



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116917332 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 20

(21) 申请号 202180093862.1

(22) 申请日 2021.12.17

(30) 优先权数据

63/127,408 2020.12.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2021/061972 2021.12.17

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/130342 EN 2022.06.23

(71) 申请人 安托拉诊疗公司

地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 S·安格斯 S·西杜 L·布莱泽

J·亚当斯 S·塞沙吉里

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

专利代理师 杜娟

(51) Int.Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

权利要求书10页 说明书111页

序列表(电子公布) 附图40页

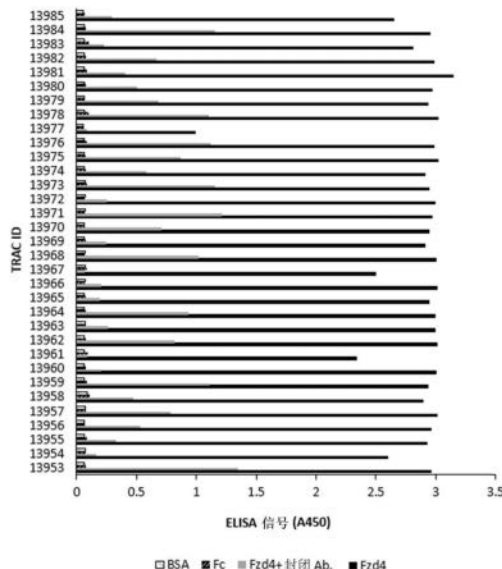
按照条约第19条修改的权利要求书10页

(54) 发明名称

四价FZD和WNT共受体结合抗体分子及其用途

(57) 摘要

本文描述了激活Wnt-β连环蛋白信号通路的四价结合抗体分子以及它们的使用方法,所述四价结合抗体分子包含在Fc结构域相对的末端的FZD受体结合结构域和LRP5/6共受体结合结构域。



1. 一种四价结合抗体分子,所述四价结合抗体分子包含:

- (a) 包含重链恒定结构域3(CH3)的Fc结构域或Fc结构域的片段;
- (b) 二价低密度脂蛋白受体相关蛋白5(LRP5)结合结构域;和
- (c) 二价卷曲蛋白(FZD)结合结构域;

其中,所述LRP5结合结构域与所述Fc结构域的一个末端连接,所述FZD结合结构域与所述Fc结构域的另一个末端连接;

其中,所述LRP5结合结构域包含结合LRP5的双抗体,所述FZD结合结构域包含结合FZD4的两个scFv或两个Fab。

2. 根据权利要求1所述的四价结合抗体分子,其中,

- (a) 所述LRP5结合结构域的双抗体与所述Fc结构域的N末端连接;以及
- (b) 所述FZD4结合结构域与所述Fc结构域的C末端连接。

3. 根据权利要求2所述的四价结合抗体分子,其中,

(a) 所述LRP5结合结构域的双抗体通过双抗体的VL或VH与所述Fc结构域的N末端连接;以及

(b) 所述FZD结合结构域包含与Fc的C末端融合的两个FZD结合Fab,其中,每个Fab通过与所述Fc结构域的CH3结构域连接的Fab的重链可变结构域或轻链可变结构域(VH或VL)与Fc结构域连接。

4. 一种四价结合抗体分子,所述四价结合抗体分子包含N末端LRP5结合双抗体和包含两个FZD4结合scFv的C末端结构域,所述四价结合抗体分子包含:

第一单体和第二单体的二聚体,其中,每个单体包含单链多肽,所述单链多肽从N末端到C末端包含:

(a) 第一肽,所述第一肽包含结合LRP5的第一重链可变结构域(VH)和第一轻链可变结构域(VL);

(b) 包含重链恒定结构域3(CH3)的Fc区或Fc区的片段;和

(c) 第二肽,所述第二肽包含结合FZD4的第二VL和第二VH;以及

第一轻链单体和第二轻链单体,每个轻链单体从N末端到C末端包含与轻链恒定结构域1(CL1结构域)连接的结合FZD4的VL;

其中,第一单体和第二单体通过Fc区或Fc区的片段二聚化,每个单体的第一VH和VL与另一个单体的第一VH和VL配对,形成结合LRP5的双抗体,并且每个单体的第二VL和VH配对形成结合FZD4的scFv;并且

其中,LRP5结合双抗体形成四价结合抗体分子的N末端LRP5结合结构域,两个FZD4结合scFv形成四价结合抗体分子的C末端FZD结合结构域。

5. 根据权利要求1所述的四价结合抗体分子,其中,所述FZD结合结构域与所述Fc结构域的N末端连接,所述LRP5结合结构域与所述Fc结构域的C末端连接。

6. 根据权利要求5所述的四价结合抗体分子,其中,

(a) 所述FZD结合结构域包含结合FZD4的两个Fab,其中,每个Fab通过与所述Fc结构域的CH2结构域连接的Fab的重链可变结构域或轻链可变结构域(VH或VL)与所述Fc结构域的N末端连接;以及

(b) 所述LRP5结合结构域包含结合LRP5的双抗体或两个scFv,其中,所述双抗体或两个

scFv通过与所述Fc结构域的CH3连接的双抗体或scFv的VL或VH与Fc结构域的C末端连接。

7. 一种四价结合抗体分子,所述四价结合抗体分子包含:包含重链恒定结构域3(CH3)的Fc结构域或Fc结构域的片段、包含两个FZD4结合Fab的N末端FZD4结合结构域和包含LRP5结合双抗体的C末端LRP5结合结构域,所述四价结合抗体分子包含:

(a) 第一重链单体和第二重链单体,其中,每个重链单体包含单链多肽,所述单链多肽从N末端到C末端包含:

(i) 结合FZD4的重链可变结构域(VH),其连接至如下(ii);

(ii) 重链恒定区结构域1(CH1结构域),其连接至如下(iii);

(iii) Fc区的CH2结构域,其连接至如下(iv);

(iv) 包含结合LRP5共受体的VH的肽,所述结合LRP5共受体的VH与结合LRP5共受体的轻链可变结构域(VL)连接;以及

(b) 第一轻链单体和第二轻链单体,每个轻链单体从N末端到C末端包含结合FZD4的VL,所述结合FZD4的VL与轻链恒定结构域1(CL1结构域)连接;

其中,第一重链单体和第二重链单体通过它们的Fc区或Fc区的片段二聚化;

其中,结合LRP5的VH和VL之间的接头的长度促进第一重链单体的VH和VL与第二重链单体的VL和VH配对,从而形成LRP5共受体结合双抗体,FZD结合Fab通过如下形成:每个重链单体与轻链单体配对使得每个重链单体中的结合FZD4的VH和CH1与轻链单体中的结合FZD4的VL和CL1配对;并且

其中,Fab在Fc结构域的N末端形成FZD4结合结构域,双抗体在Fc结构域的C末端形成LRP5共受体结合结构域。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述LRP5结合双抗体是与LRP5共受体胞外结构域内的两个表位结合的二价双特异性LRP5结合结构域。

9. 根据权利要求8所述的四价结合抗体分子,其中,所述LRP5结合结构域与LRP5共受体的Wnt1表位和Wnt3表位相互作用。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述FZD结合结构域是单特异性的。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,

所述LRP5结合结构域的双抗体结合LRP5,所述LRP5结合结构域的双抗体包含表3或表6A中的序列中所示的抗体的重链互补决定区CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3以及轻链互补决定区CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc结构域或Fc结构域的片段通过Fc区或Fc区的片段的杵臼构造二聚化。

13. 根据权利要求12所述的四价结合抗体分子,其中,根据EU编号,所述第一重链单体的Fc区包含突变T366S、L368A和Y407V,所述第二重链单体的Fc区包含突变T366W。

14. 根据权利要求13所述的四价结合抗体分子,其中,根据EU编号,所述第一重链单体的Fc区还包含突变S354I和E357L,所述第二重链单体的Fc区还包含突变Q347M、Y349F、T350D和L368M。

15. 根据权利要求13所述的四价结合抗体分子,其中,在第一重链单体和第二重链单体的Fc区之间引入另外的二硫键;优选地,根据EU编号,第一重链单体包含突变Y349C并且第

二重链单体包含突变S354C。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc结构域缺乏一种以上效应子功能。

17. 根据权利要求16所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc区具有因根据EU编号的氨基酸突变N297G(NG)和/或D265A(DA)变体而改变它们的效应子功能的突变。

18. 根据权利要求16所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc区具有因根据EU编号的氨基酸突变L234A、L235A和/或P331S而改变它们的效应子功能的突变。

19. 根据权利要求18所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc区具有因氨基酸突变L234A和L235A(LALA)而改变它们的效应子功能的突变。

20. 根据权利要求19所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc区具有因氨基酸突变L234A、L235A和P331S(LALAPS)而改变它们的效应子功能的突变。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述LRP5结合结构域和FZD结合结构域各自通过接头与所述Fc结构域连接。

22. 根据权利要求21所述的四价结合抗体分子,其中,所述接头包含1至100个、1至50个、1至30个、1至25个、1至10个、1至6个氨基酸、1至5个氨基酸或2至4个氨基酸。

23. 根据权利要求21或22所述的四价结合抗体分子,其中,形成LRP5共受体结合结构域的双抗体通过接头GGGSGGGGSEPKSSDKTHT(SEQ ID NO:892)与Fc结构域融合。

24. 根据权利要求21至23中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述FZD4结合Fab通过接头GGGSGGGSGGGSGGSTG(SEQ ID NO:891)与Fc区融合。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,结合LRP5共受体的VH通过短接头GGGGS(SEQ ID NO:886)与结合LRP5共受体的VL连接。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述FZD4结合结构域包含结合FZD4的两个Fab。

27. 根据权利要求26所述的四价结合抗体分子,其中,所述FZD4结合Fab包含表1、表2或表6中的序列中所示的抗体的轻链互补决定区CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3以及重链CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

28. 根据权利要求1至4和8至27中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述四价结合抗体分子包含:

(a) 第一重链单体和第二重链单体的二聚体,每个单体包含单链多肽,所述单链多肽从N末端到C末端包含:

- (1) 包含结合LRP5的重链可变结构域(VH)和结合LRP5的轻链可变结构域(VL)的肽,
- (2) 包含CH3的Fc区或Fc区的片段,
- (3) 结合FZD4的VH,以及
- (4) 重链恒定结构域1(CH1),

其中:

(5) 结合LRP5的VH包含表3或表6中的序列中所示的抗体的重链CDR(CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3),

(b) 结合LRP5的VL包含表3或表6中的序列中所示的抗体的轻链CDR(CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),

(c) 结合FZD4的VH包含表1、表2或表6中的序列中所示的抗体的重链CDR (CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3);以及

(d) 第三轻链单体和第四轻链单体,所述第三轻链单体和第四轻链单体各自包含结合FZD4的VL和轻链恒定结构域1 (CL1),所述结合FZD4的VL包含表1、表2或表6中的序列中所示的抗体的轻链CDR (CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),

其中,第一重链单体和第二重链单体通过它们的Fc区二聚化,第一单体的结合LRP5的VL和VH与第二单体的结合LRP5的VH和VL配对形成结合LRP5的二价双抗体,并且

第三轻链单体和第四轻链单体的CL1和结合FZD4的VL与第一重链单体和第二重链单体的CH1和结合FZD4的VH配对形成结合FZD4的两个Fab,其中,双抗体形成N末端二价LRP5结合结构域,两个Fab形成C末端二价FZD4结合结构域。

29. 根据权利要求5至7中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述四价结合抗体分子包含:

(a) 第一重链单体和第二重链单体的二聚体,每个单体包含单链多肽,所述单链多肽从N末端到C末端包含:

- (1) 结合FZD4的VH,
- (2) 包含CH3的Fc区或Fc区的片段,
- (3) 包含结合LRP5的VH和结合LRP5的VL的肽,以及
- (4) 重链恒定结构域1 (CH1),

其中:

(5) 结合LRP5的VH包含表3或表6中的序列中所示的抗体的重链CDR (CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3),

(b) 结合LRP5的VL包含表3或表6中的序列中所示的抗体的轻链CDR (CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),

(c) 结合FZD4的VH包含表1、表2或表6中的序列中所示的抗体的重链CDR (CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3);以及

(d) 第三轻链单体和第四轻链单体,所述第三轻链单体和第四轻链单体各自从N末端至C末端包含结合FZD4的VL和轻链恒定结构域1 (CL1),所述结合FZD4的VL包含表1、表2或表6中的序列中所示的抗体的轻链CDR (CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),

其中,第一重链单体和第二重链单体通过它们的Fc区二聚化,第一单体的结合LRP5的VL和VH与第二单体的结合LRP5的VH和VL配对形成结合LRP5的二价双抗体,并且

第三轻链单体和第四轻链单体的CL1和结合FZD4的VL与第一重链单体和第二重链单体的CH1和结合FZD4的VH配对形成结合FZD4的两个Fab,其中,双抗体形成C末端二价LRP5结合结构域,两个Fab形成N末端二价FZD4结合结构域。

30. 根据权利要求28或29所述的四价结合抗体分子,其中,所述LRP5结合双抗体是双特异性的,其中:

第一重链单体的结合LRP5的VH的CDR和第二重链单体的结合LRP5的VH的CDR不相同,以及

第一重链单体的结合LRP5的VL的CDR和第二重链单体的结合LRP5的VL的CDR不相同。

31. 根据权利要求30所述的四价结合抗体分子,其中:

在所述第一重链单体中，

(a) 结合LRP5的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含FSSSSI (SEQ ID NO:528) 和SISSSYGYTY (SEQ ID NO:553)，或者，结合LRP5的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含LSYYM (SEQ ID NO:527) 和SIYSSYGYTY (SEQ ID NO:552)，并且

(b) 结合LRP5的VL的CDR-L2和CDR-L3分别包含SASDLYS (SEQ ID NO:491) 和YAGAGLI (SEQ ID NO:510)，或者，结合LRP5的VL的CDR-L2和CDR-L3分别包含SASSLYS (SEQ ID NO:2) 和SSYSLI (SEQ ID NO:130)；以及

在所述第二重链单体中，

(c) 结合LRP5的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含FTAYAM (SEQ ID NO:536) 和SIYPSGGYTA (SEQ ID NO:566)，或者，结合LRP5的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含FSSSSI (SEQ ID NO:528) 和SISSSYGYTY (SEQ ID NO:553)，并且

(d) 结合LRP5的VL的CDR-L2和CDR-L3分别包含SASSLYS (SEQ ID NO:2) 和YWAYYSPI，或者，结合LRP5的VL的CDR-L2和CDR-L3分别包含SASSLYS (SEQ ID NO:2) 和ASYAPI。

32. 根据权利要求28至31中任一项所述的四价结合抗体分子，其中，在所述第一重链单体和第二重链单体中，结合FZD4的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含LSSYSM (SEQ ID NO:24) 和YISSYGYTY (SEQ ID NO:51)，或者，结合FZD4的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含LSSYSM (SEQ ID NO:24) 和YISSYDSITD (SEQ ID NO:61)。

33. 根据权利要求28至32中任一项所述的四价结合抗体分子，其中，在所述第三轻链单体和第四轻链单体中，结合FZD4的VL的CDR-L1和CDR-L2分别包含SVSSA (SEQ ID NO:1) 和SASSLYS (SEQ ID NO:2)，结合FZD4的VL的CDR-L3包含WYYAPI (SEQ ID NO:3) 或WYNAPI (SEQ ID NO:12)。

34. 根据权利要求28、29、30、32和33中任一项所述的四价结合抗体分子，所述四价结合抗体分子包含二价双特异性LRP5结合结构域，其中：

(a) 在所述第一重链单体中，

结合LRP-5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:586的CDR-H3，结合LRP-5的VL包含表6A的ANT16-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:491的CDR-L2和SEQ ID NO:510的CDR-L3，或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:527的CDR-H1、SEQ ID NO:552的CDR-H2和SEQ ID NO:584的CDR-H3，结合LRP5的VL包含表6A的ANT18-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:130的CDR-L3，或者

结合LRP-5的VH包含SEQ ID NO:527的CDR-H1、SEQ ID NO:552的CDR-H2和SEQ ID NO:584的CDR-H3，结合LRP-5的VL包含表6A的ANT20-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:491的CDR-L2和SEQ ID NO:510的CDR-L3，或者

结合LRP-5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:586的CDR-H3，结合LRP-5的VL包含表6A的ANT21-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:130的CDR-L3，或者

结合LRP-5的VH包含SEQ ID NO:527的CDR-H1、SEQ ID NO:552的CDR-H2和SEQ ID NO:584的CDR-H3，结合LRP-5的VL包含表6A的ANT36-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:130的CDR-L3，或者

结合LRP-5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:586的CDR-H3,结合LRP-5的VL包含表6A的ANT39-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:491的CDR-L2和SEQ ID NO:510的CDR-L3,

以及

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT16-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT18-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT20-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT21-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT36-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:61的CDR-H2和SEQ ID NO:90的CDR-H3,或者

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT39-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:61的CDR-H2和SEQ ID NO:90的CDR-H3,

其中,FZD CDR-L1和CDR-L2分别为SVSSA(SEQ ID NO:1)和SASSLYS(SEQ ID NO:2);以及

(b)在第二单体中,

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:536的CDR-H1、SEQ ID NO:566的CDR-H2和SEQ ID NO:603的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT16-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:493的CDR-L3,或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:585的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT18-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:492的CDR-L3,或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:536的CDR-H1、SEQ ID NO:566的CDR-H2和SEQ ID NO:603的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT20-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:492的CDR-L3,或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:585的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT21-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:493的CDR-L3,或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:585的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT36-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:492的CDR-L3,或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:536的CDR-H1、SEQ ID NO:566的CDR-H2和SEQ ID NO:603的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT39-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:493的CDR-L3,

以及

结合FZD4的VH包含:

表6B的ANT16杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

表6B的ANT18杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

表6B的ANT20杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

表6B的ANT21杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

表6B的ANT36杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:61的CDR-H2和SEQ ID NO:90的CDR-H3,或者

表6B的ANT39杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:61的CDR-H2和SEQ ID NO:90的CDR-H3;

以及

(c) 在第三单体和第四单体中的每一个中,

VL包含表6B的ANT16-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:3的CDR-L3,或者

VL包含表6B的ANT18-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:3的CDR-L3,或者

VL包含表6B的ANT20-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:3的CDR-L3,或者

VL包含表6B的ANT21-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:3的CDR-L3,或者

VL包含表6B的ANT36-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:12的CDR-L3,或者

VL包含表6B的ANT39-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:12的CDR-L3,

其中,FZD4 Fab的CDR-L1包含SVSSA(SEQ ID NO:1),FZD4 Fab的CDR-L2包含SASSLYS(SEQ ID NO:2)。

35. 根据权利要求1至34中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述四价结合抗体分子不包含如下FZD结合结构域:所述FZD结合结构域与包含LRP6结合抗体2542和/或抗体2539的CDR的Wnt共受体结合结构域组合,并且包含FZD结合抗体5044的CDR。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述四价结合抗体分子包含:

(a) 包含SEQ ID NO:898的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链、包含SEQ ID NO:897的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链以及包含SEQ ID NO:899的轻链构建体的氨基酸序列的轻链,其中,CDR的氨基酸序列为ANT16的CDR的氨基酸序列;或者

(b) 包含SEQ ID NO:901的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链、包含SEQ ID NO:900的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链以及包含SEQ ID NO:902的轻链构建体的氨基酸序列的轻链,其中,CDR的氨基酸序列为ANT18的CDR的氨基酸序列;或者

(c) 包含SEQ ID NO:904的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链、包含SEQ ID NO:903的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链以及包含SEQ ID NO:902的轻链构建体的氨基酸序列的轻链,其中,CDR的氨基酸序列为ANT20的CDR的氨基酸序列;或者

(d) 包含SEQ ID NO:906的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链、包含SEQ ID NO:905的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链以及包含SEQ ID NO:902的轻链构建体的氨基酸序列的轻链,其中,CDR的氨基酸序列为ANT21的CDR的氨基酸序列;或者

(e) 包含SEQ ID NO:908的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链、包含SEQ ID NO:907的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链以及包含SEQ ID NO:909的轻链构建体的氨基酸序列的轻链,其中,CDR的氨基酸序列为ANT39的CDR的氨基酸序列;或者

(f) 包含选自如下的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链:SEQ ID NO:921、SEQ ID NO:922、SEQ ID NO:923、SEQ ID NO:924、SEQ ID NO:925、SEQ ID NO:926、SEQ ID NO:927和SEQ ID NO:928;包含选自如下的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链:SEQ ID NO:929、SEQ ID NO:930、SEQ ID NO:931、SEQ ID NO:932、SEQ ID NO:933、SEQ ID NO:934、SEQ ID NO:935和SEQ ID NO:936;以及包含选自SEQ ID NO:909和SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链。

37. 根据权利要求1至35中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述四价结合抗体分子包含:

a) 包含SEQ ID NO:921或SEQ ID NO:925的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:929或SEQ ID NO:933的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

b) 包含SEQ ID NO:922或SEQ ID NO:926的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:930或SEQ ID NO:934的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

c) 包含SEQ ID NO:923或SEQ ID NO:927的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:931或SEQ ID NO:935的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

d) 包含SEQ ID NO:924或SEQ ID NO:928的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:932或SEQ ID NO:936的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

e) 包含SEQ ID NO:908或SEQ ID NO:940的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:944或SEQ ID NO:948的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

f) 包含SEQ ID NO:937或SEQ ID NO:941的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:945或SEQ ID NO:949的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

g) 包含SEQ ID NO:938或SEQ ID NO:942的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:946或SEQ ID NO:950的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

h) 包含SEQ ID NO:939或SEQ ID NO:943的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:947或SEQ ID NO:951的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链。

38. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子和药学上可接受的媒介物。

39. 一种用于促进组织中的内皮细胞屏障功能的方法,所述方法包括向组织施用有效量的权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中,所述组织为脑组织、肾组织或眼组织。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中,所述四价结合抗体分子通过玻璃体内注射施用至眼组织。

42. 一种在有需要的受试者中增加视网膜或脑内皮细胞屏障功能、降低内皮细胞通透性、增强或恢复血视网膜屏障和血脑屏障维持的方法,所述方法包括使有需要的受试者中具有FZD4受体和LRP5的内皮细胞与有效量的权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子接触。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述四价结合抗体分子通过注射、局部或口服施用于有需要的受试者。

44. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述四价结合抗体分子通过皮下、静脉内、腹膜内、鞘内、玻璃体内或眼内施用。

45. 作为药物应用的权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子或权利要求38所述的药物组合物。

46. 根据权利要求45所述的四价结合抗体分子或药物组合物在治疗或预防病症或病况中的应用,所述病症或病况的特征在于视网膜或脑血管生成缺陷,和/或所述病症或病况的特征在于内皮细胞屏障功能降低和/或血管渗漏。

47. 一种治疗或预防病症或病况的方法,所述病症或病况的特征在于视网膜或脑血管生成缺陷和/或内皮细胞屏障功能降低和/或血管渗漏,所述方法包括向有需要的人施用治疗有效量的权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子或权利要求38所述的药物组合物。

48. 权利要求1至37所述的四价结合抗体分子或权利要求38所述的药物组合物在制备用于治疗或预防病症或病况的药物中的应用,所述病症或病况的特征在于视网膜或脑血管生成缺陷和/或内皮细胞屏障功能降低和/或血管渗漏。

49. 用于权利要求46至48中任一项所述的应用、方法或应用的四价结合抗体分子或药物组合物,其中,所述病症选自:糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、Coats病、FEVR、诺里病、黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、儿童玻璃体视网膜病、阿尔茨海默氏病、癫痫、多发性硬化症、中风和局部缺血。

50. 根据权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子或根据权利要求37所述的药物组合物,所述四价结合抗体分子或药物组合物用于治疗或预防眼部病症,例如视网膜或黄斑疾病,例如选自糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、Coats病、FEVR、诺里病、黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿和儿童玻璃体视网膜病,或者用于治疗或预防选自如下的病症:阿尔茨海默氏病、癫痫、多发性硬化症、中风和局部缺血。

51. 一种治疗或预防眼部病症或者用于治疗或预防选自如下病症的方法:阿尔茨海默氏病、癫痫、多发性硬化症、中风和局部缺血,所述眼部病症为例如视网膜或黄斑疾病,例如选自糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、Coats病、FEVR、诺里病、黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿和儿童玻璃体视网膜病,所述方法包括向有需要的人施用治疗有效量的权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子或权利要求38所述的药物组合物。

52. 权利要求1至36所述的四价结合抗体分子或权利要求38所述的药物组合物在制备药物中的应用,所述药物用于治疗或预防眼部病症,例如视网膜或黄斑疾病,例如选自糖尿

病性视网膜病、早产儿视网膜病、Coats病、FEVR、诺里病、黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿和儿童玻璃体视网膜病,或者用于治疗或预防选自如下的病症:阿尔茨海默氏病、癫痫、多发性硬化症、中风和局部缺血。

四价FZD和WNT共受体结合抗体分子及其用途

[0001] 序列表

[0002] 本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式通过电子方式提交,并通过引用将其整体并入。所述ASCII拷贝创建于2021年12月16日,名为117946_PD606W0_FINAL.txt,大小为989,432字节。

背景技术

[0003] Wnt信号通路对于胚胎发育和成体组织稳态至关重要。当细胞表面膜上的卷曲蛋白受体(FZD)与Wnt配体结合时,Wnt信号传导被启动。Wnt配体是调节各种细胞过程(例如增殖、分化、存活和迁移)的分泌的生长因子。

[0004] 人体中存在的19种Wnt配体与由10种卷曲蛋白细胞表面受体(FZD)和几种共受体之一组成的网络相互作用,所述几种共受体引导不同胞内信号传导分支的选择性参与(Wodarz, A. 和Nusse, R. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 59-88 (1998); Angers, S和Moon, R. T., transduction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10, 468-477 (2009))。FZD具有保守的结构特征(包括七个疏水性跨膜结构域和富含半胱氨酸的配体结合结构域)。已知FZD在三个不同的信号通路(称为Wnt平面细胞极性(PCP)通路、经典Wnt/ β -连环蛋白通路和Wnt/钙通路)中发挥作用。Wnt共受体也是指导上述胞内信号级联的差异性参与所必需的。例如,Wnt配体与卷曲蛋白受体和低密度脂蛋白受体相关蛋白5和6(LRP5/6)共受体家族的成员结合以激活Wnt/ β -连环蛋白通路,或与受体酪氨酸激酶样孤儿受体1和2(ROR1/2)(与受体酪氨酸激酶(RYK)或蛋白酪氨酸激酶7(PTK7)共受体相关)结合以激活替代性的不依赖 β -连环蛋白的信号通路。

[0005] Wnt配体对于控制组织干细胞的自我更新和调节许多祖细胞群具有普遍重要的作用,但Wnt蛋白的疏水性和敏感的三级结构使它们的生化纯化具有挑战性,并且使它们在体外和体内的使用效率低下。本文描述了激活Wnt信号通路的四价结合抗体分子和它们的应用方法。

发明内容

[0006] 本文描述了激活Wnt信号通路的四价结合抗体分子和它们的应用方法。四价结合抗体分子与FZD受体(例如卷曲蛋白类受体1(FZD1)、卷曲蛋白类受体2(FZD2)、卷曲蛋白类受体3(FZD3)、卷曲蛋白类受体4(FZD4)、卷曲蛋白类受体5(FZD5)、卷曲蛋白类受体6(FZD6)、卷曲蛋白类受体7(FZD7)、卷曲蛋白类受体8(FZD8)、卷曲蛋白类受体9(FZD9)或卷曲蛋白类受体10(FZD10))和Wnt共受体(例如LRP5或LRP6(LRP5/6))结合,从而激活Wnt信号通路。在一个实施方式中,四价结合抗体分子与FZD4受体和LRP5和/或LRP6结合并激活Wnt/ β -连环蛋白信号通路。本发明的四价结合抗体分子在本文中也被称为“FZD激动剂”、卷曲蛋白(Frizzled)和LRP5/6激动剂(Agonist)(FLAg),在一些实施方式中被称为“ANT”。

[0007] 四价结合抗体分子包含:由CH2和CH3结构域组成的Fc结构域或Fc结构域的包含CH3结构域的片段、与一种以上FZD受体(例如FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、

FZD8、FZD9和FZD10中的一种以上)相互作用的第一二价结合结构域,以及与WNT共受体(例如LRP5或LRP6)结合的第二二价结合结构域;其中,FZD结合结构域与Fc结构域的一个末端连接,共受体结合结构域与Fc结构域的另一末端连接。因此,FZD受体的结合结构域不与WNT共受体的结合结构域直接连接,而是它们被Fc结构域或Fc结构域的包含CH3结构域的片段隔开。

[0008] FZD激动剂的Fc结构域可以为具有或不具有效应子功能的免疫球蛋白的Fc结构域。免疫球蛋白可以为IgG(例如IgG₁)。在本发明的一个实施方式中,四价结合抗体分子包含含有Fc区的两个多肽,其通过每个多肽中Fc区的内在二聚化能力或通过Fc内的杵臼(knob-in-hole)构造二聚化。因此,Fc二聚体可以是异二聚体或同二聚体。通过杵臼构造使肽二聚化的方法描述于W02018/026942(发明人Van Dyk等)、“Carter P.(2001) J.Immunol.Methods 248,7-15”、“Ridgway等,(1996)Protein Eng.9,617-621”、“Merchant等,(1998)Nat.Biotechnol.16,677-681”,以及“Atwell等,(1997) J.Mol.Biol.270,26-35”,全部通过引用并入本文。

[0009] 在一个实施方式中,本文所述的FZD激动剂的每个结合结构域是二价的,每个结合结构域可以是单特异性的(具有针对FZD受体(例如FZD4)或Wnt共受体(例如LRP5/6)的相同表位的两个结合位点),或者可以是双特异性的(具有两个结合位点,每个位点结合FZD或Wnt共受体上的不同表位,例如,LRP5/6共受体内的Wnt1结合位点(LRP5/6的胞外结构域内的结构域E1-E2)和Wnt3结合位点(LRP5/6的胞外结构域内的结构域E3-E4))。在一个实施方式中,LRP5/6结合结构域结合LRP5上的Wnt3A位点(结构域E3-E4)和LRP6上的Wnt3A位点(结构域E3-E4)。

[0010] 在本发明的实施方式中,与FZD激动剂的Fc结构域连接的FZD结合结构域包含结合FZD(例如FZD4)的一个以上免疫球蛋白重链可变结构域(VH)片段和/或一个以上免疫球蛋白轻链可变结构域(VL)片段。在本发明的一个实施方式中,FZD结合结构域可以包含结合FZD上的相同或不同表位的Fab、双抗体(diabody)或单链可变片段(scFv)、单域抗体片段(例如V_HH)或它们的组合。

[0011] 在本发明的一个实施方式中,FZD结合结构域的VH和/或VL结合FZD4或FZD5,并包含表1、表2或表6的FZD4或FZD5结合抗体的轻链CDR和重链CDR,和/或包含与表1、表2或表6的FZD4抗体的CDR具有50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性、并且仍然保留与FZD4或FZD5受体的结合性的轻链CDR和重链CDR。例如,在本发明的一个实施方式中,FZD结合结构域可以包含第一重链(CDR-H1)、第二重链(CDR-H2)和/或第三重链(CDR-H3),以及第一轻链(CDR-L1)、第二轻链(CDR-L2)和/或第三轻链(CDR-L3),其中,结合FZD的VH可以包含SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:365或SEQ ID NO:893的CDR-H1,SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:462或SEQ ID NO:894的CDR-H2,和/或SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:484或SEQ ID NO:895的CDR-H3;结合FZD的VL可以包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:12的CDR-L1,SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:12的CDR-L2和/或SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:285或SEQ ID NO:896的CDR-L3。

[0012] 在本发明的一个实施方式中,与FZD激动剂的Fc结构域连接的共受体(LRP5/6)结合结构域包含结合Wnt共受体(例如LRP5和/或LRP6)的一个以上免疫球蛋白重链可变结构

域(VH)片段和/或一个以上免疫球蛋白轻链可变结构域(VL)片段。例如,在本发明的一个实施方式中,LRP结合结构域可以包含第一重链(CDR-H1)、第二重链(CDR-H2)和/或第三重链(CDR-H3),以及第一轻链(CDR-L1)、第二轻链(CDR-L2)和/或第三轻链(CDR-L3),其中,结合LRP的VH可以包含SEQ ID NO:527、SEQ ID NO:528、SEQ ID NO:536、SEQ ID NO:716或SEQ ID NO:720的CDR-H1,SEQ ID NO:552、SEQ ID NO:553或SEQ ID NO:566、SEQ ID NO:785或SEQ ID NO:791的CDR-H2,和/或SEQ ID NO:584、SEQ ID NO:585、SEQ ID NO:586或SEQ ID NO:603、SEQ ID NO:856或SEQ ID NO:862的CDR-H3;结合LRP的VL可以包含SEQ ID NO:1的CDR-L1,SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:491的CDR-L2和/或SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:492、SEQ ID NO:493、SEQ ID NO:510、SEQ ID NO:623或SEQ ID NO:665的CDR-L3。

[0013] 在本发明的一个实施方式中,Wnt共受体结合结构域是二价的并且可以包含双抗体,或者可以包含Fab、单链可变片段(scFv)或单域抗体片段(V_{H})或它们的组合,以用于结合共受体上的相同或不同的表位。在本发明的实施方式中,Wnt共受体结合结构域的VH和VL包含表3、表4或表6的LRP5和/或LRP6结合抗体的轻链CDR和/或重链CDR,或者包含与表3、表4或表6的LRP5和/或LRP6抗体的CDR具有50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性、并且仍然保留与LRP5和/或LRP6共受体的结合性的轻链CDR和/或重链CDR。

[0014] 在本发明的一个实施方式中,与本文所述的FZD激动剂的Fc结构域连接的Wnt共受体结合结构域包含由两个肽形成的双抗体,所述两个肽各自包含与轻链可变结构域(VL或VL结构域)连接的重链可变结构域(VH或VH结构域),其中,来自一个肽的VH和VL与另一个肽的VL和VH配对形成双抗体。在此构造中,结合结构域有两个结合Wnt共受体(例如LRP5或LRP6)的结合位点。双抗体可以是单特异性的(结合共受体上的相同位点),或者可以是双特异性的(bs)(结合共受体上的两个不同位点)。通过使用杵臼Fc构型,包含与Fc区连接的VH和VL的肽可以不相同,但仍将配对形成能够结合Wnt共受体(例如LRP5或LRP6)上两个不同位点的双特异性结合结构域。

[0015] 形成双抗体、 V_{H} 、scFv和Fab的肽可以来源于如下抗体(即“源抗体”):该抗体因其与期望靶标结合而被选择,所述双抗体、 V_{H} 、scFv和Fab形成结合结构域。对于FZD结合结构域,“FZD源抗体”可以为结合一种以上FZD受体(例如FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9和FZD10中的一种以上)并拮抗Wnt信号传导或抑制Wnt与给定FZD受体结合的抗体。或者,FZD源抗体可以为结合FZD受体而不拮抗Wnt信号传导或不抑制Wnt与FZD受体结合的抗体。同样,对于共受体结合结构域,“共受体源抗体”可以为结合Wnt共受体(例如LRP5/6)并拮抗Wnt信号传导或抑制Wnt与Wnt共受体结合的抗体。或者,共受体源抗体可以为结合共受体(例如LRP5/6)而不拮抗Wnt信号传导或不抑制Wnt与共受体结合的抗体。

[0016] 在本发明的一个实施方式中,FZD激动剂的FZD结合结构域可以以比与其他FZD(即FZD1、FZD2、FZD3、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9和FZD10)的亲和力(affinity)更高的亲和力特异性地结合特定的FZD(例如FZD4),或者可以是泛特异性的(与FZD受体家族的一个以上其他成员结合)。在一个实施方式中,FZD结合结构域以比与任何其他卷曲蛋白家族成员的结合高大于10倍的亲和力特异性地结合一种FZD。

[0017] 在本发明的一个实施方式中,FZD激动剂结合FZD4,即“FZD4激动剂”。FZD4激动剂的FZD4结合结构域可以特异性地结合FZD4(以比其他FZD更高的亲和力结合FZD4),或者可

以是泛特异性的(结合FZD4和FZD受体家族的一种以上其他成员,例如卷曲蛋白类受体1(FZD1)、卷曲蛋白类受体2(FZD2)、卷曲蛋白类受体3(FZD3)、卷曲蛋白类受体5(FZD5)、卷曲蛋白类受体6(FZD6)、卷曲蛋白类受体7(FZD7)、卷曲蛋白类受体8(FZD8)、卷曲蛋白类受体9(FZD9)或卷曲蛋白类受体10(FZD10))。在一个实施方式中,FZD结合结构域以比上述任何其他卷曲蛋白家族成员高大于10倍的亲和力特异性地结合FZD4。

[0018] 在本发明的一个实施方式中,FZD激动剂结合FZD5,即“FZD5激动剂”。FZD5激动剂的FZD5结合结构域可以特异性地结合FZD5(以比其他FZD更高的亲和力结合FZD5)或者可以是泛特异性的(结合FZD5和FZD受体家族的一种以上其他成员,例如FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9或FZD10)。在一个实施方式中,FZD结合结构域特以比上述任何其他卷曲蛋白家族成员高大于10倍的亲和力特异性地结合FZD5。

[0019] 在本发明的FZD激动剂的一个实施方式中,Wnt共受体结合结构域为二价单特异性LRP5/6共受体结合结构域,并结合LRP5和/或LRP6共受体上的单表位(例如结合Wnt1的LRP5和/或LRP6共受体的表位(LRP5或LRP6的E1-E2结构域)或结合Wnt3a的LRP5和/或LRP6共受体的表位(LRP5或LRP6的E3-E4结构域))。在本发明的一个实施方式中,共受体结合结构域是二价双特异性LRP5/6结合结构域,其结合LRP5和/或LRP6共受体胞外结构域内的两个表位,例如,共受体结合结构域与LRP5和/或LRP6共受体的Wnt1表位(E1-E2)和Wnt3表位(E3-E4)相互作用。在本发明的一个实施方式中,共受体结合结构域是二价双特异性结合结构域,其结合LRP5和LRP6的胞外结构域,例如,该结构域与LRP5共受体的Wnt1表位(E1-E2)和LRP6共受体的Wnt1表位(E1-E2)相互作用,或者,该结构域与LRP5共受体的Wnt3a表位(E3-E4)和LRP6共受体的Wnt3a表位(E3-E4)相互作用,或者,替代地,该结构域与LRP5共受体的Wnt1表位(E1-E2)和LRP6共受体的Wnt3a表位(E3-E4)相互作用,或反之亦然。

[0020] 图6中描绘了本文所述的四价结合抗体分子的各种形式。在一个特定形式双抗体-Fc-Fab中,LRP5/6结合双抗体与Fc结构域的N末端连接,两个Fab与Fc结构域的C末端连接,其中,Fab通过Fab重链可变结构域(VH)与Fc结构域的CH3连接。或者,Fab通过轻链可变区(VL)与Fc结构域的CH3连接。

[0021] 我们先前报道了多价结合分子,所述多价结合分子包含Fc结构域、FZD结合结构域和在Fc结构域的相对末端的Wnt共受体(LRP5/6)结合结构域,例如,具有与Fc结构域的一个末端连接的FZD4双抗体以及与该Fc结构域的另一末端连接的LRP5/6结合双抗体的分子,参见PCT/IB2019/051174(发明人Angers等)和PCT/IB2020/055463(发明人Angers等),两者均通过引用整体并入。

[0022] 据报道,Wnt- β 连环蛋白信号传导(特别是通过FZD4的激活)对于脉管系统发育和成体脉管系统稳态是重要的。更具体地,它对于血视网膜的屏障功能和血脑屏障(BRB和BBB)至关重要。FZD4信号传导中的缺陷可导致内皮细胞通透性缺陷,已知该通路内的基因突变会导致血管缺陷(例如诺里病(Norrie disease)、FEVR)。在血视网膜屏障处,胞外配体诺里蛋白(Norrin)主要激活FZD4-TSPAN12-LRP5复合物,以调节内皮细胞间相互作用、屏障功能和通透性(Wang等,(2012) *Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity*. *Cell*.151:1332-1344)。在血脑屏障处,分泌的Wnt7a/b生长因子主要激活FZD4-GPR124-LRP6受体复合物(Chang等,(2017), *GPR124 is essential for blood-brain barrier integrity in central nervous*

system disease.Nat.Med.23:450-460)。本文所述的FZD4激动剂,例如,具有LRP5/6双抗体结合结构域和由结合FZD4的两个Fab片段组成的FZD4结合结构域的构造,其中,结合结构域位于Fc结构域的相对的末端,产生特别稳定且同质的分子,该分子具有出乎意料高水平的在内皮细胞中的Wnt- β 连环蛋白信号通路激活,从而转化为增强的屏障功能和降低的血管通透性(图11)。实质上,本文所述的FZD4激动剂起到诺里蛋白和Wnt7a/b模拟分子的作用。

[0023] 本发明还包括使用本文所述的FZD激动剂的方法。本文描述的是使用本发明的四价结合抗体分子激活Wnt信号通路(例如Wnt/ β -连环蛋白信号通路)的方法,预期该方法促进细胞上FZD受体和Wnt共受体(例如,FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9和FZD10受体中的一种以上以及RP5和/或LRP6共受体)的接近,其中,FZD激动剂与FZD受体和LRP5和/或LPR6共受体的结合激活Wnt信号通路。

[0024] 视网膜屏障(BRB)的形成和视网膜血管生成需要由配体诺里蛋白(NDP[诺里蛋白])、受体FZD4、共受体LRP5和TSPAN12(四次跨膜蛋白12)诱导的 β 连环蛋白信号传导。因此,本发明的一个方面为通过用有效量的本发明的四价FZD4激动剂处理眼组织(例如视网膜组织)来促进和/或维持视网膜脉管系统屏障功能和血管生成的方法。

[0025] 此外,本发明的一个方面为通过用有效量的本文所述的四价FZD4激动剂处理BRB或BBB脉管系统来促进、恢复和/或维持BRB和BBB功能的方法。本发明的另一方面为通过向患有病症或病况的受试者施用有效量的本发明的FZD4激动剂来治疗该受试者的方法,所述病症或病况的特征在于视网膜或脑血管生成缺陷,所述视网膜或脑血管生成缺陷的特征在于内皮细胞屏障功能降低导致血管渗漏。本发明的另一方面为用于治疗或预防病症或病况的FZD4/LRP5四价结合抗体分子或药物组合物,所述病症或病况的特征在于视网膜或脑血管生成缺陷,和/或特征在于内皮细胞屏障功能降低和/或血管渗漏。本发明的另一方面为治疗或预防病症或病况的方法,所述病症或病况的特征在于视网膜或脑血管生成缺陷和/或内皮细胞屏障功能降低和/或血管渗漏,所述方法包括向有需要的人施用治疗有效量的本文所述的FZD4/LRP5四价结合抗体分子。本发明的另一方面是FZD4/LRP5四价结合抗体分子在制备用于治疗或预防病症或病况的药物中的应用,所述病症或病况的特征在于视网膜或脑血管生成缺陷和/或内皮细胞屏障功能降低和/或血管渗漏。此类病症或病况包括眼部疾病,包括但不限于视网膜或黄斑疾病。此类视网膜或黄斑疾病包括但不限于糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、Coats病、FEVR、诺里病、黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿和儿童玻璃体视网膜病。本发明的实施方式中包括的另外的病症或病况包括但不限于阿尔茨海默氏病、癫痫、多发性硬化症、局部缺血和中风。

[0026] 本发明的一个实施方式包括通过促进整个类器官的脉管系统网络的屏障功能来产生血管化的脑的类器官的方法,由此使用有效量的本文所述的四价FZD4激动剂模拟血脑屏障功能。

[0027] 此外,本发明的一个实施方式为通过向患有胃肠道病症的受试者施用有效量的本发明的药物组合物(例如包含FZD5激动剂的组合物)来治疗此类受试者的方法,所述受试者包括患有全部肠或部分肠的炎症(也称为炎症性肠病)的受试者。炎症性肠病的示例包括但不限于克罗恩病和溃疡性结肠炎。

[0028] 此外,本发明的一个实施方式为通过在有效量的本发明的四价结合抗体分子的存在下培养iPS或其他多能干细胞(PSC, pluripotent stem cell)来使这些细胞向各种谱系

定向分化的方法。

[0029] 本文还描述了用于制备本发明的四价结合抗体分子的方法。

[0030] 本发明的模块化方面允许在Fc结构域的相对的末端上混合和匹配来源于FZD结合抗体和LRP5/6结合抗体的结合结构域,以产生可以结合FZD-LRP5/6共受体复合物来选择性激活Wnt信号传导的四价结合抗体分子。本文所述的用于激活Wnt信号通路的四价结合抗体分子的模块性和有效性与现有技术中描述的Wnt替代物形成对比,所述Wnt替代物由单价FZD和Wnt共受体结合配体组成、或由结合配体不连接到Fc结构域的相对两端的FZD和Wnt共受体结合配体组成。

附图说明

[0031] 图1A和图1B:单点ELISA。从已知FZD4结合抗体5044的亲合力成熟文库中分离的FZD4结合抗体结合与它们的亲本抗体竞争的FZD4位点(图1A),从已知FZD4结合抗体5027的亲合力成熟文库中分离的FZD4结合抗体结合与它们的亲本抗体竞争的FZD4位点(图1B)。通过添加1M H_3PO_4 来终止反应,并在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度;白色=BSA;黑白条纹=Fc;灰色=FZD4+封闭抗体;黑色=FZD4。

[0032] 图2:FZD4抗体的表位作图。FZD4与5027和5044具有重叠的表位。泛FZD结合剂5016为阳性对照,其显示除“FZD4_Swap10”之外的抗原具有功能。FZD4特异性抗体5027和5044均不能结合“FZD4 Swap 7”,表明这些分子与FZD ECD的此区域结合。

[0033] 图3A:尺寸排阻色谱(SEC)。FZD4抗体与曲妥珠单抗(Trastuzumab)相比的分析。使用280nm处的吸光度监测蛋白质洗脱。

[0034] 图3B:ELISA特异性。针对FZD4以及针对FZD1和FZD10(与FZD4最密切相关的两个FZD家族成员)确定的FZD4抗体的测量。通过添加1M H_3PO_4 来终止反应,并在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度。

[0035] 图4:靶向LRP5的合成抗体的噬菌体克隆ELISA。结果表明合成抗体与LRP5结合。在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度;灰色=BSA;浅灰色=his-Fc;深灰色=LRP5。

[0036] 图5A和5B:靶向LRP6的合成抗体的噬菌体克隆ELISA。结果表明合成抗体与LRP6结合。在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度;黑色=BSA;灰色=Fc;浅灰色=LRP6-Fc。

[0037] 图6:四价结合抗体分子的形式。显示的是:双抗体-Fc-双抗体形式,其具有在Fc结构域的N末端的单特异性FZD结合双抗体以及在Fc结构域的C末端的双特异性LRP5/6结合双抗体;双抗体-Fc-scFv形式,其具有N末端的双特异性LRP5/6结合双抗体和C末端的两个FZD结合scFv;IgG-双抗体形式,其具有形成N末端结合结构域的两个FZD结合Fab和形成C末端结合结构域的双特异性LRP5/6结合双抗体;IgG-scFv形式,其具有形成N末端结合结构域的两个FZD结合Fab和形成C末端结合结构域的两个LRP5/6结合scFv;以及双抗体-Fc-Fab形式,其具有形成N末端结合结构域的双特异性LRP5/6结合双抗体和形成C末端结合结构域的两个FZD结合Fab,其中,所述Fab通过Fab重链可变区与Fc结构域的CH3连接。特别考虑的是,在替代性的双抗体-Fc-Fab形式中,Fab通过Fab轻链可变区与Fc结构域的CH3连接。四价分子各个结构域(VL、VH、CH1、CH2、CH3、CL1和Fc)通过接头(例如肽接头)连接。Fc结构域由

白 (Ho1e) 构建体Fc区和杵 (Knob) 构建体Fc区的CH2和CH3结构域二聚化形成。四价分子的各个结构域 (VL、VH、CH1、CH2、CH3、CL1和Fc) 通过接头 (例如肽接头) 连接。

[0038] 图7:具有双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂。双抗体-Fc-Fab形式,其具有形成二价双特异性N末端LRP5结合结构域的双特异性LRP5结合双抗体、形成二价单特异性C末端FZD4结合结构域的两个FZD4结合Fab以及Fc区,所述Fc区具有因氨基酸突变 (例如N297G (NG) 和D265A (DANG) 变体) 而减弱的效应子功能。四价分子的各个结构域 (VL、VH、CH1、CH2、CH3、CL1和Fc) 通过接头 (例如肽接头) 连接。

[0039] 图8:具有双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂 (ANT) 以高选择性结合FZD4。图8A描绘了通过生物膜干涉测量法 (BLI) 测定的FZD4激动剂针对10个FZD中的9个FZD的重组胞外结构域 (ECD) 的表观选择性。图8B表明FZD激动剂不识别常见的非特异性抗原。测试FZD激动剂在100nM下与一组抗原的结合,如“Mouquet等, Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heteroligation. *Nature*. 2010年9月; 467 (7315): 591-595. DOI:10.1038/nature09385, PMC3699875”和“Jain T. 等, Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017年1月; 114 (5): 944-949. DOI:10.1073/pnas.1616408114, PMC5293111”中所述。

[0040] 图9:具有双抗体-Fc-Fab形式 (具有双特异性LRP结合双抗体和两个FZD4结合Fab) 的FZD4激动剂 (ANT) 在溶液中是稳定的、单体的。图9A呈现了FZD激动剂与曲妥珠单抗IgG相比的分析性SEC分析结果。图9B呈现了差示扫描荧光测定的结果,该结果表明双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂具有与曲妥珠单抗相似的热变性曲线,而第一代双抗体-Fc-双抗体FZD4形式 (CM0199) 不够理想。

[0041] 图10:具有双抗体-Fc-Fab形式的FZD4-LRP5特异性FZD4激动剂 (ANT)。该形式的FZD4-LRP5特异性FZD4激动剂刺激小鼠内皮细胞系 (bEND3.1) 中的FZD4,并以浓度依赖的方式导致Axin2 (β 连环蛋白靶基因) 基因转录的增加。

[0042] 图11A和图11B描绘了具有双抗体-fc-双抗体形式的FZD4-LRP5特异性激动剂以抗VEGF诱导的通透性的机制促进内皮细胞的屏障功能。图11A描绘了bEnd.3细胞连接处的ZO-1/CLDN3和ZO-1/CLDN5免疫荧光定位。在存在或不存在VEGF (100ng/ml) 的情况下,用或不用30nM的F4L5.13 (又名CM0199) 和诺里蛋白 (NDP) 处理bEnd.3细胞1小时。从顶行开始向下:NT (未处理) 显示通透性没有变化;VEGF处理bEND3.1细胞导致连接解体,如CLDN3、CLDN5和ZO-1的质膜染色丧失所示;用VEGF和FZD4激动剂CM0199 (F4L5.13) 共同处理细胞导致几乎完全挽救了单独的VEGF的效果;图11A的最后一行显示用VEGF和NDP共同处理细胞类似地导致几乎完全挽救了单独的VEGF的效果,这表明本文所述的FZD4激动剂起到诺里蛋白和Wnt7a/b模拟分子的作用。图11B显示了量化FITC-葡聚糖穿过单层bEnd.3细胞的跨内皮通透性测定。在将bEnd.3细胞暴露于100ng/ml VEGF、30nM F4L5.13或它们两者1h之后,或者在用VEGF预处理1h之后再用F4L5.13处理1h后,测量FITC-葡聚糖的穿过。数据以平均值 \pm SD呈现, $n=5$ 个独立实验。显著性通过Bonferroni多重比较检验的单向方差分析来计算 (与VEGF处理相比, $*P<0.05$)。

[0043] 图12:单点ELISA。FZD5抗体在与从亲和力成熟文库中鉴定的2919重叠的位点结合FZD5的胞外结构域。新FZD5抗体在与从亲和力成熟文库中鉴定的2919重叠的位点结合

FZD5。在存在或不存在饱和浓度的2919IgG的情况下,单点ELISA在用人FZD5蛋白的ECD包被的96孔Maxisorp板上进行。在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度;白色带黑色条纹=BSA;黑色带白色条纹=Fc;灰色=FZD5+封闭抗体;黑色=FZD5。

[0044] 图13:单点ELISA。显示了来自2928亲和力成熟文库的新FZD5抗体选择性结合FZD5。来自2928亲和力成熟文库的新FZD5抗体选择性结合FZD5。单点ELISA在用人FZD2、FZD5或FZD8蛋白的ECD包被的96孔Maxisorp板上进行。在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度;黑色带白色条纹=Fc;白色带黑色条纹=FZD2;灰色=FZD8;黑色=FZD5。

[0045] 图14:荧光素酶测定。泛FZD/LRP6 ANT9和FZD5特异性/LRP6 ANT59激活细胞中的Wnt信号传导。用不同浓度的FZD激动剂或非靶向对照分子(CM0156)处理TOPFLASH细胞过夜,使用标准荧光素酶测定法测量TCF/LEF驱动的荧光素酶表达。这两种分子都能够以浓度响应的方式激活FZD介导的荧光素酶表达。ANT9能够结合10种FZD受体亚型中的7种,产生比FZD5特异性ANT59更高的最大激活信号。

[0046] 图15:初始形式ANT39和反转形式ANT39i。具有双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂ANT39和具有IgG-双抗体形式(具有形成N末端结合结构域的两个FZD结合Fab和形成C末端结合结构域的双特异性LRP5/6结合双抗体)和Fc结构域的FZD4激动剂ANT39i。ANT39i的FZD结合结构域包含与Fc结构域的N末端连接的两个Fab片段,每个Fab结合FZD。LRP5/6共受体结合结构域与Fc结构域的C末端连接,并由结合共受体上两个不同位点(例如LRP5/6上的Wnt1位点(E1-E2)和Wnt3位点(E3-E4))的双抗体组成。Fab可以特异性地针对特定的FZD(例如FZD4)或者可以泛特异性地结合超过一种FZD(例如结合FZD4和一种以上其他FZD)。Fc区可以具有因氨基酸突变(例如N297G(NG)和D265A(DANG)变体)而减弱的效应子功能。四价分子的各个结构域(VL、VH、CH1、CH2、CH3、CL1和Fc)通过接头例如肽接头连接。

[0047] 图16A描绘了具有双抗体-Fc-Fab形式(具有形成二价双特异性N末端LRP5结合结构域的双特异性LRP5结合双抗体和形成二价单特异性C末端FZD4结合结构域的两个FZD4结合Fab)的FZD4激动剂ANT39,其中,Fc区具有因氨基酸突变(N297G和D265A(DANG)变体或L234A、L235A、P331S(LALAPS)变体)而减弱的效应子功能,Fc区还包含杵臼异二聚化变体Merrimack、Merchant或Merchant S:S(如W02018/026942A1中所述的Merrimack CH3突变,如“Merchant A.M.等,Nature Biotechnology,1998,第16卷,第677-681页”中所述的Merchant CH3突变)。图16A按出现顺序分别公开了SEQ ID NO:886、892、891、886、892、891、886、892、891、886、892和891。图16B描绘了FZD4激动剂ANT39i,其具有IgG-Fc-双抗体形式(具有连接到Fc结构域的N末端的两个Fab片段(每个Fab结合FZD)和连接到Fc结构域的C末端的LRP5/6共受体结合结构域(由结合共受体上的两个不同位点的双抗体组成))和Fc区,Fc区具有由于DANG或LALAPS变体以及Merrimack、Merchant或Merchant S:S异二聚化变体而减弱的效应子功能。图16B按出现顺序分别公开了SEQ ID NO:891、886、891、886、891、886、891和886。

[0048] 图17:ANT39变体的热稳定性。图17呈现了差示扫描荧光测定实验的结果,该结果表明FZD4激动剂ANT39的LALA变体(ANT39 LALA)相对于亲本ANT39(在Fc中含有DANG突变)具有改善的热稳定性。具体地,LALA变体显示出改善的热稳定性,其更接近含有与ANT相同的杵/臼Fc突变的曲妥珠单抗变体的曲线。

