(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114173875 B
(45)授权公告日 2025.04.15

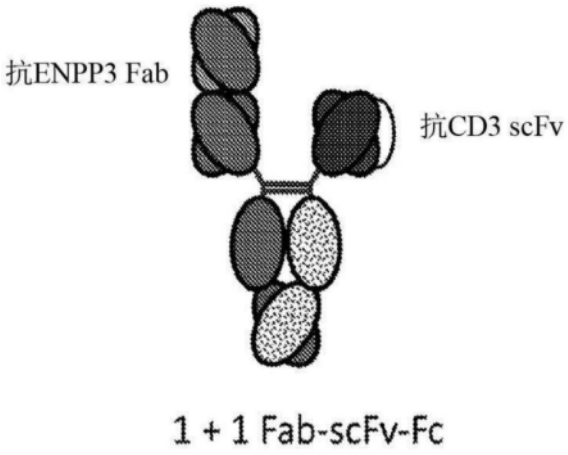
(21)申请号 202080032762.3
(22)申请日 2020.02.28
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114173875 A
(43)申请公布日 2022.03.11
(30)优先权数据
62/812,922 2019.03.01 US
62/929,687 2019.11.01 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.10.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/020493 2020.02.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/180726 EN 2020.09.10
(73)专利权人 XENCOR股份有限公司
地址 美国加利福尼亚
(72)发明人 R·拉施德 U·S·马奇哈拉
G·摩尔 A·尼萨尔 S·楚
S-H·李 Y·K·金
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 陈晓娜
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
C07K 16/00(2006.01)
(56)对比文件
JP 2008538182 A,2008.10.16
US 2009022663 A1,2009.01.22
审查员 王宗岳
权利要求书1页 说明书74页
序列表（电子公布） 附图114页

(54)发明名称

结合ENPP3和CD3的异二聚抗体

(57)摘要

本发明涉及包含新颖的抗原结合结构域的抗体,以及结合胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员3(ENPP3)的异二聚抗体。



CN 114173875 B

1.一种异二聚抗CD3x抗ENPP3抗体,所述异二聚抗CD3x抗ENPP3抗体包含:

a.第一单体,所述第一单体由SEQ ID NO:531组成;

b.第二单体,所述第二单体由SEQ ID NO:532组成;和

c.轻链,所述轻链由SEQ ID NO:533组成。

2.一种异二聚抗体,所述异二聚抗体包含:

a.由编码SEQ ID NO:531的核酸编码的第一单体;

b.由编码SEQ ID NO:532的核酸编码的第二单体;和

c.由编码SEQ ID NO:533的核酸编码的轻链。

3.一种核酸组合物,所述核酸组合物包含:

a.第一核酸,所述第一核酸编码根据权利要求1或权利要求2所述的第一单体;

b.第二核酸,所述第二核酸编码根据权利要求1或权利要求2所述的第二单体;和

c.第三核酸,所述第三核酸编码根据权利要求1或权利要求2所述的轻链。

4.一种表达载体组合物,所述表达载体组合物包含:

a.第一表达载体,所述第一表达载体包含根据权利要求3所述的第一核酸;

b.第二表达载体,所述第二表达载体包含根据权利要求3所述的第二核酸;和

c.第三表达载体,所述第三表达载体包含根据权利要求3所述的第三核酸。

5.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求4所述的表达载体组合物。

6.一种制备根据权利要求1或权利要求2所述的异二聚抗体的方法,所述方法包括在表达所述异二聚抗体的条件下培养根据权利要求5所述的宿主细胞,以及回收所述异二聚抗体。

结合ENPP3和CD3的异二聚抗体

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求于2019年3月1日提交的美国临时申请号62/812,922和2019年11月1日提交的美国临时申请号62/929,687的优先权,这些美国临时申请据此全文以引用方式并入。

背景技术

[0003] 基于抗体的治疗剂已经成功地用于治疗各种疾病,包含癌症。正在探索的日益普遍的途径是共接合两种不同抗原的单一免疫球蛋白分子的工程化。接合两种不同抗原的此类替代性抗体形式通常称为双特异性抗体。因为抗体可变区(Fv)的相当大的多样性使得可以产生识别几乎任何分子的Fv,所以产生双特异性抗体的典型方法是将新的可变区引入到抗体中。

[0004] 双特异性抗体的特别有用的方法是使接合CD3的第一结合结构域和接合与癌细胞相关或在癌细胞上上调的抗原的第二结合结构域工程化,使得双特异性抗体重定向$CD3^+$ T细胞以破坏癌细胞。先前已经报道,胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员3(ENPP3)在肾细胞癌中高表达,而在正常组织中最低地表达。有鉴于此,据信抗ENPP3抗体可用于例如将抗肿瘤治疗剂(例如,化学治疗剂和T细胞)定位至此类表达ENPP3的肿瘤。本文提供了能够将$CD3^+$效应T细胞定位至表达ENPP3的肿瘤的针对CD3和ENPP3的新颖双特异性抗体。

发明内容

[0005] 因此,本文提供了ENPP3抗原结合结构域和抗ENPP3抗体(例如,双特异性抗体)。

[0006] 在一个方面中,本文提供了一种组合物,所述组合物包含胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员3(ENPP3)结合结构域,所述ENPP3结合结构域包含以下ENPP3结合结构域中的任何ENPP3结合结构域的可变重链互补决定区1-3(vhCDR1-3)和可变轻链互补决定区(vlCDR1-3):AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。在一些实施方式中,所述vhCDR1-3和所述vlCDR1-3选自图12、图13A至图13B、和图14A至图14I中提供的ENPP3结合结构域的vhCDR1-3序列和vlCDR1-3序列。

[0007] 在另一方面中,本文提供了一种组合物,所述组合物包含胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员3(ENPP3)结合结构域,所述ENPP3结合结构域包含以下ENPP3结合结构域中的任何ENPP3结合结构域的可变重链结构域和可变轻链结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、

H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。

[0008] 在另一方面中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员3(ENPP3)结合结构域,所述ENPP3结合结构域选自以下ENPP3结合结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。

[0009] 在另一方面中,本发明提供了一种核酸组合物,所述核酸组合物包含:a)第一核酸,所述第一核酸编码可变重链结构域,所述可变重链结构域包含ENPP3结合结构域的可变重链互补决定区1-3(vhCDR1-3);以及b)第二核酸,所述第二核酸编码可变轻链结构域,所述可变轻链结构域包含ENPP3结合结构域的可变轻链互补决定区1-3(vlCDR1-3),其中所述ENPP3结合结构域是以下ENPP3结合结构域中的一种ENPP3结合结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。在一些实施方式中,所述vhCDR1-3和所述vlCDR1-3选自图12、图13A至图13B、和图14A至图14I中提供的vhCDR1-3序列和vlCDR1-3序列。

[0010] 在另一方面中,本发明提供了一种核酸组合物,所述核酸组合物包含:a)第一核酸,所述第一核酸编码可变重链结构域,所述可变重链结构域包含ENPP3结合结构域的可变重链结构域;以及b)第二核酸,所述第二核酸编码可变轻链结构域,所述可变轻链结构域包含ENPP3结合结构域的可变轻链结构域,其中所述ENPP3结合结构域是以下ENPP3结合结构域中的任何一种ENPP3结合结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。

[0011] 在一些实施方式中,本发明提供了一种表达载体组合物,所述表达载体组合物包含:a)第一表达载体,所述第一表达载体包含第一核酸;b)第二表达载体,所述第二表达载体包含第二核酸。在其它实施方式中,本发明提供了一种包含表达载体组合物的宿主细胞。

[0012] 在一些实施方式中,本发明提供了一种制备胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家

族成员3(ENPP3)结合结构域的方法,所述方法包括在表达ENPP3结合结构域的条件下培养宿主细胞,以及回收ENPP3结合结构域。

[0013] 在另一方面中,本发明提供了一种抗ENPP3抗体,所述抗ENPP3抗体包含胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员3(ENPP3)结合结构域,所述ENPP3结合结构域包含以下ENPP3结合结构域中的任何ENPP3结合结构域的可变重链互补决定区1-3(vhCDR1-3)和可变轻链互补决定区(vlCDR1-3):AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。在一些实施方式中,vhCDR1-3和vlCDR1-3选自图12、图13A至图13B、和图14A至图14I中的以下ENPP3结合结构域中的任何ENPP3结合结构域的vhCDR1-3和vlCDR1-3。

[0014] 在另一方面中,本发明提供了一种抗ENPP3抗体,所述抗ENPP3抗体包含胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员3(ENPP3)结合结构域,所述ENPP3结合结构域包含以下ENPP3结合结构域中的任何ENPP3结合结构域的可变重链结构域和可变轻链结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。

[0015] 在另一方面中,本文提供了一种抗ENPP3抗体,所述抗ENPP3抗体包含胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员3(ENPP3)结合结构域,所述ENPP3结合结构域选自以下ENPP3结合结构域中的任何一种ENPP3结合结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1(3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。

[0016] 在一些实施方式中,所述抗体包含:a)第一单体,所述第一单体包含第一抗原结合结构域和第一恒定结构域;以及b)第二单体,所述第二单体包含第二抗原结合结构域和第二恒定结构域,其中所述第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域中的任一者是ENPP3结合结构域。在其它实施方式中,所述第一抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域与不同的抗原结合。在其它实施方式中,所述第一抗原结合结构域是ENPP3结合结构域,并且所述第二抗原结合结构域是CD3结合结构域。在其它实施方式中,CD3结合结构域包含以下CD3结合结构域中的任何CD3结合结构域的vhCDR1-3和vlCDR1-3:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_

H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)。在其它实施方式中,所述CD3结合结构域的所述vhCDR1-3和所述vlCDR1-3选自图10A至图10F中的vhCDR1-3和vlCDR1-3。

[0017] 在一些实施方式中,所述CD3结合结构域包含以下CD3结合结构域中的任何CD3结合结构域的可变重链结构域和可变轻链结构域:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)。

[0018] 在一些实施方式中,CD3结合结构域是抗CD3 scFv。

[0019] 在一些实施方式中,其中所述第一恒定结构域和所述第二恒定结构域各自包含CH2-CH3。

[0020] 在一些实施方式中,所述第一恒定结构域和所述第二恒定结构域各自包含CH1-铰链-CH2-CH3。

[0021] 在一些实施方式中,所述第一恒定结构域和所述第二恒定结构域各自是变体恒定结构域。

[0022] 在一些实施方式中,第一单体和第二单体包括一组异二聚化变体,所述一组异二聚化变体是图1A至图1E中描绘的变体中的任何一种变体。在一些实施方式中,所述一组异二聚化变体包括以下一组变体中的一种变体:S364K/E357Q:L368D/K370S;S364K:L368D/K370S;S364K:L368E/K370S;D401K:T411E/K360E/Q362E;和T366W:T366S/L368A/Y407V。

[0023] 在一些实施方式中,所述第一单体和所述第二单体各自进一步包含消融变体。在其它实施方式中,所述消融变体是E233P/L234V/L235A/G236del/S267K。

[0024] 在一些实施方式中,所述第一单体或所述第二单体中的至少一个单体进一步包含pI变体。在一些实施方式中,所述pI变体是N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D。在一些实施方式中,所述scFv包含带电荷的scFv接头。

[0025] 在一些实施方式中,本发明提供了一种核酸组合物,所述核酸组合物包含编码抗ENPP3的核酸。在一些实施方式中,所述组合物包含编码第一单体和第二单体的核酸。在一些实施方式中,本发明提供了包括核酸的表达载体。在一些实施方式中,本发明提供了一种用表达载体转化的宿主细胞。

[0026] 在一些实施方式中,本发明提供了一种制备根据权利要求B1至B21中任一项所述的抗ENPP3抗体的方法。所述方法包括在表达抗ENPP3抗体的条件下培养根据权利要求B25所述的宿主细胞,以及回收所述抗ENPP3抗体。在一些实施方式中,本发明提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的患者施用抗体。

[0027] 在另一方面中,本发明提供了一种异二聚抗体,所述异二聚抗体包含:a)第一单体,所述第一单体包含:i)抗CD3scFv,所述抗CD3scFv包含第一可变轻链结构域、scFv接头和第一可变重链结构域;以及ii)第一Fc结构域,其中使用结构域接头将scFv共价附接至第一Fc结构域的N末端;b)第二单体,所述第二单体包含VH2-CH1-铰链-CH2-CH3单体,其中VH是第二可变重链结构域并且CH2-CH3是第二Fc结构域;以及c)轻链,所述轻链包含第二可变轻链结构域,其中所述第二可变重链结构域和所述第二可变轻链结构域形成ENPP3结合结构域。

[0028] 在一些实施方式中,ENPP3结合结构域包含以下ENPP3结合结构域的任何ENPP3结

合结构域的vhCDR1-3和vlCDR1-3:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。

[0029] 在一些实施方式中,ENPP3结合结构域的vhCDR1-3和vlCDR1-3选自图12、图13A至图13B、和图14A至图14I中提供的ENPP3结合结构域的vhCDR1-3序列和vlCDR1-3序列。

[0030] 在一些实施方式中,第二重链可变结构域包含重链可变结构域,并且第二轻链可变结构域包含以下ENPP3结合结构域中任何ENPP3结合结构域的可变轻链结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。

[0031] 在一些实施方式中,抗CD3 scFv包含以下CD3结合结构域中的任何CD3结合结构域的vhCDR1-3和vlCDR1-3:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)。

[0032] 在一些实施方式中,抗CD3 scFv的vhCDR1-3和vlCDR1-3选自图10A至图10F中的vhCDR1-3和vlCDR1-3。

[0033] 在一些实施方式中,所述抗CD3 scFv包含以下CD3结合结构域中的任何CD3结合结构域的可变重链结构域和可变轻链结构域:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)。

[0034] 在一些实施方式中,所述第一可变轻链结构域使用结构域接头共价附接至所述第一Fc结构域的N末端。

[0035] 在一些实施方式中,所述第一可变重链结构域使用结构域接头共价附接至所述第一Fc结构域的N末端。

[0036] 在一些实施方式中,所述scFv接头是带电荷的scFv接头。

[0037] 在一些实施方式中,第一Fc结构域和第二Fc结构域是变体Fc结构域。

[0038] 在一些实施方式中,第一单体和第二单体包括选自图1A至图1E中的异二聚化变体中的任何异二聚化变体的一组异二聚化变体。在一些实施方式中,所述一组异二聚化变体选自以下:S364K/E357Q:L368D/K370S;S364K:L368D/K370S;S364K:L368E/K370S;D401K:T411E/K360E/Q362E;和T366W:T366S/L368A/Y407V,其中所述编号是根据EU编号进行的。

[0039] 在一些实施方式中,所述第一单体和所述第二单体进一步包含消融变体。在一些实施方式中,所述消融变体是E233P/L234V/L235A/G236del/S267K,其中所述编号是根据EU

编号进行的。

[0040] 在一些实施方式中,第一单体或第二单体中的一者包括pI变体。

[0041] 在一些实施方式中,所述pI变体是N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D,其中所述编号是根据EU编号进行的。

[0042] 在一些实施方式中,第一单体包含氨基酸变体S364K/E357Q/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K,其中第二单体包含氨基酸变体L368D/K370S/N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K,并且其中编号是根据EU编号进行的。

[0043] 在一些实施方式中,所述scFv接头是具有氨基酸序列$(GKPGS)_4$的带电荷scFv接头。

[0044] 在一些实施方式中,第一单体和第二单体各自进一步包括氨基酸变体428/434S。

[0045] 在一些实施方式中,异二聚抗体包含以下异二聚抗体:XENP24804、XENP26820、XENP28287、XENP28925、XENP29516、XENP30262、XENP26821、XENP29436、XENP28390、XENP29463、和XENP30263。

[0046] 在另一方面中,本发明提供了一种异二聚抗体,所述异二聚抗体包含:a)第一单体,所述第一单体从N末端到C末端包含scFv-接头-CH2-CH3,其中scFv是抗CD3 scFV并且CH2-CH3是第一Fc结构域;b)第二单体,所述第二单体从N末端到C末端包含VH-CH1-铰链-CH2-CH3,其中CH2-CH3是第二Fc结构域;以及c)轻链,所述轻链包含VL-CL;其中所述第一变体Fc结构域包含氨基酸变体S364K/E357Q,其中所述第二变体Fc结构域包含氨基酸变体L368D/K370S,其中所述第一变体Fc结构域和第二变体Fc结构域各自包含氨基酸变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K,其中第二单体的铰链-CH2-CH3包含氨基酸变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D,其中VH和VL形成ENPP3结合结构域,所述ENPP3结合结构域包含选自以下的ENPP3结合结构域的分别可变重链结构域和可变轻链结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I),其中抗CD3 scFv包含选自以下的CD3结合结构域的可变重链结构域和可变轻链结构域:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F),并且其中编号是根据EU编号进行的。

[0047] 在一些实施方式中,所述scFv包含具有氨基酸序列$(GKPGS)_4$的带电荷scFv接头。

[0048] 在一些实施方式中,所述第一变体Fc结构域和所述第二变体Fc结构域各自进一步包含氨基酸变体428/434S,其中编号是根据EU编号进行的。

[0049] 在一些实施方式中,本发明提供了一种核酸组合物,所述核酸组合物包含编码抗体的第一单体和第二单体以及轻链的核酸。

[0050] 在一些实施方式中,本发明提供了一种表达载体,所述表达载体包含核酸。在一些实施方式中,本发明提供了一种用表达载体转化的宿主细胞。

[0051] 在一些实施方式中,本发明提供了一种治疗ENPP3相关癌症的方法,所述方法包括向有需要的患者施用本文提供的抗体中的任何一种抗体。

[0052] 在另一方面中,本发明提供了一种异二聚抗体,所述异二聚抗体包含:a)第一单体,所述第一单体从N末端到C末端包含VH1-CH1-接头1-scFv-接头2-CH2-CH3,其中VH1是第一可变重链结构域,scFv是抗CD3 scFV,接头1和接头2分别是第一结构域接头和第二结构域接头,并且CH2-CH3是第一Fc结构域;b)第二单体,所述第二单体从N末端到C末端包含VH2-CH1-铰链-CH2-CH3,其中VH2是第二可变重链结构域并且CH2-CH3是第二Fc结构域;以及c)共同轻链,所述共同轻链包含可变轻链结构域;其中所述第一可变重链结构域和所述可变轻链结构域形成第一ENPP3结合结构域,并且第二可变重链结构域和可变轻链结构域形成第二ENPP3结合结构域。

[0053] 在一些实施方式中,第一ENPP3结合结构域和第二ENPP3结合结构域各自包含以下ENPP3结合结构域的任何ENPP3结合结构域的vhCDR1-3和vlCDR1-3:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。

[0054] 在一些实施方式中,所述第一ENPP3结合结构域和第二ENPP3结合结构域的vhCDR1-3和vlCDR1-3选自图14和图45中提供的vhCDR1-3和vlCDR1-3。

[0055] 在一些实施方式中,第一可变重链结构域和第二可变重链结构域各自包含ENPP3结合结构域的可变重链结构域,并且第一可变轻链结构域和第二可变轻链结构域各自包含ENPP3结合结构域的可变轻链结构域,其中ENPP3结合结构域是以下ENPP3结合结构域中的任何ENPP3结合结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。

[0056] 在一些实施方式中,scFv包含以下CD3结合结构域中的任何CD3结合结构域的vhCDR1-3和vlCDR1-3:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)。

[0057] 在一些实施方式中,scFv的vhCDR1-3和vlCDR1-3选自图10A至图10F中的vhCDR1-3和vlCDR1-3。

[0058] 在一些实施方式中,所述scFv包含以下CD3结合结构域中的任何CD3结合结构域的可变重链结构域和可变轻链结构域:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)。

[0059] 在一些实施方式中,所述scFv包含scFv可变重链结构域、scFv可变轻链结构域,以及连接所述scFv可变重链结构域和所述scFv可变轻链结构域的scFv接头。

[0060] 在一些实施方式中,所述scFv可变重链结构域使用所述第一结构域接头附接至所述第一单体的所述CH1的C末端,并且所述scFv可变轻链结构域使用所述第二结构域接头共价附接至所述第一Fc结构域的N末端。

[0061] 在一些实施方式中,所述scFv可变轻链结构域使用所述第一结构域接头附接至所述第一单体的所述CH1的C末端,并且所述scFv可变重链结构域使用所述第二结构域接头共价附接至所述第一Fc结构域的N末端。

[0062] 在一些实施方式中,所述scFv接头是带电荷的scFv接头。

[0063] 在一些实施方式中,第一Fc结构域和第二Fc结构域是变体Fc结构域。

[0064] 在一些实施方式中,所述第一单体和所述第二单体包含选自由图1A至图1E中所描绘的异二聚化变体的一组异二聚化变体。

[0065] 在一些实施方式中,所述一组异二聚化变体选自以下:S364K/E357Q:L368D/K370S;S364K:L368D/K370S;S364K:L368E/K370S;D401K:T411E/K360E/Q362E;和T366W:T366S/L368A/Y407V,其中所述编号是根据EU编号进行的。

[0066] 在一些实施方式中,所述第一单体和所述第二单体进一步包含消融变体。

[0067] 在一些实施方式中,所述消融变体是E233P/L234V/L235A/G236del/S267K,其中所述编号是根据EU编号进行的。

[0068] 在一些实施方式中,所述第一单体或所述第二单体中的一者进一步包含pI变体。

[0069] 在一些实施方式中,所述pI变体是N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D,其中所述编号是根据EU编号进行的。

[0070] 在一些实施方式中,第一变体Fc结构域包含氨基酸变体S364K/E357Q/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K,其中第二变体Fc结构域包含氨基酸变体L368D/K370S/N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K,其中编号是根据EU编号进行的。

[0071] 在一些实施方式中,所述scFv接头是具有氨基酸序列$(GKPGS)_4$的带电荷scFv接头。

[0072] 在一些实施方式中,所述第一变体Fc结构域和所述第二变体Fc结构域各自进一步包含氨基酸变体428/434S,其中编号是根据EU编号进行的。

[0073] 在一些实施方式中,异二聚抗体包括以下异二聚抗体:XENP29437、XENP29520、XENP30264、XENP26822、XENP28438、XENP29438、XENP29467、XENP30469、XENP30470、XENP30819、XENP30821、XENP31148、XENP31149、XENP31150、XENP31419、和XENP31471。

[0074] 在另一方面中,所述异二聚抗体包含:a)第一单体,所述第一单体从N末端到C末端包含VH1-CH1-接头1-scFv-接头2-CH2-CH3,其中scFv是抗CD3 scFV并且CH2-CH3是第一Fc结构域;b)第二单体,所述第二单体从N末端到C末端包含VH1-CH1-铰链-CH2-CH3,其中CH2-CH3是第二Fc结构域;以及c)共用轻链,所述共用轻链包含VL-CL;其中所述第一变体Fc结构域包含氨基酸变体S364K/E357Q,其中所述第二变体Fc结构域包含氨基酸变体L368D/K370S,其中所述第一变体Fc结构域和第二变体Fc结构域各自包含氨基酸变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K,其中第二单体的铰链-CH2-CH3包含氨基酸变体N208D/

Q295E/N384D/Q418E/N421D,其中所述VH和VL包含选自以下的ENPP3结合结构域的可变重链结构域和可变轻链结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I),其中抗CD3 scFv包含选自以下的CD3结合结构域的可变重链结构域和可变轻链结构域:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F),并且其中编号是根据EU编号进行的。

[0075] 在一些实施方式中,所述scFv包含具有氨基酸序列$(GKPGS)_4$的带电荷scFv接头。

[0076] 在一些实施方式中,第一变体Fc结构域和第二变体Fc结构域各自进一步包含氨基酸变体428/434S。

[0077] 在一些实施方式中,第一单体和第二单体以及抗体的共同轻链。在一些实施方式中,本发明提供了一种表达载体,所述表达载体包含核酸。在一些实施方式中,本发明提供了一种用表达载体转化的宿主细胞。在一些实施方式中,本发明提供了治疗ENPP3相关癌症的方法,所述方法包括向有需要的患者施用抗体。

[0078] 在另一方面中,本发明提供了一种异二聚抗体,所述异二聚抗体包括以下异二聚抗体:XENP24804、XENP26820、XENP28287、XENP28925、XENP29516、XENP30262、XENP26821、XENP29436、XENP28390、XENP29463、和XENP30263。

[0079] 在另一个方面中,本发明提供了一种异二聚抗体,所述异二聚抗体包括下列异二聚抗体:XENP29437、XENP29520、XENP30264、XENP26822、XENP28438、XENP29438、XENP29467、XENP30469、XENP30470、XENP30819、XENP30821、XENP31148、XENP31149、XENP31150、XENP31419、和XENP31471。在一些实施方式中,本发明提供了包含编码异二聚抗体的核酸的核酸组合物。在一些实施方式中,本发明提供了一种表达载体,所述表达载体包含核酸。在一些实施方式中,本发明提供了一种用表达载体转化的宿主细胞。

[0080] 在一些实施方式中,本发明方法提供了一种治疗ENPP3相关癌症的方法,所述方法包括向有需要的患者施用本文提供的异二聚抗体中的任何一种异二聚抗体。

附图说明

[0081] 图1A至图1E描绘了Fc异二聚化变体组的有用对(包括偏斜变体和pI变体)。有些变体没有对应的“单体2”变体;这些变体是可以单独用于任一单体上的pI变体。

[0082] 图2描绘同配变体抗体恒定区和其相应的取代的列表。pI_(-)表示较低的pI变体,而pI_(+)表示较高的pI变体。这些可以任选地且独立地与本文所述的抗体的其它异二聚化变体(以及其它变体类型,如本文所概述)组合。

[0083] 图3描绘有用的消融变体,所述有用的消融变体消融Fc γ R结合(有时被称为“敲除”或“KO”变体)。通常,在两种单体上都发现了消融变体,尽管在一些情况下其可能仅在一种单体上。

[0084] 图4描绘了本文所述抗体的“非Fv”组分的特别有用的实施方式。

[0085] 图5描绘了用于增大或减小利用一个或多个scFv作为组分的本发明异源二聚bsAb的pI的如本文所述的多个带电荷的scFv接头。(+H)阳性接头在本文中特别适用,尤其是与本文所示的抗CD3 V_L和V_H序列一起使用。根据Whitlow等人,《蛋白质工程(Protein Engineering)》6(8):989-995 (1993),具有单个电荷的单个现有技术scFv接头被称为“Whitlow”。应注意的是,这种接头用于减少scFv中的聚集和增强scFv中的蛋白水解稳定性。此类带电荷的scFv接头可以用于本文公开的本发明抗体形式中的任何本发明抗体形式中,所述本发明抗体形式包含scFv(例如,1+1 Fab-scFv-Fc形式和2+1 Fab_2-scFv-Fc形式)。

[0086] 图6描绘了许多示例性结构域接头。在一些实施方式中,这些接头用于将单链Fv连接到Fc链。在一些实施方式中,这些接头可以组合。例如,GGGGS接头可以与“半铰链”接头组合。

[0087] 图7A至图7D描绘了基于人IgG1的若干有用的1+1 Fab-scFv-Fc双特异性抗体形式重链主链的序列,没有Fv序列(例如,Fab侧的scFv和VH)。主链1基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包括S364K/E357Q:L368D/K370S偏斜变体、具有S364K/E357Q偏斜变体的链上的C220S、具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。主链2基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包括S364K:L368D/K370S偏斜变体、具有S364K偏斜变体的链上的C220S、具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。主链3基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包括S364K:L368E/K370S偏斜变体、具有S364K偏斜变体的链上的C220S、具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。主链4基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包括D401K:K360E/Q362E/T411E偏斜变体、具有D401K偏斜变体的链上的C220S、具有K360E/Q362E/T411E偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。主链5基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包括S364K/E357Q:L368D/K370S偏斜变体、具有S364K/E357Q偏斜变体的链上的C220S、具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。主链6基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包含S364K/E357Q:L368D/K370S偏斜变体、具有S364K/E357Q偏斜变体的链上的C220S、具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、和两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体,以及两条链上的N297A变体。除了突变是N297S之外,主链7与主链6相同。主链8基于人IgG4,并且包括S364K/E357Q:L368D/K370S偏斜变体、具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、以及两条链上的S228P(EU编号,这是Kabat中的S241P)变体,所述变体消融如本领域已知的Fab臂交换。主链9基于人IgG2,并且包括S364K/E357Q:L368D/K370S偏斜变体、具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体。主链10基于人IgG2,并且包括S364K/E357Q:L368D/K370S偏斜变体、具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、以及两条链上的S267K变体。除了主链11

包含M428L/N434S Xtend突变之外,主链11与主链1相同。主链12基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包含S364K/E357Q:L368D/K370S偏斜变体、具有S364K/E357Q偏斜变体的链上的C220S和P217R/P229R/N276K pI变体,以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。在这些主链的每一条主链内包括与所列举的序列90%、95%、98%和99%同一(如本文所定义)和/或含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个额外的氨基酸取代的序列(与图的"亲本"相比,如所属领域技术人员将理解,与亲本人IgG1(或IgG2或IgG4,这取决于主链)相比,其已含有多个氨基酸修饰)。即,除了此图的主链中所含的偏斜变体、pI变体和消融变体之外,所列举主链可以含有另外的氨基酸修饰(通常是氨基酸取代)。

[0088] 图8A至图8C描绘了基于人IgG1的若干有用的2+1 Fab_2-scFv-Fc双特异性抗体形式重链主链的序列,没有Fv序列(例如,Fab侧的scFv和VH)。主链1基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包含S364K/E357Q:L368D/K370S偏斜变体、具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。主链2基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包含S364K:L368D/K370S偏斜变体、具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。主链3基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包含S364K:L368E/K370S偏斜变体、具有L368E/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。主链4基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包含D401K:K360E/Q362E/T411E偏斜变体、具有K360E/Q362E/T411E偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。主链5基于人IgG1(356D/358L同种异型),并且包含S364K/E357Q:L368D/K370S偏斜变体、在具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体,以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。主链6基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包含S364K/E357Q:L368D/K370S偏斜变体、具有L368D/K370S偏斜变体的链上的N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D pI变体、和两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体,以及两条链上的N297A变体。除了突变是N297S之外,主链7与主链6相同。除了主链8包含M428L/N434S Xtend突变之外,主链8与主链1相同。主链9基于人IgG1(356E/358M同种异型),并且包含S364K/E357Q:L368D/K370S偏斜变体、具有S364K/E357Q偏斜变体的链上的P217R/P229R/N276K pI变体、以及两条链上的E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体。在这些主链的每一条主链内包括与所列举的序列90%、95%、98%和99%同一(如本文所定义)和/或含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个额外的氨基酸取代的序列(与图的"亲本"相比,如所属领域技术人员将理解,与亲本人IgG1(或IgG2或IgG4,这取决于主链)相比,其已含有多个氨基酸修饰)。即,除了此图的主链中所含的偏斜变体、pI变体和消融变体之外,所列举主链可以含有另外的氨基酸修饰(通常是氨基酸取代)。

[0089] 图9描绘了基于人IgG1的几个有用的恒定轻链结构域主链的序列,没有Fv序列(例如scFv或Fab)。本文包含的恒定轻主链序列与所列举的序列是90%、95%、98%和99%同一的(如本文所定义),和/或含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个额外的氨基酸修饰。

[0090] 图10A至图10F描绘了适合用于本文所述的双特异性抗体中的示例性抗CD3 scFv的序列。CDR加下划线,scFv接头加双下划线(在序列中,scFv接头是带正电的scFv

$(GKPGS)_4$接头(SEQ ID NO: XXX),但是如本领域的技术人员将理解的,这个接头可以被其它接头代替,包含不带电接头或带负电的接头,其中一些描绘在图5中),并且斜线指示可变结构域的一个或多个边界。另外,命名约定展示了scFv从N末端到C末端的朝向。如本文中所指出并且对本文中含有CDR的每一序列而言确实如此,如表2中所示,取决于所使用的编号,CDR位置的精确标识可能略微不同,并且因此本文中不仅包括带下划线的CDR并且还包括使用其它编号系统的VH和VL结构域内所包括的CDR。此外,对于图中的所有序列,这些V_H和V_L序列可以以scFv形式或Fab形式使用。

[0091] 图11A至图11B描绘了本文所述的抗体中使用的多种抗原的抗原序列(包括人类和食蟹猴两者),以辅助开发易于临床开发的结合到两者的抗原结合结构域。

[0092] 图12描绘了在本文中称作AN1的例示性人源化ENPP3结合结构域的可变重链序列和可变轻链序列,以及XENP28278(一种基于具有E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体的AN1和IgG1主链的抗ENPP3 mAb)的序列。CDR加有下划线,并且斜线指示可变区与恒定结构域之间的边界。如本文中所指出并且对本文中含有CDR的每一序列而言确实如此,如表2中所示,取决于所使用的编号,CDR位置的精确标识可能略微不同,并且因此本文中不仅包括带下划线的CDR并且还包括使用其它编号系统的VH和VL结构域内所包括的CDR。此外,对于图中的所有序列,这些V_H和V_L序列可以以scFv形式或Fab形式使用。

[0093] 图13A至图13B描绘了经工程化以实现改进的纯化和/或ENPP3结合亲和力和/或效力的调节的AN1变体的可变重链序列和可变轻链序列。CDR加有下划线,并且斜线指示可变区与恒定结构域之间的边界。如本文所提及且对含有CDR每一序列而言确实如此,取决于所使用的编号方法(如图12中所示),CDR位置的精确标识可能略微不同,且因此本文中不仅包括带下划线的CDR且还包括使用其它编号系统的VH和VL结构域内所包括的CDR。进一步,如对于附图中的所有序列,这些V_H和V_L序列可以scFv形式或Fab形式使用。此外,本文描绘的可变重链结构域中的每个可变重链结构域可以与任何其它αENPP3可变轻链结构域配对;并且本文描绘的可变轻链结构域中的每个可变轻链结构域可以与任何其它αENPP3可变重链结构域配对。

[0094] 图14A至图14I描绘了可用于αENPP3xαCD3抗体的附加ENPP3抗原结合结构域的可变区。CDR加有下划线。如本文所提及且对含有CDR每一序列而言确实如此,取决于所使用的编号方法(如图12中所示),CDR位置的精确标识可能略微不同,且因此本文中不仅包括带下划线的CDR且还包括使用其它编号系统的VH和VL结构域内所包括的CDR。此外,对于图中的所有序列,这些V_H和V_L序列可以以scFv形式或Fab形式使用。

[0095] 图15A至图15B描绘了本文所述抗体的几种形式。图15A描绘了“1+1 Fab-scFv-Fc”形式,其中第一臂包含ENPP3结合Fab,并且第二臂包含CD3结合scFv。图30B描绘了“2+1 Fab_2-scFv-Fc”形式,其中第一臂包含ENPP3结合Fab,并且第二臂包含Fab和scFv,其中Fab结合ENPP3并且scFv结合CD3。

[0096] 图16描绘了开瓶器形式的对照抗RSVx抗CD3双特异性抗体(Fab-scFv-Fc)的氨基酸序列。首先使用Fab可变区命名抗体,并且其次使用scFv可变区命名抗体,用虚线分开。CDR加有下划线,并且斜线指示可变区的边界。scFv结构域具有V_H-scFv接头-V_L的取向(N末端到C末端),但是这可以颠倒。另外,本文概述的每个序列均可以包含或不包含一个或优选地两个Fc结构域中的M428L/N434S变体,这产生了较长的血清半衰期。

[0097] 图17A至图17C描绘了为1+1 Fab-scFv-Fc形式并且包含H1.30_L1.47抗CD3 scFv(又称为CD3 高[VHVL])的说明性αENPP3 x αCD3 bsAb的序列。CDR加有下划线,并且斜线指示可变区与其它链组件(例如恒定区和结构域接头)之间的边界。应当注意的是,αENPP3 x αCD3 bsAb可以利用90%、95%、98%和99%同一(如本文所定义)和/或包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸取代的可变区、Fc区和恒定结构域序列。另外,本文概述的每个序列均可以包含或不包含一个或优选地两个Fc结构域中的M428L/N434S变体,这产生了较长的血清半衰期。

[0098] 图18A至图18C描绘了为1+1 Fab-scFv-Fc形式并且包含H1.32_L1.47抗CD3 scFv(又称为CD3高-Int编号1[VHVL])的说明性αENPP3 x αCD3 bsAb的序列。CDR加有下划线,并且斜线指示可变区与其它链组件(例如恒定区和结构域接头)之间的边界。应当注意的是,αENPP3 x αCD3 bsAb可以利用90%、95%、98%和99%同一(如本文所定义)和/或包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸取代的可变区、Fc区和恒定结构域序列。另外,本文概述的每个序列均可以包含或不包含一个或优选地两个Fc结构域中的M428L/N434S变体,这产生了较长的血清半衰期。

[0099] 图19A至图19C描绘了为2+1 Fab_2-scFv-Fc形式并且包含H1.30_L1.47抗CD3 scFv(又称为CD3高[VHVL])的说明性αENPP3 x αCD3 bsAb的序列。CDR加有下划线,并且斜线指示可变区与其它链组件(例如恒定区和结构域接头)之间的边界。应当注意的是,αENPP3 x αCD3 bsAb可以利用90%、95%、98%和99%同一(如本文所定义)和/或包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸取代的可变区、Fc区和恒定结构域序列。另外,本文概述的每个序列均可以包含或不包含一个或优选地两个Fc结构域中的M428L/N434S变体,这产生了较长的血清半衰期。

[0100] 图20A至图20D描绘了为2+1 Fab_2-scFv-Fc形式并且包含H1.32_L1.47抗CD3 scFv(又称为CD3高-Int编号1[VHVL])的说明性αENPP3 x αCD3 bsAb的序列。CDR加有下划线,并且斜线指示可变区与其它链组件(例如恒定区和结构域接头)之间的边界。应当注意的是,αENPP3 x αCD3 bsAb可以利用90%、95%、98%和99%同一(如本文所定义)和/或包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸取代的可变区、Fc区和恒定结构域序列。另外,本文概述的每个序列均可以包含或不包含一个或优选地两个Fc结构域中的M428L/N434S变体,这产生了较长的血清半衰期。

[0101] 图21描绘了为2+1 Fab_2-scFv-Fc形式并且包含L1.47_H1.30抗CD3 scFv(又称为CD3高[VLVH])的说明性αENPP3 x αCD3 bsAb的序列。CDR加有下划线,并且斜线指示可变区与其它链组件(例如恒定区和结构域接头)之间的边界。应当注意的是,αENPP3 x αCD3 bsAb可以利用90%、95%、98%和99%同一(如本文所定义)和/或包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸取代的可变区、Fc区和恒定结构域序列。另外,本文概述的每个序列均可以包含或不包含一个或优选地两个Fc结构域中的M428L/N434S变体,这产生了较长的血清半衰期。

[0102] 图22A至图22C描绘了为2+1 Fab_2-scFv-Fc形式并且包含L1.47_H1.32抗CD3 scFv(又称为CD3高-Int编号1[VHVL])的说明性αENPP3 x αCD3 bsAb的序列。CDR加有下划线,并且斜线指示可变区与其它链组件(例如恒定区和结构域接头)之间的边界。应当注意的是,αENPP3 x αCD3 bsAb可以利用90%、95%、98%和99%同一(如本文所定义)和/或包含1个、2个、3

个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸取代的可变区、Fc区和恒定结构域序列。另外，本文概述的每个序列均可以包含或不包含一个或优选地两个Fc结构域中的M428L/N434S变体，这产生了较长的血清半衰期。

[0103] 图23A至图23E描绘了为2+1 Fab_2-scFv-Fc形式并且包含L1.47_H1.89抗CD3 scFv(又称为CD3高-Int编号2[VLVH])的说明性αENPP3 x αCD3 bsAb的序列。CDR加有下划线，并且斜线指示可变区与其它链组件(例如恒定区和结构域接头)之间的边界。应当注意的是，αENPP3 x αCD3 bsAb可以利用90%、95%、98%和99%同一(如本文所定义)和/或包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸取代的可变区、Fc区和恒定结构域序列。另外，本文概述的每个序列均可以包含或不包含一个或优选地两个Fc结构域中的M428L/N434S变体，这产生了较长的血清半衰期。

[0104] 图24A至图24B描绘了CFSE标记的KU812细胞上的RTCC诱导，A)如由$CFSE^+$ KU812细胞数量减少所指示并且B)如由在CFSE标记的KU812与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体(XENP26820、XENP26821、XENP28287和XENP28390)一起孵育24小时后用Zombie Aqua染色的$CFSE^+$ KU812细胞的百分比所指示的。使用的对照是αRSV x αCD3双特异性抗体(XENP13245)、仅效应细胞和靶细胞、以及仅靶细胞。总的来说，数据显示原型αENPP3 x αCD3 bsAb剂量依赖性地诱导KU812 细胞上的重定向T细胞细胞毒性(RTCC)；CD3结合亲和力与RTCC效力相关(即具有CD3高的bsAb比具有CD3高-Int编号1的bsAb更有效地诱导RTCC)；并且具有AN1结合结构域的bsAb比具有H16-7.8结合结构域的bsAb更有效地诱导RTCC。

[0105] 图25A至图25C描绘了活化$CD4^+$ T细胞，如由以下所指示的：A)$CD4^+$ T细胞上的CD107a MFI，B)$CD4^+$ T细胞上的CD25 MFI，和C)在CFSE标记的KU812与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3 双特异性抗体(XENP26820、XENP26821、XENP28287和XENP28390)一起孵育24小时后$CD4^+$ T细胞上的CD69 MFI。使用的对照是αRSV x αCD3双特异性抗体(XENP13245)、仅效应细胞和靶细胞、以及仅靶细胞。与RTCC数据一致，αENPP3 x αCD3 bsAb剂量依赖性地诱导$CD4^+$ T细胞的活化；CD3结合亲和力与活化效力相关(即具有CD3高的bsAb比具有CD3高-Int编号1的bsAb更有效地诱导$CD4^+$ T细胞活化)；并且具有AN1结合结构域的bsAb比具有H16-7.8结合结构域的bsAb更有效地诱导$CD4^+$ T细胞活化。

[0106] 图26A至图26C描绘了活化$CD8^+$ T细胞，如由以下所指示的：A)$CD8^+$ T细胞上的CD107a MFI，B)$CD8^+$ T细胞上的CD25 MFI，和C)在CFSE标记的KU812与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3 双特异性抗体(XENP26820、XENP26821、XENP28287和XENP28390)一起孵育24小时后$CD8^+$ T细胞上的CD69 MFI。使用的对照是αRSV x αCD3双特异性抗体(XENP13245)、仅效应细胞和靶细胞、以及仅靶细胞。与RTCC数据一致，αENPP3 x αCD3 bsAb剂量依赖性地诱导$CD8^+$ T细胞的活化；CD3结合亲和力与活化效力相关(即具有CD3高的bsAb比具有CD3高-Int编号1的bsAb更有效地诱导$CD8^+$ T细胞活化)；并且具有AN1结合结构域的bsAb比具有H16-7.8结合结构域的bsAb更有效地诱导$CD8^+$ T细胞活化。

[0107] 图27A至图27B描绘了CFSE标记的RXF393细胞上的RTCC诱导，A)如由$CFSE^+$ RXF393细胞数量减少所指示并且B)如由在CFSE标记的RXF393与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为20:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体(XENP26820、XENP26821、XENP28287和XENP28390)一起孵育24小时后用Zombie Aqua染色的$CFSE^+$ RXF393细胞的百分比所指示的。使用的对

照是αRSV x αCD3双特异性抗体(XENP13245)、仅效应细胞和靶细胞、以及仅靶细胞。与KU812细胞的数据一致,数据显示原型αENPP3 x αCD3 bsAb剂量依赖性地诱导RXF393细胞上的重定向T细胞细胞毒性(RTCC);CD3结合亲和力与RTCC效力相关(即具有CD3高的bsAb比具有CD3高-Int编号1的bsAb更有效地诱导RTCC);并且具有AN1结合结构域的bsAb比具有H16-7.8结合结构域的bsAb更有效地诱导RTCC。

[0108] 图28A至图28C描绘了活化$CD4^+$ T细胞,如由以下所指示的:A)$CD4^+$ T细胞上的CD107a MFI,B)$CD4^+$ T细胞上的CD25 MFI,和C)在CFSE标记的RXF393与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为20:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体(XENP26820、XENP26821、XENP28287和XENP28390)一起孵育24小时后$CD4^+$ T细胞上的CD69 MFI。使用的对照是αRSV x αCD3双特异性抗体(XENP13245)、仅效应细胞和靶细胞、以及仅靶细胞。与RTCC数据一致,αENPP3 x αCD3 bsAb剂量依赖性地诱导$CD4^+$ T细胞的活化;CD3结合亲和力与活化效力相关(即具有CD3高的bsAb比具有CD3高-Int编号1的bsAb更有效地诱导$CD4^+$ T细胞活化);并且具有AN1结合结构域的bsAb比具有H16-7.8结合结构域的bsAb更有效地诱导$CD4^+$ T细胞活化。

[0109] 图29A至图29C描绘了活化$CD8^+$ T细胞,如由以下所指示的:A)$CD8^+$ T细胞上的CD107a MFI,B)$CD8^+$ T细胞上的CD25 MFI,和C)在CFSE标记的RXF393与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为20:1)和αENPP3 x αCD3 双特异性抗体(XENP26820、XENP26821、XENP28287和XENP28390)一起孵育24小时后$CD8^+$ T细胞上的CD69 MFI。使用的对照是αRSV x αCD3双特异性抗体(XENP13245)、仅效应细胞和靶细胞、以及仅靶细胞。与RTCC数据一致,αENPP3 x αCD3 bsAb剂量依赖性地诱导$CD8^+$ T细胞的活化;CD3结合亲和力与活化效力相关(即具有CD3高的bsAb比具有CD3高-Int编号1的bsAb更有效地诱导$CD8^+$ T细胞活化);并且具有AN1结合结构域的bsAb比具有H16-7.8结合结构域的bsAb更有效地诱导$CD8^+$ T细胞活化。

[0110] 图30描绘了A)色谱图,所述色谱图展示了XENP28287的纯化部分2(在蛋白A色谱法之后的阳离子交换色谱法),以及如图30A中所描绘的从阳离子交换分离中分离出的峰B和BC(以及预纯化的材料)的纯度和同质性,如通过B)利用多角度光散射的分析型尺寸排阻色谱法(aSEC-MALS)和C)分析型阳离子交换色谱法(aCIEX)测定的。图30B还描绘了如通过多角度光散射测定的峰中的蛋白质物种的分子量。

[0111] 图31描绘了A)色谱图,所述色谱图展示了XENP28925的纯化部分2(在蛋白A色谱法之后的阳离子交换色谱法),以及如图31A中所描绘的从阳离子交换分离中分离出的峰B(以及预纯化的材料)的纯度和同质性,如通过B)利用多角度光散射的分析型尺寸排阻色谱法(aSEC-MALS)和C)分析型阳离子交换色谱法(aCIEX)测定的。图31B还描绘了如通过多角度光散射测定的峰中的蛋白质物种的分子量。

[0112] 图32描绘了A)色谱图,所述色谱图展示了XENP31149的纯化部分2(在蛋白A色谱法之后的阳离子交换色谱法),以及B)如图XA中所描绘的从阳离子交换分离中分离出的峰A和B(以及预纯化的材料)的身份,如通过利用多角度光散射的分析型尺寸排阻色谱法(aSEC-MALS)测定的。

[0113] 图33描绘了A)色谱图,所述色谱图展示了XENP31419的纯化部分2(在蛋白A色谱法之后的阳离子交换色谱法),以及B)如图XA中所描绘的从阳离子交换分离中分离出的峰A和B(以及预纯化的材料)的身份,如通过利用多角度光散射的分析型尺寸排阻色谱法(aSEC-MALS)测定的。

[0114] 图34描绘了在CFSE标记的KU812(实线,ENPP3^{高})或CFSE标记的RCC4(虚线,ENPP3^{低})细胞上的RTCC诱导,如由在CFSE标记的靶细胞与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体XENP28925一起孵育细18小时后用Zombie Aqua染色的CFSE^{+}细胞的百分比所指示。

[0115] 图35描绘了亲和工程化的αENPP3 x αCD3 1+1 bsAb与ENPP3^{高} KU812细胞的结合。

[0116] 图36描绘了在CFSE标记的KU812(实线,ENPP3^{高})或CFSE标记的RCC4(虚线,ENPP3^{低})细胞上的RTCC诱导,如由在CFSE标记的靶细胞与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体XENP28925(WT高ENPP3结合)、XENP29516(中度ENPP3结合)或XENP30262(低ENPP3结合)一起孵育42小时后用Zombie Aqua染色的CFSE^{+}细胞的百分比所指示。数据显示,与XENP28925相比,XENP29516和XENP30262都显示出对ENPP3^{低} RCC4细胞上的RTCC的实质上较少有效诱导,其中RTCC效力与结合效力相关,如上所示。XENP29516和XENP30262还显示出对ENPP3^{高} 细胞上的RTCC的较少有效诱导。

[0117] 图37A至图37C描绘了对与KU812细胞(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体XENP28925(CD3高)或XENP29436(CD3高-Int编号1)一起孵育了18小时的人PBMC的A)IFNγ、B)IL-6和C)TNFα释放的诱导。数据表明,与XENP28925相比,XENP29436表现出实质上较少有效的对细胞因子释放的诱导。

[0118] 图38描绘了对与RCC4细胞(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体XENP28925(CD3高)或XENP29436(CD3高-Int编号1)一起孵育了18小时的人PBMC的IFNγ释放的诱导。数据显示,在存在ENPP3^{低} RCC4细胞的情况下,与XENP28925相比,XENP29436表现出可忽略不计的对细胞因子释放的诱导。

[0119] 图39描绘了在CFSE标记的KU812(实线,ENPP3^{高})或CFSE标记的RCC4(虚线,RCC4^{低})细胞上的RTCC诱导,如由在CFSE标记的靶细胞与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体XENP28925(CD3高)或XENP29436(CD3高-Int编号1)一起孵育42小时后用Zombie Aqua染色的CFSE^{+}细胞的百分比所指示。数据表明,与XENP28925相比,XENP29436表现出实质上较少有效的对ENPP3^{低}细胞上的RTCC的诱导;然而,XENP29436还表现出降低的诱导ENPP3^{高}细胞上的RTCC的效力。

[0120] 图40描绘了对与KU812细胞(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体XENP28925(ENPP3高;CD3高)、XENP29436(ENPP3高;CD3高-Int编号1)、XENP29518(ENPP3中度;CD3高)、XENP29463(ENPP3中度;CD3高-Int编号1)、XENP30262(ENPP3低;CD3高)或XENP30263(ENPP3低;CD3高-Int编号1)一起孵育的人PBMC的IFNγ释放的诱导。数据显示降低CD3或ENPP3结合效力降低了对细胞因子释放的诱导。值得注意的是,降低CD3和ENPP3结合效力进一步降低了对细胞因子释放的诱导。

[0121] 图41描绘了在CFSE标记的KU812(实线,ENPP3^{高})或CFSE标记的RCC4(虚线,ENPP3^{低})细胞上的RTCC诱导,如由在CFSE标记的靶细胞与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体XENP28925(WT高ENPP3结合;CD3高;单价ENPP3结合)、XENP29516(中度ENPP3结合;CD3高;单价ENPP3结合)、或XENP29520(中度ENPP3结合;CD3高;二价ENPP3结合)一起孵育42小时后用Zombie Aqua染色的CFSE^{+}细胞的百分比所指示。数据显示,二价结合(具有中度ENPP3结合)在ENPP3^{低}细胞上维持降低的RTCC效力,但在ENPP3^{高}细胞上恢复了接近由XENP28925所表现出的RTCC效力。

[0122] 图42描绘了在CFSE标记的KU812(实线,ENPP3^{高})或CFSE标记的RCC4(虚线,ENPP3^{低})细胞上的RTCC诱导,如由在CFSE标记的靶细胞与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体XENP28925(WT高ENPP3结合;CD3高;单价ENPP3结合)、XENP30262(低ENPP3结合;CD3高;单价ENPP3结合)、或XENP30264(低ENPP3结合;CD3高;二价ENPP3结合)一起孵育42小时后用Zombie Aqua染色的CFSE^{+}细胞的百分比所指示。数据显示二价结合(具有低ENPP3结合)进一步降低了ENPP3^{低}细胞上的 RTCC效力,并恢复了ENPP3^{高}细胞上的一定RTCC效力。

[0123] 图43描绘了CFSE标记的KU812上的RTCC诱导,如在CFSE标记的靶细胞与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体XENP28925(CD3高;单价ENPP3结合)、XENP29437(CD3高;二价ENPP3结合)、XENP29436(CD3高-Int编号1;单价ENPP3结合)或XENP29438(CD3高-Int编号1;二价ENPP3结合)一起孵育44小时后用Zombie Aqua染色的CFSE^{+}细胞的百分比所指示。出乎意料的是,XENP29438无法诱导KU812细胞上的RTCC。

[0124] 图44描绘了在CFSE标记的KU812(实线,ENPP3^{高})或CFSE标记的RCC4(虚线,ENPP3^{低})上的RTCC诱导,如由在CFSE标记的靶细胞与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体XENP29437(CD3高VH/VL;二价ENPP3结合)、XENP30469(CD3高VL/VH;二价ENPP3结合)、XENP29428(CD3高-Int编号1 VH/VL;二价ENPP3结合)或XENP30470(CD3高-Int编号2 VL/VH;二价ENPP3结合)一起孵育24小时后用Zombie Aqua染色的CFSE^{+}细胞的百分比所指示。数据显示,在2+1 Fab_2-scFv-Fc bsAb形式(XENP29438对比XENP30470)的背景下,交换CD3高-Int编号1 scFv中可变重链结构域和可变轻链结构域的取向恢复了其活性。在2+1 Fab_2-scFv-Fc bsAb形式(XENP29437对比XENP30469)的背景下,交换CD3高scFv中可变重链结构域和可变轻链结构域的取向使RTCC效力的改善更适度。

[0125] 图45描绘了在CFSE标记的KU812(实线,ENPP3^{高})或CFSE标记的RCC4(虚线,ENPP3^{低})上的RTCC诱导,如由在CFSE标记的靶细胞与人PBMC(效应细胞与靶细胞的比率为10:1)和αENPP3 x αCD3双特异性抗体XENP29520(CD3高[VH/VL];二价ENPP3中度结合)、XENP30819(CD3高-Int编号1[VL/VHL];二价ENPP3中度结合)、XENP31149(CD3高-Int编号2[VL/VHL];二价ENPP3中度结合)、XENP30264(CD3高[VH/VL];二价ENPP3低结合)、XENP30821(CD3高-Int编号1[VL/VHL];二价ENPP3低结合)或XENP31150(CD3高-Int编号2[VL/VHL];二价ENPP3低结合)一起孵育40小时后用Zombie Aqua染色的CFSE^{+}细胞的百分比所指示。

[0126] 图46描绘了XENP16432(一种基于纳武单抗和具有E233P/L234V/L235A/G236del/S267K消融变体的Ig主链的抗PD-1 mAb)的序列;以及XENP21461(帕博利珠单抗)的序列。

[0127] 图47描绘了用PBS、XENP16432(二价抗PD-1 mAb),或用单独或与XENP16432组合使用的说明性的αENPP3 x αCD3 2+1 bsAb(XENP30819、XENP30821或XENP31419)投配的KU812和huPBMC移植的NSG小鼠中肿瘤体积随时间的变化(如通过卡尺测量确定的)。αENPP3 x αCD3 bsAb中的每一者,在低剂量和/或较高剂量处理时,都能够增强T细胞对KU812细胞的同种异体抗肿瘤效应,并与PD-1阻断很好地组合。

[0128] 图48A至图48C描绘了到第14天时在用PBS、XENP16432(一种二价抗-PD-1 mAb),或用单独的说明性αENPP3 x αCD3 2+1 bsAb(XENP30819、XENP30821或XENP31419)或与XENP16432的组合投配的KU812和huPBMC移植的NSG小鼠的血液中A)CD45^{+}淋巴细胞、B)CD8^{+} T细胞和C)CD4^{+} T细胞的扩增。在所有情况下,与PD-1阻断组合增强了淋巴细胞扩增。

[0129] 图49描绘了用PBS、XENP16432(二价抗PD-1 mAb),或用单独或与XENP16432组合使用的说明性的αENPP3 x αCD3 2+1 bsAb(XENP30819或XENP31419)投配的RXF-393和huPBMC移植的NSG小鼠中肿瘤体积随时间的变化(如通过卡尺测量确定的)。αENPP3 x αCD3 bsAb中的每一者,在低剂量、中等剂量和/或高剂量处理时,都能够增强T细胞对KU812细胞的同种异体抗肿瘤效应,并与PD-1阻断很好地组合。

[0130] 图50A至图50N描绘了用A)PBS、B)XENP16432(二价抗PD-1 mAb),或用单独或与XENP16432组合使用的说明性的αENPP3 x αCD3 2+1 bsAb(XENP30819、XENP30821或XENP31419)投配的单独KU812和huPBMC移植的NSG小鼠中肿瘤体积随时间的变化(如通过卡尺测量确定的)。αENPP3 x αCD3 bsAb中的每一者,在低剂量和/或较高剂量处理时,都能够增强T细胞对KU812细胞的同种异体抗肿瘤效应,并与PD-1阻断很好地组合。

