

抗体及其药物偶联物和用途

技术领域

本发明涉及抗体以及抗体-药物偶联物，更具体地涉及靶向 TROP2 和/或 NECTIN4 的抗体及抗体-药物偶联物（ADC）以及含有所述抗体或 ADC 的组合物及其治疗应用。

背景技术

Trop2 (trophoblast cell-surface antigen 2, 人滋养层细胞表面糖蛋白抗原 2) 又称肿瘤相关钙信号转导子 2 (TACSTD2)、上皮糖蛋白 1 (EGP-1)、胃肠道抗原 733-1 (GA733-1)、膜表面标志物 1 (M1S1), 是由 TACSTD2 基因编码的 I 型细胞表面糖蛋白。Trop2 在人类癌症中高度表达, 其介导的信号通路主要通过调节钙离子信号通路、细胞周期蛋白表达及降低纤黏蛋白黏附作用来促进肿瘤细胞生长、增殖和转移。因此, Trop2 已成为癌症治疗的一个有吸引力的治疗靶点。但由于 Trop2 不仅在卵巢癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌等多种癌组织中表达, 也在乳腺、子宫颈、前列腺、皮肤、胃、胸腺等大量正常人组织中表达; 因此, 靶向 Trop2 的药物具有潜在的在靶毒性。比如皮肤、口腔黏膜受到药物的影响较大时, 容易出现口腔炎、皮疹等副作用。

目前已上市的 Trop2 ADC 药物仅有吉利德 Trodelvy® (sacituzumab govitecan; SG)。在 ASCENT 研究中, SG 引起的 3 级以上不良反应发生率达到 45%, 而且中性粒细胞减少和腹泻这两项副作用更是被 FDA 标上了黑框警告; 此外, 9% 的患者出现了皮疹、5% 的患者出现眼毒性。Datopotamab Deruxtecán (DS-1062, Dato-DXd) 是一款由第一三共和阿斯利康 (AstraZeneca) 共同开发的 TROP2 靶向 Dxd 抗体偶联药物 (ADC)。为控制毒性, Dato-DXd 使用了中等亲和力的靶向 Trop2 的单克隆抗体与毒性较低 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂 (DXd) 连接, 并将 DAR 值控制在 4。但在食蟹猴毒性实验中, 因为 Dxd 带来的肺毒性, Dato-DXd 的 HNSTD (最高无严重毒性剂量) 也仅为 10mg/kg, 低于 DAR 值为 8 的 DS-8201 在猴子毒理中 30mg/kg 的 HNSTD。

Nectin4 (Nectin cell adhesion molecule 4), 是属于 Nectin 家族的 I 型跨膜细胞粘附分子。该蛋白以前称为脊髓灰质炎病毒受体 (PVR/CD155) 的同系物, 也称为脊髓灰质炎病毒受体相关 (PRR) 蛋白。在生理发育过程中, Nectin4 在胚胎和胎儿发育过程中特异性表达, 在成年后组织中表达很低。它在相邻细胞之间形成物理连接, 对于实现细胞间通讯、迁移和其他重要细胞过程至关重要。Nectin4 在多种肿瘤细胞中过表达, 被作为癌症复发和转移的标志物, 与多种癌的预后不良有关, 所述癌症包括尿路上皮癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、胃癌、肝细胞癌和膀胱癌等。

与 HER2、EGFR、Trop2 等热门靶点相比, 目前针对 Nectin4 的靶向药较少, 全球仅有一款 ADC 产品 Padcev® 上市。Padcev® (Enfortumab Vedotin; EV) 是 Seagen 和安斯泰来联合开发的“first-in-class”新药, 但由于 Nectin4 在正常皮肤组织中有一定表达, Padcev 带有严重皮肤毒性的黑框警告。

纳米抗体是由单一链的抗体分子组成的小型蛋白质, 具有高度特异性和亲和力, 与传统抗体相比具有更小的体积、更高的稳定性和更深的组织穿透性。这使得它们在肿瘤治疗中具有巨大的潜力, 可以通过识别并针对肿瘤细胞表面上的特定抗原进行精准的治疗, 并能突破进入常规抗体不能到达的深层肿瘤组织。纳米抗体可以被设计成能够递送药物或放射性同位素到肿瘤细胞中, 以达到杀灭肿瘤细胞的效果。此外, 它们还可以用于光动力疗法、免疫检测等多种其他治疗方式。因此, 纳米抗体在肿瘤治疗领域中的应用正在受到广泛关注, 并有望成为未来肿瘤治疗的重要手段之一 (Bannas, Hambach, and Koch-Nolte 2017)。

基于抗体的药物已经促进了癌症治疗领域的进展, 但许多基于抗体的药物在安全性和功效上仍不甚理想。抗癌药物面临的一个主要挑战仍是药物的选择性, 即, 在保证药物有效攻击癌症的同时, 最大限度地减少药物对正常细胞的附带损害。为了克服单靶向药物在此方面的局限性, 提出了将靶向不同靶标的多种单克隆抗体相结合的策略。然而, 已经发表的有关不同 mAb 联合疗法的研究表明, 取决于不同靶点组合等因素, 联用效果之间的差异很大。例如, 曲妥珠单抗 (抗 HER2) 和贝伐单抗 (抗 VEGF-A) 的同时注

射在 HER2 +转移性乳腺癌中显示出令人鼓舞的结果；但是，贝伐单抗联合西妥昔单抗(抗 EGFR)治疗晚期大肠癌，并未导致有利的结果。参见，例如，Maruani A 等，Bispecifics and antibody-drug conjugates: A positive synergy. *Drug Discov Today Technol.* 2018 Dec;30:55-61.

因此，本领域仍然亟需具有改善的肿瘤特异性和选择性的新药物分子，以降低在靶毒性，提高用药窗口和扩大治疗指数。

发明概述

通过对临床病理样本的免疫组化及生物信息学数据的分析(参见，例如，*Annals of Oncology* 28: 769–776, 2017; doi:10.1093/annonc/mdw678; 以及 *Front. Oncol.* 12:858865. doi: 10.3389/fonc.2022.858865)，发现 Trop2 和 Nectin4 蛋白在很多肿瘤组织或细胞中呈现共表达模式，比如尿路上皮癌、乳腺癌、宫颈鳞状上皮癌、肺癌、头颈癌和甲状腺癌等，而在正常组织中共表达比例较低。因此本发明人提出并设计了同时靶向 Trop2 和 Nectin4 的抗体分子来降低 2 个靶点的在靶毒性并提高疗效。在此基础上，本发明人进一步提出了基于纳米抗体的创新抗体模式，使得最终的抗体分子量仅为常规四链抗体分子量的 60%左右，由此实现了抗体分子在肿瘤组织中的更高比例的富集，从而进一步提高了疗效。基于这些设计和发现，本发明人建立了本发明的多特异性抗体及其药物偶联分子和用途，尤其是在癌症治疗中的用途。

因此，在第一方面，本发明提供了一种结合 Trop2 和 Nectin4 的多特异性抗体、及其药物组合物和用途，其中所述抗体包含至少一个特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域和至少一个特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域。

在第二方面，本发明提供了一种抗 Trop2 VHH 结构域和抗 Trop2 抗体以及一种抗 Nectin4 VHH 结构域和抗 Nectin4 抗体、及包含其的抗原结合分子、免疫缀合物、免疫融合物、及其药物组合物和用途。

在第三方面，本发明提供了一种包含本发明抗体的抗体药物偶联分子(ADC)、及其药物组合物和用途。

在一些实施方案中，本发明的抗体和抗体-药物偶联物具有以下一项或多项优点：

- (1) 结合表达人 Nectin4 和/或 Trop2 的靶细胞，与其具有高亲和力；
- (2) 协同结合表达人 Nectin4 和 Trop2 的靶细胞；
- (3) 在表达人 Nectin4 和 Trop2 的靶细胞上的协同内吞作用；
- (4) 在表达人 Nectin4 和 Trop2 的靶细胞上的协同杀伤作用；
- (5) 具有显著的旁杀者效应；
- (6) 具有高的抗肿瘤药效，对肿瘤细胞有更强的杀伤作用，对肿瘤的生长有更强的抑制作用，尤其是 Nectin4 和/或 Trop2 高表达的肿瘤；具有显著提高甚至出乎预料的抗肿瘤活性。

在一些实施方案中，本发明的抗体和抗体-药物偶联物还具有以下一项或多项优点：

- (7) 相比 Nectin4 和 Trop2 单靶点药物，抵抗肿瘤耐药性出现的能力增强；
- (8) 抵抗因 Nectin4 或 Trop2 抗原表位突变引起的肿瘤耐药性；
- (9) 对耐受 Nectin4 和 Trop2 单靶点药物的肿瘤细胞(例如，表达高水平的多药耐药蛋白 MDR1 的肿瘤细胞)，具有抑瘤活性；以及
- (10) 相比 Nectin4 或 Trop2 单靶点药物，改善的肿瘤靶向性分布。

在一些实施方案中，所述单靶点药物为参照抗体 Datopotamab、参照抗体 Enfortumab 或其相应的 ADC 药物。

在一些实施方案中，本发明的抗体-药物偶联物还具有以下一项或多项优点：

- (11) 具有更好的产品均一性。
- (12) 具有低毒性；
- (13) 具有良好的物理化学稳定性和；
- (14) 具有良好的成药性。

在下面的附图和具体实施方案中进一步说明本发明。然而，这些附图和具体实施方案不应被认为限制本发明的范围，并且本领域技术人员容易想到的改变将包括在本发明的精神和所附权利要求的保护范围内。

附图简述

图 1A 显示，示例性抗 Trop2 VHH-Fc 在 BT-474 细胞上的内吞检测。

图 1B 显示，示例性抗 Trop2 VHH-Fc 在 NCI-N87 细胞上的内吞检测。

图 2A 显示，示例性抗 Nectin4 VHH-Fc 在 BT474 细胞上的内吞检测。

图 2B 显示，示例性抗 Nectin4 VHH-Fc 在 NCI-N87 细胞上的内吞检测。

图 3 显示，示例性抗 Trop2 VHH-Fc 与 NCI-N87 细胞结合情况。

图 4A 显示，示例性抗 Nectin4 VHH-Fc 抗体与 NCI-N87 细胞的结合情况。

图 4B 显示，示例性抗 Nectin4 VHH-Fc 抗体与 BT474 细胞的结合情况。

图 5A 显示，示例性抗 Nectin4 VHH-His 抗体与 CHO-K1-Human Nectin4 细胞结合情况。

图 5B 显示，示例性抗 Nectin4 VHH-His 抗体与 CHO-K1-Cyno Nectin4 细胞结合情况。

图 5C 显示，示例性抗 Nectin4 VHH-His 抗体与 CHO-K1 细胞非特异结合情况。

图 6 显示，各种靶细胞上的 Trop2 抗原和 Nectin4 抗原表达情况。

图 7A 显示，示例性抗体 V-hu21-Fc 对旁系同源物 Nectin1、2、3 和 Trop1 抗原无特异性结合。

图 7B 显示，示例性抗体 V-hu23-Fc 对旁系同源物 Nectin1、2 和 3 抗原无特异性结合与靶抗原 Nectin4 有特异结合。

图 7C 显示，示例性抗体 V-hu23-Fc 对旁系同源物 Trop1 抗原无特异性结合与靶抗原 Trop2 有特异结合。

图 8A 显示，示例性单链形式的双特异性抗体与 NCI-N87 细胞的结合。

图 8B 显示，示例性双链形式的双特异性抗体与 NCI-N87 细胞的结合。

图 9A 显示，示例性单链形式的双特异性抗体与 BT-474 细胞的结合。

图 9B 显示，示例性双链形式的双特异性抗体与 BT-474 细胞的结合。

图 10A 显示，示例性双链形式的双特异性抗体与 MDA-MB-468 细胞的结合。

图 10B 显示，示例性双链形式的双特异性抗体与 NCI-N87 细胞的结合。

图 10C 显示，示例性双链形式的双特异性抗体与 BT-474 细胞的结合。

图 11 显示，示例性抗体 V-hu21-Fc 与不同肿瘤细胞的结合情况。

图 12 显示, 示例性抗体 V-hu23-Fc 与不同肿瘤细胞的结合情况。

图 13A 显示, BT-474 细胞对示例性双特异性抗 Trop2/Nectin4 抗体分子的内吞结果。

图 13B 显示, BT-474 细胞对示例性双特异性抗 Trop2/Nectin4 抗体分子的内吞结果。

图 13C 显示, NCI-N87 细胞对示例性双特异性抗 Trop2/Nectin4 抗体分子的内吞结果。

图 13D 显示, NCI-N87 细胞对示例性双特异性抗 Trop2/Nectin4 抗体分子的内吞结果。

图 13E 显示, 不同靶细胞对示例性双特异性抗体 V-hu21-Fc 和 V-hu23-Fc 分子的内吞结果。

图 14A-E 显示, ADC 与相应双特异抗体的细胞结合能力比较。

图 15A 显示, V-hu21-VA-Exd 对靶细胞 MDA-MB-468 靶向杀伤。

图 15B 显示, V-hu21-VA-Exd 对非靶细胞 MKN45 细胞的杀伤情况。

图 15C 显示, V-hu21-VA-Exd、V-hu23-VA-Exd 和 V-hu24-VA-Exd 对靶细胞 MDA-MB-468 杀伤情况。

图 15D 显示, V-hu23-Glu-Exd 和 V-hu24-Glu-Exd 对靶细胞 MDA-MB-468 细胞的杀伤情况。

图 15E 显示, 抗体的 anti-Trop2 结合位点与 anti-Nectin4 结合位点对双阳性 NCI-H292 肿瘤细胞的协同杀伤作用。

图 16A 显示, V-hu21-VA-Exd 的旁观者效应。

图 16B 显示, V-hu23-Glu-Exd 的旁观者效应。

图 17 显示, ADCs 多次给药在小鼠 MDA-MB-468 皮下移植模型中的药效。

图 18 显示, ADCs 单次给药在小鼠 MDA-MB-468 皮下移植模型中的药效。

图 19 显示, ADCs 多次给药在小鼠 HT1376 皮下移植模型中的药效。

图 20 显示, ADCs 单次给药在小鼠 HT1197 皮下移植模型中的药效。

图 21 显示, ADCs 单次给药在 MDA-MB-453 皮下移植模型中的药效。

图 22 显示 ADC 多次给药在人源性头颈癌体内移植瘤模型中的药效。

图 23 显示 ADC 单次给药在人源性子宫内膜癌体内移植瘤模型中的药效。

图 24 显示 ADC 单次给药在人源性宫颈癌体内移植瘤模型中的药效。

图 25 显示 ADC 两次给药在鼠源性结肠癌体内移植瘤模型中的药效。

图 26 显示, 通过生物信息学分析揭示的 Trop2 与 Nectin4 在多种肿瘤中的共表达情况。图中, 使用 TPM (Transcripts Per Million) 来量化基因表达水平, 显示了 Trop2 与 Nectin4 在不同类型的肿瘤组织中的表达丰度。图 26A 显示按照患者人群 TPM 中位数呈 Trop2 与 Nectin4 双阳性表达的示例性肿瘤类型。图 26B 显示, 在特定肿瘤类型的患者群体中观察到的 Trop2 与 Nectin4 表达分布情况。

图 27 显示双特异抗体在小鼠人源性 HT1376 移植瘤模型中的生物分布。图 27A: 通过肿瘤与背景的荧光比率, 来定量抗体的肿瘤蓄积量随时间的变化。图 27B: 在注射荧光标记的抗体蛋白后 72 小时, 通过肿瘤与肌肉的荧光比率, 来评估抗体在器官组织中的分布。

发明详述

除非另外限定，否则本文中使用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入。此外，本文中所述的材料、方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从后附的权利要求书中显而易见。

定义

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

如本文所用，术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项。

在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

在本文中，术语“抗原结合分子”是指包含能够与靶抗原结合的抗原结合结构域或抗原结合位点的蛋白质或多肽。当靶抗原是 TROP2 和/或 NECTIN4 时，结合 TROP2 和/或 NECTIN4 的抗原结合分子也称作 TROP2 结合分子、NECTIN4 结合分子或 TROP2/NECTIN4 结合分子。抗原结合分子包括例如抗体及其抗原结合片段、以及基于抗体或抗原结合片段构建的各种融合物，例如 VHH-Fc 抗体、多/双特异性抗体、嵌合抗原受体(CAR)。如本领域技术人员明了的，抗体的抗原结合位点通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。

在本文中，术语“抗体”是指，至少包含轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽，所述免疫球蛋白可变区特异性识别并结合抗原。该术语涵盖各种抗体结构，包括、但不限于单克隆抗体、单链抗体或多链抗体、单特异性或多特异性抗体（例如双特异性抗体）、单域抗体、重链抗体、嵌合抗体或人源化抗体、完整抗体和抗体片段，只要它们呈现期望的抗原结合活性即可。

在本文中，“完整抗体”是指包含至少两条重链(H)和两条轻链(L)的免疫球蛋白分子。每条重链由重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成。

在本文中，术语“抗体片段”与“抗原结合片段”可互换使用，是指与完整抗体不同的分子，其包含完整抗体的一部分且能够结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体(例如 scFv); 单结构域抗体; 骆驼科抗体(重链抗体)或其片段(例如 VHH); 和由抗体片段形成的单特异性、双特异性抗体或多特异性抗体。除非本文中另有说明或明确与上下文相悖，否则本文中提及术语“抗体”等同于“抗体或其抗体片段”。在根据本发明的一些实施方案中，抗体片段包含用于在重链与重链之间形成链间二硫键的半胱氨酸残基部分，例如，抗体较链区的半胱氨酸残基，以提供可用于巯基偶联化学的氨基酸残基位点。在根据本发明的另一些实施方案中，抗体片段包含引入 Fc 区的半胱氨酸残基，以提供可用于巯基偶联化学的氨基酸残基位点。

在本文中，术语“抗原结合位点”与“抗原结合结构域”可以互换使用，表示抗体分子中与抗原实际结合的区域。用于本发明抗体的抗原结合位点优选由来自重链抗体的可变结构域(即，“VHH”)提供。

在本文中，术语“多特异性”指具有至少两个分别与不同抗原表位结合的抗原结合位点的抗原结合分子(例如抗体)，例如，与不同抗原上的不同表位和/或同一抗原上的不同表位结合。相应地，“单特异性”指仅结合一种表位的能力。“双特异性”指结合两种不同表位的能力。

在本文中，与抗体相关的表述“价”或“价数”是指，抗体分子中的抗原结合位点的总数，或具有相同抗原结合特异性的抗原结合位点的数目。例如，4 价抗体是指该抗体分子包含总共 4 个抗原结合位点；该抗

体分子可以是“2+2 价”型的双特异性抗体，即，所述抗体具有两种不同的抗原结合特异性，其中针对每一种抗原结合特异性，分别存在 2 个相同的抗原结合位点。

术语“在靶/脱肿瘤毒性(on-target/off tumor toxicity)”是指除肿瘤细胞外，正常组织细胞也表达被抗体靶向的肿瘤相关抗原，从而与抗体结合而导致损伤。

在本文中，术语“TROP2”与“Trop2”可互换使用，是指滋养层细胞表面糖蛋白抗原 2。除非另有说明，否则该术语包括人 Trop2 的任何变体，包括序列变体，尤其是天然存在的变体、等位基因变体，以及翻译后修饰变体和构象变体，并涵盖其物种同源物。此外，应理解，该术语不仅涵盖由细胞天然或重组表达的 TROP2 或在天然或重组细胞上表达的 TROP2，也涵盖重组表达的包含 TROP2 胞外域的融合蛋白。TROP2 的一个例子是包含 UniProtKB - P09758 下的氨基酸序列的人 TROP2 蛋白，或包含所述蛋白胞外域(尤其是，氨基酸 31-274 的氨基酸序列)的重组蛋白。TROP2 的另一个例子是包含 NCBI -XP_005543292.2 下的氨基酸序列的猴 TROP2 蛋白，或包含所述蛋白胞外域的重组蛋白。在本文中，在不特别指明的情况下，术语“TROP2”或“Trop2”是指来源于人的 Trop2。在本公开的实施方案中，“针对 Trop2 的抗原结合特异性”，也即，“特异性结合 TROP2 的抗原结合结构域”，优选地由 VHH 结构域提供。

在本文中，术语“TROP2 阳性”细胞是指，呈 TROP2 细胞表面表达阳性的细胞，例如癌细胞、经改造的癌细胞或经改造的非肿瘤细胞。可以通过本领域已知用于确定细胞表面抗原表达水平的任何常规方法，例如，FACS 检测方法或免疫荧光染色方法，确定细胞表面的 TROP2 表达水平。TROP2 在多种肿瘤细胞上具有显著高于正常组织/细胞上的表达水平，例如，HT1376(人膀胱癌细胞)和 MDA-MB-468(人乳腺癌细胞)。优选地，在本文中，TROP2 阳性细胞是 TROP2 阳性肿瘤细胞。

在本文中，术语“NECTIN4”与“Nectin4”和“Nectin4”可互换使用，是指 Nectin 细胞粘附分子 4。除非另有说明，否则该术语包括人 NECTIN4 的任何变体，包括序列变体，尤其是天然存在的变体、等位基因变体，以及翻译后修饰变体和构象变体，并涵盖其物种同源物。此外，应理解，该术语不仅涵盖由细胞天然或重组表达的 NECTIN4 或在天然或重组细胞上表达的 NECTIN4，也涵盖重组表达的包含 NECTIN4 胞外域的融合蛋白。NECTIN4 的一个例子是包含 UniProtKB-Q96NY8 下的氨基酸序列的人 NECTIN4 蛋白，或包含所述蛋白胞外域(尤其是，氨基酸 32-349 的氨基酸序列)的重组蛋白。NECTIN4 的另一个例子是包含 NCBI - XP_005541277.1 下的氨基酸序列的猴 NECTIN4 蛋白，或包含所述蛋白胞外域的重组蛋白。在本文中，在不特别指明的情况下，术语“NECTIN4”是指来源于人的 NECTIN4。在本公开的实施方案中，“针对 NECTIN4 的抗原结合特异性”，也即，“特异性结合 NECTIN4 的抗原结合结构域”，优选由 VHH 结构域提供。

在本文中，术语“NECTIN4 阳性”细胞是指，呈 NECTIN4 细胞表面表达阳性的细胞，例如癌细胞、经改造的癌细胞或经改造的非肿瘤细胞。可以通过本领域已知用于确定细胞表面抗原表达水平的任何常规方法，例如，FACS 检测方法或免疫荧光染色方法，确定细胞表面的 NECTIN4 表达水平。NECTIN4 在多种肿瘤细胞上具有显著高于正常组织/细胞上的表达水平，例如，HT1376(人膀胱癌细胞)和 BT474(人乳腺导管癌细胞)。优选地，NECTIN4 阳性细胞是 NECTIN4 阳性肿瘤细胞。

在本文中，术语“亲和力”(affinity)或“结合亲和力”是指一个分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原表位)之间全部非共价相互作用总和的强度。“结合亲和力”反映结合对的成员之间 1:1 相互作用的内在结合亲和力。结合亲和力通常可用结合解离平衡常数(K_D)来表述，并可以通过本领域已知的常用方法，例如表面等离子体共振(SPR)技术来测量。

在本文中，术语“亲合力”(avidity)或“结合亲合力”是指一个分子(抗体)的多个结合位点与相同靶标的相互作用的组合强度。因此，亲合力的一个必要条件是：分子(例如抗体)对一个靶标的多价性。

在本文中，术语“免疫球蛋白”指具有天然存在抗体的结构的蛋白质。例如，IgG 类免疫球蛋白是由二硫键键合的两条轻链和两条重链组成的约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白。从 N 端至 C 端，每条免疫球蛋白重链具有一个重链可变区(VH)，也称作重链可变结构域，随后是三个重链恒定结构域(CH1、CH2 和

CH3)。类似地，从N端至C端，每条免疫球蛋白轻链具有一个轻链可变区(VL)，也称作轻链可变结构域，随后是一个轻链恒定结构域(CL)。免疫球蛋白的重链可以基于其恒定区的类型，归属5个类别之一，称作 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)或 μ (IgM)，其中某些类别可以进一步划分成亚类，例如 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3)、 $\gamma 4$ (IgG4)、 $\alpha 1$ (IgA1)和 $\alpha 2$ (IgA2)。免疫球蛋白的轻链也可以基于其恒定结构域的氨基酸序列而划分成两种类型之一，称作 κ 和 λ 。

在本文中，术语“同种型”是指由抗体重链恒定区确定的抗体类型。例如，根据本发明的抗体可以是IgA(例如IgA1或IgA2)、IgG1、IgG2(例如IgG2a或IgG2b)、IgG3、IgG4、IgE、IgM和IgD抗体，并具有所述免疫球蛋白类型的重链恒定区。此外，本发明不仅考虑采用天然序列恒定区的抗体，也考虑包含变体序列恒定区的抗体。

在本文中，术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重或轻链的结构域。在重链抗体例如来自骆驼科重链抗体的情况下，单个VH结构域(在本文中，也称作VHH结构域)可以足以给予抗原结合特异性。VHH结构域与常规IgG抗体的重链和轻链可变区一样，都包含四个保守的框架区(FR)和三个互补决定区(CDR)，并以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的顺序排列。在根据本发明的一些方面，可以对抗体的可变区中的一个或多个残基进行修饰，例如，对一个或多个CDR区和/或对一个或多个框架区进行残基修改，尤其是保守残基取代，以获得仍基本上保持亲本抗体的至少一个生物学特性(例如，抗原结合能力)的抗体变体。在再一些方面，可以通过CDR移植，修饰抗体可变区。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用，故可以构建模拟已知抗体的性质的重组抗体变体。在此类抗体变体中，来自已知抗体的CDR序列被移植到具有不同性质的不同抗体的构架区上，并可以根据需要进行1至几个残基突变，例如回复突变以精细化抗体的期望性质。可以在体外或体内测定试验中评估突变和/修饰后的抗体或包含其的ADC偶联物的性质，例如靶抗原结合性质或其它期望的功能性质，例如内吞活性、药代动力学、和体内肿瘤杀伤活性。因此，本发明也考虑本文所给出的任何可变区(例如VHH)的变体。

在本文中，“互补决定区”或“CDR区”或“CDR”或“高变区”，是抗体可变结构域中在序列上高度可变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR主要负责与抗原表位结合。在本发明抗体的VHH结构域中，CDR从N-端开始顺序编号，通常称作CDR1、CDR2和CDR3。可以采用本领域公知的方案，确定一个确定的VHH结构域中的CDR序列，例如通过Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT方案来定义CDR的区域范围及其组合范围。除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR序列”涵盖以所述的任一种方式及其组合确定的CDR序列。此外，本领域知晓，尽管CDR在抗体与抗体之间是不同的，但是CDR内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用Kabat、Chothia、AbM和Contact方法中的至少两种，可以确定最小重叠区域，从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。这样的最小结合单位可以是CDR的一个子部分。而CDR序列其余部分的残基，正如本领域技术人员明了，可以通过抗体的结构和蛋白折叠予以确定。因此，本发明也考虑本文所给出的任何CDR的变体。例如，在一个CDR的变体中，最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变，而其余CDR残基可以被替代。

除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区和CDR中的残基位置(包括重链可变区残基)时，是指根据Kabat编号系统的编号位置。

在本文中，术语“VHH”与“VHH结构域”可互换使用，用于指从缺乏轻链的重链抗体衍生的重链可变结构域，有时也称作单可变域片段(sVD)。因此，VHH与四链免疫球蛋白的常规VH不同，其无需与轻链可变结构域配对来形成抗原结合位点。这种VHH分子可以衍生自骆驼科物种(例如骆驼、羊驼、单峰驼、鸵羊和原驼)中产生的抗体。除骆驼科之外的其他物种也可以产生天然缺乏轻链的重链抗体，这类VHH也处于本发明的范围内。在一些情况下，对于抗体或其衍生分子的治疗应用，期望的是降低其免疫原性。因此，优选地，在一个实施方案中，本发明的抗体包含人源化的可变区(例如VHH结构域)。

在本文中，术语“半衰期延长结构域”是指能够赋予与之结合的分子(例如抗体)在施用于动物后增加的循环半衰期的化学结构。这样的化学结构包括，例如，柔性亲水分子(例如，碳水化合物或PEG(聚乙二醇))、免疫球蛋白Fc区、血清白蛋白、血清白蛋白结合结构域(例如，能够与血清白蛋白结合的小有机

分子、脂肪酸、肽和蛋白质) 或血清白蛋白结合性肽。半衰期延长结构域可以根据其具体性质, 通过化学缀合或融合与本发明的抗体连接。优选地, 用于本发明的半衰期延长结构域为肽或多肽类结构。

在本文中, “血清白蛋白结合性肽”是指能够与血清白蛋白结合从而起到半衰期延长结构域作用的肽或多肽。这样的肽或多肽的实例包括但不限于, 由抗血清白蛋白抗体衍生的片段, 如 Fab、单链 Fab, scFv、单可变域片段(sVD)、VHH, 以及细菌白蛋白结合性结构域和肽, 如来自链球菌 G 蛋白(*Streptococcal Protein G*, 简称 SPG)的白蛋白结合性结构域。这样的肽或多肽可以通过遗传融合而连接到本发明抗体分子上, 从而避免了化学偶联部分。参见例如, Expert Opin Biol Ther. 2016 Jul;16(7):903-15. doi: 10.1517/14712598.2016.1165661。

在本文中, 术语“免疫球蛋白 Fc 区”, 与“Fc 区”和“Fc 结构域”在本文中可互换使用, 用来定义免疫球蛋白重链的 C 端区域, 所述区域包含至少一部分的恒定区。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。可用于本发明抗体中的 Fc 区, 包括但不限于, 具有天然序列或变体序列的 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 的 Fc 区。除非本文中另外说明, 否则 Fc 区或重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如 Kabat 等人, SEquences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述的 EU 编号体系(也称作 EU 索引)进行编号。在本文中, 术语“Fc 区”或“Fc 结构域”不包括免疫球蛋白的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 以及重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL; 但可以包含 CH2 结构域和 CH3 结构域, 以及包含或不包含免疫球蛋白铰链区。例如, 在一些实例中, Fc 区可以从 N 末端到 C 末端包含 CH2 结构域和 CH3 结构域或由所述 CH2 结构域和 CH3 结构域组成。在另一些实例中, Fc 区可以从 N 末端到 C 末端包含免疫球蛋白铰链区或部分免疫球蛋白铰链区、CH2 结构域和 CH3 结构域或由所述免疫球蛋白铰链区或部分铰链区、CH2 结构域和 CH3 结构域组成。

在本文中, 术语“天然序列 Fc 区”涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 区序列, 例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区序列(Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.)。在一些实施方案中, 人 IgG 重链 Fc 区具有自 Cys226 或自 Pro230 延伸至重链羧基端的氨基酸序列。然而, Fc 区的 C 末端端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。在一些实施方案中, 人 IgG 重链 Fc 区在 N 端带有天然免疫球蛋白的铰链序列或部分铰链序列, 例如根据 EU 编号, E216 到 T225 的序列或 D221 到 T225 的序列。

在本文中, 术语“变体序列 Fc 区”是指, 相对于天然序列 Fc 区多肽包含修饰的 Fc 区多肽。所述的修饰可以是氨基酸残基的添加, 缺失或取代。取代可以包括天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸。修饰的目的可以是旨在改变由 Fc 区与其受体的结合及其由此引发的效应子功能, 或修饰的目的可以是旨在防止不期望的重链错配, 或者旨在定点引入可以用于缀合其他活性分子的氨基酸修饰。

在本文中, 术语“效应子功能”指随免疫球蛋白同种型变动的归因于免疫球蛋白 Fc 区的那些生物学活性。免疫球蛋白效应子功能的例子包括: Fc 受体结合作用、C1q 结合和补体依赖的细胞毒性(CDC)、和抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。根据抗体分子的预期用途, 可以修饰抗体的 Fc 区, 从而相对于具有野生型 Fc 区的抗体分子, 使其具有改变的效应子功能, 例如降低或消除的 Fcγ 受体结合等。

在本文中, 术语“柔性连接肽”或“肽接头”或“连接肽”可互换使用, 是指由氨基酸组成的短氨基酸序列, 例如单独或组合使用的甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T), 或来自免疫球蛋白的铰链区。

在本文中, 氨基酸序列的“同一性百分数(%)”是指将候选序列与本说明书中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后, 并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分时, 候选序列中与本说明书中所示的具体氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分数。在一些实施方案中, 本发明考虑本发明抗体分子的变体, 所述变体相对于在本文中具体公开的抗体分子及其序列而言具有相当程度的同一性, 例如同一性为至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%或 99%或更高。所述变体可以包含保守性修饰。

对于多肽序列，“保守性修饰”包括对多肽序列的置换、缺失或添加，它们导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。以下 8 组含有互为保守替换的氨基酸：1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)；5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；和 8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参阅例如，Creighton, Proteins(1984))。在一些实施方案中，术语“保守序列修饰”尤其用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的期望性质(例如结合特征和/或内化特征)的氨基酸修饰。

在本文中，术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。抗原结合位点与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法测定，例如，通过实施例描述的 ELISA 测定法检测抗体与抗原的结合能力，或通过实施例描述的 FACS 测定法检测抗体与表面表达抗原的细胞的结合能力，或通过实施例描述的 SPR 技术检测亲和力和常数 K_D 。

在本文中，术语“表位”是指抗体特异性结合的抗原部分。表位可由形成构象空间单元的连续和/或不连续氨基酸构成。可以通过竞争结合试验，对结合相同抗原的不同抗体进行表位分组。当待测抗体在竞争结合试验中阻断参考抗体与抗原(例如 TROP2 或 NECTIN4)结合达到 50%或更多；以及相反地，在竞争结合试验中参考抗体阻断该抗体与抗原(例如 TROP2 或 NECTIN4)结合达到 50%或更多时，可以认为待测抗体与参考抗体为“竞争结合的抗体”。竞争结合的抗体可以与参考抗体结合相同的表位区，例如相同表位、相邻表位或重叠表位。竞争结合试验可以通过本领域已知的方法，例如固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定，或采用本文实施例中描述的方法进行。

在本文中，“人源化”抗体是指包含来自非人 CDR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的嵌合抗体。在一些实施方案中，人源化抗体中的所有或基本上所有的 CDR(例如，CDR)对应于非人抗体的那些，并且所有或基本上所有的 FR 对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。在本文中，在一些实施方案中，本发明的人源化抗体具有“来源于”特定的人种系序列的构架区序列。在此，“来源于”是指，所述抗体构架区的氨基酸序列与由所述人种系免疫球蛋白基因编码的相应构架区氨基酸序列具有至少 85%、90% 同一性，并且所述抗体保持抗原结合活性。

在本文中，如果氨基酸序列(例如 VHH)对两种不同的抗原或抗原决定簇(例如来自不同哺乳动物物种的 TROP2 或 NECTIN4，例如人 TROP2 或人 NECTIN4、食蟹猴 TROP2 或食蟹猴 NECTIN4)具有特异性，则称对这两种不同的抗原或抗原决定簇是“交叉反应性的”。抗体具有人猴物种交叉反应性，尤其是具有相近似的人猴抗原结合亲和力，将是有利的，该性质可以有助于抗体的临床前药物开发，例如由抗体构成的 ADC 分子的毒理检测。在一些实施方案中，本发明抗体优选具有人猴物种交叉反应性。

在本文中，术语“内吞”与“内化”可互换使用，是指由配体与细胞表面上的相应受体结合所触发的、配体/受体复合物被内化并递送到细胞溶质中或转移至合适的细胞内区室的过程。在一些实施方案中，本发明的抗体在与细胞表面表达的 TROP2 和/或 NECTIN4 结合后引发由 TROP2 和/或 NECTIN4 受体介导的内吞。在本文中，可以通过例如实施例所述的方法测定内吞和内吞率，表征抗体所具有的内吞活性。在一些实施方案中，具有内吞活性的本发明抗体可以用作在本发明的 ADC 中运载抗肿瘤药物进入癌细胞中的工具。

在本文中，术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞，包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生本发明抗体分子的任何类型的细胞系统，包括真核细胞，例如，哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞；和原核细胞，例如，大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞，也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。

在本文中，术语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体，其包含有效连接要表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件；用于表达的其它元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中。表达载体包括本领域已知的所有那些，包括被掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如，裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如，慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

在本文中，提及“协同内吞”、“协同结合”和“协同杀伤”时，表述“协同”是指，具有 TROP2 和 NECTIN4 双靶向结合位点的本发明抗体或基于其的 ADC 分子，相比具有相应的 TROP2 或 NECTIN4 单靶向结合位点的参照抗体(例如 TROP2 或 NECTIN4 的母本抗体)或基于其的 ADC 分子，在相同条件下测试时，具有增加的内吞作用、结合或杀伤效应。

在本文中，术语“免疫缀合物”或“免疫偶联物”通常指通过将一种或多种免疫球蛋白相关分子或其片段(例如抗体或其片段)与一种或多种其他分子缀合而形成的分子。免疫缀合物典型地包含至少一个非蛋白质性质的化学结构部分，例如，用于实现所述缀合的化学连接子。在一些情况下，所述其他分子可以是蛋白质性质的分子，例如肽、多肽或蛋白质。在一些情况下，所述其他分子也可以是非蛋白质性质的分子，例如，化学毒素。在一些情况下，所述其他分子可以同为免疫球蛋白相关分子或其片段。在一些情况下，其他分子可以不同于免疫球蛋白相关分子或其片段。所述一种或多种其他分子可以相同或彼此不同。例如，所述其他分子可以是靶标结合元件和/或效应子元件，诸如化疗剂，毒素，药物(如免疫治疗剂)，放射性元素，探针或信号分子等。

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

在本文中，术语“治疗”指意欲改变正在接受治疗的个体中疾病之天然过程的临床介入。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态，以及缓解或改善预后。涉及肿瘤或癌症治疗的情形下，“治疗”涵盖可以通过人为干预手段(例如，通过药物的施用)引起的抗肿瘤生物学效果，包括但不限于，例如，肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。

在本文中，术语“癌症”和“肿瘤”可互换使用，指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌，实体瘤和液体瘤。在某些实施方案中，适合于通过本发明的抗体或免疫缀合物或免疫融合物来治疗的癌症包括 TROP2 阳性和/或 NECTIN4 阳性的肿瘤/癌症，也包括其转移性形式。

如本文所用的，“抗体-药物偶联物(ADC)”是指通过连接子(Linker)连接抗体与(小分子)药物所得的化合物/分子。

术语“连接子”是指将药物(例如小分子药物)与抗体部分连接起来的结构片段。应当理解，连接子在连接至抗体或其抗原结合片段之前具有可与抗体或其抗原结合片段的官能团形成键的官能团。

术语“连接子-有效载荷(linker-payload)”是指有效载荷，例如药物(例如小分子药物)与连接子连接形成的化合物。

本文所述的术语“烷基”指完全饱和的支链的或无支链的烃基团。烷基优选包含 1-16 个碳原子，例如 1-12 个碳原子、1-10 个碳原子、1-6 个碳原子或 1-4 个碳原子。烷基的代表性示例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基等。

术语“烯基”指含有 2-16 个碳原子并且包含至少一个双键且不包含叁键的直链或支链烃基团。烯基基团优选含有 2-12 个碳原子、2-10 个碳原子、2-8 个碳原子、2-6 个碳原子或 2-4 个碳原子。烯基的代表性示例包括但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基等。

术语“炔基”指含有 2-16 个碳原子并且包含至少一个叁键的直链或支链烃基团。炔基基团优选含有 2-12 个碳原子、2-10 个碳原子、2-8 个碳原子或 2-6 个碳原子或 2-4 个碳原子。炔基的代表性示例包括但不限于乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基等。

术语“卤素”或“卤代”指氟(-F)、氯(-Cl)、溴(-Br)或碘(-I)。

术语“卤代烷基”指被一个或多个本文所定义的卤素基团取代的如本文所定义的烷基。卤代烷基可以优选是单卤代烷基、二卤代烷基或多卤代烷基(包括全卤代烷基)。单卤代烷基基团在烷基中可以含有一个碘、溴、氯或氟。二卤代烷基和多卤代烷基基团在烷基中可以含有两个或多个相同的卤原子或含有不同卤代基团的组合。优选地，多卤代烷基最多包含 12、10 或 8 或 6 或 4 或 3 或 2 个卤素基团。卤代烷基的非限制性示例包括氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、五氟乙基、七氟丙基、二氟氯甲基、二氯氟甲基、二氟乙基、二氟丙基、二氯乙基和二氯丙基。全卤代烷基指所有氢原子被卤素原子替换的烷基。

术语“卤代烯基”指被一个或多个本文所定义的卤素基团取代的如本文所定义的烯基。术语“卤代炔基”指被一个或多个本文所定义的卤素基团取代的如本文所定义的炔基。对于“卤代烷基”定义的“卤代”含义可适用于“卤代烯基”和“卤代炔基”。

术语“氨基酸”是指天然存在和合成的氨基酸。氨基酸可以是 L 或 D 异构体。本文涉及的常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如, Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), 其以引用的方式并入本文中。并且在本公开中, 氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如, 氨基酸可选自苯丙氨酸(Phe; F)、酪氨酸(Tyr; Y)、亮氨酸(Leu; L)、甘氨酸(Gly; G)、丙氨酸(Ala; A)、缬氨酸(Val; V)、赖氨酸(Lys; K)、瓜氨酸(Cit)、丝氨酸(Ser; S)、谷氨酸(Glu; E)、天冬氨酸(Asp; D)、天冬酰胺(Asn)、异亮氨酸(Ile)、精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)和谷氨酰胺(Gln)。

术语“戊糖醛酸”是指戊糖的伯羟基被氧化为羧基形成的化合物。戊糖醛酸的示例包括但不限于木糖醛酸、阿拉伯糖醛酸。

术语“己糖醛酸”是指己糖的伯羟基被氧化为羧基形成的化合物。己糖醛酸的示例包括但不限于葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸和甘露糖醛酸。

术语“戊糖”又称为五碳糖, 是指含有五个碳原子的单糖。戊糖包括 D-型和/或 L-型戊糖。戊糖的示例包括但不限于木糖、阿拉伯糖、核糖和脱氧核糖。

术语“己糖”又称为六碳糖, 是指含有六个碳原子的单糖。己糖包括 D-型和/或 L-型戊糖。己糖的示例包括但不限于葡萄糖、半乳糖、甘露糖和果糖。

术语“任选的”或“任选地”: 意为随后描述的事件或情况发生或不发生, 并且该描述包括所述事件或情况发生的实例以及所述事件或情况没有发生的实例。例如, 当基团或结构是“任选被取代的”, 所述基团或结构可以被取代, 也可以是不被取代的。

术语“药学上可接受的盐”表示指保持本发明的 ADC 偶联物的生物学效应和性能的盐, 并且该盐在生物学上或其它方面不是不被期望的。本发明的 ADC 偶联物可以以它们的药学上可接受的盐形式存在, 包括酸加成盐和碱加成盐。在本发明中, 药学上可接受的无毒的酸加成盐表示本发明中的 ADC 偶联物与有机或无机酸形成的盐, 有机或无机酸包括但不限于盐酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硝酸、高氯酸、乙酸、草酸、马来酸、富马酸、酒石酸、苯磺酸、甲磺酸、水杨酸、琥珀酸、柠檬酸、乳酸、丙酸、苯甲酸、对甲苯磺酸、苹果酸等。药学上可接受的无毒的碱加成盐表示本发明中的 ADC 偶联物与有机或无机碱所形成的盐, 包括但不限于碱金属盐, 例如锂、钠或钾盐; 碱土金属盐, 例如钙或镁盐; 有机碱盐, 例如通过与含 N 基团的有机碱形成的铵盐。

术语“溶剂化物”表示一个或多个溶剂分子与本发明中的 ADC 抗体-药物偶联物所形成的缔合物。形成溶剂化物的溶剂包括但不限于水、甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜等。

在根据上下文无矛盾的情况下，本文中“药学上可接受的”和“药用”可互换使用。

术语“药物:抗体比率”或“DAR”是指抗体药物偶联物分子中偶联于本文所述的 Ab 部分的药物部分(D)与 Ab 部分的比例。在本文所述的一些实施方案中，DAR 可由式 I 中的 p 确定，例如 DAR 可以为 1 至 16，例如 2-16、4-16、5-12、6-10、2-8、3-8、2-6、4-6、6-10，例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15。DAR 也可被计算为产品中分子群体的平均 DAR，即通过检测方法(例如通过常规方法如质谱法、ELISA 测定、电泳和/或 HPLC)测得的产品中偶联于本文所述的 Ab 部分的药物部分(D)与 Ab 部分的总体比例，此 DAR 在文中称为平均 DAR。在一些实施方案中，本发明偶联物的平均 DAR 值是 1 至 16，例如 2-16、4-16、5-12、6-10、2-8、3-8、2-6、4-6、6-10，例如 1.0-8.0，2.0-6.0，例如 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8.0、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 或 10.0，以这些数值中的两个作为端点的范围。应当理解，当提及平均 DAR 值时，本发明的 ADC 是指 ADC 分子群体或 ADC 分子混合物，其包含具有相同和/或不同 DAR 的 ADC 分子。

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

术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。

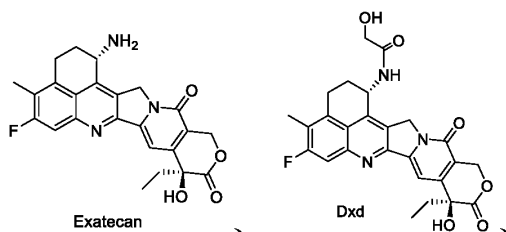
“化疗剂”包括在治疗癌症或免疫系统疾病中有用的化学化合物。

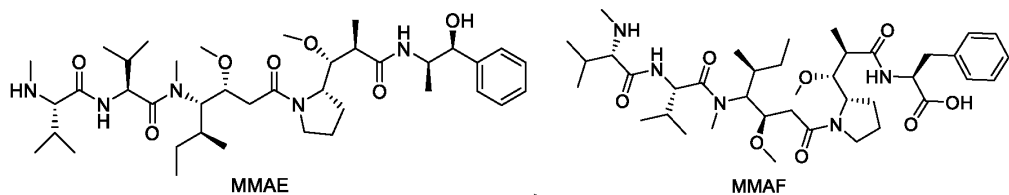
术语“药物”是指能够调节生物过程尤其改变或预防病理过程的有机化合物。

术语“小分子药物”是指低分子量的能够调节生物过程尤其改变或预防病理过程的有机化合物。“小分子”被定义为分子量小于 10kD、通常小于 2kD 和优选小于 1kD 的分子，更优选小于 500 D。小分子药物包括但不限于有机分子、含无机组分的有机分子、含放射性原子的分子、合成分子、肽模拟物和抗体模拟物。作为治疗剂，小分子可以比大分子更能透过细胞、对降解更不易感和更不易于引发免疫应答。

本文使用的术语“免疫调节剂”指抑制或调节(例如激活)免疫应答的天然或合成活性剂或者药物。免疫应答可以是体液应答或细胞应答。免疫调节剂包括免疫抑制剂或免疫激动剂。在一些实施方案中，本发明的免疫调节剂包括免疫检查点抑制剂或免疫检查点激动剂。

“抗肿瘤化合物”是对肿瘤有作用的药理学活性化合物，其包括但不限于细胞毒性剂或化疗剂，例如 WO2021/173773、US5658920 中公开的细胞毒性剂、例如喜树碱类化合物依喜替康(拓扑异构酶 I 抑制剂 Exatecan)、Dxd(一种新型拓扑异构酶 I 抑制剂 Exatecan 衍生物)、澳瑞他汀类化合物例如单甲基澳瑞他汀 E(MMAE)，其结构如下所示：





术语“有效量”指本发明的抗体或 ADC 分子或组合物或组合的这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。根据预期效果，可以包括“治疗有效量”和“预防有效量”。

“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体或 ADC 分子或组合物或组合的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤体积)至少约 30%、甚至更优选地至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%甚至 100%。

“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量将小于治疗有效量。

术语“抗肿瘤作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果，包括但不限于例如，肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。

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

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

术语“药物组合”、“组合产品”、“药物联合”或“联合产品”是指非固定组合产品或固定组合产品，包括但不限于药盒、药物组合物。术语“非固定组合”意指活性成分（例如，(i)本发明的抗体分子或ADC分子、以及(ii)其他治疗剂）以分开的实体被同时、无特定时间限制或以相同或不同的时间间隔、依次地施用于患者，其中这类施用为患者体内提供预防或治疗有效水平的两种或更多种活性剂。在一些实施方案中，药物组合中使用的本发明的抗体分子或ADC分子和其他治疗剂以不超过它们单独使用时的水平施用。术语“固定组合”意指两种或更多种活性剂以单个实体的形式被同时施用于患者。优选对两种或更多种活性剂的剂量和/或时间间隔进行选择，从而使各部分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。各成分可以各自呈单独的制剂形式，其制剂形式可以相同也可以不同。

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

用于本文时，“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。在一些实施方式中，具有癌症家族病史的受试者是预防性方案的候选。通常，在癌症的背景中，术语“预防”是指在癌症的病征或症状发生前，特别是在具有癌症风险的受试者中发生前的药物施用。