[0049] 图18:具有双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂ANT42。FZD4激动剂ANT42具有形成二价双特异性N末端LRP5结合结构域的双特异性LRP5结合双抗体和形成二价单特异性C末端FZD4结合结构域的两个FZD4结合Fab,其中,Fc区具有因氨基酸突变(N297G和D265A(DANG)变体或L234A、L235A、P331S(LALAPS)变体)而减弱的效应子功能,Fc区还包含杵臼异二聚化变体Merrimack、Merchant或Merchant S:S(如W02018/026942A1中所述的Merrimack CH3突变,如“Merchant A.M.等,Nature Biotechnology,1998,第16卷,第677-681页”中所述的Merchant CH3突变)。FZD4激动剂ANT42i,其具有IgG-Fc-双抗体形式(具有与Fc结构域的N末端连接的两个Fab片段(每个Fab结合FZD)以及与Fc结构域的C末端连接的LRP5/6共受体结合结构域(由结合共受体上两个不同位点的双抗体组成))和Fc区,所述Fc区具有由于DANG或LALAPS变体以及Merrimack、Merchant或Merchant S:S异二聚化变体而减弱的效应子功能。图18按出现顺序分别公开了SEQ ID NO:886、892、891、891、886、886、892、891、891、886、886、892、891、891和886。

[0050] 图19:测试抗体形式的FZD激动作用。A)测试双抗体-Fc-双抗体、VH和VL的FZD或LRP结合可变结构域;B)双抗体-Fc-scFv;C)scFv-Fc-双抗体;D)scFv-Fc-scFv;E)IgG-双抗体;F)IgG-scFv;G)双抗体-Fc-Fab;H)双抗体-CH3-双抗体;I)Fab-双抗体。在图19中,分子B至F、H至I包含N末端的结合LRP的可变结构域和C末端的结合FZD的可变结构域。在图19中,分子G包含在N末端的结合FZD的可变结构域和在C末端的结合LRP的可变结构域。这些标有*的抗体形式使用杵臼Fc进行了测试。

[0051] 图20:多种抗体结构能够引发有效的FZD激动作用。靶向泛FZD和LRP6的互补位以表14中描述的各种排列进行配置。由两位不同的科学家以盲法在表达TOPFLASH报告基因的野生型HEK细胞上测定每种抗体对经典Wnt通路的刺激。数据以平均值±SD呈现,代表4个不同的实验。

[0052] 图21:各种FZD激动剂形式的表达滴度。各种FZD激动剂形式在HEK细胞中表达,通过蛋白A色谱分析法纯化,根据在280nm处的吸光度测定表达滴度。FZD激活的EC₅₀由两位不同的科学家以盲法在表达TOPFLASH报告基因的野生型HEK细胞上测定。

[0053] 图22:类器官活力测定。小鼠小肠类器官在1μM LGK-974存在下生长以阻断内源性Wnt分泌,并按指示用PBS、Wnt3a条件培养基或FLAG分子进行处理。左图:来自n=3个独立实验的代表性图像。右图:通过CellTiter-Glo荧光测定对类器官活力的定量。条形代表3个独立实验的平均值±标准差。

[0054] 图23:小鼠结肠组织学。DSS处理周期(7天2%DSS,3天0.5%DSS)后小鼠结肠的组织学表现,其中,在第4天和第7天腹膜内注射对照IgG或ANT59(10mg/kg)。(A)在20倍放大倍数下捕获的图像,其显示了整体结构。(B)在100倍下捕获的图像,其显示了ANT59处理对粘膜完整性的挽救。

[0055] 图24:(A)在整个DSS处理周期(7天2%DSS,3天0.5%DSS)中小鼠体重的变化,其中,在第4天和第7天腹膜内注射对照CM0156、泛FZD激动剂或ANT59(10mg/kg)。(B)左图:每个处理组6至8只小鼠的结肠解剖的代表性图像,以厘米为单位进行比较。右图:每个处理组的结肠长度,条形代表平均结肠长度±S.D.并显示了单个数据点。***表示单向方差分析中p<0.0001,H₂O表示普通水(无DSS)。

[0056] 图25:FZD5/LRP6 ANT的表征。ANT在HEK细胞中表达,通过蛋白A色谱分析法纯化,

根据280nm处的吸光度测定表达滴度。使用生物膜干涉测量法测定每个分子针对重组Fc融合的人FZD5的表观亲和力(整体亲合力(avidity)),并测量针对其他人FZD的选择性。在过表达FZD5的FZD(1、2、4、5、7)敲除的HEK293细胞中激活LEF/TCF报告基因的剂量响应曲线。将细胞接种在96孔培养皿中24小时,然后按指示处理17小时。使用双荧光素酶报告基因检测系统(Promega)评估报告基因激活。数据以技术重复的平均值 \pm SD呈现,代表n=3个独立实验。

具体实施方式

[0057] 本文描述的是四价结合抗体分子,其包含具有或不具有效应子功能的Fc结构域、二价FZD结合结构域和二价LRP结合结构域,其中,所述结合结构域与Fc结构域相对的末端连接。在一个实施方式中,FZD结合结构域与Fc区的羧基末端连接,LRP共受体结合结构域与Fc结构域的氨基末端连接。或者,FZD结合结构域与Fc区的氨基末端连接,共受体结合结构域与Fc结构域的羧基末端连接。结合结构域可以直接与Fc结构域连接或通过接头与Fc结构域连接。FZD结合结构域可以结合一种或超过一种FZD受体(即FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9和FZD10中的一种以上)。

[0058] 在本发明的一个实施方式中,FZD结合结构域是二价的并包含结合FZD的双抗体或scfv、 V_H H片段或Fab片段或它们的组合;共受体结合结构域是二价的并包含结合LRP5/6共受体的双抗体或 V_H H片段、Fab或scFv或它们的组合。在本发明的一个实施方式中,FZD结合结构域与Fc结构域的羧基末端连接,并包含结合FZD的两个scfv、两个 V_H H片段、两个Fab片段或双抗体;共受体结合结构域与Fc结构域的氨基末端连接,并包含结合LRP5/6共受体的双抗体、两个 V_H H片段或两个scFv。当与Fc结构域的羧基末端连接时,FZD结合Fab通过Fab的重链可变区或轻链可变区与Fc结构域的CH3连接。在其他实施方式中,FZD结合结构域与Fc结构域的氨基末端连接并由两个Fab组成,LRP5/6共受体结合结构域与Fc结构域的羧基末端连接并由结合共受体的双抗体或两个scFv组成。

[0059] 图6显示了本发明的双抗体-Fc-scFv形式的四价结合抗体分子,其具有LRP5/6共受体结合结构域、Fc结构域和FZD结合结构域。双抗体-Fc-sFv包含:(i)Fc结构域,(ii)与Fc结构域的N末端连接的双特异性双抗体,其结合共受体上的两个不同位点(例如LRP5/6上的Wnt1位点(E1-E2)和LRP5/6上的Wnt3位点(E3-E4)),以及(iii)FZD结合结构域,其包含与Fc结构域的羧基末端连接的两个FZD结合scFv片段。scFv可以是针对特定FZD(例如FZD4)特异性的,或者可以是泛特异性的(与超过一种FZD结合(例如与FZD4和一个以上其他FZD结合))。

[0060] 本发明的一个实施方式为双抗体-Fc-scFv形式的四价结合抗体分子,其具有:(i)Fc结构域,(ii)LRP5/6共受体结合结构域,其包含结合共受体上两个不同位点(例如LRP5/6上的Wnt1位点(E1-E2)和LRP5/6上的Wnt3位点(E3-E4))的双特异性双抗体,其中所述双抗体与Fc结构域的氨基末端连接,以及(iii)FZD结合结构域,其与Fc结构域的羧基末端连接并包含各自结合FZD的两个scFv片段。scFv可以是针对FZD特异性的,或者可以是泛特异性的(与FZD和一种以上其他FZD结合)。

[0061] 图6还显示了本发明的IgG-双抗体形式的四价结合抗体分子,其具有:(i)Fc结构域,(ii)FZD结合结构域,其包含与Fc结构域的N末端连接的两个Fab片段,每个Fab结合FZD,以及(iii)与Fc结构域的C末端连接的LRP5/6共受体结合结构域,其由结合共受体上两个不

同位点(例如LRP5/6上的Wnt1位点(E1-E2)和Wnt3位点(E3-E4))的双抗体组成。Fab可以是针对特定FZD(例如FZD4)特异性的,或者可以是泛特异性的(与超过一种FZD结合(例如与FZD4和一种以上其他FZD结合))。

[0062] 本发明的一个实施方式为IgG-双抗体形式的四价结合抗体分子,其包含:(i)Fc结构域,(ii)N末端的FZD结合结构域,其包含两个FZD结合Fab,以及(ii)C末端的LRP5和/或LRP6共受体结合结构域,其包含LRP5/6共受体结合双抗体。这种IgG-双抗体形式的FZD激动剂包含:

[0063] (1) 第一重链单体和第二重链单体,其中,每个重链单体包含单链多肽,所述单链多肽从N末端到C末端包含:

[0064] (a) 结合FZD的重链可变结构域(VH),其连接至如下(b),

[0065] (b) 重链恒定区结构域1(CH1结构域),其连接至如下(c),

[0066] (c) Fc区(或包含重链恒定结构域3(CH3结构域)的Fc区的片段),其连接至如下(d),

[0067] (d) 包含结合LRP5/6共受体的VH的肽,所述结合LRP5/6共受体的VH与结合LRP5/6共受体的轻链可变结构域(VL)连接,以及

[0068] (2) 第一轻链单体和第二轻链单体,每个轻链单体从N末端到C末端包含与轻链恒定结构域1(CL1结构域)连接的结合FZD的VL。

[0069] 第一重链单体和第二重链单体通过它们的Fc区或Fc区的片段二聚化。结合LRP5/6的VH和VL之间的接头的长度促进第一重链单体的VH和VL与第二重链单体的VL和VH配对,从而形成LRP5/6共受体结合双抗体。FZD结合Fab通过如下形成:每个重链单体与轻链单体配对,使得每个重链单体的VH(结合FZD4)和CH1与轻链单体的VL(结合FZD4)和CL1配对。在该IgG-双抗体形式中,Fab在Fc结构域的N末端形成FZD4结合结构域,双抗体在Fc结构域的C末端形成共受体结合结构域。Fab可以是针对一种FZD(例如FZD4或FZD5)特异性的,或者可以是泛特异性的(与超过一种FZD结合(例如,与FZD4和/或FZD5结合,以及在一些情况下与更多的FZD结合))。Fc区可以通过杵臼构造二聚化。通过杵臼构造使肽二聚化的方法描述于“WO2018/026942,发明人Van Dyk等”、“Carter P. (2001) J. Immunol. Methods 248, 7-15”、“Ridgway等, (1996) Protein Eng. 9, 617-621”、“Merchant等, (1998) Nat. Biotechnol. 16, 677-681”以及“Atwell等, (1997) J. Mol. Biol. 270, 26-35”中。Fc区可以是Merrimack(杵链:Q347M、Y349F、T350D、T366W和L368M;臼链:S354I、E357L、T366S、L368A和Y407V)、Merchant(杵链:T366W;臼链:T336S、L368A和Y407V)或Merchant S:S(杵链中有额外S354C变体和臼链中有Y349C变体的Merchant突变)。Fc区还可以含有改变它们的效应子功能的突变,例如,Fc区可以具有因氨基酸突变(例如DANG变体和LALAPS变体)而减弱的效应子功能。

[0070] 尽管在图6中,在IgG-双抗体形式中形成双抗体的肽通过它们的VH结构域以VH-VL方向(N末端至C末端)连接至Fc结构域的C末端,但在一些实施方式中,形成双抗体的肽通过它们的VL结构域以VL-VH方向(N末端至C末端)与Fc结构域的C末端连接。以及,尽管重链被描述为包含VH结构域和与Fc结构域的N末端连接的CH1结构域、轻链被描述为包含VL结构域和CL1结构域以形成Fab,但在一些实施方式中(图6和图7A中的双抗体-Fc-Fab),双抗体融合到Fc的N末端,Fab融合到Fc的C末端。为此,Fc的CH3结构域通过它的VH结构域(VH-CH1)直接融合到Fab的重链,或通过它的VL结构域(VL-CL)直接融合到轻链,其中,轻链和重链仍然

缔合以形成Fab。

[0071] 图6显示了双抗体-Fc-Fab构造的四价结合抗体分子,其具有形成N末端结合结构域的二价双特异性LRP5/6结合双抗体和形成C末端结合结构域的两个FZD结合Fab。Fab可以是针对特定的FZD(例如FZD4)特异性的,或者可以是泛特异性的(与超过一种FZD结合(例如与FZD4和一种以上其他FZD结合))。另外,参见图7A,图7A显示了双抗体-Fc-Fab形式的四价结合抗体分子,其具有杵臼(KiH)构造的Fc和形成N末端结合结构域的二价双特异性LRP5结合双抗体,以及形成C末端结合结构域的两个FZD4结合Fab。尽管图6和7A显示了Fab通过Fab的可变重链结构域(VH)与Fc结构域的CH3连接(在C末端),但特别预期在替代性的双抗体-Fc-Fab形式中,Fab通过Fab的可变轻结构域(VL)与Fc结构域的CH3连接。四价分子的各个结构域(VL、VH、CH1、CH2、CH3、CL1和Fc)通过接头(例如肽接头)连接。

[0072] 另外,本发明的一个实施方式为双抗体-Fc-Fab形式的四价结合抗体分子,其包含:(i)Fc结构域,(ii)N末端结合结构域,其包含结合共受体(例如,LRP5和/或LRP6共受体)的双抗体,以及(ii)C末端结合结构域,其包含两个结合一种以上FZD(例如FZD4或FZD5)的Fab。该双抗体-Fc-Fab形式的FZD激动剂包含:

[0073] (1) 第一重链单体和第二重链单体,其中,每个重链单体包含单链多肽,所述单链多肽从N末端到C末端包含:

[0074] (a) 包含结合LRP5/6共受体的重链可变(VH)结构域和结合LRP5/6共受体的轻链可变(VL)结构域的肽,其连接至如下(b),

[0075] (b) Fc区(或包含重链恒定结构域3(CH3结构域)的Fc区的片段),其连接至如下(c)

[0076] (c) 结合FZD的VH结构域,其连接至如下(d),

[0077] (d) CH1结构域,以及

[0078] (2) 第一轻链单体和第二轻链单体,每个轻链单体从N末端到C末端包含结合FZD的VL结构域和轻链恒定结构域1(CL1)。

[0079] 第一重链单体和第二重链单体通过Fc区或Fc区的片段二聚化,二价LRP5/6结合双抗体通过第一重链单体的结合LRP5/6的VH结构域和VL结构域与第二重链单体的结合LRP5/6的VL结构域和VH结构域的配对而形成。两个FZD结合Fab通过每个重链单体与轻链单体的配对(使得轻链单体的VL(结合FZD)和CL1与每个重链单体的VH(结合FZD)和CH1配对)形成。在该双抗体-Fc-Fab形式中,双抗体在四价结合抗体分子的氨基末端形成LRP5/6共受体结合结构域,两个Fab在四价结合抗体分子的C末端形成FZD结合结构域。Fc区可以通过杵臼构造二聚化。

[0080] 通过杵臼构造使肽二聚化的方法描述于“W02018/026942,发明人Van Dyk等”、“Carter P. (2001) J. Immunol. Methods 248, 7-15”、“Ridgway等, (1996) Protein Eng. 9, 617-621”、“Merchant等, (1998) Nat. Biotechnol. 16, 677-681”以及“Atwell等, (1997) J. Mol. Biol. 270, 26-35”中。Fc区可以是Merrimack(杵链:Q347M、Y349F、T350D、T366W和L368M;臼链:S354I、E357L、T366S、L368A和Y407V)、Merchant(杵链:T366W;臼链:T336S、L368A和Y407V)或Merchant S:S(杵链中有额外S354C变体和臼链中有Y349C变体的Merchant突变)。Fc区还可以含有改变它们的效应子功能的突变,例如,Fc区可以具有因氨基酸突变(例如DANG变体和LALAPS变体)而减弱的效应子功能。

[0081] 尽管在图6和7A中,在双抗体-Fc-Fab形式中形成双抗体的肽通过它们的VL结构域

与Fc结构域连接,因此为VH-VL方向(从N末端到C末端),但在一些实施方式中,可以转换方向使得形成双抗体的肽通过它们的VH结构域与Fc结构域的N末端连接,因此为VL-VH方向(从N末端到C末端)。此外,尽管双抗体-Fc-Fab形式中的重链被描述为包含VH结构域和CH1结构域,该重链与包含VL和CL1结构域的轻链配对以形成Fab,但还预期在一些实施方式中,可变结构域和恒定结构域被转换,使得重链包含VL结构域和CL1结构域,轻链包含VH结构域和CH1结构域,重链和轻链仍然配对以形成Fab。

[0082] 在本发明的一个实施方式中,FZD结合结构域的结合部分来源于特异性结合一种FZD(例如FZD4或FZD5)或者泛特异性地与特定FZD(例如FZD4或FZD5)和一种以上另外的FZD受体相互作用的抗体或抗体片段(FZD源抗体),共受体结合结构域包含来源于结合LPR5和/或LRP6的抗体或抗体片段(LRP5/6共受体源抗体)的结合部分。在本发明的一个实施方式中,FZD结合抗体结合FZD受体的胞外富含半胱氨酸结构域(CRD)。结合FZD的抗体可以为结合FZD受体并拮抗Wnt信号传导或抑制Wnt配体与FZD受体结合的抗体。结合FZD的抗体可以为结合FZD受体但不拮抗或不抑制Wnt配体与FZD受体结合的抗体。结合FZD的抗体可以为结合FZD并增强Wnt信号传导的抗体。结合LRP5/6共受体的抗体可以为结合LRP5/6共受体并拮抗Wnt信号传导或抑制Wnt配体与共受体结合的抗体,或结合LRP5/6共受体的抗体,可以为结合共受体但不拮抗Wnt或诺里蛋白信号传导或不抑制Wnt或诺里蛋白配体与共受体结合的抗体。

[0083] 在本发明的一个实施方式中,LRP5/6共受体结合结构域结合共受体上的单表位(例如LRP5/6的结合Wnt1相互作用结构域的表位(E1-E2)或结合Wnt3相互作用结构域的表位(E3-E4))。在本发明的一个实施方式中,LRP5/6共受体结合结构域结合共受体内的两个表位,例如LRP5/6的结合Wnt1相互作用表位(E1-E2)的互补位和结合Wnt3表位(E3-E4)的互补位。在本发明的一个实施方式中,多价结合分子包含Fc结构域,其中Fc结构域为包含CH3结构域的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段的Fc结构域。在本发明的一个实施方式中,免疫球蛋白为IgG。在本发明的一个实施方式中,IgG为IgG₁。

[0084] 在本发明的一个实施方式中,LRP5/6结合结构域包含双抗体,所述双抗体包含两个肽,所述两个肽各自包含结合LRP5/6的重链可变结构域(VH),所述重链可变结构域与结合LRP5/6的轻链可变结构域(VL)连接,其中,结合结构域通过如下形成:来自一个肽的VH和VL与来自另一个肽的VL和VH配对从而形成LRP5/6结合结构域。

[0085] 在本发明的四价结合抗体分子中,两个结合结构域均为二价的,二价结合结构域中的一个或两个可以是针对各自的FZD受体(例如FZD4或FZD5)或LRP5/6共受体双特异性的。例如,结合分子可以包含二价的和单特异性的FZD结合结构域(每个结合位点结合相同的表位),LRP 5/6结合结构域是二价的和双特异性的,其结合两个不同的表位(LRP5/6胞外结构域上的Wnt1位点(E1-E2)和Wnt3位点(E3-E4))。在本发明的一个实施方式中,两个结合结构域均为二价的和双特异性的,每个结合结构域结合它们各自的靶FZD受体或LRP 5/6共受体上的两个不同表位。

[0086] 本发明的四价分子的FZD结合结构域的VH和VL结构域可以包含FZD源抗体(例如表1、表2或表6的FZD4或FZD5结合抗体)的三个轻链CDR和三个重链CDR,或者与FZD源抗体(例如表1、表2或表6的FZD4抗体)的CDR具有至少50%、至少55%、至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性、

并且仍然保留与FZD或FZD5受体(与源抗体结合)的结合性的三个轻链CDR和三个重链CDR。

[0087] 本发明的四价分子的LRP5/6共受体结合结构域的VH和VL结构域可以包含LRP5/6共受体源抗体(例如表3、表4或表6的LRP5/6结合抗体)的三个轻链CDR和三个重链CDR,或者与Wnt共受体源抗体(例如表3、表4或表6的LRP5/6结合抗体)的VH和VL具有至少50%、至少55%、至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性、并且仍然结合LRP5/6共受体的三个轻链CDR和三个重链CDR。

[0088] 在本发明的一个实施方式中,本发明的四价结合分子的FZD结合结构域结合FZD4(FZD4激动剂)或结合FZD5(FZD5激动剂)或结合FZD4和/或FZD5和一种以上其他FZD(泛FZD激动剂),并包含:

[0089] 表1、表2或表6的抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3以及CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或与表1、表2或表6的抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3以及CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3具有至少50%、至少55%、至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性、并且仍然结合FZD4或FZD5的CDR;

[0090] FZD4激动剂或FZD5激动剂或泛FZD激动剂的LRP5/6结合结构域包含:

[0091] 表3、表4或表6的抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3以及CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或与表3、表4或表6的抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3以及CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3具有至少50%、至少55%、至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性、并且仍然结合LRP5或LRP6的CDR。

[0092] 在一个实施方式中,四价结合抗体分子的FZD结合结构域不包含与Wnt共受体结合结构域组合的双抗体、scFv或Fab,所述双抗体、scFv或Fab包含FZD4结合抗体5044的三个重链CDR或三个轻链CDR,所述Wnt共受体结合结构域包含如下双抗体、scFv或Fab:所述双抗体、scFv或Fab包含LRP6结合抗体2542和/或LRP6结合抗体2539的三个重链CDR和三个轻链CDR。在一个实施方式中,四价结合分子不包含与Wnt共受体结合结构域组合的双抗体、scFv或Fab,所述双抗体、scFv或Fab包含FZD4结合抗体5027的三个重链CDR和三个轻链CDR,所述Wnt共受体结合结构域包含如下双抗体、scFv或Fab:所述双抗体、scFv或Fab包含LRP6结合抗体2542和/或LRP6结合抗体2539的三个重链CDR和三个轻链CDR。

[0093] 此外,本发明的一个实施方式为编码本文所述的四价结合分子的核酸分子。本发明的一个实施方式为编码本文所述的四价结合分子的多肽的核酸分子,所述四价结合分子的多肽包含表1、2、3、4、6中所示的重链CDR和轻链CDR。此外,本发明的一个实施方式为编码图7A和7B的四价结合分子(例如FZD5激动剂或FZD4激动剂)的多肽的核酸分子,所述多肽包含表6的CDR。此外,本发明的一个实施方式为编码VH结构域和VL结构域的核酸分子,所述VH结构域和VL结构域分别包含表1、2、3、4和6中所示的重链CDR和轻链CDR。可以将核酸分子插入载体中并在适当的宿主细胞中表达,然后可以使用本领域熟知的方法从细胞中分离四价结合抗体分子。因此,本发明的另一个方面为表达盒和载体,其包含编码本文所述的四价结合分子(例如FZD4或FZD5激动剂)、VL和VH结构域、Fab和双抗体以及本文所述的Fc结构域的多肽的核酸分子,所述四价结合分子、VL和VH结构域、Fab和双抗体包含表1、2、3、4和6中所示的CDR。本发明的一个方面为表达这些表达盒和载体的宿主细胞。

[0094] 如本发明中所用,术语“载体”指可被工程改造以含有核酸分子(例如编码本文所

述的四价结合抗体分子的核酸序列)的核酸递送运载物或质粒。插入多核苷酸后能够表达蛋白质的载体被称为表达载体。载体可以通过转化、转导或转染插入宿主细胞中,使所携带的遗传物质能够在宿主细胞中表达。载体为本领域技术人员所熟知,包括但不限于:质粒;噬菌粒;粘粒;人工染色体,例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体,例如 λ 噬菌体或M13噬菌体;以及动物病毒等。动物病毒可以包括但不限于:逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒)、水痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳多空病毒(例如SV40)。载体可以含有控制本文所述的四价结合抗体分子表达的多个组件,所述多个组件包括但不限于:启动子,例如病毒启动子或真核启动子(例如CMV启动子);信号肽,例如TRYP2信号肽;转录起始因子、增强子、选择元件和报告基因。此外,载体还可以含有复制起始位点。

[0095] 如本发明中所用,术语“宿主细胞”指能够导入表达盒和载体的细胞,其包括但不限于:原核细胞,例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌;真菌细胞,例如酵母和曲霉;昆虫细胞,例如S2果蝇细胞和Sf9;或动物细胞,包括人类细胞(例如成纤维细胞、CHO细胞、COS细胞、NS0细胞、HeLa细胞、BHK细胞或HEK293细胞)。

[0096] 本发明的一个实施方式为药物组合物,其包含本文所述的FZD激动剂或编码本文所述的FZD激动剂的核酸分子、表达盒和载体,以及药学上可接受的媒介物、稀释剂或赋形剂。药物组合物还可包含另外的药剂,例如第二治疗抗体(例如抗VEGF抗体(阿柏西普(aflibercept)、雷珠单抗(ranibizumab)和贝伐单抗(bevacizumab))、生长因子(例如VEGF)或激活Wnt通路的药剂(例如小分子CHIR99021、诺里蛋白或R-Spondin)、或编码所述药剂的核酸分子、表达盒和载体。药物组合物可以由或基本上由以下组成:本文所述的FZD激动剂,或编码FZD激动剂的核酸分子、表达盒或载体,以及药学上可接受的稀释剂、媒介物或赋形剂。合适的媒介物、稀释剂和赋形剂和他们的制剂描述在“Remington:The Science and Practice of Pharmacy,(第19版),A.R.Gennaro编辑,Mack Publishing Company,宾夕法尼亚州伊斯顿,1995”中。通常,在制剂中使用适量的药学上可接受的盐以使制剂等渗。药学上可接受的媒介物的示例包括但不限于盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。溶液的pH可以为例如约5至约8、约5至7.5或约6至7。另外的媒介物包括缓释制剂,例如含有激动剂的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形制品(例如薄膜、脂质体或微粒)的形式。对于本领域技术人员而言显而易见的是,取决于例如施用途径和所施用的FZD激动剂的浓度,某些媒介物可以是更优选的。

[0097] 本发明还包括使用本文所述的FZD激动剂的方法。本发明的一个实施方式为用于激活细胞中Wnt信号通路的方法,该方法包括使具有FZD受体和LRP5/6共受体的细胞与有效量的本发明的结合FZD(例如FZD4)和LRP5/6的四价结合抗体分子接触,以激活Wnt信号传导。据报道,诺里蛋白-FZD4通路在视网膜血管生成中发挥作用(参见Wang等,Cell.2012;151(6):1332-1344;Braunger BM,Tamm ER.Adv Exp Med Biol.2012;723:679-683;Ohlmann A,Tamm ER.Prog Retin Eye Res.2012;31(3):243-257;以及Ye等,Trends Mol Med.2010;16(9):417-425)。通过诺里蛋白-FZD4通路的信号传导对于视网膜脉管系统的发育和维持是必要的。影响该通路的基因的突变可能导致多种玻璃体视网膜病,例如诺里病、家族性渗出性玻璃体视网膜病(FEVR)以及假性神经胶质瘤和骨质疏松症综合征。此外,早产儿视网膜病(ROP)与该诺里蛋白-FZD4通路的突变有关,已报道在Coats病和持续性胚胎

血管症(PFV)中有Wnt通路突变。诺里蛋白和/或WNT7A/B激活的FZD4信号传导通路还与CNS血脑屏障发育和稳态相关。诺里蛋白、FZD4、LRP5、LRP6和共受体四次跨膜蛋白12(Tspan-12)的基因消融会导致视网膜和/或小脑血管中的血管生成缺陷和屏障破坏(Cho等,(2017)Neuron 95,1056-1073;Zhou等,(2014)J Clin Invest 124:3825-3846)。因此,功能性Wnt信号传导系统在眼睛和视网膜中的充足的血管和神经网络发育中发挥关键的基础作用以支持视力,在CNS中的充足的血管和神经网络发育中发挥关键的基础作用以支持BBB的发育和稳态。

[0098] 本发明的一个方面为通过局部或全身施用有效量的药物组合物处理眼组织(例如视网膜组织)来促进和/或维持视网膜脉管系统的方法,所述药物组合物包含具有图6所示结构的本发明的四价抗体分子(例如结合FZD4和LRP5/6的四价抗体分子,FZD4激动剂)。此外,本发明的一个方面为通过用有效量的本发明的药物组合物(例如,包含具有图6所示结构的FZD4激动剂的组合物)治疗有需要的受试者来促进和/或维持BBB脉管系统的方法。BBB在发育过程中启动,它的完整性对于整个生命周期的稳态和神经保护仍然至关重要。有需要的受试者包括患有与BBB功能障碍相关的神经病症(例如阿尔茨海默氏病等神经退行性疾病,以及癫痫症、多发性硬化症和中风)的受试者。

[0099] 本发明的另一方面为通过向受试者施用有效量的本发明药物组合物(例如,包含具有图6所示结构的FZD4激动剂的组合物)来治疗所述受试者的方法,所述受试者患有以血管渗漏(特别是视网膜血管渗漏)和/或内皮细胞渗漏为特征的病症以及以视网膜或脑内皮细胞屏障功能降低或BBB或BRB受损为特征的病症,例如,糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、Coats病、FEVR、诺里病、黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿和儿童玻璃体视网膜病。此类组合物的有效量为足以例如增加或恢复内皮细胞的屏障功能并由此减少此类受试者中的血管渗漏的量。受试者可以是胎儿。本发明的FZD4激动剂(特别是双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂)激活内皮细胞中的FZD4和β连环蛋白信号传导、促进屏障功能,从而降低内皮细胞通透性并显著增强血管生成,其中,所述双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂包含在Fc受体的羧基末端形成FZD4结合结构域的两个Fab片段和在Fc结构域的氨基末端由双抗体组成的LRP5和/或LRP6结合结构域(如图6所示)。特别地,用这些FZD4激动剂(优选具有双抗体-Fc-Fab形式的那些FZD4激动剂)在体内、离体或体外处理内皮细胞,远比不具有该结构的其他分子更有效地增强视网膜脉管系统和/或BRB和BBB的发育和维持。

[0100] 本发明的另一方面为通过向受试者施用有效量的本发明的药物组合物(例如包含FZD5激动剂的组合物)来治疗患有全部肠或部分肠的炎症(也称为炎症性肠病)的所述受试者的方法。炎症性肠病的示例包括但不限于克罗恩病和溃疡性结肠炎。此类组合物的有效量为足以减轻、改善、消除或治疗炎症的量。有需要的受试者包括患有胃肠道粘膜炎症的受试者。本文公开的方法可被实施以减少炎症(例如,与IBD相关的炎症或受IBD影响的组织(例如小肠、大肠或结肠等胃肠道组织)中的炎症)、激活WNT信号传导或减轻IBD的任何组织学症状(例如本文公开的那些)。

[0101] 本发明的FZD激动剂可以全身或局部施用,例如通过注射(例如皮下、静脉内、腹膜内、鞘内、眼内、玻璃体内等)、植入、局部或口服施用。根据施用途径,FZD激动剂可以被包裹在材料中以保护激动剂免受可能使激动剂失活的条件的影响。本文所述的四价结合抗体分子可以溶解在或悬浮在药学上可接受的(优选水性的)媒介物中。此外,包含FZD激动剂的组

合物可以含有赋形剂(例如缓冲剂、粘合剂、喷射剂、稀释剂、调味剂、润滑剂等)。可以在此类组合中使用的赋形剂的广泛列表可以例如来自“A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000)”。四价结合抗体分子还可以与免疫刺激物质(例如细胞因子)一起施用。

[0102] 本发明的一个实施方式包括通过使用本文所述的四价抗体分子来获得具有表现出屏障功能的血管网络的脑的类器官的方法。预期本文所述的激活FZD4信号传导的四价结合抗体分子促进用脑的类器官培养的内皮细胞内的屏障功能,从而促进血管生成。

[0103] 本发明的一个实施方式包括用于专能干细胞(multipotent stem cell)或多能干细胞(PSC)或诱导多能干细胞(iPS)的定向分化的方法,其包括在适合定向分化的条件下培养细胞,其中,所述培养条件还包含有效量的本文所述的四价结合抗体分子。在小鼠和人类PSC中的研究已经确定了添加可以诱导PSC分化为不同谱系的生长因子(包括Wnt)的特定方法。包括激活Wnt信号传导的PSC定向分化的方法是本领域已知的,参见例如Lam等,(2014) *Semin Nephrol* 34(4):445-461; Yucer等,(2017年9月6日) *Scientific Reports* 7, 文章编号10741。预期本文所述的FZD激动剂(例如FZD4激动剂)可以以足以有效激活Wnt信号通路以使PSC定向分化为某些中胚层谱系(例如心肌细胞)的量使用(引用Yoon等, FZD4 Marks Lateral Plate Mesoderm and Signals with NORRIN to Increase Cardiomyocyte Induction from Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors. *Stem Cell Reports*. 2018年1月; 10(1):87-100. DOI:10.1016/j.stemcr.2017.11.008. PMID: 29249665)。

[0104] 本发明的一个实施方式为通过向有需要的受试者施用有效量的本文所述的FZD激动剂激活该受试者中的Wnt信号传导来增强该有需要的受试者中的组织再生的方法。

[0105] 本发明的一个实施方式包括通过施用有效量的本发明的结合FZD4和LRP5/6的四价结合分子(FZD4激动剂)在有需要的受试者中促进眼组织(例如视网膜组织)中的内皮细胞屏障功能的方法。在一个特定实施方式中,本发明的结合FZD4的FZD4激动剂和结合LRP5或/和LRP6的结合结构域具有图6和7中描绘的双抗体-Fc-Fab结构。在本发明的一个实施方式中,用于增强视网膜血管生成的FZD4激动剂包含如表1、2和6所示的FZD4结合抗体和表3、4和6所示的LRP5/6结合抗体的轻链CDR(即CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)和重链CDR(即CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)。

[0106] 本文所用的受试者可以为任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类动物、马、牛、狗、猫、啮齿类动物等。受试者可以为胎儿。通常,受试者是人。

[0107] 用于施用本文所述的FZD激动剂和编码它们的核酸的有效剂量和时间表可以凭经验确定,做出此类确定在本领域技术范围内。本领域技术人员将理解,必须施用的此类FZD激动剂的剂量将根据例如将要接受抗体的受试者、施用途径、使用的FZD激动剂的具体类型和施用的其他药物而变化。选择FZD激动剂的适当剂量的指导可见于关于抗体治疗应用的文献,例如, *Handbook of Monoclonal Antibodies*, Ferrone等编辑, Noyes Publications, Park Ridge, N. J., (1985) 第22章和第303至357页; *Smith, Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*, Haber等编辑, Raven Press, New York (1977) 第365至389页。施用组合物的剂量范围为足够大以产生期望的效果(例如促进内皮细胞屏障功能、血管稳态或增强Wnt信号传导)的那些。剂量不应太大,以免引起不良副作用(例如不希望的交叉反应、

过敏反应等)。通常,剂量将随着患者的年龄、病况、性别和疾病或病症的程度而变化,并且可以由本领域技术人员确定。在有任何禁忌症的情况下,剂量可以由特定的医生调整。剂量可以变化,可以每天施用一剂以上,持续一天或几天。尽管个体需求不同,但载体有效量的最佳范围的确定在本领域技术范围内。

[0108] 此外,本发明的一个方面为用于制备本文所述的四价结合抗体分子的方法。FZD受体(例如FZD4)和Wnt共受体LRP5/6的氨基酸序列,和编码FZD受体和Wnt共受体LRP5/6的核苷酸序列,以及结合FZD(例如FZD4)或Wnt共受体LRP5/6的抗体和抗体文库均易于获得或可以使用本领域熟知的方法产生(参见例如,美国公开号2015/0232554,发明人Gurney等;美国公开号2016/0194394,发明人Sidhu等;US20190040144,发明人Pan等;美国公开号2017/0166636,发明人Wu等;美国公开号2016/0208018,发明人Chen等;美国公开号2016/0053022,发明人Maceda等;和美国公开号2015/031293,发明人Damelin等)。本领域已知用于产生和筛选具有期望的结合特性的抗体和抗体片段、scFv、Fab、VL和VH的此类噬菌体展示文库的多种方法。此类方法例如在“Hoogenboom等,Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等编辑,Human Press,新泽西州托托瓦,2001)”中进行了综述,还在例如“McCafferty等,Nature 348:552-554”、“Clackson等,Nature352:624-628(1991)”、“Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597(1992)”、“Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo编辑,Human Press,新泽西州托托瓦,2003)”、“Sidhu等,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004)”、“Lee等,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004)”、“Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004)”,以及“Lee等,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)”中进行了描述,全部通过引用并入本文。在某些噬菌体展示方法中,通过聚合酶链式反应(PCR)分别克隆VH和VL基因的库(repertoire),并在噬菌体文库中随机重组,然后可以筛选抗原结合噬菌体(如“Winter等,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)”中所述)。噬菌体通常展示作为单链Fv片段(scFv)或Fab片段的抗体片段。来自免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,可以克隆初始库(例如来自人)以提供针对范围广泛的非自身抗原和自身抗原的单来源的抗体,而无需进行任何免疫(如“Griffiths等,EMBO J,12:725-734(1993)”中所述)。最后,还可以通过克隆来自干细胞的未重排的V基因片段,并使用含有随机序列的PCR引物以编码高度可变的CDR3区域并在体外完成重排来合成制备初始文库(如“Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)”所述)。描述人抗体噬菌体文库的专利公布包括例如,美国专利号5,750,373,以及美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360,全部通过引用并入本文。在本文中,从人抗体文库分离的抗体或抗体片段被认为是人抗体或人抗体片段。

[0109] 在本发明的一个实施方式中,双抗体-Fc-scFv形式的四价结合抗体分子包含含有LRP5/6结合双抗体的LRP5/6共受体结合结构域和含有两个FZD结合scFv的FZD结合结构域,所述四价结合抗体分子通过如下产生:

[0110] (a) 选择具有C末端和N末端的Fc结构域;

[0111] (b) 鉴定结合FZD受体的抗体(“FZD源抗体”);

[0112] (c) 鉴定结合LRP5/6共受体的抗体(“共受体源抗体”或“LRP5/6源抗体”);以及

[0113] (d) 产生包含编码多肽单体的核苷酸序列的核酸分子,所述多肽单体包含:

[0114] (i) 包含与VH结构域连接的VL结构域的肽,所述结构域包含步骤b的结合FZD受体的抗体的重链CDR和/或轻链CDR,或包含来源于步骤b的抗体并且仍然结合FZD的重链CDR和/或轻链CDR,其连接至如下(ii),

[0115] (ii) 步骤a的Fc结构域,其连接至如下(iii),

[0116] (iii) 包含与VH结构域连接的VL结构域的肽,所述肽包含步骤c的抗体的轻链CDR和/或重链CDR,或包含来源于步骤c的抗体并且仍然结合LRP5/6共受体的CDR,

[0117] (e) 表达步骤d的核酸分子以产生多肽单体,然后使多肽二聚化,

[0118] 其中,每个单体的结合FZD的VH和VL形成结合FZD的scFv,一个单体的结合LRP 5/6共受体的VH结构域和VL结构域与另一单体的结合Wnt共受体的VL和VH结合,形成LRP5/6共受体结合双抗体,

[0119] 其中,多肽单体通过Fc区二聚化以形成四价结合抗体分子,所述四价结合抗体分子包含Fc结构域、由两个FZD结合scFv组成的FZD结合结构域,以及由双抗体组成的LRP5/6共受体结合结构域,并且

[0120] 其中,FZD结合结构域和LRP5/6共受体结合结构域位于Fc结构域的相对的末端。预期包含结合FZD或LRP的VL结构域和VH结构域的肽可以通过VL结构域或VH结构域与Fc结构域的N末端或C末端连接,前提为FZD结合结构域和LRP结合结构域位于Fc结构域的相对的末端。FZD可以为FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9和FZD10中的一种以上。

[0121] 在本发明的一个实施方式中,四价结合抗体分子具有与Fc结构域的一个末端连接的两个FZD结合Fab(例如FZD4结合Fab),以及与Fc结构域的另一个末端连接的LRP5/6结合双抗体或两个LRP5/6结合scFv,所述四价结合抗体分子通过如下产生:

[0122] (a) 鉴定结合FZD(例如FZD4或FZD5)的抗体(“FZD源抗体”)的轻链互补决定区(CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)和/或重链互补决定区(CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3);

[0123] (b) 鉴定一种以上结合LRP5或LRP6的抗体(“LRP5/6源抗体”)的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3和/或CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;

[0124] (c) 产生编码“重链”多肽的核酸分子,所述“重链”多肽包含:

[0125] (i) 包含与VH结构域连接的免疫球蛋白重链恒定区1(CH1结构域)的肽,所述VH结构域包含步骤a)的抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或来源于步骤a)并且仍然结合FZD4的抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,其连接至如下(ii),

[0126] (ii) Fc区,其连接至如下(iii),

[0127] (iii) 包含与VH结构域连接的VL结构域的肽,所述VL结构域包含步骤b)的抗体的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,所述VH结构域包含步骤b)的抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或来源于步骤b)的抗体的结合LRP5或LRP6的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;

[0128] (d) 产生包含编码“轻链”多肽的核苷酸序列的核酸分子,所述“轻链”多肽包含与VL结构域连接的免疫球蛋白轻链恒定区1(CL1),其中,所述VL结构域包含步骤a)中的FZD抗体的轻链CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3;以及

[0129] (e) 表达(c)和(d)的核酸分子以产生重链多肽和轻链多肽;

[0130] 其中,两个重链多肽通过它们的Fc区二聚化,重链多肽的结合FZD的VH和CH1结构域与轻链多肽的结合FZD的VL和CL1结构域配对,形成两个FZD Fab,以及

[0131] 其中,每个重链多肽中的结合LRP5/6的VH和VL配对以形成结合LRP5/6的scFv,或者二聚体中的一个重链多肽的结合LRP5/6的VH和VL与二聚体中的另一重链多肽的结合LRP5/6的VL和VH配对以形成双抗体,从而形成四价结合抗体分子,所述四价结合抗体分子包含Fc结构域、与Fc结构域的N末端或C末端连接的两个FZD Fab以及与Fc结构域的另一末端连接的LRP5/6结合双抗体或两个LRP5/6结合scFv。

[0132] FZD源抗体可以为特异性地结合一种FZD(例如FZD4)的抗体,或者为与FZD(例如FZD4或FZD5)和一种以上其他FZD受体结合的泛特异性抗体,并且拮抗Wnt信号传导或抑制Wnt与受体结合。或者,FZD源抗体可以为特异性地结合一种FZD(例如FZD4或FZD5)的抗体,或者为与一种FZD(例如FZD4或FZD5)和一种以上其他FZD受体结合但不拮抗Wnt信号传导或抑制Wnt与受体结合的泛特异性抗体。LRP源抗体可以为特异性结合LRP5/6的抗体,或者为与LRP5/6和一种以上Wnt共受体泛特异性结合的抗体,并且拮抗Wnt信号传导或抑制Wnt与共受体结合。或者,LRP5/6源抗体可以为结合LRP5/6共受体的抗体,或者为与LRP5/6和一种以上Wnt共受体泛特异性结合的抗体,并且不拮抗Wnt信号传导或抑制Wnt与LRP5/6共受体结合。

[0133] FZD源抗体可以为结合FZD受体的抗体片段(例如Fab、VL或VH)。FZD激动剂的FZD结合结构域中的轻链CDR和重链CDR、VH和/或VL可以与FZD源抗体的CDR、VH和/或VL相同,或者可以与源抗体的CDR、VH或VL具有至少50%、至少55%、至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性,并且仍然保留与FZD受体的结合性。FZD激动剂的FZD结合结构域中的CDR、VH和/或VL可以与表1、表2或表6的FZD4结合抗体或FZD5结合抗体的CDR、VH和/或VL相同,或者可以与表1或表2或表6的FZD4结合抗体或FZD5结合抗体的CDR、VH或VL具有至少50%、至少55%、至少60%、75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性,并且仍然保留与FZD受体的结合性。

[0134] 类似地,Wnt共受体源抗体可以为结合LRP共受体(例如LRP5/6)的抗体片段(例如Fab、VL或VH)。FZD4激动剂的Wnt共受体结合结构域中的轻链CDR和重链CDR、VH和/或VL可以与Wnt共受体源抗体的CDR、VH和/或VL相同,或者可以与源抗体的CDR、VH或VL具有至少50%、至少55%、至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性,并且仍然保留与LRP共受体的结合性。FZD激动剂的LRP5/6结合结构域中的轻链CDR和重链CDR、VH和/或VL可以与表3、表4或表6的LRP结合抗体的轻链CDR和重链CDR、VH和/或VL相同,或者可以与表3、表4或表6的LRP结合抗体的轻链CDR和重链CDR、VH或VL具有至少50%、至少55%、至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性,并且仍然保留与LRP共受体的结合性。

[0135] 在本发明的一个实施方式中,四价结合抗体分子的两个多肽通过它们的Fc序列的杵臼构造二聚化。本发明的四价结合抗体分子可以通过使两个多肽以“杵臼”构造二聚化来产生。杵臼构造通过促进肽的缔合而增加了本发明的模块性,所述肽包含结合部分,所述结合部分结合FZD受体或LRP5/6共受体上的不同表位或者结合FZD受体家族或共受体家族不同成员上的表位,参见例如图6。通过杵臼设计来工程化改造Fc分子的方法是本领域众所周知的,参见例如“W02018/026942,发明人Van Dyk等”、“Carter P.(2001)

J.Immunol.Methods 248,7-15”、“Ridgway等,(1996)Protein Eng.9,617-621”、“Merchant等,(1998)Nat.Biotechnol.16,677-681”,以及“Atwell等,(1997)J.Mol.Biol.270,26-35”。

[0136] 不希望被理论束缚,预期本发明的四价结合抗体分子通过促进细胞上的FZD受体和LRP5/6共受体的接近和稳定有利于激活Wnt信号通路的受体蛋白的构象,来促进细胞上的FZD受体和LRP5/6共受体的相互作用。本发明的另一个实施方式为促进细胞上的FZD受体和LRP5/6共受体的相互作用从而激活细胞中的Wnt信号通路的方法,所述方法包括:a)选择具有C末端和N末端、包含CH3结构域的Fc结构域或Fc结构域的片段;b)将结合FZD受体的第一二价结合结构域连接在Fc结构域的一个末端,将结合Wnt共受体的第二二价结合结构域连接在Fc结构域的另一端,从而形成四价结合抗体分子;c)在所述四价结合抗体分子与FZD受体和Wnt共受体都结合的条件下,使所述四价结合抗体分子与表达所述FZD受体和Wnt共受体的细胞接触,从而激活Wnt信号通路。Wnt共受体结合结构域和FZD结合结构域是二价的并且各自包含VL和/或VH或V_HH结构域,结合结构域中的一个或两个可以是单特异性的。在本发明的一个实施方式中,Wnt共受体结合结构域和FZD结合结构域中的一个或两个是双特异性的。在本发明的一个实施方式中,Wnt共受体结合结构域是二价的和双特异性的。FZD结合结构域可包含结合FZD的scFV、结合FZD的V_HH或结合FZD的Fab或它们的组合,或结合FZD的双抗体。Wnt共受体结合结构域可以包含结合LRP5/6共受体的scFV、结合LRP5/6共受体的V_HH、结合LRP5/6共受体的Fab或它们的组合,或结合LRP5/6共受体的双抗体。在本发明的一个实施方式中,FZD结合结构域包含两个FZD结合Fab,Wnt共受体结合结构域包含在两个不同表位上结合LRP5/6的二价双特异性双抗体。

[0137] 本发明的四价结合抗体分子启动由FZD-共受体复合物激发的Wnt信号通路(例如由FZD-LRP5/6复合物激发的β-连环蛋白通路)。Wnt配体通过促进FZD受体与共受体的聚集来发挥作用。不希望被理论束缚,预期本文所述的FZD激动剂与FZD受体和它的LRP5/6共受体均结合,从而形成模拟Wnt分子与FZD受体和LRP5/6共受体的结合的复合物,进而激活Wnt信号通路,Wntβ-连环蛋白通路。

[0138] 本发明的一个实施方式为激活Wnt信号通路的方法,所述方法包括使表达FZD受体和它的LRP5/6共受体的细胞与有效量的本发明的包含FZD结合结构域和LRP5/6共受体结合结构域的FZD激动剂接触。

[0139] 本发明的FZD激动剂可以重组制备,例如通过Gibson组装(参见Gibson等(2009)Nature Methods 6(5):343-345和Gibson DG.(2011)Methods in Enzymology 498:349-361)来制备,或者该分子可以合成制备,例如使用商业合成装置(例如通过Applied Biosystems,Inc.、Beckman等的自动合成仪来合成制备。通过使用合成仪,可以用非天然氨基酸取代天然存在的氨基酸。具体的制备顺序和方式将根据便利性、经济性、所需的纯度等来确定。若需要,可以在合成期间或表达期间将各种基团引入肽中,这允许与其他分子或表面连接。

[0140] FZD激动剂的结合结构域可以通过接头与Fc结构域连接。在一些实施方式中,相邻的VH结构域和VL结构域可以通过肽接头彼此连接。在一些实施方式中,相邻的恒定结构域和可变结构域通过肽接头连接。接头可以是例如多肽接头或非肽接头。在一些实施方式中,FZD激动剂的恒定结构域和可变结构域通过肽接头与Fc结构域连接。合适的接头是本领域

众所周知的,例如XTEN接头(参见W02013120683,发明人Schellenberger等)。在一些实施方式中,肽接头包含至少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、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个或至少100个氨基酸。在一些实施方式中,肽接头的长度为1至100个、5至75个、1至50个、5至50个、1至30个、1至25个、5至25个、5至20个、5至15个、5至10个、1至10个或1至5个氨基酸。本发明的模块化方面允许将来源于结合FZD受体的抗体或结合LRP5/6共受体的抗体的结合结构域在Fc结构域的相对的末端混合和匹配以产生四价结合抗体分子,其可以与FZD受体-LRP5/6共受体复合物结合以激活Wnt信号传导。

[0141] 无论有或没有接头,FZD激动剂的Fc结构域的长度和灵活性允许本发明的四价结合抗体分子结合FZD受体和它的LRP5/6共受体,从而稳定与下游Wnt信号通路的激活兼容的受体构象。在本发明的一个实施方式中,无论有或没有接头,Fc结构域或包含CH3结构域的Fc结构域的片段超过100个氨基酸、跨度高至300Å,超过125个氨基酸、跨度高至375Å,超过150个氨基酸、跨度高至450Å,超过175个氨基酸、跨度高至525Å,或超过300个氨基酸、跨度高至900Å。优选地,Fc结构域的长度为约200个氨基酸至约300个氨基酸。

[0142] 如本文和所附权利要求中所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指示物。因此,例如,提及“细胞”包括多个此种细胞,提及“肽”包括提及一个以上肽和肽等同物(例如,本领域技术人员所知的多肽等)。

[0143] “亲和力成熟的”抗体或“成熟抗体”指与亲本抗体或源抗体相比,在一个或多个高变区(HVR)中具有一个以上改变的抗体,所述亲本抗体或源抗体不具有此类改变,此类改变导致抗体对抗原的亲和力或分子的其他期望的特性的改善。

[0144] “包含”指组合物/方法/试剂盒中需要所列举的要素,但是可以包括其他要素以形成权利要求范围内的组合物/方法/试剂盒等。例如,包含四价结合抗体分子的组合物为可以包含除了四价结合抗体分子之外的其他要素(如本领域中容易理解的,例如,与四价结合抗体分子结合(例如共价结合)的多肽、小分子或核酸等功能部分、促进四价结合抗体分子组合物的稳定性的试剂、促进四价结合抗体分子组合物的溶解性的试剂、佐剂等,由任何否定条件所涵盖的要素除外)的组合物。

[0145] “基本上由.....组成”指将所描述的组合物或方法的范围限定到不会实质上影响本发明主题的基本和新颖的特征的特定材料或步骤。例如,“基本上由所公开的序列组成”的四价结合抗体分子具有所公开的序列的氨基酸序列加上或减去基于其所源自的序列的序列边界处的约5个氨基酸残基的氨基酸序列,例如,比所记载的边界氨基酸残基少约5个残基、4个残基、3个残基、2个残基或约1个残基,或者比所记载的边界氨基酸残基多约1个残基、2个残基、3个残基、4个残基或5个残基。

[0146] “由.....组成”指从组合物、方法或试剂盒中排除权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。例如,“由所公开的序列组成”的四价结合抗体分子仅由所公开的氨基酸序

列组成。

[0147] 应当理解,当提供数值范围时,除非上下文另外明确指出,否则还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个间隔值,间隔为下限单元的十分之一。在设定范围内的任何设定值或中间值之间的每个较小范围和该设定范围内的任何其他设定值或中间值都涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在该范围内或排除在该范围内,任一个、两个限值包括在较小范围内或两个限值都不包括在较小范围内的各个范围也涵盖在本发明内,这受到在该设定范围中的任何特定排除的限值的约束。当设定范围包括一个或两个限值时,排除了那些所包括的限值中的一个或两个的范围也包括在本发明中。

[0148] 已知基本抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50至70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100至110或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基末端部分限定了主要负责效应子功能(例如,结合Fc受体以及抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)的激活)的恒定区。通过杵臼构造使肽二聚化的方法描述于“WO2018/026942,发明人Van Dyk等”、“Carter P. (2001) J. Immunol. Methods 248, 7-15”、“Ridgway等, (1996) Protein Eng. 9, 617-621”、“Merchant等, (1998) Nat. Biotechnol. 16, 677-681”以及“Atwell等, (1997) J. Mol. Biol. 270, 26-35”中。Fc区可以是Merrimack(杵链:Q347M、Y349F、T350D、T366W和L368M;白链:S354I、E357L、T366S、L368A和Y407V)、Merchant(杵链:T366W;白链:T336S、L368A和Y407V)或Merchant S:S(杵链中有额外S354C变体和白链中有Y349C变体的Merchant突变)。Fc区还可以含有改变它们的效应子功能的突变,例如,Fc区可以具有因氨基酸突变(例如DANG变体和LALAPS变体)而减弱的效应子功能。用于减弱抗体效应子功能的方法是本领域熟知的,包括例如Fc区中的氨基酸取代,例如N297G和D265A、N297G(DANG)变体、L234A、L235A、P331S(LALAPS)、LALAPS Merchant、LALAPS Merchant S-S变体(Merchant A.M.等,Nature Biotechnol,1998,第16卷第677-681页),或L234A、L235A、P329G(LALA-PG)取代,参见例如“Lo等, Effector Attenuating Substitutions that Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice. The Journal of Biological Chemistry第292卷第9期第3900-3908页,2017年3月3日”,通过引用并入本文。通常,从人类获得的抗体分子涉及IgG、IgM、IgA、IgE和IgD的任何类别,它们因分子中存在的重链的性质而彼此不同。某些类别还具有子类,例如IgG₁、IgG₂等。此外,在人类中,轻链可以是κ链或λ链。

[0149] 每个重链可变结构域(VH或VH结构域)和每个轻链可变结构域(VL或VL结构域)内的三个高度趋异段(称为互补决定区(CDR))插入更保守的侧翼段之间(称为“框架区”或“FR”)。因此,术语“FR”指天然存在于免疫球蛋白中的在CDR之间的和与CDR毗邻的氨基酸序列。VH结构域通常具有四个FR,在本文中称为VH框架区1(FR1)、VH框架区2(FR2)、VH框架区3(FR3)和VH框架区4(FR4)。类似地,VL结构域通常具有四个FR,在本文中称为VL框架区1(FR1)、VL框架区2(FR2)、VL框架区3(FR3)和VL框架区4(FR4)。在抗体分子中,VL结构域的三个CDR(CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)和VH结构域的三个CDR(CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)在三维空间中相对于彼此排列形成抗体可变区内的抗原结合位点。抗原结合位点的表面与所结合抗原的三维表面互补。可以根据如下对VL结构域和VH结构域的氨基酸序列进行编号以及鉴定/限定其中的CDR和FR:Kabat编号系统(“Kabat等,1991, Sequences of Proteins of

Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,马里兰州贝塞斯达”)或国际免疫遗传学信息系统(IMG T编号系统;Lefranc等,2003,Development and Comparative Immunology 27:55-77),两者均通过引用并入本文。本领域普通技术人员具有根据常规使用的编号系统(例如IMG T编号系统、Kabat编号系统等)对VL结构域和VH结构域的氨基酸残基进行编号以及鉴定其中的CDR和FR的知识。

