抗 DLL3 抗体及其用途

相关申请的交叉引用

本申请基于申请号为 202410297394.5，申请日为 2024 年 3 月 15 日的中国专利申请提出，并要求所述中国专利申请的优先权，所述中国专利申请的全部内容在此引入本申请作为参考。

本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段可以特异性结合 DLL3 蛋白，例如人 DLL3 蛋白。本发明还提供了特异性结合 DLL3 以及一种或多种肿瘤相关抗原的多特异性结合分子，例如多特异性抗体。本发明进一步提供了编码所述抗体的核酸分子、用于表达所述抗体的表达载体、宿主细胞及其制备方法。本发明还提供了使用本发明的抗体的诊断和治疗方法。

发明背景

DLL3(即，δ样配体 3 或δ样蛋白 3)是 I 型单次跨膜蛋白，并且是 Notch 配体之一，包含 1 个 DSL 结构域，6 个表皮生长因子样结构域和一个跨膜结构域。正常情况下，DLL3 在正常组织表达有限，且定位于高尔基体内部，不会表达在细胞膜表面，而在一些神经内分泌肿瘤类型(包括 SCLC 和 LCNEC)的细胞中，比如说小细胞肺癌，会异常高表达 DLL3(70%-80%)，异常表达的 DLL3 不仅定位于高尔基体，而且在细胞膜表面也能检测到。

因此，DLL3 是用于神经内分泌肿瘤治疗有前景的靶标。近年来已经开发了针对 DLL3 的治疗剂用于治疗表达 DLL3 的肿瘤或癌症。

对于 DLL3 而言，可以开发一种由抗体和毒素偶联在一起形成的抗体毒素偶合物(ADC)。然而这一策略在临床上面临较大挑战，可能的原因也在于 DLL3 在细胞表面表达丰度较低导致， Rova-T 药物选择活性较强的 PBD 作为毒素载荷，临床剂量较低，药效一般。

还尝试将 DLL3 靶向与其他蛋白质的靶向组合。举例而言，WO2019234220A1、US10294300 或 Susanne Hipp et al.,A Bispecific DLL3/CD3 IgG-Like T-Cell Engaging Antibody Induces Antitumor Responses in Small Cell Lung Cancer, Clin Cancer Res 2020;26:5258–68 或 Giffin MJ et al., AMG 757, a Half-Life Extended, DLL3-Targeted Bispecific T-Cell Engager, Shows High Potency and Sensitivity in Preclinical Models of Small-Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res. 2021 Mar 1;27(5):1526-1537 均描述了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。

CD3 是特异性表达于 T 细胞上的表面分子，作为 TCR 的共受体，TCR 胞内段没有传递信号的结构域，因此当 TCR 接收到来自 MHC/HLA 的信号时，CD3 不同亚基可以聚集在一起，从而向下游传递 T 细胞激活的信号。功能性 CD3 由以下四种不同链中的两种的二聚缔合形成：ε、ζ、δ和γ。CD3 二聚体排列包含γ/ε、δ/ε和ζ/ζ。已显示针对 CD3 的抗体在 T 细胞上聚集 CD3，从而以类似于通过肽负载的 MHC 分子参与 TCR 的方式引起 T 细胞活化。因此，已提出抗 CD3 抗体用于涉及 T 细胞活化的治疗目的。此外，已提出能够结合 CD3 和靶向肿瘤表面抗原的双特异性抗体能够将肿瘤细胞和 T 细胞衔接，促使 T 细胞表面的 CD3 交联在一起，从而直接活化 T 细胞，释放颗粒酶、穿孔素及细胞因子杀伤肿瘤，从而达到抑制肿瘤的治疗目的。

但是，本领域仍然有待于开发作为药物适用的安全的抗 DLL3 抗体，以及基于其构建的特异性结合 DLL3 以及其他靶抗原特别是 CD3 的多特异性抗原结合分子，应用于治疗肿瘤。

发明内容

本发明的一个方面涉及一种特异性结合 DLL3 的结合分子，例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，包括特异性结合 DLL3 和其他靶标的多特异性结合分子，例如多特异性抗体，如双特异性抗体。

本发明一个方面涉及一种抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段与 DLL3（例如人 DLL3）特异性结合。在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段与 DLL3（例如人 DLL3）的结合亲和力的 K_D 值小于或等于大约 10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM 或 0.6nM，或在所述数值之间。在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段与 DLL3（例如人 DLL3）的结合亲和力的 K_D 值大于或等于大约 0.5nM。

在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段能够有效结合 DLL3，并通过 Fc 区与 FcR 结合传递下游信号通路，例如抗 DLL3 抗体的 Fc 端结合巨噬细胞传递 CD64 下游通路进而诱发巨噬细胞吞噬作用

本发明的另一个方面涉及一种基于本发明的 DLL3 抗体构建的多特异性结合分子（例如多特异性抗体，如双特异性抗体），其包含来自本发明抗 DLL3 抗体的靶标结合区，以及任选地一个或多个其他靶标结合区（抗原结合区）。

在一个实施方案中，本发明涉及一种特异性结合 DLL3 和一种或多种其他抗原的多特异性抗体，例如双特异性抗体。在一些实施方案中，其他抗原是 CD3。

在一个实施方案中，本发明涉及一种特异性结合 DLL3（例如人 DLL3）和 CD3（例如人 CD3）的双特异性抗体。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体能够 DLL3 依赖性的激活 CD3 的信号通路。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体能在 DLL3 阳性肿瘤内激活 T 细胞，例如 CD4 或 CD8T 细胞，例如激活其释放细胞因子，例如释放 TNF，如 TNFα，或释放白介素，例如 IL2。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体能够激活人 T 细胞杀伤肿瘤细胞，例如激活人 T 细胞杀伤 DLL3 阳性肿瘤细胞。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体能够特异性结合 DLL3（例如人 DLL3）和 CD3（例如人 CD3）。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体，例如特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体，具有抗肿瘤（例如 DLL3 阳性肿瘤）活性，例如具有体内抗肿瘤活性。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体，能够与其他治疗剂组合，用于抗肿瘤（例如 DLL3 阳性肿瘤）。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体的半衰期长，大于大约 100 小时、110 小时、120 小时、130 小时、140 小时、145 小时、150 小时或 155 小时或在其之间，例如在 100-200 小时之间，例如在 140-160 小时之间，例如在大约 148-159 小时之间。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体具有较好的成药性，例如其成药性风险低例如其具有较好的胶体稳定性、较低的非特异性结合、较低的疏水性，较高的热稳定性（例如 Tagg 在大约 60℃以上，例如在大约 61℃、62℃、63℃或 64℃以上）。

附图说明

图 1 显示了待测抗体与 DLL3 过表达 CHO 细胞的结合;

图 2 显示了待测抗体剂量依赖性地激活 CD64 下游信号通路;

图 3 显示了双特异性抗体的制备路线（A）和结构（B）;

图 4 显示了待测双特异性抗体 DLL3/CD3 和人 DLL3（A）及人 CD3（B）的亲和力;

图 5 显示了待测双特异性抗体 DLL3/CD3 和 DLL3 过表达 CHO 细胞的结合;

图 6 显示了待测双特异性抗体 DLL3/CD3 和人 CD4 T 细胞(图 6B)和 CD8 T 细胞(图 6A)表面的 CD3 结合;

图 7 显示了待测双特异性抗体 DLL3/CD3 在细胞中激活 NFAT 信号的活性;

图 8 显示了待测双特异性抗体 DLL3/CD3 剂量依赖性地诱导人 CD8+ T 细胞对 SHP77 靶细胞的杀伤作用（图 8A）和对非靶细胞 H460 的作用（图 8B）;

图 9 显示了去除 hotspot 突变位点后的单抗与 DLL3 的结合活性和表达产量;

图 10 显示了去除 hotspot 突变位点后的单抗与 DLL3 过表达 CHO 细胞的结合;

图 11 显示了待测双特异性抗体 DLL3/CD3 和 DLL3 过表达 CHO 细胞的结合;

图 12 显示了待测双特异性抗体 DLL3/CD3 在细胞中激活 NFAT 信号的情况;

图 13 和 14 显示了待测双特异性抗体 DLL3/CD3 剂量依赖性地诱导人 CD8+ T 细胞对 SHP77 靶细胞的杀伤作用;

图 15 显示了待测双特异性抗体与人 DLL3 的结合;

图 16 显示了待测双特异性抗体与 CHO-hDLL1 以及 293T-hDLL4 细胞的结合;

图 17 显示了待测双特异性抗体与 DLL3 过表达细胞系以及 T 细胞的结合;

图 18 显示了待测双特异性抗体在体外细胞中激活 NFAT 信号的情况;

图 19 显示了待测双特异性抗体在体外对肿瘤细胞的杀伤活性;

图 20 显示了待测双特异性抗体在无 DLL3 交联情况下，对 PBMC 中在免疫细胞产生细胞因子的情况;

图 21 显示了待测双特异性抗体在体内抑制肿瘤生长的活性;

图 22 显示了组别 IgG1 0.1mpk（图 22A）、BI-D3C1 analog 0.01mpk（图 22B）以及 D3-107/CD3-C1 0.01mpk（图 22C）给药后肿瘤内的 CD3 阳性细胞的浸润;

图 23 显示了不同给药组别下单位面积 CD3 阳性细胞数量;

图 24 显示了待测双特异性抗体在体内抑制肿瘤生长的活性;

图 25 显示了待测双特异性抗体在体内抑制肿瘤生长的活性;

图 26 显示了待测双特异性抗体和标准化疗联用在体内抑制肿瘤生长的活性;

图 27 显示了待测双特异性抗体和免疫检查点抑制剂联用在体内抑制肿瘤生长的活性;

图 28 显示了待测双特异性抗体在体内的 PK 检测结果。

发明详述

应理解本发明不限于本文中描述的特定方法、方案、实施例和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。

I. 定义

除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。要理解，本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案，并且不意味是限制性的。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5%、4%、3%、2%或 1%的下限和比指定数字数值大 5%、4%、3%、2%或 1%的上限的范围内的数字数值。

如本文所用，术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项或全部。

在本文中当提及“第一”“第二”时，仅为了区分两个结构域或两条链，而不以任何方式表明两个结构域的位置。

如本文所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

本文所使用的术语“DLL3”是指属于 Notch 配位体家族的 I 型跨膜蛋白。人 DLL3 包括例如具有如 UniProtKB/Swiss-Prot: Q9NYJ7 中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中，DLL3 是人 DLL3。

如本文所使用的，“结合 DLL3 的抗体”或“抗 DLL3 抗体”或 “特异性结合 DLL3 的抗体”是指这样的抗体：所述抗体能够以适当的亲和力结合 DLL3。

在一些方面，本文所述的抗 DLL3 抗体也涵盖同时特异性结合 DLL3 和其它靶标抗原的多特异性抗体，例如双特异性抗体。

本文所使用的术语“CD3”指表达在 T 细胞上作为多分子 T 细胞受体(TCR)的部分的抗原，即 T 细胞衔接抗原 T 细胞表面糖蛋白 CD3，其是由下列四条受体链中的二条链所形成的同源二聚体或异源二聚体所组成：CD3-ε、CD3-δ、CD3-ζ 和 CD3-γ。人类 CD3-εn(hCD3ε)包含 UniProtKB/Swiss-Prot： P07766 中所述的氨基酸序列。人类 CD3-δ(hCD3δ) 包含 UniProtKB/Swiss-Prot: P04234 中所述的氨基酸序列。在一些实施方案中，本发明所述的 CD3 是指来自人或猴（例如食蟹猴）的 CD3。

本文所使用的术语“结合 CD3 的抗体”或“抗 CD3 抗体”包含特异性识别单一 CD3 亚单元(例如 ε、δ、γ 或 ζ)或与其结合的抗体，以及特异性识别两个 CD3 亚单元的二聚复合物(例如，

γ/ε、δ/ε 和 ζ/ζCD3 二聚体)以及与其连结的抗体。本发明的抗体和抗原结合片段可与可溶性 CD3、结合 CD3 和/或细胞表面表达的 CD3 结合。可溶性 CD3 包含天然的 CD3 蛋白以及重组的 CD3 蛋白变异体，例如，缺乏跨膜区或另外不与细胞膜结合的单体和二聚体 CD3 结构。可以通过流式细胞术检测或生物膜层光学干涉技术检测，检测抗体对 CD3 的结合亲和力。

效应细胞包含效应 T 细胞(T 淋巴细胞)，例如 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、Th1、Th2 和调节 T 细胞(Tregs)。效应细胞还可以包含自然杀伤细胞、巨噬细胞、粒细胞、浆细胞或 B 细胞(淋巴细胞)。

关于人免疫球蛋白轻链和重链的氨基酸序列和核苷酸序列的一般信息在 Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中给出。

本发明的多特异性抗体可以包含接头。如本文所用的术语“接头”是指使得能够直接连接多特异性抗体的不同部分的任何分子。在多特异性抗体不同部分之间建立共价连接的接头的实例包括肽接头和非蛋白质聚合物，包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇、聚丙二醇的共聚物。在一些实施方案中，根据本发明的术语“肽接头”是指氨基酸的序列，其中所述序列将多特异性抗体的各个部分的氨基酸序列连接在一起。优选地，所述肽接头具有这样的长度，其足以连接两个实体，其方式使得它们维持它们相对于彼此的构象，使得不妨碍期望的活性。肽接头可以主要包括或可以不主要包括以下氨基酸残基：Gly、Ser、Ala 或 Thr。

术语“Fc 结构域”或“Fc 区”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的 C 端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然的免疫球蛋白“Fc 结构域”包含两个或三个恒定结构域，即 CH2 结构域、CH3 结构域和可选的 CH4 结构域。例如，在天然抗体中，免疫球蛋白 Fc 结构域包含源自 IgG、IgA 和 IgD 类抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域(CH2 结构域和 CH3 结构域)；或者包含源自 IgM 和 IgE 类抗体的两条重链的第二、第三和第四恒定结构域(CH2 结构域、CH3 结构域和 CH4 结构域)。除非本文中另外说明，否则 Fc 区或重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interes, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述的 EU 编号体系（也称作 EU 索引）进行编号。然而，Fc 区的 C 端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。两个 Fc 区可以实现二聚化以构成二聚 Fc，两个不同的 Fc 异二聚化形成异二聚 Fc。在本文中，术语“Fc 区”、“Fc 部分”和“二聚 Fc（例如异二聚 Fc）”不包括免疫球蛋白的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 以及重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL， 但在一些情况下可以包括在重链恒定区 N 端的铰链区。在一个实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区从 Asp221 或从 Cys226 或从 Asp231 延伸至重链的羧基端。

在一个实施方案中，人 IgG1 Fc 区多肽（包含部分铰链区）包含以下氨基酸序列或由其组成:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:26); 或

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO:27）。

在一个实施方案中，Fc 区来源于人的 Fc 区。在一个实施方案中，该 Fc 区包含人类恒定区的全部或部分。抗体 Fc 区直接参与补体激活、C1q 结合、C3 活化和 Fc 受体结合。在一个实施方案中，Fc 区是人 Fc 区。在一个实施方案中，Fc 区属于人 IgG4 亚类。在一个实施方案中，Fc 区属于人 IgG1 亚类。在一个实施方案中，Fc 区是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。

在本文中，“异二聚体 Fc 支架”是指包含两个不同的 Fc 区或由两个不同的 Fc 区二聚化后形成的支架，其可以在其 N 末端或 C 末端连接结合抗原的结构域（例如可以与靶分子结合的抗体的重链和/或轻链可变区或抗体的抗原结合片段，或可以与靶分子结合的配体或受体的可溶性部分），用于构成多特异性抗体例如双特异性抗体。

术语“CH1 区”指抗体重链多肽的从 EU 位置 118 延伸至 EU 位置 220 的部分(EU 编号体系)。在一个实施方案中，CH1 结构域包含 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC(SEQ ID NO:28)的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，CH1 可以包含部分铰链区。在一些实施方案中，Fc 区可以包含部分铰链区。

在本文中，根据 EU 编号系统，述及抗体 IgG 恒定区的特定氨基酸残基。例如，“S364”是指位于 EU 位置 364 的丝氨酸。在恒定区特定位置的氨基酸突变用（原始氨基酸,氨基酸位置,突变氨基酸）来表示。例如，“S364R”是指，位于 EU 位置 364 的丝氨酸(S)被精氨酸取代(R)。当述及突变组合时，组合的突变之间用加号(+)或“-”或“和”连接。“S364R+D399K”，S364R-D399K 或“S364R 和 D399K”表示 Fc 区同时包含突变 S364R 和 D399K。当在一个特定位置可以具有多种突变可能性时，在本文中，通过符号“/”来表示。例如，突变“K370T/S”表示 370 位的残基 K 可以替代为 T 或 S 残基。

对于多肽序列，“保守性改变”包括对多肽序列的置换、缺失或添加，但不实质性改变多肽序列的期望功能活性。例如，保守性置换常常导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。以下列出了 8 组含有互为保守替换的氨基酸：1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)；5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；和 8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。在一些实施方案中，术语“保守序列改变”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的本发明抗体分子或结合蛋白分子的目的抗原结合特征的氨基酸修饰。例如保守修改变体相对于亲本抗体或结合蛋白分子保持对目的抗原至少 80%,85%,90%,95%,98%,99%或更高，例如 100-110%或更高的结合亲和力。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。

术语“结合分子”是指能够与靶标特异性结合的任何分子，例如抗体或其抗原结合片段或融合蛋白。

术语“靶标”是指结合分子所针对的被结合物。靶标可以是抗原，也可以是配体或受体。术语“抗原”是指引发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫细胞的活化，或两者兼有。技术人员将理解，任何大分子，包括基本上所有的蛋白质或肽，都可以

用作抗原。此外，抗原可以衍生自重组或基因组DNA。如本文所用，术语“表位”指抗原中与抗体分子特异性相互作用的部分。在本发明的结合分子涉及来源于抗体的靶标结合区时，“靶标”和“抗原”可以互换使用。在一些实施方案中，抗原为CD3。

如本文所用的术语“靶标结合区”是指结合分子，例如多特异性结合分子或双特异性结合分子的结合特定靶标或抗原的部分。靶标结合区可以是例如抗体或免疫球蛋白本身或抗体片段。这种靶标结合区可以具有或可以不具有独立于结合分子的剩余部分的三级结构，并且可以作为单独实体结合或不结合其靶标。靶标结合区还可以是受体或配体，或受体的能够结合配体的结构域。在多特异性抗体或双特异性抗体时，也将“靶标结合区”称为“抗原结合区”。

如本文所用的术语“抗原结合区”是指抗体或其抗原结合片段，例如多特异性抗体或双特异性抗体的结合特定靶标或抗原的任何部分。抗原结合区可以是例如抗体或免疫球蛋白本身或抗体片段。这种抗原结合区可以具有或可以不具有独立于多特异性抗体或双特异性抗体的剩余部分的三级结构，并且可以作为单独实体结合或不结合其抗原/表位。在本发明的结合分子涉及来源于抗体的靶标结合区时，“靶标结合区”和“抗原结合区”可以互换使用。

术语“多特异性结合分子”是指至少是双特异性的多特异性结合分子，例如双特异性结合分子，即所述分子包含至少第一靶标结合区和第二靶标结合区，其中所述第一靶标结合区结合一种靶标或抗原且所述第二靶标结合区结合另一抗原或靶标。根据本发明的多特异性结合分子也涵盖包含多个靶标结合区/结合位点的多特异性结合分子。在一些实施方案中，本发明的多特异性结合分子是多特异性抗体。在一些实施方案中，本发明的双特异性结合分子是双特异性抗体。

