I865842

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I865842 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：110145684 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 12 月 07 日

(51)Int. Cl.： *A61K47/64 (2017.01)* *A61K47/68 (2017.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2020/12/08 中國大陸 202011423832.6
2021/03/25 世界智慧財產權組織 PCT/CN2021/083024

(71)申請人：中國商諾納生物（上海）有限公司 (中國大陸) NONA BIOSCIENCES (SHANGHAI) CO., LTD (CN)
中國大陸

(72)發明人：何云 HE YUN (CN) ；石磊 SHI LEI (CN) ；曹暘 CAO YANG (CN)

(74)代理人：洪澄文；洪茂

(56)參考文獻：

CN 110575547A

審查人員：陳琬瑜

申請專利範圍項數：79 項 圖式數：72 共 346 頁

(54)名稱

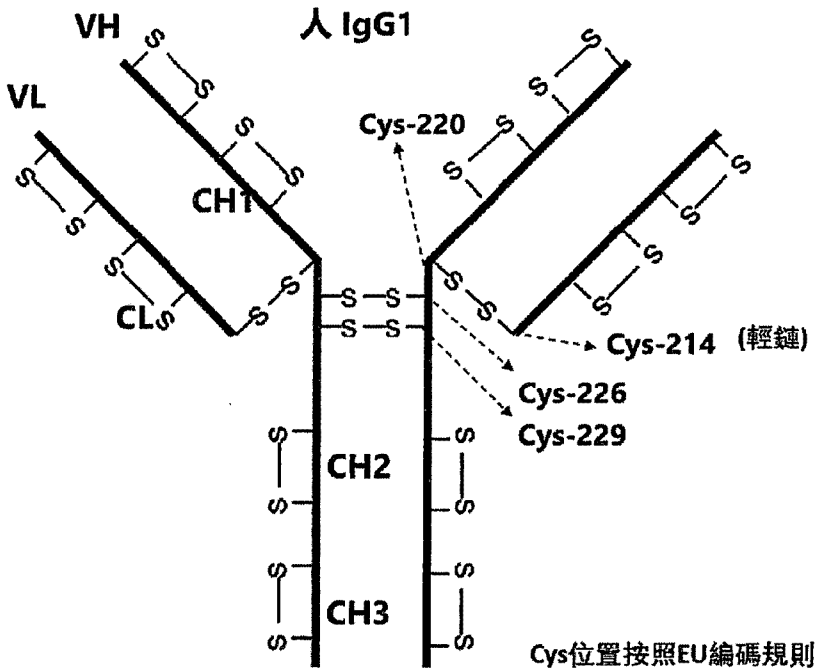
蛋白-藥物偶聯物和定點偶聯方法

(57)摘要

本申請涉及一種蛋白-藥物偶聯物，其包含抗原結合蛋白部分和藥物偶聯物部分；該抗原結合蛋白部分包括一個或多個抗原結合片段，以及與該抗原結合片段直接或間接連接的至少兩個連接肽；該兩個連接肽可各自獨立地含有第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2；該藥物偶聯物部分共價結合於該 Cys1 上。本申請還涉及一種蛋白-藥物偶聯物的製備方法，以及該蛋白-藥物偶聯物在預防或治療腫瘤或其他疾病中的用途。

This application relates to a protein-drug conjugate, which comprises an antigen-binding protein part and a drug conjugate part; the antigen-binding protein part includes one or more antigen-binding fragments, and at least two connecting peptides connected to the antigen-binding fragment directly or indirectly; each of the two connecting peptides can independently comprises a first cysteine Cys1 and a second cysteine Cys2; the drug conjugate part is covalently bound to the Cys1. This application also relates to a method for preparing the protein-drug conjugate, and the use of the protein-drug conjugate in the prevention or treatment of tumors or other diseases.

指定代表圖：


VH
人 IgG1
VL
Cys-220
CH1
CLs
Cys-214 (輕鏈)
Cys-226
Cys-229
CH2
CH3
Cys位置按照EU編碼規則

【圖 1】

I865842

【發明摘要】

【中文發明名稱】 蛋白-藥物偶聯物和定點偶聯方法

【英文發明名稱】 PROTEIN-DRUG CONJUGATES AND METHODS FOR SITE-SPECIFIC CONJUGATING

【中文】

本申請涉及一種蛋白-藥物偶聯物，其包含抗原結合蛋白部分和藥物偶聯物部分；該抗原結合蛋白部分包括一個或多個抗原結合片段，以及與該抗原結合片段直接或間接連接的至少兩個連接肽；該兩個連接肽可各自獨立地含有第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2；該藥物偶聯物部分共價結合於該 Cys1 上。本申請還涉及一種蛋白-藥物偶聯物的製備方法，以及該蛋白-藥物偶聯物在預防或治療腫瘤或其他疾病中的用途。

【英文】

This application relates to a protein-drug conjugate, which comprises an antigen-binding protein part and a drug conjugate part; the antigen-binding protein part includes one or more antigen-binding fragments, and at least two connecting peptides connected to the antigen-binding fragment directly or indirectly; each of the two connecting peptides can independently comprises a first cysteine Cys1 and a second cysteine Cys2; the drug conjugate part is covalently bound to the Cys1. This application also relates to a method for preparing the protein-drug conjugate, and the use of the protein-drug conjugate in the prevention or treatment of tumors or other diseases.

【指定代表圖】　　圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】　　無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 蛋白-藥物偶聯物和定點偶聯方法

【英文發明名稱】 PROTEIN-DRUG CONJUGATES AND METHODS FOR SITE-SPECIFIC CONJUGATING

【技術領域】

【0001】 本發明一般涉及生物醫藥領域，具體的涉及一種蛋白-藥物偶聯物以及一種製備該蛋白-藥物偶聯物的方法。

【先前技術】

【0002】 抗體偶聯藥物(Antibody-Drug Conjugate，ADC)是由靶向腫瘤抗原的抗體經由連接子與高效細胞毒性的小分子化學藥物偶聯產生的，利用抗體與靶抗原特異性結合的特點，將小分子藥物靶向遞送至腫瘤細胞進而發揮殺傷腫瘤的作用。近年來，隨著新的連接子、小分子毒素、抗體以及靶點發現技術的不斷發展，ADC 早期的問題不斷被克服，陸續有 ADC 藥物的上市，在血液瘤、實體瘤展現良好的臨床效果。另一方面，近年來，ADC 技術也被應用於非腫瘤領域；例如，AbbVie 公司將類固醇偶聯於抗 TNFα 的抗體上用於治療多種 TNFα 介導的自身免疫性疾病。

【0003】 偶聯方法和連接子結構對於 ADC 藥物的穩定性至關重要。半胱胺酸偶聯技術是早期的化學偶聯方法的代表；其利用 IgG1 抗體天然的 4 個鏈間二硫鍵作為偶聯用的活性巯基，相較於賴胺酸醯胺偶聯技術，該技術具有可控的 DAR 值(藥物/抗體比)，但是仍產生 DAR 值為 0 到 8 的分佈的混合物。由於此類

技術產生的偶聯產物成分不均一，其穩定性和藥學性能有較大不足。近年來，隨著細胞毒性藥物與定點偶聯方法的不斷發展，第三代 ADC 技術經由藥物與抗體經特定位點偶聯獲得穩定的 DAR 值，提高了抗體偶聯藥物的穩定性和藥物代謝動力學性能。第三代 ADC 代表的偶聯技術主要包括 ThioMab、ThioBridge、引入非天然胺基酸、轉肽反應、N-糖鏈偶聯等。ThioMab 技術最早由 Genentech 公司開發，在半胱胺酸偶聯技術基礎上，其在抗體中的除天然二硫鍵以外的特定位點引入兩個或多個半胱胺酸作為偶聯位點，用以產生位點專一的 DAR 為 2 的高均質性的抗體偶聯藥物；但是由於其引入的突變不是天然存在的胺基酸序列，因而面臨潛在的分子穩定性和免疫原性的風險。ThioBridge 技術則是將單抗本身的二硫鍵還原，利用二溴馬來醯亞胺或二溴吡啶二苯醚等試劑與還原的鏈間半胱胺酸反應，使其重新橋接，得到主要組分是 DAR 為 4 的產物，但是該技術仍有發生二硫鍵錯配的風險。非天然胺基酸偶聯技術使用一種特殊的編碼非天然胺基酸的 tRNA 合成酶，使得細胞可以合成帶有對乙醯苯丙胺酸(*p*-acetylphenylalanine)殘基的各種抗體，利用對乙醯苯丙胺酸殘基的羰基與帶有烷氧基胺基團的連接子發生偶聯反應，得到主要組分是 DAR 為 2 的產物；由於該技術需要使用經過改造的宿主細胞來產生非天然胺基酸，因而其明顯的不足是抗體生產的產率較低而成本較高。利用轉肽反應的偶聯技術是在抗體的重鏈或輕鏈的 C'末端引入一段序列 LPETG，轉肽酶 Sortase A 特異識別該序列並水解蘇胺酸和甘胺酸間的肽鍵，然後再把含有甘胺酸的偶聯物連接到蘇胺酸上；但是該技術產生的偶聯產物中引入了額外的肽段序列，因而也面臨潛在的免疫原性的風險。N-糖鏈偶聯技術如 GlycoConnect 技術使用內切糖苷酶 Endo S2 修剪位於抗體 CH2 區的 Asn297(Eu 編號)的糖鏈，然後使用突變的半乳糖轉移酶

GalT(Y289L)和 N-疊氮基乙醯半乳糖胺(GalNAz)引入疊氮基，利用點擊化學(Click Chemistry)將該疊氮基與小分子藥物偶聯，產生穩定且均勻的 DAR 為 2 的抗體偶聯藥物；由於該技術需要使用特殊的突變的酶，其工藝開發成本較高。

【0004】 目前，儘管已經開發了多種可以定點偶聯產生具有可控的 DAR 值的偶聯技術，但是這些技術或是引入胺基酸突變、或是引入額外的胺基酸序列、或是改變 Fc 上的糖鏈結構、或是引入非天然胺基酸，其工藝開發過程繁雜且成本較高。而且現有技術中沒有通用的針對重鏈抗體、單鏈抗體或者雙特異性抗體或者融合蛋白來製備蛋白-藥物偶聯物的偶聯技術。因而仍亟需開發新的無需複雜的製備工藝的定點偶聯技術，以提高偶聯產物的穩定性，減少免疫原性。

【發明內容】

【0005】 本申請提供了蛋白-藥物偶聯物的定點偶聯方法及由該方法製備所得的蛋白藥物偶聯物。具有下列性質中的一種或多種：1)可以定點偶聯產生均一 DAR 值(藥物/抗體比)或均一 CAR 值(偶聯物/抗體比)的偶聯產物；2)相較於其他定點偶聯技術如 THIOMAB 技術等，可利用天然鉸鏈區胺基酸序列，不引入胺基酸突變或額外肽段序列，也不改變 Fc 上的糖鏈結構；3)可對天然鉸鏈區的胺基酸序列進行長度或特定位點胺基酸種類的優化，提高產物的表達量和均一度；4)無需特別複雜的偶聯技術或工藝；5)該定點偶聯方法的副產物少，可開發性強；6)抗原結合片段可擴展到多種形式，全人 VH 結構域、駱駝科 VHH 結構域、單鏈抗體 scFv、可溶性受體融合蛋白等；7)抗原結合片段可擴展成多價多特異性形式；8)有良好的穩定性和半衰期；9)有更好的靶細胞內化作用；10)有更好的組織穿透性。

【0006】 一方面，本申請提供了一種蛋白-藥物偶聯物，其包含抗原結合蛋白部分和藥物偶聯物部分；該抗原結合蛋白部分包括一個或多個抗原結合片段，以及與該抗原結合片段直接或間接連接的至少兩個連接肽；該至少兩個連接肽包括第一連接肽和第二連接肽；其中，該第一連接肽包含第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2，該藥物偶聯物部分經由該 Cys1 偶聯至該第一連接肽；且該第二連接肽包含第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2，該藥物偶聯物部分經由該 Cys1 偶聯至該第二連接肽。

【0007】 在某些實施方式中，該第一連接肽的該 Cys2 與該第二連接肽的該 Cys2 之間經由二硫鍵連接。

【0008】 在某些實施方式中，該一個或多個抗原結合片段中不包含能夠影響藥物偶聯物與該第一連接肽和/或該第二連接肽在 Cys1 處進行偶聯的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物，該影響表現為顯著降低藥物偶聯物在 Cys1 位點的偶聯機率。

【0009】 在某些實施方式中，該一個或多個抗原結合片段中不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和/或該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物。

【0010】 在某些實施方式中，該一個或多個抗原結合片段中不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和/或該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的半胱胺酸或者前述半胱胺酸與其他藥物偶聯物形成的綴合物。

【0011】 在某些實施方式中，該第一連接肽和該第二連接肽的胺基酸序列可以相同或不同。

【0012】 在某些實施方式中，該第一連接肽和/或該第二連接肽自 N 端至 C 端包含 Cys1-(X)n-Cys2 所示的胺基酸序列；其中，n 為大於或等於 3 的整數，X 是不為 Cys 的任意胺基酸。

【0013】 在某些實施方式中，該第一連接肽和/或該第二連接肽源自抗體鉸鏈區序列或其衍生序列。其中，該衍生序列為經由對抗體鉸鏈區序列進行改造獲得，該改造不涉及抗體鉸鏈區中 Cys1 和 Cys2 的改變。例如，該改造為調整抗體鉸鏈區序列中 Cys1 和 Cys2 之間的胺基酸種類、數目和/或在 Cys1 前進行柔性連接胺基酸的添加。

【0014】 在某些實施方式中，該連接肽源自人 IgG 鉸鏈區，例如，該抗體鉸鏈區為人 IgG1 鉸鏈區。

【0015】 在某些實施方式中，該連接肽為人 IgG1 的鉸鏈區，該第一連接肽和該第二連接肽的序列各自獨立地如 SEQ ID NO: 73 所示，連接肽中該 Cys1 為人 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-220，該 Cys2 為人 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-226。

【0016】 在某些實施方式中，該第一連接肽和該第二連接肽可以各自獨立地源自人 IgG1 的鉸鏈區的衍生序列，其胺基酸序列如 SEQ ID NOs: 74-105、145-146 中任一項所示；該第一連接肽中該 Cys1 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-220 的 Cys，該第一連接肽中該 Cys2 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-226 的 Cys；該第二連接肽中該 Cys1 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-220 的 Cys，該第二連接肽中該 Cys2 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-226 的 Cys。

【0017】 在某些實施方式中，該連接肽為小鼠 IgG2c 的鉸鏈區，該第一連接肽和該第二連接肽的序列各自獨立地如 SEQ ID NO: 147 所示，該連接肽中的

該 Cys1 為小鼠 IgG2c 的鉸鏈區序列的第一個半胱胺酸，該 Cys2 為其序列的第二個半胱胺酸。

【0018】 在某些實施方式中，蛋白-藥物偶聯物的抗原結合蛋白部分包括的多個抗原結合片段連接於同一該連接肽或分別連接於不同的該連接肽。

【0019】 在某些實施方式中，該多個抗原結合片段可以部分或全部相同或彼此均不同。

【0020】 在某些實施方式中，該多個抗原結合片段包括第一抗原結合片段和第二抗原結合片段。第一抗原結合片段和第二抗原結合片段可以相同或不同。例如，該第一抗原結合片段和該第二抗原結合片段結合相同的靶點且胺基酸序列相同；例如，該第一抗原結合片段和該第二抗原結合片段結合相同的靶點但胺基酸序列不相同；例如，該第一抗原結合片段和該第二抗原結合片段結合不同的靶點。

【0021】 在某些實施方式中，該多個抗原結合片段包含第一抗原結合片段、第二抗原結合片段、第三抗原結合片段和第四抗原結合片段。第一抗原結合片段、第二抗原結合片段、第三抗原結合片段和第四抗原結合片段可以部分或全部相同或彼此均不同。例如，該第一抗原結合片段和該第二抗原結合片段結合相同的靶點且胺基酸序列相同；例如，該第一抗原結合片段和該第二抗原結合片段結合相同的靶點但胺基酸序列不相同；例如，該第一抗原結合片段和該第二抗原結合片段結合不同的靶點。例如，該第三抗原結合片段和該第四抗原結合片段結合相同的靶點且胺基酸序列相同；例如，該第三抗原結合片段和該第四抗原結合片段結合相同的靶點但胺基酸序列不相同；例如，該第三抗原結合片段和該第四

抗原結合片段結合不同的靶點。例如，該第一抗原結合片段和該第二抗原結合片段和該第三抗原結合片段和該第四抗原結合片段結合不同的靶點。

【0022】在某些實施方式中，該一個或多個抗原結合片段可以各自獨立地為 VHH 結構域、VH、VL、Fab、ScFv、受體蛋白可溶性胞外區、配體蛋白、脂質運載蛋白 lipocalins、神經細胞黏附分子 NCAM、 纖維結合蛋白 fibronectin 和/或錨蛋白重複片段蛋白 DARPins 等衍生蛋白結構。

【0023】在某些實施方式中，該一個或多個抗原結合片段能夠特異性結合腫瘤抗原或非腫瘤抗原。

【0024】在某些實施方式中，其中該腫瘤抗原包括 CD19、BCMA、TSHR、CD171、CS-1、CLL-1、GD3、Tn Ag、FLT3、CD38、CD123、CD44v6、B7H3、B7H4、KIT、IL-13Ra2、IL-11Ra、PSCA、PSMA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR-beta、SSEA-4、MUC1、EGFR、NCAM、CAIX、LMP2、EphA2、岩藻糖基 GM1(fucosyl GM1)、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、GD2、FOLR1、FOLR2、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、多聚唾液酸(polysialic acid)、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TAARP、WT1、ETV6-AML、SPA17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、FOSL1、hTERT、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS 融合基因)、NA17、PAX3、AR(雄激素受體)、細胞週期蛋白 B1(Cyclin B1)、MYCN、RhoC、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、CD20、CD30、HER2、ROR1、FLT3、TAAG72、CD22、CD33、GD2、gp100Tn、FAP、

酪胺酸酶(tyrosinase)、EPCAM、CEA、IGF-1R、EphB2、間皮素(mesothelin)、鈣黏蛋白 17(Cadherin17)、CD32b、EGFRvIII、GPNMB、GPR64、HER3、LRP6、LYPD8、NKG2D、SLC34A2、SLC39A6、SLITRK6、GUCY2C、5T4 和/或 TACSTD2 等。

【0025】 在某些實施方式中，該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段各自獨立地抗原結合片段包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且該抗原結合片段包含選自下述的任意一組胺基酸序列：(1)HCDR1：SEQ ID NO: 7，HCDR2：SEQ ID NO: 22，HCDR3：SEQ ID NO: 38；(2)HCDR1：SEQ ID NO: 10，HCDR2：SEQ ID NO: 25，HCDR3：SEQ ID NO: 41；(3)HCDR1：SEQ ID NO: 11，HCDR2：SEQ ID NO: 26，HCDR3：SEQ ID NO: 42；(4)HCDR1：SEQ ID NO: 13，HCDR2：SEQ ID NO: 28，HCDR3：SEQ ID NO: 44；(5)HCDR1：SEQ ID NO: 14，HCDR2：SEQ ID NO: 29，HCDR3：SEQ ID NO: 42；(6)HCDR1：SEQ ID NO: 9，HCDR2：SEQ ID NO: 24，HCDR3：SEQ ID NO: 40；和(7)HCDR1：SEQ ID NO: 8，HCDR2：SEQ ID NO: 23，HCDR3：SEQ ID NO: 39。

【0026】 在某些實施方式中，該抗原結合片段包含 VH，且該 VH 包括 SEQ ID NOs: 55-59、61 和 62 中任一項所示的胺基酸序列。

【0027】 在某些實施方式中，該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段各自獨立地抗原結合片段包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，且該 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分別依次包含 SEQ ID NO: 12，SEQ ID NO: 27，SEQ ID NO: 43，SEQ ID NO: 49，SEQ ID NO: 51 和 SEQ ID NO: 53 所示的胺基酸序列。

【0028】 在某些實施方式中，該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段各自獨立地包含 VL 和 VH，且該 VL 包括 SEQ ID NO: 63 所示的胺基酸序列，該 VH 包括 SEQ ID NO: 60 所示的胺基酸序列。

【0029】 在某些實施方式中，該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段各自獨立地包含一對 VH 和 VL 和/或另一種 VH，且該一對 VH 和 VL 分別包括 SEQ ID NO: 60 和 SEQ ID NO: 63 所示的胺基酸序列，和該另一種 VH 包括 SEQ ID NO: 62 所示的胺基酸序列。例如，該一對 VH 和 VL 可以形成 scFv。