I. 本发明的多特异性抗体

通过深入的研究, 本发明人发现, 通过设计同时靶向 Trop2 和 Nectin4 的抗体分子, 可以降低 2 个靶点的在靶毒性并提高抗肿瘤疗效。因此, 在第一方面, 本发明提供了一种结合 Trop2 和 Nectin4 的多特异性抗体, 其中所述抗体包含至少一个特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域和至少一个特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域。在一些方面, 为了增加本发明抗体在动物循环中的半衰期, 本发明的抗体还包含半衰期延长结构域, 例如, 血清白蛋白结合性肽或免疫球蛋白 Fc 区。本发明的抗体可以采用任何适宜的形式, 例如单链或双链形式, 其中位于相同链上的结构域之间可以根据需要通过肽接头连接或直接连接。

以下就本发明多特异性抗体的组件进行详述描述。本领域技术人员可以理解, 除非上下文有明确相反指示, 这些组件的任何技术特征的任何组合均在本发明考虑范畴之中。并且, 本领域技术人员可以理解, 除非上下文有明确相反指示, 本发明的抗体(包括任何形式的抗体)可以包含任何这样的组合特征。

抗原结合结构域

尽管在早期的抗体筛选中高亲和力抗体备受青睐, 但越来越多的研究表明, 高亲和力抗体并不等同于高疗效。例如, 与快速内化靶点结合的高亲和力抗体可能会迅速从循环中消除。此外, 高亲和力还可能造成抗体被最初遇到的肿瘤组织外围细胞紧密结合或快速内化, 从而限制抗体对肿瘤的渗透。相反地, 抗体亲和力过低, 尽管可能提高抗体的肿瘤穿透效率, 但由于抗体无法与受体有效结合, 这样的抗体也将具有低的肿瘤滞留率。因此, 根据抗体或基于抗体的分子的具体应用影响, 筛选和采用能够允许抗体在整个肿瘤中有效传递, 同时能够允许抗体在肿瘤中蓄积的中等亲和力抗体, 在一些情况下是更为有利的。在本文中, “中等亲和力”是指, 例如通过表面等离子体共振技术(SPR)测定, 抗原结合结构域对于其靶表位的结合亲和力 K_D 值等于或高于 1nM, 但小于 500nM。

就本发明的靶向 Trop2 和 Nectin4 的抗体而言, 在研究中, 本发明人发现, 在一些情况下(例如将抗体作为 ADC 运载工具), 通过选择具有中等结合亲和力的 Trop2 和 Nectin4 抗原结合结构域, 以及通过调整抗体中 Trop2 和 Nectin4 抗原结合结构域的价数, 可以有利地赋予本发明多特异性抗体在功效和安全性方面的额外优势。例如, 通过减少 Trop2 结合结构域的价数和亲和力, 可以有助于减少施用于个体时抗体的系统毒性; 而通过包含相对较多价数(例如二价)的中等亲和力 Nectin4 结合结构域, 增加亲合力(avidity), 可以起到平衡抗体功效和毒性的作用。此外, 通过将所述抗体中的抗原结合结构域选择为基于纳米抗体的 VHH 结构域, 则可以进一步改善抗体在肿瘤组织中的富集速度和富集量。

因此, 在一些实施方案中, 本发明提供了包含 Trop2 结合结构域和 Nectin4 结合结构域的多特异性抗体。在一些实施方案中, 根据本发明抗体的 Trop2 抗原结合结构域对 Trop2(优选人 Trop2)具有中等结合亲和力, 例如, 结合亲和力 K_D 值为 50×10^{-8} M 至 0.5×10^{-8} M 或 50×10^{-8} M 至 1×10^{-8} M, 任选地 15×10^{-8} M 至 1×10^{-8} M。在一些实施方案中, 根据本发明抗体的 Nectin4 抗原结合结构域对 Nectin4(优选人 Nectin4)具有中等结合亲和力, 例如, 结合亲和力 K_D 值为 50×10^{-8} M 至 0.5×10^{-8} M 或 50×10^{-8} M 至 1×10^{-8} M, 任选地 30×10^{-8} M 至 1×10^{-8} M。在一些实施方案中, 所述 Trop2 和 Nectin4 抗原结合结构域的抗原结合亲和力 K_D 值分别为 50×10^{-8} M 至 0.5×10^{-8} M。在一些实施方案中, 所述 Trop2 结合结构域对 Trop2 的结合亲和力 K_D 值为 10×10^{-8} M 至 1×10^{-8} M, 且其中所述 Nectin4 结合结构域对 Nectin4 的结合亲和力为 30×10^{-8} M 至 1×10^{-8} M, 任选地 20×10^{-8} M 至 1×10^{-8} M。

在一些实施方案中, 本发明提供了包含 Trop2 抗原结合结构域与 Nectin4 抗原结合结构域的多特异性抗体, 其中所述 Trop2 抗原结合结构域与所述 Nectin4 抗原结合结构域的个数比或价数比为 1:1 或 1:2。在一些实施方案中, 根据本发明的多特异性抗体的价数(也即, 抗原结合结构域的总数)为 2-5 价, 优选地不超过 4 价。在一些实施方案中, 根据本发明的多特异性抗体为三价抗体, 其包含 1 个所述中等亲和力的 Trop2 结合结构域和 2 个所述中等亲和力的 Nectin4 结合结构域。在另一些实施方案中, 根据本发明的多特异性抗体为四价抗体, 其包含 2 个所述中等亲和力的 Trop2 结合结构域和 2 个所述中等亲和力的 Nectin4 结合结构域。

在一些实施方案中, 本发明的抗体为“分离的”抗体。在本文中, “分离的”抗体是指人工抗体、重组生

成的抗体、以及已经与产生其的天然环境中的组分至少部分地分离的抗体。在一些实施方案中，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE，等电聚焦(IEF)，毛细管电泳)或层析(例如，离子交换或反相 HPLC)确定，分离的抗体被纯化至超过 95% 或 99% 纯度。

Trop2 抗原结合结构域

在根据本发明的多特异性抗体中，在一些实施方案中，优选地，特异性结合 TROP2 的抗原结合位点由 VHH 结构域(在本文中也缩写为 VHH^{Trop2})提供。

在一些实施方案中，根据本发明的 VHH^{Trop2} 结构域包含具有选自 SEQ ID Nos: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 所示氨基酸序列的可变区中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。优选地，所述 CDR 根据 AbM、Chothia、Kabat、IMGT 或其任意组合进行定义。再优选地，所述 CDR 根据 Kabat 或 AbM 或其组合进行定义，更优选地，所述 CDR 根据 AbM 定义。但应当明了，所述的 CDR 也可以采用本领域已知的任何其他方式定义。

在一些实施方案中，根据本发明的 VHH^{TROP2} 结构域包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列，其中所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列：

- (i) 分别包含 SEQ ID Nos: 6, 7 和 8 的氨基酸序列或由其组成；
- (ii) 分别包含 SEQ ID Nos: 10, 11 和 12 的氨基酸序列或由其组成；
- (iii) 分别包含 SEQ ID Nos: 14, 15 和 16 的氨基酸序列或由其组成；或
- (iv) 分别包含 SEQ ID Nos: 31, 32 和 33 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，根据本发明的 VHH^{TROP2} 结构域包含：本发明示例性抗体之任一的 VHH 可变区序列或其变体，例如，具有与前述示例性抗体之一相同的 CDR 序列，并具有相同或不同的构架区序列的抗体或其片段，例如人源化抗体。在一些情况下，优选地，对构架序列进行 1 至几个残基突变，以例如去除翻译后修饰(PTM)和/或去免疫化。可以在体外或体内测定试验中评估突变后的抗体的抗原结合性质或其它功能性质的保持或改善情况。

在一些实施方案中，根据本发明的 VHH^{TROP2} 结构域包含具有选自 SEQ ID Nos: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列的可变区序列。在再一些实施方案中，根据本发明的 VHH^{TROP2} 结构域包含与选自 SEQ ID Nos: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95% 或 99% 同一性并且保留特异性结合 TROP2 的能力的氨基酸序列。在再一些实施方案中，根据本发明的 VHH^{TROP2} 结构域包含与选自 SEQ ID Nos: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代(例如，保守性取代)并且保留特异性结合 TROP2 的能力的氨基酸序列。优选地，所述氨基酸的添加、缺失和/或取代不发生在 CDR 区中。

在一些优选的实施方案中，根据本发明的 VHH^{TROP2} 结构域包含 SEQ ID Nos: 10-12 的 CDR1-3 序列。在一些实施方案中，所述 VHH^{TROP2} 结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列、或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列。优选地，所述 VHH^{TROP2} 结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列组成。

在一些优选的实施方案中，根据本发明的 VHH^{TROP2} 结构域包含 SEQ ID Nos: 31-33 的 CDR1-3 序列。在一些实施方案中，所述 VHH^{TROP2} 结构域包含 SEQ ID NO: 29、30、98 或 99 的氨基酸序列、或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性的氨基酸序列。优选地，所述 VHH^{TROP2} 结构域包含 SEQ ID NO: 29 或 30 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 29 或 30 所示的氨基酸序列组成。

Nectin4 抗原结合结构域

在根据本发明的多特异性抗体中，在一些实施方案中，优选地，特异性结合 NECTIN4 的抗原结合位点由 VHH 结构域(在本文中也缩写为 VHH^{Nectin4})提供。

在一些实施方案中,根据本发明的 VHH^{NECTIN4} 结构域包含具有选自 SEQ ID Nos: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 所示氨基酸序列的可变区中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。优选地,所述 CDR 根据 AbM、Chothia、Kabat、IMGT 或其任意组合进行定义。再优选地,所述 CDR 根据 Kabat 或 AbM 或其组合进行定义,更优选地,所述 CDR 根据 AbM 定义。但应当明了,所述的 CDR 也可以采用本领域已知的任何其他方式定义。

在一些实施方案中,根据本发明的 VHH^{NECTIN4} 结构域包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列,其中所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列:

- (i) 分别包含 SEQ ID Nos:18、19 和 20 的氨基酸序列或由其组成;
- (ii) 分别包含 SEQ ID Nos:22、23 和 24 的氨基酸序列或由其组成;
- (iii) 分别包含 SEQ ID Nos:26、27 和 28 的氨基酸序列或由其组成;
- (iv) 分别包含 SEQ ID Nos:18、36 和 20 的氨基酸序列或由其组成;或
- (v) 分别包含 SEQ ID Nos:18、37 和 20 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中,根据本发明的 VHH^{NECTIN4} 结构域包含:本发明示例性抗体之任一的 VHH 可变区序列或其变体,例如,具有与所述示例性抗体之一相同的 CDR 序列,并具有相同或不同的构架区序列的抗体或其片段,例如人源化抗体。在一些情况下,优选地,对构架区序列进行 1 至几个残基突变,以例如去除翻译后修饰(PTM)和/或去免疫化。可以在体外或体内测定试验中评估突变后的抗体的抗原结合性质或其他功能性质的保持或改善情况。

在一些实施方案中,根据本发明的 VHH^{NECTIN4} 结构域包含具有选自 SEQ ID Nos: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列的可变区序列。在再一些实施方案中,根据本发明的 VHH^{NECTIN4} 结构域包含与选自 SEQ ID Nos: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性并且保留特异性结合 NECTIN4 的能力的氨基酸序列。在再一些实施方案中,根据本发明的 VHH^{NECTIN4} 结构域包含与选自 SEQ ID Nos: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选地 1-10 个,更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代(例如,保守性取代)并且保留特异性结合 NECTIN4 的能力的氨基酸序列。优选地,所述氨基酸的添加、缺失和/或取代不发生在 CDR 区中。

在一些优选的实施方案中,根据本发明的 VHH^{NECTIN4} 结构域包含 SEQ ID Nos:22-24 的 CDR1-3 序列。在一些实施方案中,所述 VHH^{NECTIN4} 结构域包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列、或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。优选地,所述 VHH^{NECTIN4} 结构域包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列,或由 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列组成。

在一些优选的实施方案中,根据本发明的 VHH^{NECTIN4} 结构域包含 SEQ ID NO: 18 的 CDR1 序列, SEQ ID NO:36 的 CDR2 序列,和 SEQ ID NO: 20 的 CDR3 序列。在一些实施方案中,所述 VHH^{NECTIN4} 结构域包含 SEQ ID NO:34、38、102、104 或 106 的氨基酸序列、或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。优选地,所述 VHH^{NECTIN4} 结构域包含 SEQ ID NO: 34 或 38 的氨基酸序列,或由 SEQ ID NO:34 或 38 所示的氨基酸序列组成。

在一些优选的实施方案中,根据本发明的 VHH^{NECTIN4} 结构域包含 SEQ ID NO: 18 的 CDR1 序列, SEQ ID NO:37 的 CDR2 序列,和 SEQ ID NO: 20 的 CDR3 序列。在一些实施方案中,所述 VHH^{NECTIN4} 结构域包含 SEQ ID NO: 35、103 或 105 的氨基酸序列、或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。优选地,所述 VHH^{NECTIN4} 结构域包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列,或由 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列组成。

半衰期延长结构域

根据本发明的多特异性抗体，除前述的抗原结合结构域外，在一些实施方案中，还可以包含半衰期延长结构域，以调整抗体在施用于动物后的循环半衰期时间。优选地，用于本发明抗体的半衰期延长结构域为肽或多肽类结构，由此可以通过遗传融合的方式偶联到本发明抗体上。可用的肽或多肽类半衰期延长结构域包括，但不限于，免疫球蛋白 Fc 区、血清白蛋白或血清白蛋白结合性肽。在一些实施方案中，优选地，本发明抗体包含免疫球蛋白 Fc 区，尤其是在抗体采取双链构型的情况下。在一些实施方案中，优选地，本发明抗体包含血清白蛋白结合性肽，尤其是在抗体采取单链构型的情况下。半衰期延长结构域可连接至 TROP2 结合结构域的 C 或 N 末端或连接至 NECTIN4 的 C 或 N 末端。

免疫球蛋白 Fc 区

半衰期延长结构域可以包含免疫球蛋白 Fc 区。免疫球蛋白 Fc 区可以是任何免疫球蛋白 Fc 区。Fc 区是免疫球蛋白的 C 端恒定结构域，与细胞表面 Fc 受体和补体系统的一些蛋白质相互作用。免疫球蛋白 Fc 区通常包含两个或三个重链恒定结构域(称为 CH2、CH3 和 CH4)和铰链区，并通常以二聚化形式存在。二聚化 Fc 区中的两条链可以通过铰链区内的二硫键连接。来自免疫球蛋白同种型 IgG1、IgG2 和 IgG4 的 Fc 区能够结合 FcRn 受体并经历 FcRn 介导的再循环，以提供长的循环半衰期。IgG 与 FcRn 的相互作用位置已被确定在覆盖部分的 CH2 和 CH3 结构域的 Fc 区中。

用于本发明多特异性抗体的免疫球蛋白 Fc 区可以为来自任何免疫球蛋白 Fc 区。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 区至少包含免疫球蛋白 CH2 结构域和 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 区还包含铰链区或部分铰链区。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 区从 N 端到 C 端包含免疫球蛋白铰链区或部分铰链区、CH2 结构域和 CH3 结构域，或由其组成。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 区从 N 端到 C 端包含 CH2 结构域和 CH3 结构域，或由其组成。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 区优选来自 IgG1、IgG2 或 IgG4，或其亚型。优选地，所述免疫球蛋白 Fc 区包含来自人的 Fc 区序列。

免疫球蛋白 Fc 区可以融合至其他结构域(即 TROP2 或 NECTIN4 结合结构域，例如 VHH^{TROP2} 或 VHH^{NECTIN4}) 的 C 或 N 末端。免疫球蛋白 Fc 可以通过肽接头融合至其他结构域，或者直接融合至其他结构域。在免疫球蛋白 Fc 区以其 N 端融合其他结构域的实施方案中，优选地，通过免疫球蛋白铰链区序列进行所述融合。

在一些情况下，包含铰链区序列的免疫球蛋白 Fc 区是优选的，其可以例如促进抗体多肽链的二聚化和/或提供用于偶联其他活性分子的半胱氨酸残基。这样的铰链序列可基本上或部分对应于 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的铰链区。例如，所述的铰链区序列可包括核心铰链区的全部或部分以及下铰链区的全部或部分。核心铰链区在 IgG1、IgG2 和 IgG3 中具有氨基酸序列 CPPC，在 IgG4 中具有 CPSC 序列。优选地，铰链区含有至少一个连接两条 Fc 链的二硫键。在一些实施方案中，所述铰链区序列包含来自 IgG1 的 E216 到 T225 的铰链区序列或 D221 到 T225 的铰链区序列(根据 EU 编号)，或来自其他免疫球蛋白同种型的对应铰链区序列。在一些实施方案中，所述铰链区序列包含 SEQ ID NO:96 或 97 的氨基酸序列。

用于本发明多特异性抗体的免疫球蛋白 Fc 区可以为天然 Fc 区序列。或者，Fc 区可以包含相对于天然 Fc 序列的突变。突变包括替换、插入和/或缺失。可以出于引入所需治疗特性的目的而进行此类突变。例如，为了促进异二聚化，可以将 Knob-into-Hole (KiH) 突变引入 CH3 结构域中。在这种情况下，一条 Fc 链被设计为包含一个大的突出残基(即 Knob)，而另一条 Fc 链被设计为包含一个互补的口袋(即 Hole)。KiH 突变的合适位置是本领域已知的。示例性 KiH 突变包括，但不限于，Knob 突变 T366W 和 Hole 突变 T366S、L368A、Y407V 组合；和 Knob 突变 T366Y 和 Hole 突变 Y407T 组合。在本发明多特异性抗体包含不对称双链结构时，优选地 Fc 区包含促进抗体多肽链进行正确异二聚化的 KiH 突变。另外地或备选地，可以在 Fc 区中引入半胱氨酸突变，以增加二聚化的 Fc 区中的二硫键连接，例如，在一条 Fc 链中引入突变 S354C，且在另一条 Fc 链中引入突变 Y349C。

此外，根据抗体或基于抗体的分子的具体应用，Fc 区也可以包含改变效应子功能的突变。例如，在不

需要效应子功能的情况下，Fc 区可以包含降低或消除效应子功能的突变。在一些情况下(例如以本发明抗体作为 ADC 运载体的情况下)，优选地，所述 Fc 区包含降低或消除 Fc 区与 Fc γ 受体的突变，例如 Fc 区的 234 和 235 位赖氨酸(L)变成丙氨酸(A)的 LALA 突变，以降低 Fc γ 受体介导的脱靶细胞毒性。另外地或备选地，可以在 Fc 区中引入突变以增加与 FcRn 的结合和/或去除蛋白酶位点，和/或引入可用于偶联活性分子的氨基酸修饰。另外或备选地，可以出于抗体生产原因，对 Fc 区进行突变，例如去除或替换可能发生翻译后修饰(例如糖基化)的氨基酸，以提供治疗性抗体改善的成药性和可开发性。

在一些实施方案中，根据本发明多特异性抗体包含来自 IgG 的 Fc 区，例如，IgG1、IgG2 或 IgG4 的 Fc 区，优选地来自人 IgG1 或人 IgG4 的 Fc 区。优选地，所述 Fc 区包含选自 SEQ ID NOs: 83-87 和 111-117 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

血清白蛋白结合性肽

半衰期延长结构域可以包含血清白蛋白结合性肽。如本领域已知的，血清白蛋白具有长循环半衰期。附着于白蛋白是改善治疗分子体内循环半衰期的众所周知的策略。白蛋白可以通过使用特定的白蛋白结合结构域非共价地连接，或者通过缀合或直接基因融合共价地连接。

用于本发明多特异性抗体的白蛋白结合结构域优选为结合血清白蛋白的肽或多肽。这样的肽或多肽在本文中也称作“血清白蛋白结合性肽”。可用于本发明的血清白蛋白结合性肽的实例包括，例如，特异性结合血清白蛋白的抗体和抗体片段，例如基于单域抗体的 AlbuDab®(O'Connor-Semmes 等人, Clin Pharmacol Ther. 2014 年 12 月; 96(6):704-12); 以及基于与血清白蛋白结合的天然蛋白质(例如链球菌 G 蛋白)的人工蛋白质，例如 Albumod®。可用于本发明的血清白蛋白结合性肽的另一些实例包括，例如，在 WO 04/041865、WO 06/122787、WO 2012/175400 中描述的诸多与人血清白蛋白结合的 ISVD，所述 ISVD 选自 Alb-1、Alb-3、Alb-4、Alb-5、Alb-6、Alb-7、Alb-8、Alb-9、Alb-10 和 Alb-23 的血清白蛋白结合部分。

血清白蛋白结合性肽可以融合至其他结构域(即 TROP2 或 NECTIN4 结合结构域，例如 VHH^{TROP2} 或 VHH^{NECTIN4})的 C 或 N 末端。血清白蛋白结合性肽可以通过肽接头融合至其他结构域，或者直接融合至其他结构域。优选地，血清白蛋白结合性肽通过肽接头融合至其他结构域。可以根据连接位置，容易地确定可用的肽接头的序列或最佳长度。在一些实施方案中，优选地，所述肽接头为长度 5-15 个氨基酸长度，更优选地所述肽接头包含氨基酸序列 G4S 或(G4S)₂。

在一些实施方案中，用于本发明多特异性抗体的血清白蛋白结合性肽是特异性结合血清白蛋白的抗体或抗体片段，尤其是单链抗体或单域抗体。在一些实施方案中，所述血清白蛋白结合性肽是特异性结合血清白蛋白的 VHH 结构域(在本文中也缩写为 VHH^{SA})。优选地，血清白蛋白是人血清白蛋白(HSA)。优选地，所述血清白蛋白结合性肽对人血清白蛋白具有皮摩尔至微摩尔的结合亲和力。

在一些实施方案中，根据本发明多特异性抗体包含特异性结合血清白蛋白的 VHH 结构域。在一些实施方案中，所述 VHH^{SA} 包含具有选自 SEQ ID NO: 39 或 40 的氨基酸序列的可变区序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3。所述 CDR 可以根据 AbM、Chothia、Kabat、IMGT 或其任意组合进行定义。在一些实施方案中，所述 VHH^{SA} 包含 SEQ ID NO: 39 或 40 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 VHH^{SA} 包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列或由其组成。

肽接头

在根据本发明的多特异抗体中，抗体组件(即，抗原结合结构域和可选地半衰期结合结构域)之间可以采用肽接头进行连接。

可以用于本发明抗体中的肽接头并无特定限制。肽接头序列通常具有柔性。其可以主要由甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸等不具有可能限制灵活性的大侧链的氨基酸组成。或者，其可以由来自免疫球蛋白铰链区的序列组成。根据连接位置和待连接的组件，本领域技术人员可以容易地确定可用的肽接头的序列或最佳

长度。

适宜的肽接头长度可以为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个氨基酸长度，或者更长。在一些情况下，肽接头序列的长度可以较短，例如小于约 20 个或 15 个氨基酸长度，例如 2-15 个氨基酸长度或 5-10 个氨基酸长度。

适宜的肽接头序列包含但不限于，G4S (SEQ ID NO: 88); (G4S)₂ (SEQ ID NO: 89); (G4S)₃ (SEQ ID NO: 90); GGGSG (SEQ ID NO: 118); GGSGG (SEQ ID NO: 119); GSGGG (SEQ ID NO: 120); GSGGGP (SEQ ID NO: 121); GGEPS (SEQ ID NO: 122); GGEGGGP (SEQ ID NO: 123) 和 GGEGGGSEGGGS (SEQ ID NO: 124); 以及 (G4S)_n (SEQ ID NO: 91)，其中 n 是等于或大于 1 的整数；TS(G4S)_n (SEQ ID NO: 92)，其中 n 是等于或大于 1 的整数；G(G4S)_n (SEQ ID NO: 93)，其中 n 是等于或大于 1 的整数；(G4)_n (SEQ ID NO: 94)，其中 n 是等于或大于 1 的整数；(GRPGS)_n (SEQ ID NO: 95)，其中 n 是等于或大于 1 的整数。可以用于本发明抗体分子的肽接头还可以是，例如但不限于，如下氨基酸序列：(G₃S)₂ (SEQ ID NO: 125)、(G₄S)₂ (SEQ ID NO: 89)、(G₃S)₃ (SEQ ID NO: 126)、(G₄S)₃ (SEQ ID NO: 90)、(G₃S)₄ (SEQ ID NO: 127)、(G₄S)₄ (SEQ ID NO: 128)、(G₃S)₅ (SEQ ID NO: 129)、(G₄S)₅ (SEQ ID NO: 130)、(G₃S)₆ (SEQ ID NO: 131)、(G₄S)₆ (SEQ ID NO: 88)、GGG (SEQ ID NO: 132)、DGGGS (SEQ ID NO: 133)、TGEKP (SEQ ID NO: 134)、GGRR (SEQ ID NO: 135)、EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 136)、KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 137)、GGRRGGGS (SEQ ID NO: 138)、LRQRDGERP (SEQ ID NO: 139)、LRQKDGGGGERP (SEQ ID NO: 140) 和 GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 141)。或者，可以使用计算机程序模拟蛋白和肽的三维结构，或通过噬菌体展示方法，来合理地设计合适的柔性连接肽。

在一些实施方案中，用于本发明抗体中的肽接头为 5-50 个氨基酸的柔性连接肽，优选地包含甘氨酸 (G) 和/或丝氨酸 (S) 和/或苏氨酸残基 (T) 的连接肽。在一个实施方案中，所述肽接头具有 5-50 个氨基酸长度，例如，5、10、15、20、25 或 30 个氨基酸长度，或具有落入任何两个整数之间的氨基酸长度。在一些实施方案中，肽接头包含氨基酸序列 (G₄S)_n (SEQ ID NO: 91)，其中 n 是等于或大于 1 的整数，例如，n 是 2、3、4、5、6 或 7 的整数。在再一些实施方案中，肽接头为来自免疫球蛋白的铰链区。

在一些优选实施方案中，在根据本发明的多特异性抗体中，用于连接抗原结合结构域和半衰期延长结构域(如果存在的话)的肽接头包含氨基酸序列 G4S (SEQ ID NO: 88) 或 (G4S)₂ (SEQ ID NO: 89)。

多特异性抗体的形式

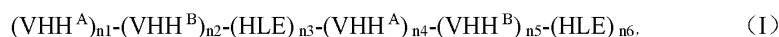
根据本发明的多特异性抗体可以采用任何适宜的形式，例如单链或双链形式。

在一些实施方案中，本发明提供了单链形式的多特异性抗体。在一些实施方案中，根据本发明的多特异性抗体包含单条多肽链，其中所述多肽链包含至少一个(优选 1 或 2 个)Nectin4 结合结构域与至少一个(优选 1 或 2 个)Trop2 结合结构域以及任选地至少一个半衰期延长结构域，其中所述半衰期延长结构域为血清白蛋白结合性肽，优选地所述结构域之间通过肽接头连接。

在一些实施方案中，本发明提供了双链形式的多特异性抗体。在一些实施方案中，根据本发明的多特异性抗体包含第一和第二多肽链，其中所述第一和第二多肽链分别包含至少一个(优选 1 或 2 个)Nectin4 结合结构域和/或至少一个(优选 1 或 2 个)Trop2 结合结构域以及至少一个(优选 1 个)半衰期延长结构域，其中所述半衰期延长结构域为免疫球蛋白 Fc 区，优选地同一链上结构域之间通过肽接头连接或直接连接。

单链形式

在一些实施方案中，本发明提供包含单条多肽链的多特异性抗体。在一些实施方案中，所述多肽链从 N 端到 C 端包含：



其中 n1, n2, n3, n4, n5 和 n6 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数；其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗

原 A 和 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 彼此不同且独立地选自 Trop2 和 Nectin4; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的血清白蛋白结合性肽; 其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接, 优选表示长度 5-15 个氨基酸的肽接头。

所述多特异性抗体可以具有任何适宜的价数。在一些情况下, 优选所述多特异性抗体具有 2 价至 6 价 (即, $n1+n2+n4+n5=2$ 至 6), 更优选地, 不超过 4 价 (即, $n1+n2+n4+n5=2$ 至 4)。

所述多特异性抗体中 VHH^{Nectin4} 结构域和 VHH^{Trop2} 结构域的个数可以相等或不等。在一些实施方案中, 优选地, VHH^{Trop2} 结构域的个数不超过 4 个, 优选地不超过 3 个, 例如为 1-2 个。在一些实施方案中, 优选地 VHH^{Nectin4} 结构域的个数为不超过 4 个, 优选地不超过 3 个, 例如为 1-2 个。在一些实施方案中, 优选地, VHH^{Trop2} 结构域与 VHH^{Nectin4} 结构域的个数比优选为 1:1 或 1:2。在一个实施方案中, VHH^{Trop2} 结构域的个数为 1 或 2, 且 VHH^{Nectin4} 结构域的个数为 1 或 2。

所述多特异性抗体可以根据需要包含或不包含 HLE 结构域, 例如抗体可以包含 0 或 1 个 HLE。

在一些优选的实施方案中, 本发明提供了上述式 I 的多特异性抗体, 其中 $n1, n2, n3, n4, n5$ 和 $n6$ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数; 且其中 $n1+n4=1$ 或 2, $n2+n5=1$ 或 2, 且 $n3+n6=0$ 或 1。

在一些更优选的实施方案中, 本发明提供了包含单条多肽链的多特异性抗体, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含:

- (i) VHH^A-VHH^B,
- (ii) VHH^A-VHH^B-HLE,
- (iii) VHH^B-VHH^A-VHH^B,
- (iv) VHH^A-VHH^B-VHH^B,
- (v) VHH^A-HLE-VHH^B-VHH^B, 或
- (vi) VHH^A-VHH^A-HLE-VHH^B-VHH^B, 其中优选地 A 表示 Trop2 且 B 表示 Nectin4。

在上述单链形式的抗体实施方案中, 优选地, 所述 HLE 表示抗血清白蛋白 VHH 结构域(VHH^{SA})。所述 VHH^{SA} 结构域可以是本文中描述的或本领域已知的任何 VHH^{SA} 结构域。例如, 作为实例, 所述 VHH^{SA} 结构域可以包含选自 SEQ ID NOs: 39 和 40 的氨基酸序列、或与其具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。在一些实施方案中, 优选地, 所述 HLE 包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列或由其组成。

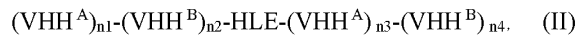
在上述单链形式的抗体实施方案中, 优选地, 各结构域之间通过肽接头连接。优选地所述肽接头具有长度 5-15 个氨基酸长度, 更优选地包含 G4S 氨基酸序列或(G4S)₂ 氨基酸序列。

如本领域技术人员理解, 为了便于后续的纯化或连接其他活性分子, 本发明的单链多特异性抗体可以任选地在多肽链的 N 末端或 C 末端添加纯化标签(例如 His 标签)或其他辅助肽序列。所述添加可以通过肽接头(例如 AAA)实现或通过直接连接实现。

具有式(I)多肽链的多特异性抗体优选是三价双特异性抗体或四价双特异性抗体。

对称双链形式

在一些实施方案中, 本发明提供包含两条相同多肽链的多特异性抗体。在一些实施方案中, 本发明提供包含如下多肽链的多特异性抗体, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含:



其中 n_1, n_2, n_3 和 n_4 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 彼此不同且独立地选自 Trop2 和 Nectin4; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区, 尤其是人 IgG1 或人 IgG4 Fc 区; 其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接, 优选表示长度 5-15 个氨基酸的肽接头。

所述多特异性抗体可以具有任何适宜的价数。在一些情况下, 优选所述多特异性抗体具有 2 价至 6 价 (即, $2 \times (n_1 + n_2 + n_3 + n_4) = 2$ 至 6), 更优选地, 不超过 4 价。

所述多特异性抗体中 $VHH^{Nectin4}$ 结构域和 VHH^{Trop2} 结构域的个数可以相等或不等。在一些实施方案中, 优选地, VHH^{Trop2} 结构域的个数不超过 4 个, 优选地不超过 3 个, 例如为 1-2 个。在一些实施方案中, 优选地 $VHH^{Nectin4}$ 结构域的个数为不超过 4 个, 优选地不超过 3 个, 例如为 1-2 个。在一些实施方案中, 优选地, VHH^{Trop2} 结构域与 $VHH^{Nectin4}$ 结构域的个数比优选为 1:1 或 1:2。在一个实施方案中, VHH^{Trop2} 结构域的个数为 1 或 2, 且 $VHH^{Nectin4}$ 结构域的个数为 1 或 2。

在一些优选的实施方案中, n_3 和 n_4 为 0, 具有式(II)的多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^A)_{n_1}-(VHH^B)_{n_2}$ -HLE, 其中 n_1 和 n_2 彼此独立地选自 1 或 2 的整数。

在一些更优选的实施方案中, n_3 和 n_4 为 0, 且 n_1 和 n_2 为 1, 具有式(II)的多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH^A - VHH^B -HLE, 例如 $VHH^{Nectin4}$ - VHH^{Trop2} -Fc 或 VHH^{Trop2} - $VHH^{Nectin4}$ -Fc。

在一些再优选的实施方案中, 具有式(II)的多肽链从 N 端到 C 端包含 $VHH^{Nectin4}$ - VHH^{Trop2} -Fc。

在上述多特异性抗体中, 优选地, 多肽链上的各抗原结合结构域(即, VHH^{Trop2} 结构域与 $VHH^{Nectin4}$ 结构域)之间通过肽接头连接。优选地所述肽接头具有长度 5-15 个氨基酸长度, 更优选地包含 G4S 氨基酸序列或(G4S)₂ 氨基酸序列。在上述多特异性抗体中, 优选地, Fc 区包含铰链区或部分铰链区, 并直接与位于其 N 端的结构域连接。

具有上式(II)多肽链的多特异性抗体可以由于免疫球蛋白 Fc 区的二聚化作用, 而缔合形成同源二聚体, 由此产生双链形式的多特异性结合分子。在一些实施方案中, 所述 Fc 区包含来自人 IgG1 或 IgG4 的氨基酸序列。在一些实施方案中, 所述 Fc 区包含降低或消除 Fc γ 受体结合的突变, 例如 LALA 突变。

具有式(II)多肽链的多特异性抗体优选为四价双特异性抗体。

不对称双链形式

在一些实施方案中, 本发明提供了包含两条不同多肽链的多特异性抗体。在一些实施方中, 本发明提供了包含第一多肽链和第二多肽链的多特异性抗体, 其中

第一多肽链从 N 端到 C 端分别包含: $(VHH^A)_{n_1}-(VHH^B)_{n_2}$ -HLE- $(VHH^A)_{n_3}-(VHH^B)_{n_4}$. (III)

第二多肽链从 N 端到 C 端分别包含: $(VHH^B)_{m_1}-(VHH^A)_{m_2}$ -HLE- $(VHH^B)_{m_3}-(VHH^A)_{m_4}$. (IV)

其中 n_1, n_2, n_3 和 n_4 以及 m_1, m_2, m_3 和 m_4 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 彼此不同且独立地选自 Trop2 和 Nectin4; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区, 尤其是人 IgG1 或 IgG4 Fc 区; 其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接, 优选表示长度 5-15 个氨基酸的肽接头。

所述多特异性抗体可以具有任何适宜的价数。在一些情况下, 优选所述多特异性抗体具有 2 价至 6 价 (即, $n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + m_1 + m_2 + m_3 + m_4 = 2$ 至 6), 更优选地, 不超过 4 价。

所述多特异性抗体中 $VHH^{Nectin4}$ 结构域和 VHH^{Trop2} 结构域的个数可以相等或不等。在一些实施方案中, 优选地, VHH^{Trop2} 结构域的个数不超过 4 个, 优选地不超过 3 个, 例如为 1-2 个。在一些实施方案中, 优选地 $VHH^{Nectin4}$ 结构域的个数为不超过 4 个, 优选地不超过 3 个, 例如为 1-2 个。在一些实施方案中,

优选地，VHH^{Trop2} 结构域与 VHH^{Nectin4} 结构域的个数比优选为 1:1 或 1:2。在一个实施方案中，VHH^{Trop2} 结构域的个数为 1 或 2，且 VHH^{Nectin4} 结构域的个数为 1 或 2。

在一些优选的实施方案中，n3, n4, m3 和 m4 为 0，所述多特异性抗体包含第一和第二多肽链，其中

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^B)_{m1}-(VHH^A)_{m2}-HLE.

其中 n1, n2 以及 m1, m2 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数，但 n1 和 n2 不同时为 0，m1 和 m2 不同时为 0，且 n1 与 m2 之和以及 n2 与 m1 之和大于或等于 1。

在一些更优选的实施方案中，n3, n4, m3 和 m4 为 0，且 m1=0 且 m2=1 或 m2=0 且 m1=1，所述多特异性抗体包含第一和第二多肽链，其中

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^B)_{m1}-HLE, 或者 (VHH^A)_{m2}-HLE.

其中 n1, m1 和 m2 彼此独立地选自 1 或 2 的整数，n2 为 0 或 1 的整数。

在一些再优选的实施方案中，n3, n4, m3 和 m4 为 0，n1+m2=1 或 2，n2+m1=1 或 2，并且 m1=0 且 m2=1 或 m2=0 且 m1=1，所述多特异性抗体包含第一和第二多肽链，其中

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-HLE.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^B)-HLE.

或者，

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-(VHH^B)-HLE.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-HLE.

或者，

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-(VHH^A)-HLE.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^B)-HLE.

或者，

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-(VHH^B)-HLE.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^B)-HLE.

在一些再优选的实施方案中，所述多特异性抗体包含第一和第二多肽链，其中：

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-HLE.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^B)-HLE.

或者，

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-(VHH^B)-HLE.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-HLE.

或者，

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-(VHH^A)-HLE.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^B)-HLE.

其中 A 表示 NECTIN4，且 B 表示 TROP2。

在一些最优化的实施方案中,所述多特异性抗体包含第一和第二多肽链,其中:

第一多肽链从N端到C端包含:VHH^{Nectin4}-VHH^{Trop2}-Fc;且

第二多肽链从N端到C端包含:VHH^{Nectin4}-Fc。

由于免疫球蛋白Fc区的二聚化作用,上述多特异性抗体的第一和第二多肽链可以缔合形成异源二聚体,由此产生双链形式的多特异性结合分子。优选地,为了促进第一和第二多肽链的异二聚化,可以在第一和第二多肽链的Fc区中引入Knob-into-hole突变,例如(T366W/T366S,L368A,Y407V)突变或(T366Y/Y407T)突变。优选地,所述Fc区包含来自人IgG1或IgG4的氨基酸序列,优选地,所述Fc区还包含降低或消除Fc γ 受体结合的突变,例如LALA突变。

在一些实施方案中,根据本发明多特异性抗体包含第一Fc区和第二Fc区,其中所述第一Fc区和第二Fc区包含促进所述Fc二聚体形成的氨基酸突变。在一些实施方案中,所述第一Fc区包含T336W和S354C,且所述第二Fc区包含T366S、L368A、Y407V和Y349C,或反之亦然;或者,所述第一Fc区包含T336W,且所述第二Fc区包含T366S、L368A和Y407V,或反之亦然;或者,所述第一Fc区包含T366Y,且所述第二Fc区包含Y407T,或反之亦然。在一些进一步的实施方案中,所述第一Fc区和第二Fc区还分别包含降低或消除所述Fc区与Fc γ R的结合作用的突变,例如,L234AL235A突变。在一些实施方案中,优选地,所述第一和第二Fc区包含选自SEQ ID NOs: 111-116的氨基酸序列或与其具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

在上述多特异性抗体中,优选地,多肽链上的各抗原结合结构域(即,VHH^{Trop2}结构域与VHH^{Nectin4}结构域)之间通过肽接头连接。优选地所述肽接头具有长度5-15个氨基酸长度,更优选地包含G4S氨基酸序列或(G4S)₂氨基酸序列。在上述多特异性抗体中,优选地,Fc区包含铰链区或部分铰链区,并直接与位于其N端的结构域连接。

具有式(III)和式(IV)的第一和第二多肽链的多特异性抗体优选为三价双特异性抗体或四价双特异性抗体。

示例抗原结构域组合

在上述根据本发明的单链和双链形式多特异性抗体的一些实施方案中,优选地,根据本发明的多特异性抗体包含如下的TROP2和NECTIN4抗原结合结构域组合:

(a) 特异性结合Nectin4的抗原结合结构域包含SEQ ID NO: 25的氨基酸序列中的3个CDR且特异性结合Trop2的抗原结合结构域包含SEQ ID NO: 13的氨基酸序列中的3个CDR;

(b) 特异性结合Nectin4的抗原结合结构域包含SEQ ID NO: 21的氨基酸序列中的3个CDR且特异性结合Trop2的抗原结合结构域包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列中的3个CDR;

(c) 特异性结合Nectin4的抗原结合结构域包含SEQ ID NO: 25的氨基酸序列中的3个CDR且特异性结合Trop2的抗原结合结构域包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列中的3个CDR;

(d) 特异性结合Nectin4的抗原结合结构域包含SEQ ID NO: 35的氨基酸序列中的3个CDR且特异性结合Trop2的抗原结合结构域包含选自SEQ ID NO: 29和30的氨基酸序列中的3个CDR;或

(e) 特异性结合Nectin4的抗原结合结构域包含选自SEQ ID NO: 34和38的氨基酸序列中的3个CDR且特异性结合Trop2的抗原结合结构域包含选自SEQ ID NO: 29和30的氨基酸序列中的3个CDR。

在根据本发明的单链和双链形式多特异性抗体的一些实施方案中,更优选地,根据本发明的多特异性抗体包含如下的TROP2和NECTIN4抗原结合结构域组合:

(a) 特异性结合Nectin4的抗原结合结构域包含SEQ ID NO: 21的氨基酸序列,且特异性结合Trop2的抗原结合结构域包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列;

(b) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 29 和 30 的氨基酸序列；或

(c) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 34 和 38 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 29 和 30 的氨基酸序列。

在根据本发明的单链和双链形式多特异性抗体的一些实施方案中，再优选地，根据本发明的多特异性抗体包含如下的 TROP2 和 NECTIN4 抗原结合结构域组合：

(a) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 34 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列；或

(b) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列。

示例性多特异性抗体

在一些实施方案中，本发明提供了多特异性抗体，其中所述抗体为对称双链形式，且其中所述抗体的多肽链包含 SEQ ID NO: 53 或 54 的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，优选地包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本发明提供了多特异性抗体，其中所述抗体为不对称双链形式，且其中所述抗体包含选自下组的第一和第二多肽链：

(i) 分别包含 SEQ ID NOs: 55 和 56 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 57 和 58 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 59 和 60 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 61 和 62 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(v) 分别包含 SEQ ID NOs: 63 和 64 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(vi) 分别包含 SEQ ID NOs: 65 和 66 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(vii) 分别包含 SEQ ID NOs: 67 和 68 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(viii) 分别包含 SEQ ID NOs: 69 和 70 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(ix) 分别包含 SEQ ID NOs: 71 和 72 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(x) 分别包含 SEQ ID NOs: 73 和 74 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，和

(xi) 分别包含 SEQ ID NOs: 75 和 76 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸

序列的第一和第二多肽链，

优选地，所述第一和第二多肽链分别包含 SEQ ID NOs: 61/62、69/70 或 71/72 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本发明提供了多特异性抗体，其中所述抗体为单链形式，其中所述抗体的多肽链包含选自 SEQ ID NOs: 41-52 的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

本发明多特异性抗体的特性

本发明多特异性抗体可以具有以下一个或多个性质：

- (i) 以高亲合力(avidity)与共表达 TROP2 和 NECTIN4 的肿瘤细胞结合；
- (ii) 具有与食蟹猴 TROP2 和 NECTIN4 的物种交叉反应性；
- (iii) 具有 TROP2 和/或 NECTIN4 受体介导的内吞活性；
- (iv) 在 TROP2 和 NECTIN4 抗原共表达肿瘤细胞上呈现协同结合；
- (v) 在 TROP2 和 NECTIN4 抗原共表达肿瘤细胞上呈现协同内吞作用。

在一些方面，本发明的多特异性抗体对共表达 TROP2 和 NECTIN4 的肿瘤细胞具有高结合亲合力。可以通过 FACS 或 ELSA 测定(例如实施例中所测定的)，确定本发明抗体对 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性肿瘤细胞的结合 EC50 值和/或最大结合量，并任选地与参照抗体进行比较，来反映抗体的细胞结合亲合力。在一些实施方案中，相较于 TROP2 和 NECTIN4 单特异性结合分子，本发明的多特异性抗体对共表达 TROP2 和 NECTIN4 的肿瘤细胞呈现出协同结合作用。

在一些实施方案中，本发明多特异性抗体表现出对人和猴 TROP2 和 NECTIN4 的交叉反应性。在一些实施方案中，本发明抗体与人 TROP2 结合的 KD 值，与所述抗体与猴 TROP2 结合的 KD 值大约相当，例如，两者之 KD 比值在 1-10 之间，例如在 1-5 之间，更优选地大约 1-3 之间。在再一些实施方案中，所述抗体与人 TROP2 结合的 KD 值，与所述抗体与猴 TROP2 结合的 KD 值大约相当，例如，两者的 KD 比值(人/猴 KD 比值或猴/人 KD 比值)在 1-10 之间，例如 1-5 之间，更优选地大约 1-3 之间。在一些实施方案中，本发明抗体与人 NECTIN4 结合的 KD 值，与所述抗体与猴 NECTIN4 结合的 KD 值大约相当，例如，两者之 KD 比值在 1-5 之间，更优选地大约 1-3 之间。在再一些实施方案中，所述抗体与人 NECTIN4 结合的 KD 值，与所述抗体与猴 NECTIN4 结合的 KD 值大约相当，例如，两者的 KD 比值(人/猴 KD 比值或猴/人 KD 比值)在 1-10 之间，例如 1-5 之间，更优选地大约 1-3 之间。

在一些实施方案中，本发明多特异性抗体具有由 TROP2 和/或 NECTIN4 受体介导的内吞活性。可以在基于细胞的测定试验中，如在实施例所述的测定试验中，进行抗体的内吞活性评价。在一些实施方案中，在基于 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性细胞的测定试验中，将待测抗体与 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性细胞（尤其是 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性肿瘤细胞）在 37°C 孵育一段时间（例如，2 小时或 4 小时）后，相对于保持在 4°C 相同时间的阴性对照，通过流式细胞术，荧光检测细胞表面结合的抗体量的变化，以确定抗体的内吞和/或内吞率。在一些实施方案中，当与 TROP2 单特异性结合分子或 NECTIN4 单特异性结合分子相比较，由本发明的多特异性抗体介导的内化对共表达这两种靶标的肿瘤细胞显示出更大的选择性，由此，可以最小化抗体对不显示显著水平的 TROP2 和 NECTIN4 共表达或仅 TROP2 高表达，或仅 NECTIN4 高表达的正常组织中的不利影响。在一些实施方案中，相较于 TROP2 和 NECTIN4 单特异性结合分子，本发明的多特异性抗体对共表达 TROP2 和 NECTIN4 的肿瘤细胞呈现出协同内吞作用。

在再一些实施方案中，本发明的多特异性抗体还具有以下一个或多个特性：(iv) 良好的可开发性能；(v) 良好的稳定性；和(vi)有利的药代动力学性质。

在一些实施方案中，在采用蛋白 A 亲和层析从重组哺乳动物细胞产生的抗体产物中一步纯化后，根据

SEC-HPLC 测定, 本发明多特异性抗体可以达到 90%或 95%以上的纯度。

在再一些实施方案中, 本发明多特异性抗体具有良好的稳定性。在一些实施方案中, 按实施例的测定, 在室温放置 14 天后, 本发明抗体与储存前相比无抗原结合活性变化。

在再一些实施方案中, 本发明多特异性抗体具有血清稳定性。可以按实施例的动物试验, 测定抗体在动物体内的循环半衰期, 确定抗体的血清稳定性。

II. 本发明抗 Trop2 VHH 结构域和抗 Trop2 抗体

在第二方面, 本发明提供结合 Trop2 的抗 Trop2 VHH 结构域和包含所述 VHH 结构域的抗 Trop2 抗体。在一些实施方案中, 根据本发明的抗 Trop2 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列;

再优选地, 所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列:

- (i) 分别包含 SEQ ID NOs:6, 7 和 8 的氨基酸序列或由其组成;
- (ii) 分别包含 SEQ ID NOs:10, 11 和 12 的氨基酸序列或由其组成;
- (iii) 分别包含 SEQ ID NOs:14, 15 和 16 的氨基酸序列或由其组成; 或
- (iv) 分别包含 SEQ ID NOs:31, 32 和 33 的氨基酸序列或由其组成;

再优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列, 或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列,

最优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列, 或由选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列组成。

根据本发明的抗 Trop2 抗体可以包含或由根据本发明的抗 Trop2 VHH 结构域组成, 并可以具有任何适宜的抗体结构, 包括, 但不限于, 单链抗体或多链抗体、单特异性或多特异性抗体(例如双特异性抗体)、线性抗体、单域抗体、重链抗体、嵌合抗体或人源化抗体。在一些实施方案中, 根据本发明的抗 Trop2 抗体包含与所述 VHH 结构域连接的免疫球蛋白 Fc 区(即, 具有 VHH-Fc 形式)。在一些实施方案中, 根据本发明的抗 Trop2 抗体是重链抗体。在本文中, 术语“重链抗体(heavy-chain antibody, hcAb)”是指不具有轻链的抗体, 从 N 端到 C 端可以包含 VHH-CH2-CH3, 或可以包含 VHH-CH1-CH2-CH3; 其可以构成同型二聚体, 例如不具有轻链的重链二聚体抗体。在一些实施方案中, 根据本发明的抗 Trop2 抗体还包含抗 Nectin4 结合结构域, 并优选是前文第 I 章节中描述的根据本发明的抗 Trop2 和 NECTIN4 多特异性抗体。