如本文所用，术语“单特异性”指，具有一个或多个靶标结合区的多肽/蛋白分子，所述每一个结合区与相同靶标的相同位点或结构或相同抗原的相同表位结合。

如本文所用，术语“多特异性”结合分子例如抗体指具有至少两个靶标结合区，所述至少两个靶标结合区中的每一个靶标结合区与相同靶标的不同位点/结构或与不同靶标结合。多特异性结合分子是对至少两个不同靶标或位点/结构具有结合特异性的结合分子。在一个实施方案中，本文提供了这样的双特异性结合分子，其具有针对第一靶标和第二靶标的结合特异性。

如本文所用，术语“多特异性”抗体指具有至少两个抗原结合区的抗体，所述至少两个抗原结合区中的每一个抗原结合区与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。多特异性抗体是对至少两个不同抗原表位具有结合特异性的抗体。在一个实施方案中，本文提供了这样的双特异性抗体，其具有针对第一抗原和第二抗原的结合特异性。

当在多特异性抗体或双特异性抗体中提及“第一抗原结合区”时，是指结合第一抗原的结合区，而不意图限制抗体中所含的该抗原结合区的个数，例如多特异性抗体或双特异性抗体中可以包含1个或1个以上的第一抗原结合区。例如，双特异性抗体包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，但是可以包含1个或1个以上的第一抗原结合区和1个或1个以上的第二抗原结合区。

当在结合分子中提及“第一靶标结合区”时，是指结合第一靶标的结合区，而不意图限制结合分子中所含的该靶标结合区的个数，例如多特异性结合分子或双特异性结合分子中可以包含1个或1个以上的第一靶标结合区。例如，双特异性结合分子包含第一靶标结合区和第二靶标结合区，可以包含1个或1个以上的第一靶标结合区和1个或1个以上的第二靶标结合区。

当提及“靶标或抗原结合区来源于抗体”时，是指构成该靶标/抗原结合区的结合结构域

为或衍生自该抗体的特异性结合抗原的结合结构域，例如，抗原结合区的特异性结合抗原的片段例如 Fab 为或衍生自该抗体的相应片段例如 Fab，或抗原结合区的重链可变区和/或轻链可变区为或衍生自该抗体的重链可变区和/或轻链可变区，或者该抗原结合区的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个 CDR 为该抗体的 CDR。

术语“衍生自”是指在抗原结合区中的片段与其所来源的抗体的片段基本相同，但是在一个或多个位点处具有突变，例如取代、缺失或添加。在一个具体的实施方案中，所述突变不在抗体的 CDR 中。

术语“全抗体”或“全长抗体”在本文中可互换使用，是指具有天然免疫球蛋白分子结构的抗体分子。在常规四链 IgG 抗体的情况下，全长抗体包含由二硫键相互连接的两条重链(H)和两条轻链(L)。在仅具有重链而缺乏轻链的重链抗体情况下，全长抗体包含由二硫键相互连接的两条重链(H)。对于常规四链 IgG 抗体，全长抗体重链通常由重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成，其中重链恒定区至少包含 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3（以及任选地 CH4）。全长抗体轻链由轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成，其中轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。每个重链可变区 VH 和每个轻链可变区都由三个 CDR 和 4 个 FR 组成，从氨基端到羧基端以如下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。术语“抗体片段”包括完整抗体的一部分。在优选的实施方案中，抗体片段为抗原结合片段。

术语抗体的“抗原结合片段”是与全长抗体不同的分子，其包含全长抗体的一部分，但其能结合全长抗体的抗原或与全长抗体(即与抗原结合片段所来源的全长抗体)竞争结合抗原。可以通过重组 DNA 技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于 Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv、单链 Fv、双体抗体(diabody)、单域抗体(sdAb)、纳米抗体。例如，通过木瓜蛋白酶消化全长抗体能够获得 Fab 片段。此外，通过胃蛋白酶在铰链区的二硫键下面消化完全抗体产生 F(ab')2，其为 Fab’的二聚体，是二价的抗体片段。F(ab')2 可以在中性条件下通过破坏铰链区中的二硫键而被还原，由此将 F(ab')2 二聚体转化为 Fab' 单体。Fab'单体基本上是具有铰链区的 Fab 片段。Fv 片段由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成。Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 可以由独立的基因编码，但是也可以使用重组方法，使用合成性连接肽连接这两个结构域以使其作为单条蛋白链产生，并且在所述单条蛋白链中 VL 区和 VH 区配对以形成单链 Fv (scFv)。

“Fab 片段”或“Fab”在本文中可互换使用，用于指，由两条多肽链组成的、包含免疫球蛋白重链可变结构域 VH、重链恒定结构域 CH1、轻链可变结构域 VL 和轻链恒定结构域 CL 的免疫球蛋白片段，其中，一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VH 和选自 CH1 和 CL 的一个恒定区，另一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VL 和选自 CL 和 CH1 的另一恒定区，其中所述 VH 结构域和 VL 结构域配对形成抗原结合位点。在本文中，包含重链恒定区 CH1 的 Fab 多肽链也称作“Fab 重链”；相应地，包含轻链恒定区 CL 的 Fab 多肽链也称作“Fab 轻链”。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环（“超变环”）和/或含有抗原接触残基（“抗原接触点”）的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派方案的任一种或其组合确定，所述指派方案包括例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人. (1989) Nature 342: 877-883，Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948

(1997)），基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath)，Contact (University College London)，国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (www.imgt.cines.fr/上)，以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类(affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式或其组合确定的 CDR 序列。CDR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。

在一些实施方案中，本发明中抗体的重链可变区的 CDR 是按照 Kabat 或 Chothia，或 Kabat 和 Chothia 组合（后文称为 “Kabat& Chothia”，在 Kabat 编号系统下对应于 H26-H32）确定的。在一些实施方案中，本发明中抗体的轻链可变区的 CDR 是按照 Kabat 确定的。

在一个实施方案中，本发明抗 DLL3 抗体中的 HCDR1 按照 Kabat& Chothia 规则定义，HCDR2、HCDR3 按照 Kabat 规则定义， LCDRs 分别按照 Kabat 规则定义。

CDR	Kabat 方案	Chothia 方案	Kabat& Chothia
LCDR1（Kabat 编号系统）	L24-L34		
LCDR2（Kabat 编号系统）	L50-L56		
LCDR3（Kabat 编号系统）	L89-L97		
HCDR1（Kabat 和 Chothia 编号系统）	H31-H35	H26-H32	H26-H35
HCDR2（Kabat 编号系统）	H50-H65		
HCDR3（Kabat 编号系统）	H95-H102		

如下进行序列之间序列同一性的计算。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数，将所述序列出于最佳比较目的比对(例如，可以为了最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。在一个优选实施方案中，为比较目的，所比对的参考序列的长度是至少 30%、优选地至少 40%、更优选地至少 50%、60%和甚至更优选地至少 70%、80%、90%、100%的参考序列长度。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时，则所述分子在这个位置处是相同的。

“人源化抗体”是一种保留非人类抗体的抗原特异性反应性，同时作为治疗药对人施用时免疫原性较低的抗体。这可以例如通过保留非人类抗原结合位点并将抗体的剩余部分替换成它们的人类相应部分(即，将可变区中不参与结合的部分替换为人类抗体的相应部分)来实现。

如本文所用，术语“抗”、“结合”或“特异性结合”意指结合作用对靶标或抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。结合位点与特定靶标或抗原结合的能力可以通过流式细胞术或酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法如通过放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法（SPR）测定。

“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对其配偶物 Y 的亲和力可以通常由解离常数(K_D)表示，解离常数是解离速率常数和缔合速率常数(分别是 K_{dis} 和 K_{on})的比例。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力

的一个具体方法是本文中的ForteBio动力学结合测定法。

术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞，包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。

术语“个体”或“受试者”可互换地使用，是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如，奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类(例如，人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。特别地，个体是人。

术语“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转疾病的症状、并发症、或生化指征的发作、缓解症状或阻止或抑制疾病、病状或病症的进一步发展。

术语“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。

本文所述的术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗肿瘤，例如癌症中有效的任何物质，包括化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体（例如免疫检查点分子抗体）、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫抑制剂或激动剂）。

术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂或治疗方式以治疗本文所述疾病。这种施用包括以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂，例如以具有固定比例的活性成分的单一胶囊。或者，这种施用包括对于各个活性成分在多种或在分开的容器(例如片剂、胶囊、粉末和液体)中的共同施用。粉末和/或液体可以在施用前重构或稀释至所需剂量。此外，这种施用还包括以大致相同的时间或在不同的时间以顺序的方式使用每种类型的治疗剂。在任一情况下，治疗方案将提供药物组合在治疗本文所述的病症或病状中的有益作用。

术语“药物组合或组合产品”是指非固定组合产品或固定组合产品，包括但不限于药盒、药物组合物。术语“非固定组合”意指活性成分（例如，(i)本发明的抗体、以及(ii)其他治疗剂）以分开的实体被同时、无特定时间限制或以相同或不同的时间间隔、依次地施用于患者，其中这类施用在患者体内提供预防或治疗有效水平的两种或更多种活性剂。术语“固定组合”意指两种或更多种活性剂以单个实体的形式被同时施用于患者。优选对两种或更多种活性剂的剂量和/或时间间隔进行选择，从而使各部分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。各成分可以各自呈单独的制剂形式，其制剂形式可以相同也可以不同。

术语“药物组合物”指这样的组合物，其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。

“受试者/患者/个体样品”指从患者或受试者得到的细胞或流体的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织，像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品；体液，诸如泪液、玻璃体液、脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液。

肿瘤样品的例子在本文中包括但不限于肿瘤活检、细针吸出物、支气管灌洗液、胸膜液(胸水)、痰液、尿液、手术标本、循环中的肿瘤细胞、血清、血浆、循环中的血浆蛋白质、腹水、衍生自肿瘤或展现出肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系，以及保存的肿瘤样品，诸如福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤样品或冷冻的肿瘤样品。

II. 抗 DLL3 抗体

在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR）和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR）。

在一些方面中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）。在一些方面中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区（VL）。在一些方面中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）。在一些实施方案中，所述重链可变区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中，所述轻链可变区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明所述的抗 DLL3 抗体重链可变区 VH

(i)包含与 SEQ ID NO:12、13、14 或 15 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii)包含 SEQ ID NO: 12、13、14 或 15 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 12、13、14 或 15 所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明所述的抗 DLL3 抗体轻链可变区 VL

(i)包含与 SEQ ID NO:16、17 或 18 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii)包含 SEQ ID NO: 16、17 或 18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 16、17 或 18 所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明所述的抗 DLL3 抗体的 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 为

(i)如 SEQ ID NO: 12、13、14 或 15 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，或

(ii)相对于(i)的序列，在所述三个 HCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列，

例如，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 可以根据任何 CDR 定义规则定义，例如根据 Kabat、Chothia、IMGT、AbM 或 North 规则或其组合定义，优选地，所述 HCDR1 根据 Kabat& Chothia 规则确定， HCDR2、HCDR3 分别根据 Kabat 规则确定。

在一些实施方案中，本发明所述的抗 DLL3 抗体的 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为

(i)如 SEQ ID NO: 16、17 或 18 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，或

(ii)相对于(i)的序列，在所述三个 LCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列；

例如，所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 可以根据任何 CDR 定义规则定义，例如根据 Kabat、Chothia、IMGT、AbM 或 North 规则或其组合定义，优选地，所述 LCDR1、2 和 3 分别根据 Kabat 规则确定。

在一些实施方案中，本文所述的 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本文所述的 HCDR2 包含 SEQ ID NO:2、3、4 或 5 所示的氨基酸序列，或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本文所述的 HCDR3 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列，或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本文所述的 LCDR1 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列，或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本文所述的 LCDR2 包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列，或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本文所述的 LCDR3 包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列，或与其相比具有 1、2 或 3 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段中，

所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2、3、4 或 5 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

所述 VH 含有 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

所述 VH 含有 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

所述 VH 含有 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含

(i). 如 SEQ ID NO:13 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:18 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(ii). 如 SEQ ID NO:12 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

和如SEQ ID NO:16所示的VL中所含的三个互补决定区域LCDR1、LCDR2和LCDR3;

(iii). 如SEQ ID NO:13所示的VH中所含的三个互补决定区域HCDR1、HCDR2和HCDR3，和如SEQ ID NO:16所示的VL中所含的三个互补决定区域LCDR1、LCDR2和LCDR3;

(iv). 如SEQ ID NO:14所示的VH中所含的三个互补决定区域HCDR1、HCDR2和HCDR3，和如SEQ ID NO:16所示的VL中所含的三个互补决定区域LCDR1、LCDR2和LCDR3;

(v). 如SEQ ID NO:15所示的VH中所含的三个互补决定区域HCDR1、HCDR2和HCDR3，和如SEQ ID NO:16所示的VL中所含的三个互补决定区域LCDR1、LCDR2和LCDR3;

(vi). 如SEQ ID NO:12所示的VH中所含的三个互补决定区域HCDR1、HCDR2和HCDR3，和如SEQ ID NO:17所示的VL中所含的三个互补决定区域LCDR1、LCDR2和LCDR3;

(vii). 如SEQ ID NO:12所示的VH中所含的三个互补决定区域HCDR1、HCDR2和HCDR3，和如SEQ ID NO:18所示的VL中所含的三个互补决定区域LCDR1、LCDR2和LCDR3;或

(viii). 如SEQ ID NO:14所示的VH中所含的三个互补决定区域HCDR1、HCDR2和HCDR3，和如SEQ ID NO:18所示的VL中所含的三个互补决定区域LCDR1、LCDR2和LCDR3;

例如，所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3可以根据任何CDR定义规则定义，例如根据Kabat、Chothia、IMGT、AbM或North规则或其组合定义，优选地，所述HCDR1根据Kabat& Chothia规则确定， HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3分别根据Kabat规则确定。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗DLL3抗体或其抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中

所述HCDR1由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成；所述HCDR2由SEQ ID NO:2、3、4或5的氨基酸序列组成；所述HCDR3由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成；所述LCDR1由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成；所述LCDR2由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成；和所述LCDR3由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗DLL3抗体或其抗原结合片段包含VH和VL，其中

所述VH含有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述VL含有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述VH含有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述VL含有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述VH含有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述VL含有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述VH含有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述VL含有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述VH含有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述VL含有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

所述 VH 含有 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一个实施方案中，本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。在优选的实施方案中，本发明所述的氨基酸改变发生在 CDR 外的区域（例如在 FR 中）。更优选地，本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。优选的，本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换。在一些实施方案中，所述氨基酸置换为保守置换。

在本发明的一个优选的实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含去除翻译后修饰（PTM）的突变，例如氨基酸置换。在一个实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段的 hotspot 点被突变，例如在重链可变区 CDR，例如 HCDR2 中的连续氨基酸 DG 氨基酸中的任一个或两个氨基酸被突变，例如， D 被突变为 E 或 Q，和/或 G 被突变为 V。在一个实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段的糖基化位点被突变以去除糖基化，例如在轻链可变区的框架区，例如 FR3 的连续氨基酸 NFS 中的任一个或多个氨基酸被突变，例如 NFS 的 N 被突变为 Q，或 NFS 的 S 被突变为 A。

在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段是 IgG1 形式的抗体或 IgG2 形式的抗体或 IgG3 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体或其抗原结合片段，例如，为 IgG1 形式的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段还包含抗体重链恒定区 HC。在一些实施方案中，本发明抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段还包含抗体轻链恒定区 LC。在一些实施方案中，本发明抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区 HC 和轻链恒定区 LC。在一些实施方案中，本发明的重链恒定区包含 Fc 区。

在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体的重链恒定区来自 IgG，例如人 IgG 的重链恒定区，例如为（人）IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区，例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区，如人 IgG1 的重链恒定区。

在一些实施方案中，适用于本发明抗体分子的 IgG1 重链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述重链恒定区包含降低与 Fcγ 受体结合的突变，例如 LALA 突变。

在一些实施方案中，本文所述的重链恒定区包含 Fc 区，例如野生型 Fc 区或突变的 Fc 区。例如，本文所述的重链恒定区可以包含在 Fc 区的效应子功能（例如 Fc 区的补体激活功能）的特性上修饰的 Fc 区或具有改变对一种或多种 Fc 受体的结合亲和力的修饰的 Fc 区。

在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体的轻链恒定区为来自 lambda 或 kappa 轻链恒定区的轻链恒定区，例如为 lambda 或 kappa 轻链恒定区，例如人 lambda 或 kappa 轻链恒定区。

在一些实施方案中，所述轻链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO:24 或 25 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含 SEQ ID NO:24 或 25 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:24 或 25 所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链。在一些实施方案中，本发明抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体轻链。在一些实施方案中，本发明抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链。在一些实施方案中，本发明抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含两条重链和两条轻链。在一些实施方案中，本发明抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段包含两条相同的重链和两条相同的轻链。在一些实施方案中，所述重链包含重链可变区和重链恒定区，或由重链可变区和重链恒定区组成。在一些实施方案中，所述轻链包含轻链可变区和轻链恒定区，或由轻链可变区和轻链恒定区组成。

在一些实施方案中，抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段具有以下一个或多个特性:

(i)显示与本发明抗体对 DLL3 相同或相似的结合亲和力和/或特异性;

(ii)抑制(例如，竞争性抑制)本发明抗体与 DLL3 的结合;

(iii)与本发明抗体结合相同或重叠的表位;

(iv)与本发明抗体竞争结合 DLL3;

(v)具有本发明抗体的一个或多个生物学特性。

在一些实施方案中，抗 DLL3 抗体是单克隆抗体。

在一些实施方案中，抗 DLL3 抗体是全长抗体。

在一些实施方案中，抗 DLL3 抗体是人源化的。人源化可以通过如下方式实现：将非人源的天然抗体重链可变区和轻链可变区中的一个或多个氨基酸残基，尤其是构架区序列，置换成来自人的常规抗体的可变区相应位置的残基。人源化抗体的方法在本领域中是熟知的。典型地，人源化置换以保持抗体的有利结合性质的方式进行。本领域熟知用于确定人源化抗体的生物学性质，例如结合亲和力等的试验，以确定和选择适宜的人源化残基突变或突变组合。

在一个实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体还涵盖其抗体片段（例如抗原结合片段），优选地选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、$(Fab')_2$、单结构域抗体(例如 VHH)、diabody、dAb(domain antibody)、重链抗体或线性抗体。在一个实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体片段是 Fab，包含本文所述的 VH 和 VL，以及 CH1 和 CL。

在一个实施方案中，本发明的抗 DLL3 抗体还可以是双特异性抗体或多特异性抗体，其特异性结合 DLL3，以及一种或多种其他抗原（例如 CD3）。

III. 多特异性结合分子

在本发明的一个方面，本发明涉及多特异性结合分子，其能够特异性结合 DLL3，以及特异性结合一个或多个其他靶标或抗原。在一些实施方案中，所述其他抗原为 CD3。在一些实施方案中，所述多特异性结合分子是多特异性抗体，例如双特异性抗体。

在一些实施方案中，本发明的抗体是双特异性抗体。术语“双特异性抗体”是指包含第一抗原结合区和第二抗原结合区的抗体，其中所述第一抗原结合区结合一种抗原或表位且所述第二抗原结合区结合另一抗原或另一表位。因此，根据本发明的双特异性抗体包含对于两种不同的抗原，或对一种抗原的两个不同的表位的特异性。双特异性抗体形式包含 IgG 样抗体(Fan 等人 (2015) Journal of Hematology & Oncology . 8: 130)。最常见的 IgG 样抗体类型包含两个 Fab 区域和两个 Fc 区域,每个 Fab 的重链和轻链可以来自单独的单克隆抗体。可以使用本领域已知的双特异性抗体形式或技术来制备本发明的双特异性抗体。可以在本发明的背景下使用的具体示例性双特异性形式参见例如，Labrijn,et al.Bispecific antibodies:a mechanistic review of the pipeline.Nature Reviews Drug Discovery,2019, 18(8):1-24。