【0030】 在某些實施方式中，該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段各自獨立地包含 VH，且該 VH 包括 SEQ ID NO: 62 所示的胺基酸序列；和，該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段各自獨立地包含一對 VH 和 VL，且該一對 VH 和 VL 分別包括 SEQ ID NO: 130 和 SEQ ID NO: 131 所示的胺基酸序列。例如，該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段可以包含 Fab。

【0031】 在某些實施方式中，該蛋白-藥物偶聯物中的抗原結合蛋白部分還可以包含能夠使得第一連接肽和第二連接肽配對的配對單元部分，該配對單元可以包含至少第一配對亞單元和第二配對亞單元，且該第一配對亞單元可以經由共價鍵或者非共價鍵與該第二配對亞單元相互作用。

【0032】 在某些實施方式中，該配對單元為 Fc 片段或突變的 Fc 片段。

【0033】 在某些實施方式中，該第一配對亞單元的 N 端與該第一連接肽的 C 端連接，且該第二配對亞單元的 N 端與該第二連接肽的 C 端連接，或者，該第一配對亞單元的 N 端與該第二連接肽的 C 端連接，且該第二配對亞單元的 N 端與該第一連接肽的 C 端連接。

【0034】在某些實施方式中，該蛋白-藥物偶聯物包含 SEQ ID NOs: 64-71、106-129、148-149 中任一項所示的胺基酸序列。

【0035】在某些實施方式中，該蛋白-藥物偶聯物的該藥物偶聯物部分包括分別與第一連接肽和第二連接肽連接的兩個藥物偶聯物，該藥物偶聯物包含載荷藥物以及視需要地連接子。

【0036】在某些實施方式中，該蛋白-藥物偶聯物中該藥物偶聯物包含至少一個載荷藥物。該載荷藥物可以包含但不局限於小分子化合物、毒素分子、抗生素、寡核苷酸、蛋白降解靶向嵌合體(PROTAC)、親和配體、螢光或核素標記基團、多肽、免疫調節劑等。

【0037】在某些實施方式中，該連接子包含可斷裂的連接子或非可斷裂的連接子；其中，該可斷裂的連接子包含蛋白酶可切割的連接子。

【0038】在某些實施方式中，該藥物偶聯物包括 mc-vc-PAB-MMAE(如圖 6 所示)。

【0039】在某些實施方式中，該藥物偶聯物包括 PROTAC，例如一種 BRD4 的蛋白降解劑(如圖 64 所示)。

【0040】在某些實施例中，該蛋白-藥物偶聯物為抗體-藥物偶聯藥物(ADC)。

【0041】另一方面，本申請提供了一種製備本申請所述的蛋白-藥物偶聯物的方法，其包括使該藥物偶聯物與該第一連接肽和/或該第二連接肽上的該 Cys1 的反應性巯基進行共價結合。

【0042】另一方面，本申請提供了一種製備蛋白-藥物偶聯物的方法。該蛋白-藥物偶聯物包含抗原結合蛋白部分和藥物偶聯物部分；該抗原結合蛋白部分

包括一個或多個抗原結合片段，以及與該抗原結合片段直接或間接連接的至少兩個連接肽；該兩個連接肽包含第一連接肽和第二連接肽，其中該第一連接肽包含第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2，且該第二連接肽包含第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2；該方法包括使該藥物偶聯物部分經由該第一連接肽的該 Cys1 與該第一連接肽聯結，和/或使該藥物偶聯物部分經由該第二連接肽的該 Cys1 與該第二連接肽聯結。

【0043】 在某些實施方式中，該一個或多個抗原結合片段中不包含能夠影響藥物偶聯物與該第一連接肽和/或該第二連接肽在 Cys1 處進行偶聯的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物，該影響表現為顯著降低藥物偶聯物在 Cys1 位點的偶聯機率。

【0044】 在某些實施方式中，該方法中的該一個或多個抗原結合片段不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和/或該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物。

【0045】 在某些實施方式中，該一個或多個抗原結合片段不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和/或該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的半胱胺酸或者前述半胱胺酸與其他藥物偶聯物形成的綴合物。

【0046】 在某些實施方式中，該方法中的該第一連接肽和該第二連接肽的胺基酸序列可以相同或不同。

【0047】 在某些實施方式中，該方法中的該第一連接肽和/或該第二連接肽自 N 端至 C 端包含 Cys1-(X)n-Cys2 所示的胺基酸序列；其中，n 為大於或等於 3 的整數，X 是指不為 Cys 的任意胺基酸。

【0048】在某些實施方式中，該第一連接肽和/或該第二連接肽源自抗體鉸鏈區序列或其衍生序列。

【0049】在某些實施方式中，該方法中的該衍生序列為經由對抗體鉸鏈區序列進行改造獲得，該改造不涉及抗體鉸鏈區中 Cys1 和 Cys2 的改變。在某些實施方式中，該改造為調整抗體鉸鏈區序列中 Cys1 和 Cys2 之間的胺基酸種類、數目和/或在 Cys1 前進行柔性連接胺基酸的添加。

【0050】在某些實施方式中，該方法中的該連接肽為人 IgG 鉸鏈區，較佳地人 IgG1 鉸鏈區。

【0051】在某些實施方式中，該方法中的該第一連接肽為人 IgG1 的鉸鏈區，該第一連接肽序列如 SEQ ID NO: 73 所示，該第一連接肽中該 Cys1 為人 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-220，該 Cys2 為人 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-226。

【0052】在某些實施方式中，該方法中的該第二連接肽為人 IgG1 的鉸鏈區，該第二連接肽序列如 SEQ ID NO: 73 所示，該第二連接肽中該 Cys1 為人 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-220，該 Cys2 為人 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-226。

【0053】在某些實施方式中，該方法中的該第一連接肽可以源自人 IgG1 的鉸鏈區的衍生序列，其胺基酸序列如 SEQ ID NOs: 74-105、145-146 中任一項所示的序列，該第一連接肽中該 Cys1 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-220 的 Cys，連接肽中該 Cys2 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-226 的 Cys。

【0054】在某些實施方式中，該方法中的該第二連接肽可以源自人 IgG1 的鉸鏈區的衍生序列，其胺基酸序列如 SEQ ID NOs: 74-105、145-146 中任一項所

示的序列，該第二連接肽中該 Cys1 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-220 的 Cys，連接肽中該 Cys2 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-226 的 Cys。

【0055】 在某些實施方式中，該方法中的該第一連接肽為小鼠 IgG2c 的鉸鏈區，其胺基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示，該第一連接肽中該 Cys1 為其序列的第一個半胱胺酸，該 Cys2 為其序列的第二個半胱胺酸。

【0056】 在某些實施方式中，該方法中的該第二連接肽為小鼠 IgG2c 的鉸鏈區，其胺基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示，該第二連接肽中該 Cys1 為其序列的第一個半胱胺酸，該 Cys2 為其序列的第二個半胱胺酸。

【0057】 在某些實施方式中，該方法包括還原、偶聯以及視需要地純化步驟。

【0058】 在某些實施方式中，該還原包括在還原劑的條件下使該第一連接肽的該 Cys1 和該第二連接肽的該 Cys1 之間的二硫鍵還原。

【0059】 在某些實施方式中，該還原包括使用還原劑 DTT 和/或 TCEP；在某些實施方式中，該還原劑為 TCEP。

【0060】 在某些實施方式中，該還原劑的用量為 1 至 50 莫耳倍數；在某些實施方式中，該還原劑的用量為 1 至 6 莫耳倍數；在某些實施方式中，還原劑用量為 1.5 至 3 莫耳倍數。

【0061】 在某些實施方式中，該還原的反應時長為 1 至 17 小時；在某些實施方式中，該還原反應時長為 1 至 3 小時；在某些實施方式中，還原反應時長為 1.5 至 2 小時。

【0062】 在某些實施方式中，該還原的反應溫度為 0 至 40 ℃；在某些實施方式中，該還原的反應溫度為 0 ℃或室溫(25-30 ℃)或 37 ℃。

【0063】在某些實施方式中，該還原的反應緩衝液 pH 為 4.0 至 9.0；在某些實施方式中，該還原反應緩衝液 pH 為 5.0 至 8.0；在某些實施方式中，該 pH 為 5.0 至 7.0；在某些實施方式中，該 pH 為 5.0 至 6.0。

【0064】在某些實施方式中，該偶聯包括使該藥物偶聯物與該第一連接肽和/或該第二連接肽上的該 Cys1 的反應性巯基進行共價結合。

【0065】在某些實施方式中，該藥物偶聯物包括 mc-vc-PAB-MMAE 或 PROTAC 或 CpG 寡核苷酸。

【0066】在某些實施方式中，該藥物偶聯物的用量為 1 至 50 莫耳倍數；在某些實施方式中，該藥物偶聯物的用量為 1 至 10 莫耳倍數；在某些實施方式中，藥物偶聯物用量為 3 至 7 莫耳倍數。

【0067】在某些實施方式中，該藥物偶聯物是 mc-vc-PAB-MMAE，mc-vc-PAB-MMAE 的用量為 1 至 50 莫耳倍數；在某些實施方式中，mc-vc-PAB-MMAE 的用量為 3 至 18 莫耳倍數；在某些實施方式中，mc-vc-PAB-MMAE 的用量為 3 至 7 莫耳倍數。

【0068】在某些實施方式中，該藥物偶聯物 PROTAC 的用量為 10 至 15 莫耳倍數。

【0069】在某些實施方式中，該偶聯的反應時長為 0.5 至 10 小時；在某些實施方式中，該偶聯反應時長為 0.5 至 3 小時；在某些實施方式中，偶聯反應時長為 0.5 至 1 小時。

【0070】在某些實施方式中，該偶聯的反應溫度為 0 至 40 ℃；在某些實施方式中，該偶聯的反應溫度為室溫(25-30 ℃)。

【0071】 在某些實施方式中，該偶聯的反應緩衝液 pH 為 4.0 至 9.0；在某些實施方式中，該偶聯的反應緩衝液 pH 為 5.0 至 8.0；在某些實施方式中，該 pH 為 5.0 至 7.0；在某些實施方式中，該 pH 為 7.0 至 8.0；在某些實施方式中，該 pH 為 5.0 至 6.0。

【0072】 在某些實施方式中，該蛋白-藥物偶聯物的純度大於 80%。例如，該蛋白-藥物偶聯物的純度大於 82%、大於 85%、大於 88%或大於 90%。

【0073】 在某些實施方式中，該製備方法可以提供一種包括“還原”和“偶聯”的反應步驟和反應條件參數的組合；該反應步驟和反應條件參數的組合可以進一步提高偶聯產物中單一組分的含量，減少額外的“純化”步驟的需求；在某些實施方式中，經過偶聯步驟後無需額外的純化步驟即可以得到純度大於 90 %的高均質性的偶聯產物；進一步在某些實施方式中，該高均質性的偶聯產物是位點特異性地偶聯於 Cys1 的 CAR=2 的蛋白-藥物偶聯物。

【0074】 另一方面，本申請提供了包含該蛋白-藥物偶聯物和藥學上可接受的載體的醫藥組成物。

【0075】 另一方面，本申請提供了預防和/或治療疾病的方法，其包括施用該蛋白-藥物偶聯物和/或該醫藥組成物，視需要地，該蛋白-藥物偶聯物和/或該醫藥組成物與其他療法或藥物聯用。

【0076】 另一方面，本申請提供了該蛋白-藥物偶聯物和/或該醫藥組成物在製備藥物中的用途，該藥物用於治療腫瘤或其他疾病。

【0077】 另一方面，本申請提供了該蛋白-藥物偶聯物與其他療法或藥物聯用在製備藥物中的用途，該藥物用於治療腫瘤或其他疾病。

【0078】在某些實施方式中，該其他療法或藥物選自下組：化療、放療、miRNA 和寡核苷酸。

【0079】在某些實施方式中，該腫瘤選自下組中的任意一種或多種：淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、卵巢癌、腎癌、子宮內膜癌、黑色素瘤、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、間皮瘤、食管癌、頭頸部腫瘤、膽管癌、膽囊癌、膀胱癌、胸腺癌和結直腸癌。

【0080】另一方面，本申請提供了診斷特定疾病的方法，其包括使用該蛋白-藥物偶聯物和/或該醫藥組成物。

【0081】另一方面，本申請提供了檢測特定靶標的方法，其包括使用該蛋白-藥物偶聯物和/或該醫藥組成物，較佳地，該檢測為非疾病診斷目的的。

【0082】另一方面，本申請提供了用於檢測的試劑盒，其包括該蛋白-藥物偶聯物和/或該醫藥組成物，和視需要地使用說明。

【0083】另一方面，本申請提供了給藥裝置，其包括該蛋白-藥物偶聯物和/或該醫藥組成物，以及施用該蛋白-藥物偶聯物和/或該醫藥組成物的裝置。

【0084】本申請的發明人意外的發現：在沒有輕鏈的情況下，人 IgG1 重鏈鉸鏈區的 Cys-220(Eu 編碼)有機會形成重鏈間的二硫鍵，但是這個二硫鍵沒有其他的二硫鍵穩定，只需要用較弱的還原劑就可以把 Cys-220 的二硫鍵和其他二硫鍵區分開，使 Cys-220 的二硫鍵可以被有效地打開而其他二硫鍵保持完整，進而使得 Cys-220 成為幾乎唯一的游離半胱胺酸殘基作為定點偶聯位元點與藥物偶聯物進行共價結合。經由對人 IgG1 天然鉸鏈區的 Cys-220 和 Cys-226 之間的胺基酸種類和數量進行調整或在 Cys-220 前添加柔性連接肽形成的鉸鏈區衍生序列同樣能夠作為連接肽以實現在對應於天然鉸鏈區 Cys-220 位元點的定點偶聯。

【0085】 在符合本領域常識的基礎上，上述各條件，可任意組合，即得本申請各較佳實例。

【圖式簡單說明】

【0086】

圖1顯示的是人IgG1抗體的二硫鍵結構。

圖2顯示了具有人IgG1抗體鉸鏈區序列的重鏈抗體HCAb的結構，以及鉸鏈區二硫鍵結構在人IgG1和HCAb之間的差異。

圖3顯示了在HCAb結構中，位於鉸鏈區的220位置(Eu編號)的半胱胺酸Cys-220的兩種可能狀態：Cys-220形成或者未形成重鏈之間的二硫鍵。

圖4顯示了HCAb PR000020的非還原樣品分子量分析的質譜反褶積處理圖譜。

圖5顯示了HCAb PR000020的木瓜蛋白酶Papain酶切分析結果：(A) Cys-220是否形成重鏈之間的二硫鍵的假設以及相應的酶切產物組分推測；(B) 酶切產物的非還原SDS-PAGE的結果。

圖6顯示了 (A) 含有藥物偶聯物mc-vc-PAB-MMAE的ADC示意圖和mc-vc-PAB-MMAE(也稱為VcMMAE)的結構，mc-vc-PAB-MMAE由連接子mc-vc-PAB和載荷藥物MMAE組成，(圖中“抗體”和“ADCs”僅作為一般性的示意，不指代本發明的“抗原結合蛋白”或“蛋白-藥物偶聯物”的特定結構)；和 (B) 質譜分析中mc-vc-PAB-MMAE的特徵碎片結構。

圖7顯示了HCAb PR000020及其偶聯產物PR000020-ADC結合高表達CTLA4的細胞的結合活性。

圖8顯示了HCAb PR000020及其偶聯產物PR000020-ADC的HIC-HPLC分析結果：(A) HCAb偶聯前；(B) 偶聯後，純化前；(C) 偶聯及一步HIC純化後。

圖9顯示了HCAb PR000020及其偶聯產物PR000020-ADC的RP-HPLC分析結果：(A) HCAb偶聯前；(B) 偶聯後，純化前；(C) 偶聯及一步HIC純化後。

圖10顯示了HCAb PR000020的偶聯產物PR000020-ADC的分子量分析的質譜反褶積處理圖譜：(A) 非還原樣品；(B) 還原樣品。

圖11顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR000020-ADC的化合物偶聯位點：(A) PR000020-ADC的胺基酸序列，含有Cys-IAM的多肽片段用灰色背景標識；(B) PR000020-ADC樣品中含有Cys-IAM的多肽片段；(C) PR000020樣品中含有Cys-IAM的多肽片段；(B) 和 (C) 中表的各列名釋義見 (C) 下方。

圖12顯示了HCAb PR000759蛋白表達純化後的樣品的SEC-HPLC分析結果。

圖13顯示了HCAb PR000759的偶聯產物PR000759-ADC經一步HIC純化後的樣品的HIC-HPLC分析結果。

圖14顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR000759-ADC的化合物偶聯位點，和篩選出的帶有偶聯位點的肽段；其中表的各列名釋義同圖11 (C)。

圖15顯示了HCAb PR000759及其偶聯產物PR000759-ADC的分子量分析的質譜反褶積處理圖譜：(A) PR000759的非還原樣品；(B) PR000759-ADC的非還原樣品；(C) PR000759-ADC的還原樣品。

圖16顯示了HCAb PR001046蛋白表達純化後的樣品的SEC-HPLC分析結果。

圖17顯示了HCAb PR001046的偶聯產物PR001046-ADC經一步HIC純化後的樣品的HIC-HPLC分析結果。

圖18顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR001046-ADC的化合物偶聯位點，和篩選出的帶有偶聯位點的肽段；其中表的各列名釋義同圖11 (C)。

圖19顯示了HCAb PR001046及其偶聯產物PR001046-ADC的分子量分析的質譜反褶積處理圖譜：(A) PR001046的非還原樣品；(B) PR001046-ADC的非還原樣品；(C) PR001046-ADC的還原樣品。

圖20顯示了HCAb PR001046及其偶聯產物PR001046-ADC結合高表達BCMA的細胞的結合活性。

圖21顯示了PR001046-ADC的特異性的細胞毒性：(A) 特異性地殺傷$BCMA^+$細胞 NCI-H929以及混合細胞；(B) 不同純度的ADC(D2組分)對於細胞毒性的影響。

圖22顯示了HCAb PR004432蛋白表達純化後的樣品的SEC-HPLC分析結果。

圖23顯示了HCAb PR004432的偶聯產物PR004432-ADC經一步HIC純化後的樣品的RP-HPLC分析結果。

圖24顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR004432-ADC的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的肽段，以及對應的偶聯位點覆蓋率。

圖25顯示了HCAb PR004432的偶聯產物PR004432-ADC的分子量分析的質譜反褶積處理圖譜： (A) 非還原樣品；(B) 還原樣品。

圖26顯示了HCAb PR004432及其偶聯產物PR004432-ADC結合高表達5T4的細胞的結合活性。

圖27顯示了PR004432-ADC對高表達5T4的細胞的特異性的細胞毒性。

圖28顯示了HCAb PR004433蛋白表達純化後的樣品的SEC-HPLC分析結果。

圖29顯示了HCAb PR004433的偶聯產物PR004433-ADC經一步HIC純化後的樣品的HIC-HPLC分析結果。

圖30顯示了HCAb PR004433及其偶聯產物PR004433-ADC的HIC-HPLC分析結果：(A) HCAb偶聯前；(B) 偶聯後，純化前；(C) 偶聯及一步HIC純化後。

圖31顯示了HCAb PR004433的偶聯產物PR004433-ADC的分子量分析的質譜反褶積處理圖譜： (A) 非還原樣品；(B) 還原樣品。

圖32顯示了HCAb PR004433及其偶聯產物PR004433-ADC結合表達BCMA的細胞的結合活性：(A) 結合高表達人BCMA的細胞HEK293T-hBCMA；(B) 結合高表達人BCMA的細胞NCI-H929；(C) 不結合BCMA陰性細胞SNU-16。

圖33顯示了PR004433-ADC的特異性的細胞毒性：(A) 對HEK293T-hBCMA有特異性的細胞毒性；(B) 對HEK293T沒有細胞毒性；(C) 對NCI-H929有特異性的細胞毒性； (D) 對SNU-16沒有細胞毒性。

圖34顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR004433-ADC的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的肽段，以及對應的偶聯位點覆蓋率。

圖35顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR000020-ADC的化合物偶聯位點時，篩選出的帶有偶聯位點的肽段所對應的二級譜圖。

圖36顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR000020-ADC的化合物偶聯位點時，酶解肽段PHGSDIWGQGTMVTVSSEPKSC#DK(#表示偶聯位點)在ADC樣品(上)和單抗樣品(下)的XIC圖。

圖37顯示了利用LC-MS分析PR002129中Cys-220的二硫鍵： (A) 顯示了在PR002129的結構中，Cys-220的兩種可能狀態；(B) PR002129的非還原樣品分子量分析的質譜反褶積處理圖譜。