[0131] 图51A至图51L描绘了用A)PBS、B)XENP16432(二价抗PD-1 mAb),或用单独或与XENP16432组合使用的说明性的αENPP3 x αCD3 2+1 bsAb(XENP30819或XENP31419)投配的单独RXF-393和huPBMC移植的NSG小鼠中肿瘤体积随时间的变化(如通过卡尺测量确定的)。αENPP3 x αCD3 bsAb中的每一者,在低剂量、中等剂量和/或高剂量处理时,都能够增强T细胞对KU812细胞的同种异体抗肿瘤效应,并与PD-1阻断很好地组合。

[0132] 图52A至图52K描绘了用于本文公开的抗ENPP3x抗CD3双特异性抗体的几种形式。第一种是“1+1 Fab-scFv-Fc”形式(也称为“开瓶器(bottle opener)”或“三重F”形式),其中第一抗原结合结构域是Fab结构域并且第二抗抗原结合结构域是scFv结构域(图1A)。另外,“mAb-Fv”、“mAb-scFv”、“2+1 Fab2-scFv-Fc”(也称为“中央scFv”或“中央scFv”形式)、“中央Fv”、“单臂中央scFv”、“单scFv-mAb”、“scFv-mAb”、“双scFv”、“三叉”和非异源二聚体双特异性形式都有显示。图49中描绘的scFv结构域可以从N末端到C末端是可变重链-(任选的接头)-可变轻链,或可变轻链-(任选的接头)-可变重链。另外,对于所述单臂scFv-mAb,scFv可以附接至重链单体的N末端或附接至轻链的N末端。在某些实施方式中,图52中的“抗抗原1”是指ENPP3结合结构域。在某些实施方式中,图52中的“抗抗原1”是指CD3结合结构域。在某些实施方式中,图52中的“抗抗原2”是指ENPP3结合结构域。在某些实施方式中,图52中的“抗抗原2”是指CD3结合结构域。在一些实施方式中,图52中的“抗抗原1”是指ENPP3结合结构域并且图52中的“抗抗原2”是指CD3结合结构域。在一些实施方式中,图52中的“抗抗原1”是指CD3结合结构域并且图52中的“抗抗原2”是指ENPP3结合结构域。所公开的ENPP3结合结构域和CD3结合结构域中的任一者可包含在图52的双特异性形式中。

[0133] 图53提供本文描述的异二聚Fc蛋白的示意图,包括2:1 Fab2-scFv-Fc、1:1 Fab=scFv-Fc、Y/Z-Fc(例如,非靶向白介素-Fc)、抗X x Y/ZF(例如,靶向的白介素-Fc)c和单臂Fc蛋白。

[0134] 图54提供了基于蛋白质数据库条目3AVE使用MOE构建的CH3-CH3界面的结构模型。一组新颖的Fc取代能够实现超过95%的异二聚体产率,而热稳定性几乎没有变化。

[0135] 图55描绘了用于最小化对三级结构的影响的同配取代。Fc区的工程化等电点差异允许或促进Fc异二聚体的直接纯化。

[0136] 图56描绘了铰链和CH2取代消除了Fc γR结合。

[0137] 图57A至图57C示出了2:1 Fab_2-scFv-Fc形式使得能够靶向正常细胞上低密度的肿瘤抗原。调谐TAA效价和TAA/CD3亲和力使得能够实现模拟癌组织和正常组织(高/低抗原

密度)的细胞系的选择性细胞毒性。经调谐的2:1双特异性抗体还减少了可溶性抗原的干扰并减少了细胞因子的释放。

[0138] 图57A示出了调谐FAP效价和FAP/CD3亲和力使得能够实现模拟癌组织和正常组织(高/低抗原密度)的细胞系的选择性细胞毒性。XENP23535代表靶向FAP的经调谐的1:1形式。XENP25967代表靶向FAP的经调谐的2:1形式。

[0139] 图57B示出调谐SSTR2效价和SSTR2/CD3亲和力使得能够实现模拟癌组织和正常组织(高/低抗原密度)的细胞系的选择性细胞毒性。XENP18087代表靶向SSTR2的经调谐的1:1形式。XENP30458代表靶向SSTR2的经调谐的2:1形式。

[0140] 图57C示出调谐ENPP3效价和ENPP3/CD3亲和力使得能够实现模拟癌组织和正常组织(高/低抗原密度)的细胞系的选择性细胞毒性。XENP28925代表靶向ENPP3的经调谐的1:1形式。XENP31149代表靶向ENPP3的经调谐的2:1形式。

[0141] 图58描绘了使用本文描述的方法研究规模生产异二聚Fc蛋白的优势。该方法可用于直接生产异二聚Fc蛋白。

[0142] 图59示出了具有高滴度和高异二聚体患病率的克隆中的稳定细胞系发育结果。顶部克隆的摇瓶产量为1-2 g/L,其中异二聚体含量为约90%。数据是在仅标准蛋白A纯化步骤后获得的。

[0143] 图60描绘了A)XENP18087或B)XENP30458对用SSTR2(高、中和低密度)转染的A549细胞上的RTCC的诱导。

[0144] 图61描绘了在将CFSE标记的SSTR2+COR-L279靶细胞与人PBMC(效应物:靶标比率为20:1)一起在XENP18087或XENP30458存在下孵育48小时后效应细胞对A)靶细胞数量和B)IL-6、C)TNFα、D)IFNγ和E)IL-1ß的释放的降低。

[0145] 图62A至图62D.本文所述的说明性经1:1调谐的形式和经2:1调谐的形式TAA x CD3双特异性的序列。示出了抗TTA(例如,抗FAP、抗SSTR2和抗ENPP3)部件诸如可变区、抗CD3部件诸如可变区、恒定/Fc区和接头。接头加有双下划线(但是本领域技术人员应理解,接头可以被其它接头替代),斜线(/)表示可变区、恒定区/Fc区和接头之间的边界。CDR加有下划线。在一些实施方式中,1:1形式的TAA x CD3双特异性是XENP23535、XENP18087或XENP28925。在一些实施方式中,2:1形式的TAA x CD3双特异性是XENP25967、XENP30458、XENP31149。

[0146] 图63描绘了SSTR2结合结构域[αSSTR2]_H1.24_L1.30的序列。

具体实施方式

[0147] I. 概述

[0148] 共同结合CD3和肿瘤抗原靶标的抗双特异性抗体用于重定向T细胞以攻击和裂解靶向的肿瘤细胞。示例包括BiTE®和DART形式,它们单价结合CD3和肿瘤抗原。虽然靶向CD3的方法已显示出相当大的前景,但此类疗法的常见副作用是相关的细胞因子产生,往往会导致毒性细胞因子释放综合征。由于双特异性抗体的抗CD3结合结构域与所有T细胞结合,因此募集了高产生细胞因子的CD4 T细胞亚群。此外,CD4 T细胞亚群包括调节性T细胞,所述调节性T细胞的募集和扩增可能会导致免疫抑制并对长期肿瘤抑制具有负面影响。此外,这些形式不包含Fc结构域并且在患者中显示出非常短的血清半衰期。

[0149] 本文提供了新颖的抗CD3 x 抗ENPP3(也称为抗ENPP3 x 抗CD3、αCD3 x αENPP3、或αENPP3 x αCD3)异二聚双特异性抗体和使用此类抗体治疗癌症的方法。具体地,本文提供了各种形式的抗CD3、抗ENPP3双特异性抗体,例如图15A和图15B中描绘的那些。这些双特异性抗体可用于治疗癌症,尤其是那些ENPP3表达增加的癌症,例如肾细胞癌。此类抗体用于将CD3+效应T细胞引导到ENPP3+肿瘤,从而允许CD3+效应T细胞攻击并裂解ENPP3+肿瘤。

[0150] 此外,在一些实施方式中,本公开提供了对人CD3具有不同结合亲和力的双特异性抗体,该双特异性抗体可以改变或减少抗CD3疗法的潜在副作用。也就是说,在一些实施方式中,本文所述的抗体提供了抗体构建体,所述抗体构建体包含抗CD3抗原结合结构域,所述抗CD3抗原结合结构域是与CD3的“强”或“高亲和力”结合物(例如,一个示例是描述为H1.30_L1.47的重链和轻链可变结构域(任选地包括适当的带电荷接头))并且还与ENPP3结合。在其它实施方式中,本文所述的抗体提供了抗体构建体,所述抗体构建体包含抗CD3抗原结合结构域,所述抗CD3抗原结合结构域是与CD3的“轻度”或“低亲和力”结合物。另外的实施方式提供了抗体构建体,所述抗体构建体包含抗CD3抗原结合结构域,所述抗CD3抗原结合结构域对也结合ENPP3的CD3具有中度或“中等”亲和力。虽然可以使用非常大量的抗CD3抗原结合结构域(ABD),但特别有用的实施方式使用6种不同的抗CD3 ABD,尽管它们可以如本文所讨论的以两种scFv取向使用。通常使用Biacore测定测量亲和力。

[0151] 应当理解的是,本文提供的“高、中、低”抗CD3序列可以多种异二聚化形式使用,如图15A、图15B和所示。通常,由于T细胞募集的潜在副作用,例示性的施方式利用仅单价结合CD3的形式,例如图15A和图15B中描绘的,并且在本文描绘的形式中,CD3 ABD是如本文更充分描述的scFv。相比之下,主题双特异性抗体可以单价(例如图15A)或二价(例如图15B)地结合ENPP3。

[0152] 本文提供了包含ENPP3结合结构域的组合物,所述组合物包含具有此类ENPP结合结构域的抗体(例如,ENPP3 x CD3双特异性抗体)。包含此类ENPP3结合结构域的主题抗体有利地引发一系列不同的免疫应答,这取决于所使用的特定ENPP3结合结构域。例如,主题抗体在对具有不同ENPP3表达的细胞的选择性、对于ENPP3表达性细胞的效力、引发细胞因子释放的能力以及对可溶性ENPP3的敏感性方面表现出差异。此类ENPP3结合结构域和相关的抗体可用于例如治疗ENPP3相关癌症。

[0153] 因此,在一个方面中,本文提供了与两种不同抗原结合的异二聚抗体,例如抗体是“双特异性的”,因为所述抗体与两种不同的靶抗原结合,通常是如本文所述的ENPP3和CD3。这些异二聚抗体可以与这些靶抗原(例如,存在单个抗原结合结构域,如可变重链和可变轻链结构域对)或二价地(存在各自独立地与抗原结合的两个抗原结合结构域)单价地结合。在一些实施方式中,本文提供的异二聚抗体包含一个CD3结合结构域和一个ENPP3结合结构域(例如,本文描述的“1+1 Fab-scFv-Fc”形式的异二聚抗体)。在其它实施方式中,本文提供的异二聚抗体包括一个CD3结合结构域和两个ENPP3结合结构域(例如,本文描述的“2+1 Fab2-scFv-Fc”形式的异二聚抗体)。本文提供的异二聚抗体基于使用不同的单体,所述不同的单体含有使异二聚体相比于同源二聚体“偏斜”形成的氨基酸取代,如以下更完整地概述的,所述不同的单体与允许异二聚体远离同源二聚体的简单纯化的“pI变体”结合,如以下类似地概述的。所提供的异二聚体双特异性抗体通常依赖于使用可以在生产细胞中自组装以产生异二聚体蛋白的工程化或变体Fc结构域,以及产生和纯化此类异二聚体蛋白的方

法。

[0154] II. 命名法

[0155] 本文提供的抗体以若干种不同的形式列出。在一些实例中,特定抗体中的每个单体被给予唯一的“XENP”编号,但是如本领域中将理解的,较长的序列可能含有较短的XENP编号。例如,1+1 Fab-scFv-Fc形式抗体的“scFv-Fc”单体可以具有第一XENP编号,而scFv结构域本身将具有不同的XENP编号。一些分子具有三种多肽,因此具有组分的XENP编号被用作名称。因此,呈2+1 Fab_2-scFv-Fc形式的分子XENP29520包括三个序列(参见图19A):“Fab-Fc重链”单体;2)“Fab-scFv-Fc重链”单体;和3)“轻链”单体或等同物,但是本领域的技术人员将能够通过序列比对容易地鉴定这些序列。这些XENP编号在序列表以及标识符中,并且在附图中使用。另外,一个包含三种组分的分子产生多个序列标识符。例如,Fab的列表包括全重链序列、可变重链结构域序列和可变重链结构域序列的三个CDR、全轻链序列、可变轻链结构域序列和可变轻链结构域序列的三个CDR。Fab-scFv-Fc单体包括全长序列、可变重链结构域序列、3个重链CDR序列和一个scFv序列(包括scFv可变重链结构域序列、scFv可变轻链结构域序列和scFv接头)。应注意,本文中具有scFv结构域的一些分子使用单个带电荷的scFv接头(+H),但也可以使用其它的。另外,特定抗原结合结构域(例如,ENPP3和CD3结合结构域)的术语命名法使用“Hx.xx_Ly.yy”类形式,其中编号作为特定可变链序列的唯一标识符。因此,CD3结合结构域AN1[ENPP3] H1L1的Fab侧的可变结构域(例如,图12)是“H1 L1”,其指示可变重链结构域H1与轻链结构域L1组合。在这些序列用作scFv的情况下,名称“H1 L1”指示可变重链结构域,H1与轻结构域L1组合并且从N末端到C末端处于VH-接头-VL取向。具有重链可变结构域和轻链可变结构域的相同序列但是所述序列处于倒序(从N末端到C末端是VL-接头-VH取向)的这种分子将被命名为“L1_H1.1”。类似地,不同构建体可能“混合和匹配”重链和轻链,如从序列表和附图中将显而易见的。

[0156] III. 定义

[0157] 为了可以更全面地理解本申请,下面阐述几个定义。此类定义意在涵盖语法等同物。

[0158] “ENPP3”或“胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员3”(例如,基因库登录号NP 005012.2)在本文中是指属于残余胞外核苷酸水解的一系列胞外酶的蛋白质。ENPP3序列描绘于例如图11A和图11B中。ENPP3在特定的癌症中表达,包括肾细胞癌。

[0159] 本文中通过“消融”意指活性的降低或去除。因此例如,“消融Fc γR结合”意指Fc区氨基酸变体与不含特异性变体的Fc区相比具有少于50%的起始结合,优选大于70%到80%到90%到95%到98%的活性损失,并且通常,活性低于Biacore、SPR或BLI测定中的可检测结合的水平。特别用于Fc γR结合的消融的是图5所示的那些变体,所述变体通常添加到两个单体中。

[0160] 如本文所用,“ADCC”或“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”意指其中表达Fc γR的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并且随后引起靶细胞裂解的细胞介导反应。ADCC与结合Fc γRIIIa相关;与Fc γRIIIa结合增加引起ADCC活性增加。

[0161] 如本文所用,“ADCP”或抗体依赖性细胞介导的吞噬意指其中表达Fc γR的非特异性吞噬细胞识别靶细胞上的结合抗体并且随后引起靶细胞吞噬的细胞介导反应。

[0162] 如本文所用,通常使用术语“抗体”。本文所述的抗体可以采取如本文所述的多种

形式,包含本文所述的传统抗体以及抗体衍生物、片段和模拟物。

[0163] 传统的免疫球蛋白(Ig)抗体是“Y”形四聚体。每个四聚体通常由两对相同的多肽链构成,每对具有一个“轻链”单体(通常分子量为约25 kDa)和一个“重链”单体(通常分子量为约50-70 kDa)。

[0164] 其它有用的抗体形式包括但不限于本文所述的1+1 Fab-scFv-Fc形式和2+1 Fab-scFv-Fc抗体形式,以及“mAb-Fv”、“mAb-scFv”、“中央-Fv”、“单臂scFv-mAb”、“scFv-mAb”、“双scFv”和“三叉”形式抗体,如图49所示。

[0165] 抗体重链通常包含可变重链(VH)结构域,所述结构域包含vhCDR1-3;以及Fc结构域,所述Fc结构域包含CH2-CH3单体。在一些实施方式中,抗体重链包含铰链和CH1结构域。传统的抗体重链是从N末端到C末端如下组织的单体:VH-CH1-铰链-CH2-CH3。CH1-铰链-CH2-CH3统称为抗体的重链“恒定结构域”或“恒定区”,其中有五种不同的类别或“同种型”:IgA、IgD、IgG、IgE和IgM。因此,如本文所用的“同种型”意指根据其恒定区的化学和抗原特征界定的免疫球蛋白的任一子类。应当理解,治疗性抗体还可以包含同种型和/或亚类的杂合体。例如,如在以引用方式并入的美国公开2009/0163699中所示,本文所述的抗体包含使用人IgG1/G2杂交体。

[0166] 在一些实施方式中,本文提供的抗体包括IgG同种型恒定结构域,所述IgG同种型恒定结构域具有若干亚类,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在免疫球蛋白的IgG亚类中,重链中存在几个免疫球蛋白结构域。本文中通过“免疫球蛋白(Ig)结构域”意指具有不同三级结构的免疫球蛋白区域。本文所述的抗体中感兴趣的是重链结构域,包括恒定重链(CH)结构域和铰链结构域。在IgG抗体的上下文中,IgG同种型各自具有三个CH区。因此,在IgG的上下文中,“CH”结构域如下:“CH1”是指根据如Kabat中的EU编号的位置118-220。“CH2”根据如Kabat中的EU编号是指位置237-340,并且“CH3”根据如Kabat中的EU编号是指位置341-447。如本文所示和下文所述的,pI变体可以在一个或多个CH区以及铰链区中,如下文讨论的。

[0167] 应注意IgG1具有在356(D或E)和358(L或M)处具有多型性的不同同种异型。本文描述的序列使用356D/358M同种异型,然而本文包括其它同种异型。也就是说,本文包括的包含IgG1 Fc结构域的任何序列可以具有替代356D/358M同种异型的356E/358L。应当理解,治疗性抗体还可以包含同种型和/或亚类的杂合体。例如,如以引用方式并入的美国公开2009/0163699中所示,本发明的抗体在一些实施方式中包含IgG1/IgG2杂交体。

[0168] 如本文所使用的,“Fc”或“Fc区”或“Fc结构域”意指包括抗体的恒定区,在一些情况下不包含所有第一恒定区免疫球蛋白结构域(例如,CH1)或其一部分,并且在一些情况下,任选地包含铰链的全部或一部分的多肽。对于IgG,Fc结构域包括免疫球蛋白结构域CH2和CH3(Cγ2和Cγ3),以及任选地CH1(Cγ1)与CH2(Cγ2)之间的铰链区的全部或一部分。因此,在一些情况下,Fc结构域从N末端到C末端包含CH2-CH3和铰链-CH2-CH3。在一些实施方式中,Fc结构域是来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc结构域,其中IgG1铰链-CH2-CH3和IgG4铰链-CH2-CH3特别用于许多实施方式中。另外,在人IgG1 Fc结构域的情况下,铰链时常包含C220S氨基酸取代。此外,在人IgG4 Fc结构域的情况下,铰链时常包含S228P氨基酸取代。尽管Fc区的边界可以变化,但人IgG重链Fc区通常被定义成在其羧基末端包含残基E216、C226或A231,其中根据如Kabat中的EU索引进行编号。在一些实施方式中,如下文更全面地

描述,对Fc区进行氨基酸修饰,例如改变与一种或多种Fcγ R或与FcRn的结合。

[0169] 本文中的“重链恒定区”意指抗体(或其片段)的CH1-铰链-CH2-CH3部分,不包含可变重链结构域;在人IgG1的EU编号中,这是氨基酸118到447。本文中的“重链恒定区片段”意指从N末端和C末端中的任一者或两者含有较少氨基酸但仍保持能够与另一个重链恒定区形成二聚体的重链恒定区。

[0170] 重链的另一种类型的Ig结构域是铰链区。本文的“铰链”或“铰链区”或“抗体铰链区”或“铰链结构域”意指包括抗体的第一恒定结构域与第二恒定结构域之间的氨基酸的柔性多肽。结构上,IgG CH1结构域结束于EU位置215处,且IgG CH2结构域开始于残基EU位置231处。因此本文中对于IgG而言定义抗体铰链包含位置216(在IgG1中为E216)至230(在IgG1中为p230),其中编号是根据如Kabat中的EU索引。在一些情况下,使用“铰链片段”,其在铰链结构域的N末端和C末端中任一个或两个处含有较少氨基酸。如本文所提及,pI变体还可在铰链区中制成。在本文中许多抗体具有被被丝氨酸代替的在根据EU编码(铰链区)的位置220处的至少一个半胱氨酸。通常,这种修饰在本文所描绘的大多数序列的“scFv单体”侧上,但是其也可以是在“Fab单体”侧上或在两者上以减少二硫化物形成。本文序列中特别包括这些半胱氨酸中的一个或两个被取代(C220S)。

[0171] 如本领域技术人员将理解的,重链恒定区结构域的确切编号和位置在不同编号系统间可能不同。根据EU和Kabat编号的重链恒定区的有用比较如下,参见Edelman等,1969,Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85和Kabat等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,美国公共卫生服务部(United States Public Health Service),美国国家卫生研究院(National Institutes of Health),贝塞斯达(Bethesda),这些文献以引用方式整体并入本文中。

[0172] 表1

[0173]

	EU编号	**Kabat编号**
CH1	118-215	114-223
铰链	216-230	226-243
CH2	231-340	244-360
CH3	341-447	361-478

[0174] 抗体轻链通常包含两个结构域:可变轻链结构域(VL),所述可变轻链结构域包含轻链CDR vlCDR1-3,以及恒定轻链区(往往称为CL或Cκ)。抗体轻链通常从N末端到C末端如下组织:VL-CL。

[0175] 本文中的“抗原结合结构域”或“ABD”意指一组六个互补决定区(CDR)在作为多肽序列的一部分存在时与如本文所讨论的靶抗原(例如,ENPP3或CD3)特异性地结合。如本领域中已知,这些CDR通常作为第一组可变重链CDR(vhCDR或VHCDR)和第二组可变轻链CDR(vlCDR或VLCDR)存在,其各自包含三个CDR:vhCDR1、vhCDR2、vhCDR3、可变重链CDR和vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3 vhCDR3可变轻链CDR。CDR存在于可变重链结构域(vhCDR1-3)和可变轻链结构域(vlCDR1-3)中。来自Fv区的可变重链结构域和可变轻链结构域。

[0176] 本文所述的抗体提供大量不同的CDR组。在这种情况下,“完整CDR组”包含三个可变轻链和三个可变重链CDR,例如vlCDR1、vlCDR2、vlCDR3、vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3。这些可

以分别是较大可变轻链结构域或可变重链结构域的一部分。另外,如本文中更全面地概述的,当使用重链和轻链时(例如当使用Fab时),可变重链结构域和可变轻链结构域可以在单独的多肽链上,或在scFv序列的情况下在单个多肽链上。

[0177] 如本领域技术人员将理解的,CDR的确切编号和放置在不同编号系统中可以是不同的。然而,应理解的是,可变重链序列和/或可变轻链序列的公开包含相关(固有)CDR的公开。因此,每个可变重区的公开内容是vhCDR的公开内容(例如,vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3),并且每个可变轻区的公开内容是vlCDR的公开内容(例如,vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3)。CDR编号的有用比较如下,参见Lafranc等人,《发展与比较免疫学(Dev.Comp.Immunol.)》27(1):55-77 (2003):

[0178] 表2

[0179]

	Kabat+ Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact	Xencor
vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35	27-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58	54-61
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101	103-116
vlCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36	27-38
vlCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55	56-62
vlCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96	97-105

[0180] 在整个本说明书中,当提及可变结构域(大致是轻链可变区的残基1-107和重链可变区的残基1-113)中的残基以及用于Fc区的EU编号系统时,通常使用Kabat编号系统(例如Kabat等人, 见上文(1991))。

[0181] CDR有助于形成抗原结合结构域和抗体的抗原结合位点,或更具体来说,表位结合位点。“表位”是指与称为互补位的抗体分子可变区中的特定抗原结合位点相互作用的决定簇。表位是诸如氨基酸或糖侧链的分子的组,并且通常具有特定的结构特征以及特定的电荷特征。单个抗原可具有多于一个表位。

[0182] 表位可以包含直接参与结合的氨基酸残基(也称为表位的免疫显性组分)和不直接参与结合的其它氨基酸残基,如被特异性抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基;换句话说,氨基酸残基在特异性抗原结合肽的覆盖面积内。

[0183] 表位可以是构象的或线性的。通过来自线性多肽链的不同区段的空间并置的氨基酸产生构象表位。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。构象和非构象表位的区别可以在于在变性溶剂存在下,与前者而非后者的结合丧失。

[0184] 表位通常包括独特空间构象中的至少3个,并且更通常至少5个或8-10个氨基酸。识别相同表位的抗体可以在简单的免疫分析中验证,展示一种抗体阻断另一种抗体与目标抗原结合的能力,例如“框并”。如下文所概述,本公开不仅包括本文所列举的抗原结合结构域和抗体,还包括竞争与所列举的抗原结合结构域结合的表位结合的抗原结合结构域和抗体。

[0185] 在一些实施方式中,抗原结合结构域的六个CDR源自可变重链结构域和可变轻结构域。在“Fab”形式中,一组6个CDR源自两个不同的多肽序列、可变重链结构域(vh或VH;含

有vhCDR1、vhCDR2和vhCDR3)和可变轻结构域(vl或VL;含有vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3),vh结构域的C末端与重链的CH1结构域的N末端连接并且vl结构域的C末端与恒定轻结构域的N末端连接(并且因此形成轻链)。在scFv形式中,vh结构域和vl结构域通常通过使用如本文概述的接头("scFv接头")二价连接到单个多肽序列中,这可以是(从N末端开始)vh-接头-vl或vl-接头-vh,通常优选的是前者(包含各侧上的任选结构域接头,这取决于所使用的形式(例如,根据图1))。通常,scFv结构域的C末端附接至第二单体中的铰链的N末端。

[0186] 如本文所使用的,"可变区"或"可变结构域"意指包括基本上由分别构成κ、λ和重链免疫球蛋白基因基因座的任何Vκ、Vλ和/或VH基因编码的一个或多个Ig结构域并且含有赋予抗原特异性的CDR的免疫球蛋白的区域。因此,"可变重链结构域"与"可变轻结构域"配对以形成抗原结合结构域("ABD")。另外,每个可变结构域包括从氨基末端到羧基末端按以下顺序布置的三个高变区("互补决定区"、"CDR")(可变重链结构域的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3和可变轻结构域的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3)和四个架构(FR)区:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。高变区通常涵盖以下氨基酸残基:轻链可变区中的约氨基酸残基24-34(LCDR1;"L"表示轻链)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)以及重链可变区中的约31-35B(HCDR1;"H"表示重链)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);Kabat等人,SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,第5版,马里兰州贝塞斯达美国国家卫生研究院公共卫生服务部(Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)(1991)和/或那些形成高变环的残基(例如轻链可变区中的残基26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和91-96(LCDR3)以及重链可变区中的26-32(HCDR1)、53-55(HCDR2)和96-101(HCDR3);Chothia和Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917。表2中描述了本发明的特定CDR。

[0187] 如本文所用,"Fab"或"Fab区"意指包含VH、CH1、VL以及CL免疫球蛋白结构域的多肽,所述结构域通常位于两条不同的多肽链上(例如VH-CH1位于一个链上而VL-CL位于另一个链上)。Fab可以指分离情况下的这个区或在本文所述的双特异性抗体的背景下的这个区。在Fab的上下文中,除了CH1和CL结构域之外,Fab还包括Fv区。

[0188] 如本文所使用的,"Fv"或"Fv片段"意指包括ABD的VL和VH结构域的多肽。Fv区可以格式化为Fab(如上文所讨论的,通常是还包含如上文概述的恒定区的两种不同的多肽)和scFv两者,其中VL和VH结构域组合(通常是与如本文所讨论的接头组合)以形成scFv。

[0189] 本文中通过"单链Fv"或"scFv"意指通常使用如本文所讨论的scFv接头来共价附接至可变轻链结构域以形成scFv或scFv结构域的可变重链结构域。scFv结构域由N末端至C末端可呈任一定向(VH-接头-VL或VL-接头-VH)。在序列表和图中所描绘的序列中,VH和VL结构域的顺序在名称中指示,例如,H.X_L.Y意指N末端到C末端是VH-接头-VL,并且L.Y_H.X是VL-接头-VH。

[0190] 本文提供的本发明抗体的一些实施方式包括至少一个scFv结构域,所述至少一个scFv结构域虽然不是天然发生的但是通常包含通过scFv接头连接在一起的可变重链结构域和可变轻结构域。如本文所概述,虽然scFv结构域通常由N末端到C末端定向为VH-scFv接头-VL,但是针对任一个scFv结构域(或使用Fab的vh和vl序列构筑的那些)这种定向可以逆向,成为VL-scFv接头-VH,其中取决于形式)任选的接头位于一个末端或两个末端。

[0191] 本文中的"修饰"意指多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失或对与蛋白质化

学连接的部分的更改。例如,修饰可以是附接于蛋白质的改变的碳水化合物或PEG结构。本文的“氨基酸修饰”意指多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失。出于清楚起见,除非另外说明,否则氨基酸修饰总是针对由DNA编码的氨基酸,例如具有DNA和RNA中的密码子的20种氨基酸。

[0192] 本文的“氨基酸取代”或“取代”意谓用不同氨基酸取代在亲体多肽序列中的特定位置处的氨基酸。特别地,在一些实施方式中,取代是针对并非天然存在于特定位置、并非天然存在于生物体内或任何生物体内的氨基酸。例如,取代E272Y是指变体多肽,在这一情况下是指Fc变体,其中位置272处的谷氨酸用酪氨酸代替。为清楚起见,已经被工程化以改变核酸编码序列但不改变起始氨基酸(例如,将CGG(编码精氨酸)换成CGA(仍然编码精氨酸)以增加宿主生物体表达水平)的蛋白质不是“氨基酸取代”;也就是说,尽管产生对相同蛋白质进行编码的新基因,但是如果蛋白质在其开始的特定位置处具有相同氨基酸,则所述蛋白质不是氨基酸取代。

[0193] 如本文所使用的,“氨基酸插入”或“插入”意指在亲本多肽序列中的特定位置处添加氨基酸序列。例如,-233E或233E表示在位置233之后和位置234之前插入谷氨酸。另外,-233ADE或A233ADE表示在位置233之后和位置234之前插入AlaAspGlu。

[0194] 本文所用的“氨基酸缺失”或“缺失”是指去除亲本多肽序列中特定位置的氨基酸序列。例如,E233-或E233#、E233()或E233del表示在位置233处的谷氨酸的缺失。另外,EDA233-或EDA233#表示从位置233开始的序列GluAspAla的缺失。

[0195] 如本文所使用的,“变体蛋白质”或“蛋白质变体”或“变体”意指由于至少一个氨基酸修饰而与亲本蛋白质不同的蛋白质。与亲本蛋白质相比,蛋白质变体具有至少一个氨基酸修饰,但并没有多得使得变体蛋白质使用如下所述比对程序将不与亲本蛋白质比对。通常,使用下文所述的比对程序如BLAST,变体蛋白质(如本文概述的变体Fc结构域等)与亲本蛋白质通常至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。如本文所用的“变体”还指赋予特定功能的特定氨基酸修饰(例如,“异二聚化变体”、“pI变体”、“消融变体”等)。

[0196] 如下所述,在一些实施方式中,亲本多肽,例如Fc亲本多肽是人野生型序列,如来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重恒定结构域或Fc区,但是具有变体的人序列还可以用作“亲本多肽”,例如可以包含美国公开2006/0134105的IgG1/2杂交体。本文中的蛋白质变体序列将与亲本蛋白质序列优选地拥有至少约80%同一性,并且最优选地至少约90%同一性,更优选地至少约95%到98%到99%同一性。因此,如本文所使用的,“抗体变体”或“变体抗体”意指由于至少一个氨基酸修饰而与亲本抗体不同的抗体,如本文所使用的,“IgG变体”或“变体IgG”意指由于至少一个氨基酸修饰而与亲本IgG(再次,在许多情况下,来自人IgG序列)不同的抗体,并且如本文所使用的,“免疫球蛋白变体”或“变体免疫球蛋白”意指由于至少一个氨基酸修饰而与亲本免疫球蛋白序列不同的免疫球蛋白序列。如本文所使用的,“Fc变体”或“变体Fc”意指包括如与人IgG1、IgG2或IgG4的Fc结构域相比,在Fc结构域中的氨基酸修饰的蛋白质。

[0197] 如本文所使用的,“Fc变体”或“变体Fc”意指包括Fc结构域中的氨基酸修饰的蛋白质。修饰可以是添加、缺失或取代。Fc变体根据构成其的氨基酸修饰进行定义。因此,例如,N434S或434S是相对于亲本Fc多肽具有位置434处的丝氨酸取代的Fc变体,其中编号是根据

EU索引。同样地,M428L/N434S定义了相对于亲本Fc多肽具有取代M428L和N434S的Fc变体。WT氨基酸的身份标识可以是非特定的,在此情况下前述变体称为428L/434S。应注意,提供取代的顺序是任意的,也就是说,例如,428L/434S是与434S/428L相同的Fc变体等。对于本文所讨论的涉及抗体或其衍生物和片段(例如,Fc结构域)的所有位置,除非另外指出,否则氨基酸位置编号是根据EU索引。"EU索引"或如Kabat或"EU编号"方案中的"EU索引"是指EU抗体的编号(Edelman等人, 1969,《美国国家科学院院刊》63:78-85,所述文献特此通过引用整体并入)。

[0198] 通常,变体Fc结构域与对应的亲本人IgG Fc结构域具有至少约80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%同一性(使用下文所讨论的同一性算法,其中一个实施方式利用如本领域已知的BLAST算法,使用默认参数)。可替代地,与亲本Fc结构域相比,变体Fc结构域可以具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个氨基酸修饰。可替代地,与亲本Fc结构域相比,变体Fc结构域可以具有至多1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个氨基酸修饰。另外,如本文所讨论的,本文所述的变体Fc结构域仍然保持与另一个Fc结构域形成二聚体的能力,如使用本文所述已知技术如非变性凝胶电泳所测量的。

[0199] 本文的"蛋白质"意指至少两个共价连接的氨基酸,其包含蛋白质、多肽、寡肽和肽。另外,构成本文所述的抗体的多肽可以包含一个或多个侧链或末端的合成衍生化、糖基化、聚乙二醇化、循环变换、环化、其它分子的接头、与蛋白质或蛋白质结构域的融合以及肽标签或标记的添加。

[0200] 如本文所用的"残基"意指蛋白质中的位置及其相关的氨基酸实体。举例来说,天冬酰胺297(也称为Asn297或N297)是人类抗体IgG1中位置297处的残基。

[0201] 如本文所用,"IgG子类修饰"或"同型修饰"意指将IgG同型的一个氨基酸转化成不同比对的IgG同型中的对应的氨基酸的氨基酸修饰。例如,因为在EU位置296处IgG1包含酪氨酸并且IgG2包含苯丙氨酸,所以IgG2中的F296Y取代被认为是IgG亚类修饰。

[0202] 如本文所使用的,"非天然发生修饰"意指不是同种型的氨基酸修饰。例如,因为人IgG均不包括位置434处的丝氨酸,因此IgG1、IgG2、IgG3或IgG4(或其杂交体)的取代434S被认为是非天然发生修饰。

[0203] 如本文所使用的,"氨基酸"和"氨基酸同一性"意指由DNA和RNA编码的20个天然发生的氨基酸之一。

[0204] 如本文所用的"效应子功能"意指由抗体Fc区与Fc受体或配体相互作用产生的生物化学事件。效应子功能包含但不限于ADCC、ADCP和CDC。

[0205] 如本文所使用的,"IgG Fc配体"意指来自与IgG抗体的Fc区结合以形成Fc/Fc配体络合物的任何生物体的分子,优选地是多肽。Fc配体包含但不限于Fcγ RI、Fcγ RII、Fcγ RIII、FcRn、C1q、C3、甘露聚糖结合凝集素、甘露糖受体、葡萄球菌蛋白A、链球菌蛋白G和病毒性Fcγ R。Fc配体还包括Fc受体同源物(FcRH),其是与Fcγ R同源的Fc受体家族(Davis等人, 2002,《免疫评论(Immunological Reviews)》190:123-136,其以引用的方式整体并入本文中)。Fc配体可以包含结合Fc的未发现的分子。特定的IgG Fc配体是FcRn和Fcγ 受体。如本文所使用的,"Fc配体"意指来自与抗体的Fc区结合以形成Fc/Fc配体络合物的任何生

物体的分子,优选地是多肽。

[0206] 如本文所使用的,“Fcγ受体”或“FcγR”或“FcgammaR”意指与IgG抗体Fc区结合并由FcγR基因编码的蛋白质家族的任何成员。在人类中,这个家族包括但不限于FcγRI(CD64),包括同种型FcγRIa、FcγRIb和FcγRIc;FcγRII(CD32),包括同种型FcγRIIa(包括同种异型H131和R131)、FcγRIIb(包括FcγRIIb-1和FcγRIIb-2)和FcγRIIc;和FcγRIII(CD16),包括同种型FcγRIIIa(包括同种异型V158和F158)和FcγRIIIb(包括同种异型FcγRIIIb-NA1和FcγRIIIb-NA2)(Jefferis等人, 2002,《免疫学快报(Immunol Lett)》82:57-65,其以引用的方式整体并入本文中),以及任何未发现的人类FcγR或FcγR同种型或同种异型。FcγR可以来自任何生物体,包括但不限于人类、小鼠、大鼠、兔和猴。小鼠FcγR包含但不限于FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、FcγRIII(CD16)和FcγRIII-2(CD16-2)以及任何未发现的小鼠FcγR或FcγR同种型或同种异型。

[0207] 如本文所使用的,“FcRn”或“新生儿Fc受体”意指与IgG抗体Fc区结合并且至少部分地由FcRn基因编码的蛋白质。FcRn可以来自任何生物体,包含但不限于人、小鼠、大鼠、兔和猴。如本领域已知的,功能FcRn蛋白包括两种肽,通常被称为重链和轻链。轻链是β-2微球蛋白且重链由FcRn基因编码。除非本文另外指出,否则FcRn或FcRn蛋白是指FcRn重链与β-2-微球蛋白的络合物。多种FcRn变异体用于增强与FcRn受体的结合,且在一些情况下,增加血清半衰期。“FcRn变异体”增强与FcRn受体的结合,且适合的FcRn变异体在下文中展示。

[0208] 如本文所用,“亲本多肽”意指随后经过修饰来产生变异体的起始多肽。亲本多肽可以是天然存在的多肽或天然存在的多肽的变体或工程化版本。因此,如本文所使用的,“亲本免疫球蛋白”意指被修饰以产生变体的未经修饰免疫球蛋白多肽,并且如本文所使用的,“亲本抗体”意指被修饰以产生变体抗体的未经修饰抗体。应注意,“亲本抗体”包含如下文概述的已知商业的重组产生抗体。在这个上下文中,“亲本Fc结构域”将是相对于所列举变体;因此,将“变体人IgG1 Fc结构域”与人IgG1的亲本Fc结构域相比较,将“变体人IgG4 Fc结构域”与亲本Fc结构域人IgG4相比较等。

[0209] 如本文所用的“位置”意指蛋白序列中的位置。位置可以顺序编号,或根据确定的形式(例如用于抗体编号的EU索引)编号。

[0210] 如本文所使用的,“靶抗原”意指通过包括给定抗体的可变区的抗原结合结构域来特异性地结合的分子。

[0211] 本文所述的异二聚抗体的单体的下背景通过“链性(strandedness)”意指与“匹配”的两条DNA链相似,将异二聚化变体并入每种单体中以保留“匹配”以形成异二聚体的能力。举例来说,如果将一些pI变异体工程化到单体A(例如使得pI更高)中,那么同样可以使用的作为“电荷对”的空间变异体不会干扰pI变异体,例如将使得pI更高的电荷变异体放在相同“链”或“单体”上以保留两种功能。类似地,对于如下文更全面概述的组中成对出现的“偏斜”变异体来说,所属领域的技术人员在决定所述一组对将进入哪个链或单体时考虑pI,以使得使用偏斜变异体的pI也使pI分离最大化。

[0212] 本文使用的“靶细胞”是指表达靶抗原的细胞。

[0213] 在产生根据本文所述的双特异性抗体的上下文中,“宿主细胞”意指含有对双特异性抗体的组分进行编码的外源性核酸并且能够在适合条件下表达双特异性抗体的细胞。下文中讨论了适合的宿主细胞。

[0214] “野生型或WT”在本文中意指在自然界中发现的氨基酸序列或核苷酸序列,包括等位基因变体。WT蛋白质具有未经有意修饰的氨基酸序列或核苷酸序列。

[0215] 本文提供了与人抗体结构域具有序列同一性的多个抗体结构域。两个类似序列之间的序列同一性(例如,抗体可变结构域)可以通过如以下的算法等算法测量:如Smith, T.F.和Waterman, M.S.(1981) “生物序列的比较(Comparison Of Biosequences)”,《应用数学进展(Adv. Appl.Math.)》2:482 [局部同源算法];Needleman, S.B.和Wunsch, CD.(1970) “可适用于搜索两种蛋白质的氨基酸序列中的类似性的一般方法(A General Method Applicable To The Search For Similarities In The Amino Acid Sequence Of Two Proteins)”,《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》 48:443 [同源比对算法], Pearson, W.R.和Lipman, D.J.(1988) “用于生物序列比较的改进的工具(Improved Tools For Biological Sequence Comparison)”,《美国国家科学院(U.S.A.))》85:2444 [相似度搜索法];或Altschul, S.F.等人, (1990) “基础局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool)”,《分子生物学杂志》 215:403-10,“BLAST”算法,参见https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi。当使用前述算法中的任一种时,使用默认参数(用于窗口长度、空位罚分等)。在一个实施方式中,使用默认参数用BLAST算法来完成序列同一性。

[0216] 本文所述的抗体通常是分离的或重组的。在用于描述本文所公开的各种多肽时,“分离的”意指已经从表达多肽的细胞或细胞培养物中鉴定并且分离和/或回收的多肽。通常,分离的多肽将通过至少一个纯化步骤来制备。“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体。“重组”意指在外源性宿主细胞中使用重组核酸技术产生抗体,并且也可以分离抗体。

[0217] “特异性结合”或“特异性地结合”或“特异于”特定抗原或表位意指可测量地不同于非特异性相互作用的结合。特异性结合可以如下测量:例如相比于对照分子的结合来确定一种分子的结合,所述对照分子通常是不具有结合活性的类似结构分子。举例而言,特异性结合可藉由与类似于目标的对照分子竞争来确定。

[0218] 特定抗原或表位的特异性结合可以通过例如抗体来展现,所述抗体针对抗原或表位的KD为至少约10^{-4} M、至少约10^{-5} M、至少约10^{-6} M、至少约10^{-7} M、至少约10^{-8} M、至少约10^{-9} M、或者至少约10^{-10} M、至少约10^{-11} M、至少约10^{-12} M或更大,其中KD是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。典型地,特异性结合抗原的抗体的KD是对照分子相对于抗原或表位的KD的20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、5,000倍、10,000倍或更多倍。

[0219] 而且,特定抗原或表位的特异性结合可以例如通过针对抗原或表位的KA或Ka为以下的抗体来表现:针对相对于对照物的表位大至少20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、5,000倍、10,000倍或更多倍,其中KA或Ka是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率。结合亲和力通常使用Biacore、SPR或BLI测定来测量。

[0220] IV. ENPP3结合结构域

[0221] 在一个方面中,本文提供了ENPP3抗原结合结构域(ABD)和包含此类ENPP3抗原结合结构域(ABD)的组合物,包括抗ENPP3抗体。包含此类ENPP3抗原结合结构域的主题抗体(例如,抗ENPP3 x抗CD3双特异性抗体)有利地引发一系列不同的免疫应答(参见实施例5和实施例6)。此类ENPP3结合结构域和相关的抗体可用于例如治疗ENPP3相关癌症。

[0222] 如本领域的技术人员将理解的,适合的ENPP3结合结构域可以包括如在序列表和图12、图13A至图13B、和图14A至图14I中所描绘的或如CDR被加下划线的一组6个CDR,或在如本文所述并且如表2中所示的使用不同编号方案的情况下,使用在图12、图13A至图13B、和图14A至图14I以及序列表中所描绘的那些序列的可变重(VH)链结构域和可变轻结构域(VL)序列内的其它比对鉴定的CDR(参见表2)。适合的ENPP3 ABD还可以包含如这些序列和附图中所描绘的用作scFv或Fab结构域的整个VH和VL序列。

[0223] 在一个实施方式中,ENPP3抗原结合结构域包括本文,包括附图和序列表所述的ENPP3 ABD的6个CDR(即,vhCDR1-3和vlCDR1-3)。在例示性实施方式中,ENPP3 ABD是以下ENPP3 ABD中的一个ENPP3 ABD:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、 H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。

[0224] 除了在图和序列表中公开的形成针对ENPP3的ABD的亲本CDR集外,本文还提供了具有CDR的ENPP3 ABD变体,所述CDR包括本文公开的ENPP3 ABD CDR的至少一种修饰。在一个实施方式中,与本文,包括附图和序列表中所描绘的ENPP3 ABD的6个CDR相比,ENPP3 ABD包含具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个氨基酸修饰的一组6个CDR。在例示性实施方式中,与以下ENPP3 ABD中的一个ENPP3 ABD的6个CDR相比,ENPP3 ABD包括具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个氨基酸修饰的一组6个CDR:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、 H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。在某些实施方式中,如通过Biacore、表面等离振子共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉法,例如八位位组测定)测定中的至少一种测定,变体ENPP3 ABD能够结合ENPP3抗原,后一种测定尤其用于许多实施方式中。在特定实施方式中,ENPP3 ABD能够结合人ENPP3抗原(参见实施例5)。

[0225] 在一个实施方式中,ENPP3 ABD包括与如本文,包括附图和序列表所述的ENPP3 ABD的6个CDR具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的6个CDR。在例示性实施方式中,ENPP3 ABD包括与以下ENPP3 ABD中的一个ENPP3 ABD的6个CDR具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的6个CDR:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、 H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。在某些实施方式中,如通过Biacore,表面等离振子共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉法,例如八位

位组测定)测定中的至少一种测定,ENPP3 ABD能够结合TIM-3,后一种测定尤其用于许多实施方式中。在特定实施方式中,ENPP3 ABD能够结合人ENPP3抗原(参见图2)。

[0226] 在另一个例示性实施方式中,ENPP3 ABD包括本文,包括附图和序列表所述的ENPP3 ABD中的任何一个ENPP3 ABD的可变重链(VH)域和可变轻链(VL)结构域。在例示性实施方式中,ENPP3 ABD是以下ENPP3 ABD中的一个ENPP3 ABD:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、 H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。

[0227] 除了本文公开的亲本ENPP3可变重和可变轻结构域之外,本文提供了包含可变重链结构域和/或可变轻结构域的ENPP3 ABD,所述可变重链结构域和/或可变轻结构域是本文公开的ENPP3 ABD VH和VL结构域的变体。在一个实施方式中,变体VH结构域和/或VL结构域与本文,包括附图和序列表所述的ENPP3 ABD的VH和/或VL结构域相比具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸变化。在例示性实施方式中,变体VH结构域和/或VL结构域与以下ENPP3 ABD中的一个ENPP3 ABD的VH和/或VL结构域相比具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸变化:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、 H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。在某些实施方式中,如通过Biacore、表面等离振子共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉法,例如八位位组测定)测定中的至少一种测定,ENPP3 ABD能够结合所述ENPP3,后一种测定尤其用于许多实施方式中。在特定实施方式中,ENPP3 ABD能够结合人ENPP3抗原(参见实施例5)。

[0228] 在一个实施方式中,变体VH和/或VL结构域与如本文,包括附图和序列表中所描述的ENPP3 ABD的VH和/或VL至少90%、95%、97%、98%或99%同一。在例示性实施方式中,变体VH和/或VL结构域与以下ENPP3 ABD中的一个ENPP3 ABD的VH和/或VL至少90%、95%、97%、98%或99%同一:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、 H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。在某些实施方式中,如通过Biacore、表面等离振子共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉法,例如八位位组测定)测定中的至少一种测定,ENPP3 ABD能够结合所述ENPP3,后一种测定尤其用于许多实施方式中。在特定实施方式中,ENPP3 ABD能够结合人ENPP3抗原(参见实施例5)。

[0229] V. 抗体

[0230] 在一个方面中,本文提供结合ENPP3的抗体(例如,抗ENPP3抗体)。在某些实施方式中,所述抗体与人ENPP3结合(图11A)。主题抗ENPP3抗体包括单特异性ENPP3抗体,以及多特异性(例如,双特异性)抗ENPP3抗体。在某些实施方式中,抗ENPP3抗体具有根据图15A、图15B和图52A至图52K中所描绘的抗体形式中的任一种抗体形式的形式。

[0231] 在一些实施方式中,主题组合物包含ENPP3结合结构域。在一些实施方式中,组合物包含具有ENPP3结合结构域的抗体。本文提供的抗体包含一个、两个、三个、四个和五个或更多个ENPP3结合结构域。在某些实施方式中,ENPP3结合结构域包含选自图12、图13A至图13B和图14A至图14I中所描绘的那些的ENPP3结合结构域的vhCDR1、vhCDR2、vhCDR3、vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3序列中的任一者。在一些实施方式中,ENPP3结合结构域包含选自图12、图13A至图13B和图14A至图14I中所描绘的那些的ENPP3结合结构域的加下划线的vhCDR1、vhCDR2、vhCDR3、vlCDR1、vlCDR2和vlCDR3序列。在一些实施方式中,ENPP3结合结构域包含选自图12、图13A至图13B和图14A至图14I中所描绘的那些的ENPP3结合结构域的可变重链结构域和可变轻结构域。图12、图13A至图13B和图14A至图14I中描述的ENPP3结合结构域包括AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80。

[0232] 在一个方面中,本文提供双特异性抗体,所述双特异性抗体以如下所述的各种形式结合ENPP3和CD3,并且总体上描绘在图15A和图15B中。这些双特异性异二聚抗体包括ENPP3结合结构域。在某些实施方式中,ENPP3结合结构域包括选自由图12、图13A至图13B和图14A至图14I中描述的那些组成的组的ENPP3结合结构域的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列。在一些实施方式中,ENPP3结合结构域包括选自图12、图13A至图13B和图14A至图14I中描绘的那些的ENPP3结合结构域的加下划线的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列。

[0233] 这些双特异性异二聚抗体结合ENPP3和CD3。此类抗体包含CD3结合结构域和至少一个ENPP3结合结构域。任何适合的ENPP3结合结构域可以包含在抗ENPP3 X 抗CD3双特异性抗体中。在一些实施方式中,抗ENPP3 X 抗CD3双特异性抗体包含一个、两个、三个、四个或更多个ENPP3结合结构域,包含但不限于图12、图13A至图13B和图14A至图14I中描述的ENPP3结合结构域。在某些实施方式中,抗ENPP3 X 抗CD3抗体包含ENPP3结合结构域,所述ENPP3结合结构域包含选自由图12、图13A至图13B和图14A至图14I中描述的那些组成的组的ENPP3结合结构域的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列。在一些实施方式中,抗ENPP3 X 抗CD3抗体包含ENPP3结合结构域,所述ENPP3结合结构域包含选自由图12、图13A至图13B和图14A至图14I中描述的那些组成的组的ENPP3结合结构域的加下划线的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列。在一些实施方式中,抗ENPP3 X 抗CD3抗体包含ENPP3结合结构域,所述ENPP3结合结构域包含选自由图12、图13A至图13B和图14A至图14I中所描绘的ENPP3结合结构域组成的组的ENPP3结合结构域的可变重链结构域和可变轻链结构域。在示例性实施方式中,抗ENPP3 X 抗CD3抗体包含抗ENPP3AN1

[ENPP3]_H1L1结合结构域。

[0234] 本文提供的抗ENPP3 x 抗CD3抗体可包含任何适合的CD3结合结构域。在某些实施方式中,抗ENPP3 X 抗CD3抗体包含CD3结合结构域,所述CD3结合结构域包含选自由图10A至图10F中描述的那些组成的组的CD3结合结构域的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列。在一些实施方式中,抗ENPP3 X 抗CD3抗体包含CD3结合结构域,所述CD3结合结构域包含选自由图10A至图10F中描述的那些组成的组的CD3结合结构域的加下划线的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3序列。在一些实施方式中,抗ENPP3 X 抗CD3抗体包含CD3结合结构域,所述CD3结合结构域包含选自由图10A至图10F中所描绘的CD3结合结构域组成的组的CD3结合结构域的可变重链结构域和可变轻链结构域。在一些实施方式中,CD3结合结构域选自抗CD3 H1.30_L1.47、抗CD3 H1.32_L1.47;抗CD3 H1.89_L1.48;抗CD3 H1.90_L1.47;抗CD3 H1.33_L1.47;和抗CD3 H1.31_L1.47。如本文所述,这些抗CD3抗原结合结构域(CD3-ABD)可以以任一取向(例如从N末端到C末端是VH-scFv接头-VL或VL-scFv接头-VH)以scFv形式使用。

[0235] 本文提供的抗体包含不同的抗体结构域。如本文所述以及所属领域中已知,本文所述的抗体包含重链和轻链内的不同结构域,所述结构域也可以是重叠的。这些结构域包括但不限于Fc结构域、CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域、铰链结构域、重链恒定结构域(CH1-铰链-Fc结构域或CH1-铰链-CH2-CH3)、可变重链结构域、可变轻链结构域、轻链恒定结构域、FAb结构域和scFv结构域。

[0236] 如本文所示,存在可以用于共价连接所列举结构域(例如,scFv、Fab、Fc结构域等)的多个适合的接头(用于用作结构域接头或scFv接头),包含通过重组技术产生的传统肽键。图6中描绘了使主题抗体的结构域彼此附接的示例性接头。在一些实施方式中,接头肽可能主要包含以下氨基酸残基:Gly、Ser、Ala或Thr。接头肽应该具有足以连接两个分子的长度,以便其相对于彼此呈现正确的构象,从而使其保留所期望的活性。在一个实施方式中,接头具有约1-50个氨基酸的长度,优选约1-30个氨基酸的长度。在一个实施方式中,可以使用长度为1-20个氨基酸的接头,在一些实施方式中可以使用约5个到约10个氨基酸。有用的接头包括甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)n、(GSGGS)n、(GGGGS)n和(GGGS)n,其中n是至少为一(并且通常为3到4)的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其它柔性接头,它们中的一些在图5和图6中示出。可替代地,可使用多种非蛋白质聚合物,包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚环氧烷或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物作为接头。

[0237] 其它接头序列可以包括CL/CH1结构域的任何长度的任何序列,但不包括CL/CH1结构域的所有残基;例如CL/CH1结构域的前5-12个氨基酸残基。接头可以来源于免疫球蛋白轻链,例如Cκ或Cλ。接头可以来源于任何同型的免疫球蛋白重链,包括例如Cγ1、Cγ2、Cγ3、Cγ4、Cα1、Cα2、Cδ、Cε和Cμ。接头序列还可以来源于其它蛋白质,如Ig样蛋白质(例如TCR、FcR、KIR)、铰链区源序列,和来自其它蛋白质的其它天然序列。

[0238] 在一些实施方式中,接头是“结构域接头”,其用于将如本文所概述的任何两个结构域连接在一起。例如,在图15B中,可以存在将Fab的CH1结构域的C末端与scFv的N末端连接的结构域接头,其中另一个任选的结构域接头将scFv的C末端与CH2结构域连接(但是在许多实施方式中,铰链用作此结构域接头)。虽然可使用任何合适的接头,许多实施方式利

用甘氨酸-丝氨酸聚合物作为结构域接头,包括例如(GS)n、(GSGGS)n、(GGGGS)n以及(GGGS)n,其中n是至少为一(并且通常3到4到5)的整数,以及允许两个域的重组连接并且具有足够长度和柔性以使得每个结构域保留其生物功能的任何肽序列。在一些情况下,并且注意"链型",如下所概述,可以使用如在scFv接头的一些实施方式中使用的带电荷的结构域接头。图6中描绘了例示性有用的结构域接头。

[0239] 特别参考用于以"2+1"形式将scFv结构域附接至Fc结构域的结构域接头,有几种具有特殊用途的结构域接头,包括如图6所示的"全铰链C220S变体"、"柔性半铰链"、"带电荷的半铰链1"和"带电荷的半铰链2"。

[0240] 在一些实施方式中,接头是"scFv接头",其用于共价附接如本文所讨论的VH和VL结构域。在许多情况下,scFv接头是带电荷的scFv接头,多个所述带电荷的scFv接头示出在图5中。因此,在一些实施方式中,本文所述的抗体还提供带电荷的scFv接头,以促进第一单体与第二单体之间的pI分离。也就是说,通过并入带正或负(或两者,在不同单体上使用scFv的主链的情况下)电的scFv接头,由此允许包含带电接头的单体改变pI而不会在Fc结构域中产生进一步的变化。这些带电荷的接头可以被取代到含有标准接头的任何scFv中。再次,如本领域技术人员将理解的,根据所期望的pI变化,在正确的"链"或单体上使用带电荷的scFv接头。例如,如本文所讨论的,为了形成1+1 Fab-scFv-Fc形式的异二聚抗体,计算每个期望抗原结合结构域的Fv区的原始pI,并且一个被选择成形成scFv,并且根据pI,选择正或负接头。

