW**L**QQKPGKAPK**G**LIYH GANLE**E**GVPSRFSGSGSG**A**D**Y**TLTISSLQPEDFA**D**YYCVQYAQFPYTFGGGTKV EIK

hu6VL7(SEQ ID NO: 43)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGW**L**QQKPGKAPK**G**LIYH GANLE**S**GVPSRFSGSGSG**A**D**Y**TLTISSLQPEDFA**D**YYCVQYAQFPYTFGGGTKV EIK

hu6VL8(SEQ ID NO: 44)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGW**L**QQKPGKAPK**G**LIYH GANLE**E**GVPSRFSGSGSG**A**D**Y**TLTISSLQPEDFA**D**YYCVQYAQ**Y**PYTFGGGTK VEIK

hu6VL9(SEQ ID NO: 45)

NIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGW**L**QQKPGKAPK**G**LIYH G**R**NLE**E**GVPSRFSGSGSG**A**D**Y**TLTISSLQPEDFA**D**YYCVQYAQ**Y**PYTFGGGTK VEIK

hu6VL10(SEQ ID NO: 46)

Graft(IGKV3-20*02)+ Y36L,Q42K,L46G,T69A,F71Y,E79Q,V85D + D56E

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASQGISGNMGWLQQKPGKAPRGLIYHGANLEEGIPARFSGSGSGADYTLTISRLQPEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

hu6VL11(SEQ ID NO: 47) Graft(IGKV3-20*02)+ D56E

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASQGISGNMGWYQQKPGQAPRLLIYHGANLEEGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

注：单下划线部分为 CDR，双下划线处为氨基酸取代位点，其余部分为 FR 区，下同。

mAb6 的人源化抗体的 CDR 如下：

表 6. mAb6 人源化抗体的 CDR

可变区	CDR	序列	SEQ ID NO
hu6VH14	HCDR2	INPYSGVT**T**YNHKFKG	48
hu6VH15	HCDR2	INPYSG**S**TIYNHKFKG	49
hu6VL6/VL8/VL10/VL11	LCDR2	HGANLE**E**	50
hu6VL7	LCDR2	HGANLE**S**	51
hu6VL9	LCDR2	HG**R**NLE**E**	52
hu6VL8/VL9	LCDR3	VQYAQ**Y**PYT	53

表 7. mAb6 的人源化抗体

可变区	VL1	VL2	VL3	VL4	VL5
VH1	hu6L1H1	hu6L2H1	hu6L3H1	hu6L4H1	hu6L5H1
VH2	hu6L1H2	hu6L2H2	hu6L3H2	hu6L4H2	hu6L5H2
VH3	hu6L1H3	hu6L2H3	hu6L3H3	hu6L4H3	hu6L5H3
VH4	hu6L1H4	hu6L2H4	hu6L3H4	hu6L4H4	hu6L5H4
VH5	hu6L1H5	hu6L2H5	hu6L3H5	hu6L4H5	hu6L5H5
VH6	hu6L1H6	hu6L2H6	hu6L3H6	hu6L4H6	hu6L5H6
VH7	hu6L1H7	hu6L2H7	hu6L3H7	hu6L4H7	hu6L5H7
VH8	hu6L1H8	hu6L2H8	hu6L3H8	hu6L4H8	hu6L5H8
VH9	hu6L1H9	hu6L2H9	hu6L3H9	hu6L4H9	hu6L5H9
VH10	hu6L1H10	hu6L2H10	hu6L3H10	hu6L4H10	hu6L5H10
VH11	hu6L1H11	hu6L2H11	hu6L3H11	hu6L4H11	hu6L5H11
VH12	hu6L1H12	hu6L2H12	hu6L3H12	hu6L4H12	hu6L5H12
VH13	hu6L1H13	hu6L2H13	hu6L3H13	hu6L4VH13	hu6L5H13

VH14	hu6L1H14	hu6L2H14	hu6L3H14	hu6L4VH14	hu6L5H14
VH15	hu6L1H15	hu6L2H15	hu6L3H15	hu6L4VH15	hu6L5H15

注：hu6L1H1 表示该抗体包含重链可变区 hu6VH1 和轻链可变区 hu6VL1，且其重链恒定区的序列为 SEQ ID NO：20，轻链恒定区的序列为 SEQ ID NO：21，其他类推。

表 8. mAb6 的人源化抗体

可变区	VL6	VL7	VL8	VL9	VL10	VL11
VH1	hu6L6H1	hu6L7H1	hu6L8H1	hu6L9H1	hu6L10H1	hu6L11H1
VH2	hu6L6H2	hu6L7H2	hu6L8H2	hu6L9H2	hu6L10H2	hu6L11H2
VH3	hu6L6H3	hu6L7H3	hu6L8H3	hu6L9H3	hu6L10H3	hu6L11H3
VH4	hu6L6H4	hu6L7H4	hu6L8H4	hu6L9H4	hu6L10H4	hu6L11H4
VH5	hu6L6H5	hu6L7H5	hu6L8H5	hu6L9H5	hu6L10H5	hu6L11H5
VH6	hu6L6H6	hu6L7H6	hu6L8H6	hu6L9H6	hu6L10H6	hu6L11H6
VH7	hu6L6H7	hu6L7H7	hu6L8H7	hu6L9H7	hu6L10H7	hu6L11H7
VH8	hu6L6H8	hu6L7H8	hu6L8H8	hu6L9H8	hu6L10H8	hu6L11H8
VH9	hu6L6H9	hu6L7H9	hu6L8H9	hu6L9H9	hu6L10H9	hu6L11H9
VH10	hu6L6H10	hu6L7H10	hu6L8H10	hu6L9H10	hu6L10H10	hu6L11H10
VH11	hu6L6H11	hu6L7H11	hu6L8H11	hu6L9H11	hu6L10H11	hu6L11H11
VH12	hu6L6H12	hu6L7H12	hu6L8H12	hu6L9H12	hu6L10H12	hu6L11H12
VH13	hu6L6H13	hu6L7H13	hu6L8H13	hu6L9VH13	hu6L10H13	hu6L11H13
VH14	hu6L6H14	hu6L7H14	hu6L8H14	hu6L9VH14	hu6L10H14	hu6L11H14
VH15	hu6L6H15	hu6LH15	hu6L8H15	hu6L9VH15	hu6L10H15	hu6L11H15

分别克隆、表达、纯化上述抗体，经蛋白结合实验（测试例 3)、细胞结合实验（测试例 2)、Biacore (测试例 1)，最终选出活性较好的人源化抗体。示例性的人源化抗体的重、轻链氨基酸序列如下：