圖38顯示了HCAb PR000184及其C220S衍生變體的DSC熱力學分析曲線圖：(A) PR000184；(B) PR000184(C220S)。

圖39顯示了HCAb PR000453及其C220S衍生變體的DSC熱力學分析曲線圖：(A) PR000453；(B) PR000453(C220S)。

圖40顯示了HCAb PR004432、其C220S衍生變體和其偶聯產物利用Uncle分析平臺測定熔解溫度Tm：(A) PR004432；(B) PR004432(C220S)；(C) PR004432-ADC。

圖41舉例說明瞭本發明具體實施方式中該"蛋白-藥物偶聯物"的組成部分以及相關術語。

圖42顯示了示例性的抗原結合蛋白：(A) 具有兩個抗原結合片段和兩個連接肽的抗原結合蛋白；(B) 具有四個抗原結合片段和兩個連接肽的抗原結合蛋白。

圖43顯示了利用圖42所示的抗原結合蛋白進行偶聯產生的示例性的蛋白-藥物偶聯物：(A) 具有兩個抗原結合片段和兩個連接肽的蛋白-藥物偶聯物；(B) 具有四個抗原結合片段和兩個連接肽的蛋白-藥物偶聯物。

圖44顯示了不同物種的鉸鏈區序列和二硫鍵結構：(A) 人、小鼠和羊駝的不同IgG同型的鉸鏈區序列，半胱胺酸Cys被標識出；(B) 人IgG1鉸鏈區序列和二硫鍵結構；(C) 人IgG4鉸鏈區序列和二硫鍵結構；(D) 小鼠IgG1鉸鏈區序列和二硫鍵結構；(E) 小鼠IgG2a鉸鏈區序列和二硫鍵結構。

圖45顯示了HCAb PR004433在不同的還原和偶聯反應條件下製備的偶聯產物利用LC-MS分析非還原樣品的完整分子量所得到的質譜圖中的總離子流圖(TIC)，分別對應於實施例 10.1 的表 10-1和表 10-2中的實驗編號：(A) 實驗#8；(B) 實驗#9；(C) 實驗#11；(D) 實驗#12。

圖46顯示了HCAb PR004433及其變體分子結合NCI-H929細胞的結合活性。

圖47顯示了HCAb PR006468的偶聯產物PR006468-ADC的非還原樣品的完整分子量分析的質譜反褶積處理圖譜。

圖48顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR006468-ADC的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的肽段，以及對應的偶聯位點覆蓋率。

圖49顯示了BCMA結合蛋白(HCAb PR004433，HCAb PR006468)及其偶聯產物(PR004433-ADC，PR006468-ADC)結合NCI-H929細胞的結合活性。

圖50顯示了PR006468-ADC和PR004433-ADC對NCI-H929細胞的細胞毒性。

圖51顯示了PR002129的偶聯產物PR002129-ADC的HIC-HPLC分析結果：(A) 偶聯後，純化前；(B) 偶聯及一步HIC純化後。

圖52顯示了PR002129的偶聯產物PR002129-ADC的分子量分析的質譜反褶積處理圖譜：(A) HIC純化前樣品的非還原分子量；(B) HIC純化後樣品的還原分子量；(C) HIC純化後樣品的非還原分子量。

圖53顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR002129-ADC的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的肽段，以及對應的偶聯位點覆蓋率。

圖54顯示了PR002129及其偶聯產物PR002129-ADC結合高表達ROR1的細胞的結合活性。

圖55顯示了SIRPa-Fc融合蛋白PR006345的偶聯產物PR006345-ADC的純化前樣品的HIC-HPLC分析結果。

圖56顯示了SIRPa-Fc融合蛋白PR006345的偶聯產物PR006345-ADC的純化前樣品的非還原分子量分析的質譜反褶積處理圖譜。

圖57顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR006345-ADC的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的肽段，以及對應的偶聯位點覆蓋率。

圖58顯示了PR006345及其偶聯產物PR006345-ADC結合高表達CD47的細胞的結合活性。

圖59顯示了四價雙特異性抗原結合蛋白PR005744的結構。

圖60顯示了PR005744在NCI-H929細胞上的內化。

圖61顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR005744-ADC的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的肽段，以及對應的偶聯位點覆蓋率。

圖62顯示了PR005744及其偶聯產物PR005744-ADC結合NCI-H929細胞的結合活性。

圖63顯示了PR005744-ADC對NCI-H929細胞的細胞毒性。

圖64顯示了BRD4蛋白降解劑(PROTAC)的分子結構。

圖65顯示了HCAb PR004433與PROTAC進行偶聯的產物PR004433-PROTAC的純化前樣品的非還原分子量分析的質譜反褶積處理圖譜。

圖66顯示了HCAb PR004433及其偶聯產物PR004433-PROTAC結合NCI-H929細胞的結合活性。

圖67顯示了二價雙特異性抗原結合蛋白2129/4433的結構。

圖68顯示了2129/4433的偶聯產物2129/4433-ADC的純化前樣品的HIC-HPLC分析結果。

圖69顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析2129/4433-ADC的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的肽段，以及對應的偶聯位點覆蓋率。

圖70顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR001046-ADC的化合物偶聯位點時，篩選出的帶有偶聯位點的肽段所對應的二級譜圖。

圖71顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析PR006468-ADC的化合物偶聯位點時，篩選出的帶有偶聯位點的肽段所對應的二級譜圖。

圖72顯示了利用LC-MS 肽譜圖分析2129/4433-ADC的化合物偶聯位點時，篩選出的帶有偶聯位點的肽段所對應的二級譜圖。

【實施方式】

【0087】 以下由特定的具體實施例說明本申請發明的實施方式，熟悉此技術的人士可由本說明書所公開的內容容易地瞭解本申請發明的其他優點及效果。

【0088】 在本申請中，術語“免疫球蛋白”(Ig)與“抗體”在本文中可互換使用。基本的四鏈抗體單元是異四聚體蛋白，其由兩條相同的輕鏈(L)和兩條相同的重鏈(H)構成。在 IgG 的情況中，每個 L 鏈經由一個共價二硫鍵連接到 H 鏈，而兩條 H 鏈經由一個或多個二硫鍵彼此相連，二硫鍵的數目取決於 H 鏈的同種型。每個 H 和 L 鏈還具有規律間隔的鏈內二硫鍵。每條 H 鏈在胺基端具有可變結構域(VH)，接著是三個(對於每條 α 和 γ 鏈)或四個(對於 μ 和 ε 同種型)恆定結構域(CH)。每條 L 鏈在胺基端具有可變結構域(VL)，接著是一個恆定結構域(CL)。人 IgG 有四個亞型：IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。人或鼠類的抗體 L 鏈還進一步分為 κ 鏈和 λ 鏈兩種，相應地，其可變結構域分為 Vκ 和 Vλ，其恆定結構域分為 Cκ 和 Cλ。

【0089】 在本申請中，術語“結合蛋白”或者“抗原結合蛋白”通常是指包含結合抗原的部分的蛋白質，以及視需要地允許結合抗原的部分採用促進抗原結合蛋白與抗原結合的構象的支架或骨架部分。典型地，該“結合蛋白”或者“抗原結合蛋白”可以包含抗體輕鏈可變區(VL)、抗體重鏈可變區(VH)或上述兩者。VH和VL區可進一步被區分為稱為互補決定區(CDR)的高變區和相對保守的框架區(FR)。每個VH和VL可由三個CDR和四個FR區構成。VH和VL含有與抗原相互作用的結合位點。VH的三個CDR分別表示為HCDR1、HCDR2和HCDR3，也可表示為VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3；VL的三個CDR分別表示為LCDR1、LCDR2和LCDR3，也可表示為VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。抗原結合蛋白的實例可以包括但不限於抗體、抗原結合片段(Fab、Fab'、$F(ab)_2$、Fv片段、$F(ab')_2$、scFv、di-scFv和/或dAb)、免疫綴合物、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、抗體片段、抗體衍生物、抗體類似物、受體蛋白可溶性胞外區、配體蛋白或其他形式的融合蛋白等，只要它們顯示出所需的抗原結合活性即可。

【0090】 在本申請中，該CDR的胺基酸序列均是按照Chothia定義規則所示出的。但是，本領域人員公知，在本領域中可以經由多種方法來定義抗體的CDR，例如基於序列可變性的Kabat定義規則(參見，Kabat等人，免疫學的蛋白質序列，第五版，美國國立衛生研究院，貝塞斯達，馬裡蘭州(1991))和基於結構環區域位置的Chothia定義規則(參見JMol Biol 273:927-48,1997)。在本發明的技術方案中，還可以使用包含了Kabat定義和Chothia定義的Combined定義規則來確定可變結構域序列中的胺基酸殘基。該Combined定義規則即是將Kabat定義和Chothia定義的範圍相結合，基於此取了一個更大的範圍，詳見下表。本領域技術人員應當理解的是，除非另有規定，否則術語給定抗體或其區(例如可變

區)的"CDR"及"互補決定區"應瞭解為涵蓋如經由本發明描述的上述已知方案中的任何一種界定的互補決定區。雖然本發明中請求保護的範圍是基於 Chothia 定義規則所示出的序列，但是根據其他 CDR 的定義規則所對應的胺基酸序列也應當在本發明的保護範圍中。

	Kabat	**Chothia**	**Combined**
LCDR1	L24--L34	L24--L34	L24-L34
LCDR2	L50--L56	L50--L56	L50-L56
LCDR3	L89--L97	L89--L97	L89-L97
HCDR1	H31--H35	H26--H32	H26-H35
HCDR2	H50--H65	H52--H56	H50-H65
HCDR3	H95--H102	H95--H102	H95-H102

表-I 本申請抗體 CDR 定義方法

【0091】其中，Laa-Lbb 可以指從抗體輕鏈的 N 端開始，第 aa 位(Chothia 編碼規則)至第 bb 位(Chothia 編碼規則)的胺基酸序列；Haa-Hbb 可以指從抗體重鏈的 N 端開始，第 aa 位(Chothia 編碼規則)至第 bb 位(Chothia 編碼規則)的胺基酸序列。例如，L24-L34 可以指從抗體輕鏈 N 端開始，按照 Chothia 編碼規則的從第 24 位至第 34 位的胺基酸序列；H26-H32 可以指從抗體重鏈 N 端開始，按照 Chothia 編碼規則的從第 26 位至第 32 位的胺基酸序列。本領域技術人員應當知曉的是，在用 Chothia 編碼 CDR 時，有些位置會有插入位元點的情況(可參見 http://bioinf.org.uk/abs/)。

【0092】在本申請中，術語“單株抗體”通常是指從一群基本上同質的細胞中獲得的抗體，即集群中的抗體是相同的，除了可能存在的少量的自然突變。單株抗體通常針對單個抗原位點具有高度特異性。而且，與常規多株抗體製劑(通常具有針對不同決定簇的不同抗體)不同，各單株抗體是針對抗原上的單個決定簇。除了它們的特異性之外，單株抗體的優點在於它們可以經由融合瘤培養合成，不受其他免疫球蛋白污染。修飾語“單株”表示從基本上同質的抗體群體獲得的抗體的特徵，但是不被解釋為需要經由任何特定方法產生抗體。例如，根據本發明使用的單株抗體可以在融合瘤細胞中製備，或者可以經由重組 DNA 方法製備。

【0093】在本申請中，術語“全人源抗體”通常是指將人類編碼抗體的基因全部轉移至基因工程改造的抗體基因缺失動物中，使動物表達的抗體。抗體所有部分(包括抗體的可變區和恆定區)均由人類來源的胺基酸序列所組成。全人源抗體可以大大減少異源抗體對人體造成的免疫副反應。本領域獲得全人源抗體的方法可以有噬菌體展示技術、轉基因小鼠技術等。

【0094】在本申請中，術語“特異性結合”通常是指抗原結合蛋白與抗原表位結合，並且該結合需要抗原結合蛋白和表位之間的一些互補性。根據該定義，當抗體相比於其將結合隨機的，不相關的表位而言更容易經由其抗原結合蛋白與表位結合時，抗體被稱為“特異性結合”該抗原。“表位”是指抗原上與抗原結合蛋白(如抗體)結合的特定的原子基團(例如，糖側鏈、磷醯基、磺醯基)或胺基酸。

【0095】在本申請中，術語“Fab”通常指常規抗體(例如 IgG)中與抗原結合的部分，包括抗體的重鏈可變區 VH、輕鏈可變區 VL 和重鏈恆定區結構域 CH1 以及輕鏈恆定區 CL。在常規抗體中，VH 的 C 端與 CH1 的 N 端聯結形成重鏈

Fd片段，VL的C端與CL的N端聯結形成輕鏈，CH1的C端又進一步與重鏈的鉸鏈區和其他恆定區結構域聯結形成重鏈。在某些實施方式中，“Fab”也指Fab的變體結構。例如，在某些實施方式中，VH的C端與CL的N端聯結形成一個多肽鏈，VL的C端與CH1的N端聯結形成另一個多肽鏈，形成Fab(cross VH/VL)的結構；在某些實施方式中，Fab的CH1不與鉸鏈區聯結，而是CL的C端與重鏈的鉸鏈區聯結，形成Fab(cross Fd/LC)的結構。

【0096】 在本申請中，術語“VH”通常指抗體的重鏈可變區VH結構域。在某些實施方式中，“VH”可以是人或者其他動物的常規抗體(H2L2結構)的重鏈可變區VH。在某些實施方式中，“VH”也可以是駱駝科等動物的重鏈抗體(HCAb結構)的重鏈可變區VHH。在某些實施方式中，“VH”還可以是利用Harbour HCAb轉基因小鼠產生的全人源重鏈抗體(HCAb結構)的重鏈可變區VH。

【0097】 在本申請中，術語“抗原結合片段”通常指任何可以與抗原特異結合的蛋白功能區域。在某些實施方式中，“抗原結合片段”可以是“Fab”。在某些實施方式中，“抗原結合片段”也可以是“VH”。在某些實施方式中，“抗原結合片段”也可以是單鏈抗體scFv。在某些實施方式中，“抗原結合片段”還可以是其他抗原結合形式(例如受體蛋白可溶性胞外區、配體蛋白、脂質運載蛋白(lipocalins)、神經細胞黏附分子(NCAM)、纖維結合蛋白(fibronectin)、錨蛋白重複片段蛋白(DARPins)等衍生蛋白結構)。

【0098】 在本申請中，術語“配對單元”通常是指一組含有至少兩個可以互相配對的亞單元的結構。該互相配對的亞單元之間可以互相結合，該結合需要亞單元之間的互補性；該互相配對的亞單元之間可以發生共價鍵或者非共價鍵相互作用；該非共價鍵相互作用可以包括範德華力、氫鍵、疏水作用、靜電作用、

偶極作用等。“配對單元”可以是天然存在的或者經過修飾的具有同源或者異源多聚體形式的多肽鏈的集合；例如，“配對單元”可以是抗體 Fc 片段或其變體的二聚體形式；“配對單元”可以是 CD79 的 α 鏈和 β 鏈；“配對單元”可以是 CD8 的 α 鏈和 β 鏈；“配對單元”可以是 T 細胞受體(TCR)的 α 鏈和 β 鏈。

【0099】 在本申請中，術語“Fc 片段”通常是指抗體的可結晶片段(fragment crystallizable, Fc)，即包含由重鏈恆定結構域 CH2 和 CH3 組成的多肽鏈。在某些實施方式中，Fc 片段可以是天然的二聚體形式；在另一些實施方式中，Fc 片段可以是修飾的單體形式。

【0100】 在本申請中，術語“CTLA4”通常是指細胞毒性 T 淋巴細胞相關蛋白-4(也稱為 CD152)、其功能變體和/或其功能片段。CTLA4 序列是本領域已知的。例如，示例性的全長的人 CTLA4 序列可以在 Uniprot 登錄號 P16410 中找到；示例性的全長的食蟹猴 CTLA4 序列可以在 Uniprot 登錄號 G7PL88 中找到。針對 CTLA4 的藥物可能應用於治療黑色素瘤、肺癌、結腸癌、肝癌、頭頸癌、腎癌、乳腺癌、胰腺癌、膀胱癌等腫瘤。

【0101】 在本申請中，術語“BCMA”通常是指腫瘤壞死因數受體超家族成員 17(也稱為 CD269，B 細胞成熟蛋白)、其功能變體和/或其功能片段。BCMA 序列是本領域已知的。例如，示例性的全長的人 BCMA 序列可以在 Uniprot 登錄號 Q02223 中找到；示例性的全長的食蟹猴 BCMA 序列可以在 NCBI 登錄號 XP_005591343 中找到。針對 BCMA 的藥物可能應用於治療多發性骨髓瘤和其他血液系統惡性腫瘤。

【0102】 在本申請中，術語“MSLN”通常是指間皮素分子(也稱為 MPF)、其功能變體和/或其功能片段。MSLN 序列是本領域已知的。例如，示例性的全長

的人 MSLN 序列可以在 Uniprot 登錄號 Q13421 中找到；示例性的全長的食蟹猴 MSLN 序列可以在 NCBI 登錄號 XP_005590873 中找到。針對 MSLN 的藥物可能應用於治療間皮瘤、肺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宮內膜癌等腫瘤。

【0103】 在本申請中，術語“5T4”通常是指滋養細胞糖蛋白(也稱為 TPBG)、其功能變體和/或其功能片段。5T4 序列是本領域已知的。例如，示例性的全長的人 5T4 序列可以在 Uniprot 登錄號 Q13641 中找到；示例性的全長的食蟹猴 5T4 序列可以在 Uniprot 登錄號 Q4R8Y9 中找到。針對 5T4 的藥物可能應用於治療胸腺癌、肺癌、食管癌、胃癌、小腸癌、胰腺癌、肝癌、膽囊癌、腎癌、膀胱癌、卵巢癌、子宮內膜癌、宮頸癌等腫瘤。

【0104】 在本申請中，術語“ROR1”通常是指失活酪胺酸蛋白激酶跨膜受體 ROR1(也稱為 NTRKR1)、其功能變體和/或其功能片段。ROR1 序列是本領域已知的。例如，示例性的全長的人 ROR1 序列可以在 Uniprot 登錄號 Q01973 中找到；示例性的全長的食蟹猴 ROR1 序列可以在 NCBI 登錄號 XP_015290264 中找到。針對 ROR1 的藥物可能應用於治療白血病、非霍奇金淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌等腫瘤。

【0105】 在本申請中，術語“CD47”通常是指白細胞表面抗原 CD47、其功能變體和/或其功能片段。CD47 序列是本領域已知的。例如，示例性的全長的人 CD47 序列可以在 Uniprot 登錄號 Q08722 中找到。針對 CD47 的藥物可能應用於治療白血病、非霍奇金淋巴瘤、多發性骨髓瘤、黑色素瘤、頭頸癌等腫瘤。

【0106】 在本申請中，術語“SIRPα”通常是指信號調節蛋白 α(也稱為 BIT、MFR、MYD1、PTPNS1、SHPS1 或 SIRP)、其功能變體和/或其功能片段。

SIRP α 是 CD47 的受體。SIRP α 序列是本領域已知的。例如，示例性的全長的人 SIRP α 序列可以在 Uniprot 登錄號 P78324 中找到。

【0107】 在本申請中，術語“蛋白-藥物偶聯物”通常是指一類將藥物偶聯物經由共價鍵結合到抗原結合蛋白而形成的藥物分子。該藥物偶聯物包含至少一個載荷藥物。本領域已知多種蛋白-藥物偶聯物及其製備方法。在某些實施例中，該蛋白-藥物偶聯物可以是抗體-藥物偶聯藥物(ADC)。例如，示例性的蛋白-藥物偶聯物可包括但不限於曲妥珠單抗 (trastuzumab)，奧瑞珠單抗 (ocrelizumab)，帕妥珠單抗 (pertuzumab)，利妥昔單抗 (rituximab) 等抗體可以經由連接子單元將載荷藥物模組共價附著至抗體以形成抗體-藥物偶聯物，以實現靶向治療效應。在某些實施例中，“蛋白-藥物偶聯物”可以包含抗原結合片段、連接肽和藥物偶聯物。在某些實施例中，“蛋白-藥物偶聯物”的該藥物偶聯物可以是 mc-vc-PAB-MMAE(也稱為 VcMMAE)。

【0108】 在本申請中，術語“藥物偶聯物”通常是指一類可以經由特定官能團以共價鍵結合到其他分子的、具有特定結構的原子和基團的集合體；其包含至少一個載荷藥物，和視需要地包含連接子。本領域已知多種載荷藥物、多種連接子或連接子構件。在某些實施例中，該藥物偶聯物可以是 mc-vc-PAB-MMAE(也稱為 VcMMAE)。