因此，本发明的一个方面涉及一种双特异性抗体，其包含

第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中第一抗原结合区特异性结合 DLL3，且第二抗原结合区特异性结合 CD3。

适用于本发明的双特异性抗体的第一抗原结合区可以包含本发明的抗 DLL3 全长抗体或其抗原结合片段，或由其组成，只要其能够特异性结合 DLL3 即可，包括但不限于，例如特异性结合 DLL3 的全长抗体、半抗体、Fab、Fab’、Fab’-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、$(Fab')_2$、单结构域抗体(例如 VHH)、dAb(domain antibody)、diabody、重链抗体或线性抗体等。

在一些实施方案中，第一抗原结合区来源于本文所述的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，例如是本文所述的抗 DLL3 抗体的 Fab。在一些实施方案中，特异性结合 DLL3 的第一抗原结合区包含本文所述的抗 DLL3 抗体的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。在一些实施方案中个，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 DLL3 抗体的 1、2 或 3 个重链可变区 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 DLL3 抗体的 1、2 或 3 个轻链可变区 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 DLL3 抗体的 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 DLL3 抗体的重链可变区。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 DLL3 抗体的轻链可变区。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含本文所述的抗 DLL3 抗体的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含或由本文所述的抗 DLL3 抗体的 Fab 组成。

适用于本发明的双特异性抗体的第二抗原结合区可以包含抗 CD3 的抗体或其抗原结合片段，或由其组成，只要其能够特异性结合 CD3 即可，包括但不限于，例如特异性结合 CD3 的全长抗体、半抗体、Fab、Fab’、Fab’-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、$(Fab')_2$、单结构域抗体(例如 VHH)、dAb(domain antibody)、diabody、重链抗体或线性抗体等。

在一些实施方案中，第二抗原结合区来源于抗 CD3 的抗体或其抗原结合片段，例如是抗 CD3 的 Fab。在一些实施方案中，适用于本发明的双特异性抗体的第二抗原结合区可以包含抗 CD3 的抗体或其抗原结合片段(例如 WO2022068809A1 公开的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段，例如 HzSP34.24 抗体或其抗原结合片段)，或由其组成，只要其能够特异性结合 CD3 即可，包括但不限于，例如特异性结合 CD3 的全长抗体、半抗体、Fab、Fab’、Fab’-SH、Fv、

单链抗体(例如 scFv)、$(Fab')_2$、单结构域抗体(例如 VHH)、diabody、重链抗体或线性抗体等。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体是 IgG 样双特异性抗体。在一些实施方案中，本发明的 IgG 样双特异性抗体是指包含 Fc 二聚体(例如异二聚体 Fc 支架)的双特异性抗体。因此，在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体包含 Fc 二聚体，例如异二聚体 Fc 支架。

在一个实施方案中，所述双特异性抗体可以包含一个或多个第一抗原结合区。在一个实施方案中，所述双特异性抗体可以包含一个或多个第二抗原结合区。在一些实施方案中，所述双特异性抗体包含 2 个第一抗原结合区和 2 个第二抗原结合区。

本发明已就多特异性结合分子例如双特异性抗体的组件（例如抗原结合区或其中所包含的结构域如 VH、VL、CL、CH1，或 Fc 区）进行详述描述。本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，这些组件的任何技术特征的任何组合均在本发明范畴之中。并且，本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，本发明的抗体(包括任何形式的抗体)可以包含任何这样的组合。

III-1 第二抗原结合区

在一些实施方案中，第二抗原结合区特异性结合 CD3。

在一些实施方案中，第二抗原结合区是特异性结合 CD3 的抗原结合区。在一些实施方案中，特异性结合 CD3 的第二抗原结合区来源于特异性结合 CD3 的抗体，例如 WO2022068809A1（以其全文并入本文）中公开的特异性结合 CD3 的抗体，例如其中公开的 HzSP34.24。

在一些实施方案中，特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体(例如 WO2022068809A1 中公开的 CD3 抗体，例如其中公开的 HzSP34.24)的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。在一些实施方案中个，所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体(例如 WO2022068809A1 中公开的 CD3 抗体，例如其中公开的 HzSP34.24)的 1、2 或 3 个重链可变区 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中，所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体(例如 WO2022068809A1 中公开的 CD3 抗体，例如其中公开的 HzSP34.24)的 1、2 或 3 个轻链可变区 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些实施方案中，所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体(例如 WO2022068809A1 中公开的 CD3 抗体，例如其中公开的 HzSP34.24)的 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。在一些实施方案中，所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体(例如 WO2022068809A1 中公开的 CD3 抗体，例如其中公开的 HzSP34.24)的重链可变区。在一些实施方案中，所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体(例如 WO2022068809A1 中公开的 CD3 抗体，例如其中公开的 HzSP34.24)的轻链可变区。在一些实施方案中，所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体(例如 WO2022068809A1 中公开的 CD3 抗体，例如其中公开的 HzSP34.24)的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中，所述第二抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体(例如 WO2022068809A1 中公开的特异性结合 CD3 的抗体，例如其中公开的 HzSP34.24)的 Fab。

在一些实施方案中，特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 为如 SEQ ID NO:31 所示重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中，所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO:35 所示轻链可

变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些实施方案中，所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由其组成，和/或 LCDR3 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 VH，其中所述 VH 包含

(a) 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列或由其组成，且 HCDR3 包含 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列或由其组成；或

(b) SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 VL，其中所述 VL 包含

(a) 3 个来自轻链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由其组成，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由其组成；或

(b) SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由其组成，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 VH 和 VL，其中 VH 包含 SEQ ID NO:31 所示的序列或由所述序列组成；和/或 VL 包含 SEQ ID NO:35 所示的序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区是 Fab 片段。

III-2 Fab 片段

在一些实施方案中，本发明的第一抗原结合区和/或第二抗原结合区是 Fab 片段。适用于作为本文所述的多特异性抗体例如双特异性抗体抗原结合区的 Fab 片段由包含抗体 VH、CH1、VL 和 CL 结构域的两条多肽链组成，其中所述 VH 与 VL 配对且所述 CH1 与 CL 配对以形成抗原结合区。在一些实施方案中，在 Fab 中，一条链从 N 端到 C 端包含 VH 和 CH1（即，VH-CH1）或由 VH 和 CH1 组成，另一条链从 N 端到 C 端包含 VL 和 CL（即，VL-CL）或由 VL 和 CL 组成。在一些实施方案中，在本发明的多特异性抗体例如双特异性抗体中，Fab 可以通过包含 VH 的链的 C 端连接在抗体的 Fc 结构域的 N 端。优选地，所述 Fab 包含 VH-CH1 链和 VL-CL 链，并可以通过 VH-CH1 链的 CH1 的 C 末端与抗体 Fc 结构域连接。在一些实

施方案中，所述连接是直接连接，或通过接头连接。在本文中，包含 VH-CH1 或 VH-CH1 其组成的 Fab 链也称作 Fab 重链，而包含 VL-CL 或由 VL-CL 组成的 Fab 链也称作 Fab 轻链。

在一些实施方案中，所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地来自 IgG1 的 CH1，优选是来自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，例如为人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1。在一些实施方案中，所述 CH1

(i)包含与 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述 CL 为来自 lambda 或 kappa 轻链恒定区的轻链恒定区，例如为 lambda 或 kappa 轻链恒定区，例如人 lambda 或 kappa 轻链恒定区。在一些实施方案中，CL 是人 Kappa 轻链恒定区或人 Lambda 轻链恒定区。在一些实施方案中，所述 CL

(i)包含与 SEQ ID NO:24 或 25 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含 SEQ ID NO:24 或 25 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:24 或 25 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区是特异性结合 DLL3 的 Fab，其中所述 Fab 片段来自本发明的抗 DLL3 抗体，其包含本发明的抗 DLL3 抗体的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。在一些实施方案中，作为第一抗原结合区的特异性结合 DLL3 的 Fab 的 Fab 重链包含 VH 和 CH1，或由 VH 和 CH1 组成，其中 VH 为本发明的抗 DLL3 抗体的 VH。在一些实施方案中，作为第一抗原结合区的特异性结合 DLL3 的 Fab 的 Fab 轻链包含 VL 和 CL，或由 VL 和 CL 组成，其中 VL 为本发明的抗 DLL3 抗体的 VL。在一些实施方案中，第一抗原结合区包含来自 IgG1 的 CH1，和/或 Kappa 轻链恒定区。

在一些实施方案中，所述特异性结合 DLL3 的 Fab 重链

(i) 包含与 SEQ ID NO:19、20、21 或 22 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含 SEQ ID NO: 19、20、21 或 22 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 19、20、21 或 22 所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述特异性结合 DLL3 的 Fab 轻链包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:45、46 或 47 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含 SEQ ID NO: 45、46 或 47 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 45、46 或 47 所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，特异性结合 DLL3 的 Fab 包含 Fab 重链和 Fab 轻链或由其组成，其中

Fab 重链包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列或由其组成;

Fab 重链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列或由其组成;

Fab 重链包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列或由其组成;

Fab 重链包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列或由其组成;

Fab 重链包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:46 所示的氨基酸序列或由其组成;

Fab 重链包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列或由其组成;

Fab 重链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列或由其组成;或

Fab 重链包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述第二抗原结合区是特异性结合 CD3 的 Fab，其中所述 Fab 片段来源自抗 CD3 抗体，其包含抗 CD3 抗体的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。

在一些实施方案中，作为第二抗原结合区的所述 Fab 包含本文所述的第二抗原结合区的 VH 或 VL，或者包含本文所述的第二抗原结合区的 VH 和 VL。

在一些实施方案中，作为第二抗原结合区的特异性结合 CD3 抗体的 Fab 重链包含 VH 和 CH1，或由 VH 和 CH1 组成，其中 VH 为本文所述的第二抗原结合区的 VH。在一些实施方案中，作为第二抗原结合区的特异性结合 CD3 的 Fab 轻链包含 VL 和 CL，或由 VL 和 CL 组成，其中 VL 为本文所述的第二抗原结合区的 VL。在一些实施方案中，第二抗原结合区包含来自 IgG1 的 CH1，和/或 Lambda 轻链恒定区。

在一些实施方案中，特异性结合 CD3 的 Fab 重链包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，特异性结合 CD3 的 Fab 轻链包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，特异性结合 CD3 的 Fab 重链包含 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列或由其组成，且 Fab 轻链包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区的 Fab 轻链中的轻链恒定区与第二抗原结合区的 Fab 轻链的轻链恒定区相同或不同。在一些实施方案中，所述第一和第二抗原结合区的 Fab 轻链的轻链恒定区都是 Kappa 轻链恒定区或 Lambda 轻链恒定区。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区的 Fab 轻链的轻链恒定区为 Kappa 轻链恒定区，且所述第二抗原结合区的 Fab 轻链的轻链恒定区为 Lambda 轻链恒定区; 或者所述第一抗原结合区的 Fab 轻链的轻链恒定区为 Lambda 轻链恒定区，且所述第二抗原结合区的 Fab 轻链的轻链恒定区为 Kappa 轻链恒定区。

III-3 Fc 区

在一些实施方案中，本发明的多特异性抗体（例如双特异性抗体）的一个或多个靶标结合区（抗原结合区）还包含 Fc 区，其中所包含的 Fc 区可以相同或不同。

在一些实施方案中，第一 Fc 区和第二 Fc 区不同，其能够二聚化形成异二聚体 Fc 支架。

在本文中，Fc 区是指含有至少一部分的恒定区的免疫球蛋白重链的 C-端区域，并且可以包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然序列 F 区涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 序列，例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区 (Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions，20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520)。在一些实施方案中，本发明的 Fc 区包含抗体 CH2 和 CH3。在一些实施方案中，抗体 Fc 区还可以在 N 端带有 IgG 铰链区或部分 IgG 铰链区，例如，IgG1 铰链区或部分 IgG1 铰链区，例如根据 EU 编号，D221 到 P230 的序列。在所述铰链区中可以含有突变。

除非本文中另外指出，Fc 区中的氨基酸残基的编号根据 EU 编号系统，也称为 EU 索引，如 Kabat，E.A.等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Public Health Service,National Institutes of Health，Bethesda，MD（1991），NIH Publication 91-3242 中所述。

在一些实施方案中， Fc 区为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc, 人 IgG2 Fc, 人 IgG3 Fc 或人 IgG4 Fc。在一个实施方案中，Fc区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:26 或 27 与其具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，98%、99%或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。

如本领域技术人员理解的，为了促进本发明的多特异性抗体作为异二聚体的形成，本发明多特异性抗体所包含的 Fc 区可以包含利于第一 Fc 区与第二 Fc 区异二聚化的突变。在一个实施方案中，在两个 Fc 区的 CH3 区中引入突变。

本领域已知促进 Fc 区异二聚化的方法。例如，第一 Fc 区的 CH3 区和第二 Fc 区的 CH3 区以互补方式进行工程化改造使得每个 CH3 区(或包含它的重链)不再能与其自身同二聚化但被迫与互补工程化改造的其它 CH3 区异二聚化(使得第一和第二 Fc 区的 CH3 区异二聚化且两个第一 CH3 区或两个第二 CH3 区之间不形成同二聚体)。例如，基于 Knob-into-Hole 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入相应的 Knob 突变和 Hole 突变。此技术参见例如 US 5 ,731 ,168; US 7 ,695 ,936; Ridgway 等,Prot Eng 9 ,617-621(1996)和 Carter ,J Immunol Meth 248 ,7-15(2001)。

还可以基于 Innobody 技术，在第一 Fc 区的第一 CH3 区和第二 Fc 区的第二 CH3 区中引入相应的突变。此技术参见例如 PCT/CN2021/143141（所述专利以其全文并入本文）。

在一个特定的实施方案中，

所述第一 CH3 区包含 S364R/K 突变(优选地 S364R)，以及任选的一个或多个其他突变。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V 突变（优选地 K370S），以及任选的一个或多个其他突变。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R/K 突变，且所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V 突变。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R 突变，且所述第二 CH3 区包含 K370S 突变。

在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R/K(优选地 S364R)和 D399K/R（优选地 D399K）突变。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V（优选地 K370S）突变和 K409D/E（优选地 K409D）突变和/或 Y349 T/S/A/V 突变。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R/K+D399K/R，且所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V+Y349T/S/A/V。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R +D399K，且所述第二 CH3 区包含 K370S +Y349T。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区还包含 E375N/Q(优选地 E375N)和/或 T350V/A (优选地 T350V)。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区还包含 K409D/E（优选地 K409D）、Q347D/E（优选地 Q347D）和/或 T350V/A（优选地 T350V）。

在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区还包含 E357N。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区还包含 Q347D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区还包含 E357N，且所述第二 CH3 区还包含 Q347D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区和所述第二 CH3 区还分别包含 T350V，或都包含 T350V。

因此，在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D+Q347D 。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K+E357N，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D+Q347D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K+E357N+T350V，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D+Q347D+T350V。

在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 K409E/D(优选地 K409E)。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区包含 D399K/R（优选地 D399K）或 K370T/S/A/V（优选地 K370T）。在一些

实施方案中，所述第一CH3区包含K409E/D(优选地K409E)，且所述第二CH3区包含D399K/R（优选地D399K）。在一些实施方案中，所述第一CH3区还包含T411R/K(优选地T411R)。在一些实施方案中，所述第二CH3区还包含K370T/S/A/V（优选地K370T）。在一些实施方案中，所述CH3区包含K409E/D+T411R/K，且所述第二CH3区包含D399K/R+K370T/S/A/V。在一些实施方案中，所述CH3区包含K409E+T411R，且所述第二CH3区包含D399K+K370T。

在一些具体的实施方案中，所述第一和第二CH3区具有以下5种突变组合:

第一CH3区	第二CH3区
S364R, D399K, E357N, T350V	K370S, Y349T, Q347D, K409D, T350V
K409E, T411R	D399K, K370T
S364R, D399K, E357N	K370S, Y349T, Q347D, K409D
S364R, D399K	K370S, Y349T, Q347D, K409D
S364R, D399K	K370S, Y349T, K409D

在一个实施方案中，一个Fc区的CH3包含S364R和D399K突变，且另一个Fc区的CH3突变包含Y349T、K370S和K409D突变。

在一些实施方案中，Fc区还包含其他利于异二聚体纯化的突变。

还可以将本发明的结合分子例如抗体中的Fc区进行突变以获得所需的特性。本领域已知对Fc区的突变。

在一个实施方案中，在Fc区的效应子功能（例如Fc区的补体激活功能）的特性上修饰Fc区。在一个实施方案中，所述效应子功能相对于野生同种型Fc区已经被降低或消除。在一个实施方案中，通过选自以下的方法来降低或消除效应子功能：使用天然具有降低或消除的效应子功能的Fc同种型、和Fc区修饰。

在一个优选的实施方案中，Fc区具有减少的由Fc区介导的效应子功能，例如减少的或消除的ADCC或ADCP或CDC效应子功能，例如包含实现上述功能的突变。

如本领域技术人员理解的，根据本发明结合分子例如抗体分子的预期用途，本发明结合分子例如抗体分子也可以在Fc结构域中包含改变对一种或多种Fc受体的结合亲和力的修饰。在一个实施方案中，所述Fc受体是Fcγ受体，特别地是人Fcγ受体。在一些实施方案中，所述Fc区包含降低与Fcγ受体结合的突变。例如，在一些实施方案中，用于本发明的Fc区具有降低与Fcγ受体结合的L234A/L235A突变。在再一优选的实施方案中，Fc片段可以具有导致增加的血清半衰期的突变，例如改善Fc片段与FcRn结合的突变。

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的抗体如多特异性抗体包含的两个Fc区异二聚化，其中

一个Fc-区多肽包含突变S364R和D399K，而另一个Fc-区多肽包含突变Y349T、K370S和K409D。

在一些实施方案中，所述Fc区还分别包含L234A/L235A突变，以及任选地在P329位缺

失脯氨酸（P329delP）。

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的抗体如多特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一个具体的实施方案中，本发明的抗体如多特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列。

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的结合分子例如抗体如多特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中

a) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D；或

b) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K 和 L234A/L235A 突变，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D 和 L234A/L235A 突变。

III-4 示例性双特异性抗体

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体包含本文所述的特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和本文所述的特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）。在一个具体的实施方案中，第一 Fab 与第一 Fc 区构成结合第一抗原的第一半抗体，第二 Fab 与第二 Fc 区构成结合第二抗原的第二半抗体，且第一半抗体和第二半抗体构成本发明的双特异性抗体。

在一个具体的实施方案，所述双特异性抗体是 IgG 样抗体，其具有如图 3 所示的构型。在一个具体的实施方案中，第一 Fc 区和第二 Fc 区包含 Innobody 突变，以及任选地减少的由 Fc 区介导的效应子功能的突变或降低与 Fcγ 受体结合的突变。在一个实施方案中，所述双特异性抗体包含或由下述组成：

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二

Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含后或下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区。

在一些实施方案中，Fab 重链可变区和重链恒定区 CH1 构成 Fab 重链。在一些实施方案中，Fab 轻链可变区和轻链恒定区构成 Fab 轻链。

在一些实施方案中，第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1 和第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区构成第一 Fab；第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1 和第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区构成第二 Fab。

在一些实施方案中，所述第一 Fc 区包含 S364R 和 D399K 突变，且第二 Fc 区包含 Y349T、K370S 和 K409D 突变。

在一个具体的实施方案中，第一 Fab 是本发明的抗 DLL3 的 Fab，且第二 Fab 是抗 CD3 的 Fab，或反之亦然。

在一个具体的实施方案，本发明的双特异性抗体特异性结合 DLL3 和 CD3，且包含或由下述组成：

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：特异性结合 DLL3 的 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：特异性结合 DLL3 的 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：特异性结合 CD3 的 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；和/或