Hu6（也称 hu6L4H12）重链（SEQ ID NO：54）：

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGIINPYSGVTIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN*

GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

Hu6（也称 hu6L4H12）轻链（SEQ ID NO：55）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWLQQKPGKAPKGLIYHG ANLEDGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKVE IK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

注：序列中下划线部分为可变区，斜体部分为恒定区。

实施例 4. 抗 DLL3-CD3 双特异性抗体的制备

4.1 本披露使用的 CD3 抗体

本披露的 CD3 结合部分可以来源于任意适宜的抗体。具体的，本披露的实施例采用的是 S107E，其可变区及 CDR 序列如下：

表 9. S107E 的 CDR

抗体	名称	序列	编号
S107E	HCDR1	KYAMN	SEQ ID NO：56
	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD	SEQ ID NO：57
	HCDR3	HGNFGN**E**YISYWAY	SEQ ID NO：58
	LCDR1	GSSTGAVTSGNYPN	SEQ ID NO：59
	LCDR2	GTKFLAP	SEQ ID NO：60
	LCDR3	VLWYSNRWV	SEQ ID NO：61

S107E 可变区序列如下：

> S107E-VH（SEQ ID NO：62）

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR HGNFGN**E**YISYWAYWGQGTLVTVSS

> S107E-VL（SEQ ID NO：63）

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGG GTKLTVL

注：下划线部分为 CDR。

4.2 本披露的 DLL3-CD3 双特异性抗体的结构

本披露的 DLL3-CD3 双特异性抗体分子包含两条链，具体结构如下：

链 1 结构：[VL(anti-DLL3)]-连接子 1-[VH(anti-CD3)]-连接子 2-[Fc (Knob, L234A，L235A，G237A，Y349C，T366W)]；

链 2 结构：[VL(anti-CD3)]-连接子 3-[VH(anti-DLL3)]-连接子 2-[Fc (hole, L234A，L235A，G237A，S354C，T366S，L368A，Y407V)]；

其示意图如图 1 所示。

双特异性抗体分子两条链的 Fc 区为能够以杵臼技术相互缔合的 Fc 区。 示例性的，链 1 的 Fc 区为具有根据杵臼技术的凸起结构（如 SEQ ID NO：64 或 SEQ ID NO：66），链 2 的 Fc 区为具有根据杵臼技术的孔结构（如 SEQ ID NO：65 或 SEQ ID NO：67）。

相关序列如下：

> IgG1Fc(Knob, L234A/L235A/S354C/T366W)（SEQ ID NO：64）

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IgG1Fc(Hole, L234A, L235A, Y349C,T366S, L368A,Y407V)（SEQ ID NO：65）

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Fc Knob(L234A，L235A，G237A，Y349C，T366W)(SEQ ID NO：66)

CPPCPAPE**AA**G**A**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSREEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Fc hole(L234A, L235A，G237A，S354C，T366S，L368A，Y407V) (SEQ ID NO：67)

CPPCPAPE**AA**G**A**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**REEMTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>连接子 1(SEQ ID NO：68)

GGGSGGGG

>连接子 2(SEQ ID NO：69)

G

>连接子 3(SEQ ID NO：70)

GGGGSGGGG。

基于 mAb6 人源化抗体氨基酸序列，构建了如下所示的双特异性抗体：hu6(D56E)-S107E-diabody

链 1：hu6-VL (D56E)-连接子 1- S107E -连接子 2- VH-Fc knob；（SEQ ID NO：71）

链 2：CD3VL -连接子 3- hu6VH -连接子 2- Fc hole；（SEQ ID NO：72）

注：hu6(D56E)-S107E-diabody 表示该分子采用 hu6(D56E)人源化抗体的可变区作为 DLL3 结合域，S107E 的可变区作为 CD3 结合域，采用 diabody 作为分子结构。

>链 1（SEQ ID NO：71）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWLQQKPGKAPKGLIYHGANLEEGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK*GGGSGGGG*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSS*G*CPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>链 2（SEQ ID NO：72）

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL*GGGGSGGGG*EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGIINPYSGVTIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTTVTVSS*G*CPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

本披露中使用的对照分子 AMG-75，其参考 WO2017021349 制备。对照分子的序列如下：

AMG-757（SEQ ID NO：73）：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYV
YYSGTTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYF
DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSCRAS
QRVNNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQQYDRSPLTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL
SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI
SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPN
WVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY
CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR
CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

测试例

测试例 1：Biacore 抗体亲和力测定

用 Protein A 生物传感芯片(Cat. # 29127556，Cytiva)亲和捕获待测抗体 18 秒，然后于芯片表面流经抗原人 DLL3（ACRO，DLL3-H52H4），食蟹猴 DLL3（KACTUS，DLL-RM103），小鼠 DLL3（KACTUS，DLL-MM103），人 CD3D&3E（ACRO，CDD-H52W1）和猴 CD3D&3E（ACRO，CDD-C52W4）180 秒，然后解离 600 秒。用 Biacore 8K(Cytiva)仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后，用 10 mM 甘氨酸-盐酸溶液（pH 1.5，Cat. # BR-1003-54，Cytiva）将芯片洗净再生。数据拟合模型采用 1:1 Model。结果见表 10 和表 11。

表 10. 抗体与人 DLL3 的亲和力（基于克隆 6）

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
M6CHI	9.65E+05	6.57E-04	6.81E-10
hu6L1H1	7.98E+05	2.25E-03	2.81E-09
hu6L1H2	7.87E+05	1.73E-03	2.19E-09

hu6L1H3	8.12E+05	2.24E-03	2.76E-09
hu6L2H1	7.09E+05	1.55E-03	2.19E-09
hu6L2H2	7.04E+05	1.16E-03	1.64E-09
hu6L2H3	6.95E+05	1.39E-03	2.01E-09
hu6L3H1	7.15E+05	1.44E-03	2.02E-09
hu6L3H2	7.16E+05	1.14E-03	1.59E-09
hu6L3H3	7.18E+05	1.35E-03	1.88E-09
hu6L4H4	7.43E+05	1.08E-03	1.45E-09
hu6L2H5	8.10E+05	7.84E-04	9.69E-10
hu6L2H6	8.63E+05	7.56E-04	8.77E-10
hu6L2H7	6.70E+05	2.05E-03	3.06E-09
hu6L2H11	2.06E+06	7.49E-04	3.63E-10
hu6L2H12	1.98E+06	9.13E-04	4.61E-10
hu6L2H13	2.10E+06	8.03E-04	3.82E-10
hu6L4H6	1.91E+06	8.11E-04	4.24E-10
hu6L4H11	2.14E+06	6.72E-04	3.14E-10
hu6L4H12	2.06E+06	8.05E-04	3.91E-10
hu6L4H13	2.16E+06	6.95E-04	3.22E-10