根据本发明的抗 Trop2 VHH 结构域具有良好的肿瘤靶向性、肿瘤组织穿透能力和靶细胞内吞能力, 并具有人猴物种免疫交叉反应性。因此根据本发明的抗 Trop2 VHH 结构域或根据本发明的抗 Trop2 抗体可作为缀合物或偶联物的靶向模块, 并缀合或偶联诸如化疗剂, 毒素, 药物(如免疫治疗剂), 放射性元素, 探针或信号分子等, 以提供更好的肿瘤杀伤、免疫调节或疾病检测等应用。

III. 本发明抗 NETIN4 VHH 结构域和抗 NETIN4 抗体

在第三方面, 本发明提供结合 NECTIN4 的抗 NECTIN4 VHH 结构域和包含所述 VHH 结构域的抗 NECTIN4 抗体。在一些实施方案中, 根据本发明的抗 Nectin4 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列;

优选地, 所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列:

- (i) 分别包含 SEQ ID NOs:18、19 和 20 的氨基酸序列或由其组成;

- (ii) 分别包含 SEQ ID NOs:22、23 和 24 的氨基酸序列或由其组成；
- (iii) 分别包含 SEQ ID NOs:26、27 和 28 的氨基酸序列或由其组成；
- (iv) 分别包含 SEQ ID NOs:18、36 和 20 的氨基酸序列或由其组成；或
- (v) 分别包含 SEQ ID NOs:18、37 和 20 的氨基酸序列或由其组成；

再优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列，或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列，或由选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列组成。

根据本发明的抗 NECTIN4 抗体可以包含或由根据本发明的抗 Nectin4 VHH 结构域组成，并可以具有任何适宜的抗体结构，包括，但不限于，单链抗体或多链抗体、单特异性或多特异性抗体（例如双特异性抗体）、线性抗体、单域抗体、重链抗体、嵌合抗体或人源化抗体。在一些实施方案中，根据本发明的抗 NECTIN4 抗体包含与所述 VHH 结构域连接的免疫球蛋白 Fc 区（即，具有 VHH-Fc 形式）。在一些实施方案中，根据本发明的抗 NECTIN4 抗体是重链抗体。在一些实施方案中，根据本发明的抗 NECTIN4 抗体还包含抗 TROP2 结合结构域，并优选是前文第 I 章节中描述的根据本发明的抗 Trop2 和 NECTIN4 多特异性抗体。

根据本发明的抗 NECTIN4 VHH 结构域具有良好的肿瘤靶向性、肿瘤组织穿透能力和靶细胞内吞能力，并具有人猴物种免疫交叉反应性。因此根据本发明的抗 NECTIN4 VHH 结构域或根据本发明的抗 NECTIN4 抗体可作为缀合物或偶联物的靶向模块，并缀合或偶联诸如化疗剂，毒素，药物（如免疫治疗剂），放射性元素，探针或信号分子等，以提供更好的肿瘤杀伤、免疫调节或疾病检测等应用。

IV. 本发明抗体的生产和纯化

在第四方面，本发明提供用于生产本发明抗体的方法。为了产生本发明的抗体，可以例如通过固态肽合成(例如 Merrifield 固相合成)或重组生产获得本发明的抗体的多肽链，并在适宜条件下使其装配。

为了重组生产，可以将编码所述抗体的任意一条多肽链和/或多条多肽链的多核苷酸分离并插入一个或多个载体中以便进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。使用常规方法，可以轻易地分离所述多核苷酸并将其测序。在一个实施方案中，提供了编码本发明抗体的一条或多条多肽链的多核苷酸。在再一实施方案中，本发明提供了包含本发明的一种或多种多核苷酸的载体，优选地表达载体。因此，在一个实施方案中，本发明提供用于生产本发明抗体的方法，所述方法包括：在适于表达所述抗体的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的宿主细胞；和在适于所述多肽链装配为所述抗体的条件下使多肽链装配产生所述抗体。

可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体。表达载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、 λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

在一个实施方案中，本发明也提供了包含一种或多种本发明多核苷酸的宿主细胞。在一些实施方案中，提供了包含本发明表达载体的宿主细胞。合适的宿主细胞包括原核微生物，如大肠杆菌，真核微生物如丝状真菌或酵母，或各种真核细胞，如中国仓鼠卵巢巢细胞(CHO)、昆虫细胞等。可以使用适于悬浮培养的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子包括 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)、人胚肾系(HEK293 或 293F 细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝脏细胞(HepG2)、CHO 细胞、NSO 细胞、骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0 等。在一个优选的实施方案中，所述宿主细胞是 CHO 或 HEK293 细胞。

通过本文所述方法制备的抗体,可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。在纯化后,可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的抗体的纯度,所述熟知分析方法包括大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。可以通过本领域已知的多种测定法,鉴定、筛选或表征本文提供的抗体的物理/化学特性和/或生物学活性。

在一个优选的实施方案中,本发明抗体在哺乳动物宿主细胞例如 CHO 细胞中重组生产时表现出良好的生产性质,尤其是,良好的表达产量和良好的副产物谱。

V. 抗原结合分子、免疫融合物、免疫缀合物和抗体药物偶联物(ADC)

在第五方面,本发明提供通过将本发明抗体融合或缀合于异源分子而产生的抗原结合分子、免疫融合物或免疫缀合物。

在一个实施方案中,根据本发明的抗原结合分子包含至少一个(例如,1、2或3个)本文所描述的特异性结合 Trop2 的本发明 VHH^{Trop2} 结构域。在一个实施方案中,根据本发明的抗原结合分子包含至少一个(例如,1、2或3个)本文所描述的特异性结合 Nectin4 的本发明 VHH^{NECTIN4} 结构域。根据本发明的抗原结合分子可以是,包括但不限于,包含所述 VHH 结构域的单特异性或多特异性蛋白。作为一个示例,所述抗原结合分子是嵌合抗原受体。

在一个实施方案中,本发明提供了包含本发明抗体的免疫融合物。在根据本发明的免疫融合物的一个实施方案中,本发明的抗体(或其抗原结合片段)与异源肽或多肽分子直接或通过氨基酸肽接头连接。可以提及的异源肽或多肽包括但不限于,赋予该融合另一功能活性的蛋白或多肽、或利于免疫融合物纯化或检测的标签肽。

在一个实施方案中,本发明提供了包含本发明抗体或本发明抗原结合分子的免疫缀合物。在根据本发明的免疫缀合物的一个实施方案中,本发明的抗体(或其抗原结合片段)或本发明的抗原结合分子,与治疗剂或诊断剂或可检测剂缀合。在缀合物中,可以使用接头来共价连接缀合物的不同实体。适宜的接头包括化学接头或肽接头。有利地,接头是利于多肽在递送至靶位点后释放的“可裂解接头”。例如,可以使用酸不稳定性接头、肽酶敏感性接头、光不稳定性接头、二甲基接头或含二硫化物的接头。

在与治疗剂缀合的实施方案中,适用于缀合物的治疗剂包括但不限于细胞毒素(例如细胞生长抑制剂或细胞杀伤剂),药物或放射性同位素。

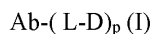
在与诊断剂或可检测剂缀合的实施方案中,这类缀合物可以作为临床检验方法的部分(如确定特定疗法的效力),用于监测或预测疾病或病症的发作、形成、进展和/或严重性。可以通过将抗体与可检测剂偶联实现这类诊断和检测,所述可检测剂包括但不限于多种酶,例如辣根过氧化物酶;辅基,例如链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;荧光物质;发光物质;放射性物质;和用于各种正电子发射成像术中的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

在一些实施方案中,适用于缀合物的治疗剂包括但不限于药物(例如抗肿瘤药物);在另一些实施方案中,适用于缀合物的诊断剂包括但不限于放射性诊断剂、荧光物质或发光物质。

抗体药物偶联物(ADC)

在一些优选的实施方案中,根据本发明的免疫缀合物是抗体药物偶联物(ADC)。

在一些实施方案中,本发明提供一种具有式(I)的抗体-药物偶联物:



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

其中:

Ab 是本发明的抗体或抗原结合分子，例如上述特异性结合 Trop2 和/或 Nectin4（例如人 Trop2 和/或人 Nectin4）的抗体或其片段（例如抗原结合片段）；

L 是连接子；

D 是药物，例如抗肿瘤化合物；并且

p 是选自 1 至 16 的整数，例如选自 1-10、1-9、2-8、4-10、6-8、3-7、4-6、2-6 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 12。在一些实施方案中，Ab 为根据本公开的结合 Trop2 和 Nectin4 的多特异性抗体。在一些特别优选的实施方案中，所述 Ab 为双链多特异性抗体，其中：

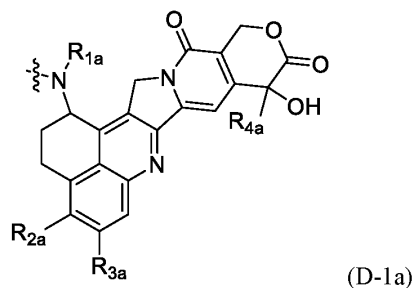
(a) 所述抗体为对称双链形式，且其中所述抗体的多肽链包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列或与之具有至少 90%、91%、92%、93%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列；或者

(b) 所述抗体为不对称双链形式，且其中所述抗体包含第一和第二多肽链，所述第一和第二多肽链分别含有 SEQ ID NOs: 61/62、69/70 或 71/72 的氨基酸序列、或与之具有至少 90%、91%、92%、93%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本发明式 (I) 中的 D 可以是任何抗肿瘤化合物，只要是具有抗肿瘤效果、且具有能连接于连接子结构的取代基、部分结构的化合物即可，没有特别限制。抗肿瘤化合物可以是对肿瘤有作用的药理学活性化合物。对于抗肿瘤性化合物而言，连接子的一部分或全部优选可在肿瘤细胞内被切断，游离出抗肿瘤性化合物部分，从而显示抗肿瘤效果。在与药物的连接部分切断连接子时，以未修饰的结构游离出抗肿瘤性化合物，可发挥其本来的抗肿瘤效果。

在一些实施方案中，抗肿瘤化合物可以是例如细胞毒性剂，例如喜树碱类化合物例如依喜替康 (Exatecan)、Dxd、澳瑞他汀类化合物例如单甲基澳瑞他汀 E(MMAE)。

在一些实施方案中，D 具有式 (D-1a) 或式 (D-1b) 所示结构：

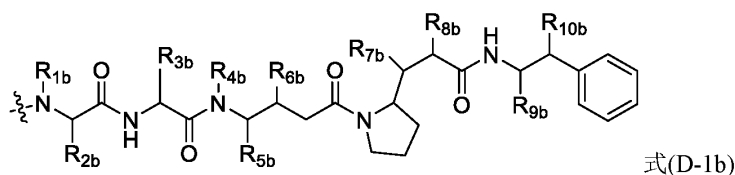


其中 R_{1a} 选自 H 和 C₁-C₆ 烷基；

R_{2a} 选自 H、卤素、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、-OR_{5a} 和 -SR_{5a}；

R_{3a} 选自 H、卤素、CN、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和 -OR_{5a}；且

R_{4a} 和 R_{5a} 独立地选自 H 和 C₁-C₄ 烷基；



其中 R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b} 和 R_{8b} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷基；优选 C₁₋₄ 烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；

R_{6b} 和 R_{7b} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷氧基，例如甲氧基、乙氧基或丙氧基；

R_{9b} 选自 C₁₋₈ 烷基和 COOH；优选 C₁₋₄ 烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；且

R_{10b} 选自 OH 和 H。

在一些实施方案中，R_{1a} 为 H；R_{2a} 为 C₁₋₆ 烷基；R_{3a} 为卤素，优选为-F；R_{4a} 为 C₁₋₄ 烷基，优选为乙基。

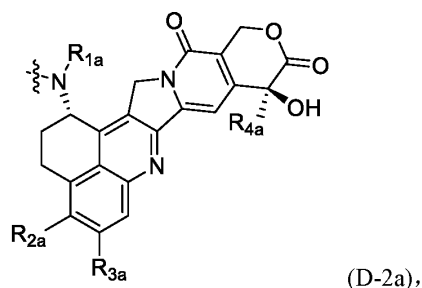
在一些实施方案中，R_{1b}、R_{4b} 和 R_{8b} 各自独立地选自 C₁₋₂ 烷基；优选甲基；

R_{2b}、R_{3b} 和 R_{5b} 各自独立地选自 C₃₋₄ 烷基；

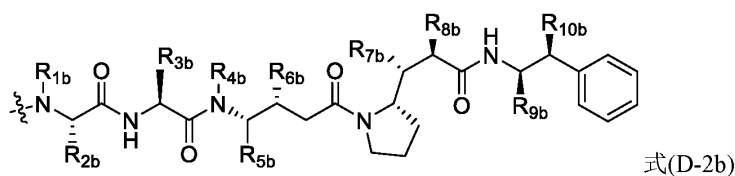
R_{6b} 和 R_{7b} 各自独立地选自 C₁₋₂ 烷氧基；且

R_{9b} 选自 C₁₋₄ 烷基且 R_{10b} 为 OH；或 R_{9b} 为 COOH 且 R_{10b} 为 H。

在一些实施方案中，D 具有式(D-2a)或式(D-2b)所示的结构：

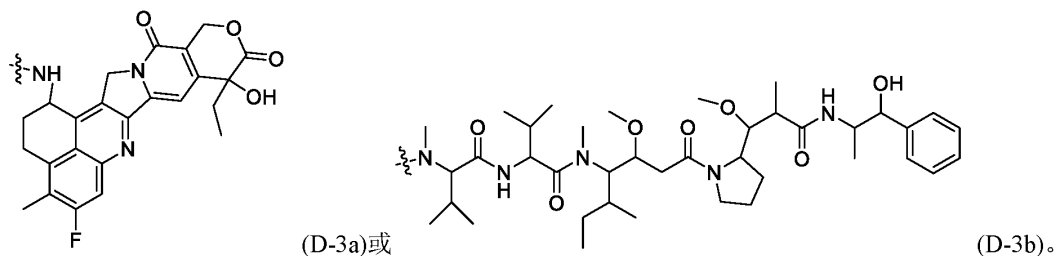


其中 R_{1a}、R_{2a}、R_{3a} 和 R_{4a} 如上所定义；或

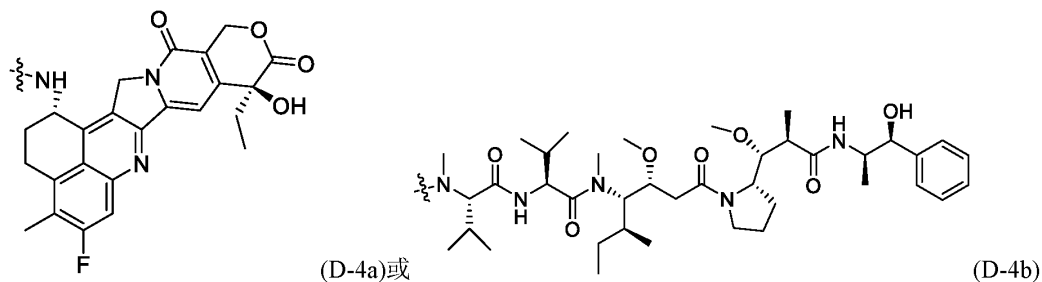


其中 R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b}、R_{6b}、R_{7b}、R_{8b}、R_{9b} 和 R_{10b} 如上所定义。

在一些实施方案中，D 具有式(D-3a)或(D-3b)所示的结构：

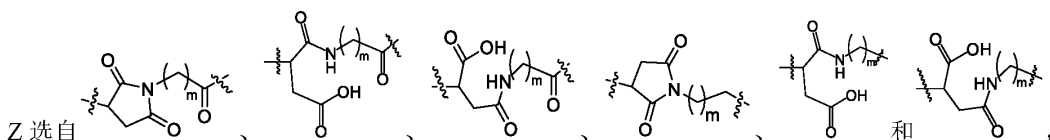


在一些实施方案中，D 具有式(D-4a)或(D-4b)所示的结构：

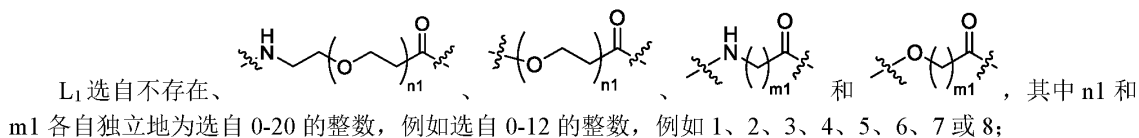


在一些实施方案中，-L-具有如下结构：-Z-L₁-L₂-L₃-

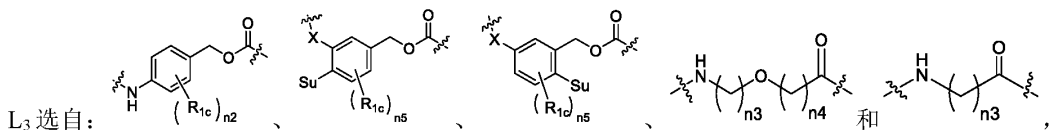
其中



其中 m 独立地为选自 1-10 的整数，例如为 1、2、3、4、5、6、7 或 8；



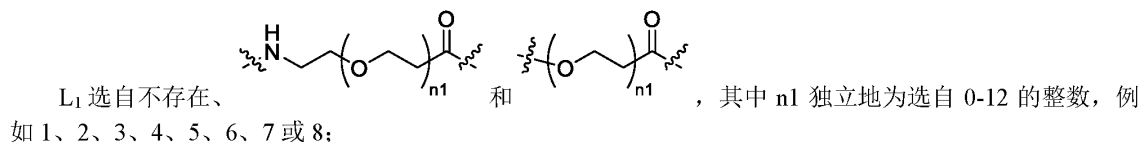
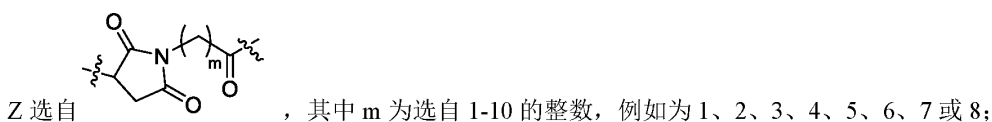
L₂ 是氨基酸残基或由 2-8 个氨基酸构成的肽残基；且



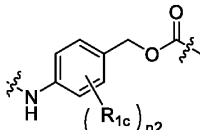
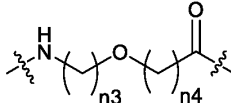
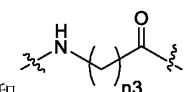
其中 X 选自 -NH-、-O- 和 -S-；R_{1c} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 卤代烷基、C₁₋₈ 烷氧基、卤素、硝基和氰基；Su 各自独立地选自戊糖、戊糖醛酸、己糖和己糖醛酸；n₂ 为 0、1、2、3 或 4；n₅ 为 0、1、2 或 3；n₃ 和 n₄ 独立地为 1、2、3、4、5 或 6；

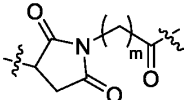
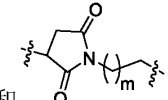
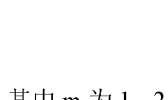
应当理解，上述 -Z-L₁-L₂-L₃- 中，Z 与 Ab 上的 S 连接，L₃ 与 D 连接。

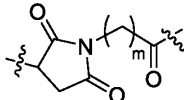
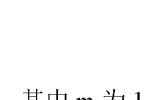
在一些实施方案中，

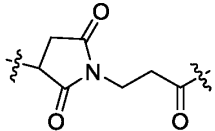
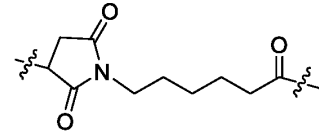
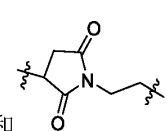


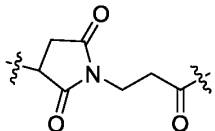
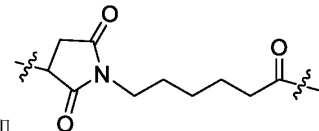
L₂ 是由 2-8 个氨基酸构成的肽残基；且

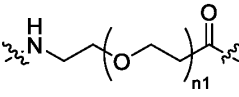
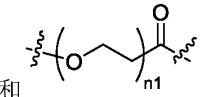
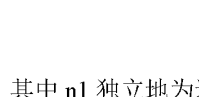

L₃选自：
 和 ，其中 R_{1c}选自：H 和 C₁-C₆ 烷基； n₂ 为 1、2、3 或 4；且 n₃ 和 n₄ 独立地为 1、2、3、4、5 或 6。

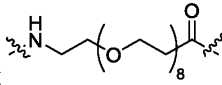

在一些实施方案中，Z 选自  和 ，其中 m 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8。


在一些实施方案中，Z 选自 ，其中 m 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8。


在一些实施方案中，Z 选自  和 。


在一些实施方案中，Z 选自  和 。


在一些实施方案中，L₁ 选自不存在、
 和 ，其中 n₁ 独立地为选自 0-12 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8。


在一些实施方案中，L₁ 是不存在或 。

在一些实施方案中，其中 L₂ 是氨基酸残基或由 2、3、4、5、6、7 或 8 个氨基酸构成的肽残基。

在一些实施方案中，L₂ 是由 2、3、4、5、6 或 7 个氨基酸构成的肽残基。

在一些实施方案中，L₂ 是氨基酸残基或由 2、3 或 4 个氨基酸构成的肽残基。

构成 L₂ 的氨基酸没有特别限制，例如为 L-或 D-氨基酸，优选为 L-氨基酸。另外，除了 α-氨基酸之外，还可以是 β-丙氨酸、ε-氨基己酸、γ-氨基丁酸等结构的氨基酸，此外，也可以是例如经 N-甲基化的氨基酸等非天然型的氨基酸。

在一些实施方案中，所述氨基酸残基或构成所述肽残基的氨基酸各自独立地选自甘氨酸(Gly)、缬氨酸

(Val)、丙氨酸(Ala)、赖氨酸(Lys)、瓜氨酸(Cit)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、异亮氨酸(Ile)、精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、甲硫氨酸(Met)、色氨酸(Trp)、半胱氨酸(Cys)、组氨酸(His)和苏氨酸(Thr)，其中所述氨基酸残基或氨基酸任选被一个或多个 C₁₋₆ 烷基取代。

在一些实施方案中，所述氨基酸残基或构成所述肽残基的氨基酸各自独立地选自甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、赖氨酸(Lys)、瓜氨酸(Cit)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、精氨酸(Arg)和苏氨酸(Thr)。

在一些实施方案中，所述氨基酸残基或构成所述肽残基的氨基酸各自独立地选自甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、苯丙氨酸(Phe)、谷氨酸(Glu)和瓜氨酸(Cit)。

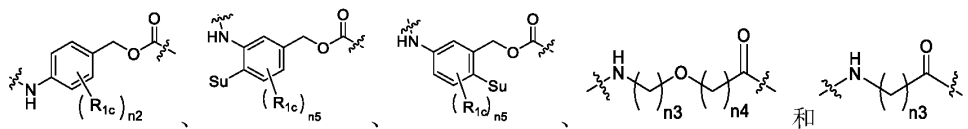
在一些实施方案中，L₂ 选自 -Ala-、-Val-、-Gly-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Cit-和 -Glu-Val-Cit-。

在一些实施方案中，L₂ 选自 -Gly-、-Val-Ala-和 -Gly-Gly-Phe-Gly-。

在一些实施方案中，L₂ 选自 -Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Cit-和 -Glu-Val-Cit-。

应当理解，L₂ 通过左侧氨基酸的氨基与 L₁ 或 Z 连接，通过右侧氨基酸的羧基与 L₃ 连接，这与下面的解释相一致。

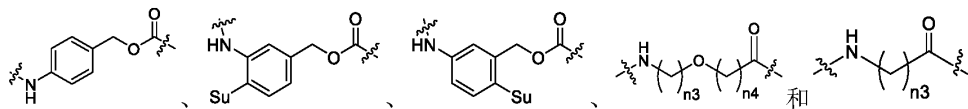
在一些实施方案中，L₃ 选自：



其中 R_{1c} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 卤代烷基、C₁₋₈ 烷氧基、卤素、硝基和氰基；Su 各自独立地

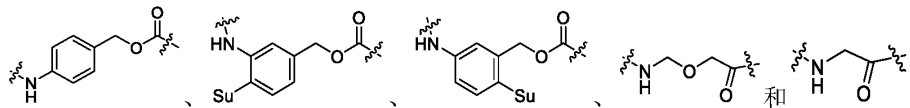
选自 ；n₂ 为 0、1、2、3 或 4；n₅ 为 0、1、2 或 3；和 n₃ 和 n₄ 独立地为 1、2、3、4、5 或 6。

在一些实施方案中，L₃ 选自：



其中各变量如本文所定义。

在一些实施方案中，L₃ 选自：

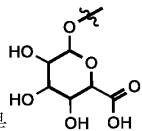


其中各变量如本文所定义。

在一些实施方案中，L₃ 选自：，其中各变量

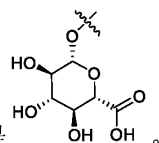
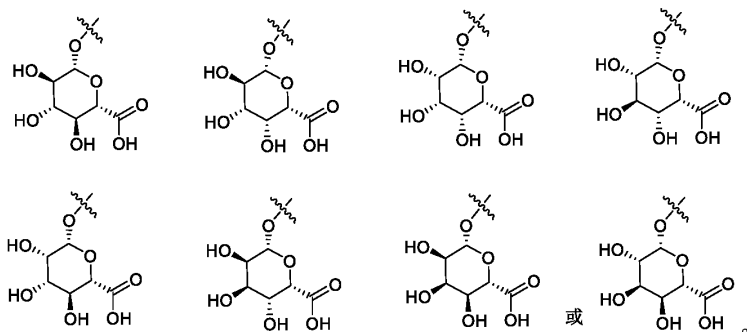
如本文所定义。

在一些实施方案中，Su 选自木糖、阿拉伯糖、木糖醛酸、阿拉伯糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸和甘露糖醛酸。

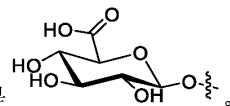


在一些实施方案中，Su 是

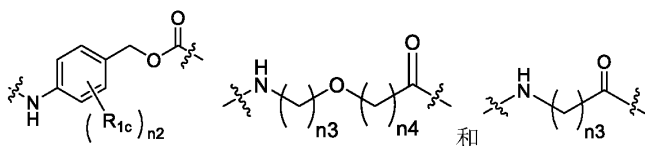
在一些实施方案中，Su 各自独立地是：



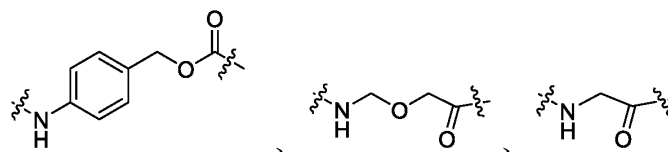
在一些实施方案中，Su 各自独立地是



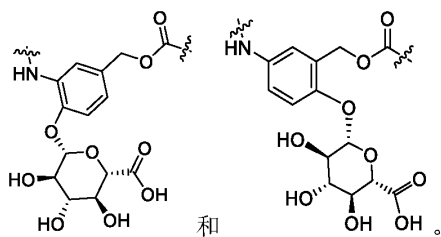
在一些实施方案中，Su 各自独立地是



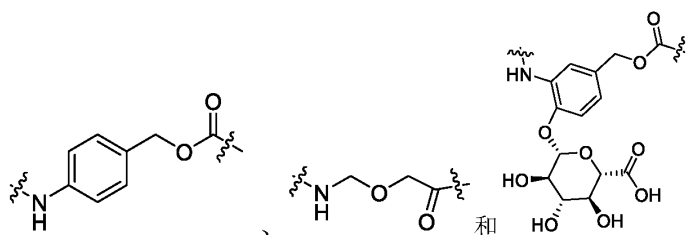
在一些实施方案中，L₃ 选自：
选自：H 和 C₁-C₆ 烷基； n₂ 为 1、2、3 或 4； n₃ 和 n₄ 独立地为 1、2、3、4、5 或 6。



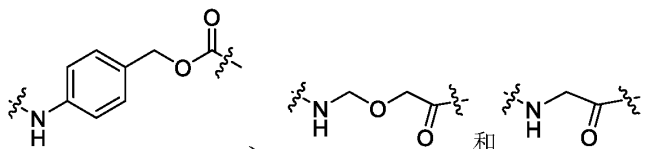
在一些实施方案中，L₃ 选自：



在一些实施方案中，L₃选自：

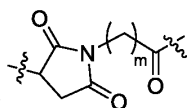


在一些实施方案中，L₃选自：



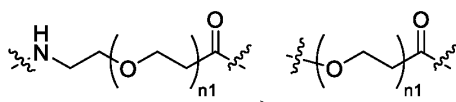
应当理解，L₃通过左侧的氨基与L₂连接，通过右侧的羰基与D连接，这与下面的解释相一致。

在一些实施方案中，Z选自



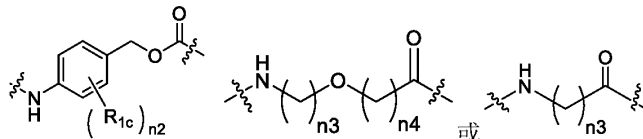
，其中m为1、2、3、4、5、6、7或8；

L₁选自不存在、



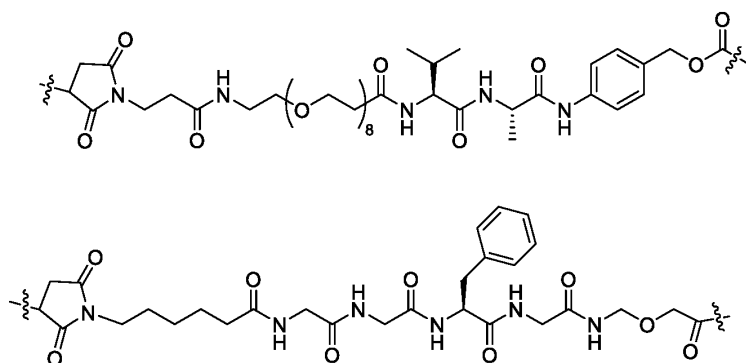
，其中n₁独立地为选自0-12的整数；且

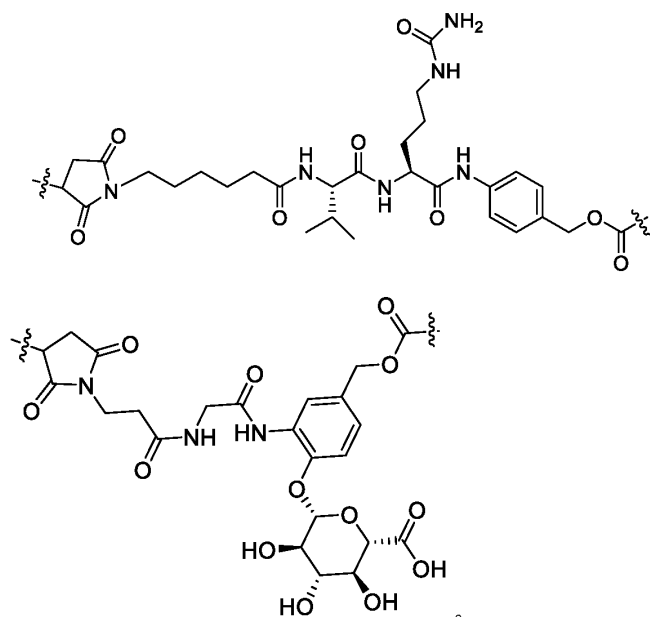
L₃选自：



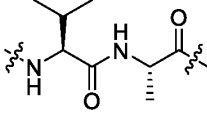
基；n₂为1、2、3或4；n₃和n₄独立地为1、2、3、4、5或6。

在一些实施方案中，-Z-L₁-L₂-L₃-选自如下结构





应当理解, 在没有特别说明且根据上下文不矛盾的情况下, 对于本发明的 ADC, 本文所示的二价基团的左侧的键与 Ab 或靠近 Ab 端的基团连接, 所述二价基团的右侧的键与 D 或靠近 D 端的基团连接。例如,

当 L_2 为  时, 其中左侧的氨基与 L_1 连接, 右侧的羧基与 L_3 连接;

在一些实施方案中, 所述抗体-药物偶联物具有 2-10、6-10、4-8、7-9 或 2-4 的平均 DAR。

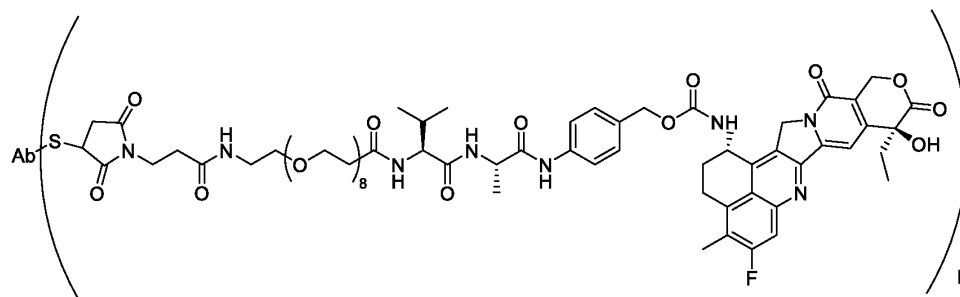
在一些实施方案中, 式(I)如式(I')所示,

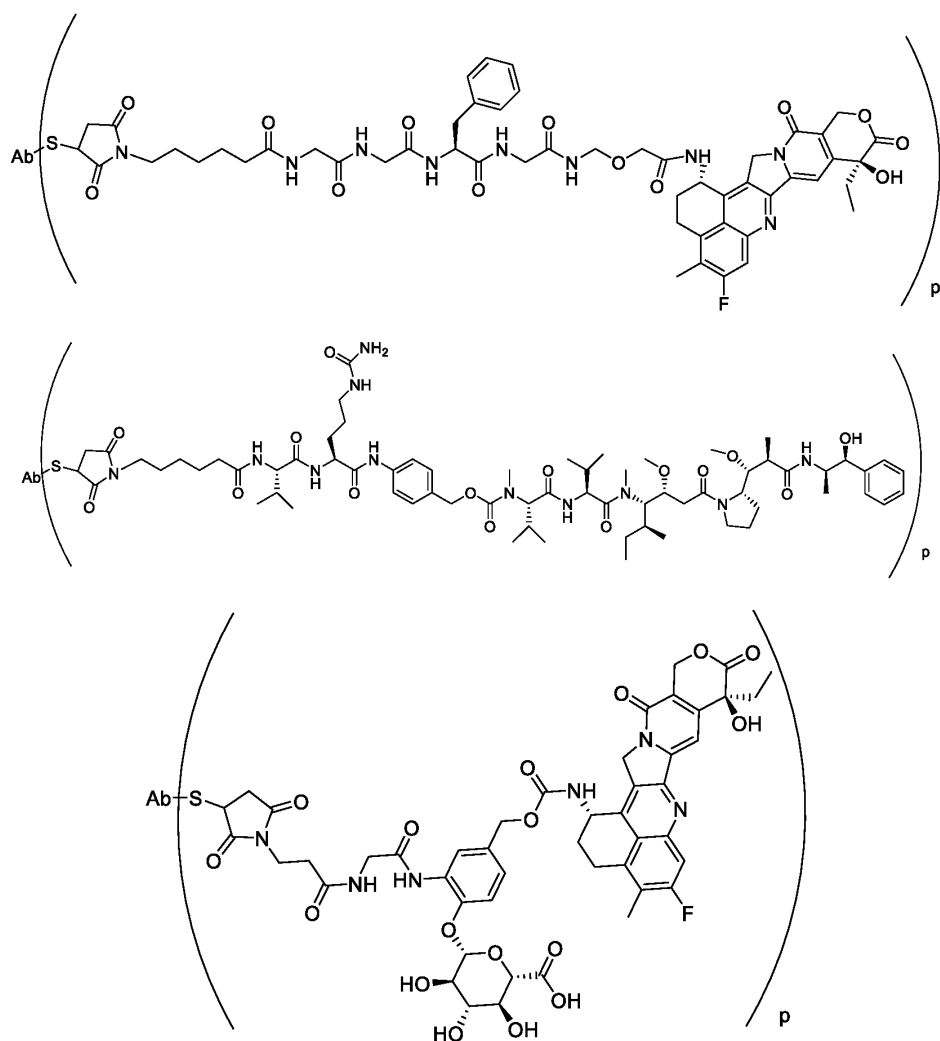


其中 Ab、L、D 和 p 如上文对式(I)所定义;

应当理解, 式(I')中的 S 是来自抗体 Ab 的硫。

在一些实施方案中, 所述抗体-药物偶联物选自





其中 Ab 是本发明的抗体，优选 V-15、V-hu-21、V-hu-23 或 V-hu-24；p 如上所定义，优选地，所述抗体-药物偶联物具有例如 2-10、6-10、4-8、7-9 或 2-4 的平均 DAR。

应当理解，以上 ADC 中与 Ab 相连接的 S 原子来自于抗体 Ab。Ab 在还原剂例如 TCEP 作用下打开二硫键，生成巯基-SH，然后与连接子的末端官能团例如马来酰亚胺部分连接。

VI. 药物组合物、药物联合和试剂盒

在一个方面，本发明提供了组合物，例如，药物组合物，所述组合物包含与可药用载体配制在一起的本文所述的抗体。如本文所用，“可药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。本发明的药物组合物适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、直肠、脊髓或表皮施用(例如，通过注射或输注)。在一些实施方案中，本发明抗体或本发明免疫缀合物或免疫融合物是药物组合物中的唯一活性成分。在另一些实施方案中，药物组合物可以包含本文所述的抗体或本发明免疫缀合物或免疫融合物与一种以上治疗剂。

在另一方面，本发明也提供包含本文所述的抗体或本发明免疫缀合物或免疫融合物与一种以上治疗剂的药物联合。

适用于本发明的药物组合物和药物联合中的治疗剂可以为选自以下类别(i)-(iv)任一类别的治疗剂：(i)增强抗原呈递(例如，肿瘤抗原呈递)的药物；(ii)增强效应细胞反应(例如，B细胞和/或T细胞活化和/或动员)的药物；(iii)减少免疫抑制的药物；(iv)具有抑制肿瘤作用的药物。

本发明的药物组合物可以包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明所述抗体。“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量等变动治疗有效量。治疗有效量是任何有毒或有害作用不及治疗有益作用的量。相对于未治疗的受试者，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤生长率)至少约20%、更优选地至少约40%、甚至更优选地至少约60%和仍更优选地至少约80%。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价本发明的抗体抑制可度量参数(例如，肿瘤体积)的能力。“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在受试者中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量小于治疗有效量。

包含本文所述抗体的试剂盒也处于本发明的范围内。试剂盒可以包含一个或多个其他要素，例如包括：使用说明书；其他试剂，例如标记物或用于偶联的试剂；可药用载体；和用于施用至受试者的装置或其他材料。

VII. 用途和方法

基于本发明抗体或本发明免疫缀合物或融合物对于表达TROP2和/或NECTIN4的肿瘤细胞的良好靶向性以及上述其他优良性质，本发明也提供了本发明抗体或本发明免疫缀合物或融合物和在TROP2和/或NECTIN4相关疾病治疗和预防中的应用和方法。

TROP2和NECTIN4在多种来源的癌组织细胞表面过表达，因此是适用于开发癌症免疫疗法的合适靶点。在一个方面，因此，本发明提供了，本发明免疫缀合物或偶联物或其可药用盐或溶剂化物以及本发明抗体或其抗原结合片段用于在受试者中预防和/或治疗TROP2和/或NECTIN4阳性肿瘤(例如癌症)的应用。在所述应用中，本发明的免疫缀合物或偶联物或其可药用盐或溶剂化物、或本发明的抗体或抗原结合片段可以作为唯一活性剂施用于受试者，或可以与其它疗法或治疗剂联合施用于受试者。所述的其它疗法和治疗剂包括，例如，靶向肿瘤细胞表面的抗原，通过结合和/或阻断这些分子而消灭肿瘤的药物；激活受试者的免疫系统，促使其自发消灭肿瘤的药物。

在再一个方面，本发明也提供了在受试者中预防或治疗TROP2和/或NECTIN4阳性肿瘤(例如癌症)的方法，包括向有需要的受试者施用本发明的免疫缀合物或偶联物或其可药用盐或溶剂化物、或向有需要的受试者施用本发明的抗体或其抗原结合片段。

适用于本发明方法和应用的TROP2和/或NECTIN4阳性肿瘤可以选自各种实体瘤。

应用TCGA肿瘤转录组数据，在来自人肿瘤患者的临床病理样本上进行的表达水平相关性分析(皮尔逊相关性分析)，已经揭示，TROP2和NECTIN4蛋白在多种人类肿瘤组织中的表达模式。呈TROP2和NECTIN4双阳性表达趋势的肿瘤类型包括，但不限于，膀胱癌(例如，BLCA(Bladder Urothelial Carcinoma, 膀胱尿路上皮癌))；宫颈癌(例如，CESC(Cervical squamous cell carcinoma, 宫颈鳞癌和腺癌))；头颈癌(例如，HNSC(Head and neck squamous cell carcinoma, 头颈部鳞状细胞癌))；肺癌(例如，LUSC(Lung Squamous Cell Carcinoma, 肺鳞状细胞癌)和LUAD(Lung Adenocarcinoma, 肺腺癌))；乳腺癌(例如，BRCA(Breast Invasive Carcinoma, 乳腺浸润癌))；胰腺癌(例如，PAAD(Pancreatic adenocarcinoma))；食管癌(例如，ESCA(Esophageal carcinoma, 食管腺癌))；前列腺癌(例如，PRAD(Prostate adenocarcinoma))；胆管癌(例如，CHOL(Cholangiocarcinoma))；子宫内膜样癌(例如，UCEC(Uterine Corpus Endometrial Carcinoma))；甲状腺癌(例如，THCA(Thyroid carcinoma))；卵巢癌(例如，OV(Ovarian serous cystadenocarcinoma, 卵巢浆液性囊腺癌))；结直肠癌(例如，COAD(Colon adenocarcinoma, 结肠癌)和READ(Rectum adenocarcinoma, 直肠癌))；和胃癌(例如，STAD(Stomach adenocarcinoma))。参见图26。这些癌症类型均在本公开的考虑之列。

在一些实施方案中，用于本发明方法和应用的肿瘤选自：尿路上皮癌；膀胱癌(例如，BLCA)；宫颈癌(例如，CESC)；头颈癌(例如，HNSC)；肺癌(例如，LUSC 和 LUAD)；乳腺癌(例如，BRCA)；胰腺癌(例如，PAAD)；食管癌(例如，ESCA)；前列腺癌(例如，PRAD)；胆管癌(例如，CHOL)；子宫内膜样癌(例如，UCEC)；甲状腺癌(例如，THCA)；卵巢癌(例如，OV)；结直肠癌(例如，COAD 和 READ)；和胃癌(例如，STAD)。

在一些实施方案中，用于本发明方法和应用的肿瘤选自：宫颈癌、子宫内膜癌、头颈癌(例如头颈鳞状细胞癌)、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、胃癌、膀胱癌(例如肌浸润性膀胱癌)、甲状腺癌、卵巢癌、肺癌(例如非小细胞肺癌)、结直肠癌和尿路上皮癌(例如转移性尿路上皮癌)。

适用于本发明方法和应用的 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性肿瘤可以是处于早期、中期或晚期或是转移性的癌。此外，适用于本发明方法和应用的 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性肿瘤可以是先前接受过治疗而发生免疫逃逸的肿瘤。

在一些实施方案中，根据本发明方法治疗的 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性肿瘤具有至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%的 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性细胞。可以通过免疫组织化学，评估肿瘤活检物上的 TROP2 和/或 NECTIN4 表达水平。已经在多种癌症活检物上检测到高的 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性细胞百分比，例如，膀胱癌。

优选地，在一些实施方案中，根据本发明的方法用于治疗具有高百分比的 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性细胞的肿瘤，例如，具有至少 25%、50%、75%或 100%的 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性细胞的肿瘤。在一些实施方案中，本发明方法在所述癌症中的应用，诱导肿瘤消退。

在一些实施方案中，根据本发明的方法也可以用于治疗 TROP2 和/或 NECTIN4 阳性细胞百分比低于 25%或 20% 的癌症。在一些实施方案中，本发明方法在所述癌症中的应用，导致肿瘤生长抑制。

在本发明方法的上述任何一个实施方案中，根据本发明的抗体或其结合片段和根据本发明的免疫缀合物或偶联物或其可药用盐或溶剂化物的施用，可以包括 1)治疗性措施，该措施治愈、减缓、减轻经诊断的病理状况或疾患的症状及/或停止该经诊断的病理状况或疾患的进展；或 2)预防性或防范性措施，该措施预防及/或减缓病理状况或疾患的发展。因此，在本发明的方法中，受试者可以是，已罹患疾患的个体、易于罹患疾患的个体，或欲预防疾患的个体。所述个体将受益于所述的治疗性措施或预防性措施，并相比于未接受所述处理的个体，表现出在疾病、病症、病状、和/或症状的发生、复发或发展上的减轻或改善。在一些实施方案中，本发明涉及疾病或病症的治疗；在另一些实施方案中，本发明涉及疾病或病症的预防。

根据本发明的抗体或其结合片段和根据本发明的免疫缀合物或其可药用盐或溶剂化物，以及任选地与之联用的其他治疗剂，可以通过任何合适的方法给药，包括肠胃外给药，肿瘤内给药和鼻内给药。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。本文中涵盖各种用药时程，包括，但不限于，单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

为了预防或治疗疾病，根据本发明的抗体或其结合片段和根据本发明的免疫缀合物或偶联物或其可药用盐或溶剂化物的合适剂量(当单独或与一种或多种其他的治疗剂组合使用时)，将取决于待治疗疾病的类型、所用药物的具体类型、疾病的严重性和进程、所述药物是以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答，和主治医师的判断力。

在一些实施方案中，本发明也提供本发明的免疫缀合物或偶联物或其可药用盐或溶剂化物以及本发明的抗体或抗体片段用作药物或用于制备药物的用途。在一些实施方案中，所述药物为用于前述治疗和预防方法的药物。

VIII. 本发明的 ADC 分子的制备

本发明的另一个方面提供了一种应用本发明的抗体制备 ADC 的方法。本发明中的“ADC”被定义为通

过连接子(L)偶联至具有生物学和/药学活性的活性物质(D)的抗体。所述方法包括将本发明的抗体(Ab)通过一个或多个本发明定义的连接子(L)偶联至一个或多个的活性物质D上。优选地,连接子-活性物质位点特异性偶联至抗体。

在一些实施方案中,所述方法包括制备用于ADC的Ab,其包含在适合Ab或其链表达的条件下,培养包含编码所述Ab(例如任意一条多肽链和/或多条多肽链)的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞,如上文所提供的,和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述Ab。

在一些实施方案中,所述方法包括如下步骤:

- (a) 将抗体Ab加入缓冲溶液中,加入还原剂,然后进行孵育;
- (b) 向步骤(a)中的反应溶液中加入连接子-有效载荷进行偶联,获得粗产物;和
- (c) 任选地将粗产物进行纯化得到本发明的抗体药物偶联物;

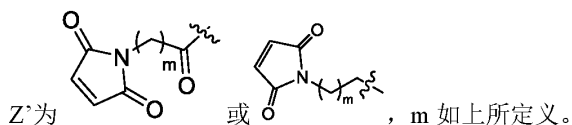
其中Ab如上所定义。

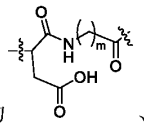
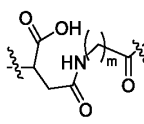
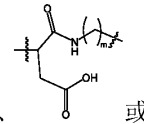
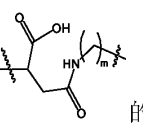
应当理解,所述连接子-有效载荷与Ab反应提供式I化合物中的-L-D部分,在-L-D清楚定义的情况下,根据现有技术,可以确定连接子-有效载荷的结构。

在一些实施方案中,步骤a)的缓冲溶液为PBS缓冲液,优选地,其pH为5.0-9.0,例如6.0-8.0。

在一些实施方案中,步骤a)的还原剂为TCEP。

在一些实施方案中,连接子-有效载荷具有如下结构: $Z'-L_1-L_2-L_3-D$, 其中 L_1 、 L_2 、 L_3 、D如上所定义,



在一些实施方案中,对于合成其中Z为 , ,  或  的ADC的方法,其还包含另外的使马来酰亚胺开环的水解步骤。

在一些实施方案中,所述步骤在实施例公开的条件下进行。

应当指出的是,实施例中公开的具体反应条件的范围或具体值浮动100%、80%、60%、40%、20%或10%得到的实施方案也在本发明的考虑中。

在一个方面,本发明还提供了如下A组实施方案:

A1. 一种结合Trop2和Nectin-4的多特异性抗体,其中所述抗体包含至少一个特异性结合Trop2的抗原结合结构域和至少一个特异性结合Nectin-4的抗原结合结构域。

A2. 实施方案A1的多特异性抗体,其中所述抗体具有选自以下的一项或多项特征:

- (a) 所述Trop2和Nectin-4抗原结合结构域分别为VHH结构域;
- (b) 所述Trop2和Nectin-4抗原结合结构域的抗原结合亲和力 K_D 值分别为 50×10^{-8} M至 0.5×10^{-8} M;
- (c) 所述抗体中Trop2抗原结合结构域与Nectin-4抗原结合结构域的价数比为1:1或1:2;以及
- (d) 所述抗体为三价或四价双特异性抗体。

A3. 实施方案 A1-A2 的多特异性抗体, 其中: 特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域为 VHH 结构域, 且

其中, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列;

再优选地, 所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列:

- (i) 分别包含 SEQ ID NOs: 6, 7 和 8 的氨基酸序列或由其组成;
- (ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 10, 11 和 12 的氨基酸序列或由其组成;
- (iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 14, 15 和 16 的氨基酸序列或由其组成; 或
- (iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 31, 32 和 33 的氨基酸序列或由其组成;

再优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列, 或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列,

最优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列, 或由选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列组成。

A4. 实施方案 A1-A3 的多特异性抗体, 其中: 特异性结合 Nectin-4 的抗原结合结构域为 VHH 结构域, 且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列;

再优选地, 所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列:

- (i) 分别包含 SEQ ID NOs: 18, 19 和 20 的氨基酸序列或由其组成;
- (ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 22, 23 和 24 的氨基酸序列或由其组成;
- (iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 26, 27 和 28 的氨基酸序列或由其组成;
- (iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 18, 36 和 20 的氨基酸序列或由其组成; 或
- (v) 分别包含 SEQ ID NOs: 18, 37 和 20 的氨基酸序列或由其组成;

再优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列, 或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列,

最优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列, 或由选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列组成。

A5. 实施方案 A1-A4 的多特异性抗体, 其中所述抗体还包含:

(a) 半衰期延长结构域, 优选地, 所述半衰期延长结构域选自血清白蛋白结合性肽和免疫球蛋白 Fc 区; 和/或

(b) 连接子, 优选地, 所述连接子为 5-15 个氨基酸长度, 更优选地, 所述连接子包含氨基酸序列 $(G_4S)_n$, 其中 $n=1, 2$ 或 3 。

A6. 实施方案 A1-A5 的多特异性抗体, 其中所述抗体为包含至少一个(优选 1 或 2 个)Nectin4 结合结

构域以及至少一个(优选 1 个或 2 个)Trop2 结合结构域的单链或双链抗体。

A7. 实施方案 A1-A6 的多特异性抗体, 其中所述抗体包含两条相同的多肽链, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE-(VHH^A)_{n3}-(VHH^B)_{n4}$.