[0150] 本文提及的术语“抗体”包括完整抗体和它们的任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。“完整抗体”或全长指包含通过二硫键互相连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白或它们的抗原结合部分。每条重链由重链可变区或结构域(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。每条轻链由轻链可变区或结构域(本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域(CL或CL1)组成。VH区和VL区可进一步细分为散布有更保守区域(称为框架区(FR))的高变区(称为互补决定区(CDR))。每个VH和VL由3个CDR和4个FR组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0151] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”(或简称为“抗体部分”或“抗体片段”)指抗体的保留与抗原特异性结合的能力的一个以上片段、部分或结构域。已经表明,全长抗体的片段可以执行抗体的抗原结合功能。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的示例包括:(i) Fab片段,由VL、VH、CL1和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含在铰链区通过二硫桥连接的两个F(ab)'片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等,(1989) Nature 241:544-546);(vi) 分离的互补决定区(CDR)。此外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH是由不同基因编码的,但可以使用重组方法通过合成接头将它们连接起来,使它们被制成单个连续的链,其中VL区和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如“Bird等,(1988) Science 242:423-426”和“Huston等,(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883”)。此类单链抗体也旨在涵盖于术语抗体的“抗原结合部分”内。还包括其他形式的单链抗体,例如双抗体(参见例如Holliger等(1993) PNAS. USA, 90:6444-6448)。

[0152] 如本文所用,“双抗体”或有时在本文中称为“Dia”是二聚体抗体片段。在双抗体的每个多肽中,重链可变结构域(VH)与轻链可变结构域(VL)连接,但与单链Fv片段不同,VL和VH之间的接头对于分子内配对而言太短,因此,通过一个多肽的VH和VL与另一个多肽的VL和VH配对形成各个抗原结合位点。因此,双抗体具有两个抗原结合位点,可以是单特异性的或双特异性的。参见例如“Holliger, P. 等,(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448”、“Poljak, R. J. 等,(1994) Structure 2:1121-1123”、“Kontermann和Dubel编辑, Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, 纽约,第790页 (ISBN 3-540-41354-5)”,通过引用并入本文。

[0153] 如本文所用,试剂(例如四价结合抗体分子或包含所述分子的药物组合物)的“有效量”指以必要的剂量以及在必要的时间段内有效实现期望结果的量。在一些实施方式中,治疗有效量为降低疾病(disease)、病症(disorder)和/或病况(condition)的一种以上症

状的发生率和/或严重性,稳定疾病、病症和/或病况的一种以上症状的一种以上特征,和/或延迟疾病、病症和/或病况的一种以上症状的发作的量。在一些实施方式中,施用于受试者的FZD激动剂的量为受试者体重的约0.001mg/kg至10mg/kg、0.5mg/kg至约10mg/kg或约0.5mg/kg至约1mg/kg。例如,在一些实施方式中,FZD4激动剂可以以例如每只眼睛约0.02至1.5mg、约0.05至1.0mg或约0.1至0.5mg的量施用于眼睛。

[0154] 如本文所用,术语“表位”包括能够特异性地结合免疫球蛋白或免疫球蛋白的片段或T细胞受体的任何蛋白决定簇。术语“表位”包括能够特异性地结合免疫球蛋白或T细胞受体的任何蛋白决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团(例如氨基酸或糖侧链)组成,通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。当解离常数 $\leq 10\mu\text{M}$ (例如 $\leq 100\text{nM}$,优选 $\leq 10\text{nM}$,更优选 $\leq 1\text{nM}$)时称为抗体特异性地结合抗原。

[0155] 免疫球蛋白分子的恒定区也称为可结晶片段区、“Fc区”或“Fc结构域”。Fc结构域由两个相同的蛋白片段组成,所述蛋白片段来源于抗体两条重链的第二和第三恒定结构域,IgG的Fc结构域具有高度保守的N-糖基化位点。Fc片段的糖基化对于Fc受体介导的活性至关重要。在本发明的一个实施方式中,四价结合抗体分子的Fc结构域被工程化改造,使其不靶向结合四价结合抗体分子以进行ADCC或CDC依赖性死亡的细胞。在本发明的一个实施方式中,四价结合抗体分子的Fc结构域是杵臼构造的肽二聚体。肽二聚体可以是异二聚体。

[0156] 术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用,指需要诊断、处理或治疗的任何哺乳动物受试者,特别是人类。

[0157] “LRP”、“LRP蛋白”和“LRP受体”在本文中用于指低密度脂蛋白受体相关蛋白家族的成员。这些受体是在受体介导的内吞作用过程中结合配体并将配体内化的单次跨膜蛋白。LRP蛋白LRP5(例如LRP5:NP_002326.2)和LRP6(例如LRP6:NP_002327.2)包含在激活Wnt- β 连环蛋白信号通路所需的Wnt受体复合物中。另参见人/小鼠LRP5和LRP6:<https://www.uniprot.org/uniprot/075197>,<https://www.uniprot.org/uniprot/Q91VN0>,<https://www.uniprot.org/uniprot/075581>,<https://www.uniprot.org/uniprot/088572>。

[0158] 如本文所用,术语“多肽片段”指具有氨基末端缺失和/或羧基末端缺失的多肽,但其中剩余的氨基酸序列与推定的天然存在的序列中的相应位置相同,例如来自全长cDNA序列。

[0159] 如本文所用,术语“互补位”包括与表位结合的抗体的可变区中的抗原结合位点。

[0160] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH结构域和VL结构域,其中,这些结构域存在于单条多肽链中。通常,Fv多肽还包含在VH结构域和VL结构域之间的多肽接头,所述多肽接头使scFv能够形成抗原结合所需的结构。有关scFv和其他抗体片段的综述,参见“James D.Marks,Antibody Engineering,第2章,Oxford University Press(1995)(Carl K.Borrebaeck编辑)”。

[0161] “单域抗体”(sdAb)或“纳米抗体”是由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。如本文所用,“V_HH”或“V_HH片段”指已被工程改造为不依赖于轻链的人VH(Nilvebrant等,Curr Pharm Des.2016,22(43):6527-6537;Barthelemy等,Journal of Biological Chemistry2007,283:3639-3654)。

[0162] 本文使用的术语“治疗”、“处理”等通常指获得期望的药理学和/或生理学效果。该

效果可以是预防性的(就完全或部分预防疾病或疾病的症状而言),和/或可以是治疗性的(就部分或完全治愈疾病和/或归因于该疾病的副作用而言)。如本文所用,“治疗”涵盖哺乳动物中疾病的任何治疗,包括:(a)预防在可能容易患疾病但尚未被诊断为患有该疾病的受试者中发生该疾病;(b)抑制疾病,即减缓或阻止其发展;(c)缓解疾病,即引起疾病的消退。治疗剂可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用。特别令人感兴趣的是对正在进行的疾病的治疗,其中,该治疗稳定或减少患者的不期望的临床症状。此类治疗期望在受影响组织的功能完全丧失之前进行。本发明的治疗可以在疾病的症状阶段期间实施,在一些情况下在疾病的症状阶段之后实施。

[0163] 本发明的四价结合抗体分子激活Wnt信号传导的能力可以通过多种测定来确定。本发明的四价结合抗体分子通常引发与FZD受体的天然配体所引发的反应或活性相似或相同的反应或活性。本发明的四价结合抗体分子激活Wnt信号通路,例如经典Wnt- β 连环蛋白信号通路。如本文所用,术语“激活”指与不存在本发明的FZD激动剂时的水平相比,Wnt信号通路(例如Wnt- β 连环蛋白信号通路)的胞内水平的可测量的增加。

[0164] 用于测量Wnt- β 连环蛋白活化水平的多种方法是本领域已知的。这些包括但不限于测量如下的测定法:Wnt- β 连环蛋白靶基因的表达;LEF/TCF报告基因的表达(例如TopFLASH、superTopFLASH、pBAR); β 连环蛋白稳定性;LRP5/6磷酸化;散乱蛋白(Dishevelled)磷酸化;轴蛋白(Axin)从细胞质易位至细胞膜以及与LRP5/6的结合。经典Wnt- β 连环蛋白信号通路最终通过转录因子TCF1、TCF7L1、TCF7L2和LEF1导致基因表达的变化。Wnt激活的转录响应已在许多细胞和组织中被表征。因此,通过本领域众所周知的方法进行的整体转录谱分析可用于评估Wnt- β 连环蛋白信号传导的激活。

[0165] Wnt响应基因表达的变化通常由转录因子TCF和LEF介导。TCF报告基因测定法评估TCF/LEF控制的基因转录的变化,以确定Wnt- β 连环蛋白信号传导的水平。Korinek, V. 等于1997年首次描述了TCF报告基因测定法。该方法也被称为TOP/FOP,其涉及使用位于驱动荧光素酶表达的最小c-Fos启动子的上游的三个拷贝的最佳TCF基序CCTTTGATC或三个拷贝的突变基序CCTTTGCC(分别为pTOPFLASH和pFOPFLASH),以确定内源性 β 连环蛋白/TCF的反式激活活性。这两个报告基因活性的比率(TOP/FOP)越高,表明 β 连环蛋白/TCF活性越高。该报告基因的更新更灵敏的版本称为pBAR,包含12个TCF基序重复(Biechele和Moon, *Methods Mol Biol.* 2008;468:99-110, PMID:19099249)。

[0166] 分子和细胞生物化学的通常方法可以在如下标准教科书中找到: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版(Sambrook等, CSH Laboratory Press 2001); *Short Protocols in Molecular Biology*, 第四版(Ausubel等编辑, John Wiley&Sons 1999); *Protein Methods* (Bollag等, John Wiley&Sons 1996); *Nonviral Vectors for Gene Therapy* (Wagner等编辑, Academic Press 1999); *Viral Vectors* (Kapliff&Loewy编辑, Academic Press 1995); *Immunology Methods Manual* (I. Lefkovits编辑, Academic Press 1997); 以及 *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology* (Doyle&Griffiths, John Wiley&Sons 1998)。

[0167] 除非另有定义,否则所使用的与本发明相关的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。通常,本文所述的细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白质和寡核苷酸

或多核苷酸化学和杂交的技术,以及与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白质和寡核苷酸或多核苷酸化学和杂交关联使用的命名法是本领域熟知和常用的那些。标准技术用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如电穿孔、脂转染)。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书或如本领域通常实现的或如本文所述的进行。前述技术和程序通常根据本领域众所周知的常规方法以及如本说明书全文中引用和讨论的各种一般性的和更具体的参考文献中所描述的来进行。参见例如Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)。本文所述的分析化学、合成有机化学以及医疗化学和药物化学的实验室程序和技术,以及与本文所述的分析化学、合成有机化学以及医疗化学和药物化学关联使用的命名法是本领域众所周知和常用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制、递送以及患者治疗。

[0168] 实施例

[0169] 实施例1:FZD4结合Fab噬菌体或FZD5结合Fab噬菌体的鉴定和表征。

[0170] A. 来自FZD4结合抗体5027和5044的亲和力成熟文库的FZD4抗体;来自FZD5结合抗体2919和2928的亲和力成熟文库的FZD5抗体。

[0171] 使用常规方法(基本上如“美国公开号2016/0194394,发明人Sidhu等”中所述,另外参见Persson等, *J. Mol. Biol.*, 2013年2月22日; 425(4):803-11 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23219464/>,两者通过引用整体并入本文)制备已知FZD4结合抗体5027和5044以及已知FZD5结合抗体2919和2928的亲和力成熟文库。

[0172] 表1和表2显示了从亲和力成熟文库中分离的抗体5044、5027、2919和2928的重链(CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)和轻链(CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)的6个CDR。

[0173] 在存在或不存在饱和浓度的5027双抗体-Fc(包含与Fc结构域连接的5027的VL和VH的双抗体)的情况下,在用人FZD4蛋白的胞外结构域(ECD)包被的96孔Maxisorp板中进行单点ELISA。将板用单克隆Fab噬菌体孵育,然后用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗M13抗体孵育。随后将孔洗涤8次,然后用3,3',5,5'-四甲基联苯胺/ H_2O_2 过氧化物酶(TMB)底物孵育5至10分钟。通过添加1M H_3PO_4 终止反应,在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度。测定结果描绘在图1和图2中,显示新鉴定的FZD4抗体在与抗体5027识别的位点重叠的位点处结合FZD4。FZD4结合抗体5027和5044描述于美国临时申请号62/885,781中,通过引用并入本文。

[0174] B. 范例(lead)FZD4抗体的表位作图。

[0175] ELISA测定在用FZD4 ECD野生型(FZD4)或突变FZD4蛋白(用来自FZD5的相应区域替换FZD4 ECD的片段)(FZD_swap1-18)包被的384孔Maxisorp板中进行。将板用10nM已知特异性结合FZD4的IgG(即5044和5027)或泛特异性的IgG(结合FZD4、FZD5和其他FZD受体)(即5016)孵育,然后用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗 κ 轻链抗体孵育。使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)和不结合FZD4或FZD5的IgG 4275作为对照。将孔洗涤6次,然后用3,3',5,5'-四甲基联苯胺/ H_2O_2 过氧化物酶(TMB)底物孵育3至5分钟。通过添加1M H_3PO_4 来终止反应,在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度,参见图2。泛FZD结合剂5016为阳性对照,其显示除了“FZD4_Swap10”之外的抗原是有功能的。FZD4特异性抗体5027和5044均不能与“FZD4 Swap 7”结合,这表明这些分子与FZD ECD的该区域结合。

[0176] C.FZD4 IgG的表征。

[0177] 全长FZD4结合IgG通过瞬时转染在Expi293细胞培养系统中表达(基本上如“Tao等 Tailored tetravalent antibodies potently and specifically activate Wnt/ Frizzled pathways in cells, organoids and mice. *Elife*. 2019年8月27日; 8: e46134. doi:10.7554/eLife.46134; PMID:31452509”中所述), 以及通过蛋白A亲和色谱分析法纯化。简而言之, 细胞在带挡板的细胞培养瓶中在Expi293表达培养基(Gibco)中生长至密度为约 2.5×10^6 个细胞/ml, 使用FectoPRO转染试剂(Polyplus-transfection)通过标准制造方案(ThermoFisher)用适当的载体转染。表达在37°C和8%CO₂并在125rpm摇动下进行5天。表达后, 通过离心去除细胞, 使用rProtein A Sepharose(GE Healthcare)从条件培养基中纯化蛋白。将纯化的蛋白缓冲交换到PBS或配制的稳定缓冲液(36.8mM柠檬酸、63.2mM Na₂HPO₄、10%海藻糖、0.2M L-精氨酸、0.01%Tween-80, pH 6.0)中用于储存。通过280nm处的吸光度测定蛋白浓度, 通过SDS-PAGE分析确认蛋白纯度。

[0178] 表达滴度测定为每升哺乳动物细胞培养物中纯化蛋白的毫克数。下表A中的尺寸排阻色谱(SEC)结果被定义为:“-”:SEC迹线上多个峰的证据, <50%单体种类;“+”:>50%单体种类, 延迟的保留时间(>14分钟);“++”:>单体IgG处于/接近预期保留时间的主峰的90%。通过与曲妥珠单抗的比较来确定标准保留时间。

[0179] 表A

[0180]

TRAC ID	表达滴度 (mg/l)	SEC 结果
13980	58	-
13981	40	-
13982	43	-
13983	65	++
13984	52	-
13985	61	++
13956	47	+
13957	52	+
13958	58	-
13959	46	+
13962	38	-
13963	56	-
13964	47	-
13965	74	++
13966	86	-
13967	87	-
13968	89	+
13969	72	-
13970	36	-
13971	46	++
13972	27	+
13973	41	+
13974	41	+
13975	41	++
13979	49	-

[0181] Trac ID与表1和表2中的抗体编号相对应。

[0182] D.FZD4 IgG的尺寸排阻色谱分析和ELISA特异性测量。

[0183] 使用Agilent Bio-Inert HPLC通过AdvanceBio SEC (300Å、2.7μm、4.6×300mm柱)以PBS流动相分离20微克的FZD4结合IgG。使用280nm处的吸光度监测蛋白洗脱。结果呈现在图3A中。

[0184] FZD4抗体的ELISA特异性测量是针对FZD1和FZD10这两个与FZD4最密切相关的FZD家族成员确定的。ELISA测定在包被有浓度为1μg/ml的FZD ECD野生型或突变蛋白并用0.5%BSA封闭过量结合位点的384孔Maxisorp板上进行。将板用10nM FZD4结合IgG孵育,然后用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗κ轻链抗体孵育。将孔洗涤6次,然后用3,3',5,5'-四甲基联苯胺/H₂O₂过氧化物酶(TMB)底物孵育3至5分钟。通过添加1M H₃PO₄来终止反应,在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度。结果呈现在图3B中。

[0185] E.FZD4或FZD5结合抗体的CDR的鉴定。

[0186] 表1和2中显示了FZD4结合免疫球蛋白和FZD5结合免疫球蛋白的CDR的氨基酸序列。CDR根据国际免疫遗传学信息系统(IMG T编号系统;Lefranc等,2003,Development and Comparative Immunology 27:55-77)来鉴定,按照“Persson等,J.Mol.Biol.,2013年2月22

日;425(4):803-11”中所述来注释,二者均通过引用并入本文。

[0187]

表 1 抗体 ID	文库	FZD4 结合抗体 CDR											
		L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	H1	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO	H3	SEQ ID NO
5044	F	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYYAPI	3	LSSYSM	24	YISSYYGYTY	51	PAPGHWF	79
13953	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GNYGPI	4	IAFYSI	25	YISPFSGITH	52	PAVGLAM	80
13954	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GYAPI	5	IYSYSI	26	YISSYYGYTY	51	STVGHGGM	81
13955	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYYAPI	3	ISSYSI	27	YISPPYYSYTY	53	PAPAHWF	82
13956	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GYVALI	6	LSSYSM	24	YISSYAGYTS	54	PALGHAGM	83
13957	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYFAPI	7	ISAYSI	28	YISPYFGLTG	55	PAPGHWGM	84
13958	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYYAPI	3	LSSYSI	29	YISSYYGYTY	51	PVAGHGGM	85
13959	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GYNAPI	8	LYSYSM	30	FISSFYGYTD	56	PAVGLHAL	86
13960	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYYAPI	3	LTSYSM	31	YISSYYGSTY	57	PAPGHWGM	84
13961	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYYAPI	3	ISSYSM	32	YISSYYSYTY	58	PAPGYGAL	87
13962	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GYFAPI	9	LFSYPM	33	YISPPYGYTN	59	QTAGHAGM	88
13963	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WFNAPI	10	LSAYSM	34	YISSYYGYTY	51	PAPGHWF	79
13964	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SNYAPI	11	ISSHSM	35	YISPFPSFTH	60	QAPGVSGI	89
13965	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYNAPI	12	LSSYSM	24	YISSYDSIID	61	PAVGHMAF	90
13966	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GFYAPI	13	LSSYSM	24	YISSYYSYTA	62	PTPGHGGL	91
13967	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYYAPI	3	ISAYAM	36	YISPPYGYTF	63	PAPGHGGM	92
13968	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GYSAPI	14	ISTYSM	37	YISPHYGFTS	64	PAVGLHGM	93
13969	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYFAPI	7	LHAFSM	38	YISPPYGYTY	65	PAPGHWGL	94
13970	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GFYAPI	13	ISGYSI	39	YISSYYGYTF	66	TAPGHGAF	95
13971	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GFYAPI	13	ISNYSI	40	IISNFGYTS	67	PALGLHAM	96
13972	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GYAGLI	15	ISAYSM	41	SISSYYGFTS	68	LAPGPAL	97
13973	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GFSSPI	16	LTSYAM	42	YISPPYGYTY	65	PAAGHLAL	98
13974	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GYAPI	5	LYYSI	43	YISPSYGSTY	69	PIPGHLAF	99
13975	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GHYAPI	17	LSSFSM	44	YISSFNSTF	70	PTWAHGAF	100
13976	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SFYAPI	18	IASYSI	45	YISSYYGSTY	57	PVLAHSF	101
13977	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GYRAPI	19	IHSNSM	46	YISPPYSFST	71	QTPGHSGM	102

[0188]

FZD4 结合抗体 CDR

表 1 续	抗体 ID	文库	L1	抗体 ID	文库	L1	抗体 ID	文库	L1	抗体 ID	文库	L1	抗体 ID	文库	L1	抗体 ID	文库
	13978	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	WHRAPI	20	LSTNSM	47	YISPYYSFTY	72	QAPGPWGM	103				
	13979	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	SFYAPI	18	LHSFSM	48	FISSYYGYTY	73	PAPGHGAF	104				
	13980	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	GYAPI	5	LTSYSM	31	SISPPYYSYTN	74	PTTAHMAL	105				
	13981	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	WYYAPI	3	ISSFSI	49	FINPYYSYTY	75	PAPGHWGM	84				
	13982	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	GYAPI	5	ISSYSM	32	YISSYYDYTY	76	PTPGHSGF	106				
	13983	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	GDFAPF	21	LPYYSM	50	IISSEYFGFTY	77	PAVGHGAL	107				
	13984	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	GYSSPI	22	ISSHSM	35	YISPYYSYTY	53	TAPGHPAM	108				
	13985	5044AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	WFYAPI	23	ISSYSI	27	YISSNFGSTY	78	PVPAHGAF	109				

FZD4 结合抗体 CDR

表 2A	抗体 ID	文库	L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	H1	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO	H3	SEQ ID NO
	5027	F	SVSSA	1	SASSLYS 2	SSYSLI	130	SSFYFM	148	TVVYPYLDYTY	985	AFPGSYHPM	199	
	13986	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	ASYLLI	110	STYFFI	139	TIYPYLNSTY	166	AYPGSYHPL	198	
	13987	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	SNYALI	111	TSFYFM	140	SVYYPYLDNTY	167	AFPGSYHPM	199	
	13988	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	SSSFLI	112	SSFYFI	141	TVVYSYIDITY	168	AFPFYHPM	200	
	13989	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	SSDSL	113	SAYYFI	142	TVVYPYRGYTY	169	GYPLAYYTPL	201	
	13990	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	STHFLI	114	SYFYFM	143	SVVYPYLSYTY	170	AFPGSYHPM	199	
	13991	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	ASYSLI	115	SSFYFI	141	SVVYPYLDFTY	171	ALQGHYHPM	202	
	13992	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	SAYTLI	116	TSEYYM	144	AIYYPYLDYTY	172	AFPGSYLPM	203	
	13993	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	SSVSLI	117	FTFYFM	145	SIYYPYLNITY	173	AFPGSYHPM	199	
	13994	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	SYYSLI	118	SSYYFI	146	TIYPSYDNTY	174	GFPGRYHPL	204	
	13995	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	SSYYLI	119	SSFYVM	147	SIYSYGNITY	175	APPLSYHPM	205	
	13996	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	ASYLLI	110	SSFYFM	148	AIYYPYLSYTY	176	AFPGRYHGM	206	
	13997	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	AYYFLI	120	SSFYYI	149	TVFPYLGRTY	177	AFPFYTPL	207	
	13998	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS 2	SSSFLI	121	STFYFM	150	SVVYPYLNITY	178	AFPGAYSMP	208	

[0189]

13999	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SAYSLI	122	SAFYYM	151	TVYPYLSYTY	179	AFPGAYHPM	209
14000	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSYALI	123	ASFYFM	152	TVYPYLNHTY	180	AFPGAYHPF	210
14001	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SYFSLI	124	SAFYFI	153	SIYPYLSYTY	181	AFPGAYHPM	209
14002	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SRFTLI	125	FPFYFM	154	SVYPYLNDDTY	182	AYPGFYHPI	211
14003	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSNTLI	126	SAFYFM	155	SVYSSLSHTY	183	AYPLSYHPM	212
14004	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSFSLI	121	ASYFYM	156	SVYPYLDFTY	171	ALPGFYHPF	213
14005	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSFALI	127	SVFYFM	157	SVYPYNDITY	184	GFPPTYHPL	214
14006	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	ANYALI	128	SSLYYM	158	SVYPYLDNTH	185	AIPGFYHPI	215
14008	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	ASYSLI	115	SNFYLM	159	SIYSYLNITY	186	AFPGSYHPM	199
14009	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSASLI	129	FSFYFI	160	SIYPYLDFTH	187	AFPGSYHPL	216
14010	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSYSLI	130	SAFYFM	155	AIYPYIGYTY	188	PFPAHYHPL	217
14011	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSYSLI	130	SSLYFM	161	TIYPFRGTTY	189	AYPGRYHPL	218
14012	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SAFYLI	131	YIFYYM	162	AIYPYLGTY	190	AFPGSYHPL	216
14013	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SAYFLI	132	SSFYFI	141	SVYPYLGDTY	191	AFPGFYHPF	219
14015	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	ASSSLI	133	TSYFYI	163	SVYSYLGTYF	192	AFPGSYHPL	216
14016	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SIYSLI	134	SYFYFM	143	AIYPYLSYTY	176	AFPGSYHPM	199
14018	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	ASYILI	110	FSFYFI	160	TVYPYLSHTY	193	AFPGSYHPM	199
14019	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	STGSLI	135	SDFYFI	164	TIYPFIIGNTY	194	AFPGSYHPF	220
14020	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSHSLI	136	SSFYFM	148	SVYPYVDYTY	195	AFPGFYHPM	221
14021	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSYTLI	137	SSFYFM	165	TVYPYLSFTY	196	ALPGSYHPF	222
14022	5027AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SYHYLI	138	STFYFM	150	SVYPYLDDDTY	197	AYPGSYHPL	198

[0190]

表 2B 抗体 ID	抗原 名称	筛选 ID	FZD5 结合抗体 CDR										SEQ ID NO	H3	SEQ ID NO
			L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	H1	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO			
14023	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSGVHGHLI	223	LIYTYI	308	TIYPASSSTS	381	GAM	381	
14024	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WFSSAHVPF	224	ITYPGM	309	TIFSSHGSTS	382	FGM	382	
14025	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSYGHHLI	225	ISYSYM	310	SIYSSSSSTS	383	GAL	383	
14026	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYTSGHVLI	226	ISFFYM	311	TIDSSTGSTT	384	GAL	384	
14027	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYASDHGLI	227	IPYFYM	312	SIYSSSSGSTS	385	GAM	385	
14028	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WFSPGNVLI	228	ISYYYI	313	SIYPSSSSTT	386	AAF	386	
14029	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSTRNILI	229	ISYAYM	314	SIYPSSSSTA	387	YAF	387	
14030	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYFSDHDLF	230	ITYFYM	315	SIYPSFGSTS	388	GGM	388	
14031	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSGDVLI	231	IYYSYI	316	SIYSSNGGTS	389	GAM	389	
14032	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSADVLF	232	ILNTYM	317	SIYPSSSSTA	387	SSL	387	
14033	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSGHGLI	233	ISFYI	318	SIYPASSSTS	390	GGI	390	
14034	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSGHALI	234	LAYSYM	319	SIYPSSGDTS	391	GAM	391	
14035	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSNHIPI	235	IRYSYI	320	AIYSSSSSTS	392	GAM	392	
14036	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSSNVLI	236	ITYSYM	321	TIYPSSGSTA	393	FAM	393	
14037	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYFSDRVLI	237	IINTYM	322	SIYSAPSSTA	394	GAI	394	
14038	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYPSSSHVLI	238	ISYSYM	310	TIYPSSGSTA	393	GGM	393	
14039	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSRHHLI	239	LANSYM	323	TIYSSSSGSTS	395	GAM	395	
14040	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSTGRVLF	240	LSYTYM	324	SIDPSSGSTS	396	FGM	396	
14041	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WFPTGHVLF	241	ISYSYI	325	TIYPSSGSTG	397	FGM	397	
14042	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYAPRHVLI	242	ISYSYI	325	SIYSSSSSTS	383	GAM	383	
14043	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WFTSGLVLF	243	LSYLYI	326	SIYPSSSSTS	398	GGM	398	
14044	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSGHVLF	244	ISYAYI	327	SIYSSPSTS	399	GAM	399	
14045	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYPGAPVLI	245	IAYSYM	328	SIYPSSSSTS	398	GAM	398	
14046	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSSNVLI	236	FIWESLLVS	329	TIYPSSGSTA	393	FAM	393	
14047	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSANALF	246	ISHSYM	330	SIDSSSGSTS	400	GAL	400	
14048	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSGDVLI	231	LRYSYI	331	TIYSASGSTT	401	GAL	401	
14049	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSSNHVLI	247	ISYAYM	314	SISPSDSTS	402	GAL	402	
14050	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYSAAHILF	248	ISYSYM	310	SIDPSSGLTS	403	GAL	403	

[0191]

FZD5 结合抗体 CDR

表 2B 抗体 ID	抗原名称	筛选 ID	L1 SEQ ID NO	L2 SEQ ID NO	L3 SEQ ID NO	H1 SEQ ID NO	H2 SEQ ID NO	H3 SEQ ID NO	SEQ ID NO
14051	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFASGHVLI 249	IRYAYM 249	TIDFSFGSTS 332	YAM 404	404
14052	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFSSGDSL 250	ITHLYM 250	SIYPSSGSTS 333	AAL 405	405
14053	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYASGNVLI 251	LSIFYM 251	TIYPSSSSTS 334	GAF 406	406
14054	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFSPGHLLI 252	LSYSYI 252	AIYPSPSSTS 335	GAM 407	407
14055	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYPSGHVLF 253	ISYSFM 253	SIYSTSGSTS 336	GGL 408	408
14056	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFAAGHVLI 254	IAYVGI 254	AITPSSNNTS 337	FGF 409	409
14057	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFRSAHVLI 255	LSYSYM 255	SIDPSSSSTA 338	FGF 410	410
14058	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFASGHIL 256	ISYSFM 256	SIYRSRGSTA 336	GAM 411	411
14059	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFSGGHAL 257	IAYFYI 257	TIDPSSGSTS 339	GGL 412	412
14060	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFASAHVLF 258	LSSSYM 258	SIGPSSGSTS 340	FGF 413	413
14061	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYSPGHVLI 259	LSYSYM 259	SIYPSSSSTS 338	GGI 398	398
14062	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYASGLVLI 260	IYYSYM 260	SIDPSSSSTS 341	GGM 414	414
14063	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYTSGHVLF 261	ITYSYM 261	SIYPSPSSTS 321	GGM 415	415
14064	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFSFPHAL 262	LHYGGI 262	SISSEFSSTS 342	FGF 416	416
14066	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYASGTDLI 263	ISYSYM 263	TIYSSSSTA 310	GGM 417	417
14067	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYSSGRLLI 264	IGYAYM 264	SIYSSPGSTA 343	GAL 418	418
14068	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFSSPHVLF 265	LSYSSI 265	SICPFCSTS 344	FGF 419	419
14069	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFASASSLF 266	LSYDGI 266	TIYSSSGSTS 345	FGL 395	395
14070	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYPSHHVLF 267	LSYAYM 267	SIHPFDGSTS 346	GAL 420	420
14071	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFAHHVLF 268	ISYSGI 268	SISSSSGSTA 347	FGM 421	421
14072	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFPSGNVLF 269	ISSSYM 269	TIDPYAGSTS 348	FAM 422	422
14073	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYSSNNVLI 270	LSYSYM 270	SIYPSSGSTA 338	GGM 423	423
14074	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFSSRHVLF 271	LSYSGM 271	TIYPSSSSTS 349	FGM 406	406
14075	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYFSDHDL 272	GFTISYFFM 272	SIYPSDSTS 350	GAM 424	424
14076	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYSSGGVLI 273	ISYSFI 273	SIYPSSGHTS 351	GAL 425	425
14077	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFPSGHVLF 274	ISYSYM 274	SIDPSSGSTS 310	FGM 396	396
14078	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYSSTHVLF 275	LSYTYM 275	SIYSSPGSTS 324	GGM 426	426
14079	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYSSGSALI 276	ISHAYM 276	SIYSSPGSTA 352	FAL 418	418
14080	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WFSPGSVLI 277	LLFFYM 277	SIDPSSGFTS 353	GAM 427	427
14081	FZD5	2919AM	SVSSA 1	SASSLYS 2	WYPSAHILF 278	IAYSYM 278	SIYPASSSTS 328	GGM 390	390

[0192]

FZD5 结合抗体 CDR														
表 2B 抗体 ID	抗原 名称	筛选 ID	L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	H1	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO	H3	SEQ ID NO
14082	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYGGGGIL	279	LSYFYM	354	SIFSSSSSTS	428	GAM	
14083	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WFTSGRDLF	280	GFTLISSSI	355	SIYPAPSTP	429	GGM	
14084	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WYLSRNIL	281	LSYSYI	335	SIYSSSSSTS	383	GAM	
14085	FZD5	2919AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	WFSGRDALF	282	ITNSYM	356	SIYSPSSTS	399	GGL	
14369	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	283	ISFSSI	357	SIYPSYSSSF	430	YYAF	483
14370	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSM	358	TIYPYSSSTL	431	YYAF	483
14371	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AHYFPI	285	ISYSSM	358	SIYSSYSSTY	432	YYAM	484
14372	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSM	358	SIYPSYSVTY	433	YYGM	485
14373	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SHYYPI	286	LSFSSM	359	SIYPPYGSTF	434	YYAM	484
14374	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSM	358	SIYSSYSSTY	432	YYGF	486
14375	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GFYYPI	287	ISFGSI	360	SIYPSYSSTF	435	YYAM	484
14376	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ITYYSS	361	SIYPAYSSTY	436	YYAF	483
14377	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SFYFPI	289	ISYSAI	362	SIYSSYSSTF	437	YYAM	484
14378	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSM	358	SIYSSYGSTY	438	YYAM	484
14379	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	ADYFPI	290	ISYSSM	358	SIYPSYSSTY	439	YYGM	485
14380	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ISYSS	363	SIYSYYGSTY	440	YYAM	484
14381	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISFSSI	357	TIYSLFGATF	441	YYGF	486
14382	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SFYFPI	289	ISYSSM	358	SIYPSYSSTY	439	YYAF	483
14383	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFHYPI	291	ISFSSI	357	SIYPSYSSTY	439	YYAM	484
14384	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ISFSSI	357	SIYPAYGATF	442	YYGM	485
14385	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AYYYPI	292	ISYSS	363	SIYSSYSSTF	437	YYAF	483
14386	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	VFYFPI	293	ISYSSM	358	SIYSSYSSTY	432	YYAF	483
14387	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SFYFPI	289	ISYSSM	358	SIYPPYSSTY	443	YYAM	484
14388	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	LSYSSM	364	SIYPAYSSTY	436	YYGM	485
14389	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	ANYFPI	294	ISFGSI	360	SIYSSYSSTY	432	YYAM	484
14390	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	GFYFPI	295	ISYSS	363	SIYPSFGSTY	444	YYAM	484
14391	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSM	358	SIYPSISPTY	445	YYGM	485
14392	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	IAYSSM	365	SIYSSYGSTF	446	YYAF	483
14393	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AYYFPI	296	ISYSS	363	SIYPAYSPTY	447	YYAF	483
14394	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFIFPI	297	ISYSAM	366	SIYPSYSSTY	439	YYAL	487

[0193]

表 2B 抗体 ID	抗原名称	筛选 ID	FZD5 结合抗体 CDR										SEQ ID NO	
			L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	H1	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO		H3
14395	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AYYYPI	292	ISYGV1	367	SIYSAYSSTF	448	YYAF	483
14396	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SFYFPI	289	ISYSS1	363	TIYPYDPTY	449	YYAF	483
14397	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	LSYSSM	364	SIYSSYGSTY	438	YYAM	484
14398	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ISYSS1	363	SIYPSYGSTY	450	YYGM	485
14399	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSM	358	SIYPHYGATF	451	YYGM	485
14400	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ISYSS1	363	SIYPSYGSTF	452	YYAM	484
14401	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFFPPI	298	ISYSS1	363	SIYSSYSATY	453	YYAM	484
14402	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SFYYPPI	299	ISYSSM	358	SIYPSYSSTY	439	YYAF	483
14403	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	IPYGSM	368	SIYPSYGSTF	452	YYAM	484
14404	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	ALYYPI	300	ISYSSM	358	SIYPSYSTF	435	YYAM	484
14405	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSAM	366	SIYPYYGPTY	454	YYAF	483
14406	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	VFYYPPI	293	ISYSS1	363	SIYPFYGSTF	455	FYAF	488
14407	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	RFYFPI	301	ISYSS1	363	AIYPSYSSTN	456	YYAM	484
14408	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ISYSS1	363	SIYPYSSSTH	457	YYAM	484
14409	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	LYYFPI	302	IAYSAM	369	SIYPSYSSTY	458	YYAM	484
14410	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	LFSS1	370	SIYPSYSTF	435	YYAF	483
14411	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AYYFPI	296	ISYSSM	358	SIYSSYGSTY	438	YYGM	485
14412	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSYFPI	303	ISYSSM	358	SIYSNYSSSY	459	YYAM	484
14413	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	LYSS1	371	TIYPSYGSTY	460	YYAM	484
14414	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSM	358	SIYPSFGSTF	461	YYAI	489
14415	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AHYFPI	285	LSYGS1	372	SIYPSYGSTY	450	YYGM	485
14416	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	ASYFPI	304	ISYSSM	358	TIYPSYSSTY	462	YYAM	484
14417	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	IAYSAM	365	TIYSSYGATS	463	YYAF	483
14418	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AHYYPPI	305	ISYSS1	363	SIYPSYSTI	464	YYAM	484
14419	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AGFFPI	306	ISYSS1	363	TIYPYYGATY	465	YYGF	486
14420	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSYYPI	307	ISYSS1	363	SIYSGYSATY	466	YYAM	484
14421	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ITYSSM	373	SIYPSYGSTY	450	YYGF	486
14422	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSS1	363	TIYPSYSSTY	462	YYAM	484
14423	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	LGYGSM	374	SIYPSYGSTY	450	YYAM	484
14424	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSM	358	SIYPSYSATF	467	YFAL	490

[0194]

表 2B 抗体 ID	抗原名称	筛选 ID	FZD5 结合抗体 CDR											
			L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	H1	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO	H3	SEQ ID NO
14425	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	IGYSSI	375	TIYPSYSSTF	468	YYAF	483
14426	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ITYGSI	376	AIYSSYGSTY	469	YYAF	483
14427	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ISYSSM	358	SIFPYYGSTY	470	YYGF	486
14428	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSM	358	SIYPFYSTTF	471	YYAM	484
14429	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	SSYYPI	307	ISYGSM	377	SIYPSYSATF	467	YYGM	485
14430	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ISYSSM	358	SIYPSYGSTS	472	YYGM	485
14431	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	IYYSSM	378	SIPTYGSTV	473	YYGM	485
14432	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSI	363	TIYPNYSSY	474	YYAM	484
14433	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	IFYSSM	379	SIYPSYSATY	475	YYAM	484
14434	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ISYSSM	358	SIYPGYSSY	476	YYAM	484
14435	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AHYFPI	285	IAYSSM	365	TIYPSYSSTY	462	YYAM	484
14436	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ISYSSI	363	SIYPSYSSTS	477	YYGM	485
14437	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSM	358	SIYSGYGSTY	478	YYGM	485
14438	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISYSSM	358	SIYPSYGSTY	450	YYGM	485
14439	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	LSFSSM	359	SIYSGYSATY	466	YYAL	487
14440	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AYYFPI	296	ISYSSM	358	SIYPSYGSTN	479	YYAF	483
14441	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	LSYSSI	344	SIPTYGSAY	480	YYGM	485
14442	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ITYSSM	373	TIYSSYGSTY	481	YYAM	484
14443	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYFPI	284	ISFSSM	380	AIYPPYGSTY	482	YYGF	486
14444	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AHYFPI	285	ISYSSM	358	SIYSSYGSTY	438	YYGM	485
14445	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	ASYFPI	304	LSYSSM	364	SIYPSYSSTF	435	YYAM	484
14446	FZD5	2928AM	SVSSA	1	SASSLYS	2	AFYYPI	288	ISYGSM	377	SIYPSYGSTY	450	YYGM	485

[0195] 实施例2:合成LRP结合抗体的鉴定和表征

[0196] A. 靶向LRP5和LRP6的合成抗体的噬菌体克隆ELISA。

[0197] 单点ELISA在包被有小鼠LRP5-his蛋白的ECD或人Fc并用BSA(0.5%)封闭的96孔Maxisorp板上进行。将板用滴度 $>10^9$ 噬菌体/ml的单克隆Fab噬菌体或VH噬菌体孵育,然后用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗M13抗体孵育。将孔洗涤8次,然后用3,3',5,5'-四甲基联苯胺/ H_2O_2 过氧化物酶(TMB)底物孵育5至10分钟。通过添加1M H_3PO_4 来终止反应,在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度。结果呈现在图4中。结果表明合成抗体与LRP5结合。LRP5结合抗体2459、2460和8716描述于美国临时申请号62/886,913中,通过引用并入本文。

[0198] 单点ELISA在包被有人LRP6-Fc蛋白嵌合体的ECD的96孔Maxisorp板上进行。将板用滴度 $>10^9$ 噬菌体/ml的单克隆Fab噬菌体或VH噬菌体孵育,然后用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗M13抗体孵育。将孔洗涤8次,然后用3,3',5,5'-四甲基联苯胺/ H_2O_2 过氧化物酶(TMB)底物孵育5至10分钟。通过添加1M H_3PO_4 来终止反应,在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度。结果呈现在图5A和5B中。结果表明合成抗体与LRP6结合。LRP6结合抗体2539、2540和2542描述于美国临时申请号62/886,918中,通过引用并入本文。

[0199] B. 靶向LRP5和LRP6的合成抗体的CDR的鉴定。

[0200] 表3和表4中显示的LRP5结合免疫球蛋白和LRP6结合免疫球蛋白的CDR根据国际免疫遗传学信息系统(IMGT编号系统;Lefranc等,2003,Development and Comparative Immunology 27:55-77)来鉴定,按照“Persson等,J.Mol.Biol.,2013年2月22日;425(4):803-11”中所述来注释,二者均通过引用并入本文。

[0201]

表 3	LRP5 - 抗体		LRP5 结合抗体 CDR											
	抗体 ID	文库	抗原	L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	H1	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO	H3
2459	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	ASYPAPI	492	LSYYYM	527	SIYSSYGYTY	552	WHSVSGHYSGM	584	
2460	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	SSYSLI	130	FSSSSI	528	SISSSYGYTY	553	GGSGVSHYGSVYYSSWWAL	585	
8716	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	YWAYYSPI	493	FSSSSI	528	SISSSYGYTY	553	SWAM	586	
9931	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	SSSGHLI	494	LYYYSM	529	YISSYYSYTS	554	WHSV'GAHYGWAI	587	
9932	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	PYGYPI	495	IYYYSM	530	SISSYGYTS	555	SWWYWSYHGAAAM	588	
9933	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	FHGLI	496	ISSSYM	348	SIYSSYTS	556	GYSYVWYGVYYHGYGAM	589	
9934	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	YWFLI	497	LYYYI	531	SISPYGYTS	557	SGYGWYAM	590	
9935	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	HSYGYPI	498	ISYSYM	310	SISSYGYTY	553	SYWGYWAAL	591	
9936	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	YYAWYLI	499	ISYYSM	532	SIYSSYGYTY	552	GGVYYPSYAGWPYGM	592	
9937	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	AAYSPI	500	ISSSYM	348	SIYPSYGYTY	558	HYAWVVGAF	593	
9938	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	YYSWYPPF	501	ISYSYM	310	SIYSYYSYTS	559	GGGAHWGYSL	594	
9939	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	SFYPI	502	LSSYI	29	SIYPPYGYTS	560	SGPVYASYSWAWYYYGAL	595	
9940	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	YYWYYPF	503	LSYYI	533	SIYSYSSY	561	YSWGAYGYGAM	596	
9941	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	WGSPi	504	FSSSSI	528	SIYSSSGSTY	562	YYYHYSVPVYAAL	597	
9942	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	YSSWYLI	505	LYYYSM	529	SIYSSSGSTY	562	SPYYGFFYSGFYHWWVYFGF	598	
9943	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	GAYLI	506	LYYSSM	534	YIYSYGYTY	563	AAWGWHPAF	599	
9944	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	HFYYYPi	507	IYSSYI	535	YISSYYGSTY	57	GGFFYYAGGWPYASYAWAF	600	
9945	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	AFHSPI	508	LYYSSM	534	YIYPPYGYTS	564	AWYSYVGL	601	
9946	F	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASSLYS 2	AWYPI	509	ISYSSM	358	SIYPPYGYTY	565	GVYYGGYWGAGGYPAAL	602	
12600	H	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASDLYS 491	YAGAGLI	510	FTAYAM	536	SIYSSGGYTA	566	RSYYFAL	603	
12601	H	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASDLYS 491	SYSYPI	511	LGGYGI	537	GIYPSGGYTA	567	SSTYSYYHYFAL	604	
12602	H	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASDLYS 491	YYRSRLI	512	FASAWM	538	RISPSGGYTA	568	STRWHSAYAYYSHAM	605	
12603	H	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASDLYS 491	SYFYPI	513	IGGAAM	539	GISASGGATA	569	SRPSWYWSYHYFAL	606	
12604	H	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASDLYS 491	GFFPI	514	FSSSSI	528	GISTSGGATA	570	SYYGYSRFG	607	
12605	H	mLRP5-his	SVSSA I	SVSSA I	SASDLYS 491	SHSYPI	515	FASYGM	540	SIYPSGGYTA	566	SYSFHYAWPRYHYGAL	608	

[0202]

表 3	LRP5 - 抗体		LRP5 结合抗体 CDR											
	抗体 ID	文库	抗原	L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	H1	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO	H3
12606	H	mLRP5-his	SVSSA 1	SASDLYS 491	SHYYPI	286	IAGSSI	541	GISASGGYTA	571	YDSGYYAWYYHDRAM	609		
12607	H	mLRP5-his	SVSSA 1	SASDLYS 491	RGSGPI	516	LTGDWM	542	GIYPSGGATA	572	FGSPHYGM	610		
12608	H	mLRP5-his	SVSSA 1	SASDLYS 491	RYSGGLI	517	FTSYSM	543	GIYPSGGSTA	573	PRYYAAYSSGGF	611		
12609	H	mLRP5-his	SVSSA 1	SASDLYS 491	SARYYYLI	518	LNAAM	544	GISASRGATA	574	SHSSGSRSRGL	612		
12610	H	mLRP5-his	SVSSA 1	SASDLYS 491	SSYSLI	130	LAGAGM	545	RISTSGGYTA	575	YSFRYPSYAM	613		
12611	H	mLRP5-his	SVSSA 1	SASDLYS 491	SYRGYYLI	519	IGGAAM	539	GIYASGGATA	576	GSRYSGF	614		
13218	2539 AM	mLRP5-his	SVSSA 1	SASSLYS 2	FSWGLI	520	ISYYPM	546	YISPSGYTF	577	HYYFRWSRGM	615		
13219	2539 AM	mLRP5-his	SVSSA 1	SASSLYS 2	YSWLPI	521	IVFGSI	547	HIAPYYGFTY	578	VNFIRFRGM	616		
13378	2542 AM	mLRP5-his	SVSSA 1	SASSLYS 2	FFRPI	522	ISSNYI	548	SINPSYSYTF	579	AVRRSQGI	617		
13379	2539 AM	mLRP5-his	SVSSA 1	SASSLYS 2	YSRRLF	523	LTYTSM	549	SISPFHGHTF	580	FPYFAWVGGM	618		
13380	2539 AM	mLRP5-his	SVSSA 1	SASSLYS 2	FIRVPI	524	ITYYSM	550	SITSYYGNTD	581	SHYFPWTVAL	619		
13558	2540 AM	mLRP5-his	SVSSA 1	SASSLYS 2	FYVPPF	525	N.D.		SIYPYYGFTD	582	ASYHASFDGL	620		
13559	2540 AM	mLRP5-his	SVSSA 1	SASSLYS 2	GYSFGQ	526	IADSSI	551	SISPYFSYTR	583	TSIFKRFAGM	621		

[0203]

表 4 LRP6- 抗体		LRP6 结合抗体 CDR												
抗体 ID	文库	抗原	L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	HI	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO	H3	SEQ ID NO
2539	F	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YSWGPF	622	ISYSSI	363	YISSYGYTY	51	AHYFPWAGAM	813
2542	F	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YYWPI	623	ISSYYI	683	SIYSSYGYTS	741	TVRGSKKPYFSGWAM	814
2540	F	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YYFLI	624	ISYSSI	363	SISPYGYTY	742	SSYFPWFSAM	815
12612	H	LRP6-Fc	SVSSA	1	SADLYS 491	491	YRYWRPI	625	FSGDAM	684	RISSGGYTA	743	ASYYSNYYYGPAM	816
12613	H	LRP6-Fc	SVSSA	1	SADLYS 491	491	GPWGLI	626	ISGAWM	685	RIYPSGGTTD	744	GWFSFRSYRYSYYYSAL	817
12614	H	LRP6-Fc	SVSSA	1	SADLYS 491	491	RYSSPI	627	FTTYSI	686	GISTSGGYTD	745	SGHPRYYSRRHSYGM	818
12615	H	LRP6-Fc	SVSSA	1	SADLYS 491	491	YRYWYGPI	628	FAASGI	687	YISPSGGYTD	746	SYYSNYYYYYDAM	819
12979	2539AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YSWALF	629	IFSSM	688	GISSYGFYTY	747	AHYFPWAGAL	820
12980	2539AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	ISWGLI	630	IRYSSI	689	GIFSNYGPTT	748	AHYFRRARGL	821
12981	2539AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YFSYPI	631	LSYSSI	344	FISSYYSFTH	749	SHYFPWAGAM	822
12982	2539AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YRWALF	632	LAYSSI	690	SISSYYGFTY	750	AHYFPWAGGM	823
12983	2539AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YSRILF	633	LRYASM	691	YIASFYGDTY	751	SYYYPRSRGM	824
12984	2539AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YSLRPI	634	LSFSSI	370	HISPYGYGTH	752	SHYFPWAVAM	825
12985	2539AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YSRGLI	635	IFYSSI	692	YISSYYSYTY	58	SHYFPWAVAM	825
12986	2539AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YFWGLI	636	LSYSSM	364	NITPYGYTS	753	SHYFPWFAAM	826
12987	2539AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YSWGLI	637	INYSSI	693	GISSYYSYTY	754	ANYFPWAYAM	827
12988	2539AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	DSWGLF	638	ISYSSM	358	LITSYGYTT	755	AHYFPWVVGAM	828
12989	2539AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YYWGLI	639	LSYSSI	344	FISSYGYTY	73	SHYFPWAGAL	829
13002	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YYILI	640	IAFSSI	694	SISSYGYTS	555	SSYFPWFSAL	830
13003	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YYILI	641	LFYSSM	695	FISPYYSFTN	756	SSYFPWLSDM	831
13004	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	HSFPI	642	ISYSSM	358	NITSYGYTT	757	SSYFPWVSGM	832
13005	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YHHLI	643	ISFASM	696	SISPYYSYTS	758	SSYFPWFSAM	815
13006	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YYSPI	644	IFYSSI	692	SISPYGYTD	759	SSYLPWFSAL	833
13007	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	2	YYYPI	645	ISFYSI	697	SISSYYSYTD	760	SSYFPWFTAL	834

[0204]

表 4 LRP6 - 抗体		LRP6 结合抗体 CDR												
抗体 ID	文库	抗原	L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	H1	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO	H3	SEQ ID NO
13008	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YHFLI	646	ISYSSI	363	AIYSYSYTYI	761	SSYFPWVGGF	835
13009	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	647	LSYSSI	344	SISPYYSYTS	758	SSRFPWFYGL	836
13010	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YDFLI	648	ISYSSM	358	SISSSYGYTS	555	SSYFPWFSAL	830
13394	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YYILI	641	LFYASM	698	SISSSYGYTS	555	SSYFPWFSAM	815
13395	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YYYLI	640	ISYSSI	363	SISPPYGFLL	762	SSYFPWFSAM	815
13396	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	647	IAYASI	699	SISSSYSYTY	763	SSYFPWFSAM	815
13397	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	647	ITYSSI	361	SISSSYGYTA	764	SSYFPWSSAM	837
13398	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	NSFLI	649	ISRSSI	700	GISSYGYTR	765	SHYFPWLSAL	838
13399	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	650	ISYASI	701	SISPPYGYTR	766	ASYYPWFSAM	839
13400	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YGFLI	651	LDYSSI	702	SISPPYSYTT	767	SSYIPWRYAI	840
13401	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	624	ISYSSI	363	SISPPYSYTN	74	SSYFPWISAM	841
13402	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	647	IYYYSM	530	GISSYYSYTS	768	SSYFPWISAL	842
13403	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	647	ISYSSM	358	SISPPYSFTS	769	SSRFPWISGM	843
13404	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YNFLI	652	ISYSSI	363	SISSSYGFST	68	SSYFPWFSAL	830
13405	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	647	ISYSSI	363	SISSSYGFST	68	SPYFPWSSAL	844
13406	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	647	LSYSAI	703	YISPPYGYTY	65	ASYLPWFSAM	845
13407	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	SSFLI	653	LSGFGI	704	FISSYGYTA	770	SSYLPWITAM	846
13408	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YVFLI	654	LSFASM	705	SISSSYGYTP	771	SAYFPWFAAL	847
13409	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	647	LAYNSI	706	SISSSYSYTN	772	SSYFPWFSAM	815
13410	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YGPI	655	ISFSSI	357	SISSSYGYTL	773	SSYFPWFFAM	848
13411	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	656	LYYSNI	707	YISSYGYTS	774	SSYFPWFSAL	830
13412	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	657	IHYYSI	708	SISPPYSFTD	775	SSYFPWFSAM	815
13413	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YDFLI	648	ISFASI	709	SISSSYSSFTN	776	SSHFPWVSAL	849
13414	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	644	IYYSSM	378	SISPPYGYTS	557	SSYFPWVSAM	850
13415	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	1	YFPI	624	LSYFSM	710	SISSSYGFNT	777	SSHFPWFSAM	851

[0205]

表 4 LRP6 - 抗体		LRP6 结合抗体 CDR												
抗体 ID	文库	抗原	L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	H1	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO	H3	SEQ ID NO
13422	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	FYGPPI	655	LFYSSM	695	TISPYYGYS	778	SSYFPWFSAI	830	
13428	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YTLPI	658	ISFSSM	380	HISSYYGFTS	779	SSYFPWFSAI	830	
13430	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YRFPPI	659	ISYFSI	711	SISPYYSYTN	74	SSYFPWFSAI	852	
13431	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YHLLI	660	LYNSI	712	AHPYYGYTS	780	SSRFPWFPAI	853	
13432	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YSFPI	661	LSYASI	713	SISYYGYTG	781	SSYFPWFSAI	815	
13435	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YFLPI	662	LSYSSM	364	SISYYGYTY	782	SSYFPWFSAI	830	
13436	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYFPI	647	ISYASM	714	SISYYGYTD	783	SSYVPWFYAL	854	
13437	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YDNLI	663	ITYSSI	361	SISYYGYTS	68	SSYFPWFSAI	815	
13438	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YLFPI	664	ISYYSI	715	SIYSYYGYTT	784	ASYFPWFPAI	855	
13439	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YFFPI	665	LHSSI	716	SISHYGYTH	785	SSYFPWFAL	856	
13440	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYIPI	666	IAYNSM	717	SISYYSYTD	760	SSYFPWFSAI	830	
13441	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	FNFLI	667	LSYSSI	344	YISSYGYTA	786	SSYFPWFSAI	857	
13442	2540AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YNYLI	668	LAYSSI	690	SISYYGYTY	787	SSYLPWFSAI	858	
12990	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYWPI	623	ISLFEM	718	SIYSSSYTS	788	SFNGAKKPYFSGWAM	859	
12991	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYWPI	623	IPSYFM	719	SIYSSSYTA	789	NVVVSRKPYFERSAM	860	
12992	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYWPI	623	ISSSYM	348	SIYSSSYTG	790	TVPGSKRPFASLAI	861	
12993	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYWPI	623	ISSYFI	720	SIYPSYSYTS	791	NVRGFRKPYFERSAM	862	
12994	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYWPI	623	LSSYYM	721	SIYRSFYTA	792	NVPGIKRPFYFTAWAM	863	
12995	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	SYWPI	669	LHSYYI	722	NIYSSYGYTS	793	TIRGSKRPFYFAASGL	864	
12996	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYWPI	623	LSSYYM	721	SIYSSSYTS	788	TARENKKPYFSGWAM	865	
12997	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYRPI	670	IGSYYM	723	AIYSPYGYTS	794	TLPLSKKPYFSLWAF	866	
12998	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYWPI	623	LGSYYI	724	TIYSSYSYTS	795	TFHGSKKPYFSGRAM	867	
12999	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYWPI	623	LTSYYI	725	SIYPSYSYTS	791	SIRGSKKPYFSRLAL	868	
13000	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYWPI	623	ISTYYM	726	SIYPSYSYTS	791	SVRGSKKPYFSHWAM	869	
13001	2542AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2	YYWPI	623	ISSNYI	548	SIYSSFGYTS	796	NVRTSKKPYFPLWAM	870	