表 11. 双特异性抗体 hu6(D56E)-S107E-diabody 与不同种属抗原的亲和力

不同种属抗原	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD (M)**
人 DLL3	4.22E+05	4.62E-04	1.09E-09
食蟹猴 DLL3	2.64E+05	4.88E-04	1.85E-09
小鼠 DLL3	3.78E+05	4.51E-03	1.19E-08
人 CD3	1.93E+05	1.12E-02	5.82E-08
食蟹猴 CD3	2.66E+05	1.23E-02	4.60E-08

结果显示，本披露的特异性结合 DLL3 的人源化抗体，嵌合抗体与人 DLL3 均具有良好亲和力；双特异性抗体与人和食蟹猴的 DLL3 和 CD3 均具有良好的亲和力。

测试例 2：DLL3 细胞水平的 FACS 结合实验

将表达 DLL3 的小细胞肺癌细胞系 H1184（ATCC，货号 CRL-5858），DLL3/H82，DLL3/SHP77，hDLL3/CHO-s，cynoDLL3/CHO-s 细胞，表达 CD3 的细胞 Jurkat

（ATCC，TIB-152）用 FACS 缓冲液（1%BSA + pH 7.4 PBS）制备成 1×10^6/mL 的细胞悬液，100μL/孔加入 96 孔圆底板中。300g 离心 5 分钟，去除上清。加入不同浓度待测抗体，100μL/孔。放于 4℃冰箱中避光孵育 1 小时。300g 离心洗涤 3 次后，加入工作浓度的 APC anti-human IgG Fc (BioLegend，410712)或者 PE F(ab')2-羊抗人 IgG (invitrogen, H10104)，放于 4℃冰箱中避光孵育 40 分钟。300g 离心洗涤 3 次后，在 Invitrogen 流式细胞仪上检测几何平均数荧光强度，计算抗体对表达 DLL3 的细胞的结合 EC_{50} 值。结果见表 12 和表 13。

表 12. 抗体与表达人 DLL3 的 H1184 细胞的结合活性

抗体	Emax	EC_{50} (nM)
hu6L2H2	2193	0.06
hu6L4H4	2312	0.06
hu6L2H5	2486	0.06
hu6L2H6	2422	0.05
hu6L2H7	2196	0.07
hu6L2H11	1959	0.04
hu6L2H12	2145	0.10
hu6L2H13	2105	0.10
hu6L4H11	2188	0.07
hu6L4H12	2131	0.05
hu6L4H13	2118	0.09

表 13. 双特异性抗体与细胞的结合活性

抗体	hDLL3/CHO-S EC_{50}(nM)	CynoDLL3/CHO-S EC_{50}(nM)	Jurkat EC_{50}(nM)
hu6(D56E)-S107E-diabody	1.00	1.17	13.62

结果显示，本披露的抗 DLL3 人源化抗体与表达人 DLL3 的细胞具有良好结合能力；双特异性抗体对表达人和食蟹猴的 DLL3 细胞以及 CD3 的细胞有良好的结合能力。

测试例 3：DLL3 蛋白水平的 ELISA 结合实验

将 streptavidin(abcam，ab136200，1μg/ml)包板，100μL/孔，4℃过夜。用 PBST 溶液(PBS 含 0.1%吐温 20)250μL/孔，洗板 3 次。5%牛奶封闭，250μL/孔，37℃ 封闭 2 小时。用 PBST 溶液 250μL/孔，洗板 3 次。加入生物素化的 DLL3 抗原(1μg/mL)（SEQ ID NO：9），37℃ 孵育 1 小时。使用 PBST 溶液 250μL/孔，洗板 3 次。配

制抗体(最高浓度 400 nM，4 倍梯度稀释)，37℃ 孵育 1 小时。使用 PBST 溶液 250μL/孔，洗板 6 次。加入工作浓度的 human IgG (H+L)-HRP（Jackson, 109-035-003，1：4000 稀释）抗体，100μL/孔，37℃ 孵育 1 小时。使用 PBST 溶液 250μL/孔，洗板 6 次。加入 TMB (KPL, 5120-0077)显色液 100μL/孔， 室温显色 5-10 分钟。加入 1M H_2SO_4，100μL /孔，中止显色，酶标仪（Molecular Devices, VERSA max）450nm 读数。

表 14. 双特异性抗体与人 DLL3 蛋白的结合活性

抗体	EC_{50}(nM)	Emax
hu6(D56E)-S107E-diabody	0.49	0.33

结果显示，本披露的双特异性抗体对人 DLL3 蛋白有良好的亲和力。

测试例 4：DLL1 和 DLL4 蛋白的 ELISA 结合实验

将 DLL1(ACRO，DL1-H52H8，1μg/mL)和 DLL4(ACRO，DL4-H5227，1μg/mL)包板，100μL/孔，4℃过夜。用 PBST 溶液(PBS 含 0.1%吐温 20)250μL/孔，洗板 3 次。5%牛奶封闭，250μL/孔，37℃ 封闭 2 小时。用 PBST 溶液 250μL/孔，洗板 3 次。加入待检测抗体(最高浓度 100 nM，4 倍梯度稀释)，37℃ 孵育 1 小时。使用 PBST 溶液 250μL/孔，洗板 6 次。加入工作浓度的 human IgG (H+L)-HRP（Jackson, 109-035-003，1：4000 稀释）抗体，100μL/孔，37℃ 孵育 1 小时。使用 PBST 溶液 250μL/孔，洗板 6 次。加入 TMB (KPL，5120-0077)显色液 100μL/孔， 室温显色 5-10 分钟。加入 1M H_2SO_4，100μL /孔，中止显色，酶标仪（Molecular Devices, VERSA max）450nm 读数，结果见图 2A-图 2B。

结果显示，本披露的双特异性抗体未检测到结合人 DLL1 和 DLL4 蛋白。

测试例 5. 本披露的双特异性抗体对细胞的杀伤活性

本测试例研究了双特异性抗体作为 T 细胞衔接分子对肿瘤细胞的杀伤活性。用表达 LUC-GFP 的 SHP77、H1184 和 H460 稳转细胞系作为靶细胞来检测本披露的双特异性抗体的靶点特异性细胞毒活性。