其中 $n1, n2, n3$ 和 $n4$ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数, 且优选地 $n3$ 和 $n4$ 为 0, $n1$ 和 $n2$ 均为 1;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区; 其中符号“-”表示通过连接子连接或直接连接。

A8. 实施方案 A7 的多特异性抗体, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH^A-VHH^B-HLE , 且其中 VHH^A 表示 Nectin4 结合结构域且 VHH^B 表示 Trop2 结合结构域。

A9. 实施方案 A1-A6 的多特异性抗体, 其中所述抗体包含两条不同的多肽链, 其中:

第一多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE-(VHH^A)_{n3}-(VHH^B)_{n4}$.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^B)_{m1}-(VHH^A)_{m2}-HLE-(VHH^B)_{m3}-(VHH^A)_{m4}$.

其中 $n1, n2, n3$ 和 $n4$ 以及 $m1, m2, m3$ 和 $m4$ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数, 且优选地其中 $n3, n4, m3$ 和 $m4$ 为 0, 且 $n1+m2=1$ 或 2, $n2+m1=1$ 或 2, 再优选地 $m1=0$ 且 $m2=1$ 或 $m2=0$ 且 $m1=1$;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区, 且优选地包含 knob-into-hole 突变; 其中符号“-”表示通过连接子连接或直接连接。

A10. 实施方案 A9 的多特异性抗体, 其中:

第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH^A-VHH^B-HLE .

第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH^A-HLE .

且其中 VHH^A 表示 Nectin4 结合结构域且 VHH^B 表示 Trop2 结合结构域。

A11. 实施方案 A7-A11 的多特异性抗体, 其中所述免疫球蛋白 Fc 区为来自 IgG 的 Fc 区, 例如, 来自人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区, 优选所述 Fc 区包含降低或消除所述 Fc 区与 FcγR 的结合作用的突变。

A12. 实施方案 A1-A6 的多特异性抗体, 其中所述抗体包含单条多肽链, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-(HLE)_{n3}-(VHH^A)_{n4}-(VHH^B)_{n5}-(HLE)_{n6}$.

其中 $n1, n2, n3, n4, n5$ 和 $n6$ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数, 且优选地 $n1+n4=1$ 或 2, $n2+n5=1$ 或 2, 且 $n3+n6=0$ 或 1;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的血清白蛋白结合性肽; 其中符号“-”表示通过连接子连接或直接连接,

优选地, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含:

(i) VHH^A-VHH^B ,

(ii) VHH^A-VHH^B-HLE ,

(iii) $VHH^B-VHH^A-VHH^B$,

(iv) $VHH^A-VHH^B-VHH^B$,

(v) VHH^A-HLE-VHH^B-VHH^B, 或

(vi) VHH^A-VHH^A-HLE-VHH^B-VHH^B, 其中优选地 A 表示 Trop2 且 B 表示 Nectin4,

再优选地, 所述 HLE 表示抗血清白蛋白 VHH 结构域, 任选地选自 SEQ ID NOs: 39 和 40 的氨基酸序列、或与其具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

A13. 实施方案 A1-A12 的多特异性抗体, 其中:

(a) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列;

(b) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列;

(c) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列;

(d) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 29 和 30 的氨基酸序列; 或

(e) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 34 和 38 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 29 和 30 的氨基酸序列。

A14. 实施方案 A1-A6 的多特异性抗体, 其中所述抗体为双链形式, 其中:

(a) 所述抗体为对称双链形式, 且其中所述抗体的多肽链包含 SEQ ID NO: 53 或 54 的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 优选地包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列; 或者

(b) 所述抗体为不对称双链形式, 且其中所述抗体包含选自下组的第一和第二多肽链:

(i) 分别包含 SEQ ID NOs: 55 和 56 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 57 和 58 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 59 和 60 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 61 和 62 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(v) 分别包含 SEQ ID NOs: 63 和 64 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(vi) 分别包含 SEQ ID NOs: 65 和 66 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(vii) 分别包含 SEQ ID NOs: 67 和 68 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(viii) 分别包含 SEQ ID NOs: 69 和 70 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸

序列的第一和第二多肽链,

(ix) 分别包含 SEQ ID NOs: 71 和 72 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(x) 分别包含 SEQ ID NOs: 73 和 74 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链, 和

(xi) 分别包含 SEQ ID NOs: 75 和 76 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

优选地, 所述第一和第二多肽链分别包含 SEQ ID NOs: 61/62、69/70 或 71/72 的氨基酸序列。

A15. 实施方案 A1-A6 的多特异性抗体, 其中所述抗体为单链形式, 其中所述抗体的多肽链包含选自 SEQ ID NOs: 41-52 的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

A16. 一种抗 Trop2 抗体, 其包含特异性结合 Trop2 的 VHH 结构域, 且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列;

再优选地, 所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列:

(i) 分别包含 SEQ ID NOs:6, 7 和 8 的氨基酸序列或由其组成;

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs:10, 11 和 12 的氨基酸序列或由其组成;

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs:14, 15 和 16 的氨基酸序列或由其组成; 或

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs:31, 32 和 33 的氨基酸序列或由其组成;

再优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列, 或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列,

最优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列, 或由选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列组成。

A17. 一种抗 Necti-4 抗体, 其包含特异性结合 Nectin-4 的 VHH 结构域, 且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列;

优选地, 所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列:

(i) 分别包含 SEQ ID NOs:18、19 和 20 的氨基酸序列或由其组成;

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs:22、23 和 24 的氨基酸序列或由其组成;

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs:26、27 和 28 的氨基酸序列或由其组成;

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs:18、36 和 20 的氨基酸序列或由其组成; 或

(v) 分别包含 SEQ ID NOs:18、37 和 20 的氨基酸序列或由其组成;

再优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列, 或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地

1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列,

最优选地,所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列,或由选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列组成。

A18. 多核苷酸,其编码实施方案 A1-A17 任一项所述的抗体。

A19. 载体,优选地表达载体,其包含实施方案 A18 的多核苷酸。

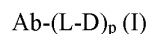
A20. 宿主细胞,其包含实施方案 A18 所述的多核苷酸或实施方案 A19 所述的载体,例如,所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

A21. 用于生产实施方案 A1-A17 任一项所述的抗体的方法,所述方法包括:

在适于表达所述抗体的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的宿主细胞;和在适于所述多肽链装配为所述抗体的条件下使多肽链装配产生所述抗体。

A22. 包含实施方案 A1-A17 任一项所述的抗体的免疫缀合物或免疫融合物。

A23. 根据实施方案 A22 所述的免疫缀合物,其为式(I)所示的抗体-药物偶联物:



或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

其中:

Ab 是实施方案 A1-A17 中任一项所述的抗体;

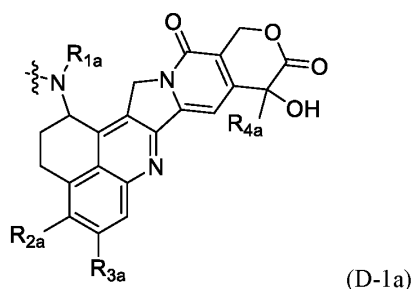
L 是接头;

D 是药物,优选抗肿瘤化合物;并且

p 是选自 1 至 16 的整数,例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

A24. 根据实施方案 A23 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中所述抗肿瘤化合物是细胞毒性剂,例如喜树碱类化合物、澳瑞他汀类化合物,例如依喜替康、Dxd 或 MMAE。

A25. 根据实施方案 A23 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中 D 具有式 (D-1a)或式(D-1b)所示结构:



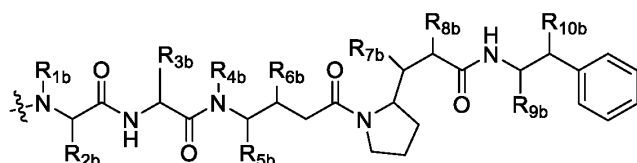
其中 R_{1a} 选自 H 和 C₁-C₆ 烷基;

R_{2a} 选自 H、卤素、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、-OR_{5a} 和 -SR_{5a};

R_{3a} 选自 H、卤素、CN、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和 -OR_{5a}; 且

R_{4a} 和 R_{5a} 独立地选自 H 和 C₁-C₄ 烷基;

或



式(D-1b)

其中 R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b} 和 R_{8b} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷基；例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；

R_{6b} 和 R_{7b} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷氧基，例如甲氧基、乙氧基或丙氧基；

R_{9b} 选自 C₁₋₈ 烷基和 COOH；例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；且

R_{10b} 选自 OH 和 H。

A26. 根据实施方案 A25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中

R_{1a} 为 H；R_{2a} 为 C₁₋₆ 烷基；R_{3a} 为卤素，优选为-F；R_{4a} 为 C₁₋₄ 烷基，优选为乙基；

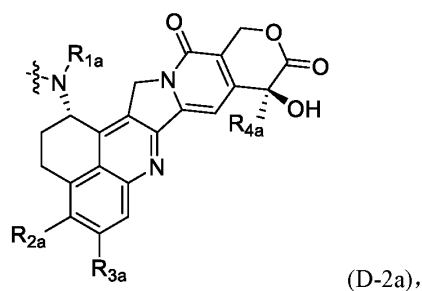
R_{1b}、R_{4b} 和 R_{8b} 各自独立地选自 C₁₋₂ 烷基；优选甲基；

R_{2b}、R_{3b} 和 R_{5b} 各自独立地选自 C₃₋₄ 烷基；

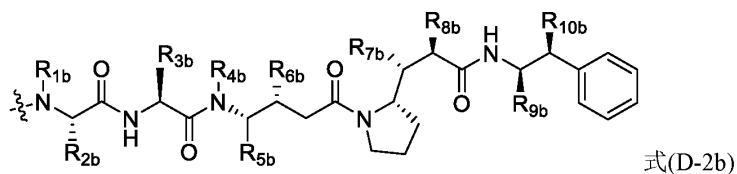
R_{6b} 和 R_{7b} 各自独立地选自 C₁₋₂ 烷氧基；且

R_{9b} 选自 C₁₋₄ 烷基且 R_{10b} 为 OH；或 R_{9b} 为 COOH 且 R_{10b} 为 H。

A27. 根据实施方案 A25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式 (D-2a)或式(D-2b)所示的结构：

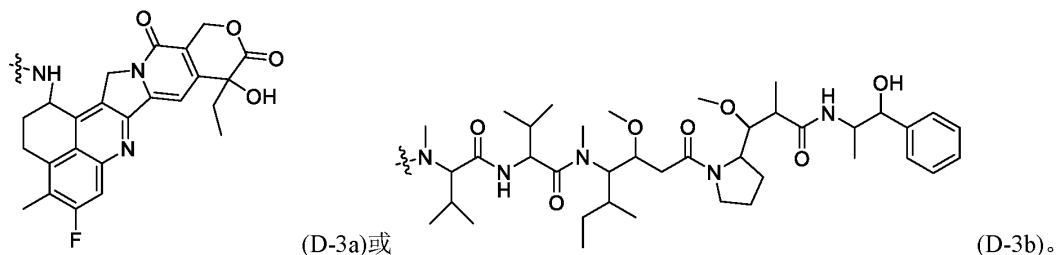


其中 R_{1a}、R_{2a}、R_{3a} 和 R_{4a} 如实施方案 A25 或 A26 中所定义；

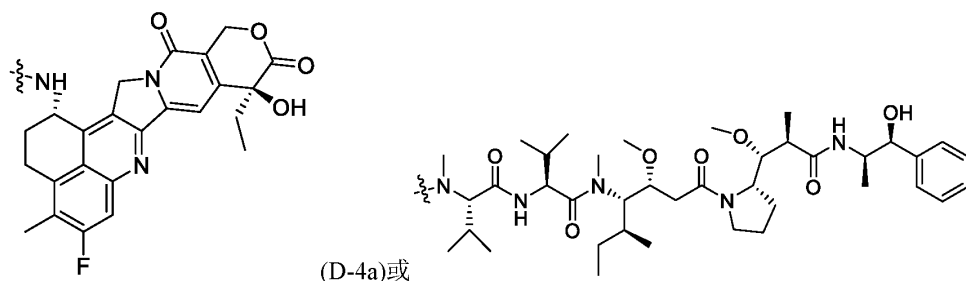


其中 R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b}、R_{6b}、R_{7b}、R_{8b}、R_{9b} 和 R_{10b} 如实施方案 A25 或 A26 中所定义。

A28. 根据实施方案 A25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其中 D 具有式 (D-3a)或(D-3b)所示的结构:



A29. 根据实施方案 A25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其中 D 具有式 (D-4a)或(D-4b)所示的结构:



A30、 根据实施方案 A23-A29 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其中-L-具有如下结构 -Z-L₁-L₂-L₃-

其中



L₁ 选自不存在、、 其中 n₁ 独立地为选自 0-12 的整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8;

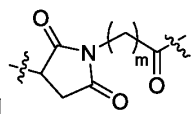
L₂ 是由 2-8 个氨基酸构成的肽残基; 且

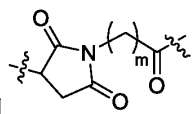
L₃ 选自:或或 , 其中 R_{1c} 选自: H 和 C₁-C₆ 烷基; n₂ 为 1、2、3 或 4; 且 n₃ 和 n₄ 独立地为 1、2、3、4、5 或 6。

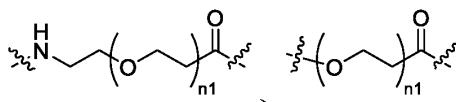
A31. 根据实施方案 A30 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

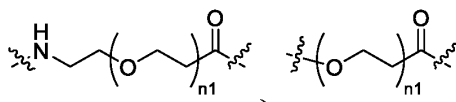
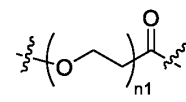
其中 L₂ 是由 2、3、4、5、6 或 7 个氨基酸构成的肽残基。

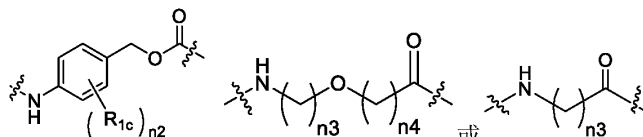
A32、根据实施方案 A31 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

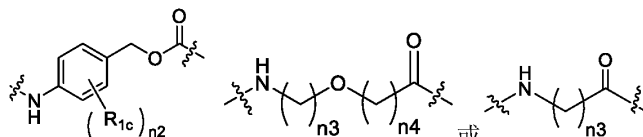


其中，Z 选自 ，其中 m 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8；

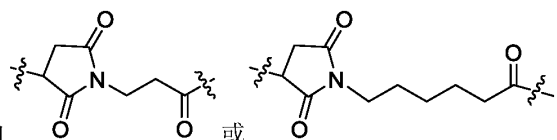


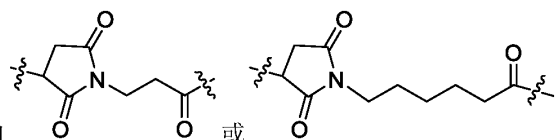
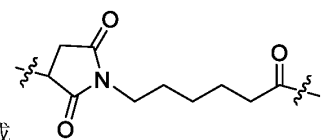
L₁ 选自不存在、、，其中 n₁ 独立地为选自 0-12 的整数；且

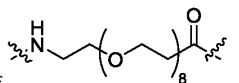


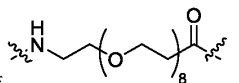
L₃ 选自：，其中 R_{1c} 选自：H 和 C₁-C₆ 烷基；n₂ 为 1、2、3 或 4；n₃ 和 n₄ 独立地为 1、2、3、4、5 或 6。

A33、根据实施方案 A31 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

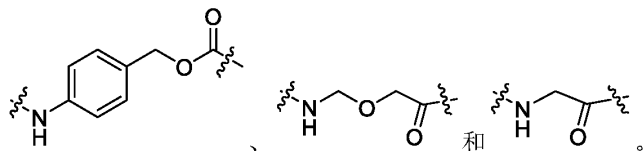


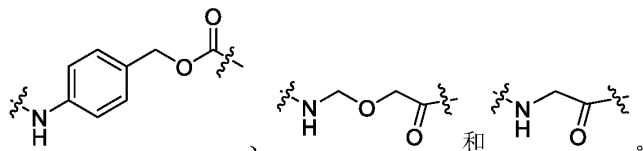
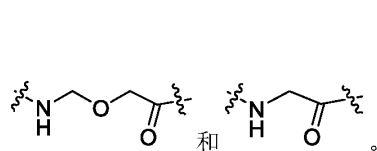
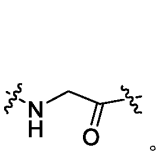
Z 选自  或 ；



L₁ 选自不存在或 ；

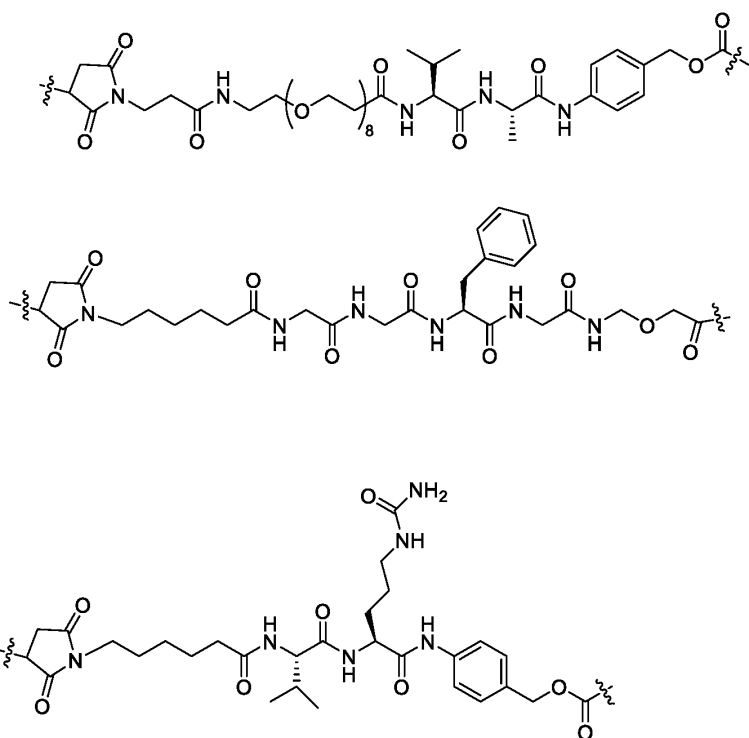
L₂ 选自 -Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Cit- 和 -Glu-Val-Cit-；且



L₃ 选自：、 和 。

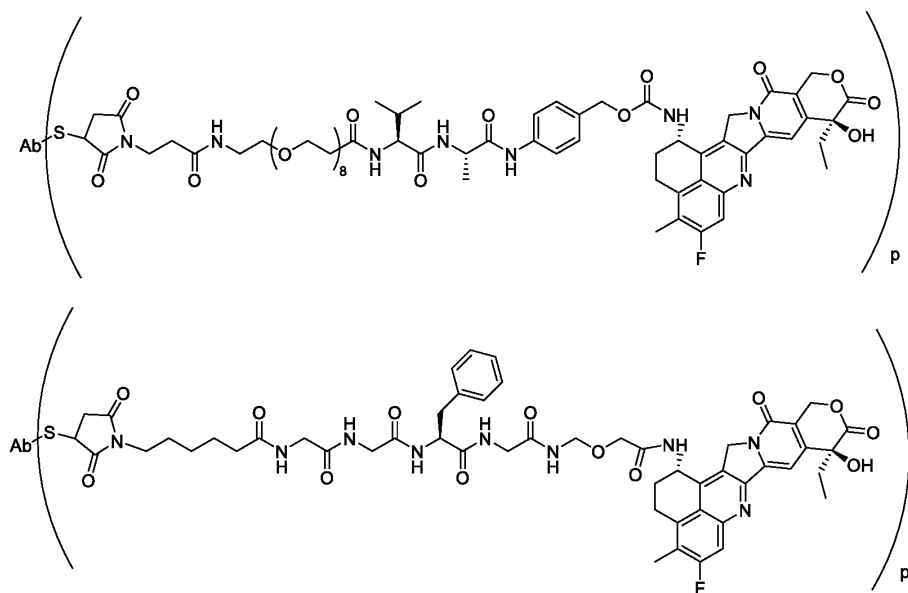
A34、根据实施方案 A31 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

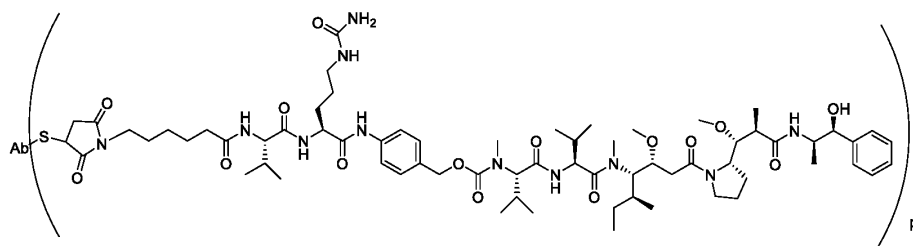
其中 -Z-L₁-L₂-L₃- 选自如下结构



A35、根据实施方案 A23-A34 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其具有 2-10 例如 4-8 的平均 DAR 值。

A36、根据实施方案 A23 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体-药物偶联物选自





其中 Ab 和 p 如实施方案 A23 所定义，

优选地，Ab 优选为双链抗体，其中：

- (a) 所述抗体为对称双链形式，且其中所述抗体的多肽链包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列；或者
- (b) 所述抗体为不对称双链形式，且其中所述抗体包含分别含有 SEQ ID NOs: 61/62、69/70 或 71/72 的氨基酸序列的第一和第二多肽链；

优选地，所述抗体-药物偶联物具有 2-10 或 4-8 的平均 DAR。

A37. 药物组合物，其包含实施方案 A1-A17 任一项所述的抗体或实施方案 A22-A36 的免疫缀合物或免疫融合物和可药用载体。

A38. 实施方案 A1-A17 任一项所述的抗体或实施方案 A22-A36 的免疫缀合物或免疫融合物用作药物或用于制备药物的用途。

A39. 实施方案 A38 的用途，其中所述药物用于在个体中治疗和 / 或预防癌症，其中所述癌症为 Trop2 和 Nectin-4 双阳性实体瘤，优选地所述肿瘤具有至少 40% 细胞呈现 Trop2 和 Nectin-4 双阳性高水平表达。

在一个方面，本发明还提供了如下 B 组实施方案：

B1. 一种结合 Trop2 和 Nectin-4 的多特异性抗体，其中所述抗体包含至少一个特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域和至少一个特异性结合 Nectin-4 的抗原结合结构域。

B2. 实施方案 B1 的多特异性抗体，其中所述抗体具有选自以下的一项或多项特征：

- (a) 所述 Trop2 和 Nectin-4 抗原结合结构域分别为 VHH 结构域；
- (b) 所述 Trop2 和 Nectin-4 抗原结合结构域的抗原结合亲和力 K_D 值分别为 50×10^{-8} M 至 0.5×10^{-8} M；
- (c) 所述抗体中 Trop2 抗原结合结构域与 Nectin-4 抗原结合结构域的价数比为 1:1 或 1:2；以及
- (d) 所述抗体为三价或四价双特异性抗体。

B3. 实施方案 B1-B2 的多特异性抗体，其中：特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域为 VHH 结构域，且

其中，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列；

再优选地，所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列：

- (i) 分别包含 SEQ ID NOs: 6, 7 和 8 的氨基酸序列或由其组成；

- (ii) 分别包含 SEQ ID NOs:10, 11 和 12 的氨基酸序列或由其组成;
- (iii) 分别包含 SEQ ID NOs:14, 15 和 16 的氨基酸序列或由其组成; 或
- (iv) 分别包含 SEQ ID NOs:31, 32 和 33 的氨基酸序列或由其组成;

再优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列, 或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列,

最优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列, 或由选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列组成。

B4. 实施方案 B1-B3 的多特异性抗体, 其中: 特异性结合 Nectin-4 的抗原结合结构域为 VHH 结构域, 且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列;

再优选地, 所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列:

- (i) 分别包含 SEQ ID NOs:18、19 和 20 的氨基酸序列或由其组成;
- (ii) 分别包含 SEQ ID NOs:22、23 和 24 的氨基酸序列或由其组成;
- (iii) 分别包含 SEQ ID NOs:26、27 和 28 的氨基酸序列或由其组成;
- (iv) 分别包含 SEQ ID NOs:18、36 和 20 的氨基酸序列或由其组成; 或
- (v) 分别包含 SEQ ID NOs:18、37 和 20 的氨基酸序列或由其组成;

再优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列, 或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列,

最优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列, 或由选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列组成。

B5. 实施方案 B1-B4 的多特异性抗体, 其中所述抗体还包含:

(a) 半衰期延长结构域, 优选地, 所述半衰期延长结构域选自血清白蛋白结合性肽和免疫球蛋白 Fc 区; 和/或

(b) 连接子, 优选地, 所述连接子为 5-15 个氨基酸长度, 更优选地, 所述连接子包含氨基酸序列(G4S)_n, 其中 n=1、2 或 3。

B6. 实施方案 B1-B5 的多特异性抗体, 其中所述抗体为包含至少一个(优选 1 或 2 个)Nectin4 结合结构域以及至少一个(优选 1 个或 2 个)Trop2 结合结构域的单链或双链抗体。

B7. 实施方案 B1-B6 的多特异性抗体, 其中所述抗体包含两条相同的多肽链, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含: (VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE-(VHH^A)_{n3}-(VHH^B)_{n4}.

其中 n1, n2, n3 和 n4 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数, 且优选地 n3 和 n4 为 0, n1 和 n2 均为 1;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区; 其中符号“-”表示

通过连接子连接或直接连接。

B8. 实施方案 B7 的多特异性抗体, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH^A - VHH^B -HLE, 且其中 VHH^A 表示 Nectin4 结合结构域且 VHH^B 表示 Trop2 结合结构域。

B9. 实施方案 B1-B6 的多特异性抗体, 其中所述抗体包含两条不同的多肽链, 其中:

第一多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^A)_{n1}$ -(VHH^B) $_{n2}$ -HLE-(VHH^A) $_{n3}$ -(VHH^B) $_{n4}$.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^B)_{m1}$ -(VHH^A) $_{m2}$ -HLE-(VHH^B) $_{m3}$ -(VHH^A) $_{m4}$.

其中 $n1, n2, n3$ 和 $n4$ 以及 $m1, m2, m3$ 和 $m4$ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数, 且优选地其中 $n3, n4, m3$ 和 $m4$ 为 0, 且 $n1+m2=1$ 或 2, $n2+m1=1$ 或 2, 再优选地 $m1=0$ 且 $m2=1$ 或 $m2=0$ 且 $m1=1$;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区, 且优选地包含 knob-into-hole 突变; 其中符号“-”表示通过连接子连接或直接连接。

B10. 实施方案 B9 的多特异性抗体, 其中:

第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH^A - VHH^B -HLE.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH^A -HLE.

且其中 VHH^A 表示 Nectin4 结合结构域且 VHH^B 表示 Trop2 结合结构域。

B11. 实施方案 B7-B11 的多特异性抗体, 其中所述免疫球蛋白 Fc 区为来自 IgG 的 Fc 区, 例如, 来自人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区, 优选所述 Fc 区包含降低或消除所述 Fc 区与 $Fc\gamma R$ 的结合作用的突变。

B12. 实施方案 B1-B6 的多特异性抗体, 其中所述抗体包含单条多肽链, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^A)_{n1}$ -(VHH^B) $_{n2}$ -(HLE) $_{n3}$ -(VHH^A) $_{n4}$ -(VHH^B) $_{n5}$ -(HLE) $_{n6}$.

其中 $n1, n2, n3, n4, n5$ 和 $n6$ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数, 且优选地 $n1+n4=1$ 或 2, $n2+n5=1$ 或 2, 且 $n3+n6=0$ 或 1;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的血清白蛋白结合性肽; 其中符号“-”表示通过连接子连接或直接连接,

优选地, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含:

(i) VHH^A - VHH^B ,

(ii) VHH^A - VHH^B -HLE,

(iii) VHH^B - VHH^A - VHH^B ,

(iv) VHH^A - VHH^B - VHH^B ,

(v) VHH^A -HLE- VHH^B - VHH^B , 或

(vi) VHH^A - VHH^A -HLE- VHH^B - VHH^B , 其中优选地 A 表示 Trop2 且 B 表示 Nectin4,

再优选地, 所述 HLE 表示抗血清白蛋白 VHH 结构域, 任选地选自 SEQ ID NOs: 39 和 40 的氨基酸序列、或与其具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

B13. 实施方案 B1-B12 的多特异性抗体，其中：

(a) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列；

(b) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列；

(c) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列；

(d) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 29 和 30 的氨基酸序列；或

(e) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 34 和 38 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 29 和 30 的氨基酸序列。

B14. 实施方案 B1-B6 的多特异性抗体，其中所述抗体为双链形式，其中：

(a) 所述抗体为对称双链形式，且其中所述抗体的多肽链包含 SEQ ID NO: 53 或 54 的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，优选地包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列；或者

(b) 所述抗体为不对称双链形式，且其中所述抗体包含选自下组的第一和第二多肽链：

(i) 分别包含 SEQ ID NOs: 55 和 56 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 57 和 58 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 59 和 60 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 61 和 62 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(v) 分别包含 SEQ ID NOs: 63 和 64 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(vi) 分别包含 SEQ ID NOs: 65 和 66 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(vii) 分别包含 SEQ ID NOs: 67 和 68 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(viii) 分别包含 SEQ ID NOs: 69 和 70 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(ix) 分别包含 SEQ ID NOs: 71 和 72 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

(x) 分别包含 SEQ ID NOs: 73 和 74 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，和

(xi) 分别包含 SEQ ID NOs: 75 和 76 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链，

优选地，所述第一和第二多肽链分别包含 SEQ ID NOs: 61/62、69/70 或 71/72 的氨基酸序列。

B15. 实施方案 B1-B6 的多特异性抗体，其中所述抗体为单链形式，其中所述抗体的多肽链包含选自 SEQ ID NOs: 41-52 的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

B16. 一种抗 Trop2 抗体，其包含特异性结合 Trop2 的 VHH 结构域，且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列；

再优选地，所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列：

(i) 分别包含 SEQ ID NOs:6, 7 和 8 的氨基酸序列或由其组成；

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs:10, 11 和 12 的氨基酸序列或由其组成；

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs:14, 15 和 16 的氨基酸序列或由其组成；或

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs:31, 32 和 33 的氨基酸序列或由其组成；

再优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列，或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列，或由选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29 和 30 的氨基酸序列组成。

B17. 一种抗 Necti-4 抗体，其包含特异性结合 Nectin-4 的 VHH 结构域，且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列；

优选地，所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列：

(i) 分别包含 SEQ ID NOs:18、19 和 20 的氨基酸序列或由其组成；

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs:22、23 和 24 的氨基酸序列或由其组成；

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs:26、27 和 28 的氨基酸序列或由其组成；

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs:18、36 和 20 的氨基酸序列或由其组成；或

(v) 分别包含 SEQ ID NOs:18、37 和 20 的氨基酸序列或由其组成；

再优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列，或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列，或由选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35 和 38 的氨基酸序列组成。

B18. 多核苷酸，其编码实施方案 B1-B17 任一项所述的抗体。

B19. 载体，优选地表达载体，其包含实施方案 B18 的多核苷酸。

B20. 宿主细胞，其包含实施方案 B18 所述的多核苷酸或实施方案 B19 所述的载体，例如，所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

B21. 用于生产实施方案 B1-B17 任一项所述的抗体的方法，所述方法包括：

在适于表达所述抗体的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的宿主细胞；和在适于所述多肽链装配为所述抗体的条件下使多肽链装配产生所述抗体。

B22. 包含实施方案 B1-B17 任一项所述的抗体的免疫缀合物或免疫融合物。

B23. 根据实施方案 B22 所述的免疫缀合物，其为式(I)所示的抗体-药物偶联物：



或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

其中：

Ab 是实施方案 B1-B17 中任一项所述的抗体；

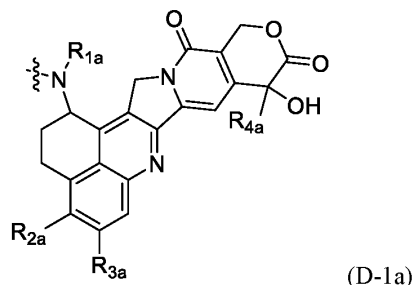
L 是接头；

D 是药物，优选抗肿瘤化合物；并且

p 是选自 1 至 16 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

B24. 根据实施方案 B23 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗肿瘤化合物是细胞毒性剂，例如喜树碱类化合物、奥瑞他汀类化合物，例如依喜替康、Dxd 或 MMAE。

B25. 根据实施方案 B23 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式 (D-1a)或式(D-1b)所示结构：



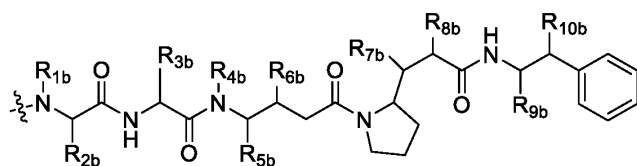
其中 R_{1a} 选自 H 和 C₁-C₆ 烷基；

R_{2a} 选自 H、卤素、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、-OR_{5a} 和 -SR_{5a}；

R_{3a} 选自 H、卤素、CN、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和 -OR_{5a}；且

R_{4a} 和 R_{5a} 独立地选自 H 和 C₁-C₄ 烷基；

或



式(D-1b)

其中 R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b} 和 R_{8b} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷基；例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；

R_{6b} 和 R_{7b} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷氧基，例如甲氧基、乙氧基或丙氧基；

R_{9b} 选自 C₁₋₈ 烷基和 COOH；例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；且

R_{10b} 选自 OH 和 H。

B26. 根据实施方案 B25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中

R_{1a} 为 H；R_{2a} 为 C₁₋₆ 烷基；R_{3a} 为卤素，优选为-F；R_{4a} 为 C₁₋₄ 烷基，优选为乙基；

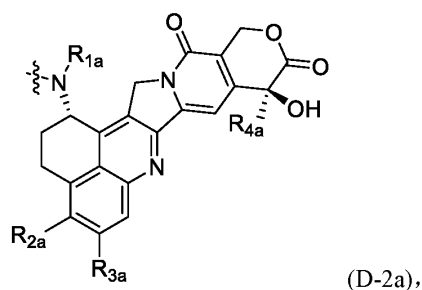
R_{1b}、R_{4b} 和 R_{8b} 各自独立地选自 C₁₋₂ 烷基；优选甲基；

R_{2b}、R_{3b} 和 R_{5b} 各自独立地选自 C₃₋₄ 烷基；

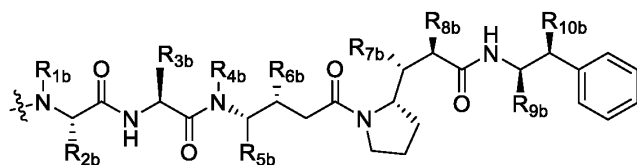
R_{6b} 和 R_{7b} 各自独立地选自 C₁₋₂ 烷氧基；且

R_{9b} 选自 C₁₋₄ 烷基且 R_{10b} 为 OH；或 R_{9b} 为 COOH 且 R_{10b} 为 H。

B27. 根据实施方案 B25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式 (D-2a)或式(D-2b)所示的结构：

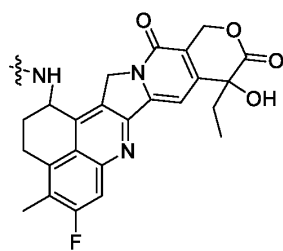


其中 R_{1a}、R_{2a}、R_{3a} 和 R_{4a} 如实施方案 B25 或 B26 中所定义；

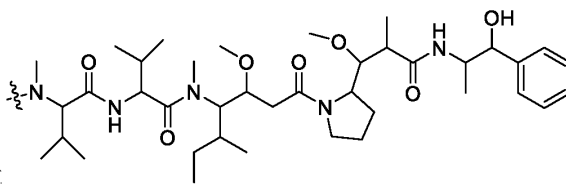


其中 R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b}、R_{6b}、R_{7b}、R_{8b}、R_{9b} 和 R_{10b} 如实施方案 B25 或 B26 中所定义。

B28. 根据实施方案 B25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式 (D-3a)或(D-3b)所示的结构：

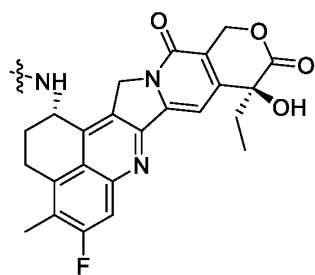


(D-3a)或

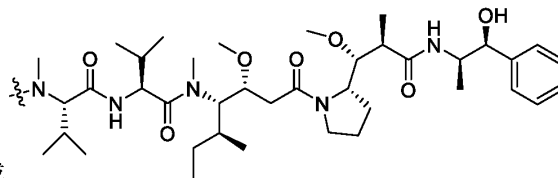


(D-3b)。

B29. 根据实施方案 B25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式 (D-4a)或(D-4b)所示的结构：



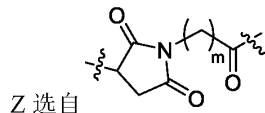
(D-4a)或

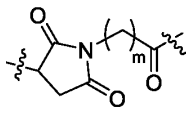


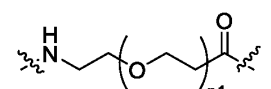
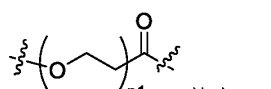
。

B30. 根据实施方案 B23-B29 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中-L-具有如下结构 -Z-L₁-L₂-L₃-

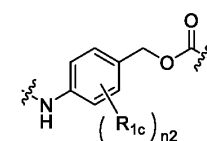
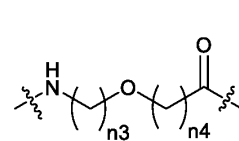
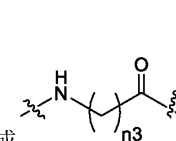
其中



Z 选自 ，其中 m 为选自 1-10 的整数，例如为 1、2、3、4、5、6、7 或 8；

L₁ 选自不存在、、 其中 n₁ 独立地为选自 0-12 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8；

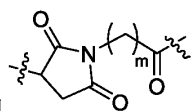
L₂ 是由 2-8 个氨基酸构成的肽残基；且

L₃ 选自： (R_{1c})_{n2} 或  或 ，其中 R_{1c} 选自：H 和 C₁-C₆ 烷基； n₂ 为 1、2、3 或 4；且 n₃ 和 n₄ 独立地为 1、2、3、4、5 或 6。

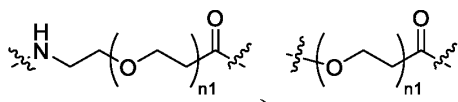
B31. 根据实施方案 B30 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

其中 L₂ 是由 2、3、4、5、6 或 7 个氨基酸构成的肽残基。

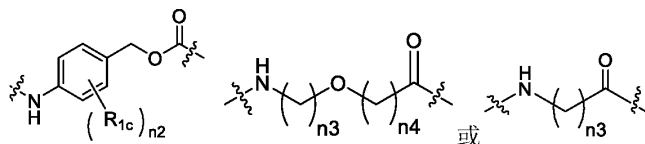
B32. 根据实施方案 B31 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，



其中, Z 选自 , 其中 m 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8;

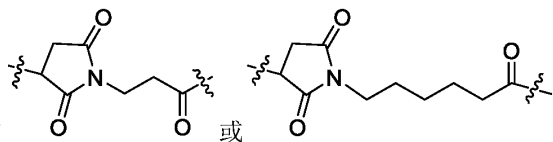


L₁ 选自不存在、 , 其中 n₁ 独立地为选自 0-12 的整数; 且

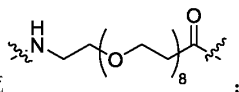


L₃ 选自: , 其中 R_{1c} 选自: H 和 C₁-C₆ 烷基; n₂ 为 1、2、3 或 4; n₃ 和 n₄ 独立地为 1、2、3、4、5 或 6。

B33. 根据实施方案 B31 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

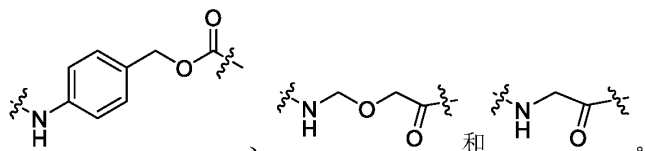


Z 选自 或 ;



L₁ 选自不存在或 ;

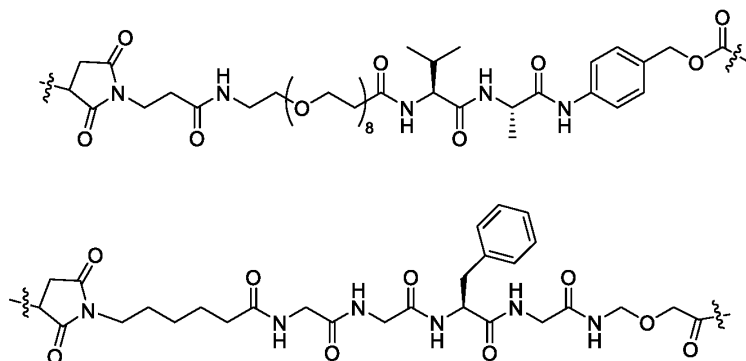
L₂ 选自 -Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Cit-和 -Glu-Val-Cit-; 且

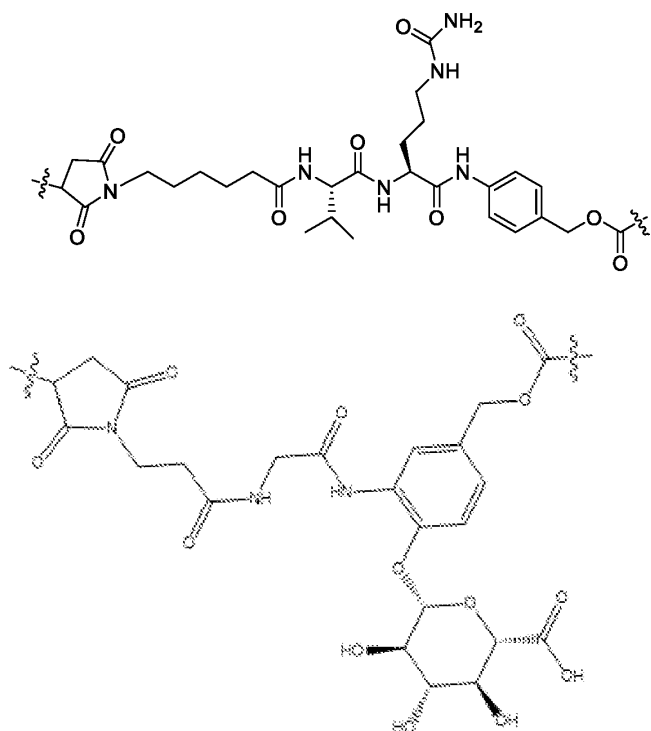


L₃ 选自: , 和 。

B34. 根据实施方案 B31 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

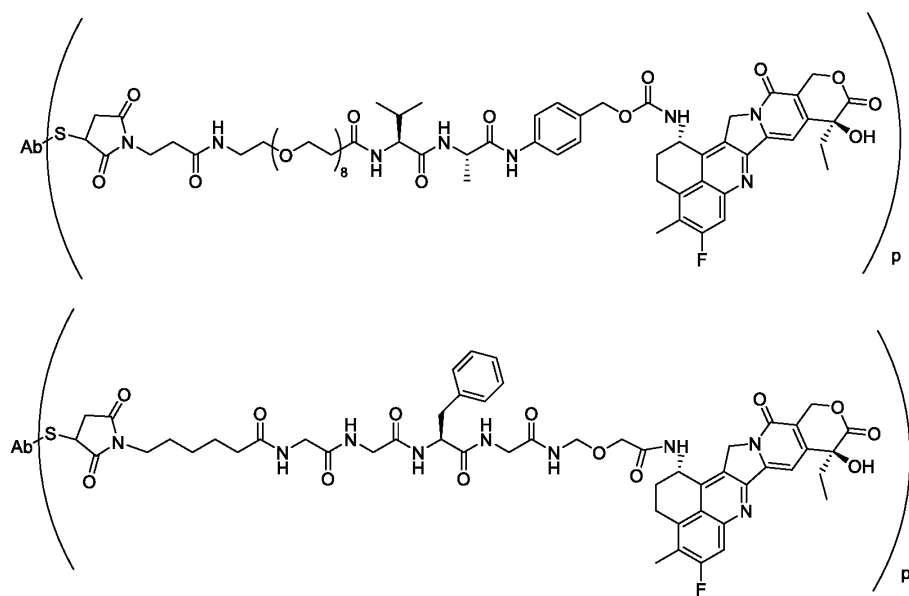
其中 -Z-L₁-L₂-L₃- 选自如下结构

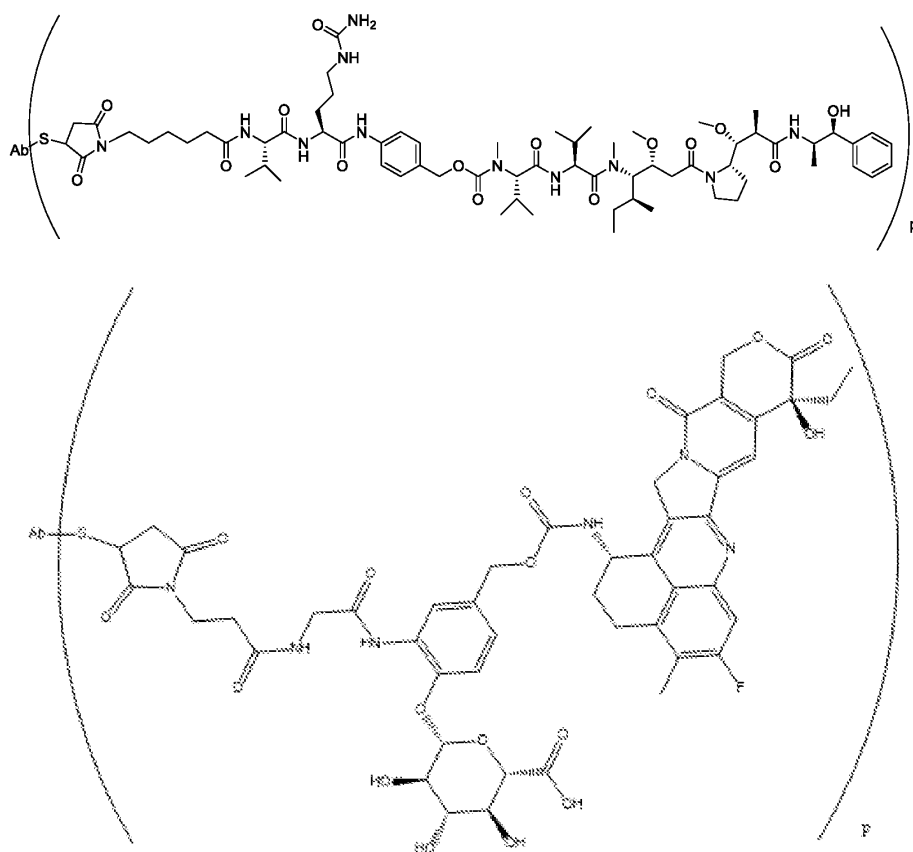




B35. 根据实施方案 B23-B34 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其具有 2-10 例如 4-8 的平均 DAR 值。