轻链 2：从 N 端至 C 端包含后或下述组成：特异性结合 CD3 的 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区。

在一些实施方案中，所述第一 Fc 区包含 S364R 和 D399K 突变，且第二 Fc 区包含 Y349T、K370S 和 K409D 突变或反之亦然；任选地，所述第一 Fc 区和第二 Fc 区还分别包含 L234A/L235A 突变。在一些实施方案中，轻链 1 中的轻链恒定区与轻链 2 中的轻链恒定区相同或不同，例如轻链 1 中的轻链恒定区是 Kappa 轻链恒定区且轻链 2 中的轻链恒定区是 Lambda 轻链恒定区。

本发明的双特异性抗体的各个结构域如本文所定义。

在一些具体的实施方案中，特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体包含重链 1、重链 2、轻链 1 和轻链 2 或由所述链组成，其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:41、42、43 或 44 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:45、46 或 47 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、

97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中，特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体包含重链 1、重链 2、轻链 1 和轻链 2 或由所述链组成，其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

重链 1 包含 SEQ ID NO:42 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

重链 1 包含 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中，特异性结合 DLL3 和 CD3 的双特异性抗体包含重链 1、重链 2、轻链 1 和轻链 2 或由所述链组成，其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

重链 1 包含 SEQ ID NO:42 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

重链 1 包含 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

IV. 多核苷酸、载体和宿主细胞

本发明提供编码以上任何本发明抗体分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体）的核酸。

在一方面，本发明提供编码以上任何抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体的核酸。

为了便于生产和纯化，抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体可以在 N 端或 C 端（例如 C 端）融合分泌性信号肽，和/或利于纯化的标签肽，如六组氨酸标签或生物素标记。

如本领域技术人员明了的，因为密码子简并性，每一个抗体或多肽氨基酸序列可以由多种核酸序列编码。

在一些实施方案中，本发明的核酸包含选自 SEQ ID NO:10 或 11 中任一项所示的核酸，或与选自 SEQ ID NO:10 或 11 中任一项所示的核酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的核酸。

在一些实施方案中，本发明的核酸包含编码选自 SEQ ID NO:12-22 和 41-47 中任一项所示氨基酸序列的核酸，或编码与选自 SEQ ID NO: 12-22 和 41-47 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列的核酸。

编码本发明分子的核酸序列可以采用本领域熟知的方法，例如通过从头固相 DNA 合成，或通过 PCR 扩增而产生。

在一个方面，本发明还提供包含本发明核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如原核表达载体或真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在优选的实施方案，表达载体是 pCDNA，例如 pCDNA3.1。

在一个方面，本发明还提供了包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞或 293 细胞，例如(HEK 293 或 293F 细胞或 293FT 细胞或 Expi293 细胞)。在另一个实施方案中，宿主细胞是原核的。

合适的宿主细胞包括原核微生物，如大肠杆菌，真核微生物如丝状真菌或酵母，或各种真核细胞，如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、昆虫细胞等。可以使用适于悬浮培养的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子包括 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚肾系(HEK 293 或 293F 细胞或 293FT 细胞或 Expi293 细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、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)、布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝脏细胞(Hep G2)、CHO 细胞、NSO 细胞、骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0 等。本领域已知适合产生抗体的哺乳动物宿主细胞系。在一个优选的实施方案中，所述宿主细胞是 CHO 或 HEK293 细胞或 293FT 细胞或 Expi293 细胞。

V. 本发明分子的生产和纯化

再一方面，本发明提供用于生产本发明的抗体分子（例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体）的方法，所述方法包括：在适于表达所述分子的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的宿主细胞；任选地还包括在适于所述多肽链装配为所述分子的条件下使多肽链装配产生所述分子。

为了重组生产，可以将编码本发明分子的多肽链的多核苷酸插入一个或多个载体中以便进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体。表达载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。一旦已经制备了用于表达的包含本发明的一种或多种多核苷酸的表达载体，则可以将表达载体转染或引入适宜的宿主细胞中。多种技术可以用来实现这个目的，例如，原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒的转导、病毒转染、基因枪、基于脂质体的转染或其他常规技术。

如本文所述制备的分子可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析（例如 Protein A 亲和层析）、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于如净电荷、疏水性、亲水性等因素，并且这些对本领域技术人员是显而易见的。

可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的分子的纯度，所述熟知分析方法包括大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。可以通过本领域已知的多种测定法，鉴定、筛选或表征本文提供的抗体分子的物理/化学特性和/或生物学活性。

VI. 测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的分子（例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体）进行鉴定，筛选，或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。实施例示例了对于本发明抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体的性质的测定方法，例如生物膜薄层干涉测定技术（BLI）、T 细胞报告基因检测方法、T 细胞激活检测方法、介导 T 细胞杀伤实验或抗肿瘤活性检测等。

VII. 免疫缀合物

在一个方面，本发明提供了免疫缀合物，其包含本发明分子（例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体）和一种或多种其他活性成分（例如来自治疗本发明疾病的药物或治疗剂的活性成分，例如增强本发明分子治疗效果的小分子）。

在一些实施方案中，所述免疫缀合物是抗体-药物-偶联物（ADC）。

VIII. 药物和用途

在一些实施方案中，本发明还涉及包含本发明分子（例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体，或免疫缀合物）的组合物（例如药物组合物或药物制剂）。

在一个实施方案中，组合物，例如药物组合物，包含本发明的分子，以及一种或多种其

它治疗剂的组合。

本发明的组合物还可以包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。如本文所用，“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂或吸收延迟剂等。对于药用辅料的使用及其用途，亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”,第八版, R.C.Rowe,P.J.Seskey和S.C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。本发明的组合物可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型，如液态溶液剂(例如，可注射用溶液剂和可输注溶液剂)、散剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。

可以通过将具有所需纯度的本发明的抗体分子（例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体）或免疫缀合物与一种或多种任选的药用辅料混合来制备包含本文所述的抗体分子或免疫缀合物的药物，例如以冻干制剂或水溶液的形式。

在一些实施方案中，本发明还提供了药物组合或药物组合产品，其包含本发明分子（例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体，或免疫缀合物），以及一种或多种其它治疗剂等。

本发明的另一个目的是提供一种成套药盒，其包含本发明的药物组合，优选地所述药盒为药物剂量单元形式，由此可以依据给药方案或药物施用间隔提供剂量单元。

在一个实施方案中，本发明的成套药盒在同一包装内包含:

- 含有包含本发明分子（例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体，或免疫缀合物）的药物组合物的第一容器;

- 含有包含一种或多种其它治疗剂的药物组合物的一个或多个容器。

在一些实施方案中，当本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物）用于治疗肿瘤时，所述其它治疗剂例如用于治疗肿瘤的各种治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂）。

在一些具体的实施方案中，所述其它治疗剂可以是其它抗体，例如特异性结合免疫检查点分子的抗体，例如抑制 PD-1/PD-L1 信号通路的抗体，如抗 PD-1 抗体；或者抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体。

在一些具体的实施方案中，本发明的药物组合包含本发明的分子(例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物)和抑制 PD-1/PD-L1 信号通路的抗体，如抗 PD-1 抗体；或者抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体。

在一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体选自纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、西米普利单抗、特瑞普利单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、卡瑞利珠单抗、派安普利单抗、赛帕利单抗、普特利单抗或阿得贝利单抗。

在一些具体的实施方案中，所述其它治疗剂是化疗剂，例如治疗肿瘤的标准化疗方法中所使用的化疗剂。在一些具体的实施方案中，所述其它化疗剂选自铂类化疗药物例如卡铂（Carboplatin）; 或拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶 II 抑制剂，例如依托泊苷(Etoposide)。

在一些具体的实施方案中，本发明的药物组合包含本发明的分子(例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物)和一种、两种或两种以上的化疗剂，

例如两种化疗剂，其中一种化疗剂是铂类化疗药物例如卡铂（Carboplatin），且另一种化疗剂是拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶 II 抑制剂，例如依托泊苷（Etoposide）。

在一些具体的实施方案中，本发明的药物组合包含本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物），以及卡铂和依托泊苷的组合。

本发明的另一方面提供了在受试者中预防或治疗疾病的方法，包括向受试者施用有效量的本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体或其免疫缀合物）、药物组合物、药物组合或药盒。在一些实施方案中，所述疾病例如肿瘤如癌症。

在一些实施方案中，本发明涉及本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体或其免疫缀合物）、药物组合物、药物组合或药盒，其用于疗法，例如用于治疗肿瘤例如癌症。

在一些实施方案中，本发明涉及利用本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体或其免疫缀合物）、药物组合物、药物组合或药盒治疗疾病，例如肿瘤例如癌症的方法，或用于所述治疗的用途，或用于制备用于所述治疗的药物的用途。

在一些实施方案中，所述肿瘤是实体瘤或血液肿瘤以及转移性病灶。在一个实施方案中，实体瘤的例子包括恶性肿瘤。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。在一些实施方案中，肿瘤具有肿瘤免疫逃逸。

在一些实施方案中，所述肿瘤是 DLL3 阳性肿瘤或癌症。在一些实施方案中，所述肿瘤与 DLL3 的异常表达或异常活性相关。

在一些实施方案中，DLL3 阳性肿瘤或癌症是指患有所述肿瘤例如癌症的受试者中 DLL3 异常表达或活性。在一些实施方案中，所述受试者（特别是成年受试者）中具有 DLL3 表达。在一些实施方案中，所述受试者中具有（例如升高水平的，例如核酸或蛋白质水平或活性）DLL3（例如相比健康受试者）。在一些实施方案中，所述受试者的生物样品（例如肿瘤细胞或肿瘤组织）中具有（例如升高水平的，例如核酸或蛋白质水平或活性的）DLL3（例如相比健康受试者的生物样品（例如健康受试者中的相应组织或细胞），或者相比所述受试者的临近健康组织或细胞中的 DLL3）。

在一些实施方案中，DLL3 阳性肿瘤是指含有异常表达 DLL3 的肿瘤细胞的肿瘤。在一些实施方案中，DLL3 的异常表达是指在所述肿瘤细胞的细胞膜上具有 DLL3 的表达。在一些实施实施方案中，DLL3 的异常表达是指在肿瘤细胞上的 DLL3 的表达相比对照细胞（例如健康个体相应组织的健康细胞，或相比肿瘤细胞临近的健康细胞）具有更高的 DLL3 表达。

在一些实施方案中，所述肿瘤为神经内分泌肿瘤（例如 DLL3 阳性的神经内分泌肿瘤），例如肺癌（例如 DLL3 阳性的肺癌），例如小细胞肺癌(small cell lung cancer; SCLC)。

取决于其治疗用途，本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或多特异性抗体如双特异性抗体或其免疫缀合物）或药物组合物还可以与一种或多种其他疗法例如治疗方式和/或其它治疗剂组合施用，用于本文所述的方法或用途，例如用于预防和/或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中，当本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物）用于治疗肿瘤时，所述其它治疗剂例如用于治疗肿瘤的各种

治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂）。在一些实施方案中，所述治疗剂是 PD-1 抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，当本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物）用于治疗肿瘤时，治疗方式包括外科手术；放射疗法、局部照射或聚焦照射等。

在一些具体的实施方案中，所述其它治疗剂可以是其它抗体，例如特异性结合免疫检查点分子的抗体，例如抑制 PD-1/PD-L1 信号通路的抗体，如抗 PD-1 抗体；或者抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体。

在一些具体的实施方案中，本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物）与抑制 PD-1/PD-L1 信号通路的抗体，如抗 PD-1 抗体；或者抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体组合施用，用于本文所述的方法或用途。

在一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体选自纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、西米普利单抗、特瑞普利单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、卡瑞利珠单抗、派安普利单抗、赛帕利单抗、普特利单抗或阿得贝利单抗。

在一些具体的实施方案中，所述其它治疗剂是化疗剂，例如治疗肿瘤的标准化疗方法中所使用的化疗剂。在一些具体的实施方案中，所述其它化疗剂选自铂类化疗药物例如卡铂（Carboplatin）；或拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶 II 抑制剂，例如依托泊苷（Etoposide）。

在一些具体的实施方案中，本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物）与标准化疗组合施用，用于本文所述的方法或用途。

如本文所述的的，标准化疗（Standard Chemotherapy）是指针对特定癌症类型，经过临床研究和实践验证，被广泛认可并作为常规治疗方案的化疗方法。在一些具体的实施方案中，标准化疗包括适用于治疗本文所述肿瘤的标准化疗方法。

在一些实施方案中，用于治疗本文所述肿瘤的标准化疗方法包括组合施用一种、两种或两种以上的化疗剂，例如两种化疗剂，例如其中一种化疗剂是铂类化疗药物例如卡铂（Carboplatin），且另一种化疗剂是拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶 II 抑制剂，例如依托泊苷（Etoposide）。在一些实施方案中，用于治疗本文所述肿瘤的标准化疗方法包括组合施用卡铂和依托泊苷。

在一些具体的实施方案中，本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物）与一种、两种或两种以上的化疗剂，例如两种化疗剂组合施用，用于本文所述的方法或用途，优选地，其中一种化疗剂是铂类化疗药物例如卡铂（Carboplatin），且另一种化疗剂是拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶 II 抑制剂，例如依托泊苷（Etoposide）。

在一些具体的实施方案中，本发明的分子（例如本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物）与卡铂和依托泊苷组合施用，用于本文所述的方法或用途。

在其他方面，本发明提供本发明的分子（例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物等）或包含其的组合物或组合产品在生产或制备药物中的用途，所述药物用于本文所述的用途，例如用于预防或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在其他方面，本发明还提供了本发明的分子（例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特

异性抗体或其免疫缀合物等），或包含其的组合物或药物或制剂或组合产品，其用于疗法，例如用于治疗本文提及的相关疾病或病症。

IX. 诊断和检测

在某些实施方案中，本文中提供的分子（例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物等）可以用于检测 DLL3 在生物样品中的存在。

术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测，示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术(例如，FACS)、抗体分子复合的磁珠、ELISA 测定法、PCR-技术(例如，RT-PCR)。在某些实施方案中，生物样品是体液。

在某些实施方案中，所述方法包括将生物样品与如本文所述的分子（例如双特异性抗体或其免疫缀合物）在允许其与 DLL3 结合的条件下接触，并检测在该分子与 DLL3 之间是否形成复合物，其中复合物的形成表示存在 DLL3。该方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中，本发明的分子用于选择适合利用针对本发明的抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物等）治疗的受试者，例如其中 DLL3 是用于选择所述受试者的生物标记物。

在某些实施方案中，提供标记的本发明的分子（例如本发明的例如抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体或其免疫缀合物等）。标记包括但不限于，被直接检测的标记或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记)，以及被间接检测的部分，如酶或配体，例如，通过酶促反应或分子相互作用。

在本文中提供的一些实施方案中，样品是在用本发明的分子或包含其的组合物、药物、制剂或组合产品治疗之前获得的。在一些实施方案中，样品是在用其他疗法之前获得的。在一些实施方案中，样品是在用其他疗法治疗过程中，或者用其他疗法治疗后获得的。

在一些实施方案中，在治疗之前，例如，在起始治疗之前或在治疗间隔后的某次治疗之前检测 DLL3。

在一些实施方案中，提供了一种治疗本发明疾病的方法，所述方法包括：对受试者(例如，样品)(例如，受试者样品)检验 DLL3 的存在，因而确定 DLL3 值，将 DLL3 的值与对照值（例如正常个体中的值）比较，并且如果 DLL3 值大于对照值，则向受试者施用治疗有效量的任选与一种或多种其他疗法组合的本发明的双特异性抗体或包含其的组合物、药物或制剂，因而治疗所述疾病。

X. 具体实施方案

1、抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH 的 3 个 CDR，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及轻链可变区 VL 的 3 个 CDR，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 选自

(i). 如 SEQ ID NO:13 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:18 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(ii). 如 SEQ ID NO:12 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:16 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(iii). 如 SEQ ID NO:13 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:16 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(iv). 如 SEQ ID NO:14 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:16 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(v). 如 SEQ ID NO:15 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:16 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(vi). 如 SEQ ID NO:12 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:17 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(vii). 如 SEQ ID NO:12 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:18 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

(viii). 如 SEQ ID NO:14 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:18 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

2、抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 HCDR1 由 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列组成；HCDR2 由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成；HCDR3 由 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列组成；LCDR1 由 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列组成；LCDR2 由 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列组成；和 LCDR3 由 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列组成；

任选地，HCDR2 中的连续氨基酸 DG 中的任一氨基酸 D 或 G 可以被取代，例如其中 D 可以被取代为 E 或 Q，和/或 G 被取代为 V，例如 HCDR2 由 SEQ ID NO:3、4 或 5 所示的氨基酸序列组成。

3、实施方案 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH，其中所述重链可变区

(i)包含与 SEQ ID NO: 12、13、14 或 15 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 12、13、14 或 15 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

4、实施方案 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含轻链可变区 VL，其中所述轻链可变区

(i)包含与 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

任选地，所述 VL 的框架区 FR3 中的连续氨基酸 NFS 中的任一氨基酸可以被突变，例如其中的 N 被取代为 Q 和/或其中的 S 被取代为 A；例如

所述轻链可变区

(i)包含与 SEQ ID NO: 17 或 18 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 17 或 18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

5、实施方案 1-4 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中

(i). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(iii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(iv). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(v). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(vi). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(vii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(viii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

6、实施方案 1-5 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中

(i). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(iii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(iv). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(v). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(vi). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(vii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(viii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

7、实施方案 1-6 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其还包含重链恒定区 HC，例如，所述抗体重链恒定区 HC 为来自 IgG，例如人 IgG 的重链恒定区，例如为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区，优选的人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区。

8、实施方案 7 的抗体或其抗原结合片段，其中所述重链恒定区

(i)包含与 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

9、实施方案 7 或 8 的抗体或其抗原结合片段，其中所述重链恒定区包含 Fc 区，其中所述 Fc 区为来自 IgG 例如人 IgG 的 Fc 区，例如为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区，优选的人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc，任选地，所述 Fc 区包含

(i)包含与 SEQ ID NO:26 或 27 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO:26 或 27 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

10、实施方案 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其还包含轻链恒定区，例如所述轻链恒定区为来自 lambda 或 kappa 轻链恒定区的轻链恒定区，例如为 lambda 或 kappa 轻链恒定区，例如人 lambda 或 kappa 轻链恒定区。

11、实施方案 10 的抗体或其抗原结合片段，其中所述轻链恒定区

(i)包含与 SEQ ID NO:24 或 25 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO:24 或 25 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

12、实施方案 1-11 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为人源化抗体或嵌合抗体。

13、实施方案 1-12 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为单克隆抗体。

14、实施方案 1-13 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段为选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、$(Fab')_2$、diabody 或线性抗体。

15、实施方案 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是双特异性抗体或多特异性抗体，其包含针对 DLL3 的第一结合特异性和针对一种或多种的其他抗原的其它结合特异性。

16、实施方案 15 的抗体或其抗原结合片段，其中所述其他抗原为 CD3。

17、双特异性抗体，其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，

其中第一抗原结合区特异性结合 DLL3，且包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 包含如实施方案 1 或 2 所定义的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 且所述 VL 包含如实施方案 1 或 2 所定义的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

所述 VH 和 VL 为如实施方案 3-6 中任一项所定义的 VH 和 VL；且

所述第二抗原结合区特异性结合 CD3。

18、实施方案 17 的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合区为实施方案 1-14 中任一项所定义的抗 DLL3 抗体的 Fab。

19、实施方案 17 或 18 所述的双特异性抗体，其中所述第二抗原结合区为特异性结合 CD3 的 Fab。

20、实施方案 18 或 19 所述的双特异性抗体，其中所述作为第一抗原结合区或第二抗原结合区的 Fab 包含 CH1，其中所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地来自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，例如为人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1。