SHP77/lucG 细胞培养在 1640+10% FBS+10 μg/mL 嘌呤霉素（puromycin）完全培养基中，一周传代 2-3 次。H1184/lucG 细胞培养在 1640+5% FBS+10 μg/mL 嘌呤霉素（puromycin）完全培养基中，一周传代 1 次。H460/lucG 细胞培养在 1640+10% FBS 完全培养基中，一周传代 2-3 次。冻存 PBMC（妙顺生物）复苏后用 1640+10% FBS 完全培养基重悬，置于 T75 培养瓶培养 4 小时（密度为 2E6 cells/mL）。PBMC 收集离心后用 1640+10% FBS 重悬、计数，调整细胞数为 1.5E6 cells/mL。将上述 PBMC 悬液和靶细胞悬液按照等体积混合，每孔加入 100 μL 确保 E:T Ratio 为 10:1。另外设置 PBMC ONLY 组，将上述 PBMC 悬液和 1640+10% FBS 完全培养基按照等体积混合。抗体用 1640+10% FBS 培养基稀释，起始浓度为 600 nM (6x 终浓度)，

5 倍稀释，9 个剂量点, 每孔加入 20 μL。处理好的细胞放在 37°C, 5% CO_2 的培养箱培养 48 小时。取出培养板，1000 rpm 离心 3 分钟，吸取 50 μL 上清于新的 3788 板中用于检测细胞因子检测，-20°C 保存。在培养板中加入 50 μL ONE-GloTMLuciferase (Promega，E6120)，室温孵育 5 分钟后，用 Vendor 检测 Luminescence，计算抗体在不同浓度下的杀伤作用。使用 Graphpad Prism8.0 软件根据抗体的对数浓度和信号值做出量效曲线图，得出抗体介导杀伤的 IC50。将只有靶细胞、PBMC 不加抗体的孔设为 0%抑制，计算抗体的最大抑制率 Imax。结果见表 15 及图 3。

表 15. 双特异性抗体 hu6(D56E)-S107E-diabody 对不同靶细胞的细胞毒活性

靶细胞	**Imax(%)**	**IC_{50}(pM)**
SHP77	96	83.04
H1184	97	19.68

结果显示，本披露的双特异性抗体对表达 DLL3 的细胞 SHP77 和 H1184 有较强的杀伤作用；而对不表达 DLL3 的 H460 细胞无杀伤作用（图 3）。

测试例 6. 本披露的双特异性抗体的体外 T 细胞激活活性

H82/DLL3 细胞培养在 1640+10% FBS 完全培养基中，一周传代 2-3 次，传代比例 1:3 左右。H460 细胞培养在 1640+10% FBS 完全培养基中，一周传代 2-3 次，传代比例 1:10 左右。Jurkat Lucia™ NFAT 细胞(InvivoGen)培养在 1640+10% FBS+100μg/ml zeocin(InvivoGen, ant-zn-1)完全培养基中，一周传代 2-3 次，传代比例 1:10 左右。收集 Jurkat Lucia™ NFAT 细胞，1000 rpm 离心 3 分钟，重悬、计数，调整细胞数为 1E6 cells/mL。收集靶细胞 H82/DLL3 细胞，1000 rpm 离心 3 分钟，重悬、计数，调整细胞数为 2E5 cells/mL。收集 H82/DLL3 和 H460 细胞，1000 rpm 离心 3 分钟，重悬、计数，调整细胞数为 4E5 cells/mL。将上述 Jurkat Lucia™ NFAT 和靶细胞按照等体积混合，每孔加入 100 μL，确保 H82/DLL3 细胞 E:T Ratio 为 5:1，H82/DLL3 和 H460 细胞 E:T Ratio 为 2.5:1。抗体用 1640+10% FBS 培养基稀释，起始浓度为 600nM (6×终浓度)，5 倍稀释，9 个剂量点, 每孔加入 20 μL。处理好的细胞放在 37°C, 5% CO_2 的培养箱培养 5 小时。用 25 mL 的 ddH_2O 溶解 QUANTI-Luc™ Gold 试剂(Invivogen, rep-qlcg5)。加入 50μL QUANTI-Luc™ Gold，室温孵育 5 分钟后，用 Vendor 检测 Luminescence，计算抗体在不同浓度下对 Jurkat Lucia™ NFAT 细胞的激活作用。使用 Graphpad Prism8.0 软件做图，结果见图 4A 至图 4B 和表 16。

激活倍数的公式 N=待测抗体的荧光读值/阴性孔的荧光读值

表 16. 双特异性抗体对 T 细胞的激活结果

抗体	**激活倍数**	**EC_{50}(pM)**
hu6(D56E)-S107E-diabody	22.20	15.21

结果显示，本披露的双特异性抗体只有在存在表达DLL3的DLL3/H82细胞时，才会激活T细胞；当存在不表达DLL3的阴性细胞H460时，不会激活T细胞。

测试例 7. 本披露的双特异性抗体的细胞因子释放水平

1. 本披露的双特异性抗体的细胞因子 IFNγ 释放水平

使用HTRF法检测在DLL3/CD3双抗在H1184细胞存在的情况下，分别刺激PBMC中细胞因子IFNγ分泌情况。

取出细胞杀伤实验中（测试例5）收集的冻存于-20°C冰箱的上清，常温解冻，震荡混匀。使用无菌水溶解IFNγ标准品粉末，使用1640+10% FBS培养基稀释标准品至需要的浓度。取出要检测IFNγ的试剂盒(CISBIO, 62HIFNGPEG)，平衡试剂盒至常温，使用detection buffer稀释试剂盒中的两个检测抗体（20倍稀释）。取16 μL细胞上清（10倍稀释用于IFNγ检测）及IFNγ标准品于96孔板中，加入4 μL 稀释好的对应的检测抗体；震荡混匀，1000 rpm离心1分钟，常温孵育过夜。取出孵育过夜的样品，1000 rpm离心1分钟，使用PHERAstar多功能酶标仪读取665 nm和620nm的吸收值。用Graphpad Prism 8分析数据，结果见图5A。

结果显示，本披露的双特异性抗体释放IFNγ的水平非常低。

2. 本披露的双特异性抗体的细胞因子 IL-6 释放水平

使用ELISA法检测在DLL3/CD3双抗在H1184细胞存在的况下，刺激PBMC中细胞因子IL-6分泌的情况。

取出细胞杀伤实验中（测试例5）收集的冻存于-20°C冰箱的上清，常温解冻，震荡混匀，样品使用样品稀释液稀释5倍备用。细胞因子检测前，取出IL-6 ELISA试剂盒（欣博盛生物科技有限公司，EHC007.96）常温平衡，根据说明书分别稀释IL-6标准品和进行检测测量OD450值，用Graphpad Prism 8分析数据。结果见图5B。