B36. 根据实施方案 B23 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体-药物偶联物选自





其中 Ab 和 p 如实施方案 B23 所定义，

优选地，Ab 优选为双链抗体，其中：

- (a) 所述抗体为对称双链形式，且其中所述抗体的多肽链包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列；或者
- (b) 所述抗体为不对称双链形式，且其中所述抗体包含分别含有 SEQ ID NOs: 61/62、69/70 或 71/72 的氨基酸序列的第一和第二多肽链；

优选地，所述抗体-药物偶联物具有 2-10 或 4-8 的平均 DAR。

B37. 药物组合物，其包含实施方案 B1-B17 任一项所述的抗体或实施方案 B22-B36 的免疫缀合物或免疫融合物和可药用载体。

B38. 实施方案 B1-B17 任一项所述的抗体或实施方案 B22-B36 的免疫缀合物或免疫融合物用作药物或用于制备药物的用途。

B39. 实施方案 B38 的用途，其中所述药物用于在个体中治疗和 / 或预防癌症，其中所述癌症为 Trop2 和 Nectin-4 双阳性实体瘤，优选地所述肿瘤具有至少 40% 细胞呈现 Trop2 和 Nectin-4 双阳性高水平表达。

在一个方面，本发明还提供了如下 C 组实施方案：

C1. 一种结合 Trop2 和 Nectin4 的多特异性抗体，其中所述抗体包含至少一个特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域和至少一个特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域。

C2. 实施方案 C1 的多特异性抗体，其中所述抗体具有选自以下的一项或多项特征：

- (a) 所述 Trop2 和 Nectin4 抗原结合结构域分别为 VHH 结构域；
- (b) 所述 Trop2 和 Nectin4 抗原结合结构域的抗原结合亲和力 K_D 值分别为 50×10^{-8} M 至 0.5×10^{-8} M；
- (c) 所述抗体中 Trop2 抗原结合结构域与 Nectin4 抗原结合结构域的价数比为 1:1 或 1:2；以及
- (d) 所述抗体为三价或四价双特异性抗体；且

优选地，所述抗体还具有选自以下的一项或多项特征：相比 Nectin4 和 Trop2 单靶点药物，在表达人 Nectin4 和 Trop2 的靶肿瘤细胞上呈现 (e) 协同结合作用；(f) 协同内吞作用；以及 (g) 改善的肿瘤细胞靶向性分布。

C3. 实施方案 C1-C2 中任一项的多特异性抗体，其中：特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域为 VHH 结构域，且

其中，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列；

再优选地，所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列：

- (i) 分别包含 SEQ ID NOs: 6, 7 和 8 的氨基酸序列或由其组成；
- (ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 10, 11 和 12 的氨基酸序列或由其组成；
- (iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 14, 15 和 16 的氨基酸序列或由其组成；或
- (iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 31, 32 和 33 的氨基酸序列或由其组成；

再优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列，或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列，或由选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列组成。

C4. 实施方案 C1-C3 中任一项的多特异性抗体，其中：特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域为 VHH 结构域，且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列；

再优选地，所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列：

- (i) 分别包含 SEQ ID NOs: 18, 19 和 20 的氨基酸序列或由其组成；
- (ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 22, 23 和 24 的氨基酸序列或由其组成；
- (iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 26, 27 和 28 的氨基酸序列或由其组成；
- (iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 18, 36 和 20 的氨基酸序列或由其组成；或
- (v) 分别包含 SEQ ID NOs: 18, 37 和 20 的氨基酸序列或由其组成；

再优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列，或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个，更

优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列,

最优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列, 或由选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列组成。

C5. 实施方案 C1-C4 中任一项的多特异性抗体, 其中所述抗体还包含:

(a) 半衰期延长结构域, 优选地, 所述半衰期延长结构域选自血清白蛋白结合性肽和免疫球蛋白 Fc 区; 和/或

(b) 肽接头, 优选地, 所述肽接头为 5-15 个氨基酸长度, 更优选地, 所述肽接头包含氨基酸序列(G₄S)_n, 其中 n=1、2 或 3。

C6. 实施方案 C1-C5 中任一项的多特异性抗体, 其中所述抗体为包含至少一个(优选 1 或 2 个)Nectin4 结合结构域以及至少一个(优选 1 个或 2 个)Trop2 结合结构域的单链或双链抗体。

C7. 实施方案 C1-C6 中任一项的多特异性抗体, 其中所述抗体包含两条相同的多肽链, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含: (VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE-(VHH^A)_{n3}-(VHH^B)_{n4}。

其中 n₁, n₂, n₃ 和 n₄ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数, 且优选地 n₃ 和 n₄ 为 0, n₁ 和 n₂ 均为 1;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区; 其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接。

C8. 实施方案 C7 的多特异性抗体, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH^A-VHH^B-HLE, 且其中 VHH^A 表示 Nectin4 结合结构域且 VHH^B 表示 Trop2 结合结构域。

C9. 实施方案 C1-C6 中任一项的多特异性抗体, 其中所述抗体包含两条不同的多肽链, 其中:

第一多肽链从 N 端到 C 端包含: (VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE-(VHH^A)_{n3}-(VHH^B)_{n4}。

第二多肽链从 N 端到 C 端包含: (VHH^B)_{m1}-(VHH^A)_{m2}-HLE-(VHH^B)_{m3}-(VHH^A)_{m4}。

其中 n₁, n₂, n₃ 和 n₄ 以及 m₁, m₂, m₃ 和 m₄ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数, 且优选地其中 n₃、n₄、m₃ 和 m₄ 为 0, 且 n₁+m₂=1 或 2, n₂+m₁=1 或 2, 再优选地 m₁=0 且 m₂=1, 或 m₂=0 且 m₁=1;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区, 且优选地包含 knob-into-hole 突变; 其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接。

C10. 实施方案 C9 的多特异性抗体, 其中:

第一多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH^A-VHH^B-HLE。

第二多肽链从 N 端到 C 端包含: VHH^A-HLE。

且其中 VHH^A 表示 Nectin4 结合结构域且 VHH^B 表示 Trop2 结合结构域。

C11. 实施方案 C7-C10 中任一项的多特异性抗体, 其中所述免疫球蛋白 Fc 区为来自 IgG 的 Fc 区, 例如, 来自人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区, 优选所述 Fc 区包含降低或消除所述 Fc 区与 FcγR 的结合作用的突变。

C12. 实施方案 C1-C6 中任一项的多特异性抗体, 其中所述抗体包含单条多肽链, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含: (VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-(HLE)_{n3}-(VHH^A)_{n4}-(VHH^B)_{n5}-(HLE)_{n6}。

其中 n₁, n₂, n₃, n₄, n₅ 和 n₆ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数, 且优选地 n₁+n₄=1 或 2, n₂+n₅=1 或 2,

且 $n3+n6=0$ 或 1;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的血清白蛋白结合性肽; 其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接,

优选地, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含:

- (i) VHH^A-VHH^B ,
- (ii) VHH^A-VHH^B-HLE ,
- (iii) $VHH^B-VHH^A-VHH^B$,
- (iv) $VHH^A-VHH^B-VHH^B$,
- (v) $VHH^A-HLE-VHH^B-VHH^B$, 或
- (vi) $VHH^A-VHH^A-HLE-VHH^B-VHH^B$, 其中优选地 A 表示 Trop2 且 B 表示 Nectin4,

再优选地, 所述 HLE 表示抗血清白蛋白 VHH 结构域, 任选地选自 SEQ ID NOs: 39 和 40 的氨基酸序列、或与其具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

C13. 实施方案 C1-C12 中任一项的多特异性抗体, 其中:

(a) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列;

(b) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列;

(c) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列;

(d) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 29 和 30 的氨基酸序列; 或

(e) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 34 和 38 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 29 和 30 的氨基酸序列。

C14. 实施方案 C1-C6 的多特异性抗体, 其中所述抗体为双链形式, 其中:

(a) 所述抗体为对称双链形式, 且其中所述抗体的多肽链包含 SEQ ID NO: 53 或 54 的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列, 优选地包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列; 或者

(b) 所述抗体为不对称双链形式, 且其中所述抗体包含选自下组的第一和第二多肽链:

(i) 分别包含 SEQ ID NOs: 55 和 56 或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 57 和 58 或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 59 和 60 或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸

序列的第一和第二多肽链,

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 61 和 62 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(v) 分别包含 SEQ ID NOs: 63 和 64 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(vi) 分别包含 SEQ ID NOs: 65 和 66 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(vii) 分别包含 SEQ ID NOs: 67 和 68 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(viii) 分别包含 SEQ ID NOs: 69 和 70 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(ix) 分别包含 SEQ ID NOs: 71 和 72 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(x) 分别包含 SEQ ID NOs: 73 和 74 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链, 和

(xi) 分别包含 SEQ ID NOs: 75 和 76 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

优选地, 所述第一和第二多肽链分别包含 SEQ ID NOs: 61/62、69/70 或 71/72 的氨基酸序列。

C15. 实施方案 C1-C6 的多特异性抗体, 其中所述抗体为单链形式, 其中所述抗体的多肽链包含选自 SEQ ID NOs: 41-52 的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

C16. 一种特异性结合 Trop2 的 VHH 结构域, 且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列;

再优选地, 所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列:

(i) 分别包含 SEQ ID NOs:6, 7 和 8 的氨基酸序列或由其组成;

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs:10, 11 和 12 的氨基酸序列或由其组成;

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs:14, 15 和 16 的氨基酸序列或由其组成; 或

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs:31, 32 和 33 的氨基酸序列或由其组成;

再优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列, 或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列,

最优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列, 或由选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列组成。

C17. 一种特异性结合 Nectin4 的 VHH 结构域, 且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列中的 CDR1,

CDR2 和 CDR3 序列；

优选地，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列：

- (i) 分别包含 SEQ ID NOs:18、19 和 20 的氨基酸序列或由其组成；
- (ii) 分别包含 SEQ ID NOs:22、23 和 24 的氨基酸序列或由其组成；
- (iii) 分别包含 SEQ ID NOs:26、27 和 28 的氨基酸序列或由其组成；
- (iv) 分别包含 SEQ ID NOs:18、36 和 20 的氨基酸序列或由其组成；或
- (v) 分别包含 SEQ ID NOs:18、37 和 20 的氨基酸序列或由其组成；

再优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列，或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列，或由选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列组成。

C18. 一种抗体，其包含实施方案 C16 所述的特异性结合 Trop2 的 VHH 结构域和/或实施方案 C17 所述的特异性结合 Nectin4 的 VHH 结构域。

C19. 一种抗原结合分子，其包含实施方案 C18 的抗体。

C20. 多核苷酸，其编码实施方案 C1-C15 任一项所述的抗体、实施方案 C16 或 C17 的 VHH 结构域、实施方案 C18 的抗体或实施方案 C19 的抗原结合分子。

C21. 载体，优选地表达载体，其包含实施方案 C20 的多核苷酸。

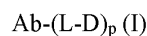
C22. 宿主细胞，其包含实施方案 C20 所述的多核苷酸或实施方案 C21 所述的载体，例如，所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

C23. 用于生产实施方案 C1-C15 或 C18 任一项所述的抗体的方法，所述方法包括：

在适于表达所述抗体的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的宿主细胞；和在适于所述多肽链装配为所述抗体的条件下使多肽链装配产生所述抗体。

C24. 包含实施方案 C1-C15 或 C18 任一项所述的抗体的免疫缀合物或免疫融合物。

25. 式(I)所示的抗体-药物偶联物：



或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

其中：

Ab 是实施方案 C1-C15 或 C18 中任一项所述的抗体或实施方案 C19 的抗原结合分子；

L 是连接子；

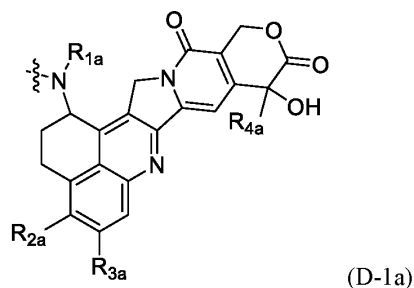
D 是药物，优选抗肿瘤化合物；并且

p 是选自 1 至 16 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

C26. 根据实施方案 C25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗肿瘤

化合物是细胞毒性剂，例如喜树碱类化合物、澳瑞他汀类化合物，例如依喜替康、Dxd 或 MMAE。

C27. 根据实施方案 C25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式 (D-1a)或式(D-1b)所示结构：



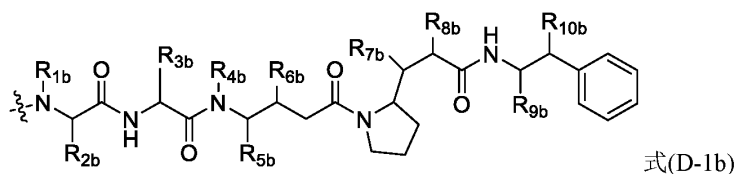
其中 R_{1a}选自 H 和 C₁-C₆ 烷基；

R_{2a}选自 H、卤素、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、-OR_{5a} 和-SR_{5a}；

R_{3a}选自 H、卤素、CN、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和-OR_{5a}；且

R_{4a}和 R_{5a}独立地选自 H 和 C₁-C₄ 烷基；

或



其中 R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b}和 R_{8b}各自独立地选自 C₁₋₈ 烷基；例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；

R_{6b}和 R_{7b}各自独立地选自 C₁₋₈ 烷氧基，例如甲氧基、乙氧基或丙氧基；

R_{9b}选自 C₁₋₈ 烷基和 COOH；例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；且

R_{10b}选自 OH 和 H。

C28. 根据实施方案 C27 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中

R_{1a}为 H；R_{2a}为 C₁-C₆ 烷基；R_{3a}为卤素，优选为-F；R_{4a}为 C₁-C₄ 烷基，优选为乙基；

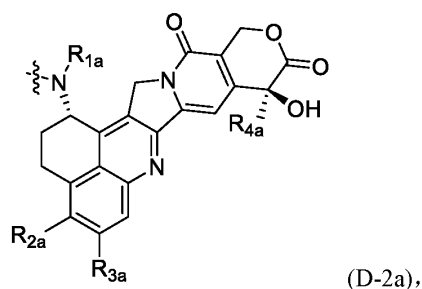
R_{1b}、R_{4b}和 R_{8b}各自独立地选自 C₁₋₂ 烷基；优选甲基；

R_{2b}、R_{3b}和 R_{5b}各自独立地选自 C₃₋₄ 烷基；

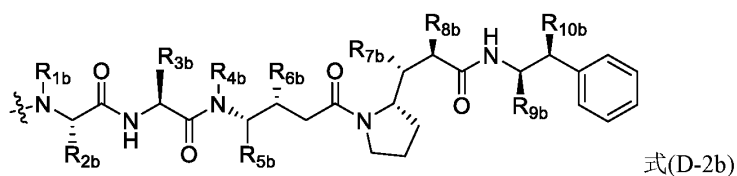
R_{6b}和 R_{7b}各自独立地选自 C₁₋₂ 烷氧基；且

R_{9b}选自 C₁₋₄ 烷基且 R_{10b}为 OH；或 R_{9b}为 COOH 且 R_{10b}为 H。

C29. 根据实施方案 C27 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式 (D-2a)或式(D-2b)所示的结构：

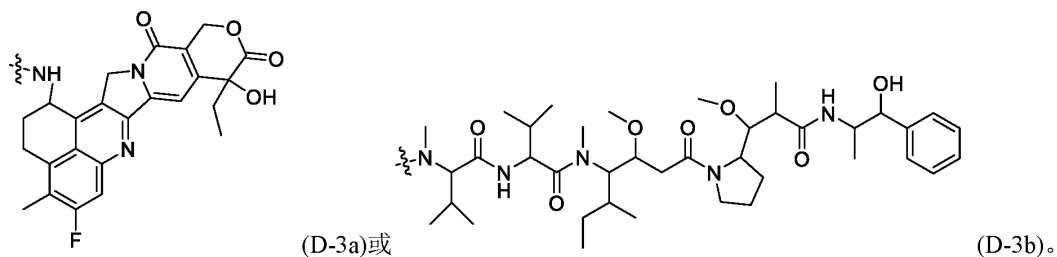


其中 R_{1a}、R_{2a}、R_{3a} 和 R_{4a} 如实施方案 C27 或 C28 中所定义；

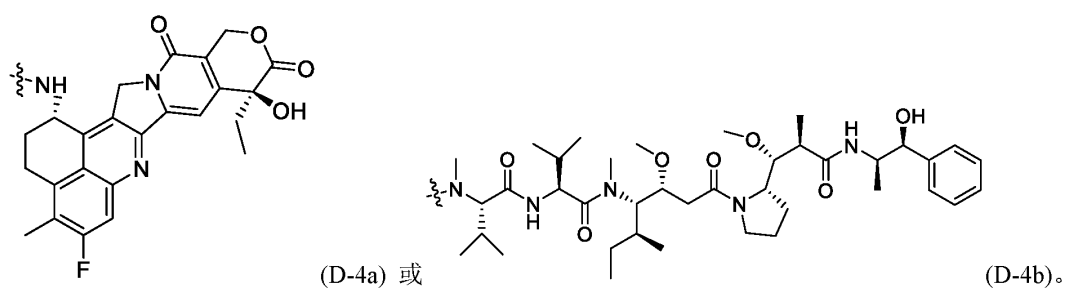


其中 R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b}、R_{6b}、R_{7b}、R_{8b}、R_{9b} 和 R_{10b} 如实施方案 C27 或 C28 中所定义。

C30. 根据实施方案 C27 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式 (D-3a)或(D-3b)所示的结构：

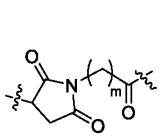
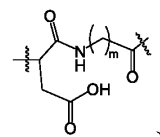
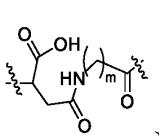
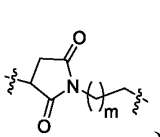
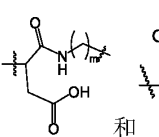


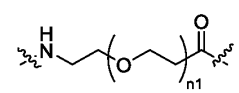
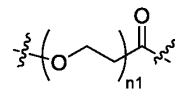
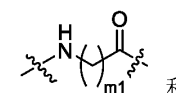
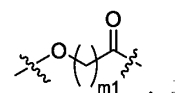
C31. 根据实施方案 C27 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式 (D-4a)或(D-4b)所示的结构：



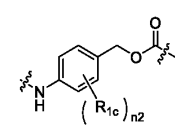
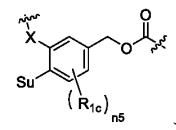
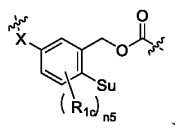
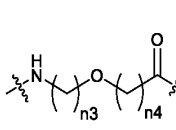
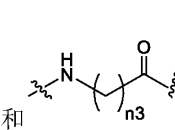
C32. 根据实施方案 C25-C31 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 -L-具有如下结构 -Z-L₁-L₂-L₃-

其中

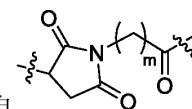
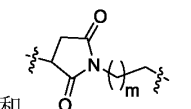
Z 选自 、、、 和 ，其中 m 独立地为选自 1-10 的整数，例如为 1、2、3、4、5、6、7 或 8；

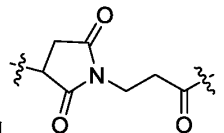
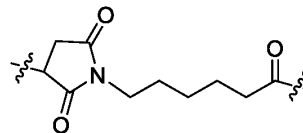
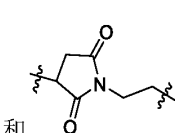
L₁ 选自不存在、、、 和 ，其中 n₁ 和 m₁ 各自独立地为选自 0-20 的整数，例如选自 0-12 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8；

L₂ 是氨基酸残基或由 2-8 个氨基酸构成的肽残基；且

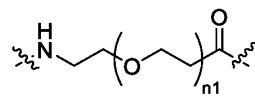
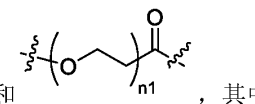
L₃ 选自：、、、 和 ，其中 X 选自 -NH-、-O- 和 -S-；R_{1c} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 卤代烷基、C₁₋₈ 烷氧基、卤素、硝基和氰基；Su 各自独立地选自戊糖、戊糖醛酸、己糖和己糖醛酸；n₂ 为 0、1、2、3 或 4；n₅ 为 0、1、2 或 3；n₃ 和 n₄ 独立地为 1、2、3、4、5 或 6；。

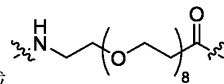
C33. 根据实施方案 C32 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

其中，Z 选自  和 ，其中 m 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8；

优选地，Z 选自 、 和 。

C34. 根据实施方案 C32-C33 中任何一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

其中，L₁ 选自不存在、 和 ，其中 n₁ 独立地为选自 0-12 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8；

优选地，L₁ 是不存在或 。

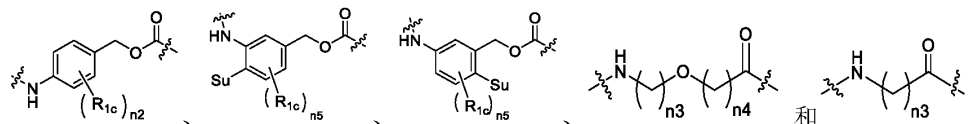
C35. 根据实施方案 C32-C34 中任何一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

其中 L₂ 是氨基酸残基或由 2、3、4、5、6 或 7 个氨基酸构成的肽残基；优选地，所述氨基酸残基或构成所述肽残基的氨基酸各自独立地选自甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、赖氨酸(Lys)、瓜氨酸(Cit)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、异亮氨酸(Ile)、精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、甲硫氨酸(Met)、色氨酸(Trp)、半胱氨酸(Cys)、组氨酸(His)和苏氨酸(Thr)，其中所述氨基酸残基或氨基酸任选被一个或多个 C₁₋₆ 烷基取代；

更优选地, 所述氨基酸残基或构成所述肽残基的氨基酸各自独立地选自甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、苯丙氨酸(Phe)、谷氨酸(Glu)和瓜氨酸(Cit);

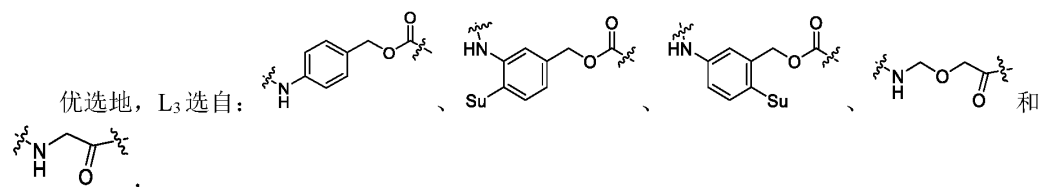
还更优选地, L_2 选自-Ala-、-Val-、-Gly-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Cit-和-Glu-Val-Cit-。

C36. 根据实施方案 C32-C35 中任何一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其中, L_3 选自:



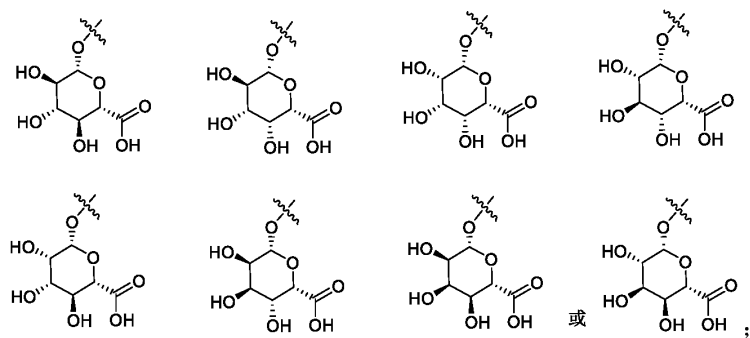
其中 R_{1c} 各自独立地选自 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 卤代烷基、 C_{1-8} 烷氧基、卤素、硝基和氰基; Su 各自独立地

选自 ; n_2 为 0、1、2、3 或 4; n_5 为 0、1、2 或 3; 和 n_3 和 n_4 独立地为 1、2、3、4、5 或 6;



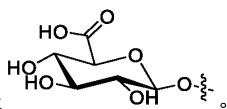
其中各变量上所定义。

C37. 根据实施方案 C32-C36 中任何一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其中, Su 各自独立地是:

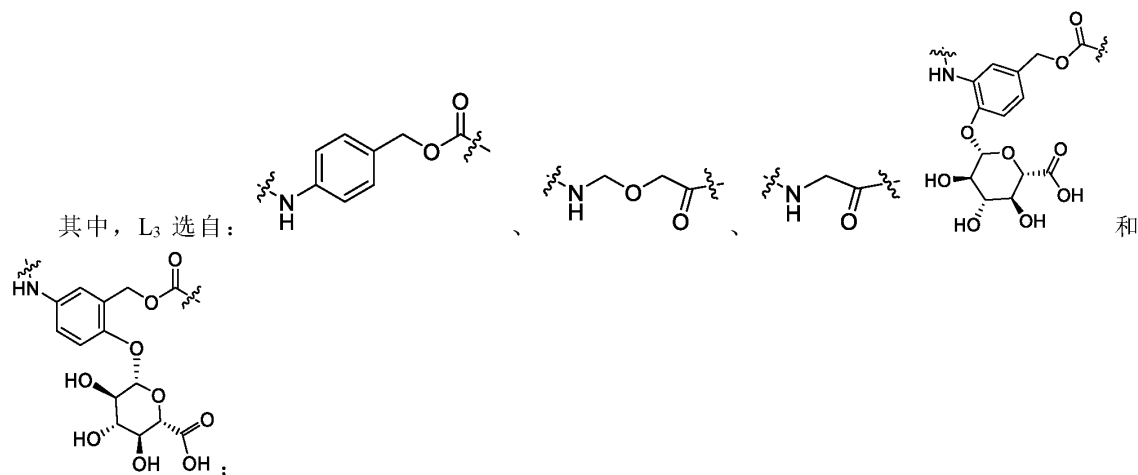


更优选地, Su 各自独立地是 ;

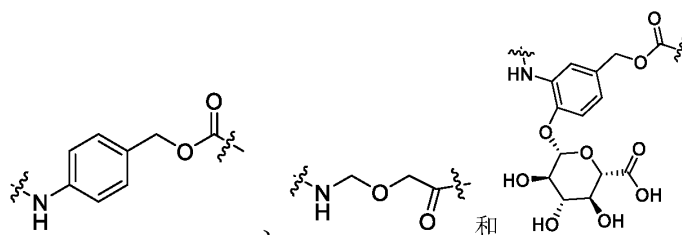
还更优选地，Su 各自独立地是



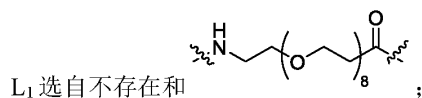
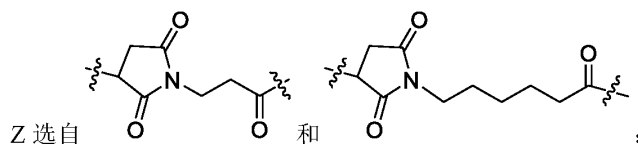
C38. 根据实施方案 C32-C36 中任何一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，



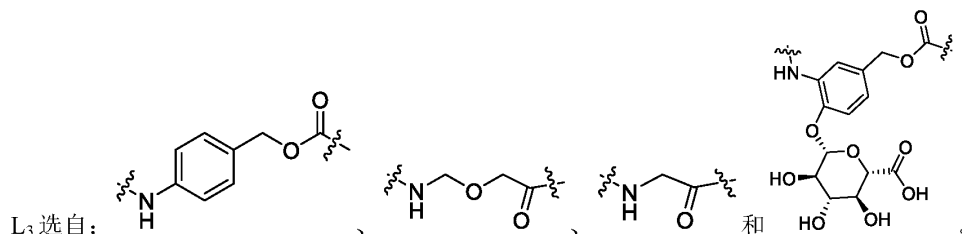
优选地， L_3 选自：



C39. 根据实施方案 C35 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

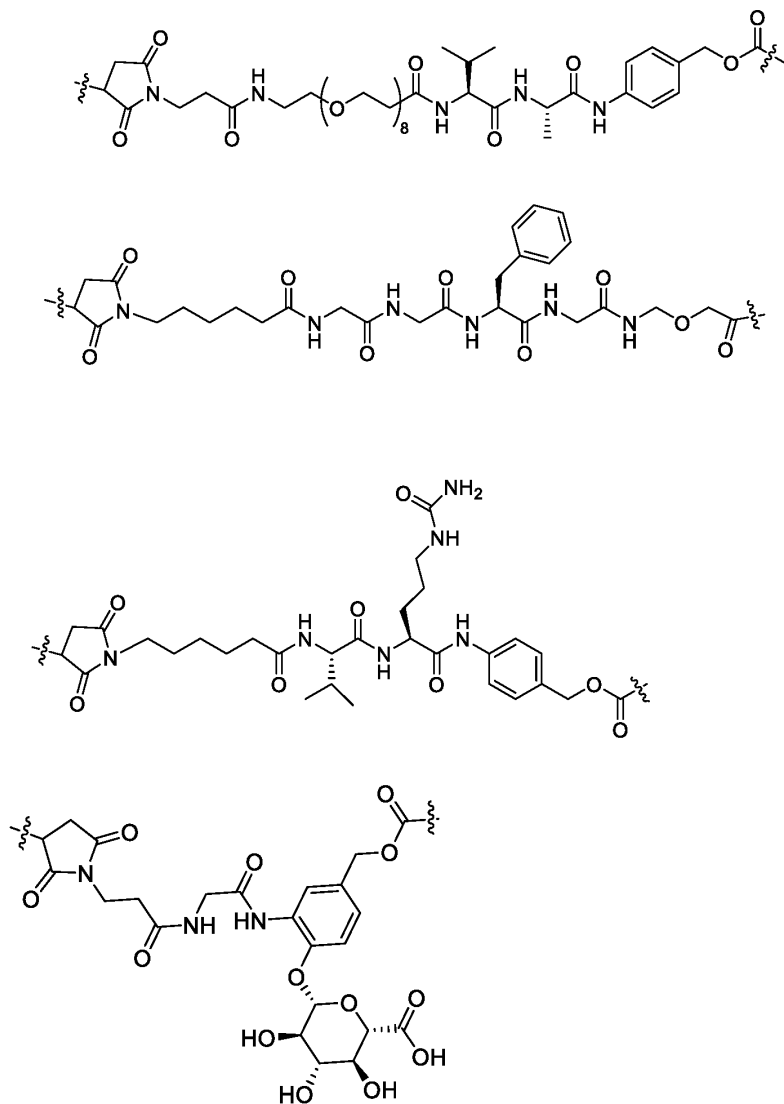


L_2 选自-Gly-、-Val-Ala-和-Gly-Gly-Phe-Gly；且



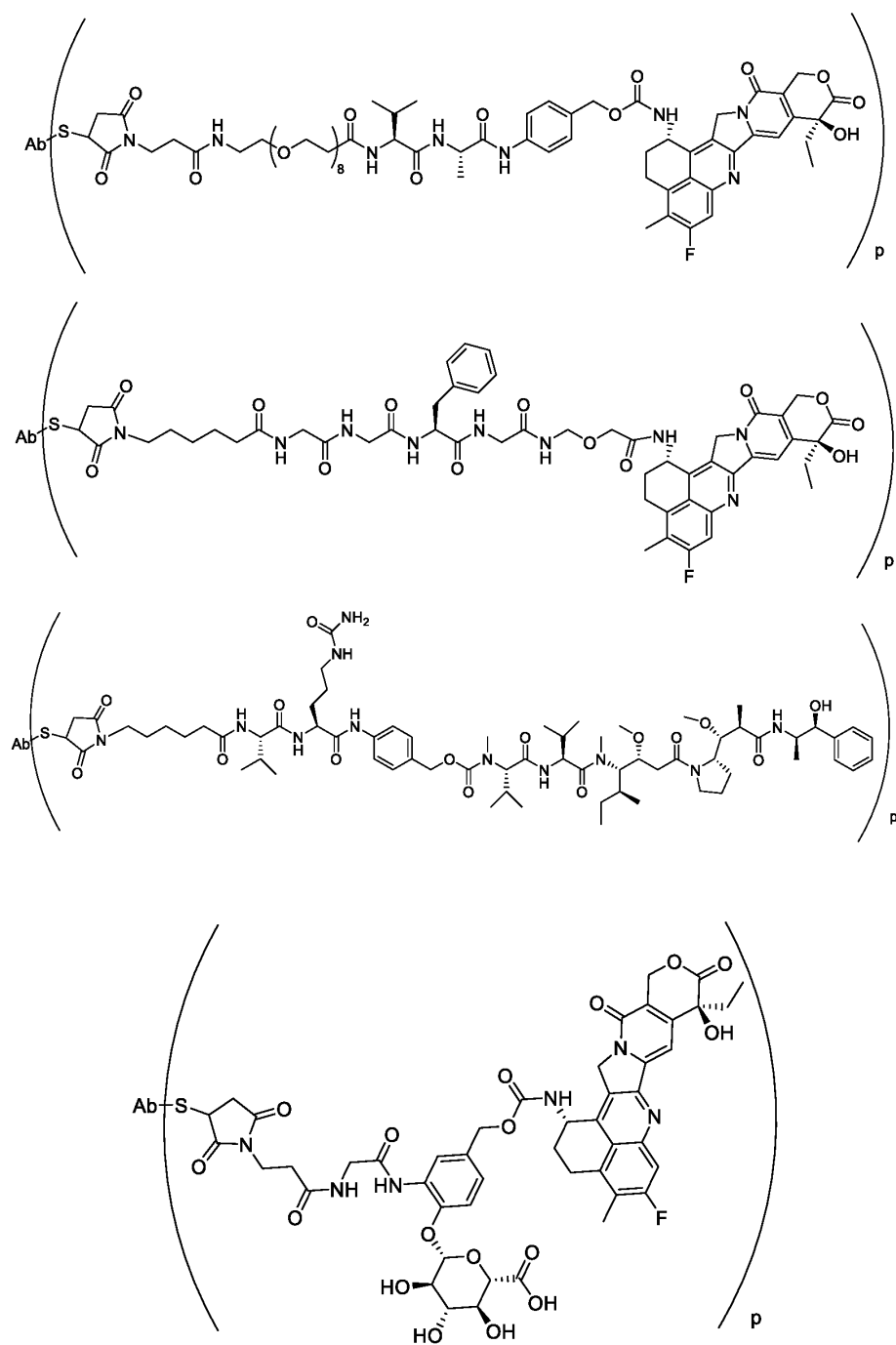
C40. 根据实施方案 C35 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

其中-Z-L₁-L₂-L₃-选自如下结构



C41. 根据实施方案 C25-C40 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其具有 2-10 例如 4-8 的平均 DAR 值。

C42. 根据实施方案 C25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体-药物偶联物选自



其中 Ab 和 p 如实施方案 C25 所定义，

优选地，Ab 为双链抗体，其中：

(a) 所述抗体为对称双链形式，且其中所述抗体的多肽链包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列；或者

(b) 所述抗体为不对称双链形式，且其中所述抗体包含分别含有 SEQ ID NOs: 61/62、69/70 或 71/72 的氨基酸序列的第一和第二多肽链：

优选地，所述抗体-药物偶联物具有 2-10 或 4-8 的平均 DAR。

C43. 药物组合物，其包含实施方案 C1-C15 或 C18 任一项所述的抗体、实施方案 C19 的抗原结合分子或实施方案 C24 的免疫缀合物或免疫融合物、或实施方案 C25-C42 任一项的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物和可药用载体。

C44. 实施方案 C1-C15 或 C18 任一项所述的抗体、实施方案 C19 的抗原结合分子或实施方案 C24 的免疫缀合物或免疫融合物、或实施方案 C25-C42 任一项的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物用作药物或用于制备药物的用途。

C45. 实施方案 C44 的用途，其中所述药物用于在个体中治疗和 / 或预防癌症，其中所述癌症为 Trop2 阳性、Nectin4 阳性、或 Trop2 和 Nectin4 双阳性实体瘤，选自例如尿路上皮癌；膀胱癌(例如，BLCA)；宫颈癌(例如，CESC)；头颈癌(例如，HNSC)；肺癌(例如，LUSC 和 LUAD)；乳腺癌(例如，BRCA)；胰腺癌(例如，PAAD)；食管癌(例如，ESCA)；前列腺癌(例如，PRAD)；胆管癌(例如，CHOL)；子宫内膜样癌(例如，UCEC)；甲状腺癌(例如，THCA)；卵巢癌(例如，OV)；结直肠癌(例如，COAD 和 READ)；和胃癌(例如，STAD)，包括其原发性、复发性和难治性癌症。

上文以及整个本申请中所描述的任何或所有特征可以在本发明的各种实施方案中组合。以下实施例进一步说明本发明，然而，应理解实施例以举例说明为目的，不应理解为构成任何限制。

实施例

材料和方法

参照抗体及其制备

在本实施例中，使用参照抗体 Datopotamab (也称作 V-BMK1)和参照抗体 Enfortumab (也称作 V-BMK2)。

“参照抗体 Datopotamab”是根据 NCATS Inxight Drugs 公布的单特异性二价抗体 Datopotamab (FDA UNII: BA3HQ7PO9)的重链和轻链可变区氨基酸序列构建的抗 Trop2 抗体。在涉及参照抗体 Datopotamab 的上下文中，除非另有明确说明，所述参照抗体将具有 Fab 抗原结合结构域以及人 IgG1 重链恒定区和 kappa 轻链。

“参照抗体 Enfortumab”是根据 NCATS Inxight Drugs 公布的单特异性二价抗体 Enfortumab (FDA UNII: UIHUE4W970)的重链和轻链可变区氨基酸序列构建的抗 Nectin4 抗体。在涉及参照抗体 Enfortumab 的上下文中，除非另有明确说明，所述参照抗体将具有 Fab 抗原结合结构域以及人 IgG1 重链恒定区和 kappa 轻链。

两个参照抗体重链可变区和轻链可变区序列分别显示在 SEQ ID NOs:1-4 中。

按如下制备参照抗体。由金唯智(中国上海)基因合成参照抗体编码序列，克隆至 pcDNA3.4 表达载体中，并转染至 Expi293F 细胞。收集转染细胞的培养物上清液，通过蛋白 A 柱分离和纯化抗体。用 Nano Drop 测量纯化后抗体的浓度；并通过 SDS-PAGE 和分析型 HPLC-SEC 测定蛋白纯度，然后将其储存在 -80°C 备用。

抗原及其制备

从数据库中检索人 Trop2 (UniProt_P09758-1)和食蟹猴 Trop2 (XP_005543292.2)的胞外段序列信息 (Gln31- Tyr 274)和人 Nectin4 (UniProt_Q96NY8-1) 和食蟹猴 Nectin4(XP_005541277.1)的胞外段序列信息

(Gly 32- Ser 349), 分别在 C 端添加 His 标签, 按照人密码子偏好性优化后进行基因合成并亚克隆至 pcDNA3.4 载体中; 经 Sanger 测序验证无误后, 进行质粒抽提备用。使用构建好的这些蛋白真核表达载体瞬时转染 Expi293F 细胞; 从转染细胞培养物收集蛋白表达上清, 采用镍柱纯化目的蛋白; 进行 SDS-PAGE 实验检测蛋白纯度, 纯度>95%。使用上述参照抗 Trop2 抗体 (Datopotamab)和参照抗 Nectin 4 抗体 (Enfortumab), 通过 ELISA 法, 确认所制备的人 Trop2-His 和人 Nectin4-His 重组抗原蛋白的活性。

重组表达抗原的工程细胞系及其制备

按照下述制备表达人 Trop2 的 CHO-K1 工程细胞系和表达人 Nectin4 的 CHO-K1 工程细胞系。

将人 Trop2 和人 Nectin4 的全长基因分别插入至慢病毒表达载体 pLVX-puro 中, 使用 293T 细胞包装慢病毒, 并感染 CHO-K1 细胞。细胞在含有 8ug/ml 嘌呤霉素筛选压力的培养基中培养, 以获得多克隆细胞株。通过有限稀释, 选择高表达 Trop2 和 Nectin4 的稳转 CHO-K1-人 Trop2 细胞系和 CHO-K1-人 Nectin4 细胞系。使用参照抗体 Datopotamab 和 Enfortumab 进行 FACS 检测, 稳转细胞系的抗原表达阳性率>90%。

ELISA 结合试验

抗原用 PBS 稀释至 0.5-1.0 µg/ml, 100 µl/孔包板, 2-8℃过夜或者 37℃孵育 2h。洗板机 0.05% PBST 洗板 3 次, 加入 250 µl/孔封闭液 (1% BSA 或 8%脱脂奶粉在 PBS 中), 室温静置封闭 1h 以上。将待测样品用封闭液稀释至合适的浓度。洗板机 0.05% PBST 洗板 3 次, 加入 100 µl/孔稀释好的样品, 室温静置 1h 左右。洗板机 0.05% PBST 洗板 3 次, 加入 100 µl/孔稀释至目标稀释倍数的二抗-HRP, 室温静置 0.5 或 1h 左右。洗板机 0.05% PBST 洗板 3 次, 加入 100 µl/孔 TMB, 观察颜色的变化, 待颜色到合适时立即加入 100 µl/孔终止液。读取 OD450-OD650。

FACS 结合试验

靶细胞以每孔 $1-5 \times 10^5$ 个细胞的密度铺 96 孔板, 并在 4℃以 300g 离心 5 分钟。加入稀释至合适浓度的待测样品, 2-8℃孵育 1 小时左右。4℃离心, 去除上清, 200 µl/孔 FACS 缓冲液 (1% BSA 或 2% FBS 在 PBS 中) 洗涤 2 次, 4℃离心。加入 100 µl/孔稀释至目标稀释倍数的流式二抗, 重悬细胞, 2-8℃避光孵育 0.5h 或 1h 左右。200 µl/孔 FACS 缓冲液洗涤 2 次后, 100 µl/孔 FACS 缓冲液重悬细胞, 上机检测。用流式细胞仪(Beckman Coulter)测定细胞的 MFI。

内吞试验

靶细胞以每孔 $1-5 \times 10^5$ 个细胞铺板, 加入稀释至合适浓度的待测样品, 2-8℃孵育 0.5h 左右, 使待测样品与细胞结合。4℃, 800 x g 离心 3min, 去掉上清, 使用预冷的 200 µl/孔 FACS 缓冲液洗涤细胞 2-3 次, 以去除多余未结合的待测样品。使用预冷的 100 µl/孔 FACS 缓冲液重悬细胞。将细胞平均分为 2 组, 分别于 4℃和 37℃孵育 4 h。孵育结束后, 立刻加入冰浴的 FACS 缓冲液终止内吞实验。4℃, 800 x g 离心 3min, 使用预冷的 200 µl/孔 FACS 缓冲液洗涤细胞 2-3 次。立即加入 100 µl/孔稀释至目标稀释倍数的流式二抗, 重悬细胞, 2-8℃避光孵育 30 分钟至 1h 左右。200 µL/孔 FACS 缓冲液洗涤细胞 2-3 次后, 加入 100 µl/孔 FACS 缓冲液重悬细胞, 上机检测。用流式细胞仪(Beckman Coulter)测定细胞的 MFI。使用下式计算细胞表面结合抗体的内化水平:

内吞 = 4℃孵育样本的 MFI - 37℃孵育样本的 MFI。

内吞率% = $100\% - (37^\circ\text{C} \text{ 孵育样本的 MFI} / 4^\circ\text{C} \text{ 孵育样本的 MFI}) \times 100\%$ 。

SPR 测定

通过表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance, 简称 SPR) 技术, 检测抗体与抗原的结合亲和力。

固定抗体检测抗原: 将 10µg/mL 的抗体固定在 Protein A 芯片上。以 30 µL/min 的流速注入稀释的抗原, 结合时间为 120 秒, 然后解离时间为 200 秒。在每个解离阶段后, 10mM 甘氨酸(pH 2.0)用于芯片再

生。实验数据采用 1:1 结合模型进行分析。

固定抗原检测抗体：抗原浓度为 10 μ g/mL，被固定在 CM5 芯片上。稀释后的抗体以 30 μ L/分钟的流速注入，结合时间为 120 秒，然后解离时间为 200 秒。每次解离后，使用 10mM 的甘氨酸（pH 2.0）进行再生。实验数据采用 1:1 的结合模型进行分析。

SEC-HPLC

在环境柱温下将适量的蛋白质样品上样至 TSK-gel G3000SWxL 柱(Tosoh Corporation)或 Zenix-C SEC-300 柱(Sepax Technologies)。使用 Agilent 1260 HPLC 系统，使用由 0.05M 磷酸钠、0.3M 氯化钠、pH 6.8 $\pm$ 0.1 组成的流动相，以 0.8 mL/min 的流速等度洗脱样品 20 分钟。使用 280 nm 处的 UV 吸光度检测洗脱的蛋白质。

CEX-HPLC

在环境柱温下将适量的蛋白质样品上样到 ProPacTM WCX-10 BioLC 柱 (Thermo SCIENTIFIC) 上。使用 Agilent 1260 HPLC 系统，使用由 2-甲基哌嗪、咪唑、Tris, pH 5.0 $\pm$ 0.1 组成的流动相 A 和由 100 mM 氯化钠以及 2-甲基哌嗪、咪唑和 Tris, pH 10.8 $\pm$ 0.1 组成的流动相 B，以流速 0.9 mL/min，梯度洗脱样品 70 分钟。使用 280 nm 处的 UV 吸光度检测洗脱的蛋白质。

HIC-HPLC

在环境柱温下将适量的蛋白质样品上样到 MAbPacTM HIC-Butyl 柱 (Thermo SCIENTIFIC) 上。使用 Agilent 1260 HPLC 系统，使用流动相 A 和流动相 B，以 0.8 mL/min 的流速，梯度洗脱样品 35 分钟，其中流动相 A 由 1.5M 硫酸铵、0.05M 磷酸钠和 5%异丙醇，pH 6.0 $\pm$ 0.1 组成，流动相 B 由 0.05M 磷酸钠和 5%异丙醇，pH 6.0 $\pm$ 0.1 组成。使用 280 nm 处的 UV 吸光度检测洗脱的蛋白质。

通过 DSF 测定热稳定性

基于微量差示扫描荧光 (nanoDSF) 技术，变温范围 25-95 $^{\circ}$ C，变温速率 1 $^{\circ}$ C/min，以 280-450nm 荧光光谱及 266nm 或 473nm 激光散射光强变化来精确测定抗体蛋白的变性温度(T_m 和 T_{onset})以及蛋白形成聚集的起始温度 (T_{agg})，评估抗体蛋白的热稳定性。

实施例 1.1 VHH 筛选

采用羊驼免疫和磁分选技术，通过初步性质表征，筛选结合 Trop2 和 Nectin4 的候选 VHH 序列。简言之，使用上述制备的重组抗原蛋白人 Trop2-His 和人 Nectin4-His，分别对羊驼 (Alpaca) 进行免疫，免疫间隔时间为 14 天。从第二次免疫后开始，每次免疫后七天采集外周血，通过 ELISA 结合实验，监测免疫血清效价。在血清免疫效价达到采血建库的标准后，采集免疫羊驼的外周血，分离外周血单个核细胞 (PBMC)。从 PBMCs 中抽提总 RNA，以 RNA 为模板，使用 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA 合成试剂盒 (Takara 公司) 进行反转录，制备 cDNA。以 cDNA 为模板，第一轮 PCR 扩增产生常规 IgG (包含 VH) 和缺乏 CH1 结构域的纯重链 IgG (包含 VHH) 的核酸片段。在琼脂糖凝胶上分离这两类核酸，将包含 VHH 的编码核酸提取纯化后进行第二轮 PCR 扩增，凝胶分离并纯化回收 VHH 片段。将回收的 VHH 基因片段和经线性化处理的酵母展示载体 pDisplay 混合后，通过电击，共转入酵母感受态细胞，以产生在酵母细胞表面展示 VHH 抗体的酵母展示文库。通过事先与目标抗原孵育并因此结合了所述抗原的链霉亲和素磁珠，通过磁分选，从构建的文库中富集结合目标抗原的酵母细胞。

将磁珠分选后得到的酵母菌液，涂 SDCAA 平板，挑取单克隆细胞进行培养。在诱导表达 48h 后，使单克隆细胞培养物先后与 Biotin-抗原和 PE-Streptavidin 孵育。孵育完成后，进行流式细胞术(FACS)检测，确定与目标抗原结合的阳性单克隆酵母细胞。从所得阳性酵母细胞克隆的培养物，提取基因组 DNA，用于 PCR 扩增抗体序列和测序。

根据测序结果，挑选序列差异大的候选 VHH 序列，以 C 端融合人 IgG1-Fc 序列的形式，将其分别连

接到表达载体 pcDNA3.4 中。载体经测序验证无误后，瞬时转染 HEK-293F 细胞（下文也简称为“293F 细胞”）。取培养物上清液，进行表达抗体的结合性质和内存性质的表征，最终筛选获得下表 1 的抗 Trop2 VHH 抗体和抗 Nectin4 VHH 抗体：