[0206]

表 4 LRP6- 抗体 抗体 ID		LRP6 结合抗体 CDR												
抗体 ID	文库	抗原	L1	SEQ ID NO	L2	SEQ ID NO	L3	SEQ ID NO	H1	SEQ ID NO	H2	SEQ ID NO	H3	SEQ ID NO
13011	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		ASNNLI	671	IPLYTI	727	SISPSYSYTY	797	GVSGGSNYISIFRNSSGM	871
13012	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		SSYSLI	130	IFSTSI	728	SITSAYSYTY	798	GGLSVSHYNYVHSPFKWGL	872
13013	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		SAITPI	672	ISYSTEM	729	SIVSSYSRTY	799	SCSSFNCYVSNYNARRAL	873
13014	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		FSYSPF	673	LSSSGM	730	AIYPFDGYTY	800	GNARVSNYISSYYAWRAM	874
13015	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		SSYNLI	674	FSSSSI	528	GIFSYFSYTY	801	GGYGFSYNSVTFYRWAF	875
13016	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		SYNPF	675	IRGPSI	731	SISPCGFTY	802	VSGGVCNSLHNYFYKRG	876
13017	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		SSTVPF	676	FSSTYM	732	SITPSYGYTN	803	SSSDISIDNSIRYTWGAM	877
13018	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		SSYSLI	130	INSSFM	733	SISPSYGYTY	804	GHSVGTNFISFYRRRAM	878
13019	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		SNYSLF	677	IFGYSM	734	SIFPCCSNTY	805	GVSGLDNNRTASYSRMGM	879
13020	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		STYSLI	678	FSSSTI	735	SIAPSEFGHTY	806	GAASVNHIGSLYVSWRGL	880
13021	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		SAFSLI	679	LSSSTM	736	SISPYYSYTR	807	HGSGLSHNATTSYYSR	881
13022	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		SSYSLI	130	ISYTSI	737	SIFSTYSYTY	808	SSSAVSRNSIVYYSRTAM	882
13023	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		SSYTPI	680	FSSSYM	738	SIAPSYSFTY	809	GVCRVSNYSSYFYSRGAM	883
13024	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		YSNLI	681	ISYSTEM	729	SITPYYSITTS	810	AISHVAHYDNVYISKWGI	884
13025	2460AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		SSYSLI	130	IASYSM	739	FISPYHSYTD	811	GHSVLSNYVSIHYWAGF	885
13026	8716AM	LRP6-Fc	SVSSA	1	SASSLYS 2		YWAYFSPI	682	FSYSSM	740	SISSRYGYTY	812	SWAM	586

[0207]

实施例3:四价结合抗体分子形式

[0208]

A.我们生成了各种形式的四价结合抗体分子,其包含在Fc结构域的任一末端的泛

FZD和LRP5/6抗体片段(例如scFv、双抗体和Fab),参见表5和图6,并测定了它们的Wnt激动剂活性。编码抗体可变结构域的DNA片段通过PCR从噬菌粒DNA模板扩增或通过化学合成(Twist Biosciences)构建。DNA片段被克隆到哺乳动物表达载体(pSCSTa)中。双特异性双抗体和IgG包含优化版本的“杵臼”异二聚体Fc(Ridgway等,Protein Eng.9,617-621(1996))。双抗体结构域以VH-VL方向排列,并且可变结构域由短接头GGGS(SEQ ID NO:886)分隔开,这有利于VH结构域和VL结构域之间的分子间缔合,因此有利于双抗体形成。为了产生双抗体融合构建体,将双抗体链与人IgG1 Fc融合。双抗体-fc-双抗体蛋白被构建为VH-x-VL-y-[人IgG1 Fc]-z-VH-x-VL,其中接头为x=GGGS(SEQ ID NO:886),y=LEDKHTKVEPKSS(SEQ ID NO:887),并且z=SGSETPGTSESATPESGGG(SEQ ID NO:888)。在该形式中,人IgG1 Fc或杵臼IgG1 Fc片段跨越第234至478位(Kabat编号)。对于scFv-Fc融合物,可变结构域以VL-VH方向排列并通过长接头GTTAASGSSGSSSGA(SEQ ID NO:889)连接,这有利于VH结构域和VL结构域之间的分子内缔合,因此有利于scFv形成。Fab结构域与Fc的C末端融合的变体通过化学合成(Twist Biosciences)产生。对于所有构建体,将整个编码区以与分泌信号肽读码框相符地克隆到哺乳动物表达载体中。

[0209] 在TOPFLASH测定中测试了这些包含泛特异性FZD和LRP5/6抗体片段的各种四价结合抗体分子,以监测 β 连环蛋白介导的报告基因活性。将蛋白与天然配体Wnt3a进行比较。通过将TOPFLASH细胞在96孔组织培养处理板中铺板至约70%汇合度来进行测定。将激动剂在DMEM中稀释以提供0.046nM至100nM的最终测定浓度,将细胞在37°C、5%CO₂下处理过夜。根据制造商的说明,使用双荧光素酶报告基因检测系统(Promega)在黑色96孔板中对荧光素酶的表达进行定量。简而言之,用编码pBAR1s报告基因的慢病毒转导HEK293T细胞(Biechele和Moon,Wnt Signaling:PathwayMethods and Mammalian Models,E.Vincan编辑,Humana Press,Totowa,NJ,2008,第99-110页),以海肾荧光素酶作为对照,产生Wnt- β 连环蛋白信号传导报告基因细胞系。在转染或刺激之前,将 $1-2 \times 10^3$ 个细胞(120 μ l)接种到96孔板的各个孔中24小时。第二天,添加FZD激动剂或Ab蛋白,刺激15至20小时后,裂解细胞,使用Envision酶标仪(PerkinElmer)根据双荧光素酶方案(Promega)测量荧光。对于FZD4激动剂测定,在添加FZD激动剂之前转染FZD4cDNA 6小时。对于Wnt抑制测定,在添加Ab蛋白之前,通过cDNA转染引入Wnt1或施加WNT3A蛋白6小时。所有测定至少重复三次。结果呈现在表5中。如表5所示,当使FZD4和LRP5聚集时,四价形式各自在不同程度上激活FZD信号传导。还评估了这些形式的稳定性、同质性以及来自Expi293的产量(图3和9)。根据这些分析,双抗体-Fc-Fab形式提供了活性、表达、稳定性的最佳平衡。最后,我们对FZD5和LRP6应用相同的形式排列,观察到有效的激动剂活性。表5中的结果显示,各种四价形式引发WNT激动,2个LRP5/6表位的参与产生比1个LRP5/6表位更高的WNT信号传导活性(最大值)。

[0210]

表 5

分子	形式	互补位	结合特异性 (互补位化学计量)	Topflash EC ₅₀ (nM) 平均标准偏差	% Wnt 最大值 平均标准偏差
Wnt3a	重组产生的配体	NA	FZD/LRP	6	100% ND
CM0011	FZD 双抗体-Fc-LRP 双抗体	5019 (FZD 双抗体); 2539, 2542 (LRP 双抗体)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ¹ , LRP6 ³ (2:1:1)	0.3	63% 10%
ANT-4	FZD 双抗体-Fc-LRP Fab	5016(FZD 双抗体); 2540,2542 (LRP Fab)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ¹ , LRP6 ³ (2:1:1)	0.5	63% 6%
ANT-5	FZD 双抗体-Fc-LRP Fab	5016(FZD 双抗体); 2540,2542 (LRP Fab)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ¹ , LRP6 ³ (2:1:1)	0.5	59% 8%
CT0001	FZD IgG-LRP 双抗体	5016(FZD IgG); 2539,2542 (LRP 双抗体)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ¹ , LRP6 ³ (2:1:1)	0.3	57% 17%
CT0002	LRP 双抗体-Fc-FZD scFv (VL-VH)	2539, 2542 (LRP 双抗体); 5016 (FZD scFv)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ¹ , LRP6 ³ (2:1:1)	0.5	55% 22%
CM0126	FZD 双抗体-Fc-LRP 双抗体	5016(FZD 双抗体); 2539, 2542 (LRP 双抗体)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ¹ , LRP6 ³ (2:1:1)	0.3	52% 1%
ANT-1	LRP 双抗体-Fc-FZD Fab	2540, 2542 (LRP 双抗体); 5016 (FZD Fab)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ¹ , LRP6 ³ (2:1:1)	0.7	49% 22%
CT0003	FZD 双抗体-Fc-LRP scFv	5016 (FZD 双抗体); 2539, 2542 (LRP scFv)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ¹ , LRP6 ³ (2:1:1)	0.4	42% 16%
ANT-2	LRP 双抗体-Fc-FZD Fab	2540, 2542(LRP 双抗体); 5016(FZD Fab)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ¹ , LRP6 ³ (2:1:1)	0.3	38% 25%
CM0042	FZD 双抗体-Fc-LRP 双抗体	5019(FZD 双抗体); 2539 (LRP 双抗体)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ³ (2:2)	0.9	33% 22%
CM0302	FZD IgG-LRP 双抗体	5056(FZD IgG)-2539(LRP 双抗体)	FZD1/2/4/5/7/8/10, LRP6 ³ (2:2)	0.3	18% 8%
CM0303	FZD IgG-LRP scFv	5056(FZD IgG); 2539(LRP scFv)	FZD1/2/4/5/7/8/10, LRP6 ³ (2:2)	3.7	17% 13%
CM0299	FZD IgG-LRP 双抗体	5016(FZD IgG)-, 2539(LRP 双抗体)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ³ (2:2)	0.1	14% 5%
CM0300	FZD IgG-LRP scFv	5016(FZD IgG)-, 2539(LRP scFv)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ³ (2:2)	0.3	5% 2%
CM0301	FZD IgG-LRP scFv	5016(FZD IgG)-, 2542(LRP scFv)	FZD1/2/4/5/7/8, LRP6 ¹ (2:2)	0.2	1% 1%
CM0156	双抗体-Fc-双抗体	4275	无 FZD/LRP 结合	NA	NA NA
4275	IgG	4275	无 FZD/LRP 结合	NA	NA NA

[0211] B. 双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂。

[0212] FZD激动剂,具有双特异性LRP5结合双抗体和包含FZD4结合Fab的FZD4结合结构域

(FZD4激动剂)、包含FZD5结合Fab的FZD5结合结构域(FZD5激动剂)或结合多种FZD的FZD结合结构域(泛FZD5激动剂),使用杵臼系统生成。简而言之,构建体通过化学合成(Twist Biosciences)或通过标准分子生物学技术在哺乳动物表达载体(pSCSTa)中产生。双抗体构建体以VH-VL方式排列,用短接头(GGGGS(SEQ ID NO:886))连接VH和VL以有利于分子间的配对。对于双特异性双抗体排列,互补位A和B的可变结构域分别在白Fc链上排列为VH(A)-VL(B)、在杵Fc链上排列为VH(B)-VL(A),以便于正确的互补位形成。双抗体通过接头GGGSGGGGSEPKSS(SEQ ID NO:890)融合至优化的杵臼异二聚体Fc(Ridgway等,Protein Eng.,9:617-621,1996)的N末端。Fc区还含有效应子无效突变D278A和N314G(Kabat编号),其对应于D655A/N297G(EU编号)。Fab结构域通过接头GGGSGGGSGGGSGGGSGSTG(SEQ ID NO:891)融合至异二聚体Fc的C末端。Fab VH结构域的N末端直接与该接头融合,然后是CH1,终止于T238(Kabat编号)。该Fab与如上所述克隆的标准κ轻链配对。对于所有构建体,将整个编码区以与分泌信号肽读码框相符地克隆到哺乳动物表达载体中。

[0213] 此外,将双抗体-fc-Fab形式构建为VH-x-VL-y-[人IgG1 Fc]-z-VH,其中,接头是x=GGGGS(SEQ ID NO:886),y=GGGSGGGGSEPKSSDKTHT(SEQ ID NO:892),以及z=GGGSGGGSGGGSGGGSGSTG(SEQ ID NO:891)。双抗体结构域以VH-VL方向排列,可变结构域由短接头GGGGS(SEQ ID NO:886)分隔开,这有利于VH结构域和VL结构域之间的分子间缔合,因此有利于双抗体形成。此外,Fc区可以表现出因氨基酸突变(N297G和D265A(DANG)变体或L234A、L235A、P331S(LALAPS)变体)而减弱的效应子功能,Fc区还包含杵臼异二聚化变体Merrimack、Merchant或Merchant S:S。

[0214] 图7显示了双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂,其具有由二价的LRP5双特异性的双抗体组成的LRP5结合结构域和由两个FZD4结合Fab片段组成的FZD4结合结构域,所述FZD4结合Fab片段由轻链构建体的VL和CL1与白重链构建体和杵重链构建体各自的VH和CH1配对形成。表12呈现了FZD4激动剂ANT(双抗体-Fc-Fab形式)的重链和轻链的氨基酸序列:重链杵构建体(ANT16杵)、重链白构建体(ANT白)和轻链构建体。轻链和重链的可变CDR以粗体下划线斜体表示。

[0215] 图16A描绘了双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂,其具有因氨基酸突变(例如N297G(NG)和D265A、(DANG)变体和/或LALAPS变体)而效应子功能减弱的Fc区,Fc区还包含杵臼异二聚化变体Merrimack、Merchant或Merchant S:S。

[0216] B. IgG-双抗体形式的FZD4激动剂。

[0217] 使用杵臼系统产生具有形成N末端结合结构域的两个FZD结合Fab、形成C末端结合结构域的双特异性LRP5/6结合双抗体和Fc结构域的FZD激动剂。将IgG-双抗体蛋白构建为VH-[人IgG1 Fc]-y-VH-x-VL,其中,接头是x=GGGGS(SEQ ID NO:886)以及y=GGGSGGGSGGGSGGGSGSTG(SEQ ID NO:891)。

[0218] 图15呈现了具有FZD结合结构域的IgG-双抗体形式的FZD4激动剂的图解,所述FZD结合结构域包含与Fc结构域的N末端连接的两个Fab片段,其中每个Fab结合FZD。LRP5/6共受体结合结构域与Fc结构域的C末端连接,并由结合共受体上两个不同位点(例如LRP5/6上的Wnt1位点(E1-E2)和Wnt3位点(E3-E4))的双抗体组成。Fab可以是针对特定的FZD(例如FZD4)特异性的,或者可以是泛特异性的(结合超过一种FZD(例如结合FZD4和一种以上其他FZD))。

[0219] 图16B描绘了IgG-双抗体FZD4激动剂,其具有因氨基酸突变(例如N297G(NG)和D265A、(DANG)变体和/或LALAPS变体)而具有减弱的效应子功能的Fc区,Fc区还包含杵臼异二聚化变体Merrimack、Merchant或Merchant S:S。表13呈现了FZD4激动剂ANT39(双抗体-Fc-Fab形式)和ANT39wi(IgG-双抗体形式)的重链和轻链的氨基酸序列:杵重链构建体(ANT39杵和ANT39i杵)、臼重链构建体(ANT39臼和ANT39i臼)和轻链构建体。表13中还包括FZD4激动剂ANT39和ANT39i变体DANG、LALAPS、LALAPS Merchant和LALAPS Merchant S-S的重链和轻链的氨基酸序列。轻链和重链的可变CDR以粗体下划线斜体表示。

[0220]

表 6A	LRP5 双抗体位点 1						LRP5 双抗体位点 2					
	[1]	[2]	SEQ ID NO	[3]	SEQ ID NO	[4]	SEQ ID NO	[5]	SEQ ID NO	[6]	SEQ ID NO	
分子		CDR-H1		CDR-H2		CDR-H3		CDR-L2		CDR-L3		
ANT16-臼	D	FSSSSI	528	SISSSYGYTY	553	SWAM	586	SASDLYS	491	YAGAGLI	510	
ANT16-杵	D	FTAYAM	536	SIYPSGGYTA	566	RSYYFAL	603	SASSLYS	2	YWYYYSPI	493	
ANT18-臼	N	LSYYYM	527	SIYSSYGYTY	552	WSHVSGHYSGM	584	SASSLYS	2	SSYSLI	130	
ANT18-杵	N	FSSSSI	528	SISSSYGYTY	553	GGSGVSHYGSVYYSWWAL	585	SASSLYS	2	ASYAPI	492	
ANT20-臼	N	LSYYYM	527	SIYSSYGYTY	552	WSHVSGHYSGM	584	SASDLYS	491	YAGAGLI	510	
ANT20-杵	D	FTAYAM	536	SIYPSGGYTA	566	RSYYFAL	603	SASSLYS	2	ASYAPI	492	
ANT21-臼	N	FSSSSI	528	SISSSYGYTY	553	SWAM	586	SASSLYS	2	SSYSLI	130	
ANT21-杵	N	FSSSSI	528	SISSSYGYTY	553	GGSGVSHYGSVYYSWWAL	585	SASSLYS	2	YWYYYSPI	493	
ANT36-臼	N	LSYYYM	527	SIYSSYGYTY	552	WSHVSGHYSGM	584	SASSLYS	2	SSYSLI	130	
ANT36-杵	N	FSSSSI	528	SISSSYGYTY	553	GGSGVSHYGSVYYSWWAL	585	SASSLYS	2	ASYAPI	492	
ANT39-臼	D	FSSSSI	528	SISSSYGYTY	553	SWAM	586	SASDLYS	491	YAGAGLI	510	
ANT39-杵	D	FTAYAM	536	SIYPSGGYTA	566	RSYYFAL	603	SASSLYS	2	YWYYYSPI	493	
ANT42-臼	D	FSSSSI	528	SISSSYGYTY	553	SWAM	586	SASDLYS	491	YAGAGLI	510	
ANT42-杵	D	FTAYAM	536	SIYPSGGYTA	566	RSYYFAL	603	SASSLYS	2	YWYYYSPI	493	

在所有分子中, LRP5 双抗体位点 2 的 CDR-L1 均为 SVSSA (SEQ ID NO: 1)。

[0221]

FZD4 FAB									
表 6B	[7]	[8]	SEQ ID NO	[9]	SEQ ID NO	[10]	SEQ ID NO	[11]	SEQ ID NO
分子		CDR-H1		CDR-H2		CDR-H3		CDR-L3	
ANT16-白	T	LSSYSM	24	YISSYYGYTY	51	PAPGHWGF	79	WYYAPI	3
ANT16-粹	T	LSSYSM	24	YISSYYGYTY	51	PAPGHWGF	79	WYYAPI	3
ANT18-白	T	LSSYSM	24	YISSYYGYTY	51	PAPGHWGF	79	WYYAPI	3
ANT18-粹	T	LSSYSM	24	YISSYYGYTY	51	PAPGHWGF	79	WYYAPI	3
ANT20-白	T	LSSYSM	24	YISSYYGYTY	51	PAPGHWGF	79	WYYAPI	3
ANT20-粹	T	LSSYSM	24	YISSYYGYTY	51	PAPGHWGF	79	WYYAPI	3
ANT21-白	T	LSSYSM	24	YISSYYGYTY	51	PAPGHWGF	79	WYYAPI	3
ANT21-粹	T	LSSYSM	24	YISSYYGYTY	51	PAPGHWGF	79	WYYAPI	3
ANT36-白	T	LSSYSM	24	YISSYDSITD	61	PAVGHMAF	90	WYNAPI	12
ANT36-粹	T	LSSYSM	24	YISSYDSITD	61	PAVGHMAF	90	WYNAPI	12
ANT39-白	T	LSSYSM	24	YISSYDSITD	61	PAVGHMAF	90	WYNAPI	12
ANT39-粹	T	LSSYSM	24	YISSYDSITD	61	PAVGHMAF	90	WYNAPI	12
ANT42-白	T	SDFYFI	164	TIYFFIGNTY	194	AFPGSYHPF	220	STGSLI	135
ANT42-粹	T	SDFYFI	164	TIYFFIGNTY	194	AFPGSYHPF	220	STGSLI	135

在所有分子中，FZD FAB 的 CDR-L1 和 CDR-L2 分别为 SVSSA (SEQ ID NO: 1) 和 SASSLYS (SEQ ID NO: 2)。

[0222]

表 6C	LRP6 双抗体位点 1						LRP6 双抗体位点 2					
	[1]	[2]	SEQ ID NO	[3]	SEQ ID NO	[4]	SEQ ID NO	[5]	SEQ ID NO	[6]	SEQ ID NO	
分子		CDR-H1		CDR-H2		CDR-H3		CDR-L2		CDR-L3		
ANT59-白	D	ISSYFI	720	SIYPSYSYTS	791	NVRGFRKPYFSRWAM	862	SASSLYS	2	YFFPI	665	
ANT59-杆	D	LSHSSI	716	SISSHYGYTH	785	SSYFPWFAL	856	SASSLYS	2	YYWPI	623	
ANT9-白	D	ISSYFI	720	SIYPSYSYTS	791	NVRGFRKPYFSRWAM	862	SASSLYS	2	YFFPI	665	
ANT9-杆	D	LSHSSI	716	SISSHYGYTH	785	SSYFPWFAL	856	SASSLYS	2	YYWPI	623	

在所有分子中，所有 LRP ab 的 CDR-L1 均为 SVSSA (SEQ ID NO: 1)。

表 6D	FZD 互补位										
	FZD 特异性	7	H1 (8)	SEQ ID NO	H2 (9)	SEQ ID NO	H3 (10)	SEQ ID NO	L3 (11)	SEQ ID NO	SEQ ID NO
ANT59-白	5	N	IAYSSM	365	TIYPSYSSTY	462	YYAM	484	AHYFPI	285	
ANT59-杆	5	N	IAYSSM	365	TIYPSYSSTY	462	YYAM	484	AHYFPI	285	
ANT9-白	1,2,4,5,7,8	N	IHSSSI	893	ATYSSFGSIT	894	YHHPFGYAL	895	GVYLF	896	
ANT9-杆	1,2,4,5,7,8	N	IHSSSI	893	ATYSSFGSIT	894	YHHPFGYAL	895	GVYLF	896	

在所有分子中，FZD FAB 的 CDR-L1 为 SVSSA (SEQ ID NO: 1)，CDR-L2 为 SASSLYS (SEQ ID NO: 2)。

[0223] C.FZD激动剂对FZD4具有高度特异性，以高特异性结合并且在溶液中是稳定的。

[0224] 使用生物膜干涉测量法(BLI)，我们发现本文所述的FZD4激动剂相对于其他FZD受体对FZD4具有高度特异性。重组FZD ECD蛋白固定在BLI传感器上。具有LRP5结合结构域(由二价的针对LRP5双特异性的双抗体组成)和FZD4结合结构域(由两个FZD4结合Fab片段组成)的双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂，在PBS+0.05%Tween-20和1%BSA的缓冲液中，在100nM的浓度下测试其与ECD蛋白的结合。结果呈现在图8A中。测定的对照包括CM0199(识别FZD4和LRP5以及免疫球蛋白4275的双抗体-Fc-双抗体形式的FZD激动剂，免疫球蛋白4275

为不结合FZD或LRP的IgG)。

[0225] FZD4激动剂也不识别常见的非特异性抗原。在100nM下测试FZD4激动剂与一组抗原的结合(基本上如“Monquet等,Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heteroligation,Nature,2010年9月30日,467(7315):591-5(PMC3699875)和“Jain等,Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape,Proc Natl Acad Sci,2017年1月31日;114(5):944-949.(PMC5293111)”中所述)。测定中的对照包括CM0199(识别FZD4和LRP5以及免疫球蛋白6606的双抗体-Fc-双抗体形式的FZD激动剂,免疫球蛋白6606为在该测定中特别易于发生非特异性结合的IgG)。结果呈现在图8B中。

[0226] 包含FZD4结合结构域和LRP5结合结构域的FZD4激动剂以高亲和力结合FZD4和LRP5。FZD4激动剂对FZD4的重组ECD的表观亲和力通过生物膜干涉测量法测定(基本上如“Elife.2019年8月27日;8:e46134”中所述)。简而言之,BLI测定使用Octet HTX仪器(ForteBio)进行。为了测量与抗原的结合,在AHQ BLI传感器(18-5001,ForteBio)上捕获FZD-Fc蛋白以获得0.6至1nm的BLI响应,剩余的Fc结合位点被人Fc饱和(009-000-008,Jackson ImmunoResearch)。将FZD包被传感器的或对照(Fc包被)传感器转移到在测定缓冲液(PBS、1%BSA、0.05% Tween20)中的100至0.1nM四价FZD激动剂中,监测结合300s。然后将传感器转移到测定缓冲液中再监测解离300s。摇动速度为1000rpm,温度为25℃。结果呈现在表7中。

[0227]

分子	FZD4 KD (nM)	LRP5 EC ₅₀ (nM)
CM0199	0.7	7.5
ANT16	0.6	1.4
ANT18	2.6	ND
ANT20	0.7	ND
ANT21	2.2	ND
ANT36	<0.1*	ND
ANT39	0.3	ND

[0228] 还通过SEC分析了FZD4激动剂,与曲妥珠单抗IgG进行比较。结果呈现在图9A中,表明双抗体-Fc-Fab形式的激动剂在溶液中是稳定的和同质的。

[0229] FZD4激动剂在溶液中也是稳定的。将纯化的FZD4激动剂ANT16、ANT18、ANT20、ANT21和ANT 36在“10mM组氨酸、140mM NaCl、0.9%蔗糖、pH 6”中重悬为1mg/ml (ANT18除外,其重悬为0.34mg/ml),在4℃或40℃下储存6天。在不同时间点取出样品,离心去除沉淀的蛋白质,测量残留蛋白质浓度。结果呈现在表8和表9中。

表 8

在 40℃下, 时间 (天)	剩余可溶性蛋白(%)			
	0	1	2	6
CM0199	100%	60%	64%	40%
ANT-16	100%	102%	104%	104%
ANT-18	100%	92%	83%	105%
ANT-20	100%	97%	67%	104%
ANT-21	100%	102%	75%	102%
ANT-36	100%	100%	149%	106%

[0230]

表 9

在 40°C下, 时间 (天)	剩余活性蛋白(%)	
	0	6
[0231] CM0199	100%	42%
ANT-16	100%	34%
ANT-18	100%	42%
ANT-20	100%	30%
ANT-21	100%	25%

[0232] 第6天,使用BLI对样品中剩余的FZD4特异性结合位点的量进行定量。通过差示扫描荧光法分析表明,具有双抗体-Fc-Fab形式的FZD4激动剂(具有在Fc结构域N末端的LRP结合双抗体和在Fc结构域C末端的两个FZD4结合Fab)具有与曲妥珠单抗相似的热变性曲线。IgG在热稳定性测定中通常显示两个峰,第一个对应于CH2,后者对应于Fab结构域和CH3,参见图9B。

[0233] 还测定了FZD4激动剂在小鼠内皮细胞系(bEND3.1)中对 β -连环蛋白靶基因AXIN2的诱导,显示以浓度依赖性方式诱导转录。这些结果呈现在图10中。

表 10

抗体编号	识别的 FZD	识别的共受体
5019	FZD1, FZD2, FZD4, FZD5, FZD7, FZD8	
5027	FZD4	
5044	FZD4	
5016	FZD1, FZD2, FZD4, FZD5, FZD7, FZD8	
5056	FZD1, FZD 2, FZD 4, FZD5, FZD7, FZD8, FZD10	
2459		LRP5-W3
[0234] 2460		LRP5-W1
8716		LRP5-W3
12600		LRP5-W1
12608		LPR5-W1
2539		LRP6-W3
2540		LRP6-W3
2542		LRP6-W1
CM0199	FZD4	LRP5
6066	N/A 非特异性测定的阳性对照	
4275	无 FZD/LRP 结合	

[0235] 实施例4:测定FZD4激动剂的抵抗VEGF(组织缺氧期间释放的细胞因子)介导的对细胞连接分解和通透性增加的影响的能力。VEGF处理bEND3.1细胞导致连接解体,如CLDN3、CLDN5和ZO-1的质膜染色丧失所示。用VEGF和FZD4激动剂共同处理细胞几乎完全挽救了这种影响(图11)。这种由VEGF处理介导的细胞-细胞连接稳定性的降低转化为内皮细胞通透性的增加,作为跨内皮通透性测定中的监测器,测量40-kDa FITC-葡聚糖穿过在Transwell

过滤器上生长的汇合内皮单层bEnd.3。用VEGF和FZD4激动剂共同处理细胞完全挽救了VEGF介导的细胞通透性的增加。这些结果表明FZD4激动剂以不依赖于VEGF的机制促进内皮细胞屏障功能。

[0236] A) ZO-1 (绿色) /CLDN3 (红色) 和ZO-1 (绿色) /CLDN5 (红色) 在bEnd.3细胞连接处的免疫荧光定位。在存在或不存在VEGF (100ng/ml) 的情况下,用或不用30nM F4L5.13 (又名CM0199) 和诺里蛋白处理bEnd.3细胞1小时。DAPI (蓝色) 对细胞核进行染色。B) 通过测量FITC-葡聚糖穿过bEnd.3单层来确定跨内皮通透性。在单独用VEGF (100ng/ml) 或F4L5.13 (30nM) 或同时用VEGF (100ng/ml) 和F4L5.13 (30nM) 处理bEnd.3持续1小时后,或在用VEGF预处理1小时后用F4L5.13处理bEnd.3持续1小时后,测量FITC-葡聚糖的穿过。误差条表示SEM, n=5。结果呈现在图11中。

[0237] 实施例5:新FZD5抗体在与从亲和力成熟文库中鉴定的2919重叠的位点处结合FZD5。

[0238] 在存在或不存在饱和浓度的2919IgG的情况下,单点ELISA在包被有人FZD5蛋白的ECD的96孔Maxisorp板上进行。将板用单克隆Fab噬菌体孵育,然后用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗M13抗体孵育。随后将孔洗涤8次,然后用3,3',5,5'-四甲基联苯胺/H₂O₂过氧化物酶(TMB)底物孵育5至10分钟。通过添加1M H₃PO₄来终止反应,并在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度。结果呈现在图12中。

[0239] 实施例6:来自2928亲和力成熟文库的新FZD5抗体选择性地结合FZD5。

[0240] 单点ELISA在包被有人FZD2、FZD5或FZD8蛋白的ECD的96孔Maxisorp板上进行。将板用单克隆Fab噬菌体孵育,然后用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗M13抗体孵育。随后将孔洗涤8次,然后用3,3',5,5'-四甲基联苯胺/H₂O₂过氧化物酶(TMB)底物孵育5至10分钟。通过添加1M H₃PO₄来终止反应,并在微量滴定板读数器中以分光光度法在450nm处测量吸光度。结果呈现在图13中。

[0241] 实施例7:泛FZD/LRP6 ANT9和FZD5特异性/LRP6 ANT9激活细胞中的Wnt信号传导。

[0242] 用不同浓度的FZD激动剂或非靶向对照分子(CM0156)处理TOPFLASH HEK293细胞过夜,使用标准荧光素酶测定法测量TCF/LEF驱动的荧光素酶表达。两种分子都能够以浓度响应的方式激活FZD介导的荧光素酶表达。ANT9能够与10种FZD受体亚型中的7种结合,产生比FZD5特异性ANT59更高的最大激活信号。

[0243] 体内实验

[0244] DSS诱导的结肠炎模型

[0245] 在图24中,给予C57/BL6小鼠含2%DSS的饮用水7天,再给予0.5%DSS另外3天以诱导结肠炎。在第4天和第7天以10mg/kg的剂量通过腹膜内注射施用对照-FLAg、泛FLAg和ANT59。每天对小鼠进行称重。第10天对小鼠实施安乐死,收采组织用于结肠长度和组织学的测量。

[0246] 组织学

[0247] 为了进行组织学分析,将收采的组织固定在4%多聚甲醛中并包埋在石蜡中。用苏木精和曙红(H&E)对5μm的切片进行染色。使用Nikon Eclipse显微镜捕获图像(图23)。

[0248] 类器官培养和活力测量

[0249] 从8周龄雌性C57BL/6小鼠中收采小肠隐窝,并按照先前所述进行培养(O'Rourke

等,2016)。将类器官培养物传代并包埋在25 μ l低生长因子基质胶(Corning,356231)中,一式三份地在48孔板中铺板。用DMSO、1 μ M LGK974、1 μ M LGK974+50%WNT3A条件培养基、1 μ M LGK974+30nM泛FLAg、1 μ M LGK974+30nM FZD2-FLAg、1 μ M LGK974+30nM FZD4-FLAg、1 μ M LGK974+30nM FZD5-FLAg、1 μ M LGK974+30nM FZD7-FLAg处理类器官培养物。处理物在250 μ l完全培养基中制备,在传代当天添加到每个孔中,每2至3天更换一次。在终点(7天),将150 μ l Cell Titer-Glo3D(Promega)添加到每个孔中的150 μ l培养基中。室温下在摇动平台上裂解类器官30分钟。在Envision多标签酶标仪上对来自每个孔的20 μ l裂解物测量荧光读数(一式多份)。将每个条件的平均荧光读数归一化为对照条件以计算相对活力(图22)。

[0250] 实施例8:8个ANT39变体的瞬时表达。

[0251] 使用基于标准制造脂质的方案(ThermoFisher)在CHO细胞中瞬时表达8个ANT39变体系列(图16A和16B)。简而言之,细胞在生长培养基中生长至密度为约 2.0×10^6 个细胞/ml,用适当的转染试剂转染相关DNA。针对每个变体测试了两个替代性的输入质粒比率,即1:1:2或2:1:3(杵重链:白重链:轻链)。条件培养基在7天后采收,通过蛋白A琼脂糖凝胶纯化,测量滴度。

[0252] 表11

分子	DNA 比率(杵:白:LC)	滴度(mg/L)
ANT39	1:1:2	390
	2:1:3	290
ANT39i	1:1:2	260
	2:1:3	250
ANT39 LALAPS	1:1:2	330
	2:1:3	250
ANT39i LALAPS	1:1:2	300
	2:1:3	270
ANT39 LALAPS Merchant	1:1:2	340
	2:1:3	280
ANT39i LALAPS Merchant	1:1:2	240
	2:1:3	280
ANT39 LALAPS Merchant S:S	1:1:2	320
	2:1:3	190
ANT39i LALAPS Merchant S:S	1:1:2	300
	2:1:3	250
ANT42*	1:1:2	107
ANT42 LALA*	1:1:2	287
ANT42 LALAPS*	1:1:2	95
ANT42i LALAPS*	1:1:2	49

[0253]

[0254] *变体在HEK293细胞中瞬时表达。

[0255] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验即可确定本文描述的特定方法的许多等同方式。此类等同方式被认为在本发明范围内。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对本发明进行各种替换、改变和修改。其他方面、优势和修改落入本发明范围内。

[0256] 本申请全文中引用的所有文献、已公告的专利和已公布的专利申请的内容均通过引用并入本文。可以为本发明和其中的实施方式选择那些专利、申请和其他文献的适当的组分、过程和方法。

[0257] 在整个说明书和后面的权利要求书中,除非上下文另有要求,否则词语“包括”以及“包含”和“含有”等变形将被理解为意味着包括设定的整数、步骤、整数组或步骤组,并不排除任何其他整数、步骤、整数组或步骤组。

[0258] 为了澄清应用并向公众提供提醒,短语“<A>、……和<N>中的至少一个”或“<A>、……或<N>中的至少一个”或“<A>、……<N>或它们的组合中的至少一个”或“<A>、……和/或<N>”由申请人在最广泛的意义上进行限定,除非申请人明确地主张相反,否则取代上文或下文中的任何其他隐含定义,意指选自包括A、B……和N的组的一个以上要素。换句话说,这些短语意指要素A、B……或N中的一个以上的任意组合,包括单独的任何一个要素或一个要素与一个以上其他要素的组合,其还可以包括组合的未列出的附加要素。除非另有说明或上下文另有启示,否则本文所用的“一个”或“一种”指“至少一个”或“一种以上”。

[0259]

表 12: FZD4 激动剂 ANT16、ANT18、ANT20、ANT21、ANT39 和 ANT42 的白“重链”构建体、杆“重链”构建体和“轻链”构建体的双抗体-Fc-Fab 氨基酸序列。

链的 CDR 以下划线斜体表示。CDR 可以用另一种抗体的 CDR 替换以改变结合特异性，例如，可以改变特异性以结合 FZD 或 LPR5/6 上的另一个位点，或者结合另一个 FZD 或 LPR。

FZD4 激动剂 ANT16	FZD4 激动剂 ANT16
<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<i>DF</i><u><i>FTAYAM</i></u>HVWRQAPGKGLEWVA<u><i>SIYPSGGYTA</i></u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u><i>RSYFFALDY</i></u>WGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS<u><i>QSVSSA</i></u>VAWYQQKPGKAPKLLIY<u><i>SASSL</i></u><u><i>YSGVPSRFS</i></u>SGRSGTDFLTISSLPEDFATYYCQQ<u><i>WAIYSPI</i></u>TFGGQGTKVEIKGGGGGGSEPKTSDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKDTLMISRTPETCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u><i>TLSSYSM</i></u>HWVVRQAPGKGLEWVA<u><i>YISSYGYTY</i></u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u><i>PAPGHWGF</i></u>FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 897)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<i>DF</i><u><i>SSSSHH</i></u>WVRQAPGKGLEWVA<u><i>SISSYGYTY</i></u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u><i>SWAMDY</i></u>WGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS<u><i>QSVSSA</i></u>VAWYQQKPGKAPKLLIY<u><i>SASDL</i></u>YSGVPSRFSRSGTDFLTISSLPEDFATYYCQQ<u><i>YAGAGLI</i></u>TFGGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u><i>TLSSYSM</i></u>HWVVRQAPGKGLEWVA<u><i>YISSYGYTY</i></u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u><i>PAPGHWGF</i></u>FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 898)</p>
<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS<u><i>QSVSSA</i></u>VAWYQQKPGKAPKLLIY<u><i>SASSL</i></u>YSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLPEDFATYYCQQ<u><i>WY</i></u><u><i>YAPI</i></u>TFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 899)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS<u><i>QSVSSA</i></u>VAWYQQKPGKAPKLLIY<u><i>SASSL</i></u>YSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLPEDFATYYCQQ<u><i>WY</i></u><u><i>YAPI</i></u>TFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 899)</p>

[0260]

<p>FZD4 激动剂 ANTI8</p>	<p>MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGMVQPGGSLRLSCAASGFNFSSSSHHWVRQAPGKGLEWVA <u>SISSSYGYTY</u>YADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>GGGGLSHYGSVYYSWWALDY</u>WGQGTLLTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCR ASQ <u>YSSA</u>VAWYQQKPGKAPKLLIY <u>SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ <u>ASYAPIT</u></u>FGQGTKVEIKGGGGSG GGSEPKTSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPETCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPMVFDLPPSRHEEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGSGSTGEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF <u>TLSSYS</u>MHWVRQAPGKGLEWVA <u>YISSYGYTY</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCAR <u>PAGHWHGF</u>DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTTPAVL QSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 900)</p>
<p>白 Hc 构建体</p>	<p>MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF <u>NLSYYM</u>HWVRQAPGKGLEWVA <u>SISSYGYTY</u>YADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>WSHVSGHYS</u>GMDYWGQGTLLTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ <u>SVSS</u> A VAWYQQKPGKAPKLLIY <u>SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ <u>SSYSL</u></u>ITFGQGTKVEIKGGGGGGGGSEPKS SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPETCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGSGSTGEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGF <u>TLSSYS</u>MHWVRQAPGKGLEWVA <u>YISSYGYTY</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>PAGHWHGF</u>DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTTPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 901)</p>
<p>构建体</p>	<p>MNLLLILTFVAAA VADIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ <u>SVSSA</u>VAWYQQKPGKAPKLLIY <u>SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTI</u> SSLQPEDFATYYCQQ <u>WYAPIT</u>ITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 902)</p>

[0261]

FZD4 激动剂 ANT20	<p>MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u>DFTAYAM</u>HWVRQAPGKGLEWVA<u>SIYPSGGTYA</u>YADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>RSYFAL</u>DYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITICRASQ<u>S</u> <u>ISSA</u>VAWYQQKPKAPKLLIY<u>SASSLYS</u>GVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ<u>ASYAPIT</u>FFGQGTKVEIKGGGGSGG GGSEPKTSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGGGGGGGSGG GSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u>TLSSYSM</u>HWVRQAPGKGLEWVA<u>YISSYGYTY</u>YADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>PAPGHWGF</u>DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKKSCDKKTHHT (SEQ ID NO: 903)</p>	杆 Hc 构建株
巴 Hc 构建株	<p>MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u>NLSYYM</u>HWVRQAPGKGLEWVA<u>SIYSSYGYTY</u>YADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>WSHVSGHYSGM</u>DYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITICR ASQ<u>SVSSA</u>VAWYQQKPKAPKLLIY<u>SADLYS</u>GVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ<u>YAGAGLI</u>TFGQGTKVEIKGG GGSGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVLSLCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGGGGGSGG GSGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u>TLSSYSM</u>HWVRQAPGKGLEWVA<u>YISSYGYTY</u>YADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>PAPGHWGF</u>DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKKSCDKKTHHT (SEQ ID NO: 904)</p>	控株
控株	<p>MNLLLILTFVAAA VADIQMTQSPSSLSASVGDRTVITICRAS<u>QSVSSA</u>VAWYQQKPKAPKLLIY<u>SASSLYS</u>GVPSRFSGRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQ<u>WYAPIT</u>FFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 902)</p>	

[0262]

<p>FZD4 激动剂 ANT21</p> <p>MSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 905)</p>	<p>MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFSSSSJHVVRRQAPGKLEWVA <u>SJSSSYGYTY</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>GGSGVSHYGSVYYSWWALDY</u>WGQGTLLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRA <u>SQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLT</u>TISSLQPEDFATYYCQQ <u>YWAAYSPIIT</u>FGQGTQKVEIKGGGGGS <u>GGGSEPKTSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYR</u> <u>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQ</u>PREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF <u>TLSSYSM</u>HVVRRQAPGKLEWVA <u>YISSYYGYTY</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>PAPGHWGF</u>DYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL</p>	<p>拮抗剂</p> <p>MSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 906)</p>
<p>拮抗剂 ANT21</p>	<p>MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFSSSSJHVVRRQAPGKLEWVA <u>SJSSSYGYTY</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>SWAMDY</u>WGQGTLLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQ <u>SVSSAVAWYQQ</u>KPGKAPKLLIY <u>SASSLYS</u>GVPSRFSGSRSGTDFTLT <u>TISSLQPEDFATYYCQQSSYSLIT</u>FGQGTQKVEIKGGGGSGGGSEPKSSDKTHTCP <u>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYR</u>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF <u>TLSSYSM</u>HVVRRQAPGKLEWVA <u>YISSYYGYTY</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>PAPGHWGF</u>DYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 905)</p>	<p>拮抗剂</p> <p>MNLLLILTFVAAA VADIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQ <u>SVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAASSLYS</u>GVPSRFSGSRSGTDFTLT <u>TISSLQPEDFATYYCQQWYIYAPI</u>ITFGQGTQKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 902)</p>

[0263]

<p>FZD4 激动剂 ANT39</p>	<p>序 Hc 构叠序</p>	<p>MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFTAYAMHWVRQAPGKGLEWVA <u>SIYPSGGYTA</u>YADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>RSYFFALDY</u>WGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRAS <u>QSVSSAVA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>S4SSL</u>YSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLPEDFATY CQQ <u>YAWAYISPI</u>TFGQTKVEIKGGGGGGGSEPKT SDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPMVFDLPPSRHEEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPKGGGGGGGGGGSGTGEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHWVRQAPGKGLEWVA <u>YISSYDSITD</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CAR <u>PAVGHMAFDY</u>WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITFPAVLQSSGL YLSVVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 907)</p>
<p>序 Hc 构叠序</p>	<p>序 Hc 构叠序</p>	<p>MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD <u>DFSSSS</u>HWWVRQAPGKGLEWVA <u>SISSSYGYTY</u>YADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>SWAMDY</u>WGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRAS <u>QSVSSAVA</u>WY QQKPGKAPKLLIY <u>S4SDL</u>YSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLPEDFATY CQQ <u>YAGAGL</u>TFGQTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDK THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPKGGGGGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQ GGSLRLSCAASGFTLSSYSMHWVRQAPGKGLEWVA <u>YISSYDSITD</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>PA</u> <u>VGHMAFDY</u>WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 908)</p>
<p>序 Hc 构叠序</p>	<p>序 Hc 构叠序</p>	<p>MNLLLILTFVAAA VADIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRAS <u>QSVSSAVA</u>WYQQKPGKAPKLLIY <u>SASSLY</u>SGVPSRFSRSGTDFLT ISSLPEDFATY CQQ <u>WYNAPI</u>TFGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKSTYLSLSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 909)</p>

[0264]

<p>FZD4 激动剂 ANT42</p> <p> MNLILLTFVAAA AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u>DF</u><u>FAYAM</u>HWRVQAPGKGLEWVA<u>SIYPSGGY</u><u>TA</u>YADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>RSYFFAL</u>DYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ<u>SISSA</u><u>VA</u> WYQQKPKAPKLLIY<u>SASSLY</u>SGVPSRFSRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQ<u>WAYSPIT</u>FGQGTKVEIKGGGGGGGSEPKT SDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGF<u>TSDFYF</u>HWRVQAPGKGLEWVA<u>TIYFFIGN</u>TYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>RAFPGSYHHP</u>FEDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 910) </p>	<p> MNLILLTFVAAA AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u>DFSSSS</u>HWRVQAPGKGLEWVA<u>SISSSYGY</u>TYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>SWAMDY</u>WGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ<u>SISSA</u><u>VA</u>WYQQ KPGKAPKLLIY<u>SASDLYS</u>GVPSRFSRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQ<u>YAGAGL</u>TFGQGTKVEIKGGGGGGGGSEPKSSDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGF<u>TSDFYF</u>HWRVQAPGKGLEWVA<u>TIYFFIGN</u>TYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>AFPGSYHP</u> <u>F</u>DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVVTVPS SLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 911) </p>	<p>抗体</p> <p> MNLILLTFVAAA AVADIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ<u>SISSA</u><u>VA</u>WYQQKPKAPKLLIY<u>SASSLY</u>SGVPSRFSRSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQ<u>STGSL</u>TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSITYSLSSITLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 912) </p>
--	--	---

[0265]

FZD5-LRP6 ANT 59	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u>DLSSHSH</u>HWVRQAPGKGLEWVA<u>SISSHGYTHY</u>ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>SSYFPWF</u>FALDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ<u>SVSSA</u>VAWYQQKPKAPKLLIYS<u>ASSLY</u>SGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ<u>YYWPI</u>TFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKTSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u>NIAYSSM</u>HWVRQAPGKGLEWVA<u>TIYPSYSSTY</u>ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>YYAMDY</u>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKEVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 913)</p>
B _{Hc} 抗体	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u>DISSYF</u>HWVRQAPGKGLEWVA<u>SIYPSYITSY</u>ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>NVRFRAKPYFSRW</u>AMDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ<u>SVSSA</u>VAWYQQKPKAPKLLIYS<u>SASSLY</u>SGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ<u>YFPI</u>TFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<u>NIAYSSM</u>HWVRQAPGKGLEWVA<u>TIYPSYSSTY</u>ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>YYAMDY</u>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKEVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 914)</p>
抗体	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ<u>SVSSA</u>VAWYQQKPKAPKLLIYS<u>SASSLY</u>SGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ<u>HYFPI</u>TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 915)</p>

[0266]

pFZD-LRP6 ANT9	EVQLVESGGGLVQP... EDTAVYYCAR... ASSLYSGVPSR... LFPPKPKD... LPAPIEK... WQQGNV... VRQAPG... KGPSVF... VDKKEP...	EVQLVESGGGLVQP... EDTAVYYCAR... ASSLYSGVPSR... LFPPKPKD... LPAPIEK... WQQGNV... VRQAPG... KGPSVF... VDKKEP...
杆 Hc 构建体	EVQLVESGGGLVQP... DTAVYYCAR... LLIY... GPSV... SNKAL... SRW... WVR... TKGPS... KVDK...	EVQLVESGGGLVQP... DTAVYYCAR... LLIY... GPSV... SNKAL... SRW... WVR... TKGPS... KVDK...
杆 Hc 构建体	DIQMTQSP... VYLF... SGNSQES...	DIQMTQSP... VYLF... SGNSQES...