[0241] 带电荷的结构域接头还可以用于增加本文所述的抗体的单体的pI分离,并且因此图5中所包含的那些在本文中可以用于利用接头的任何实施方式中。

[0242] 具体地,图15A和15B所描绘的形式是抗体,通常被称为"异二聚抗体",意指蛋白质具有自组装成异源二聚体Fc结构域中的至少两个相关Fc序列以及至少两个Fv区,无论是作为Fab还是作为scFv。

[0243] 所提供的ENPP3结合结构域可包含在任何有用的抗体形式中,包括例如规范免疫球蛋白,以及本文提供的1+1 Fab-scFv-Fc和2+1 Fab2-scFv-Fv形式。其它有用的抗体形式包括但不限于"mAb-Fv"、"mAb-scFv"、"中央-Fv"、"单臂scFv-mAb"、"scFv-mAb"、"双重scFv"和"三叉"形式的抗体,如图52A至图52K中所公开。

[0244] 在一些实施方式中,主题抗体包含本文提供的ENPP3 ABD中的一种或多种ENPP3 ABD。在一些实施方式中,抗体包含一个ENPP3 ABD。在其它实施方式中,抗体包含两个ENPP3 ABD。在例示性实施方式中,ENPP3 ABD包含以下ENPP3 ABD中的一个ENPP3 ABD的可变重链结构域和可变轻链结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、 H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。在一些实施方式中,ENPO3 ABD是以下ENPP3 ABD中的一个ENPP3 ABD:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、

H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。

[0245] 在例示性实施方式中,抗体是双特异性抗体,所述双特异性抗体包含一个或两个ENPP3 ABD,包括本文提供的ENPP3 ABD中的任何ENPP3 ABD。包含此类ENPP3 ABD的双特异性抗体包括例如1+1 Fab-scFv-Fc和2+1 Fab_2-scFv-Fc双特异性形式抗体。在例示性实施方式中,ENPP3 ABD是以下B7H3 ABD中的一个B7H3 ABD:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、 H16-1.67、Ha1 6-1(3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。在例示性实施方式中,ENPP3结合结构域是Fab。在一些实施方式中,此类双特异性抗体是异二聚双特异性抗体,所述异二聚双特异性抗体包括本文所述的任何异二聚化偏斜变体、pI变体和/或消融变体。

[0246] A. 嵌合和人源化抗体

[0247] 在某些实施方式中,本文所述的抗体包含来自特定种系重链免疫球蛋白基因的重链可变区和/或来自特定种系轻链免疫球蛋白基因的轻链可变区。举例来说,这类抗体可包含人类抗体或由人类抗体组成,所述人类抗体包含作为特定种系序列“的产物”或“衍生自”特定种系序列的重链或轻链可变区。作为人类生殖系免疫球蛋白序列“的产物”或“来源于”其的人类抗体可以通过将人类抗体的氨基酸序列与人类生殖系免疫球蛋白的氨基酸序列比较且选择与人类抗体的序列在序列方面最接近(也就是说,最大一致性%)的人类生殖系免疫球蛋白序列(使用本文所概述的方法)来鉴别出来。由于例如天然存在的体细胞突变或有意引入定点突变,作为特定人类生殖系免疫球蛋白序列“的产物”或“来源于”特定人类生殖系免疫球蛋白序列的人类抗体与生殖系序列相比可含有氨基酸差异。然而,人源化抗体通常与由人类种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列在氨基酸序列上具有至少90%相同,并且在与其它物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如,鼠种系序列)进行比较时,含有将抗体鉴定为源自人类序列的氨基酸残基。在某些情况下,人源化抗体可以与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列在氨基酸序列上至少95%、96%、97%、98%或99%,或甚至至少96%、97%、98%或99%相同。通常,源自特定人类种系序列的人源化抗体将显示出与由人类种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列不多于10-20个氨基酸差异(在引入本文中的任何偏斜变体、pI变体和消融变体之前;也就是说,在引入本文所述的变体之前,变体的数量通常较低)。在某些情况下,相比于由生殖系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列,人源化抗体可显示不超过5或甚至不超过4、3、2或1个氨基酸差异(同样,在引入本文的任何偏斜、pI和消融变体之前;也就是说,在引入本文所述的变体之前,变体数目通常较低)。

[0248] 在一个实施方式中,亲本抗体已经发生亲和成熟,如所属领域中已知。可以利用基于结构的方法进行人源化和亲和力成熟,例如如USSN 11/004,590中所述。基于选择的方法可以用于人源化和/或亲和成熟抗体可变区,包括但不限于以下文献中所述的方法:Wu等

人，1999,《分子生物学杂志》294:151-162;Baca等人，1997,《生物化学杂志(J. Biol. Chem.)》272(16):10678-10684;Rosok等人，1996,《生物化学杂志》271(37):22611-22618;Rader等人，1998,《美国国家科学院院刊》95: 8910-8915;Krauss等人，2003,《蛋白质工程(Protein Engineering)》16(10):753-759,其以引用的方式整体并入本文中。其它人源化方法可涉及仅移植部分CDR,包括但不限于以下文献中所述的方法:USSN 09/810,510;Tan等人，2002,《免疫学杂志》169:1119-1125;De Pascalis等人，2002,《免疫学杂志》169:3076-3084,所有所述文献都以引用的方式整体并入本文中。

[0249] B. 异二聚抗体

[0250] 在例示性实施方式中,本文提供的双特异性抗体是包含两个变异Fc结构域序列的异二聚双特异性抗体。此类变体Fc结构域包含氨基酸修饰以促进异二聚抗体的自组装和/或纯化。

[0251] 抗体技术中正存在的一个问题是期望“双特异性”抗体同时与两种不同抗原结合,通常由此允许不同抗原接近且从而产生新功能和新疗法。通常,这些抗体是通过将每条重链和轻链的基因纳入宿主细胞中来产生。这通常导致期望的异源二聚体(A-B)以及两个同源二聚体(A-A和B-B(不包含轻链异源二聚体问题))形成。然而,形成双特异性抗体的主要障碍是难以使期望异二聚抗体的形成偏向于同源二聚体的形成和/或难以从同源二聚体抗体中纯化异二聚抗体。

[0252] 存在多种机制可以用于产生本发明异二聚抗体。另外,如本领域的技术人员将理解的,这些不同的机制可以组合以确保高异二聚化。促进异二聚体的产生和纯化的氨基酸修饰通常统称为“异二聚化变体”。如下文所讨论的,异二聚化变体包含“偏斜”变体(例如,下文所述“隆凸与孔”和“电荷对”变体)以及“pI变体”,这允许从同源二聚体纯化异源二聚体。如在美国专利号US 9,605,084(其全部内容通过引用并入本文)中一般性描述的,并且特别是如下文对异二聚化变体所讨论,异二聚化的有用机理包括美国专利US 9,605,084中所述的“杵和臼”(“ KIH”)、US 9,605,084中描述的“静电操纵”或“电荷对”、US 9,605,084中描述的pI变体、以及US 9,605,084中概述的一般其它Fc变体及以下内容。

[0253] 可用于形成和纯化本发明异二聚抗体(例如,双特异性抗体)的异二聚化变体在下文进一步详细讨论。

[0254] 1. 偏斜变体

[0255] 在一些实施方式中,异二聚抗体包含偏斜变体,所述偏斜变体是在第一Fc结构域(A)和/或第二Fc结构域(B)中的一个或多个氨基酸修饰,所述一个或多个氨基酸修饰有利于形成Fc异源二聚体(包含第一Fc结构域和第二Fc结构域的Fc二聚体);(A-B)超过Fc同源二聚体(包含第一Fc结构域中的两个或第二Fc结构域中的两个的Fc二聚体;A-A或B-B)。适合的偏斜变体包含在美国公开申请号2016/0355608的图29中,所述美国公开申请特此以引用方式整体并且具体地针对其偏斜变体的公开内容并入,以及在图1A至图1E和图4中。

[0256] 一种机制在所属领域中通常称为“杵和臼”,还可以任选地使用所谓的氨基酸工程来产生空间影响以有利于形成异二聚体而不利于形成同二聚体;这有时称为“杵和臼”,如以下文献中所述:USSN 61/596,846;Ridgway等人,《蛋白质工程》9(7):617(1996);Atwell等人,《分子生物学杂志》1997 270:26;美国专利第8,216,805号,所有这些文献全部并入本文供参考。图标出了依赖于“杵和臼”的“单体A-单体B”对的数目。另外,如Merchant等人,

Nature Biotech. 16:677 (1998)中所述,这些“杵和臼”突变可以与二硫键组合以偏斜形成异二聚化。

[0257] 一种用于产生异二聚抗体的另一种机制有时称为“静电转向”,如Gunasekaran等人,J. Biol. Chem. 285(25):19637 (2010)中所述,所述文献以全文引用方式并入本文中。这在本文中有时被称作“电荷对”。在此实施方式中,静电用于使形成朝异二聚化偏斜。如本领域的技术人员将理解的,这些电荷对还可能影响pI并因此影响纯化,并且因此在一些情况下还可以被视为pI变体。然而,由于这些是为了强制发生异二聚化而产生并且不是作为纯化工具使用,因此其被分类为“空间变体”。这些包含但不限于,与D221R/P228R/K409R配对的D221E/P228E/L368E(例如这些是“单体对应组”)和与C220R/E224R/P228R/K409R配对的C220E/P228E/368E。

[0258] 在一些实施方式中,偏斜变体有利地并且同时有利于基于“杵和臼”机制以及“静电操纵”机制的异二聚化。在一些实施方式中,异二聚抗体包含一组或多组此类异二聚化偏斜变体。这些变体以成“对”的“组”出现。也就是说,将一组对结合到第一单体中且将另一组对结合到第二单体中。应注意,这些组不一定表现为“隆凸入孔”变体,其中在一个单体上的残基与另一个单体上的残基之间存在一一对应。也就是说,这些成对的集合相反可以形成两个单体之间的界面,所述界面鼓励异二聚体形成并且不鼓励同源二聚体形成,从而允许在生物学条件下自发形成的异二聚体的百分比超过90%,而非预期的50%(25%同源二聚体A/A:50%异二聚体A/B:25%同源二聚体B/B)。图4中描绘了示例性的异二聚化“偏斜”变体。在例示性的实施方式中,异二聚抗体包含S364K/E357Q:L368D/K370S;L368D/K370S:S364K;L368E/K370S:S364K;T411T/E360E/Q362E:D401K;L368D/K370S:S364K/E357L;K370S:S364K/E357Q;或T366S/L368A/Y407V:T366W(可选地包括桥接二硫键,T366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354C)“偏斜”变体氨基酸取代集。在示例性实施方式中,异二聚抗体包含“S364K/E357Q:L368D/K370S”氨基酸取代集。就命名而言,配对“S364K/E357Q:L368D/K370S”意指一个单体包括具有氨基酸取代S364K和E357Q的Fc结构域,且另一单体包括具有氨基酸取代L368D和K370S的Fc结构域;如上所述,这些配对的“链性”取决于起始pI。

[0259] 在一些实施方式中,本文提供的偏斜变体可以任选地并且独立地与任何其它修饰一包含但不限于其它偏斜变体(参见例如,美国公开申请号2012/0149876号的图37中,所述美国公开申请通过引用并入本文,特别是出于其对偏斜变体的公开的原因而并入)、pI变体、同种型变体、FcRn变体、消融变体等——一起结合到异二聚抗体的第一Fc结构域和第二Fc结构域中的一者或两者中。此外,单个修饰也可以独立地并且任选地包含在主题异二聚抗体中或从主题异二聚抗体中排除。

[0260] 额外单体A和单体B变异体可以任选地且独立地以任何量与其它变异体(如本文所概述的pI变异体或US 2012/0149876的图37中所示的其它空间变异体,其中的图和图例和SEQ ID NO特此并入本文中供参考)组合。

[0261] 在一些实施方式中,本文所概述的空间变体可以任选且独立地与任何pI变体(或其它变体,如Fc变体、FcRn变体等)并入到一个或两个单体中,并且可以独立且任选地包含在本文所述的抗体的蛋白质中或从本文所述的抗体的蛋白质中排除。

[0262] 适合的偏斜变体的列表见于图1A至图1E中,其中图4示出了在许多实施方式中的一些对的特定用途。在多个实施方式中,特别适用的是包括但不限于以下组的对:S364K/

E357Q:L368D/K370S;L368D/K370S:S364K;L368E/K370S:S364K;T411T/E360E/Q362E:D401K;L368D/K370S:S364K/E357L、和K370S:S364K/E357Q。就命名法而言,对“S364K/E357Q:L368D/K370S”意指单体中的一者具有双变体组S364K/E357Q并且另一者具有双变体组L368D/K370S。

[0263] 2. 用于异二聚体的pI(等电点)变体

[0264] 在一些实施方式中,异二聚抗体包含有利地允许从同源二聚体蛋白质分离异二聚抗体(例如,抗ENPP3 x 抗CD3双特异性抗体)的纯化变体。

[0265] 存在若干种基本机制可以导致易于纯化异二聚化抗体。例如,对抗体重链单体A和B中的一者或两者的修饰,使得每个单体具有不同的pI,允许从单体A-A和B-B蛋白等电纯化异源二聚体A-B抗体。可替代地,一些支架形式,如“1+1 Fab-scFv-Fc”和“2+1 Fab_2-scFv-Fc”形式,也允许基于大小进行分离。如本文所述,还可能使用偏斜变体,相对于同源二聚体“偏斜”异源二聚体的形成。因此,异二聚化偏斜变体和pI变体的组合特别用于本文提供的异二聚抗体中。

[0266] 另外,如下文更全面地概述的,根据异二聚抗体的形式,可以使用包含在单体的恒定区和/或Fc结构域内的pI变体和/或结构域接头。在一些实施方式中,异二聚抗体包含对于还可以产生pI变化的替代性功能的另外的修饰,如Fc、FcRn和KO变体。

[0267] 在一些实施方式中,本文提供的本发明异二聚抗体包含至少一个单体,所述至少一个单体具有改变单体的pI的一个或多个修饰(即,“pI变体”)。通常,如本领域的技术人员将理解的,pI变体存在两种通用类别:提高蛋白质pI(碱性变化)的变体和降低蛋白质pI(酸性变化)的变体。如本文所述,可以进行这些变体的所有组合:一种单体可以是野生型,或者不显示与野生型显著不同的pI的变体,并且另一种可以是更碱性或更酸性的。可替代地,改变每种单体,一种具有更强碱性且一种具有更强酸性。

[0268] 根据异二聚抗体的形式,pI变体可以包含在单体的恒定和/或Fc结构域内,或者可以使用带电接头,结构域接头或scFv接头。也就是说,利用如“1 + 1 Fab-scFv-Fc”等一个或多个scFv的抗体形式可以包含出于纯化目的给出另外的pI助推的带电荷的scFv接头(带正电或负电)。如本领域的技术人员将理解的,一些1 + 1 Fab-scFv-Fc形式可与仅带电荷的scFv接头一起使用而无另外的pI调整,但是本文所述的抗体确实还提供了在单体中的一个或两个上的pI变体和/或带电荷的结构域接头。另外,用于替代功能的额外氨基酸工程化也可赋予pI变化,例如Fc、FcRn和KO变体。

[0269] 在将pI用作分离机制以允许纯化异源二聚体蛋白的本发明异二聚抗体中,将氨基酸变体引入到单体多肽中的一个或两个单体多肽中。也就是说,所述单体之一(为了简单起见,在本文中被称为“单体A”)的pI可以被工程化为远离单体B,或单体A和单体B两者均可以随着单体A的pI增加和单体B的pI降低而改变。如下文更全面地概述的,任一个或两个单体的pI变化可以通过以下来完成:去除或添加带电残基(例如,用带正电或带负电的氨基酸残基来代替中性氨基酸,例如甘氨酸到谷氨酸)、将带电残基从带正电或带负电改变为相反电荷(例如,天冬氨酸到赖氨酸)或将带电残基改变为中性残基(例如,电荷损失;赖氨酸到丝氨酸)。图3和图4中示出了多种这些变体。

[0270] 因此,在一些实施方式中,本发明异二聚抗体包含在恒定区中的氨基酸修饰,所述氨基酸修饰通过将氨基酸取代(“pI变体”或“pI取代”)结合到单体中的一个或两个中来更

改二聚体蛋白的单体中的至少一个(如果不是两个)的等电点(pI)以形成“pI抗体”。如本文所示,如果两种单体的pI差别小至0.1pH单位,则可以实现异源二聚体与两种同型二聚体的分离,其中0.2、0.3、0.4和0.5或更高都可用于本文所述的抗体中。

[0271] 如本领域的技术人员将理解的,每个或两个单体上要包含的用于得到良好分离的pI变体的数量将部分地取决于组分的起始pI,例如在1+1 Fab-scFv-Fc和2+1 Fab_2-scFv-Fc形式中,所关注scFv和Fab的起始pI。即,为了确定对哪个单体进行工程化或处于哪个“方向”(例如,更具阳性或更具阴性),计算这两种靶抗原的Fv序列并据此作出决定。如本领域已知的,不同的Fv将具有用于本文所述的抗体中的不同起始pI。通常,如本文所概述的,pI被工程化以使各个单体的总pI差为至少约0.1 log,如本文所概述的优选的是0.2到0.5。

[0272] 在pI变体用于实现异二聚化的情况下,通过使用一个或多个重链的一个或多个恒定区,提供了用于设计和纯化双特异性蛋白质(包含抗体)的更模块化方法。因此,在一些实施方式中,异二聚化变体(包含偏斜和pI异二聚化变体)并不包含在可变区中,使得每个单独的抗体必须工程化。另外,在一些实施方式中,通过导入来自不同IgG同种型的pI变体以便在不引入显著免疫原性的情况下改变pI来显著降低pI变体导致免疫原性的可能性。因此,待解决的另一个问题是阐明具有高人类序列含量的低pI恒定结构域,例如最小化或避免任何特定位置的非人类残基。可选地或除同种型取代外,通过利用同配取代(例如,Asn至Asp;和Gln至Glu)显著降低了pI变体导致免疫原性的可能性。

[0273] 如下文所论述,可能与这个pI工程化一起发生的负效应同样是血清半衰期延长和FcRn结合增加。也就是说,如在美国公开申请号US 2012/0028304(以引用方式整体并入)中所述,降低抗体恒定结构域(包含在抗体和Fc融合中找到的那些)的pI可能导致血清保留在体内更长时间。具有增加的血清半衰期的这些pI变体也促进了pI变化以进行纯化。

[0274] 另外,应注意,pI变体给予了双特异性抗体的分析和质量控制过程另外益处,因为在同源二聚体存在时消除、最小化和区分的能力是显著的。类似地,可靠地测试异二聚抗体产生的再现性的能力是重要的。

[0275] 通常,特定用途的实施方式依赖于包含偏斜变体的变体组,相比于同源二聚体化形成,所述偏斜变体与pI变体结合促成异二聚化形成,所述pI变体增加两个单体之间的pI差异以促进将异源二聚体从同源二聚体中纯化出来。

[0276] pI变体的示例性组合示出于美国公开申请号2016/0355608中的图4和图5以及图30中,所有所述文献以引用方式整体并入本文,特别是针对pI变体的公开内容并入。图1和图2中示出了pI变体的优选组合。如本文所概述和图中所示,这些变化相对于IgG1展示,但所有同型可以这种方式改变,以及同型杂合体。在重链恒定结构域来自IgG2-4的情况下,也可以使用R133E和R133Q。

[0277] 在一个实施方式中,pI变体的优选组合具有包括208D/295E/384D/418E/421D变体(在相对于人IgG1时是N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D)的一个单体(负Fab侧)和包括带正电的scFv接头的第二单体(正scFv侧),包含$(GKPGS)_4$(SEQ ID NO: XX)。然而,如本领域的技术人员将理解的,第一单体包含CH1结构域,其包含位置208。因此,在不包含CH1结构域的构建体中(例如对于在其中一个结构域上不利用CH1结构域的抗体),优选的负pI变体Fc组包括295E/384D/418E/421D变异(当相对于人IgG1时,Q295E/N384D/Q418E/N421D)。

[0278] 因此,在一些实施方式中,一个单体具有来自图2的一组取代并且另一个单体具有

带电接头(呈带电荷的scFv接头的形式,因为所述单体包括如形式所指示的scFv或带电结构域接头,所述带电结构域接头可以选自图5中所描绘的那些)。

[0279] 在一些实施方式中,在Fc结构域的铰链中进行修饰,包括基于EU编号的位置216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229和230。因此,可以在位置216-230中的一个或多个中制造pI突变并且特别是取代,其中1个、2个、3个、4个或5个突变是有用的。再次地,考虑了单独的或与其它结构域中的其它pI变体一起的所有可能的组合。

[0280] 可用于降低铰链结构域的pI的具体取代包括但不限于221位处的缺失、222位处的非天然缬氨酸或苏氨酸、223位处的缺失、224位处的非天然谷氨酸、225位处的缺失、235位处的缺失,以及236位处的缺失或非天然丙氨酸。在一些情况下,仅在铰链结构域中进行pI取代,并且在其它情况下,这些取代以任何组合添加到其它结构域中的其它pI变体。

[0281] 在一些实施方式中,可以在CH2区域中制造突变,包括基于EU编号的位置233、234、235、236、274、296、300、309、320、322、326、327、334和339。应当注意,可以进行233至236的改变以增加IgG2主链中的效应子功能(以及327A)。再次地,可以对这14个位置进行所有可能的组合;例如可包括具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个CH2 pI取代的变体Fc结构域。

[0282] 可用于降低CH2结构域的pI的具体取代包括但不限于:位置274处的非天然谷氨酰胺或谷氨酸、位置296处的非天然苯丙氨酸、位置300处的非天然苯丙氨酸、位置309处的非天然缬氨酸、位置320处的非天然谷氨酸、位置322处的非天然谷氨酸、位置326处的非天然谷氨酸、位置327处的非天然甘氨酸、位置334处的非天然谷氨酸、位置339处的非天然苏氨酸,以及CH2内的和与其它结构域的所有可能组合。

[0283] 在该实施方式中,修饰可以独立地并且任选地选自CH3区的位置355、359、362、384、389、392、397、418、419、444和447 (EU编号)。可用于降低CH3结构域的pI的具体取代包括但不限于:位置355处的非天然谷氨酰胺或谷氨酸、位置384处的非天然丝氨酸、位置392处的非天然天冬酰胺或谷氨酸、位置397处的非天然甲硫氨酸、位置419处的非天然谷氨酸、位置359处的非天然谷氨酸、位置362处的非天然谷氨酸、位置389处的非天然谷氨酸、位置418处的非天然谷氨酸、位置444处的非天然谷氨酸,以及位置447处的缺失或非天然天冬氨酸。

[0284] 通常,如本领域的技术人员将理解的,pI变体存在两种通用类别:提高蛋白质pI(碱性变化)的变体和降低蛋白质pI(酸性变化)的变体。如本文所述,可以进行这些变体的所有组合:一种单体可以是野生型,或者不显示与野生型显著不同的pI的变体,并且另一种可以是更碱性或更酸性的。可替代地,改变每种单体,一种具有更强碱性且一种具有更强酸性。

[0285] pI变异体的优选组合示于图4中。如本文所概述和图中所示,这些变化相对于IgG1展示,但所有同型可以这种方式改变,以及同型杂合体。在重链恒定结构域来自IgG2-4的情况下,也可以使用R133E和R133Q。

[0286] 在一个实施方式中,例如在图15A和图15B形式中,pI变体的优选组合具有包括208D/295E/384D/418E/421D变体(在相对于人IgG1时是N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D)的一个单体(负Fab侧)和包括带正电的scFv接头的第二单体(正scFv侧),包含$(GKPGS)_4$(SEQ ID NO: XXX)。然而,如本领域的技术人员将理解的,第一单体包含CH1结构域,其包含

位置208。因此,在不包含CH1结构域的构建体(例如,针对不在所述结构域之一上利用CH1结构域的抗体,例如以双scFv形式或“单臂”形式,如图52B、52C或52D所描绘的形式)中,优选的负pI变体Fc组包含295E/384D/418E/421D变体(在相对于人IgG1时是Q295E/N384D/Q418E/N421D)。

[0287] 因此,在一些实施方式中,一个单体具有来自图4的一组取代并且另一个单体具有带电接头(呈带电荷的scFv接头的形式,因为所述单体包括如形式所指示的scFv或带电荷的结构域接头,所述带电荷的结构域接头可以选自图5中所描绘的那些)。

[0288] 3. 同种型变体

[0289] 另外,本文所述的抗体的许多实施方式依赖于将来自一种IgG同种型的特定位置的pI氨基酸“引进”另一种IgG同种型中,从而减少或排除变体中引入非所需免疫原性的可能性。在美国公开2014/0370013的图21中示出了多种这些变体,所述美国公开特此通过引用并入。也就是说,出于多种原因,IgG1是治疗性抗体的常用同种型,包含高效应子功能。然而,IgG1的重链恒定区具有比IgG2的重链恒定区更高的pI(8.10相对于7.31)。通过将特定位置的IgG2残基引入IgG1主链中,使得所得单体的pI降低(或提高)且另外展现出较长的血清半衰期。例如,IgG1具有位置137处的甘氨酸(pI为5.97),并且IgG2具有谷氨酸(pI为3.22);输入谷氨酸将影响所得蛋白质的pI。如下文所描述的,通常需要多个氨基酸取代来显著影响变体抗体的pI。然而,应注意,如下文所论述,IgG2分子中的均一变化使得血清半衰期延长。

[0290] 在其它实施方式中,产生非同型氨基酸变化,以降低所得蛋白质的总体电荷状态(例如通过将较高pI氨基酸变为较低pI氨基酸),或允许结构适应稳定性等,如下文更进一步描述。

[0291] 另外,通过对重链和轻链恒定结构域进行pI工程化,可以发现异二聚体中的各个单体发生显著变化。如本文所论述,使两种单体的pI相差至少0.5可以允许通过离子交换色谱或等电点聚焦或对等电点敏感的其它方法来实现分离。

[0292] 4. 计算pI

[0293] 每种单体的pI可以取决于变体重链恒定结构域的pI和总单体的pI,总单体包括变体重链恒定结构域和融合配偶体。因此,在一些实施方式中,使用美国公开2014/0370013中的图19的图表,基于变异体重链恒定结构域计算pI变化:基于变体重链恒定结构域计算pI变化。如本文所讨论的,要工程化哪个单体通常由Fv和支架区的固有pI来决定。可替代地,可以比较每个单体的pI。

[0294] 5. 还赋予更好的FcRn体内结合的pI变体

[0295] 在pI变体降低单体pI的情况下,其可以具有改善体内血清滞留时间的附加益处。

[0296] 虽然仍在审查中,但是据信,Fc区在体内具有较长的半衰期,因为在核内体中以pH 6与FcRn的结合螯合了Fc(Ghetie和Ward, 1997《今日免疫学(Immunol Today.)》18(12):592-598,所述文献特此以引用方式整体并入)。核内体区室然后使Fc循环到细胞表面。一旦隔室向胞外空间敞开,则较高pH(约7.4)诱导Fc释放回到血液中。Dall’Acqua等人表明,在小鼠中,在pH 6和pH 7.4的FcRn结合增强的Fc突变异体实际上具有减小的血清浓度以及与野生型Fc相同的半衰期(Dall’Acqua等人,2002,《免疫学杂志》169:5171-5180,此文献完全并入本文供参考)。据认为,在pH为7.4时FcRn的Fc的增加的亲和力阻止将Fc释放回到血

液中。因此,增加Fc体内半衰期的Fc突变理想地增强了较低pH下的FcRn结合,同时仍允许Fc在较高pH下释放。在6.0-7.4的pH范围内,氨基酸组胺酸改变了其电荷状态。因此,在Fc/FcRn复合物中的重要位置处发现His残基不足为奇。

[0297] 最近,已经提出,带具有较低等电点的可变区的抗体还可以具有较长的血清半衰期(Igawa等人, 2010《蛋白质工程设计与选择(PEDS)》23(5): 385-392,所述文献以引用方式整体并入)。然而,对其机制仍知之甚少。而且,可变区因抗体而有所不同。具有降低的pI和延长的半衰期的恒定区变体将会提供更具模块化的方法来提高抗体的药代动力学性质,如本文所描述的。

[0298] C. 用于额外功能的额外Fc变体

[0299] 除了上文所讨论的异二聚化变体之外,存在出于各种原因可以作出的许多有用的Fc氨基酸修饰,包含但不限于更改与一个或多个Fcγ R受体的结合、更改与FcRn受体的结合等,如以下所讨论的。

[0300] 因此,本文提供的抗体(异源二聚体以及同源二聚体)可以包含具有或不具有本文概述的异二聚化变体(例如,pI变体和空间变体)的此类氨基酸修饰。每组变体可以独立地并且任选地包括任何特定的异二聚体蛋白或排除任何特定的异二聚体蛋白。

[0301] 1. Fcγ R变体

[0302] 因此,可以制造多个有用的Fc取代来改变与一种或多种Fcγ R受体的结合。在某些实施方式中,本发明抗体包含更改与一种或多种Fcγ R受体的结合的修饰(即,“Fcγ R变体”)。导致增加的结合以及减少的结合的取代可以是有用的。例如,已知增加与Fcγ RIIIa的结合通常导致ADCC增加(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性;其中表达Fcγ R的非特异性毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并且随后引起靶细胞裂解的细胞介导的反应)。类似地,在一些情况下,与Fcγ RIIb(一种抑制性受体)的结合减少也可能是有利的。可用于本文所述的抗体的氨基酸取代包含在美国专利第8,188,321号(具体地图41)和第8,084,582号以及美国公开申请号20060235208和20070148170中所列举的氨基酸取代,所有所述美国专利以引用方式整体明确并入本文,特别是针对其中公开的变体明确并入本文。可以使用的特定变体包括但不限于236A、239D、239E、332E、332D、239D/332E、267D、267E、328F、267E/328F、236A/332E、239D/332E/330Y、239D/332E/330L、243A、243L、264A、264V和299T。

[0303] 另外,如USSN 12/341,769中具体公开的,存在可用于增加与FcRn受体的结合和延长血清半衰期的另外Fc取代,该专利在此以引用方式整体并入本文中,所述另外Fc取代包括但不限于434S、434A、428L、308F、259I、428L/434S、259I/308F、436I/428L、436I或V/434S、436V/428L和259I/308F/428L。此类修饰可以包含在本发明抗体的一个或两个Fc结构域中。

[0304] 2. 消融变体

[0305] 类似地,另一类功能变体是“Fcγ R消融变体”或“Fc敲出(FcKO或KO)”变体。在这些实施方式中,在一些治疗应用中,期望减少或除去Fc结构域与一种或多种或全部Fcγ 受体(例如Fcγ R1、Fcγ RIIa、Fcγ RIIb、Fcγ RIIIa等)的正常结合以避免额外作用机制。也就是说,例如,在许多实施方式中,特别是在使用与CD3单价地结合的双特异性抗体中,通常期望的是消融Fcγ RIIIa结合以消除或显著降低ADCC活性。其中一个Fc结构域包含一个或多个Fcγ 受体消融变体。图14中描绘了这些消融变体,并且各自可以独立且任选地包含在内或

不包含在内,优选方面利用了选自由以下组成的组的消融变体:G236R/L328R、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G和E233P/L234V/L235A/G236del。应该注意的是,本文提及的消融变体消融Fcγ R结合,但通常不消融FcRn结合。

[0306] 如本领域所已知的,人IgG1的Fc结构域具有与Fcγ受体的最高结合,并且因此,在异二聚抗体的主链中的恒定结构域(或Fc结构域)为IgG1时,可以使用消融变体。例如,可替代地或除了IgG1背景下的消融变体之外,糖基化位置297处的突变(通常突变成A或S)可以显著消融与Fcγ RIIIa的结合。人IgG2和IgG4具有与Fcγ受体天然减少的结合,并且因此那些主链可以在有或没有消融变体的情况下使用。

[0307] D. 异二聚体与Fc变体的组合

[0308] 如本领域技术人员将理解的,所有所述异二聚化变体(包括偏斜和/或pI变体)都可以任选地并且独立地以任何方式组合,只要其保留其“链性”或“单体划分”。在一些实施方式中,本文提供的异二聚抗体包括异二聚化偏斜变体、同配pI取代和FcKO变体的组合,如图4所示。另外,所有这些变体可以组合成异二聚化形式中的任一种异二聚化形式。

[0309] 在pI变体的情况下,虽然图中显示了特别有用的实施方式,但是可以根据改变两种单体之间的pI差异以促进纯化的基本规则来产生其它组合。

[0310] 另外,任何异二聚化变体,偏斜和pI,也独立地并且任选地与Fc消融变体、Fc变体、FcRn变体组合,如本文总体概述的。

[0311] 包含在异二聚体1+1 Fab-scFv-Fc和2+1 Fab_2-scFv-Fc形式抗体的一些实施方式中的变体的示例性组合包含在图4中。在某些实施方式中,抗体是异二聚1+1 Fab-scFv-Fc或2+1 Fab_2-scFv-Fc形式的抗体,如图15A和图15B所示。

[0312] E. 抗ENPP3 x 抗CD3双特异性抗体

[0313] 在另一方面中,本文提供了抗ENPP3 x 抗CD3(本文也称为“αENPP3 x αCD3”)双特异性抗体。此类抗体包括至少一个ENPP3结合结构域和至少一个CD3结合结构域。在一些实施方式中,本文提供的双特异性αENPP3 x αCD3在表达ENPP3的肿瘤部位选择性地免疫应答。

[0314] 应注意,除非本文另外说明,以名称列出的抗原的顺序不赋予结构;也就是说,ENPP3 X CD3 1 + 1 Fab-scFv-Fc抗体可以具有与ENPP3或CD3结合的scFv,但是在一些情况下,所述顺序指定了如所指示结构。

[0315] 如本文中更全面地概述的,ABD的这些组合可以呈如下文概述的各种形式,通常是一个ABD呈Fab形式并且另一个呈scFv形式的组合。用于本文提供的双特异性抗体的例示性形式包括1+1 Fab-scFv-Fc和2+1 Fab2-scFv-Fv形式(参见例如,图15A和图15B)。其它有用的抗体形式包括但不限于“mAb-Fv”、“mAb-scFv”、“中央-Fv”、“单臂scFv-mAb”、“scFv-mAb”、“双重scFv”和“三叉”形式的抗体,如图52A至图52K中所公开。

[0316] 另外,通常,ABD中的一个ABD包括如本文概述的在从N末端到C末端的取向上为VH-scFv接头-VL或VL-scFv接头-VH的scFv。根据形式,其它ABD中的一个或两个通常是包括一个蛋白质链上的VH结构域(通常作为重链的组分)和另一个蛋白质链上的VL(通常作为轻链的组分)的Fab。

[0317] 如本领域的技术人员将理解的,任何一组6个CDR或VH和VL结构域可以呈scFv形式

或Fab形式,所述形式然后被添加到重恒定结构域和轻恒定结构域,其中重恒定结构域包括变体(包含在CH1结构域以及Fc结构域内)。序列表中含有的scFv序列利用特定带电荷接头,而如本文概述的,可以使用不带电或其它带电接头,包含图5和图6中所描述的那些。

[0318] 另外,如上文所讨论的,序列表中使用的用于鉴定CDR的编号是Kabat,然而,可以使用不同的编号,所述不同的编号将改变如表2所示的CDR的氨基酸序列。

[0319] 对于本文所列出的所有可变重和轻结构域,可以制备另外的变体。如本文概述的,在一些实施方式中,一组6个CDR可以具有0个、1个、2个、3个、4个或5个氨基酸修饰(其中氨基酸取代特别有用)以及可变重和轻结构域的框架区的变化,只要框架(除CDR之外)保持与选自图1中的美国专利第7,657,380号中列出的那些序列的人种系序列至少约80%、85%或90%同一性,所述美国专利的附图和图例通过引用整体并入本文。因此,例如,如本文所描述的相同CDR可以与来自人种系序列的不同框架序列组合,只要框架区保持与选自图1中的美国专利号7,657,380中列出的那些序列的人种系序列至少80%、85%或90%同一性。可替代地,CDR可以具有氨基酸修饰(例如,一组CDR中的1个、2个、3个、4个或5个氨基酸修饰(也就是说,只要一组6个CDR的变化的总数量小于6个氨基酸修饰,CDR就可以被修饰,其中CDR的任何组合被改变;例如,vlCDR1中可以存在一个改变,vhCDR2中可以存在两个改变,vhCDR3中不存在改变等)),并且具有框架区改变,只要框架区与选自图1中的美国专利号7,657,380中列出的那些序列的人种系序列保持至少80%、85%或90%同一性。

[0320] 抗ENPP3 x 抗CD3双特异性抗体可包括任何合适的CD3 ABD,包括本文所述的那些(参见例如图10A至图10F)。在一些实施方式中,抗ENPP3 x 抗CD3双特异性抗体的CD3 ABD包括本文提供的CD3 ABD的可变重链结构域和可变轻链结构域,包括图10A至图10F和序列表中描述的那些。在一些实施方式中,所述CD3 ABD包含以下CD3 ABD中的任何CD3 ABD的可变重链结构域和可变轻链结构域:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)。在例示性实施方式中,所述CD3 ABD是以下CD3 ABD中的一个CD3 ABD:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)或它们的变体。

[0321] 抗ENPP3 x 抗CD3双特异性抗体可包含任何合适的ENPP3 ABD,包括本文所述的那些(参见例如,图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。在一些实施方式中,抗ENPP3 x 抗CD3双特异性抗体的ENPP3 ABD包含本文提供的ENPP3 ABD的可变重链结构域和可变轻结构域,包括在图12、图13A至图13B和图14A至图14I和序列表中描述的那些。在一些实施方式中,ENPP3 ABD包含以下ENPP3 ABD中的一个ENPP3 ABD的可变重链结构域和可变轻链结构域:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、 H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。在例示性实施方式中,ENPP3 ABD是以下ENPP3 ABD中的一个ENPP3 ABD:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3]

H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、 H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)或它们的变体。

[0322] F. 抗SSTR2 x 抗CD3双特异性抗体

[0323] 在另一方面中,本文提供了抗SSTR2 x 抗CD3(本文也称为“αSSTR2 x αCD3”)双特异性抗体。此类抗体包括至少一个SSTR2结合结构域和至少一个CD3结合结构域。在一些实施方式中,本文提供的双特异性αSSTR2 x αCD3在表达SSTR2的肿瘤部位选择性地进行免疫应答。

[0324] 应注意,除非本文另外说明,以名称列出的抗原的顺序不赋予结构;也就是说,SSTR2 X CD3 1 + 1 Fab-scFv-Fc抗体可以具有与SSTR2或CD3结合的scFv,但是在一些情况下,所述顺序指定了如所指示结构。

[0325] 如本文中更全面地概述的,ABD的这些组合可以呈如下文概述的各种形式,通常是一个ABD呈Fab形式并且另一个呈scFv形式的组合。用于本文提供的双特异性抗体的例示性形式包括1+1 Fab-scFv-Fc和2+1 Fab2-scFv-Fv形式(参见例如,图15A和图15B)。其它有用的抗体形式包括但不限于“mAb-Fv”、“mAb-scFv”、“中央-Fv”、“单臂scFv-mAb”、“scFv-mAb”、“双重scFv”和“三叉”形式的抗体,如图52A至图52K中所公开。

[0326] 另外,通常,ABD中的一个ABD包括如本文概述的在从N末端到C末端的取向上为VH-scFv接头-VL或VL-scFv接头-VH的scFv。根据形式,其它ABD中的一个或两个通常是包括一个蛋白质链上的VH结构域(通常作为重链的组分)和另一个蛋白质链上的VL(通常作为轻链的组分)的Fab。

[0327] 如本领域的技术人员将理解的,任何一组6个CDR或VH和VL结构域可以呈scFv形式或Fab形式,所述形式然后被添加到重恒定结构域和轻恒定结构域,其中重恒定结构域包括变体(包含在CH1结构域以及Fc结构域内)。序列表中含有的scFv序列利用特定带电荷接头,而如本文概述的,可以使用不带电或其它带电接头,包含图5和图6中所描述的那些。

[0328] 另外,如上文所讨论的,序列表中使用的用于鉴定CDR的编号是Kabat,然而,可以使用不同的编号,所述不同的编号将改变如表2所示的CDR的氨基酸序列。

[0329] 对于本文所列出的所有可变重和轻结构域,可以制备另外的变体。如本文概述的,在一些实施方式中,一组6个CDR可以具有0个、1个、2个、3个、4个或5个氨基酸修饰(其中氨基酸取代特别有用)以及可变重和轻结构域的框架区的变化,只要框架(除CDR之外)保持与选自图1中的美国专利第7,657,380号中列出的那些序列的人种系序列至少约80%、85%或90%同一性,所述美国专利的附图和图例通过引用整体并入本文。因此,例如,如本文所描述的相同CDR可以与来自人种系序列的不同框架序列组合,只要框架区保持与选自图1中的美国专利号7,657,380中列出的那些序列的人种系序列至少80%、85%或90%同一性。可替代地,CDR可以具有氨基酸修饰(例如,一组CDR中的1个、2个、3个、4个或5个氨基酸修饰(也就是说,只要一组6个CDR的变化的总数量小于6个氨基酸修饰,CDR就可以被修饰,其中CDR的任何组合被改变;例如,vlCDR1中可以存在一个改变,vhCDR2中可以存在两个改变,vhCDR3中

不存在改变等)),并且具有框架区改变,只要框架区与选自图1中的美国专利号7,657,380中列出的那些序列的人种系序列保持至少80%、85%或90%同一性。

[0330] 抗SSTR2 x 抗CD3双特异性抗体可包括任何合适的CD3 ABD,包括本文所述的那些(参见例如图10A至图10F)。在一些实施方式中,抗SSTR2 x 抗CD3双特异性抗体的CD3 ABD包括本文提供的CD3 ABD的可变重链结构域和可变轻链结构域,包括图10A至图10F和序列表中描述的那些。在一些实施方式中,所述CD3 ABD包含以下CD3 ABD中的任何CD3 ABD的可变重链结构域和可变轻链结构域:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)。在例示性实施方式中,所述CD3 ABD是以下CD3 ABD中的一个CD3 ABD:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)或它们的变体。

[0331] 抗SSTR2 x 抗CD3双特异性抗体可包含[αSSTR2] H1.24_L1.30(图63)的可变重链结构域和可变轻结构域,或其变体。

[0332] G. 本发明的有用形式

[0333] 如本领域的技术人员将理解的并且如下文更全面地讨论的,本文提供的异源二聚双特异性抗体可以采取各种配置,如图1中总体上描绘的。一些图描绘“单端”构形,其中分子的一个“臂”上存在一种类型的特异性并且另一个“臂”存在不同特异性。其它附图描绘了“双端”配置,其中分子的“顶部”有至少一种类型的特异性并且分子的“底部”有一种或多种不同的特异性。因此,在一些实施方式中,本文所述的抗体针对共接合不同的第一和第二抗原的新颖免疫球蛋白组合物。

[0334] 如本领域的技术人员将理解的,本文所述的异二聚形式可以具有不同的化合价并且可以是双特异性的。也就是说,本文所述的异二聚抗体可以是二价的和双特异性的,其中一个靶肿瘤抗原(例如,CD3)由一个结合结构域结合并且另一个靶肿瘤抗原(例如,ENPP3)由第二结合结构域结合。异二聚抗体还可以是三价的和双特异性的,其中第一抗原由两个结合结构域结合并且第二抗原由第二结合结构域结合。如本文概述的,当CD3是靶抗原之一时,优选的是CD3仅单价地结合,以减少潜在的副作用。

[0335] 本文所述的抗体利用抗CD3抗原结合结构域与抗ENPP3结合结构域的组合。如本领域的技术人员将理解的,可以使用如在任何图中所描绘的抗CD3 CDR、抗CD3可变轻链和可变重链结构域、Fab和scFv的任何集合。类似地,可以使用任何抗ENPP3抗原结合结构域,无论是否可以使用如在任何图(例如,图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)中所描绘的CDR、可变轻和可变重链结构域、Fab和scFv,任选地并且独立地以任何组合组合。

[0336] 1. 1+1 Fab-scFv-Fc形式

[0337] 发现尤其用于本文所述的抗体中的一种异二聚体支架是“1+1 Fab-scFv-Fc”或“开瓶器”形式,如图15A所示,具有CD3结合结构域和肿瘤靶抗原(ENPP3)结合结构域的例示性组合。在该实施方式中,抗体的一个重链单体含有单链Fv(“scFv”,如下定义)和Fc结构域。scFv包含可变重链结构域(VH1)和可变轻链结构域(VL1),其中VH1使用可带电荷的scFv接头附接至VL1(参见例如图5)。scFv使用结构域接头附接至重链(参见例如,图6)。另一个重链单体是“常规”重链(VH-CH1-铰链-CH2-CH3)。1+1 Fab-scFv-Fc还包含与VH-CH1相互作

用形成Fab的轻链。此结构在本文中有时被称为“开瓶器”形式,这是由于与开瓶器具有大致视觉相似度。通过使用恒定区(例如,Fc结构域、CH1结构域和/或铰链区)中的如下文更全面地描述的促进异二聚抗体形成的氨基酸变体(例如,上文所讨论的异二聚化变体),这两个重链单体被放在一起。

[0338] 本发明的“1+1 Fab-scFv-Fc”形式具有若干个明显优势。如本领域所已知的,依赖于两个scFv构建体的抗体类似物常常具有稳定性和聚合问题,在本文所述的抗体中可以通过添加“常规”的重链和轻链配对来缓解所述稳定性和聚合问题。另外,与依赖于两条重链和两条轻链的形式相反,不存在重链和轻链配对不当(例如重链1与轻链2配对等)的问题。

[0339] 本文概述的许多实施方式通常依赖于包括第一单体的1+1 Fab-scFv-Fc或“开瓶器”形式抗体,所述第一单体包括scFv,所述scFv包括使用scFv接头(在许多但并非所有情况下,带电)进行共价附接的可变重链结构域和可变轻结构域,其中scFv通常通过结构域接头共价附接至第一Fc结构域的N末端。结构域接头可以是带电荷的或不带电荷的以及外源的或内源的(例如,天然铰链结构域的全部或部分)。可以使用任何合适的接头将scFv附接至第一Fc结构域的N末端。在一些实施方式中,结构域接头选自图6中的结构域接头。1+1 Fab-scFv-Fc形式或“开瓶器”形式的第二单体是重链,并且组合物还包含轻链。

[0340] 通常,在许多优选的实施方式中,scFv是与CD3结合的结构域,并且Fab形成ENPP3结合结构域。在图15A中描绘了1+1 Fab-scFv-Fc形式的例示性抗ENPP3 x 抗CD3双特异性抗体。1+1 Fab-scFv-Fc形式的例示性抗ENPP3 x 抗CD3双特异性抗体在图17A至图17C和图18A至图18C中描绘。

[0341] 另外,本文所述的抗体的Fc结构域通常包含偏斜变体(例如,如图3和图9中所示的一组氨基酸取代,其中特别有用的偏斜变体选自由以下组成的组:S364K/E357Q:L368D/K370S;L368D/K370S:S364K;L368E/K370S:S364K;T411T/E360E/Q362E:D401K;L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V:T366W和T366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354C),任选地消融变体(包含如图3中所示的那些),任选地带电scFv接头(包含如图5中所示的那些),并且重链包括pI变体(包含如图4中所示的那些)。

[0342] 在某些实施方式中,1+1 Fab-scFv-Fc支架形式包含第一单体,所述第一单体包含scFv-结构域接头-CH2-CH3单体;第二单体,所述第二单体包含第一可变重链结构域-CH1-铰链-CH2-CH3单体;以及第三单体,所述第三单体包含第一可变轻链结构域。在一些实施方式中,第一单体的CH2-CH3是第一变体Fc结构域,并且第二单体的CH2-CH3是第二变体Fc结构域。在一些实施方式中,scFv包含形成CD3结合部分的scFv可变重链结构域和scFv可变轻结构域。在某些实施方式中,scFv可变重链结构域和scFv可变轻结构域使用scFv接头(带电,在许多但不是所有情况下)进行共价连接。参见,例如,图5)。在一些实施方式中,第一可变重链结构域和第一可变轻结构域形成ENPP3结合结构域。用于1+1 Fab-scFv-Fc ENPP3 x CD3双特异性抗体形式的特别有用的ENPP3和CD3组合在图17A至图17C和图18A至图18C 中公开,并且包括:ENPP3 H16-1.93 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 H16-7.8 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1 [ENPP3] H1L1 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1[ENPP3] H1.8 L1 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1[ENPP3] H1.8 L1.33 x CD3 H1.30 L1.47、和ENPP3 H1.8 L1.77 x CD3 H.130 L1.47。在一些实施方式中,1+1 Fab-scFv-Fc形式包含偏斜变体、pI变体和消融变体。因此,一些实施方式包含1+1 Fab-scFv-Fc形式,所述形式包括:a)第一单体(“scFv

单体"),所述第一单体包括带电scFv接头(图5的+H序列在一些实施方式中是优选的)、偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K以及与如本文概述的与CD3结合的scFv;b)第二单体("Fab单体"),所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K以及可变重链结构域;以及c)轻链,所述轻链包含可变轻链结构域(VL)和恒定轻链结构域(CL),其中编号是根据EU编号进行的。可变重链结构域和可变轻链结构域构成ENPP3结合部分。尤其用于这些实施方式中的CD3结合结构域序列包括但不限于H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31,以及如图10A至图10F所示的那些。尤其用于这些实施方式中的ENPP3结合结构域序列包括但不限于AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。用于1+1 Fab_2-scFv-Fc形式抗体的特别有用的ENPP3和CD3序列组合包括例如ENPP3 H16-1.93 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 H16-7.8 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1 [ENPP3] H1L1 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1[ENPP3] H1.8 L1 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1[ENPP3] H1.8 L1.33 x CD3 H1.30 L1.47、和ENPP3 H1.8 L1.77 x CD3 H.130 L1.47。

[0343] 与CD3结合的scFv的示例性可变重和轻结构域包含在图10A至图10F中。与ENPP3结合的Fv的示例性可变重和轻结构域包含在图12、图13A至图13B和图14A至图14I中。在例示性实施方式中,1+1 Fab-scFv-Fc ENPP3 x CD3双特异性抗体的ENPP3结合结构域包含以下ENPP3结合结构域中的一个ENPP3结合结构域的VH和VL:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1(3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。在一个实施方式中,1+1 Fab-scFv-Fc ENPP3 x CD3双特异性抗体的CD3结合结构域包括以下CD3结合结构域中的一个CD3结合结构域的VH和VL:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)。用于1+1 Fab-scFv-Fc ENPP3 x CD3双特异性抗体形式的特别有用的ENPP3和CD3组合在图17A至图17C和图18A至图18C 中公开,并且包括:ENPP3 H16-1.93 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 H16-7.8 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1 [ENPP3] H1L1 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1[ENPP3] H1.8 L1 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1[ENPP3] H1.8 L1.33 x CD3 H1.30 L1.47、和ENPP3 H1.8 L1.77 x CD3 H.130 L1.47。

[0344] 在一些实施方式中,1+1 Fab-scFv-Fc形式包含偏斜变体、pI变体、消融变体和

FcRn变体。因此,一些实施方式包含1+1 Fab-scFv-Fc形式,所述形式包括:a)第一单体(“scFv单体”),所述第一单体包括带电荷的scFv接头(图6的+H序列在一些实施方式中是优选的)、偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变体M428L/N434S以及与如本文概述的CD3结合的scFv;b)第二单体(“Fab单体”),所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变体M428L/N434S以及可变重链结构域;以及c)轻链,所述轻链包含可变轻链结构域(VL)和恒定轻链结构域(CL),其中编号是根据EU编号进行的。可变重链结构域和可变轻结构域构成ENPP3结合结构域。尤其用于这些实施方式中的CD3结合结构域序列包括但不限于H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31,以及如图10A至图10F所示的那些。尤其用于这些实施方式中的ENPP3结合结构域序列包括但不限于AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1(3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80,如在图12、图13A至图13B和图14A至图14I中所描绘。用于1+1 Fab_2-scFv-Fc形式抗体的特别有用的ENPP3和CD3序列组合包括例如如在图17A至图17C和图18A至图18C中所公开的并且包含:ENPP3 H16-1.93 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 H16-7.8 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1 [ENPP3] H1L1 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1[ENPP3] H1.8 L1 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 AN1[ENPP3] H1.8 L1.33 x CD3 H1.30 L1.47、和ENPP3 H1.8 L1.77 x CD3 H.130 L1.47。

[0345] 图7A至图7D示出了在1+1 Fab-scFv-Fc形式抗体中有用的一些例示性Fc结构域序列。图7A至图7D中描绘的“单体1”序列通常是指“Fab-Fc重链”的Fc结构域,而“单体2”序列是指“scFv-Fc重链”的Fc结构域。此外,图9提供了可用于此形式的有用CL序列。

[0346] 在一些实施方式中,本文所描绘的任何VH和VL序列(包含附图和序列表中所描绘的所有VH和VL序列,包含针对ENPP3的序列)可以使用附图和序列表中所示的任何抗CD3 scFv序列添加到图7A至图7D的开瓶器主链形式作为“Fab侧”。

[0347] 对于来自图7A的开瓶器主链1(任选地包含428L/434S变体),尤其用于这些实施方式中的CD结合结构域序列包含但不限于CD3结合结构域抗CD3 H1.30_L1.47)、抗CD3 H1.32_L1.47、抗CD3 H1.89_L1.47、抗CD3 H1.90_L1.47、抗CD3 H1.33_L1.47和抗CD3 H1.31_L1.47,以及在图10A至图10F中所描绘的那些,其作为图7A至图7D中所示的主链的scFv侧连接。

[0348] 图17A至图17C和图18A至图18C中公开了特别有用的ENPP3和CD3序列组合(可选地包括428L/434S变体)。

[0349] 2. mAb-Fv

[0350] 尤其用于本文所述的抗体中的一种异二聚支架是mAb-Fv形式。在此实施方式中,所述形式依赖于使用“额外”可变重链结构域与一个单体的C末端连接,以及“额外”可变轻链结构域与另一单体的C末端连接,因此形成第三抗原结合结构域,其中所述两种单体的

Fab部分结合ENPP3且“额外”scFv结构域结合CD3。

[0351] 在这个实施方式中,第一单体包含第一重链,其包含第一可变重链结构域和包括第一Fc结构域的第一重链恒定结构域,其中第一可变轻链结构域使用结构域接头共价附接到第一Fc结构域的C末端(VH1-CH1-铰链-CH2-CH3-[任选的接头]-VL2)。第二单体包含第二可变重链结构域,其属于包括第二Fc结构域的第二重链恒定结构域,和第三可变重链结构域,其使用结构域接头共价连接到第二Fc结构域的C末端(vh1-CH1-铰链-CH2-CH3-[任选的接头]-VH2)。两个C末端附接的可变结构域构成与CD3结合的Fv(因为具有二价CD3结合是较不优选的)。这个实施方式进一步利用包含可变轻链结构域和轻链恒定结构域的轻链,所述轻链与重链缔合而形成结合ENPP3的两个相同Fab。就本文的许多实施方式来说,这些构建体包含如所期望并且本文所述的偏斜变体、pI变体、消融变体、另外的Fc变体等。

[0352] 本文所述的抗体提供mAb-Fv形式,其中CD3结合结构域序列如图10A至图10F所示。本文所述的抗体提供mAb-Fv形式,其中ENPP3结合结构域序列如图12、图13A至图13B和图14A至图14I所示。

[0353] 此外,mAb-Fv形式的Fc结构域包含偏斜变异体(例如,图3和图8中所示的一组氨基酸取代,且特别适用的偏斜变异体选自由以下组成的组:S364K/E357Q:L368D/K370S;L368D/K370S:S364K;L368E/K370S:S364K;T411T/E360E/Q362E:D401K;L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V:T366W和T366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354C);任选地消融变异体(包括图3中所示的那些);任选地带电荷的scFv接头(包括图5中所示的那些);以及包含pI变异体的重链(包括图2中所示的那些)。

[0354] 在一些实施方式中,mAb-Fv形式包含偏斜变体、pI变体和消融变体。因此,一些实施方式包含mAb-Fv形式,所述形式包括:a)第一单体,所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K和第一可变重链结构域以及第二可变重链结构域,所述第一可变重链结构域与轻链的第一可变轻结构域构成与ENPP3结合的Fv;b)第二单体,所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K和第一可变重链结构域以及第二可变轻链,所述第一可变重链结构域与第一可变轻结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv,所述第二可变轻链与第二可变重链结构域一起形成与CD3结合的Fv(ABD);以及c)轻链,所述轻链包括第一可变轻结构域和恒定轻结构域。

[0355] 在一些实施方式中,mAb-Fv形式包含偏斜变体、pI变体、消融变体和FcRn变体。因此,一些实施方式包含mAb-Fv形式,所述形式包括:a)第一单体,所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变体M428L/N434S和第一可变重链结构域以及第二可变重链结构域,所述第一可变重链结构域与轻链的第一可变轻结构域构成与ENPP3结合的Fv;b)第二单体,所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变体M428L/N434S和第一可变重链结构域以及第二可变轻链,所述第一可变重链结构域与第一可变轻结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv,所述第二可变轻链与第一单体的第二可变重链结构域一起形成与CD3结合的Fv(ABD);以及c)轻链,所述轻链包括第一可变轻结构域和恒定轻结构域。