【0109】 在本申請中，術語“載荷藥物”通常是指一類具有藥學活性的小分子化合物或者毒素或其他藥物分子形式，可以是但不局限於小分子化合物、毒素分子、抗生素、寡核苷酸、蛋白降解靶向嵌合體(PROTAC)、親和配體、螢光基團、核素基團、多肽、免疫調節分子等。本領域已知多種載荷藥物，例如單甲基

奧瑞司他汀 E(“MMAE”，monomethyl auristatin E)，美登素(“DM1”，Mertansine)，Toll 樣受體激動劑分子。

【0110】 在本申請中，術語“連接肽”或“肽段”通常是指本申請中該“蛋白-藥物偶聯物”中的多肽鏈的一部分，該連接肽含有至少一個半胱胺酸以作為與藥物偶聯物共價結合的位點。在本申請中，該連接肽可以包括第一連接肽和/或第二連接肽，該第一連接肽與該第二連接肽的胺基酸序列可以相同或不同。

【0111】 在本申請中，術語“連接子”、“連接子單元”、“接頭”或“接頭單元”通常是指為可用於連接一個或多個載荷藥物與抗原結合蛋白以形成“蛋白-藥物偶聯物”的化學官能模組。連接子可包含一種或多種連接子構件，本領域已知多種連接子構件，例如，馬來醯亞胺基己醯基(“MC”，maleimidocaproyl)，纈胺酸-瓜胺酸(“val-cit”或“vc”，valine-citrulline)，對胺基苄氧羰基(“PAB”，p-aminobenzyloxycarbonyl)。在本申請中，該“連接子”可以包括由胺基酸組成的多肽連接子，但是該“連接子”與前述“連接肽”不同，前述“連接肽”是抗原結合蛋白的一部分。

【0112】 在本申請中，術語“綴合物”通常是指本申請中該“藥物偶聯物”與特定官能團發生共價結合形成的原子和基團的集合體。在某些實施例中，該綴合物可以是藥物偶聯物與巰基發生反應形成的。例如，在某些實施例中，該綴合物可以是 mc-vc-PAB-MMAE 的馬來醯亞胺活性反應基團與巰基發生加成反應形成的穩定的原子/基團的集合體。

【0113】 在本申請中，術語“DAR”(Drug-Antibody Ratio)通常是指載荷藥物-抗體比例，即抗體所連接載荷藥物數量的平均值。目前的蛋白-藥物偶聯物所帶的載藥量通常為 0～8 個載荷藥物分子 (D0～D8)/抗體。通常，也用“D0”、“D2”、

“D4”、“D6”和“D8”分別表示偶聯產物中的沒有偶聯載荷藥物分子(DAR=0)、偶聯了 2 個載荷藥物分子(DAR=2)、偶聯了 4 個載荷藥物分子(DAR=4)、偶聯了 6 個載荷藥物分子(DAR=6)和偶聯了 8 個載荷藥物分子(DAR=8)的蛋白-藥物偶聯物組分。在某些實施例中，“D0”也稱為“裸抗”。HIC-HPLC 分析方法是測定蛋白-藥物偶聯物的 DAR 和載藥量分佈的常用分析方法。

【0114】 在本申請中，術語“CAR”(Conjugate/Antigen binding protein Ratio)來表示藥物偶聯物-抗原結合蛋白比例，即抗原結合蛋白所連接藥物偶聯物數量的平均值。通常一個藥物偶聯物包含至少一個載荷藥物；在一些實施方式中，現有技術可以使一個藥物偶聯物部分只含有一個載荷藥物，即此情形中，“CAR”和“DAR”的值可以等同；在另一些實施方式中，現有技術可以使一個藥物偶聯物部分經由連接子連接多個載荷藥物(參見，Kumara 等人，Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2018), 28, 3617-3621)，即在此情形中，“DAR”的值可以數倍於“CAR”的值；例如，當一個藥物偶聯物含有兩個載荷藥物時，DAR 值可以為 CAR 值的 2 倍。

【0115】 在本申請的具體實施例中，經由利用人 IgG1 抗體重鏈鉸鏈區的天然序列(SEQ ID NO: 73)中的半胱胺酸 Cys-220(Eu 編號)作為偶聯位點，聯結本申請該藥物偶聯物，可以產生均一 CAR 值的蛋白-藥物偶聯物，特別地，該方法可以產生均一的 CAR=2 的蛋白-藥物偶聯物。在本申請的一些具體實施例中，當使用 mc-vc-PAB-MMAE 作為藥物偶聯物進行偶聯時，由於一個 mc-vc-PAB-MMAE 只含有一個載荷藥物 MMAE，因此 CAR 值和 DAR 值可以等同，也可以使用 DAR 值來指代一個抗原結合蛋白所連接的藥物偶聯物的數量；特別地，該

方法可以產生均一 DAR 值的蛋白-藥物偶聯物，例如，該蛋白-藥物偶聯物的 DAR=2。

【0116】在本申請中，術語“源自”通常是指從親本胺基酸或核苷酸序列得到的衍生胺基酸或核苷酸序列，它通常指親本序列和衍生序列的結構相似性，不暗含或包含對源自親本序列的衍生序列的過程或來源限制，因此使用“源自”討論蛋白或多核苷酸時，不管其物理起源。在某些情形中，“源自”可以是指衍生序列是未經修飾的、親本序列的一部分。例如，在本申請的具體實施例中，Cys1、Cys2 可以是未經修飾的天然的抗體鉸鏈區序列的一部分。

【0117】一方面，本申請提供了以下實施方案：

1. 蛋白-藥物偶聯物，其基本上由第一多肽鏈和第二多肽鏈組成，該第一多肽鏈包含第一半胱胺酸(Cys1)和第二半胱胺酸(Cys2)，該第二多肽鏈包含第一半胱胺酸(Cys1)第二半胱胺酸(Cys2)，且該第一多肽鏈的 Cys1 處偶聯有結構-L1-P1，該第二多肽鏈的 Cys1 處偶聯有結構-L2-P2。

2. 根據實施方案 1 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該結構-L1-P1 可以沒有 L1。

3. 根據實施方案 1 至 2 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該結構-L2-P2 可以沒有 L2。

4. 根據實施方案 1 至 3 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該 L1 和/或該 L2 包含連接子。

5. 根據實施方案 4 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該連接子包括可斷裂連接子。

6. 根據實施方案 4-5 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該連接子包括蛋白酶敏感型連接子。

7. 根據實施方案 4 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該連接子包括 mc-vc-PAB。

8. 根據實施方案 1 至 7 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該 P1 和/或該 P2 包含載荷藥物。

9. 根據實施方案 8 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該載荷藥物包含藥物活性成分和標記分子。

10. 根據實施方案 8 至 9 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該載荷藥物包括小分子化合物、毒素分子、寡核苷酸、蛋白降解靶向嵌合體(PROTAC)、親和配體、標記基團、抗生素、多肽和/或免疫調節分子。

11. 根據實施方案 1 至 10 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該 P1 和 P2 可以相同或不同。

12. 根據實施方案 1 至 11 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該 L1 和 L2 可以相同或不同。

13. 根據實施方案 1 至 12 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該 L1 和 P1 以共價結合方式連接。

14. 根據實施方案 1 至 13 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該 L2 和 P2 以共價結合方式連接。

15. 根據實施方案 1 至 14 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一多肽鏈包含第一抗原結合片段。

16. 根據實施方案 1 至 15 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第二多肽鏈包含第二抗原結合片段。

17. 根據實施方案 15 或 16 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一抗原結合片段和/或第二抗原結合片段靶向腫瘤抗原或非腫瘤抗原。

18. 根據實施方案 15 至 17 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該抗原結合片段包含 VH、VL、scFv、Fab、dAb、受體蛋白可溶性胞外區和/或衍生蛋白結構等。

19. 根據實施方案 1 至 18 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其還包含配對單元。

20. 根據實施方案 19 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該配對單元為 Fc 結構域。

21. 根據實施方案 1 至 20 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一多肽鏈包含第一連接肽，該第二多肽鏈包含第二連接肽。

22. 根據實施方案 15 至 21 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該抗原結合片段經由該連接肽與該配對單元連接。

23. 根據實施方案 15 至 22 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該抗原結合片段的 C 端與該第一連接肽和/或第二連接肽的 N 端連接。

24. 根據實施方案 15 至 23 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一連接肽和/或第二連接肽的 C 端與該配對單元的 N 端連接。

25. 根據實施方案 1 至 24 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一多肽鏈或第二多肽鏈各自獨立地包含 SEQ ID NO: 64-77、106-129、148-149 中任一項所示的胺基酸序列。

26. 根據實施方案 1 至 25 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第一抗原結合片段、該第一連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)和該配對單元。

27. 根據實施方案 1 至 26 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第二多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第二抗原結合片段、該第二連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)和該配對單元。

28. 根據實施方案 1 至 27 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第一抗原結合片段的 VH、該第一抗原結合片段的 VL、該第一連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)、CH_2 和 CH_3。

29. 根據實施方案 28 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第二多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第二抗原結合片段的 VH、該第二抗原結合片段的 VL、該第二連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)、CH_2 和 CH_3。

30. 根據實施方案 1 至 27 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第一抗原結合片段的 VL、該第一抗原結合片段的 VH、該第一連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)、CH_2 和 CH_3。

31. 根據實施方案 30 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第二多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第二抗原結合片段的 VL、該第二抗原結合片段的 VH、該第二連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)、CH_2 和 CH_3。

32. 根據實施方案 1 至 27 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第一抗原結合片段的 VH、該第一連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)、CH_2 和 CH_3。

33. 根據實施方案 32 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第二多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第二抗原結合片段的 VH、該第二連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)、CH_2 和 CH_3。

34. 蛋白-藥物偶聯物，根據實施方案 1 至 33 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，以及第三多肽鏈和/或第四多肽鏈。

35. 根據實施方案 1 至 34 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其還包含第三抗原結合片段和/或第四抗原結合片段。

36. 根據實施方案 34 或 35 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第三抗原結合片段和/或第四抗原結合片段包括抗體或其抗原結合片段。

37. 根據實施方案 35 至 36 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第三抗原結合片段、該第一抗原結合片段、該第一連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)和該配對單元。

38. 根據實施方案 35 至 37 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第二多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第四抗原結合片段、該第二抗原結合片段、該第二連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)和該配對單元。

39. 根據實施方案 35 至 38 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第三抗原結合片段的 VL、該第三抗原結合片段的 CL、該第一抗原結合片段的 VH、該第一連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)、CH_2 和 CH_3。

40. 根據實施方案 35 至 39 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第二多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第四抗原結合片段的 VL、該第四抗原結合片段

的 CL、該第二抗原結合片段的 VH、該第二連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)、CH_2 和 CH_3。

41. 根據實施方案 35 至 40 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第三多肽鏈自 N 端至 C 端，依次包含該第三抗原結合片段的 VH 和該第三抗原結合片段的 CH_1。

42. 根據實施方案 35 至 41 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第四多肽鏈自 N 端至 C 端，依次包含該第四抗原結合片段的 VH 和該第四抗原結合片段的 CH_1。

43. 根據實施方案 35 至 42 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第三抗原結合片段和/或第四抗原結合片段為 Fab。

44. 根據實施方案 35 至 43 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一抗原結合片段和該第二抗原結合片段的胺基酸序列相同，和/或，該第三抗原結合片段和該第四抗原結合片段的胺基酸序列相同。

45. 根據實施方案 35 至 44 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一多肽鏈和該第二多肽鏈的胺基酸序列相同，和/或，該第三多肽鏈和該第四多肽鏈的胺基酸序列相同。

46. 根據實施方案 1 至 27 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第一抗原結合片段的受體蛋白可溶性胞外區、該第一連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)、CH_2 和 CH_3。

47. 根據實施方案 46 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第二多肽鏈自 N 端至 C 端依次包含該第二抗原結合片段的受體蛋白可溶性胞外區、該第二連接肽(例如，IgG 的鉸鏈區)、CH_2 和 CH_3。

【0118】**抗原結合蛋白**

一方面，本申請提供了一種抗原結合蛋白。

【0119】在本申請中，該抗原結合蛋白包含至少兩個連接肽、一個或者多個抗原結合片段。

【0120】在本申請中，兩個連接肽分別為第一連接肽和第二連接肽；第一連接肽和第二連接肽的胺基酸序列可以相同或不同。

【0121】在本申請的該抗原結合蛋白中，該第一連接肽可以至少包含第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2，且該第二連接肽可以至少包含第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2。

【0122】在本申請的該抗原結合蛋白中，該第一連接肽的 Cys1 和該第二連接肽的 Cys1 之間可以形成二硫鍵，稱為“二硫鍵 Cys1-Cys1”。

【0123】在本申請的該抗原結合蛋白中，該第一連接肽的 Cys2 和該第二連接肽的 Cys2 之間可以形成二硫鍵，稱為“二硫鍵 Cys2-Cys2”。

【0124】在本申請的該抗原結合蛋白中，該“二硫鍵 Cys1-Cys1”弱於該“二硫鍵 Cys2-Cys2”。特別地，在具體的實施方式中，二硫鍵 Cys1-Cys1 相比二硫鍵 Cys2-Cys2，更容易被還原劑所打開。

【0125】在本申請中，該抗原結合蛋白中的該第一連接肽的該 Cys1 和該 Cys2 之間可以相隔至少 3 個(例如，4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個或更多)不為半胱胺酸的胺基酸。

【0126】在本申請中，該抗原結合蛋白中的該第二連接肽的該 Cys1 和該 Cys2 之間可以相隔至少 3 個(例如，4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個或更多)不為半胱胺酸的胺基酸。

【0127】 例如，該第一連接肽自 N 端至 C 端可以包含 Cys1-(X)n-Cys2 所示的胺基酸序列，其中，n 可以為大於或等於 3 的整數(例如 n 可為 3，n 可為 4，n 可為 5，n 可為 6，n 可為 7，n 可為 8，n 可為 9，n 可為 10，n 可為 11，n 可為 12，n 可為 13，n 可為 14，n 可為 15，或 n 可為大於 15 的整數)；該 X 指的是不為 Cys 的任意胺基酸。

【0128】 例如，該第二連接肽自 N 端至 C 端可以包含 Cys1-(X)n-Cys2 所示的胺基酸序列，其中，n 可以為大於或等於 3 的整數(例如 n 可為 3，n 可為 4，n 可為 5，n 可為 6，n 可為 7，n 可為 8，n 可為 9，n 可為 10，n 可為 11，n 可為 12，n 可為 13，n 可為 14，n 可為 15，或 n 可為大於 15 的整數)；該 X 指的是不為 Cys 的任意胺基酸。

【0129】 在本申請中，該抗原結合蛋白中的該連接肽可以是含有至少兩個半胱胺酸(Cys1 和 Cys2)的天然存在的胺基酸序列，也可以是對“含有至少兩個半胱胺酸的天然存在的胺基酸序列”進行改造獲得的衍生序列。該“改造”不涉及天然存在的胺基酸序列中 Cys1 和 Cys2 的改變；例如，該改造為調整天然存在的胺基酸序列中 Cys1 和 Cys2 之間的胺基酸種類、數目和/或在 Cys1 前進行柔性連接肽(如 GSGS、GGGGS)的添加。

【0130】 例如，該第一連接肽或第二連接肽可以為人 IgG 的鉸鏈區(SEQ ID NO: 73)，該 Cys1 為人 IgG 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-220。

【0131】 例如，該第一連接肽可以為人 IgG1 的鉸鏈區，連接肽序列如 SEQ ID NO: 73 所示，連接肽中該 Cys1 為天然 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-220，該 Cys2 為天然 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-226。又例如，該第一連接肽可以為源自人 IgG1 的鉸鏈區的衍生序列，其胺基酸序列如 SEQ ID NOs: 74-105、

145-146 中任一項所示的序列，連接肽中該 Cys1 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-220 的 Cys，連接肽中該 Cys2 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-226 的 Cys。

【0132】 例如，該第二連接肽可以為人 IgG1 的鉸鏈區，連接肽序列如 SEQ ID NO: 73 所示，連接肽中該 Cys1 為天然 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-220，該 Cys2 為天然 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-226。又例如，該第二連接肽可以為源自人 IgG1 的鉸鏈區的衍生序列，其胺基酸序列如 SEQ ID NOs: 74-105、145-146 中任一項所示的序列，連接肽中該 Cys1 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-220 的 Cys，連接肽中該 Cys2 為對應於人 IgG1 鉸鏈區 Cys-226 的 Cys。

【0133】 例如，該第一連接肽或第二連接肽可以為小鼠 IgG2c 的鉸鏈區 (SEQ ID NO: 147)，該 Cys1 為其序列的第一個半胱胺酸，該 Cys2 為其序列的第二個半胱胺酸。

【0134】 在本申請中，該“一個或多個抗原結合片段”中的“多個抗原結合片段”可以部分或全部相同或都不同；該“相同”是指兩種或以上的抗原結合片段的胺基酸序列相同，該“不同”是指兩種或以上抗原結合片段的胺基酸序列不同，兩種或以上的抗原結合片段可以識別不同的抗原或表位，也可以是，兩種或以上的抗原結合蛋白識別相同的抗原或相同表位元，但序列和結構不同。

【0135】 在本申請中，該抗原結合蛋白可以包含至少兩個該抗原結合片段。在本申請中，該抗原結合蛋白可以包含第一抗原結合片段和第二抗原結合片段(如圖 42 (A) 所示結構)，第一抗原結合片段和第二抗原結合片段的胺基酸序列可以相同或不同，第一抗原結合片段和第二抗原結合片段的靶點可以相同或不同。

【0136】 在本申請中，該抗原結合蛋白還可以進一步包含第三抗原結合片段和/或第四抗原結合片段(如圖 42 (B) 所示結構)；第一、二、三、四抗原結合片段可以部分或全部相同或不同。

【0137】 在本申請中，一個或多個抗原結合片段可以連接於同一連接肽，也可以連接於不同連接肽。該抗原結合片段可以位於該連接肽的 N 端或者 C 端。

【0138】 在本申請中，該抗原結合蛋白包含第一連接肽和該第二連接肽，包含第一抗原結合片段和第二抗原結合片段，該抗原結合蛋白可以包括以下結構：

(a)該第一抗原結合片段的 C 端可以與該第一連接肽的 N 端直接或間接連接，且該第二抗原結合片段的 C 端可以與該第二連接肽的 N 端直接或間接連接，具有如圖 42 (A)所示結構；

(b)該第一抗原結合片段的 N 端可以與該第一連接肽的 C 端直接或間接連接，且該第二抗原結合片段的 C 端可以與該第二連接肽的 N 端直接或間接連接；

(c)該第一抗原結合片段的 N 端可以與該第一連接肽的 C 端直接或間接連接，且該第二抗原結合片段的 N 端可以與該第二連接肽的 C 端直接或間接連接；

(d)該第一抗原結合片段的 C 端可以與該第一連接肽的 N 端直接或間接連接，且該第二抗原結合片段的 N 端可以與該第二連接肽的 C 端直接或間接連接。

【0139】 在本申請中，該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段可以指任何可以與抗原特異結合的蛋白功能區域，既可以是來源於駱駝或者 HCAb 轉基因鼠的 VHH 結構域，也可以是單鏈抗體 scFv；或者是其他抗原結合形式(如受體蛋白可溶性胞外區、配體蛋白、脂質運載蛋白 lipocalins、神經細胞黏附分子 NCAM、纖維結合蛋白 fibronectin、錨蛋白重複片段蛋白 DARPins 等衍生蛋

白結構)。但是，該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段中不包含能夠影響藥物偶聯物與連接肽在 Cys1 處進行偶聯的官能團。

【0140】 在本申請中，該第一抗原結合片段和/或第二抗原結合片段中不包含能夠影響藥物偶聯物與連接肽在 Cys1 處進行偶聯的官能團。例如，該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段不包含能夠與該第一連接肽和/或第二連接肽的 Cys1 的側鏈巰基形成共價鍵例如二硫鍵的官能團。例如，在某些具體實施例中，該第一抗原結合片段和/或第二抗原結合片段不包含含有恆定區 Cys-214(Eu 編號)的輕鏈或輕鏈片段。

【0141】 在本申請中，該抗原結合蛋白還可以進一步包含第三抗原結片段和/或第四抗原結合片段。進一步包含的第三抗原結合片段和/或第四抗原結合片段進一步連接在上述(a)或(b)或(c)或(d)的該抗原結合蛋白的 N 端或者 C 端：