表 1. VHH 抗体及其可变区序列

抗 Trop2 抗体	VHH 序列	抗 Nectin4 抗体	VHH 序列
A04	SEQ ID NO: 5	F09（或称 F9）	SEQ ID NO: 17
G08	SEQ ID NO: 9	F12	SEQ ID NO: 21
H03	SEQ ID NO: 13	D9	SEQ ID NO: 25

实施例 1.2. 候选 VHH 的体外表征

候选 VHH-Fc 抗体表达和纯化

合成上述 VHH 抗体序列的编码基因，插入到表达载体 pcDNA3.4 中，使其在 C 端融合 hIgG1 Fc 序列 (SEQ ID NO: 85)。将构建的表达载体瞬时转染到 293F 细胞中。连续培养转染细胞 7 天后，收集培养物上清液，用 0.45μm 的滤膜过滤。滤液转至无菌离心管中，使用 Protein A 柱纯化抗体，并用 SEC-HPLC 法测定抗体产物的纯度。

ELISA 抗原结合性质检测

采用 ELISA 结合试验，检测了候选 VHH-Fc 抗体与人和猴抗原的结合。在 Trop2 ELISA 结合试验中，使用人 Trop2-his 抗原或食蟹猴 Trop2-his 抗原包被 ELISA 板，并采用抗 hFc-HRP 第二抗体(Abcam, CAT#ab97225)，进行 ELSIA 测定。在 Nectin4 ELISA 结合试验中，使用人 Nectin4-his 抗原或食蟹猴 Nectin4-his 抗原包被 ELISA 板，并采用抗 hFc-HRP 第二抗体(Abcam, CAT#ab97225)，进行 ELSIA 测定。ELISA 检测结果如下表 2 所示。

表 2. 抗 Trop2 VHH-Fc 结合 ELISA 检测结果

抗 Trop2 抗体	Human EC ₅₀ pM	Cyno EC ₅₀ pM	比值 (C/H)	抗 Nectin4 抗体	Human EC ₅₀ pM	Cyno EC ₅₀ pM	比值 (C/H)
A04-Fc	127.4	86.91	0.7	F09-Fc	82.98	73.78	0.9
G08-Fc	116.8	90.01	0.8	F12-Fc	228.1	200.4	0.9
H03-Fc	559.3	394.3	0.7	D9-Fc	344.4	287.3	0.8

如上表所示，在 Trop2 ELISA 结合试验中，所有候选物均表现出能与人和猴 Trop2 抗原有较好的结合，且所有候选物与猴和人 Trop2 抗原的结合 EC50 比值为 0.7-0.8 之间，说明候选物与人猴 Trop2 抗原的亲合力接近。

同样如上表所示，在 Nectin4 ELISA 结合试验中，所有候选物均表现出能与人和猴 Nectin4 抗原有良好的结合，且所有候选物与猴和人 Nectin4 的结合 EC50 比值为 0.8-0.9，说明候选物与人猴 Nectin4 抗原的亲合力接近。

内存性质检测

根据 FACS 结合的预实验，选择 3 个浓度 100 nM、10 nM 和 2 nM 作为内存检测的使用浓度，在肿瘤细胞 NCI-N87 和 BT474 上，对候选抗 Trop2 VHH-Fc 抗体和抗 Nectin4 VHH-Fc 抗体进行了内存试验。在该测定试验中，在 2×10⁵/孔靶细胞中加入 100 nM、10 nM 或 2 nM 浓度的待测 VHH-Fc 抗体，4℃孵育 0.5h；之后细胞平均分为 2 组，分别于 4℃和 37℃ 孵育 4h；孵育结束后，使用抗 hIgG-Fc-PE(1:500 稀释)在 4℃

避光孵育 30 分钟，采用 1%多聚甲醛(PFA)固定细胞，进行 FACS 检测。

如图 1A 和图 1B 所示，对于所检测的候选抗 Trop2 VHH-Fc 抗体，内吞检测结果的趋势在所测三个浓度上基本一致。候选物 A04、G08 与 V-BMK1 比，与靶细胞有更好的结合和非劣于 V-BMK1 的内吞，在 2nM 浓度下在具有 Trop2 高表达水平的 NCI-87 细胞(Trop2^{hi})和 Trop2 低表达水平的 BT474 细胞(Trop2^{low})中的内吞率均在 50%以上。H03 与靶细胞的结合及内吞均稍逊于 V-BMK1，在 2nM 浓度下在具有 Trop2 高表达水平的 NCI-87 细胞 (Trop2^{hi}) 内吞率为 54%和 Trop2 低表达水平的 BT474 细胞 (Trop2^{low}) 中的内吞率为 38%。

如图 2A 和 2B 所示，对于所检测的候选抗 Nectin4 VHH-Fc 抗体，内吞检测结果的趋势在所测三个浓度上基本一致。所有候选物 F9-Fc、F12-Fc 和 D9-Fc 均能与靶细胞结合，但候选物之间的靶结合水平和内吞率差异比较大。

表位分组 (epitope binning)

通过 ELISA 结合试验，检测了候选抗 VHH-Fc 抗体及相关参照抗体(Datopotamab 或 Enfortumab)的表位分组情况。

在 ELISA 结合试验中，使用稀释至 1.0μg/ml 的待测物抗体包板。将抗原(Trop2-his 或 Nectin4-his)用封闭液稀释至 300 ng/ml，竞争物抗体用封闭液稀释至 30 μg/ml，等体积的抗原和竞争物混合，室温温育 1h；另外用等体积的抗原和封闭液混合物，作为竞争实验的对照，用以计算竞争物对待测物的抑制率。将配制后的混合物以 100 μl/孔加入 ELISA 板，在室温孵育 1 小时；使用抗 His 抗体-HRP (Sino Biological /105327-MM02T-H) 作为二抗，室温孵育 1 小时后，上机检测。

如表 3 的 ELISA 结果显示，抗 Trop2 候选物 A04-Fc、G08-Fc 和 H0-Fc 均不与 Datopotamab 结合相同表位。

如表 4 的 ELISA 结果表显示，对 Enfortumab 与 Nectin4 抗原的结合，抗 Nectin4 抗体 F09-Fc 有弱的信号抑制，说明其结合表位可能与 Enfrotumab 相邻；而抗 Nectin4 抗体 D9-Fc 和 F12-Fc 与 Enfortumab 为不同表位分组。

表 3 抗 Trop2 表位竞争

	Competitor		
Coating	A04-Fc	G08-Fc	H03-Fc
Datopotamab	-35	-27	-33

表 4 抗 Nectin4 表位竞争

	Competitor		
Coating	D9-Fc	F09-Fc	F12-Fc
Enfortumab	-18	57	11

FACS 抗原结合性质检测

使用 FACS 结合试验，检测了抗 Trop2 VHH-Fc 候选抗体分子 A04-Fc、G08-Fc 和 H03-Fc 与靶细胞的结合。试验采用如下条件进行：NCI-N87 靶细胞(2×10⁵/孔)+VHH-Fc 或参照抗体 (375 nM, 6×稀释, 4℃ 1h)+抗 hIgG Fc-PE 二抗 (1:500, 4℃ 0.5h)。FACS 结合结果如图 3 所示，三种候选抗体都表现出良好的靶细胞结合性质。

使用 FACS 结合试验，检测了抗 Nectin4 VHH-Fc 候选抗体分子 D9-Fc、F09-Fc 和 F12-Fc 与靶细胞的结合。试验采用如下条件进行：NCI-N87 靶细胞(2×10⁵/孔)+D9-Fc 或 F12-Fc 抗体或参照抗体 (375 nM, 6×稀释, 4℃ 1h)+抗 hIgG Fc-PE 二抗(1:500, 4℃ 0.5h)；或者 BT474 靶细胞(2×10⁵/孔)+F09-Fc 或参照抗体 (350 nM, 5×稀释, 4℃ 1h)+ 抗 hIgG Fc-PE 二抗(1:500, 4℃ 1h)。FACS 结合结果显示(图 4 (A) 和 (B))，三种

候选抗体都表现出良好的靶细胞结合性质。

实施例 1.3.VHH 构件的序列优化和表征

抗 Trop2 VHH 构件的序列优化

选择抗 Trop2 VHH 序列 A04，对其进行序列优化。

使用“最佳匹配法”将原始 VHH 序列进行人源化。利用人种系 V 基因数据库对 VHH 框架区的氨基酸序列进行比对分析，选出最佳种系序列。用 VHH CDR 序列代替最佳匹配的人类 CDR 序列，生成人源化 VHH 序列。回复突变框架区的多个残基并进行翻译后修饰(Post-translational modification, PTM)去除。反向翻译人源化序列，送由金唯智（中国上海）基因合成。然后构建至 pcDNA3.4 表达载体中，以 C 端融合人 IgG4 序列(SEQ ID NO: 87)以产生人 IgG4 Half body 的形式表达人源化 VHHs，由此获得 VHH 抗体蛋白。

下表 5 中显示了 A04 的 PTM 去除和人源化抗体的 VHH 序列，其中下划线显示根据 AbM 方案定义的 CDR 序列。

表 5. 抗 Trop2 VHH 序列

抗 Trop2	SEQ ID NO.	序列
A04.m1	29	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKEREG VSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLQPEDTAVYY CAASWGYGLRSLRKEYDYWGQGTQVTVSS
A04.m1.m10	98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKEREG VSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYY CAASWGYGLRSLRKEYDYWGQGLTVTVSS
A04.m1.m11	99	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKEREG VSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYY CAASWGYGLRSLRKEYDYWGQGLTVTVSS
A04.m1.m12	30	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKEREG VSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLQPEDTAVYYC AASWGYGLRSLRKEYDYWGQGLTVTVSS

下表 6 显示了以 VHH-hIgG4 半抗体形式表达的 A04 人源化抗体的表达纯化结果。

表 6. A04.m1 人源化抗体表达纯化结果

抗体	浓度(mg/ml)	纯度(SEC-HPLC)%	产量(mg/L)
A04.m1-hIgG4	1.19	96.5	119
A04m1.m10-hIgG4	1.04	96.2	104
A04m1.m11-hIgG4	1.87	95.7	187
A04m1.m12-hIgG4	1.44	95.3	144

对获得的抗体 A04.m1-hIgG4、A04m1.m10-hIgG4、A04m1.m11-hIgG4 和 A04.m1.m12-hIgG4 进行 FACS 检测，两个抗体与靶细胞 NCI-N87 的结合均与母本抗体类似 (表 7)。FACS 结合试验条件如下：靶细胞 (1×10⁵/孔)+样品(200nM, 5X 稀释, 4℃ 1h 温育) +抗 Fc-PE(1:500, 4℃ 0.5h 温育)。

表 7. A04 人源化抗体与 NCI-N87 的结合活性

抗体	A04.m1-hIgG4	A04.m1.m10-hIgG4	A04.m1.m11-hIgG4	A04.m1.m12-hIgG4
EC ₅₀ nM	37.26	21.94	21.06	20.96
最高 MFI 值	67375	58524	56913	60951

进行 SPR 检测验证了所选 A04 人源化抗体的人猴交叉反应活性（表 8）。

表 8. A04 人源化抗体与人和食蟹猴 Trop2 抗原结合亲和动力学

Ligand	Analyte	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Human Trop2-His	A04.m1-hIgG4	3.50E+06	1.18E-01	3.36E-08
Human Trop2-His	A04m1.m10-hIgG4-	1.09E+06	5.92E-02	5.46E-08
Human Trop2-His	A04m1.m11-hIgG4-	8.86E+05	3.15E-02	3.56E-08
Human Trop2-His	A04m1.m12-hIgG4	8.90E+05	3.24E-02	3.65E-08
Cyno Trop2-His	A04.m1-hIgG4	5.17E+05	2.13E-02	4.12E-08
Cyno Trop2-His	A04m1.m10-hIgG4-	6.60E+05	3.33E-02	5.05E-08
Cyno Trop2-His	A04m1.m11-hIgG4-	5.09E+05	1.97E-02	3.86E-08
Cyno Trop2-His	A04m1.m12-hIgG4	4.79E+05	2.04E-02	4.26E-08

使用 HIC-HPLC 以及 DSF 测定,对如上所述从 293F 宿主细胞制备的 VHH 半抗体进行理化性质分析。结果如下表 9 所示。

表 9. A04 人源化抗体理化性质 DA 数据

抗体	MW(KDa)	浓度 (mg/mL)	HIC-HPLC(%)	Tm Onset (°C)	Tagg(°C) (266 nm)	分子类型
			主峰 (NH ₄) ₂ SO ₄ (M)			
A04.m1-hIgG4	39.20	1.19	0.55	58.28	43.49	VHH-Fc half body
A04.m1.m10-hIgG4	39.20	1.04	0.63	51.33	42.18	VHH-Fc half body
A04.m1.m11-hIgG4	39.20	1.87	0.51	54.10	42.01	VHH-Fc half body
A04.m1.m12-hIgG4	39.20	1.44	0.50	56.76	46.44	VHH-Fc half body

抗 Nectin 4 VHH 构件的序列优化

选择抗 Nectin4 VHH 序列 F09（以下简称“F09”），对其进行序列优化。

使用“最佳匹配法”将原始 VHH 序列进行人源化。利用人种系 V 基因数据库对 VHH 框架区的氨基酸序列进行比对分析，选出最佳种系序列。用 VHH CDR 序列代替最佳匹配的人类 CDR 序列，生成人源化 VHH 序列。回复突变框架区的多个残基并进行翻译后修饰(Post-translational modification, PTM)去除。反向翻译人源化序列，送由金唯智（中国上海）基因合成。然后构建至 pcDNA3.4 表达载体中，以 C 端融合 His 标签的形式表达人源化 VHHs。采用镍柱进行纯化抗体，并采用 SEC-HPLC 测定产物纯度，由此获得 VHH-His 抗体蛋白。

下表 10 中显示了人源化和优化的 VHH 序列及其相应的原始 VHH 序列，其中下划线显示根据 AbM 方案定义的 CDR 序列。

表 10 人源化和优化的 VHH 序列

抗 Nectin4	SEQ ID NO.	序列
F09 (wt)	17	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GSTFGINVMGWYRQAPGKQRE</u>

		YVASITRDGSINYADSVRGRFTISRDNASTVYLQMNSLKPDDTAVYY CNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSS
F09.m1	100	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITRDGSINYADSVKGRFTISRDNASKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSS
F09.m2	101	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITRDGSINYADSVRGRFTISRDNASKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSS
F09.m5	102	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDNASTVYLQMNSLKPDDTAVYY CNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSS
F09.m6	103	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITROGSINYADSVRGRFTISRDNASTVYLQMNSLKPDDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSS
F09.m1.m5	104	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVKGRFTISRDNASKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSS
F09.m1.m6	105	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITROGSINYADSVKGRFTISRDNASKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSS
F09.m2.m5	34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDNASKNTVYLQMNSLRAEDTAVYY CNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSS
F09.m2.m6	35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITROGSINYADSVRGRFTISRDNASKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSS

下表 11 显示了以 VHH-his 形式表达的 F09 优化抗体的表达纯化结果。

表 11. F09 优化抗体表达纯化结果

抗体	MW(KDa)	浓度(mg/ml)	纯度(SEC-HPLC)%	产量(mg/L)
F09	14.18	1.06	85.74	113.59
F09.m1	14.20	1.37	86.51	146.29
F09.m2	14.22	1.20	85.97	128.21
F09.m5	14.19	1.13	84.72	120.23
F09.m6	14.19	0.98	90.59	104.83
F09.m1.m5	14.21	1.11	83.8	130
F09.m1.m6	14.21	0.82	89.9	96
F09.m2.m5	14.24	1.10	83.7	129
F09.m2.m6	14.24	1.14	89.5	133

对获得的抗体进行 FACS 结合检测，所得抗体与母本抗体 F09 具有类似的抗原结合亲和力和。通过 SPR 测定试验，检查所得抗体与人和食蟹猴 Nectin4 抗原的结合亲和动力学，其表现出与母本相当的结合亲和

力和接近的人猴交叉反应活性 (表 12)。

表 12. F09 优化后抗体与人和食蟹猴 Nectin4 抗原的结合亲和动力学

固定的配体	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Human Nectin4-his	F09.m1.his	3.44E+05	1.82E-02	5.29E-08
Human Nectin4-his	F09.m2.his	2.88E+05	1.15E-02	3.99E-08
Human Nectin4-his	F09.m5.his	2.91E+05	7.89E-03	2.71E-08
Human Nectin4-his	F09.m6.his	5.36E+05	7.47E-03	1.39E-08
Human Nectin4-his	F09.m1.m5.his	6.57E+04	1.20E-02	1.82E-07
Human Nectin4-his	F09.m1.m6.his	7.54E+04	1.14E-02	1.51E-07
Human Nectin4-his	F09.m2.m5.his	9.50E+04	7.54E-03	7.94E-08
Human Nectin4-his	F09.m2.m6.his	1.43E+05	7.73E-03	5.40E-08
Human Nectin4-his	F09.his	9.96E+04	1.14E-02	1.15E-07
Cyno Nectin4-His	F09.m1.m5.his	8.19E+04	1.48E-02	1.80E-07
Cyno Nectin4-His	F09.m1.m6.his	1.26E+05	1.34E-02	1.06E-07
Cyno Nectin4-His	F09.m2.m5.his	6.95E+04	9.43E-03	1.36E-07
Cyno Nectin4-His	F09.m2.m6.his	1.15E+05	7.97E-03	6.91E-08
Cyno Nectin4-His	F09.his	9.11E+04	1.44E-02	1.58E-07

将 F09.m2m5 转成 Fc 双价 format 后, 通过 FACS 结合试验, 在与靶细胞 BT474 结合时, F09.m2m5-Fc 仍表现出与 F09-Fc 相近的结合。FACS 试验使用如下条件: BT474 靶细胞(2×10⁵/孔)+ 抗体样品(350 nM, 5×稀释, 4°C 1h) +抗-hIgG Fc-PE 二抗(1:500, 4°C 1h)。

基于以上数据, 选择 F09.m2m5, 通过 WeMol 软件分析人源化 VHH 序列的免疫原性, 在 F09.m2m5 中引入突变残基, 得到去免疫原性序列 F09.m2m5-2 和 F09.m2m5-4。

表 13. F09.m2m5 去免疫原性 VHH 序列

抗 Nectin4	SEQ ID NO.	序列
F09.m2m5-2	38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG STFGIN VMGWYRQAPGKQRE YVAS ITREGSIN YADSVRGRFTISRDN AKNTV YLQMNSLR PE DTAVYY CNAD RLGPTGWGSRIEL WGQGT LV TVSS
F09.m2m5-4	106	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG STFGIN VMGWYRQAPGKQRE YVAS ITREGSIN YADSVRGRFTISRDN AKNTV YLQMNSL KP EDTAVY YCNAD RLGPTGWGSRIEL WGQGT LV TVSS

对 F09.m2m5 去免疫化样本, 进行了交叉反应性 SPR 及 FACS 测定。SPR 测定结果如表 14 所示。FACS 测定结果如图 5 所示。该样本保持了与人 Nectin4 和 cyno Nectin4 工程细胞系的交叉反应, 并且不与 CHO-K1 细胞发生交叉反应。通过 SEC-HPLC、CEX-HPLC、HIC-HPLC 以及 DLS 测定, 对 F09.m2m5.his、F09.m2m5-2.his 和 F09.m2m5-4.his 进行理化性质分析。结果如下表 15 所示, 两个样本均显示出具有良好可开发性的理化性质。

表 14. F09.m2m5 去免疫化样本与人和食蟹猴 Nectin4 抗原的结合亲和动力学

固定的配体	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Human Nectin4-his	F09m2m5-2.his	8.75E+04	7.58E-03	8.66E-08
Human Nectin4-his	F09m2m5-4.his	1.03E+05	7.91E-03	7.71E-08
Cyno Nectin4-His	F09m2m5-2.his	6.48E+04	1.23E-02	1.90E-07
Cyno Nectin4-His	F09m2m5-4.his	2.16E+05	1.05E-02	4.88E-08

表 15. F09.m2m5.his 及其去免疫原性抗体的理化性质数据

抗体	浓度 (mg/mL)	CEX-HPLC(%)			HIC-HPLC(%)		Tm (°C)	Tagg(°C) 266	分子类型
		酸性峰	主峰	碱性峰	主峰(NH4)2SO4 (M)				
F09.m2m5.his	1.1	19.1	77.2	3.7	0.94		67.87	60.29	VHH-His
F09.m2m5-2.his	1.4	20.51	71.25	8.24	1.08		65.66	54.5	VHH-His
F09.m2m5-4.his	1.51	19.7	75.8	4.5	1.09		65.73	42.58	VHH-His

实施例 1.4 多特异性抗 Trop2/Nectin4 抗体分子的生成

本实施例描述了示例性抗 Trop2/Nectin4 双特异性抗体(BsAb)的结构和表达载体的设计和构建。

多特异性抗体分子设计

设计了如下双特异性抗体分子构建体：

A. 单链形式，从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-(HLE)_{n3}-(VHH^A)_{n4}-(VHH^B)_{n5}-(HLE)_{n6}。

其中 n1, n2, n3, n4, n5 和 n6 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数；其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和 B 的 VHH 结构域，其中 A 和 B 彼此不同且独立地选自 Trop2 和 Nectin4；其中 HLE (Half-life extension)表示作为半衰期延长结构域的血清白蛋白(serum albumin, SA)结合性肽，尤其是抗血清白蛋白 VHH 结构域 VHH^{SA}；其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接，优选表示长度 5-15 个氨基酸的肽接头，

优选地，VHH^{Trop2} 结构域与 VHH^{Nectin4} 结构域的比例为 1:1 或 1:2，

优选地，VHH^{Trop2} 结构域为 1-2 个，且 VHH^{Nectin4} 结构域为 1-2 个；

任选地，HLE 结构域为 0 或 1 个；

例如下表 16 的单链形式：

表 16. 抗 Trop2 和 Nectin4 单链抗体形式

Format	单条多肽链
1	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4}
2	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4} -VHH ^{SA}
3	VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4}
4	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Nectin4}
5	VHH ^{Trop2} -VHH ^{SA} -VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Nectin4}
6	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Trop2} -VHH ^{SA} -VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Nectin4}

对于单链形式抗体，为了便于后续的纯化，可以任选地在抗体分子的 C 末端添加纯化标签(例如 His 标

签), 所述添加任选地通过小的肽接头(例如 AAA)实现或通过直接连接实现。

B. 对称双链形式: 由两条相同的多肽链组成, 其中: 每条链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE-(VHH^A)_{n3}-(VHH^B)_{n4}$. 其中 $n1, n2, n3$ 和 $n4$ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 彼此不同且独立地选自 Trop2 和 Nectin4; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区, 尤其是人 IgG1 或人 IgG4 Fc 区; 其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接, 优选表示长度 5-15 个氨基酸的肽接头,

优选地, VHH^{Trop2} 结构域与 $VHH^{Nectin4}$ 结构域的比例为 1:1 或 1:2,

优选地, VHH^{Trop2} 结构域为 1-2 个, 且 $VHH^{Nectin4}$ 结构域为 1-2 个;

再优选地, 每条链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE$, 其中 $n1$ 和 $n2$ 彼此独立地选自 1 或 2 的整数, 更优选地 $n1$ 和 $n2$ 为 1, 例如下表 17 的对称双链形式:

表 17. 抗 Trop2 和 Nectin4 对称双链抗体形式

Format	抗体多肽链
1	$(VHH^{Nectin4}-VHH^{Trop2}-Fc) \times 2$
2	$(VHH^{Trop2}-VHH^{Nectin4}-Fc) \times 2$

由于免疫球蛋白 Fc 区的二聚化作用, 第一和第二多肽链可以缔合形成同源二聚体, 由此产生双链形式的多特异性结合分子。

C. 不对称双链形式: 由两条不同的多肽链组成, 其中

第一多肽链从 N 端到 C 端分别包含: $(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE-(VHH^A)_{n3}-(VHH^B)_{n4}$.

第二多肽链从 N 端到 C 端分别包含: $(VHH^B)_{m1}-(VHH^A)_{m2}-HLE-(VHH^B)_{m3}-(VHH^A)_{m4}$.

其中 $n1, n2, n3$ 和 $n4$ 以及 $m1, m2, m3$ 和 $m4$ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 彼此不同且独立地选自 Trop2 和 Nectin4; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区, 尤其是人 IgG1 或 IgG4 Fc 区; 其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接, 优选表示长度 5-15 个氨基酸的肽接头,

优选地, VHH^{Trop2} 结构域与 $VHH^{Nectin4}$ 结构域的比例为 1:1 或 1:2,

优选地, VHH^{Trop2} 结构域为 1-2 个, 且 $VHH^{Nectin4}$ 结构域为 1-2 个;

再优选地, 其中

第一多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE$.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^B)_{m1}-(VHH^A)_{m2}-HLE$.

其中 $n1, n2$ 以及 $m1, m2$ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数, 但 $n1$ 和 $n2$ 不能同时为 0, $m1$ 和 $m2$ 也不能同时为 0, 且 $n1$ 与 $m2$ 之和以及 $n2$ 与 $m1$ 之和应大于等于 1;

更优选地, 其中:

第一多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE$.

第二多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^B)_{m1}-HLE$, 或者 $(VHH^A)_{m2}-HLE$.

其中 $n1, m1$ 和 $m2$ 彼此独立地选自 1 或 2 的整数, $n2$ 为 0 或 1 的整数;

再优选地,

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-HLE.
第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^B)-HLE.

或者，

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-(VHH^B)-HLE.
第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-HLE.

或者，

第一多肽链从 N 端到 C 端包含： (VHH^A)-(VHH^A)-HLE.
第二多肽链从 N 端到 C 端包含： (VHH^B)-HLE.

或者，

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)-(VHH^B)-HLE.
第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^B)-HLE.

例如下表 18 的双链形式：

表 18. 抗 Trop2 和 Nectin4 不对称双链抗体形式

Format	抗体多肽链
1	第一链：VHH ^{Trop2} -Fc 第二链：VHH ^{Nectin4} -Fc
2	第一链：VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Trop2} -Fc 第二链：VHH ^{Nectin4} -Fc
3	第一链：VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Nectin4} -Fc 第二链：VHH ^{Trop2} -Fc

由于免疫球蛋白 Fc 区的二聚化作用，第一和第二多肽链可以缔合形成异源二聚体，由此产生双链形式的多特异性结合分子。优选地，为了促进第一和第二多肽链的异源二聚化，可以在第一和第二多肽链的 Fc 区中引入 Knob-into-hole 突变，例如(T366W/ T366S,L368A,Y407V)突变或(T366Y/Y407T)突变。

单链多特异性抗体分子构建

构建了如下表 19 和 20 中所示的示例性单链形式的双特异性构建体，其对应的氨基酸序列提供于序列表中。

在表 19 中，使用非人源化 VHH 序列作为 building block，其中 VHH^{Trop2}氨基酸序列来自 G08(以下简称 T1)和 H03(以下简称 T2)，其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 13 所示；VHH^{Nectin4}氨基酸序列来自 F12(以下简称 N1)和 D9(以下简称 N2)，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 25 所示；作为半衰期延长结构域(half life extension domain, HLE)的血清白蛋白结合肽来自 VHH 结构域 VHH^{SA}，更具体来自 VHH^{SA} 序列 MSA21 (以下简称 HLE1, SEQ ID NO: 39); 符号“-”表示两个 VHH 结构域之间通过肽接头连接。

表 19. 单链多特异性抗体

抗体名称	Format	具体连接方式*	所用具体结构域
V-1	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4}	T1-N1	G08-F12
V-2	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4} -VHH ^{SA}	T1-N1-HLE1	G08-F12-MSA21
V-3	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4}	T2-N2	H03-D9
V-4	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4} -VHH ^{SA}	T2-N2-HLE1	H03-D9-MSA21

V-5	VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4}	N2-T2-N2	D9-H03-D9
V-6	VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4}	N1-T1-N1	F12-G08-F12
V-7	VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4}	N2-T1-N2	D9-G08-D9
V-8	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Nectin4}	T1-N1-N1	G08-F12-F12
V-9	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Nectin4}	T2-N2-N2	H03-D9-D9

*肽接头=G4S

在表 20 中，使用人源化 VHH 序列作为 **building block**，其中 VHH^{Trop2} 氨基酸序列来自 A04.m1 (以下简称 S1)，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示；VHH^{Nectin4} 氨基酸序列来自 F09.m2m5 (以下简称 F1)，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示；作为半衰期延长结构域(HLE) 的血清白蛋白(SA)结合肽来自 VHH 结构域 VHH^{SA}，更具体来自 VHH 序列 ALB8 (以下简称 HLE2，SEQ ID NO: 40)；符号“-”表示两个 VHH 结构域之间通过肽接头连接。

表 20.单链多特异性抗体

抗体 ID (名称)	Format	具体拼接方式	所用具体结构域
V-hu2 (V-F1S1T1.2)	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Nectin4} -VHH ^{SA}	S1-F1-HLE2	A04.m1-F09.m2m5- ALB8
V-hu8 (V-F1F1S1T1.8)	VHH ^{Trop2} -VHH ^{SA} -VHH ^{Nectin4} - VHH ^{Nectin4}	S1-HLE2-F1-F1	A04.m1-ALB8-F09.m2m5- F09.m2m5
V-hu22 (V-F1F1S1S1T1.22)	VHH ^{Trop2} -VHH ^{Trop2} -VHH ^{SA} - VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Nectin4}	S1-S1-HLE2-F1- F1	A04.m1-A04.m1-ALB8- F09.m2m5-F09.m2m5

*肽接头=(G4S)2

将表 19 和 20 中的单链抗体以 C 末端添加 6xHis 标签的形式，构建至 pcDNA3.4 表达载体中。转染至 Expi293F 细胞中，培养细胞 3 天，并收集转染细胞的培养上清液，使用镍柱纯化表达的抗体。用 Nano Drop 测量抗体浓度。用 SDS-PAGE 和分析 HPLC-SEC 测定蛋白纯度，然后将其储存在-80℃。

多链多特异性抗体分子构建

构建体如下表 21 和 22 中所示的示例性多链形式的双特异性抗体，其对应的氨基酸序列提供于序列表中。

在表 21 中，使用非人源化 VHH 序列作为 **building block**，其中 VHH^{Trop2} 氨基酸序列来自 G08(以下简称 T1)和 H03(以下简称 T2)，其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 13 所示；VHH^{Nectin4} 氨基酸序列来自 F12(以下简称 N1)和 D9(以下简称 N2)，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 25 所示；作为半衰期延长结构域(half life extension domain, HLE)的免疫蛋白 Fc 区来自人 IgG，具体为分别包含 knob 突变和 hole 突变((T366Y/Y407T)或(T366W/T366S,L368A,Y407V))的 hIgG1 Fc 序列；符号“-”表示两个结构域之间通过肽接头连接或直接连接。

表 21. Fc 二聚体形式多链多特异性抗体

抗体 ID	Format	具体拼接方式	所用具体结构域
V-10	第一链: VHH ^{Trop2} -Fc 第二链: VHH ^{Nectin4} -Fc	第一链: T1-Fc 第二链: N1-Fc	G08-Fc F12-Fc
V-13	第一链: VHH ^{Trop2} -Fc 第二链: VHH ^{Nectin4} -Fc	第一链: T2-Fc 第二链: N2-Fc	H03-Fc D9-Fc
V-14	第一链: VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Trop2} -Fc 第二链: VHH ^{Nectin4} -Fc	第一链: N2-T2-Fc 第二链: N2-Fc	D9-H03-Fc D9-Fc

V-15	第一链: VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Trop2} -Fc 第二链: VHH ^{Nectin4} -Fc	第一链: N1-T1-Fc 第二链: N1-Fc	F12-G08-Fc F12-Fc
V-16	第一链: VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Trop2} -Fc 第二链: VHH ^{Nectin4} -Fc	第一链: N2-T1-Fc 第二链: N2-Fc	D9-G08-Fc D9-Fc
V-17	第一链: VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Nectin4} -Fc 第二链: VHH ^{Trop2} -Fc	第一链: N1-N1-Fc 第二链: T1-Fc	F12-F12-Fc G08-Fc
V-18	第一链: VHH ^{Nectin4} -VHH ^{Nectin4} -Fc 第二链: VHH ^{Trop2} -Fc	第一链: N2-N2-Fc 第二链: T2-Fc	D9-D9-Fc H03-Fc

注: 两个 VHH 结构域之间通过肽接头 G4S 连接, VHH 结构域与 Fc 结构域之间为直接连接

在表 22 中, 使用人源化 VHH 序列作为 building block, 其中 VHH^{Trop2} 氨基酸序列来自 A04.m1 (以下简称 S1) 或 A04.m1m12 (以下简称 S2), 其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 30 所示; VHH^{Nectin4} 氨基酸序列来自 F09.m2m5 (以下简称 F1) 或 F09.m2m5-2 (以下简称 F2), 其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 38 所示; 作为半衰期延长结构域(HLE) 的免疫蛋白 Fc 区来自人 IgG, 具体为分别包含或不包含 knob 突变和 hole 突变((T366Y/Y407T)或(T366W/T366S,L368A,Y407V))的 hIgG1 序列; 符号“-”表示两个结构域之间通过肽接头连接或直接连接。表 22 中也显示了作为对照的 Parental anti-Nectin4 抗体和 Parental anti-Trop2 抗体, 其中 Parental anti-Nectin4 包含 VHH^{Nectin4} 结构域(F2), 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 109 所示; Parental anti-Trop2 包含 VHH^{Trop2} 结构域(S2)以及靶向轮状病毒的 VHH^{RV} 结构域(来自 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.06.053), 第一和第二链氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 107 和 108 所示。

表 22. Fc 二聚体形式多链多特异性抗体

抗体 ID (名称)	Format	具体拼接方式	所用具体结构域
V-hu21-Fc (V-F1S1.21 uIgG1 LALA)	第一链: VHH ^{Nectin4} - VHH ^{Trop2} -Fc 第二链: VHH ^{Nectin4} -Fc	第一链: F1-S1-Fc 第二链: F1-Fc	F09.m2m5-A04.m1-Fc F09.m2m5-Fc
V-hu23-Fc (V-F2S2.23 uIgG1 LALA)	第一链: VHH ^{Nectin4} - VHH ^{Trop2} -Fc 第二链: VHH ^{Nectin4} -Fc	第一链: F2-S2-Fc 第二链: F2-Fc	F09.m2m5-2-A04.m1m12- Fc F09.m2m5-2-Fc
V-hu24-Fc (V-F2S2.24 uIgG1 LALA)	第一链: VHH ^{Nectin4} - VHH ^{Trop2} -Fc 第二链: VHH ^{Nectin4} - VHH ^{Trop2} -Fc	第一链: F2-S2-Fc 第二链: F2-S2-Fc	F09.m2m5-2-A04.m1m12- Fc F09.m2m5-2-A04.m1m12- Fc
V-hu25-Fc (V-F2S2.25 uIgG1 LALA)	第一链: VHH ^{Nectin4} - VHH ^{Trop2} -Fc 第二链: VHH ^{Nectin4} - VHH ^{Trop2} -Fc	第一链: F2-S2-Fc 第二链: F2-S2-Fc	F09.m2m5-2-A04.m1m12- Fc F09.m2m5-2-A04.m1m12- Fc
V-hu28-Fc (V-F2S2.28 uIgG1 LALA)	第一链: VHH ^{Nectin4} - VHH ^{Nectin4} -Fc 第二链: VHH ^{Trop2} -Fc	第一链: F2-F2-Fc 第二链: S2-Fc	F09.m2m5-2-F09.m2m5-2- Fc A04.m1m12- Fc
V-hu29-Fc (V-F2S2.29 uIgG1 LALA)	第一链: VHH ^{Trop2} -Fc 第二链: VHH ^{Nectin4} -Fc	第一链: S2-Fc 第二链: F2-Fc	A04.m1m12-Fc F09.m2m5-2-Fc
Parental anti- Nectin4 (V-F2.33 uIgG1 LALA)	第一链: VHH ^{Nectin4} -Fc 第二链: VHH ^{Nectin4} -Fc	第一链: F2-Fc 第二链: F2-Fc	F09.m2m5-2-Fc F09.m2m5-2-Fc

Parental anti-Trop2 # (V-S2Fr1.34-ulgG1 LALA)	第一链: VHH ^{RV} -VHH ^{RV} -Fc 第二链: VHH ^{Trop2} -Fc	-	RV-RV-Fc A04.m1m12-Fc
--	--	---	--------------------------

*两个 VHH 结构域之间通过肽接头(G4S)2 连接, VHH 结构域与 Fc 结构域之间为直接连接或者通过 G4S 连接

本发明中 V-hu21-Fc、V-hu22-Fc、V-hu23-Fc、V-hu24-Fc、V-hu25-Fc、V-hu26-Fc、V-hu27-Fc、V-hu28-Fc、V-hu29-Fc 也分别称为 V-hu21、V-hu22、V-hu23、V-hu24、V-hu25、V-hu26、V-hu27、V-hu28、V-hu29。

将表 21 和 22 所示的 Fc 二聚体形式的双链抗体的第一/第二多肽链构建至 pcDNA3.4 表达载体中(如果抗体为对称结构则生成一种载体;如果抗体为不对称结构,则生成分别包含第一和第二多肽链编码基因的两种载体),转染至 HEK293F 细胞中。培养细胞 3 天,并收集转染细胞的培养上清液,装入 Protein A 柱(MabSelect Prisma, Cytiva)用于纯化。抗体用醋酸-醋酸钠溶液(pH3.5)洗脱,然后立即用 2M Tris 中和。用 Nano Drop 测量抗体浓度。用 SDS-PAGE 和分析 HPLC-SEC 测定蛋白纯度,然后将其储存在-80°C。

对照双特异性抗体构建

使用来自参照抗体 Datopotamab 和 Enfortumab 的可变区氨基酸序列,构建对照双特异性抗体 V-11 和 V-12。抗体 V-11 由 C 端连接 Fc 区的 Datopotamab 的 Fab 部分和 C 端连接 Fc 区的 Enfortumab 的 scFv 部分组成,其两条重链和一条轻链的氨基酸序列(SEQ ID NOs: 77-79)在序列表中提供。抗体 V-12 由 C 端连接 Fc 区的 Datopotamab 的 scFv 部分和 C 端连接 Fc 区的 Enfortumab 的 Fab 部分组成,其两条重链和一条轻链的氨基酸序列(SEQ ID NOs: 80-82)在序列表中提供。采用与上述基本相同的方式,产生并纯化对照抗体 V-11 和 V-12。用 Nano Drop 测量抗体浓度。用 SDS-PAGE 和分析 HPLC-SEC 测定蛋白纯度,然后将其储存在-80°C。

实施例 1.5 多特异性抗 Trop2/Nectin4 抗体分子的表征

肿瘤细胞上靶抗原表达水平分析

使用参照抗体 Datopotamab 和 Enfortumab,采用 FACS 结合试验,检测各种靶肿瘤细胞上 Trop2 抗原和 Nectin4 抗原的表达情况。

检测结果如图 6 所示。在测试的肿瘤细胞 MKN45 上,两种抗原均呈现出极低表达水平,属于抗原阴性细胞;在其余测试的肿瘤中,除了 BT474 细胞具有极低水平的 Trop2 表达外,其余肿瘤细胞均呈现出高水平 Trop2 表达水平,且显著高于 Nectin4 的表达水平。不同肿瘤之间 Nectin4 表达水平的比较显示,HT1197 和 MDA-MB-231 的 Nectin4 表达极低,NCI-N87、SK-BR-3 和 BT474 具有相对中等水平的 Nectin4 表达,而其余肿瘤的 Nectin4 表达水平相对较高。

非特异性结合分析

通过 ELISA 结合试验,检测了上述构建并制备的多特异性抗体分子对抗原同源物的结合。ELISA 结合试验使用如下条件:抗原 Trop1/2 或 Nectin1/2/3/4 (1 µg/ml, 2-8°C 过夜包板)+待测抗体样品 (200 nM, 6×稀释, RT 1h)+Anti-Fc-HRP 二抗(1:5000, RT 1 h)。

结果显示,多特异性抗体分子对同源物 Trop1 和 Nectin1/2/3 均无特异性结合,其中针对抗体 V-hu21-Fc 和 V-hu23-Fc 的非特异性结合分析结果显示在图 7 中。

肿瘤细胞结合活性

基于上述对肿瘤细胞上抗原表达分析,选择了靶抗原表达水平不同的细胞系 NCI-N87 (Trop2^{hi}, Nectin4^{med})、BT474 (Trop2^{low}, Nectin4^{hi}) 和 MDA-MB-468 (Trop2^{hi}, Nectin4^{hi}),通过 FACS 结合试验,测试了本发明的双特异性抗体(简称“V BsAb”)在不同靶细胞上的结合能力。

单链抗体使用如下 FACS 结合试验条件进行：靶细胞($1-2 \times 10^5$ /孔)+ 样品(200 nM, 3×稀释, 4°C 1 h)+抗 His-APC 二抗(Biolegend, 1:200, 4°C 1 h)

Fc 二聚体形式的双链抗体使用如下 FACS 结合试验条件进行：靶细胞(2×10^5 /孔)+ 样品(200 nM, 3×稀释, 4°C 1 h)+抗人 IgG Fc-PE 二抗(Thermo, 1:500, 4°C 0.5 h)。

在 Trop2 高表达的 NCI-N87 细胞系上, 本发明未人源化的 V BsAb 和含有 Fc 的 V BsAb (V-10, V-13 – V-18) 的结合情况如图 8A-8B 所示。在 Trop2 低表达和 Nectin4 相对高表达的 BT474 细胞系上, 本发明未人源化的 V BsAb 和含有 Fc 的 V BsAb (V-10, V-13 – V-18) 的结合情况如图 9A-9B 所示。

在具有 Trop2 高表达的肿瘤细胞 MDA-MB-468 和 NCI-87 中, 具有 2 个 Trop2 结合位点和 2 个 Nectin4 结合位点的对称型本发明人源化 V BsAb (V-hu24-Fc 和 V-hu25-Fc)与对照抗体 Datopotamab 具有相当的高结合活性; 具有 1 个 Trop2 结合位点和 2 个 Nectin4 结合位点的不对称型本发明人源化 V BsAb (V-hu21-Fc, hu23-Fc 和 hu28-Fc)显示出相当的结合活性, 均高于对照 Enfortumab 抗体, 而且在具有更低 Nectin4 水平的靶肿瘤细胞 NCI-87 中与 Enfortumab 的差异更为明显; 此外, 仅具有 1 个 Trop2 结合位点和 1 个 Nectin4 结合位点的人源化 V BsAb (V-hu29-Fc)显示出与 Enfortumab 相似的低结合活性 (图 10A 和 10B)。在 Trop2 低表达 Nectin4 高表达的 BT474 细胞中, 本发明人源化 V BsAb 表现出与对照 Enfortumab 相似的结合行为 (图 10C)。

选择 Fc 二聚体形式的人源化 V-hu21-Fc, 通过 FACS 结合试验, 进一步检测了抗体与多种不同肿瘤细胞的结合活性。在试验中, 作为对照, 使用了抗 Nectin4 单特异性二价抗体 Parental anti-Nectin4。FACS 结合试验条件如下: 靶细胞(2×10^5 /孔)+ 样品(200 nM, 3×稀释, 4°C 1 h)+抗人 IgG Fc-PE 二抗(Thermo, 1:500, 4°C 0.5 h)。结果显示在图 11 中。

选择 Fc 二聚体形式的人源化 V-hu23-Fc, 通过 FACS 结合试验, 进一步检测了抗体与 HT1376 和 NCI-H292(人粘液表皮样癌肺, CBP60187, 南京科佰生物科技有限公司)肿瘤细胞的结合活性。在试验中, 作为对照, 使用了 Parental anti-Trop2 和 Parental anti-Nectin4 作为对照。FACS 结合试验条件如下: 靶细胞(3×10^5 /孔)+ 样品(200 nM, 3×稀释, 4°C 1 h)+抗人 IgG Fc-PE 二抗(Thermo, 1:500, 4°C 0.5 h)。结果显示在图 12 中。

结果显示 V-21-Fc、V-23-Fc 与母本对照分子相比, 在靶点双阳的细胞上显示协同结合效应。

内化测定

使用内吞试验, 检测了本发明双特异性抗体分子在不同靶细胞 NCI-N87, BT-474, HT1376、MDA-MB-468 和 NCI-H292 细胞上的内化能力。

选择靶点抗原表达不同的上述细胞系测试了本发明 V BsAb 的内吞能力。如图 13A-E 所示, 所有测试的 V BsAb 均表现出良好的内吞活性, 且 V-21-Fc、V-hu23-Fc 与其母本对照分子 Parental anti-Trop2 和 Parental anti-Nectin4 相比较在靶点双阳肿瘤细胞 (HT1376 和 NCI-H292) 上显示协同内吞效应。

结合动力学 SPR 测定

通过 SPR 法检测双特异性抗体分子 V-hu21 对人、食蟹猴 Trop2 抗原和 Nectin4 抗原 (义翘神州) 的亲合力。用 Protein A 芯片捕获 10 μ g/mL 抗体 15s, 后以 30 μ L/min 的流速注入 2 倍梯度稀释的抗原, 结合时间为 120 秒, 然后解离时间为 200 秒。在每个解离阶段后, 10mM 甘氨酸(pH 2.0)用于芯片再生。实验数据采用 1:1 结合模型进行分析。

候选分子 V-hu21-Fc 与人、食蟹猴 Trop2 的亲合力结果如表 23 所示。结果表明, 候选分子 V-hu21-Fc 与食蟹猴 Trop2 有交叉反应, 并且呈现出与人 Trop2 抗原和食蟹猴 Trop2 抗原具有相近的结合和解离速率。

表 23. V-hu21-Fc 对人、食蟹猴 Trop2 抗原的亲和力

固定物	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
V-hu21-Fc	Human Trop2	3.45E+05	2.09E-02	6.06E-08
V-hu21-Fc	Cyno Trop2	1.58E+05	9.81E-03	6.21E-08
V-BMK1 (Datopotamab)	Human Trop2	1.32E+05	3.15E-03	2.38E-08
V-BMK1 (Datopotamab)	Cyno Trop2	1.10E+05	3.57E-03	3.25E-08

候选分子 V-hu21-Fc 与人、食蟹猴 Nectin4 的亲和力结果如表 24 所示。结果表明，候选分子 V-hu21-Fc 与食蟹猴 Nectin4 有交叉反应，并且呈现出与人 Nectin4 抗原和食蟹猴 Nectin4 抗原有相近的结合和解离速率。

表 24. V-hu21-Fc 对人、食蟹猴 Nectin4 抗原的亲和力

Capture	Analyte	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
V-hu21-Fc	Human Nectin4	5.08E+04	9.86E-03	1.94E-07
V-hu21-Fc	Cyno Nectin4	2.54E+05	1.50E-02	5.89E-08
V-BMK2 (Enfortumab)	Human Nectin4	4.12E+05	4.72E-03	1.14E-08
V-BMK2 (Enfortumab)	Cyno Nectin4	3.83E+05	8.31E-03	2.17E-08

此外，也通过 SPR 法检测了双特异性抗体分子 V-hu23-Fc 对人、食蟹猴 Trop2 抗原或人、食蟹猴 Nectin4 抗原的亲和力。结果如下表 25 和 26 所示。

表 25. V-hu23-Fc 对人、食蟹猴 Trop2 抗原的亲和力

固定物	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
V-hu23-Fc	Human Trop2-His	1.14E+05	9.14E-03	8.05E-08
V-hu23-Fc	Cyno Trop2-His	9.95E+04	7.99E-03	8.03E-08
V-BMK1 (Datopotamab)	Human Trop2-His	1.31E+05	3.59E-03	2.75E-08
V-BMK1 (Datopotamab)	Cyno Trop2-His	1.10E+05	3.54E-03	3.23E-08

表 26. V-hu23-Fc 对人、食蟹猴 Nectin4 抗原的亲和力

固定物	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
V-hu23-Fc	Human Nectin4-His	4.34E+04	5.94E-03	1.37E-07
V-hu23-Fc	Cyno Nectin4-His	3.77E+04	7.18E-03	1.90E-07
V-BMK2-Enfortumab	Human Nectin4-His	3.13E+05	3.93E-03	1.26E-08
V-BMK2-Enfortumab	Cyno Nectin4-His	3.26E+05	7.38E-03	2.27E-08

可开发性评估

通过 SEC-HPLC、CEX-HPLC、HIC-HPLC 以及 DLS 测定，对候选分子 V-hu21, hu23, hu24-Fc 进行理化性质分析。样本显示出具有可开发性的理化性质如表 27。

表 27. V-hu21, hu23, hu24-Fc 理化性质 DA 数据

样品名称	浓度(mg/mL)	SEC-HPLC (%)	CEX-HPLC(%)			HIC-HPLC(%)	T _m (°C)	T _{agg} (°C) 266
		主峰	酸性峰	主峰	碱性峰	主峰 (NH ₄) ₂ SO ₄ (M)		
V-hu21-Fc	8.97	98.7	9.1	87.0	4.0	0.43	54.9	60.4
V-hu23-Fc	1.23	95.7	17.2	78.2	4.6	0.67	61.8	65.0
V-hu24-Fc	0.94	92.1	24.3	72.2	3.5	0.63	55.8	63.4