[0356] 3. mAb-scFv

[0357] 尤其用于本文所述的抗体中的一种异二聚支架是mAb-scFv形式。在此实施方式中,所述形式依赖于使用scFv与单体之一的C末端附接,从而形成第三抗原结合结构域,其中两个单体的Fab部分与ENPP3结合并且“额外”scFv结构域与CD3结合。因此,第一单体包含第一重链(包含可变重链结构域和恒定结构域),且C末端共价连接scFv,其包括scFv可变轻链结构域、scFv接头以及scFv可变重链结构域,呈任一取向。这个实施方式进一步利用包含可变轻链结构域和轻链恒定结构域的轻链,所述轻链与重链缔合而形成结合ENPP3的两个相同Fab。就本文的许多实施方式来说,这些构建体包含如所期望并且本文所述的偏斜变体、pI变体、消融变体、另外的Fc变体等。

[0358] 本文所述的抗体提供mAb-scFv形式,其中CD结合结构域序列如图10A至图10F所示,并且ENPP3结合结构域序列如图12、图13A至图13B和图14A至图14I所示。

[0359] 此外,mAb-scFv形式的Fc结构域包含偏斜变异体(例如,图1中所示的一组氨基酸取代,且特别适用的偏斜变异体选自由以下组成的群组:S364K/E357Q:L368D/K370S;L368D/K370S:S364K;L368E/K370S:S364K;T411T/E360E/Q362E:D401K;L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V:T366W和T366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354C);任选地消融变异体(包括图3中所示的那些);任选地带电荷的scFv接头(包括图5中所示的那些);以及包含pI变异体的重链(包括图2中所示的那些)。

[0360] 在一些实施方式中,mAb-scFv形式包含偏斜变体、pI变体和消融变体。因此,一些实施方式包含mAb-scFv形式,所述形式包括:a)第一单体,所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、可变重链结构域以及scFv结构域,所述可变重链结构域与共同轻链的可变轻结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv,所述scFv结构域与CD3结合;b)第二单体,所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K和可变重链结构域,所述可变重链结构域与共同轻链的可变轻结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv;以及c)共同轻链,所述共同轻链包括可变轻结构域和恒定轻结构域。

[0361] 在一些实施方式中,mAb-scFv形式包含偏斜变体、pI变体、消融变体和FcRn变体。因此,一些实施方式包括mAb-scFv形式,其包含:a)第一单体,其包含歪斜变异体S364K/E357Q、消融变异体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变异体M428L/N434S和可变重链结构域(其与共同轻链的可变轻链结构域一起构成结合到如本文所概述的ENPP3的Fv和结合到CD3的ScFv结构域);b)第二单体,其包含歪斜变异体L368D/K370S、pI变异体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变异体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变异体M428L/N434S和可变重链结构域(其与共同轻链的可变轻链结构域一起构成结合到如本文所概述的ENPP3的Fv);和c)共同轻链,其包含可变轻链结构域和轻链恒定结构域。

[0362] 4. 2+1 Fab_2-scFv-Fc形式

[0363] 发现尤其用于本文所述的抗体中的一种异二聚体支架是“2+1 Fab_2-scFv-Fc”形式(在之前的相关文件中也被称为“中央-scFv形式”),如图15B所示,具有CD3结合结构域和两个肿瘤靶抗原(ENPP3)结合结构域的例示性组合。在此实施方式中,所述形式依赖于插入的scFv结构域的使用,从而形成第三抗原结合结构域,其中两个单体的Fab部分与ENPP3结合,并且“额外的”scFv结构域与CD3结合。scFv结构域被插入Fc结构域与单体之一的CH1-Fv区之间,从而提供第三抗原结合结构域。例如,具有2+1 Fab2-scFv-Fc形式的ENPP3 x CD3

双特异性抗体在表达低水平的ENPP3的细胞环境中在诱导重定向T细胞细胞毒性方面是有效的。此外,如示例中所示,具有2+1 Fab2-scFv-Fc形式的ENPP3 x CD3双特异性抗体允许免疫应答的“微调”,因为此类抗体表现出各种各样的不同性质,这取决于所使用的ENPP3和/或CD3结合结构域。例如,此类抗体在对具有不同ENPP3表达的细胞的选择性、对于ENPP3表达性细胞的效力、引发细胞因子释放的能力以及对可溶性ENPP3的敏感性方面表现出差异。这些ENPP3抗体可用于例如治疗ENPP3相关癌症。

[0364] 在此实施方式中,一个单体包括第一重链,所述第一重链包括第一可变重链结构域、CH1结构域(以及任选的铰链)和Fc结构域,其中scFv包括scFv可变轻结构域、scFv接头和scFv可变重链结构域。scFv使用任选的结构域接头共价连接在重链恒定结构域的CH1结构域的C末端与第一Fc结构域的N末端之间(VH1-CH1-[任选的接头]-VH2-scFv接头-VL2-[包括铰链的任选的接头]-CH2-CH3,或scFv的相反取向VH1-CH1-[任选的接头]-VL2-scFv接头-VH2-[包括铰链的任选的接头]-CH2-CH3)。任选的接头可以是任何合适的肽接头,包括例如图6中包括的结构域接头。在一些实施方式中,任选的接头是铰链或其片段。另一个单体是标准Fab侧(即,VH1-CH1-铰链-CH2-CH3)。这个实施方式进一步利用包含可变轻链结构域和轻链恒定结构域的轻链,所述轻链与重链缔合而形成结合ENPP3的两个相同Fab。就本文的许多实施方式来说,这些构建体包含如所期望并且本文所述的偏斜变体、pI变体、消融变体、另外的Fc变体等。

[0365] 在一个实施方式中,2+1 Fab2-scFv-Fc形式抗体包含具有图10A至图10F或序列表中所描绘的CD3结合结构域序列的VH和VL的scFv。在一个实施方式中,2+1 Fab2-scFv-Fc形式抗体包含具有如图12、图13A至图13B和图14A至图14I和序列表中所示的ENPP3结合结构域的VH和VL的两个Fab。在例示性实施方式中,2+1 Fab2-scFv-Fc ENPP3 x CD3双特异性抗体的ENPP3结合结构域包含以下ENPP3结合结构域中的一个ENPP3结合结构域的VH和VL:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。在一个实施方式中,2+1 Fab2-scFv-Fc形式抗体的CD3结合结构域包括以下CD3结合结构域中的一个CD3结合结构域的VH和VL:H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)。用于2+1 Fab2-scFv-Fc形式抗体形式的特别有用的ENPP3和CD3组合在图19A至图19C、图20A至图20D、图21、图22A至图22C、图23A至图23E中公开,并且包括:ENPP3 H1.8 L1 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 H1.8 L1.33 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 H1.8 L1.77 x CD3 H1.30 L1.47、ENPP3 H16-7.8 x CD3 H1.32 L1.47、ENPP3 AN[ENPP3] H1L1 x CD3 H1.32 L1.47、ENPP3 H1.8 L1 x CD3 H1.32 L1.47、ENPP3 H1.8 L1.33 x CD3 H1.32 L1.47、ENPP3 H1.8 L1 x CD3 L1.47 H1.30、ENPP3 H1.8 L1 x CD3 L1.47 H1.32、ENPP3 H1.8 L1.33 x CD3 L1.47 H1.32、ENPP3 H1.8 L1.77 x CD3 L1.47 H1.32 、ENPP3 H1.8 L1 x CD3 L1.47 H1.89、ENPP3 H1.8 L1.33 x CD3 L1.47 H1.89、ENPP3 H1.8 L1.77

x CD3 L1.47 H1.89、ENPP3 H1.8 L1.33 x CD3 L1.47 H1.89、和ENPP3 H1.8 L1.77 x CD3 L1.47 H1.89。

[0366] 此外,2+1 Fab_2-scFv-Fc形式的Fc结构域包含偏斜变异体(例如,图1中所示的一组氨基酸取代,且特别适用的偏斜变异体选自由以下组成的群组:S364K/E357Q:L368D/K370S;L368D/K370S:S364K;L368E/K370S:S364K;T411T/E360E/Q362E:D401K;L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V:T366W和T366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354C);任选地消融变异体(包括图3中所示的那些);任选地带电荷的scFv接头(包括图5中所示的那些);以及包含pI变异体的重链(包括图2中所示的那些)。

[0367] 在一些实施方式中,2+1 Fab_2-scFv-Fc形式抗体包含偏斜变体、pI变体和消融变体。因此,一些实施方式包含2+1 Fab_2-scFv-Fc形式,所述形式包括:a)第一单体(Fab-scFv-Fc侧),所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K和可变重链结构域,所述可变重链结构域与共用轻链的可变轻链结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv和与CD3结合的scFv结构域;b)第二单体(Fab-Fc侧),所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K和可变重链结构域,所述可变重链结构域与共用轻链的可变轻链结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv;以及c)轻链,所述轻链包括可变轻结构域和恒定轻结构域,其中编号是根据EU编号进行的。在一些实施方式中,每个单体上的共同轻链和可变重链结构域形成ENPP3结合结构域。尤其用于这些实施方式中的CD3结合结构域序列包括但不限于H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31,以及如图10A至图10F所示的那些。尤其用于这些实施方式中的ENPP3结合结构域序列包括但不限于AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80,如在图12、图13A至图13B和图14A至图14I中所描绘。

[0368] 在一些实施方式中,2+1 Fab_2-scFv-Fc形式抗体包含偏斜变体、pI变体、消融变体和FcRn变体。因此,一些实施方式包含2+1 Fab_2-scFv-Fc形式,所述形式包括:a)第一单体(Fab-scFv-Fc侧),所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变体M428L/N434S和可变重结构域,所述可变重结构域与共用轻链的可变轻链结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv和与CD3结合的scFv结构域;b)第二单体(Fab-Fc侧),所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变体M428L/N434S和可变重结构域,所述可变重结构域与共用轻链的可变轻链结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv;以及c)轻链,所述轻链包括可变轻结构域和恒定轻结构域,其中编号是根据EU编号进行的。在一些实施方式中,每个单体上的共同轻链和可变重链结构域形成ENPP3结合结构域。尤其用于这些实施方式中的CD3结合结构域序列包括但不限于H1.30_L1.47、

H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31,以及如图10A至图10F所示的那些。尤其用于这些实施方式中的ENPP3结合结构域序列包括但不限于AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80,如在图12、图13A至图13B和图14A至图14I中所描绘。

[0369] 图8A至图8C示出了一些示例性Fc结构域序列,所述Fc结构域序列可用于2+1 Fab_2-scFv-Fc形式。图8A至图8C中描绘的“单体1”序列通常是指“Fab-Fc重链”的Fc结构域,而“单体2”序列是指“Fab-scFv-Fc重链”的Fc结构域。此外,图9提供了可用于此形式的有用CL序列。

[0370] 5. 中央-Fv

[0371] 尤其用于本文所述的抗体中的一种异二聚支架是中央-Fv形式。在此实施方式中,所述形式依赖于使用插入的Fv结构域(即,中央Fv结构域),从而形成“额外”第三抗原结合结构域,其中两个单体的Fab部分与ENPP3结合并且“额外”中央Fv结构域与CD3结合。“额外”中央Fv结构域被插入在Fc结构域与单体的CH1-Fv区之间,从而提供第三抗原结合结构域(即,“额外”中央Fv结构域),其中每个单体含有“额外”中央Fv结构域的组分(即,一个单体包括可变重链结构域,并且另一个包括“额外”中央Fv结构域的可变轻结构域)。

[0372] 在这个实施方式中,一个单体包括第一重链,所述第一重链包括第一可变重链结构域、CH1结构域以及Fc结构域和额外可变轻结构域。所述轻链结构域使用结构域接头共价连接在重链恒定结构域的CH1结构域的C末端与第一Fc结构域的N末端之间(VH1-CH1-[任选的接头]-VL2-铰链-CH2-CH3)。另一个单体包括第一重链,所述第一重链包括第一可变重链结构域、CH1结构域和Fc结构域以及另外的可变重链结构域(VH1-CH1-[任选的接头]-VH2-铰链-CH2-CH3)。所述轻链结构域使用结构域接头共价连接在重链恒定结构域的CH1结构域的C末端与第一Fc结构域的N末端之间。

[0373] 这个实施方式进一步利用包含可变轻链结构域和轻链恒定结构域的轻链,所述轻链与重链缔合而形成各自结合ENPP3的两个相同Fab。就本文的许多实施方式来说,这些构建体包含如所期望并且本文所述的偏斜变体、pI变体、消融变体、另外的Fc变体等。

[0374] 本文所述的抗体提供中央-Fv形式,其中CD3结合结构域序列如图10A至图10F所示,并且ENPP3结合结构域序列如图12、图13A至图13B和图14A至图14I所示。

[0375] 6. 单臂中央-scFv

[0376] 尤其用于本文所述的抗体中的一种异二聚支架是单臂中央-scFv形式。在此实施方式中,一种单体仅包括Fc结构域,而另一种单体包含Fab结构域(第一抗原结合结构域)、scFv结构域(第二抗原结合结构域)和Fc结构域,其中scFv结构域被插入在Fc结构域与Fc结构域之间。在此形式下,Fab部分与一个受体靶标结合,并且scFv与另一个受体靶标结合。在此形式下,Fab部分与ENPP3结合并且scFv与CD3结合,或反之亦然。

[0377] 在此实施方式中,一个单体包括第一重链,所述第一重链包括第一可变重链结构

域、CH1结构域和Fc结构域,其中scFv包括scFv可变轻结构域、scFv接头和scFv可变重链结构域。scFv使用结构域接头在任一朝向上共价连接在重恒定结构域的CH1结构域的C末端与第一Fc结构域的N末端之间(VH1-CH1-[任选的结构域接头]-VH2-scFv接头-VL2-[任选的结构域接头]-CH2-CH3或VH1-CH1-[任选的结构域接头]-VL2-scFv接头-VH2-[任选的结构域接头]-CH2-CH3)。第二单体包含Fc结构域(CH2-CH3)。此实施方式进一步利用了包括可变轻结构域和恒定轻结构域的轻链,所述轻链与重链缔合以形成Fab。

[0378] 就本文的许多实施方式来说,这些构建体包含如所期望并且本文所述的偏斜变体、pI变体、消融变体、另外的Fc变体等。

[0379] 本文所述的抗体提供中央-Fv形式,其中CD3结合结构域序列如图10A至图10F所示,并且ENPP3结合结构域序列如图12、图13A至图13B和图14A至图14I所示。

[0380] 另外,单臂中央-scFv形式的Fc结构域通常包含偏斜变体(例如,如图1中所示的一组氨基酸取代,其中特别有用的偏斜变体选自由以下组成的组:S364K/E357Q:L368D/K370S;L368D/K370S:S364K;L368E/K370S:S364K;T411T/E360E/Q362E:D401K;L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V:T366W和T366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354C),任选地消融变体(包含如图3中所示的那些),任选地带电scFv接头(包含如图5中所示的那些),并且重链包括pI变体(包含如图2中所示的那些)。

[0381] 在一些实施方式中,单臂中央-scFv形式包含偏斜变体、pI变体和消融变体。因此,单臂中央-scFv形式的一些实施方式包括:a)第一单体,所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、和可变重链结构域以及scFv结构域,所述可变重链结构域与轻链的可变轻结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv,所述scFv结构域与CD3结合;b)第二单体,所述第二单体包含具有偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K的Fc结构域;以及c)轻链,所述轻链包括可变轻结构域和恒定轻结构域。

[0382] 在一些实施方式中,单臂中央-scFv形式包含偏斜变体、pI变体、消融变体和FcRn变体。因此,单臂中央-scFv形式的一些实施方式包括:a)第一单体,所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变体M428L/N434S、和可变重链结构域以及scFv结构域,所述可变重链结构域与轻链的可变轻结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv,所述scFv结构域与CD3结合;b)第二单体,所述第二单体包含具有偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K以及FcRn变体M428L/N434S的Fc结构域;以及c)轻链,所述轻链包括可变轻结构域和恒定轻结构域。

[0383] 7.单臂scFv-mAb

[0384] 尤其用于本文所述的抗体中的一种异二聚支架是单臂scFv-mAb形式。在这个实施方式中,一个单体仅包含Fc结构域,而另一个单体使用连接到重链的N末端的scFv结构域,通常通过使用接头:VH-scFv接头-VL-[任选的结构域接头]-CH1-铰链-CH2-CH3或(呈相反取向)VL-scFv接头-VH-[任选的结构域接头]-CH1-铰链-CH2-CH3。以此形式,Fab部分各自ENPP3且scFv结合CD3。这个实施方式进一步利用包含可变轻链结构域和轻链恒定结构域的轻链,所述轻链与重链缔合而形成Fab。就本文的许多实施方式来说,这些构建体包含如所期望并且本文所述的偏斜变体、pI变体、消融变体、另外的Fc变体等。

[0385] 本文所述的抗体提供单臂scFv-mAb形式,其中CD3结合结构域序列如图10A至图10F所示,并且其中ENPP3结合结构域序列如图12、图13A至图13B和图14A至图14I所示。

[0386] 此外,单臂scFv-mAb形式的Fc结构域通常包括歪斜变异体(例如,图3和8中所示的一组氨基酸取代,且特别适用的歪斜变异体选自由以下组成的群组:S364K/E357Q:L368D/K370S;L368D/K370S:S364K;L368E/K370S:S364K;T411T/E360E/Q362E:D401K;L368D/K370S:S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V :T366W和T366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354C);任选地消融变异体(包括图3中所示的那些);任选地带电scFv接头(包括图5中所示的那些);以及包含pI变异体的重链(包括图2中所示的那些)。

[0387] 在一些实施方式中,单臂scFv-mAb形式包含偏斜变体、pI变体和消融变体。因此,单臂scFv-mAb形式的一些实施方式包括:a)第一单体,所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K和可变重结构域以及scFv结构域,所述可变重结构域与轻链的可变轻结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv,所述scFv结构域与CD3结合;b)第二单体,所述第二单体包含具有偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K的Fc结构域;以及c)轻链,所述轻链包括可变轻结构域和恒定轻结构域。

[0388] 在一些实施方式中,单臂scFv-mAb形式包含偏斜变体、pI变体、消融变体和FcRn变体。因此,一些实施方式单臂scFv-mAb形式包括:a)第一单体,所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变体M428L/N434S和可变重结构域以及scFv结构域,所述可变重结构域与轻链的可变轻结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv,所述scFv结构域与CD3结合;b)第二单体,所述第二单体包含具有偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K以及FcRn变体M428L/N434S的Fc结构域;以及c)轻链,所述轻链包括可变轻结构域和恒定轻结构域。

[0389] 8. scFv-mAb

[0390] 尤其用于本文所述的抗体中的一种异二聚支架是mAb-scFv形式。在此实施方式中,所述形式依赖于使用scFv与单体之一的N末端附接,从而形成第三抗原结合结构域,其中两个单体的Fab部分与ENPP3结合并且“额外”scFv结构域与CD3结合。

[0391] 在此实施方式中,第一单体包括第一重链(包括可变重链结构域和恒定结构域),其中N末端共价连接的scFv包括在任一朝向上的scFv可变轻结构域、scFv接头和scFv可变重链结构域((VH1-scFv接头-VL1-[任选的结构域接头]-VH2-CH1-铰链-CH2-CH3)或(scFv在相反朝向上)((VL1-scFv接头-VH1-[任选的结构域接头]-VH2-CH1-铰链-CH2-CH3))。这个实施方式进一步利用包含可变轻链结构域和轻链恒定结构域的轻链,所述轻链与重链缔合而形成结合ENPP3的两个相同Fab。就本文的许多实施方式来说,这些构建体包含如所期望并且本文所述的偏斜变体、pI变体、消融变体、另外的Fc变体等。

[0392] 本文所述的抗体提供scFv-mAb形式,其中CD3结合结构域序列如图10A至图10F所示,并且其中ENPP3结合结构域序列如图12、图13A至图13B和图14A至图14I所示。

[0393] 另外,scFv-mAb形式的Fc结构域通常包含偏斜变体(例如,如图1中所示的一组氨基酸取代,其中特别有用的偏斜变体选自由以下组成的组:S364K/E357Q:L368D/K370S;L368D/K370S:S364K;L368E/K370S:S364K;T411T/E360E/Q362E:D401K;L368D/K370S:

S364K/E357L、K370S:S364K/E357Q、T366S/L368A/Y407V:T366W和T366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354C),任选地消融变体(包含如图3中所示的那些),任选地带电scFv接头(包含如图5中所示的那些),并且重链包括pI变体(包含如图2中所示的那些)。

[0394] 在一些实施方式中,scFv-mAb形式包含偏斜变体、pI变体和消融变体。因此,一些实施方式包含scFv-mAb形式,所述形式包括:a)第一单体,所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、可变重链结构域以及scFv结构域,所述可变重链结构域与共同轻链的可变轻结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv,所述scFv结构域与CD3结合;b)第二单体,所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K和可变重链结构域,所述可变重链结构域与共同轻链的可变轻结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv;以及c)共同轻链,所述共同轻链包括可变轻结构域和恒定轻结构域。

[0395] 在一些实施方式中,scFv-mAb形式包含偏斜变体、pI变体、消融变体和FcRn变体。因此,一些实施方式包括scFv-mAb形式,其包含:a)第一单体,其包含歪斜变异体S364K/E357Q、消融变异体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变异体M428L/N434S和可变重链结构域(其与共同轻链的可变轻链结构域一起构成结合到如本文所概述的ENPP3的Fv和结合到CD3的ScFv结构域);b)第二单体,其包含歪斜变异体L368D/K370S、pI变异体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变异体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变异体M428L/N434S和可变重链结构域(其与共同轻链的可变轻链结构域一起构成结合到如本文所概述的ENPP3的Fv);和c)共同轻链,其包含可变轻链结构域和轻链恒定结构域。

[0396] 9. 双重scFv形式

[0397] 本文所述的抗体还提供本领域已知的双重scFv形式。在这个实施方式中,ENPP3 x CD3异二聚双特异性抗体由两个scFv-Fc单体构成(两个单体皆呈(VH-scFv接头-VL-[任选的结构域接头]-CH2-CH3)形式或(VL-scFv接头-VH-[任选的结构域接头]-CH2-CH3)形式,或一个单体一种取向且另一个单体另一种取向)。

[0398] 本文所述的抗体提供双重scFv形式,其中CD3结合结构域序列如图10A至图10F所示,并且其中ENPP3结合结构域序列如图12、图13A至图13B和图14A至图14I所示。在一些实施方式中,双重scFv形式包含偏斜变体、pI变体和消融变体。因此,一些实施方式包含双重scFv形式,所述形式包括:a)第一单体,所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K以及与CD3或ENPP3结合的第一scFv;以及b)第二单体,所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体

[0399] E233P/L234V/L235A/G236del/S267K以及与CD3或ENPP3结合的第二scFv。在一些实施方式中,双重scFv形式包含偏斜变体、pI变体、消融变体和FcRn变体。在一些实施方式中,双重scFv形式包含偏斜变体、pI变体和消融变体。因此,一些实施方式包含双scFv形式,所述形式包括:a)第一单体,所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变体M428L/N434S以及与CD3或ENPP3结合的第一scFv;以及b)第二单体,所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、FcRn变体M428L/N434S以及与CD3或ENPP3结合的第二scFv。

[0400] 10. 非异二聚双特异性抗体

[0401] 如本领域的技术人员将理解的,本文概述的ENPP3和CD3 Fv序列还可以用于单特异性抗体(例如,“传统单克隆抗体”)或非异源二聚体双特异性形式两者。

[0402] 尤其使用的CD3结合结构域序列包括但不限于H1.30_L1.47、H1.32_L1.47、H1.89_L1.47、H1.90_L1.47、H1.33_L1.47、H1.31_L1.47、L1.47_H1.30、L1.47_H1.30、L1.47_H1.32、L1.47_H1.89、L1.47_H1.90、L1.47_H1.33、和L1.47_H1.31(图10A至图10F)。

[0403] 尤其使用的ENPP3结合结构域序列包括但不限于AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。

[0404] 适合的非异源二聚体双特异性形式是本领域已知的,并且包含如Spiess等人,《分子免疫学(Molecular Immunology)》(67):95-106 (2015)和Kontermann, mAbs 4:2, 182-197 (2012)中总体上描绘的许多不同形式,所述两个文献均通过引用明确并入,特别是针对附图、图例以及对其中形式的引用而明确并入。

[0405] 11. 三叉形式

[0406] 在一些实施方式中,本文所述的双特异性抗体呈如在WO2015/184203中总体上描述的“三叉”形式,所述文献特此通过引用整体明确并入,特别是针对“异源二聚体促进结构域”或“HPD”的附图、图例、定义和的序列(包含“K螺旋”和“E螺旋”序列)而明确并入。三叉依赖于使用两种不同的HPD,所述两种不同的HPD缔合以形成异源二聚体结构作为结构的组分,参见图1K。在此实施方式中,三叉形式包含“传统的”重链和轻链(例如,VH1-CH1-铰链-CH2-CH3和VL1-CL)、包括第一“双抗体型结合结构域”或“DART®”、VH2-(接头)-VL3-HPD1的第三链以及包括第二DART®、VH3-(接头)-(接头)-VL2-HPD2的第四链。VH1和VL1形成第一ABD,VH2和VL2形成第二ABD,并且VH3和VL3形成第三ABD。在一些情况下,如图1K中所示,第二和第三ABD与同一抗原结合,在这种情况下通常是ENPP3,例如二价地,其中第一ABD单价地结合CD3。

[0407] 12. 单特异性的单克隆抗体

[0408] 如本领域的技术人员将理解的,本文概述的新颖Fv序列还可以用于单特异性抗体(例如,“传统单克隆抗体”)或非异源二聚体双特异性形式两者。因此,在一些实施方式中,本文所述的抗体提供了单克隆(单特异性)抗体,所述单克隆抗体包括6个CDR和/或来自附图的vh和vl序列,通常具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恒定区,其中IgG1、IgG2和IgG4(包含包括S228P氨基酸取代的IgG4恒定区)特别用于一些实施方式。也就是说,本文中的具有“H_L”名称的任何序列可以连接到人IgG1抗体的恒定区。

[0409] 在一些实施方式中,单特异性抗体是ENPP3单特异性抗体。在某些实施方式中,单特异性抗ENPP3抗体包含选自以下的任何抗ENPP3抗体的6个CDR:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、

H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19、和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B、和图14A至图14I)。

[0410] H. 抗原结合结构域

[0411] 如本文所讨论的,主题异二聚抗体包含两个抗原结合结构域(ABD),每个结合ENPP3或CD3。如本文所概述,这些异二聚抗体可以是双特异性且二价的(例如以图15A中所描绘的形式,每个抗原结合到单个ABD)或双特异性且三价(例如图15B中所描绘,一个抗原结合到单个ABD且另一个抗原结合到两个)。

[0412] 另外,通常,ABD中的一个ABD包括如本文概述的在从N末端到C末端的取向上为VH-scFv接头-VL或VL-scFv接头-VH的scFv。根据形式,其它ABD中的一个或两个通常是包括一个蛋白质链上的VH结构域(通常作为重链的组分)和另一个蛋白质链上的VL(通常作为轻链的组分)的Fab。

[0413] 本公开提供多种结合多种不同检查点蛋白质的ABD,如下文所概述。如本领域的技术人员将理解的,任何一组6个CDR或VH和VL结构域可以呈scFv形式或Fab形式,所述形式然后被添加到重恒定结构域和轻恒定结构域,其中重恒定结构域包括变体(包含在CH1结构域以及Fc结构域内)。序列表中含有的scFv序列利用特定带电接头,而如本文概述的,可以使用不带电或其它带电接头,包含图7中所描述的那些。

[0414] 另外,如上文所讨论的,序列表中使用的用于鉴定CDR的编号是Kabat,然而,可以使用不同的编号,所述不同的编号将改变如表2所示的CDR的氨基酸序列。

[0415] 对于本文所列出的所有可变重和轻结构域,可以制备另外的变体。如本文概述的,在一些实施方式中,一组6个CDR可以具有0个、1个、2个、3个、4个或5个氨基酸修饰(其中氨基酸取代特别有用)以及可变重和轻结构域的框架区的变化,只要框架(除CDR之外)保持与选自图1中的美国专利第7,657,380号中列出的那些序列的人种系序列至少约80%、85%或90%同一性,所述美国专利的附图和图例通过引用整体并入本文。因此,例如,如本文所描述的相同CDR可以与来自人种系序列的不同框架序列组合,只要框架区保持与选自图1中的美国专利号7,657,380中列出的那些序列的人种系序列至少80%、85%或90%同一性。可替代地,CDR可以具有氨基酸修饰(例如,一组CDR中的1个、2个、3个、4个或5个氨基酸修饰(也就是说,只要一组6个CDR的变化的总数量小于6个氨基酸修饰,CDR就可以被修饰,其中CDR的任何组合被改变;例如,VLCDR1中可以存在一个改变,VHCDR2中可以存在两个改变,VHCDR3中不存在改变等)),并且具有框架区改变,只要框架区与选自美国专利号7,657,380的图1中列出的那些序列的人种系序列保持至少80%、85%或90%同一性。

[0416] 1. ENPP3抗原结合结构域

[0417] 在一些实施方式中,ABD中的一个ABD结合ENPP3。图12、图13A至图13B和图14A至图14I中描绘了6个CDR和/或VH和VL结构域的合适组。在一些实施方式中,异二聚抗体是1+1 Fab-scFv-Fc或2+1 Fab2-scFv-Fv形式的抗体(参见例如图15A和图15B)。

[0418] 在一个实施方式中,ENPP3抗原结合结构域包括本文,包括附图和序列表所述的ENPP3 ABD的6个CDR(即,vhCDR1-3和v1CDR1-3)。在例示性实施方式中,ENPP3 ABD是以下ENPP3 ABD中的一个ENPP3 ABD:AN1[ENPP3] H1L1、AN1[ENPP3] H1 L1.33、AN1[ENPP3] H1

L1.77、AN1[ENPP3] H1.8 L1、AN1[ENPP3] H1.8 L1.33、AN1[ENPP3] H1 L1.77、H16-7.213、H16-9.69、H16-1.52、Ha16-1(1)23、H16-9.44、 H16-1.67、Ha1 6-1 (3,5)36、H16-1.86、H16-9.10、H16-9.33、H16-1.68、Ha16-1(1)1、Ha1 6-1(3,5)18、Ha16-1(2,4)4、Ha16-1(3,5)56、H16-7.8、H16-1.93、Ha1 6-1(3,5)27.1、H16-1.61、H16-1(3,5)5、H16-7.200、H16-1(3,5)42、H1 6-9.65、Ha1-1(3,5)19和Ha16-1.80(图12、图13A至图13B和图14A至图14I)。

[0419] 如本领域的技术人员将理解的,适合的ENPP3结合结构域可以包括如在附图中所描绘的或如其被加下划线的一组6个CDR,或在如本文所述并且如表2中所示的使用不同编号方案的情况下,使用在图12、图13A至图13B和图14A至图14I中所描绘的那些序列的VH和VL序列内的其它比对鉴定的CDR。适合的ABD还可以包含如这些序列和附图中所描绘的用作scFv或Fab的整个VH和VL序列。在本文中含有Fv到ENPP3的许多实施方式中,与ENPP3结合的是Fab单体。

[0420] 除了附图和序列表中公开的形成ABD到ENPP3的亲本CDR组之外,本公开提供了变体CDR组。在一个实施方式中,一组6个CDR可以具有来自亲本CDR的1个、2个、3个、4个或5个氨基酸变化,只要ENPP3 ABD仍然能够与靶抗原结合,如通过Biacore、表面等离子体共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉测量法,例如Octet测定)测定中的至少一种测定所测量的,后一种测定尤其用于许多实施方式中。

[0421] 除了本文公开的形成ABD到ENPP3的亲本可变重链结构域和可变轻结构域之外,本公开提供了变体VH和VL结构域。在一个实施方式中,变体VH和VL结构域各自可以具有来自亲本VH和VL结构域的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸变化,只要ABD仍然能够与靶抗原结合,如Biacore、表面等离子体共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉测量法,例如Octet测定)测定中的至少一种测定所测量的,后一种测定尤其用于许多实施方式中。在另一个实施方式中,变体VH和VL与相应的亲本VH或VL具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一,只要ABD仍然能够与靶抗原结合,如通过Biacore、表面等离子体共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉测量法,例如Octet测定)测定中的至少一种测定所测量的,后一种测定尤其用于许多实施方式中。

[0422] 2. CD3抗原结合结构域

[0423] 在一些实施方式中,ABD之一与CD3结合。图10A至图10F以及序列表中描绘了适合的多组6个CDR和/或VH和VL结构域以及scFv序列。尤其使用的CD3结合结构域序列包括但不限于抗CD3 H1.30_L1.47、抗CD3 H1.32、抗CD3 L1.47、抗CD3 H1.89_L1.47、抗CD3 H1.90_L1.47、抗CD3 H1.33_L1.47、抗CD3 H1.31_L1.47、抗CD3 L1.47_H1.30、抗CD3 L1.47_H1.30、抗CD3 L1.47_H1.32、抗CD3 L1.47_H1.89、抗CD3 L1.47_H1.90、抗CD3 L1.47_H1.33和抗CD3 L1.47_H1.31,如图10A至图10F所示。

[0424] 如本领域的技术人员将理解的,适合的CD3结合结构域可以包括如在图10A至图10F中所描绘的或如其被加下划线的一组6个CDR,或在如本文所述并且如表2中所示的使用不同编号方案的情况下,使用在图10A至图10F中所描绘的那些序列的VH和VL序列内的其它比对鉴定的CDR。适合的ABD还可以包含如这些序列和附图中所描绘的用作scFv或Fab的整个VH和VL序列。在本文中含有Fv到CD3的许多实施方式中,与CD3结合的是scFv单体。

[0425] 除了附图和序列表中公开的形成ABD到CD3的亲本CDR组之外,本公开提供了变体CDR组。在一个实施方式中,一组6个CDR可以具有来自亲本CDR的1个、2个、3个、4个或5个氨

基酸变化,只要CD3 ABD仍然能够与靶抗原结合,如通过Biacore、表面等离子体共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉测量法,例如Octet测定)测定中的至少一种测定所测量的,后一种测定尤其用于许多实施方式中。

[0426] 除了本文公开的形成ABD到CD3的亲本可变重链结构域和可变轻结构域之外,本公开提供了变体VH和VL结构域。在一个实施方式中,变体VH和VL结构域各自可以具有来自亲本VH和VL结构域的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸变化,只要ABD仍然能够与靶抗原结合,如Biacore、表面等离子体共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉测量法,例如Octet测定)测定中的至少一种测定所测量的,后一种测定尤其用于许多实施方式中。在另一个实施方式中,变体VH和VL与相应的亲本VH或VL具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一,只要ABD仍然能够与靶抗原结合,如通过Biacore、表面等离子体共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉测量法,例如Octet测定)测定中的至少一种测定所测量的,后一种测定尤其用于许多实施方式中。

[0427] VI. SSTR2结合结构域

[0428] 在一个方面中,本文提供了生长抑素受体2(SSTR2)抗原结合结构域(ABD)和包含此类SSTR2抗原结合结构域(ABD)的组合物,包括抗SSTR2抗体。

[0429] 生长抑素受体(SSTR)属于G蛋白偶联受体(GPCR)的超家族,每个GPCR都包含由细胞外/细胞内结构域和七个跨膜结构域组成的单一多肽链。SSTR在各种培养的肿瘤细胞和原代肿瘤组织中高度表达,包括NET(肺癌、胃肠道癌(GI)、胰腺癌、垂体癌、髓样癌、前列腺癌、胰腺肺癌、骨肉瘤等)以及非NET(乳腺癌、肺癌、结直肠癌、卵巢癌、宫颈癌等)(Reubi., 2003, Endocr.Rev. 24: 389-427;Volante等人,2008, Mol. Cell.Endocrinol.286: 219-229;和Schulz等人,2003, Gynecol.Oncol.89: 385-390)。迄今为止,已经鉴定了五种SSTR受体亚型(Patel等人,1997, Trends Endocrinol.Metab.8: 398-405)。特别是SSTR2在许多肿瘤细胞上以高浓度表达(Volante等人,2008, Mol. Cell.Endocrinol.286: 219-229;和Reubi等人,2003, Eur.J. Nucl.Med. Mol. Imaging 30: 781-793),从而使其成为双特异性抗体癌症靶向疗法的候选靶抗原。鉴于在各种肿瘤上表达的SSTR2的高浓度,据信抗SSTR2抗体可用于例如将抗肿瘤治疗剂(例如,化学治疗剂和T细胞)定位至此类表达SSTR2的肿瘤。

[0430] 包含本文提供的SSTR2抗原结合结构域的主题抗体(例如,抗SSTR2 x 抗CD3双特异性抗体)有利地引发一系列不同的免疫应答。此类SSTR2结合结构域和相关的抗体可用于例如治疗SSTR2相关癌症。

[0431] 如本领域的技术人员将理解的,适合的SSTR2结合结构域可以包括如在图63中所描绘的或如其被加下划线的一组6个CDR,或在如本文所述并且如表2中所示的使用不同编号方案的情况下,使用在图63中所描绘的那些序列的VH和VL序列内的其它比对鉴定的CDR。适合的ABD还可以包含如这些序列和附图中所描绘的用作scFv或Fab的整个VH和VL序列。在本文中含有Fv到SSTR2的许多实施方式中,与SSTR2结合的是Fab单体。在一个实施方式中,SSTR2抗原结合结构域包含[αSSTR2]H1.24_L1.30的6个CDR(即,vhCDR1-3和vlCDR1-3)(图63)。

[0432] 除了在图和序列表中公开的形成针对SSTR2的ABD的亲本CDR集外,本文还提供了具有CDR的SSTR2 ABD变体,所述CDR包括本文公开的SSTR2 ABD CDR的至少一种修饰。在一

个实施方式中,与本文,包括附图和序列表中所描绘的SSTR2 ABD的6个CDR相比,SSTR2 ABD包含具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个氨基酸修饰的一组6个CDR。在示例性实施方式中,与[αSSTR2] H1.24_L1.30的6个CDR相比,SSTR2 ABD包含具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个氨基酸修饰的一组6个CDR(图63)。在某些实施方式中,如通过Biacore、表面等离振子共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉法,例如八位位组测定)测定中的至少一种测定,变体SSTR2 ABD能够结合SSTR2抗原,后一种测定尤其用于许多实施方式中。在特定实施方式中,SSTR2 ABD能够结合人SSTR2抗原。

[0433] 在一个实施方式中,SSTR2 ABD包括与如本文,包括附图和序列表所述的SSTR2 ABD的6个CDR具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的6个CDR。在例示性实施方式中,SSTR2 ABD包含与[αSSTR2] H1.24_L1.30的6个CDR至少90%、95%、97%、98%或99%同一的6个CDR(图63)。在某些实施方式中,如通过Biacore,表面等离振子共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉法,例如八位位组测定)测定中的至少一种测定,SSTR2 ABD能够结合SSTR2抗原,后一种测定尤其用于许多实施方式中。在特定实施方式中,SSTR2 ABD能够结合人SSTR2抗原。

[0434] 在另一个例示性实施方式中,SSTR2 ABD包括本文,包括附图和序列表所述的ENPP3 ABD中的任何一个SSTR2 ABD的可变重链(VH)结构域和可变轻链(VL)结构域。在示例性实施方式中,SSTR2 ABD是[αSSTR2] H1.24_L1.30(图63)。.

[0435] 除了本文公开的亲本SSTR2可变重和可变轻结构域之外,本文提供了包含可变重链结构域和/或可变轻结构域的SSTR2 ABD,所述可变重链结构域和/或可变轻结构域是本文公开的SSTR2 ABD VH和VL结构域的变体。在一个实施方式中,变体VH结构域和/或VL结构域与本文,包括附图和序列表所述的SSTR2 ABD的VH和/或VL结构域相比具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸变化。在一个实施方式中,变体VH结构域和/或VL结构域具有相对于[αSSTR2] H1.24_L1.30的VH和/或VL结构域的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸变化(图63)。在某些实施方式中,如通过Biacore、表面等离振子共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉法,例如八位位组测定)测定中的至少一种测定,SSTR2 ABD能够结合所述SSTR2,后一种测定尤其用于许多实施方式中。在特定实施方式中,SSTR2 ABD能够结合人SSTR2抗原。

[0436] 在一个实施方式中,变体VH和/或VL结构域与如本文,包括附图和序列表中所描述的SSTR2 ABD的VH和/或VL至少90%、95%、97%、98%或99%同一。在例示性实施方式中,变体VH和/或VL结构域与[αSSTR2] H1.24_L1.30的VH和/或VL至少90%、95%、97%、98%或99%同一(图63)。在某些实施方式中,如通过Biacore、表面等离振子共振(SPR)和/或BLI(生物层干涉法,例如八位位组测定)测定中的至少一种测定,SSTR2 ABD能够结合所述SSTR2,后一种测定尤其用于许多实施方式中。在特定实施方式中,SSTR2 ABD能够结合人SSTR2抗原。

[0437] 在一些实施方式中,本文所述的主题抗体包含至少一个SSTR2结合结构域。在某些实施方式中,抗体是异二聚抗体。在一些实施方式中,异二聚抗体是1+1 Fab-scFv-Fc或2+1 Fab2-scFv-Fv形式的抗体(参见例如图15A和图15B)。此类异二聚抗体可包含本文独立地或组合地提供的任何Fc变体氨基酸取代(例如,偏斜、pI和消融变体,包括图1至图4中描绘的那些)。特别有用的偏斜变体选自由以下组成的组:S364K/E357Q:L368D/K370S;L368D/K370S:S364K;L368E/K370S:S364K;T411T/E360E/Q362E:D401K;L368D/K370S:S364K/E357L;K370S:S364K/E357Q;T366S/L368A/Y407V:T366W和T366S/L368A/Y407V/Y349C:T366W/S354C),任选地消融变体(包含图3中所示的那些),任选地带电scFv接头(包含图5中

所示的那些),并且重链包括pI变体(包含图2中所示的那些)。

[0438] A. 有用的实施方式

[0439] 有用的实施方式包含1+1 Fab-scFv-Fc形式,所述形式包括:a)第一单体("scFv单体"),所述第一单体包括带电scFv接头(图5的+H序列在一些实施方式中是优选的)、偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K以及与如本文概述的与CD3结合的scFv;b)第二单体("Fab单体"),所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K以及可变重链结构域;以及c)轻链,所述轻链包含可变轻链结构域(VL)和恒定轻链结构域(CL),其中编号是根据EU编号进行的。在一些实施方式中,可变重链结构域和可变轻链结构域构成ENPP3结合部分。

[0440] 其它有用的实施方式包含1+1 Fab-scFv-Fc形式,所述形式包括:a)第一单体("scFv单体"),所述第一单体包括带电scFv接头(图5的+H序列在一些实施方式中是优选的)、偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K以及与如本文概述的与CD3结合的scFv;b)第二单体("Fab单体"),所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K以及可变重链结构域;以及c)轻链,所述轻链包含可变轻链结构域(VL)和恒定轻链结构域(CL),其中编号是根据EU编号进行的。在一些实施方式中,可变重链结构域和可变轻链结构域构成SSTR2结合部分。

[0441] 其它有用的实施方式包含2+1 Fab2-scFv-Fc形式,所述形式包括:a)第一单体(Fab-scFv-Fc侧),所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K和可变重链结构域,所述可变重链结构域与共用轻链的可变轻链结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv和与CD3结合的scFv结构域;b)第二单体(Fab-Fc侧),所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K和可变重链结构域,所述可变重链结构域与共用轻链的可变轻链结构域构成与如本文概述的ENPP3结合的Fv;以及c)轻链,所述轻链包括可变轻结构域和恒定轻结构域,其中编号是根据EU编号进行的。在一些实施方式中,每个单体上的共同轻链和可变重链结构域形成ENPP3结合结构域。

[0442] 其它有用的实施方式包含2+1 Fab_2-scFv-Fc形式,所述形式包括:a)第一单体(Fab-scFv-Fc侧),所述第一单体包括偏斜变体S364K/E357Q、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K和可变重链结构域,所述可变重链结构域与共用轻链的可变轻链结构域构成与如本文概述的SSTR2结合的Fv和与CD3结合的scFv结构域;b)第二单体(Fab-Fc侧),所述第二单体包括偏斜变体L368D/K370S、pI变体N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D、消融变体E233P/L234V/L235A/G236del/S267K和可变重链结构域,所述可变重链结构域与共用轻链的可变轻链结构域构成与如本文概述的SSTR2结合的Fv;以及c)轻链,所述轻链包括可变轻结构域和恒定轻结构域,其中编号是根据EU编号进行的。在一些实施方式中,每个单体上的共同轻链和可变重链结构域形成SSTR2结合结构域(例如,[αSSTR2] H1.24_L1.30(图63))。

[0443] 一些有用的实施方式包括:XENP24804、XENP26820、XENP28287、XENP28925、XENP29516、XENP30262、XENP26821、XENP29436、XENP28390、XENP29463、和XENP30263。

[0444] 其它有用的实施方式包括:XENP29437、XENP29520、XENP30264、XENP26822、XENP28438、XENP29438、XENP29467、XENP30469、XENP30470、XENP30819、XENP30821、XENP31148、XENP31149、XENP31150、XENP31419、和XENP31471。

[0445] 另一个有用的实施方式是XENP30458。

[0446] VII. 本发明的核酸

[0447] 本公开还提供了编码本文提供的抗ENPP3抗体的核酸组合物,所述抗ENPP3抗体包括但不限于抗ENPP3 x 抗CD3双特异性抗体和ENPP3单特异性抗体。

[0448] 如本领域的技术人员将理解的,核酸组合物将依赖于异二聚体蛋白的形式和支架。因此,举例来说,当所述形式需要三种氨基酸序列(如1+1 Fab-scFv-Fc形式(例如第一氨基酸单体包含Fc结构域和scFv,第二氨基酸单体包含重链和轻链))时,可以将三种核酸序列并入一种或多种表达载体中供表达。类似地,一些形式(例如,图1中所公开的双重scFv形式)仅需要两种核酸;同样,其可以放入一个或两个表达载体中。

[0449] 如所属领域中所知,取决于用于产生本文所述的异二聚抗体的宿主细胞,可以将编码本文所述的抗体的部件的核酸并入如所属领域中已知的表达载体中。通常,核酸可操作地连接到任何数量的调控元件(启动子、复制起点、可选择标记、核糖体结合位点、诱导剂等)。表达载体可以是染色体外的或整合的载体。

[0450] 然后将本文所述的抗体的核酸和/或表达载体转化到本领域众所周知的任何数量的不同类型的宿主细胞中,包括哺乳动物、细菌、酵母、昆虫和/或真菌细胞,其中哺乳动物细胞(例如CHO细胞)在许多实施方式中使用。

[0451] 在一些实施方式中,如果取决于形式适用的话,对每个单体进行编码的核酸和对轻链进行编码的任选核酸通常在不同或相同的启动子对照条件下各自包含在单个表达载体内。在尤其用于本文所述的抗体的实施方式中,这两种或三种核酸中的每种包含在不同表达载体上。如本文和62/025,931(特此以引用方式并入)所示,可以利用不同的载体比率驱使异二聚体形成。也就是说,令人惊讶地,虽然蛋白质包括1:1:2比率的第一单体:第二单体:轻链(在本文中具有包括异二聚抗体的三个多肽的许多实施方式的情况下),但是这些并非得到最佳结果的比率。

[0452] 通过培养包括如本领域众所周知的一个或多个表达载体的宿主细胞来制备本文所述的异二聚抗体。一旦产生,就执行传统抗体纯化步骤,包含离子交换色谱法步骤。如本文所论述,使两种单体的pI相差至少0.5可以允许通过离子交换色谱或等电点聚焦或对等电点敏感的其它方法来实现分离。也就是说,包含改变每个单体的等电点(pI)的pI取代使得每个单体具有不同的pI,并且异二聚体也具有不同的pI,从而促进“1+1 Fab-scFv-Fc”和“2+1”异二聚体的等电纯化(例如,阴离子交换柱、阳离子交换柱)。这些取代还有助于测定和监测任何污染的双重scFv-Fc和纯化后mAb同源二聚体(例如,IEF凝胶、cIEF和分析型IEX柱)。

[0453] VIII. 异二聚双特异性抗体的生物和生物化学功能

[0454] 通常,向患有癌症的患者施用本文所述的双特异性ENPP3 x CD3抗体,并且以本文所述的多种方式对功效进行评估。因此,虽然可以进行标准的功效测定,如癌症负荷、肿瘤尺寸、转移的存在或程度的评估等,但是也可以基于免疫状况评估来评估免疫肿瘤学治疗。这可以通过多种方式完成,包括体外和体内分析。

[0455] IX. 治疗

[0456] 一旦制备,本文所述的抗体的组合物可用于许多应用。ENPP3在肾细胞癌中高度表达,因此,本文描述的抗体的异二聚组合物可用于治疗此类ENPP3阳性癌症。

[0457] X. 用于体内施用的抗体组合物

[0458] 通过将具有期望程度的纯度的抗体与任选的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》, 第16版, Osol, A.编辑[1980])进行混合来制备根据本文所述的抗体使用的抗体的调配物,以供以冻干调配物或水溶液的形式进行存储。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒性,并且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如氯化十八烷基二甲基苯甲基铵;氯化六羟季铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如,锌蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0459] XI. 施用方式

[0460] 本文所述的抗体和化疗剂根据已知的方法,如静脉内施用(作为推注(bolus)或通过在一段时间内连续输注)向受试者施用。

[0461] XII. 治疗方式

[0462] 在本文所述的方法中,用疗法来提供对疾病或病症的阳性治疗应答。“阳性治疗应答”旨在改善疾病或病症和/或改善与疾病或病症相关联的症状。例如,阳性治疗应答将指对疾病的以下改善中的一种或多种:(1)减少赘生性细胞的数量;(2)增加赘生性细胞死亡;(3)抑制赘生性细胞存活;(5)抑制(即减慢到某种程度并且优选地停止)肿瘤生长;(6)增加患者存活率;以及(7)与疾病或病症相关联的一个或多个症状的一些缓解。

[0463] 可以通过对那个疾病或病症具有特异性的标准化应答标准来确定任何给定疾病或病症的阳性治疗应答。可以使用筛选技术如磁共振成像(MRI)扫描、x-射线成像、计算机断层(CT)扫描、骨扫描成像、内窥镜检查和肿瘤活检取样,包含骨髓吸出(BMA)和对循环中的肿瘤细胞计数来估计针对肿瘤形态(即总体肿瘤负荷、肿瘤大小等)改变的肿瘤应答。

[0464] 除了这些阳性治疗应答之外,正经受疗法的受试者可能经历与疾病相关联的症状的改善的有益效果。

[0465] 根据本公开的治疗包含所使用的“治疗有效量的”药物。“治疗有效量”是指以剂量计并且持续所需的时间段以实现所希望的治疗结果的有效的量。

[0466] 治疗有效量可根据诸如疾病状态、年龄、性别和个体体重等因素以及药物在个体中引发期望反应的能力而变化。治疗有效量也是其中抗体或抗体部分的任何毒性或有害作用超过治疗有益效果的量。

[0467] 用于肿瘤治疗的“治疗有效量”还可以通过其稳定疾病进展的能力来测量。可以在预示人类肿瘤的功效的动物模型系统中评估化合物抑制癌症的能力。

[0468] 可替代地,通过熟练的从业者已知的体外测定,组合物的这种特性可以通过检验化合物抑制肿瘤生长或诱导凋亡的能力来评估。治疗有效量的治疗化合物可以减小肿瘤大小或以其它方式减轻受试者的症状。本领域的普通技术人员将能够基于如受试者的大小、受试者症状的严重程度和特定的组合物或所选择的施用途径这种因素确定这种量。

[0469] 调整剂量方案以提供最佳的期望应答(例如,治疗应答)。例如,可以施用单个团注物,或者可以随时间施用若干分次剂量,或者可以按治疗状况的紧急情况所表明的成比例地减少或增加剂量。为了方便施用和剂量的均匀性,肠胃外组合物可以按剂量单位调配。如本文使用的剂量单位是指作为针对要治疗受试者的单一剂量适合的物理上离散的单位;每个单位含有与所需药物载体缔合的、经计算产生所期望的治疗效果的预定量的活性化合物。

[0470] 针对本公开的剂量单位形式的规格受制于并直接取决于:(a)活性化合物的独特特性和要实现的特定治疗效果,和(b)个体敏感性对复合用于治疗的此类活性化合物造成的本领域固有限制。

[0471] 用于本文所述的双特异性抗体的有效剂量和剂量方案取决于待治疗的疾病或病症并且可以由本领域的技术人员确定。

[0472] 用于本文所述的抗体中的治疗有效量的双特异性抗体的示例性非限制性范围是约0.1-100 mg/kg。

[0473] 所有引用的参考文献均明确地以引用方式整体并入本文中。

[0474] 尽管以上为了说明的目的描述本公开的特定实施方式,但是所属领域技术人员将理解,在不脱离所附权利要求中描述的本发明的情况下,可以进行细节的许多变化。

[0475] 实施例

[0476] 以下提供实施例以说明本文所述的抗体。这些实施例不旨在将本文所述的抗体限制于任何特定的应用或操作理论。对于本文所述的抗体中所讨论的所有恒定区位置,根据如Kabat (Kabat等, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, 贝塞斯达美国国家卫生研究院公共卫生服务部(United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda),其以引用方式整体并入本文中)中的EU索引进行编号。抗体领域中的技术人员将理解,这个规约由免疫球蛋白序列的特定区域中的非顺序编号组成,所述非顺序编号使得能够对免疫球蛋白家族中的保守位置进行标准化的引用。因此,如通过EU索引定义的任何给定免疫球蛋白的位置不一定对应于其顺序序列。

[0477] 在美国公开2015/0307629、2014/0288275和WO2014/145806中概述了一般和具体的科学技术,其均以引用方式明确地整体并入本文中,并且特别是针对其中概述的技术。

[0478] 实施例1:结合结构域

[0479] 1A:CD3结合结构域

[0480] 具有不同CD3结合亲和力的CD3结合结构域的序列如图10所示。

[0481] 1B:ENPP3结合结构域

[0482] 1B(a):ENPP3结合结构域AN1

[0483] 将鼠类ENPP3结合结构域的可变区使用串含量优化进行人源化(参见例如,2010年2月2日发布的美国专利号7,657,380)。人源化ENPP3结合结构域的序列,在此称为AN1,如图

10A至图10F所示。

[0484] AN1变体被工程化以用于改进纯化(在αENPP3 x αCD3双特异性抗体的背景下)和调节ENPP3结合亲和力/效力。图13中描绘了说明性的此类变体的序列。

[0485] 1B(b):额外的ENPP3结合结构域

[0486] 可用于本文所述的αENPP3 x αCD3双特异性抗体的额外ENPP3结合结构域的序列描绘于图14中。

[0487] 实施例2:工程化并生产αENPP3 x αCD3双特异性抗体

[0488] 设想了αENPP3 x αCD3双特异性抗体(bsAb)的多种形式,其说明性形式在下面和图15中概述。

[0489] 一种此类形式是1+1 Fab-scFv-Fc形式,所述形式包含共价附接至第一异二聚Fc结构域的单链Fv("scFv")、共价附接至互补的第二异二聚Fc结构域的重链可变区(VH),以及轻链(LC),所述轻链单独地转染,使得Fab结构域与可变重链结构域一起形成。

[0490] 另一种形式是2+1 Fab2-scFv-Fc形式,所述形式包含VH结构域,所述结构域共价附接至CH1结构域,所述CH1结构域共价附接至scFv,所述scFv共价附接至第一异二聚Fc结构域(VH-CH1-scFv-Fc);VH结构域,所述VH结构域共价附接至互补的第二异二聚Fc结构域;以及LC,所述LC单独地转染,使得Fab结构域与VH结构域一起形成。

[0491] 通过以下方式生成αENPP3 x αCD3 bsAb的DNA编码链:进行标准基因合成,之后进行等温克隆(Gibson装配)或亚克隆到含有融合配偶体(例如图6中描绘的结构域接头和/或图7至图9中描绘的主链)的pTT5表达载体中。将DNA转染到HEK293E细胞中以进行表达。1+1 Fab-scFv-Fc 形式和2+1 Fab2-scFv-Fc形式的说明性αENPP3 x αCD3 bsAbs(基于实施例1中描述的结合结构域)的序列分别描绘在图17至图23中。

[0492] 实施例3:αENPP3 x αCD3 bsAb重定向T细胞以破坏表达ENPP3的细胞

[0493] 使用实施例1中描述的结合结构域工程化1+1 Fab-scFv-Fc形式的原型αENPP3 x αCD3 bsAb。特别地,XENP26820(包含ENPP3结合结构域克隆H16-7.8和CD3高scFv)、XENP26821(包含ENPP3结合结构域克隆H16-7.8和CD3高-Int编号1 scFv)、XENP28287(包含ENPP3结合结构域克隆AN1和CD3 scFv)和XENP28390(包含ENPP3结合结构域克隆AN1和CD3高Int编号1 scFv)的序列描绘于图17和图18中。将XENP13245(包含基于莫维珠单抗和抗CD3-高的RSV结合结构域;序列描绘于图16中)用作对照。