例如，該第三抗原結合片段的 C 端可以與該第一抗原結合片段的 N 端直接或者間接相連，且該第一抗原結合片段的 C 端可以與該第一連接肽的 N 端連接；和/或，該第四抗原結合片段的 C 端可以與該第二抗原結合片段的 N 端直接或者間接相連，且該第二抗原結合片段的 C 端可以與該第二連接肽的 N 端連接；具有如圖 42 (B) 所示結構。

【0142】 在本申請的該抗原結合蛋白的結構中，該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段可以包含任何可以與抗原特異結合的蛋白功能區域，既可以是“Fab”，也可以是“VH”，也可以是單鏈抗體 scFv；還可以是其他抗原結合形式(例如受體蛋白可溶性胞外區、配體蛋白、脂質運載蛋白(lipocalins)、神經細胞黏附分子(NCAM)、纖維結合蛋白(fibronectin)、錨蛋白重複片段蛋白(DARPins)等衍生蛋白結構。

【0143】在本申請中，該抗原結合蛋白還可以包含能夠使得第一連接肽和第二連接肽配對的配對單元，該配對單元可以包含第一配對亞單元和第二配對亞單元，且該第一配對亞單元可以經由共價鍵或者非共價鍵與該第二配對亞單元相互作用。

【0144】在某些實施方式中，"配對單元"可以是抗體 Fc 片段或其變體的二聚體形式；

在某些實施方式中，"配對單元"可以是非對稱的二聚體形式，例如第一配對亞單元是具有"knob"突變(T366W)的 Fc 片段單體，而第二配對亞單元是具有"hole"突變(T366S/L368A/Y407V)的 Fc 片段單體；

在某些實施方式中，"配對單元"可以是非對稱的二聚體形式，例如第一配對亞單元是 CD8 的 α 鏈，而第二配對亞單元是 CD8 的 β 鏈；

在某些實施方式中，"配對單元"可以是非對稱的二聚體形式，例如第一配對亞單元是 CD79 的 α 鏈，而第二配對亞單元是 CD79 的 β 鏈；

在某些實施方式中，"配對單元"可以是非對稱的二聚體形式，例如第一配對亞單元是 T 細胞受體的 α 鏈，而第二配對亞單元是 T 細胞受體的 β 鏈。

【0145】在某些實施方式中，該第一配對亞單元的 N 端可以與該第一連接肽的 C 端連接，且該第二配對亞單元的 N 端與該第二連接肽的 C 端連接；或者，該第一配對亞單元的 N 端可以與該第二連接肽的 C 端連接，且該第二配對亞單元的 N 端與該第一連接肽的 C 端連接。

【0146】在某些具體實施方式中，本申請提供了一種具有如圖 42 (A) 所示結構的抗原結合蛋白，其具有如下結構特徵：

該抗原結合蛋白可以包含第一連接肽和第二連接肽，第一抗原結合片段和第二抗原結合片段，和配對單元；

該第一連接肽和第二連接肽的胺基酸序列可以相同或不同；

該第一抗原結合片段與該第二抗原結合片段的靶點可以相同或不同；該第一抗原結合片段與該第二抗原結合片段的胺基酸序列可以相同或不同；

該配對單元可以是 Fc 片段同源或異源二聚體；

該第一抗原結合片段的 C 端與可以該第一連接肽的 N 端直接或間接連接，且該第二抗原結合片段的 C 端可以與該第二連接肽的 N 端直接或間接連接；

該第一連接肽和第二連接肽的 C 端分可以別與該 Fc 片段的 N 端連接；

該第一連接肽可以包含至少兩個半胱胺酸 Cys1 和 Cys2，該 Cys1 和 Cys2 之間相隔至少 3 個不為 Cys 的任意胺基酸；

該第二連接肽可以包含至少兩個半胱胺酸 Cys1 和 Cys2，該 Cys1 和 Cys2 之間相隔至少 3 個不為 Cys 的任意胺基酸；

該第一連接肽的 Cys1 和該第二連接肽的 Cys1 之間可以形成二硫鍵；

該第一連接肽的 Cys2 和該第二連接肽的 Cys2 之間可以形成二硫鍵；

【0147】 該第一連接肽和/或該第二連接肽可以源自人 IgG1 鉸鏈區序列(SEQ ID NO: 73)或其衍生序列(SEQ ID NOs: 74-105、145-146)或者源自小鼠 IgG2c 的鉸鏈區序列(SEQ ID NO: 147)；

【0148】 該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段可以指任何可以與抗原特異結合的蛋白功能區域，既可以是來源於駱駝或者 HCAb 轉基因鼠的 VHH 結構域，也可以是單鏈抗體 scFv；或者是其他抗原結合形式(如受體蛋白可

溶性胞外區、配體蛋白、脂質運載蛋白 lipocalins、神經細胞黏附分子 NCAM、纖維結合蛋白 fibronectin、 錨蛋白重複片段蛋白 DARPins 等衍生蛋白結構)；

【0149】 該第一抗原結合片段和該第二抗原結合片段中不包含能夠影響藥物偶聯物與連接肽在 Cys1 處進行偶聯的官能團；例如，不包含能夠與該第一連接肽和該第二連接肽中 Cys1 的側鏈巯基形成共價鍵官能團；例如，不包含能夠與該第一連接肽和該第二連接肽中 Cys1 的側鏈巯基形成二硫鍵的官能團；例如，不包含含有恆定區 Cys-214(Eu 編號)的輕鏈或輕鏈片段；

【0150】 在某些實施方式中，該一個或多個抗原結合片段中不包含能夠影響藥物偶聯物與該第一連接肽和/或該第二連接肽在 Cys1 處進行偶聯的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物，該影響表現為顯著降低該藥物偶聯物在 Cys1 位點的偶聯機率，該顯著降低可以包括下述一項或多項：

1)顯著降低該 Cys1 與該藥物偶聯物進行偶聯的機率，

2)當存在該官能團或該綴合物時，使得該連接肽的 Cys1 與該藥物偶聯物偶聯的機率可能降低至 50%、40%、30%、20%、10%或更低，

3)當存在該官能團或該綴合物時，使得製備得到的該蛋白-藥物偶聯物的純度為低於 50%，例如，低於 40%、30%、20%、10%或更低，

4)當存在該官能團或該綴合物時，該官能團或該綴合物與該 Cys1 之間發生相互作用，使得該 Cys1 不能與該藥物偶聯物進行偶聯，或者，使得該 Cys1 不能在本申請所述的方法中與該藥物偶聯物進行偶聯；

【0151】 在某些實施方式中，該一個或多個抗原結合片段可以不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和/或該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物；

【0152】在某些實施方式中，該一個或多個抗原結合片段可以不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和/或該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的半胱胺酸或者前述半胱胺酸與其他藥物偶聯物形成的綴合物。

【0153】在某些具體實施方式中，本申請還提供了一種具有如圖 42 (B) 所示結構的抗原結合蛋白，其具有如下結構特徵：

【0154】具有如圖 42 (A) 所示結構的抗原結合蛋白的結構特徵；

【0155】在具有如圖 42 (A) 所示結構的抗原結合蛋白的基礎上進一步包含了第三抗原結合片段和第四抗原結合片段；

【0156】該第三抗原結合片段的 C 端可以與該第一抗原結合片段的 N 端直接或者間接相連，且該第一抗原結合片段的 C 端可以與該第一連接肽的 N 端連接；

【0157】該第四抗原結合片段的 C 端可以與該第二抗原結合片段的 N 端直接或者間接相連，且該第二抗原結合片段的 C 端可以與該第二連接肽的 N 端連接；

【0158】該第一抗原結合片段，該第二抗原結合片段，該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段可以部分或完全相同或都不同；例如，第一、二抗原結合片段相同，第三、四結合片段相同，第一、三抗原結合片段不同，第二、四抗原結合片段不同；

【0159】該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段可以包含任何可以與抗原特異結合的蛋白功能區域，既可以是“Fab”，也可以是“VH”，也可以是單鏈抗體 scFv；還可以是其他抗原結合形式(例如受體蛋白可溶性胞外區、配體

蛋白、脂質運載蛋白(lipocalins)、神經細胞黏附分子(NCAM)、纖維結合蛋白(fibronectin)、錨蛋白重複片段蛋白(DARPins)等衍生蛋白結構；

【0160】該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段中同樣不包含能夠影響藥物偶聯物與連接肽在 Cys1 處進行偶聯的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物；例如不包含能夠與該第一連接肽和該第二連接肽中 Cys1 的側鏈巰基形成二硫鍵的官能團；

【0161】該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和/或該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物；

【0162】該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和/或該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的半胱胺酸或者前述半胱胺酸與其他藥物偶聯物形成的綴合物。

【0163】本申請的抗原結合蛋白可以靶向特定抗原。

【0164】該抗原結合蛋白可包含一個或多個抗原結合片段，可以結合靶細胞上的特定抗原。例如，該靶細胞上的特定抗原可以為腫瘤抗原。又例如，該腫瘤抗原可以是 CD19、BCMA、TSHR、CD171、CS-1、CLL-1、GD3、Tn Ag、FLT3、CD38、CD123、CD44v6、B7H3、B7H4、KIT、IL-13Ra2、IL-11Ra、PSCA、PSMA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR-beta、SSEA-4、MUC1、EGFR、NCAM、CAIX、LMP2、EphA2、岩藻糖基 GM1(fucosyl GM1)、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、GD2、FOLR1、FOLR2、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、多聚唾液酸(polysialic acid)、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、

GPR20、LY6K、OR51E2、TAARP、WT1、ETV6-AML、SPA17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、FOSL1、hTERT、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS 融合基因)、NA17、PAX3、AR(雄激素受體)、細胞週期蛋白 B1(Cyclin B1)、MYCN、RhoC、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、CD20、CD30、HER2、ROR1、FLT3、TAAG72、CD22、CD33、GD2、gp100Tn、FAP、酪胺酸酶(tyrosinase)、EPCAM、CEA、IGF-1R、EphB2、間皮素(mesothelin)、鈣黏蛋白 17(Cadherin17)、CD32b、EGFRvIII、GPNMB、GPR64、HER3、LRP6、LYPD8、NKG2D、SLC34A2、SLC39A6、SLITRK6、GUCY2C、5T4 和/或 TACSTD2 等。

【0165】例如，該腫瘤抗原可以是 MSLN；例如，該腫瘤抗原可以是 BCMA；例如，該腫瘤抗原可以是 5T4；例如，該腫瘤抗原可以是 ROR1。

【0166】在某些實施方式中，該分離的抗原結合蛋白可以包括抗體或其抗原結合片段。例如，該抗原結合片段可以包括抗體重鏈可變區 VH，又例如，該抗原結合片段可以包括單鏈抗體可變區 scFv，又例如，該抗原結合片段可以包括受體蛋白可溶性胞外區融合蛋白。

【0167】例如，該抗原結合蛋白可以包含靶向 CTLA4 的抗體或其抗原結合片段、靶向 MSLN 的抗體或其抗原結合片段、靶向 BCMA 的抗體或其抗原結合片段、靶向 5T4 的抗體或其抗原結合片段、靶向 ROR1 的抗體或其抗原結合片段和/或靶向 CD47 的 SIRP α 胞外區衍生的可溶性融合蛋白。

【0168】在本申請中，該 CTLA4 抗原結合片段可包含重鏈可變區；其重鏈可變區 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，分別為 SEQ ID NO: 7、22 和 38

所示的胺基酸序列。所列 CDR 的胺基酸序列按照 Chothia 定義規則所示。例如，其重鏈可變區 VH 可包括如 SEQ ID NO: 55 所示的胺基酸序列。又例如，該 CTLA4 抗原結合蛋白可包含一個多肽鏈，如 SEQ ID NO: 64 所示的胺基酸序列。

【0169】 在本申請中，該 CTLA4 抗原結合片段可包含重鏈可變區；其重鏈可變區 VH 可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，分別為 SEQ ID NO: 8、23 和 39 所示的胺基酸序列。 所列 CDR 的胺基酸序列按照 Chothia 定義規則所示。例如，其重鏈可變區 VH 可包括如 SEQ ID NO: 56 所示的胺基酸序列。又例如，該 CTLA4 抗原結合蛋白可包含一個多肽鏈，如 SEQ ID NO: 65 所示的胺基酸序列。

【0170】 在本申請中，該 MSLN 抗原結合片段可包含重鏈可變區；其重鏈可變區 VH 可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，分別為 SEQ ID NO: 10、25 和 41 所示的胺基酸序列。所列 CDR 的胺基酸序列按照 Chothia 定義規則所示。例如，其重鏈可變區 VH 可包括如 SEQ ID NO: 58 所示的胺基酸序列。又例如，該 MSLN 抗原結合蛋白可包含一個多肽鏈，如 SEQ ID NO: 67 所示的胺基酸序列。

【0171】 在本申請中，該 5T4 抗原結合片段可包含重鏈可變區；其重鏈可變區 VH 可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，分別為 SEQ ID NO: 13、28 和 44 所示的胺基酸序列。所列 CDR 的胺基酸序列按照 Chothia 定義規則所示。例如，其重鏈可變區 VH 可包括如 SEQ ID NO: 61 所示的胺基酸序列。又例如，該 5T4 抗原結合蛋白可包含一個多肽鏈，如 SEQ ID NO: 69 所示的胺基酸序列。

【0172】 在本申請中，該 BCMA 抗原結合片段可包含重鏈可變區；其重鏈可變區 VH 可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，分別為 SEQ ID NO: 9、24 和 40 所示的胺基酸序列。所列 CDR 的胺基酸序列按照 Chothia 定義規則所示。例如，

其重鏈可變區 VH 可包括如 SEQ ID NO: 57 所示的胺基酸序列。又例如，該 BCMA 抗原結合蛋白可包含一個多肽鏈，如 SEQ ID NO: 66 所示的胺基酸序列。

【0173】 在本申請中，該 BCMA 抗原結合片段可包含重鏈可變區；其重鏈可變區 VH 可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，分別為 SEQ ID NO: 11、26 和 42 所示的胺基酸序列。 所列 CDR 的胺基酸序列按照 Chothia 定義規則所示。例如，其重鏈可變區 VH 可包括如 SEQ ID NO: 59 所示的胺基酸序列。又例如，該 BCMA 抗原結合蛋白可包含一個多肽鏈，如 SEQ ID NO: 68 所示的胺基酸序列。

【0174】 在本申請中，該 BCMA 抗原結合片段可包含重鏈可變區；其重鏈可變區 VH 可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，分別為 SEQ ID NO: 14、29 和 42 所示的胺基酸序列。 所列 CDR 的胺基酸序列按照 Chothia 定義規則所示。例如，其重鏈可變區 VH 可包括如 SEQ ID NO: 62 所示的胺基酸序列。又例如，該 BCMA 抗原結合蛋白可包含一個多肽鏈，如 SEQ ID NO: 70 所示的胺基酸序列。又例如，該 BCMA 抗原結合蛋白可包含一個多肽鏈，如 SEQ ID NOs: 106-129、148 中任一項所示的胺基酸序列。

【0175】 在本申請中，該 ROR1 抗原結合片段可包含輕鏈可變區和重鏈可變區；其輕鏈可變區 VL 可包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，分別為 SEQ ID NO: 49、51 和 53 所示的胺基酸序列；其重鏈可變區 VH 可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，分別為 SEQ ID NO: 12、27 和 43 所示的胺基酸序列。所列 CDR 的胺基酸序列按照 Chothia 定義規則所示。例如，其輕鏈可變區 VL 可包括如 SEQ ID NO: 63 所示的胺基酸序列，其重鏈可變區 VH 可包括如 SEQ ID NO: 60 所示的胺基酸序列。又例如，該 ROR1 抗原結合蛋白可包含一個多肽鏈，如 SEQ ID NO: 71 所示的胺基酸序列。

【0176】在本申請中，該 CD47 抗原結合蛋白可包含一個多肽鏈，如 SEQ ID NO: 149 所示的胺基酸序列。

【0177】在本申請中，該抗原結合蛋白還可以包括重鏈恆定區 CH2 和 CH3 以及鉸鏈區，該重鏈恆定區(含鉸鏈區)的序列包括如 SEQ ID NO: 72 所示的胺基酸序列，該鉸鏈區序列較佳人 IgG1 抗體重鏈鉸鏈區序列(SEQ ID NO: 73)。

【0178】在本申請中，該抗原結合蛋白還可以是具有如圖 59 所示的對稱的、含有四個抗原結合片段的且含有四條多肽鏈的結構；該抗原結合蛋白包括抗原結合片段 A 和抗原結合片段 B；該抗原結合片段 A 和該抗原結合片段 B 靶向不同的抗原或抗原表位；該抗原結合片段 A 為 Fab 結構，該抗原結合片段 B 為 VH 結構；在該抗原結合蛋白中，該抗原結合片段 A 的數量為二個，該抗原結合片段 B 的數量為二個；該抗原結合蛋白從 N 端至 C 端依次為抗原結合片段 A、抗原結合片段 B 和 Fc，其中該抗原結合片段 A 與該抗原結合片段 B 之間直接相連，該抗原結合片段 B 與該 Fc 經由連接肽(或鉸鏈區)連接。該抗原結合蛋白具有四條多肽鏈，該四條多肽鏈包含第一多肽鏈、第二多肽鏈、第三多肽鏈和第四多肽鏈；該第一多肽鏈和該第二多肽鏈具有相同的胺基酸序列，稱為“長鏈”；該第三多肽鏈和該第四多肽鏈具有相同的胺基酸序列，稱為“短鏈”；該短鏈從 N 端至 C 端依次包括 VH_A-CH1，該長鏈從 N 端至 C 端依次包括 VL_A-CL-VH_B-L-CH2-CH3；其中，VH_A 和 VL_A 分別為該抗原結合片段 A 的重鏈可變區和輕鏈可變區，VH_B 為該抗原結合片段 B 的重鏈可變區，該 L 為連接肽。在某些實施方式中，該連接肽具有如 SEQ ID NO: 73 所示的胺基酸序列。在某些實施方式中，該抗原結合片段 A 包含輕鏈可變區和重鏈可變區，其輕鏈可變區 VL 包括如 SEQ ID NO: 131 所示的胺基酸序列，其重鏈可變區 VH 包括如 SEQ ID NO:

130 所示的胺基酸序列；該抗原結合片段 B 包含重鏈可變區，其重鏈可變區 VH 包括如 SEQ ID NO: 62 所示的胺基酸序列。在某些實施方式中，該抗原結合蛋白包含兩條相同的“短鏈”和兩條相同的“長鏈”(圖 59)，該“短鏈”包括如 SEQ ID NO: 134 所示的胺基酸序列，該“長鏈”包括如 SEQ ID NO: 135 所示的胺基酸序列。

【0179】 本申請中，該 CDR 均可包含在所限序列的基礎上進行突變的情形。該突變為在該 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3 的胺基酸序列的基礎上分別具有 3、2 或 1 個胺基酸的插入、缺失或替換。本申請中，在類似“具有 3、2 或 1 個胺基酸的插入、缺失或替換”中“胺基酸突變”是指相較於原胺基酸序列而言，變體的序列存在胺基酸的突變，包括在原胺基酸序列的基礎上發生胺基酸的插入、缺失或替換。示例性的解釋是對 CDR 的突變可以包含 3 個、2 個或 1 個胺基酸的突變，這些 CDR 之間可以視需要地選擇相同或不同數目的胺基酸殘基進行突變，例如可以是對 CDR1 進行 1 個胺基酸的突變，對 CDR2 和 CDR3 不進行胺基酸突變。

【0180】 本申請中，該 VH、VL、或該多肽鏈均可包含在所限定的序列的基礎上進行突變的情形。該突變為所限定的胺基酸序列上發生了一個或多個胺基酸殘基的缺失、取代或添加，且該突變的胺基酸序列與所限定的胺基酸序列具有至少 85%序列同源性，並保持或改善了該抗體或其抗原結合片段、結合蛋白的結合活性；該至少 85%序列同源性較佳為至少 90%序列同源性；更佳為至少 95%序列同源性；最佳為至少 99%序列同源性。

【0181】 在本申請中，該同源性通常是指兩個或多個序列之間的相似性、類似或關聯。可以經由以下方式計算“序列同源性百分比”：將兩條待比對的序列在比較窗中進行比較，確定兩條序列中存在相同核酸鹼基(例如，A、T、C、G)