结果显示，本披露的双特异性抗体释放 IL6 的水平非常低，说明本披露的双特异性抗体具有更好的安全性。

体内活性评价

测试例 8. 本披露的双特异性抗体在 SHP77 皮下移植瘤模型中的药效

本披露采用重度联合免疫缺陷NOG小鼠接种SHP-77细胞，接种后腹腔注射人PBMC，成瘤后分组给药。

NOG小鼠，雌性，体重15-17 g左右，购自维通利华。SHP-77细胞来自ATCC。人PBMCs购自于妙顺（上海）生物科技有限公司，货号：ID#A10S115034。

将SHP-77细胞（4×10^6个/只小鼠）100 μL接种于NOG小鼠右肋部皮下。接种当天，复苏冻存的hPBMC。接种第2天，每只小鼠腹腔注射hPBMC 5×10^6/100

μL 的细胞悬液。接种 8 天后，待肿瘤体积在~120 mm^3 后去除体重、肿瘤过大和过小的，按肿瘤体积将小鼠随机分为 5 组，每组 8 只，当天开始给等摩尔量的抗体，给药量如表 32 所示。通过腹腔注射相应等摩尔量的抗体，每 5 天给药 1 次，共给药 3 次，给药到第 15 天。每周测 2 次瘤体积，称体重，记录数据。

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

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

抑瘤率 TGI(%)=100- T/C(%)。

表 17. 抗体在 SHP77 皮下移植瘤模型中的药效（给药后第 15 天）

分组	剂量（mg/kg）	抑瘤率 TGI（%）
溶媒	/	/
AMG-757	1	87
hu6(D56E)-S107E-diabody	0.96	107

结果显示，本披露的双特异性抗体可以显著抑制 SHP-77 移植瘤的生长。

测试例 9. 本披露的双特异性抗体在 H1184 皮下移植瘤模型中的药效

本披露采用重度联合免疫缺陷 NOG 小鼠接种 H1184 细胞，接种后腹腔注射人 PBMC，成瘤后分组给药。

NOG 小鼠，雌性，体重 15-17 g 左右，购自维通利华。H1184 细胞来自 ATCC。人 PBMCs 购自于妙顺（上海）生物科技有限公司，货号：ID#A10S115034。

将 H1184 细胞（3.5×10^6 个，含 50%MatriGel）200 μL/只接种于 NOG 小鼠右肋部皮下。接种第 11 天，复苏 8 支冻存 hPBMC（ID#A10S115034）。接种第 12 天，每只小鼠腹腔注射人 PBMC 5×10^6/100 μL 的细胞悬液。接种 18 天后，待肿瘤体积在~140 mm^3 后去除体重、肿瘤过大和过小的，按肿瘤体积将小鼠随机分为组，每组 8 只，当天开始给等摩尔量的抗体，给药量如表 33 所示。通过腹腔注射抗体，共给药 4 次，每周 2 次。每周测 2 次瘤体积，称体重，记录数据。

使用 Excel 统计软件记录数据：平均值以 avg 计算；SD 值以 STDEV 计算；SEM 值以 STDEV/SQRT（每组动物数）计算；采用 GraphPad Prism 软件作图，采用 Two-way ANOVA、One-way ANOVA、t-test 对数据进行统计学分析。

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

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

抑瘤率 TGI(%)=100- T/C(%)。

表 18. 抗体在 H1184 皮下移植瘤模型中的药效（给药后第 15 天）

分组	剂量（mg/kg）	抑瘤率 TGI（%）

溶媒	/	/
AMG-757	1	13
hu6(D56E)-S107E-diabody	0.96	55

结果显示，本披露的双特异性抗体可以显著抑制 H1184 移植瘤的生长。

二、制备实施例-特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体制剂

SEC 分子排阻色谱法：

根据凝胶孔隙的孔径大小与高分子样品分子的线团尺寸间的相对关系而对溶质进行分离的分析的方法。

SEC%（SEC 单体含量百分比）=A 单体/A 总×100%（A 单体为样品中主峰单体的峰面积，A 总为所有峰面积之和）。ΔSEC%=稳定性实验前制剂的 SEC%-稳定性实验后制剂的 SEC%。

SEC 测定用仪器：安捷伦 HPLC 1260；

柱子：Waters，BioResolve™ SEC mAb 200Å, 2.5μm 7.8×300mm Column

NR-CE 毛细管凝胶电泳：

将凝胶移到毛细管中作为支持介质进行的一种电泳，并在一定的电压下根据样品分子量的大小进行分离的方法。

NR-CE%（NR-CE 主峰含量百分比）=A 主峰/A 总×100%（A 主峰为样品中主峰的峰面积，A 总为所有峰面积之和）。ΔNR-CE%=稳定性实验前制剂的 NR-CE%-稳定性实验后制剂的 NR-CE%。

CE 测定用仪器：Beckman 毛细管电泳仪，型号 PA800 plus

iCIEF 全柱成像毛细管等电聚焦电泳：

根据蛋白质等电点 pI 不同进行分离的技术。

iCIEF%（iCIEF 中性峰含量百分比）=A 中性峰面积/A 总面积×100%（A 总面积为酸性峰、中性峰和碱性峰面积之和）。ΔiCIEF%=稳定性实验前制剂的 iCIEF%-稳定性实验后制剂的 iCIEF%。

iCIEF 测定用仪器：simple protein，型号 Muarice。

IEC 离子交换色谱：

以离子交换树脂或化学键合离子交换剂为固定相，利用被分离组分离子交换能力的差别或选择性系数的差别而实现分离的色谱方法。

IEC%（IEC 中性峰含量百分比）=A 中性峰面积/A 总面积×100%（A 总面积为酸性峰、中性峰和碱性峰面积之和）。Δ IEC %=稳定性实验前制剂的 IEC %-稳定性实验后制剂的 IEC %。

IEC 测定用仪器：安捷伦 HPLC 1260。

渗透压测定：

冰点法测定渗透压，以冰点下降值与溶液的摩尔浓度成正比例关系为基础，采用高灵敏度感温元件，测定溶液结冰点，通过电量转化为渗透压。

渗透压测定用仪器：罗泽 Loser，型号 OM815。

蛋白

以下实施例所采用的蛋白为特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体蛋白（hu6(D56E)-S107E-diabody，以下简称“蛋白”）。

融合蛋白的浓度测定用仪器：紫外可见分光光度计， 型号：Nano Drop oneC，光程为 1mm。

制剂实施例 1. pH 和缓冲体系筛选

用表 19 所示的缓冲体系制备 70 mg/mL 蛋白、80 mg/mL 蔗糖、0.4 mg/mL 聚山梨酯 80（PS80）的制剂。对样品进行强制降解研究（40°C 放置 4 周），以 SEC 和 IEC 为评价指标，进一步考察不同 pH 和缓冲体系对蛋白稳定性的影响。