[0494] 研究原型αENPP3 x αCD3双特异性抗体(bsAb)重定向$CD3^+$效应T细胞以破坏表达ENPP3的细胞系的潜力。在第一实验中,将KU812($ENPP3^{高}$嗜碱性白血病细胞系)细胞与人PBMC(效应物与靶细胞的比率为10:1)和所指示浓度的如上所示的测试品一起在37℃下孵育24小时。孵育后,将细胞在室温下用Aqua Zombie染料染色15分钟。然后洗涤细胞并用针对细胞表面标志物的抗体染色,并通过流式细胞术分析。使用两种不同的方法研究重定向的T细胞细胞毒性(RTCC)的诱导:a)减少CSFE+靶细胞的数量(其数据描绘于图24A中),和b)对CSFE+靶细胞进行Zombie Aqua染色(其数据描绘于图24B中)。$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞的活化和脱颗粒还基于CD107a、CD25和CD69表达确定(其数据描绘于图25至图26中)。

[0495] 在第二实验中,将RXF393(表达ENPP3的临床相关肾细胞癌细胞系)细胞与人PBMC(效应物与靶细胞的比率为20:1)和所指示浓度的如上所示的原型测试品一起在37℃下孵育24小时。孵育后,将细胞在室温下用Aqua Zombie染料染色15分钟。然后洗涤细胞并用针

对细胞表面标志物的抗体染色,并通过流式细胞术分析。如上所述,使用两种不同的方法研究RTCC的诱导:a)减少CSFE+靶细胞的数量(其数据描绘于图27A中),和b)对CSFE+靶细胞进行Zombie Aqua染色(其数据描绘于图27B中)。$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞的活化和脱颗粒还基于CD107a、CD25和CD69表达确定(其数据描绘于图28至图29中)。

[0496] 总的来说,数据显示原型αENPP3 x αCD3 bsAb剂量依赖性地诱导ENPP3细胞上的RTC);CD3结合亲和力与RTCC效力相关(即具有CD3高的bsAb比具有CD3高-Int编号1的bsAb更有效地诱导RTCC);并且具有基于AN1的结合结构域的bsAb比具有基于H16-7.8的结合结构域的bsAb更有效地诱导RTCC。与RTCC数据一致,αENPP3 x αCD3 bsAb剂量依赖性地诱导T细胞的活化;CD3结合亲和力与活化效力相关(即具有CD3高的bsAb比具有CD3高-Int编号1的bsAb更有效地诱导T细胞活化);并且具有AN1结合结构域的bsAb比具有H16-7.8结合结构域的bsAb更有效地诱导T细胞活化。

[0497] 实施例4:提高αENPP3 x αCD3产量

[0498] 通常,通过在HEK293E细胞中进行瞬时转染来生产双特异性抗体,并且通过包括蛋白A色谱法(纯化部分1)然后是离子交换色谱法(纯化部分2)的两步纯化工艺进行纯化。

[0499] 4A:对AN1变体进行工程化以提高产量

[0500] 4A(a):XENP28287的生产导致包含聚集体和未配对单体的同质群体

[0501] 如上所述从HEK293E上清液中纯化XENP28287。图30A描绘了显示XENP28287的纯化部分2的色谱图(蛋白A色谱之后的阳离子交换色谱)。色谱图示出了两个峰的分离(峰B和峰BC),通过利用多角度光散射的分析型尺寸排阻色谱法(aSEC-MALS)和分析型阳离子交换色谱法(aCIEX)来进一步表征所述峰的身份、纯度和同质性,如下文所一般描述的。

[0502] 使用aSEC-MALS分析从XENP28287(以及预纯化材料)的纯化部分2中分离的峰B和BC,以推断它们的组分蛋白质物种。在Agilent 1200高效液相色谱(HPLC)系统上执行分析。利用280 nM的UV检测波长,使用1 × PBS,pH 7.4作为流动相在4℃下以1.0毫升/分钟的速度将样品注射到Superdex™200 10/300 GL柱(通用医疗生命科学公司(GE Healthcare Life Sciences))上,持续25分钟。在带有Optilab® T-rEX折射率检测器的miniDAWN® TREOS®(加利福尼亚州圣塔芭芭拉的怀雅特技术公司(Wyatt Technology, Santa Barbara, Cali.))上进行MALS。使用Agilent OpenLab色谱数据系统(CDS)ChemStation版AIC C.01.07版本和ASTRA 6.1.7.15版本进行分析。描绘预纯化材料、峰B和峰BC的SEC分离谱的色谱图以及通过MALS确定的组分物种的近似MW描绘在图30B中。谱显示峰B包含约126 kDa的主要物种,这与XENP28287异二聚体的计算分子量(基于氨基酸序列)一致,但还包含75 kDa的污染物种(可能是单体)。峰BC包含具有308 kDa(可能是聚集体)、121 kDa(XENP28287)和82 kDa(污染单体)物种的峰。值得注意的是,预纯化材料的分离谱表明少于85%的材料是双特异性抗体异二聚体。

[0503] 还使用分析型CIEX分析了来自纯化部分2的峰,以进一步评定峰B和BC的纯度和均匀性。在Agilent 1200高效液相色谱(HPLC)系统上执行分析。利用280 nM的UV检测波长,在20 mM MES、pH 6.0缓冲液中使用0-40% NaCl梯度以1.0毫升/分钟将样品注入到Proteomix SCX-NP5 5μM无孔柱(特拉华州纽瓦克的赛分科技有限公司(Sepax Technologies, Inc., Newark, Del.))上。使用Agilent OpenLAB CDS ChemStation版AIC C.01.07版本进行分析。图30C中描绘了描绘峰B和BC的CIEX分离的色谱图。值得注意的是,aCIEX分离表明在峰

BC材料中,除了主峰外,还有许多电荷变体。

[0504] 4A(b):AN1 VH变体H1.8使得能够改进分离

[0505] 设计了许多AN1可变重链(VH)结构域,目的是提高双特异性抗体的产量。一种特定的VH变体(H1.8;SEQ ID NO: XXX;也描绘在图13中)使得能够改进双特异性抗体异二聚体与污染物种的分离。为了说明这一点,如上所述从HEK293E上清液中生产和纯化XENP28925(其包含具有AN1 H1.8 VH变体的ENPP3结合结构域;序列描绘于图17中)。图31A描绘了显示XENP28925的纯化部分2的色谱图(蛋白A色谱之后的阳离子交换色谱)。色谱图示出了一个主峰(峰B)的分离,如上所述该分离通过aSEC-MALS和aCIEX)进一步表征以得知身份、纯度和同质性。

[0506] 图31B至图31C中描绘了描绘预纯化材料和峰B的aSEC分离谱(其中组分物种的MW是如通过MALS确定的)以及峰B的aCIEX分离谱的色谱图。谱显示峰B包含约128 kDa的主要物种,这与XENP28925异二聚体的计算分子量(基于氨基酸序列)一致。值得注意的是,预纯化材料的分离曲线显示大于97%的该材料是双特异性抗体异二聚体。

[0507] 总的来说,这表明AN1 H1.8 VH变体使得能够提高αENPP3 x αCD3异二聚体的产量,以及改进异二聚体与污染物种的分离。

[0508] 4B:对2+1 Fab_2-scFv-Fc双特异性形式的主链进行工程化以提高产量

[0509] 4B(a):XENP31419的生产导致蛋白质群朝向VH-Fc同源二聚体偏斜

[0510] 如上所述从HEK293E上清液中纯化XENP31149(2+1 Fab_2-scFv-Fc形式的 αENPP3 x αCD3 bsAb;序列描绘于图23中)。图32A描绘了显示XENP31149的纯化部分2的色谱图(蛋白A色谱之后的阳离子交换色谱)。色谱图示出了两个峰(峰A和峰B)的分离,所述分离通过利用多角度光散射的分析型尺寸排阻色谱法(aSEC-MALS)进一步表征以得到身份,如上文所一般描述的。

[0511] 图32B中描绘了峰A和峰B的aSEC分离曲线的色谱图以及由MALS确定的组分物种的MW。谱显示,主峰A包含分子量为148.4 kDa的物种,这与VH-Fc同源二聚体的计算分子量一致,而次要峰B包含分子量为173.9 kDa的物种,这与XENP31149异二聚体的计算分子量一致。因此,生产得到了非常低的12.4 mg/L滴度的XENP31149。

[0512] 4B(b):在Fab-scFv-Fc链中工程化全铰链提高了2+1 Fab_2-scFv-Fc异二聚体产量

[0513] 研究了用于提高2+1 Fab_2-scFv-Fc异二聚体产量的各种方法,所述方法包括改变Fab-scFv-Fc链中VH与scFv之间的接头或scFv与CH2之间的接头。将XENP31419(图23中描述的序列)工程化为XENP31149对应物,所述XENP31149对应物在Fab-scFv-Fc链中的scFv与CH2区之间具有全铰链(EPKSCDKTHTCPPCP;SEQ ID NO: XX)而不是柔性半铰链(GGGGSGGGGSKTHTCPPCP;SEQ ID NO: XX)。如上所述,生产并从HEK293E上清液中纯化XENP31419。图33A描绘了显示XENP31419的纯化部分2的色谱图(蛋白A色谱之后的阳离子交换色谱)。色谱图示出了两个峰(次要峰A和主峰B)的分离,所述分离通过利用多角度光散射的分析型尺寸排阻色谱法(aSEC-MALS)进一步表征以得到身份,如上文所一般描述的。

[0514] 图33B中描绘了峰A和峰B的aSEC分离曲线的色谱图以及由MALS确定的组分物种的MW。谱显示,次要峰A包含分子量为152.2 kDa的物种,这与VH-Fc同源二聚体的计算分子量一致,而主峰B包含分子量为180 kDa的物种,这与XENP31419异二聚体的计算分子量一致。因此,生产产生了显著提高的107.8 mg/L滴度的XENP31419异二聚体。

[0515] 实施例5:调谐αENPP3 x αCD3 bsAb以提高选择性和治疗指数

[0516] 以下实验通常使用KU812作为ENPP3^{高}靶细胞(作为ENPP3^{+}肿瘤细胞的替代物)或RCC4作为ENPP3^{低}靶细胞(作为肿瘤环境外的细胞的替代物)执行。将靶细胞与人PBMC和测试品一起以指定的效应物与靶细胞比率在37℃下孵育。孵育后,将细胞在室温下用Aqua Zombie染料染色15分钟。然后洗涤细胞并用针对细胞表面标志物的抗体染色,并通过流式细胞术分析。使用对CSFE+靶细胞的Zombie Aqua染色确定RTCC的诱导;并且T细胞的活化和脱颗粒通过淋巴细胞上的CD107a、CD25和CD69表达确定。还应该指出的是,数据集中的一些数据集来自同一个实验,因为同时探索了几种工程化方法。

[0517] 为了研究具有高亲和力CD3结合和高亲和力ENPP3结合的原型1+1 Fab-scFv-Fc双特异性抗体的在靶/脱肿瘤杀伤的潜力,将KU812细胞和RCC4细胞与人PBMC(效应物与靶细胞的比率为10:1)和所指示浓度的XENP28925在37℃下一起孵育18小时。图34中描绘的数据显示XENP28925在ENPP3^{高}KU812细胞上诱导RTCC;然而,XENP28925还在ENPP3^{低}RCC4细胞上诱导RTCC,表明存在提高αENPP3 x αCD3双特异性抗体的治疗指数的空间。因此,将原型αENPP3 x αCD3 bsAb进一步工程化,目的是提高选择性和治疗指数。

[0518] 5A:调谐ENPP3结合亲和力

[0519] 第一种方法探索了调谐ENPP3结合亲和力。将变体ENPP3结合臂工程化为具有可变轻链结构域变体,目的是创建ENPP3结合亲和力阶梯,其说明性序列描绘于图13(对于可变区)和图16(在1+1 Fab-scFv-Fc bsAb的背景下)中。

[0520] 研究了经亲和力工程化αENPP3 x αCD3 bsAb与细胞表面ENPP3的结合。将KU812细胞与指定浓度的指定测试品一起孵育。然后用Fcγ片段特异性二抗对细胞进行染色以检测测试品,并通过流式细胞术进行分析。如图35所描绘的数据显示,经亲和力工程化的αENPP3 x αCD3 bsAb表现出从高(具有L1可变轻链的XENP28925)到中度(具有L1.33可变轻链的XENP29516)到低(具有L1.77可变轻链的XENP30262)的对ENPP3^{高}KU812细胞的一系列结合效力。

[0521] 接下来为了研究调节ENPP3结合亲和力对双特异性抗体的选择性的影响,将KU812(ENPP3^{高})和RCC4(ENPP3^{低})细胞与人PBMC(效应物与靶细胞的比率为10:1)和指定浓度的以下具有固定CD3效力(CD3高)的双特异性抗体一起在37℃下孵育42小时:XENP28925(WT高ENPP3结合)、XENP29516(中度ENPP3结合)或XENP30262(低ENPP3结合)。如图36所描绘的数据显示,与XENP28925相比,XENP29516和XENP30262都显示出对ENPP3^{低}细胞上的RTCC的实质上较少有效诱导,其中RTCC效力与结合效力相关,如上所示。然而,XENP29516和XENP30262还显示出对ENPP3^{高}细胞上的RTCC的较少有效诱导。

[0522] 5B:调谐CD3结合效力

[0523] 还探索了降低对CD3的亲和力以改善药代动力学和减弱细胞因子释放。工程化具有CD3高-Int编号1 scFv的αENPP3 x αCD3 1+1 Fab-scFv-Fc bsAb,其说明性序列描绘于图18中。

[0524] 为了研究细胞因子释放的诱导,执行了一项实验,其中将KU812和RCC4细胞与人PBMC(效应物与靶细胞的比率为10:1)和指定浓度的XENP28925(CD3高)或XENP29436(CD3高-Int编号1)一起在37℃下孵育18小时。使用V-PLEX促炎小组1人试剂盒(根据制造商方案;Meso Scale Discovery, Rockville, Md.)测定IFNγ、IL-6和TNFα的释放,其数据描绘

于图37和图38中。

[0525] 为了研究调谐CD3结合效力是否对选择性有任何影响,执行了另一项实验,其中将KU812(ENPP3^{高})和RCC4(ENPP3^{低})细胞与人PBMC(效应物与靶细胞的比率为10:1)和所指示浓度的XENP28925(CD3高)或XENP29436(CD3高-Int编号1)一起在37℃下孵育42小时。如图39所描绘的数据表明,与XENP28925相比,XENP29436表现出实质上较少有效的对ENPP3^{低}细胞上的RTCC的诱导;然而,XENP29436还表现出降低的诱导ENPP3^{高}细胞上的RTCC的效力。

[0526] 5C:调谐ENPP3结合亲和力和CD3结合效力两者

[0527] 接下来,研究降低ENPP3和CD3结合效力两者的影响。工程化具有降低效力的ENPP3结合结构域和CD3高-Int编号1 scFv的αENPP3 x αCD3 1+1 Fab-scFv-Fc bsAb,其序列描绘于图18中。

[0528] 将KU812细胞与人PBMC(效应物与靶细胞的比率为10:1)和指定浓度的 XENP28925(ENPP3高;CD3高)、XENP29436(ENPP3高;CD3高-Int编号1)、XENP29518(ENPP3中度;CD3高)、XENP29463(ENPP3中度;CD3高-Int编号1)、XENP30262(ENPP3低;CD3高)或XENP30263(ENPP3低;CD3高-Int编号1)一起在37℃下孵育18小时。使用V-PLEX促炎小组1人类试剂盒测定IFNγ的释放。图40中描绘的数据显示降低CD3或ENPP3结合效力降低了对细胞因子释放的诱导。值得注意的是,降低CD3和ENPP3结合效力进一步降低了对细胞因子释放的诱导。

[0529] 5D:调谐ENPP3结合效价和ENPP3结合效价两者

[0530] 据假设,虽然降低的ENPP3结合效力降低了与ENPP3^{低}细胞和ENPP3^{高}细胞两者的结合,但是增加的结合价可能会恢复对ENPP3^{高}细胞的效力。因此,将具有降低的ENPP3结合效力的αENPP3 x αCD3双特异性抗体工程化为2+1 Fab_2-scFv-Fc形式,其序列描绘于图19中。

[0531] 将KU812(ENPP3^{高})和RCC4(ENPP3^{低})细胞与人PBMC(效应物与靶细胞的比率为10:1)和指定浓度的XENP28925(单价高ENPP3结合)、XENP29516(单价中度ENPP3结合)、XENP29520(二价中度ENPP3结合)、XENP30262(单价低ENPP3结合)或XENP30264(二价低ENPP3结合)在37℃下一起孵育42小时。

[0532] 数据(如图41中所描绘)显示,二价结合(具有中度ENPP3结合)在ENPP3^{低}细胞上维持降低的RTCC效力,但在ENPP3^{高}细胞上恢复了接近由XENP28925所表现出的RTCC效力。数据(如图42中所描绘)显示二价结合(具有低ENPP3结合)进一步降低了ENPP3^{低}细胞上的 RTCC效力,并恢复了ENPP3^{高}细胞上的一定RTCC效力。总的来说,数据证实了组合降低的ENPP3结合亲和力和增加的ENPP3结合效价增强选择性的假设。

[0533] 5E:调谐ENPP3结合效价和CD3结合效力两者

[0534] 接下来,探索增加的ENPP3结合效价与降低的CD3结合亲和力的组合。因此,将具有降低的CD3结合效力的αENPP3 x αCD3双特异性抗体工程化为2+1 Fab_2-scFv-Fc形式,其序列描绘于图20中。

[0535] 将KU812细胞与人PBMC(效应物与靶细胞的比率为10:1)和指定浓度的XENP28925(CD3高;单价ENPP3结合)、XENP29437(CD3高;二价ENPP3结合)、XENP29436(CD3高-Int编号1;单价ENPP3结合)、或XENP29438(CD3高-Int编号1;二价ENPP3结合)一起在37℃下孵育44小时。出乎意料的是,数据(如图43中所描绘)显示XENP29438无法在KU812 细胞上诱导RTCC。

[0536] 5E(a):修复降低效力的CD3结合结构域的活性

[0537] 一种探索修复用于2+1 Fab_2-scFv-Fc bsAb的高-Int编号1 CD3结合结构域的活性的方法是交换αCD3 scFv中的可变重链结构域和可变轻链结构域的取向。新scFv的序列如图10中所描绘。在此,αCD3 scFv被指定为VH/VL或VL/VH以指示其组成可变结构域的取向。将αENPP3 x αCD3双特异性抗体VL/VH CD3 scFv工程化为2+1 Fab_2-scFv-Fc形式,其序列描绘于图21至图22中。

[0538] 将KU812(ENPP3^{高})和RCC4(ENPP3^{低})细胞与人PBMC(效应物与靶细胞的比率为10:1)和指定浓度的XENP29437(CD3高VH/VL;二价ENPP3结合)、XENP30469(CD3高VL/VH;二价ENPP3结合)、XENP29428(CD3高-Int编号1 VH/VL;二价ENPP3结合)、或XENP30470(CD3高-Int编号2 VL/VH;二价ENPP3结合)一起在37℃下孵育44小时。如图44所描绘的数据显示,在2+1 Fab_2-scFv-Fc bsAb形式的背景下,交换CD3高-Int编号1 scFv中可变重链结构域和可变轻链结构域的取向恢复了其活性。鉴于当在2+1 Fab_2-scFv-Fc bsAb形式(如在XENP30469中)的背景下交换CD3高scFv中的可变重链结构域和可变轻链结构域的取向时,效力的增加要适度得多,这是令人惊讶的。此外,在Octet实验(数据未显示)中,发现交换可变结构域的取向不会影响分子对CD3抗原的结合亲和力,进一步突出了VL/VH交换意外恢复了RTCC活性.

[0539] 5F:微调2+1 Fab_2-scFv-Fc形式的ENPP3和CD3结合效力

[0540] 鉴于上述集体发现(即,选择性与效力之间存在折衷),2+1 Fab_2-scFv-Fc形式的额外αENPP3 x αCD3双特异性抗体具有ENPP3和CD3结合效力的不同组合,以提供用于生成了一系列具有不同选择性/效力特征的分子,其序列描绘于图17至图23中。

[0541] 将KU812(ENPP3^{高})和RCC4(ENPP3^{低})细胞与人PBMC(效应物与靶细胞的比率为10:1)和指定浓度的XENP29520(CD3高[VH/VL];二价ENPP3中度结合)、XENP30819(CD3高-Int编号1[VL/VHL];二价ENPP3中度结合)、XENP31149(CD3高-Int编号2[VL/VHL];二价ENPP3中度结合)、XENP30264(CD3高[VH/VL];二价ENPP3低结合)、XENP30821(CD3高-Int编号1[VL/VHL];二价ENPP3低结合)或XENP31150(CD3高-Int编号2[VL/VHL];二价ENPP3低结合)一起孵育。如图45所描绘的数据表明,所述分子中的每种分子提供在ENPP3^{高}细胞与 ENPP3^{低}细胞上的RTCC效力之间的良好分离。

[0542] 实施例6:αENPP3 x αCD3 bsAb增强了体内T细胞的同种异体抗肿瘤效应并与PD-1阻断良好组合

[0543] 6A:aNTI-ENPP3 x aNTI-CD3 bsAb在体内对KU812细胞有活性

[0544] 在第一项研究中,在第-15天在NOD SCID γ (NSG)小鼠(n=10)的右胁腹移植5×10^6个KU812细胞。在第0天,将小鼠腹膜内移植5×10^6个人PBMC。然后在第0天、第7天、第14天和第21天用单独或与3 mg/kg XENP16432(二价抗PD-1 mAb,一种检查点抑制剂,其通过对移植的人类T细胞去抑制来增强抗肿瘤活性;序列描绘于图46中)组合的低或高剂量XENP30819、XENP30821或XENP31419处理小鼠。每周通过卡尺测量肿瘤体积3次(其数据如图47所示)并抽血以研究淋巴细胞扩增(其数据如图48所示)。图50A至图50N中示出了每种处理的个体小鼠曲线。

[0545] 数据显示αENPP3 x αCD3 bsAb中的每一者,在低剂量和/或较高剂量处理时,都能够增强T细胞对KU812细胞的同种异体抗肿瘤效应。值得注意的是,与单独的PD-1阻断(XENP16432)相比,用单独的3 mg/kg XENP30819处理在第5天显著增强了抗肿瘤活性(如由

肿瘤体积的变化所指示)。到第7天,与单独的PD-1阻断相比,用单独的较低1 mg/kg剂量的XENP30819处理显著增强了抗肿瘤活性。使用曼-惠特尼检验对基线校正后的数据执行统计学分析;显著性表示p<0.5。此外,到第7天,与单独的PD-1阻断相比,用6 mg/kg XENP30821(其体外效力低于XENP30819)和PD-1阻断的组合处理显著增强了抗肿瘤活性;并且到第16天,与单独的PD-1阻断相比,用6 mg/kg XENP31419(其对CD3的亲和力低于XENP30819和XENP30821两者)和PD-1阻断的组合处理显著增强了抗肿瘤活性。总的来说,这表明αENPP3 x αCD3 bsAb与PD-1阻断有效组合。使用曼-惠特尼检验对基线校正后的数据执行统计学分析;显著性表示p<0.5。此外,如图48所描绘,将αENPP3 x αCD3 bsAb与PD-1阻断组合增强了淋巴细胞扩增。

[0546] 6B:抗-ENPP3 x 抗-CD3 bsAb在体内对RXF-393细胞有活性

[0547] 在第二项研究中,使用了RXF-393,它是一种更具有临床相关性的人肾肾细胞癌细胞系。在第-8天在NOD SCID γ (NSG)小鼠(n=10)的右胁腹移植1×10^6个RXF-393细胞。在第0天,将小鼠腹膜内移植5×10^6个人PBMC。然后在第0天、第7天、第14天、第21天和第28天用单独或与3 mg/kg XENP16432(PD-1阻断)组合的低、中或高剂量的XENP30819或XENP31419处理小鼠。每周通过卡尺测量肿瘤体积3次(其数据示出在图49中)。图51A至图51L中示出了每种处理的个体小鼠曲线。数据显示αENPP3 x αCD3 bsAb中的每一者,在低剂量、中等剂量和/或较高剂量处理时,都能够增强T细胞对RXF-393细胞的同种异体抗肿瘤效应。尽管单独的XENP31419(其具有较低效力的CD3结合)不如XENP30819 有效,但是与PD-1阻断结合增强了其抗肿瘤效应。

[0548] 实施例7:利用2:1混合效价形式的TAA x CD3双特异性的肿瘤选择性细胞毒性

[0549] 已显示肿瘤相关抗原(TAA) x CD3双特异性物募集T细胞以介导对肿瘤细胞的细胞毒性。TAA x CD3双特异性物的药效动力学和耐受性受TAA生物学的多个方面影响,例如肿瘤负荷、细胞表面抗原密度和正常组织表达。使用二价/单价(2:1)混合效价形式,将TAA x CD3双特异性物的多个示例工程化为使得此类双特异性物表现出对分别模拟肿瘤与正常组织的高与低抗原密度细胞系的选择性重定向T细胞毒性(RTCC)。2:1形式表现出的选择性可能使TAA x CD3双特异性物能够解决一系列扩展的肿瘤抗原生物学问题。

[0550] 异二聚Fc赋予了具有改变的效价的下一代双特异性形式。此类异二聚Fc蛋白(参见例如图53)包括但不限于2:1 Fab_2-scFv-Fc双特异性蛋白(例如,当需要亲合力或选择性时,CD3双特异性物)、1:1 Fab-scFv-Fc双特异性蛋白(例如,双重检查点靶标或检查点靶标x 共刺激靶标)、Y/Z-Fc蛋白(例如,杂细胞因子)、抗X x Y/Z-Fc蛋白(例如,靶向的细胞因子)和单臂Fc蛋白(例如,单价细胞因子)。

[0551] 稳定且表现良好的异二聚Fc区已启用2:1 Fab_2-scFv-Fc双特异性形式。一组新的Fc取代能够实现超过95%的异二聚体产率,而热稳定性几乎没有变化(图54)。此外,Fc区的工程化等电点差异允许直接纯化异二聚体。使用同配取代来最小化对三级结构的影响。图55示出了标准A蛋白纯化后的分布,如通过pI工程化的Fc二聚体和pI工程化的Fc异二聚体的分析IEX确定的。pI工程化的Fc二聚体和pI工程化的Fc异二聚体的热稳定性之间几乎没有差异。铰链和CH2取代消除了Fcγ R结合(图56)。经Fc沉默的构建体显示基本上没有Fcγ RI、Fcγ RIIa (H)、Fcγ RIIa (R)、Fcγ RIIb、Fcγ RIIIa (V)和Fcγ RIIIa (F)结合。

[0552] 2:1 Fab_2-scFv-Fc形式还使得能够靶向正常组织上的低密度实体瘤抗原。调谐

TAA效价和TAA/CD3亲和力使得能够实现模拟癌组织和正常组织(高/低抗原密度)的细胞系的选择性细胞毒性。测试了靶向TAA的双特异性形式,例如FAP、SSTR2和ENPP3。经调谐的1:1形式显示出广泛的反应性,而经调谐的2:1形式显示出高选择性(图57A至图57C)。经调谐的2:1双特异性物还减少了可溶性抗原的干扰并减少了细胞因子释放。

[0553] 本文所述的2:1 Fab2-scFv-Fc CD3双特异性物是稳定的、表现良好的且易于纯化。此外,包括研究规模生产在内的生产很简单。2:1 Fab2-scFv-Fc CD3双特异性物显示出如由DSC确定的抗体样热稳定性和如由SEC测量的有利溶液特性(图58)。双特异性物还具有高纯度,如通过IEX确定的。

[0554] 表达本文所述的双特异性物的稳定细胞系具有高滴度和高异二聚体患病率。例如,顶部克隆的摇瓶产量为1-2g/L,其中异二聚体含量为约90%(图59)。

[0555] 本文所述的TAA x CD3双特异性物的2:1混合效价形式稳定且易于纯化。它们还表现出肿瘤选择性细胞毒性。

[0556] 实施例8:调谐αSSTR2 x αCD3双特异性抗体以实现提高的选择性和减弱的细胞因子释放

[0557] 在RTCC实验中研究了未调谐的XENP18087(1+1 Fab-scFv-Fc bsAb)和经调谐的XENP30458(2+1 $(Fab)_2$-scFv-Fc bsAb)。

[0558] 在第一实验中,探索了通过调谐αSSTR2 x αCD3双特异性抗体来提高选择性。使用以不同密度(高、中、低)SSTR2转染的A549细胞。将CFSE标记的A549细胞与人PBMC(效应物:靶标比例为20:1)在XENP18087或XENP30458存在下一起孵育48小时。描绘RTCC活性的数据(如通过Zombie Aqua染色所指示)描绘于图60中。数据显示,尽管XENP30458在高密度和中密度细胞系上诱导RTCC的效力不如XENP18087,但在高浓度XENP30458下仍可实现有效的靶细胞杀伤。然而,值得注意的是,与在较高浓度下诱导有效靶细胞杀伤的XENP18087相比,即使在非常高的浓度下,XENP30458也几乎没有诱导低密度细胞系上的RTCC。

[0559] 在第二实验中,探索了通过调谐αSSTR2 x αCD3双特异性抗体来减弱细胞因子释放。在该实验中,使用了COR-L279,它是一种已知为SSTR2阳性的临床相关性更强的人肺小细胞癌细胞系。将CFSE标记的COR-L279细胞与人PBMC(效应物:靶标比率为20:1)在XENP18087或XENP30458存在下一起孵育48小时。描绘靶细胞杀伤的数据描绘于图61A中,并且描绘效应细胞的细胞因子释放的数据描绘于图61B至图61E中。如图61A所示,尽管XENP30458诱导RTCC的效力不如XENP18087,但在高浓度XENP30458下仍可实现完全的靶细胞杀伤。然而,如图61B至图61E所示,即使在高剂量下,与XENP18087相比,XENP30458也诱导显著降低的细胞因子释放。

[0560] 虽然这里已经示出和描述了本发明的示例性实施方式,但是对于本领域技术人员来说将是显而易见的是此类实施方式仅作为示例提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和替换。应当理解的是,在实践本发明时可以采用对本文所述的本发明的实施方式的各种替代。以下权利要求旨在限定本发明的范围,并且由此涵盖在这些权利要求及其等同物范围内的方法和结构。

单体1	单体2
F405A	T394F
S364D	Y349K
S364E	L368K
S364E	Y349K
S364F	K370G
S364H	Y349K
S364H	Y349T
S364Y	K370G
T411K	K370E
V397S/F405A	T394F
K370R/T411K	K370E/T411E
L351E/S364D	Y349K/L351K
L351E/S364E	Y349K/L351K
L351E/T366D	L351K/T366K
P395T/V397S/F405A	T394F
S364D/K370G	S364Y/K370R
S364D/T394F	Y349K/F405A
S364E/F405A	Y349K/T394F
S364E/F405S	Y349K/T394Y
S364E/T411E	Y349K/D401K
S364H/D401K	Y349T/T411E
S364H/F405A	Y349T/T394F
S364H/T394F	Y349T/F405A
Y349C/S364E	Y349K/S354C
L351E/S364D/F405A	Y349K/L351K/T394F
L351K/S364H/D401K	Y349T/L351E/T411E
S364E/T411E/F405A	Y349K/T394F/D401K
S364H/D401K/F405A	Y349T/T394F/T411E
S364H/F405A/T411E	Y349T/T394F/D401K

图1A

单体1	单体2
K370E/T411D	T411K
L368E/K409E	L368K
Y349T/T394F/S354C	S364H/F405A/Y349C
T411E	D401K
T411E	D401R/T411R
Q347E/K360E	Q347R
L368E	S364K
L368E/K370S	S364K
L368E/K370T	S364K
L368E/D401R	S364K
L368E/D401N	S364K
L368E	E357S/S364K
L368E	S364K/K409E
L368E	S364K/K409V
L368D	S364K
L368D/K370S	S364K
L368D/K370S	S364K/E357L
L368D/K370S	S364K/E357Q
T411E/K360E/Q362E	D401K
K370S	S364K
L368E/K370S	S364K/E357Q
K370S	S364K/E357Q
T411E/K360D	D401K
T411E/K360E	D401K
T411E/Q362E	D401K
T411E/N390D	D401K
T411E	D401K/Q347K
T411E	D401K/Q347R
T411E/K360D/Q362E	D401K

图1B

单体1	单体2
T411E/K360E/N390D	D401K
T411E/Q362E/N390D	D401K
T411E/Q347R	D401K/K360D
T411E/Q347R	D401K/K360E
T411E/K360	D401K/Q347K
T411E/K360D	D401K/Q347R
T411E/K360E	D401K/Q347K
T411E/K360E	D401K/Q347R
T411E/S364K	D401K/K370S
T411E/K370S	D401K/S364K
Q347E	E357Q
Q347E	E357Q/Q362K
K360D/Q362E	Q347R
K360D/Q362E	D401K
K360D/Q362E	Q347R/D401K
K360E/Q362E	Q347R
K360E/Q362E	D401K
K360E/Q362E	Q347R/D401K
Q362E/N390D	D401K
Q347E/K360D	D401N
K360D	Q347R/N390K
K360D	N390K/D401N
K360E	Y349H
K370S/Q347E	S364K
K370S/E357L	S364K
K370S/E357Q	S364K
K370S/Q347E/E357L	S364K
K370S/Q347E/E357Q	S364K

图1C

单体1	单体2
L368D/K370S/Q347E	S364K
L368D/K370S/E357L	S364K
L368D/K370S/E357Q	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370S/Q347E	S364K
L368E/K370S/E357L	S364K
L368E/K370S/E357Q	S364K
L368E/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368E/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368D/K370T/Q347E	S364K
L368D/K370T/E357L	S364K
L368D/K370T/E357Q	S364K
L368D/K370T/Q347E/E357L	S364K
L368D/K370T/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E	S364K
L368E/K370T/E357L	S364K
L368E/K370T/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E/E357L	S364K
L368E/K370T/Q347E/E357Q	S364K
T411E/Q362E	D401K/T411K
T411E/N390D	D401K/T411K
T411E/Q362E	D401R/T411R
T411E/N390D	D401R/T411R
Y407T	T366Y
F405A	T394W
T366Y/F405A	T394W/Y407T
Y407A	T366W
T366S/L368A/Y407V	T366W
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C

图1D

单体1	单体2
K392D/K409D	E356K/D399K
K370D/K392D/K409D	E356K/E357K/D399K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	Q196K/I199T/N276K
N384S/K392N/V397M/Q419E	N276K
D221E/P228E/L368E	D221R/P228R/K409R
C220E/P228E/L368E	C220R/E224R/P228R/K409R
F405L	K409R
T366I/K392M/T394W	F405A/Y407V
T366V/K409F	L351Y/Y407A
T366A/K392E/K409F/T411E	D399R/S400R/Y407A
L351K	L351E
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447_	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447_	Q196K/I199T/N276K
I199T/N203D/K274Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	
N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D	
N208D/Q295E/Q418E/N421D	
Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K	
Q196K/I199T/N276K	
E269Q/E272Q/E283Q/E357Q	
E269Q/E272Q/E283Q	
E269Q/E272Q	
E269Q/E283Q	
E272Q/E283Q	
E269Q	

图1E

变体恒定区	取代
pI-ISO(-)	I199T/N203D/K274Q/R355Q/N384S/K392N/N397M/Q419E/K447_
仅pI_ISO(-)-Fc	K274Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_
pI_(-)_同配_A	N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D
仅pI_(-)_同配A-Fc	Q295E/N384D/Q418E/N421D
pI_(-)_同配_B	N208D/Q295E/Q418E/N421D
仅pI_(-)_同配_B-Fc	Q295E/Q418E/N421D
pI_ISO(+RR)	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
仅pI_ISO(+RR)-Fc	P217R/P228R/N276K
pI_ISO(+)	Q196K/I199T/N276K
仅pI_ISO(+)-Fc	N276K
pI_(+)_同配_A	E269Q/E272Q/E283Q/E357Q
pI_(+)_同配_B	E269Q/E272Q/E283Q
pI_(+)_同配_E269Q/E272Q	E269Q/E272Q
pI_(+)_同配_E269Q/E283Q	E269Q/E283Q
pI_(+)_同配_E272Q/E283Q	E272Q/E283Q
pI_(+)_同配_E269Q	E269Q

图2

消融变体
G236R
S239G
S239K
S239Q
S239R
V266D
S267K
S267R
H268K
E269R
299R
299K
K322A
A327G
A327L
A327N
A327Q
L328E
L328R
P329A
P329H
P329K
A330L
A330S/P331S
I332K
I332R
V266D/A327Q
V266D/P329K
S267R/A327Q
S267R/P329K
G236R/L328R
E233P/L234V/L235A/G236_/S239K
E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
E233P/L234V/L235A/G236_/S239K/A327G
E233P/L234V/L235A/G236_/S267K/A327G
E233P/L234V/L235A/G236_
S239K/S267K
267K/P329K

图3

重链1 (-)，例如Fab-Fc	重链2 (+)，例如scFv-Fc或Fab-scFv-Fc
	C220S
异二聚偏斜变体L368D/K370S	异二聚偏斜变体S364K/E357Q
同配pI取代N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D	
FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236_/S267K
±M428L/N434S	±M428L/N434S

图4

带正电荷的scFv接头

名称	序列	长度	电荷	
Gly-Ser 15	GGGGSGGGGSGGGGS	15	0	7
Whitlow接头	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	18	+1	8
6paxA_1 (+A)	IRPRAIGGSKPRVA	14	+4	9
+B	GKGGSGKGGSGKGGS	15	+3	10
+C	GGKGSGGKGSGGKGS	15	+3	11
+D	GGGKSGGGKSGGGKS	15	+3	12
+E	GKGKSGKGKSGKGKS	15	+6	13
+F	GGGKSGGKGSGKGGS	15	+3	14
+G	GKPGSGKPGSGKPGS	15	+3	15
+H	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	20	+4	1
+I	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	20	+8	16

带负电荷的scFv接头

名称	序列	长度	电荷	
Gly-Ser 20	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	20	0	17
3hsc_2 (-A)	STAGDTHLGGEDFD	14	-4	18
-B	GEGGSGEGGSGEGGS	15	-3	19
-C	GGEGSGGEGSGGEGS	15	-3	20
-D	GGGESGGGESGGGES	15	-3	21
-E	GEGESGEGESGEGES	15	-6	22
-F	GGGESGGEGSGEGGS	15	-3	23
-G	GEGESGEGESGEGESGEGES	20	-8	24

附加scFv接头

GGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 7
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 17
GSTSGSGKPGSGEGSTKG	SEQ ID NO: 8
PRGASKSGSASQTGSAPGS	SEQ ID NO: 25
GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	SEQ ID NO: 26
GTSGSSGSGSGGSGSGGGG	SEQ ID NO: 27
GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	SEQ ID NO: 1

图5

可用的结构域接头

名称	序列	SEQ ID NO:
$(GGGGS)_1$ or GGGGS	GGGGS	2
$(GGGGS)_2$	GGGGSGGGGS	28
$(GGGGS)_3$	GGGGSGGGGSGGGGS	7
$(GGGGS)_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	17
$(GGGGS)_5$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	29
$(GGGGS)_6$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	30
$(GGGGS)_7$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	31
$(GGGGA)_1$ or GGGGA	GGGGA	32
$(GGGGA)_2$	GGGGAGGGGA	33
$(GGGGA)_3$	GGGGAGGGGAGGGGA	34
$(GGGGA)_4$	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	35
$(GGGGA)_5$	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	36
$(GGGGA)_6$	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	37
$(GGGGA)_7$	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	38
30AA-linker	DPALVHQRPAPPGGGGSGGGGSGGGGSGGG	39
$(GKPGS)_1$ or GKPGS	GKPGS	40
$(GKPGS)_5$	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	41
$(GKPGS)_6$	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	42
$(GGGES)_1$ or GGGES	GGGES	43
“半铰链”	KTHTCPPCP	44
“全铰链C220S变体”	EPKSSDKTHTCPPCP	45
“柔性半铰链”	GGGGSGGGGSKTHTCPPCP	6
“带电荷的半铰链1”	GKPGSGKPGSKTHTCPPCP	46
“带电荷的半铰链2”	GKPGSKTHTCPPCP	47

图6

1+1 Fab-scFv-Fc主链1

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 48)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 49)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

1+1 Fab-scFv-Fc主链2

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 50)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 51)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

1+1 Fab-scFv-Fc主链3

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 52)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCEVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 53)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图7A

1+1 Fab-scFv-Fc主链4

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 54)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTENEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLEVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 55)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSKGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

1+1 Fab-scFv-Fc主链5

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 56)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 57)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDQLTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

1+1 Fab-scFv-Fc主链6

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 58)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 59)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图7B

1+1 Fab-scFv-Fc主链7

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 60)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 61)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

1+1 Fab-scFv-Fc主链8

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 62)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TKTYTCNVDHKPSDTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEEFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWEEGDVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSLGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 63)
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEQMTKNQVKLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

1+1 Fab-scFv-Fc主链9

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 64)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFG
TQTYTCNVDHKPSDTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEEFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 65)
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图7C

1+1 Fab-scFv-Fc主链10

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 66)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFG
TQTYTCNVDHKPSDTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEEFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 67)
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

1+1 Fab-scFv-Fc主链11

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 68)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 69)
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

1+1 Fab-scFv-Fc主链12

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 70)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVAGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 71)
ERKSSDKTHTCPPRPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFKWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图7D

2+1 Fab2-scFv-Fc主链1

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 72)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Fab-scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 73)

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

2+1 Fab2-scFv-Fc主链2

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 74)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Fab-scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 75)

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

2+1 Fab2-scFv-Fc主链3

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 76)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCEVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Fab-scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 77)

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图8A

2+1 Fab2-scFv-Fc主链4

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 78)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTENEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLEVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Fab-scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 79)

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSKGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

2+1 Fab2-scFv-Fc主链5

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 80)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Fab-scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 81)

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDQLTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

2+1 Fab2-scFv-Fc主链6

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 82)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Fab-scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 83)

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图8B

2+1 Fab2-scFv-Fc主链7

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 84)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Fab-scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 85)

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

2+1 Fab2-scFv-Fc主链8

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 86)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCS
VLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

>Fab-scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 87)

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

2+1 Fab2-scFv-Fc主链9

>Fab-Fc侧 (SEQ ID NO: 88)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCDVAGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Fab-scFv-Fc侧 (SEQ ID NO: 89)

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图8C

恒定轻链结构域-κ(SEQ ID NO: 90)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

恒定轻链结构域-λ(SEQ ID NO: 91)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPE
QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

图9

CD3高-[抗CD3]_H1.30_L1.47_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	92
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	93
vhCDR1	TYAMN	94
vhCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	95
vhCDR3	HGNFGDSYVSWFAY	96
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	97
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	98
vlCDR2	GTNKRAP	99
vlCDR3	ALWYSNHWV	100
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	101

CD3高-Int编号1-[抗CD3]_H1.32_L1.47_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	102
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	103
vhCDR1	TYAMN	104
vhCDR2	RIRSKANNYATYYADSVKG	105
vhCDR3	HGNFGDSYVSWFAY	106
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	107
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	108
vlCDR2	GTNKRAP	109
vlCDR3	ALWYSNHWV	110
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	111

图10A

CD3高-Int编号2-[抗CD3]_H1.89_L1.47_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	112
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSS	113
vhCDR1	TYAMN	114
vhCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	115
vhCDR3	HGNFGDEYVSWFAY	116
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	117
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	118
vlCDR2	GTNKRAP	119
vlCDR3	ALWYSNHWV	120
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	121

CD3高-Int-[抗CD3]_H1.90_L1.47_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	122
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFAYWGQGTLVTVSS	123
vhCDR1	TYAMN	124
vhCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	125
vhCDR3	HGNFGDPYVSWFAY	126
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	127
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	128
vlCDR2	GTNKRAP	129
vlCDR3	ALWYSNHWV	130
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	131

图10B

抗CD3-中间体-[抗CD3]_H1.33_L1.47_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	132
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSS	133
vhCDR1	TYAMN	134
vhCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	135
vhCDR3	HGNFGDSYVSWFDY	136
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	137
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	138
vlCDR2	GTNKRAP	139
vlCDR3	ALWYSNHWV	140
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	141

CD3高-Int-[抗CD3]_H1.31_L1.47_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	142
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	143
vhCDR1	TYAMS	144
vhCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	145
vhCDR3	HGNFGDSYVSWFAY	146
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	147
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	148
vlCDR2	GTNKRAP	149
vlCDR3	ALWYSNHWV	150
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	151

图10C

CD3高[VL-VH]-[抗CD3]_L1.47_H1.30_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	152
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	153
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	154
vlCDR2	GTNKRAP	155
vlCDR3	ALWYSNHWV	156
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	157
vhCDR1	TYAMN	158
vhCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	159
vhCDR3	HGNFGDSYVSWFAY	160
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	161

CD3高-Int编号1[VL-VH]-[抗CD3]_L1.47_H1.32_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	162
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	163
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	164
vlCDR2	GTNKRAP	165
vlCDR3	ALWYSNHWV	166
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	167
vhCDR1	TYAMN	168
vhCDR2	RIRSKANNYATYYADSVKG	169
vhCDR3	HGNFGDSYVSWFAY	170
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	171

图10D

CD3高-Int编号2[VL-VH]-[抗CD3]_L1.47_H1.89_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSS	172
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	173
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	174
vlCDR2	GTNKRAP	175
vlCDR3	ALWYSNHWV	176
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSS	177
vhCDR1	TYAMN	178
vhCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	179
vhCDR3	HGNFGDEYVSWFAY	180
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	181

CD3高-Int[VL-VH]-[抗CD3]_L1.47_H1.90_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFAYWGQGTLVTVSS	182
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	183
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	184
vlCDR2	GTNKRAP	185
vlCDR3	ALWYSNHWV	186
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFAYWGQGTLVTVSS	187
vhCDR1	TYAMN	188
vhCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	189
vhCDR3	HGNFGDPYVSWFAY	190
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	191

图10E

抗CD3-中间体[VL-VH]-[抗CD3]_L1.47_H1.33_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSS	192
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	193
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	194
vlCDR2	GTNKRAP	195
vlCDR3	ALWYSNHWV	196
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSS	197
vhCDR1	TYAMN	198
vhCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	199
vhCDR3	HGNFGDSYVSWFDY	200
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	201

CD3高-Int[VL-VH]-[抗CD3]_L1.47_H1.31_scFv

	序列	SEQ ID NO:
scFv	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	202
可变轻(vl)结构域	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL	203
vlCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	204
vlCDR2	GTNKRAP	205
vlCDR3	ALWYSNHWV	206
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	207
vhCDR1	TYAMS	208
vhCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	209
vhCDR3	HGNFGDSYVSWFAY	210
接头	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	211

图10F

人ENPP3序列

>sp|O14638 (SEQ ID NO: 212)

MESTLTLATEQPVKKNTLKKYKIACIVLLALLVIMSLGLGLGLGLRKLEKQGSCRKKCFDASFRGLENCRCDVACKD
RGDCCWDFEDTCVESTRIWMCNKFRCGETRLEASLCSCSDDCLQRKDCCADYKSVCQGETSWLEENCDTAQQSQCPE
GFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTLMPNINKLKTCGIHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIDNNMYDV
NLNKNFSLSSKEQNNPAWWHGQPMWLTAMYQGLKAATYFWPGSEVAINGSFPSIYMPYNGSVPFEERISTLLKWLDL
PKAERPRFYTMYFEEPDSSGHAGGPVSARVIKALQVVDHAFGMLMEGLKQRNLHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEY
MTDYFPRINFFYMYEGPAPRIRAHNIPHDFFSFNSEEIVRNLSCRKPDQHFKPYLTPDLPKRLHYAKNVRIDKVHLF
VDQQWLAVRSKSNTNCGGGNHGYNNEFRSMEAIFLAHGPSFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQPAPNNGTHGSL
NHLLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPTESLDCFCPHLQNSTQLEQVNQMLNLTQEEITATVKVNLPFGRPRVL
QKNVDHCLLYHREYVSGFGKAMRMPMWSSYTVPQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSESQKCSFYLADKNITHGFL
YPPASNRTSDSQYDALITSNLVPMYEEFRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEITKHLA
NTDVPIPTHYFVVLTSCKNKSHTPENCPGWLDVLPFIIPHRPTNVESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVRDVELLTG
LDFYQDKVQPVSEILQLKTYLPTFETTI

人ENPP3序列，细胞外结构域

>sp|O14638|31-875 (SEQ ID NO: 213)

LLVIMSLGLGLGLGLRKLEKQGSCRKKCFDASFRGLENCRCDVACKDRGDCCWDFEDTCVESTRIWMCNKFRCGETR
LEASLCSCSDDCLQRKDCCADYKSVCQGETSWLEENCDTAQQSQCPEGFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTLMPNI
NKLKTCGIHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIDNNMYDVNLNKNFSLSSKEQNNPAWWHGQPMWLTAMY
QGLKAATYFWPGSEVAINGSFPSIYMPYNGSVPFEERISTLLKWLDLPKAERPRFYTMYFEEPDSSGHAGGPVSARV
IKALQVVDHAFGMLMEGLKQRNLHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMYEGPAPRIRAHNIPHDF
FSFNSEEIVRNLSCRKPDQHFKPYLTPDLPKRLHYAKNVRIDKVHLFVDQQWLAVRSKSNTNCGGGNHGYNNEFRSM
EAIFLAHGPSFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQPAPNNGTHGSLNHLLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLP
TESLDCFCPHLQNSTQLEQVNQMLNLTQEEITATVKVNLPFGRPRVLQKNVDHCLLYHREYVSGFGKAMRMPMWSSY
TVPQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSESQKCSFYLADKNITHGFLYPPASNRTSDSQYDALITSNLVPMYEEFRK
MWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEITKHLANTDVPIPTHYFVVLTSCKNKSHTPENCPGW
LDVLPFIIPHRPTNVESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVRDVELLTGLDFYQDKVQPVSEILQLKTYLPTFETTI

小鼠ENPP3序列

>sp|Q6DYE8 (SEQ ID NO: 214)

MDSRLALATEEPIKKDSLKKYKILCVVLLALLVIVSLGLGLGLGLRKPEEQGSCRKKCFDSSHRGLEGCRCDSGCTG
RGDCCWDFEDTCVKSTQIWTCNLFRCGENRLETALCSCADDCLQRKDCCADYKTVCQGESPWVTEACASSQEPQCPP
GFDLPPVILFSMDGFRAEYLQTWSTLLPNINKLKTCGIHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIDNNMYDV
HLNKNFSLSSVEKSNPAWWSGQPIWLTAMYQGLKAACYYWPGSDVAVNGSFPTIYRNYSNSVPYERRITTLLQWLDL
PKADRPSFYTIYVEEPDSAGHSSGPVSAGVIKALQSVDNAFGMLMEGLKQRNLHNCVNIIVLADHGMDQTSCDRVEY
MTDYFPKINFYMYQGPAPRIRTRNIPQDFFTFNSEEIVRNLSCRKPDQHFKPYLTPDLPKRLHYAKNVRIDKAHLMV
DRQWLAFRSKGSSNCGGGTHGYNNEFKSMEAIFLAHGPSFIEKTVIEPFENIEVYNLLCDLLHIEPAPNNGTHGSLN
HLLKTPFYKPSHAGELSTPADCGFTTPLPTDPLDCSCPALQNTPGLEEQANQRLNLSEGEVAATVKANLPFGRPRVM
QKNGDHCLLYHRDYISGYGKAMKMPMWSSYTVLKPGDTSSLPPTVPDCLRADVRVAPSESQKCSFYLADKNITHGFL
YPAIKGTNESRYDALITSNLVPMYKEFKKMWDYFHEVLLIKYAIERNGLNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEITQYVAG
TDVPIPTHYFVVLTSCKDQTHTPDSCPGWLDVLPFIVPHRPTNIESCSENKTEDLWVEERFQAHAARVRDVELLTGL
DFYQEKAQPVSQILQLKTYLPTFETII

图11A

小鼠ENPP3序列，细胞外结构域

>sp|Q6DYE8|31-874 (SEQ ID NO: 215)

LLVIVSLGLGLGLGLRKPEEQGSCRKKCFDSSHRGLEGCRCDSGCTGRGDCCWDFEDTCVKSTQIWTCNLFRCGENR
LETALCSCADDCLQRKDCCADYKTVCQGESPWVTEACASSQEPQCPPGFDLPPVILFSMDGFRAEYLQTWSTLLPNI
NKLKTCGIHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIDNNMYDVHLNKNFSLSSVEKSNPAWWSGQPIWLTAMY
QGLKAACYYWPGSDVAVNGSFPTIYRNYSNSVPYERRITTLLQWLDLPKADRPSFYTIYVEEPDSAGHSSGPVSAGV
IKALQSVDNAFGMLMEGLKQRNLHNCVNIIVLADHGMDQTSCDRVEYMTDYFPKINFYMYQGPAPRIRTRNIPQDFF
TFNSEEIVRNLSCRKPDQHFKPYLTPDLPKRLHYAKNVRIDKAHLMVDRQWLAFRSKGSSNCGGGTHGYNNEFKSME
AIFLAHGPSFIEKTVIEPFENIEVYNLLCDLLHIEPAPNNGTHGSLNHLLKTPFYKPSHAGELSTPADCGFTTPLPT
DPLDCSCPALQNTPGLEEQANQRLNLSEGEVAATVKANLPFGRPRVMQKNGDHCLLYHRDYISGYGKAMKMPMWSSY
TVLKPGDTSSLPPTVPDCLRADVRVAPSESQKCSFYLADKNITHGFLYPAIKGTNESRYDALITSNLVPMYKEFKKM
WDYFHEVLLIKYAIERNGLNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEITQYVAGTDVPIPTHYFVVLTSCKDQTHTPDSCPGWL
DVLPFIVPHRPTNIESCSENKTEDLWVEERFQAHAARVRDVELLTGLDFYQEKAQPVSQILQLKTYLPTFETII

食蟹猴ENPP3序列

>tr|A0A2K5TKP4 (SEQ ID NO: 216)

MESMLTLATEQPVKKNTLKKYKIACIVLLALLVIMSLGLGLGLGLRKLEKQGSCRKKCFDASFRGLENCRCDVACED
RGDCCWDFEDTCVESTRIWTCNKFRCGETRLEASLCSCSDDCLQRKDCCADYKSVCQGETSWLEENCDTAQQSQCPE
GFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTLMPNINKLKTCGIHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIDNNMYDV
NLNKNFSLSSEEQNNPAWWHGQPMWLTAMYQGLKAATYFWPGSEVAINGSFPSIYMPYNRSVPYEERISTLLKWLDL
PKAERPSFYTMYFEEPDSSGHAGGPVSARVIKALQVVDHAFGMLMEGLKQRNLHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEY
MTDYFPRINFYMYEGPAPRIRALNVPHDFFSCKYEDTYMKKRCRKPDQHFKPYLTPDLPKRLHYAKNVRIDKVHLFV
DRQWLAVGSKSNTNCGGGNHGYNNEFRSMEAIFLAHGPSFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQPAPNNGTRGSLN
HLLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPTNNLSCLCPHLQNSIQLEQVNQMLNLTQEEITATVKVNLPFGRPRVLQ
KNVDNCLLYHREYVSGFGKAMRMPMWSSYTVPQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSESQKCSFYLADENITHGFLY
PPAINRTSDSQYDALIMSNLVPMYEEFRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAPEEITKHIAN
TDIPIPTHYFVVLTSCKNKSHTPENCPGWLDVLPFIIPHRPTNVESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVRDVELLTGL
DFYQDKAQPVSEILQLKTYLPTFETTI

食蟹猴PD-1序列，细胞外结构域（预测的）

>tr|A0A2K5TKP4|31-874 (SEQ ID NO: 217)

LLVIMSLGLGLGLGLRKLEKQGSCRKKCFDASFRGLENCRCDVACEDRGDCCWDFEDTCVESTRIWTCNKFRCGETR
LEASLCSCSDDCLQRKDCCADYKSVCQGETSWLEENCDTAQQSQCPEGFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTLMPNI
NKLKTCGIHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIDNNMYDVNLNKNFSLSSEEQNNPAWWHGQPMWLTAMY
QGLKAATYFWPGSEVAINGSFPSIYMPYNRSVPYEERISTLLKWLDLPKAERPSFYTMYFEEPDSSGHAGGPVSARV
IKALQVVDHAFGMLMEGLKQRNLHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFYMYEGPAPRIRALNVPHDFF
SCKYEDTYMKKRCRKPDQHFKPYLTPDLPKRLHYAKNVRIDKVHLFVDRQWLAVGSKSNTNCGGGNHGYNNEFRSME
AIFLAHGPSFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQPAPNNGTRGSLNHLLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPT
NNLSCLCPHLQNSIQLEQVNQMLNLTQEEITATVKVNLPFGRPRVLQKNVDNCLLYHREYVSGFGKAMRMPMWSSYT
VPQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSESQKCSFYLADENITHGFLYPPAINRTSDSQYDALIMSNLVPMYEEFRKM
WDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAPEEITKHIANTDIPIPTHYFVVLTSCKNKSHTPENCPGWL
DVLPFIIPHRPTNVESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVRDVELLTGLDFYQDKAQPVSEILQLKTYLPTFETTI

图11B

AN1[ENPP3]_H1L1

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGKRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS	218
vhCDR1	NYGMS	219
vhCDR2	YISSGGGTTYYLDSVKG	220
vhCDR3	HRRVYYGYYFDY	221
可变轻(vl)结构域	DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK	222
vlCDR1	RASQSIGTSIH	223
vlCDR2	YASESIS	224
vlCDR3	QQSNSWPYT	225