或相同胺基酸殘基(例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met)的位置的數目以得到匹配位置的數目，將匹配位置的數目除以比較窗中的總位置數(即，窗大小)，並且將結果乘以 100，以產生序列同源性百分比。為了確定序列同源性百分數而進行的比對，可以按本領域已知的多種方式實現，例如，使用可公開獲得的電腦軟體如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign(DNASTAR)軟體。本領域技術人員可以確定用於比對序列的適宜參數，包括為實現正在比較的全長序列範圍內或目標序列區域內最大比對所需要的任何演算法。該同源性也可以經由以下的方法測定：FASTA 和 BLAST。對 FASTA 演算法的描述可以參見 W．R．Pearson 和 D．J．Lipman 的“用於生物學序列比較的改進的工具”，美國國家科學院院刊(Proc．Natl．Acad．Sci．)，85：2444-2448，1988；和 D．J．Lipman 和 W．R．Pearson 的“快速靈敏的蛋白質相似性搜索”，Science，227：1435-1441，1989。對 BLAST 演算法的描述可參見 S．Altschul、W．Gish、W．Miller、E．W．Myers 和 D．Lipman 的“一種基本的局部對比(alignment)搜索工具”，分子生物學雜誌，215：403-410，1990。

【0182】 **藥物偶聯物**

本申請該蛋白-藥物偶聯物可以包含至少一個藥物偶聯物；該藥物偶聯物可以以共價結合形式聯結在該蛋白-藥物偶聯物中的蛋白部分上。

【0183】 該藥物偶聯物可以包含至少一個載荷藥物。該載荷藥物可以包含藥物活性物成分和/或標記分子。

【0184】 在本申請中，載荷藥物是一類具有藥學活性的小分子化合物或者毒素或其他藥物分子形式，可以是但不局限於小分子化合物、毒素分子、抗生素、

寡核苷酸、蛋白降解靶向嵌合體(PROTAC)、親和配體、螢光基團、核素基團、多肽、免疫調節分子(例如，Toll 樣受體激動劑分子，STING 激動劑分子)等。本領域已知多種載荷藥物。例如，小分子化合物通常是指具有較強細胞毒性的一類物質。示例性的小分子化合物可經由包括但不限於微管蛋白結合、DNA 結合、抑制 RNA 聚合酶、蛋白質合成或抑制拓撲異構酶等機制來發揮此類細胞毒性和細胞抑制性效應。例如，小分子化合物可以是微管蛋白抑制劑；例如，該微管蛋白抑制劑可以是美登素(例如，DM1 或 DM4)和奧瑞司他汀(例如，MMAE 或 MMAF)等等。例如，該小分子化合物可以是 DNA 損傷劑；例如，該 DNA 損傷劑可以是卡奇黴素(Calicheamicins)、吡咯並苯并二氮雜卓(PBD，pyrrolobenzodiazepines)等等。例如，蛋白降解靶向嵌合體(PROTAC)是一類能夠經由誘導靶蛋白的多聚泛素化而導致靶蛋白降解的化合物；例如，該 PROTAC 可以是 BET 蛋白降解劑。

【0185】 在本申請中，該藥物偶聯物還可以包含至少一個連接子。例如，該連接子可包含可斷裂連接子或非可斷裂連接子。該連接子用於將一個或多個載荷藥物連接到抗原結合蛋白。在本申請中，可斷鏈的連接子可以是便於釋放藥物的“可切割”連接子。例如，可切割連接子可以包括但不局限於酸敏感連接子，蛋白酶敏感連接子，光敏感連接子，或含二硫化物連接子。

【0186】 在本申請中，該連接子可具有能夠與抗原結合蛋白上存在的游離半胱胺酸反應以形成共價鍵的官能團。例如，此類反應性官能團可以包括但不局限於馬來醯亞胺，鹵代乙醯胺，α-鹵代乙醯基，活化的酯諸如琥珀醯亞胺酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯、酸酐、醯氯、磺醯氯、異氰酸酯、和異硫氰酸酯。例如，該連接子可具有能夠與抗原結合蛋白上存在的親電子基團反

應的官能團。例如，此類反應性官能團可以包括但不局限於醯肼(hydrazide)，肟(oxime)，胺基(amino)，肼(hydrazine)，硫代半卡巴腙(thiosemicarbazone)，肼羧酸酯(hydrazine carboxylate)，和芳醯肼(arylhydrazide)。

【0187】 在本申請中，連接子可包含一種或多種連接子構件，本領域已知多種連接子構件，例如，馬來醯亞胺基己醯基("MC"，maleimidocaproyl)，馬來醯亞胺基丙醯基("MP")，纈胺酸-瓜胺酸("val-cit"或"vc"，valine-citrulline)，對胺基苄氧羰基("PAB"，p-aminobenzyloxycarbonyl)。

【0188】 在本申請中，該藥物偶聯物是 mc-vc-PAB-MMAE(也稱為 VcMMAE，結構如圖 6 所示，CAS No.: 646502-53-6)，其包含連接子 mc-vc-PAB 和載荷藥物 MMAE。

【0189】 在本申請中，該藥物偶聯物還可以是 BRD4 蛋白降解劑(結構如圖 64 所示)，其包含靶向 BET 的 PROTAC GNE-987 和含二硫化物的連接子。

【0190】 蛋白-藥物偶聯物

另一方面，本申請提供了一種蛋白-藥物偶聯物。

【0191】 在本申請中，該蛋白-藥物偶聯物包含至少一個抗原結合蛋白部分和至少一個藥物偶聯物部分。

【0192】 在本申請中，該抗原結合蛋白部分是前面"抗原結合蛋白"描述的靶向特定抗原的、包含一個或多個抗原結合片段的和至少兩個連接肽的抗原結合蛋白。

【0193】 在本申請中，該藥物偶聯物包含至少一個載荷藥物。該載荷藥物可以包含但不局限於小分子化合物、毒素分子、抗生素、寡核苷酸、蛋白降解靶

向嵌合體(PROTAC)、親和配體、螢光標記基團、核素標記基團、多肽、免疫調節分子(例如，Toll 樣受體激動劑)等。

【0194】 在本申請中，該藥物偶聯物還可以包含至少一個連接子。

【0195】 在本申請中，該載荷藥物可以經由該連接子以共價鍵結合方式偶聯到該抗原結合蛋白；在本申請中，該載荷藥物可以經由該連接子以共價鍵結合方式偶聯到該抗原結合蛋白中的該連接肽上。

【0196】 在本申請中，該藥物偶聯物可以經由該第一連接肽的該 Cys1 和/或該第二連接肽的該 Cys1 與該抗原結合蛋白聯結，進而產生該蛋白-藥物偶聯物。

【0197】 在本申請中，經由斷裂抗原結合蛋白第一連接肽和第二連接肽的 Cys1 間的二硫鍵形成反應性巰基官能團實現與藥物偶聯物在 Cys1 處的共價結合。

【0198】 在本申請中，該一個或多個抗原結合片段不包含能夠影響藥物偶聯物與連接肽在 Cys1 處進行偶聯的官能團；例如，不包含能夠與該連接肽中 Cys1 的側鏈巰基形成共價鍵官能團；例如，不包含能夠與該連接肽中 Cys1 的側鏈巰基形成二硫鍵的官能團。

【0199】 在本申請中，該藥物偶聯物與該抗原結合蛋白的聯結主要發生在該第一連接肽和/或該第二連接肽的 Cys1 位點，幾乎不發生在其他半胱胺酸位點(例如，Cys2 位點)。例如，該連接肽的 Cys1 被該藥物偶聯物所結合的機率至少為 50%，也可以至少為 55%，也可以至少為 60%，也可以至少為 65%，也可以至少為 70%，也可以至少為 75%，也可以至少為 80%，也可以至少為 85%，也可以至少為 90%，也可以至少為 95%，也可以至少為 99%。例如，該連接肽的

Cys2 被該藥物偶聯物所結合的機率至多為 50%，也可以至多為 45%，也可以至多為 40%，也可以至多為 35%，也可以至多為 30%，也可以至多為 25%，也可以至多為 20%，也可以至多為 15%，也可以至多為 10%，也可以至多為 5%。

【0200】 在本申請中，以該第一連接肽和/或第二連接肽中的 Cys1 作為偶聯位點，聯結本申請該藥物偶聯物，可以產生均一 DAR 值的蛋白-藥物偶聯物。在一些具體的實施例中，產生含有兩個藥物偶聯物(即 CAR=2；當該藥物偶聯物的一個單元僅含有一個載荷藥物時，也是 DAR=2，也作 D2)的均一偶聯產物。在一些具體的實施例中，偶聯產物中的具有 CAR=2(或 DAR=2，也作 D2)的蛋白-藥物偶聯物分子為主要組分，該 CAR=2(或 DAR=2，也作 D2)的組分的含量至少為 50%，也可以至少為 55%，也可以至少為 60%，也可以至少為 65%，也可以至少為 70%，也可以至少為 75%，也可以至少為 80%，也可以至少為 85%，也可以至少為 90%，也可以至少為 95%。在一些具體的實施例中，偶聯產物中含有超過 80%的 CAR=2(或 DAR=2，也作 D2)的組分，且偶聯主要發生於第一連接肽和第二連接肽中的該 Cys1；無需經過進一步純化步驟，即可得到均一 DAR 值的蛋白-藥物偶聯物。

【0201】 在本申請中，利用人 IgG1 抗體重鏈鉸鏈區的天然序列(SEQ ID NO: 73)中的半胱胺酸 Cys-220(Eu 編號)作為偶聯位點，聯結本申請該藥物偶聯物，可以產生均一 DAR 值的蛋白-藥物偶聯物。在一些具體的實施例中，產生含有兩個藥物偶聯物(即 CAR=2；當該藥物偶聯物的一個單元僅含有一個載荷藥物時，也是 DAR=2，也作 D2)的均一偶聯產物。在一些具體的實施例中，偶聯產物中的具有 CAR=2(或 DAR=2，也作 D2)的蛋白-藥物偶聯物分子為主要組分，該 CAR=2(或 DAR=2，也作 D2)的組分的含量至少為 50%，也可以至少為 55%，

也可以至少為 60%，也可以至少為 65%，也可以至少為 70%，也可以至少為 75%，也可以至少為 80%，也可以至少為 85%，也可以至少為 90%，也可以至少為 95%。在一些具體的實施例中，偶聯產物中含有超過 80%的 CAR=2(或 DAR=2，也作 D2)的組分，且偶聯主要發生於人 IgG1 鉸鏈區中的 Cys-220(Eu 編號)；無需經過進一步純化步驟，即可得到均一 DAR 值的蛋白-藥物偶聯物。

【0202】 在本申請中，該蛋白-藥物偶聯物可以具有如圖 41 或圖 43 所示結構。

【0203】 在本申請中，該蛋白-藥物偶聯物可以是抗體偶聯藥物(ADC)。

【0204】 本申請還提供了一種利用具有如圖 42 (A) 所示結構的抗原結合蛋白進行藥物偶聯，得到的具有如圖 43 (A) 所示結構的蛋白-藥物偶聯物，其具有如下結構特徵：

具有如圖 42 (A) 所示結構的抗原結合蛋白的結構特徵；

該蛋白-藥物偶聯物包含第一連接肽和該第二連接肽，第一抗原結合片段和二抗原結合片段；

【0205】 該第一連接肽和該第二連接肽的胺基酸序列可以相同或不同；

【0206】 該第一抗原結合片段與該第二抗原結合片段的靶點可以相同或不同；該第一抗原結合片段和該第二抗原結合片段的胺基酸序列可以相同或不同；

【0207】 該蛋白-藥物偶聯物還包含配對單元，例如 Fc 片段；

【0208】 該第一連接肽和該第二連接肽包含至少兩個半胱胺酸，從 N 端到 C 端分別命名為 Cys1 和 Cys2；

【0209】該第一連接肽和/或第二連接肽的序列可以是人 IgG1 鉸鏈區序列(SEQ ID NO: 73)或其衍生序列(SEQ ID NOs: 74-105、145-146)，該第一連接肽和/或第二連接肽的該 Cys1 可以是人 IgG1 鉸鏈區序列的 Cys-220(Eu 編號)或衍生序列中對應於人 IgG1 鉸鏈區序列的 Cys-220(Eu 編號)的 Cys；且該 Cys2 可以是人 IgG1 鉸鏈區序列的 Cys-226(Eu 編號)或衍生序列中對應於人 IgG1 鉸鏈區序列的 Cys-226(Eu 編號)的 Cys；

【0210】該第一連接肽和/或第二連接肽的序列還可以是小鼠 IgG2c 的鉸鏈區序列(SEQ ID NO: 147)或其衍生序列，該第一連接肽和/或第二連接肽的該 Cys1 可以是小鼠 IgG2c 的鉸鏈區序列或其衍生序列的第一個半胱胺酸，且該 Cys2 可以是小鼠 IgG2c 的鉸鏈區序列或其衍生序列的第二個半胱胺酸；

【0211】該蛋白-藥物偶聯物在製備過程中，該第一連接肽和該第二連接肽的 Cys2 間的二硫鍵(即圖 42 (A) 所示結構的抗原結合蛋白的“二硫鍵 Cys2-Cys2”)被保留；

【0212】該蛋白-藥物偶聯物在製備過程中，該第一連接肽和該第二連接肽的 Cys1 間的二硫鍵(即圖 42 (A) 所示結構的抗原結合蛋白的“二硫鍵 Cys1-Cys1”)被斷裂用於藥物偶聯物的偶聯；

【0213】該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段不影響該藥物偶聯物在該第一連接肽和/或第二連接肽的該 Cys1 位點的偶聯；

【0214】該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段中不包含能夠影響該藥物偶聯物在該第一連接肽和/或該第二連接肽的 Cys1 上發生偶聯的官能團；

【0215】該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段中不包含能夠與Cys1的側鏈巰基形成共價鍵的官能團；

【0216】該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段中不包含能夠與Cys1形成二硫鍵的官能團。

【0217】本申請還提供了一種利用具有如圖42 (B)所示結構的抗原結合蛋白進行藥物偶聯，得到的具有如圖43 (B)所示結構的蛋白-藥物偶聯物，其具有如下結構特徵：

【0218】具有如圖42 (B)所示結構的抗原結合蛋白的結構特徵；

【0219】該蛋白-藥物偶聯物包含第一連接肽和該第二連接肽，包含第一抗原結合片段，該第二抗原結合片段，該第三抗原結合片段和該第四抗原結合片段；

【0220】該第一連接肽和該第二連接肽的胺基酸序列可以相同或不同；

【0221】該第一抗原結合片段，該第二抗原結合片段，該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段可以部分或完全相同或都不同；例如，第一、二抗原結合片段相同，第三、四結合片段相同，第一、三抗原結合片段不同，第二、四抗原結合片段不同；該相同或不同的部分可以是該抗原結合片段結合的靶點和/或胺基酸序列。

【0222】該蛋白-藥物偶聯物還包含配對單元，例如Fc片段；

【0223】該第一連接肽和該第二連接肽包含至少兩個半胱胺酸，從N端到C端分別命名為Cys1和Cys2；

【0224】該第一連接肽和/或第二連接肽的序列可以是人IgG1鉸鏈區序列(SEQ ID NO: 73)或其衍生序列(SEQ ID NOs: 74-105、145-146)，該第一連接肽和

/或第二連接肽的該 Cys1 可以是人 IgG1 鉸鏈區序列的 Cys-220(Eu 編號)或衍生序列中對應於人 IgG1 鉸鏈區序列的 Cys-220(Eu 編號)的 Cys；且該 Cys2 可以是人 IgG1 鉸鏈區序列的 Cys-226(Eu 編號)或衍生序列中對應於人 IgG1 鉸鏈區序列的 Cys-226(Eu 編號)的 Cys；

【0225】該第一連接肽和/或第二連接肽的序列還可以是小鼠 IgG2c 的鉸鏈區序列(SEQ ID NO: 147)或其衍生序列，該第一連接肽和/或第二連接肽的該 Cys1 可以是小鼠 IgG2c 的鉸鏈區序列或其衍生序列的第一個半胱胺酸，且該 Cys2 可以是小鼠 IgG2c 的鉸鏈區序列或其衍生序列的第二個半胱胺酸；

【0226】該蛋白-藥物偶聯物在製備過程中，該第一連接肽和該第二連接肽的 Cys2 間的二硫鍵(即圖 42 (B) 所示結構的抗原結合蛋白的“二硫鍵 Cys2-Cys2”)被保留；

【0227】該蛋白-藥物偶聯物在製備過程中，該第一連接肽和該第二連接肽的 Cys1 間的二硫鍵(即圖 42 (B) 所示結構的抗原結合蛋白的“二硫鍵 Cys1-Cys1”)被斷裂用於藥物偶聯物的偶聯；

【0228】該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段和/或該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段不包含能夠影響藥物偶聯物與連接肽在 Cys1 處進行定點偶聯的官能團；

【0229】該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段和/或該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段中不包含能夠與 Cys1 的側鏈巰基形成共價鍵的官能團；

【0230】該第一抗原結合片段和/或該第二抗原結合片段和/或該第三抗原結合片段和/或該第四抗原結合片段中不包含能夠與 Cys1 的側鏈巰基形成二硫鍵的官能團。

【0231】本申請還提供了一種蛋白-藥物偶聯物。

【0232】在某些情形中，該藥物偶聯物可以包括第一多肽鏈和第二多肽鏈。該第一多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第一抗原結合片段、第一連接肽和第一配對亞單元。該第二多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第二抗原結合片段、第二連接肽和第二配對亞單元。其中，該第一配對亞單元和該第二配對亞單元可以相互作用以形成二聚體。

【0233】例如，該第一多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第一抗原結合片段的 VH、第一抗原結合片段的 VL、第一連接肽(例如，人 IgG1 鉸鏈區或小鼠 IgG2c 鉸鏈區或衍生序列)、CH_2 和 CH_3，且藥物偶聯物經由該第一連接肽的 Cys1(例如，IgG 鉸鏈區的 Cys220(EU 編碼))與該第一多肽鏈連接。例如，該第二多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第二抗原結合片段的 VH、第二抗原結合片段的 VL、第二連接肽(例如，人 IgG1 鉸鏈區或小鼠 IgG2c 鉸鏈區或衍生序列)、CH_2 和 CH_3，且藥物偶聯物經由該第二連接肽的 Cys1(例如，IgG 鉸鏈區的 Cys220(EU 編碼))與該第二多肽鏈連接。

【0234】例如，該第一多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第一抗原結合片段的 VH、第一連接肽(例如，人 IgG1 鉸鏈區或小鼠 IgG2c 鉸鏈區或衍生序列)、CH_2 和 CH_3，且藥物偶聯物經由該第一連接肽的 Cys1(例如，IgG 鉸鏈區的 Cys220(EU 編碼))與該第一多肽鏈連接。例如，該第二多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第二抗原結合片段的 VH、第二連接肽(例如，人 IgG1 鉸鏈區或小鼠

IgG2c 鉸鏈區或衍生序列)、CH_2 和 CH_3，且藥物偶聯物經由該第二連接肽的 Cys1(例如，IgG 鉸鏈區的 Cys220(EU 編碼))與該第二多肽鏈連接。

【0235】 例如，該第一多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第一抗原結合片段的受體蛋白可溶性胞外區、第一連接肽(例如，人 IgG1 鉸鏈區或小鼠 IgG2c 鉸鏈區或衍生序列)、CH_2 和 CH_3，且藥物偶聯物經由該第一連接肽的 Cys1(例如，IgG 鉸鏈區的 Cys220(EU 編碼))與該第一多肽鏈連接。例如，該第二多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第二抗原結合片段的受體蛋白可溶性胞外區、第二連接肽(例如，人 IgG1 鉸鏈區或小鼠 IgG2c 鉸鏈區或衍生序列)、CH_2 和 CH_3，且藥物偶聯物經由該第二連接肽的 Cys1(例如，IgG 鉸鏈區的 Cys220(EU 編碼))與該第二多肽鏈連接。

【0236】 在某些情形中，該蛋白-藥物偶聯物可包含第一多肽鏈、第二多肽鏈、第三多肽鏈和第四多肽鏈。該第一多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第三抗原結合片段、第一抗原結合片段、第一連接肽和第一配對亞單元。該第二多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第四抗原結合片段、第二抗原結合片段、第二連接肽和第二配對亞單元。其中，該第一配對亞單元和該第二配對亞單元可以相互作用以形成二聚體。該第三多肽鏈可包含第三抗原結合片段。該第四多肽鏈可包含第四抗原結合片段。

【0237】 例如，該第一多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第三抗原結合片段的 VL、第三抗原結合片段的 CL、第一抗原結合片段的 VH、第一連接肽(例如，人 IgG1 鉸鏈區或小鼠 IgG2c 鉸鏈區或衍生序列)、CH_2 和 CH_3，且藥物偶聯物經由該第一連接肽的 Cys1(例如，IgG 鉸鏈區的 Cys220(EU 編碼))與該第一多肽鏈連接。例如，該第二多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第四抗原結合片段