实施例 2. 抗体-药物偶联物（ADC）的制备和表征

本发明实施例部分使用的连接子-有效载荷是现有技术已知和/或可商购的，当所绘制结构与实际情况不一致时，应当允许根据实际情况对结构进行修改。

材料和方法

Name	Manufacturer	Catalog Number
Mal-Gly-EXD-D-glucuronic acid	MedChemExpress	HY- 153179
Mal-PEG8-Val-Ala-PAB-Exatecan	MedChemExpress	HY-147271
Deruxtecan	MedChemExpress	HY-13631E
Constant Temperature Oscillation Metal Bath	Dlab	HCM100-pro
Centrifuge	Thermo Fisher Scientific	Cat# 75002420
Amicon Utral-15	Millipore	UFC903096
TECP	aladdin	T107252

通用合成方法 A

将在 20 mM His-hac，150 mM NaCl，pH5.5 缓冲液中的 5.45mg/ml 抗体(例如根据上述抗体制备实施例制备的相应双特异性抗体)置于 Eppendorf 管中。将 6 摩尔当量的 TCEP (Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride, 5mM 浓度)加入到抗体缓冲液中(TCEP: 抗体= 6:1 摩尔比)。将含有反应混合物的 Eppendorf 管置于振荡器(x500 rpm)上，在 37°C 反应 2 小时。向混合物中加入另外 6 摩尔当量的 TCEP (5mM)。将反应混合物置于振荡器(500rpm)上在 37°C 下再振荡 2 小时。然后，超滤(MWCO 30 kd)以除去 TECP，并用 20 mM His-hac 缓冲液补充至原体积。将 6 摩尔当量的连接子-有效载荷(即 linker-payload)(5 mg/ml，在 DMA 中)逐滴加入完全还原的抗体中，同时 DMA 浓度保持低于 20% (v/v)。将反应在振荡器上室温保持 2 小时(连接子-有效载荷: 抗体= 6:1)。用 HIC-HPLC 检测转化率，当转化完全进行纯化。将反应混合物转移到超滤管(MWCO 30 kd)中，加入 10 mM His-hac (pH 6)至总共 450μl。以 10,000 rpm 离心样品 5 分钟，剩余约 200μl 溶液，用 His-hac 补充至 450μl。丢弃流穿物。重复洗涤步骤 6 次。转移剩余的溶液，并加入 200μl His-hac，通过上下吸移冲洗滤膜，合并得 ADC 偶联产品。

进行 Pro A 树脂纯化(40g/L 树脂装载容量)。用 10 CV PBS 洗涤填充有树脂的重力柱，然后将样品装载到柱上。首先用至少 10 CV 的含有 10% DMSO 的 PBS 缓冲液洗涤，然后用至少 50 CV 的 PBS 缓冲液洗涤以完全除去游离的有效载荷。用 pH 3 的醋酸溶液(浓度 50mM)洗脱并立即用 2M tris 缓冲液(pH 12.0)中和至 pH 5.5~pH 6.0。重复洗脱步骤并测量流穿浓度(Nanodrop, A280)直至偶联物完全洗脱。将 ADC 溶液在 Eppendorf 管中合并。如果终浓度小于预期，用超滤膜(MWCO 30 kd)浓缩至所需浓度。

通过 SEC-HPLC 方法测定纯度，HIC-HPLC 方法测定平均 DAR 值，通过 RP-HPLC 方法测定游离连接子-有效载荷。

通用合成方法 B

将 PH=7.4 在 PBS 中的抗体(例如根据上述抗体制备实施例制备的相应双特异性抗体)置于 Eppendorf

管中。将 5.7 摩尔当量的 TCEP (5mM 浓度)和 2.85 摩尔当量的 ZnCl₂ (5mM 浓度)加入抗体缓冲液(TCEP: 抗体: ZnCl₂ = 5.7:1:2.85)。将包含反应混合物的 Eppendorf 管置于 6°C的振荡器(x500 rpm)上 16 小时。将 12 摩尔当量的连接子-有效载荷(5 mg/ml, 在 DMA 中)逐滴加入完全还原的抗体中, 同时 DMA 浓度保持在 10% (v/v)。将反应在 6°C下在振荡器上保持 2 小时(连接子-有效载荷: 抗体= 12:1)。用 HIC-HPLC 检测转化率, 当转化完全立即进行纯化。将反应混合物转移到超滤管(MWCO 30 kd)中, 加入 PBS (pH 7.4)至 450µl。以 10,000 rpm 离心样品 5 分钟, 剩余约 200µl 溶液, 用 PBS 补充至原体积。丢弃流穿液体。重复洗涤步骤 10 次。最后一次加入 200µl PBS, 通过上下吹打冲洗滤膜, 合并剩余的溶液得到 ADC 产品。如果终浓度小于预期, 用超滤膜(MWCO 30 kd)浓缩至所需浓度。通过 SEC-HPLC 方法测定 ADC 纯度, HIC-HPLC 方法测定平均 DAR 值, 以及 RP-HPLC 方法检测游离连接子-有效载荷含量。

通用合成方法 C

将在 20 mM His-hac, 150 mM NaCl, pH5.5 缓冲液中的 5.45mg/ml 抗体(例如根据上述抗体制备实施例制备的相应双特异性抗体)置于 Eppendorf 管中。将 6 摩尔当量的 TCEP (Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride, 5mM 浓度)加入到抗体缓冲液中(TCEP: 抗体=6:1)。将含有反应混合物的 Eppendorf 管置于振荡器(x500 rpm)上, 在 37°C反应 2 小时。向混合物中加入另外 6 摩尔当量的 TCEP (5mM)。将反应混合物置于振荡器(500rpm)上在 37°C下再振荡 2 小时。然后, 超滤(MWCO 30 kd)以除去 TECP, 并用 20 mM His-hac 缓冲液补充至原体积。将 8 摩尔当量的连接子-有效载荷(即 linker-payload)(5 mg/ml, 在 DMA 中)逐滴加入完全还原的抗体中, 同时 DMA 浓度保持低于 20% (v/v)。将反应在振荡器上室温保持 2 小时(连接子-有效载荷: 抗体= 8:1)。用 HIC-HPLC 检测转化率, 当转化完全即进行纯化。将反应混合物转移到超滤管(MWCO 30 kd)中, 加入含有 10%DMA 的 10 mM His-hac (pH 6)至总共 450µl。以 10,000 rpm 离心样品 5 分钟, 剩余约 200µl 溶液, 用 His-hac 补充至 450µl。丢弃流穿物。重复洗涤步骤 10 次。然后加入含有 10 mM His-hac (pH 6)至总共 450µl, 重复洗涤步骤 5 次, 最后转移剩余的溶液, 并加入 200µl His-hac, 通过上下吸移来冲洗滤膜。合并转移溶液与滤膜洗涤液得到 ADC 产品。

通过 SEC-HPLC 方法测定 ADC 纯度, HIC-HPLC 方法测定平均 DAR 值, 以及 RP-HPLC 方法检测游离连接子-有效载荷含量。

用于测定或检测 ADC 的一般方法和/或参数

尺寸排阻色谱法(SEC)方法(用于 ADC 纯度检测)。

SEC-HPLC 方法参数

色谱条件	
柱温箱	25±1°C
流速	0.8 mL/mL
运行时间	20 min
进样量	至少 40µg
洗脱类型	等度洗脱
柱	Zenix-C SEC-150, 7.8*300mm 150*
流动相:	50mM PB +300 mM NaCl, pH 6.8 ±0.1

反相 HPLC (RP HPLC) 法(用于游离药物检测)

RP HPLC 法参数

柱	Agilent 安捷伦 ZORBAX StableBond 300 C3 柱, 4.6x150mm, 5µm
检测波长	280 nm; 214nm (任选)
柱温箱温度:	60 °C
取样器温度:	15 °C
流速:	1.0 mL/min
进样量:	2µg
流动相	流动相 A: 0.1% TFA 的 H ₂ O 溶液
	流动相 B: 0.1% TFA 的 ACN 溶液

按照下表进行洗脱

时间(Min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.0	75.0	25.0
2.0	75.0	25.0
10.0	5.0	95.0
12.0	5.0	95.0
14.0	5.0	95.0
16.0	80.0	20.0
18.0	80.0	20.0

HIC-HPLC 法(用于游离抗体和 DAR 分布检测)

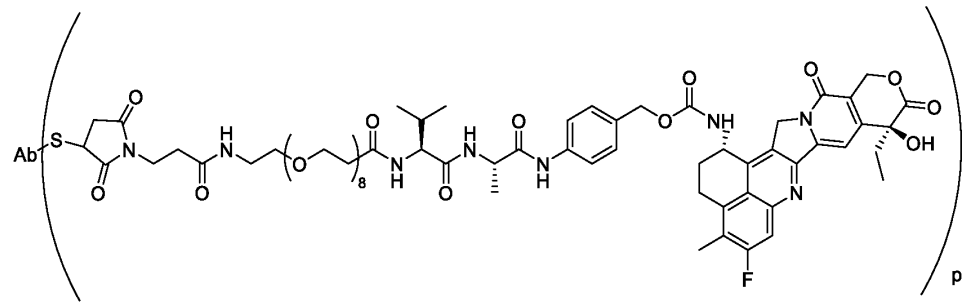
HIC-HPLC 条件。

柱	MAbPac™ HIC-Butyl HPLC 色谱柱, 5µm, 4.6 X 100mm, Thermo SCIENTIFIC
检测波长	280 nm; 214nm (任选的)
柱温箱温度:	25°C
取样器温度:	15°C
流速:	0.6 mL/min
进样量:	30-50µg
流动相	流动相 A: 1.5M (NH ₄) ₂ SO ₄ 和 50mM PB, pH7.4
	流动相 B: 50 mM PB, 25% IPA, pH 7.4

按照下表进行洗脱

时间(Min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.0	100.0	0.0
7.0	100.0	0.0
23.0	0.0	100.0
26.0	0.0	100.0
26.5	100.0	0.0
35.0	100.0	0.0

实施例 2.1 V-hu21-VA-Exd 的制备

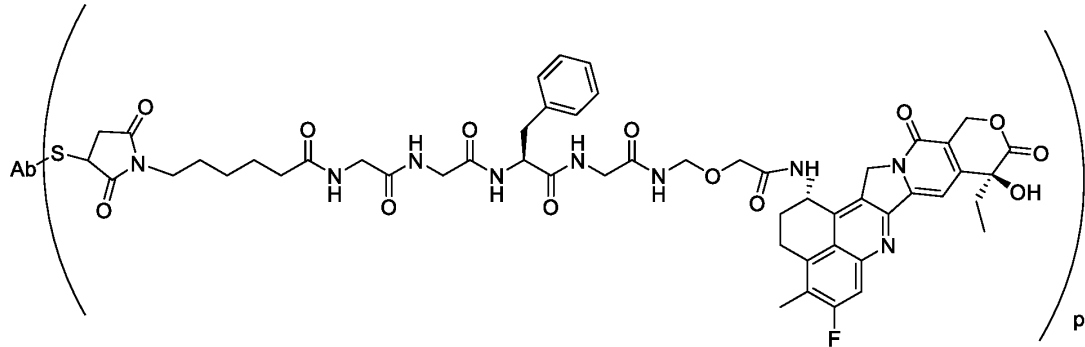


V-hu21-VA-Exd

其中 Ab 是双特异性抗体 V-hu21；p 主要为 4，获得的 V-hu21-VA-Exd 测定具有 4.0 的平均 DAR。

按照通用合成方法 A，采用按照上述实施例方法制备的双特异性抗体 V-hu21 和连接子-有效载荷 Mal-PEG8-Val-Ala-PAB-Exatecan (CAS No. : 2679821-39-5；目录号 HY-147271)制备得到 V-hu21-VA-Exd。

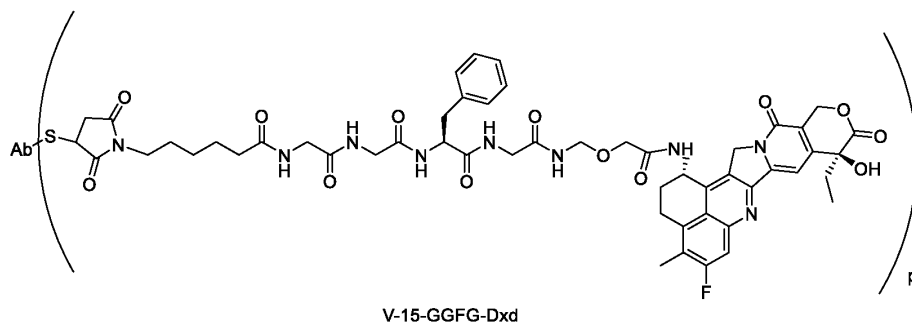
实施例 2.2 V-hu21-GGFG-Dxd 的制备



V-hu21-GGFG-Dxd

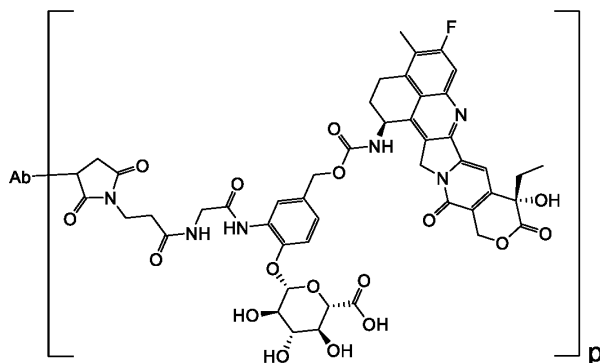
其中 Ab 是双特异性抗体 V-hu21；p 主要为 4，获得的 V-hu21-GGFG-Dxd 测定具有 4.0 的平均 DAR。

按照通用合成方法 A，采用按照上述实施例方法制备的双特异性抗体 V-hu21 和连接子-有效载荷 Deruxtecan (CAS No. : 1599440-13-7；MCE, HY-13631E)制备得到 V-hu21-GGFG-Dxd。产物纯度为 95%。

实施例 2.3 V-15-GGFG-Dxd 的制备

其中 Ab 是双特异性抗体 V-15; p 主要为 4, 获得的 V-15-GGFG-Dxd 测定具有 4.0 的平均 DAR。

按照通用合成方法 A, 采用按照上述实施例方法制备的双特异性抗体 V-15 和连接子-有效载荷 Deruxtecan (CAS No. : 1599440-13-7; MCE, HY-13631E) 制备得到 V-15-GGFG-Dxd。产物具有 4.0 的平均 DAR 值, 产率 60%, SEC-HPLC 纯度为 95%。

实施例 2.4 V-hu23-Glu-Exd 的制备

其中 Ab 是双特异性抗体 V-hu23; p 主要为 4, 获得的 V-hu23-Glu-Exd 测定具有 4.0 的平均 DAR。

按照通用合成方法 C, 采用按照上述实施例方法制备的双特异性抗体 V-hu23 和连接子-有效载荷 Mal-Gly-EXD-D-glucuronic acid (CAS No. : 2763252-25-9; MCE, HY-153179) 制备得到 V-hu23-Glu-Exd。产物具有 4.0 的平均 DAR 值, 产率 86%。

实施例 2.5 另外的 ADC 的制备

按照实施例 2.1 所述的方法, 但采用不同的抗体 (如 V-15、V-hu23 或 V-hu24) 代替 V-hu21, 分别制备得到 V-15-VA-Exd、V-hu23-VA-Exd 或 V-hu24-VA-Exd。

按照实施例 2.4 所述的方法, 但采用不同的抗体 (V-hu24) 代替 V-hu23, 制备得到 V-hu24-Glu-Exd。

将本申请实施例制备得到的 ADC 和对照 ADC (商业可获得的 Dato-Dxd) 的一些相关信息提供在下面的表格中 (表 28)。其中 Dato-Dxd 也可按照前述通用合成方法 B 制备得到。

表 28 ADC 基本信息

Molecule ID	Linker-payload type and DAR value	Conjugation Strategy	Extinction coefficient	MW	ConC.	平均 Dar value	Purity (%)
Dato-Dxd	GGFG-DXD /DAR4	Cysteine	1.52	150.14	1.86	3.8	99
V-15 -GGFG-DXD	GGFG-Dxd/DAR4	Cysteine	1.74	92.89	3.85	4.0	95
V-15-VA-Exd	PEG-VA-PAB-EXD/DAR4	Cysteine	1.74	94.37	1.47	4.0	>95
V-hu21- GGFG-DXD	GGFG-Dxd/DAR4	Cysteine	1.68	96.30	2.63	4.0	95
V-hu21-VA-EXD	PEG-VA-PAB-EXD/DAR4	Cysteine	1.68	97.48	1	3.8	99
V-hu23-VA-Exd	PEG-VA-PAB-EXD/DAR4	Cysteine	1.69	97.3	1.29	4.0	>95
V-hu24-VA-Exd	PEG-VA-PAB-EXD/DAR4	Cysteine	1.68	111.3	1.48	3.9	>95
V-hu23-Glu-Exd	Mal-Gly-ExD-D-glucuronic acid /DAR4	Cysteine	1.69	96	2.3	4.0	>95
V-hu24-Glu-Exd	Mal-Gly -ExD-D-glucuronic acid /DAR4	Cysteine	1.69	110.5	2.27	4.0	>95

在本公开中，当涉及连接子-有效载荷时，Glu 也被称为 Gluc，例如 Glu-Exd 也被称为 Gluc-Exd。

实施例 3. ADC 的体外实验

实施例 3.1 ADC 的体外结合实验

方法：

- 1) 靶细胞 NCI-N87 细胞 (TCHu130, 中国科学院细胞库)，或者 MDA-MB-468 (TCHu136, 中国科学院细胞库) 以每孔 1-3×10⁵ 个细胞铺板，并加入已稀释好的前述制备好的待测抗体或 ADC (100 nM, 3 倍稀释) 2-8℃孵育 1h 左右
- 2) 4℃离心，去除上清，200 μl/孔 FACS Buffer (1% BSA in PBS) 重悬细胞，4℃离心，再次用 200 μl/孔 FACS Buffer 重悬细胞，4℃离心
- 3) 100 μl/孔稀释至目标稀释倍数的流式二抗 Anti-Hu IgG Fc-PE(ThermoFisher Scientific)重悬细胞，2-8℃避光孵育 1h 左右
- 4) 200 μl/孔 FACS Buffer 洗涤 2 次后，100 μl/孔 FACS Buffer 重悬细胞；
- 5) 用流式细胞仪(Beckman Coulter)测定细胞的 MFI。

结果见图 14A-E。各 ADC 分子均表现出与其对应裸抗类似的细胞结合能力。

实施例 3.2 体外杀伤实验

方法 1

- 1) 靶细胞以 3000-6000 个 MDA-MB-468 肿瘤细胞 (TCHu136, 中国科学院细胞库) 或 MKN45 肿瘤细胞(CBP60488, 南京科佰生物科技有限公司)/孔铺板，100μL/孔，37℃ 5%CO₂ 培养箱孵育过夜；待测样品用完全培养基稀释至合适的浓度(起始浓度 400nM)，100μL/孔加入到已铺板的 96 孔培养板，37℃ 5 %CO₂ 培养箱孵育 3-6 天。2) 20μL/孔加入 CCK-8，37℃ 5%CO₂ 培养箱孵育 1-5 h。3) 读取 OD450。

V-hu21-VA-Exd 和 EV（即 Enfortumab Vedotin）对 Nectin4⁺Trop2⁺ MDA-MB-468 细胞有细胞毒性作用，但对 MNK45 细胞(Nectin4^{low}Trop2⁻)无细胞毒性。有效负载 Exatecan 和 MMAE 能够有效杀死这 2 种细胞系。结果见图 15 A、B。V-hu21-VA-Exd、V-hu23-VA-Exd 和 V-hu24-VA-Exd 对 MDA-MB-468 细胞有细胞毒性作用（图 15 C）。V-hu23-Glu-Exd 和 V-hu24-Glu-Exd 对 MDA-MB-468 细胞有细胞毒性作用（图 15 D）。

方法 2

靶细胞 NCI-H292 (人粘液表皮样癌肺, CBP60187, 南京科佰生物科技有限公司)以 5000 个/孔铺板, 100μL/孔, 37°C 5% CO₂ 培养箱孵育过夜。rProtein G-MMAE (Levena; LEV-GME-100) 用完全培养基稀释至 200nM, 目标抗体（包括表 22 所涉及的 V-hu23-Fc 抗体, Parental anti-Nectin4 抗体, Isotype 抗体）用完全培养基稀释到 200 nM, 目标抗体和 rProtein G-MMAE 体积比 1: 1 混合（摩尔浓度比为 1: 1），室温孵育 1h 左右。目标抗体和 rProtein G-MMAE 混合液用完全培养基 1: 2.5 稀释后, 梯度稀释, 100μL/孔加入到已铺板的 96 孔培养板, 37°C 5 %CO₂ 培养箱孵育 3-6 天; 20μL/孔加入 CCK-8 (Cell Counting Kit-8), 37°C 5% CO₂ 培养箱孵育 1-5 h; 读取 OD 450。

由图 15 E 可见, V-hu23-Protein G-MMAE 在 Trop2 和 Nectin4 双阳肿瘤细胞系 NCI-H292 上引起的杀伤能力优于 anti-Nectin4 parental 对照分子, 显示了 anti-Trop2 与 anti-Nectin4 对双阳肿瘤细胞的协同杀伤作用。

实施例 3.3 旁观者效应

实验 1: 在靶抗原阳性(Ag⁺) 细胞（MDA-MB-468）或培养基中加入指定浓度的 ADC, 培养 4 天。将 100ul 的培养上清液转移到 100ul 培养基中的靶抗原阴性(Ag⁻)细胞（MKN45）中。Ag⁻细胞在 37°C、5%CO₂ 培养箱中再培养 3-4 天。通过添加 CCK8 测定 Ag⁻细胞的活力。

对于靶抗原阴性肿瘤细胞(MKN45), V-hu21-VA-Exd 具有比 EV（即 Enfortumab Vedotin）更强的旁观者效应, 在 2.5nM-20nM 时, 杀伤比例为 60-80% VS <10%。结果见图 16A。图中“EV in medium”和“V-hu21-VA-Exd in medium”分别表示来自添加了相应 ADC 药物的培养基的上清液; “EV cultured w/ MDA-MB-468”和“V-hu21-VA-Exd cultured w/ MDA-MB-468”分别表示来自添加了相应 ADC 药物的 MDA-MB-468 细胞培养基的上清液。

实验 2: Ag⁺细胞 T47D (TCHu 87, 中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)和 Ag⁻细胞 MKN45 分别以荧光染料 CFSE (Invitrogen, 65-0850-84)和 CellTrace Violet (Thremo, C34557 A) 染色后, 阳性细胞 T47D 以 75000 个/250μL/孔铺板, 阴性细胞 MKN45 以 25000 个/250μL/孔铺板, 两种细胞混合培养, 37°C 5% CO₂ 培养箱孵育过夜。待测样品用完全培养基稀释至 4nM 和 2nM, 以 500μL/孔加入到已铺板的 24 孔培养板, 37°C 5 %CO₂ 培养箱孵育 3 天。之后, 将所有细胞收集到深孔板中, 以 3μL/孔加入 counting beads (invitrogen, C36995), 400g 离心 5 分钟, 然后细胞用 DPBS 清洗两遍。收集的细胞以 Live/Dead 染料 (Thremo, L34976) 染色。染色完成后, 细胞用 2% FBS-DPBS 缓冲液清洗两次, 之后重悬细胞, 于流式细胞仪 (Beckman, CytoFLEX) 上机检测, 记录 V450/B525/R780 通道下的荧光信号。

结果如图 16B 所示。V-hu23-Glu-Exd 被阳性细胞 T47D 内吞后酶切释放的毒性小分子, 展示了明显的旁观者杀伤效应。V-hu23-Glu-Exd 的旁观者杀伤效应明显优于对照 enfortumab vedotin (EV)。

实施例 4. ADC 的体内效果实验

在无特别说明且不与上下文矛盾时, 所用缩写具有如下含义

缩略词	中文全称
ANOVA	方差分析

BIW	每周两次
QW	每周一次
BW	体重
D	天
<i>i.v.</i>	静脉注射
<i>G</i>	组
mpk	毫克 (药物)每千克 (体重)
N/A	不可用或不适用
PBMC	外周血单核细胞
SD	标准差
SEM	标准误
SPF	无特定病原体
TBD	待定(To be determined)
TGI	肿瘤生长抑制
T-Test	独立样本 T 检验
TV	肿瘤体积
TW	肿瘤重量

实施例 4.1 ADCs 在小鼠 MDA-MB-468 皮下移植模型中的抗肿瘤作用

本实验用于评价受试品(包括本发明的 ADCs)在 NCG 小鼠人乳腺癌细胞 MDA-MB-468 皮下移植模型中的药效作用。

实验 A

受试品配制信息

给药组	给药剂量 (mg/kg)	药物浓度 (mg/mL)	配制方法
Dato-Dxd	8	0.8-	谷氨酸钠缓 冲液稀释
SG+EV	4+4	0.4	谷氨酸钠缓 冲液稀释
EV	8	0.8	谷氨酸钠缓 冲液稀释
V-hu21-GGFG- Dxd	5	0.5	谷氨酸钠缓 冲液稀释

模型构建与分组

模型构建：取 7-8 周龄雌性 NCG 小鼠(Balb/c nu/nu, 来自江苏集萃生物科技股份有限公司), 适应 1 周后, 于右侧肩甲部位注射 MDA-MB-468 (TCHu136, 中国科学院细胞库) PBS 重悬细胞液 (1×10^7 cells/动物), 待肿瘤体积生长到 100-200 cm^3 时依据肿瘤平均体积随机分为 5 组(n=4)。定义分组当天为 D0, 于 D1 静脉给予受试品, 每周 1 次, 预计给药 3 次。

给药体积：根据小鼠体重调整(小鼠给药体积=5 $\mu\text{L/g}$ 或 10 $\mu\text{L/g} \times$ 小鼠体重 (g))

数据采集：开始给药后, 每周称量小鼠体重 2 次, 测量肿瘤体积 2 次, 每天观察动物 2 次。

试验终点：

依据肿瘤体积 (1500-2000 cm^3) 或动物状态确定终点。终点时安乐死所有存活动物并采集肿瘤, 肿瘤拍照、称重后做后续处理。

终点分析

试验结束时, 分析下列指标:

肿瘤体积变化 (TGI_{TV})

肿瘤重量 (TGI_{TW})

体重变化

TGI_{TV} 计算公式:

$$\text{TGI}_{\text{TV}} = \{1 - [(V_t - V_0) / (C_t - C_0)]\} \times 100\%$$

V_t : 受试品给药组小鼠在第 t 天的组平均肿瘤体积;

V_0 : 受试品给药组小鼠在第 0 天的组平均肿瘤体积;

C_t : 溶媒组小鼠在第 t 天的组平均肿瘤体积;

C_0 : 溶媒组小鼠在第 0 天的组平均肿瘤体积。

统计分析

分析处理及报告, 定量指标采用平均值 $\pm$ 标准误 (Mean $\pm$ SEM/SD)描述。定量指标应用 one-way ANOVA 或 two-way ANOVA 等进行分析。组间比较, T 检验, $p < 0.05$ 认为有统计学意义。结果分析时同时考虑统计学意义和生物学意义。作图软件为 GraphPad Prism 8。

V-hu21-GGFG-Dxd 5mpk 组表现出与对照药品 EV(EV-PADCEV® (Enfortumab vedotin)), SG(SG-Trudelvy® (Sacituzumab govitecan))+EV 联合给药和 Dato-Dxd 相当的药效。实验结果见图 17。应当理解, 若无特别说明, 本公开的其他实验中的对照药品 EV 和 SG 与该实验的 EV (EV-Padcev™ (enfortumab vedotin); 厂家: Astellas/Seagen; 批号: 3PA0031) 和 SG (Trudelvy™ (Sacituzumab govitecan); 厂家: Gilead; 批号: S22B002D) 是相同产品。

实验 B

模型构建与分组

模型构建：7-8 周龄雌性 NCG 小鼠(Balb/c nu/nu, 来自江苏集萃生物科技股份有限公司), 适应 1 周后, 于右侧肩甲部位注射 MDA-MB-468 PBS 重悬细胞液 (1×10^7 cells/动物), 待肿瘤体积生长到 100-200 cm^3 时依据肿瘤平均体积随机分为 9 组 (n=4), 定义分组当天为 D0, 于 D1 静脉给予受试品, 单次给药。各组给药剂量见图 18。

给药体积：根据小鼠体重调整(小鼠给药体积=5 $\mu\text{L/g}$ 或 10 $\mu\text{L/g} \times$ 小鼠体重 (g))

数据采集：开始给药后, 每周称量小鼠体重 2 次, 测量肿瘤体积 2 次, 每天观察动物 2 次。

参照实验 A 进行数据处理，实验结果见图 18。

等剂量下，与对照药品 SG 比较，V-hu21-VA-Exd、V-hu23-VA-Exd 和 V-hu24-VA-Exd 均表现出更好的药效。

实施例 4.2 V-ADCs 在 HT1376 模型中的抗肿瘤作用

模型构建：7-8 周龄雌性 NCG 小鼠(Balb/c nu/nu, 来自江苏集萃生物科技股份有限公司)，适应 1 周后，于右侧肩甲部位注射 HT-1376 (CBP60310, 南京科佰生物医药科技有限公司) PBS 重悬细胞液 (5×10^6 cells/动物)，待肿瘤体积生长到 100-200 mm³ 时依据肿瘤平均体积随机分为 5 组 (n=4)，定义分组当天为 D0，于 D1 静脉给予受试品，每周给药一次，共给药 4 次。各组给药剂量见图 19。

给药体积：根据小鼠体重调整(小鼠给药体积=5 μ L/g 或 10 μ L/g $\times$ 小鼠体重 (g))

数据采集：开始给药后，每周称量小鼠体重 2 次，测量肿瘤体积 2 次，每天观察动物 2 次。

参照实施例 4.1 进行数据处理，实验结果见图 19。

V-hu21-GGFG-Dxd 和 V-hu21-VA-Exd 均表现出比对照药品 EV (EV-PADCEV® (Enfortumab vedotin))，SG (SG- Trodelvy® (Sacituzumab govitecan)和 EV 联合给药更优的效果。

实施例 4.3 V-ADCs 在 HT1197 模型中的抗肿瘤作用

HT1197 模型构建：7-8 周龄雌性 BALB/c nu/nu 小鼠(来自上海灵畅生物科技有限公司)，适应 3-7 天后，于右侧肩甲部位注射 HT-1197 (CBP60673, 南京科佰生物医药科技有限公司) PBS 伴随 30%基质胶重悬细胞液 (1×10^7 cells/动物)，待肿瘤体积生长到 100-200 mm³ 时依据肿瘤平均体积随机分为 6 组 (n=4)，定义分组当天为 D0，于 D0 静脉给予受试品，共给药 1 次。各组给药剂量如图 20 所示。给药及数据采集处理参考实施例 4.1。实验结果显示，该模型所用细胞系 HT1197 表达低水平的 Nectin4 抗原，因此，该模型也显示对 EV 耐药。而 V-hu23-Glu-Exd 4mpk 与 Dato-Dxd 8mpk 药效相当，且均优于 EV 3mpk (MTD 剂量) 和 SG 8mpk。

实施例 4.4 V-ADCs 在 MDA-MB-453 模型中的抗肿瘤作用

MDA-MB-453 模型构建：7-8 周龄雌性 NSG 雌性小鼠(来自上海南方模式生物科技有限公司)，适应 3-7 天后，于右侧肩甲部位注射 MDA-MB-453 (CBP60386, 南京科佰生物医药科技有限公司) PBS 伴随 30%基质胶重悬细胞液 (1×10^7 cells/动物)，待肿瘤体积生长到 110-210 mm³ 时依据肿瘤平均体积随机分为 8 组 (n=4)，定义分组当天为 D0，于 D0 静脉给予受试品，共给药 1 次。各组给药剂量参见图 21。数据采集处理参考实施例 4.1。实验结果显示，V-hu23-VA-Exd、V-hu23-Glu-Exd、V-hu24-Glu-Exd 在 4mpk 剂量下，药效均优于 EV 3 mpk (MTD 剂量)，SG 8mpk 和 EV+SG (1.25+8 mpk，临床使用剂量)。

实施例 4.5 V-ADCs 在人源性头颈癌体内移植瘤 LD1-0023-200615 模型中的抗肿瘤作用

模型构建：7-8 周龄雌性 NU/NU (北京维通利华实验动物部技术有限公司)，适应 1 周后，将已建成的人源肿瘤组织(上海立迪生物技术股份有限公司)接种于免疫缺陷小鼠皮下，持续观察至肿瘤生成并且肿瘤体积达到约 500-800mm³ 时，剥离肿瘤组织并将其均匀切成约 3 mm $\times$ 3 mm $\times$ 3 mm 的组织小块，之后将肿瘤组织小块接种到小鼠的皮下，观察肿瘤的生长，当平均肿瘤体积达到约 100-200mm³ (平均值 120 ± 30 mm³)，将荷瘤小鼠随机分为 2 组 (n=5)，定义分组当天为 D0，于 D0 静脉给予受试品，QWx3 给药。各组给药剂量见图 22。

参照实施例 4.1 进行数据处理，实验结果见图 22。在 8mg/kg 剂量下，在给药后第 28 天，V-hu23-VA-Exd 药效可以达到 TGI 94.56%，且肿瘤抑制效果可至少维持到 49 天。

实施例 4.6 V-ADCs 在人源性子宫内膜癌体内移植瘤 LD1-0014-200628 模型中的抗肿瘤作用

模型构建：7-8 周龄雌性 NU/NU (北京维通利华实验动物部技术有限公司), 适应 1 周后, 将已建成的人源肿瘤组织 (上海立迪生物技术股份有限公司) 接种于免疫缺陷小鼠皮下, 持续观察至肿瘤生成并且肿瘤体积达到约 500-800mm³ 时, 剥离肿瘤组织并将其均匀切成约 3 mm × 3 mm × 3 mm 的组织小块, 之后将肿瘤组织小块接种到小鼠的皮下, 观察肿瘤的生长, 当平均肿瘤体积达到约 100-200mm³ (平均值 120 ± 30mm³), 将荷瘤小鼠随机分为 2 组 (n=5), 定义分组当天为 D0, 于 D0 静脉给予受试品, 单次给药。各组给药剂量如图 23。

参照实施例 4.1 进行数据处理, 实验结果见图 23。在 8mg/kg 剂量下, 在给药后第 28 天, V-hu23-VA-Exd 药效可以达到 TGI 130.47%。

实施例 4.7 V-ADCs 在人源性宫颈癌体内移植瘤 LD1-0010-200615 模型中的抗肿瘤作用

模型构建：7-8 周龄雌性 NU/NU (北京维通利华实验动物部技术有限公司), 适应 1 周后, 将已建成的人源肿瘤组织 (上海立迪生物技术股份有限公司) 接种于免疫缺陷小鼠皮下, 持续观察至肿瘤生成并且肿瘤体积达到约 500-800mm³ 时, 剥离肿瘤组织并将其均匀切成约 3 mm × 3 mm × 3 mm 的组织小块, 之后将肿瘤组织小块接种到小鼠的皮下, 观察肿瘤的生长, 当平均肿瘤体积达到约 100-200mm³ (平均值 120 ± 30mm³), 将荷瘤小鼠进行随机分为 2 组 (n=5), 定义分组当天为 D0, 于 D0 静脉给予受试品, 单次给药。各组给药剂量如图 24。

参照实施例 4.1 进行数据处理, 实验结果见图 24。在 8mg/kg 剂量下, 在给药后第 28 天, V-hu23-Glu-Exd 药效可以达到 TGI 94.37%。

实施例 4.8 V-ADCs 在鼠源性 MC38-hNectin4 模型中的抗肿瘤作用

模型构建：7-8 周龄雌性 BALB/c nude 小鼠(北京维通利华实验动物部技术有限公司), 适应 1 周后, 于右侧肩甲部位注射 MC38-hNectin4 (重组稳定表达人 Nectin4 的 MC38 细胞, CBPG0035, 南京科佰生物医药科技有限公司) PBS 重悬细胞液 (1×10⁶cells/动物), 待肿瘤体积生长到 100-250 mm³ 时依据肿瘤平均体积进行分组。

受试品配制信息如下表:

药物	配制方法	给药浓度 (mg/mL)
溶媒组(Vehicle)	10 mM glutamate, 8% (w/v) sucrose, pH 5.0	--
V-hu23-Glu-Exd	使用溶媒稀释至目标浓度	0.1, 0.3 和 0.8
EV	10mM His buffer (pH6.2)稀释至目标浓度	0.3
Isotype-control ADC	使用溶媒稀释至目标浓度	0.3
V-hu23-Fc	使用溶媒稀释至目标浓度	0.8
Exatecan	10%DMSO/5%Tween80/85% dd water	0.03

给药体积：根据小鼠体重调整(小鼠给药体积=5 或 10 μL/g×小鼠体重 (g))。数据采集：开始给药后, 每周称量小鼠体重 2-3 次, 测量肿瘤体积 2-3 次, 每天观察动物 2 次。

荷瘤小鼠被随机分为 8 组 (n=5), 定义分组当天为 D0, 于 D0 和 D4 静脉给予受试品, 共计给药 2 次。各组给药剂量见图 25。

参照实施例 4.1 进行数据处理，实验结果见图 25。给药后，所有剂量组动物耐受良好；MC38-hNectin4 细胞表达高水平的多药耐药蛋白 MDR1，对于 EV 属于耐药细胞，因此，EV 未显示明显抗肿瘤效果。同时对于 isotype control ADC、小分子 exatecan（货号 HY-13631，MedChemExpress LLC。与 V-hu23-Glu-Exd 8mpk 所含 exatecan 等量）及裸抗 V-hu23-Fc 均未显示明显的抗肿瘤效果。但本发明 ADC V-hu23-Glu-Exd 高中低给药组均有显著的肿瘤抑制效果，且呈现剂量相关性。本试验条件下，V-hu23-Glu-Exd 比 EV 显著效力更高。

实施例 5 进行活体成像以研究荧光标记双特异抗体的生物分布

使用 IVIS Lumina Series III 系统，进行荧光活体成像实验，评估本发明双特异抗体与常规单抗在生物分布和肿瘤靶向能力方面的差异。这些实验是在 Balb/c nu/nu 裸鼠中进行的，所述裸鼠携带有皮下植入的人类尿路上皮肿瘤细胞系 HT1376，位于一侧。实验时，雌性小鼠（25-32 克）为 6 到 8 周龄，肿瘤体积 500 mm³ 左右。

准备受试品：使用离心过滤器（Millipore）将测试药物的缓冲液更换为 pH=8.5 的 PBS。然后，通过将 Sulfo-Cy7 NHS Ester（Duofluor, 10 mg/mL）与抗体（V-15 和 Enfortumab）按 6:1 的摩尔比（染料/蛋白质）立即混合来进行标记反应，在 20-25°C 的黑暗中反应 5 小时。标记后，使用离心过滤器（3K）纯化结合物以去除未结合的游离染料。结合反应后，V-15-Cy7 和 Enfortumab-Cy7 的染料/蛋白质摩尔比分别为 1.2 和 2.4。通过 FACS 测试体外结合亲和力，在药物与细胞孵育 1 小时后评估结合不影响蛋白质特性。之后，将 1 nmol 染料标记的蛋白质注射到肿瘤携带小鼠中，所述浓度为基于染料的浓度。在 30 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、8 小时、24 小时、48 小时和 72 小时的时间点，使用 IVIS Lumina III 系统进行活体成像。数据使用活体成像软件（版本：4.7.4）进行分析。

结果如图 27A 所示，随时间延长，V-15-Cy7 在小鼠肿瘤组织内的分布随时间累积，且多于 Enfortumab-Cy7 在小鼠肿瘤组织内的蓄积。图 27B 显示，在将荧光染料标记的蛋白质注射到肿瘤携带小鼠后 72 小时，药物分布到多个组织中，具有不同的组织穿透能力。V-15-Cy7 和 Enfortumab-Cy7 在 72 小时的肿瘤与肌肉组织积蓄比率分别为 233 和 162，表明 V-15-Cy7 具有更佳的肿瘤积累。但在其他正常组织内（除肾脏组织外），V-15-Cy7 的蓄积略低于 Enfortumab-Cy7，意味着本发明分子具有更好的肿瘤靶向性。

序列表概览

SEQ ID NO:	序列描述	序列
		参照抗体可变区序列
1	Datopotamab VH	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQG</u> <u>LEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDT</u> <u>AVYYCARSGFGSSYWFYFDVWGQGLVTVSS</u>
2	Datopotamab VL	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAWYQQKPGKAPKLL</u> <u>IYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPL</u> <u>TFGQGTKLEIK</u>
142	Datopotamab 重链	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQGLE</u> <u>WMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYY</u> <u>CARSGFGSSYWFYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u> <u>ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS</u> <u>SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV</u> <u>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS</u> <u>KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPGK</u>
143	Datopotamab 轻链	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYS</u> <u>ASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQG</u> <u>TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD</u> <u>NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQG</u> <u>LSSPVTKSFNRGEC</u>
3	Enfortumab VH	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLE</u> <u>WVSYISSSSTIYADSVKGRFTISRDNANKNSLSLQMNSLRDEDTAVY</u> <u>YCARAYYYGMDVWGQGTITVTVSS</u>
4	Enfortumab VL	<u>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKAPKFL</u> <u>IYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPP</u> <u>TFGGGTKVEIK</u>
144	Enfortumab 重链	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLE</u> <u>WVSYISSSSTIYADSVKGRFTISRDNANKNSLSLQMNSLRDEDTAVY</u> <u>YCARAYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u> <u>ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL</u> <u>LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN</u> <u>KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY</u> <u>PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
145	Enfortumab 轻链	<u>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKAPKFL</u> <u>IYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPP</u> <u>TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</u> <u>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEKHK</u> <u>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
		抗 Trop2 羊驼 VHH 序列及 AbM 方案定义的 CDR 序列
5	A04 VHH	<u>QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE</u> <u>GVSCVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLQPEDTAV</u> <u>YYCAASWGYGLRSLRKEYDYWGQGTQVTVSS</u>
6	A04 CDR1	<u>ALTFKDYAMT</u>
7	A04 CDR2	<u>CVSSGGATT</u>

8	A04 CDR3	SWGYGLRSLTRKEYDY
9	G08 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAPERIFSVYRMYWYRQAPGKQRE WVA <u>AITTSGSADYKDSVKGRFTISRDN</u> AKNMAYLQMNSLKPDDTAV YYCNAGGGPGYYGQGTQVTVSS
10	G08 CDR1	ERIFSVYRMY
11	G08 CDR2	AITTSGSAD
12	G08 CDR3	GGGPGY
13	H03 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWARQAPGKGLE WVSGIYGDGSGTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCAQGYSDYDRRVGEYDYWGQGTQVTVSS
14	H03 CDR1	GFTFSTYAMS
15	H03 CDR2	GIYGDGSGTY
16	H03 CDR3	GYSYDYYDRRVGEYDY
		抗 Nectin4 羊驼 VHH 序列及 AbM 方案定义的 CDR 序列
17	F9 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQR EYVASITRDGSINADSVKGRFTISRDNASTVYLQMNSLKPDDTAV YYCNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSS
18	F9 CDR1	GSTFGINVMG
19	F9 CDR2	SITRDGSIN
20	F9 CDR3	DRLGPTGWGSRIEL
21	F12 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLFSINVMGWYRQPPGKKRE LVATISSGGSTKYADSVKGRFTISGDNAKNTYLQMNTLKPEDTAVYY CHAYSDWDFEYYWGQGTQVTVSS
22	F12 CDR1	GSLFSINVMG
23	F12 CDR2	TISSGGSTK
24	F12 CDR3	YSDWDFEYY
25	D9 VHH	QLQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQREL VARITSGGSIYYADSVKGRFTISRDNAKNTAYLQMNSLKPEDTAVYY CNVPWGSWYEDHMDYWGKGTLLTVSS
26	D9 CDR1	GSIFSSAPMA
27	D9 CDR2	RITSGGSIY
28	D9 CDR3	PWGSWYEDHMDY
		PTM 去除和人源化的抗 Trop2 VHH 序列
29	A04.m1 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLQPEDTAV YYCAASWGYNLRLSLTRKEYDYWGQGTQVTVSS
98	A04.m1.m10 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNASKNTVYLQMNSLRAEDTAV YYCAASWGYNLRLSLTRKEYDYWGQGTLLTVSS
99	A04.m1.m11 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNASKNTVYLQMNSLRAEDTAV YYCAASWGYNLRLSLTRKEYDYWGQGTLLTVS
30	A04.m1.m12 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNASKNTVYLQMNSLQPEDTAVY YCAASWGYNLRLSLTRKEYDYWGQGTLLTVSS
		A04.m1、A04.m1.m10、A04.m1.m11 和 A04.m1.m12 具有相同 AbM 方 案定义的 CDR 序列, 其中 CDR1 和 CDR3 同 A04
31	A04.m1 CDR1	ALTFKDYAMT

32	A04.m1 CDR2	SVSSGGATT
33	A04.m1 CDR3	SWGYGLRSLTRKEYDY
		PTM 去除和人源化的抗 Nectin4 VHH 序列及其 CDR 序列, 其中 CDR1 和 CDR3 同 F09
100	F09.m1 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITRDGSINYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGT LTVSS
101	F09.m2 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITRDGSINYADSVRGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGT LTVSS
102	F09.m5 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQR EYVASITREGSINYADSVRGRFTISRDN AKSTVYLQMNSLKPDDTAV YYCNADRLGPTGWGSRIELWGQGT QTVSS
103	F09.m6 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQR EYVASITRQGSINYADSVRGRFTISRDN AKSTVYLQMNSLKPDDTAV YYCNADRLGPTGWGSRIELWGQGT QTVSS
104	F09.m1.m5 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGT LTVSS
105	F09.m1.m6 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITRQGSINYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGT LTVSS
34	F09.m2m5 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGT LTVSS
35	F09.m2m6 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITRQGSINYADSVRGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGT LTVSS
36	F09.m2m5 CDR2	SITREGSIN
37	F09.m2m6 CDR2	SITRQGSIN
38	F09.m2m5-2 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRPEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGT LTVSS
106	F09.m2m5-4 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGT LTVSS
		半衰期延长结构域(HLE), 抗血清白蛋白 VHH, 下划线为 CDR 区
39	MSA21 (也称 HLE1)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVE WVSGISSLG DSTLYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAV YYCTIGGSLNPGGQGTQTVSS
40	ALB-8 (也称 HLE2)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGT LTVSS
		单链多特异性抗体分子, 肽接头: G4S
41	V-1, 链组成 G08-F12 肽接头: G4S	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAAPERIFSVYRMYWYRQAPGKQRE WVAAITTSGSADYKDSVKGRFTISRDN AKNMAYLQMNSLKPDDTAV YYCNAGGGPGYYGQGTQTVSSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSLFSINVMGWYRQPPGKKREL VATISSGGSTKYADSVKG RFTISGDNAKNTYLQMNTLKPEDTAVYYCHAYSDWDFEYWGQGT QTVSS

42	V-2, 链组成 G08-F12-MSA21	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSLCAAPERIFSVYRMYWYRQAPGKQRE WVAAITSGSADYKDSVKGRFTISRDNAMAYLQMNSLKPDDTAV YYCNAGGGPGYYGQGTQVTVSSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSLFSINVMGWYRQPPGKKRELVAISSGGSTKYADSVKG RFTISGDNAKNTYLMNTLKPEDTAVYYCHAYSDWDFEYWGQGT QVTVSSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMT WVRQAPGKGVEWVSGISSLDSTLYADSVKGRFTISRDNAMNTLYL QMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTVSS
43	V-3, 链组成 H03-D9	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSTYAMSWARQAPGKGLE WVSGIYGDGSGTYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCAQGYSDYDRRVGEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSQVQLVESGG GSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSI YYADSVKGRFTISRDNAMNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSW YEDHMDYWGKGLTVTVSS
44	V-4, 链组成 H03-D9-MSA21	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSTYAMSWARQAPGKGLE WVSGIYGDGSGTYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCAQGYSDYDRRVGEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSQVQLVESGG GSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSI YYADSVKGRFTISRDNAMNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSW YEDHMDYWGKGLTVTVSSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGISSLDSTLYADSVKGR FTISRDNAMNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTVS S
45	V-5, 链组成 D9-H03-D9	QLQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQREL VARITSGGSIYYADSVKGRFTISRDNAMNTAYLQMNSLKPEDTAVYY CNVPWGSWYEDHMDYWGKGLTVTVSSGGGGSQVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCEASGFTFSTYAMSWARQAPGKGLEWVSGIYGDGSGT YYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAQGYSDYD RRVGEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSQVQLVESGGGGSVQPGGSLRLS CEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSIYYADSVKGRFTI SRDNAMNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSWYEDHMDYWG KGLTVTVSS
46	V-6, 链组成 F12-G08-F12	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGSLFSINVMGWYRQPPGKKRE LVATISSGGSTKYADSVKGRFTISGDNAKNTYLMNTLKPEDTAVYY CHAYSDWDFEYWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LTLSCAAPERIFSVYRMYWYRQAPGKQREWVAAITSGSADYKDSV KGRFTISRDNAMAYLQMNSLKPDDTAVYYCNAGGGPGYYGQGT QVTVSSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGSLFSINVMG WYRQPPGKKRELVAISSGGSTKYADSVKGRFTISGDNAKNTYLM NTLKPEDTAVYYCHAYSDWDFEYWGQGTQVTVSS
47	V-7, 链组成 D9-G08-D9	QLQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQREL VARITSGGSIYYADSVKGRFTISRDNAMNTAYLQMNSLKPEDTAVYY CNVPWGSWYEDHMDYWGKGLTVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLTLSCAAPERIFSVYRMYWYRQAPGKQREWVAAITSGSAD YKDSVKGRFTISRDNAMAYLQMNSLKPDDTAVYYCNAGGGPGY YGQGTQVTVSSGGGGSQVQLVESGGGGSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSS APMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSIYYADSVKGRFTISRDNAMNTA YLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSWYEDHMDYWGKGLTVTVSS
48	V-8, 链组成 G08-F12-F12	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSLCAAPERIFSVYRMYWYRQAPGKQRE WVAAITSGSADYKDSVKGRFTISRDNAMAYLQMNSLKPDDTAV YYCNAGGGPGYYGQGTQVTVSSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSLFSINVMGWYRQPPGKKRELVAISSGGSTKYADSVKG RFTISGDNAKNTYLMNTLKPEDTAVYYCHAYSDWDFEYWGQGT QVTVSSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGSLFSINVMG WYRQPPGKKRELVAISSGGSTKYADSVKGRFTISGDNAKNTYLM