>XENP28278 AN1[αENPP3]_H1L1_IgG1_PVA_/S267K

链1-AN1[αENPP3]_H1L1_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 226)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGKRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1L1_IgG1_PVA_/S267K (SEQ ID NO: 227)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图12

AN1[ENPP3]_H1_L1.33

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGKRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS	228
vhCDR1	NYGMS	229
vhCDR2	YISSGGGTTYYLDSVKG	230
vhCDR3	HRRVYYGYYFDY	231
可变轻(vl)结构域	DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK	232
vlCDR1	RASQSIGTSIH	233
vlCDR2	YASESIS	234
vlCDR3	QQSNSWPYT	235

AN1[ENPP3]_H1_L1.77

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGKRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS	236
vhCDR1	NYGMS	237
vhCDR2	YISSGGGTTYYLDSVKG	238
vhCDR3	HRRVYYGYYFDY	239
可变轻(vl)结构域	DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYESESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK	240
vlCDR1	RASQSIGTSIH	241
vlCDR2	YESESIS	242
vlCDR3	QQSNSWPYT	243

图13A

AN1[ENPP3]_H1.8_L1

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS	244
vhCDR1	NYGMS	245
vhCDR2	YISSGGGTTYYLDSVTG	246
vhCDR3	HRRVYYGYYFDY	247
可变轻(vl)结构域	DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK	248
vlCDR1	RASQSIGTSIH	249
vlCDR2	YASESIS	250
vlCDR3	QQSNSWPYT	251

AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS	252
vhCDR1	NYGMS	253
vhCDR2	YISSGGGTTYYLDSVTG	254
vhCDR3	HRRVYYGYYFDY	255
可变轻(vl)结构域	DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK	256
vlCDR1	RASQSIGTSIH	257
vlCDR2	YASESIS	258
vlCDR3	QQSNSWPYT	259

AN1[ENPP3]_H1.8_L1.77

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS	260
vhCDR1	NYGMS	261
vhCDR2	YISSGGGTTYYLDSVTG	262
vhCDR3	HRRVYYGYYFDY	263
可变轻(vl)结构域	DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYESESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK	264
vlCDR1	RASQSIGTSIH	265
vlCDR2	YESESIS	266
vlCDR3	QQSNSWPYT	267

图13B

H16-7.213

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	WGLSEVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARELRYFGWLLSSLDYWGQGTLVTVSS	268
vhCDR1	GYYMH	269
vhCDR2	WINPNSGGTNYAQKFQG	270
vhCDR3	ELRYFGWLLSSLDY	271
可变轻(vl)结构域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWFQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYSCQQSYSFPLTFGGGTKVEIK	272
vlCDR1	RASQSISSYLN	273
vlCDR2	AASSLQS	274
vlCDR3	QQSYSFPLT	275

H16-9.69

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	WGLSEVSCKASGYTFTSYDIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTVYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARTVLLWPFDYWGQGTLVTVSS	276
vhCDR1	SYDIH	277
vhCDR2	WMNPNSGNTVYAQKFQG	278
vhCDR3	TVLLWPFDY	279
可变轻(vl)结构域	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSKNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPWTFGQGTKVEIK	280
vlCDR1	KSSQSVLYSSKNKNYLA	281
vlCDR2	WASTRES	282
vlCDR3	QQYYSTPPWT	283

H16-1.52

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSDGSPYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGYSSGWNYFDYWGQGTLVTVSS	284
vhCDR1	SYAMS	285
vhCDR2	AISGSDGSPYYADSVKG	286
vhCDR3	DGYSSGWNYFDY	287
可变轻(vl)结构域	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQEYYSTMCSFGQGTKLEIK	288
vlCDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA	289
vlCDR2	WASTRES	290
vlCDR3	QEYYSTMCS	291

图14A

Ha16-1(1)23

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	VESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWSDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYYGSGSYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	292
vhCDR1	SYGMH	293
vhCDR2	VIWSDGSNKYYADSVKG	294
vhCDR3	EGYYGSGSYYYYYGMDV	295
可变轻(vl)结构域	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGTQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRNNNRPSGISERLSASTSGNTASLTITGLQPEDEADYYCSAWDSSLSAVVFGGGTKLTVL	296
vlCDR1	TGNSNNVGTQGAA	297
vlCDR2	RNNNRPS	298
vlCDR3	SAWDSSLSAVV	299

H16-9.44

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	LSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQSAGKGLEWIGRIYTGVSTNYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYYDSSGYYPFDYWGQGTLVTVSS	300
vhCDR1	SYYWS	301
vhCDR2	RIYTGVSTNYNPSLKS	302
vhCDR3	DYYDSSGYYPFDY	303
可变轻(vl)结构域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLENGVPSKFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSSPFTFGPGTKVDIR	304
vlCDR1	RASQGISNYLA	305
vlCDR2	AASSLEN	306
vlCDR3	QQYNSSPFT	307

H16-1.67

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	VESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSINSFGYYWSWIRQYPGKGLEWIGFLYFTGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAGTMVRGAHYYGMDVWGQGTTVTVSS	308
vhCDR1	SFGYYWS	309
vhCDR2	FLYFTGSTYYNPSLKS	310
vhCDR3	AGTMVRGAHYYGMDV	311
可变轻(vl)结构域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQIYSTPPEWTFGQGTKVEIK	312
vlCDR1	RASQSISNYLN	313
vlCDR2	AASSLQS	314
vlCDR3	QQIYSTPPEWT	315

图14B

Ha1 6-1 (3,5)36

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSMYYSGSTYHNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHYITVAGIFDYWGQGTLVTVSS	316
vhCDR1	SSSYYWG	317
vhCDR2	SMYYSGSTYHNPSLKS	318
vhCDR3	HYITVAGIFDY	319
可变轻(vl)结构域	QSVLTQPPSASGTPGQRATISCSGSSTNIGSTIVNWYQQVPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDASLNGPVFGGGTKLTVL	320
vlCDR1	SGSSTNIGSTIVN	321
vlCDR2	SNNQRPS	322
vlCDR3	AAWDASLNGPV	323

H16-1.86

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	VESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAYGYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	324
vhCDR1	SYYWS	325
vhCDR2	YIYYSGSTNYNPSLKS	326
vhCDR3	AYGYYYYGMDV	327
可变轻(vl)结构域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSISSYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSSPPWTFGQGTKVEIK	328
vlCDR1	RTSQSISSYLN	329
vlCDR2	AASSLQS	330
vlCDR3	QQTYSSPPWT	331

H16-9.10

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	LLESGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNAYAVSVKSRMTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREAGGWFDPWGQGTLVTVSS	332
vhCDR1	SNSAAWN	333
vhCDR2	RTYYRSKWYNAYAVSVKS	334
vhCDR3	EAGGWFDP	335
可变轻(vl)结构域	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIK	336
vlCDR1	RASQGIRSWLA	337
vlCDR2	AASSLQS	338
vlCDR3	QQANSFPPT	339

图14C

H16-9.33

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLLESGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKYYNAYPVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREAGGWFDPWGQGTLVTVSS	340
vhCDR1	SNSAAWN	341
vhCDR2	RTYYRSKYYNAYPVSVKS	342
vhCDR3	EAGGWFDP	343
可变轻(vl)结构域	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRANQGIRSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIK	344
vlCDR1	RANQGIRSWLA	345
vlCDR2	AASSLQS	346
vlCDR3	QQANSFPPT	347

H16-1.68

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDMAMYYCARSRITIFGVVHYGMDVWGQGTTVTVSS	348
vhCDR1	SYGMH	349
vhCDR2	VIWYDGSNKYYADSVKG	350
vhCDR3	SRITIFGVVHYGMDV	351
可变轻(vl)结构域	TQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNINSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFTTYYCQQSYSSAPTFGGGTKLEIK	352
vlCDR1	RASQNINSYLN	353
vlCDR2	AASSLQS	354
vlCDR3	QQSYSSAPT	355

Ha16-1(1)1

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	GPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAVSYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	356
vhCDR1	SYYWS	357
vhCDR2	YIYYSGSTNYNPSLKS	358
vhCDR3	AVSYYYYGMDV	359
可变轻(vl)结构域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTIQNINSYLNWYQQRPGKAPKLLIYATSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTLFTFGPGTKVDIK	360
vlCDR1	RTIQNINSYLN	361
vlCDR2	ATSSLQS	362
vlCDR3	QQTYSTLFT	363

图14D

Ha1 6-1 (3,5)18

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	GPGLVKPSETLSLTCTVPGGSIRSYFWSWIRQPAGKGLEWIGRFYFSGSTNYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGDHYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	364
vhCDR1	SYFWS	365
vhCDR2	RFYFSGSTNYNPSLKS	366
vhCDR3	DYGDHYYYYGMDV	367
可变轻(vl)结构域	VLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQFPGTAPKFLIYDNNKRSSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAVIFGGGTKLTVL	368
vlCDR1	SGSSSNIGNNYVS	369
vlCDR2	DNNKRSS	370
vlCDR3	GTWDSSLSAVI	371

Ha16-1(2,4)4

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	GFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDESNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYSGSYGYSYYGM	372
vhCDR1	SYGMH	373
vhCDR2	IIWYDESNKYYADSVKG	374
vhCDR3	AYSGSYGYSYYGM	375
可变轻(vl)结构域	QDRQPASPGSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDNRTAVFGGGTKLTVL	376
vlCDR1	PGSGDKLGDKYAC	377
vlCDR2	QDSKRPS	378
vlCDR3	QAWDNRTAV	379

Ha16-1(3,5)56

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	RCRLVESGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWRSLKASDTAMYYCARKDYYYYVMDVWGQGTTVTVSS	380
vhCDR1	SYWIG	381
vhCDR2	IIYPGDSDTRYSPSFQG	382
vhCDR3	KDYYYYVMDV	383
可变轻(vl)结构域	DTISCTGTSSDVGNYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYAVNNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSRNLVVFGGGTKLTVL	384
vlCDR1	TGTSSDVGNYNYVS	385
vlCDR2	AVNNRPS	386
vlCDR3	SSYTSSRNLVV	387

图14E

H16-7.8

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGIIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVFYCARVAIVTTIPGGMDVWGQGTTVTVSS	388
vhCDR1	SGGYYWS	389
vhCDR2	IIYYSGSTYYNPSLKS	390
vhCDR3	VAIVTTIPGGMDV	391
可变轻(vl)结构域	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGISLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSRSFPWTFGQGTKVEIK	392
vlCDR1	RASQSIGISLH	393
vlCDR2	YASQSFS	394
vlCDR3	HQSRSFPWT	395

H16-1.93

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTYYAQKLQARVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGYSSSWSLLHYYGMDVWGQGTTVTVSS	396
vhCDR1	SYGIS	397
vhCDR2	WISAYNGNTYYAQKLQA	398
vhCDR3	DGYSSSWSLLHYYGMDV	399
可变轻(vl)结构域	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITWRSSQGIYNSLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPFTFGPGTKVDIK	400
vlCDR1	RSSQGIYNSLA	401
vlCDR2	AASTLHS	402
vlCDR3	QKYNSAPFT	403

Ha1 6-1(3,5)27.1

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	LVESGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARKDYYYYSMDVWGQGTTVTVSS	404
vhCDR1	SYWIG	405
vhCDR2	IIYPGDSDTRYSPSFQG	406
vhCDR3	KDYYYYSMDV	407
可变轻(vl)结构域	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGQAPKLLIYGVNIRPSGVSTRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTRSSILVVFAGGTKLTVL	408
vlCDR1	TGTSSDVGGYNYVS	409
vlCDR2	GVNIRPS	410
vlCDR3	SSYTRSSILVV	411

图14F

H16-1.61

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSRITIFGVVHYGMDVWGQGTTVTVSS	412
vhCDR1	SYGMH	413
vhCDR2	VIWYDGSNKYYADSVKG	414
vhCDR3	SRITIFGVVHYGMDV	415
可变轻(vl)结构域	DTQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQLKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYNSPITFGPGTKVDIK	416
vlCDR1	RASQSISSYLN	417
vlCDR2	AASSLES	418
vlCDR3	QQSYNSPIT	419

H16-1 (3,5)5

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARKDYYYYTMDVWGQGTTVTVSS	420
vhCDR1	SYWIG	421
vhCDR2	IIYPGDSDTRYSPSFQG	422
vhCDR3	KDYYYYTMDV	423
可变轻(vl)结构域	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYAVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTISRILVVFGGGTKLTVL	424
vlCDR1	TGTSSDVGGYNYVS	425
vlCDR2	AVSNRPS	426
vlCDR3	SSYTISRILVV	427

H16-7.200

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGDYYWSWIRQHPGKGLEWFGFIYYSGSAYYNPSLKSRITISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARERNYGGNSFDYWGQGTLVTVSS	428
vhCDR1	SGDYYWS	429
vhCDR2	FIYYSGSAYYNPSLKS	430
vhCDR3	ERNYGGNSFDY	431
可变轻(vl)结构域	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTITFGQGTRLEIK	432
vlCDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	433
vlCDR2	LGSNRAS	434
vlCDR3	MQALQTIT	435

图14G

Ha16-1(3,5)42

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARKDYYYYSMDVWGQGTTVTVSS	436
vhCDR1	SYWIG	437
vhCDR2	IIYPGDSDTRYSPSFQG	438
vhCDR3	KDYYYYSMDV	439
可变轻(vl)结构域	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGRFNYVSWYQQRPGKAPKLMIYAVNIRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAGYYCSSYTSSSTLLVFGGGTKLTVL	440
vlCDR1	TGTSSDVGRFNYVS	441
vlCDR2	AVNIRPS	442
vlCDR3	SSYTSSSTLLV	443

H1 6-9.65

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVATIWFDGSNGYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSSGSYDHFDYWGQGTLVTVSS	444
vhCDR1	SYGMH	445
vhCDR2	TIWFDGSNGYYADSVKG	446
vhCDR3	DSSGSYDHFDY	447
可变轻(vl)结构域	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNCLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGQGTRVEIK	448
vlCDR1	RSSQSLLHSNGYNCLD	449
vlCDR2	LGSNRAS	450
vlCDR3	MQALQTPIT	451

Ha16-1(3,5)19

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARKDYYYYAMDVWGQGTTVTVSS	452
vhCDR1	SYWIG	453
vhCDR2	IIYPGDSDTRYSPSFQG	454
vhCDR3	KDYYYYAMDV	455
可变轻(vl)结构域	SALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGRYNYVSWYQQHPGQAPKLMIYGISIRPSGVSPRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSHTSNSTLVVFAGGTKLTVL	456
vlCDR1	TGTSSDVGRYNYVS	457
vlCDR2	GISIRPS	458
vlCDR3	SSHTSNSTLVV	459

图14H

Ha16-1.80

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYVYFSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARATRDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	460
vhCDR1	SYYWS	461
vhCDR2	YVYFSGSTNYNPSLKS	462
vhCDR3	ATRDYYYYGMDV	463
可变轻(vl)结构域	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSHDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTLFTFGPGTKVDIK	464
vlCDR1	RTSHDISNYLN	465
vlCDR2	AASSLQS	466
vlCDR3	QQTYSTLFT	467

图14I

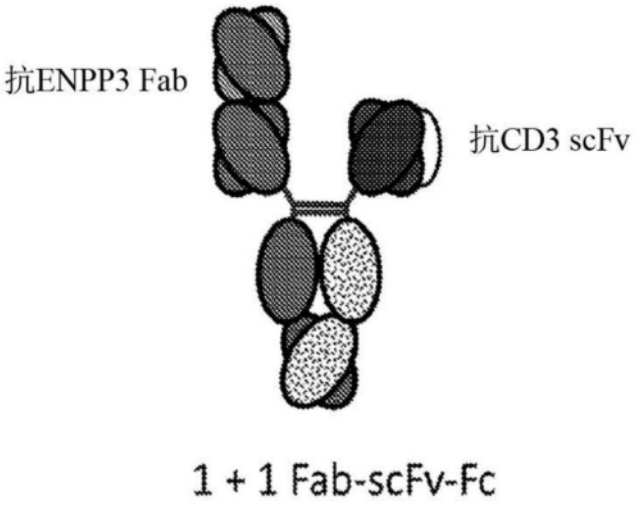


图15A

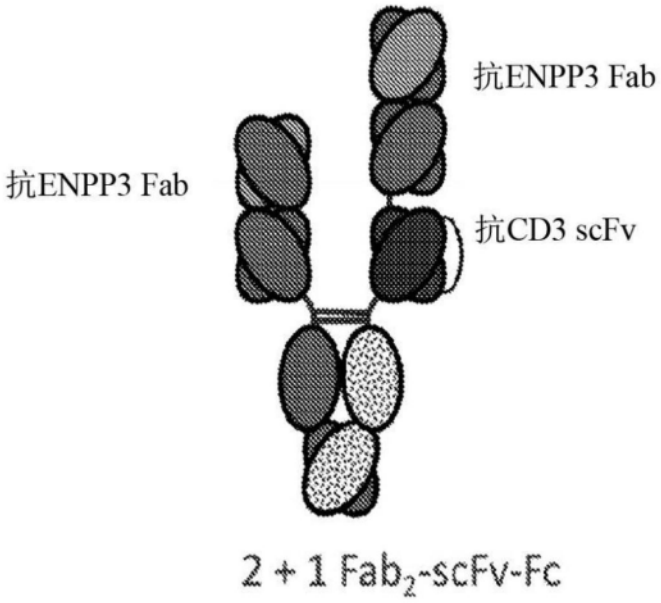


图15B

>XENP13245 Numax_Fab-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_PVA_/S267K_pI(-)_同配_A_L368D/K370S-IgG1_C220S/S364K/E357Q

链1-Numax_IgG1_C220S/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 468)

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTAGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKHYNPSLKDRLTISKDTSK
NQVVLKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDVWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWE
SDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_PVA_/S267K_pI(-)_同配_A_L368D/K370S

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-Numax轻 (SEQ ID NO: 470)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSRVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL
QPDDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图16

>XENP24804 H16-1.93[ENPP3]_H1L1_Fab-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-H16-1.93[ENPP3]_H1_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 471)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTYYAQKLQARVTMTTDTSTS
TAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGYSSSWSLLHYYGMDVWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSD
IAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 472)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-H16-1.93[ENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 473)

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITWRSSQGIYNSLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDVATYYCQKYNSAPFTFGPGTKVDIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP26820 H16-7.8[ENPP3]_H1L1_Fab-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-H16-7.8[ENPP3]_H1_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 474)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGIIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSK
NQFSLKLNSVTAADTAVFYCARVAIVTTIPGGMDVWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAV
EWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 475)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-H16-7.8[ENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 476)

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGISLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCHQSRSFPWTFGQGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图17A

>XENP28287 AN1[αENPP3]_H1L1_Fab-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 477)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGKRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 478)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 479)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP28925 AN1[αENPP3]_H1.8_L1_Fab-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 480)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 481)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 482)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图17B

>XENP29516 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.33_Fab-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 483)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 484)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.33 (SEQ ID NO: 485)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP30262 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.77_Fab-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 486)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 487)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.77 (SEQ ID NO: 488)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYESESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图17C

>XENP26821 H16-7.8[ENPP3]_H1L1_Fab-[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-H16-7.8[ENPP3]_H1_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 489)
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGIIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSK
NQFSLKLNSVTAADTAVFYCARVAIVTTIPGGMDVWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAV
EWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 490)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-H16-7.8[ENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 491)
EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGISLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCHQSRSFPWTFGQGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP29436 AN1[αENPP3]_H1.8_L1_Fab-[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 492)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 493)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 494)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图18A

>XENP28390 AN1[αENPP3]_H1L1_Fab-[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 495)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGKRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 496)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 497)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP29463 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.33_Fab-[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 498)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 499)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.33 (SEQ ID NO: 500)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图18B

>XENP30263 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.77_Fab-[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 501)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 502)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.77 (SEQ ID NO: 503)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYESESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图18C

>XENP29437 AN1[αENPP3]_H1.8_L1_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 504)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 505)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI
SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QA
VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISG
AQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 506)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图19A

>XENP29520 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.33_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1.33_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 507)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 508)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI
SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QA
VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISG
AQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.33 (SEQ ID NO: 509)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图19B

>XENP30264 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.77_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1.77_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 510)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 511)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI
SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QA
VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISG
AQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.77 (SEQ ID NO: 512)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYESESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图19C

>XENP26822 H16-7.8[ENPP3]_H1L1_Fab-H16-7.8[ENPP3]_
H1L1_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-H16-7.8[ENPP3]_H1_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 513)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGIIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSK
NQFSLKLNSVTAADTAVFYCARVAIVTTIPGGMDVWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAV
EWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-H16-7.8[ENPP3]_H1_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 514)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGIIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSK
NQFSLKLNSVTAADTAVFYCARVAIVTTIPGGMDVWGQGTTVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGG
SGGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRF
TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI
SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-H16-7.8[ENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 515)

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGISLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCHQSRSFPWTFGQGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图20A

>XENP28438 AN1[αENPP3]_H1L1_Fab-AN1[αENPP3]_H1L1_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv (GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 516)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGKRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/ S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 517)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGKRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTI
SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QA
VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISG
AQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 518)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图20B

>XENP29438 AN1[αENPP3]_H1.8_L1_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 519)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 520)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTI
SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QA
VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISG
AQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 521)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图20C

>XENP29467 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.33_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1.33_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 522)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 523)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTI
SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QA
VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISG
AQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.33 (SEQ ID NO: 524)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图20D

>XENP30469 AN1[αENPP3]_H1.8_L1_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.30_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 525)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.30_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 526)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK
AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 527)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图21

>XENP30470 AN1[αENPP3]_H1.8_L1_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.32_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 528)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.32_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 529)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK
AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 530)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图22A

>XENP30819 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.33_Fab-AN1[αENPP3]_H1.8_L1.33_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.32_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 531)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.32_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 532)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK
AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.33 (SEQ ID NO: 533)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图22B

>XENP30821 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.77_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1.77_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.32_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 534)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.32_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 535)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK
AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.77 (SEQ ID NO: 536)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYESESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图22C

>XENP31148 AN1[αENPP3]_H1.8_L1_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 537)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 538)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK
AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 539)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图23A

>XENP31149 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.33_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1.33_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(222)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 540)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4_Fc(222)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 541)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK
AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.33 (SEQ ID NO: 542)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图23B

>XENP31150 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.77_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1.77_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(222)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 543)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4_Fc(222)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 544)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK
AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.77 (SEQ ID NO: 545)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYESESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图23C

>XENP31419 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.33_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1.33_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 546)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 547)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK
AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.33 (SEQ ID NO: 548)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图23D

>XENP31471 AN1[αENPP3]_H1.8_L1.77_Fab-AN1[αENPP3]_
H1.8_L1.77_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_
同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-AN1[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 549)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-AN1[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_
C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 550)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSG
GGGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGK
AALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-AN1[αENPP3]_L1.77 (SEQ ID NO: 551)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYESESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图23E

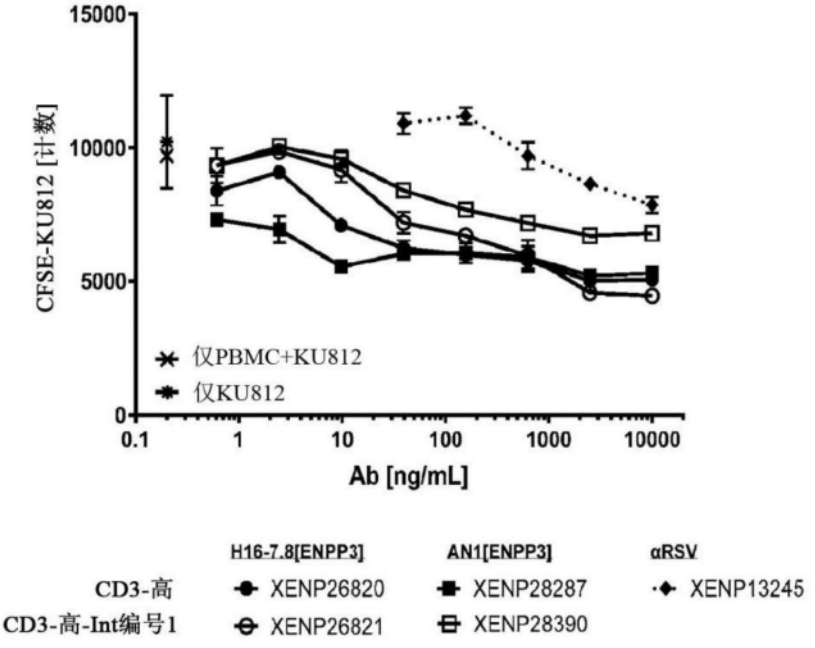


图24A

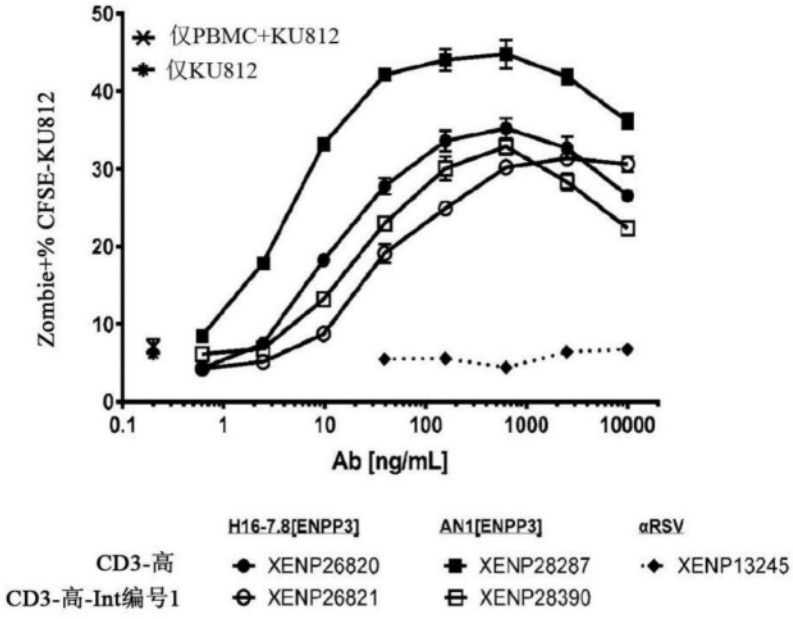


图24B

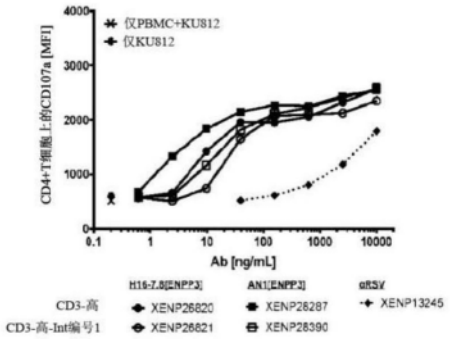


图25A

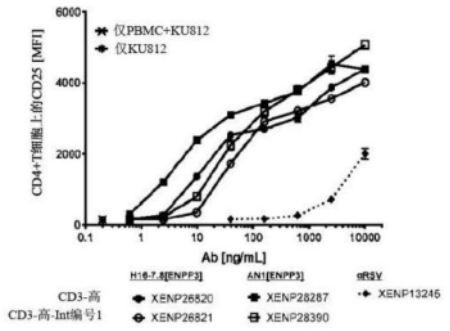


图25B

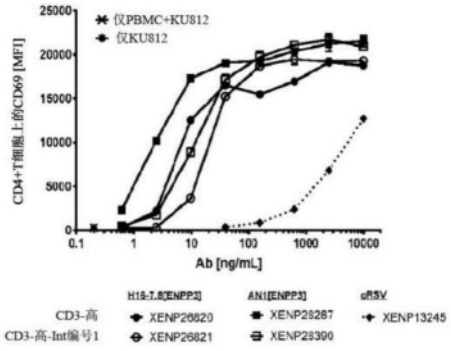


图25C

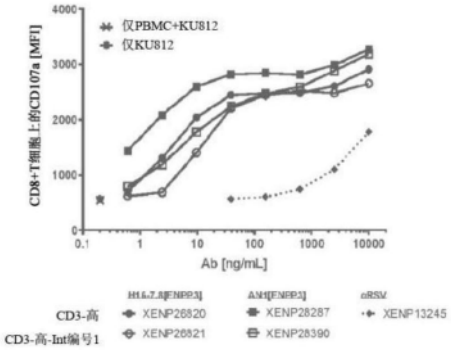


图26A

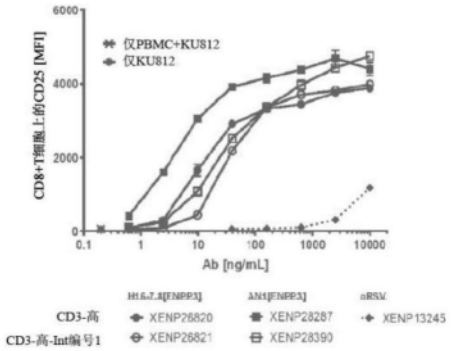


图26B

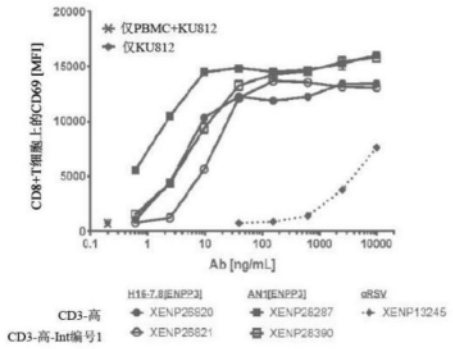

仅PBMC+KUS12
仅KU812
CD8+T细胞上的CD69 [MFI]
Ab [ng/mL]
H16-7.8[ENPP3]
AN1[ENPP3]
αRSV
CD3-高
CD3-高-Int编号1
XENP26820
XENP26821
XENP28287
XENP28390
XENP13245

图26C

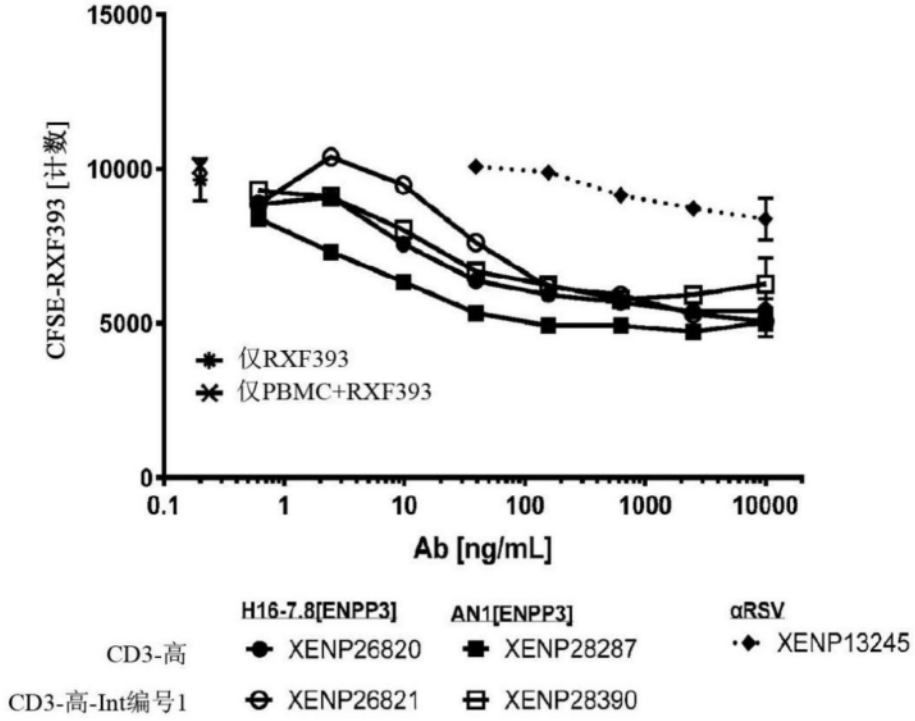

CFSE-RXF393 [计数]
仅RXF393
仅PBMC+RXF393
Ab [ng/mL]
H16-7.8[ENPP3]
AN1[ENPP3]
αRSV
CD3-高
CD3-高-Int编号1
XENP26820
XENP26821
XENP28287
XENP28390
XENP13245

图27A

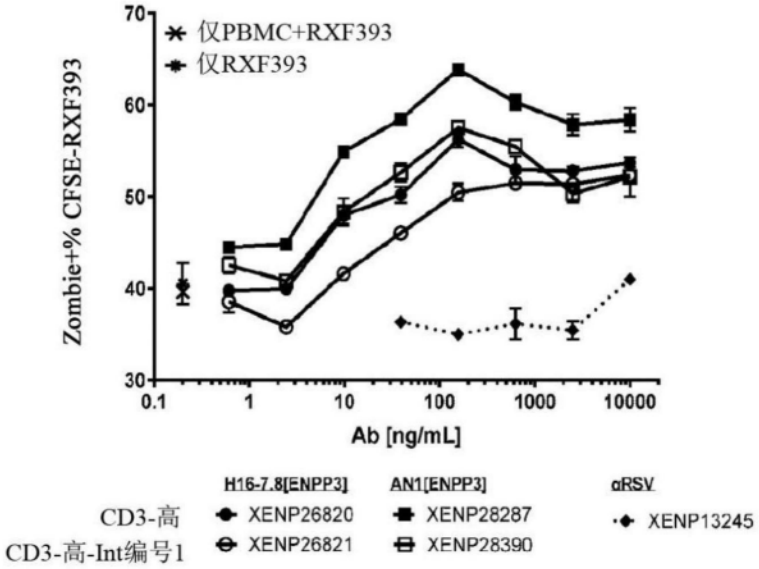


图27B

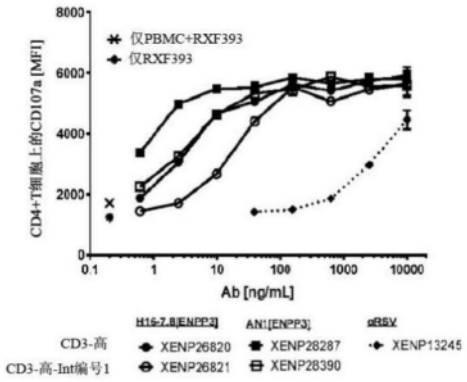


图28A

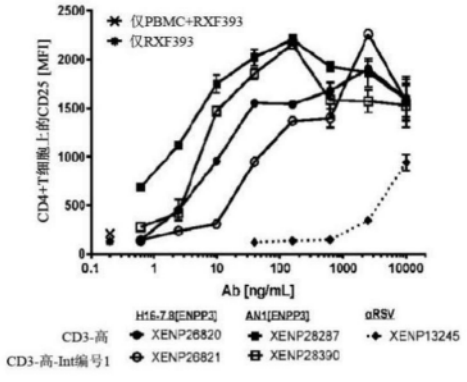


图28B

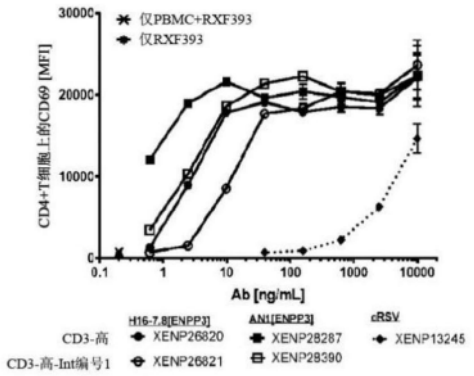


图28C

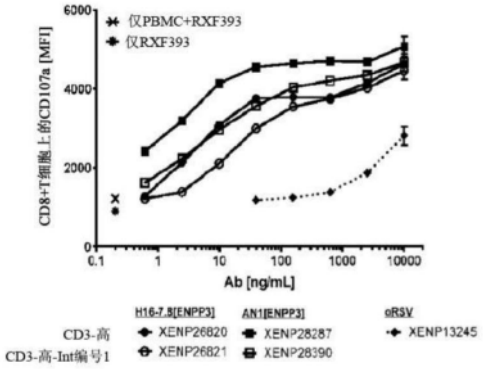


图29A

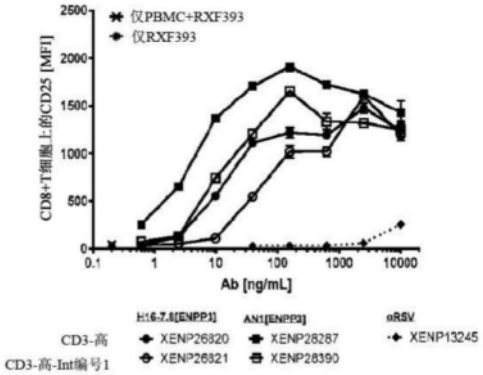


图29B

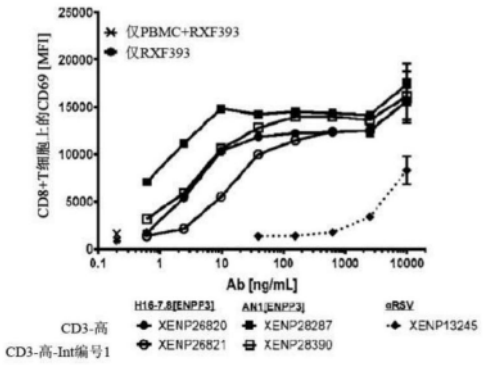

仅PBMC+RXF393
仅RXF393
CD8+T细胞上的CD69 [MFI]
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.1
1
10
100
1000
10000
Ab [ng/mL]
H16-7.8[ENPP3]
AN1[ENPP3]
αRSV
CD3-高
XENP26820
XENP28287
XENP13245
CD3-高-Int编号1
XENP26821
XENP28390

图29C

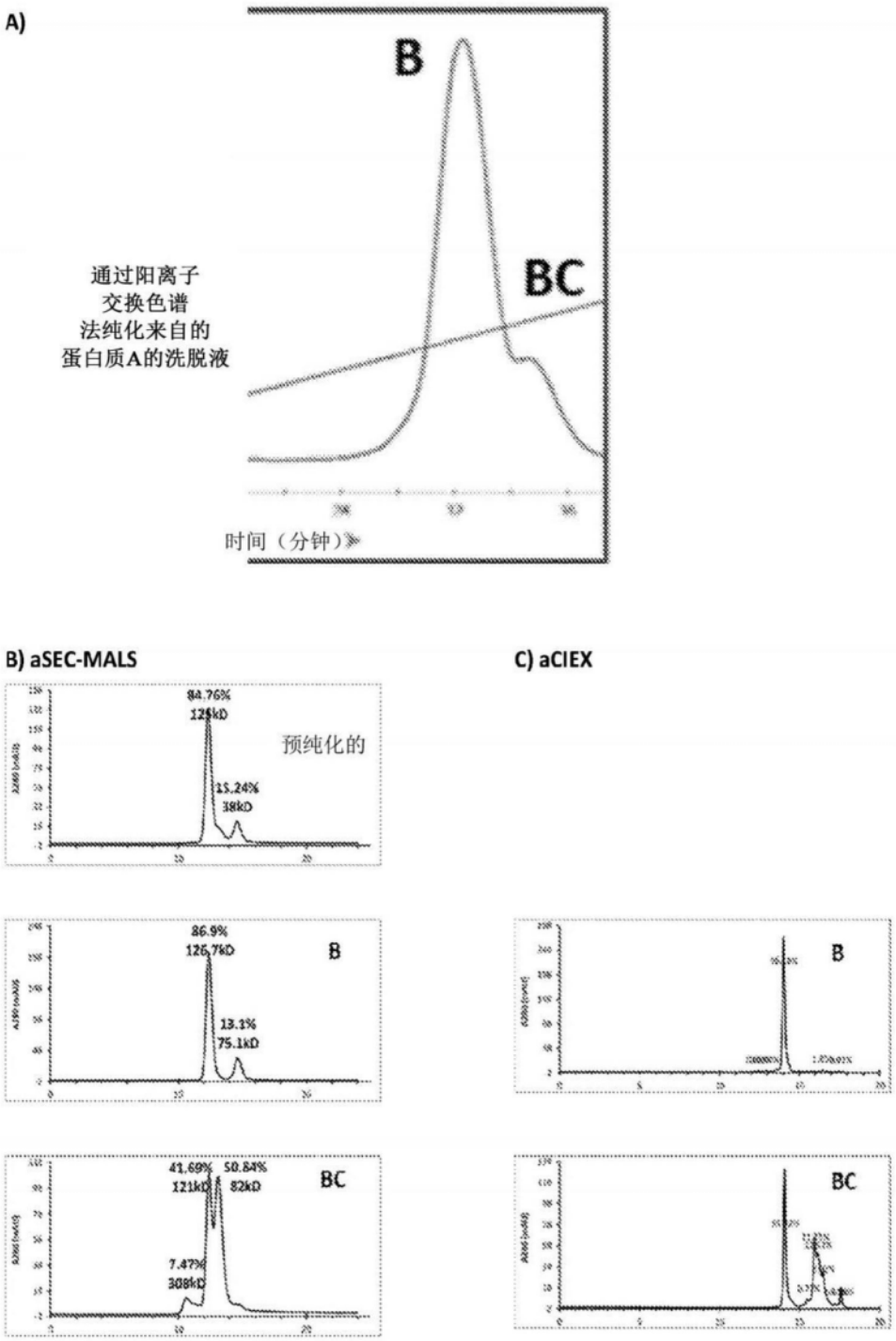

A)
B
BC
通过阳离子
交换色谱
法纯化来自的
蛋白质A的洗脱液
时间（分钟）
B) aSEC-MALS
C) aCIEX
84.76%
125kD
预纯化的
15.24%
38kD
86.9%
126.7kD
B
13.1%
75.1kD
41.69%
121kD
50.84%
82kD
BC
7.47%
308kD

图30

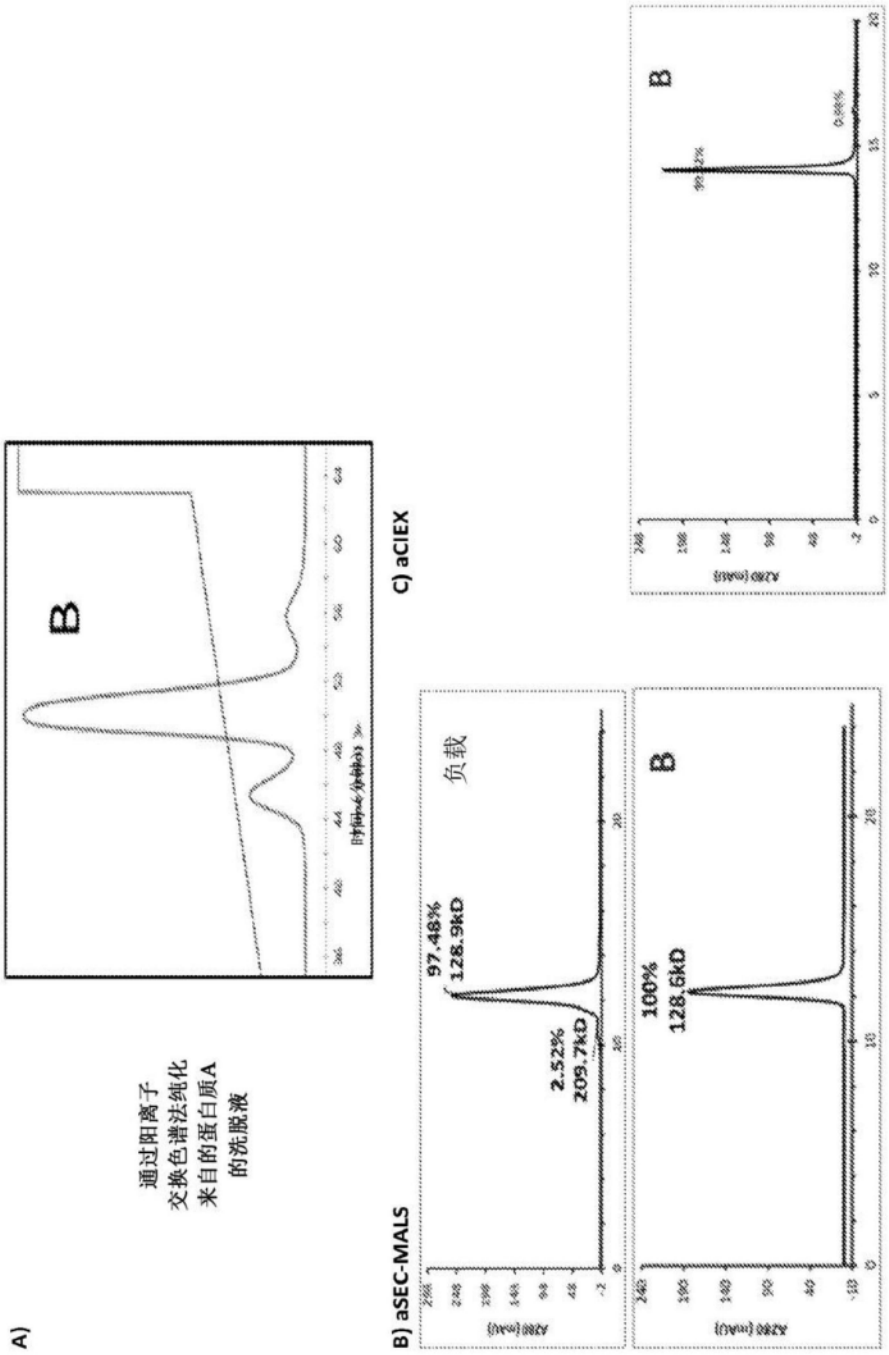

A)
通过阳离子
交换色谱法纯化
来自的蛋白质A
的洗脱液
B
B) aSEC-MALS
负载
97.48%
128.9kD
2.52%
209.7kD
B
100%
128.6kD
C) aCIEX
B

图31

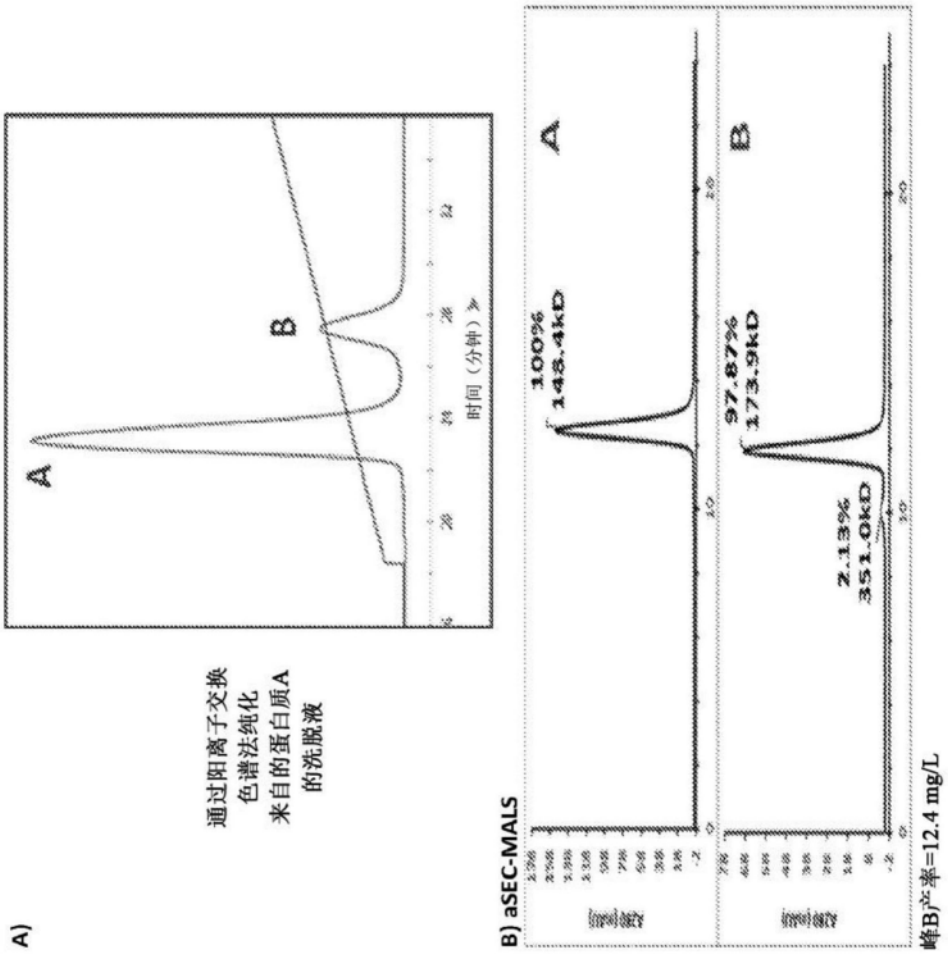

A)
通过阳离子交换
色谱法纯化
来自的蛋白质A
的洗脱液
A
B
时间（分钟）
B) aSEC-MALS
A
100%
148.4kD
B
97.87%
173.9kD
2.13%
351.0kD
峰B产率=12.4 mg/L

图32

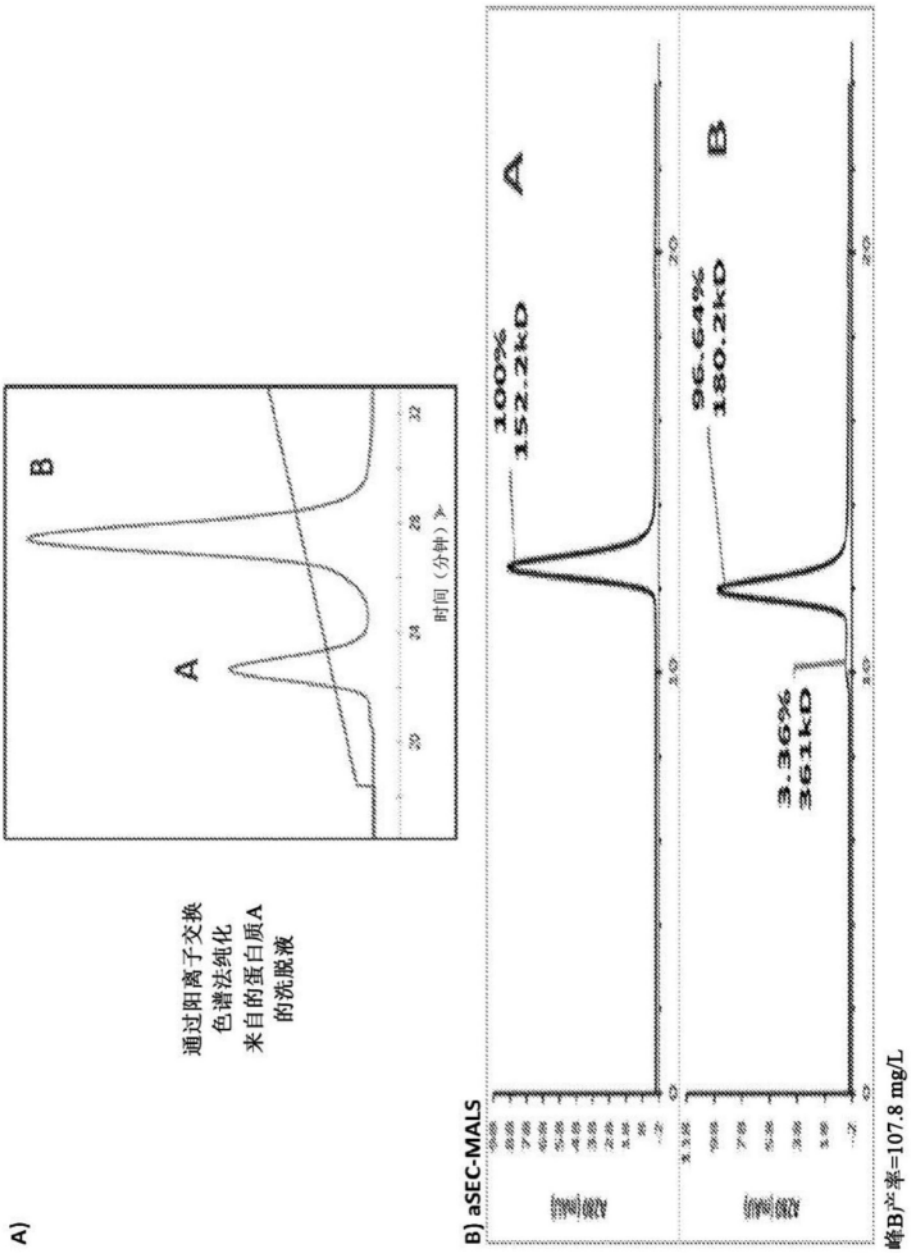

A)
通过阳离子交换
色谱法纯化
来自的蛋白质A
的洗脱液
B
A
20
24
28
32
时间（分钟）
B) aSEC-MALS
100%
152.2kD
96.64%
180.2kD
3.36%
361kD
A
B
峰B产率=107.8 mg/L

图33

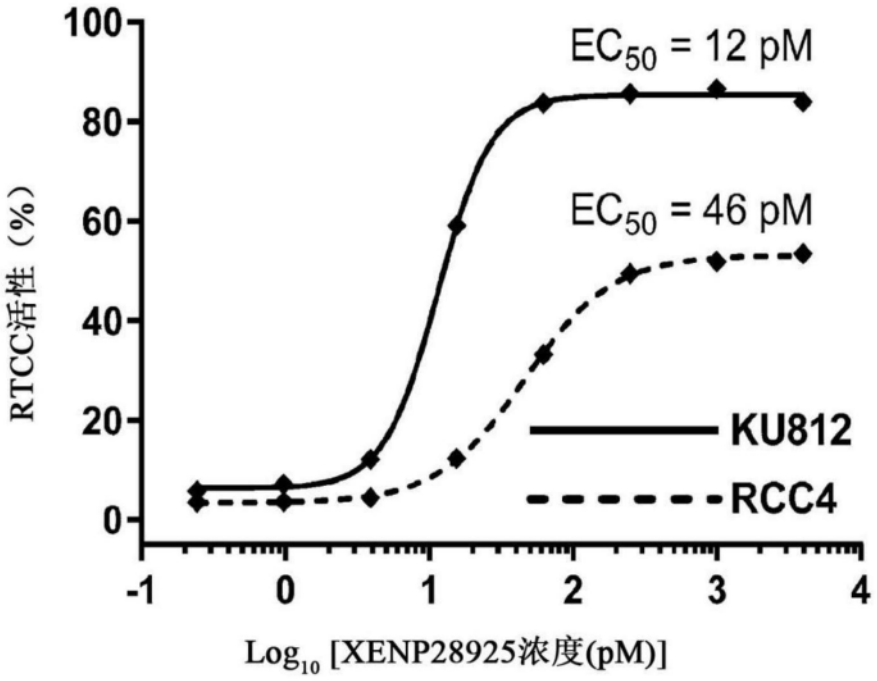

100
80
60
40
20
0
RTCC活性（%）
EC50 = 12 pM
EC50 = 46 pM
KU812
RCC4
-1
0
1
2
3
4
Log10 [XENP28925浓度(pM)]

图34

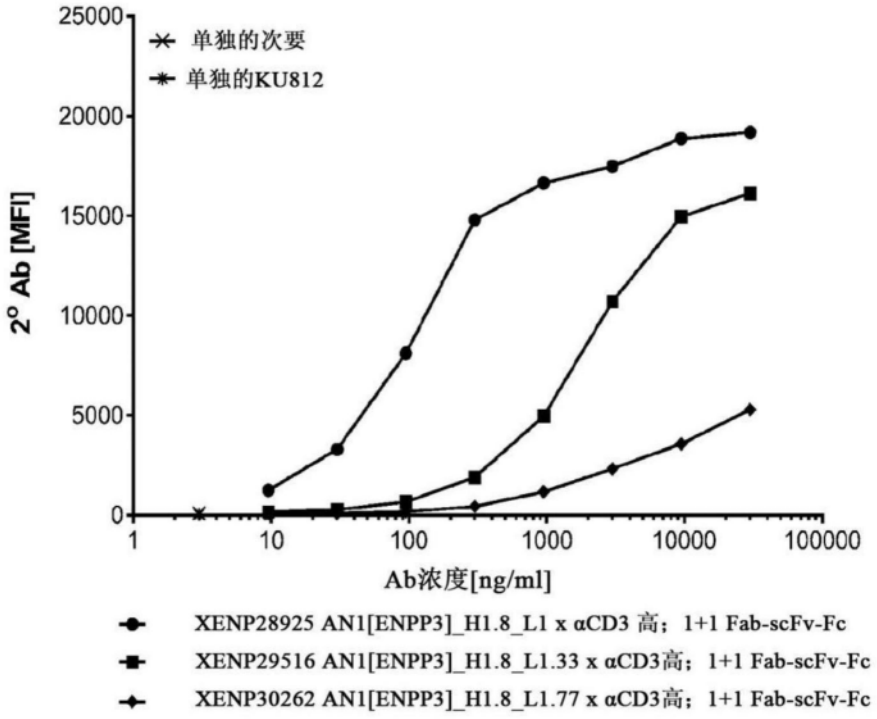

25000
20000
15000
10000
5000
0
2° Ab [MFI]
单独的次要
单独的KU812
1
10
100
1000
10000
100000
Ab浓度[ng/ml]
XENP28925 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29516 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x αCD3高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP30262 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.77 x αCD3高；1+1 Fab-scFv-Fc