的 VL、第四抗原結合片段的 CL、第二抗原結合片段的 VH、第二連接肽(例如，人 IgG1 鉸鏈區或小鼠 IgG2c 鉸鏈區或衍生序列)、CH_2 和 CH_3，且藥物偶聯物經由該第二連接肽的 Cys1(例如，IgG 鉸鏈區的 Cys220(EU 編碼))與該第二多肽鏈連接。例如，該第三多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第三抗原結合片段的 VH 和第三抗原結合片段的 CH_1。例如，該第四多肽鏈自 N 端至 C 端，可依次包含第四抗原結合片段的 VH 和第四抗原結合片段的 CH_1。例如，該第三抗原結合片段和/或第四抗原結合片段可以為 Fab。

【0238】 核酸、載體、宿主細胞

另一方面，本申請提供了一種或多種核酸分子，其可以編碼如本申請所述的蛋白-藥物偶聯物。例如，該一種或多種核酸分子中的每一個核酸分子可以編碼完整的該蛋白-藥物偶聯物，也可以編碼其中的一部分(例如，HCDR1-3、LCDR1-3、VL、VH、多肽鏈或重鏈中的一種或多種)。

【0239】 本申請所述的核酸分子可以為分離的。例如，其可以是經由以下方法產生或合成的：(i)在體外擴增的，例如可以經由聚合酶鏈式反應(PCR)擴增產生的，(ii)可以經由選殖重組產生的，(iii)純化的，例如經由酶切和凝膠電泳分級分離，或者(iv)合成的，例如可以經由化學合成。

【0240】 例如，該分離的核酸可以是經由重組 DNA 技術製備的核酸分子。

【0241】 另一個方面，本申請提供了一種或多種載體，其包含本申請所述的一種或多種核酸分子。每種載體中可包含一種或多種該核酸分子。此外，該載體中還可包含其他基因，例如允許在適當的宿主細胞中和在適當的條件下選擇該載體的標記基因。此外，該載體還可包含允許編碼區在適當宿主中正確表達的表達控制元件。這樣的控制元件為本領域技術人員所熟知的，例如，可包括啟動

子、核糖體結合位點、增強子和調節基因轉錄或 mRNA 翻譯的其他控制元件等。例如，該表達控制序列為可調的元件。該表達控制序列的具體結構可根據物種或細胞類型的功能而變化，但通常包含分別參與轉錄和翻譯起始的 5'非轉錄序列和 5'及 3'非翻譯序列，例如 TATA 盒、加帽序列、CAAT 序列等。例如，5'非轉錄表達控制序列可包含啟動子區，啟動子區可包含用於轉錄控制功能性連接核酸的啟動子序列。該表達控制序列還可包括增強子序列或上游活化子序列。在本申請中，適當的啟動子可包括，例如用於 SP6、T3 和 T7 聚合酶的啟動子、人 U6RNA 啟動子、CMV 啟動子及其人工雜合啟動子(如 CMV)，其中啟動子的某部分可與其他細胞蛋白(如人 GAPDH，甘油醛-3-磷酸脫氫酶)基因啟動子的某部分融合，其可包含或不包含另外的內含子。本申請所述的一種或多種核酸分子可以與該表達控制元件可操作地連接。

【0242】 該載體可以包括，例如質粒、黏粒、病毒、噬菌體或者在例如遺傳工程中通常使用的其他載體。例如，該載體為表達載體。例如，該表達載體可以包含真核細胞表達載體和/或原核細胞表達載體。

【0243】 另一方面，本申請提供了宿主細胞，該宿主細胞可包含本申請所述的一種或多種核酸分子和/或本申請所述的一種或多種載體。例如，每種或每個宿主細胞可包含一個或一種本申請所述的核酸分子或載體。在某些實施方式中，每種或每個宿主細胞可包含多個(例如，2 個或以上)或多種(例如，2 種或以上)本申請所述的核酸分子或載體。例如，可將本申請所述的載體引入該宿主細胞中，例如原核細胞(例如，細菌細胞)，哺乳動物真核細胞或者其他真核細胞，如來自植物的細胞、真菌或酵母細胞等。可經由本領域已知的方法將本申請所述的載體引入該宿主細胞中，例如電穿孔、lipofectine 轉染、lipofectamin 轉染等。

例如，該宿主細胞可以為 COS、CHO、NSO、sf9、sf21、DH5a、BL21(DE3)或 TG1。例如，該原核細胞可以選擇 E. coli 細胞如 TG1、BL21。例如，該真核細胞可以選擇如 CHO 細胞、CHO-K1 細胞、CHOZN 細胞、CHO-S 細胞、ExpiCHO-S 細胞、NS/0 細胞、HEK293 細胞、HEK293-T 細胞、HEK293-F 細胞或 HEK293-6E 細胞。

【0244】 方法、醫藥組成物和用途

另一方面，本申請還提供了一種製備該蛋白-藥物偶聯物的方法，其包括使該藥物偶聯物與該連接肽的特定的半胱胺酸(例如，該第一連接肽的 Cys1 和/或該第二連接肽的 Cys1)以共價鍵方式結合，以得到本申請所述的蛋白-藥物偶聯物。例如，該製備方法可以是一種基於特定位點的游離半胱胺酸的反應性巯基官能團進行藥物偶聯的過程，該製備方法可以產生出具有偶聯位點特異性和均質性的蛋白-藥物偶聯物。又例如，在某些具體實施方式中，該製備方法可以產生出高均質性的 CAR=2(一個抗原結合蛋白攜帶兩個偶聯物)的蛋白-藥物偶聯物。

【0245】 該製備方法可以包括由“還原”、“再氧化”、“偶聯”和“純化”等多種實施步驟組成的一個或多個步驟的組合。例如，該製備方法可以包括“還原”、“偶聯”和“純化”等步驟；又例如，該製備方法可以包括“還原”和“偶聯”等步驟。該實施步驟可以包含一個或多個反應過程。在該反應過程中，反應條件例如反應溫度、反應時間、反應緩衝液類型及 pH、還原劑類型及用量、偶聯物分子類型及用量等，都可能對該製備方法的結果產生重大影響，例如對藥物偶聯的效率和終產物的品質產生重大影響。該反應過程還可以包含不同反應條件參數的組合；例如，使二硫鍵還原的反應過程可以結合不同的還原劑類型、不同的還原劑用量、

不同的還原反應溫度、不同的反應緩衝液、不同的 pH 和不同的反應時長等多個參數條件。

【0246】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“還原”步驟可以使用還原劑 DTT (dithiothreitol) 或 TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine)。

【0247】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“還原”步驟的還原劑用量為約 1～50 莫耳倍數，例如，約 1～30 莫耳倍數，約 1～20 莫耳倍數，約 1～10 莫耳倍數，約 1～7 莫耳倍數，約 1～6 莫耳倍數，約 1～5 莫耳倍數，約 1.5～6 莫耳倍數或約 1.5～5 莫耳倍數。

【0248】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“還原”步驟的反應時長為約 1～17 小時，例如，約 1～10 小時，約 1～7 小時，約 1～5 小時，約 1～4 小時，約 1～3 小時或約 1.5～2 小時。

【0249】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“還原”步驟的反應溫度為約 0～40 ℃，例如，0～37 ℃，約 0～30 ℃，約 20～37 ℃，約 20～30 ℃，或室溫(約 25-30 ℃)。例如，反應溫度為 0℃、室溫(25-30 ℃)或 37℃。

【0250】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“還原”步驟的反應緩衝液 pH 為約 4.0～9.0、約 5.0～8.0 或約 5.0～7.0。

【0251】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“還原”步驟可以使用還原劑 TCEP，還原劑用量為 1～7 莫耳倍數，反應時長為 1～3 小時，反應溫度為 23～30 ℃，反應緩衝液 pH 為 5.0～7.0。

【0252】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“還原”步驟可以使用還原劑 DTT (dithiothreitol) 或 TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine)，還原劑用量為 1~50 莫耳倍數，反應時長為 1~17 小時，反應溫度為 0~40 ℃，反應緩衝液 pH 為

5.0~8.0。較佳地，還原劑為 TCEP，TCEP 用量可以為 1~7 莫耳倍數，反應時長可以為 1~3 小時，反應緩衝液 pH 為 5.0~7.0，反應溫度為 0 ℃或室溫(25-30℃)或 37 ℃。更佳地，還原劑 TCEP 用量可以為 1.5 ~ 6 莫耳倍數，反應時長可以為 1.5~2 小時，反應緩衝液 pH 為 5.0~6.0，反應溫度為 0 ℃或室溫(25-30℃)或 37℃。

【0253】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“偶聯”步驟可以使用 mc-vc-PAB-MMAE(圖 6)作為藥物偶聯物。

【0254】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“偶聯”步驟可以使用 BRD4 蛋白降解劑(圖 64)作為藥物偶聯物。

【0255】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“偶聯”步驟的藥物偶聯物用量為約 1~50 莫耳倍數，例如，約 1 ~ 30 莫耳倍數，約 1 ~ 20 莫耳倍數，約 10~15 莫耳倍數，約 1 ~ 10 莫耳倍數，約 1 ~ 7 莫耳倍數或約 3 ~ 7 莫耳倍數。

【0256】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“偶聯”步驟的反應時長為約 0.5 ~ 10 小時，例如，約 0.5 ~ 10 小時，約 0.5 ~ 3 小時，約 0.5 ~ 2 小時，約 1 ~ 2 小時或約 0.5 ~ 1。

【0257】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“偶聯”步驟的反應溫度為約 0 ~ 40 ℃，例如，0 ~ 37 ℃，約 0 ~ 30 ℃，約 20 ~ 37 ℃，約 20 ~ 30 ℃，或室溫(約 25-30 ℃)。例如，反應溫度為室溫(25-30 ℃)。

【0258】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“偶聯”步驟的反應緩衝液 pH 為約 4.0 ~ 9.0、約 5.0 ~ 8.0 或約 5.0 ~ 7.0。

【0259】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“偶聯”步驟可以使用 mc-vc-PAB-MMAE(圖 6)作為藥物偶聯物，藥物偶聯物用量為 3 ~ 7 莫耳倍數，反應時長為 0.5 ~ 2 小時，反應溫度為 23 ~ 30 ℃，反應緩衝液 pH 為 5.0 ~ 7.0。

【0260】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“偶聯”步驟可以使用mc-vc-PAB-MMAE(圖 6)作為藥物偶聯物，藥物偶聯物用量為 1～50 莫耳倍數，反應時長為 0.5 ～10 小時，反應溫度為 0～40 ℃，反應緩衝液 pH 為 5.0～8.0。較佳地，mc-vc-PAB-MMAE 用量可以為 3～18 莫耳倍數，反應時長可以為 0.5～3 小時，反應緩衝液 pH 為 5.0 ～ 7.0，反應溫度為室溫(25-30 ℃)。更佳地，mc-vc-PAB-MMAE 用量可以為 3 ～ 7 莫耳倍數，反應時長可以為 0.5 小時，反應緩衝液 pH 為 5.0～6.0，反應溫度為室溫(25-30 ℃)。

【0261】在一些具體實施方式中，該製備方法的該“偶聯”步驟可以使用BRD4 蛋白降解劑(圖 64)作為藥物偶聯物，藥物偶聯物用量為 10～15 莫耳倍數，反應時長為 1～3 小時，反應溫度為 23～30 ℃，反應緩衝液 pH 為 7.0～9.0。

【0262】在一些具體實施方式中，該製備方法還可以提供一種包括“還原”和“偶聯”等步驟的組合和反應條件參數的組合。一種較佳的該反應條件參數的組合可以是：反應緩衝液為含 20mM His-HCl 的 pH 6.0 的緩衝液，還原劑 TCEP 用量為 1.5 ～ 6.0 莫耳倍數，還原反應時長為 1.5 ～ 2.0 小時，還原反應溫度為室溫(25-30 ℃)，偶聯物為 mc-vc-PAB-MMAE，偶聯物用量為 3.0～7.0 莫耳倍數，偶聯反應時長為 0.5 小時，偶聯反應溫度為室溫(25-30 ℃)。

【0263】在一些具體實施方式中，該製備方法還可以提供一種“純化”步驟。該“純化”步驟利用疏水相互作用色譜層析方法(HIC)將偶聯反應產物中各組分進行分離，以獲取某一特定組分，例如，利用 HIC 純化分離偶聯產物得到 CAR=2 的蛋白-藥物偶聯物。

【0264】在一些具體實施方式中，該製備方法還可以進一步提高偶聯產物中單一組分的含量，減少進一步的純化的需求；更佳地，經過偶聯步驟後無需額外純化步驟即可以得到純度大於 90 % 的 CAR=2 高均質性的偶聯產物。

【0265】在一些具體實施方式中，該製備方法還可以提供一種包括“還原”和“偶聯”等步驟的組合和反應條件參數的組合；在該反應步驟和反應條件參數的組合下，該連接肽的第一半胱胺酸(Cys1)的二硫鍵可以被有效地打開而其他二硫鍵保持完整，使得 Cys1 成為幾乎唯一的游離半胱胺酸殘基，進而作為特異性的偶聯位點。

【0266】另一方面，本申請提供了一種醫藥組成物，該醫藥組成物可以包含該蛋白-藥物偶聯物，以及藥學上可接受的載體。例如，該醫藥組成物還可以包括其他抗原結合蛋白或治療劑。

【0267】另一方面，本申請提供了一種該蛋白-藥物偶聯物和/或該醫藥組成物在製備診斷、預防和/或治療疾病的藥物中的應用。例如，該藥物可以用於治療腫瘤或其他疾病。

【0268】另一方面，本申請提供了一種該蛋白-藥物偶聯物與其他療法或藥物聯用在製備藥物中的用途，該藥物可以用於治療腫瘤或其他疾病。例如，該其他療法或藥物可以選自下組：化療、放療、miRNA 和寡核苷酸。

【0269】另一方面，本申請提供了一種體外或體內檢測特異性抗原的方法，其可以包括使用如該蛋白-藥物偶聯物和/或該醫藥組成物進行檢測。在某些適用情形中，該方法可以為非診斷目的的。

【0270】另一方面，本申請提供了用於該蛋白-藥物偶聯物或醫藥組成物施用的給藥裝置。

[實施例]

【0271】 下面經由實施例的方式進一步說明本發明，但並不因此將本發明限制在該實施例範圍之中。實施例不包括對傳統方法的詳細描述，如那些用於構建載體和質粒的方法，將編碼蛋白的基因插入到這樣的載體和質粒的方法或將質粒引入宿主細胞的方法．這樣的方法對於本領域中具有普通技術的人員是眾所周知的，並且在許多出版物中都有所描述。下列實施例中未註明具體條件的實驗方法，按照常規方法和條件，或按照商品說明書選擇。

【0272】 實施例1抗體的製備

Harbour HCAb 小鼠 (Harbour Antibodies BV，WO2010/109165A2) 是一種攜帶人免疫球蛋白免疫庫的轉基因小鼠，能夠產生僅有重鏈的抗體，該抗體的大小只有傳統 IgG 抗體的一半。該小鼠產生的抗體具有人的抗體重鏈可變結構域和小鼠恆定結構域。在獲得針對某一特定靶點的重鏈抗體的 VH 序列以後，利用常規的分子生物學手段將 VH 序列和人的 IgG 抗體重鏈 Fc 序列(較佳為含有人 IgG1 鉸鏈區和 CH2 以及 CH3 區的序列，如 SEQ ID NO: 72 所示序列)進行融合表達，得到全人源重組 HCAb 抗體分子。

Harbour H2L2 小鼠 (Harbour Antibodies BV) 是一種攜帶人免疫球蛋白免疫庫的轉基因小鼠，其產生的抗體具有完整的人的抗體可變結構域和大鼠恆定結構域。利用融合瘤技術或者單 B 細胞分選技術或者其他技術篩選出針對某一特定靶點的抗體。將抗體的 VL 和 VH 序列與相應的人的 κ 輕鏈恆定區和 IgG1 重鏈恆定區序列進行融合表達，得到重組全人源抗體分子。

【0273】 實施例1.1獲得抗CTLA4的全人源HCAb抗體

用可溶的重組人 CTLA4 蛋白 (ACRO Biosystems, #CT4-H5229) 對 Harbour HCAb 小鼠進行多輪免疫。當檢測小鼠血清中 CTLA4 特異的抗體滴度達到一定的水準後，將小鼠的脾細胞取出分離 B 細胞，用小鼠漿細胞分選試劑盒 (Miltenyi, #130-092-530) 分選 CD138 陽性的漿細胞。用常規的分子生物學手段從漿細胞中擴增人 VH 基因，並將擴增的人 VH 基因片段構建到編碼人 IgG1 抗體重鏈 Fc 區域序列的哺乳動物細胞表達質粒 pCAG 載體中。質粒轉染哺乳動物宿主細胞 (如人胚腎細胞 HEK293) 進行表達，得到全人源 HCAb 抗體上清。用 ELISA 測試 HCAb 抗體上清與重組人 CTLA4 蛋白的結合，鑑定出陽性 HCAb 抗體。對這些 HCAb 抗體進行進一步的鑑定，根據其對人 CTLA4 的結合能力、食蟹猴 CTLA4 的結合能力、抑制 CTLA4 與 B7-1 結合能力等參數，選出數個候選 HCAb 抗體分子。然後對候選 HCAb 抗體分子進行序列分析和優化，得到數個變體序列。將 HCAb 抗體的 VH 序列和人的 IgG1 重鏈鉸鏈區及 Fc 序列進行融合表達，得到全人源重組 HCAb 抗體分子。抗 CTLA4 的重組全人源 HCAb 抗體列於表 1-1。

【0274】 實施例1.2獲得抗BCMA的全人源HCAb抗體

用可溶的重組人 BCMA-ECD-Fc 融合蛋白 (ACRO Biosystems, #BC7-H82F0) 對 Harbour HCAb 小鼠進行多輪免疫。抗原蛋白與免疫佐劑混合成免疫原試劑，然後經由皮下經腹股溝注射或經由腹腔注射。在每一輪免疫中，每隻小鼠接受的總注射劑量是 100 微升。在首輪免疫中，每隻小鼠接受用 50 微克抗原蛋白與完全弗氏佐劑 (Sigma, #F5881) 以體積比 1:1 混合配製的免疫原試劑的免疫。在隨後的每輪增強免疫中，每隻小鼠接受用 25 微克抗原蛋白與 Sigma Adjuvant System 佐劑 (Sigma, #S6322) 混合配製的免疫原試劑的免疫。每輪增強免疫的間隔時間至少為兩週，通常不超過五輪增強免疫。免疫時間為第 0、14、28、42、

56、70 天；並且在第 49、77 天，檢測小鼠血清抗體滴度。在進行 Harbour HCAb 小鼠脾 B 細胞分離前 5 天，以每隻小鼠 25 微克抗原蛋白的劑量進行最後一次增強免疫。

【0275】 當檢測小鼠血清中 BCMA 特異的抗體滴度達到一定的水準後，將小鼠的脾細胞取出分離 B 細胞，用 BD FACSAria™ III 細胞分選儀分選 CD138 陽性的漿細胞和 BCMA 抗原陽性的 B 細胞群。提取 RNA，反轉錄 cDNA 後 PCR 擴增人 VH 基因。擴增的 VH 基因片段構建到編碼人 IgG1 抗體重鏈 Fc 結構域序列的哺乳動物細胞表達質粒 pCAG 載體中，質粒轉染哺乳動物宿主細胞 (如人胚腎細胞 HEK293) 進行表達，表達的 HCAb 的抗體上清與重組人 BCMA-Fc, Avitag 重組蛋白 (ACRO Biosystems, #BC7-H82F0) 進行 Mirrorball (SPT Labtech, mirrorball® fluorescence cytometer) 篩選，獲得的陽性單株抗體上清用流式細胞術 FACS 進一步的鑑定。用 FACS 測試抗體上清與高表達人 BCMA 的 HEK293T 細胞株 HEK293T/hBCMA (北京康源博創, KC-0233)、高表達食蟹猴 BCMA 的 HEK293T 細胞株 HEK293T/cynoBCMA (北京康源博創, KC-0979)和高表達人 BCMA 的細胞系 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 等細胞的結合能力。經由多輪篩選，獲得了數個陽性候選 HCAb 抗體分子。利用常規的測序手段獲得編碼抗體分子可變結構域的核苷酸序列。將 HCAb 抗體的 VH 序列和人的 IgG1 重鏈鉸鏈區及 Fc 序列進行融合表達，得到全人源重組 HCAb 抗體分子。