结果见表 19。SEC 数据显示， Δ SEC 在 0.8%-3.2%范围内，其中 His-HCl 体系（pH4.5-5.5）和 His-AA 体系（pH5.0）组较优。Δ IEC 数据显示，His-HCl（pH4.5-5.5）体系和 CA 体系（pH5.5）组较优。综合 Δ SEC 和 Δ IEC 数据，优选 His-HCl 体系（pH4.5-5.5）。

表 19. pH 和缓冲体系筛选结果

组别	缓冲体系	条件	ΔSEC%	ΔIEC%
1	20 mM CA pH5.5	40°C W4	1.9	26.3
2	20 mM SA pH5.5	40°C W4	2.1	28.9
3	20 mM His-HCl pH4.5	40°C W4	1.1	23.6
4	20 mM His-HCl pH5.0	40°C W4	0.8	25.6
5	20 mM His-HCl pH5.5	40°C W4	1.5	25.3
6	20 mM His-HCl pH6.0	40°C W4	3.2	29.0
7	20 mM His-AA pH4.5	40°C W4	2.0	32.0
8	20 mM His-AA pH5.0	40°C W4	0.9	31.9

注： His-HCl 代表组氨酸-盐酸组氨酸；SA 代表琥珀酸-琥珀酸钠盐；CA 代表枸橼酸-枸橼酸钠盐；His-AA 代表组氨酸-醋酸组氨酸；40°C W4：40°C 放置 4 周，下同。

制剂实施例 2. 蛋白浓度筛选

用 18mM 的 His-HCl 缓冲剂（pH 5.0）制备 0.1mg/mL 二水合乙二胺四乙酸二钠（含二水，厂家：湖南尔康制药股份有限公司，后简称 EDTA-2Na，CAS: 6381-92-6）、80 mg/mL 蔗糖、0.4 mg/mL PS80 和表 20 所示的蛋白浓度的制剂。对样品进行强制降解研究（40°C 放置 4 周），以 SEC 和 IEC 为评价指标，考察不同蛋白浓度对蛋白稳定性的影响。

结果见表 20。40°C 放置 4 周，随着蛋白浓度提高，ΔSEC 略有增加趋势，ΔIEC 组间差异较小。

表 20. 蛋白浓度筛选结果

组别	蛋白浓度（mg/mL）	放置条件	ΔSEC%	ΔIEC%
1	1	40℃ W4	-0.5	23.9
2	5	40℃ W4	0.2	24.1
3	70	40℃ W4	0.8	25.6
4	100	40℃ W4	1.5	23.7
5	150	40℃ W4	3.6	22.0

制剂实施例 3. EDTA-2Na 浓度筛选

用 18mM 的 His-HCl 缓冲剂（pH 5.0）制备 100 mg/mL 蛋白、80 mg/mL 蔗糖、0.4 mg/mL PS80 和表 21 所示的不同浓度 EDTA-2Na 的制剂。对样品进行强制降解研究（40°C 放置 4 周），以 SEC、NR-CE 和 IEC 为评价指标，考察不同 EDTA-2Na 浓度对制剂稳定性的影响。

结果见表 21。40°C 放置 4 周，ΔSEC 在 0.7%-1.4%范围内，含 0.1mg/mL EDTA-2Na 的制剂单体纯度略优于其他组。ΔNR-CE 和 ΔIEC 组间无显著差异。

表 21. EDTA-2Na 浓度筛选结果

组别	EDTA-2Na 浓度（mg/mL）	放置条件	ΔSEC%	ΔNR-CE%	ΔIEC%
1	0.01	40℃ W4	1.3	1.9	24.5
2	0.1	40℃ W4	0.7	1.7	24.5
3	1.0	40℃ W4	1.4	1.8	23.8

制剂实施例 4. His-HCl 缓冲体系离子浓度筛选

用表 22 所示的不同离子浓度的 His-HCl 缓冲剂（pH 5.0）制备 100 mg/mL 蛋白、0.1mg/mL EDTA-2Na、80 mg/mL 蔗糖和 0.4 mg/mL PS80 的制剂。对样品进行强制降解研究（40°C 放置 4 周），以 SEC、NR-CE 和 IEC 为评价指标，考察不同组氨酸离子浓度对蛋白稳定性的影响。

结果见表 22。40°C 放置 4 周，ΔSEC、ΔNR-CE 和 ΔIEC 组间无显著差异。

表 22. His-HCl 缓冲体系浓度筛选结果

组别	His-HCl 缓冲体系离子浓度	放置条件	ΔSEC%	ΔNR-CE%	ΔIEC%
1	10	40℃ W4	1.1	1.4	23.1
2	18	40℃ W4	0.7	1.7	24.5
3	50	40℃ W4	1.1	1.5	23.2

制剂实施例 5. 糖浓度筛选

用 18mM 的 His-HCl 缓冲剂（pH 5.0）制备 100 mg/mL 蛋白、0.1mg/mL EDTA-2Na、0.4 mg/mL PS80 和表 23 所示的不同浓度蔗糖的制剂。对样品进行强制降解研究（40°C 放置 4 周），以 SEC、NR-CE 和 IEC 为评价指标，考察不同浓度蔗糖对制剂稳定性的影响。

结果见表 23。ΔSEC 在 0.7%-1.5%范围内，含 80mg/mL 蔗糖的制剂单体纯度略优于其他组。ΔNR-CE 和 ΔIEC 组间无显著差异。

表 23. 蔗糖浓度筛选结果

组别	蔗糖浓度（mg/mL）	放置条件	ΔSEC%	ΔNR-CE%	ΔIEC%
1	30	40°C W4	1.5	1.6	24.4
2	80	40°C W4	0.7	1.7	24.5
3	100	40°C W4	1.3	1.7	24.6

糖作为生物药常用辅料，本项目采用蔗糖作为渗透压调节剂及稳定剂进行处方筛选，可满足制剂要求。蔗糖浓度为 80 mg/mL 时，实际测定制剂的渗透压为 292mOsm，接近等渗。因此，优选蔗糖浓度为 80 mg/mL。

制剂实施例 6. 表面活性剂种类筛选

用 18mM 的 His-HCl 缓冲剂（pH 5.5）制备 70 mg/mL 蛋白、80 mg/mL 蔗糖和表 24 所示不同种类表面活性剂的制剂，包括 PS80 和泊洛沙姆 188（P188）。对样品进行强制降解研究（40°C 放置 4 周），以外观、SEC、NR-CE 和 iCIEF 为评价指标，考察不同种类表面活性剂对蛋白稳定性的影响。