21、实施方案 20 所述的双特异性抗体，其中所述 CH1

(i)包含与 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

22、实施方案 18-21 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述作为第一抗原结合区或第二抗原结合区的 Fab 包含轻链恒定区，其中所述轻链恒定区为来自 lambda 或 kappa 轻链恒定区的轻链恒定区，例如为 lambda 或 kappa 轻链恒定区，例如人 lambda 或 kappa 轻链恒定区，任选地，所述第一抗原结合区和第二结合区包含相同或不同的轻链恒定区，例如，所述第一抗原结合区包含 Kappa 轻链恒定区且所述第二抗原结合区包含 Lambda 轻链恒定区。

23、实施方案 22 的双特异性抗体，其中所述 Kappa 轻链恒定区包含

(i)包含与 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

和/或

所述 Lambda 轻链恒定区包含

(i)包含与 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

24、实施方案 17-23 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体是包含 Fc 二聚体的 IgG 样双特异性抗体，其中构成所述 Fc 二聚体的两个 Fc 区，第一 Fc 区和第二 Fc 区相同或不同，任选地，所述 Fc 区分别为来自 IgG 例如人 IgG 的 Fc 区，例如为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区，优选的人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc，任选地，所述 Fc 区

(i)包含与 SEQ ID NO:26 或 27 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO:26 或 27 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

25、实施方案 24 所述的双特异性抗体，其中所述两个 Fc 区不同，其中基于 Innobody 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入突变，促进第一 Fc 区和第二 Fc 区的异二聚化。

26、实施方案 25 的抗体或其抗原结合片段，其中一个 Fc 区的 CH3 包含 S364R 和 D399K 突变，且另一个 Fc 区的 CH3 突变包含 Y349T、K370S 和 K409D 突变。

27、实施方案 24-26 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第一和/或第二 Fc 区包含 L234A/L235A 突变。

28、实施方案 26 或 27 的双特异性抗体，其中

a) 一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列或由其组成，且另一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列或由其组成;

b) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K，而另一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D; 或

c) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K 和 L234A/L235A 突变，而另一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D 和 L234A/L235A 突变。

29、实施方案 17-28 中任一项的双特异性抗体，其中所述第二抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列或由其组成; HCDR2 包含 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由其组成，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由其组成。

30、实施方案 29 的双特异性抗体，其中所述第二抗原结合区包含 VH 和 VL，其中 VH

包含 SEQ ID NO:31 所示的序列或由所述序列组成；和 VL 包含 SEQ ID NO:35 所示的序列或由所述序列组成。

31、实施方案 17-30 中任一项的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体包含特异性结合 DLL3 的第一抗原结合区和特异性结合 CD3 的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）。

32、实施方案 31 的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体是 IgG 样抗体，其具有如图 3 所示的构型。

33、实施方案 31 或 32 所述的双特异性抗体，其包含作为特异性结合 DLL3 的第一抗原结合区的第一 Fab 和作为特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的第二 Fab，其中所述双特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

其中第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1 和第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区构成第一 Fab，且第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1 和第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区构成第二 Fab；

任选地，轻链 1 中的轻链恒定区和轻链 2 中的轻链恒定区不同，例如轻链 1 中的轻链恒定区是 Kappa 轻链恒定区且轻链 2 中的轻链恒定区是 Lambda 轻链恒定区。

34、实施方案 33 所述的双特异性抗体，其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

重链 1 包含 SEQ ID NO:42 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、

95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

重链 1 包含 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

35、核酸分子，其包含编码实施方案 1-16 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的任一条链，或实施方案 17-34 中任一项所述的双特异性抗体中的任一条链的多核苷酸，或由所述多核苷酸组成。

36、表达载体，其包含实施方案 35 的核酸分子，优选地，所述表达载体为 pCDNA，例如 pCDNA3.1。

37、宿主细胞，其包含实施方案 35 所述的核酸分子或实施方案 36 所述的表达载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 Expi293 细胞。

38、制备实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-34 中任一项所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括，在适合所述抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体的多肽链表达的条件下，培养包含实施方案 35 所述的核酸分子或实施方案 36 所述的表达载体的宿主细胞，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体。

39、免疫缀合物，其包含实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-34 中任一项所述的双特异性抗体。

40、药物组合物或药物或制剂，其包含实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-34 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 39 所述的免疫缀合物以及任选地药用辅料。

41、药物组合，其包含实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-34 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 39 所述的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂，优选地，所述治疗剂为用于治疗肿瘤的各种治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂）。

42、实施方案 41 所述的药物组合，其包含实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-34 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 39 所述的免疫缀合物和其它抗体，优选地，所述其它抗体是抑制 PD-1/PD-L1 信号通路的抗体，如抗 PD-1 抗体；或者抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体；或者

包含实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-34 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 39 所述的免疫缀合物和一种或多种化疗剂，例如铂类化疗药物例如卡铂（Carboplatin）；或拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶 II 抑制剂，例如依托泊苷（Etoposide）或其组合；

优选地，所述药物组合包含实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实

施方案 17-34 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 39 所述的免疫缀合物和卡铂（Carboplatin）与依托泊苷（Etoposide）的组合。

43、在受试者中预防或治疗肿瘤的方法，包括向受试者施用有效量的实施方案 1-16 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 17-34 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 39 所述的免疫缀合物，或实施方案 40 所述的药物组合物或制剂；或实施方案 41 或 42 所述的药物组合。

44、实施方案 43 所述的方法，其中所述肿瘤是实体肿瘤或血液肿瘤，例如 DLL3 阳性的肿瘤或癌症，任选地所述肿瘤为神经内分泌肿瘤（例如 DLL3 阳性的神经内分泌肿瘤），例如肺癌（例如 DLL3 阳性的肺癌），例如小细胞肺癌(small cell lung cancer; SCLC)。

45、实施方案 43 或 44 所述的方法，其中所述方法还包括与其它疗法例如治疗方式（例如手术或放疗）和/或其它治疗剂组合施用，优选地，所述治疗剂为用于治疗肿瘤的各种治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂）。

46、实施方案 45 的方法，其中所述方法还包括与其它抗体组合施用，优选地，所述其它抗体是抑制 PD-1/PD-L1 信号通路的抗体，如抗 PD-1 抗体；或者抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体；或者

所述方法还包括与一种或多种化疗剂组合施用，其中所述化疗剂选自铂类化疗药物例如卡铂(Carboplatin)；或拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶 II 抑制剂，例如依托泊苷(Etoposide)或其组合；或者

所述方法还包括与卡铂（Carboplatin）与依托泊苷（Etoposide）的组合施用。

实施例

实施例 1. DLL3 单克隆抗体的产生和筛选

免疫

将人的 DLL3 胞外段蛋白（恺佧，DLL-HM103），与弗氏完全佐剂（sigma, F5881）乳化后免疫 RenMab 小鼠（购自百奥赛图），两周后再与弗氏不完全佐剂（sigma，F5506）乳化后免疫三次，每两周皮下注射一次（每只小鼠 50 μg 蛋白）。

Single B 细胞荧光染色与分选

当血清效价满足要求后，摘取小鼠的脾脏用于获取悬浮的 B 细胞。接下来用 EasySep Buffer（Stemcell，20144）调整细胞密度为 $1*10^8$ cells/vial，体积为 0.25-2 mL，加入 50 μL/mL Rat Serum，50 μL/mL Isolation Cocktails，室温静置 5 min，随后加入 50 μL/mL RapidSpheres，室温静置 2.5 min，加入 EasySep Buffer 至 2.5 mL，将流式管室温置于磁力架 2.5 min，并收集细胞悬液。用 10 mL EasySep Buffer 清洗细胞并调整细胞密度至 $1*10^8$ cells/mL，加入 PE-Cy 7 Rat Anti-Mouse CD45R/B220（BD，552772），FITC（Invitrogen，A20181）标记 hu-DLL3，避

光孵育 1h。用 10 mL 预冷 EasySep Buffer 清洗一次，并调整细胞密度为 $1*10^8$ cells/vial，加入 APC-Cyanine 7 anti-mouse IgM Antibody（Biolegend，406516）、Brilliant Violet 510 anti-mouse IgD Antibody（Biolegend，405723）、R-Phycoerythrin AffiniPure $F(ab')_2$ Fragment Goat Anti-Mouse IgG（Jackson Immunoresearch Inc，115-116-071），避光孵育 20 min；用 10 mL 预冷的 EasySep Buffer 清洗一次，根据细胞数将细胞密度调整为 10^7 cells/mL。单 B 细胞用 Aria III 流式细胞仪进行分选。流式分选的圈门逻辑是：PE-Cy 7^{pos}/ FITC ^{pos} /APC ^{pos} / APC-Cyanine 7^{neg} / Brilliant Violet 510^{neg} / R-Phycoerythrin ^{pos}，将细胞分选到含有裂解液的 96 孔 PCR 板。

抗体可变区扩增、载体构建、表达以及检测

通过一轮 RT-PCR 和巢式 PCR，得到抗体可变区的扩增产物。将配对的扩增产物测序，测序结果利用 MEGA7 软件进行分析比对。同时配对的扩增产物同源重组在由 BsmBI（NEB，R0739L）酶切的 pcDNA3.1 载体中，其中重链恒定区选择 IgG1 野生型（SEQ ID NO:23），轻链恒定区选择 Kappa（SEQ ID NO:25）。取 5 μL 同源重组产物转化到 30 μL DH5a 感受态中，并将得到的菌液接到 2 mL 含 Amp 抗性的 LB 培养基，37 ℃摇床 220 rpm 培养过夜。过夜培养的菌液用 96 Plus Miniprep Kit （QIAGENE，27291）抽提质粒，并且用 nanodrop 测定质粒浓度。将同一抗体的轻链质粒与重链质粒按 1:1 的摩尔比混合，用聚乙烯亚胺（PEI）（Polysciences，23966）转染 293F 细胞，培养 5-7 天后，收集上清用于后续检测。

通过酶联免疫吸附试验（Elisa）和流式细胞术（FACS）筛选抗 DLL3 的抗体上清。ELISA 实验中，每孔用 100 μL Human-DLL3（1 μg/mL）包被，200 μL 5 % 的 BSA 进行封闭。一抗为 50 μL/孔的瞬转上清和 5A4（benchmark，自制），接下来每孔加入 100 μL 抗人 IgG Fc（Thermo，A24476）的二抗（1:10000 稀释在抗体稀释液中），包被、封闭、一抗和二抗过程都是在 37 ℃孵育 1h。用 100 μL/孔的 TMB（Solarbio，PR1200）避光显色 3 分钟，最后每孔加入 50 μL 的 ELISA 终止液（Solarbio，C1058），用酶标仪检测 OD450 nm 处的吸光度。FACS 实验是将待检测细胞（huDLL3/GS-CHO，内部构建）稀释至 2×10^6 个细胞/mL，向 U 型底 96 孔板中加入 50 μL/孔。将 50 μL/孔上清加入 U 型板并重悬细胞， 4 ℃静置 30 min。500 g 离心 5 min 去除上清，PBS 洗细胞 1 遍。每孔加入 100 μL 抗人 Fab（BioLegend，409304）的 PE 标记的二抗（1:500 稀释于 PBS 中），4 ℃避光孵育 30 min。500g 5min 去除上清，PBS 洗细胞 1 遍。用 50 μL 1×PBS 重悬细胞，FACS 上机检测。挑选得到 89 个阳性克隆上清，用 Protein A 亲和柱纯化出单克隆抗体，通过 FACS 检测纯化抗体与 DLL3 不同截短体细胞（内部构建）的结合来确定抗体的结合区域。同时将这些纯化抗体用 Fortebio 进行亲和力测定。根据检测结果和序列多样性，得到 19 个配对序列用于后续构建双抗。其中获得的 D3-107 的 VH 和 VL 的氨基酸序列和 DNA 序列见序列表。

表 1: DLL3 克隆初筛结果

ID	Elisa	FACS (MFI ratio)											domain
	human DLL3	human DLL3	DSL	EGF-1	EGF-2	EGF-3	EGF-4	EGF-5	EGF-6	Cyno DLL3	DLL1	DLL4	

D3-107	1.7391	42.55	54.74	106.88	63.88	44.71	86.76	21.82	147.61	1.70	1.59	2.01	EGF-6

表 2: DLL3 克隆亲和力结果

Sample ID	KD (M) antibodies on AHC sensor tip, Human DLL3 (100nM) in solution				KD (M) antibodies on AHC sensor tip, Rhesus DLL3 (100nM) in solution			
	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
D3-107	0.6325	8.84E-10	2.26E+05	2.00E-04	0.6631	9.65E-10	2.07E+05	2.00E-04

实施例 2. DLL3 单克隆抗体亲和力实验

采用生物膜薄层干涉测定技术(BLI)测定抗体 D3-107 结合 DLL3 的亲和力（KD）。实验开始前半个小时，根据样品数量，取合适数量的 AHC 传感器 (18-5060，Sartorius)浸泡于 SD 缓冲液（1x PBS，0.1% BSA，0.05% Tween-20）中。将抗体和人 DLL3（DL3-H52H4，Acro biosystems）分别稀释至 100 nM。

分别将 SD 缓冲液、抗体溶液、人 DLL3 分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯微孔板（Greiner，655209）中。使用 Fortebio Octet Red96e 进行检测，根据样品位置布板，选择传感器位置。

仪器设置参数如下：运行步骤：平衡基线 120 s、加样固化抗体 100 s、平衡基线 120 s、结合抗原 100 s 和解离 120 s，转速为 1000 rpm，温度为 30℃。实验完成后，使用 ForteBio Octet 分析软件分析 KD 值，结果见下表 3。

表 3. 示例抗体与人 DLL3 的亲和力检测

Name	Antigen	Ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD (M)
D3-107	Human DLL3	3.59E+05	2E-04	5.57E-10

实施例 3. DLL3 单克隆抗体体外结合实验

CHO-hDLL3（将人 DLL3 基因 NCBI ID: 10683 构建到 pXC17.4 载体后电转到 CHO 细胞并分选阳性单克隆获得）按照常规操作培养传代。

细胞离心重悬后计数，将细胞密度调整至 $4X10^6$ cell/mL 倒于加样槽中，用排枪以每孔 50 ul 接种于 96 孔板中。每孔 50 ul 细胞中加入 50 ul 梯度稀释（100nM 起始，3 倍稀释，共 11 个梯度）的抗体样品，然后放入 4℃冰箱孵育 30 分钟。400 g 离心 5 分钟甩板，加入 200 ul PBS 重悬，再次离心后重悬，重复 2 次。加入 PE anti-human IgG Fc 重组抗体 (Biolegend，409304，1:200) 4℃避光孵育 30 分钟，200 ul PBS 洗 2 次甩板；重悬于 100 ul PBS，流式细胞仪读数。拟合曲线，计算 EC50 值。

结果如图 1 所示，候选单抗和阳性对照在 DLL3 过表达 CHO 细胞上结合能力相当。

实施例 4. DLL3 单克隆抗体 ADCP 活性验证

DLL3 示例抗体 Fab 端与小细胞肺癌细胞表面的 DLL3 结合，同时 Fc 端和 FcγRI ADCP Bioassay Effector Cells 细胞表面的 CD64 结合，通过 DLL3 依赖性的 CD64 交联，激活下游信号通路。

本研究利用荧光素酶报告基因法检测 FcγRI ADCP Bioassay Effector Cells 细胞与 DLL3 阳性的细胞共培养条件下，通过检测加入示例抗体过夜培养后荧光素酶的表达情况反映抗体激活能力的强弱。

调整 CHO-hDLL3 和 FcγRI ADCP Bioassay Effector Cells（Promega G9871）细胞（Effector 细胞）密度至 6.0×10^5，按照 1:1 的比例将过表达细胞 CHO-hDLL3 和 Effortor 细胞混合备用。每孔加入 100 μL 细胞悬液以及梯度稀释（起始 30nM，3X 稀释，10 个梯度）的待测抗体（D3-107，DLL3 BMK 抗体（Rova-T），DLL3 BMK （Amgen）），过夜孵育。次日每孔加入 80 μL Bio-Glo Luciferase Assay System (Promega，G7940)检测液。于酶标仪（Molecular Device，SpectraMax I3）读数。

在如以上测定法所述进行的实验中，示例抗体能够剂量依赖性地激活 CD64 下游信号（见图 2），且激活强度较对照抗体略强。

实施例 5. DLL3 双抗分子表达、纯化

本发明中的双抗均采用两个亲本蛋白先分别表达纯化后再通过体外还原氧化重组的方式制备而成。双抗制备路线如图 3A，结构见图 3B。

质粒构建：序列由金唯智基因合成，装载到 pcDNA3.1 的载体上，编码基因序列如下表 4：

特异性结合 DLL3 的 DLL3 臂	
抗 DLL3 抗体 D3-107 VH	SEQ ID NO:12
抗 DLL3 抗体 D3-107 VL	SEQ ID NO:16
Fc 区(LALA+S364R/D399K)	SEQ ID NO:29
轻链恒定区	SEQ ID NO:25
重链 1	SEQ ID NO:41
轻链 1	SEQ ID NO:45
特异性结合 CD3 的 CD3 臂	
抗 CD3 抗体 VH	SEQ ID NO:31
抗 CD3 抗体 VL	SEQ ID NO:35
Fc 区(LALA+ K370S,K409D,Y349T)	SEQ ID NO:30
轻链恒定区	SEQ ID NO:24

重链 2	SEQ ID NO:48
轻链 2	SEQ ID NO:40

用 Expi293F 培养基(Gibco，REF# A14351-01)培养 Expi293F 细胞(购自 Gibco)，转染前一天检测细胞密度（活力需大于 95%），并用新鲜的 Expi293F 培养基调整到 3×10^6 个细胞/ml 继续培养，转染当天将细胞密度调整为 3×10^6 个细胞/ml。

取 1/10 转染终体积的 Opti-MEM 培养基（Gibco，REF# 31985-070）作为转染缓冲液，按照 1mg/L 的比例加入待转染的 DNA，其中轻重链质粒配比为 1:1，混匀，按照 DNA：PEI 质量比 1:3 加入 PEIMax（Polysciences Inc. Cat# 24765-1），混匀，室温孵育 20 min，然后将混合物轻柔地倒入 Expi293F 细胞悬液中，边倒边摇，细胞置于摇床培养，培养条件为 8 % CO2、36.5 ℃、120 rpm。

培养 16~18h 后，向细胞悬液中补加 2%(体积比)的浓度为 200 g/L 的 Feed(100 g/L Phytone Peptone + 100g/L Difco Select Phytone)、终浓度为 5 g/L 的葡萄糖溶液和终浓度为 2.2 mM 的 Valproic acid sodium salt（Merk，Cat# P4543-100G），轻轻混匀，8 % CO2、36.5 ℃、120 rpm 继续培养 7 天后收样。将细胞料液与硅藻土（Sartorius，Cat 1000037025）混匀(1L 细胞料液加 40g 硅藻土)，用 0.22μm 的一次性真空过滤装置进行过滤。

亲和层析纯化目的蛋白：选用 HiTrap MabSelect PrismA（GE Healthcare，Cat# 17549853）亲和层析柱进行亲和捕获，纯化前用 10-20 倍柱体积的 0.1 M NaOH 流经管路及亲和层析柱，然后用 10-20 倍柱体积的蒸馏水清洗管路以及柱子，用 5 倍柱体积的 1 × PBS（Gibco）平衡填料柱；将过滤后的细胞料液通过柱子，再用 10 倍柱体积的 1 × PBS 清洗填料柱，去除非特异性结合蛋白；用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液（100 mM sodium citrate，pH 3.5）冲洗填料，收集洗脱液，用 2 M Tris 调节 pH 至 6.0，过滤除菌，备用于进一步的离子交换层析。