[0267]

<p>双抗体-Fc-双抗体 FZD4 CM0199</p>	<p>EFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNSSFYFMHWHVVRQAPGKGLEWVATVYPYLDYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAFPGSYHPMDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYCCQSSYSLITFGQGTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFSSSSHHWVRQAPGKGLEWVASSSSYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSGVSHYGSVYYSWWALDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQASYPITFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 919)</p>
<p>单 Hc 构建体</p>	<p>EFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNSSFYFMHWHVVRQAPGKGLEWVATVYPYLDYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAFPGSYHPMDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYCCQSSYSLITFGQGTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDSDGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSYYMHWVRQAPGKGLEWVASIYSSYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWSHVSGHYSGMDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSSYSLITFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 920)</p>

[0268]

表 13: 具有 Fc 结构域氨基酸突变 DANG、LALAPS、LALAPS 和 Merchant 或 LALAPS 和 Merchant S-S 的 FZD4 激动剂 ANT39 和 ANT42、ANT39 和 ANT42 以及 ANT39i 和 ANT42i 的白“重链”构建体和“轻链”构建体的双抗体-Fc-Fab 和 IgG-双抗体氨基酸序列。成熟序列不包含 5'前导肽。链的 V 区 CDR 以下划线、斜体和粗体表示，Fc 无效突变以斜体表示，CH3 异二聚化突变以下划线和斜体表示，CH3 cys 二硫桥以粗体表示，接头以下划线表示。

ANT39i HC 白 DANG

MNLLLILTFVAAAVAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHWVVRQAPGKGLEWVAVISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKN
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPPEV
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY
 TLPPIRELMNTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLISKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSL
 LSPGKGGSGGGSGGGSGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSSIHWVVRQAPGKGLEWVASISSSYGYTYYADSVKGR
 FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGLTVVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSAVAWYQQ
 KPGKAPKLLIYSASDLYSGVPSRFRSGRSRGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKEIK* (SEQ ID NO: 921)

ANT39i HC 白 LALAPS

MNLLLILTFVAAAVAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHWVVRQAPGKGLEWVAVISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKN
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPPEV
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY
 TLPPIRELMNTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLISKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSL
 LSPGKGGSGGGSGGGSGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSSIHWVVRQAPGKGLEWVASISSSYGYTYYADSVKGR
 FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGLTVVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSAVAWYQQ
 KPGKAPKLLIYSASDLYSGVPSRFRSGRSRGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKEIK* (SEQ ID NO: 922)

[0269]

ANT39i HC 白 LALAPS Merchant

MNLLLLTFVAAA^{AEV}QLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}TLSSYSMHWVVRQAPGKLEWVA^{YISSYDSITDY}ADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSL_{SC}AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL_ISKLTVDKSRWQQGNVFSCSMHEALHNHYTQKSL
SLSPGKGGSGGGSGGGSGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}DFSSSSHVVRQAPGKLEWVA^{SISSSYGYTY}YADSVKGR
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSVSSAVAWYQ
QKPGKAPKLLIYSADLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 923)

ANT39i HC 白 LALAPS Merchant S-S

MNLLLLTFVAAA^{AEV}QLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}TLSSYSMHWVVRQAPGKLEWVA^{YISSYDSITDY}ADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQV
TLPPSREEMTKNQVSL_{SC}AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL_ISKLTVDKSRWQQGNVFSCSMHEALHNHYTQKSL
SLSPGKGGSGGGSGGGSGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}DFSSSSHVVRQAPGKLEWVA^{SISSSYGYTY}YADSVKGR
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSVSSAVAWYQ
QKPGKAPKLLIYSADLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 924)

成熟 ANT39i HC 白 DANG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}TLSSYSMHWVVRQAPGKLEWVA^{YISSYDSITDY}ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARPAVGHMAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS^{GVHTFPAVLQSSGLYS}
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKF
N^{WYVDGVEVHNAKTKPREEQY}GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPP_IRE_LMT_SNQ_VSL_S
C_AV_KG_FY_PS_DI_AV_EW_ES_NG_QP_EN_NY_KT_TP_PV_LD_SD_GS_FF_L_ISKLTVDKSRWQQGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSPGKGGSGGGSGG
GSGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}DFSSSSHVVRQAPGKLEWVA^{SISSSYGYTY}YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ

[0270]

MNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSVSSAVAWYQQPKGKAPKLLIYS4SD
LYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 925)

成熟 ANT39i HC 白 LALAPS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHWVRQAPGKGLEWVAYISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARPAVGHMAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIKTISKAKGQPREPQVYITLPP/REZMTSNQVSLS
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLSSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGG
GSGGGSGTIGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSSHHWVRQAPGKGLEWVASISSSYGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSVSSAVAWYQQPKGKAPKLLIYS4SD
LYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 926)

成熟 ANT39i HC 白 LALAPS Merchant

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHWVRQAPGKGLEWVAYISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARPAVGHMAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLS
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLSSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGG
GSGGGSGTIGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSSHHWVRQAPGKGLEWVASISSSYGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQSVSSAVAWYQQPKGKAPKLLIYS4SD
LYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 927)

成熟 ANT39i HC 白 LALAPS Merchant S-S

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHWVRQAPGKGLEWVAYISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARPAVGHMAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLS

[0271]

C4VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLJ/SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGG
GSGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSIHWVVRQAPGKGLEWVA/SISSYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGTLLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSAVAWYQQKPKAPKLLIYS4SD
LYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 928)

ANT39i HC # DANG

MNLLLILTFVAAAVAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHWVVRQAPGKGLEWVA/VISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEV
TCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREP^{MVF}
DLPPSREEMTKNQVSLIWC^{MV}KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDF^{TA}YAMHWVVRQAPGKGLEWVA/SIYPSGGY^{TA}YADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR^{RSY}FALDYWGQGTLLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSA
VAWYQQKPKAPKLLIYS4SSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYAWYSPITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 929)

ANT39i HC # LALAPS

MNLLLILTFVAAAVAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHWVVRQAPGKGLEWVA/VISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEV
TCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREP^{MVF}
DLPPSREEMTKNQVSLIWC^{MV}KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDF^{TA}YAMHWVVRQAPGKGLEWVA/SIYPSGGY^{TA}YADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR^{RSY}FALDYWGQGTLLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSA
VAWYQQKPKAPKLLIYS4SSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYAWYSPITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 930)

[0272]

ANT39i HC 杆 LALAPS Merchant

MNLLILTFVAAA^{AV}AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}TLSSYSMHWVVRQAPGKGLEWV^AYISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLPPKPKDITLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGSGGGSGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}DFIAYAMHWVVRQAPGKGLEWV^ASIYPSGGYIAYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSYFFALDYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSYVSSA
VAWYQQKPKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQYWAYISYPITFGGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 931)

ANT39i HC 杆 LALAPS Merchant S-S

MNLLILTFVAAA^{AV}AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}TLSSYSMHWVVRQAPGKGLEWV^AYISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLPPKPKDITLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY
TLPPCREEMTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGSGGGSGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}DFIAYAMHWVVRQAPGKGLEWV^ASIYPSGGYIAYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSYFFALDYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSYVSSA
VAWYQQKPKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQYWAYISYPITFGGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 932)

成熟 ANT39i HC 杆 DANG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}TLSSYSMHWVVRQAPGKGLEWV^AYISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT
VYYCARPAVGHMAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSL
#CMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGGS
GGSGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}DFIAYAMHWVVRQAPGKGLEWV^ASIYPSGGYIAYADSVKGRFTISADTSKNTA

[0273]

YLQMNSLRAEDTAVYYCARRSYYFALDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLL
IYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 933)

成熟 ANT39i HC 样 LALAPS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHHWVRQAPGKGLEWVAYISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARPAVGHMAFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPMVFDLPPSRREEMTKNQVSL
WCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGG
GGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFAYAMHWVRQAPGKGLEWVASIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSKNTA
YLQMNSLRAEDTAVYYCARRSYYFALDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLL
IYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 934)

成熟 ANT39i HC 样 LALAPS Merchant

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHHWVRQAPGKGLEWVAYISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARPAVGHMAFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSL
WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGSG
GGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFAYAMHWVRQAPGKGLEWVASIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSKNTAY
LQMNSLRAEDTAVYYCARRSYYFALDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLLI
YSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 935)

成熟 ANT39i HC 样 LALAPS Merchant S-S

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHHWVRQAPGKGLEWVAYISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARPAVGHMAFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

[0274]

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPCREEMTKNQVSL
#CLVKGYFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGSG
GGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF#DFTAYAMHWVRQAPGKGLEWVA#SIYPSGGYTA#YADSVKGRFTISADTSKNTAY
LQMNSLRAEDTAVYYCAR#RSYFFALDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRAS#QSVSSAVAWYQQKPKAPKLLI
Y#ASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQY#AYYSPITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 936)

ANT39 Hc 鼠 DANG

MNLLLLTFVAAA#AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF#DFSSSS#HWHVVRQAPGKGLEWVA#SISSSYGYTY#ADSVKGRFTISADTSKNT
AYLQMNSLRAEDTAVYYCAR#SWAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRAS#QSVSSAVAWYQQKPKAPKLLI
Y#ASDL#YSGVPSRFSGRSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQY#AGAGLITFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTHTTCTPPCPAPELLGGPSV
FLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY#GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPP#RE#MT#SNQVSL#SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL#SKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF#T#SSYS#MHWVRQAPGKGLEW
VA#YISSYDSITDY#ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR#PAVGHMAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT* (SEQ
ID NO: 908)

ANT39 Hc 鼠 LALAPS

MNLLLLTFVAAA#AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF#DFSSSS#HWHVVRQAPGKGLEWVA#SISSSYGYTY#ADSVKGRFTISADTSKNT
AYLQMNSLRAEDTAVYYCAR#SWAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRAS#QSVSSAVAWYQQKPKAPKLLI
Y#ASDL#YSGVPSRFSGRSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQY#AGAGLITFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTHTTCTPPCPAPEA#AGGPSV
FLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY#NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPP#RE#MT#SNQVSL#SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL#SKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF#T#SSYS#MHWVRQAPGKGLEW
VA#YISSYDSITDY#ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR#PAVGHMAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT* (SEQ
ID NO: 937)

[0275]

ANT39 Hc 白 LALAPS Merchant

MNLLILTFVAAVAEVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**DFSSSSHHWVRQAPGKGLEWVA****SISSSYGYTY**YADSVKGRFTISADTSKNT
 AYLQMNLSRAEDTAVYYCAR**SWAMDY**WGQGTLLTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSVSSA**VAWYQQKPGKAPKLLI
YSADLYSGVPSRFSRSGTDFLLTISSLQPEDFATYYC**QYAGAGLI**TFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTKHTCCPCPAPEAAAGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 SIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL**SCAVK**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL**I**SKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**TLSSYSMH**WVVRQAPGKGLE
 WV**AYISSYDSITD**YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAR**PAIGHMAFDY**WGQGTLLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTS
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHITPAV**LQSSGLYSLSSV**TVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDKKHTHT*
 (SEQ ID NO: 938)

ANT39 Hc 白 LALAPS Merchant S-S

MNLLILTFVAAVAEVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**DFSSSSHHWVRQAPGKGLEWVA****SISSSYGYTY**YADSVKGRFTISADTSKNT
 AYLQMNLSRAEDTAVYYCAR**SWAMDY**WGQGTLLTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSVSSA**VAWYQQKPGKAPKLLI
YSADLYSGVPSRFSRSGTDFLLTISSLQPEDFATYYC**QYAGAGLI**TFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTKHTCCPCPAPEAAAGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 SIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSL**SCAVK**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL**I**SKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**TLSSYSMH**WVVRQAPGKGLE
 WV**AYISSYDSITD**YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAR**PAIGHMAFDY**WGQGTLLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTS
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHITPAV**LQSSGLYSLSSV**TVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDKKHTHT*
 (SEQ ID NO: 939)

成熟 ANT39 Hc 白 DANG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**DFSSSSHHWVRQAPGKGLEWVA****SISSSYGYTY**YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTA
 VYYCAR**SWAMDY**WGQGTLLTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSVSSA**VAWYQQKPGKAPKLLI**YSADLY**SGVPSRFSG
 SRSGTDFLLTISSLQPEDFATYYC**QYAGAGLI**TFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTKHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREP

[0276]

QVYTLPP/REZMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL/SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF~~TLSSYSM~~HVVRQAPGKLEWVA~~YISSYDSITD~~YADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR~~PAVGHMAFD~~YWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLA~~PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE~~
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDK~~KKVEPKSCDKTHT*~~ (SEQ ID NO: 940)

成熟 ANT39 Hc 白 LALAPS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF~~DFSSSS~~IHWVRQAPGKLEWVA~~SISSSYGYTY~~YADS~~VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA~~
VYYCAR~~SWAMD~~YWGQGLTVVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS~~QSVSSAV~~AWYQQKPKAPKLLIY~~SASDL~~YSGVPSRFSG
SRSGTDFLLTISSLQPEDFATYYCQQ~~YAGAGL~~TFGGGTKVEIKGGGGGGGGSEPKSSDK~~THICPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT~~
PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEI~~KTISKAKGQPREP~~
QVYTLPP/REZMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL/SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF~~TLSSYSM~~HVVRQAPGKLEWVA~~YISSYDSITD~~YADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR~~PAVGHMAFD~~YWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLA~~PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE~~
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDK~~KKVEPKSCDKTHT*~~ (SEQ ID NO: 941)

成熟 ANT39 Hc 白 LALAPS Merchant

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF~~DFSSSS~~IHWVRQAPGKLEWVA~~SISSSYGYTY~~YADS~~VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA~~
VYYCAR~~SWAMD~~YWGQGLTVVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS~~QSVSSAV~~AWYQQKPKAPKLLIY~~SASDL~~YSGVPSRFSG
SRSGTDFLLTISSLQPEDFATYYCQQ~~YAGAGL~~TFGGGTKVEIKGGGGGGGGSEPKSSDK~~THICPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT~~
PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEI~~KTISKAKGQPREP~~
QVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL/SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT
QKLSLS~~SPKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF~~~~TLSSYSM~~HVVRQAPGKLEWVA~~YISSYDSITD~~YAD
SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR~~PAVGHMAFD~~YWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLA~~PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE~~
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDK~~KKVEPKSCDKTHT*~~ (SEQ ID NO: 942)

成熟 ANT39 Hc 白 LALAPS Merchant S-S

[0277]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD**FFSSSS**HVVRRQAPGKGLEWVA**SISSSYGYTY**YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAR**SWAMDY**WGQGTLLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRAS**QSVSSA**VAWYQQKPKAPKLLIY**SADLY**SGVPSRFSG
 SRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ**YAGAGL**ITFGQGTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHTCCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIKTISKAKGQPREP
 QVCTLPPSREEMTKNQVSL**SCAV**KVGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLJ**SKL**TVDKSRWQQGNV**FSC**VMHEALHNHYT
 QKSLSPGKGGGGGGGGSGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**TLSSYS**MHHVVRQAPGKGLEWVA**YISSYDSITD**YAD
 SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**PAVGHMAFD**YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT* (SEQ ID NO: 943)

ANT39 Hc # DANG

MNLLLLTFVAAA**VAEV**QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**DFTAYAM**HVVRRQAPGKGLEWVA**SIYPSGGYTAY**ADSVKGRFTISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**RSYFFAL**DYWGQGTLLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRAS**QSVSSA**VAWYQQKPKAP
 KLLIY**SASSLY**SGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ**YWAYYSPI**TFGQGTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHTCCPPCAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGYSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTIKAKGQPREP**MVFDL**PPSREEMTKNQVSL**MC**MVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSV**MHEALHNHY**TQKLSLS**SPGKGGGGGGSGSTGEV**QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**TLSSYS**MHHVVRQAP
 GKGLEWVA**YISSYDSITD**YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**PAVGHMAFD**YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HT* (SEQ ID NO: 944)

ANT39 Hc # LALAPS

MNLLLLTFVAAA**VAEV**QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**DFTAYAM**HVVRRQAPGKGLEWVA**SIYPSGGYTAY**ADSVKGRFTISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**RSYFFAL**DYWGQGTLLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRAS**QSVSSA**VAWYQQKPKAP
 KLLIY**SASSLY**SGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ**YWAYYSPI**TFGQGTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHTCCPPCAPEAAAG
 GPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTIKAKGQPREP**MVFDL**PPSREEMTKNQVSL**MC**MVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSV**MHEALHNHY**TQKLSLS**SPGKGGGGGGSGSTGEV**QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**TLSSYS**MHHVVRQAP

[0278]

GKGLEWVA YISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPFLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDCKT
HT* (SEQ ID NO: 945)

ANT39 Hc 序 LALAPS Merchant

MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFDFTAYAMHWVVRQAPGKGLEWVA SIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSYFALDYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAP
KLLIYSASSLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGQGTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAAG
GPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPASTIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVLTDKSRWQQ
GNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLSSYSMHWVVRQAPG
KGLEWVA YISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPFLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDCKT
HT* (SEQ ID NO: 946)

ANT39 Hc 序 LALAPS Merchant S-S

MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFDFTAYAMHWVVRQAPGKGLEWVA SIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSYFALDYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAP
KLLIYSASSLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGQGTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAAG
GPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPASTIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVLTDKSRWQ
QGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLSSYSMHWVVRQAP
GKGLEWVA YISSYDSITDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPFLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDCKT
HT* (SEQ ID NO: 947)

成熟 ANT39 Hc 序 DANG

[0279]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFDFTAYAMHWVVRQAPGKGLEWVASIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT
 AVYYCARRSYFEALDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASSLYSGVPS
 RFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGGQTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDRTL
 MISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
 HNHYTQKLSLSLSPGKGGGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFTLSSYSMHWVVRQAPGKGLEWVAYISSYDSI
TDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT* (SEQ ID NO: 948)

成熟 ANT39 He 株 LALAPS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFDFTAYAMHWVVRQAPGKGLEWVASIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT
 AVYYCARRSYFEALDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASSLYSGVPS
 RFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGGQTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHICPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDRTL
 MISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
 HNHYTQKLSLSLSPGKGGGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFTLSSYSMHWVVRQAPGKGLEWVAYISSYDSI
TDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAVGHMAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT* (SEQ ID NO: 949)

成熟 ANT39 He 株 LALAPS Merchant

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFDFTAYAMHWVVRQAPGKGLEWVASIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT
 AVYYCARRSYFEALDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASSLYSGVPS
 RFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGGQTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHICPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDRTL
 MISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLKVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
 HNHYTQKLSLSLSPGKGGGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFTLSSYSMHWVVRQAPGKGLEWVAYISSYDSI

[0280]

TDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAYGHMAFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT* (SEQ ID NO: 950)

成熟 ANT39 Hc 杆 LALAPS Merchant

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFTAYAMHWVRQAPGKGLEWVASIYPSGGYLAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT
AVYYCARRSYFFALDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASOSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPS
RFGSRSRGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPIITFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTHTCCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDRTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIETISKAKG
QPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLIKLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYSMHWVRQAPGKGLEWVAYISSYDSI
TDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARPAYGHMAFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT* (SEQ ID NO: 951)

ANT39 LC

MNLLILTFVAAAVADIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASOSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLQ
EDFATYYCQQWYNAPIITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSIT
YLSSSLTILSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 909)

成熟 ANT39 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASOSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQWYNAP
IITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITSLSSLTILSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 952)

ANT42i HC 白 DANG

MNLLILTFVAAAVAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDFYFIHWVRQAPGKGLEWVATIYPIFINTYYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAFPGSYHPFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDRTL

[0281]

TCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY
TLPP/RELMT\$NQVSL\$CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL/SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGKGGGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSS\$HWHVVRQAPGKGLEWVA\$SSSSYGYTYADSVKGR
FTISADTSKNTAYLQMN\$SLRAEDTAVYYCAR\$SW\$AMDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS\$QSVSS\$AVAWYQQ
KPGKAPKLLIY\$ASDLY\$SGVPSRFSRSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 953)

ANT42i HC 白 LALAPS

MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF\$TSDFYF\$HWHVVRQAPGKGLEWVA\$TIYFFIGNTYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMN\$SLRAEDTAVYYCAR\$AFPGSYH\$PFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS\$SLGTQTYICNVN\$H\$KPSNTKVDK\$KVEPK\$CDKTH\$T\$C\$P\$C\$P\$A\$E\$A\$GG\$S\$V\$F\$L\$P\$P\$K\$D\$T\$L\$M\$IS\$R\$T\$P\$E\$V
TCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY
TLPP/RELMT\$NQVSL\$CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL/SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGKGGGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSS\$HWHVVRQAPGKGLEWVA\$SSSSYGYTYADSVKGR
FTISADTSKNTAYLQMN\$SLRAEDTAVYYCAR\$SW\$AMDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS\$QSVSS\$AVAWYQQ
KPGKAPKLLIY\$ASDLY\$SGVPSRFSRSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 954)

ANT42i HC 白 LALAPS Merchant

MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF\$TSDFYF\$HWHVVRQAPGKGLEWVA\$TIYFFIGNTYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMN\$SLRAEDTAVYYCAR\$AFPGSYH\$PFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS\$SLGTQTYICNVN\$H\$KPSNTKVDK\$KVEPK\$CDKTH\$T\$C\$P\$C\$P\$A\$E\$A\$GG\$S\$V\$F\$L\$P\$P\$K\$D\$T\$L\$M\$IS\$R\$T\$P\$E\$V
TCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY
TLPP\$REEMTK\$NQVSL\$CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL/SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS
SLSPGKGGGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSS\$HWHVVRQAPGKGLEWVA\$SSSSYGYTYADSVKGR
RFTISADTSKNTAYLQMN\$SLRAEDTAVYYCAR\$SW\$AMDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS\$QSVSS\$AVAWYQQ
KPGKAPKLLIY\$ASDLY\$SGVPSRFSRSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 955)

ANT42i HC 白 LALAPS Merchant S-S

[0282]

MNLLILTFVAAA~~VAE~~VLVESGGGLVQPGGSLRLS~~CAASGF~~**TSDFYFJ**H~~WVRQ~~APGKGLEW~~V~~A**TIYPIFIGNTY**ADSVKGRFTISADTSKN
 TAYLQMNSLRAEDTA~~VYYCAR~~**AFPGSYHPFDY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFP~~LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP~~TVTSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV~~PS~~SLGTQTYICNVNHKPSNTK~~VDK~~KVEPKSCDK~~TH~~TCPPCAPE~~A~~AGGSPVFLFPKPKD~~TL~~MISRTP~~EV~~
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ~~YN~~STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP~~ASIEK~~TISKAKGQPREPQ~~VC~~
 TLPSSREEMTKNQVSL~~SC~~AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TT~~PPVLDSDGGSFFL~~I~~SKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCSMHEALHNHYT~~Q~~KSLS
 SLSPGKGGSGGGSGGGSGGSGTIGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS~~CAASGF~~**DFSSSSJ**H~~WVRQ~~APGKGLEW~~V~~A**SISSSYGYTY**YADSVKGRFTISADTSKN
 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA~~VYYCAR~~**SWAMDY**WGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD~~RV~~TITCRAS**QSVSSA**VAWYQ
 QKPGKAPKLLIY**SADLYSGVPSRFS**SGRS~~GT~~DFLTISSLQPEDFATYYCQQ**YAGAGLI**TFGGQTKVEIK* (SEQ ID NO: 956)

成熟 ANT421 HC 白 DANG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS~~CAASGF~~**TSDFYFJ**H~~WVRQ~~APGKGLEW~~V~~A**TIYPIFIGNTY**ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAR**AFPGSYHPFDY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFP~~LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP~~TVTSWNSGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYS~~
 LSSVTV~~PS~~SLGTQTYICNVNHKPSNTK~~VDK~~KVEPKSCDK~~TH~~TCPPCAPE~~L~~GGPSVFLFPKPKD~~TL~~MISRTP~~EV~~TCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQ~~YN~~STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP~~ASIEK~~TISKAKGQPREPQ~~VY~~TLPP~~RE~~LM~~TS~~NQVSL~~S~~
 CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TT~~PPVLDSDGGSFFL~~I~~SKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCSMHEALHNHYT~~Q~~KSLSLSPGKGGSGGGSGG
 GSGGGSGTIGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS~~CAASGF~~**DFSSSSJ**H~~WVRQ~~APGKGLEW~~V~~A**SISSSYGYTY**YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
 MNSLRAEDTA~~VYYCAR~~**SWAMDY**WGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD~~RV~~TITCRAS**QSVSSA**VAWYQQKPGKAPKLLIY**SASD**
LYSGVPSRFSSGRS~~GT~~DFLTISSLQPEDFATYYCQQ**YAGAGLI**TFGGQTKVEIK* (SEQ ID NO: 957)

成熟 ANT421 HC 白 LALAPS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS~~CAASGF~~**TSDFYFJ**H~~WVRQ~~APGKGLEW~~V~~A**TIYPIFIGNTY**ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAR**AFPGSYHPFDY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFP~~LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP~~TVTSWNSGALTS~~GVHTFPAVLQSSGLYS~~
 LSSVTV~~PS~~SLGTQTYICNVNHKPSNTK~~VDK~~KVEPKSCDK~~TH~~TCPPCAPE~~A~~AGGSPVFLFPKPKD~~TL~~MISRTP~~EV~~TCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQ~~YN~~STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP~~ASIEK~~TISKAKGQPREPQ~~VY~~TLPP~~RE~~LM~~TS~~NQVSL~~S~~
 CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TT~~PPVLDSDGGSFFL~~I~~SKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCSMHEALHNHYT~~Q~~KSLSLSPGKGGSGGGSGG
 GSGGGSGTIGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS~~CAASGF~~**DFSSSSJ**H~~WVRQ~~APGKGLEW~~V~~A**SISSSYGYTY**YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ

[0283]

MNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKAPKLLIYS4SD
LYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 958)

成熟 ANT42i HC 白 LALAPS Merchant

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDFYFIHWVVRQAPGKGLEWVATIYPIFIGNTIYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARAFPGSYHPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLS
C4VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLSSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGSGG
GSGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSSIHWVVRQAPGKGLEWVASISSSYGYTYIYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKAPKLLIYS4SD
LYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 959)

成熟 ANT42i HC 白 LALAPS Merchant S-S

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDFYFIHWVVRQAPGKGLEWVATIYPIFIGNTIYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARAFPGSYHPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLS
C4VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLSSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGSGG
GSGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSSIHWVVRQAPGKGLEWVASISSSYGYTYIYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKAPKLLIYS4SD
LYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 960)

ANT42i HC 杆 DANG

MNLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDFYFIHWVVRQAPGKGLEWVATIYPIFIGNTIYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAFPGSYHPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPET

[0284]

TCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNACTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPMVF
DLPPSREEMTKNQVSLW/CML/KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDTAYAMHWVVRQAPGKGLEWVASIYPSGGGYTAYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCCARRSYFALDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIVSSA
VAWYQQKPGKAPKLLIYSASLLYSGVPSRFRSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPIITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 961)

ANT42i HC # LALAPS

MNLLLILTFVAAAVAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDFYFJHWVVRQAPGKGLEWVATIYPIFIGNTIYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYCCARAFPGSYHHPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLPPKPKDITLMISRTPEV
TCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNACTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPMVF
DLPPSREEMTKNQVSLW/CML/KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDTAYAMHWVVRQAPGKGLEWVASIYPSGGGYTAYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCCARRSYFALDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIVSSA
VAWYQQKPGKAPKLLIYSASLLYSGVPSRFRSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPIITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 962)

ANT42i HC # LALAPS Merchant

MNLLLILTFVAAAVAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDFYFJHWVVRQAPGKGLEWVATIYPIFIGNTIYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYCCARAFPGSYHHPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLPPKPKDITLMISRTPEV
TCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNACTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLW/CML/KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDTAYAMHWVVRQAPGKGLEWVASIYPSGGGYTAYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCCARRSYFALDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIVSSA
VAWYQQKPGKAPKLLIYSASLLYSGVPSRFRSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPIITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 963)

ANT42i HC # LALAPS Merchant S-S

[0285]

MNLLILTFVAAA^{AEVQL}VESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}**TSDFYFJH**WVVRQAPGKGLEWVA**TIYPIFN**TY^YADSVKGRFTISADTSKN
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AFPGSYH**PF^{FDY}WGQGTLVTVSSASTKGPSVFP^{LAPSSK}STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV^{PSSSL}GTQTYICNVNHKPSNTKVDK^{KEPK}SCDKTHTCP^{CPAPEA}AGGSPVFLPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ^{YNSTRY}VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY
 TLPPCREEMTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TPPVLD}SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^{FSCVM}HEALHNHYTQKS
 LSLSPGKGGSGGGSGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}**DFIAYAM**HWVVRQAPGKGLEWVA**SIYPSGG**Y^{TA}YADS
 VKGRFTISADTSKN^{TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR}**RSYFAL**DYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV^{GDRVTIT}CRAS**QSVSSA**
 VAWYQQKPGKAPKLLIY**SASSLY**SGVPSRFSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQ**YWAYYSPI**TFGGQTKVEIK* (SEQ ID NO: 964)

成熟 ANT421 HC 杆 DANG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}**TSDFYFJH**WVVRQAPGKGLEWVA**TIYPIFN**TY^YADSVKGRFTISADTSKN^{TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR}**AFPGSYH**PF^{FDY}WGQGTLVTVSSASTKGPSVFP^{LAPSSK}STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS^{GVHTFPAVLQSSGLYS}
 LSSVTV^{PSSSL}GTQTYICNVNHKPSNTKVDK^{KEPK}SCDKTHTCP^{CPAPEL}GGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAV^{SHEDPEVKF}
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQ^{YSTYRV}SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREP**MVFDL**PPSREEMTKNQVSL
ICMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TPPVLD}SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^{FSCVM}HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGGS
 GGGSGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}**DFIAYAM**HWVVRQAPGKGLEWVA**SIYPSGG**Y^{TA}YADSVKGRFTISADTSKN^{TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR}**RSYFAL**
 DYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV^{GDRVTIT}CRAS**QSVSSA**VAWYQQKPGKAPKLLIY**SASSLY**SGVPSRFSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQ**YWAYYSPI**TFGGQTKVEIK* (SEQ ID NO: 965)

成熟 ANT421 HC 杆 LALAPS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}**TSDFYFJH**WVVRQAPGKGLEWVA**TIYPIFN**TY^YADSVKGRFTISADTSKN^{TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR}**AFPGSYH**PF^{FDY}WGQGTLVTVSSASTKGPSVFP^{LAPSSK}STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS^{GVHTFPAVLQSSGLYS}
 LSSVTV^{PSSSL}GTQTYICNVNHKPSNTKVDK^{KEPK}SCDKTHTCP^{CPAPEA}AGGSPVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQ^{YNSTRY}VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREP**MVFDL**PPSREEMTKNQVSL
ICMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TPPVLD}SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^{FSCVM}HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGGS
 GGGSGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS^{CAASGF}**DFIAYAM**HWVVRQAPGKGLEWVA**SIYPSGG**Y^{TA}YADSVKGRFTISADTSKN^{TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR}**RSYFAL**
 DYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV^{GDRVTIT}CRAS**QSVSSA**VAWYQQKPGKAPKLLIY**SASSLY**SGVPSRFSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQ**YWAYYSPI**TFGGQTKVEIK* (SEQ ID NO: 965)

[0286]

YLQMNSLRAEDTAVYYCARRSYYFALDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 966)

成熱 ANT42i Hc 株 LALAPS Merchant

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDFYFIHWVVRQAPGKGLEWVATIYPIFIGNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAFPGSYHPFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLICLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGSGGGGGSGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFIAYAMHWHVVRQAPGKGLEWVASIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSYYFALDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 967)

成熱 ANT42i Hc 株 LALAPS Merchant S-S

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDFYFIHWVVRQAPGKGLEWVATIYPIFIGNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAFPGSYHPFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPCREEMTKNQVSLICLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGSGGGGGSGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFIAYAMHWHVVRQAPGKGLEWVASIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSYYFALDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGQGTKVEIK* (SEQ ID NO: 968)

ANT42 Hc 株 DANG

MNLLLITFVAAA₁AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSSIHWVVRQAPGKGLEWVASISSSYGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWAMDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKAPKLLIYSASDLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYAGAGLITFGQGTKVEIKGGGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSV

[0288]

SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHT*
(SEQ ID NO: 970)

ANT42 Hc 白 LALAPS Merchant S-S

MNLLLITFVAAVAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSSHHWVVRQAPGKGLEWVA¹SISSSYGYTYYADSVKGRFTISADTSKNT
AYLQMNSLRAEDTAVYYCAR²SWAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS³OSVSSAVAWYQQKPKAPKLLI
Y⁴SASDLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ⁵YAGAGLITFGQGTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPETVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRREMTKNQVSL⁶SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLISKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMEALHNHYTQKLSLSPGKGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF⁷TSDFYFYHWHVVRQAPGKGLE
WVA⁸TIYFFIGNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR⁹AFPGSYHPPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHT*
(SEQ ID NO: 971)

成熟 ANT42 Hc 白 DANG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSSHHWVVRQAPGKGLEWVA¹SISSSYGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCAR²SWAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS³OSVSSAVAWYQQKPKAPKLLIY⁴SASDLYSGVPSRFSG
SRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ⁵YAGAGLITFGQGTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
PEVTCVVA⁶VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY⁷GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREP
QVYTLPP/RE⁸MTSNQVSL⁹SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLISKLTVDKSRWQQGNVFC¹⁰SVMEALHNHYTQ
KLSLSPGKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF¹¹TSDFYFYHWHVVRQAPGKGLEWVA¹²TIYFFIGNTYYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR¹³AFPGSYHPPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHT* (SEQ ID NO: 972)

成熟 ANT42 Hc 白 LALAPS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSSSHHWVVRQAPGKGLEWVA¹SISSSYGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCAR²SWAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS³OSVSSAVAWYQQKPKAPKLLIY⁴SASDLYSGVPSRFSG

[0289]

SRS^GT^DF^TL^TI^SS^LQ^PE^DF^AT^YC^QYAGAGLT^FG^QT^KV^EI^KG^GG^GG^GG^GS^EP^KS^SD^KT^HI^CP^PC^AP^EA^AG^GP^SV^FL^FP^PK^PK^DT^LM^IS^RT
 P^EV^TC^VV^DV^SH^ED^PE^VK^FN^WY^VD^GV^EV^HN^AK^TK^PR^EE^QY^NS^TY^RV^VS^VL^TV^LH^QD^WL^NG^KE^YK^CK^VS^NK^AL^PA^SI^EK^TI^SK^AK^GQ^PR^EP
 Q^VY^TL^PP[/]R^EL[/]M^TS^NQ[/]S^LS^CA^VK^GF^YP^SD^IA^VE^WE^SN^GQ^PE^NN^YK^TT^PP^VL^DS^DG^SF^L/S^KL^TV^DK^SR^WQ^QG^NV^FS^CS^VM^HE^AL^HN^HY^TQ
 K^SL^SL^SP^GK^GG^GG^GG^GG^GS^TG^EV^QL^VE^SG^GL^VQ^PG^SL^RL^SC^AA^SG^FTSDFYFH^WV^RQ^AP^GK^GL^EW^VA^TI^PF^IG^NT^YY^AD^S
 V^KG^RF^TI^SA^DT^SK^NT^AY^LQ^MN^SL^RA^ED^TA^VY^YC^AR^AAFPGSYHP^FD^YW^GQ^TL^VT^VS^SA^ST^KG^PS^VF^LA^PS^SK^ST^SG^GT^AL^GC^LV^KD^YF^PE
 P^VT^VS^WN^SG^AL^TS^GV^HT^FP^AV^LQ^SS^GL^YS^LS^SV^TV^PS^SL^GT^QT^YI^CN^VN^HK^PS^NT^KV^DK^KV^EP^KS^CD^KT^HT* (SEQ ID NO: 973)

成熟 ANT42 Hc 白 LALAPS Merchant

E^VQ^LV^ES^GG^GL^VQ^PG^GS^LR^LS^CA^AS^GF^DF^SS^SS^IH^WV^RQ^AP^GK^GL^EW^VA^SI^SS^SY^GY^TY^AD^SV^KG^RF^TI^SA^DT^SK^NT^AY^LQ^MN^SL^RA^ED^TA
 V^YY^CA^RSWA^MD^YW^GQ^TL^VT^VS^SG^GG^SD^IQ^MT^QS^PS^LS^AS^VG^DR^VT^IT^CR^AS^QS^VS^AV^AW^YQ^QK^PG^KA^PK^LL^IY^SASDLY^SG^VP^SR^FS^G
 S^RS^GT^DF^TL^TI^SS^LQ^PE^DF^AT^YC^QYAGAGLT^FG^QT^KV^EI^KG^GG^GG^GG^GS^EP^KS^SD^KT^HI^CP^PC^AP^EA^AG^GP^SV^FL^FP^PK^PK^DT^LM^IS^RT
 P^EV^TC^VV^DV^SH^ED^PE^VK^FN^WY^VD^GV^EV^HN^AK^TK^PR^EE^QY^NS^TY^RV^VS^VL^TV^LH^QD^WL^NG^KE^YK^CK^VS^NK^AL^PA^SI^EK^TI^SK^AK^GQ^PR^EP
 Q^VY^TL^PP^SR^EE^MT^KN^Q/S^LS^CA^VK^GF^YP^SD^IA^VE^WE^SN^GQ^PE^NN^YK^TT^PP^VL^DS^DG^SF^L/S^KL^TV^DK^SR^WQ^QG^NV^FS^CS^VM^HE^AL^HN^HY^T
 Q^KS^LS^LS^PG^KG^GG^GG^GG^GS^TG^EV^QL^VE^SG^GL^VQ^PG^SL^RL^SC^AA^SG^FTSDFYFH^WV^RQ^AP^GK^GL^EW^VA^TI^PF^IG^NT^YY^A
 D^SV^KG^RF^TI^SA^DT^SK^NT^AY^LQ^MN^SL^RA^ED^TA^VY^YC^AR^AAFPGSYHP^FD^YW^GQ^TL^VT^VS^SA^ST^KG^PS^VF^LA^PS^SK^ST^SG^GT^AL^GC^LV^KD^Y
 F^PE^PV^TV^SW^NS^GA^LT^SG^VH^TF^PA^VL^QS^SG^LY^SL^SS^SV^TV^PS^SL^GT^QT^YI^CN^VN^HK^PS^NT^KV^DK^KV^EP^KS^CD^KT^HT* (SEQ ID NO: 974)

成熟 ANT42 Hc 白 LALAPS Merchant S-S

E^VQ^LV^ES^GG^GL^VQ^PG^GS^LR^LS^CA^AS^GF^DF^SS^SS^IH^WV^RQ^AP^GK^GL^EW^VA^SI^SS^SY^GY^TY^AD^SV^KG^RF^TI^SA^DT^SK^NT^AY^LQ^MN^SL^RA^ED^TA
 V^YY^CA^RSWA^MD^YW^GQ^TL^VT^VS^SG^GG^SD^IQ^MT^QS^PS^LS^AS^VG^DR^VT^IT^CR^AS^QS^VS^AV^AW^YQ^QK^PG^KA^PK^LL^IY^SASDLY^SG^VP^SR^FS^G
 S^RS^GT^DF^TL^TI^SS^LQ^PE^DF^AT^YC^QYAGAGLT^FG^QT^KV^EI^KG^GG^GG^GG^GS^EP^KS^SD^KT^HI^CP^PC^AP^EA^AG^GP^SV^FL^FP^PK^PK^DT^LM^IS^RT
 P^EV^TC^VV^DV^SH^ED^PE^VK^FN^WY^VD^GV^EV^HN^AK^TK^PR^EE^QY^NS^TY^RV^VS^VL^TV^LH^QD^WL^NG^KE^YK^CK^VS^NK^AL^PA^SI^EK^TI^SK^AK^GQ^PR^EP
 Q^VY^TL^PP^SR^EE^MT^KN^Q/S^LS^CA^VK^GF^YP^SD^IA^VE^WE^SN^GQ^PE^NN^YK^TT^PP^VL^DS^DG^SF^L/S^KL^TV^DK^SR^WQ^QG^NV^FS^CS^VM^HE^AL^HN^HY^T
 Q^KS^LS^LS^PG^KG^GG^GG^GG^GS^TG^EV^QL^VE^SG^GL^VQ^PG^SL^RL^SC^AA^SG^FTSDFYFH^WV^RQ^AP^GK^GL^EW^VA^TI^PF^IG^NT^YY^A
 D^SV^KG^RF^TI^SA^DT^SK^NT^AY^LQ^MN^SL^RA^ED^TA^VY^YC^AR^AAFPGSYHP^FD^YW^GQ^TL^VT^VS^SA^ST^KG^PS^VF^LA^PS^SK^ST^SG^GT^AL^GC^LV^KD^Y
 F^PE^PV^TV^SW^NS^GA^LT^SG^VH^TF^PA^VL^QS^SG^LY^SL^SS^SV^TV^PS^SL^GT^QT^YI^CN^VN^HK^PS^NT^KV^DK^KV^EP^KS^CD^KT^HT* (SEQ ID NO: 975)

ANT42 Hc 杆 DANG

[0290]

MNLLILTFVAAA AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF DFTAYAMHWWVRQAPGKGLEWVA SIYPSGGYTAY ADSVKGRFTISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR RSYFALDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS QSVSSAVAWYQQKPKGKAP
 KLLIY SASSLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YWAIYSPITFGQGTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELGG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTIISKAKGQPREP MVFDLPPSREEMTKNQVSL WCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TSDFYFHWWVRQAPG
 KGLEWVA TIYFFIGNTY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR AFPGSYHPFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HT* (SEQ ID NO: 976)

ANT42 Hc 序 LALAPS

MNLLILTFVAAA AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF DFTAYAMHWWVRQAPGKGLEWVA SIYPSGGYTAY ADSVKGRFTISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR RSYFALDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS QSVSSAVAWYQQKPKGKAP
 KLLIY SASSLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YWAIYSPITFGQGTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPASIEKTIISKAKGQPREP MVFDLPPSREEMTKNQVSL WCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TSDFYFHWWVRQAPG
 KGLEWVA TIYFFIGNTY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR AFPGSYHPFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HT* (SEQ ID NO: 977)

ANT42 Hc 序 LALAPS Merchant

MNLLILTFVAAA AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF DFTAYAMHWWVRQAPGKGLEWVA SIYPSGGYTAY ADSVKGRFTISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR RSYFALDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS QSVSSAVAWYQQKPKGKAP
 KLLIY SASSLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YWAIYSPITFGQGTKVEIKGGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPASIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ

[0291]

GNVFSVMEALHNHYTQKSLSPKGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**TSDFYFHHWVRQAPGK**
 GLEWVA**TIYPIGNTIY**ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AFPGSYHHPFDY**WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKKTH
 T* (SEQ ID NO: 978)

ANT42 Hc 杆 LALAPS Merchant S-S

MNLLLLTFVAAA~~AEV~~QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**DFTAYAMH**WVRQAPGKGLEWVA**SIYPSGGYTA**YADSVKGRFTISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**RSYFALDY**WGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRAS**QSVSSAV**AWYQQKPKGKAP
 KLLIY**SASSLYSGVPSRFS**SGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQ**YWAYYSPIT**FGQGTKVEIKGGGGGGGGSEPKSSDKTHICPPCPAPEAAG
 GPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPASTIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSVMEALHNHYTQKSLSPGKGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**TSDFYFHHWVRQAPG**
 KGLEWVA**TIYPIGNTIY**ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AFPGSYHHPFDY**WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HT* (SEQ ID NO: 979)

成熟 ANT42 Hc 杆 DANG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**DFTAYAMH**WVRQAPGKGLEWVA**SIYPSGGYTA**YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAR**RSYFALDY**WGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRAS**QSVSSAV**AWYQQKPKGKAPKLLIY**SASSLYSGVPS**
 RFGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQ**YWAYYSPIT**FGQGTKVEIKGGGGGGGGSEPKSSDKTHICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDRTL
 MISRTPEVTCVVA~~AV~~SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKG
 QPREP**MVE**DLPPSREEMTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEAL
 HNHYTQKSLSPKGGGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**TSDFYFHHWVRQAPGKGLEWVA****TIYPIG**
NTIYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AFPGSYHHPFDY**WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKKTH* (SEQ ID NO:
 980)

成熟 ANT42 Hc 杆 LALAPS

[0292]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFTAYAMHWVRRQAPGKGLEWVASIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT
 AVYYCARRSYFEALDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASSLYSGVPS
 RFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDNL
 MISRTPETCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIEKTIISKAKG
 QPREPMVFDLPSPREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEAL
 HNHYTQKLSLSPGKGGGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDFYFIHWVRRQAPGKGLEWVATIYFFIG
NTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAFPGSYHHPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKKTHT* (SEQ ID NO:
 981)

成熟 ANT42 Hc 杆 LALAPS Merchant

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFTAYAMHWVRRQAPGKGLEWVASIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT
 AVYYCARRSYFEALDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASSLYSGVPS
 RFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDNL
 MISRTPETCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIEKTIISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEAL
 HNHYTQKLSLSPGKGGGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDFYFIHWVRRQAPGKGLEWVATIYFFIG
NTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAFPGSYHHPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKKTHT* (SEQ ID NO:
 982)

成熟 ANT42 Hc 杆 LALAPS Merchant S-S

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFTAYAMHWVRRQAPGKGLEWVASIYPSGGYTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT
 AVYYCARRSYFEALDYWGQGTLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASSLYSGVPS
 RFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWAYYSPITFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDNL
 MISRTPETCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIEKTIISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEAL

[0293]

HNHYTQKSLSPGKGGSGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**TSDFYFI**HWVRQAPGKGLEWVA**TIYFFIG**
NTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAR**AFPGSYHHPFDY**WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT* (SEQ ID NO:
983)

ANT42 LC

MNLLLILTFVAAAADIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS**QSVSSAV**AWYQQKPGKAPKLLIY**SASSLY**SGVPSRFSGSRSGTDFLTLISSLQP
EDFATYYCQ**STGSLIT**FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNINFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDDSTY
SLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 912)

成熟 ANT42 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS**QSVSSAV**AWYQQKPGKAPKLLIY**SASSLY**SGVPSRFSGSRSGTDFLTLISSLQPEDFATYYCQ**STGSLI**
TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNINFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDDSTYSLSSTLTLKADYEEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 984)

ANT80-1 白

MNLLLILTFVAAA AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**TLSSYSYI**HWVRQAPGKGLEWVA**SIYSYTGATD**YADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNLSRAEDTAVYYCAR**YHSTNRILSYGGMDY**WGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS**QSVSSAV**AWYQQ
KPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTLISSLQPEDFATYYCQ**YFDPIT**FGQGTKVEIKGGGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAP
ELLGGSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDHWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPIRELMTSNQVSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**NLAYSSM**HWVRQ
APGKGLEWVA**TIYPSYSSTYY**ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAR**YYAMDY**WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
(SEQ ID NO: 986)

ANT80-2 杆

[0294]

MNLLILTFVAAA^{AEVQL}VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF^{DLSSHSH}HWVRQAPGKGLEWVA^{SISSHYGYTHY}ADSVKGRFTISADTSKN
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR^{SSYFPWF}FALDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ^{DI/STAV}AWYQQKPG
 KAPKLLIY^{SASF}LYSGVPSRFSGRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ^{HYTTP}TFGGTKVEIKGGGGGGSEPKTSDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVA^{AVSHEDPEV}KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 NKALPAPIEKTIKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF^{NAYSSM}HWVRQ
 APGKGLEWVA^{TIYPSYS}STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR^{YYAMDY}WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH^{TFPAVLQSSGLYSLSSVTV}VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKKTH
 (SEQ ID NO: 987)

ANT98-1 白

MNLLILTFVAAA^{AEVQL}VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF^{TLSYSYH}HWVRQAPGKGLEWVA^{SIYSYTGATD}YADSVKGRFTISADTSKN
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR^{YWSNRILSYGGMDY}WGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ^{SVSSAV}AWYQQ
 KPGKAPKLLIY^{SASSLYS}GVPSRFSGRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ^{YFDPI}TFGGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVA^{VSHEDPEV}KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPIRELMITSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGSGTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF^{NAYSSM}HWVRQ
 APGKGLEWVA^{TIYPSYS}STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR^{DYAMDY}WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH^{TFPAVLQSSGLYSLSSVTV}VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKKTH
 T (SEQ ID NO: 988)

ANT98-2 柱

MNLLILTFVAAA^{AEVQL}VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF^{DLSSHSH}HWVRQAPGKGLEWVA^{SISSHYGYTHY}ADSVKGRFTISADTSKN
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR^{SSYFPWF}FALDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ^{DI/STAV}AWYQQKPG
 KAPKLLIY^{SASF}LYSGVPSRFSGRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ^{HYTTP}TFGGTKVEIKGGGGGGSEPKTSDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVA^{AVSHEDPEV}KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 NKALPAPIEKTIKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR

[0295]

WQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSPGKGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNAYSSMHWVVRQ
 APGKGLEWVAJYPSYSSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCARDYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKKTH
 T (SEQ ID NO: 989)

ANT99-1 白

MNLLLLTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TLSYSYVHWVVRQAPGKGLEWVA SISYVTGATDYADSVKGRFTISADTSKN
 TAYLQMNSLRAEDTAVYCAR YWSTNRILSYGGMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ SVSSAVAWYQQ
 KPGKAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQ YFDPTIFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR
 WQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSPGKGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNAYSSMHWVVRQ
 APGKGLEWVAJYPSYSSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCAR YYDMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKKTH
 (SEQ ID NO: 990)

ANT99-2 柱

MNLLLLTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF DLSHSSHHWVVRQAPGKGLEWVA SISSHYYGYTHYADSVKGRFTISADTSKN
 TAYLQMNSLRAEDTAVYCAR SSYFPWFALDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ DISTAVAWYQQKPG
 KAPKLLIY SASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQ HYITPTIFGQGTKVEIKGGGGGGSEPKTSDKTHCPCPAPPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR
 WQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSPGKGGGGGGGGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNAYSSMHWVVRQ
 APGKGLEWVAJYPSYSSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCAR YYDMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKKTH
 (SEQ ID NO: 991)

[0296]

ANT80-ANT98-ANT99 LC

MNLLLLTFVAAA VADIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQSISSAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTTISSLQP
EDFATYYCQQ AHYFPITTFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSST
YSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 992)

CM0042 (双抗体-Fc-双抗体)

MNLLLLTFVAAA VAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NIGSSSHHWVRQAPGKGLEWVASIYS AFASTSYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHFPFGFALDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDVDRVTITCRASQSISSAVAWYQQKPG
KAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTTISSLPEDFATYYCQQ GVYLFTFGGTKVEIKLEDKTHTKVEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLG
GPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPKSGSETPTSEATPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NISYSHHWVRQAPGKGLE
WVA YISSYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR AHYFPWAGAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSS
LSASVGDVDRVTITCRASQSISSAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTTISSLPEDFATYYCQQ YSWGPFTTFGGTKV
EIK (SEQ ID NO: 993)

CM0011 白 (双抗体-Fc-双抗体)

MNLLLLTFVAAA VAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NIGSSSHHWVRQAPGKGLEWVASIYS AFASTSYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHFPFGFALDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDVDRVTITCRASQSISSAVAWYQQKPG
KAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTTISSLPEDFATYYCQQ GVYLFTFGGTKVEIKLEDKTHTKVEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLG
GPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPIRELMNTSNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPKSGSETPTSEATPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NISYSHHWVRQAPGKGLE
WVA SIYSSYGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR TVRGSKKPIYFSGWAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQSISSAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTTISSLPEDFATYYCQQ YSWGPFTTFGG
GTKVEIK (SEQ ID NO: 994)

[0297]

CM0011 种 (双抗体-Fc-双抗体)

MNLLLITFVAAA AEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSHHWVRQAPGKGLEWVA SIYSFAFASTSYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHFPFGFALDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQ SISSAVAWYQQKPG
KAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSSGRSRGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQGIVYLFTFGGGTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIISKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NISSYSHHWVRQAPGKGL
EWVA YISSYYGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR AHYFPWAGAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDRTVTITCRASQ SISSAVAWYQQKPKAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSRSRGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQYYPITTFGGQTKVE
IK (SEQ ID NO: 995)

CM0126 白 (双抗体-Fc-双抗体)

MNLLLITFVAAA AEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSHHWVRQAPGKGLEWVA AIYSSFGSITYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHHPFGYALDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQ SISSAVAWYQQKPG
KAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSSGRSRGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQGIVYLFTFGGGTKVEIKLEDKTHTKVEPKSSDKTHNCPAPELLG
GPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NISSYSHHWVRQAPGKGL
WVA SIYSSYGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR IVRGSKKPYFSGWAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRTVTITCRASQ SISSAVAWYQQKPKAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSRSRGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQYSSWGFTFGGQ
GTKVEIK (SEQ ID NO: 996)

CM0126 种 (双抗体-Fc-双抗体)

MNLLLITFVAAA AEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSHHWVRQAPGKGLEWVA AIYSSFGSITYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHHPFGYALDYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQ SISSAVAWYQQKPG
KAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSSGRSRGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQGIVYLFTFGGGTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK

[0298]

ALPAPIEKTKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN**SIYSSIH**WVVRQAPGKGL
 EWVA**YISSYGYTY**ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AHYFPWAGAM**DYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPS
 SLSASVGDRVTTITCRASQ**SIYSSA**VAWYQQKPKAPKLLIY**SASSLYSGV**PSRFSRSGTDFLTITSSLPQEDFATYYC**QYYWPI**TFGGQTKVE
 IK (SEQ ID NO: 997)

CM0107 白 (双抗体-Fc-scFv)

MNLLLLITFVAAAVAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**NIGSSSIH**WVVRQAPGKGLEWVA**SIYSAFAST**SYADSVKGRFTISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**YHFFPFGFAL**DYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQ**SIYSSA**VAWYQQKPG
 KAPKLLIY**SASSLYSGV**PSRFSRSGTDFLTITSSLPQEDFATYYC**QQGVYLF**TFGGQTKVEIKLEDKTHTKVEPKSSDKTHNCPCPAPELLG
 GPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPIRELMTSNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQ**SIYSSA**VAWYQQKPKGAPKL
 LIY**SASSLYSGV**PSRFSRSGTDFLTITSSLPQEDFATYYC**QYISWGPFT**FGQTKVEIKGTTAAAGSSGGSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSL
 RLSCAASGF**NIYSSIH**WVVRQAPGKGLEWVA**YISSYGYTY**ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AHYFPWAGAM**
 YWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 998)

CM0107 样 (双抗体-Fc-scFv)

MNLLLLITFVAAAVAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**NIGSSSIH**WVVRQAPGKGLEWVA**SIYSAFAST**SYADSVKGRFTISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**YHFFPFGFAL**DYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQ**SIYSSA**VAWYQQKPG
 KAPKLLIY**SASSLYSGV**PSRFSRSGTDFLTITSSLPQEDFATYYC**QQGVYLF**TFGGQTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHTCPAPELLG
 GPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQ**SIYSSA**VAWYQQKPKGAPK
 LLIY**SASSLYSGV**PSRFSRSGTDFLTITSSLPQEDFATYYC**QYISWGPFT**FGQTKVEIKGTTAAAGSSGGSSGAEVQLVESGGGLVQPGGS
 LRLSCAASGF**NIYSSIH**WVVRQAPGKGLEWVA**YISSYGYTY**ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AHYFPWAGAM**
 DYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 999)

[0299]

CM0108 白 (双抗体-Fc-scFv)

MNLLLLTFVAAA AEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIGSSSHHWVRQAPGKGLEWVA SIYSAFASTSYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHFPFGFALDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ SISSAVAWYQQKPG
KAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ GIVYLFTFGGGTKVEIKLEDKTHTKVEPKSSDKTHNCPCPAPELLG
GPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLVSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPTSESA TPESGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ SISSAVAWYQQKPKAPKL
LIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YYWPITFGGGTKVEIKGTTAASGSSGGSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLR
LSCAASGF NISSYYIHWVRQAPGKGLEWVA SIYSSYGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR TVRGSKKPYPFSGW
AMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 1000)

CM0108 种 (双抗体-Fc-scFv)

MNLLLLTFVAAA AEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIGSSSHHWVRQAPGKGLEWVA SIYSAFASTSYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHFPFGFALDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ SISSAVAWYQQKPG
KAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ GIVYLFTFGGGTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHNCPCPAPELLG
GPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPTSESA TPESGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ SISSAVAWYQQKPKAPK
LLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YYWPITFGGGTKVEIKGTTAASGSSGGSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCAASGF NISSYYIHWVRQAPGKGLEWVA SIYSSYGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR TVRGSKKPYPFSG
WAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 1001)

CM0108 白 (双抗体-Fc-scFv)

MNLLLLTFVAAA AEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIGSSSHHWVRQAPGKGLEWVA SIYSAFASTSYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHFPFGFALDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ SISSAVAWYQQKPG
KAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ GIVYLFTFGGGTKVEIKLEDKTHTKVEPKSSDKTHNCPCPAPELLG
GPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK

[0301]

CM0109 种 (双抗体-Fc-scFv)

MNLLLITFVAAA AEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNIGSSSHHWVRQAPGKGLEWVA SIYSAFASTSYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHFPFGFALDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSAVAWYQQKPG
KAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGIVYLFTFGGGTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIKAKGQPREPMVFDLPPSRREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFC SVMHEALHNHYTQKLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSAVAWYQQKPGKAPK
LLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSWGPFFTFGGGTKVEIKGTTAASGSSGGSSGAEVQLVESGGGLVQPGGG
LRLS CAASGFN SIYSSHHWVRQAPGKGLEWVA YISSYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR AHYFPWAGAM
DYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 999)

CT003 白 (双抗体-Fc-scFv)

MNLLLITFVAAA AEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFN SISSYHHWVRQAPGKGLEWVA SISSYGYTSYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR TVRGSKKPFYSGWAMDYWGQGLVTVSSGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSAVAW
YQQKPGKAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSWGPFFTFGGGTKVEIKLEDKTHTKVEPKSSDKTHNCPP
CPAPELLGGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLVSKLTV
KSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFN SISSSHHWVRQ
APGKGLEWVA ATYSSFGSITYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHHPFGYALDYWGQGLVTVSSGTTAASGSSG
GSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QGVYLFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 1002)

CT003 种 (双抗体-Fc-scFv)

MNLLLITFVAAA AEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFN SISSYHHWVRQAPGKGLEWVA YISSYGYTYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR AHYFPWAGAMDYWGQGLVTVSSGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSAVAWYQQK
GKAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYIWPPITFGGGTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

[0302]

KALPAPIEKTISKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPTGTSAPESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSIHWVRQAPGK
GLEWVAATYSIFGSITADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCAR~~YHFFPFGF~~ALDYWGQGLVTVSSGTTAASGSSGGSS
GADIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ~~SISSA~~VAWYQQKPKAPKLLIY~~SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQGYI~~
LFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1003)

CM0112 白 (scFv-Fc-双抗体)

MNLLILTFVAAAVAEFDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ~~SISSA~~VAWYQQKPKAPKLLIY~~SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSL~~
QPEDFATYYCQQ~~GVYLF~~TFGQGTKVEIKGTTAASGSSGSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI~~GSSSI~~HWVRQAPGKLEWV
A~~SIYS4F~~ASTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCAR~~YHFFPFGF~~ALDYWGQGLVTVSSLEDKTHTKVEPKSSDKTHN
CPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTSISKAKGQPREPQVYTLPPREIMTSNQVLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPTGTSAPESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI~~SIYSIY~~HW
VRQAPGKLEWVA~~SIYSYGYT~~SYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCAR~~TVRGSKKP~~YFSGW~~AMDY~~WGQGLVTVSS
GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ~~SISSA~~VAWYQQKPKAPKLLIY~~SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQ~~
YSW~~GP~~TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1004)

CM0112 样 (scFv-Fc-双抗体)

MNLLILTFVAAAVAEFDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ~~SISSA~~VAWYQQKPKAPKLLIY~~SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSL~~
QPEDFATYYCQQ~~GVYLF~~TFGQGTKVEIKGTTAASGSSGSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI~~GSSSI~~HWVRQAPGKLEWV
A~~SIYS4F~~ASTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCAR~~YHFFPFGF~~ALDYWGQGLVTVSSLEDKTHTKVEPKTSDKTH
CPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTSISKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPTGTSAPESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI~~SIYSI~~HW
WVRQAPGKLEWVA~~YISSYGYT~~YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCAR~~AHYFPW~~AG~~AMDY~~WGQGLVTVSSGGG
GSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ~~SISSA~~VAWYQQKPKAPKLLIY~~SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYYW~~
PITFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1005)

[0303]

CM0110 白 (scFv-Fe-scFv)

MNLLLILTFVAAVAEFDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLQPEDFATYCCQGGVYLFTFGGQGTKVEIKGTTAASGSSGSSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMIGSSSIHWVVRQAPGKGLWEVAVSIYSAFASISYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYICARVHFFPFGFALDYWGQGLTVVSSLEDKTHTKVEPKSSDKKTHNCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPETCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPIRELMTSNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLQPEDFATYCCQYYIWPITFGQGTKVEIKGTTAASGSSGSSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMISYYIHWVVRQAPGKGLWEVAVSIYSSYGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYICARVIRGSKKPYFSGWAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1006)

CM0110 种 (scFv-Fe-scFv)

MNLLLILTFVAAVAEFDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLQPEDFATYCCQGGVYLFTFGGQGTKVEIKGTTAASGSSGSSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMIGSSSIHWVVRQAPGKGLWEVAVSIYSAFASISYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYICARVHFFPFGFALDYWGQGLTVVSSLEDKTHTKVEPKTSDKTHNCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPETCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLQPEDFATYCCQYISWGPFTFGQGTKVEIKGTTAASGSSGSSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMISYSSIHWVVRQAPGKGLWEVAVIYSSYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYICARAHYFPWAGAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1007)

CT001 CM0299 CM0300 CM0301 ANTI LC

MNLLLILTFVAAVAADIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISSLQPEDFATYCCQGGVYLFTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 1008)

[0304]

CT001 白 (bsIgG-双抗体)

MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSHHWVRQAPGKGLEWVA ATYSSFGSITY ADSVKGRFTISADTSKNT
AYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHHPFGYALDY WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL
PIRELMTSNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKSGSETPGTSESATPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NISYYIHWVRQAPGKGLEWVA SIYSSYGYIYS ADSVKGRFTIS
ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR TVRGSKKPIYFSGWAMDY WGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQ SVSS
AVAWYQQKPKAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY SWGPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 1009)

CT001 杆 (bsIgG-双抗体)

MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSHHWVRQAPGKGLEWVA ATYSSFGSITY ADSVKGRFTISADTSKNT
AYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHHPFGYALDY WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVDFDL
PPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGKSGSETPGTSESATPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NISYSSIHWWVRQAPGKGLEWVA YISSYGYIYY ADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR AHYFPWAGAMDY WGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQ SVSSAVA
WYQQKPKAPKLLIY SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY YIWPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 1010)

CM0299 Hc (IgG-双抗体)

MNLLLILTFVAAA VAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSHHWVRQAPGKGLEWVA ATYSSFGSITY ADSVKGRFTISADTSKNT
AYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YHHPFGYALDY WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
LSPGKSGSETPGTSESATPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NISYSSIHWWVRQAPGKGLEWVA YISSYGYIYY ADSVKGRFTI

[0305]

SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAHYFPWAGAMDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTVTITCRASQSYSSAVA
WYQQKPKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSWGPFTTFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 1011)

CM0300 Hc (IgG-scFv)

MNLLILTFVAAVAEVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSIHHWVRQAPGKGLEWVAATYSSFGSITYADSVKGRFTISADTSKNT
AYLQMNSLRAEDTAVYYCARYHHPFGYALDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGKSGSETPTGTSESATPESGGGDIQMTQSPSSLASVGDRTVTITCRASQSYSSAVAAWYQQKPKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTD
TLTISSLQPEDFATYCQQYSWGPFTTFGGQTKVEIKGTTAASGSSGGSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISSYSHHWVRQAPG
KGLEWVAYISSYYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAHYFPWAGAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:
1012)

CM0301 Hc (IgG-scFv)

MNLLILTFVAAVAEVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSIHHWVRQAPGKGLEWVAATYSSFGSITYADSVKGRFTISADTSKNT
AYLQMNSLRAEDTAVYYCARYHHPFGYALDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGKSGSETPTGTSESATPESGGGDIQMTQSPSSLASVGDRTVTITCRASQSYSSAVAAWYQQKPKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTD
TLTISSLQPEDFATYCQQYWPITTFGGQTKVEIKGTTAASGSSGGSSGAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISSYYIHWVRQAPGK
GLEWVASIYSSYGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVRGSKKPYFSGWAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID
NO: 1013)

ANT1 白 (双抗体-Fc-Fab)

MNLLILTFVAAVAEVEVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISSYYIHWVRQAPGKGLEWVASIIYSSYGYTSYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVRGSKKPYFSGWAMDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTVTITCRASQSYSSAVA

[0306]

YQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYFLTFGGQGTKVEIKLEDKTHTKVEPKSSDKTHNCPPCP
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPRELMTNSQVLSLCAVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPTGTSATPESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSIHHWVRQAP
 GKGLEWVAATYSSFGSITYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCARYHHPFGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA
 PSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK
 THT (SEQ ID NO: 1014)

ANT1 种 (双抗体-Fc-Fab)

MNLLILTFVAAA¹AEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISSSIHHWVRQAPGKGLEWVASISPIYGYTYADSVKGRFTISADTSK
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYCARSSYFPWFSAMDYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQSISSAVAWYQQK
 GKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYPIITFGGQTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAIEKTIKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPTGTSATPESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSIHHWVRQAPGK
 GLEWVAATYSSFGSITYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCARRYHHPFGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH
 T (SEQ ID NO: 1015)

Fab-双抗体 Hc (Fab-双抗体)

MNLLILTFVAAA¹AEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIHSSSIHHWVRQAPGKGLEWVAATYSSFGSITYADSVKGRFTISADTSKNT
 AYLQMNSLRAEDTAVYCARYHHPFGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHGGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI
SYSSSIHHWVRQAPGKGLEWVASISPIYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCARSSYFPWFSAMDYWGQGLTVTVS
 SGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQSISSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QYYWPIITFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 1016)

Fab-双抗体 LC (Fab-双抗体)

[0307]

MNLLLLTFVAAAADIQMTQSPSSLSASVGDRTVITICRASQ**SVSSA**VAWYQQKPGKAPKLLIY**SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPE**
DFATYYCQQGVYLFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**TISSYYIH**WVVRQAPGKGLE
WVA**SISSYGYTSY**ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**TVRGSKKPYFSGWAMDY**WGQGLTVTVSSGGGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRTVITICRASQ**SVSSA**VAWYQQKPGKAPKLLIY**SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPE**DFATYYCQQ**YVFL**ITFGQG
TKVEIK (SEQ ID NO: 1017)

CH3 (双抗体-CH3-双抗体)

MNLLLLTFVAAAIAEFVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**NIGSSSIH**WVVRQAPGKGLEWVA**SIYSFAFAS**TSYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**YHFFGFALD**YWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITICRASQ**SVSSA**VAWYQQKPG
KAPKLLIY**SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPE**DFATYYCQQ**GVYLF**ITFGQGTKVEIKDKHTTKVEPKTSDKTHTCPPCPGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKGTAAAGSSGGSSGAGRTEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**NISSSIH**WVVRQAPGKGLEWVA**YISSYGYTY**YADSVKGR
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**AHYFPWAGAMDY**WGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITICRASQ**SVSS**
AVAWYQQKPGKAPKLLIY**SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPE**DFATYYCQQ**YSWGP**ITFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1018)

CM0156

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**NISSYIM**HWVVRQAPGKGLEWVA**SISPIYSYTSY**ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCAR**PSAWSHYYPSSSSAFD**YWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITICRASQ**SVSSA**VAWYQQKPGKAPKLLIY**SASS**
LYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ**SSYSL**ITFGQGTKVEIKLEDKHTTKVEPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSESA**TPESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYSIM**HWVVRQAPGKGLEWVA**SISPIYSY**
TSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**PSAWSHYYPSSSSAFD**YWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD
RVITICRASQ**SVSSA**VAWYQQKPGKAPKLLIY**SASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPE**DFATYYCQQ**SSYSL**ITFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 1019)

[0308]

表 14: 蛋白 A 纯化后 FZD 激动剂的表达滴度和单分散性的比较。参见相应的图 21。

分子	形式	N末端 互补位	C末端 互补位	表达滴度 mg/l	%单体	单体产量 (mg/l)
CM0042	双抗体 - Fc - 双抗体	5019	2539	8±4	43	3
CM0011	双抗体 - Fc - 双抗体	5019	2539/2542	12±3	81±5	10
CM0126	双抗体 - Fc - 双抗体	5016	2539/2542	8±0.7	ND	ND
CM0107	双抗体 - Fc - scFv	5019	2539	90	87	80
CM0108	双抗体 - Fc - scFv	5019	2542	47	89	40
CM0109	双抗体 - Fc - scFv	5019	2539/2542	79	86	70
CT003	双抗体 - Fc - scFv	2539/2542	5016	47	67	30
CM0112	scFv - Fc - 双抗体	5019	2539/2542	15	79	10
CM0110	scFv - Fc - scFv	5019	2539/2542	82	81	70
CT001	bsIgG-双抗体	5016	2539/2542	47±21	44±11	30
CM0299	IgG-双抗体	5016	2539	20±8	ND	ND
CM0300	IgG - scFv	5016	2539	134±38	66±7	100
CM0301	IgG - scFv	5016	2542	134±27	71±8	90
ANT1	双抗体 - Fc - Fab	5016	2539/2542	294±75	53±9	150
CH3	双抗体 - CH3-双抗体	5019	2539	<1	ND	ND
Fab-双抗体	Fab-双抗体	5016	2540/2542	1	ND	ND

[0309]

表 15: FZD 激动剂的功能比较。使用 TOPFLASH 测定生成每个 FZD 激动剂的浓度响应曲线。图 20 显示了 A) 双抗体-Fc-双抗体和 B) 双抗体-Fc-Fab 形式的代表性迹线, 其与 Wnt3a 重叠以进行比较。计算出相对于重组 Wnt3a 对照的 EC₅₀ 和最大功效, 并以平均值±SD 表示。

名称	形式	N末端 互补位		C末端 互补位		EC ₅₀ (nM)	最大信号 (% Wnt3a 最大值)
		NA	NA	NA	NA		
Wnt3a	重组蛋白	NA	NA	NA	NA	6±3	100
CM0042	双抗体-Fc-双抗体	5019	2539	2539	2539	0.9±0.8	33±22
CM0011	双抗体-Fc-双抗体	5019	2539/2542	2539/2542	2539/2542	0.3±0.1	63±10
CM0126	双抗体-Fc-双抗体	5016	2539/2542	2539/2542	2539/2542	0.3±0.2	52±1
CM0107	双抗体-Fc-scFv	5019	2539	2539	2539	ND	ND
CM0108	双抗体-Fc-scFv	5019	2542	2542	2542	ND	ND
CM0109	双抗体-Fc-scFv	5019	2539/2542	2539/2542	2539/2542	ND	ND
CT003	双抗体-Fc-scFv	2539/2542	2539/2542	5016	5016	0.4±0.1	42±16
CM0112	scFv-Fc-双抗体	5019	2539/2542	2539/2542	2539/2542	ND	ND
CM0110	scFv-Fc-scFv	5019	2539/2542	2539/2542	2539/2542	ND	ND
CT001	bsIgG-双抗体	5016	2539/2542	2539/2542	2539/2542	0.3±0.1	57±17
CM0299	IgG-双抗体	5016	2539	2539	2539	0.1±0.1	14±5
CM0300	IgG-scFv	5016	2539	2539	2539	0.3±0.2	5±2
CM0301	IgG-scFv	5016	2542	2542	2542	0.2±0.2	1±1
ANT1	双抗体-Fc-Fab	5016	2539/2542	2539/2542	2539/2542	0.7±0.5	50±18
CH3	双抗体-CH3-双抗体	5019	2539	2539	2539	ND	22±10
Fab-双抗体	Fab-双抗体	5016	2540/2542	2540/2542	2540/2542	0.4±0.2	42±16

[0310]

表 16

FZD2-LRP6 CM0072	<p>MNLLILTFVAAAVAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIYYSSHHWVRQAPGKGLEWVA<u>SIYPYGYTY</u>YADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>YHYGL</u>DYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ<u>SISSA</u>VAWYQQ KPGKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYCYCQQ<u>SYWHSYLIT</u>TFGGQTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHNCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPMVFDLPPSRREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG <u>FNISSYHHWVRQAPGKGLEWVA</u><u>YISSYGYTY</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>AHYFPWAGAMDY</u>WGQ GTLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ<u>SISSA</u>VAWYQQKPKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFTLTISSLQ PEDFATYCYCQQ<u>YYWPI</u>TFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 1020)</p>
杆构建体	<p>MNLLILTFVAAAVAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIYYSSHHWVRQAPGKGLEWVA<u>SIYPYGYTY</u>YADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>YHYGL</u>DYWGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ<u>SISSA</u>VAWYQQ KPGKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYCYCQQ<u>SYWHSYLIT</u>TFGGQTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHNCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF <u>NISSYHHWVRQAPGKGLEWVA</u><u>SISSYGYTS</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>TVRGSKKPYFSGWAMDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ<u>SISSA</u>VAWYQQKPKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFTLTI SSLQPEDFATYCYCQQ<u>YSWGP</u>TFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 1021)</p>
杆构建体	

[0311]

FZD5-LRP6 CM0024	<p>MNLLLILTFVAAAVAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFNISYSSHWVRQAPGKGLEWVASIYPSYSSYTYYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYAMDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIITCRASQSYSSAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQAFYYPITFGQGTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFN ISYSSHWVRQAPGKGLEWVAYSSYYGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAHIFPWAGAMDYWGQGL VTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIITCRASQSYSSAVAWYQQKPKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISSLQPED FATYYCQQYYWPITFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1022)</p>	<p>MNLLLILTFVAAAVAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFNISYSSHWVRQAPGKGLEWVASIYPSYSSYTYYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYAMDYWGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIITCRASQSYSSAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQAFYYPITFGQGTKVEIKLEDKTHTKVEPKSSDKTHNCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLVS KLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFNIS YIHWVRQAPGKGLEWVASIYSSYYGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVRGSKKPIFSGWAMDYWGQG TLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIITCRASQSYSSAVAWYQQKPKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISSLQ EDFATYYCQQYSWGPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1023)</p>
	杆构建体	臼构建体

[0312]

FZD7-LRP6 CM0172	<p>MNLLLLTFVAAA^{VAE}FEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN<u>ISSSSM</u>HWVRQAPGKGLEWV<u>SIYSYIGSTYY</u>ADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>WYGM</u>DYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ<u>SISSA</u>VAWYQQ KPGKAPKLLIY<u>SASSLYSG</u>VPSRFSRSGTDFLLTISSLQPEDFATYYCQQ<u>PGSWYFPPI</u>TFGGQTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFN<u>SISSYSH</u>HWVRQAPGKGLEWV<u>VISSYIGYIYY</u>ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>AHYFPWAGAMDY</u> GQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ<u>SISSA</u>VAWYQQKPKAPKLLIY<u>SASSLYSG</u>VPSRFSRSGTDFLLTISS LQPEDFATYYCQQ<u>YYWPI</u>TFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 1024)</p>	<p>MNLLLLTFVAAA^{VAE}FEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN<u>ISSSSM</u>HWVRQAPGKGLEWV<u>SIYSYIGSTYY</u>ADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>WYGM</u>DYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ<u>SISSA</u>VAWYQQ KPGKAPKLLIY<u>SASSLYSG</u>VPSRFSRSGTDFLLTISSLQPEDFATYYCQQ<u>PGSWYFPPI</u>TFGGQTKVEIKLEDKTHTKVEPKSSDKTHN CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFN<u>SISSYIHW</u>VRQAPGKGLEWV<u>SIYSYIGYISY</u>ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>IVRGSKKPIYFSGWAMDY</u> WGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ<u>SISSA</u>VAWYQQKPKAPKLLIY<u>SASSLYSG</u>VPSRFSRSGTDFLLTI SSLQPEDFATYYCQQ<u>YSWGPPI</u>TFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 1025)</p>
	杆构建体	臼构建体

[0313]

<p>注 FZD-LRP6 CM0011</p>	<p>结构建体</p> <p>MNLLLLTFVAAA VAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIGSSSHHWVRQAPGKGLEWVA<u>SIYSAF</u>ASTSYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>YHFPFGFAL</u>DYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQ<u>SIYSSA</u>V WYQQKPGKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFTLTISSLPEDFATYCYCQQ<u>GVYLF</u>TFGGQTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTH TCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPMVFDLPPSREEMTKNQVSLWCMVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFN<u>ISYSSH</u>HWVRQAPGKGLEWVA<u>YISSYGYTY</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>AHYFPWAGAMDY</u> WGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQ<u>SIYSSA</u>VAWYQQKPGKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFTLTI SSLQPEDFATYCYCQQ<u>YYWPI</u>TFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 1026)</p>
<p>结构建体</p> <p>MNLLLLTFVAAA VAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIGSSSHHWVRQAPGKGLEWVA<u>SIYSAF</u>ASTSYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>YHFPFGFAL</u>DYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQ<u>SIYSSA</u>V WYQQKPGKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFTLTISSLPEDFATYCYCQQ<u>GVYLF</u>TFGGQTKVEIKLEDKTHTKVEPKSSDKTH NCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSEATPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFN<u>ISSYIH</u>HWVRQAPGKGLEWVA<u>SIYSYGYTS</u>YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>TVRGSKKPYFSGWAM</u> DYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQ<u>SIYSSA</u>VAWYQQKPGKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFT LTISSLPEDFATYCYCQQ<u>YSWGP</u>TFGGQTKVEIK (SEQ ID NO: 1027)</p>	

[0314]

<p>FZD4-LRP6 CM0016</p>	<p>MNLLLLTFVAAA VAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN<u>ISYYIH</u>WVRQAPGKGLEWVA<u>SIYSSGYTY</u>ADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>SSFYW</u>AMDYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ<u>SISSA</u>VAWY QQKPGKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ<u>SYAYL</u>FTFGQGTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHN CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSESA TPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GF<u>NISSYYIH</u>WVRQAPGKGLEWVA<u>SIYSSGYTY</u>ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>TVRGSKKPIYFSGW</u>AMDY WGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ<u>SISSA</u>VAWYQQKPGKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQ<u>YSW</u>GPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1028)</p>
<p>结构建体</p>	<p>MNLLLLTFVAAA VAEFEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN<u>ISYYIH</u>WVRQAPGKGLEWVA<u>SIYSSGYTY</u>ADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>SSFYW</u>AMDYWGQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ<u>SISSA</u>VAWY QQKPGKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ<u>SYAYL</u>FTFGQGTKVEIKLEDKTHTKVEPKTSDKTHN CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPIRELMTSNQVLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSETPGTSESA TPESGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGF<u>NISSYYIH</u>WVRQAPGKGLEWVA<u>SIYSSGYTY</u>ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<u>AIHYFPW</u>AGAMDYW GQGLTVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ<u>SISSA</u>VAWYQQKPGKAPKLLIY<u>SASSLYSGV</u>PSRFSGRSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQ<u>YYW</u>PITFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1029)</p>
<p>结构建体</p>	<p>结构建体</p>