结果见表 24。外观、ΔSEC、ΔNR-CE 和 ΔiCIEF 数据显示，40°C 放置 4 周后，含不同种类表面活性剂的制剂外观和纯度项无显著差异。

表 24. 表面活性剂浓度筛选结果

组别	表面活性剂种类及浓度（mg/mL）	放置条件	外观	ΔSEC%	ΔNR-CE%	ΔiCIEF%
1	PS80（0.4 mg/mL）	40°C W4	澄明	1.2	4.9	26.8
2	P188（2 mg/mL）	40℃ W4	澄明	1.1	3.8	27.8

制剂实施例 7. 表面活性剂浓度筛选

用 18mM 的 His-HCl 缓冲剂（pH 5.0）制备 100 mg/mL 蛋白、0.1 mg/mL EDTA-2Na、80 mg/mL 蔗糖和表 25 所示不同浓度 PS80 的制剂。对样品进行强制降解研究（40°C 放置 4 周），以外观、SEC、NR-CE 和 IEC 为评价指标，考察不同浓度表面活性剂对蛋白稳定性的影响。

结果见表 25。外观、ΔSEC、ΔNR-CE 和 ΔIEC 数据显示，40°C 放置 4 周后，含不同浓度 PS80 的制剂外观和纯度项无显著差异。

表 25. 表面活性剂浓度筛选结果

组别	PS80 浓度（mg/mL）	放置条件	外观	ΔSEC%	ΔNR-CE%	ΔIEC%
1	0.1	40℃ W4	澄明	0.9	1.4	24.0
2	0.4	40℃ W4	澄明	0.7	1.7	24.5
3	1.0	40℃ W4	澄明	1.0	1.5	23.8

制剂实施例 8.处方确认

用 18mM 的 His-HCl 缓冲剂（pH 5.0）制备 150 mg/mL 蛋白、0.1mg/mL EDTA-2Na、80 mg/mL 蔗糖和 0.4 mg/mL PS80 的制剂。对样品进行长期稳定性研究（5℃放置 6 个月），以 SEC 和 IEC 为评价指标，考察该处方的蛋白稳定性。

结果见表 26。5℃放置 6 个月，与第 0 天相比，SEC 和 IEC 均无显著变化，因此在该蛋白浓度条件下，蛋白稳定性良好。

表 26. 蛋白浓度 150mg/mL 处方长期稳定性结果

组别	放置条件	SEC%	IEC%
		单体	中性峰
1	第 0 天	99.2	63.6
2	5℃，M6	98.6	62.8

制剂实施例 9.处方确认

用 18 mM His-HCl 缓冲剂（pH 5.0）制备 100 mg/mL 蛋白、0.1 mg/mL EDTA-2Na、0.4 mg/mL PS80 和 80 mg/mL 蔗糖的制剂。对样品进行长期稳定性研究，以 SEC、NR-CE、IEC 为评价指标，考察长期稳定性。

结果见表 27。SEC、NR-CE 和 IEC 数据显示，5°C 放置 12 个月后制剂纯度项无显著变化。

表 27.长期稳定性结果

组别	放置条件	SEC%	NR-CE%	IEC%
		单体	单体	中性峰
1	第 0 天	98.4	99.3	61.3
	5°C，M3	97.9	99.2	61.5
	5°C，M12	96.2	99.1	57.7

注： 5°C，M3/M12：5°C 放置 3 个月/12 个月。

制剂实施例 10.处方确认

用 18 mM His-HCl 缓冲剂（pH 5.0）制备 5 mg/mL 蛋白、0.1 mg/mL EDTA-2Na、0.4 mg/mL PS80 和 80 mg/mL 蔗糖的制剂。对样品进行长期稳定性研究，以 SEC、IEC 为评价指标，考察长期稳定性。

结果见表 28。SEC 和 IEC 数据显示，5°C 放置 6 个月后制剂纯度项无显著变化。

表 28.长期稳定性结果

组别	放置条件	SEC%	IEC%
		单体	中性峰
1	第 0 天	99.6	66.5
	5°C，M1	99.6	66.7
	5°C，M6	99.7	63.8

注： 5°C，M1/M6：5°C 放置 1 个月/6 个月。

虽然为了清楚的理解，已经借助于附图和实例详细描述了上述发明，但是描述和实例不应当解释为限制本披露的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

权利要求书

1. 一种药物组合物，包含特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体和缓冲剂，其中：

所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体包含一条具有式 I 所示结构的第一链和一条具有式 II 所示结构的第二链，

式 I： [DLL3-VL]-[连接子 1]- [CD3-VH]- [连接子 2]- [Fc1]，

式 II： [CD3-VL]- [连接子 3]- [DLL3-VH]- [连接子 2]-[Fc2]，

所述 DLL3-VH 包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 DLL3-HCDR1，包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列的 DLL3-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列的 DLL3-HCDR3；和所述 DLL3-VL 具有：包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列的 DLL3-LCDR1，包含 SEQ ID NO：50 的氨基酸序列的 DLL3-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 DLL3-LCDR3；和

所述 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列的 CD3-HCDR1，包含 SEQ ID NO：57 的氨基酸序列的 CD3-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：58 的氨基酸序列的 CD3-HCDR3；和所述 CD3-VL 具有：包含 SEQ ID NO：59 的氨基酸序列的 CD3-LCDR1，包含 SEQ ID NO：60 的氨基酸序列的 CD3-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：61 的氨基酸序列的 CD3-LCDR3；

其中：式 I 和式 II 所示的结构是从 N 端至 C 端排列的；所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 是相同或不同的肽连接子；所述 Fc1 和所述 Fc2 是能够以杵臼技术相互缔合的 Fc 区结构序列；

所述缓冲剂为组氨酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂、枸橼酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂或磷酸盐缓冲剂；

优选地，所述缓冲剂为组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂、组氨酸-醋酸组氨酸缓冲剂或枸橼酸-枸橼酸钠盐缓冲剂；

更优选地，所述缓冲剂为组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。

2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 6.0；优选地，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5；更优选地，所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2；最优选地，所述药物组合物的 pH 为约 5.0。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合物，其中所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为 1 mg/mL 至 250 mg/mL；

优选地，所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为 1 mg/mL 至 150 mg/mL；

进一步优选地，所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为 70 mg/mL 至 150 mg/mL；

更优选地，所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为 80 mg/mL 至 120 mg/mL；