体外还原氧化：将亲和层析下来的蛋白收集液按照摩尔比 1:1 混合，加入适量 GSH，用 2M Tris 调节反应 pH 至 8.0。室温过夜。反应物换液至 PBS 中于 4℃放置备用。

离子交换层析纯化双抗：选用 Mono S 5/50 GL (获自 GE Healthcare)离子交换层析柱，并置于 AKTApure 系统（获自 GE healthcare）内。用 0.5 M NaOH 对装备有 Mono S 5/50 GL 离子交换层析柱的 AKTApure 系统除内毒素 2 小时，然后，用蒸馏水清洗系统以及柱子。使用 5-10 倍柱体积的上样缓冲液（20 mM NaPO4, pH 6.6）平衡柱子，直至电导以及 pH 稳定；将亲和层析所获得的蛋白用上样缓冲液稀释 10 倍，然后上样；使用 5 倍柱体积的上样缓冲液再平衡；以洗脱缓冲液(20 mM NaPO4, 1 M NaCl, pH 6.6)的含量为 0-40 %的梯度进行线性洗脱，共洗脱 30 个柱体积，根据紫外吸收值来收集样品。

利用大小排阻层析 (size exclusion chromatography; SEC)检测收集的各级分管中样品的纯度。根据 SEC 结果将纯度大于 95%的级分管中的样品合并。

将纯化后的双特异性抗体溶液使用 15 ml 超滤离心管，4500 转／分钟离心 30 分钟，使用 PBS 将蛋白稀释后继续离心，4500 转／分钟离心 30 分钟，重复该操作几次，以更换缓冲液。将更换缓冲液后的抗体合并，测抗体浓度。进一步利用毛细管电泳（CE-SDS）和液相色谱-质谱联用技术（LC-MS）相结合对双特异性抗体 DLL3/CD3 的成分和含量进行定性和定量。

类似的表达纯化阳性对照抗体 AMGEN757（AMG757, INN Prop. List 123 tarlatamab，本文称为 AMG757 或 AMG757 analog)和 BI 公司的 DLL3/CD3 双抗 BI-D3C1(WO 2019/234220 A1; SEQ ID NO:75 DLL3#3 chain; SEQ ID NO:79 CD3#1 chain，本文中称为 BI-D3C1 或 BI-D3C1 analog)。阴性对照 IgG1 来自 BioXCell BP0297。

类似的表达纯化抗体 Anti-mPD-1（重链为 SEQ ID NO:49，轻链为 SEQ ID NO:50）。

实施例 6. DLL3/CD3 双抗亲和力

采用生物膜薄层干涉测定技术(BLI)测定双特异性抗体结合 DLL3 的亲和力（KD）。实验开始前半个小时，根据样品数量，取合适数量的 AHC 传感器 (18-5060，Sartorius)和 HIS1K 传感器（18-5120，Sartorius）浸泡于 SD 缓冲液（1x PBS，0.1% BSA，0.05% Tween-20）中。将双特异性抗体和人 DLL3（DL3-H52H4，Acro biosystems），人 CD3(CDD-H52W1, Acro biosystems)稀释至 100 nM。

分别将 SD 缓冲液、抗体溶液、人 DLL3、人 CD3 分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯微孔板（Greiner，655209）中。使用 Fortebio Octet Red96e 进行检测，根据样品位置布板，选择传感器位置。仪器设置参数如下：运行步骤：平衡基线 120 s、加样固化抗体 100 s、平衡基线 120 s、结合抗原 100 s 和解离 120 s，转速为 1000 rpm，温度为 30°C。实验完成后，使用 ForteBio Octet 分析软件分析 KD 值，结果见下表。

在如以上测定法所述进行的实验中，DLL3/CD3 和人 DLL3-His 的亲和力如表 5 所示。

Sample ID	KD (M) antibodies on AHC sensor tip, Human DLL3 His (100 nM) in solution	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
D3-107/CD3	图 4A	0.3671	4.91E-10	4.07E+05	2.00E-04

DLL3/CD3 和人 CD3 的亲和力如表 6 所示。

Sample ID	KD (M) Human CD3 on HIS1K sensor tip, antibody (100nM) in solution	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
D3-107/CD3	图 4B	1.2595	9.92E-09	2.93E+05	2.90E-03

获得的结合亲和力见表 7。

Name	Antigen	Ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD (M)
D3-107/CD3	人 DLL3	4.07E+05	2.00E-04	4.91E-10
D3-107/CD3	人 CD3	2.93E+05	2.90E-03	9.92E-09

实施例 7. DLL3/CD3 双抗细胞结合实验

通过流式细胞技术检测 DLL3/CD3 双特异性抗体与 DLL3 过表达细胞系的结合能力。

CHO-hDLL3 按照常规操作培养传代。细胞离心重悬后计数，将细胞密度调整至 $4X10^6$ cell/mL 倒于加样槽中，用排枪以每孔 50 ul 接种于 96 孔板中。每孔 50 ul 细胞中加入 50 ul 梯度稀释的抗体样品（300nM 起始，3 倍稀释，共 12 个梯度），然后放入 4℃冰箱孵育 30 分钟。

400 g 离心 5 分钟甩板，加入 200 ul PBS 重悬，再次离心后重悬，重复 2 次。加入 PE anti-human IgG Fc 重组抗体 (1:200) 4℃避光孵育 30 分钟，200 ul PBS 洗 2 次甩板；重悬于 100 ul PBS，流式细胞仪读数。拟合曲线，计算 EC50 值。

在如以上测定法所述进行的实验中，示例抗体与过表达细胞表面的 DLL3 结合见图 5。如图 5 可见，示例抗体与 DLL3 过表达细胞系结合的上平台较对照抗体略强。

PBMC（Oricells，货号 FPB005-C）按照常规操作复苏。复苏后离心重悬后计数，将细胞密度调整至 4X10^6 cell/ml，加入 Human TruStain FcX™ (Biolegend，422302)后混匀，4℃封闭 10 分钟。封闭完成后，加入 FITC anti-human CD4 Antibody (Biolegend, 300506)以及 APC anti-human CD8a Antibod (Biolegend, 301014)后混匀。倒于加样槽中，用排枪以每孔 50 ul 接种于 96 孔板中。每孔 50 ul 细胞中加入 50 ul 梯度稀释的抗体样品（300nM 起始，3 倍稀释，共 12 个梯度），然后放入 4℃冰箱孵育 30 分钟。400 g 离心 5 分钟甩板，加入 200 ul PBS 400 g 5 分钟 离心甩板，重复 3 次。400 g 离心 5 分钟甩板，加入 200 ul PBS 重悬，再次离心后重悬，重复 2 次。加入 PE anti-human IgG Fc 重组抗体 (1:200) 4℃避光孵育 30 分钟，200 ul PBS 洗 2 次甩板；重悬于 100 ul PBS，流式细胞仪读数。拟合曲线，计算 EC50 值。

在如以上测定法所述进行的实验中，示例抗体与人 CD4 T 细胞(图 6B)和 CD8 T 细胞(图 6A)表面的 CD3 结合见图 6。如图 6 可见，示例抗体和对照抗体与 T 细胞表面 CD3 结合能力相当。

实施例 8. DLL3/CD3 双抗体外激活 Jurkat-NFAT-Luc 实验

DLL3/CD3 双抗同时与小细胞肺癌细胞表面的 DLL3 和 Jurkat-NFAT-Luc 细胞表面的 CD3 结合，通过 DLL3 依赖性的 CD3 交联，激活 NFAT-Luc 下游信号通路。本研究利用荧光素酶报告基因法检测 Jurkat-NFAT-Luc 细胞与 DLL3 阳性的细胞共培养条件下，通过检测加入示例抗体过夜培养后荧光素酶的表达情况反映抗体激活能力的强弱。

使用 Assay 培养基重悬 SHP77,H82(ATCC, HTB-175), DMS53(南京科佰，CBP60172),H460（ATCC, HTB-177, DLL3 阴性细胞)和 Jurkat-NFAT-Luc 细胞，调整细胞密度至 6.0 × 10^5 cell/ml，按照 1:1 的比例将肿瘤细胞和 Jurkat-NFAT-Luc 细胞混合备用。每孔加入 100 μL 细胞悬液以及梯度稀释的待测抗体 (50nM 起始，3 倍稀释，12 个梯度)，过夜孵育。次日每孔加入 80 μL Bio-Glo Luciferase Assay System (Promega，G7940)检测液。于酶标仪（Molecular Device，SpectraMax I3）读数。

在如以上测定法所述进行的实验中，在 DLL3 阳性细胞（SHP77，H82，DMS53）实验体系内，示例抗体能够剂量依赖性地激活 NFAT 信号（见图 7A，7B 和图 7C），激活强度和对照抗体相当。在 DLL3 表达最高的 SHP77 中，激活强度最强，而在表达略低的 H982 和 DMS53 中，激活强度略低；而在 DLL3 阴性细胞 H460 实验体系内，示例抗体未显示出激活作用（见图 7D）。因此，DLL3/CD3 双抗对 NFAT 信号的激活强度与表达程度相关。

实施例 9. DLL3/CD3 双抗体外激活 T 细胞杀伤小细胞肺癌实验

DLL3/CD3 双抗同时与小细胞肺癌细胞表面的 DLL3 和原代 T 细胞表面的 CD3 结合，通过 DLL3 依赖性的 CD3 交联，激活 T 细胞，介导 T 细胞对 DLL3 阳性肿瘤细胞的杀伤。本研究利用 Propidium Iodide 染色（PI）法检测人 PBMC 细胞与 DLL3 阳性的细胞共培养条件下，加入示例抗体 24 小时检测肿瘤细胞 PI 阳性的比率，从而评估人 CD8+ T 细胞对 DLL3 阳性肿

瘤细胞的杀伤能力。

从液氮罐中取出 PBMC 于 37 ℃快速融化，滴加入预热的含 10% FBS 的 1640 培养基(含 0.1% DNA 酶)中，得混合液 10 ml。400 g 离心 5 分钟，用 10 ml 的含 10% FBS 的 1640 培养基重悬，并加入 10 μl DNA 酶，37 ℃、5 % CO_2 培养箱贴壁过夜。

DLL3 阳性细胞 SHP77 和 DLL3 阴性细胞 H460 细胞（阴性对照）分别作为靶细胞，400g 离心 5 分钟，去上清，用 30ml PBS 洗二遍后离心去上清。加入 CellTrace Far Red Cell 染液（THERMO FISHER，C34564）标记细胞，并在 37℃培养箱中避光孵育 20 分钟，结束后加入 1640 完全培养基 400g 离心 5 分钟，去上清，1640 完全培养基重悬后转至 CO2 培养箱培养过夜。

将靶细胞密度调至 2x10E5/ml，PBMC 的细胞密度调至 4x10E6/ml，加入 50ul 梯度稀释的抗体(起始浓度 10nM，3 倍稀释，共 11 个梯度)，50ul 靶细胞和 50ul PBMC 细胞，混匀后放入 CO_2 培养箱培养。杀伤 24h 小时后，取出 96 孔板，每孔加入 100ul PI 检测液，和细胞混匀后上流式检测。

在如以上测定法所述进行的实验中，示例抗体能够剂量依赖性地诱导人 CD8+ T 细胞对 SHP77 靶细胞的杀伤作用（见图 8A），示例抗体对非靶细胞 H460 未显示出杀伤作用（见图 8B）。

实施例 10. DLL3/CD3 双抗 PTM 去除

D3-107/CD3 双抗分子在 DLL3 臂（D3-107）重链可变区(HCDR2)存在一个 DG 作为 hotspot 点，以及在轻链框架区域(FR3)存在一个 NFS 糖基化位点。为了减少 CMC 方面的分析困难以及潜在的成药性风险，我们针对以上 hotspot 设计了相应突变（表 8）。对突变后的分子基于实施例 2 和 3 的方法(抗体稀释起始浓度为 300nM，3 倍稀释，共 12 个梯度)，验证其结合活性和表达产量，证明突变后的分子能够保持较好的 DLL3 结合活性以及表达产量（表 8 和表 10；图 9）。

根据表达量以及细胞水平结合能力的结果，我们重链选择 D3-107-VH-P1 和 D3-107-VH-P2 分别与轻链 D3-107-VL-P2 进行组合，得到 D3-107-C1 和 D3-107-C2，得到的新的单抗序列我们再次通过流式验证其结合活性（参见实施例 2），PTM 去除的分子相比于亲本分子，均能有较好的结合活性（表 9、表 10 和图 10）。

接下来 D3-107-C1 和 D3-107-C2 与 CD3 臂拼接双抗，得到 D3-107/CD3-C1 和 D3-107/CD3-C2 双抗。我们检测了这两个双抗的细胞水平结合能力（方法参见实施例 3 和 7，结果见图 11）、reporter 激活（方法参见实施例 8，结果参见图 12）以及体外杀伤功能（方法参见实施例 9，结果参见图 13 和 14），发现这两个候选分子体外活性相当，并与亲本分子保持一致，我们选择 D3-107/CD3-C1。

表 8: DLL3 候选分子 D3-107 PTM 去除突变

编号	新质粒名称	序列	SEQ ID NO
1	D3-107-VH	CDR2 的第 6 位为 D，第 7 位为 G	SEQ ID NO:12
2	D3-107- P1-VH	CDR2 的第 6 位的 D 突变为 E	SEQ ID NO:13

3	D3-107 -P2-VH	CDR2 的第 6 位的 D 突变为 Q	SEQ ID NO:14
4	D3-107 -P3-VH	CDR2 的第 6 位的 G 突变为 V	SEQ ID NO:15
5	D3-107-VL	FR3 中含有 NFS	SEQ ID NO:16
6	D3-107-VL-P1	FR3 中 NFS 的 N 突变为 Q	SEQ ID NO:17
7	D3-107-VL-P2	FR3 中 NFS 的 S 突变为 A	SEQ ID NO:18

将上述轻链可变区和重链可变区组合，如实施例 1 所述的制备相应的单克隆抗体，获得的抗体如下表 9。

表 9：单克隆抗体的名称和可变区

蛋白名称	重链可变区	轻链可变区
D3-107	D3-107-VH SEQ ID NO:12	D3-107-VL SEQ ID NO:16
D3-107-P1	D3-107-P1-VH SEQ ID NO:13	D3-107-VL SEQ ID NO:16
D3-107-P2	D3-107-P2-VH SEQIDNO:14	D3-107-VL SEQ ID NO:16
D3-107-P3	D3-107-P3-VH SEQ ID NO:15	D3-107-VL SEQ ID NO:16
D3-107-P4	D3-107-VH SEQ ID NO:12	D3-107-P1-VL SEQID NO:17
D3-107-P5	D3-107-VH SEQ ID NO:12	D3-107-P2-VL SEQ ID NO:18
D3-107-C1	D3-107-P1-VH SEQ ID NO:13	D3-107-P2-VL SEQ ID NO:18
D3-107-C2	D3-107-P2-VH SEQIDNO:14	D3-107-P2-VL SEQ ID NO:18

表 10: DLL3-S4-107 去除单一 hotspot 点后 DLL3 结合活性及表达量

蛋白名称	表达量(mg/L)	纯度（SEC）	KD	EC50
D3-107	69.3	99.871%	9.24E-10	1.575
D3-107-P1	72.9	99.819%	9.34E-10	1.541
D3-107-P2	75.4	100.000%	1.22E-09	1.252
D3-107-P3	80.3	99.791%	9.98E-10	1.664
D3-107-P4	52.8	99.809%	9.71E-10	1.01
D3-107-P5	73.8	99.866%	9.97E-10	0.9556
D3-107	69.3	99.871%	9.24E-10	0.6575
D3-107-C1	108.9	99.924%	6.68E-10	0.7164
D3-107-C2	121.3	99.964%	7.75E-09	0.5609

获得的 D3-107/CD3-C1 双抗的具体序列如下：

特异性结合 DLL3 的 DLL3 臂	
抗 DLL3 抗体 D3-107 VH（D3-107-P1-VH）	SEQ ID NO:13
抗 DLL3 抗体 D3-107 VL（D3-107-P2-VL）	SEQ ID NO:18
Fc 区(LALA+S364R/D399K)	SEQ ID NO:29
轻链恒定区	SEQ ID NO:25
重链 1	SEQ ID NO:42
轻链 1	SEQ ID NO:47
特异性结合 CD3 的 CD3 臂	
抗 CD3 抗体 VH	SEQ ID NO:31
抗 CD3 抗体 VL	SEQ ID NO:35
Fc 区(LALA+ K370S，K409D,Y349T)	SEQ ID NO:30
轻链恒定区	SEQ ID NO:24
重链 2	SEQ ID NO:48
轻链 2	SEQ ID NO:40

获得的 D3-107/CD3-C2 双抗的具体序列如下：

特异性结合 DLL3 的 DLL3 臂	
抗 DLL3 抗体 D3-107 VH（D3-107-P2-VH）	SEQIDNO:14
抗 DLL3 抗体 D3-107 VL(D3-107-P2-VL)	SEQ ID NO:18
Fc 区(LALA+S364R/D399K)	SEQ ID NO:29
轻链恒定区	SEQ ID NO:25
重链 1	SEQ ID NO:43
轻链 1	SEQ ID NO:47
特异性结合 CD3 的 CD3 臂	
抗 CD3 抗体 VH	SEQ ID NO:31
抗 CD3 抗体 VL	SEQ ID NO:35
Fc 区(LALA+ K370S，K409D,Y349T)	SEQ ID NO:30
轻链恒定区	SEQ ID NO:24
重链 2	SEQ ID NO:48
轻链 2	SEQ ID NO:40

实施例 11. PTM 去除的 DLL3/CD3 双抗亲和力

采用生物膜薄层干涉测定技术(BLI)测定双特异性抗体结合 DLL3 的亲和力（KD）。实验开始前半个小时，根据样品数量，取合适数量的 AHC 传感器 (18-5060，Sartorius)浸泡于 SD 缓冲液（1x PBS，0.1% BSA，0.05% Tween-20）中。将双特异性抗体和人 DLL3（DL3-H52H4，Acro biosystems）稀释至 100 nM。

分别将 SD 缓冲液、抗体溶液、人 DLL3 分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯微孔板（Greiner，655209）中。使用 Fortebio Octet Red96e 进行检测，根据样品位置布板，选择传感器位置。仪器设置参数如下：运行步骤：平衡基线 120 s、加样固化抗体 100 s、平衡基线 120 s、结合抗原 100 s 和解离 120 s，转速为 1000 rpm，温度为 30℃。实验完成后，使用 ForteBio Octet 分析软件分析 KD 值，结果见下表 11 和图 15。

Sample ID	KD (M) antibodies on AHC sensor tip, Human DLL3 His (100 nM) in solution	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
D3-107/CD3-C1	图 15A	0.7832	6.68E-10	2.99E+05	2.00E-04
D3-107/CD3-C2	图 15B	0.8162	7.75E-10	2.58E+05	2.00E-04

实施例 12. PTM 去除的 DLL3/CD3 双抗对 DLL1 和 DLL4 的结合验证

示例抗体在体外实验中对 DLL1 和 DLL4 的亲和力测定

采用生物膜薄层干涉测定技术(BLI)测定双特异性抗体结合 DLL3 的亲和力（KD）。实验开始前半个小时，根据样品数量，取合适数量的 AHC 传感器 (18-5120，Sartorius)浸泡于 SD 缓冲液（1x PBS，0.1% BSA，0.05% Tween-20）中。将双特异性抗体和人 DLL1（DL1-H52H8，Acro biosystems），人 DLL4（DL4-H5227，Acro biosystems ）稀释至 100 nM。