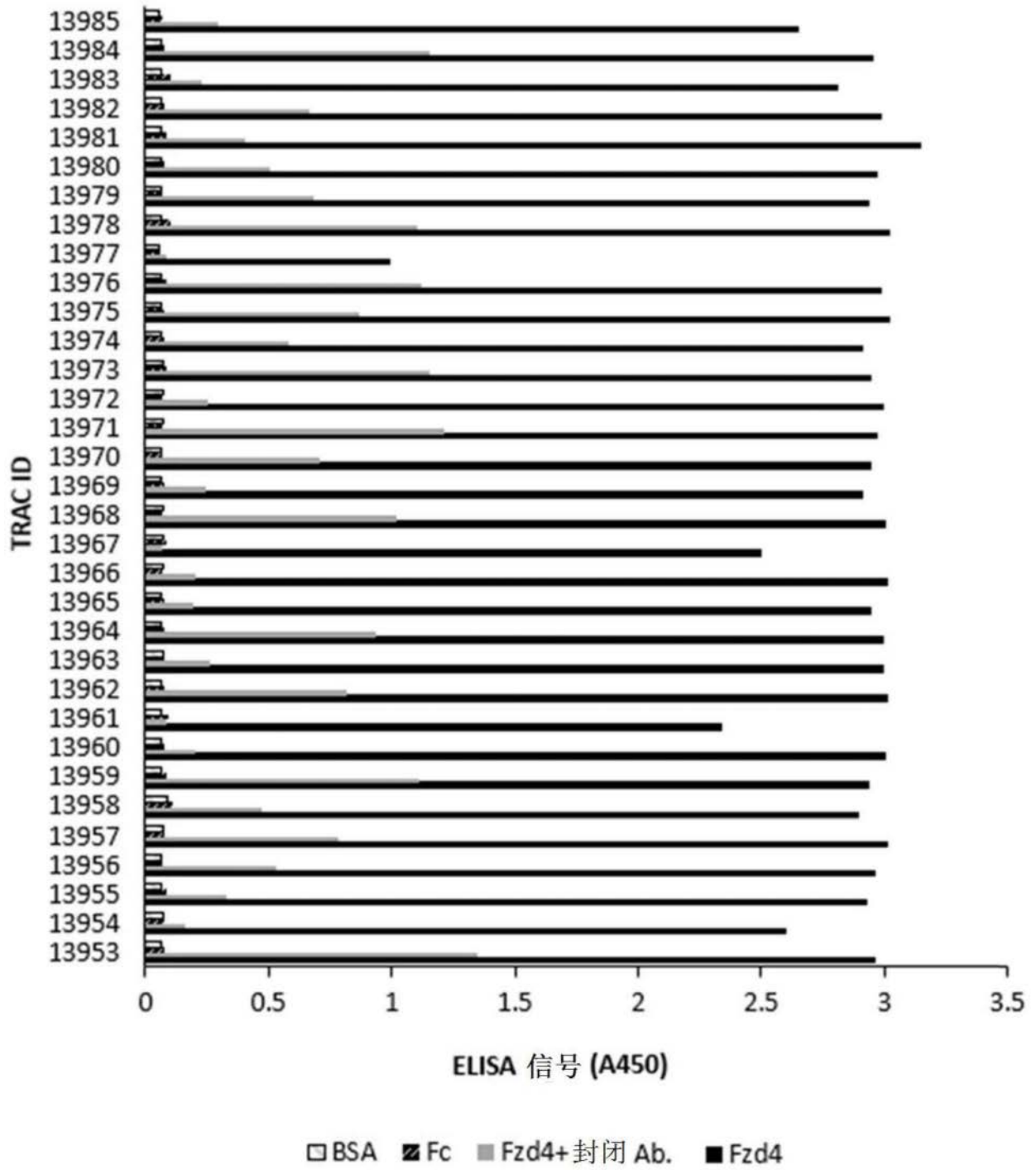


图1A

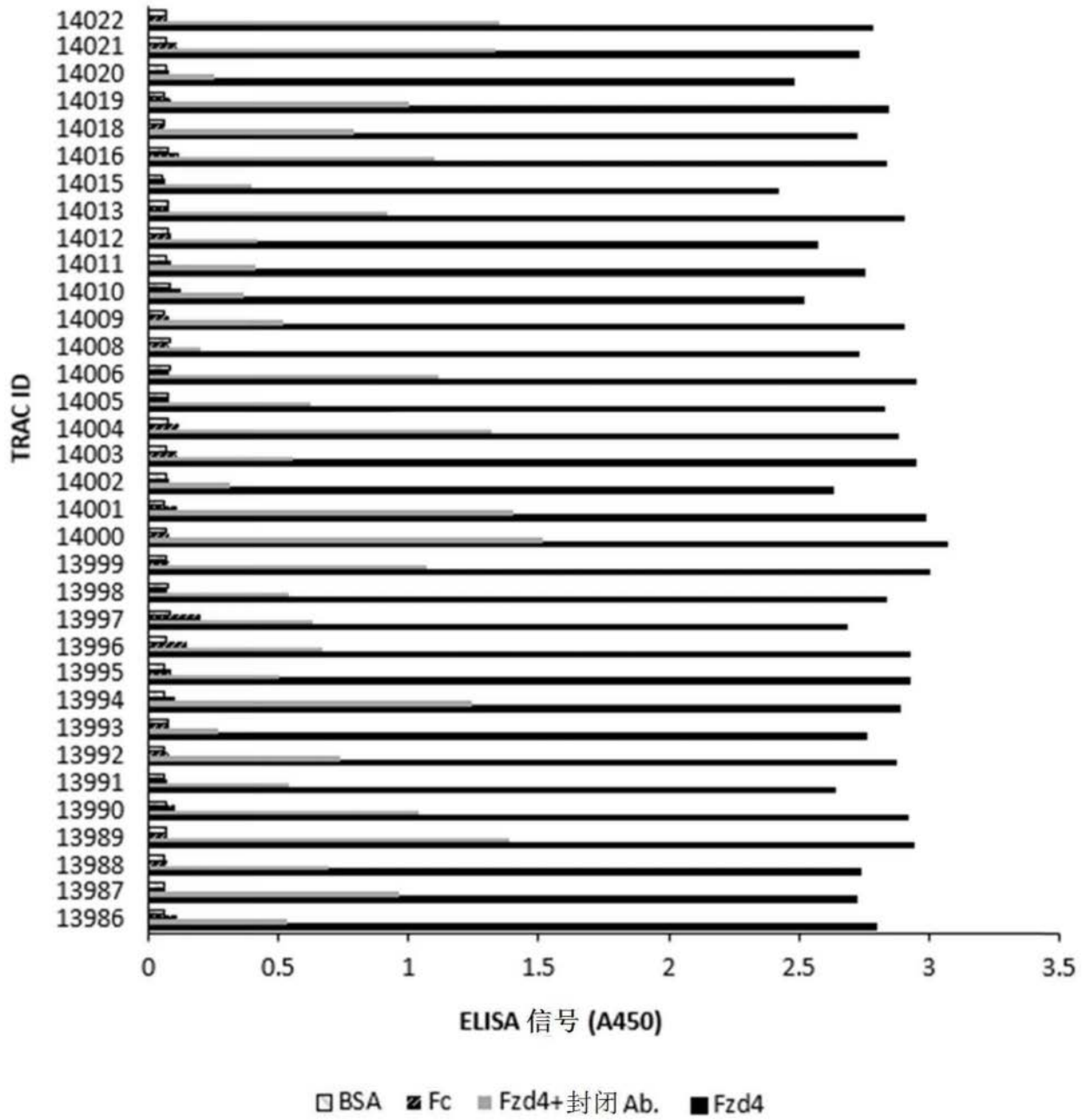


图1B

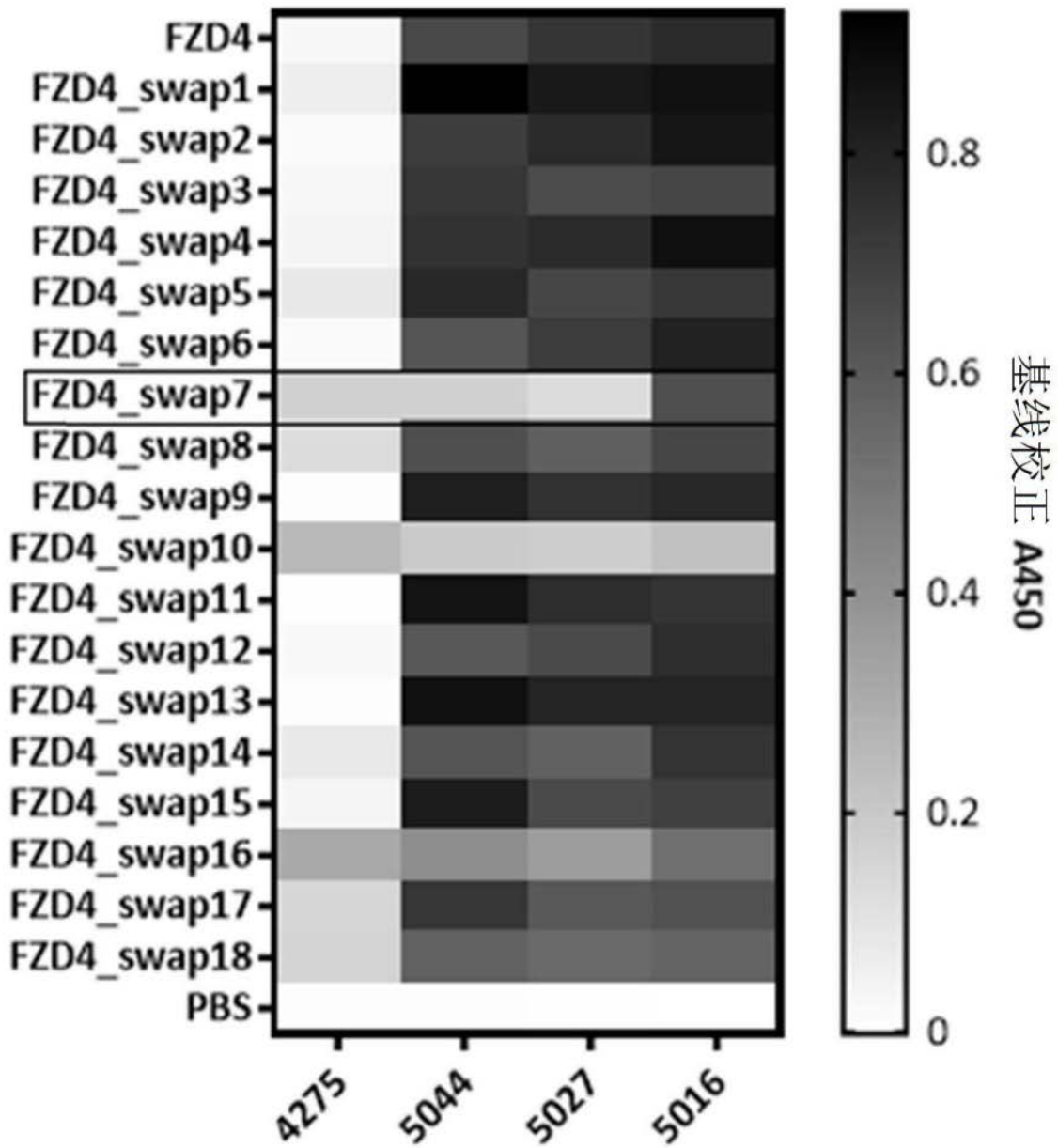


图2

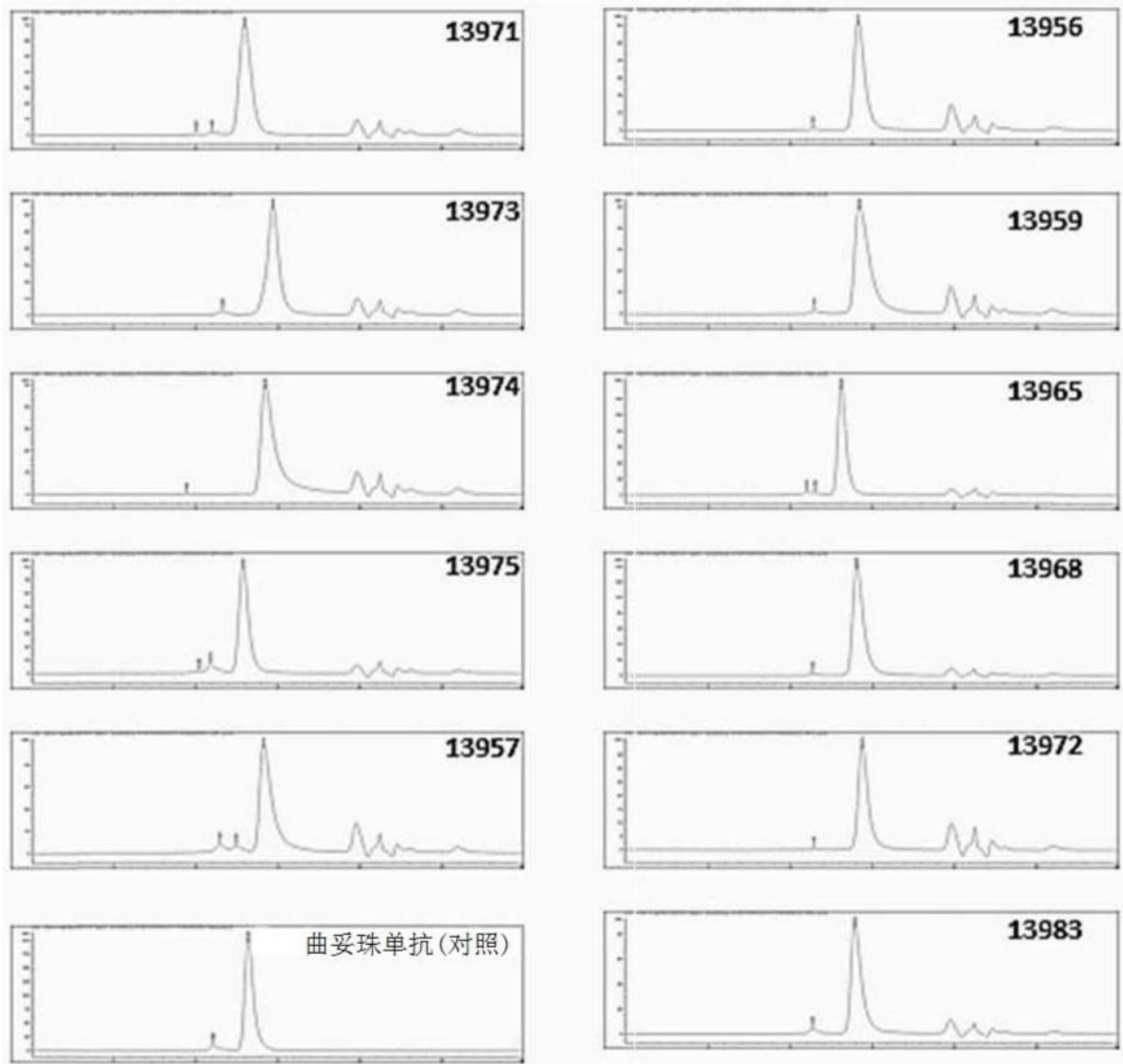


图3A

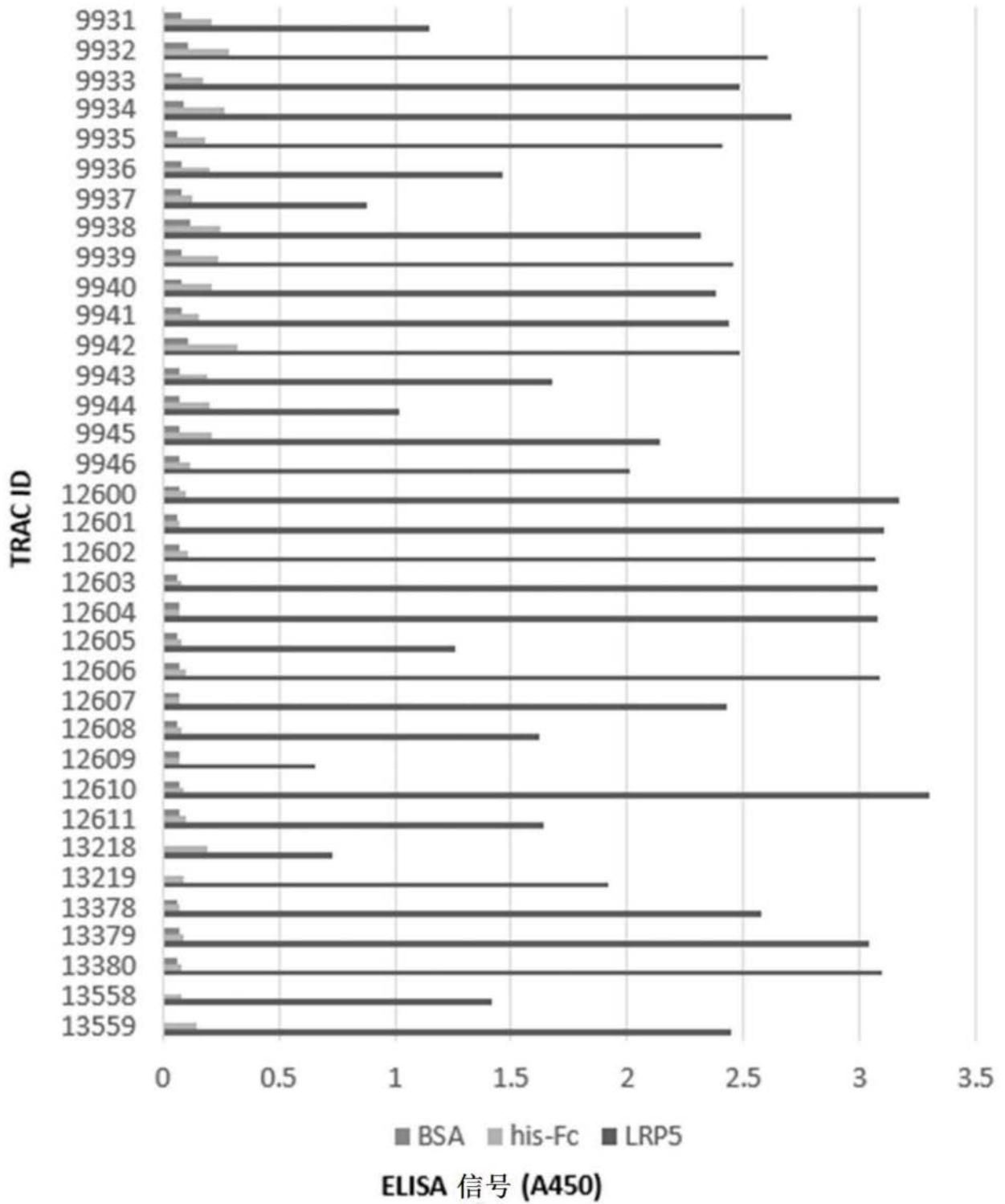


图4

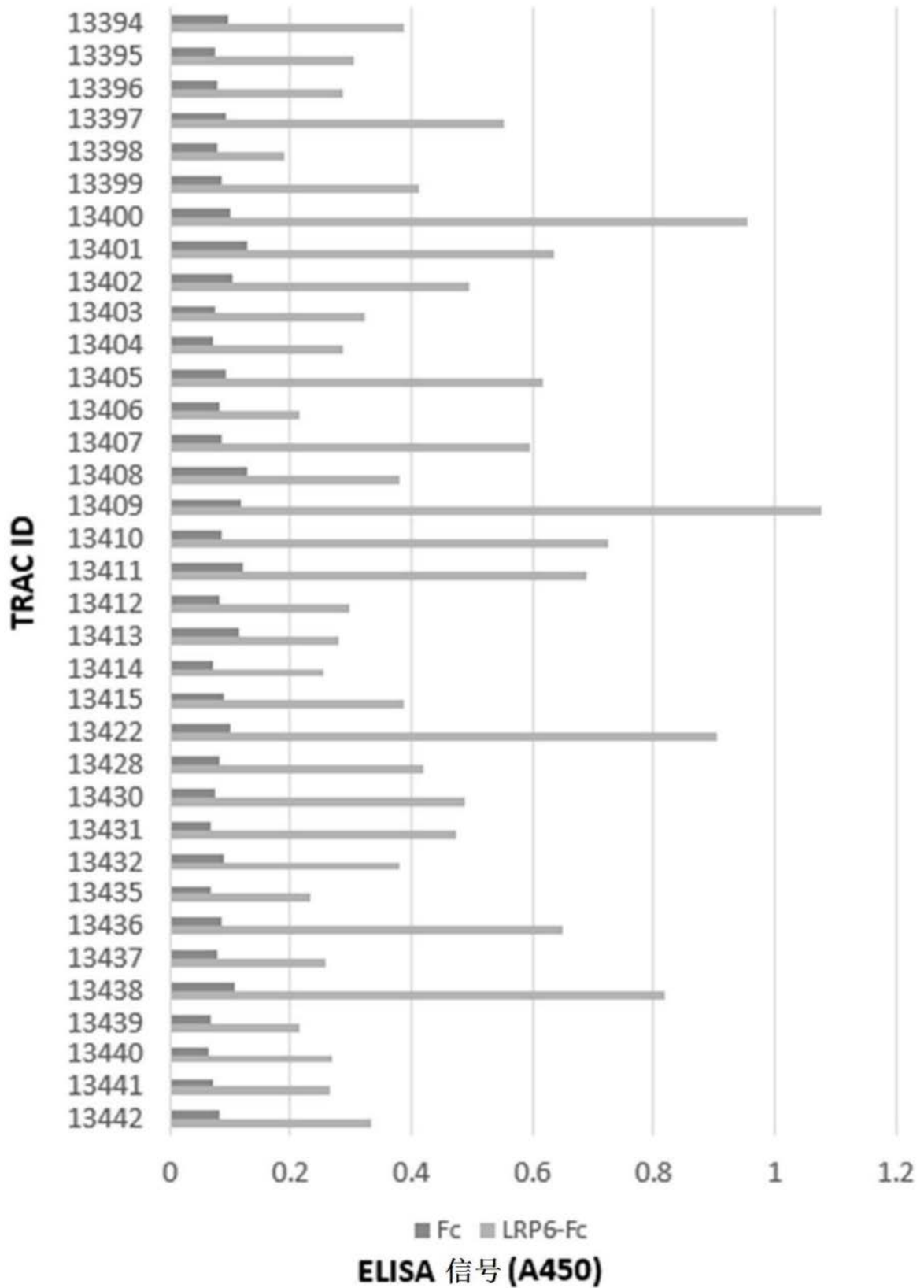


图5A

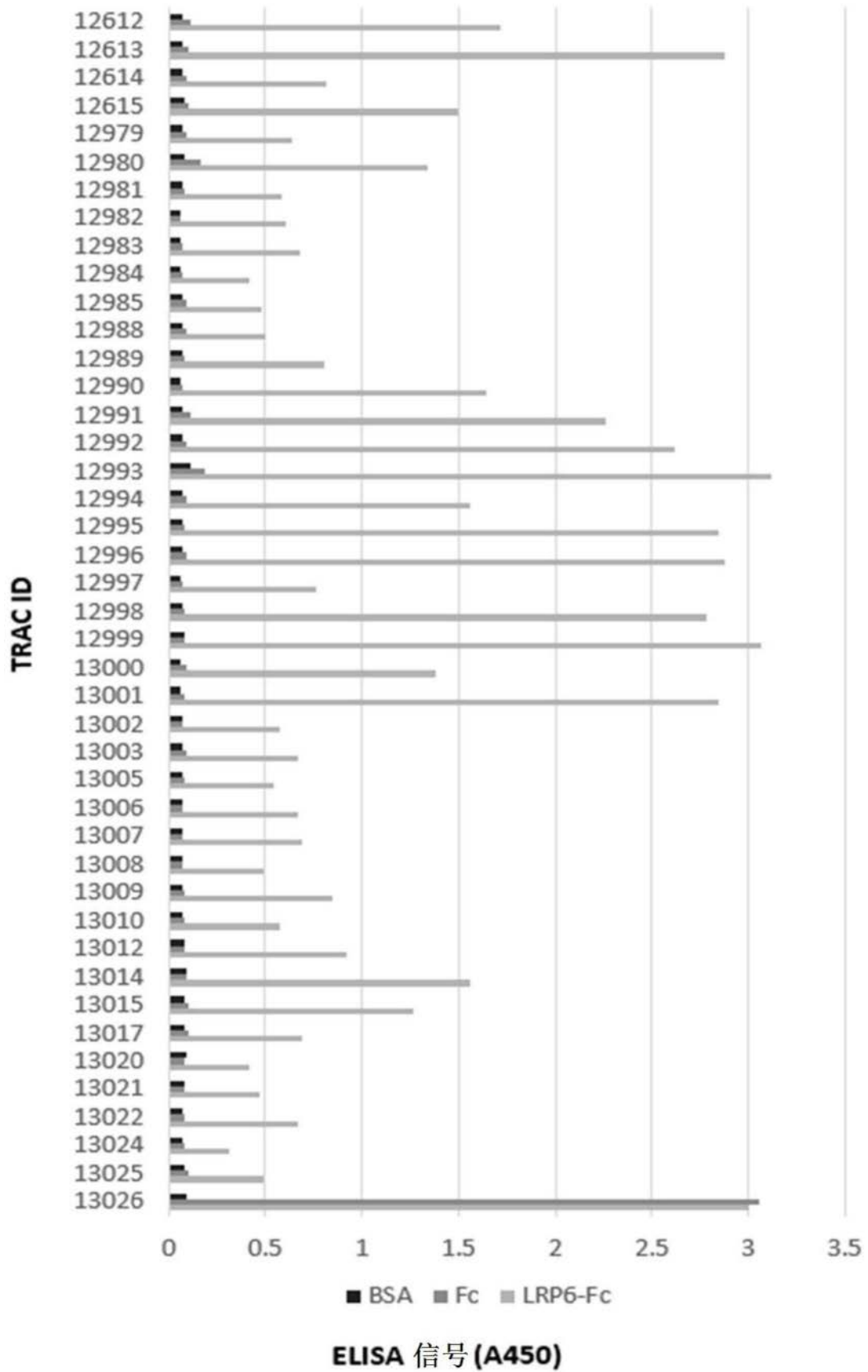


图5B

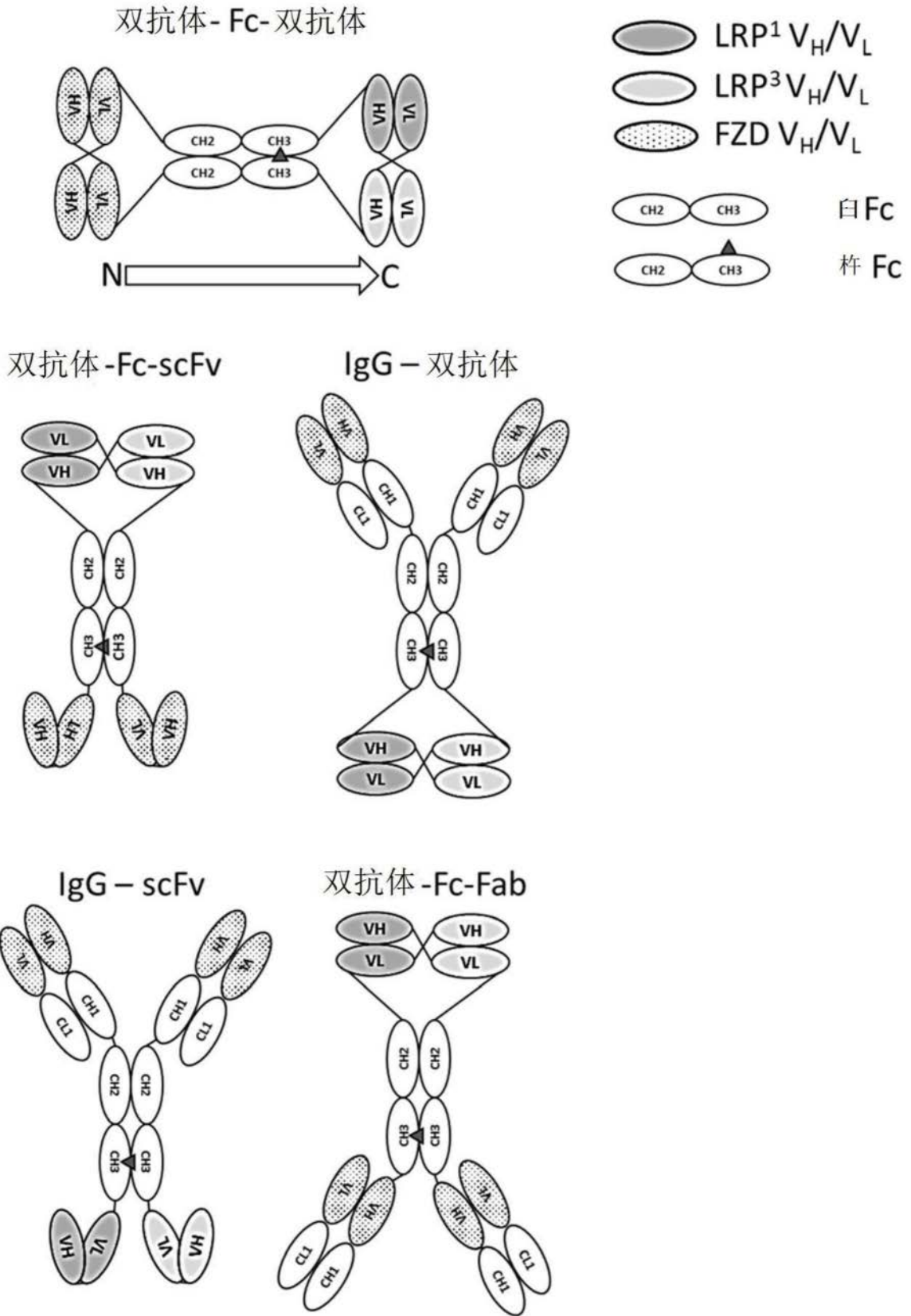


图6

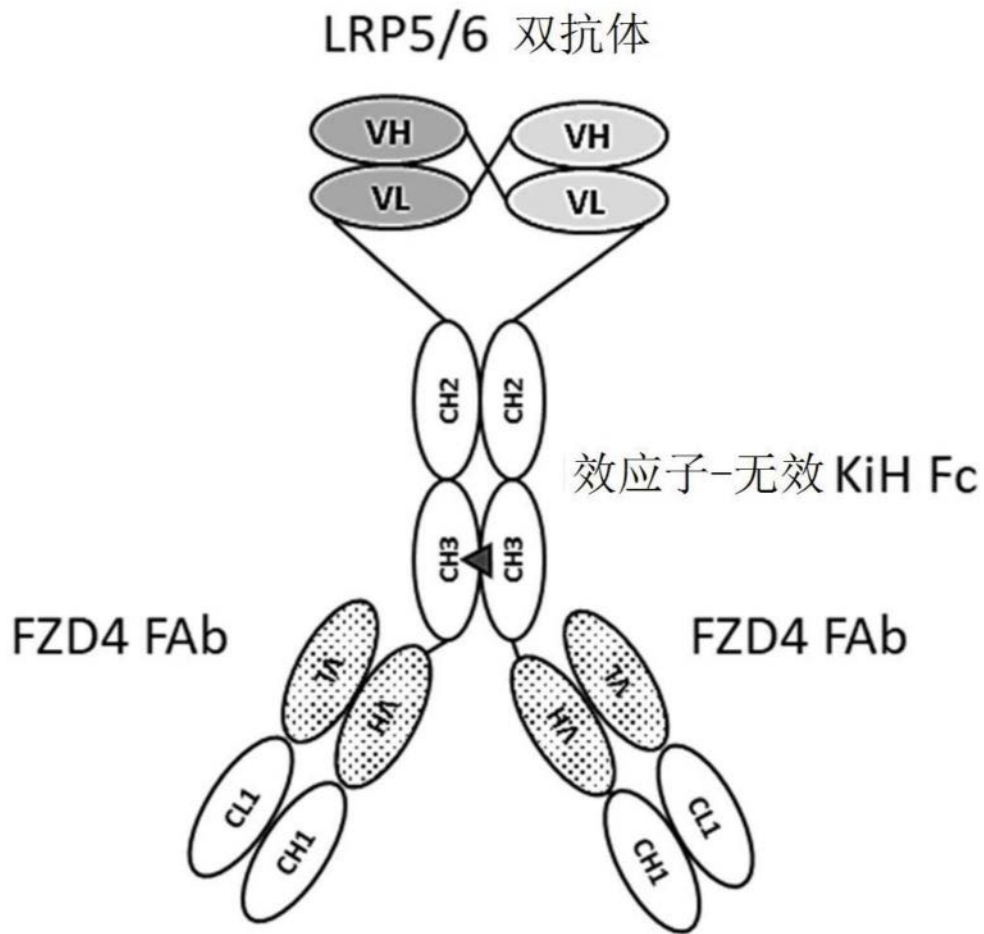


图7

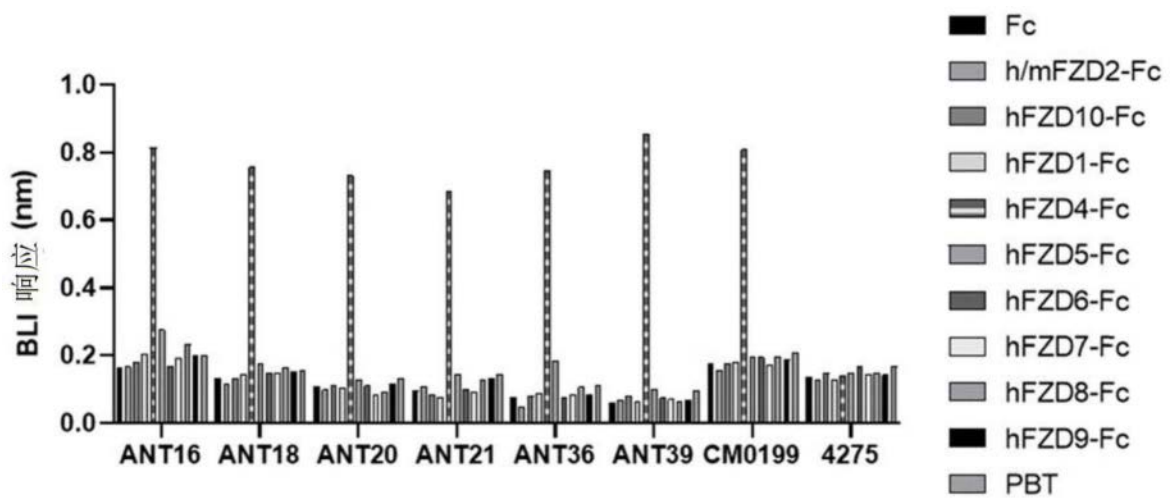


图8A

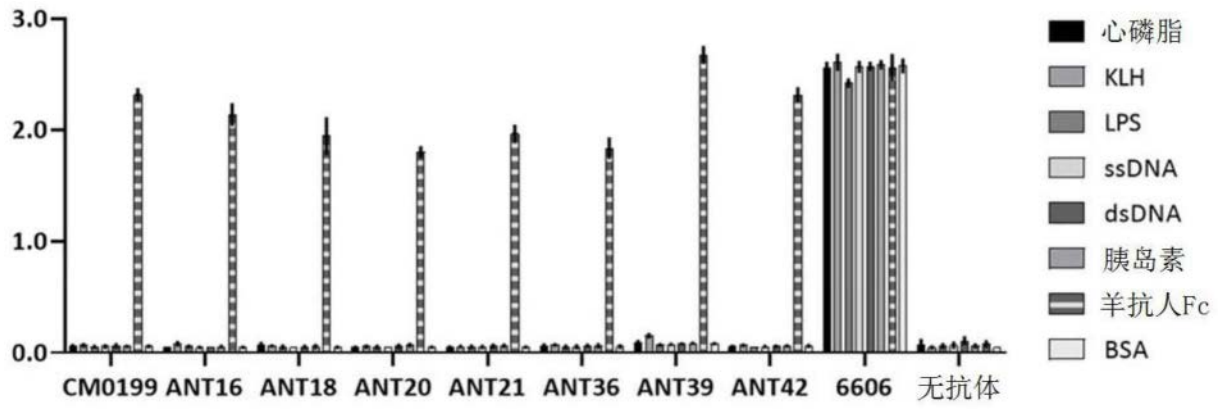


图8B

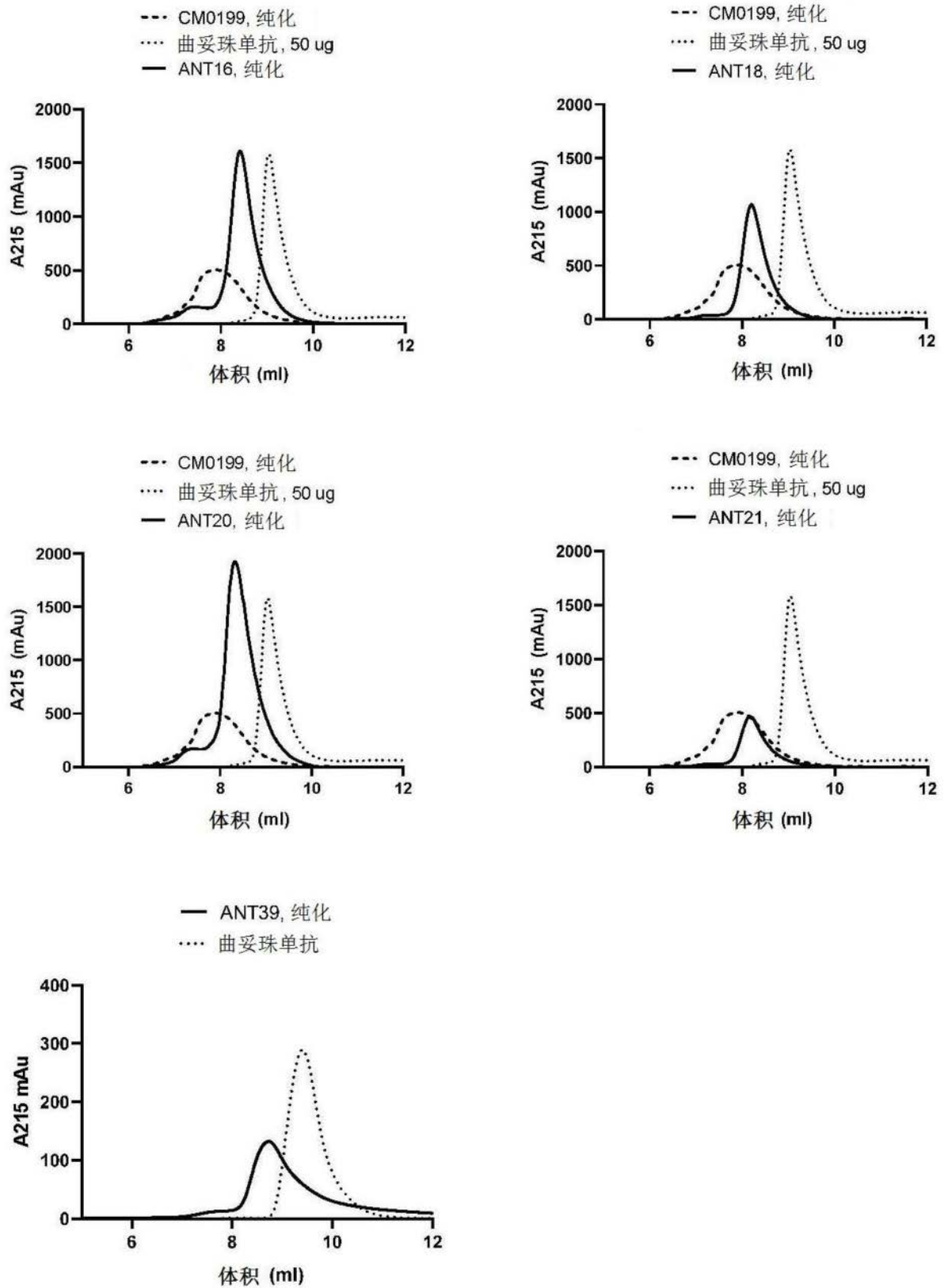


图9A

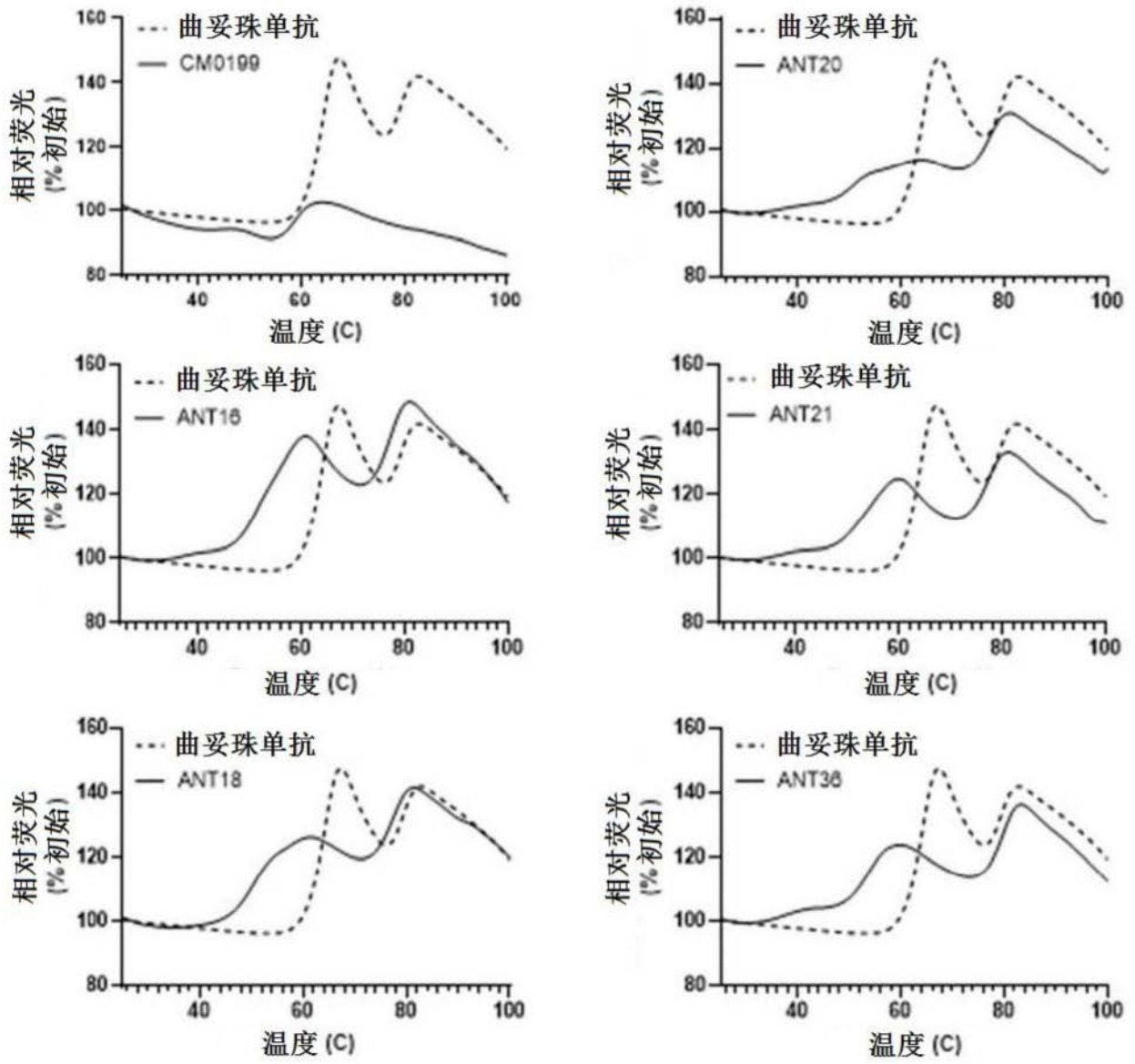


图9B

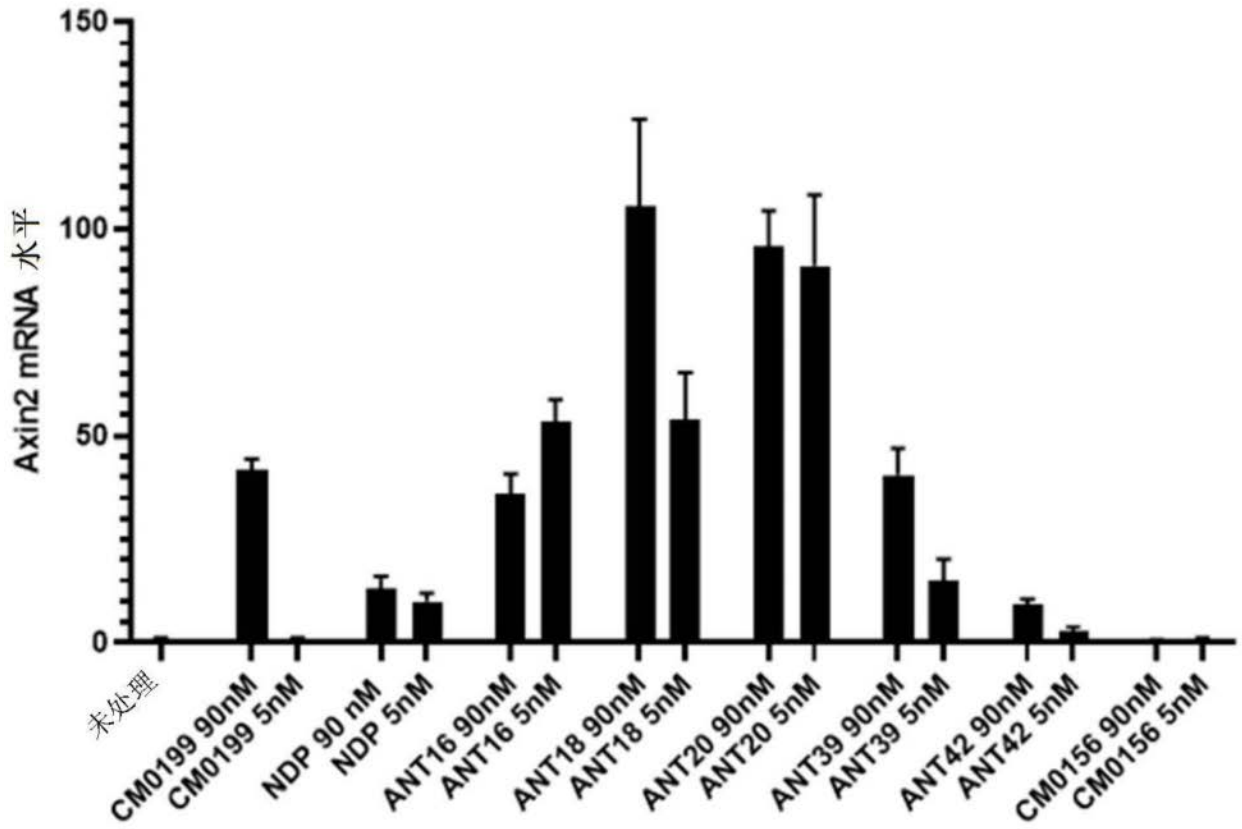


图10

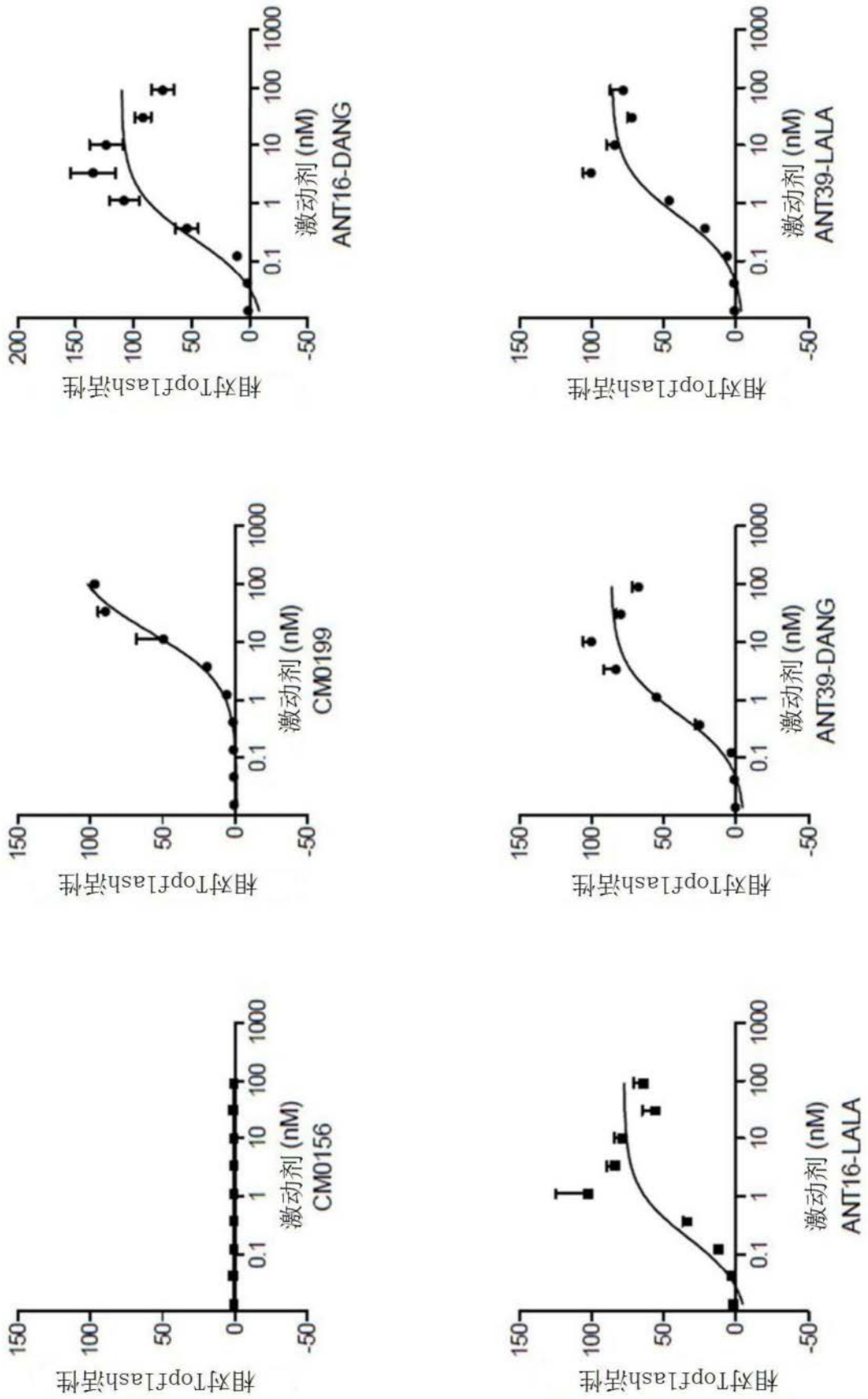


图10续

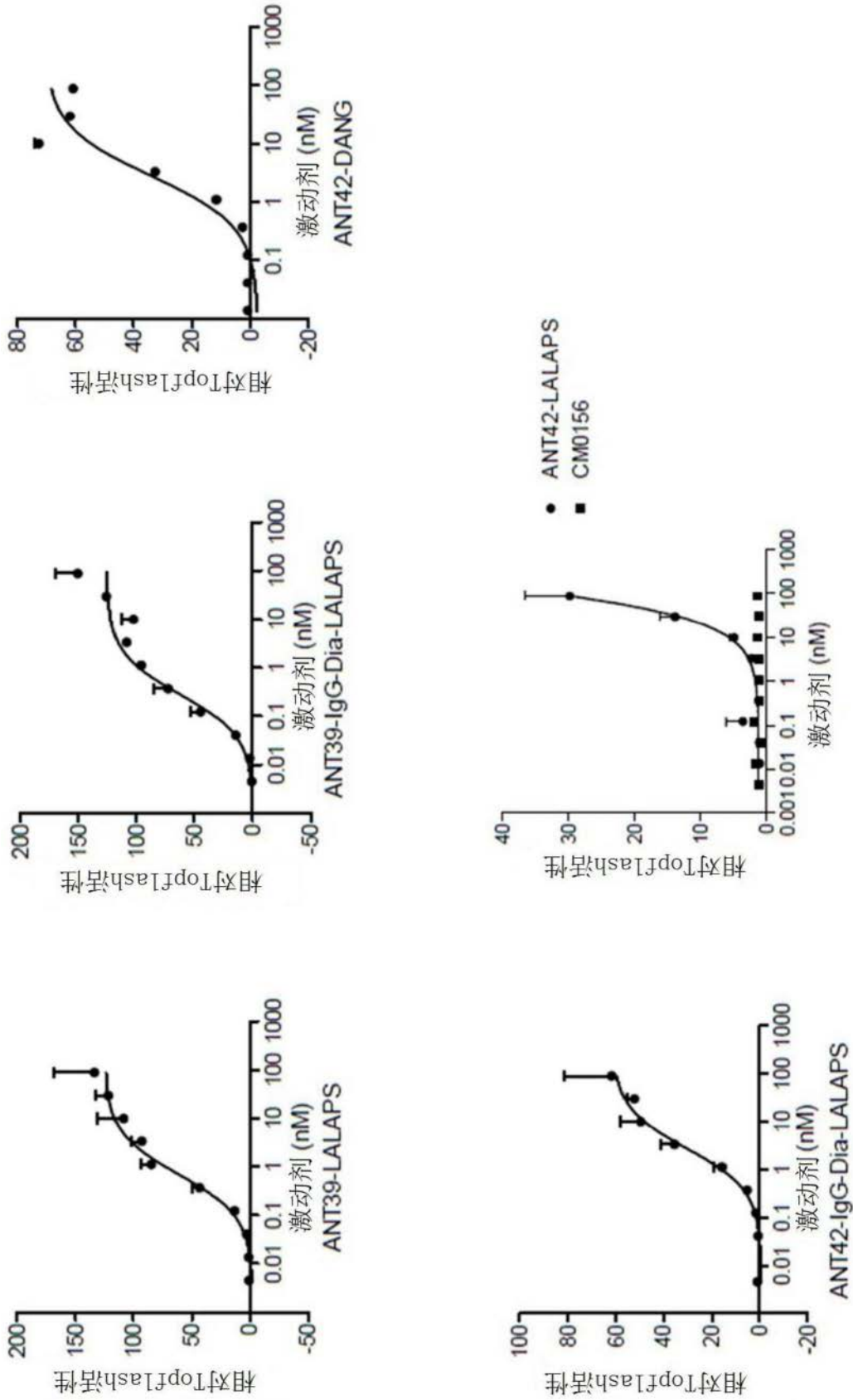


图10续

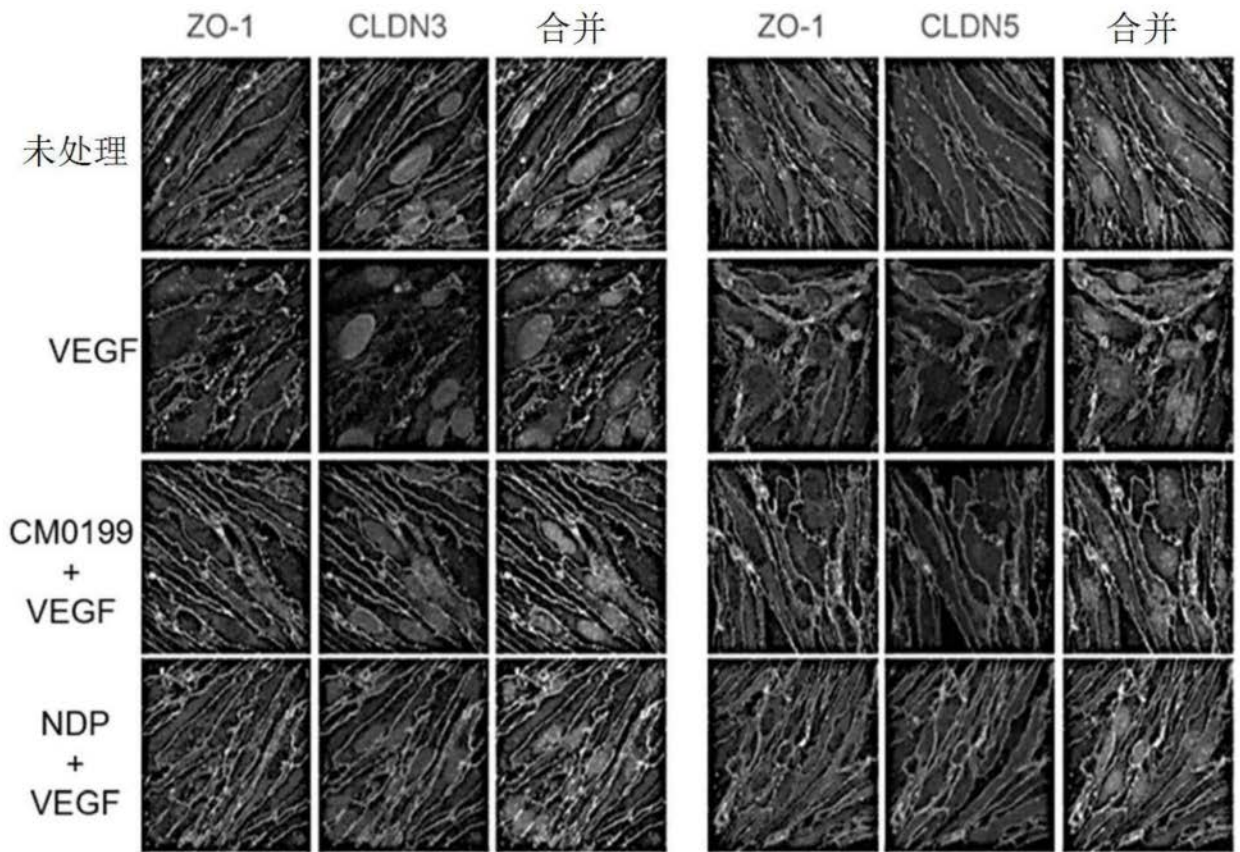


图11A

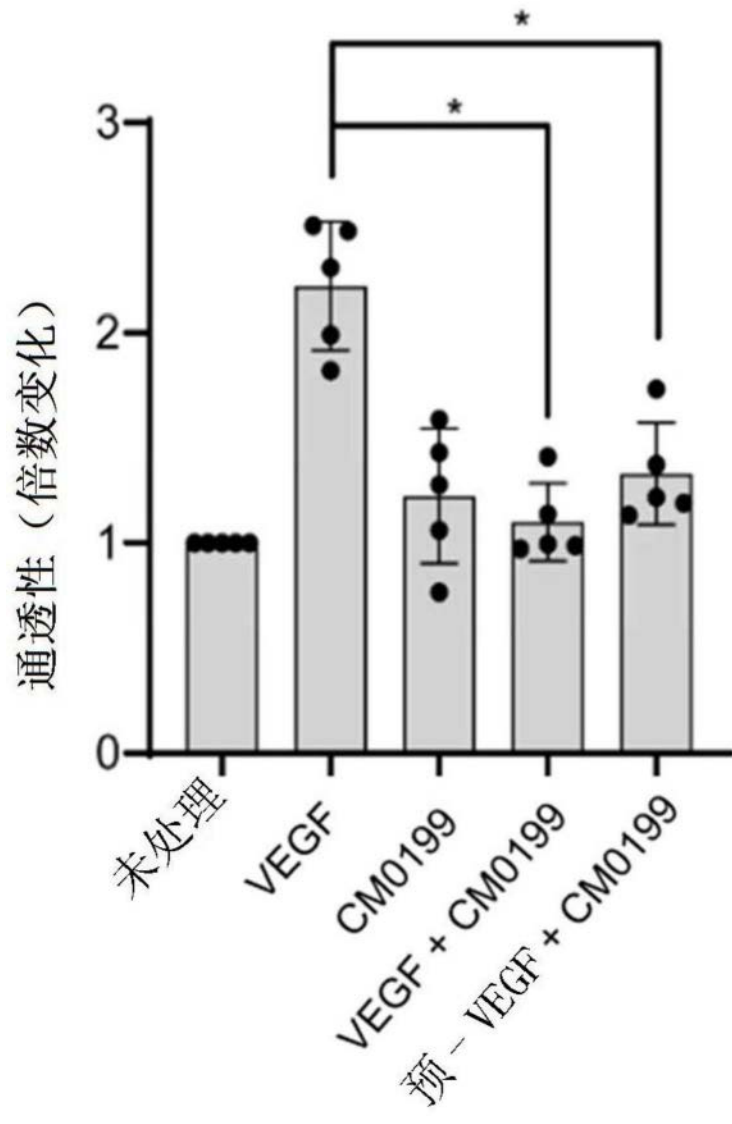


图11B

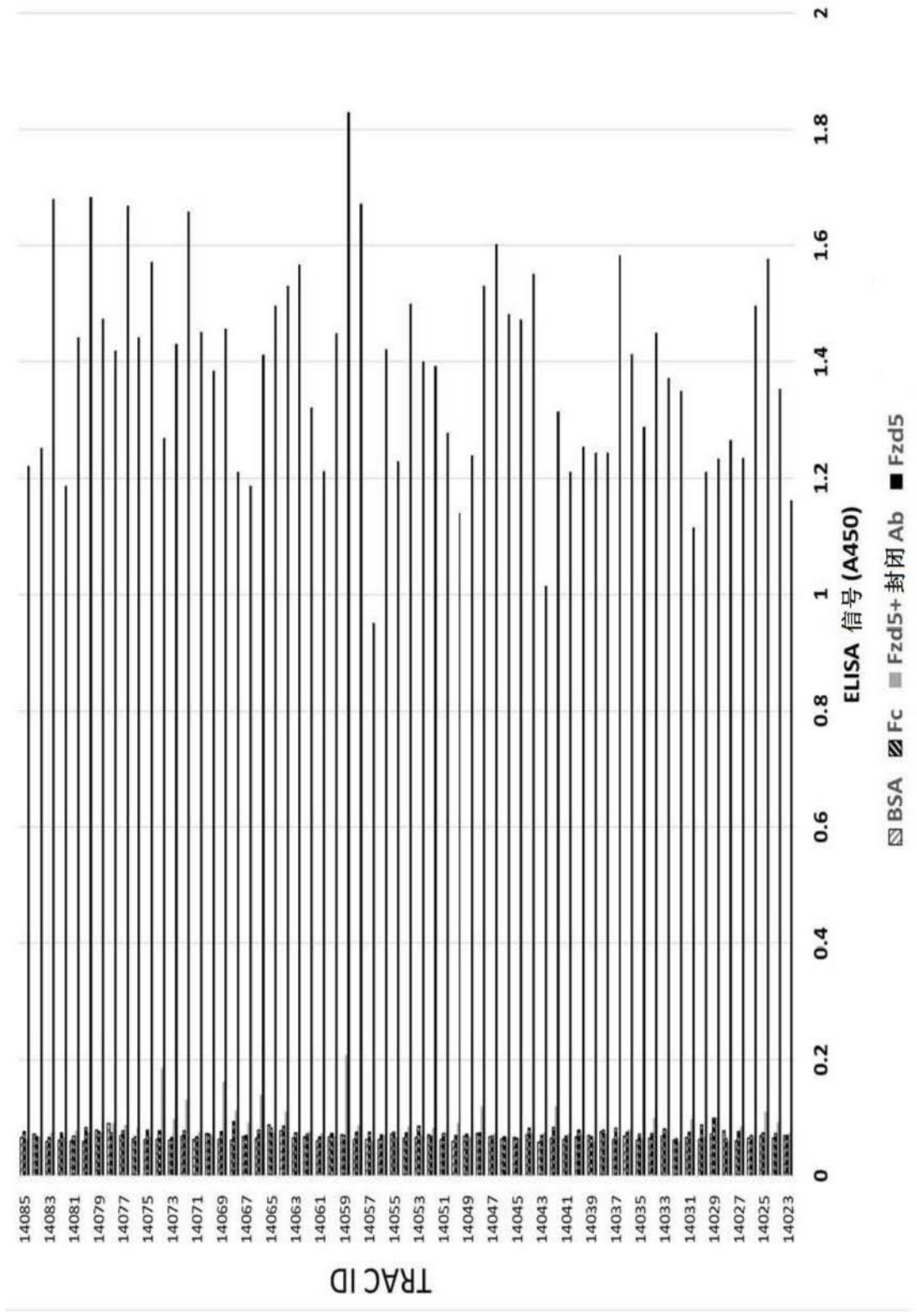


图12

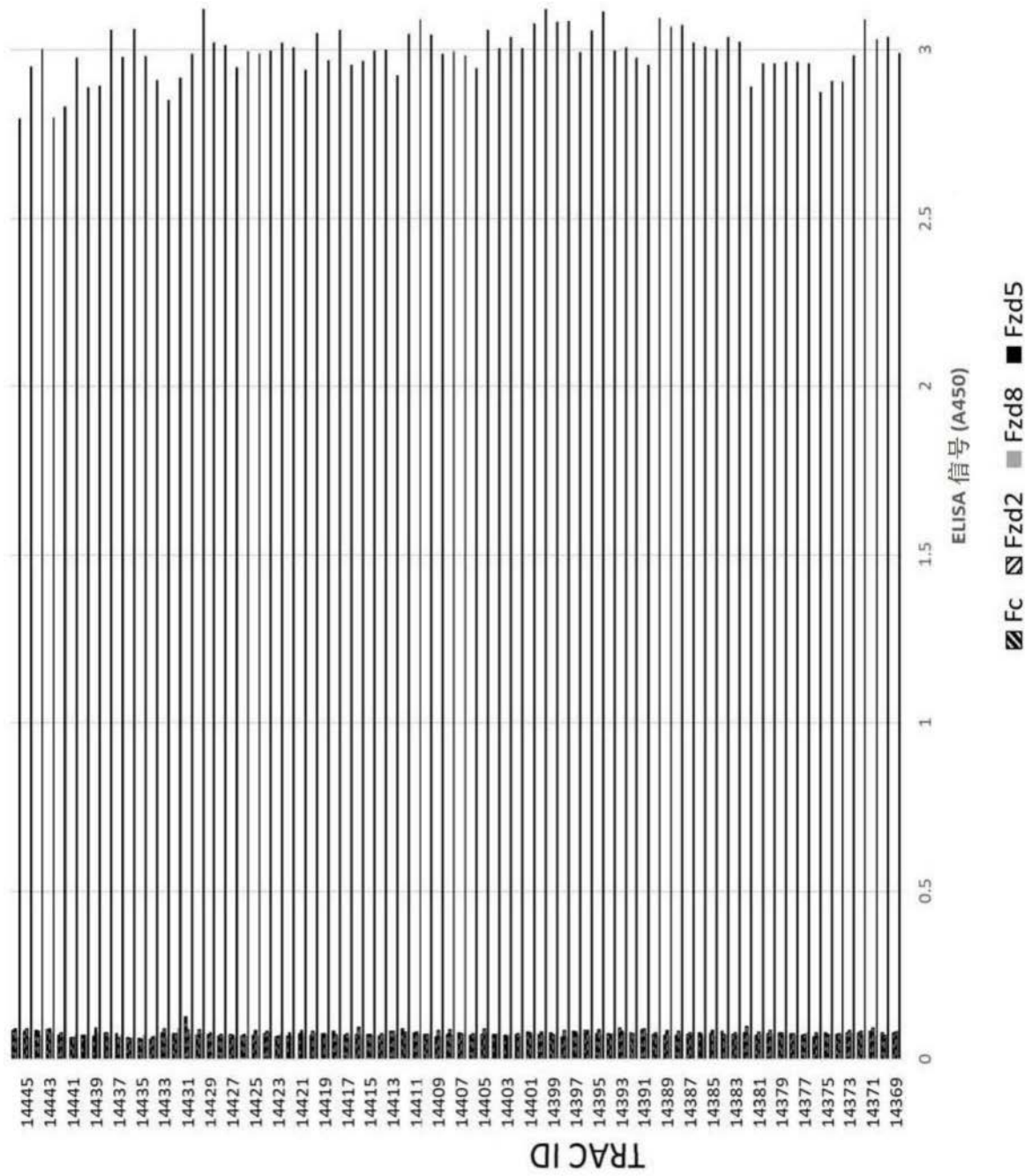


图13

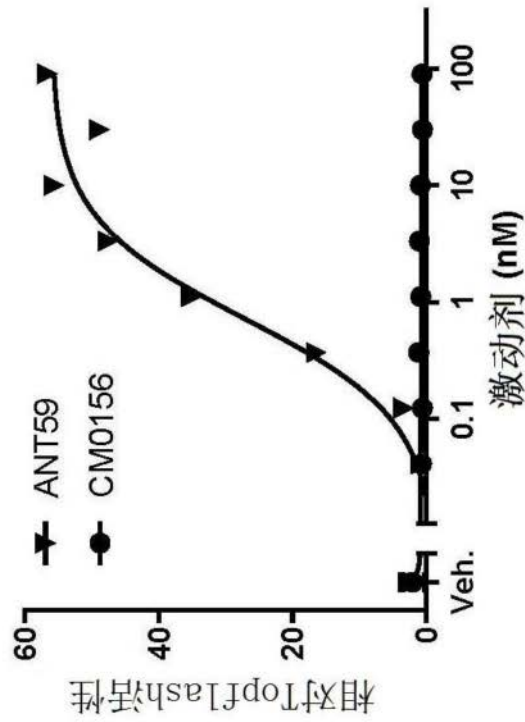
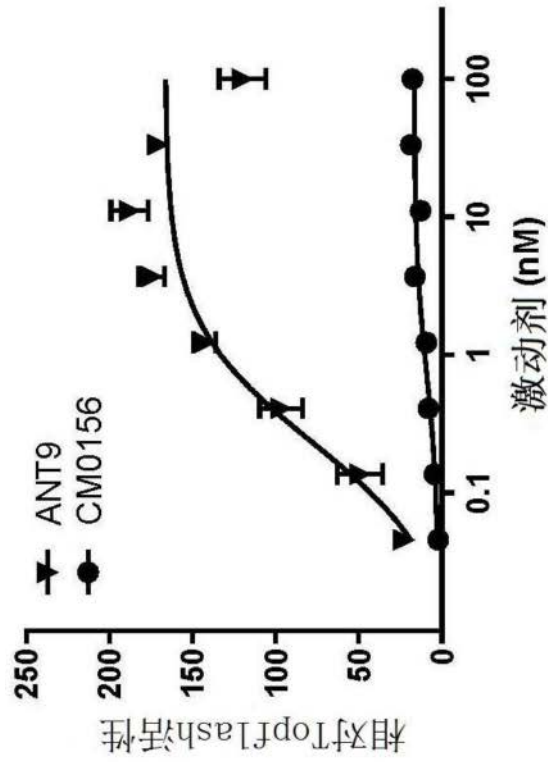


图14

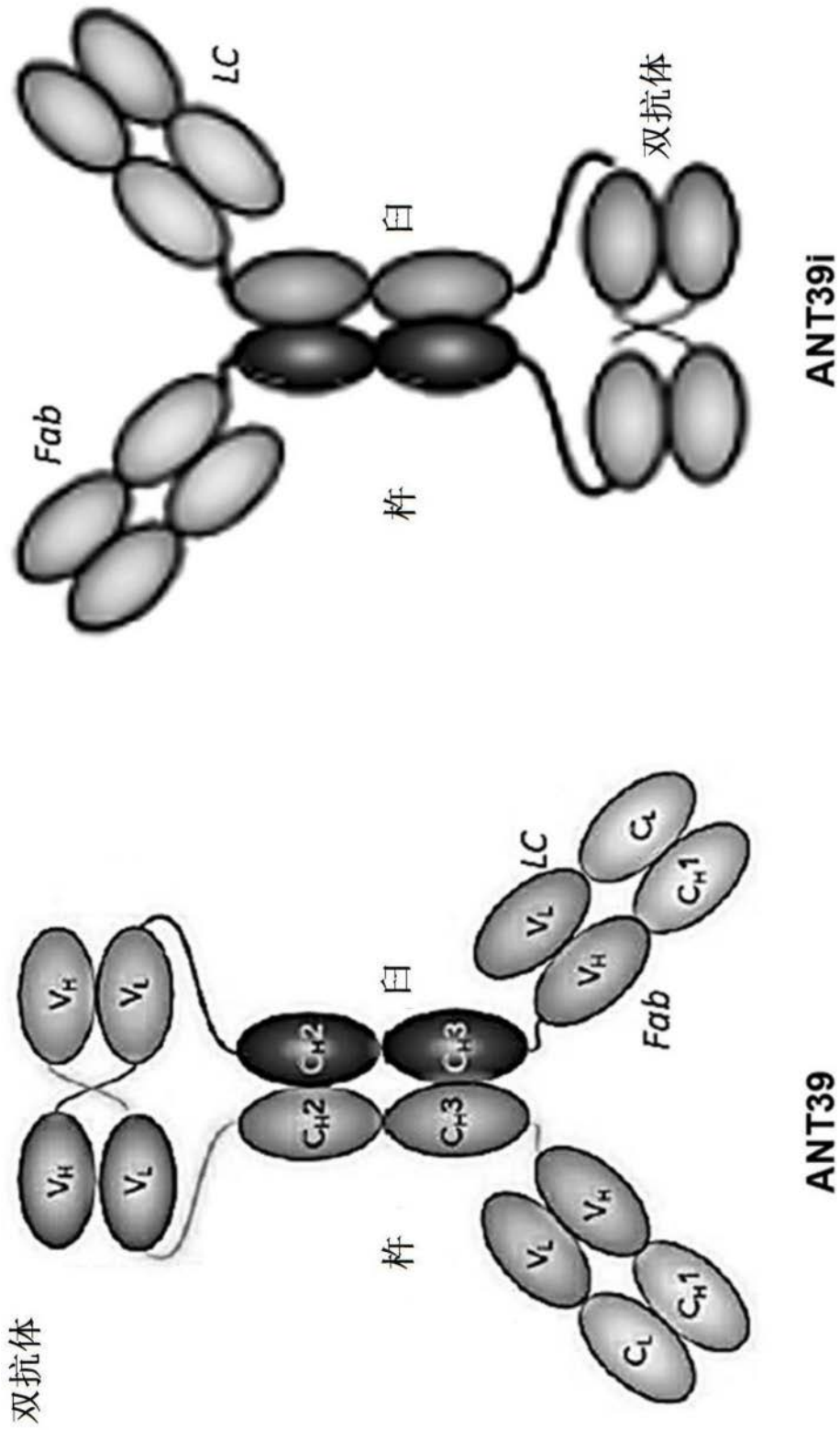


图15

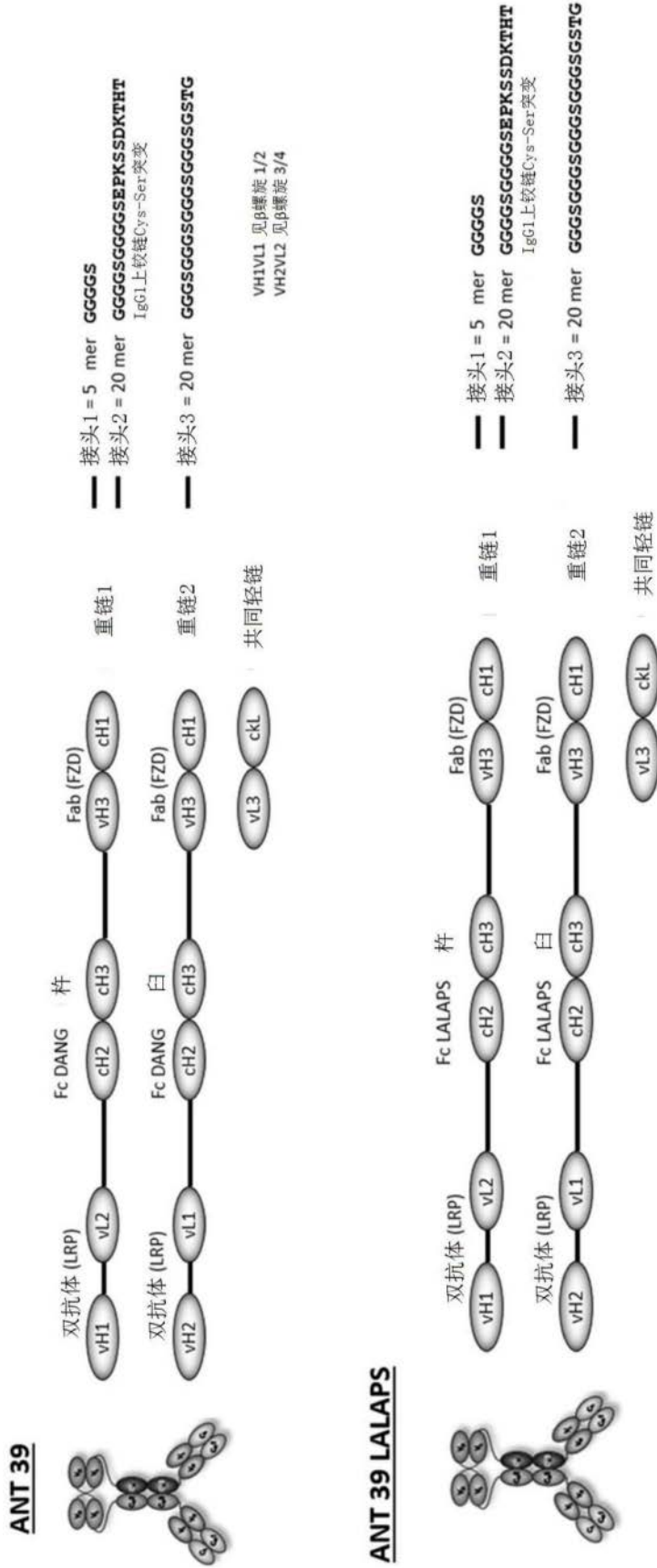
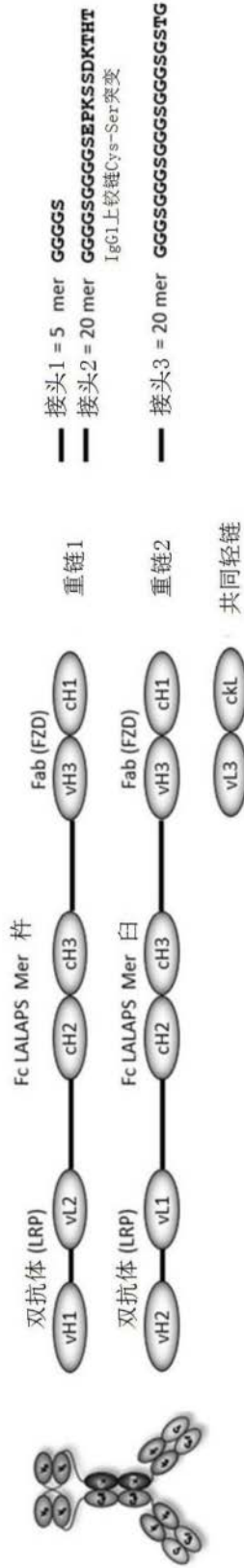


图16A

ANT 39 LALAPS Merchant



ANT 39 LALAPS Merchant S-S

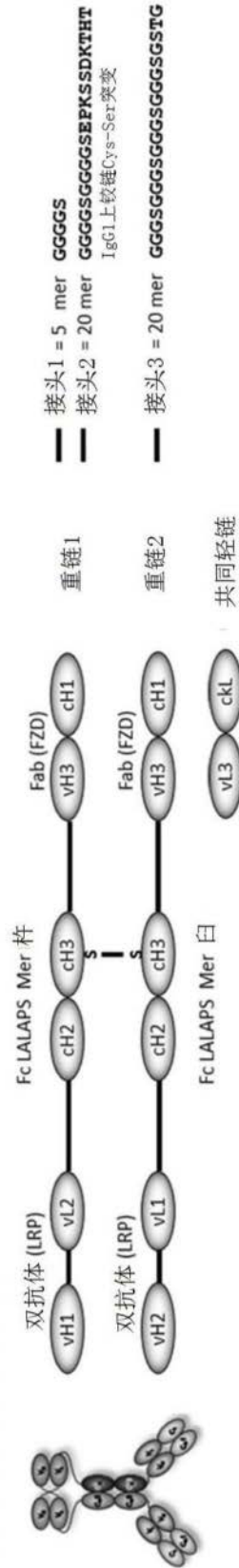


图16A续

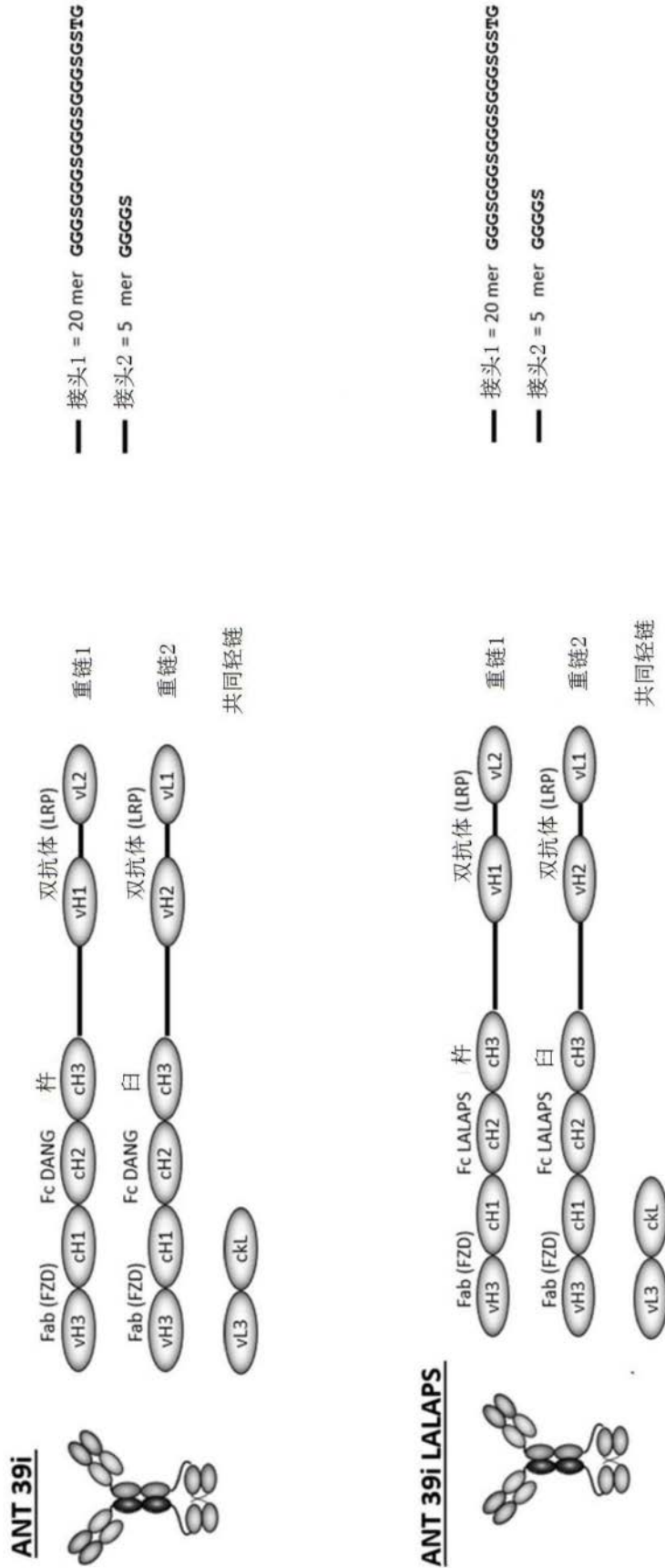
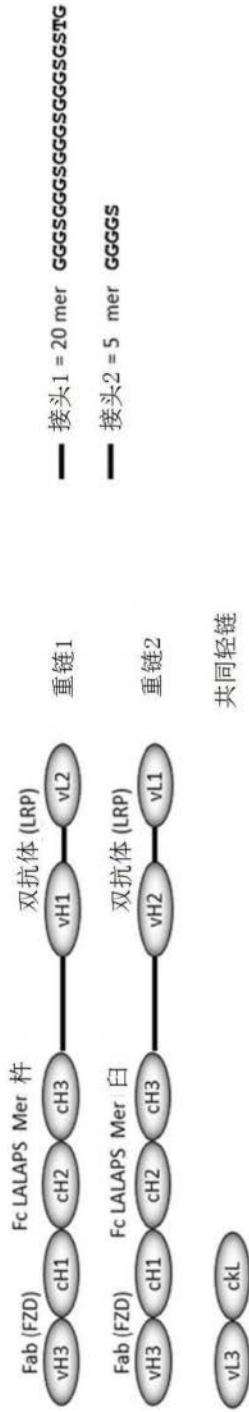


图16B

ANT 39i LALAPS Merchant



ANT 39i LALAPS Merchant S-S

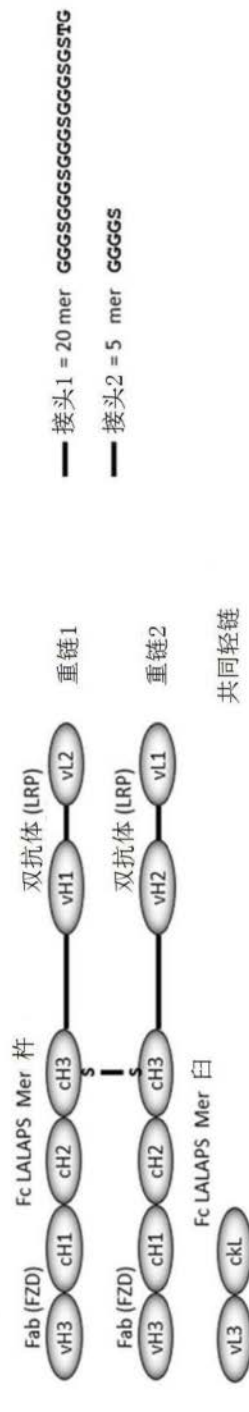


图16B续

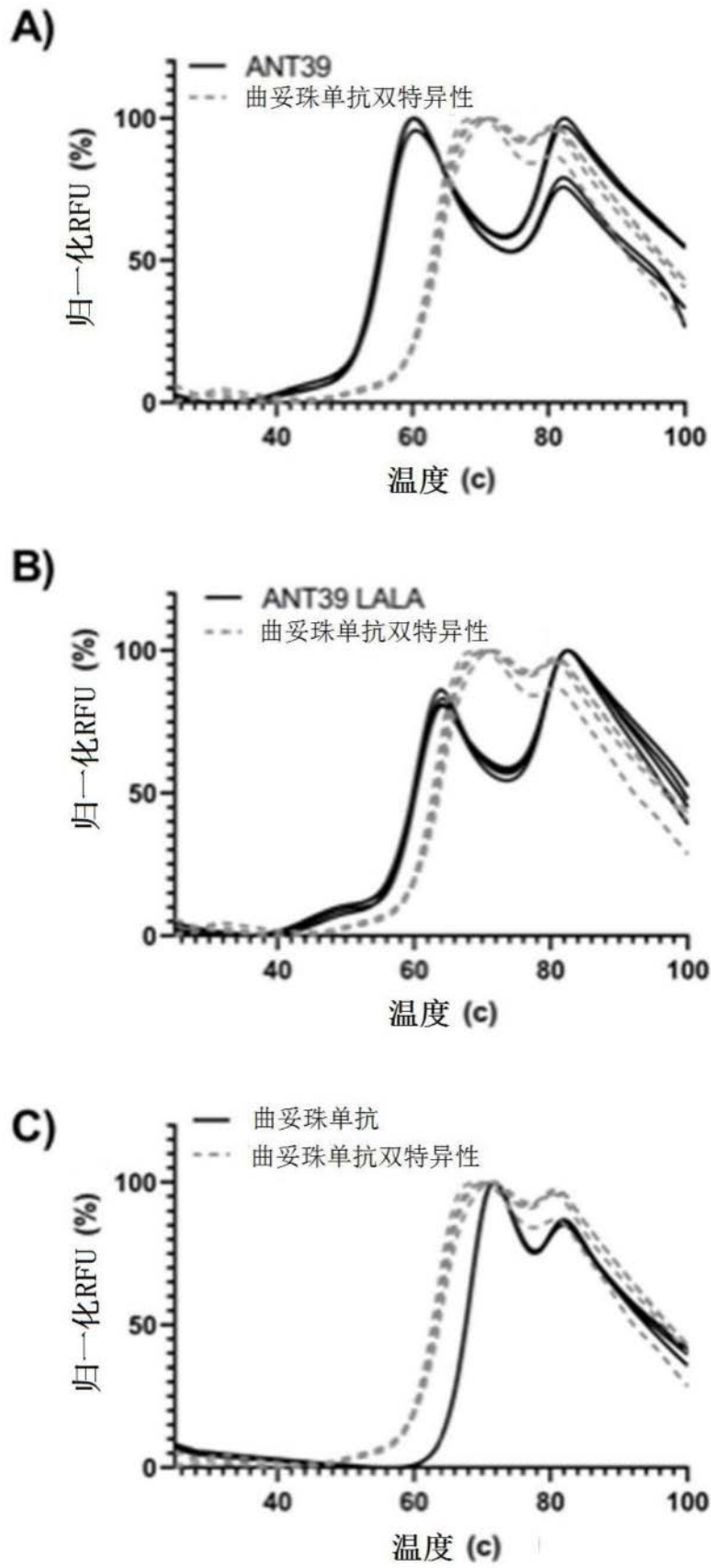


图17

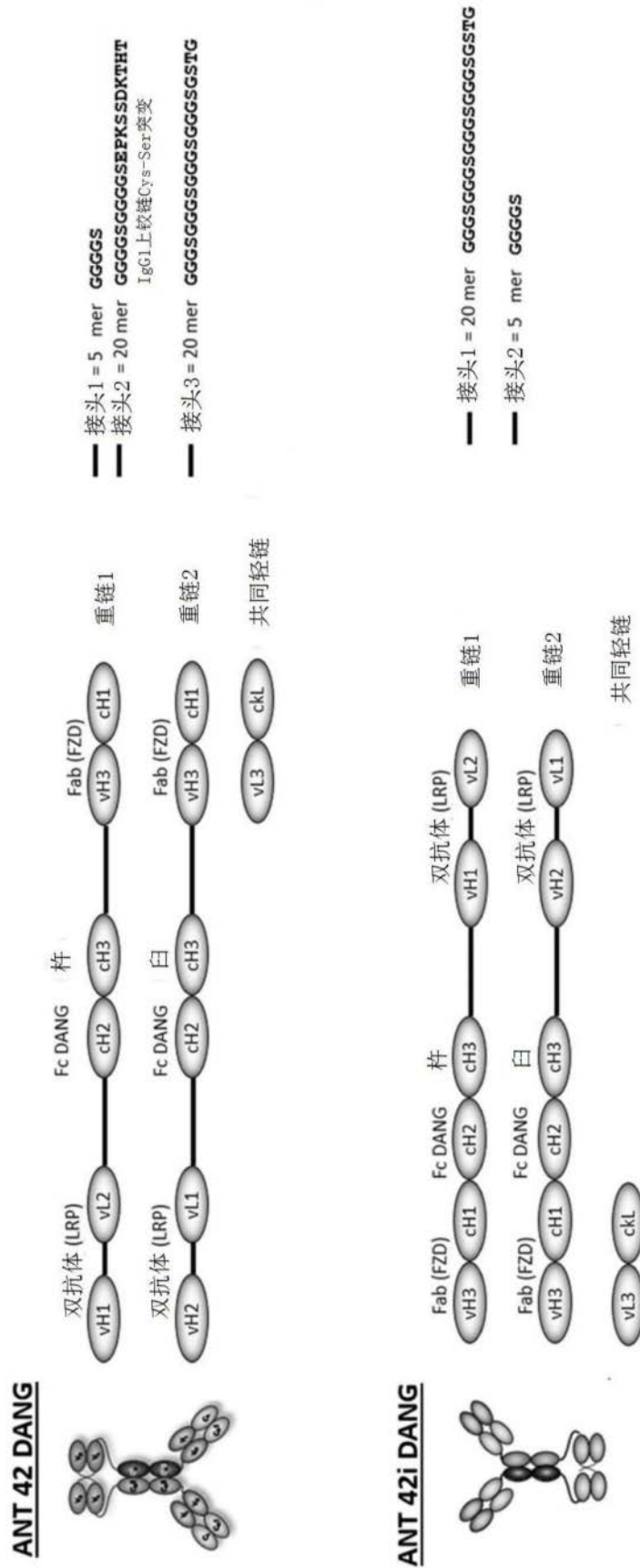


图18

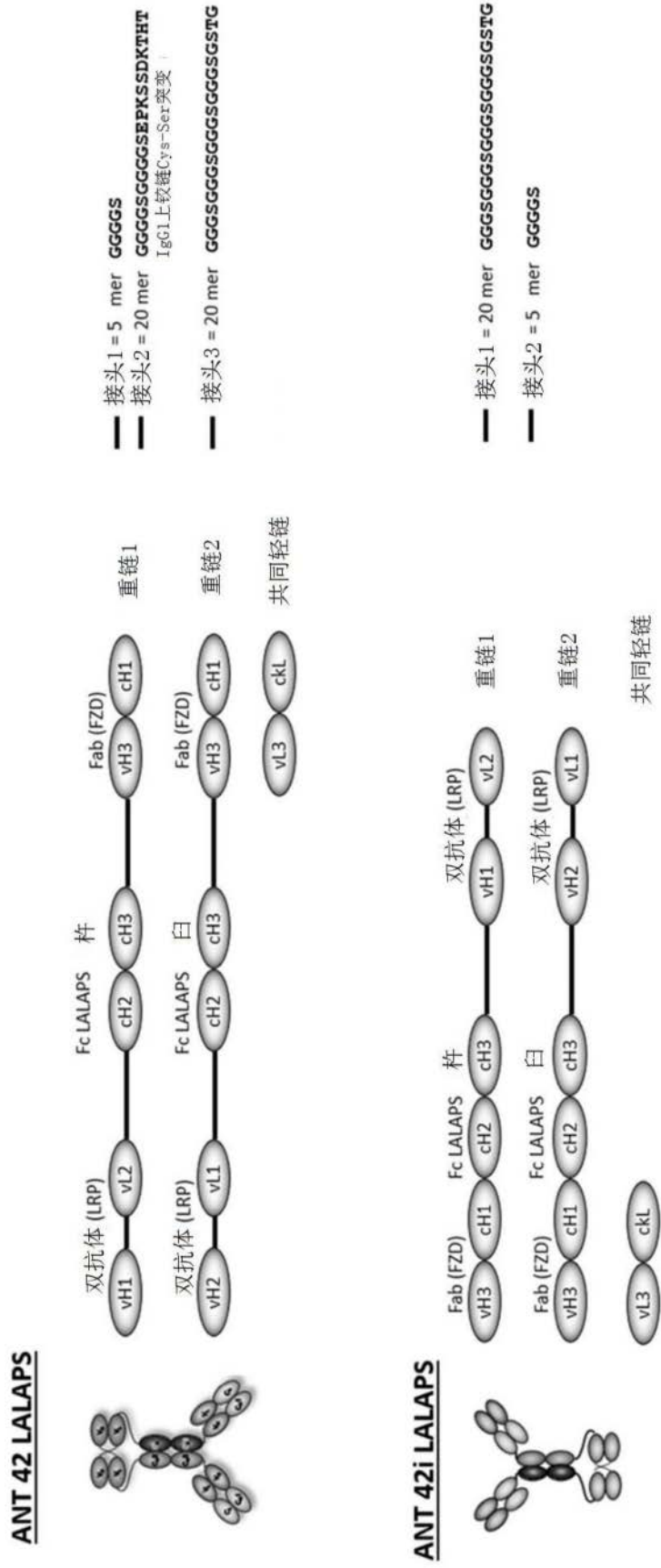


图18

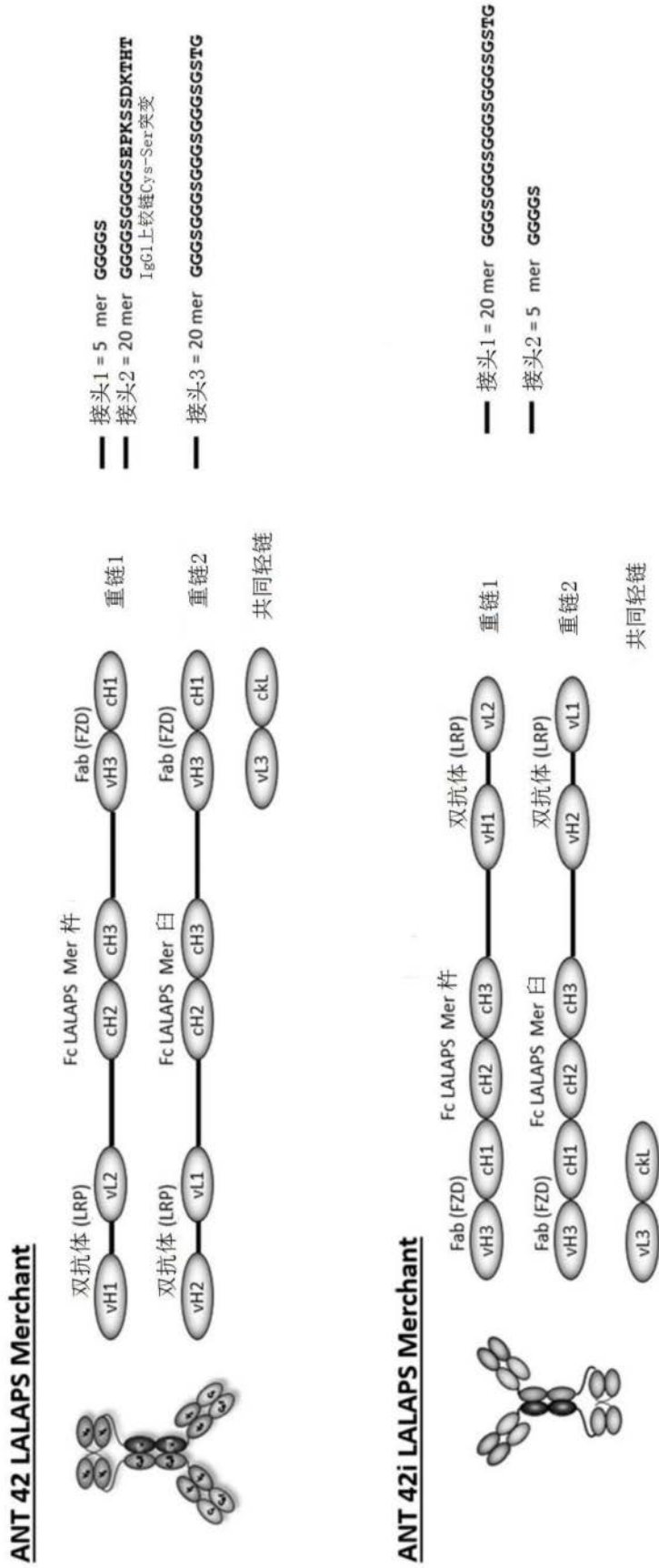
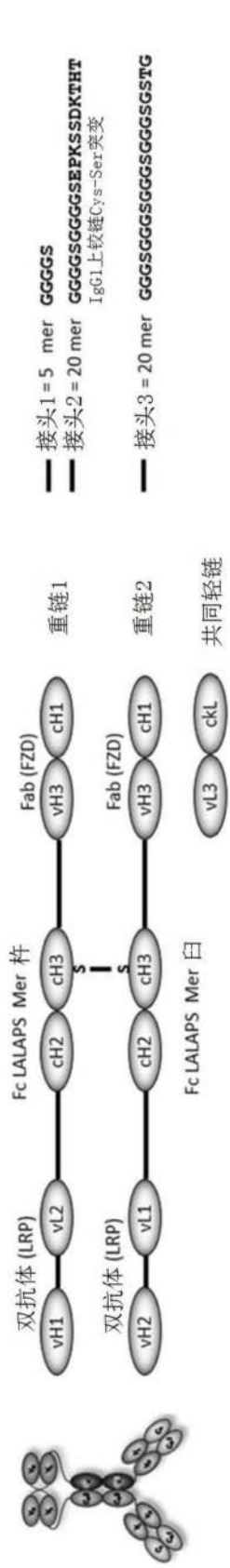