		NTLKPEDTAVYYCHAYSDWDFFEEYWGQGTQVTVSS
49	V-9, 链组成 H03-D9-D9	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWARQAPGKGLE WVSGIYGDGSGTYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTA LYYCAQGYSDYDRRVGEYDYWGQGTQVTVSSGGGGGSQLQLVESGG GSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSI YYADSVKGRFTISRDNANTAYLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSW YEDHMDYWGKGLTVTVSSGGGGGSQLQLVESGGGSVQPGGSLRLS CEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSIYYADSVKGRFTI SRDNANTAYLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSWYEDHMDYWG KGLTVTVSS
50	V-hu2 (V-F1S1T1.2) 链组成: A04.m1-F09.m2m5- ALB8 肽接头(G4S)2	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLQPEDTAV YYCAASWGYGLRSLRTRKEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQREY VASITREGSINYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYY CNADRLGPTGWGSRIELWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGLTVTVSS
51	V-hu8 (V-F1F1S1T1.8) 链组成: A04.m1-ALB8- F09.m2m5- F09.m2m5	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLQPEDTAV YYCAASWGYGLRSLRTRKEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQREYVASITREGSINYADSVR GRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNADRLGPTGWGSRIE LWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGSTFGINVMGWYRQAPGKQREYVASITREGSINYADSVRGRFTISR DNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNADRLGPTGWGSRIELWGQGT LTVTVSS
52	V-hu22 (V-F1F1S1S1T1.22) 链组成: A04.m1-A04.m1- ALB8- F09.m2m5- F09.m2m5	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLQPEDTAV YYCAASWGYGLRSLRTRKEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSQL QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLQPEDTAVYY CAASWGYGLRSLRTRKEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQREYVASITREGSINYADSVRGRF TISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNADRLGPTGWGSRIELWG QGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGS TFGINVMGWYRQAPGKQREYVASITREGSINYADSVRGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNADRLGPTGWGSRIELWGQGLTVT VSS
		双链对称双特异性抗体分子, 具有相同的两条链, Fc 区均引入 LALA 突 变
53	V-hu24-Fc 链组成: F09.m2m5-2- A04.m1m12-Fc 与 Fc 直接连接	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDNANTVYLQMNSLRPEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQLQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLQPEDTAVYYCAASW GYGLRSLRTRKEYDYWGQGLTVTVSSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV

		EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	V-hu25-Fc 链组成: F09.m2m5-2-A04.m1m12-Fc 通过肽接头 G4S 与 Fc 连接	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQREYVASITREGSINYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNADRLGPTGWGSRLELWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSQLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKEREGVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASWGYGLRSLTRKEYDYWGQGTLLTVSSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
		双链不对称双特异性抗体分子,具有不同两条链,第一链中引入 knob 突变,第二链中引入对应的 hole 突变,两链 Fc 区均引入 LALA 突变
55	V-10 第一链 G08-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSLCAAPERIFSVYRMYWYRQAPGKQREWVAAITTSGSADYKDSVKGRFTISRDNKNTAYLQMNSLKPDDTAVYYCNAGGGPGYYGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	V-10 第二链 F12-Fc	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLFSINVMGWYRQPPGKKRELVAITSSGGSTKYADSVKGRFTISGDNAKNTYLQMTLKPEDTAVYYCHAYSDWDFEYYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSLKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	V-13 第一链 H03-Fc	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWARQAPGKGLEWVSGIYGDGSGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAQGYSDYDRRGEYDYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
58	V-13 第二链 D9-Fc	QLQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSIYADSVKGRFTISRDNKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSWYEDHMDYWGKGTLLTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSLKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	V-14 第一链 D9-H03-Fc	QLQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSIYADSVKGRFTISRDNKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSWYEDHMDYWGKGTLLTVSSGGGGSQLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWARQAPGKGLEWVSGIYGDGSGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAQGYSDYDRRGEYDYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK

		KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
60	V-14 第二链 D9-Fc	QLQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSIYYADSVKGRFTISRDNANKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSWYEDHMDYWGKGTLLTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSLKTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	V-15 第一链 F12-G08-Fc	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLFSINVMGWYRQPPGKKRELVATISSGGSTKYADSVKGRFTISGDNAKNTYLQMNTLKPEDTAVYYCHAYSDWDFEEYWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAAPERIFSVYRMYWYRQAPGKQREWVAITSGSADYKDSVKGRFTISRDNANKMAYLQMNSLKPDPTAVYYCNAGGGPGYYGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
62	V-15 第二链 F12-Fc	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLFSINVMGWYRQPPGKKRELVATISSGGSTKYADSVKGRFTISGDNAKNTYLQMNTLKPEDTAVYYCHAYSDWDFEEYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
63	V-16 第一链 D9-G08-Fc	QLQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSIYYADSVKGRFTISRDNANKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSWYEDHMDYWGKGTLLTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAAPERIFSVYRMYWYRQAPGKQREWVAITSGSADYKDSVKGRFTISRDNANKMAYLQMNSLKPDPTAVYYCNAGGGPGYYGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
64	V-16 第二链 D9-Fc	QLQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSIYYADSVKGRFTISRDNANKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSWYEDHMDYWGKGTLLTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTSLKTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65	V-17 第一链 F12-F12-Fc	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLFSINVMGWYRQPPGKKRELVATISSGGSTKYADSVKGRFTISGDNAKNTYLQMNTLKPEDTAVYYCHAYSDWDFEEYWGQGTQVTVSSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLFSINVMGWYRQPPGKKREL

		GRFTISGDNAKNTYLQMNTLKPEDTAVYYCHAYSDDWDFEYYWGQG TQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
66	V-17 第二链 G08-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSLCAAPERIFSVYRMYWYRQAPGKQRE WVAAITTSGSADYKDSVKGRFTISRDNAMAYLQMNSLKPDDTAV YYCNAGGGPGYYGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLF PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLTSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
67	V-18 第一链 D9-D9-Fc	QLQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQREL VARITSGGSIYADSVKGRFTISRDNAKNTAYLQMNSLKPEDTAVYY CNVPWGSWYEDHMDYWGKGLTVTVSSGGGGSQQLQLVESGGGSV QPGGSLRLSCEAFGSIFSSAPMAWYRQAPGKQRELVARITSGGSIYYA DSVKGRFTISRDNAKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCNVPWGSWYED HMDYWGKGLTVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
68	V-18 第二链 H03-Fc	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSTYAMSWARQAPGKGLE WVSGIYGDGSGTYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTA LYYCAQGYSDYDRRVGEYDYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLTSLKLTVDKSRWQQG NVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
69	V-hu21-Fc 第一链: F09.m2m5-A04.m1- Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSSGGGGSQQLQLVES GGGLVQPGGSLRLSCEASALTFKDYAMTWFRQAPGKEREGVSSVSS GGATTYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLQPEDTAVYYCAAS WGYGLRSLTRKEYDYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
70	V-hu21-Fc 第二链: F09.m2m5-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
71	V-hu23-Fc 第一链:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVY

	F09.m2m5-2-A04.m1m12-Fc	YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSQLQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKEREGVSSVSS GGATTYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLQPEDTAVYYCAASW GYGLRSLTRKEYDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
72	V-hu23-Fc 第二链: F09.m2m5-2-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRPEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
73	V-hu28-Fc 第一链: F09.m2m5-2- F09.m2m5-2-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRPEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQREYVASITR EGSINYADSVRGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNADR LGPTGWGSRIELWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
74	V-hu28-Fc 第二链: A04.m1m12- Fc	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLQPEDTAVY YCAASWGYGLRSLTRKEYDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
75	V-hu29-Fc 第一链: A04.m1m12-Fc	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKERE GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLQPEDTAVY YCAASWGYGLRSLTRKEYDYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
76	V-hu29-Fc 第二链: F09.m2m5-2-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRPEDTAVY YCNADRLGPTGWGSRIELWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
		对照多特异性抗体
77	V-11 LC 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPL

		TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
78	V-11 knob 重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQG LEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDT AVYYCARSGFGSSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLYC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
79	V-11 hole 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLE WVSYISSSSTIYADSVKGRFTISRDNANKNSLSLQMNSLRDEDTAVY YCARAYYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQTQ SPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAAS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPITFGGGT KVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LSDGSFFLTSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SPGK
80	V-12 LC 轻链	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKAPKFL IYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP TFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
81	V-12 Knob 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLE WVSYISSSSTIYADSVKGRFTISRDNANKNSLSLQMNSLRDEDTAVY YCARAYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLYCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
82	V-12 hole 重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQG LEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDT AVYYCARSGFGSSYWFYFDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYRYTGVPFSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPL TFGQGTKLEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLTSLKTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK
107	Parental anti-Trop2 Knob 重链	QVQLQDSGGGLVQAGDRLSLSCAASGRTFSSYDMAWFRQAPGKER EFVAAITTSEGTYWGDAKGGRFTIARVNAKNTVYLHMNRLKPEDTA VYYCAASNQGGSLQISTNYYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSQVQ LQDSGGGLVQAGDRLSLSCAASGRTFSSYDMAWFRQAPGKEREFVA AITTSEGTYWGDAKGGRFTIARVNAKNTVYLHMNRLKPEDTAVYY

		CAASNQGGSLQISTNYYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
108	Parental anti-Trop2 Hole 重链	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASALTFKDYAMTWFRQAPGKER GVSSVSSGGATTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLQPEDTAVY YCAASWGYGLRSLRKEYDYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
109	Parental anti- Nectin4 抗体链 F09.m2m5-2-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFGINVMGWYRQAPGKQRE YVASITREGSINYADSVRGRFTISRDNKNTVYLMNSLQPEDTAVY YCNADRLGPTGWGRIELWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
110	Isotype/isotype control	QVQLQDSGGGLVQAGDRLSLSCAASGRFTSSYDMAWFRQAPGKER EFVAAITTSEGTWYGDAGKGRFTIARVNAKNTVYLHMNRLKPEDTA VYYCAASNQGGSLQISTNYYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
		人 IgG Fc 区序列
83	人 IgG1 Fc EM	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
84	人 IgG1 Fc DL	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
85	人 IgG1 Fc 带部分铰链区	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
86	人 IgG1 Fc 带部分铰链区	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
87	人 IgG4 序列	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ

		DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTDPPLDSDGSF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
111	人 IgG1 Fc knob 链 T366Y+LALA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
112	人 IgG1 Fc hole 链 Y407T+LALA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF TSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
113	人 IgG1 Fc knob 链 T366W+LALA	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	人 IgG1 Fc hole 链 T366S,L368A,Y407 V+LALA	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	人 IgG1 Fc knob 链 T366W+LALA	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
116	人 IgG1 Fc hole 链 T366S,L368A,Y407 V+LALA	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
117	人 IgG1 Fc 链 LALA	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
		肽接头
88	G4S	GGGGS
89	(G4S)2	GGGSGGGGS
90	(G4S)3	GGGSGGGSGGGGS
91	(G4S) _n	(GGGGS) _n , 其中 n 是等于或大于 1 的整数
92	TS(G4S) _n	TS(GGGGS) _n , 其中 n 是等于或大于 1 的整数
93	G(G4S) _n	G(GGGGS) _n , 其中 n 是等于或大于 1 的整数
94	(G4) _n	(GGGG) _n , 其中 n 是等于或大于 2 的整数
95	(GRPGS) _n	(GRPGS) _n , 其中 n 是等于或大于 2 的整数
		铰链区
96	人 IgG1 铰链区	EPKSSDKTHTCPPCP
97	人 IgG1 铰链区, 部	DKTHTCPPCP

	分	
		其他肽接头
118	肽接头	GGGSG
119	肽接头	GGSGG
120	肽接头	GSGGG
121	肽接头	GSGGGP
122	肽接头	GGEPS
123	肽接头	GGEGGGP
124	肽接头	GGEGGGSEGGGS
125	肽接头(G ₃ S) ₂	GGGSGGGS
126	肽接头(G ₃ S) ₃	GGGSGGGS
127	肽接头(G ₃ S) ₄	GGGSGGGS
128	肽接头(G ₄ S) ₄	GGGSGGGS
129	肽接头(G ₃ S) ₅	GGGSGGGS
130	肽接头(G ₄ S) ₅	GGGSGGGS
131	肽接头(G ₃ S) ₆	GGGSGGGS
132	肽接头	GGG
133	肽接头	DGGGS
134	肽接头	TGEKP
135	肽接头	GGRR
136	肽接头	EGKSSGSGSESKVD
137	肽接头	KESGSVSSEQLAQFRSLD
138	肽接头	GGRRGGGS
139	肽接头	LRQRDGERP
140	肽接头	LRQKDGGGSERP
141	肽接头	GSTSGSGKPGSGEGSTKG

权利要求

1. 一种结合 Trop2 和 Nectin4 的多特异性抗体，其中所述抗体包含至少一个特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域和至少一个特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域。

2. 权利要求 1 的多特异性抗体，其中所述抗体具有选自以下的一项或多项特征：

(a) 所述 Trop2 和 Nectin4 抗原结合结构域分别为 VHH 结构域；

(b) 所述 Trop2 和 Nectin4 抗原结合结构域的抗原结合亲和力 K_D 值分别为 50×10^{-8} M 至 0.5×10^{-8} M；

(c) 所述抗体中 Trop2 抗原结合结构域与 Nectin4 抗原结合结构域的价数比为 1:1 或 1:2；以及

(d) 所述抗体为三价或四价双特异性抗体；且

优选地，所述抗体还具有选自以下的一项或多项特征：相比 Nectin4 和 Trop2 单靶点药物，在表达人 Nectin4 和 Trop2 的靶肿瘤细胞上呈现 (e) 协同结合作用；(f) 协同内吞作用；以及 (g) 改善的肿瘤细胞靶向性分布。

3. 权利要求 1-2 中任一项的多特异性抗体，其中：特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域为 VHH 结构域，且

其中，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列；

再优选地，所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列：

(i) 分别包含 SEQ ID NOs: 6, 7 和 8 的氨基酸序列或由其组成；

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 10, 11 和 12 的氨基酸序列或由其组成；

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 14, 15 和 16 的氨基酸序列或由其组成；或

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 31, 32 和 33 的氨基酸序列或由其组成；

再优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列，或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列，或由选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列组成。

4. 权利要求 1-3 中任一项的多特异性抗体，其中：特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域为 VHH 结构域，且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列；

再优选地，所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列：

(i) 分别包含 SEQ ID NOs: 18, 19 和 20 的氨基酸序列或由其组成；

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 22, 23 和 24 的氨基酸序列或由其组成；

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 26, 27 和 28 的氨基酸序列或由其组成；

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 18, 36 和 20 的氨基酸序列或由其组成；或

(v) 分别包含 SEQ ID NOs:18、37 和 20 的氨基酸序列或由其组成；

再优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列，或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列，或由选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列组成。

5. 权利要求 1-4 中任一项的多特异性抗体，其中所述抗体还包含：

(a) 半衰期延长结构域，优选地，所述半衰期延长结构域选自血清白蛋白结合性肽和免疫球蛋白 Fc 区；和/或

(b) 肽接头，优选地，所述肽接头为 5-15 个氨基酸长度，更优选地，所述肽接头包含氨基酸序列(G4S)_n，其中 n=1、2 或 3。

6. 权利要求 1-5 中任一项的多特异性抗体，其中所述抗体为包含至少一个(优选 1 或 2 个)Nectin4 结合结构域以及至少一个(优选 1 个或 2 个)Trop2 结合结构域的单链或双链抗体。

7. 权利要求 1-6 中任一项的多特异性抗体，其中所述抗体包含两条相同的多肽链，其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE-(VHH^A)_{n3}-(VHH^B)_{n4}。

其中 n1, n2, n3 和 n4 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数，且优选地 n3 和 n4 为 0，n1 和 n2 均为 1；

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域，其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2；其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区；其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接。

8. 权利要求 7 的多特异性抗体，其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH^A-VHH^B-HLE，且其中 VHH^A 表示 Nectin4 结合结构域且 VHH^B 表示 Trop2 结合结构域。

9. 权利要求 1-6 中任一项的多特异性抗体，其中所述抗体包含两条不同的多肽链，其中：

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-HLE-(VHH^A)_{n3}-(VHH^B)_{n4}。

第二多肽链从 N 端到 C 端包含：(VHH^B)_{m1}-(VHH^A)_{m2}-HLE-(VHH^B)_{m3}-(VHH^A)_{m4}。

其中 n1, n2, n3 和 n4 以及 m1, m2, m3 和 m4 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数，且优选地其中 n3、n4、m3 和 m4 为 0，且 n1+m2=1 或 2，n2+m1=1 或 2，再优选地 m1=0 且 m2=1，或 m2=0 且 m1=1；

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域，其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2；其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白 Fc 区，且优选地包含 knob-into-hole 突变；其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接。

10. 权利要求 9 的多特异性抗体，其中：

第一多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH^A-VHH^B-HLE。

第二多肽链从 N 端到 C 端包含：VHH^A-HLE。

且其中 VHH^A 表示 Nectin4 结合结构域且 VHH^B 表示 Trop2 结合结构域。

11. 权利要求 7-10 中任一项的多特异性抗体，其中所述免疫球蛋白 Fc 区为来自 IgG 的 Fc 区，例如，来自人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区，优选所述 Fc 区包含降低或消除所述 Fc 区与 FcγR 的结合作用的突变。

12. 权利要求 1-6 中任一项的多特异性抗体, 其中所述抗体包含单条多肽链, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含: $(VHH^A)_{n1}-(VHH^B)_{n2}-(HLE)_{n3}-(VHH^A)_{n4}-(VHH^B)_{n5}-(HLE)_{n6}$.

其中 $n1, n2, n3, n4, n5$ 和 $n6$ 彼此独立地选自 0, 1 或 2 的整数, 且优选地 $n1+n4=1$ 或 2, $n2+n5=1$ 或 2, 且 $n3+n6=0$ 或 1;

其中 VHH^A 和 VHH^B 分别表示结合抗原 A 和抗原 B 的 VHH 结构域, 其中 A 和 B 互不相同且彼此独立地选自 Nectin4 和 Trop2; 其中 HLE 表示作为半衰期延长结构域的血清白蛋白结合性肽; 其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接,

优选地, 其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含:

- (i) VHH^A-VHH^B ,
- (ii) VHH^A-VHH^B-HLE ,
- (iii) $VHH^B-VHH^A-VHH^B$,
- (iv) $VHH^A-VHH^B-VHH^B$,
- (v) $VHH^A-HLE-VHH^B-VHH^B$, 或
- (vi) $VHH^A-VHH^A-HLE-VHH^B-VHH^B$, 其中优选地 A 表示 Trop2 且 B 表示 Nectin4,

再优选地, 所述 HLE 表示抗血清白蛋白 VHH 结构域, 任选地选自 SEQ ID NOs: 39 和 40 的氨基酸序列、或与其具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

13. 权利要求 1-12 中任一项的多特异性抗体, 其中:

(a) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列;

(b) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列;

(c) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列;

(d) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 29 和 30 的氨基酸序列; 或

(e) 特异性结合 Nectin4 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 34 和 38 的氨基酸序列且特异性结合 Trop2 的抗原结合结构域包含选自 SEQ ID NO: 29 和 30 的氨基酸序列。

14. 权利要求 1-6 的多特异性抗体, 其中所述抗体为双链形式, 其中:

(a) 所述抗体为对称双链形式, 且其中所述抗体的多肽链包含 SEQ ID NO: 53 或 54 的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 优选地包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列; 或者

(b) 所述抗体为不对称双链形式, 且其中所述抗体包含选自下组的第一和第二多肽链:

(i) 分别包含 SEQ ID NOs: 55 和 56 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 57 和 58 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 59 和 60 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 61 和 62 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(v) 分别包含 SEQ ID NOs: 63 和 64 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(vi) 分别包含 SEQ ID NOs: 65 和 66 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(vii) 分别包含 SEQ ID NOs: 67 和 68 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(viii) 分别包含 SEQ ID NOs: 69 和 70 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(ix) 分别包含 SEQ ID NOs: 71 和 72 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

(x) 分别包含 SEQ ID NOs: 73 和 74 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链, 和

(xi) 分别包含 SEQ ID NOs: 75 和 76 或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一和第二多肽链,

优选地, 所述第一和第二多肽链分别包含 SEQ ID NOs: 61/62、69/70 或 71/72 的氨基酸序列。

15. 权利要求 1-6 的多特异性抗体, 其中所述抗体为单链形式, 其中所述抗体的多肽链包含选自 SEQ ID NOs: 41-52 的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

16. 一种特异性结合 Trop2 的 VHH 结构域, 且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列;

再优选地, 所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列:

(i) 分别包含 SEQ ID NOs: 6, 7 和 8 的氨基酸序列或由其组成;

(ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 10, 11 和 12 的氨基酸序列或由其组成;

(iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 14, 15 和 16 的氨基酸序列或由其组成; 或

(iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 31, 32 和 33 的氨基酸序列或由其组成;

再优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列, 或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个, 更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列,

最优选地, 所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列, 或由选自 SEQ ID NOs: 5, 9, 13, 29, 30, 98 和 99 的氨基酸序列组成。

17. 一种特异性结合 Nectin4 的 VHH 结构域，且

其中所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列；

优选地，所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列：

- (i) 分别包含 SEQ ID NOs: 18、19 和 20 的氨基酸序列或由其组成；
- (ii) 分别包含 SEQ ID NOs: 22、23 和 24 的氨基酸序列或由其组成；
- (iii) 分别包含 SEQ ID NOs: 26、27 和 28 的氨基酸序列或由其组成；
- (iv) 分别包含 SEQ ID NOs: 18、36 和 20 的氨基酸序列或由其组成；或
- (v) 分别包含 SEQ ID NOs: 18、37 和 20 的氨基酸序列或由其组成；

再优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列，或相对于所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、95% 或 99% 同一性、或具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VHH 结构域包含选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列，或由选自 SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 34, 35, 38 和 100-106 的氨基酸序列组成。

18. 一种抗体，其包含权利要求 16 所述的特异性结合 Trop2 的 VHH 结构域和/或权利要求 17 所述的特异性结合 Nectin4 的 VHH 结构域。

19. 一种抗原结合分子，其包含权利要求 18 的抗体。

20. 多核苷酸，其编码权利要求 1-15 任一项所述的抗体、权利要求 16 或 17 的 VHH 结构域、权利要求 18 的抗体或权利要求 19 的抗原结合分子。

21. 载体，优选地表达载体，其包含权利要求 20 的多核苷酸。

22. 宿主细胞，其包含权利要求 20 所述的多核苷酸或权利要求 21 所述的载体，例如，所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

23. 用于生产权利要求 1-15 或 18 任一项所述的抗体的方法，所述方法包括：

在适于表达所述抗体的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的宿主细胞；和在适于所述多肽链装配为所述抗体的条件下使多肽链装配产生所述抗体。

24. 包含权利要求 1-15 或 18 任一项所述的抗体的免疫缀合物或免疫融合物。

25. 式(I)所示的抗体-药物偶联物：



或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

其中：

Ab 是权利要求 1-15 或 18 中任一项所述的抗体或权利要求 19 的抗原结合分子；

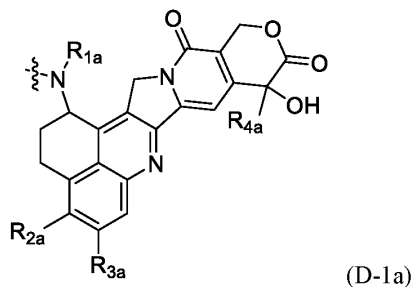
L 是连接子；

D 是药物，优选抗肿瘤化合物；并且

p 是选自 1 至 16 的整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

26. 根据权利要求 25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其中所述抗肿瘤化合物是细胞毒性剂, 例如喜树碱类化合物、澳瑞他汀类化合物, 例如依喜替康、Dxd 或 MMAE。

27. 根据权利要求 25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其中 D 具有式(D-1a)或式(D-1b)所示结构:



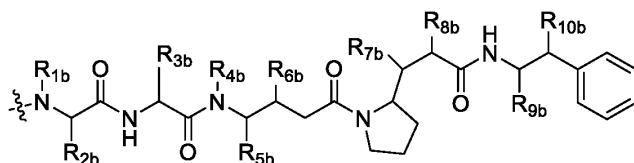
其中 R_{1a} 选自 H 和 C₁-C₆ 烷基;

R_{2a} 选自 H、卤素、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基、-OR_{5a} 和 -SR_{5a};

R_{3a} 选自 H、卤素、CN、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 卤代烷基和 -OR_{5a}; 且

R_{4a} 和 R_{5a} 独立地选自 H 和 C₁-C₄ 烷基;

或



式(D-1b)

其中 R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b} 和 R_{8b} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷基; 例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基;

R_{6b} 和 R_{7b} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷氧基, 例如甲氧基、乙氧基或丙氧基;

R_{9b} 选自 C₁₋₈ 烷基和 COOH; 例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基; 且

R_{10b} 选自 OH 和 H。

28. 根据权利要求 27 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物, 其中

R_{1a} 为 H; R_{2a} 为 C₁-C₆ 烷基; R_{3a} 为卤素, 优选为 -F; R_{4a} 为 C₁-C₄ 烷基, 优选为乙基;

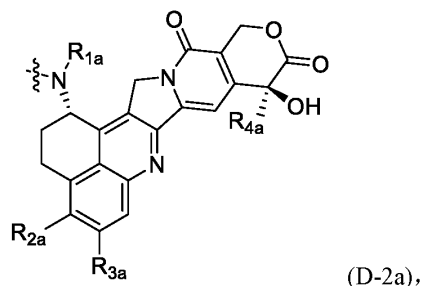
R_{1b}、R_{4b} 和 R_{8b} 各自独立地选自 C₁₋₂ 烷基; 优选甲基;

R_{2b}、R_{3b} 和 R_{5b} 各自独立地选自 C₃₋₄ 烷基;

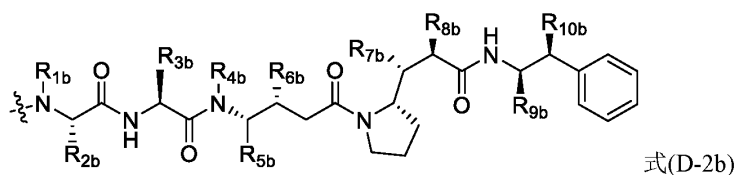
R_{6b} 和 R_{7b} 各自独立地选自 C₁₋₂ 烷氧基；且

R_{9b} 选自 C₁₋₄ 烷基且 R_{10b} 为 OH；或 R_{9b} 为 COOH 且 R_{10b} 为 H。

29. 根据权利要求 27 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式(D-2a)或式(D-2b)所示的结构：

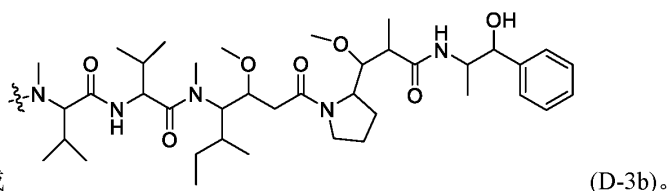
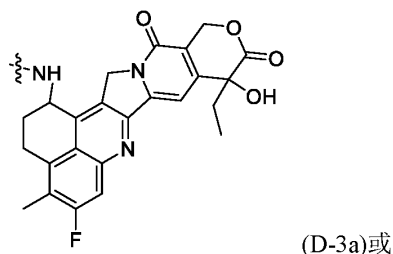


其中 R_{1a}、R_{2a}、R_{3a} 和 R_{4a} 如权利要求 27 或 28 中所定义；

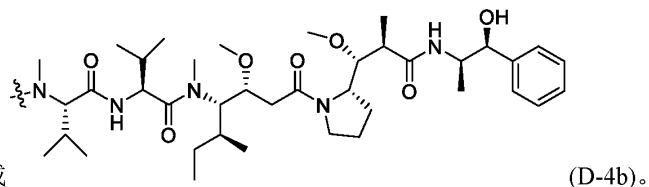
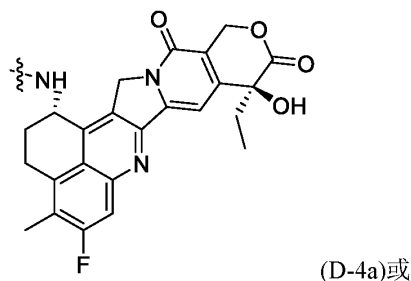


其中 R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b}、R_{6b}、R_{7b}、R_{8b}、R_{9b} 和 R_{10b} 如权利要求 27 或 28 中所定义。

30. 根据权利要求 27 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式(D-3a)或式(D-3b)所示的结构：

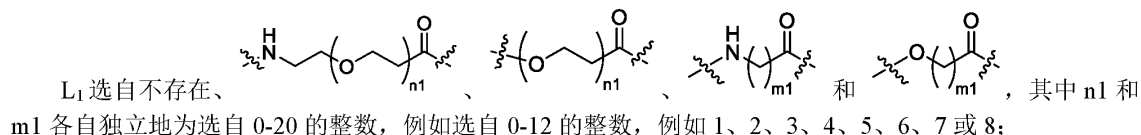
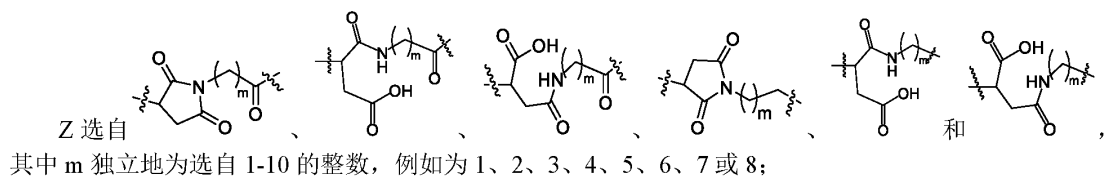


31. 根据权利要求 27 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中 D 具有式(D-4a)或式(D-4b)所示的结构：

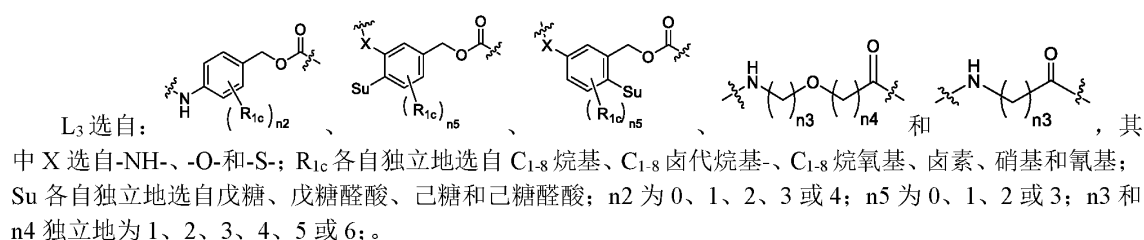


32. 根据权利要求 25-31 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中-L-具有如下结构 -Z-L₁-L₂-L₃-

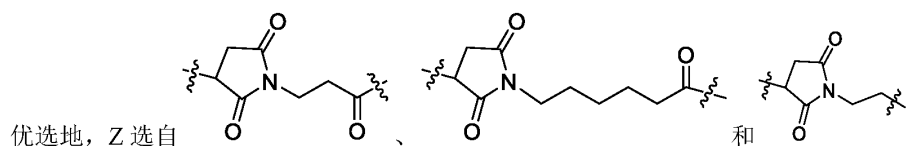
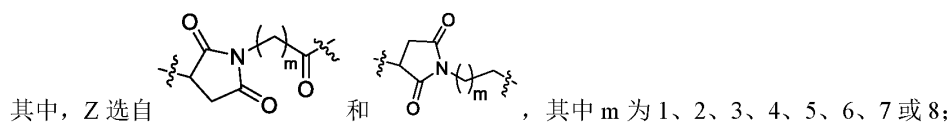
其中



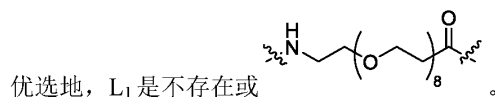
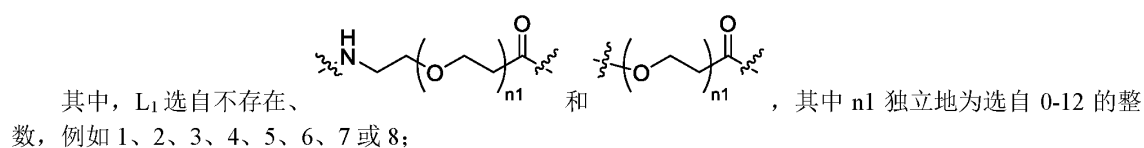
L₂ 是氨基酸残基或由 2-8 个氨基酸构成的肽残基; 且



33. 根据权利要求 32 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,



34. 根据权利要求 32-33 中任何一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,



35. 根据权利要求 32-34 中任何一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

其中 L₂ 是氨基酸残基或由 2、3、4、5、6 或 7 个氨基酸构成的肽残基; 优选地, 所述氨基酸残基或构成所述肽残基的氨基酸各自独立地选自甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、赖氨酸(Lys)、瓜氨酸(Cit)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)、

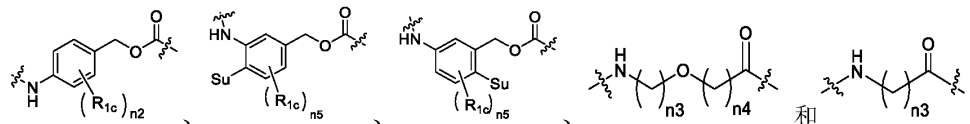
天冬酰胺(Asn)、异亮氨酸(Ile)、精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、甲硫氨酸(Met)、色氨酸(Trp)、半胱氨酸(Cys)、组氨酸(His)和苏氨酸(Thr)，其中所述氨基酸残基或氨基酸任选被一个或多个 C₁₋₆ 烷基取代；

更优选地，所述氨基酸残基或构成所述肽残基的氨基酸各自独立地选自甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、苯丙氨酸(Phe)、谷氨酸(Glu)和瓜氨酸(Cit)；

还更优选地，L₂ 选自-Ala-、-Val-、-Gly-、-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Cit-和-Glu-Val-Cit-。

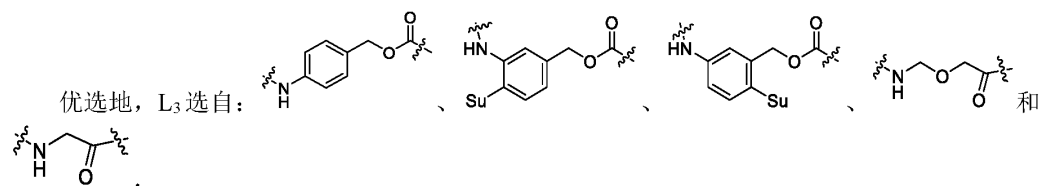
36. 根据权利要求 32-35 中任何一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

其中，L₃ 选自：



其中 R_{1c} 各自独立地选自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 卤代烷基、C₁₋₈ 烷氧基、卤素、硝基和氰基；Su 各自独立地

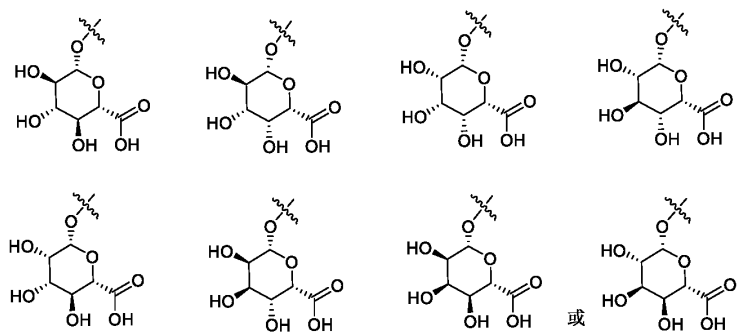
选自 ；n₂ 为 0、1、2、3 或 4；n₅ 为 0、1、2 或 3；和 n₃ 和 n₄ 独立地为 1、2、3、4、5 或 6；



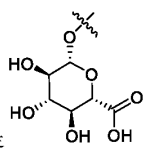
其中各变量上所定义。

37. 根据权利要求 32-36 中任何一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

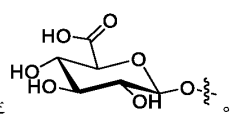
其中，Su 各自独立地是：



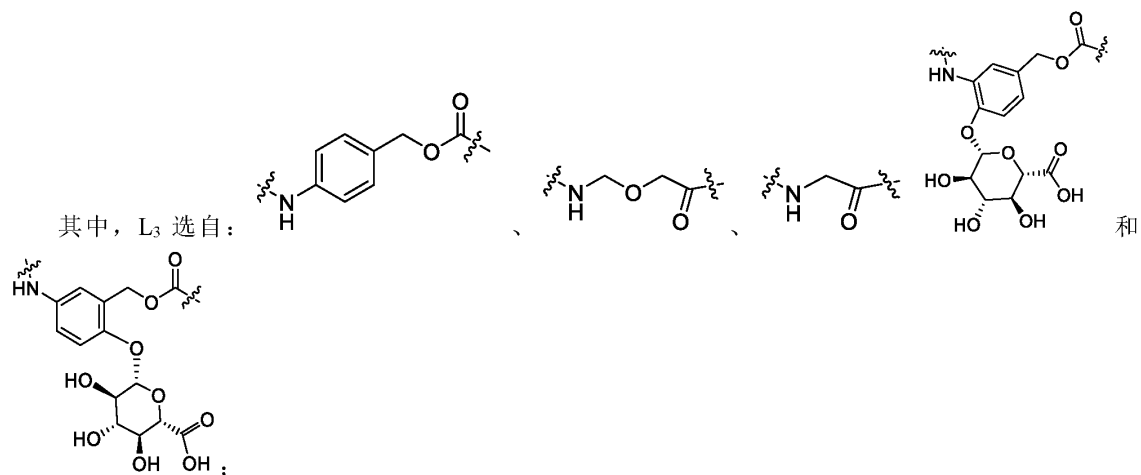
更优选地，Su 各自独立地是



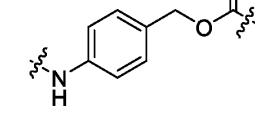
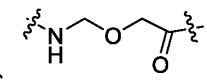
还更优选地，Su 各自独立地是



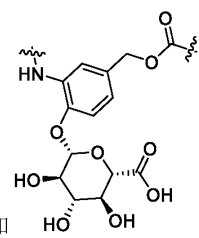
38. 根据权利要求 32-36 中任何一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，



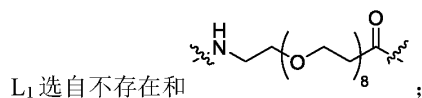
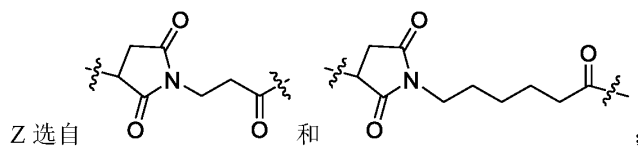
优选地， L_3 选自：

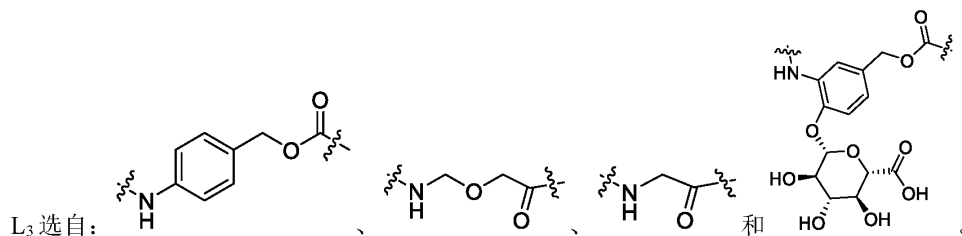
和



39. 根据权利要求 35 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

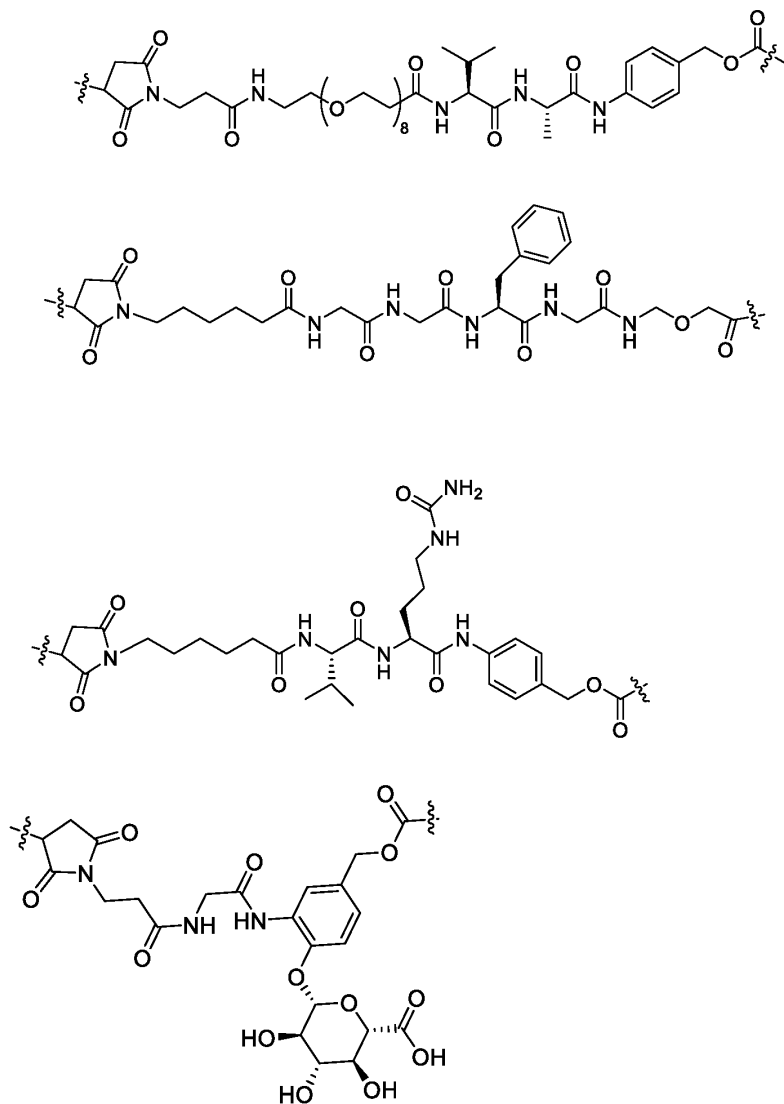


L_2 选自 -Gly-、-Val-Ala- 和 -Gly-Gly-Phe-Gly；且



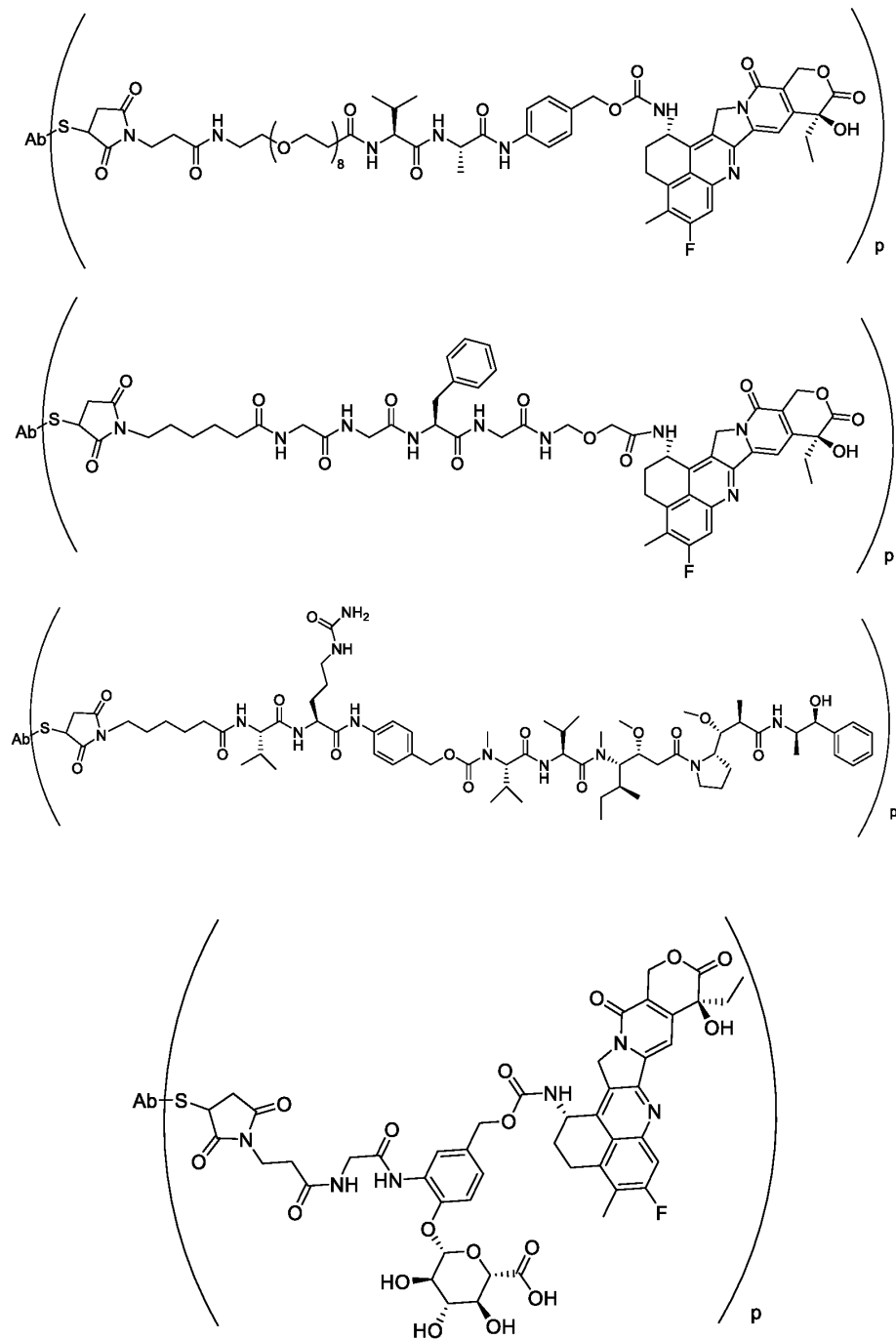
40. 根据权利要求 35 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，

其中-Z-L₁-L₂-L₃-选自如下结构



41. 根据权利要求 25-40 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其具有 2-10 例如 4-8 的平均 DAR 值。

42. 根据权利要求 25 所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体-药物偶联物选自



其中 Ab 和 p 如权利要求 25 所定义，

优选地，Ab 为双链抗体，其中：

(a) 所述抗体为对称双链形式，且其中所述抗体的多肽链包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列；或者

(b) 所述抗体为不对称双链形式，且其中所述抗体包含分别含有 SEQ ID NOs: 61/62、69/70 或 71/72 的氨基酸序列的第一和第二多肽链：

优选地，所述抗体-药物偶联物具有 2-10 或 4-8 的平均 DAR。

43. 药物组合物，其包含权利要求 1-15 或 18 任一项所述的抗体、权利要求 19 的抗原结合分子或权利要求 24 的免疫缀合物或免疫融合物、或权利要求 25-42 任一项的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物和可药用载体。

44. 权利要求 1-15 或 18 任一项所述的抗体、权利要求 19 的抗原结合分子或权利要求 24 的免疫缀合物或免疫融合物、或权利要求 25-42 任一项的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物用作药物或用于制备药物的用途。

45. 权利要求 44 的用途，其中所述药物用于在个体中治疗和 / 或预防癌症，其中所述癌症为 Trop2 阳性、Nectin4 阳性、或 Trop2 和 Nectin4 双阳性实体瘤，选自例如尿路上皮癌；膀胱癌(例如，BLCA)；宫颈癌(例如，CESC)；头颈癌(例如，HNSC)；肺癌(例如，LUSC 和 LUAD)；乳腺癌(例如，BRCA)；胰腺癌(例如，PAAD)；食管癌(例如，ESCA)；前列腺癌(例如，PRAD)；胆管癌(例如，CHOL)；子宫内膜样癌(例如，UCEC)；甲状腺癌(例如，THCA)；卵巢癌(例如，OV)；结直肠癌(例如，COAD 和 READ)；和胃癌(例如，STAD)，包括其原发性、复发性和难治性癌症。