最优选地，所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为约 100 mg/mL。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合物，其中所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为 1 mg/mL 至 20 mg/mL；

优选地，所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为 1 mg/mL 至 10 mg/mL；

更优选地，所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为 4 mg/mL 至 6 mg/mL；

最优选地，所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体的浓度为约 5 mg/mL。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含表面活性剂；优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯或泊洛沙姆；更优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯 80 或泊洛沙姆 188；最优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯 80。

6. 根据权利要求 5 所述的药物组合物，其中所述聚山梨酯 80 的浓度为 0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL；优选地，所述聚山梨酯 80 的浓度为 0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL；进一步优选地，所述聚山梨酯 80 的浓度为 0.2 mg/mL 至 0.6 mg/mL；更优选地，所述聚山梨酯 80 的浓度为 0.3 mg/mL 至 0.5 mg/mL；最优选地，所述聚山梨酯 80 的浓度为约 0.4 mg/mL。

7. 根据权利要求 5 所述的药物组合物，其中所述泊洛沙姆 188 的浓度为 0.5mg/mL 至 5.0 mg/mL；优选地，所述泊洛沙姆 188 的浓度为 1 mg/mL 至 3mg/mL；更优选地，所述泊洛沙姆 188 的浓度为 1.5mg/mL 至 2.5mg/mL；最优选地，所述泊洛沙姆 188 的浓度为约 2.0mg/mL。

8. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含糖；优选地，所述糖为蔗糖、海藻糖、甘露醇或山梨糖醇；更优选地，所述糖为蔗糖。

9. 根据权利要求 8 所述的药物组合物，其中所述糖的浓度为 10 mg/mL 至 120 mg/mL；优选地，所述糖的浓度为 30 mg/mL 至 100 mg/mL；更优选地，所述糖的浓度为 64 mg/mL 至 96 mg/mL；最优选地，所述糖的浓度为约 80 mg/mL。

10. 根据权利要求 1 至 9 任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 100 mM；优选地，所述缓冲剂的浓度为 10 mM 至 50 mM；进一步优选地，所述缓冲剂的浓度为 10 mM 至 30 mM；更优选地，所述缓冲剂的浓度为 15 mM 至 25 mM；最优选地，所述缓冲剂的浓度为约 18 mM。

11. 根据权利要求 1 至 10 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含辅料；优选地，所述辅料为二水合乙二胺四乙酸二钠、DTPA、盐酸精氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、氯化钠或氯化钙；更优选地，所述辅料为二水合乙二胺四乙酸二钠。

12. 根据权利要求 11 所述的药物组合物，其中所述辅料的浓度为 0.01 mg/mL 至 1 mg/mL；优选地，所述辅料的浓度为 0.01 mg/mL 至 0.5 mg/mL；更优选地，所述辅料的浓度为 0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL；最优选地，所述辅料的浓度为约 0.1 mg/mL。

13. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体中：

所述 DLL3-VH 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列，和所述 DLL3-VL 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列；和

所述 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：62 的氨基酸序列，和所述 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：63 的氨基酸序列。

14. 根据权利要求 1 至 13 任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体中所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构，和所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构；

优选地，所述 Fc1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：66 所示；和所述 Fc2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：67 所示。

15. 根据权利要求 1 至 14 任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体中所述的连接子 1、连接子 2 和连接子 3 相同或不同，各自独立地选自 SEQ ID NO：68、SEQ ID NO：69 和 SEQ ID NO：70。

16. 根据权利要求 1 至 15 任一项所述的药物组合物，其中特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，其中

式 I 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：71 所示，和式 II 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：72 所示。

17. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 250 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 0.5 mg/mL 至 5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）10 mg/mL 至 120 mg/mL 的糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 6.0；

优选地，所述药物组合物包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 1 mg/mL 至 3 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂、组氨酸-醋酸组氨酸缓冲剂或枸橼酸-枸橼酸钠盐缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5；

进一步优选地，所述药物组合物包含如下组分：

（a）70 mg/mL 至 150 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.2 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 1 mg/mL 至 3 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 30 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5；

更优选地，所述药物组合物包含如下组分：

（a）80 mg/mL 至 120 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.3 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 1.5 mg/mL 至 2.5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）15 mM 至 25 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2；

最优选地，所述药物组合物包含如下组分：

（a）约 100 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b 约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）约 80mg/mL 的蔗糖，

（d）约 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）约 18mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为约 5.0。

18. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 20 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.01 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 0.5 mg/mL 至 5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）10 mg/mL 至 120 mg/mL 的糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）5 mM 至 100 mM 的缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 6.0；

优选地，所述药物组合物包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 10 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80 或 0.5 mg/mL 至 5 mg/mL 泊洛沙姆 188，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂、组氨酸-醋酸组氨酸缓冲剂或枸橼酸-枸橼酸钠盐缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5；

进一步优选地，所述药物组合物包含如下组分：

（a）1 mg/mL 至 10 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.1 mg/mL 至 1.0 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）30 mg/mL 至 100 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.01 mg/mL 至 1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）10 mM 至 50 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 5.5；

更优选地，所述药物组合物包含如下组分：

（a）4 mg/mL 至 6 mg/mL 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）0.3 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）64 mg/mL 至 96 mg/mL 的蔗糖，

（d）0.08 mg/mL 至 0.12 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）15 mM 至 25 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 4.8 至 5.2；

最优选地，所述药物组合物包含如下组分：

（a）约 5 mg/m 的所述特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，

（b）约 0.4mg/mL 的聚山梨酯 80，

（c）约 80 mg/mL 的蔗糖，

（d）约 0.1 mg/mL 的二水合乙二胺四乙酸二钠，和

（e）约 18 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为约 5.0。

19. 根据权利要求 1 至 18 任一项所述的药物组合物，其为皮下注射制剂、静脉注射制剂、腹腔注射制剂或肌肉注射制剂；优选为皮下注射制剂。

20.一种制备冻干制剂的方法，其中包括将权利要求 1 至 18 任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。

21. 一种冻干制剂，所述制剂通过权利要求 20 所述的方法获得的。

22. 权利要求 1 至 19 任一项所述的药物组合物，或权利要求 21 所述的冻干制剂在制备用于治疗肿瘤或癌症的药物中的用途；优选地，其中所述肿瘤或癌症选自：

肺癌、小细胞肺癌、大细胞肺癌、头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、咽鳞癌、口腔鳞癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌、恶性胸膜间皮瘤、乳腺癌、肝癌、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结肠癌、结肠直肠癌、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、皮肤癌、黑色素瘤、大细胞肺癌、三阴性乳腺癌和淋巴瘤。