图18

ANT 42 LALAPS Merchant S-S



ANT 42i LALAPS Merchant S-S

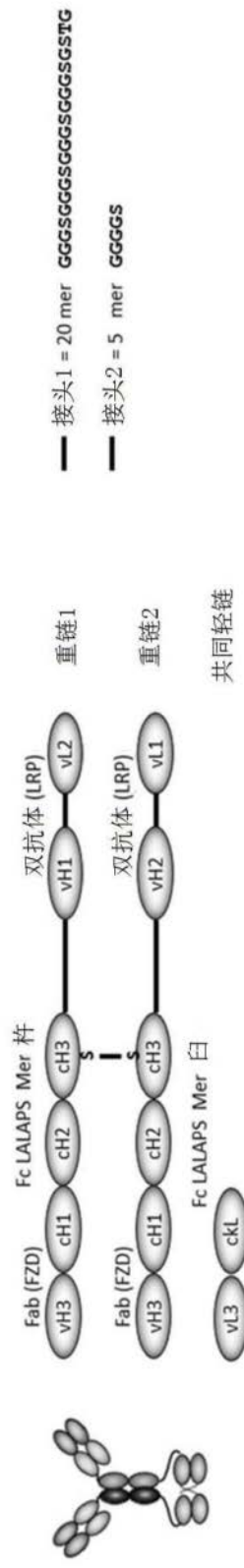


图18

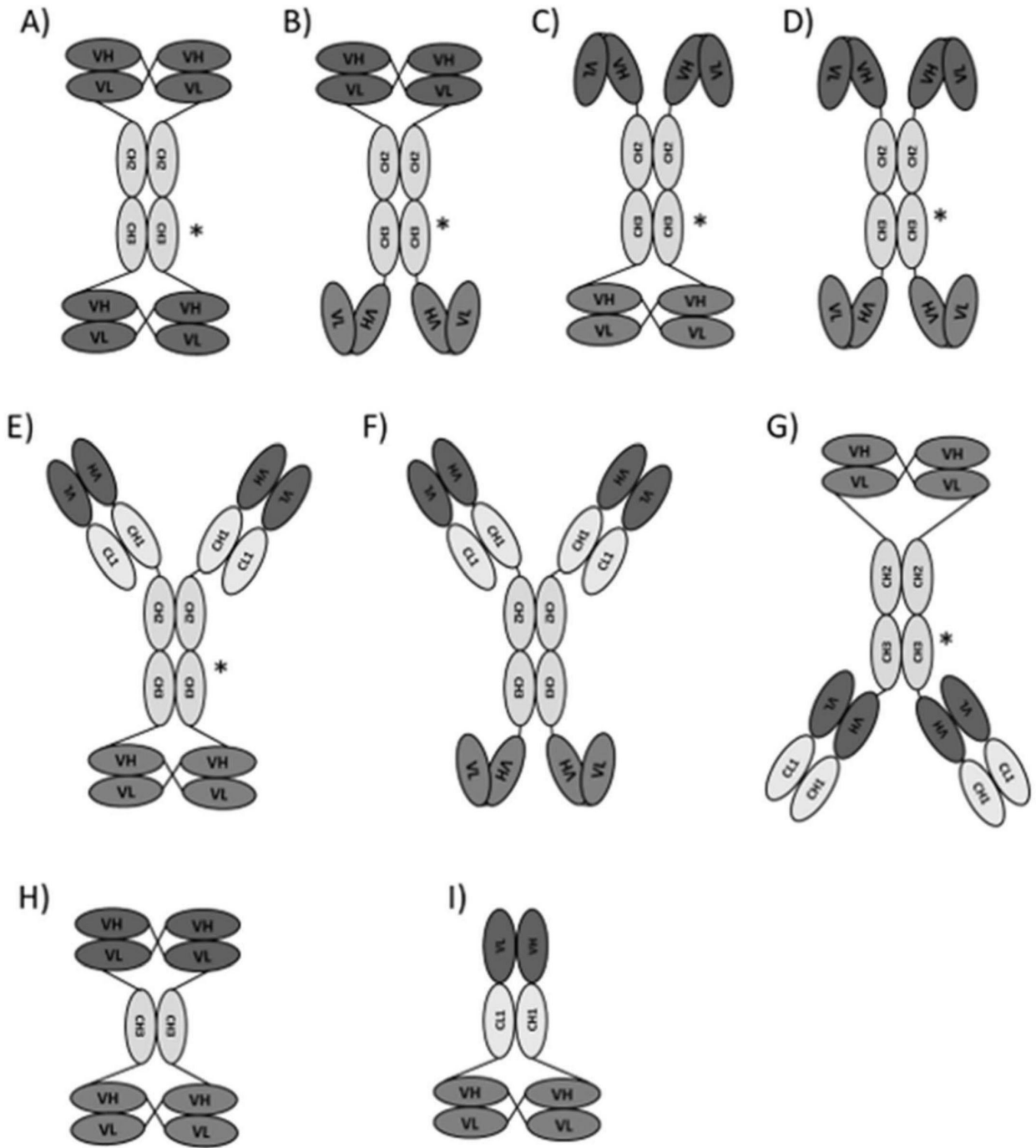


图19

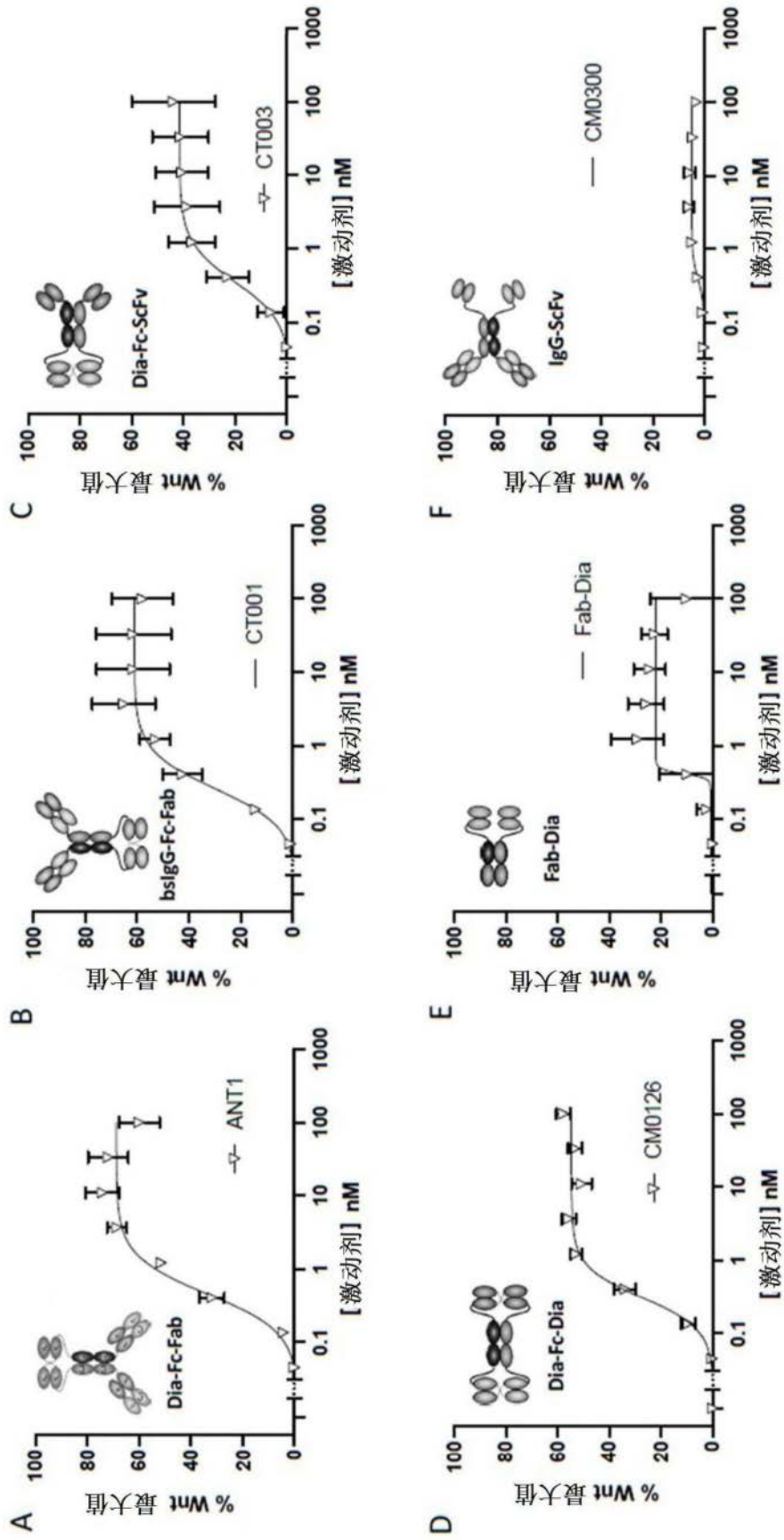








图20

#	形式	表达 [单体] (mg/l)*	EC50 (nM)	替代名称/替代变体名称
1	Dia-Fc-Fab 	97	0.45	ANT#, Ant#, ANT #, Ant #, 双抗体-Fc-Fab, ANT#LALAPS, ANT# LALAPS, ANT# LALALPS Merchant, ANT# LALALPS Merchant_S:S, ANT#LALA, ANT# LALA, ANT#DANG, ANT# DANG,
2	bslgG-Dia 	50	0.26	ANT#i, Ant#i, IgG- 双抗体 , IgG-Dia, bslgG-Dia, CT#, CM#, ANT#iLALAPS, ANT#i LALAPS, ANT#i LALALPS Merchant, ANT#i LALALPS Merchant_S:S
3	Dia-Fc-ScFv 	50	0.60	双抗体 -Fc-ScFv, CM#, CT#
4	Dia-Fc-Dia 	20	0.31	FLAg, CM#, 双抗体 -Fc- 双抗体 , CM#
5	Fab-Dia 	25	0.42	Fab-双抗体 , CM#
6	IgG-ScFv 	100	NA	CM#

- 编号 ; Dia = 双抗体

图21

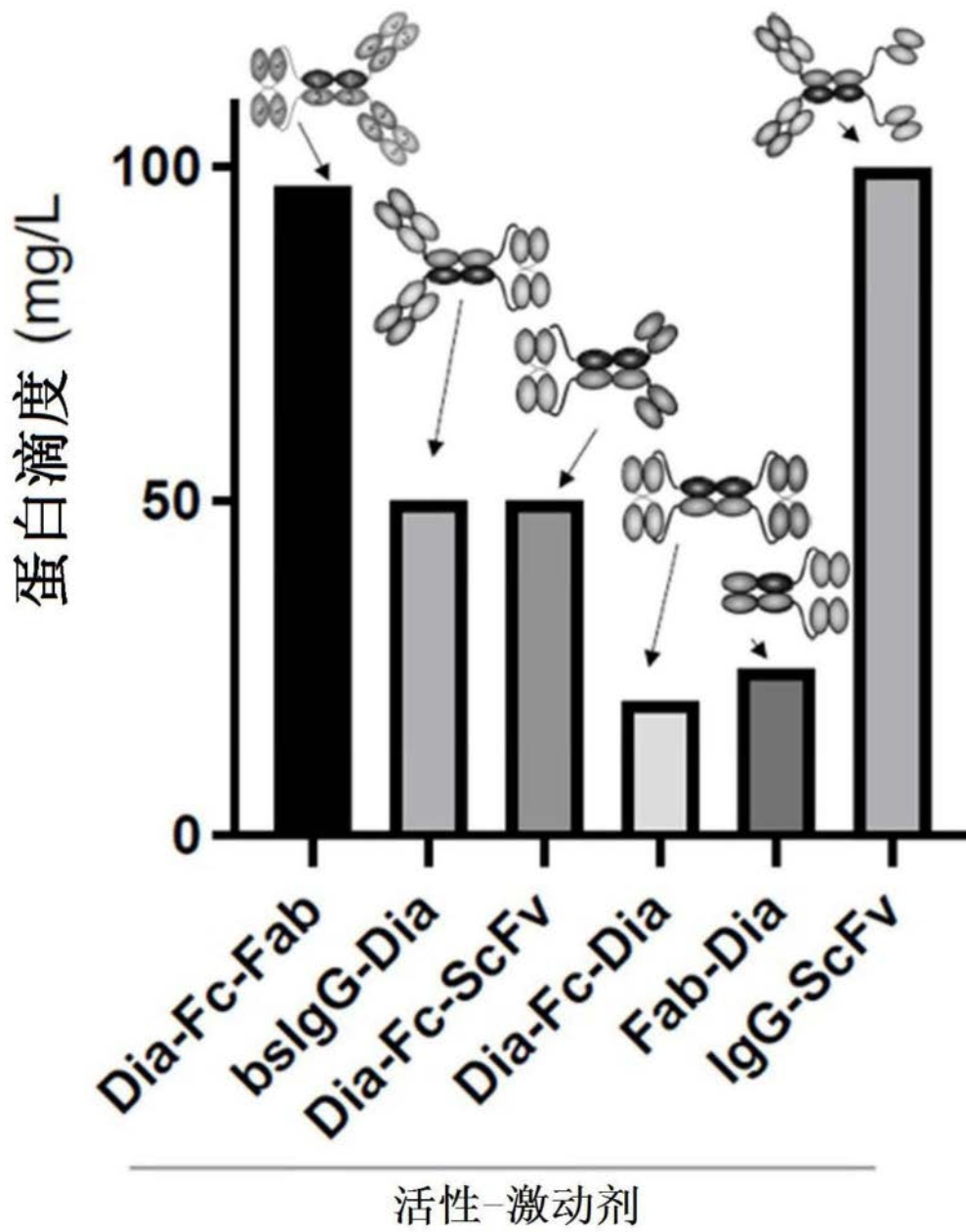


图21续

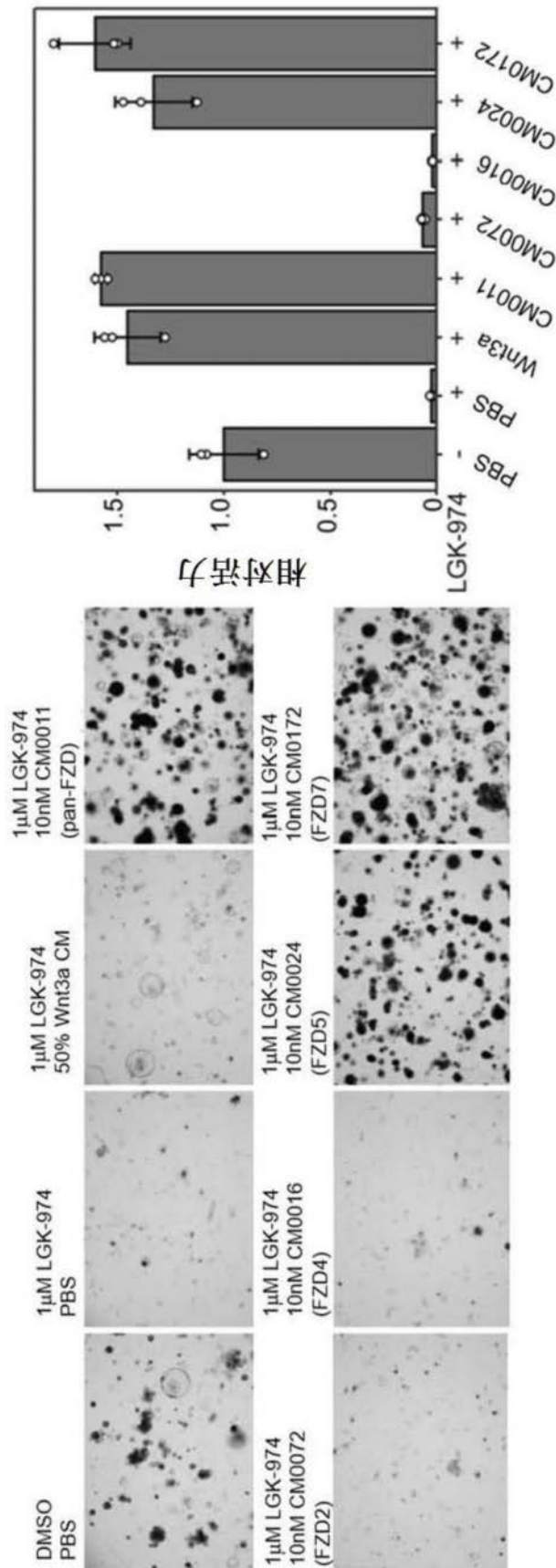


图22

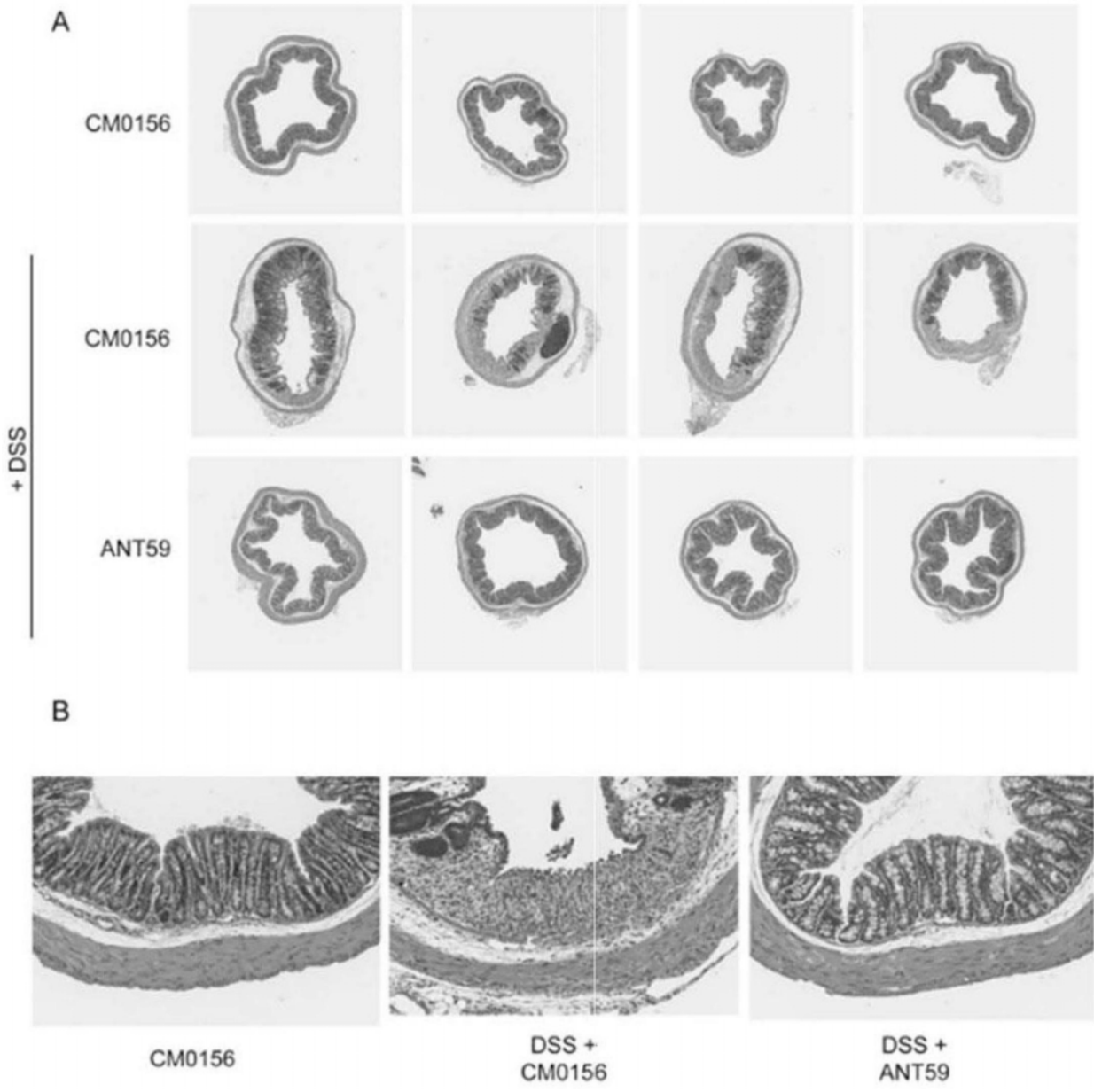


图23

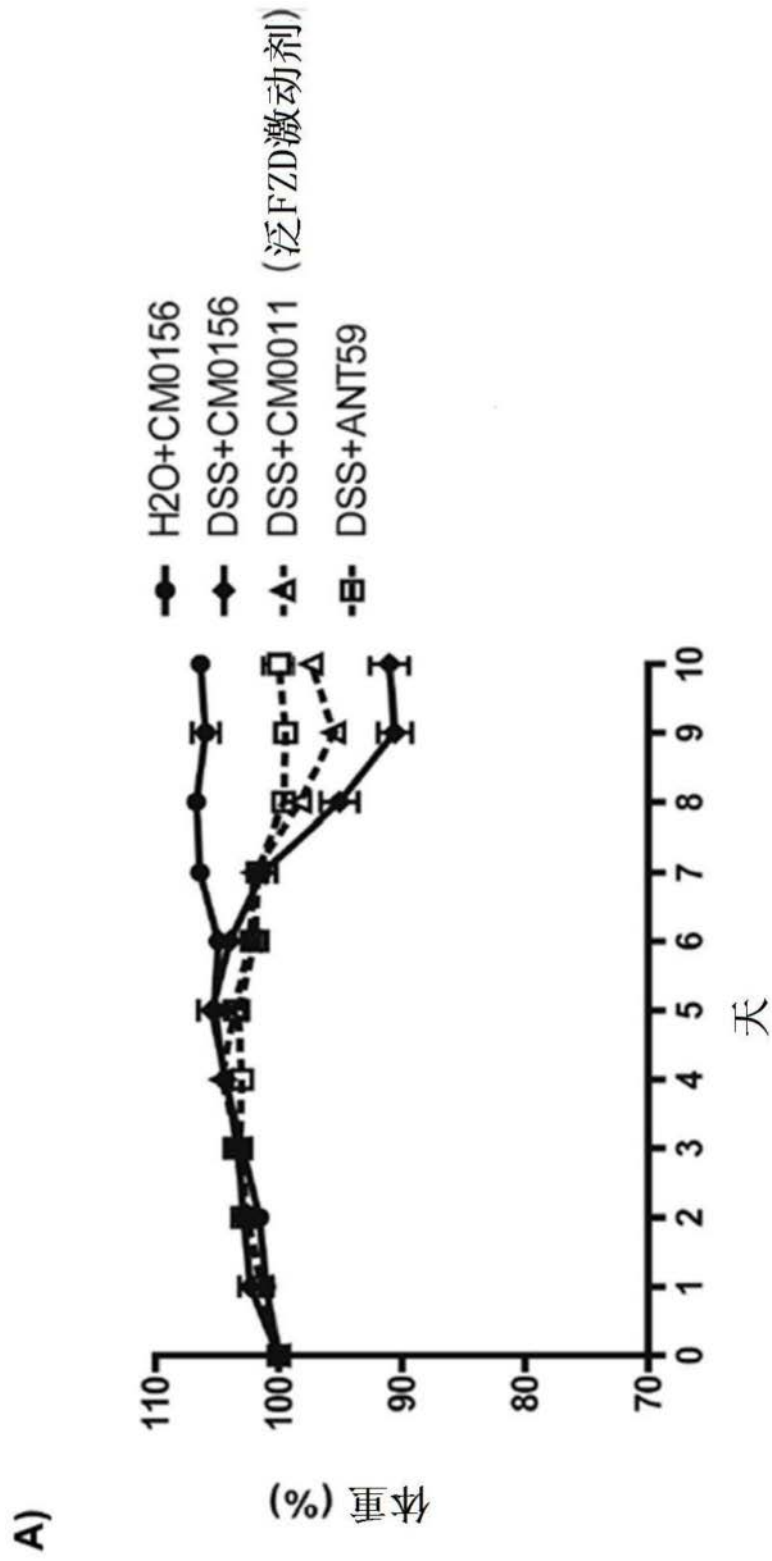


图24

B)

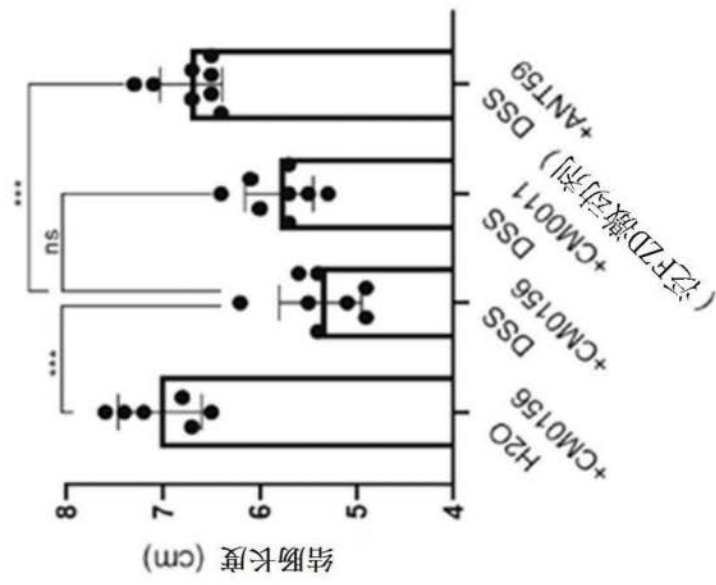
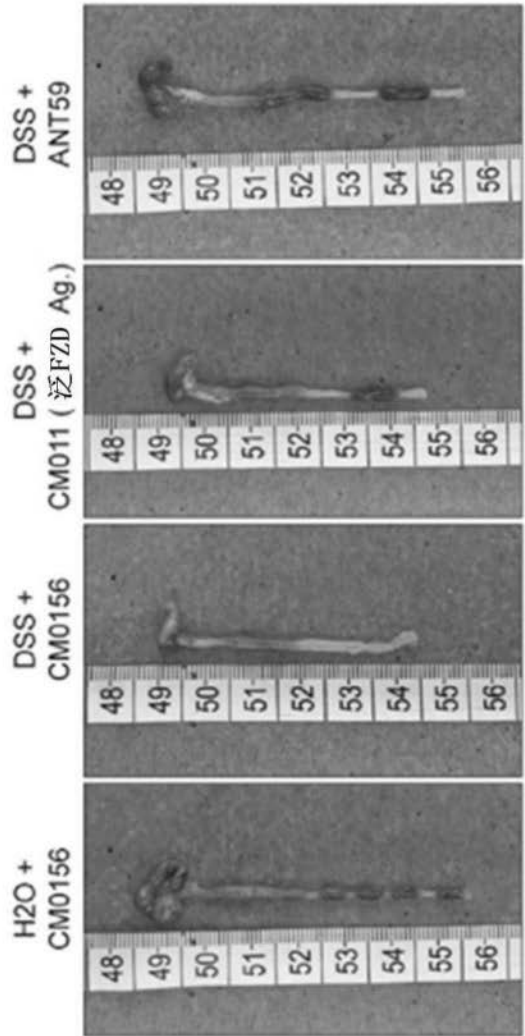


图24续

ANT	表达滴度 (mg/l)	FZD5整体亲和力(nM)
80	121	0.05
98	81	2
99	234	0.4

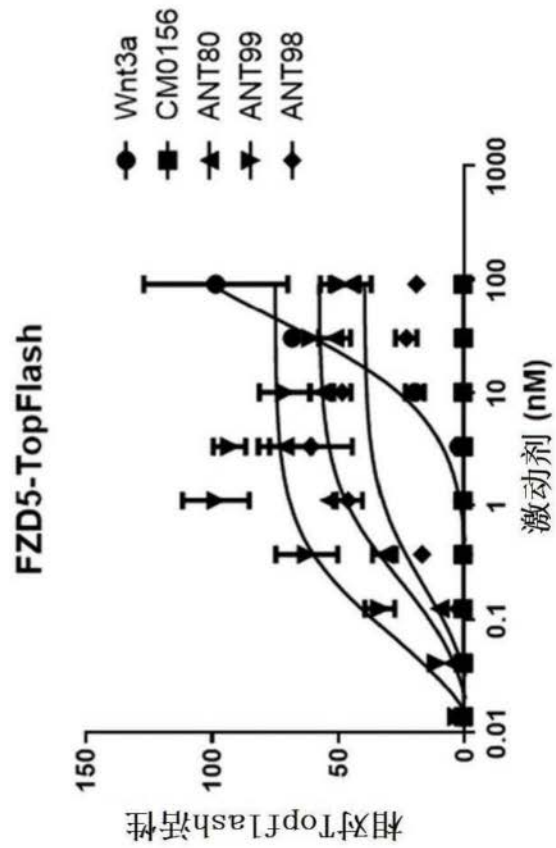
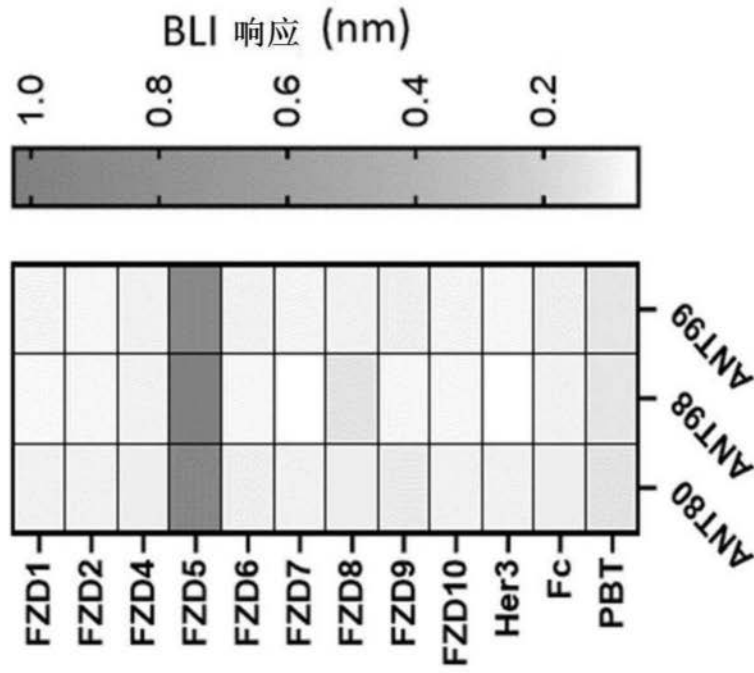


图25

1. 一种四价结合抗体分子,所述四价结合抗体分子包含:

- (a) 包含重链恒定结构域3(CH3)的Fc结构域或Fc结构域的片段;
- (b) 二价低密度脂蛋白受体相关蛋白5(LRP5)结合结构域;和
- (c) 二价卷曲蛋白(FZD)结合结构域;

其中,所述LRP5结合结构域与所述Fc结构域的一个末端连接,所述FZD结合结构域与所述Fc结构域的另一个末端连接;

其中,所述LRP5结合结构域包含结合LRP5的双抗体,所述FZD结合结构域包含结合FZD4的两个scFv或两个Fab。

2. 根据权利要求1所述的四价结合抗体分子,其中,

- (a) 所述LRP5结合结构域的双抗体与所述Fc结构域的N末端连接;以及
- (b) 所述FZD4结合结构域与所述Fc结构域的C末端连接。

3. 根据权利要求2所述的四价结合抗体分子,其中,

(a) 所述LRP5结合结构域的双抗体通过双抗体的VL或VH与所述Fc结构域的N末端连接;以及

(b) 所述FZD结合结构域包含与Fc的C末端融合的两个FZD结合Fab,其中,每个Fab通过与所述Fc结构域的CH3结构域连接的Fab的重链可变结构域或轻链可变结构域(VH或VL)与Fc结构域连接。

4. 一种四价结合抗体分子,所述四价结合抗体分子包含N末端LRP5结合双抗体和包含两个FZD4结合scFv的C末端结构域,所述四价结合抗体分子包含:

第一单体和第二单体的二聚体,其中,每个单体包含单链多肽,所述单链多肽从N末端到C末端包含:

(a) 第一肽,所述第一肽包含结合LRP5的第一重链可变结构域(VH)和第一轻链可变结构域(VL);

(b) 包含重链恒定结构域3(CH3)的Fc区或Fc区的片段;和

(c) 第二肽,所述第二肽包含结合FZD4的第二VL和第二VH;以及

第一轻链单体和第二轻链单体,每个轻链单体从N末端到C末端包含与轻链恒定结构域1(CL1结构域)连接的结合FZD4的VL;

其中,第一单体和第二单体通过Fc区或Fc区的片段二聚化,每个单体的第一VH和VL与另一个单体的第一VH和VL配对,形成结合LRP5的双抗体,并且每个单体的第二VL和VH配对形成结合FZD4的scFv;并且

其中,LRP5结合双抗体形成四价结合抗体分子的N末端LRP5结合结构域,两个FZD4结合scFv形成四价结合抗体分子的C末端FZD结合结构域。

5. 根据权利要求1所述的四价结合抗体分子,其中,所述FZD结合结构域与所述Fc结构域的N末端连接,所述LRP5结合结构域与所述Fc结构域的C末端连接。

6. 根据权利要求5所述的四价结合抗体分子,其中,

(a) 所述FZD结合结构域包含结合FZD4的两个Fab,其中,每个Fab通过与所述Fc结构域的CH2结构域连接的Fab的重链可变结构域或轻链可变结构域(VH或VL)与所述Fc结构域的N末端连接;以及

(b) 所述LRP5结合结构域包含结合LRP5的双抗体或两个scFv,其中,所述双抗体或两个

scFv通过与所述Fc结构域的CH3连接的双抗体或scFv的VL或VH与Fc结构域的C末端连接。

7. 一种四价结合抗体分子,所述四价结合抗体分子包含:包含重链恒定结构域3(CH3)的Fc结构域或Fc结构域的片段、包含两个FZD4结合Fab的N末端FZD4结合结构域和包含LRP5结合双抗体的C末端LRP5结合结构域,所述四价结合抗体分子包含:

(a) 第一重链单体和第二重链单体,其中,每个重链单体包含单链多肽,所述单链多肽从N末端到C末端包含:

(i) 结合FZD4的重链可变结构域(VH),其连接至如下(ii);

(ii) 重链恒定区结构域1(CH1结构域),其连接至如下(iii);

(iii) Fc区的CH2结构域,其连接至如下(iv);

(iv) 包含结合LRP5共受体的VH的肽,所述结合LRP5共受体的VH与结合LRP5共受体的轻链可变结构域(VL)连接;以及

(b) 第一轻链单体和第二轻链单体,每个轻链单体从N末端到C末端包含结合FZD4的VL,所述结合FZD4的VL与轻链恒定结构域1(CL1结构域)连接;

其中,第一重链单体和第二重链单体通过它们的Fc区或Fc区的片段二聚化;

其中,结合LRP5的VH和VL之间的接头的长度促进第一重链单体的VH和VL与第二重链单体的VL和VH配对,从而形成LRP5共受体结合双抗体,FZD结合Fab通过如下形成:每个重链单体与轻链单体配对使得每个重链单体中的结合FZD4的VH和CH1与轻链单体中的结合FZD4的VL和CL1配对;并且

其中,Fab在Fc结构域的N末端形成FZD4结合结构域,双抗体在Fc结构域的C末端形成LRP5共受体结合结构域。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述LRP5结合双抗体是与LRP5共受体胞外结构域内的两个表位结合的二价双特异性LRP5结合结构域。

9. 根据权利要求8所述的四价结合抗体分子,其中,所述LRP5结合结构域与LRP5共受体的Wnt1表位和Wnt3表位相互作用。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述FZD结合结构域是单特异性的。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,

所述LRP5结合结构域的双抗体结合LRP5,所述LRP5结合结构域的双抗体包含表3或表6A中的序列中所示的抗体的重链互补决定区CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3以及轻链互补决定区CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc结构域或Fc结构域的片段通过Fc区或Fc区的片段的杵臼构造二聚化。

13. 根据权利要求12所述的四价结合抗体分子,其中,根据EU编号,所述第一重链单体的Fc区包含突变T366S、L368A和Y407V,所述第二重链单体的Fc区包含突变T366W。

14. 根据权利要求13所述的四价结合抗体分子,其中,根据EU编号,所述第一重链单体的Fc区还包含突变S354I和E357L,所述第二重链单体的Fc区还包含突变Q347M、Y349F、T350D和L368M。

15. 根据权利要求13所述的四价结合抗体分子,其中,在第一重链单体和第二重链单体的Fc区之间引入另外的二硫键;优选地,根据EU编号,第一重链单体包含突变Y349C并且第

二重链单体包含突变S354C。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc结构域缺乏一种以上效应子功能。

17. 根据权利要求16所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc区具有因根据EU编号的氨基酸突变N297G(NG)和/或D265A(DA)变体而改变它们的效应子功能的突变。

18. 根据权利要求16所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc区具有因根据EU编号的氨基酸突变L234A、L235A和/或P331S而改变它们的效应子功能的突变。

19. 根据权利要求18所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc区具有因氨基酸突变L234A和L235A(LALA)而改变它们的效应子功能的突变。

20. 根据权利要求19所述的四价结合抗体分子,其中,所述Fc区具有因氨基酸突变L234A、L235A和P331S(LALAPS)而改变它们的效应子功能的突变。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述LRP5结合结构域和FZD结合结构域各自通过接头与所述Fc结构域连接。

22. 根据权利要求21所述的四价结合抗体分子,其中,所述接头包含1至100个、1至50个、1至30个、1至25个、1至10个、1至6个氨基酸、1至5个氨基酸或2至4个氨基酸。

23. 根据权利要求21或22所述的四价结合抗体分子,其中,形成LRP5共受体结合结构域的双抗体通过接头GGGSGGGGSEPKSSDKTHT(SEQ ID NO:892)与Fc结构域融合。

24. 根据权利要求21至23中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述FZD4结合Fab通过接头GGGSGGGSGGGSGGSTG(SEQ ID NO:891)与Fc区融合。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,结合LRP5共受体的VH通过短接头GGGS(SEQ ID NO:886)与结合LRP5共受体的VL连接。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述FZD4结合结构域包含结合FZD4的两个Fab。

27. 根据权利要求26所述的四价结合抗体分子,其中,所述FZD4结合Fab包含表1、表2或表6中的序列中所示的抗体的轻链互补决定区CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3以及重链CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

28. 根据权利要求1至4和8至27中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述四价结合抗体分子包含:

(a) 第一重链单体和第二重链单体的二聚体,每个单体包含单链多肽,所述单链多肽从N末端到C末端包含:

- (1) 包含结合LRP5的重链可变结构域(VH)和结合LRP5的轻链可变结构域(VL)的肽,
- (2) 包含CH3的Fc区或Fc区的片段,
- (3) 结合FZD4的VH,以及
- (4) 重链恒定结构域1(CH1),

其中:

(5) 结合LRP5的VH包含表3或表6中的序列中所示的抗体的重链CDR(CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3),

(b) 结合LRP5的VL包含表3或表6中的序列中所示的抗体的轻链CDR(CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),

(c) 结合FZD4的VH包含表1、表2或表6中的序列中所示的抗体的重链CDR (CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3);以及

(d) 第三轻链单体和第四轻链单体,所述第三轻链单体和第四轻链单体各自包含结合FZD4的VL和轻链恒定结构域1 (CL1),所述结合FZD4的VL包含表1、表2或表6中的序列中所示的抗体的轻链CDR (CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),

其中,第一重链单体和第二重链单体通过它们的Fc区二聚化,第一单体的结合LRP5的VL和VH与第二单体的结合LRP5的VH和VL配对形成结合LRP5的二价双抗体,并且

第三轻链单体和第四轻链单体的CL1和结合FZD4的VL与第一重链单体和第二重链单体的CH1和结合FZD4的VH配对形成结合FZD4的两个Fab,其中,双抗体形成N末端二价LRP5结合结构域,两个Fab形成C末端二价FZD4结合结构域。

29. 根据权利要求5至7中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述四价结合抗体分子包含:

(a) 第一重链单体和第二重链单体的二聚体,每个单体包含单链多肽,所述单链多肽从N末端到C末端包含:

- (1) 结合FZD4的VH,
- (2) 包含CH3的Fc区或Fc区的片段,
- (3) 包含结合LRP5的VH和结合LRP5的VL的肽,以及
- (4) 重链恒定结构域1 (CH1),

其中:

(5) 结合LRP5的VH包含表3或表6中的序列中所示的抗体的重链CDR (CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3),

(b) 结合LRP5的VL包含表3或表6中的序列中所示的抗体的轻链CDR (CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),

(c) 结合FZD4的VH包含表1、表2或表6中的序列中所示的抗体的重链CDR (CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3);以及

(d) 第三轻链单体和第四轻链单体,所述第三轻链单体和第四轻链单体各自从N末端至C末端包含结合FZD4的VL和轻链恒定结构域1 (CL1),所述结合FZD4的VL包含表1、表2或表6中的序列中所示的抗体的轻链CDR (CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),

其中,第一重链单体和第二重链单体通过它们的Fc区二聚化,第一单体的结合LRP5的VL和VH与第二单体的结合LRP5的VH和VL配对形成结合LRP5的二价双抗体,并且

第三轻链单体和第四轻链单体的CL1和结合FZD4的VL与第一重链单体和第二重链单体的CH1和结合FZD4的VH配对形成结合FZD4的两个Fab,其中,双抗体形成C末端二价LRP5结合结构域,两个Fab形成N末端二价FZD4结合结构域。

30. 根据权利要求28或29所述的四价结合抗体分子,其中,所述LRP5结合双抗体是双特异性的,其中:

第一重链单体的结合LRP5的VH的CDR和第二重链单体的结合LRP5的VH的CDR不相同,以及

第一重链单体的结合LRP5的VL的CDR和第二重链单体的结合LRP5的VL的CDR不相同。

31. 根据权利要求30所述的四价结合抗体分子,其中:

在所述第一重链单体中，

(a) 结合LRP5的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含FSSSSI (SEQ ID NO:528) 和SISSSYGYTY (SEQ ID NO:553)，或者，结合LRP5的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含LSYYM (SEQ ID NO:527) 和SIYSSYGYTY (SEQ ID NO:552)，并且

(b) 结合LRP5的VL的CDR-L2和CDR-L3分别包含SASDLYS (SEQ ID NO:491) 和YAGAGLI (SEQ ID NO:510)，或者，结合LRP5的VL的CDR-L2和CDR-L3分别包含SASSLYS (SEQ ID NO:2) 和SSYSLI (SEQ ID NO:130)；以及

在所述第二重链单体中，

(c) 结合LRP5的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含FTAYAM (SEQ ID NO:536) 和SIYPSGGYTA (SEQ ID NO:566)，或者，结合LRP5的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含FSSSSI (SEQ ID NO:528) 和SISSSYGYTY (SEQ ID NO:553)，并且

(d) 结合LRP5的VL的CDR-L2和CDR-L3分别包含SASSLYS (SEQ ID NO:2) 和YWAYYSPI (SEQ ID NO:493)，或者，结合LRP5的VL的CDR-L2和CDR-L3分别包含SASSLYS (SEQ ID NO:2) 和ASYAPI (SEQ ID NO:492)。

32. 根据权利要求28至31中任一项所述的四价结合抗体分子，其中，在所述第一重链单体和第二重链单体中，结合FZD4的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含LSSYSM (SEQ ID NO:24) 和YISSYGYTY (SEQ ID NO:51)，或者，结合FZD4的VH的CDR-H1和CDR-H2分别包含LSSYSM (SEQ ID NO:24) 和YISSYDSITD (SEQ ID NO:61)。

33. 根据权利要求28至32中任一项所述的四价结合抗体分子，其中，在所述第三轻链单体和第四轻链单体中，结合FZD4的VL的CDR-L1和CDR-L2分别包含SVSSA (SEQ ID NO:1) 和SASSLYS (SEQ ID NO:2)，结合FZD4的VL的CDR-L3包含WYYAPI (SEQ ID NO:3) 或WYNAPI (SEQ ID NO:12)。

34. 根据权利要求28、29、30、32和33中任一项所述的四价结合抗体分子，所述四价结合抗体分子包含二价双特异性LRP5结合结构域，其中：

(a) 在所述第一重链单体中，

结合LRP-5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:586的CDR-H3，结合LRP-5的VL包含表6A的ANT16-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:491的CDR-L2和SEQ ID NO:510的CDR-L3，或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:527的CDR-H1、SEQ ID NO:552的CDR-H2和SEQ ID NO:584的CDR-H3，结合LRP5的VL包含表6A的ANT18-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:130的CDR-L3，或者

结合LRP-5的VH包含SEQ ID NO:527的CDR-H1、SEQ ID NO:552的CDR-H2和SEQ ID NO:584的CDR-H3，结合LRP-5的VL包含表6A的ANT20-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:491的CDR-L2和SEQ ID NO:510的CDR-L3，或者

结合LRP-5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:586的CDR-H3，结合LRP-5的VL包含表6A的ANT21-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:130的CDR-L3，或者

结合LRP-5的VH包含SEQ ID NO:527的CDR-H1、SEQ ID NO:552的CDR-H2和SEQ ID NO:584的CDR-H3，结合LRP-5的VL包含表6A的ANT36-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2

的CDR-L2和SEQ ID NO:130的CDR-L3,或者

结合LRP-5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:586的CDR-H3,结合LRP-5的VL包含表6A的ANT39-白的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:491的CDR-L2和SEQ ID NO:510的CDR-L3,

以及

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT16-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT18-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT20-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT21-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3,或者

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT36-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:61的CDR-H2和SEQ ID NO:90的CDR-H3,或者

结合FZD4的VH包含如下FZD4 VH CDR:表6B的ANT39-白的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:61的CDR-H2和SEQ ID NO:90的CDR-H3,

其中,FZD CDR-L1和CDR-L2分别为SVSSA(SEQ ID NO:1)和SASSLYS(SEQ ID NO:2);以及

(b)在第二单体中,

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:536的CDR-H1、SEQ ID NO:566的CDR-H2和SEQ ID NO:603的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT16-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:493的CDR-L3,或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:585的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT18-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:492的CDR-L3,或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:536的CDR-H1、SEQ ID NO:566的CDR-H2和SEQ ID NO:603的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT20-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:492的CDR-L3,或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:585的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT21-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:493的CDR-L3,或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:528的CDR-H1、SEQ ID NO:553的CDR-H2和SEQ ID NO:585的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT36-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:492的CDR-L3,或者

结合LRP5的VH包含SEQ ID NO:536的CDR-H1、SEQ ID NO:566的CDR-H2和SEQ ID NO:603的CDR-H3,结合LRP5的VL包含表6A的ANT39-杵的SEQ ID NO:1的CDR-L1、SEQ ID NO:2的CDR-L2和SEQ ID NO:493的CDR-L3,

以及

结合FZD4的VH包含：

表6B的ANT16杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3，或者

表6B的ANT18杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3，或者

表6B的ANT20杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3，或者

表6B的ANT21杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:51的CDR-H2和SEQ ID NO:79的CDR-H3，或者

表6B的ANT36杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:61的CDR-H2和SEQ ID NO:90的CDR-H3，或者

表6B的ANT39杵的FZD4 Fab的SEQ ID NO:24的CDR-H1、SEQ ID NO:61的CDR-H2和SEQ ID NO:90的CDR-H3；

以及

(c) 在第三单体和第四单体中的每一个中，

VL包含表6B的ANT16-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:3的CDR-L3，或者

VL包含表6B的ANT18-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:3的CDR-L3，或者

VL包含表6B的ANT20-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:3的CDR-L3，或者

VL包含表6B的ANT21-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:3的CDR-L3，或者

VL包含表6B的ANT36-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:12的CDR-L3，或者

VL包含表6B的ANT39-杵的FZD4 Fab的CDR-L1、CDR-L2和SEQ ID NO:12的CDR-L3，

其中，FZD4 Fab的CDR-L1包含SVSSA (SEQ ID NO:1)，FZD4 Fab的CDR-L2包含SASSLYS (SEQ ID NO:2)。

35. 根据权利要求1至34中任一项所述的四价结合抗体分子，其中，所述四价结合抗体分子不包含如下FZD结合结构域：所述FZD结合结构域与包含LRP6结合抗体2542和/或抗体2539的CDR的Wnt共受体结合结构域组合，并且包含FZD结合抗体5044的CDR。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的四价结合抗体分子，其中，所述四价结合抗体分子包含：

(a) 包含SEQ ID NO:898的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链、包含SEQ ID NO:897的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链以及包含SEQ ID NO:899的轻链构建体的氨基酸序列的轻链，其中，CDR的氨基酸序列为ANT16的CDR的氨基酸序列；或者

(b) 包含SEQ ID NO:901的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链、包含SEQ ID NO:900的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链以及包含SEQ ID NO:902的轻链构建体的氨基酸序列的轻链，其中，CDR的氨基酸序列为ANT18的CDR的氨基酸序列；或者

(c) 包含SEQ ID NO:904的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链、包含SEQ ID NO:903的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链以及包含SEQ ID NO:902的轻链构建体的氨基酸序列的轻链，其中，CDR的氨基酸序列为ANT20的CDR的氨基酸序列；或者

(d) 包含SEQ ID NO:906的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链、包含SEQ ID NO:905的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链以及包含SEQ ID NO:902的轻链构建体的氨

基酸序列的轻链,其中,CDR的氨基酸序列为ANT21的CDR的氨基酸序列;或者

(e) 包含SEQ ID NO:908的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链、包含SEQ ID NO:907的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链以及包含SEQ ID NO:909的轻链构建体的氨基酸序列的轻链,其中,CDR的氨基酸序列为ANT39的CDR的氨基酸序列;或者

(f) 包含选自如下的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链:SEQ ID NO:921、SEQ ID NO:922、SEQ ID NO:923、SEQ ID NO:924、SEQ ID NO:925、SEQ ID NO:926、SEQ ID NO:927和SEQ ID NO:928;包含选自如下的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链:SEQ ID NO:929、SEQ ID NO:930、SEQ ID NO:931、SEQ ID NO:932、SEQ ID NO:933、SEQ ID NO:934、SEQ ID NO:935和SEQ ID NO:936;以及包含选自SEQ ID NO:909和SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链。

37. 根据权利要求1至35中任一项所述的四价结合抗体分子,其中,所述四价结合抗体分子包含:

a) 包含SEQ ID NO:921或SEQ ID NO:925的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:929或SEQ ID NO:933的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

b) 包含SEQ ID NO:922或SEQ ID NO:926的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:930或SEQ ID NO:934的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

c) 包含SEQ ID NO:923或SEQ ID NO:927的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:931或SEQ ID NO:935的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

d) 包含SEQ ID NO:924或SEQ ID NO:928的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:932或SEQ ID NO:936的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

e) 包含SEQ ID NO:908或SEQ ID NO:940的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:944或SEQ ID NO:948的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

f) 包含SEQ ID NO:937或SEQ ID NO:941的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:945或SEQ ID NO:949的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

g) 包含SEQ ID NO:938或SEQ ID NO:942的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:946或SEQ ID NO:950的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链;或者

h) 包含SEQ ID NO:939或SEQ ID NO:943的白重链构建体的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:947或SEQ ID NO:951的杵重链构建体的氨基酸序列的第二重链,以及包含SEQ ID NO:909或SEQ ID NO:952的轻链构建体的氨基酸序列的轻链。

38. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子和药学上可接受的媒介物。

39. 一种用于促进组织中的内皮细胞屏障功能的方法,所述方法包括向组织施用有效

量的权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中,所述组织为脑组织、肾组织或眼组织。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中,所述四价结合抗体分子通过玻璃体内注射施用于眼组织。

42. 一种在有需要的受试者中增加视网膜或脑内皮细胞屏障功能、降低内皮细胞通透性、增强或恢复血视网膜屏障和血脑屏障维持的方法,所述方法包括使有需要的受试者中具有FZD4受体和LRP5的内皮细胞与有效量的权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子接触。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述四价结合抗体分子通过注射、局部或口服施用于有需要的受试者。

44. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述四价结合抗体分子通过皮下、静脉内、腹膜内、鞘内、玻璃体内或眼内施用。

45. 作为药物应用的权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子或权利要求38所述的药物组合物。

46. 根据权利要求45所述的四价结合抗体分子或药物组合物在治疗或预防病症或病况中的应用,所述病症或病况的特征在于视网膜或脑血管生成缺陷,和/或所述病症或病况的特征在于内皮细胞屏障功能降低和/或血管渗漏。

47. 一种治疗或预防病症或病况的方法,所述病症或病况的特征在于视网膜或脑血管生成缺陷和/或内皮细胞屏障功能降低和/或血管渗漏,所述方法包括向有需要的人施用治疗有效量的权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子或权利要求38所述的药物组合物。

48. 权利要求1至37所述的四价结合抗体分子或权利要求38所述的药物组合物在制备用于治疗或预防病症或病况的药物中的应用,所述病症或病况的特征在于视网膜或脑血管生成缺陷和/或内皮细胞屏障功能降低和/或血管渗漏。

49. 用于权利要求46至48中任一项所述的应用、方法或应用的四价结合抗体分子或药物组合物,其中,所述病症选自:糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、Coats病、FEVR、诺里病、黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、儿童玻璃体视网膜病、阿尔茨海默氏病、癫痫、多发性硬化症、中风和局部缺血。

50. 根据权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子或根据权利要求37所述的药物组合物,所述四价结合抗体分子或药物组合物用于治疗或预防眼部病症,例如视网膜或黄斑疾病,例如选自糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、Coats病、FEVR、诺里病、黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿和儿童玻璃体视网膜病,或者用于治疗或预防选自如下的病症:阿尔茨海默氏病、癫痫、多发性硬化症、中风和局部缺血。

51. 一种治疗或预防眼部病症或者用于治疗或预防选自如下病症的方法:阿尔茨海默氏病、癫痫、多发性硬化症、中风和局部缺血,所述眼部病症为例如视网膜或黄斑疾病,例如选自糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、Coats病、FEVR、诺里病、黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿和儿童玻璃体视网膜病,所述方法包括向有需要的人施用治疗有效量的权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子或权利要求38所述的药物组合物。

52. 权利要求1至36所述的四价结合抗体分子或权利要求38所述的药物组合物在制备

药物中的应用,所述药物用于治疗或预防眼部病症,例如视网膜或黄斑疾病,例如选自糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、Coats病、FEVR、诺里病、黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿和儿童玻璃体视网膜病,或者用于治疗或预防选自如下的病症:阿尔茨海默氏病、癫痫、多发性硬化症、中风和局部缺血。

53. 核酸分子,所述核酸分子编码权利要求1至37中任一项所述的四价结合抗体分子的多肽。

54. 载体,所述载体包含权利要求53所述的核酸分子。

55. 根据权利要求54所述的载体,其中,所述载体是动物病毒,例如选自如下的病毒:逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、水痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳多空病毒。

56. 宿主细胞,所述宿主细胞表达权利要求54或55所述的载体。

57. 药物组合物,所述药物组合物包含权利要求53所述的核酸分子或权利要求54或55所述的载体,以及药学上可接受的媒介物、稀释剂或赋形剂。