分别将 SD 缓冲液、抗体溶液、人 DLL1、人 DLL4 分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯微孔板（Greiner，655209）中。使用 Fortebio Octet Red96e 进行检测，根据样品位置布板，选择传感器位置。仪器设置参数如下：运行步骤：平衡基线 120 s、加样固化抗体 100 s、平衡基线 120 s、结合抗原 100 s 和解离 120 s，转速为 1000 rpm，温度为 30℃。实验完成后，使用 ForteBio Octet 分析软件分析 KD 值，结果见下表 12。

表 12：示例抗体在体外实验中对 DLL1 和 DLL4 细胞水平结合

Name	Antigen	Response	Ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD (M)
D3-107/CD3-C1	人 DLL1	-0.014	No binding		
D3-107/CD3-C1	人 DLL4	0.0405	No binding		

通过流式细胞技术检测 DLL3/CD3 双特异性抗体与 DLL1 以及 DLL4 过表达细胞系的结合能力。

CHO-hDLL1（将人 DLL1 基因 NCBI ID: 28514 构建到 pXC17.4 载体后电转到 CHO 细胞并分选阳性细胞群获得）和 293T-hDLL4（将人 DLL4 基因 NCBI ID: 54567 构建到 pLenti-C-MYC-DDK-IRES-puro 载体后用 293T 包装病毒，并感染 293T 细胞并分选阳性细胞群获得）

细胞按照常规操作培养传代。细胞离心重悬后计数，将细胞密度调整至 4X10^6 cell/mL 倒于加样槽中，用排枪以每孔 50 ul 接种于 96 孔板中。每孔 50 ul 细胞中加入 50 ul 梯度稀释的抗体样品（100nM起始，3倍稀释，共10个梯度，其中阳性对照为商用 DLL1 抗体（PE anti-human Delta-like protein 1 (DLL1); Biolegend; 346404）和商用 DLL4 抗体（PE anti-human Delta-like protein 4 (DLL4) Antibody; Biolegend; 346506）），然后放入 4℃冰箱孵育 30 分钟。400 g 离心 5 分钟甩板，加入 200 ul PBS 重悬，再次离心后重悬，重复 2 次。加入 PE anti-human IgG Fc 重组抗体 (1:200) 4℃避光孵育 30 分钟，200 ul PBS 洗 2 次甩板；重悬于 100 ul PBS，流式细胞仪读数。拟合曲线，计算 EC50 值。

在如以上测定法所述进行的实验中，示例抗体与 CHO-hDLL1 以及 293T-hDLL4 细胞结合情况见图 16。示例抗体与 DLL3 同源蛋白（DLL1/DLL4）过表达细胞系并无结合。

实施例 13. PTM 去除的 DLL3/CD3 双抗对小细胞肺癌和 T 细胞结合实验

通过流式细胞技术检测 PTM 去除后 DLL3/CD3 双特异性抗体与 DLL3 过表达细胞系以及 T 细胞的结合能力。详细实验细节参见实施例 7。

结果见图 17，从图 17 可以看出 PTM 去除后的 DLL3/CD3 双特异性抗体和阳性对照 AMG757 analog 结合能力相当，并优于 BI-D3C1 analog。

实施例 14. PTM 去除的 DLL3/CD3 双抗体外激活 NFAT-reporter 细胞情况

示例抗体在体外实验中对 NFAT 报告细胞的激活作用，具体实验方法参考实施例 8，区别在于应用 IgG1 作为阴性对照，BI-D3C1 analog 作为阳性对照。

实验结果见图 18，从图 18 可以看出，D3-107/CD3-C1 抗体在 DLL3 阳性细胞，都能够展现出很明显的剂量依赖的刺激活性，且和 BI 阳性药物激活程度类似。而在我们关注的 DLL3 阴性细胞上面，示例抗体未展现出任何激活作用，提示其具有很好的安全性。

实施例 15. PTM 去除的 DLL3/CD3 双抗体外刺激 T 细胞杀伤肿瘤细胞情况

我们通过原代 PBMC 和小细胞肺癌共培养体系，来评价示例抗体在体外对肿瘤细胞的杀伤活性。具体实验方法参考实施例 9，待测抗体以 10nM 起始，进行 3 倍稀释，10 个梯度。

具体结果如图 19 显示，示例抗体 D3-107/CD3-C1 能够有效的杀伤 DLL3 阳性的肿瘤细胞（SHP-77（ATCC CRL-2195），DMS-79（ATCC CRL-2049），H82（ATCC HTB-175）），且呈现明显的剂量效应。而对于 DLL3 阴性的肿瘤细胞（293T-hDLL4（如上所述构建）和 U87（ATCC HTB-14）），即使在高达 900nM 的剂量下，都未观察到非特异性杀伤，提示示例抗体安全可靠。

实施例 16. PTM 去除的 DLL3/CD3 双抗对于 DLL3 阴性细胞的细胞因子释放实验

为了进一步评判示例抗体的安全性，我们监测在无 DLL3 交联情况下，对 PBMC 中免疫细胞产生细胞因子情况。具体实验方法参考实施例 9。区别在于不加靶细胞，只加 PBMC 和抗体稀释液，抗体起始浓度 10nM，3 倍稀释，共 12 个梯度。处理结束后，取出上清，用 Human Th1/Th2/Th17 CBA Kit 测定细胞因子含量，并用 FCAP 分析。

具体结果如图 20 显示，示例抗体 D3-107/CD3-C1 在无 DLL3 交联情况下，对 T 细胞或者巨噬细胞几乎没有刺激作用，所检测的细胞因子（TNFa, IL-6 等）基本和基线差不多，提示本示例抗体具有较高的安全性。

实施例 17. PTM 去除的 DLL3/CD3 双抗体内抗肿瘤作用研究

本研究采用人小细胞肺癌细胞系 DMS79 和 SHP77 细胞接种 NOG 小鼠的 PBMC 模型来测定示例抗体的抗肿瘤作用。

17.1 示例抗体在 DMS-79 荷瘤人源化小鼠模型体内的抗肿瘤药效

实验步骤

雌性 NOG 小鼠（16-19g）购自北京维通利华实验动物技术有限公司。等级为 SPF 级。小鼠在到达后驯化检疫 3 天，随后开始研究。

小鼠静脉注射 PBMC 细胞，$4x10^6$ 个/只，接种体积 200 ul/只。DMS-79 细胞在 PBMC 注射后第三天接种。将 DMS-79 细胞进行常规传代培养，离心收集细胞，以 PBS 分散 DMS-79 细胞，NOG 小鼠右侧背腹部剃毛接种 DMS79 细胞，$5x10^6$ 个/只，接种体积 200 ul/只。

给药：DMS-79 细胞接种后第 7 天，根据小鼠瘤体积以及 PBMC 增殖情况进行分组（每组 6 只）给药。对照组初始肿瘤体~129 mm3。

每 7 天给药一次，总共给药 3 次。给药剂量分别为 0.1mpk 和 0.01mpk，给药分组如下：

hIgG: human IgG 对照（Equitech-Bio SLH56-0001）；

D3-107/CD3-C1: 示例抗体 D3-107/CD3-C1

BI-D3C1 analog: 阳性对照 BI DLL3/CD3。

每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重。

肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：V=L×W2/2。采用电子天平测定体重。在整个研究期间，当肿瘤达到端点时或当小鼠具有> 20 %体重减轻时，使小鼠安乐死。统计肿瘤大小，计算肿瘤抑制率（TGI %）。

接种后第 24 天计算相对肿瘤抑制率（TGI %），计算公式如下：

TGI %=100 %× (hIgG 对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(hIgG 对照组肿瘤体积–hIgG 对照组初始肿瘤体积)。

实验结果

肿瘤生长曲线见图 21，示例抗体可以显著抑制 DMS79 细胞的生长，在第 24 天统计肿瘤大小，并计算出肿瘤抑制率和肿瘤完全消退的比例。

与 hIgG 对比，示例抗体 D3-107/CD3-C1 和 BI 阳性对照 BI DLL3/CD3 高剂量 0.1mg/kg 的肿瘤抑制率分别为 115%和 103%。同时在给药示例抗体 D3-107/CD3-C1 和给药 BI 阳性对照 BI DLL3/CD3 的小鼠组中，其中肿瘤完全消退的比例分别是 5/6 和 2/6。因此，示例抗体 D3-107/CD3-C1 相比阳性对照 BI DLL3/CD3 呈现更为优效的抗肿瘤作用，二者均没有发现体重明显减轻的现象。

在低剂量 0.01mg/kg 的剂量下，示例抗体 D3-107/CD3-C1 和 BI 阳性对照 BI DLL3/CD3 的肿瘤抑制率分别为 75%和 53%，示例抗体 D3-107/CD3-C1 也呈现更优秀的抗肿瘤作用。

DMS-79 模型数据

在低剂量组别中，实验结束后，取肿瘤组织，放入福尔马林中，最后制作成蜡块，用来 IHC 染色 CD3，从而来评判给药后肿瘤内 CD3 情况。

图 22 中的 A、B、C 分别对应组别 IgG1 0.1mpk、BI-D3C1 analog 0.01mpk 以及

D3-107/CD3-C1 0.01mpk。由图可见，D3-107/CD3-C1 0.01mpk 组别可观测到明显的 CD3+细胞的浸润，并且较 hIgG 组别更高

通过 HALO 软件（Indica Labs）统计单位面积 CD3+细胞数量，结果见图 23。结果显示 D3-107/CD3-C1 组别相较于 BI-D3C1 analog 组别，肿瘤中有更多阳性细胞浸润，与更强的抑瘤效果相符。

17.2 示例抗体在 SHP-77 荷瘤人源化小鼠模型体内的抗肿瘤药效

实验步骤

雌性 NOG 小鼠（16-19g）购自北京维通利华实验动物技术有限公司。等级为 SPF 级，小鼠在到达后驯化检疫 3 天，随后开始研究。

用 0.1% DNA 酶预热过的 RPMI-1640 培养基复苏 PBMC 细胞，然后用 PBS 分散 PBMC 细胞，制备成细胞浓度为 $20*10^6$ 个/mL 细胞悬液。小鼠静脉注射 PBMC 细胞悬液，0.2 mL/只，即接种量为 $4*10^6$ 个细胞/只小鼠。

SHP-77 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。PBMC 细胞接种 6 天后，用 PBS 与基质胶（Matrigel）以 1:1 的比例分散 SHP-77 细胞，制备成细胞浓度为 $25*10^6$ 个/mL 细胞悬液。NOG 小鼠右侧背部剃毛，皮下注射 SHP-77 细胞悬液，0.2 mL/只，即接种量为 $5*10^6$ 个细胞/只小鼠。

肿瘤细胞接种 4 天后，根据小鼠瘤体积进行分组（每组 6 只）给药，每 7 天一次，连续给药 3 次。给药方式为腹腔注射。给药剂量分别为 0.6mpk 和 0.06mpk，给药分组如下：

h-IgG: human IgG 对照（Equitech-Bio SLH56-0001）；

D3-107/CD3-C1: 示例抗体 D3-107/CD3-C1

BI-D3C1 analog: 阳性对照 BI DLL3/CD3。

每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重，监测至 24 天结束。

接种后第 24 天计算相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下：

TGI%=100% × (hIgG 对照组肿瘤体积 - 治疗组肿瘤体积)/(hIgG 对照组肿瘤体积 - hIgG 对照组给药前肿瘤体积)。

肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：V=L × W2/2。采用电子天平测定体重。

实验结果

肿瘤生长曲线见图 24，示例抗体 D3-107/CD3-C1 可以显著抑制 SHP77 的生长，在第 24 天统计肿瘤大小，并计算出肿瘤抑制率。抗体 D3-107/CD3-C1 和 BI 阳性对照 BI DLL3/CD3 高剂量 0.6 mg/kg 的肿瘤抑制率分别为 108%和 111%。在低剂量 0.06mg/kg 的剂量下，示例抗体 D3-107/CD3-C1 和 BI 阳性对照 BI DLL3/CD3 的肿瘤抑制率分别为 75%和 34%。同时在给药抗体 D3-107/CD3-C1 和 BI 阳性对照 BI DLL3/CD3 的小鼠组中，均没有发现体重明显减轻的现象。

17.3 示例抗体在 SHP-77 荷瘤人源化小鼠模型体内的抗肿瘤药效

实验步骤

雌性 NOG 小鼠（16-19g）购自北京维通利华实验动物技术有限公司。等级为 SPF 级，小鼠在到达后驯化检疫 3 天，随后开始研究。

用 0.1% DNA 酶预热过的 RPMI-1640 培养基复苏 PBMC 细胞，然后用 PBS 分散 PBMC 细胞，制备成细胞浓度为 $20*10^6$ 个/mL 细胞悬液。小鼠静脉注射 PBMC 细胞悬液，0.2 mL/只，即接种量为 $4*10^6$ 个细胞/只小鼠。

SHP-77 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。PBMC 细胞接种 4 天后，用 PBS 与基质胶（Matrigel）以 1:1 的比例分散 SHP-77 细胞，制备成细胞浓度为 25*106 个/mL 细胞悬液。NOG 小鼠右侧背部剃毛，皮下注射 SHP-77 细胞悬液，0.2 mL/只，即接种量为 5*106 个细胞/只小鼠。

肿瘤细胞接种 4 天后，根据小鼠瘤体积进行分组（每组 6 只）给药，每 7 天一次，连续给药 3 次。给药方式为腹腔注射。给药剂量见图 25 图例（确保摩尔给药剂量相同）。给药分组如下：

h-IgG: human IgG 对照（Equitech-Bio SLH56-0001）；

D3-107/CD3-C1: 示例抗体 D3-107/CD3-C1

AMG757 analog: 阳性对照 AMG757。

每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重，监测至 25 天结束。给药剂量我们按照等摩尔数来匹配给药。

接种后第 21 天计算相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下：

TGI%=100% × (hIgG 对照组肿瘤体积 – 治疗组肿瘤体积)/(hIgG 对照组肿瘤体积 – hIgG 对照组给药前肿瘤体积)。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：V=L × W2/2。采用电子天平测定体重。

实验结果

肿瘤生长曲线见图 25，示例抗体 D3-107/CD3-C1 可以显著抑制 SHP77 的生长，在第 20 天统计肿瘤大小，并计算出肿瘤抑制率。

抗体 D3-107/CD3-C1 和 Amgen 阳性对照 AMG757 analog 高剂量的肿瘤抑制率分别为 112% 和 110%。在低剂量下，示例抗体 D3-107/CD3-C1 和 Amgen 阳性对照 AMG757 analog 的肿瘤抑制率分别为 75%和 40%。同时在给药 D3-107/CD3-C1 和 Amgen 阳性对照 AMG757 analog 的小鼠组中，均没有发现体重明显减轻的现象。

17.4 示例抗体和标准化疗联用在 H82 荷瘤人源化小鼠模型中的抑瘤效果

实验步骤

雌性 NOG 小鼠（16-19g）购自北京维通利华实验动物技术有限公司。等级为 SPF 级，

小鼠在到达后驯化检疫 3 天，随后开始研究。

用 0.1% DNA 酶预热过的 RPMI-1640 培养基复苏 PBMC 细胞，然后用 PBS 分散 PBMC 细胞，制备成细胞浓度为 $20*10^6$ 个/mL 细胞悬液。小鼠静脉注射 PBMC 细胞悬液，0.2 mL/只，即接种量为 $4*10^6$ 个细胞/只小鼠。

H82 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。PBMC 细胞接种 6 天后，用 PBS 与基质胶（Matrigel）以 1:1 的比例分散 H82 细胞，制备成细胞浓度为 $12.5*10^6$ 个/mL 细胞悬液。NOG 小鼠右侧背部剃毛，皮下注射 H82 细胞悬液，0.2 mL/只，即接种量为 $2.5*10^6$ 个细胞/只小鼠。

肿瘤细胞接种 5 天后，根据小鼠瘤体积进行分组（每组 6 只）给药，示例抗体每周给 2 次，给药 7 次；标准化疗药每周给 1 次，给药 4 次。给药方式为腹腔注射，给药体积为 10 ml/kg，给药剂量见图 26 图例。给药分组如下：

h-IgG: IgG 对照（Equitech-Bio SLH56-0001）

D3-107/CD3-C1: 示例抗体 D3-107/CD3-C1

Chemotherapy (Chemo): carboplatin+etoposide

Combination therapy: carboplatin+etoposide+ D3-107/CD3-C1

每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重，监测至 31 天结束。

肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：$V=L\times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

实验结果

肿瘤生长曲线见图 26，计算接种后第 29 天相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下：

TGI%=100% × (hIgG 对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(hIgG 对照组肿瘤体积–hIgG 对照组给药前肿瘤体积)。

抗体 D3-107/CD3-C1 和标准化疗药肿瘤抑制率分别为 23.0%和 65.9%，联合后肿瘤抑制率达到 83.5%，联合组显示出更强的抑瘤效果。此外，实验过程中未发现体重明显减轻的现象。

17.5 示例抗体和免疫检查点抑制剂联用在 MC38-hDLL3 荷瘤 hCD3 KI 小鼠模型中的抑瘤效果

实验步骤

雌性 hCD3EDG 小鼠（6-8w）购自上海南方模式生物科技股份有限公司。等级为 SPF 级，小鼠在到达后驯化检疫 3 天，随后开始研究。

MC38-hDLL3 细胞内部构建获得：将人 DLL3 基因 NCBI ID: 10683 构建到 pLenti-C-MYC-DDK-IRES-puro 载体后用 293T 包装病毒，感染 MC38 细胞(上海和元生物，HYC0116)并分选阳性细胞群。MC38-hDLL3 细胞常规传代培养用于后续体内实验。MC38-hDLL3 细胞制备成浓度为 $15*10^6$ 个/mL 细胞悬液。小鼠右侧背部剃毛，皮下注射 MC38-hDLL3 细胞悬液，0.2 mL/只，即接种量为 $3*10^6$ 个细胞/只小鼠。

肿瘤细胞接种 8 天后，根据小鼠瘤体积进行分组（每组 6 只）给药，示例抗体每周给 2 次，给药 5 次；免疫检查点抑制剂单次给药。给药方式为腹腔注射，给药体积为 10 ml/kg。给药剂量见图 27 图例。给药分组如下：

h-IgG：IgG 对照（Equitech-Bio SLH56-0001）, 5 mg/kg

D3-107/CD3-C1：示例抗体 D3-107/CD3-C1, 3 mg/kg

Anti-mPD-1:小鼠 PD-1 抑制剂（如实施例 1 所述制备）, 2 mg/kg

Combination therapy: D3-107/CD3-C1, 3 mg/kg + Anti-mPD-1, 2 mg/kg

每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重，监测至 29 天结束。

肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：$V=L \times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

实验结果

肿瘤生长曲线见图 27，接种后第 29 天计算相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下：TGI%=100% × (hIgG 对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(hIgG 对照组肿瘤体积–hIgG 对照组给药前肿瘤体积)。

抗体 D3-107/CD3-C1 和小鼠 PD-1 抑制剂肿瘤抑制率分别为 21.1%和 64.5%，联合后肿瘤抑制率达到 96.9%，联合组显示出更强的抑瘤效果。此外，实验过程中未发现体重明显减轻的现象。

实施例 18. PTM 去除的 DLL3/CD3 双抗小鼠体内 PK 研究

通过小鼠 PK 实验，观察 D3-107/CD3-C1 在体内的稳定性。给 9 只 BALB/c 小鼠（北京维通利华）尾静脉注射 10mpk 的 D3-107/CD3-C1，分别于 5 分钟，0.5 小时，2 小时，6 小时，24 小时，48 小时，72 小时，168 小时，336 小时以及 504 小时采小鼠血清样本进行 ELISA 检测。

ELISA 采用两种方法检测：

方法 1，用 DLL3-his 抗原（kactusbio，DLL-HM103）包被板子，之后加入待检测血清，然后用抗人 Fc 的二抗（BETHYL，A80-104P）检测，最后 TMB 显色。