图35

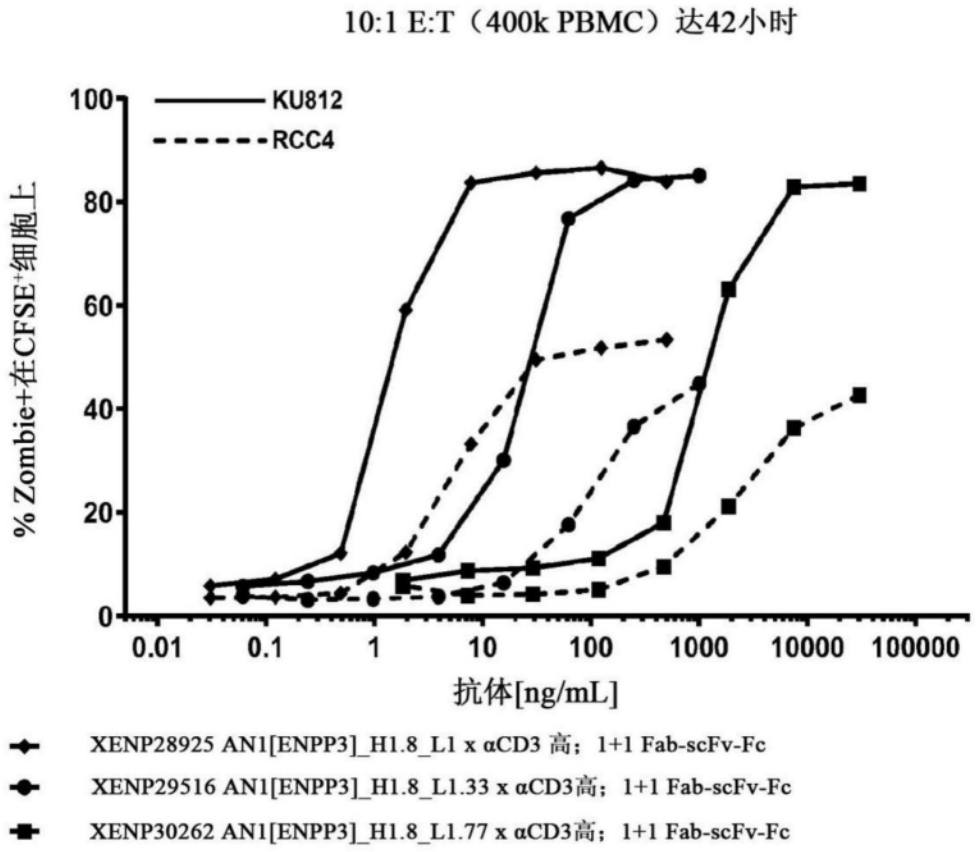

10:1 E:T（400k PBMC）达42小时
KU812
RCC4
% Zombie+在CFSE+细胞上
抗体[ng/mL]
XENP28925 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29516 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x αCD3高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP30262 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.77 x αCD3高；1+1 Fab-scFv-Fc

图36

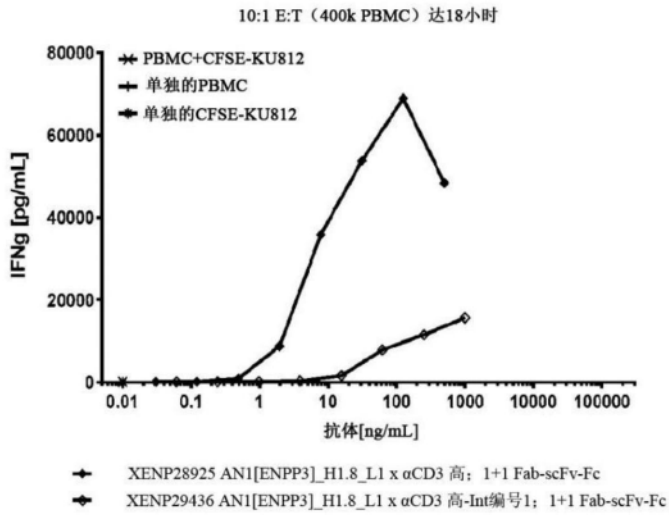

10:1 E:T（400k PBMC）达18小时
PBMC+CFSE-KU812
单独的PBMC
单独的CFSE-KU812
IFNg [pg/mL]
抗体[ng/mL]
XENP28925 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29436 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高-Int编号1；1+1 Fab-scFv-Fc

图37A

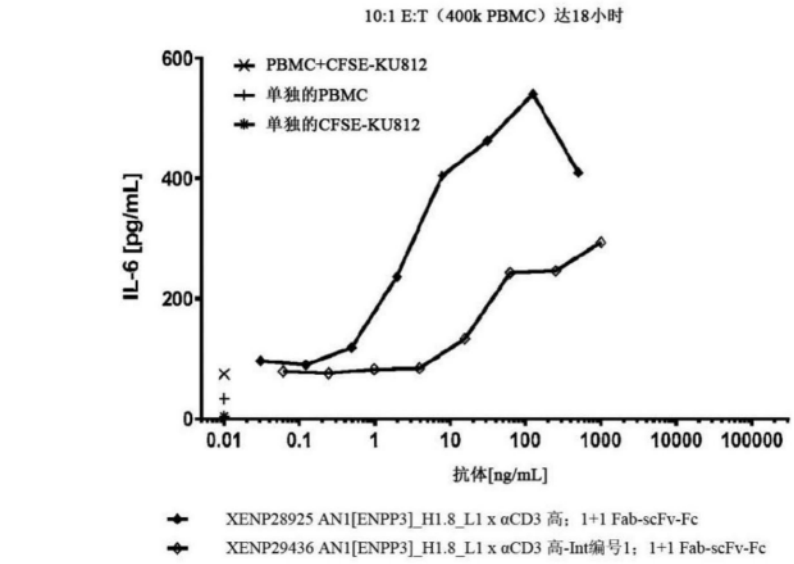

10:1 E:T（400k PBMC）达18小时
PBMC+CFSE-KU812
单独的PBMC
单独的CFSE-KU812
IL-6 [pg/mL]
600
400
200
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体[ng/mL]
XENP28925 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29436 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高-Int编号1；1+1 Fab-scFv-Fc

图37B

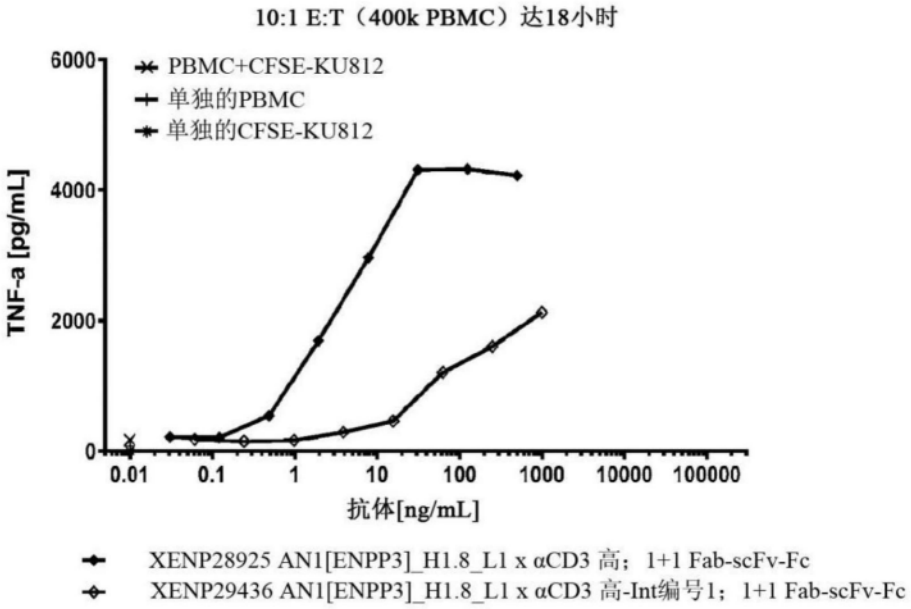

10:1 E:T（400k PBMC）达18小时
PBMC+CFSE-KU812
单独的PBMC
单独的CFSE-KU812
TNF-a [pg/mL]
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体[ng/mL]
XENP28925 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29436 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高-Int编号1；1+1 Fab-scFv-Fc

图37C

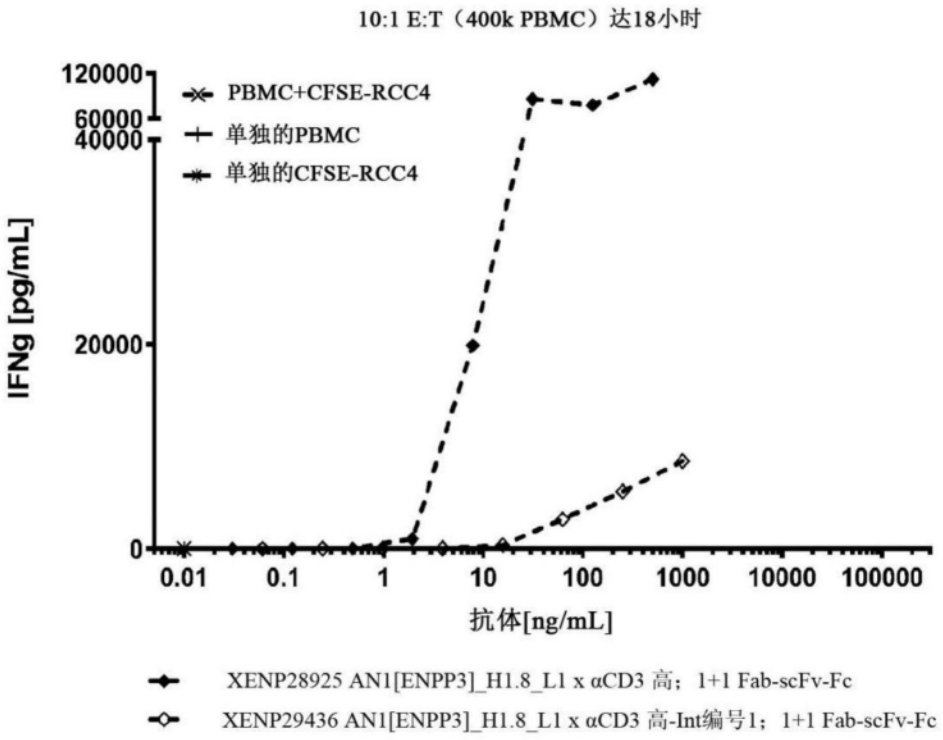

10:1 E:T（400k PBMC）达18小时
120000
60000
40000
20000
0
IFNg [pg/mL]
PBMC+CFSE-RCC4
单独的PBMC
单独的CFSE-RCC4
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体[ng/mL]
XENP28925 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29436 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高-Int编号1；1+1 Fab-scFv-Fc

图38

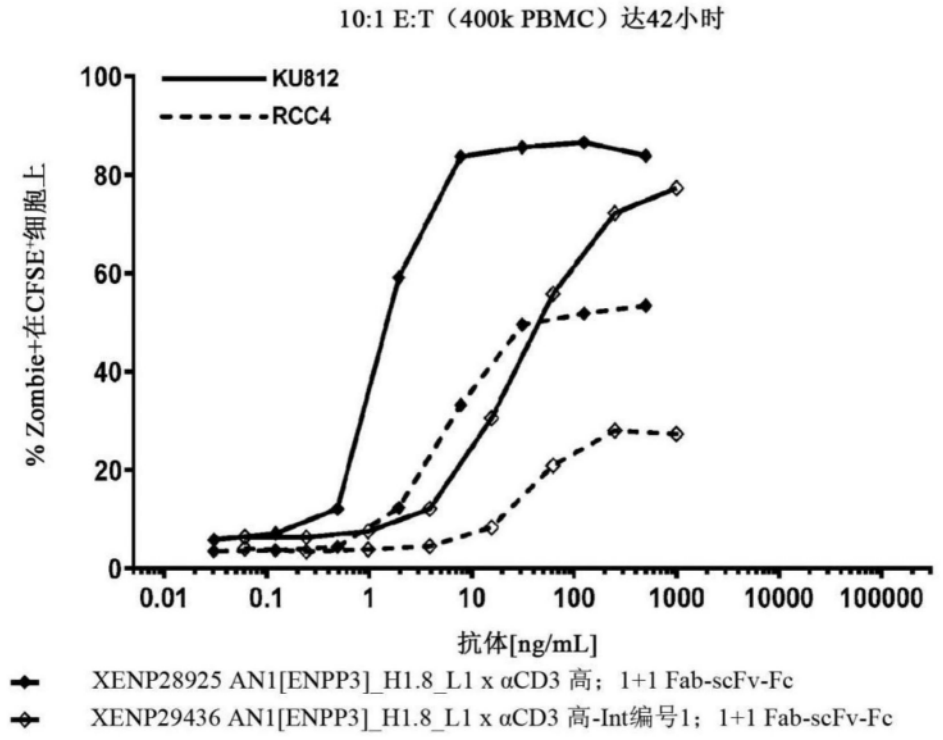

10:1 E:T（400k PBMC）达42小时
100
80
60
40
20
0
% Zombie+在CFSE+细胞上
KU812
RCC4
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体[ng/mL]
XENP28925 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29436 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高-Int编号1；1+1 Fab-scFv-Fc

图39

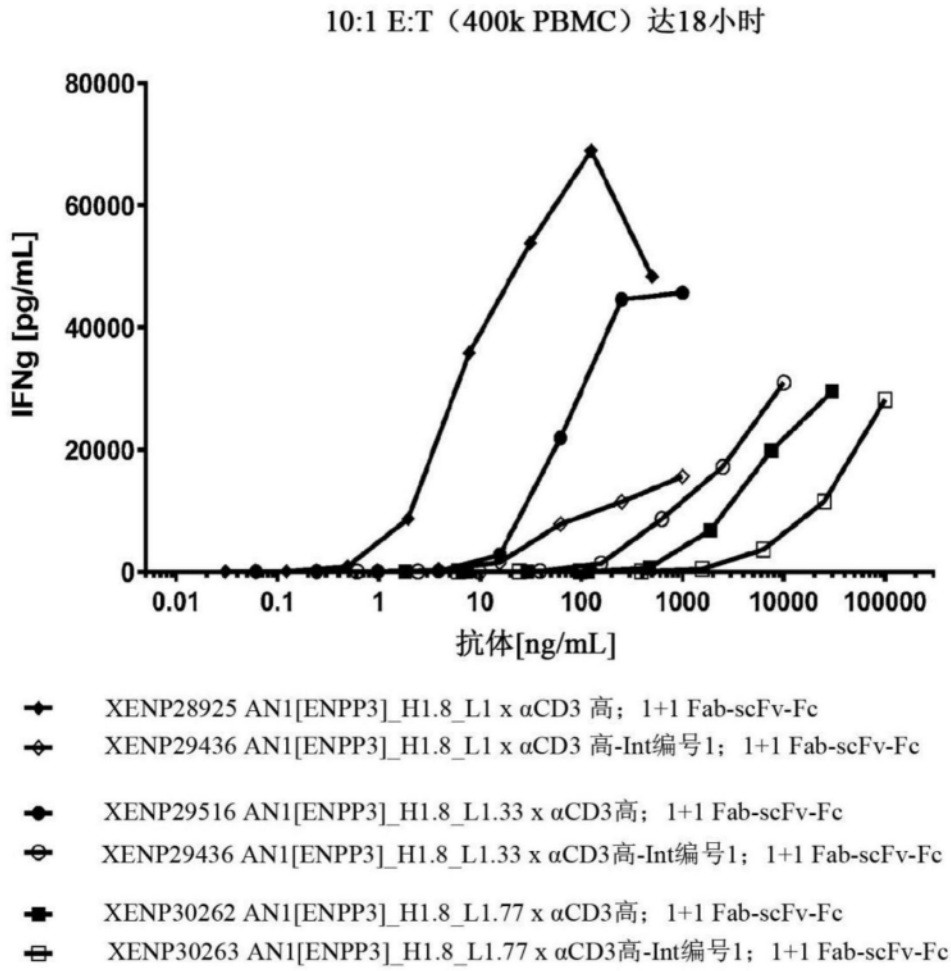

10:1 E:T（400k PBMC）达18小时
80000
60000
40000
20000
0
IFNg [pg/mL]
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体[ng/mL]
XENP28925 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29436 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高-Int编号1；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29516 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x αCD3高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29436 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x αCD3高-Int编号1；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP30262 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.77 x αCD3高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP30263 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.77 x αCD3高-Int编号1；1+1 Fab-scFv-Fc

图40

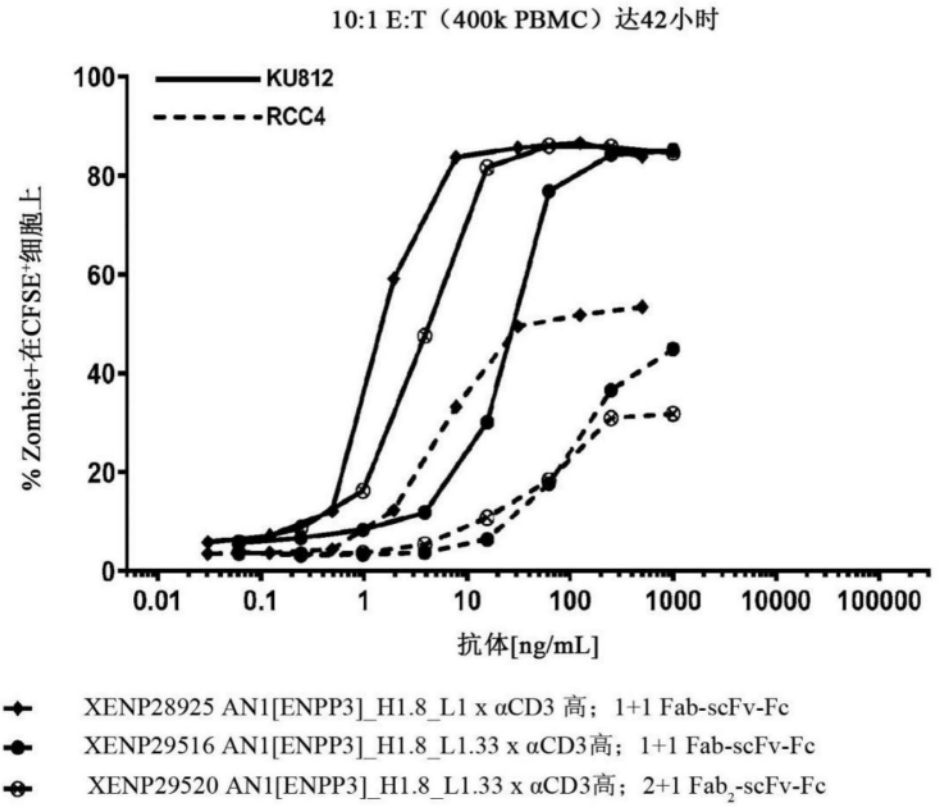

10:1 E:T（400k PBMC）达42小时
KU812
RCC4
% Zombie+在CFSE+细胞上
抗体[ng/mL]
0
20
40
60
80
100
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
XENP28925 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29516 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x αCD3高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29520 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x αCD3高；2+1 Fab2-scFv-Fc

图41

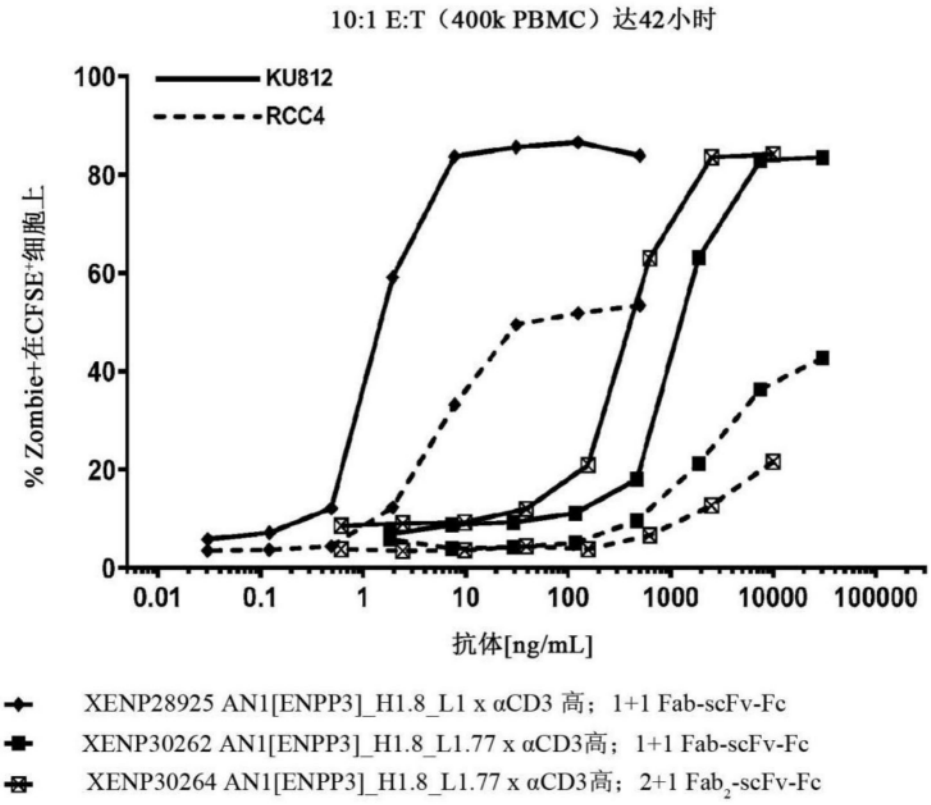

10:1 E:T（400k PBMC）达42小时
KU812
RCC4
% Zombie+在CFSE+细胞上
抗体[ng/mL]
XENP28925 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP30262 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.77 x αCD3高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP30264 AN1[ENPP3]_H1.8_L1.77 x αCD3高；2+1 Fab2-scFv-Fc

图42

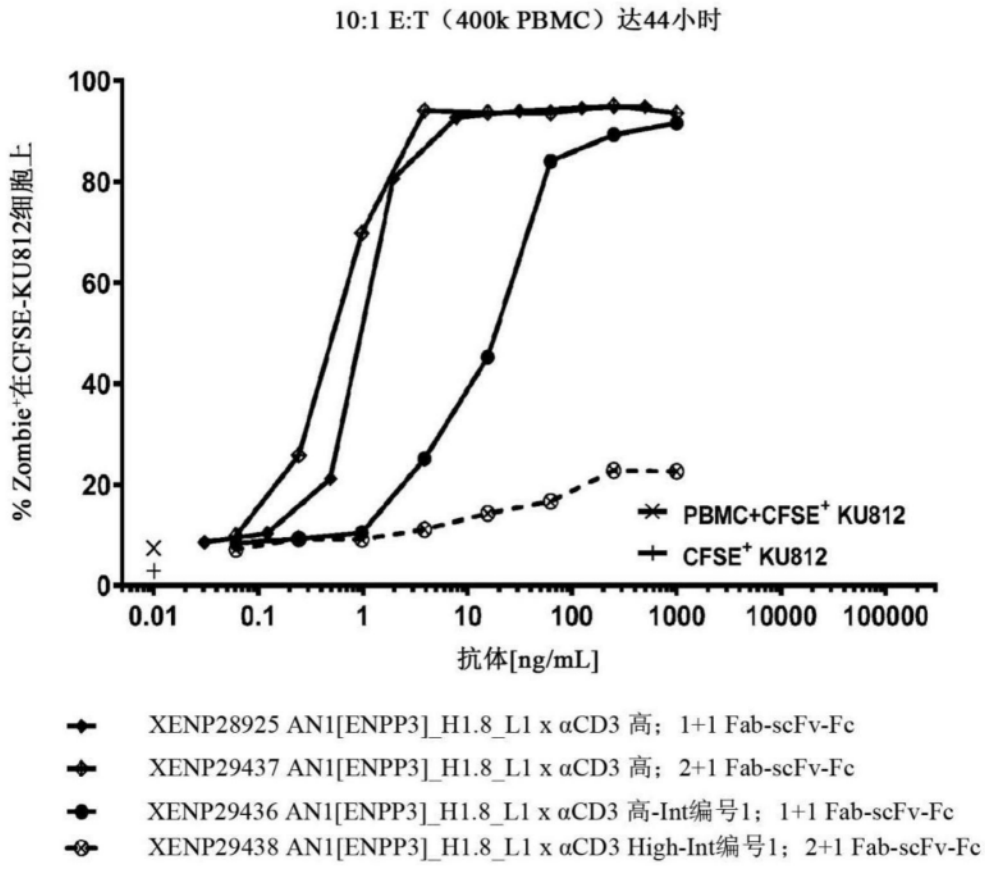

10:1 E:T（400k PBMC）达44小时
% Zombie+在CFSE-KU812细胞上
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体[ng/mL]
PBMC+CFSE+ KU812
CFSE+ KU812
XENP28925 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29437 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高；2+1 Fab-scFv-Fc
XENP29436 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高-Int编号1；1+1 Fab-scFv-Fc
XENP29438 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 High-Int编号1；2+1 Fab-scFv-Fc

图43

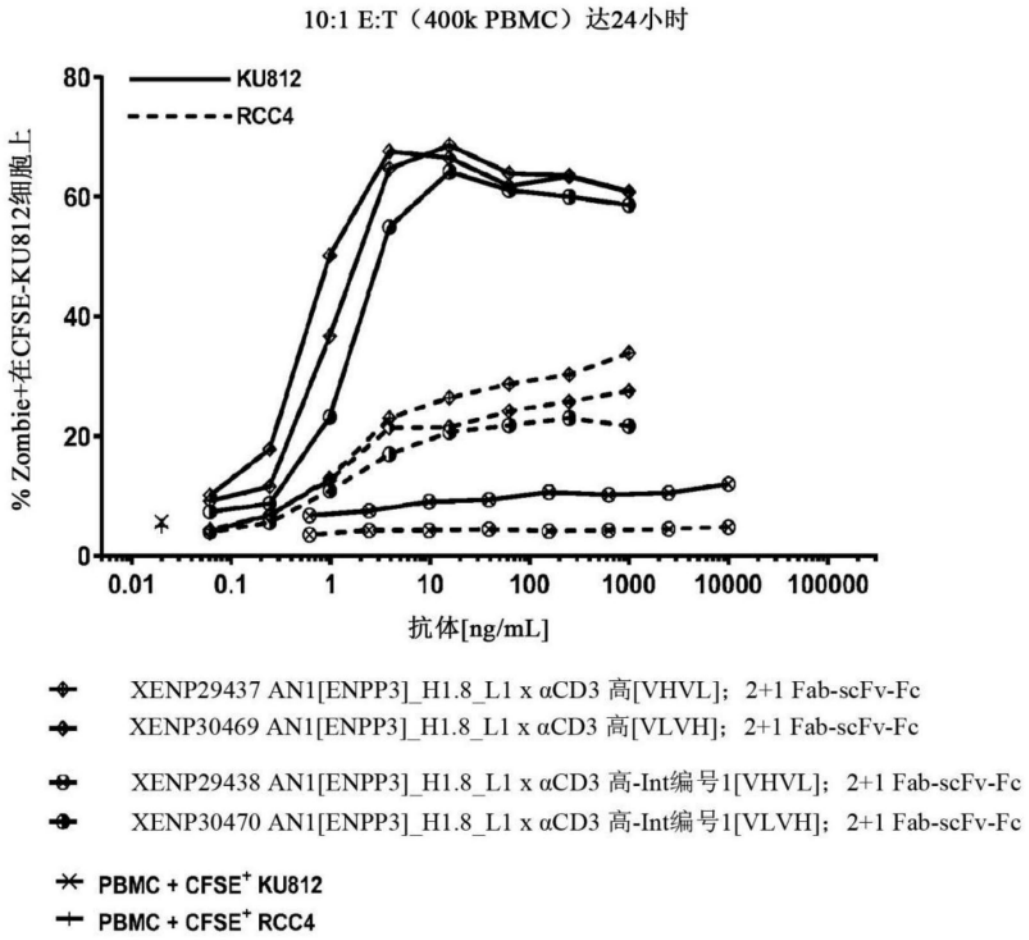

10:1 E:T（400k PBMC）达24小时
KU812
RCC4
% Zombie+在CFSE-KU812细胞上
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
抗体[ng/mL]
XENP29437 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高[VHVL]；2+1 Fab-scFv-Fc
XENP30469 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高[VLVH]；2+1 Fab-scFv-Fc
XENP29438 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高-Int编号1[VHVL]；2+1 Fab-scFv-Fc
XENP30470 AN1[ENPP3]_H1.8_L1 x αCD3 高-Int编号1[VLVH]；2+1 Fab-scFv-Fc
PBMC + CFSE+ KU812
PBMC + CFSE+ RCC4

图44

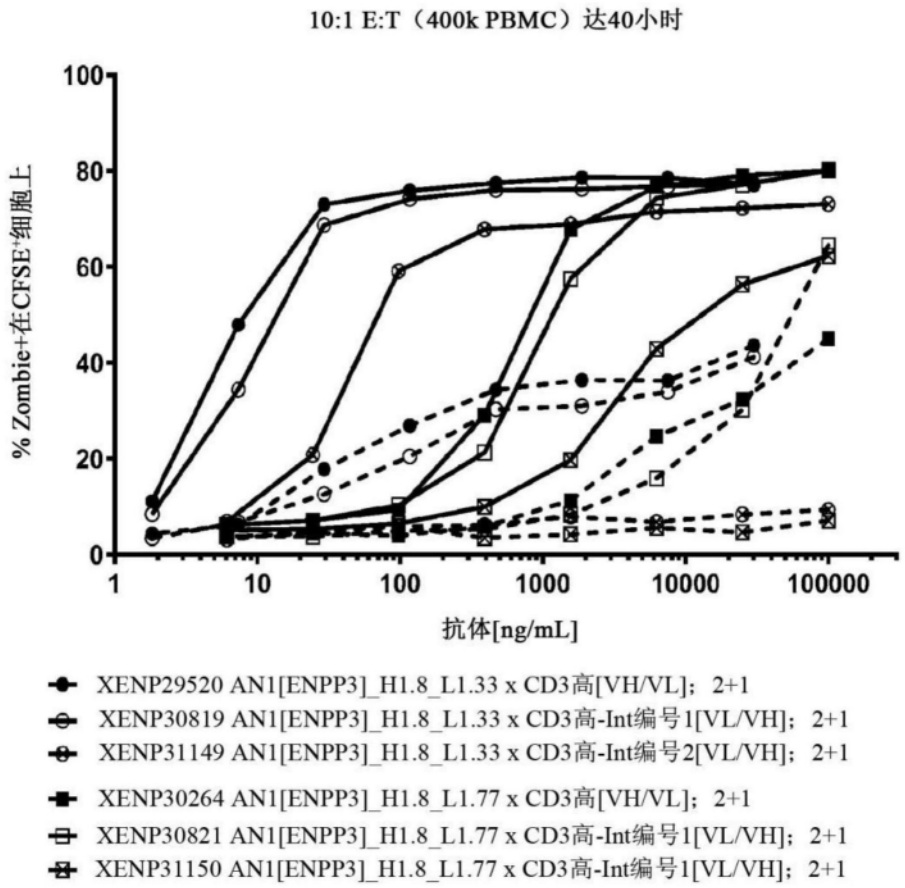


图45

>XENP016432纳武单抗H0L0_IgG1_PVA_/S267K

XENP016432纳武单抗_H0L0_IgG1_PVA_/S267K重链 (SEQ ID NO: 552)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKN
TLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

XENP016432纳武单抗_H0L0_IgG1_PVA_/S267K轻链 (SEQ ID NO: 553)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS
LEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图46

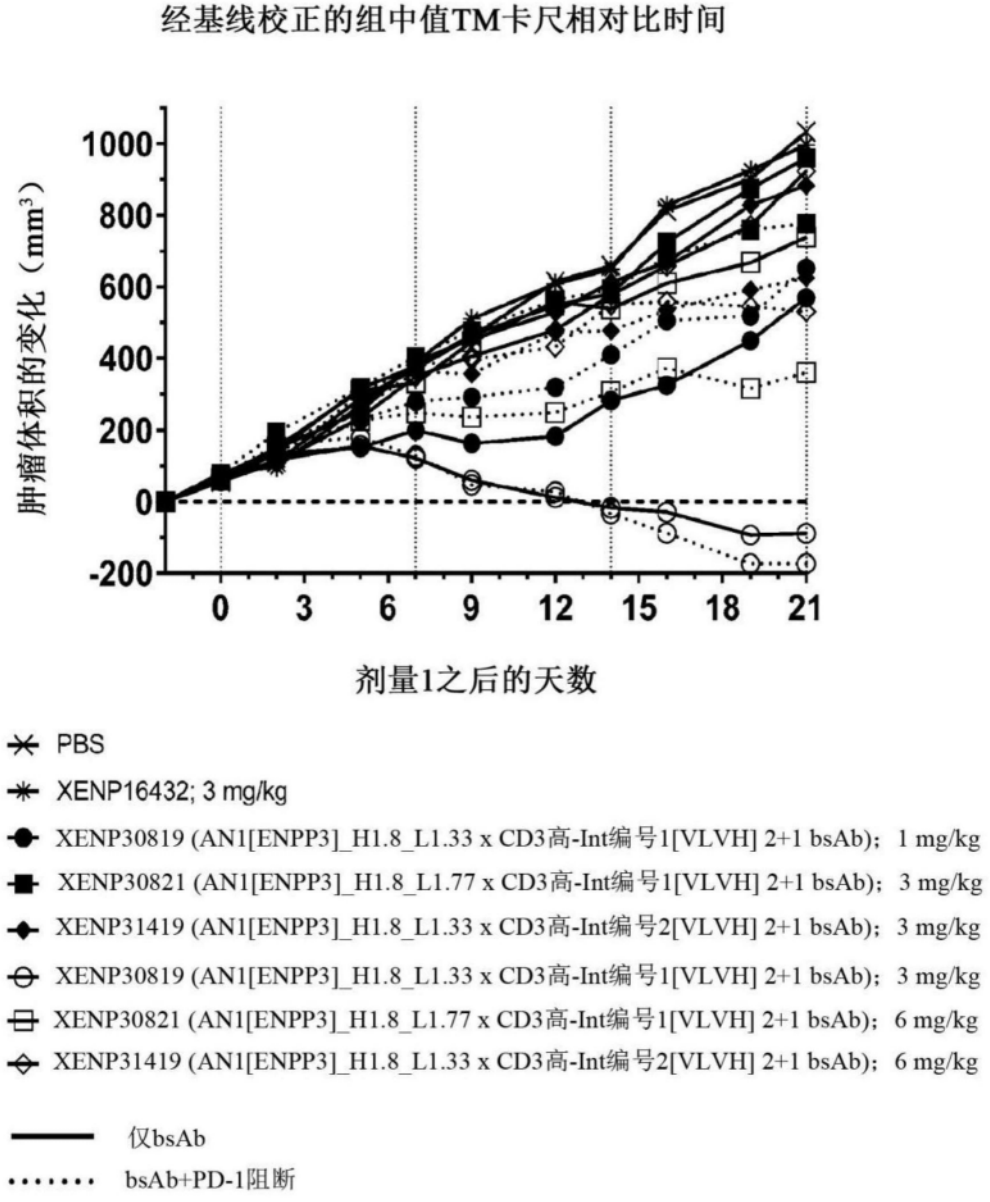

经基线校正的组中值TM卡尺相对比时间
肿瘤体积的变化（mm³）
1000
800
600
400
200
0
-200
0
3
6
9
12
15
18
21
剂量1之后的天数
PBS
XENP16432; 3 mg/kg
XENP30819 (AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x CD3高-Int编号1[VLVH] 2+1 bsAb)；1 mg/kg
XENP30821 (AN1[ENPP3]_H1.8_L1.77 x CD3高-Int编号1[VLVH] 2+1 bsAb)；3 mg/kg
XENP31419 (AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x CD3高-Int编号2[VLVH] 2+1 bsAb)；3 mg/kg
XENP30819 (AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x CD3高-Int编号1[VLVH] 2+1 bsAb)；3 mg/kg
XENP30821 (AN1[ENPP3]_H1.8_L1.77 x CD3高-Int编号1[VLVH] 2+1 bsAb)；6 mg/kg
XENP31419 (AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x CD3高-Int编号2[VLVH] 2+1 bsAb)；6 mg/kg
仅bsAb
bsAb+PD-1阻断

图47

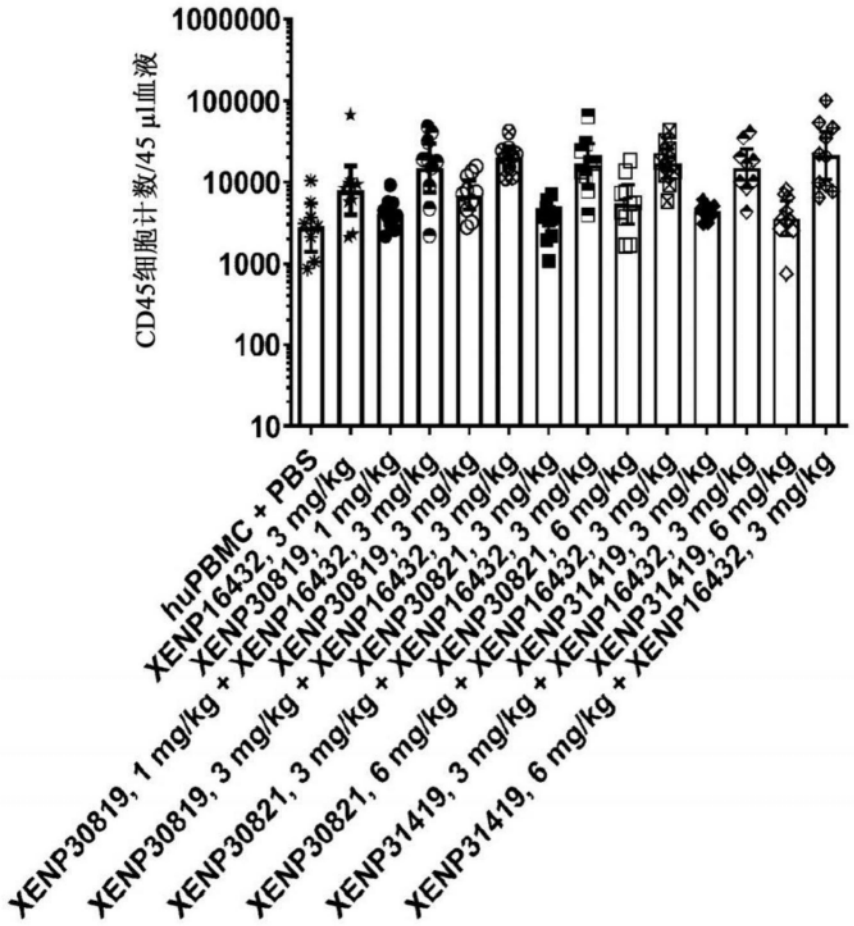

CD45细胞计数/45 μl血液
1000000
100000
10000
1000
100
10
huPBMC + PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP30819, 1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30819, 3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30821, 3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30821, 6 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP31419, 3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP31419, 6 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg

图48A

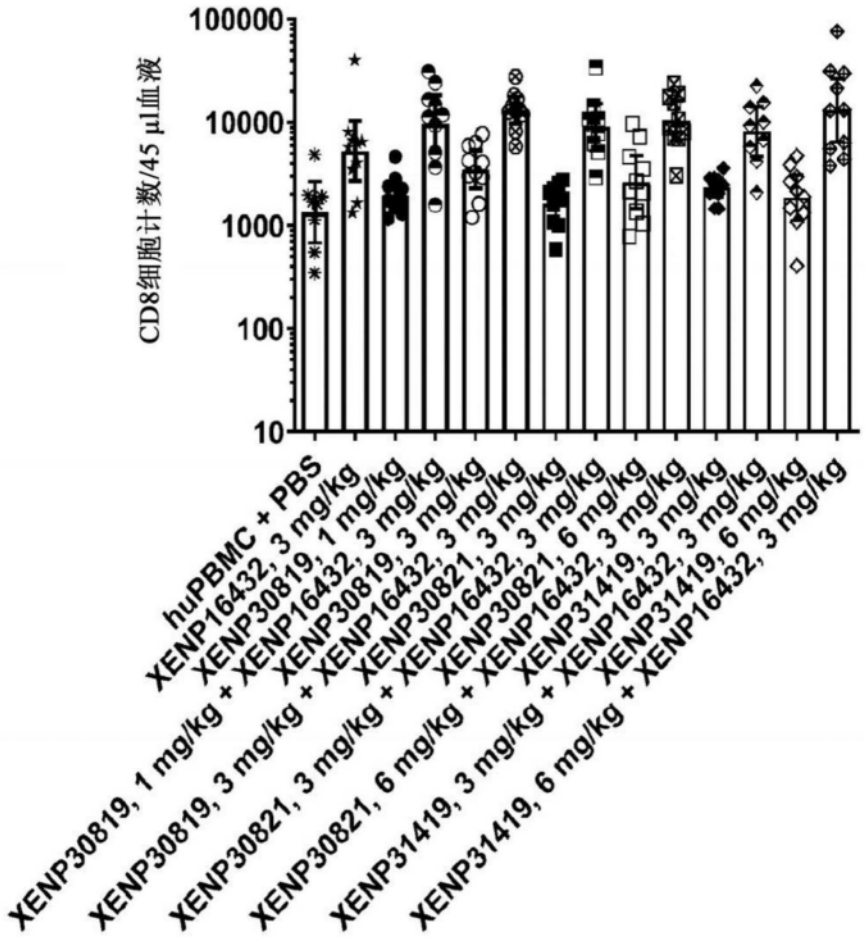

CD8细胞计数/45 μl血液
100000
10000
1000
100
10
huPBMC + PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP30819, 1 mg/kg
XENP30819, 1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30819, 3 mg/kg
XENP30819, 3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30821, 3 mg/kg
XENP30821, 3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30821, 6 mg/kg
XENP30821, 6 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP31419, 3 mg/kg
XENP31419, 3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP31419, 6 mg/kg
XENP31419, 6 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg

图48B

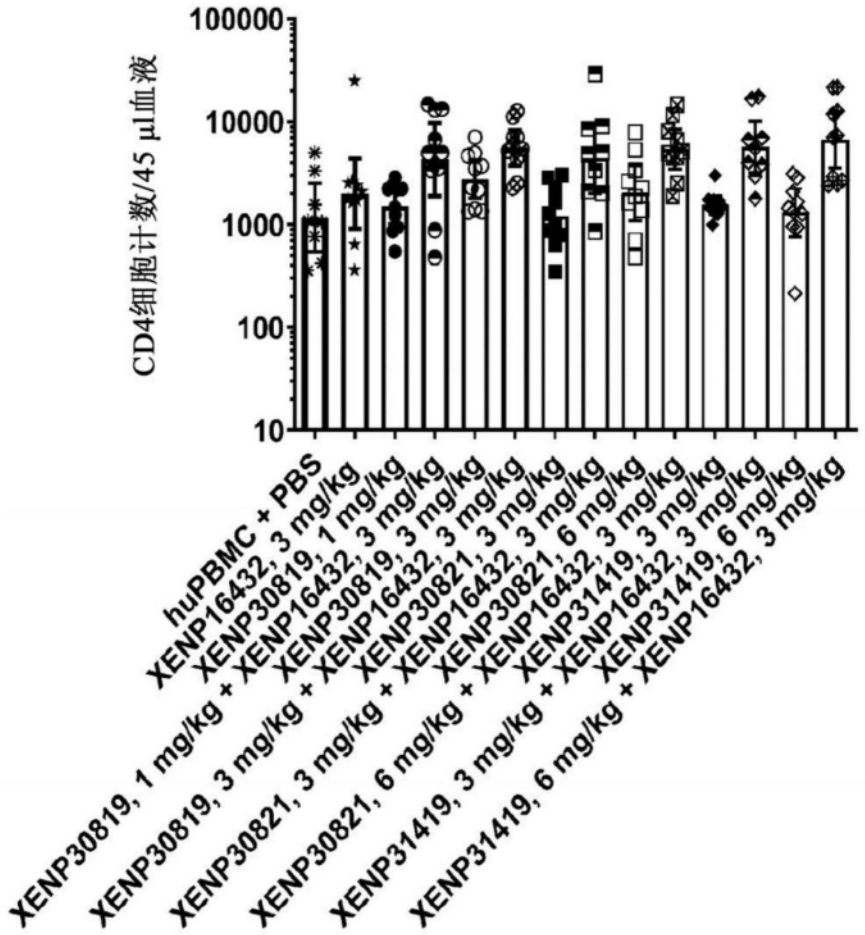

CD4细胞计数/45 μl血液
100000
10000
1000
100
10
huPBMC + PBS
XENP16432, 3 mg/kg
XENP30819, 1 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30819, 3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30821, 3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP30821, 6 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP31419, 3 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg
XENP31419, 6 mg/kg + XENP16432, 3 mg/kg

图48C

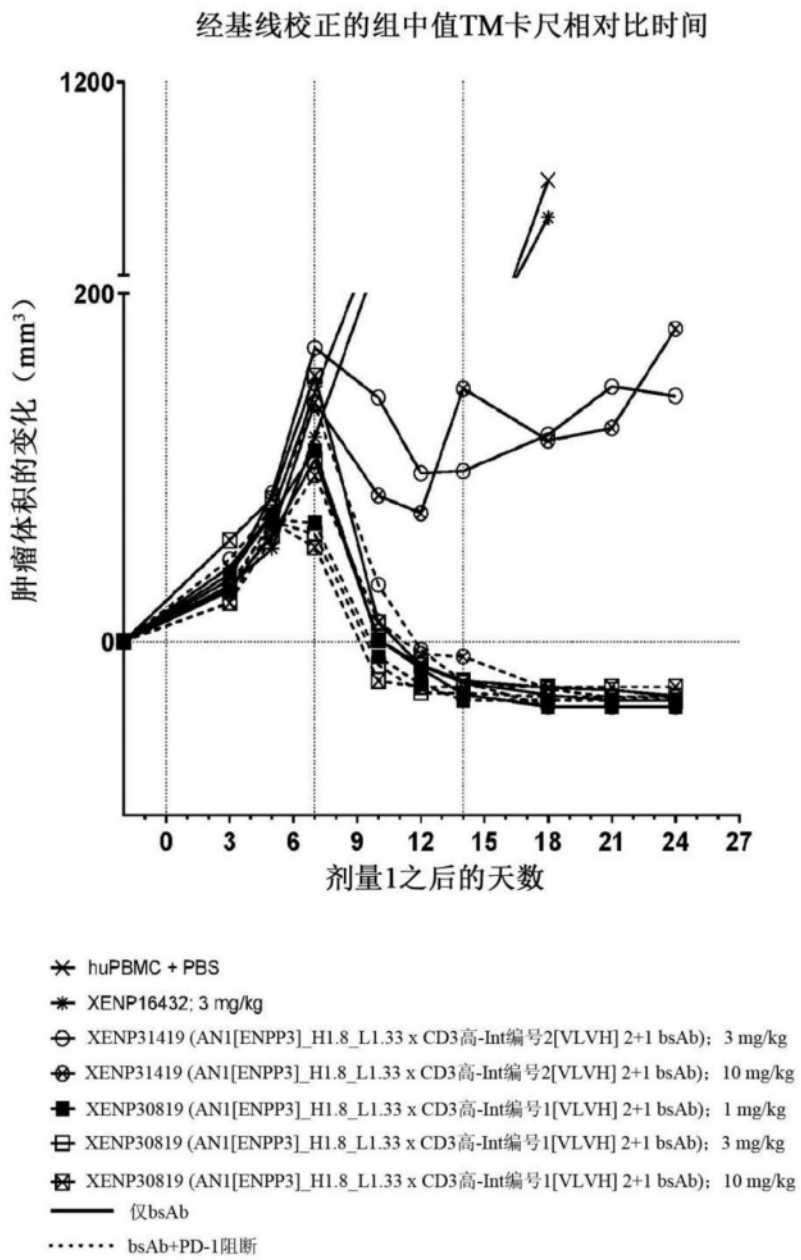

经基线校正的组中值TM卡尺相对比时间
1200
200
0
肿瘤体积的变化（mm³）
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27
剂量1之后的天数
huPBMC + PBS
XENP16432; 3 mg/kg
XENP31419 (AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x CD3高-Int编号2[VLVH] 2+1 bsAb)；3 mg/kg
XENP31419 (AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x CD3高-Int编号2[VLVH] 2+1 bsAb)；10 mg/kg
XENP30819 (AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x CD3高-Int编号1[VLVH] 2+1 bsAb)；1 mg/kg
XENP30819 (AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x CD3高-Int编号1[VLVH] 2+1 bsAb)；3 mg/kg
XENP30819 (AN1[ENPP3]_H1.8_L1.33 x CD3高-Int编号1[VLVH] 2+1 bsAb)；10 mg/kg
仅bsAb
bsAb+PD-1阻断