方法 2，用 DLL3-his 抗原（kactusbio，DLL-HM103）包被板子，之后加入待检测血清，然后加入生物素标记的 CD3（Acrobiosystem，CDD-H82W6），再加入带链亲和素的二抗（BIOLEGEND，405210），最后 TMB 显色。PK 检测结果如图 28 所示，D3-107/CD3-C1 的两臂在小鼠体内相对稳定，且 PK 曲线呈现 IgG 样的 PK profile，半衰期达到 148-159 小时，清除率为 0.39-0.42 ml/kg/h。PK 详细参数见表 13。

表 13：示例双抗分子的 PK 参数

D3-107 /CD3-C1	Cmax (ug/mL)	AUC0-t (ug*h/mL)	AUC0-inf _obs (ug*h/mL)	MRT0-inf _obs(h)	t1/2 (h)	CL(ml/kg/h)	Vss (ml/kg)
Method 1	249	23635	25613	198	148	0.39	77
Method 2	251	21700	23901	211	159	0.42	88

实施例 19. PTM 去除的 DLL3/CD3 成药性研究

1.1 SMAC 柱检测抗体胶体稳定性

1.1.1 实验步骤

通过记录抗体在 Zenix-HPLC 柱中的保留时间，检测抗体的胶体稳定性。取 100ul 样品（D3-107/CD3-C1）13000rpm 离心 5min，取上清上样 HPLC。色谱条件：Zenix SEC-300 色谱柱；流动相 PBS；波长 214nm；柱温 25 度；流速 0.35ml/min；进样量 10ul。

1.2 HIC 检测抗体疏水性

1.2.1 实验步骤

通过记录抗体在 HIC-HPLC 柱中的保留时间，检测抗体的疏水性。将样品（D3-107/CD3-C1）稀释至 1mg/ml，取 10ul 进样 MAbPac HIC-10 色谱柱。色谱条件如下：检测波长 280nm；柱温 25 度；流速 1 ml/min。流动相梯度：0-20 min 100% A – 100% B; 20-25min 100% B; 25-30 min 100% A。(A: 1.8 M (NH4)2SO4, 100 mM NaH2PO4, pH 6.5; B: 100 mM NaH2PO4, 10% IPA, pH 6.5)

1.3 CIC 检测抗体非特异性

将来自人血清的 IgG 包被到 NHS 活化的色谱柱上，利用 HPLC 考察抗体在该柱子上的保留时间，保留时间与其溶解性呈显著的负相关性。因此可以利用此方法筛选出溶解性更佳的抗体。

取 100 μl 稀释至 1mg/ml 的样品（D3-107/CD3-C1）13000 rpm 离心 5 min。 接上预先偶联有 polyclonal human IgG 的色谱柱，并设置检测方法（检测波长： 280 nm；流速：0.35 ml/min；进样量 10 μl，室温下运行实验。

1.4 DLS 检测抗体的热稳定性

动态光散射（DLS）利用激光照射在溶液中做布朗运动的小颗粒，并检测散射光强度的变化。DLS 可用于检测溶液中蛋白粒径，以及在不同温度或不同浓度条件下的稳定性。将以 13000 G/min 离心 5 min 后加入至样品板中，再使用板式离心机离心 1min 去除气泡。检测 Tagg 选择连续升温实验选定读取孔位后，检测设置 DLS 采集时间 5 s，采集次数 5 次，以及实验温度 25-85℃。实验结束后分析样品粒径随温度的变化。

1.5 DSC 检测抗体的热稳定性

示扫描量热法（DSC）是热分析的一种方法。它是在程序升温的条件下，测量试样与参比物之间的能量差随温度变化的一种分析方法。随着温度的升高，蛋白结构发生变化，伴随的热量变化被差式扫描量热仪记录到 DSC 曲线，通过对 DSC 曲线进行分析得到蛋白的 Tm

值。

分别将样品（D3-107/CD3-C1）用 PBS 稀释至 0.5-1 mg/ml，将稀释后样品和 PBS 缓冲液脱气后，将样品加入左侧样品板，并在右侧参比板中对应位置加入 PBS 缓冲液。起始温度 30℃ 平衡时间 10 min；以 1 ℃/min 速率加热，终止温度 90 ℃。

双抗分子抗 DLL3 半分子 107-C1-innoA.LALA（重链 SEQ ID NO:42; 轻链: SEQ ID NO:47）在 CHO 细胞中瞬时转染的滴度为 109mg/L，抗 CD3 半分子 hzsp34.24-innoB.LALA（重链 SEQ ID NO:48；轻链：SEQ ID NO:40）的滴度为 244mg/L。

获得的成药性参数具体见表 14 所示，其中双抗分子 D3-107/CD3-C1 组装后的回收率为 69%，CEX 纯化后的纯度 SEC 检测为 97%；早期成药性 HPLC 色谱保留时间检测显示胶体稳定性(SMAC 8.3 min)、非特异性结合(CIC 9.8 min)，疏水性(HIC 13 min)，表明成药性指标风险低。

表 14：示例双抗分子的成药性参数

	Colloidal stability	Polyspecificity	Hydrophobicity	Thermostability	
	SMAC(min)	CIC(min)	HIC(min)	Tm1(℃)	Tagg(℃)
D3-107/CD3-C1	8.3	9.8	13.0	65.6	64.3

序列总结

SEQ ID NO	序列名称	具体序列
1	D3-107-VH-CDR1	GYTFTSYYMH
2	D3-107-VH-CDR2	IINPSDGRKSYAQKFLG
3	D3-107-P1-VH-CDR2	IINPSEGRKSYAQKFLG
4	D3-107-P2-VH-CDR2	IINPSQGRKSYAQKFLG
5	D3-107-P3-VH-CDR2	IINPSDVRKSYAQKFLG
6	D3-107-VH-CDR3	GEKVAGPYYYYYSMDV
7	D3-107-VL-CDR1	RASQGISNYLA
8	D3-107-VL-CDR2	AASSLQS
9	D3-107-VL-CDR3	QQYDSYPLT

10	D3-107-VH-DNA	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCTAGTGATGGTAGGAAAAGCTACGCACAGAAGTTCCTGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGGGGGAGAAAGTGGCTGGTCCCTACTACTATTACTACAGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
11	D3-107-VL-DNA	GAGATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAACTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATGATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
12	D3-107-VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSDGRKSYAQKFLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSS
13	D3-107- P1-VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSEGRKSYAQKFLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSS
14	D3-107 -P2-VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSQGRKSYAQKFLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSS
15	D3-107 -P3-VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSDVRKSYAQKFLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSS
16	D3-107-VL-氨基酸	EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSNFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDSYPLTFGGGTKVEIK
17	D3-107-P1-VL	EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSQFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDSYPLTFGGGTKVEIK
18	D3-107-P2-VL	EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSNFAGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDSYPLTFGGGTKVEIK
19	D3-107-Fab 重链（VH+CH1)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSDGRKSYAQKFLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
20	D3-107- P1-Fab 重链（VH+CH1)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSEGRKSYAQKFLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
21	D3-107 -P2-Fab 重链（VH+CH1)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSQGRKSYAQKFLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
22	D3-107 -P3-Fab 重链（VH+CH1)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSDVRKSYAQKFLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
23	重链恒定区（IgG1 野生型）	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
24	轻链恒定区	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

	Lambda	
25	轻链恒定区 Kappa	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
26	IgG1 Fc（野生型）	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
27	IgG1 Fc（野生型）	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
29	IgG1 Fc (LALA+S364R/ D399K)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	IgG1 Fc (LALA+ K370S,K409D,Y 349T)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVT TLPPSRDELTKNQVSLTCLVSGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
31	抗 CD3 抗体 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS
32	抗 CD3 抗体 VH-HCDR1	GFTFNTYAMN
33	抗 CD3 抗体 VH-HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
34	抗 CD3 抗体 VH-HCDR3	HGNFGQSYVSWFAY
35	抗 CD3 抗体 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFS GSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVL
36	抗 CD3 抗体 VL-LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
37	抗 CD3 抗体 VL-LCDR2	GTNKRAP
38	抗 CD3 抗体 VL-LCDR3	ALWYSNLWV
39	抗 CD3 抗体 Fab 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
40	抗 CD3 抗体 Fab 轻链	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFS GSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
41	D3-107-Fab 重链 -Fc	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSDGRKSYAQK FLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK

42	D3-107- P1-Fab 重链-Fc	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSEGRKSYAQK FLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
43	D3-107 -P2-Fab 重链-Fc	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSQGRKSYAQK FLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
44	D3-107 -P3-Fab 重链-Fc	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSDVRKSYAQK FLGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEKVAGPYYYYYSMDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVRLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
45	D3-107-VL-CL	EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSNFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
46	D3-107-P1-VL-C L	EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSQFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
47	D3-107-P2-VL-C L	EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSNFAGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
48	抗 CD3 抗体 Fab 重链-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPPSRDELTKNQVSLTCLVSGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
49	Anti-mPD-1 重链	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSSYRWNWIRKFPGNRLEWMGYINSAGISNYNPSLKR RISITRDTSKNQFFLQVNSVTTEDAATYYCARSDNMGTTPFTYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

50	Anti-mPD-1 轻链	DIVMTQGTLPNPVPSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYLNWYLQRPGQSPQLLIYWMSTRASGVSD RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYYCQQGLEFPTFGGGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

权 利 要 求

1、抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH 的 3 个 CDR，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及轻链可变区 VL 的 3 个 CDR，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 选自

(i). 如 SEQ ID NO:13 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和 如 SEQ ID NO:18 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(ii). 如 SEQ ID NO:12 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和 如 SEQ ID NO:16 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(iii). 如 SEQ ID NO:13 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和 如 SEQ ID NO:16 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(iv). 如 SEQ ID NO:14 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和 如 SEQ ID NO:16 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(v). 如 SEQ ID NO:15 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和 如 SEQ ID NO:16 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(vi). 如 SEQ ID NO:12 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和 如 SEQ ID NO:17 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(vii). 如 SEQ ID NO:12 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和 如 SEQ ID NO:18 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

(viii). 如 SEQ ID NO:14 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和 如SEQ ID NO:18所示的VL中所含的三个互补决定区域LCDR1、LCDR2和LCDR3。

2、抗 DLL3 抗体或其抗原结合片段，其包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 HCDR1 由 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列组成；HCDR2 由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成；HCDR3 由 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列组成；LCDR1 由 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列组成；LCDR2 由 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列组成；和 LCDR3 由 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列组成；

任选地，HCDR2 中的连续氨基酸 DG 中的任一氨基酸 D 或 G 可以被取代，例如其中 D 可以被取代为 E 或 Q，和/或 G 被取代为 V，例如 HCDR2 由 SEQ ID NO:3、4 或 5 所示的氨基酸序列组成。

3、权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH，其中所述重链可变区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 12、13、14 或 15 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 12、13、14 或 15 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

和/或，其包含轻链可变区 VL，其中所述轻链可变区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

任选地，所述 VL 的框架区 FR3 中的连续氨基酸 NFS 中的任一氨基酸可以被取代，例如其中的 N 被取代为 Q 和/或其中的 S 被取代为 A；例如

所述轻链可变区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 17 或 18 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 17 或 18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

4、权利要求 1-3 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中

(i). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(iii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(iv). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(v). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(vi). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(vii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和

所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(viii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

5、权利要求 1-4 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中

(i). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(iii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(iv). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(v). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(vi). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(vii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(viii). 所述 VH 含有 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

6、权利要求 1-5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其还包含重链恒定区 HC，例如，所述抗体重链恒定区 HC 来自 IgG，例如人 IgG 的重链恒定区，例如为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区，优选的人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区；

任选地，所述重链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

任选地，所述重链恒定区包含来自 IgG 例如人 IgG 的 Fc 区，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区，优选人的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc，任选地，所述 Fc 区

(i) 包含与 SEQ ID NO:26 或 27 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含 SEQ ID NO:26 或 27 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

7、权利要求 1-6 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其还包含轻链恒定区，例如所述轻链恒定区为来自 lambda 或 kappa 轻链恒定区的轻链恒定区，例如为 lambda 或 kappa 轻链恒定区，例如人 lambda 或 kappa 轻链恒定区；

任选地，所述轻链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO:24 或 25 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含 SEQ ID NO:24 或 25 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

8、权利要求 1-7 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为人源化抗体或嵌合抗体；或者，所述抗体为单克隆抗体。

9、权利要求 1-8 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段为选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、$(Fab')_2$diabody 或线性抗体。

10、权利要求 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是双特异性抗体或多特异性抗体，其包含针对 DLL3 的第一结合特异性和针对一种或多种其他抗原的结合特异性；任选地，所述其他抗原为 CD3。

11、双特异性抗体，其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，

其中第一抗原结合区特异性结合 DLL3，且包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 包含如权利要求 1 或 2 所定义的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，且所述 VL 包含如权利要求 1 或 2 所定义的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

所述 VH 和 VL 为如权利要求 3-6 中任一项所定义的 VH 和 VL；且

第二抗原结合区特异性结合 CD3；

任选地，所述第一抗原结合区为权利要求 1-14 中任一项所定义的抗 DLL3 抗体的 Fab；和/或所述第二抗原结合区为特异性结合 CD3 的 Fab。

12、权利要求 11 所述的双特异性抗体，其中所述作为第一抗原结合区或第二抗原结合区的 Fab 包含 CH1，其中所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地是来自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，例如为人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1；

任选地，所述 CH1

(i) 包含与 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

13、权利要求 11 或 12 所述的双特异性抗体，其中所述作为第一抗原结合区或第二抗原结合区的 Fab 包含轻链恒定区，其中所述轻链恒定区为来自 lambda 或 kappa 轻链恒定区的轻链恒定区，例如为 lambda 或 kappa 轻链恒定区，例如人 lambda 或 kappa 轻链恒定区，任选地，所述第一抗原结合区和第二结合区包含相同或不同的轻链恒定区，例如，所述第一抗原结合区包含 Kappa 轻链恒定区且所述第二抗原结合区包含 Lambda 轻链恒定区；

任选地，所述 Kappa 轻链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

和/或

所述 Lambda 轻链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

14、权利要求 11-13 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体是包含 Fc 二聚体的 IgG 样双特异性抗体，其中构成所述 Fc 二聚体的两个 Fc 区，第一 Fc 区和第二 Fc 区相同或不同，任选地，所述 Fc 区分别为来自 IgG 例如人 IgG 的 Fc 区，例如为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区，优选的人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc，任选地，所述 Fc 区

(i) 包含与 SEQ ID NO:26 或 27 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含 SEQ ID NO:26 或 27 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

任选地，所述两个 Fc 区不同，其中基于 Innobody 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入突变，促进第一 Fc 区和第二 Fc 区的异二聚化; 例如其中一个 Fc 区的 CH3 包含 S364R 和 D399K 突变，且另一个 Fc 区的 CH3 突变包含 Y349T、K370S 和 K409D 突变;

任选地，其中所述第一和/或第二 Fc 区包含 L234A/L235A 突变;

例如，

a) 一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列或由其组成，且另一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列或由其组成;

b) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K，而另一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D; 或

c) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K 和 L234A/L235A 突变，而另一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D 和 L234A/L235A 突变。

15、权利要求 11-14 中任一项的双特异性抗体，其中所述第二抗原结合区包含: 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列或由其组成; HCDR2 包含 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由其组

成，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由其组成。

16、权利要求 15 的双特异性抗体，其中所述第二抗原结合区包含 VH 和 VL，其中 VH 包含 SEQ ID NO:31 所示的序列或由所述序列组成；和 VL 包含 SEQ ID NO:35 所示的序列或由所述序列组成。

17、权利要求 11-16 中任一项的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体包含特异性结合 DLL3 的第一抗原结合区和特异性结合 CD3 的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）；

任选地，所述双特异性抗体是 IgG 样抗体，其具有如图 3 所示的构型。

18、权利要求 16 或 17 所述的双特异性抗体，其包含作为特异性结合 DLL3 的第一抗原结合区的第一 Fab 和作为特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的第二 Fab，其中所述双特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

其中第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1 和第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区构成第一 Fab，且第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1 和第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区构成第二 Fab；

任选地，轻链 1 中的轻链恒定区和轻链 2 中的轻链恒定区不同，例如轻链 1 中的轻链恒定区是 Kappa 轻链恒定区且轻链 2 中的轻链恒定区是 Lambda 轻链恒定区。

19、权利要求 18 所述的双特异性抗体，其中

（i）重链 1 包含 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

（ii）重链 1 包含 SEQ ID NO:42 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，

或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

（iii）重链 1 包含 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；轻链 1 包含 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；重链 2 包含 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和轻链 2 包含 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

20、核酸分子，其包含编码权利要求 1-10 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的任一条链，或权利要求 11-19 中任一项所述的双特异性抗体中的任一条链的多核苷酸，或由所述多核苷酸组成。

21、表达载体，其包含权利要求 20 的核酸分子，优选地，所述表达载体为 pCDNA，例如 pCDNA3.1。

22、宿主细胞，其包含权利要求 20 所述的核酸分子或权利要求 21 所述的表达载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 Expi293 细胞。

23、制备权利要求 1-10 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 11-19 中任一项所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括，在适合所述抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体的多肽链表达的条件下，培养包含权利要求 20 所述的核酸分子或权利要求 21 所述的表达载体的宿主细胞，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体。

24、免疫缀合物，其包含权利要求 1-10 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 11-19 中任一项所述的双特异性抗体。

25、药物组合物或药物或制剂，其包含权利要求 1-10 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 11-19 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 24 所述的免疫缀合物，以及任选地药用辅料。

26、药物组合，其包含权利要求 1-10 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 11-19 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 24 所述的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂，优选地，所述治疗剂为用于治疗肿瘤的各种治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂）；

任选地，所述药物组合

包含权利要求 1-10 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 11-19 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 39 所述的免疫缀合物和其它抗体，优选地，所述其它抗体是抑制 PD-1/PD-L1 信号通路的抗体，如抗 PD-1 抗体；或者抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体；或者

包含权利要求 1-10 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段权利要求 11-19 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 39 所述的免疫缀合物和一种或多种化疗剂，例如铂类化疗药

物例如卡铂（Carboplatin）；或拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶II抑制剂，例如依托泊苷（Etoposide）或其组合；

优选地，所述药物组合包含权利要求1-10中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 11-19 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 39 所述的免疫缀合物和卡铂（Carboplatin）与依托泊苷（Etoposide）的组合。

27、在受试者中预防或治疗肿瘤的方法，包括向受试者施用有效量的权利要求1-10中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 11-19 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求24所述的免疫缀合物，或权利要求25所述的药物组合物或制剂，或权利要求26所述的药物组合；

任选地，所述肿瘤是实体肿瘤或血液肿瘤，例如 DLL3 阳性的肿瘤或癌症，任选地所述肿瘤为神经内分泌肿瘤（例如DLL3阳性的神经内分泌肿瘤），例如肺癌（例如DLL3阳性的肺癌），例如小细胞肺癌(small cell lung cancer; SCLC)。

28、权利要求27所述的方法，其中所述方法还包括与其它疗法例如治疗方式（例如手术或放疗）和/或其它治疗剂组合施用，优选地，所述治疗剂为用于治疗肿瘤的各种治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂）；

任选地，所述方法还包括与其它抗体组合施用，优选地，所述其它抗体是抑制PD-1/PD-L1信号通路的抗体，如抗PD-1抗体；或者抗PD-L1抗体或抗PD-L2抗体；或者

所述方法还包括与一种或多种化疗剂组合施用，其中所述化疗剂选自铂类化疗药物例如卡铂(Carboplatin)；或拓扑异构酶抑制剂，例如拓扑异构酶II抑制剂，例如依托泊苷(Etoposide)或其组合；或者

所述方法还包括与卡铂（Carboplatin）与依托泊苷（Etoposide）的组合施用。