图49

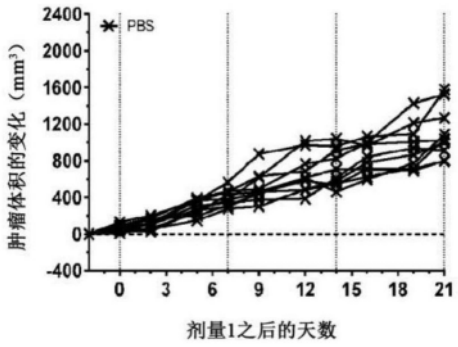


图50A

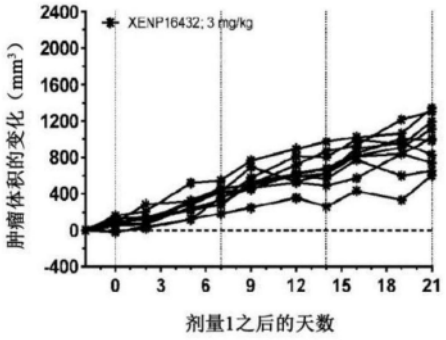


图50B

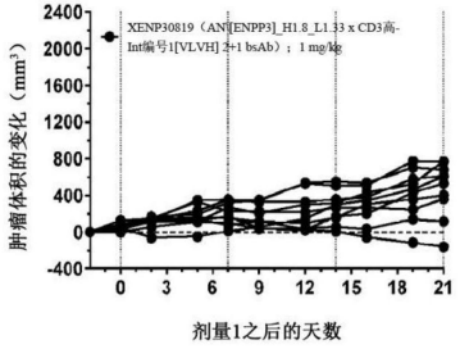


图50C

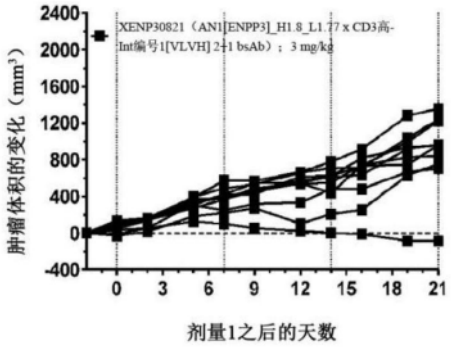


图50D

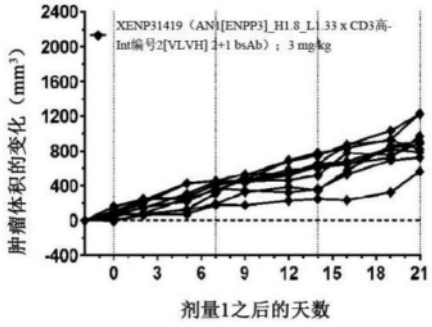


图50E

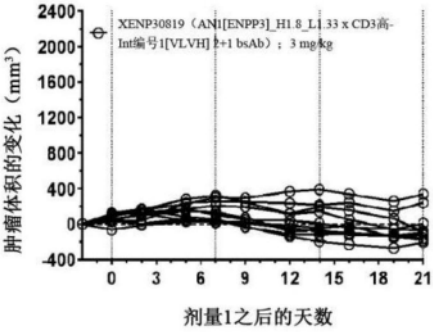


图50F

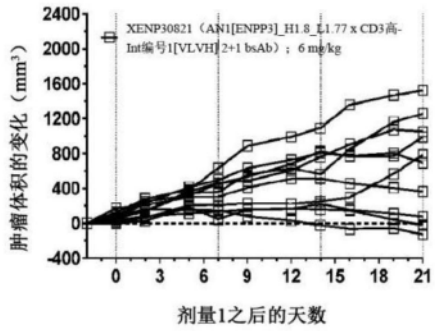


图50G

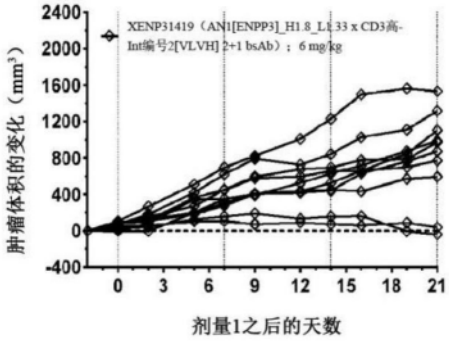


图50H

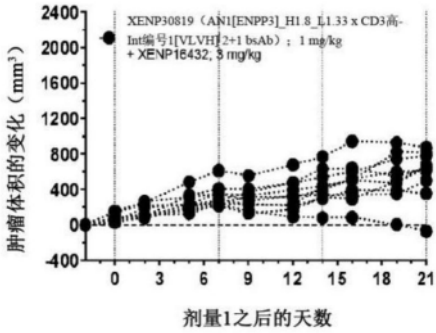


图50I

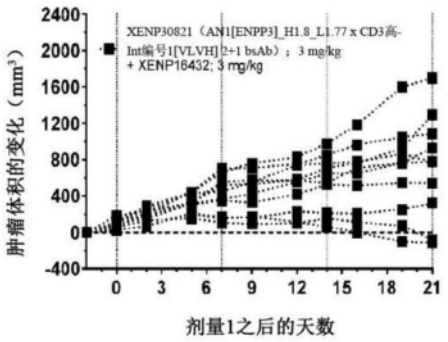


图50J

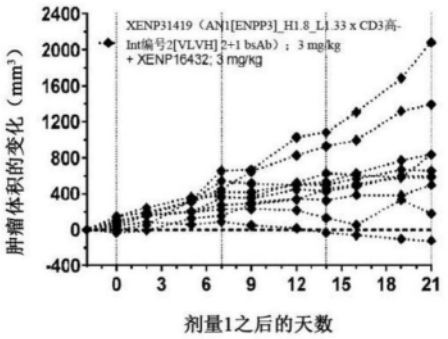


图50K

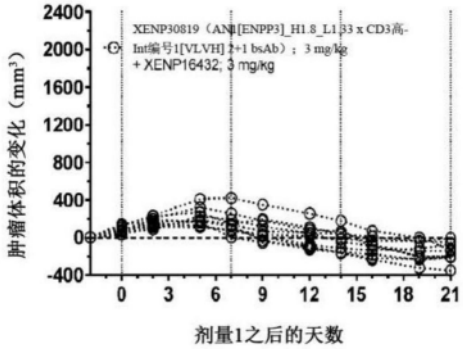


图50L

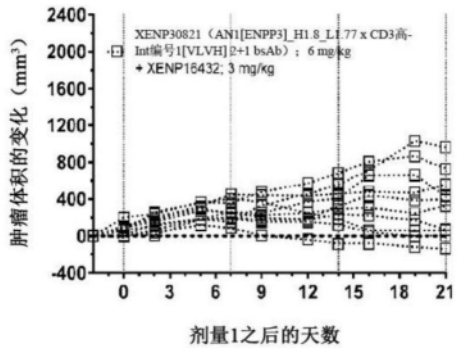


图50M

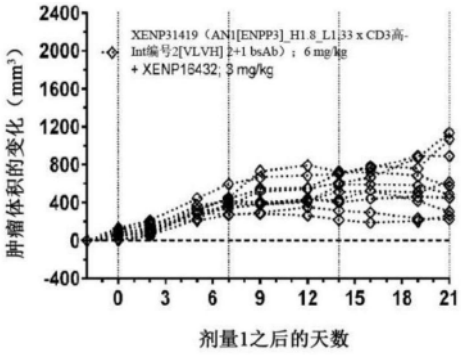


图50N

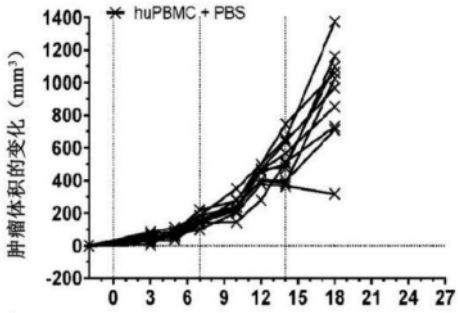


图51A

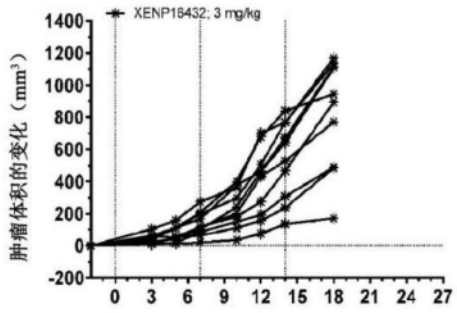


图51B

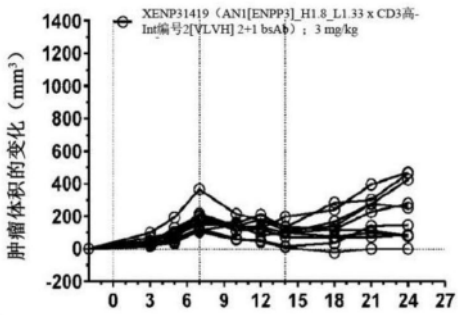


图51C

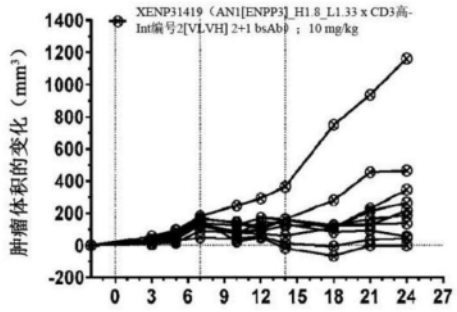


图51D

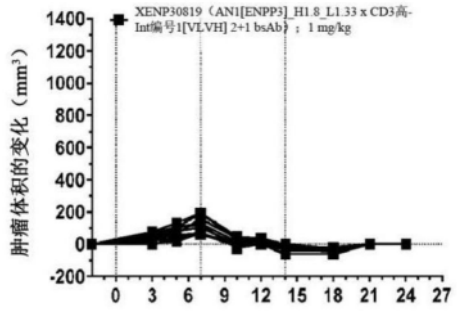


图51E

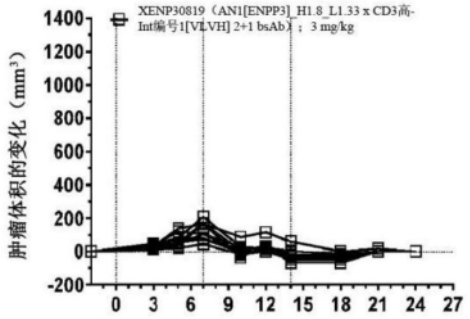


图51F

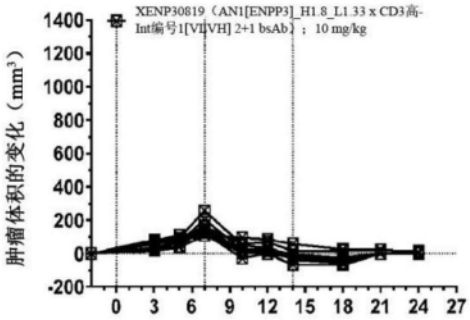


图51G

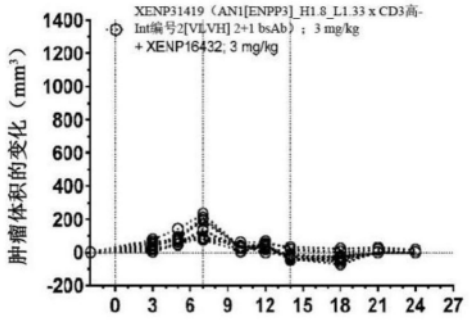


图51H

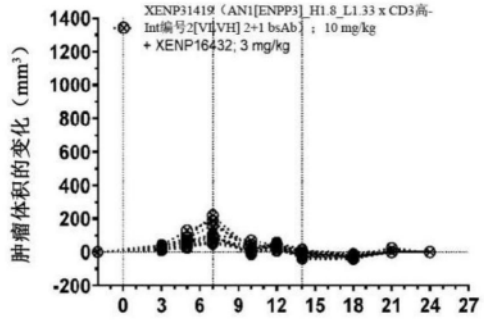


图51I

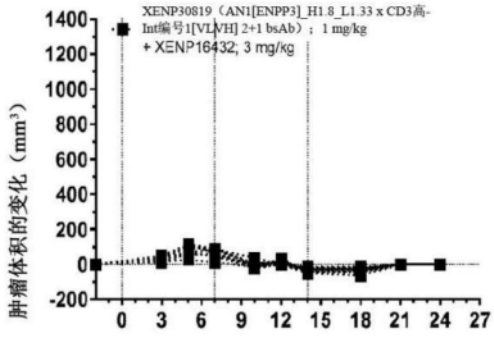


图51J

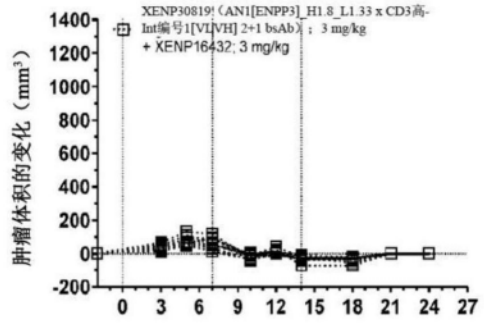


图51K

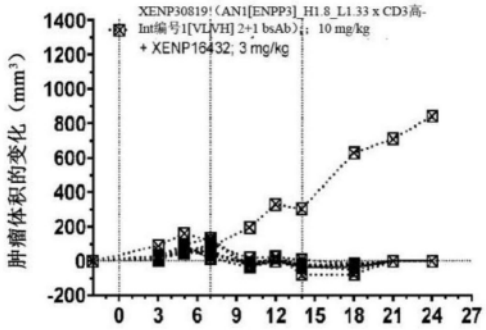


图51L

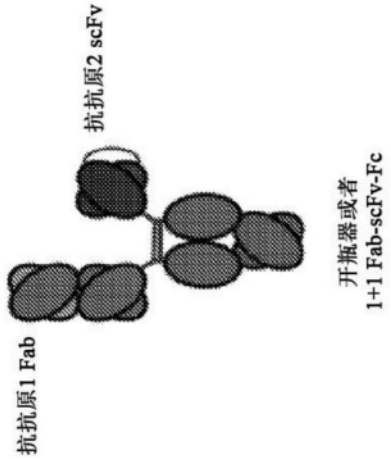


图52A

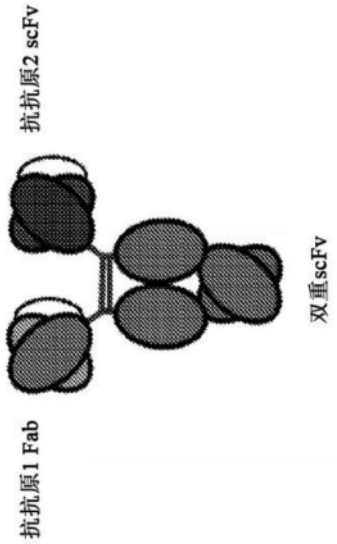


图52B

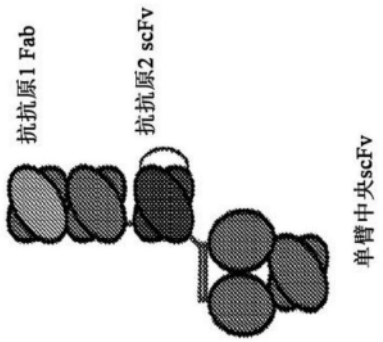


图52C

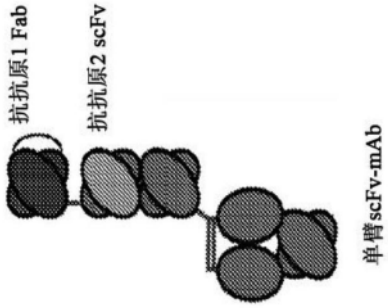


图52D

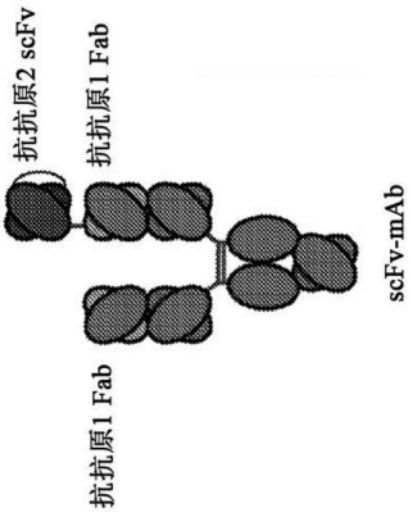


图52E

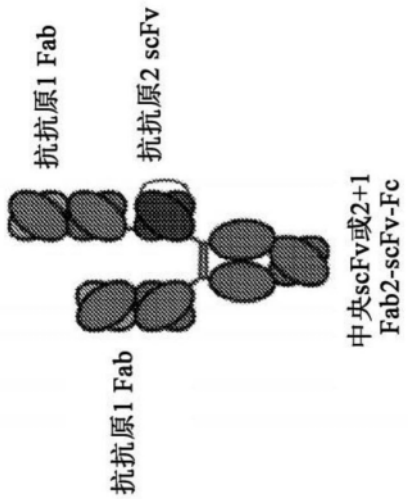

抗抗原1 Fab
抗抗原2 scFv
中央scFv或2+1
Fab2-scFv-Fc
抗抗原1 Fab

图52F

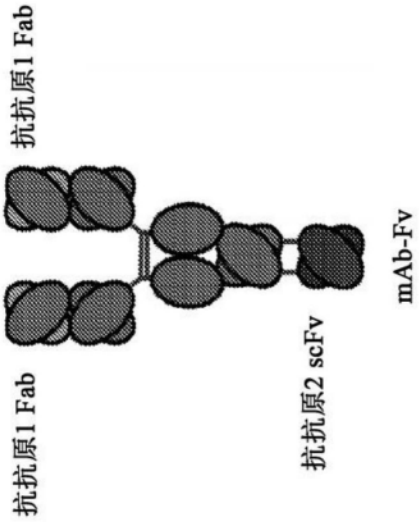

抗抗原1 Fab
mAb-Fv
抗抗原2 scFv
抗抗原1 Fab

图52G

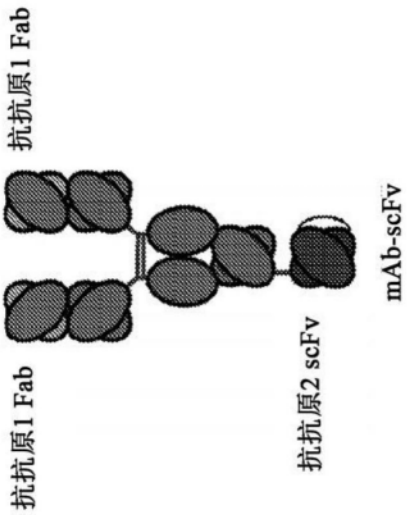

抗抗原1 Fab
抗抗原1 Fab
抗抗原2 scFv
mAb-scFv

图52H

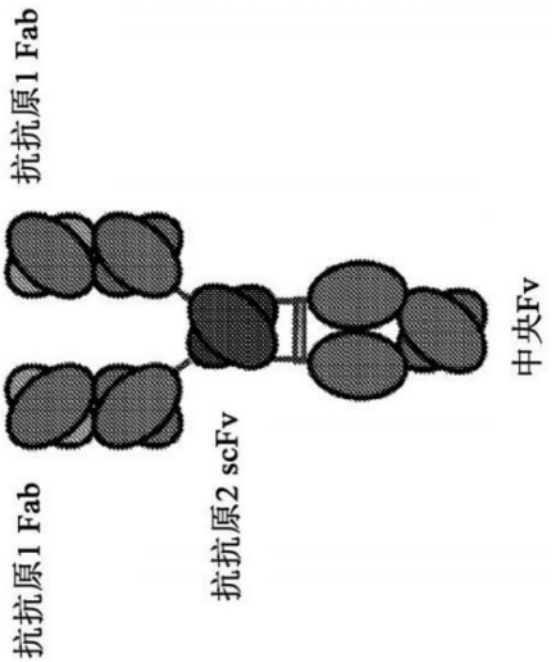

抗抗原1 Fab
抗抗原1 Fab
抗抗原2 scFv
中央Fv

图52I

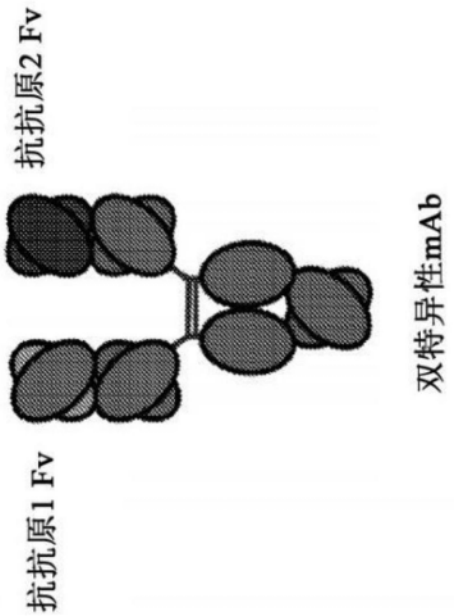


图52J

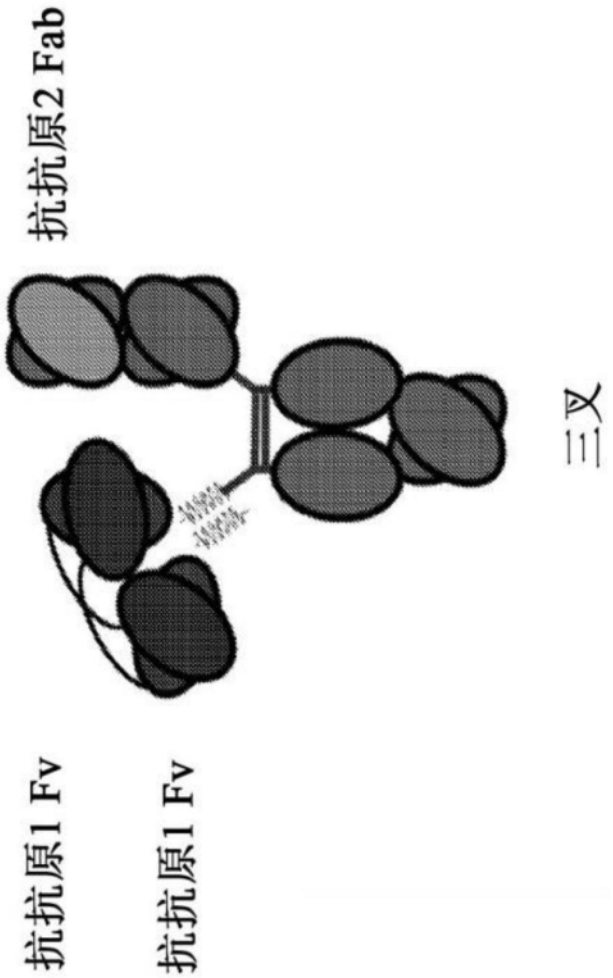


图52K

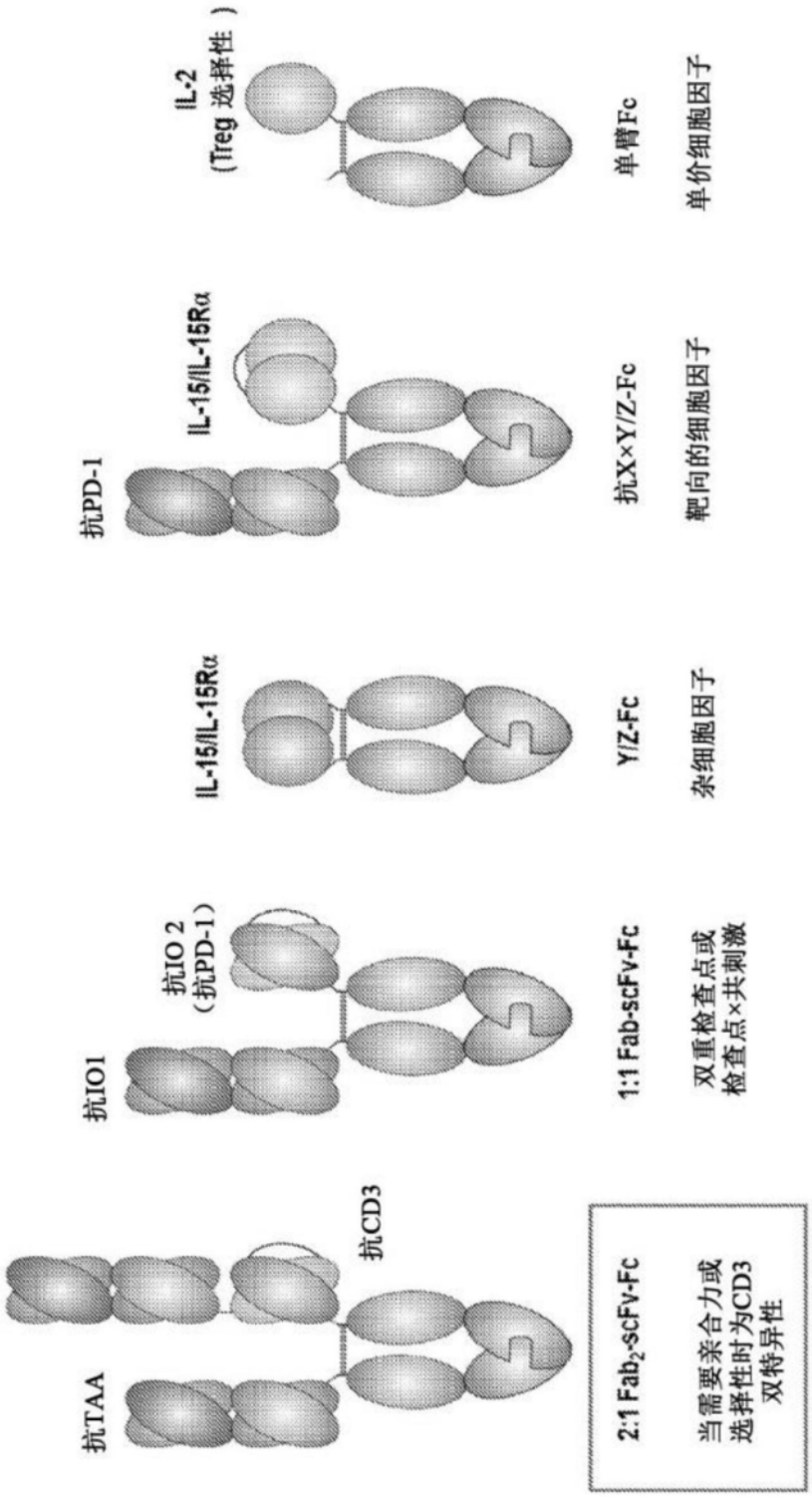

抗TAA
抗CD3
2:1 Fab2-scFv-Fc
当需要亲合力或选择性时为CD3双特异性
抗IO1
抗IO 2（抗PD-1）
1:1 Fab-scFv-Fc
双重检查点或检查点×共刺激
IL-15/IL-15Rα
Y/Z-Fc
杂细胞因子
抗PD-1
IL-15/IL-15Rα
抗X×Y/Z-Fc
靶向的细胞因子
IL-2（Treg 选择性）
单臂Fc
单价细胞因子

图53

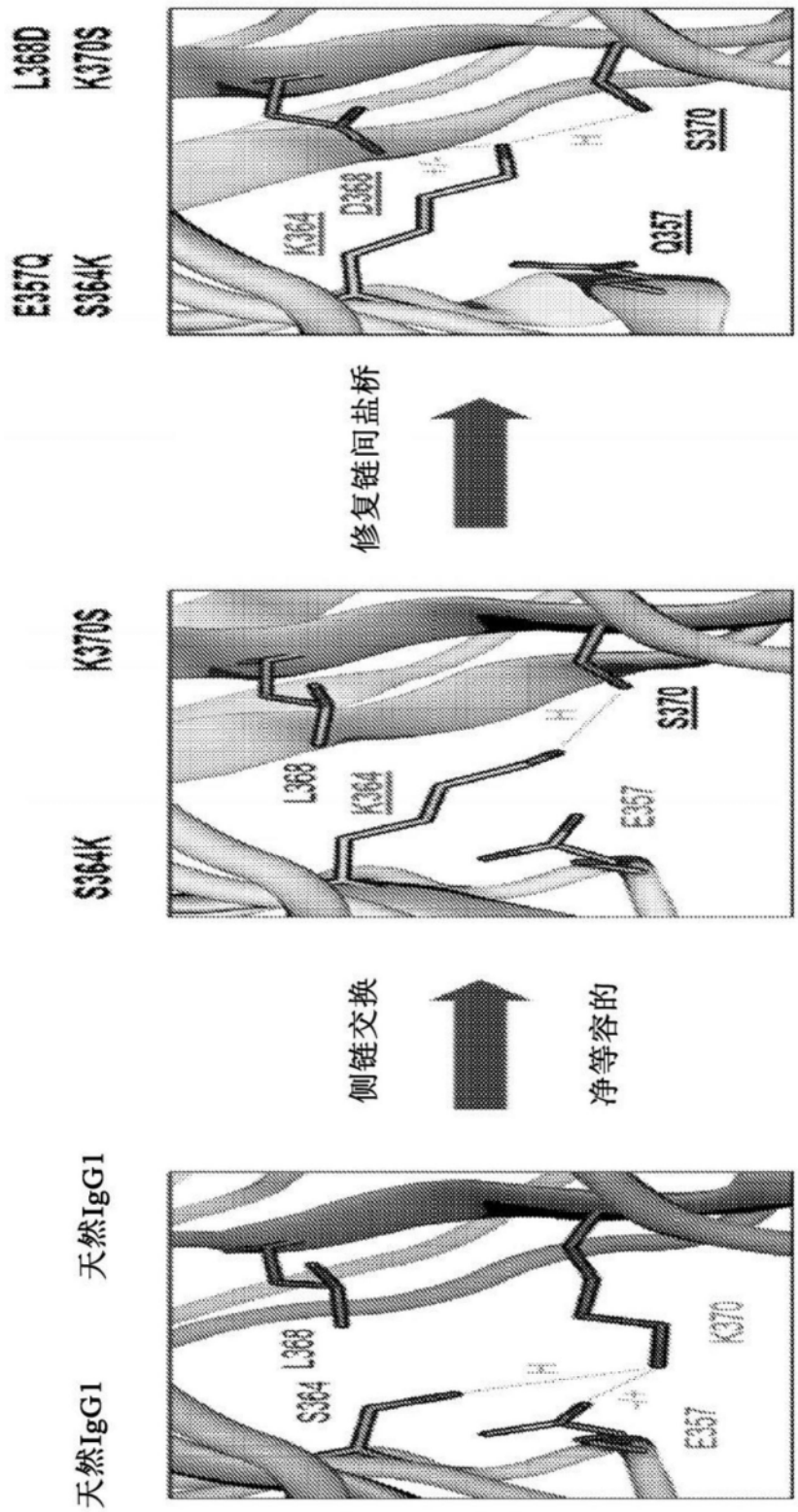

天然IgG1
天然IgG1
S364
L368
E357
K370
侧链交换
净等容的
S364K
K370S
L368
K364
E357
S370
修复链间盐桥
E357Q
S364K
L368D
K370S
K364
D368
Q357
S370

图54

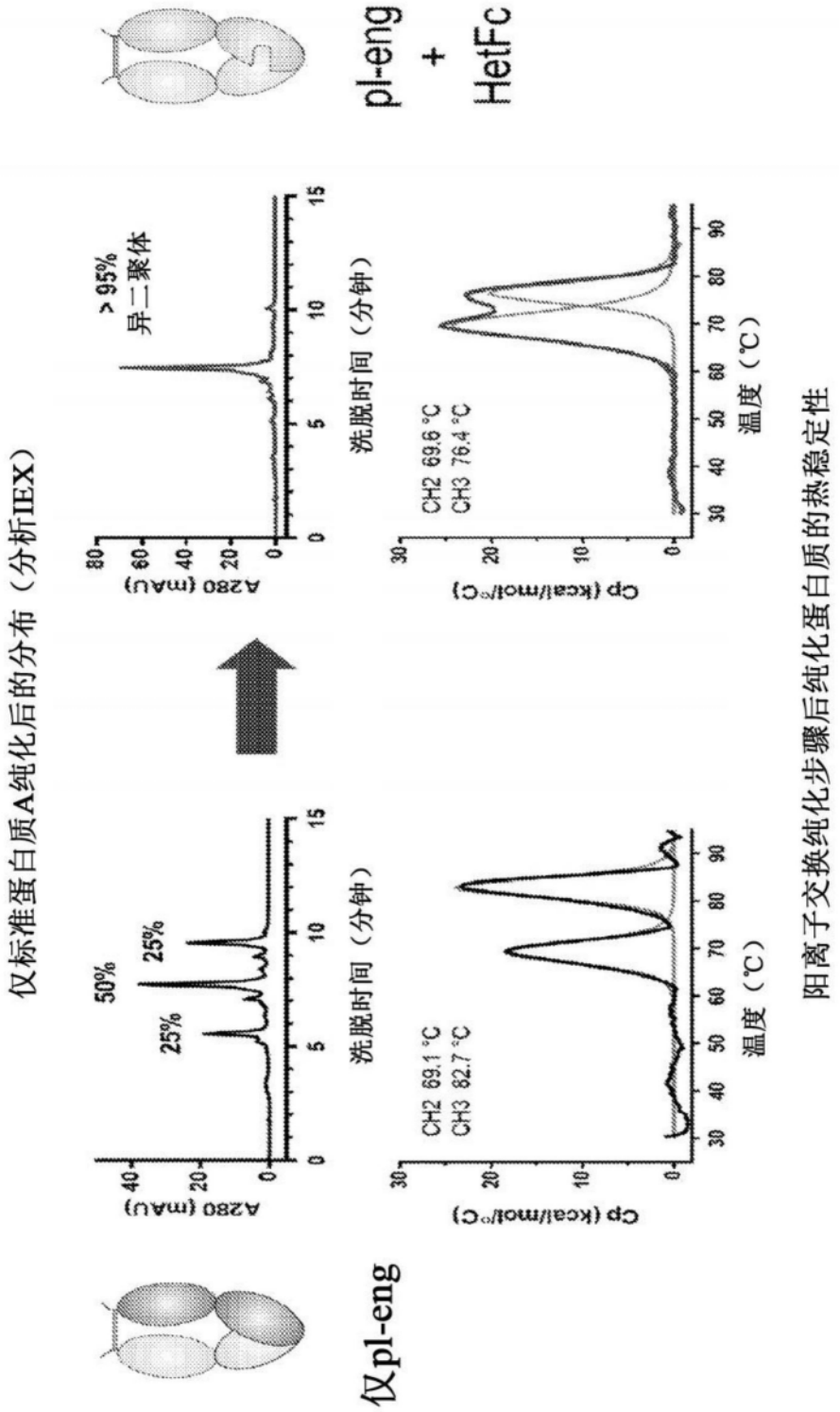
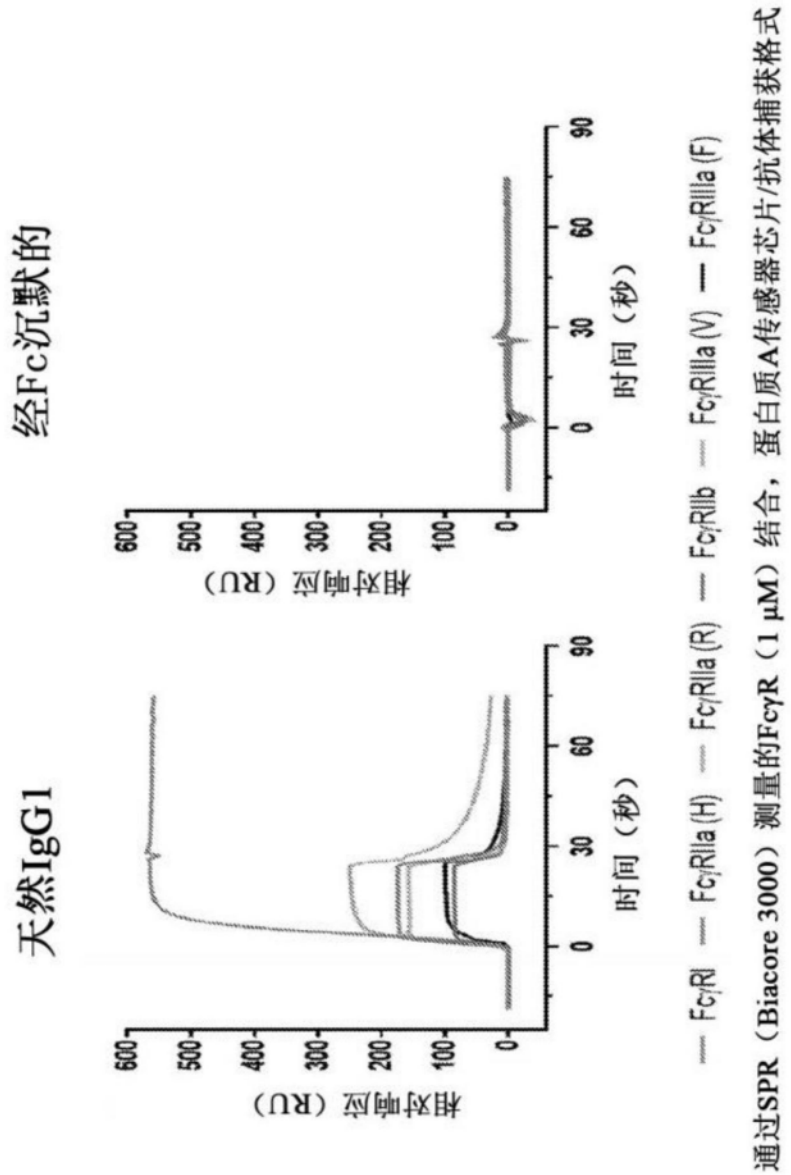

仅标准蛋白质A纯化后的分布（分析IEX）
仅pl-eng
pl-eng + HetFc
50%
25%
25%
> 95%
异二聚体
A280 (mAU)
洗脱时间（分钟）
CH2 69.1 °C
CH3 82.7 °C
CH2 69.6 °C
CH3 76.4 °C
Cp (kcal/mol/°C)
温度（°C）
阳离子交换纯化步骤后纯化蛋白质的热稳定性

图55



通过SPR（Biacore 3000）测量的FcγR（1 μM）结合，蛋白质A传感器芯片/抗体捕获格式

图56

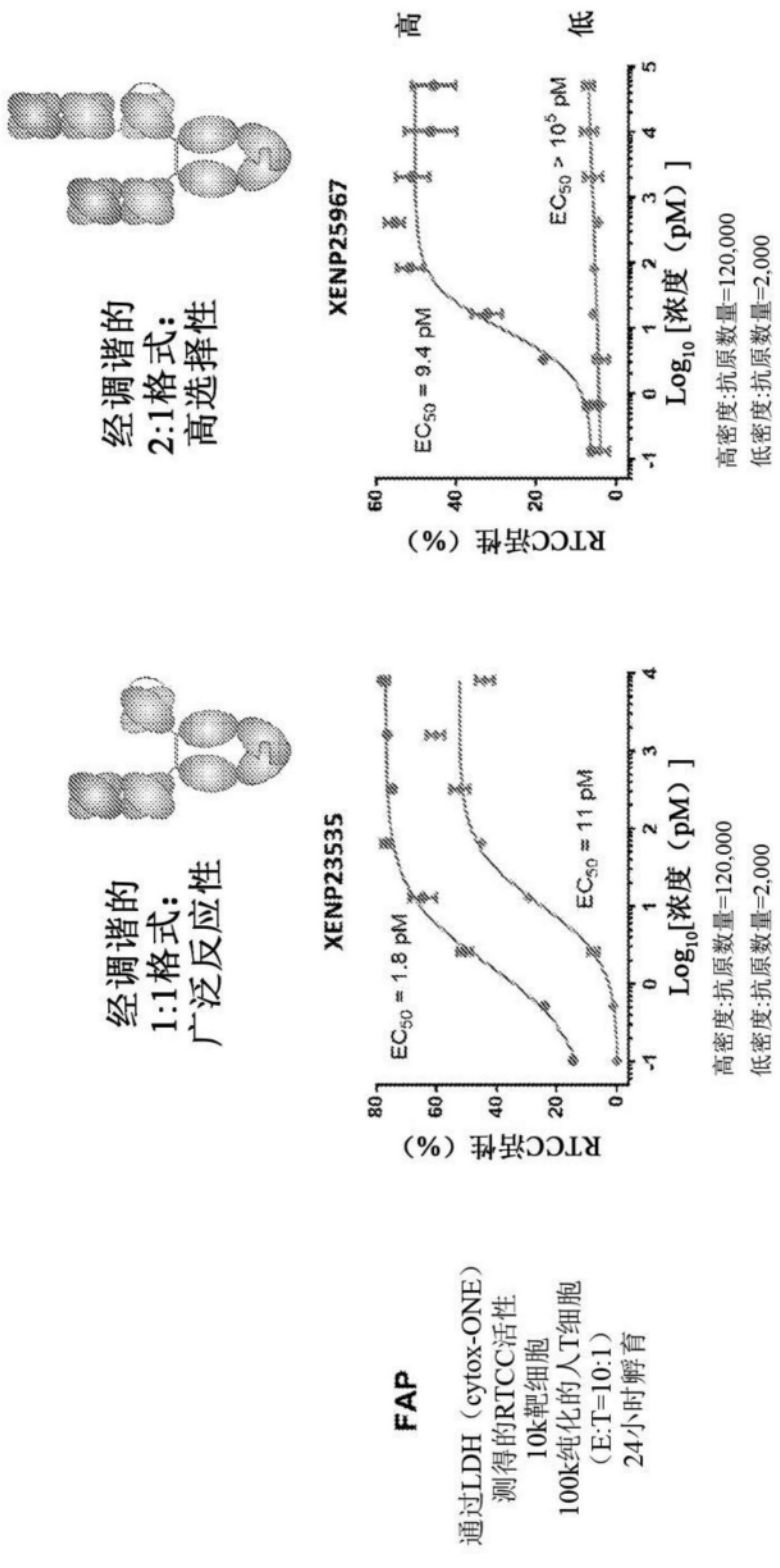

经调谐的
2:1格式:
高选择性
XENP25967
高
低
RTCC活性（%）
EC50 = 9.4 pM
EC50 > 10^5 pM
Log10 [浓度（pM）]
高密度:抗原数量=120,000
低密度:抗原数量=2,000
经调谐的
1:1格式:
广泛反应性
XENP23535
RTCC活性（%）
EC50 = 1.8 pM
EC50 = 11 pM
Log10[浓度（pM）]
高密度:抗原数量=120,000
低密度:抗原数量=2,000
FAP
通过LDH（cytox-ONE）
测得的RTCC活性
10k靶细胞
100k纯化的人T细胞
（E:T=10:1）
24小时孵育

图57A

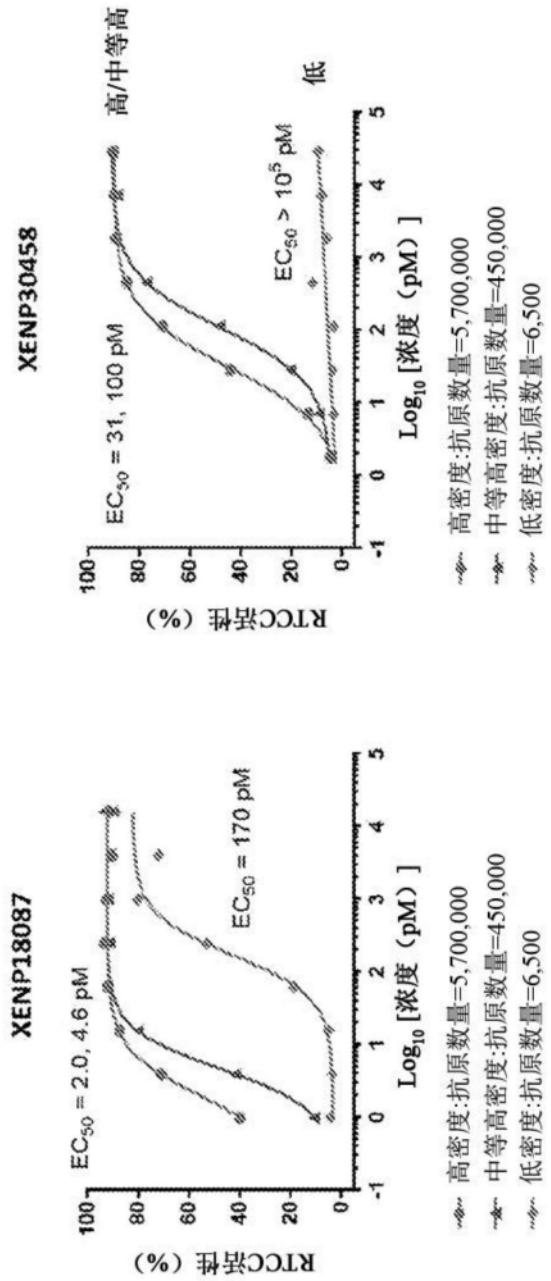

SSTR2
通过细胞计数
（Zombie Aqua, BioLegend）
测得的RTCC活性
20k经CFSE标记的靶细胞
400k人PBMC
（E:T=20:1）
24小时孵育
XENP18087
XENP30458
RTCC活性（%）
EC_{50} = 2.0, 4.6 pM
EC_{50} = 170 pM
EC_{50} = 31, 100 pM
EC_{50} > 10^5 pM
高/中等高
低
Log_{10} [浓度（pM）]
高密度:抗原数量=5,700,000
中等高密度:抗原数量=450,000
低密度:抗原数量=6,500

图57B

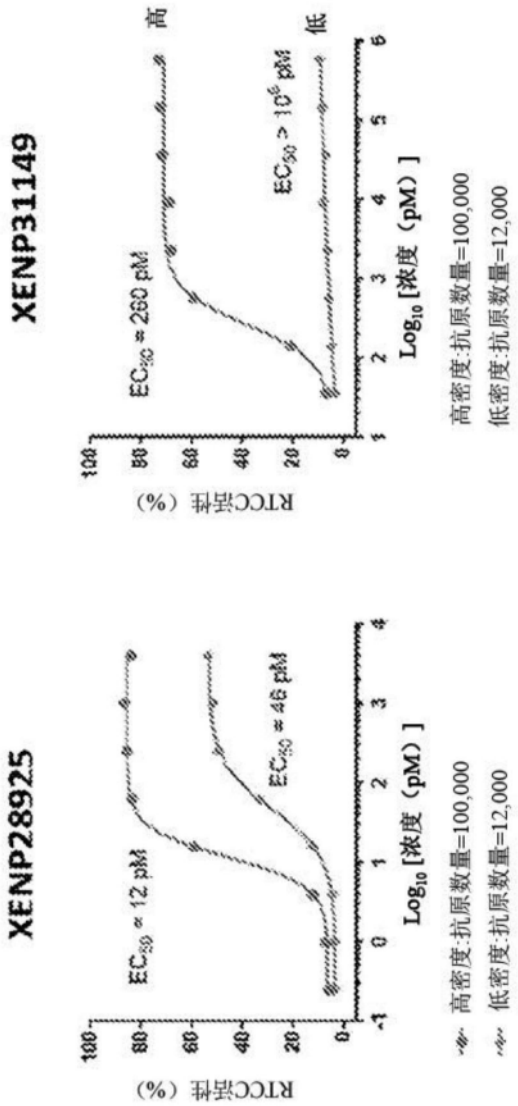

XENP31149
XENP28925
ENPP3
通过细胞计数
(Zombie Aqua, BioLegend)
测得的RTCC活性
40k经CFSE标记的靶细胞
400k PBMC
(E:T=10:1)
24小时孵育
RTCC活性 (%)
Log10 [浓度 (pM)]
EC50 = 260 pM
EC50 > 10^6 pM
EC50 = 12 pM
EC50 = 46 pM
高
低
高密度:抗原数量=100,000
低密度:抗原数量=12,000

图57C

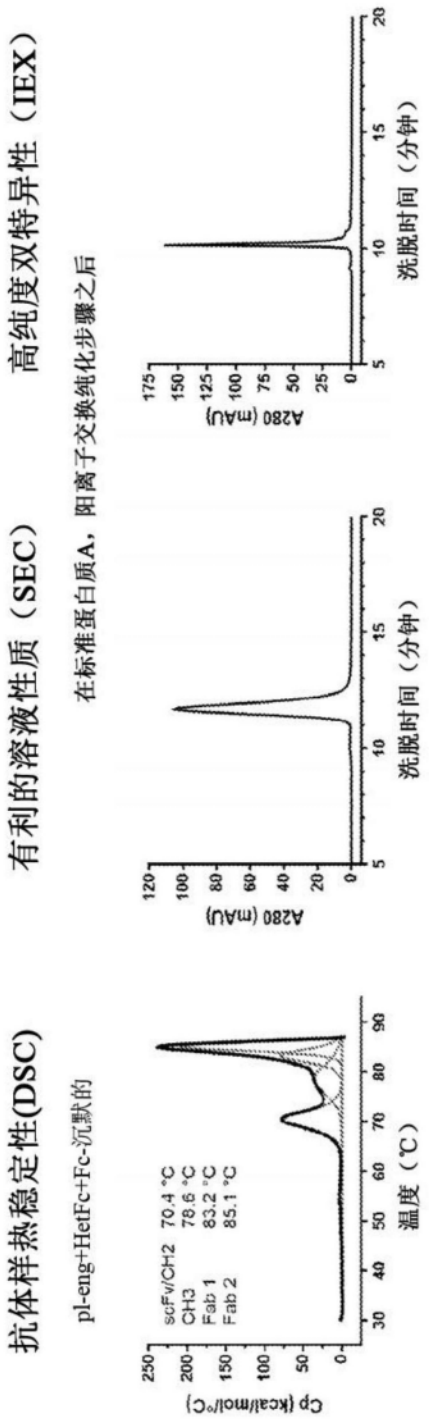

抗体样热稳定性(DSC)
pl-eng+HetFc+Fc-沉默的
scFv/CH2 70.4 °C
CH3 78.6 °C
Fab 1 83.2 °C
Fab 2 85.1 °C
Cp (kcal/mol/°C)
温度（℃）
有利的溶液性质（SEC）
在标准蛋白质A，阳离子交换纯化步骤之后
A280 (mAU)
洗脱时间（分钟）
高纯度双特异性（IEX）
A280 (mAU)
洗脱时间（分钟）

图58

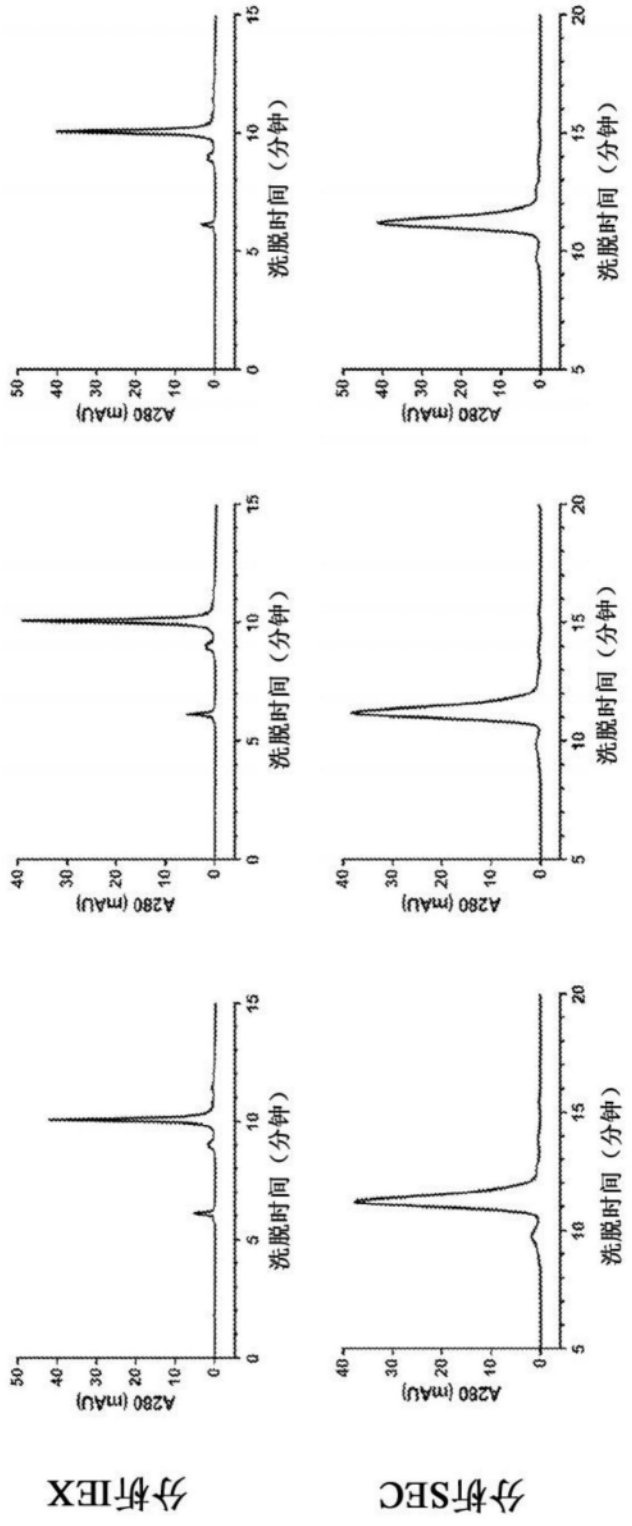
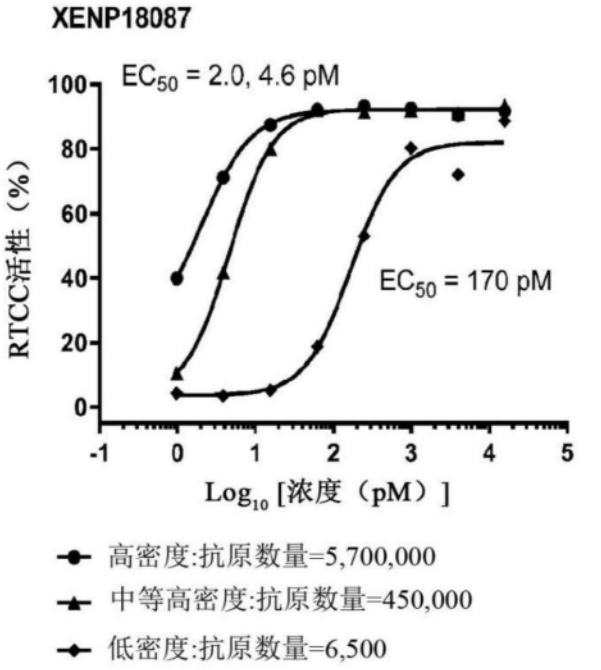


图59

A)


XENP18087
EC50 = 2.0, 4.6 pM
EC50 = 170 pM
RTCC活性（%）
Log10 [浓度（pM）]
高密度:抗原数量=5,700,000
中等高密度:抗原数量=450,000
低密度:抗原数量=6,500

B)

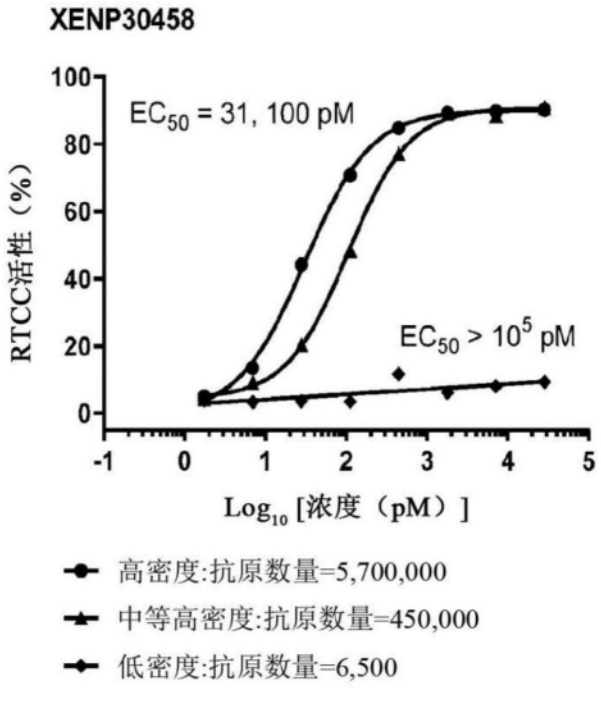

XENP30458
EC50 = 31, 100 pM
EC50 > 10^5 pM
RTCC活性（%）
Log10 [浓度（pM）]
高密度:抗原数量=5,700,000
中等高密度:抗原数量=450,000
低密度:抗原数量=6,500

图60

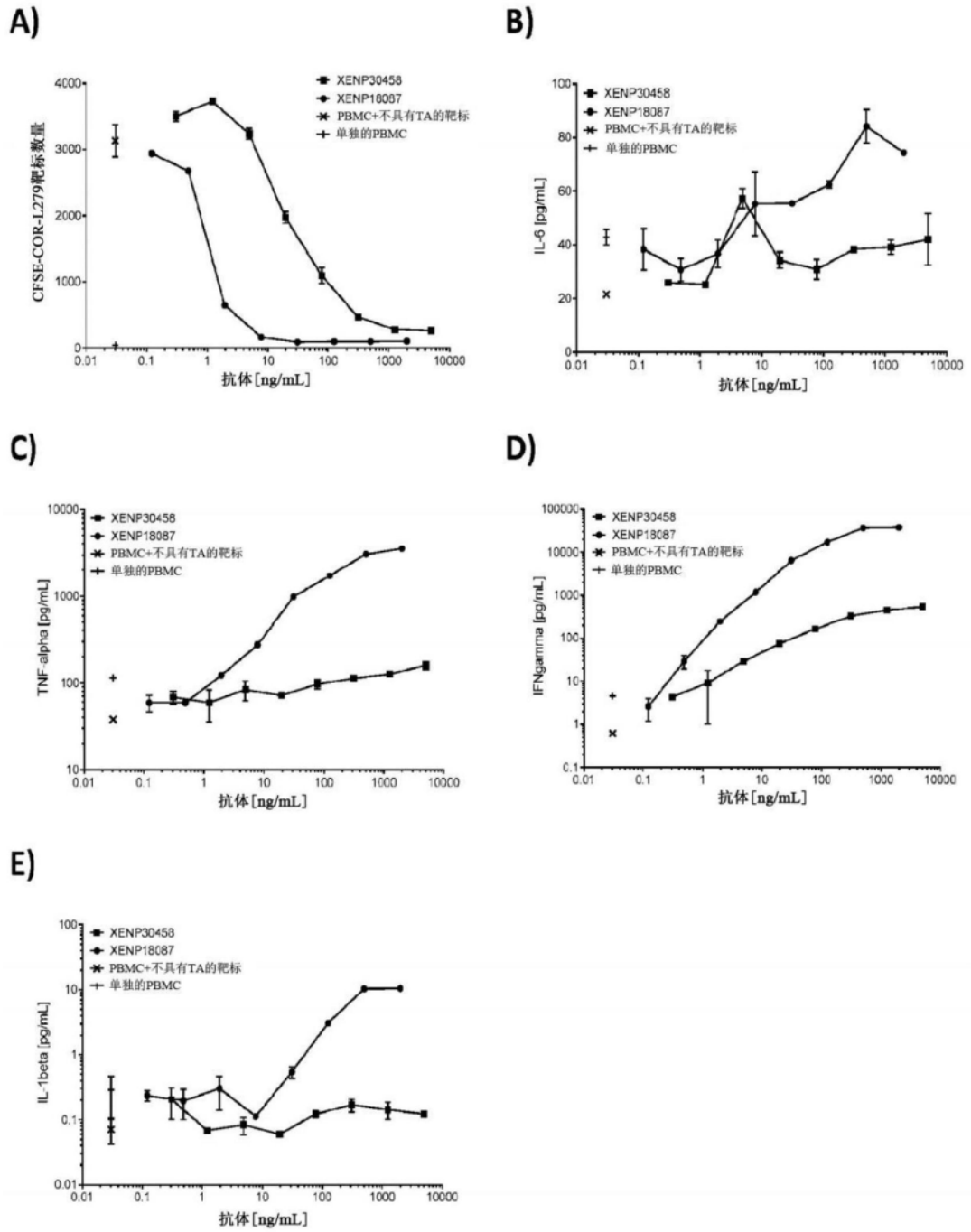

A)
CFSE-COR-L279靶标数量
XENP30458
XENP18087
PBMC+不具有TA的靶标
单独的PBMC
抗体[ng/mL]
B)
IL-6 [pg/mL]
C)
TNF-alpha [pg/mL]
D)
IFNgamma [pg/mL]
E)
IL-1beta [pg/mL]

图61

>XENP18087 [αSSTR2]_H1.143_L1.30_Fab-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_PVA_/S267K_pI(-)_同配_A_L368D/K370S-IgG1_C220S/S364K/E357Q

链1-[αSSTR2]_H1.143_IgG1_PVA_/S267K_pI(-)_同配_A_L368D/K370S (SEQ ID NO: 554)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMAWFRQAPGKGLEWVSFISNLGYSIYYADSVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPYDYDSFDPMDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVE
WESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 555)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-[αSSTR2]_L1.30 (SEQ ID NO: 556)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRNRKNYLAWYQQKPDQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCKQSYYLWTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP23535 [αFAP]_H0L0_Fab-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-[αFAP]_H0_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 557)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIGGINPNNGIPNYNQKFKGRVTITVDTSAS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARRRIAYGYDEGHAMDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIA
VEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 558)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPED
EADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVK
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-[αFAP]_L0 (SEQ ID NO: 559)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFWASTRESGVPDRFSGSGFGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSYPLTFGQGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图62A

>XENP25967 [αFAP] H1L1 Fab-[αFAP] H1L1
Fab (G4S)2 [αCD3] H1.32 L1.47 scFv(GKPGS)4 (G4S)2 IgG1 PVA /S267K-pI(-)
同配 A L368D/K370S-IgG1 C220S/S364K/E357Q

链1-[αFAP]_H1_IgG1_PVA_/S267K-pI(-)_同配_A_L368D/K370S (SEQ ID NO: 560)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAKISFYPGGTYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αFAP]_H1_(G4S)2_[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4_(G4S)2_IgG1_C220S/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 561)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAKISFYPGGTYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC/GGGGSGGGGS/EVQLVESGG
GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST
GAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTV
L/GGGGSGGGGS/KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-[αFAP]_L1 (SEQ ID NO: 562)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSYSSPYTFGQGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>XENP28925 [αENPP3] H1.8 L1 Fab-[αCD3] H1.30 L1.47 scFv(GKPGS)4-IgG1 pI(-)
同配 A /PVA /S267K/L368D/K370S-Fc(216) IgG1 C220S/PVA /S267K/S364K/E357Q

链1-[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 563)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αCD3]_H1.30_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(216)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 564)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/QAVVTQEPSLTVSPGGT
VTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWV
FGGGTKLTVL/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-[αENPP3]_L1 (SEQ ID NO: 565)
DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAED
AATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图62B

>XENP30458 [αSSTR2]_H1.24_L1.30_Fab-[αSSTR2]_H1.24_L1.30_Fab_(G4S)2_[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S-Fc(222)_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S

链1-[αSSTR2]_H1.24_IgG1_pI(-)_同配_A_PVA_/S267K/L368D/K370S/M428L/N434S (SEQ ID NO: 566)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMAWFRQAPGKGLEWVSFISNLAYSIYYADSVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPYDYDSFYPMDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVE
WESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

链2-[αSSTR2]_H1.24_[αCD3]_H1.32_L1.47_scFv(GKPGS)4_Fc(222)_IgG1_PVA_/S267K/S364K/E357Q/M428L/N434S (SEQ ID NO: 567)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMAWFRQAPGKGLEWVSFISNLAYSIYYADSVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPYDYDSFYPMDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC/GGGG
SGGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRF
TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI
SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GGGGSGGGGS/KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

链3-[αSSTR2]_L1.30 (SEQ ID NO: 568)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRNRKNYLAWYQQKPDQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCKQSYYLWTFGGGTKVEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图62C

>XENP31149 [αENPP3]_H1.8_L1.33_Fab-[αENPP3]_H1.8_L1.33_CH1_(G4S)2_ [αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4-IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S-Fc(222)_IgG1_C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q

链1-[αENPP3]_H1.8_IgG1_pI(-)_同配_A_/PVA_/S267K/L368D/K370S (SEQ ID NO: 569)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW
ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链2-[αENPP3]_H1.8_CH1_(G4S)2_[αCD3]_L1.47_H1.89_scFv(GKPGS)4_Fc(222)_IgG1_ C220S/PVA_/S267K/S364K/E357Q (SEQ ID NO: 570)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYGMSWVRQAPGQRLEWVSYISSGGGTTYYLDSVTGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRRVYYGYYFDYWGQGTLVTVSS/ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC/GGGGS
GGGGS/QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGG
KAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL/GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS/EVQLVESGGGLVQPGGS
LRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSS/GGGGSGGGGS/KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

链3-[αENPP3]_L1.33 (SEQ ID NO: 571)

DILLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTSIHWYQQKPDQSPKLLIEYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LEAEDAATYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK/RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图62D

[αSSTR2]_H1.24_L1.30

	序列	SEQ ID NO:
可变重(vh)结构域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMAWFRQAPGKGLEW VSFISNLAYSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARAPYDYDSFYPMDYWGQGTLVTVSS	572
vhCDR1	DYGMA	573
vhCDR2	FISNLAYSIYYADSVKG	574
vhCDR3	APYDYDSFYPMDY	575
可变轻(vl)结构域	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRNRKNYLAWYQQKPD QSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC KQSYYLWTFGGGTKVEIK	576
vlCDR1	KSSQSLLNSRNRKNYLA	577
vlCDR2	WASTRES	578
vlCDR3	KQSYYLWT	579

图63