【0276】 針對抗 BCMA 的 HCAb 抗體 PR001046 的可變區 VH 的 CDR 區進行兩輪定點突變，以獲得結合 BCMA 的親和力提高的突變體，如 PR001046_R2_4G10(即 PR004433)。抗 BCMA 的重組全人源 HCAb 抗體列於表 1-1。

【0277】 實施例1.3獲得抗MSLN的全人源HCAb抗體

用可溶的重組人 MSLN 蛋白 (ACRO Biosystems, #MSN-H5223) 對 Harbour HCAb 小鼠進行多輪免疫。用類似實施例 1.2 該方法篩選並獲得抗 MSLN 的全人源 HCAb 抗體。抗 MSLN 的重組全人源 HCAb 抗體列於表 1-1。

【0278】 實施例1.4獲得抗5T4的全人源HCAb抗體

用可溶的重組人 5T4 蛋白 (NovoProtein, #C678) 對 Harbour HCAb 小鼠進行多輪免疫。用類似實施例 1.2 該方法篩選並獲得抗 5T4 的全人源 HCAb 抗體。抗 5T4 的重組全人源 HCAb 抗體列於表 1-1。

【0279】 實施例1.5獲得抗ROR1的抗原結合蛋白

用可溶的重組人 ROR1 蛋白 (AcroBiosystems, #RO1-H5250) 對 Harbour H2L2 小鼠進行多輪免疫。用類似實施例 1.2 該方法並結合噬菌體展示篩選獲得抗 ROR1 的抗體株 1015M2-H4。將 1015M2-H4 的 VH 和 VL 利用重疊 PCR 製備得到單鏈可變區片段 scFv；然後把 scFv 和一段含有核酸限制性內切酶 BamHI 的酶切位點的序列(對應胺基酸序列為 GGGAS)以及人的 IgG 重鏈 Fc(包含人 IgG1 鉸鏈區和 CH2 以及 CH3 區，如 SEQ ID NO: 72 所示序列)進行融合表達，得到具有 scFv-Fc 二聚體結構的抗 ROR1 的抗原結合蛋白分子 PR002129。抗 ROR1 的抗原結合蛋白列於表 1-1。

【0280】 實施例1.6抗體的表達和純化

本實施例介紹了利用哺乳動物宿主細胞(例如，人胚腎細胞 HEK293 或中國倉鼠卵巢細胞 CHO 及其衍生細胞)、暫態轉染表達和親和捕獲分離等技術來製備抗體的一般方法。本方法適用於含有 Fc 區的目標抗體；目標抗體可以由一條或多條蛋白質多肽鏈組成；可以來源於一個或多個表達質粒。

【0281】將抗體多肽鏈的胺基酸序列經由密碼子優化方法轉換成核苷酸序列；合成編碼的核苷酸序列並株到與宿主細胞相容的表達載體上。將編碼抗體多肽鏈的質粒按照特定比例同時轉染哺乳動物宿主細胞，利用常規的重組蛋白表達和純化技術，可以得到具有正確折疊和多肽鏈組裝的重組蛋白。具體地，將 FreeStyle™ 293-F 細胞 (Thermo, #R79007) 在 FreeStyle™ F17 Expression Medium 培養基 (Thermo, #A1383504) 中擴培。暫態轉染開始之前，調節細胞濃度至 6 - 8 x10^5細胞/ml，於 37℃ 8% CO_2搖床中培養 24 小時，細胞濃度在 1.2 x10^6細胞/ml。準備 30 ml 培養的細胞。將編碼抗體多肽鏈的質粒按照一定比例混合共計 30 μg 質粒(質粒與細胞的比例為 1 μg：1 ml)溶解於 1.5 ml Opti-MEM 減血清培養基 (Thermo, #31985088)，並用 0.22 μm 濾膜過濾除菌。再取 1.5 ml Opti-MEM 溶入 1 mg/ml PEI (Polysciences, #23966-2) 120 μl，靜置 5 分鐘。把 PEI 緩慢加入質粒中，室溫孵育 10 分鐘，邊搖晃培養瓶邊緩慢滴入質粒 PEI 混合溶液，於 37℃ 8% CO_2搖床中培養 5 天。5 天後觀測細胞活率。收集培養物，以 3300g 轉速離心 10 分鐘後取上清；然後將上清高速離心去除雜質。用 PBS pH7.4 緩衝液平衡含有 MabSelect™(GE Healthcare, #71-5020-91) 的重力管柱(Bio-Rad, #7311550)，2-5 倍管柱體積沖洗。將上清樣品過管柱；用 5-10 倍管柱體積的 PBS 緩衝液沖洗管柱，再用 pH3.5 的 0.1M 甘胺酸沖提目的蛋白，隨後用 pH 8.0 的 Tris-HCl 調節至中性，最後用超濾管 (Millipore, #UFC901024) 濃縮換液至 PBS 緩衝液或者含有其他成分的緩衝液，得到純化的重組蛋白溶液。最後用 NanoDrop (Thermo, NanoDrop™ One) 測定濃度，分裝、存儲備用。

【0282】本申請所使用的抗原結合蛋白總結於表 1-1，其對應的多肽鏈和 CDR 區的胺基酸序列的序列編號 SEQ ID NOs 列於表 1-2、表 1-3、表 1-4 和表 1-5。

靶點	株號	蛋白編號	序列來源
CTLA4	CL5v3	PR000184	實施例 1.1
CTLA4	CL24	PR000020	實施例 1.1
MSLN	1018P004B9	PR000759	實施例 1.3
BCMA	1005P63B7	PR001046	實施例 1.2
5T4	1041P014H2	PR004432	實施例 1.4
BCMA	PR001046_R2_4G10	PR004433	實施例 1.2
ROR1	1015M2-H4	PR002129	實施例 1.5
BCMA	269A37917	PR000453	專利 WO2017025038A1
CD47	ALX148	PR006345	專利 US10829771B2

表 1-1 本申請所使用的部分示例性的抗原結合蛋白。

蛋白編號	重鏈	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
PR000020	64	55	7	22	38
PR000184	65	56	8	23	39
PR000759	67	58	10	25	41
PR001046	68	59	11	26	42
PR004432	69	61	13	28	44
PR004433	70	62	14	29	42
PR000453	66	57	9	24	40

表 1-2 本申請中 HCAb 抗體的序列編號表。

蛋白編號	多肽鏈	VL	VH	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
PR002129	71	63	60	49	51	53	12	27	43

表 1-3 本申請中 scFv-Fc 結構的抗原結合蛋白的序列編號表。

蛋白編號	多肽鏈
PR006345	149

表 1-4 本申請中可溶性受體融合蛋白的序列編號表。

蛋白編號	多肽鏈 1	多肽鏈 2
PR005744	134	135
2129/4433	70	71

表 1-5 本申請中雙特異性抗原結合蛋白的序列編號表。

【0283】 實施例2分析方法

實施例2.1利用SEC-HPLC(分子尺寸排阻-高效液相色譜)分析蛋白純度和聚體

本實施例使用分析型分子尺寸排阻層析色譜法(SEC)來分析蛋白樣品的純度和聚體形式。將分析型色譜管柱TSKgel G3000SWxl (Tosoh Bioscience, #08541, 5 μm, 7.8mm × 30cm) 連接到高效液相色譜儀HPLC (Agilent Technologies, Agilent 1260 Infinity II)，用PBS緩衝液室溫下平衡至少1小時。適量蛋白樣品(至少10 μg)用0.22 μm濾膜過濾後注射入系統，並設定HPLC程式：用PBS緩衝液將樣品以1.0 ml/min的流速流過色譜管柱，最長時間為25分鐘，檢測波長 280 nm，室溫運行。

採集後用 ChemStation軟體對色譜圖進行積分並計算相關資料，生成分析報告，報告出樣品內不同分子尺寸組分的滯留時間。

【0284】 實施例2.2利用HIC-HPLC(疏水相互作用-高效液相色譜)分析蛋白純度、疏水性和偶聯產物組分

本實施例使用分析型疏水相互作用層析色譜法(HIC)來分析蛋白樣品的純度和疏水性。將分析型色譜管柱 TSKgel Butyl-NPR(Tosoh Bioscience, #14947, 4.6mm×3.5cm, 2.5 μm)連接到高效液相色譜儀(HPLC)(型號：Agilent Technologies, Agilent 1260 Infinity II)，用 PBS 緩衝液室溫下平衡至少 1 小時。設定方法由約 22 分鐘內從 100% 緩衝液 A (25 mM 磷酸鹽緩衝液，1.5 M 硫酸銨((NH4)2SO4)，pH 7.0~7.2)至 100% 緩衝液 B (20 mM 磷酸鹽緩衝液，20% 異丙醇(IPA)，pH 7.0~7.2)的線性梯度，流速設定為 0.7 ml/min, 蛋白樣品濃度 1 mg/ml, 進樣體積 20 μl, 檢測波長 280 nm，室溫運行。採集後用 ChemStation 軟體對色譜圖進行積分並計算相關資料，生成分析報告，報告出樣品內不同分子尺寸組分的滯留時間；可以經由不同的滯留時間來推測偶聯產物的不同組分所攜帶的偶聯分子數目。

【0285】 實施例2.3利用RP-HPLC(反相-高效液相色譜)分析蛋白純度、疏水性和偶聯產物組分

本實施例使用分析型反相高效液相色譜法(RP)來分析蛋白樣品的純度和疏水性。本領域技術人員可以使用不同型號的高效液相色譜儀和分析型色譜管柱按照技術說明書並經過實驗摸索以建立相似的分析手段，本實施例僅列舉其中代表性方法。

【0286】 在一些具體實施方式中，例如在本發明的實施例 5.2 中，將分析型色譜管柱 Zorbax RRHD 300-Diphenyl(Agilent Technologies, #858750-944, 2.1 ×

100 mm, 1.8 μm)連接到高效液相色譜儀(HPLC)(型號：Agilent Technologies, Agilent 1260 Infinity II)，按照說明書對系統進行平衡。設定方法由 60 分鐘內從 100% 緩衝液 A(1% 三氟乙酸 TFA 溶於水)至 100% 緩衝液 B(1% 三氟乙酸 TFA 溶於乙腈)的線性梯度，流速設定為 0.35 ml/min, 運行溫度為 50 ℃，檢測波長 280 nm。採集後用 ChemStation 軟體對色譜圖進行積分並計算相關資料，生成分析報告，報告出樣品內不同分子尺寸組分的滯留時間。

【0287】 在另一些具體實施方式中，例如在本發明的實施例 8.2 中，將分析型色譜管柱 PLRP-S 1000A(Agilent Technologies, #PL1912-1502, 2.1 × 50 mm, 5.0 μm)連接到高效液相色譜儀(HPLC)(型號：Agilent Technologies, Agilent 1260 Infinity II)，按照說明書對系統進行平衡。設定方法由 40 分鐘內從 100% 緩衝液 A(0.05% 三氟乙酸 TFA 溶於水)至 100% 緩衝液 B(0.05% 三氟乙酸 TFA 溶於乙腈)的線性梯度，流速設定為 0.25 ml/min, 運行溫度為 60 ℃，檢測波長 280 nm。採集後用 ChemStation 軟體對色譜圖進行積分並計算相關資料，生成分析報告，報告出樣品內不同分子尺寸組分的滯留時間。

【0288】 隨後，可以經由不同的滯留時間來推測偶聯產物的不同組分所攜帶的偶聯分子數目。

【0289】 實施例2.4利用LC-MS(液相色譜質譜聯用)測定分子量

本實施例使用液相色譜質譜聯用方法(LC-MS)來分析蛋白樣品的分子量。本領域技術人員可以使用不同型號的液相色譜儀(LC)和質譜儀(MS)按照技術說明書並經過實驗摸索以建立相似的分析手段，本實施例僅列舉其中代表性方法。

【0290】 樣本預處理

在一些具體實施方式中，測定蛋白樣品的分子量需要對樣品進行去糖處理以去除糖鏈等修飾，例如用糖苷酶 PNGase F (NEB, #P0705L) 在 37 ℃處理樣品至少 4 小時。例如，在本發明的所有實施例中測定蛋白樣品分子量的時候，如無特殊強調，待測蛋白樣品都利用糖苷酶 PNGase F 進行去糖處理。

【0291】 在一些具體實施方式中，測定蛋白樣品的還原分子量需要對樣品進行還原處理，例如用 10 nM DTT (dithiothreitol) 在 37 ℃處理樣品 10 分鐘。例如，在本發明的所有實施例中，經過還原處理的樣品稱為還原樣品，未經還原處理的樣品稱為非還原樣品。

【0292】 LC 條件設定

在一些具體實施方式中，將色譜管柱 bioZen 3.6 μm Intact C4(Phenomenex, #00F-4767-AN, 2.1×150mm, 3.6 μm)連接到超高效液相色譜儀(UPLC)(型號：Agilent Technologies, Agilent 1290 UPLC)，按照說明書對系統進行平衡。緩衝液 A 為 0.1% 甲酸 FA 溶於水，緩衝液 B 為 0.1% 甲酸 FA 溶於乙腈。進樣約 1 μg，流速設定為 0.3 ml/min, 運行溫度為 80 ℃。當測試還原樣品時，在 12 分鐘內用緩衝液 A 和 B 混合成線性梯度: 前 8 分鐘使用 10-60% B, 後 4 分鐘使用 80% B。當測試非還原樣品時，在 9 分鐘內用緩衝液 A 和 B 混合成線性梯度: 前 6 分鐘使用 15-60% B, 後 3 分鐘使用 80% B。

【0293】 在另一些具體實施方式中，將色譜管柱 ACQUITY UPLC Protein BEH C4(Waters, # 186004495, 2.1×50mm, 1.7 μm, 300 Å)連接到超高效液相色譜儀(UPLC)(型號：Waters Acquity UPLC)，按照說明書對系統進行平衡。緩衝液 A 為 0.1% 甲酸 FA 溶於水，緩衝液 B 為 0.1% 甲酸 FA 溶於乙腈。進樣約 10 μL，流速設定為 0.2 ~ 0.5 ml/min, 運行溫度為 80 ℃，檢測波長 214 nM。當測試還原

樣品時，在 20 分鐘內用緩衝液 A 和 B 混合成線性梯度: 14 分鐘使用 25-90% B, 後 6 分鐘使用 25% B。當測試非還原樣品時，在 8 分鐘內用緩衝液 A 和 B 混合成線性梯度: 前 4 分鐘使用 5-95% B, 後 4 分鐘使用 95-5% B。

【0294】 MS 條件設定

在一些具體實施方式中，使用的質譜儀型號為 AB Sceix X500B，運行模式為 TOF-MS；當測試還原樣品時，掃描範圍是 600-4000 m/z；當測試非還原樣品時，掃描範圍是 900-6000 m/z。使用 Sceix OS 軟體對原始質譜圖進行反褶積處理得到分子量圖。

【0295】 在另一些具體實施方式中，使用的質譜儀型號為 Waters Xevo G2-XS Q-TOF，分子量掃描範圍是 500 ~ 4000 Da。使用 Water MaxEnt 或者 Agilent MassHunter BioConfirm 軟體對原始質譜圖進行反褶積處理。

【0296】 LC-MS 聯用

本發明申請的多個具體實施方式中使用了不同的 LC 條件和 MS 條件的組合設定，以實現 LC-MS 聯用來測定蛋白樣品的分子量。例如，在實施例 3.1 和實施例 5.2 中，使用的條件組合為(色譜管柱：ACQUITY UPLC Protein BEH C4；LC 儀器：Waters Acquity UPLC；MS 儀器：Waters Xevo G2-XS Q-TOF)。又例如，在實施例 3.2 、實施例 8.2 、實施例 9.2 、實施例 10.1 、實施例 11.2 、實施例 12.1 、實施例 13.2 、實施例 14.2 和實施例 16.1 中，使用的條件組合為(色譜管柱：bioZen 3.6 μm Intact C4；LC 儀器：Agilent 1290 UPLC；MS 儀器：AB Sceix X500B)。又例如，在實施例 6.2 、實施例 7.2 中，使用的條件組合為(色譜管柱：Agilent PLRP-S 1000A；LC 儀器：Agilent 1290 UPLC；MS 儀器：Waters Xevo G2-XS Q-TOF)。

【0297】 實施例2.5利用Uncle測定蛋白的分子穩定性和分子聚集性

Uncle (Unchained Labs) 是一個多功能一站式的蛋白穩定性分析平臺，它經由全螢光，靜態光散射(SLS)和動態光散(DLS)檢測方法來表徵蛋白質的穩定性。同一組樣品可同時得到熔解溫度(Tm)，聚集溫度(Tagg)和粒徑(diameter)等參數。在本實施例中，選擇 Uncle 的"Tm & Tagg with optional DLS"應用程式進行操作，取 9 μL 樣品加入 Uni 管中，設置以 0.3 ℃/分鐘的梯度逐漸從 25℃升溫至 95℃。進行初始和最終 DLS 測量四次採集，每次採集 5 秒。實驗運行結束後，Uncle 分析軟體採用重心均值(BCM)公式來計算每個樣品的 Tm 值；經由 SLS 在 266 nm 或 473 nm 波長下的螢光強度的曲線(聚集曲線)來計算 Tagg 值；樣品的粒徑和分散度則經由 DLS 相關的函數來計算。

【0298】 實施例2.6利用DSC(差示掃描量熱法)測定蛋白的熔解溫度

本實施例使用 Malvern VP-capillary DSC 儀器經由差示掃描量熱法(DSC)分析蛋白樣品的熔融溫度(Tm)。將樣品用緩衝液稀釋至檢測濃度(0.5 mg/mL)後置於 DSC 樣品池，將緩衝液置於參比池。對 DSC 樣品池和參比池進行完全一樣的等溫升溫控制，其中掃描溫度區間為 25–100 ℃，掃描速度為 1 ℃/分鐘, 掃描前平衡時間為 3 分鐘，每個待測樣品分析一次。由補償樣品池溫差的熱量組成的峰圖即為樣品的熱力學曲線圖，曲線峰頂溫度即為樣品的 Tm 值。含有多個結構域的蛋白樣品由於不同結構域的穩定性不同，其曲線可能呈現多個峰。

【0299】 實施例2.7利用DSF(差示掃描螢光法)測定蛋白的熔解溫度

差示掃描螢光法 (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) 是一種常用的高通量的測定蛋白質熱穩定性的方法。它使用即時螢光定量 PCR 儀器經由監測與去折疊的蛋白分子結合的染料的螢光強度的變化，來反映蛋白質的變性的過程，從

而反映出蛋白分子的熱穩定性。本實施例利用 DSF 方法來測定蛋白分子熔融溫度(Tm)。將 10 μg 蛋白加入 96-孔 PCR 板 (Thermo, #AB-0700/W)，接著加入 2 μl 100×稀釋的染料 SYPROTM (Invitrogen, #2008138)，然後加入緩衝液使得終體積為 40 μl 每孔。將 PCR 板密封，放置於即時螢光定量 PCR 儀器 (Bio-Rad CFX96 PCR System)，先於 25℃孵育 5 分鐘，然後以 0.2℃/0.2 分鐘的梯度逐漸從 25℃升溫至 95℃，在測試結束時將溫度降至 25℃。使用 FRET 掃描模式並使用 Bio-Rad CFX Maestro 軟體進行資料分析並計算出樣品的 Tm。

【0300】 實施例3鑑定Cys-220位點二硫鍵的形成

如圖 1 所示，人 IgG1 抗體是含有兩條相同重鏈和兩條相同輕鏈的四聚體結構，兩個重鏈之間形成了兩個鏈間二硫鍵，一個重鏈和對應輕鏈之間形成了一個鏈間二硫鍵；這些抗體的天然鏈間二硫鍵經還原後形成的數個巰基成為了可用的半胱胺酸偶聯位點。圖 44 (B) 顯示了人 IgG1 的鉸鏈區序列(SEQ ID NO: 73)，其含有三個半胱胺酸，其對應位點按照 Eu 編號分別為 Cys-220、Cys-226 和 Cys-229；其中，兩個重鏈鉸鏈區的 Cys-226 和 Cys-229 分別各自形成一個重鏈間二硫鍵，而 Cys-220 則與靠近輕鏈 C'末端的 Cys-214 形成重鏈和輕鏈之間的二硫鍵。

【0301】 圖 2 顯示了具有人 IgG1 抗體鉸鏈區序列的重鏈抗體 HCAb 的結構，以及鉸鏈區二硫鍵結構在人 IgG1 和 HCAb 之間的差異。由於沒有輕鏈的存在，位於鉸鏈區的 Cys-220 顯然無法再和輕鏈 Cys-214 形成二硫鍵。Cys-220 的狀態有如圖 3 所示的兩種可能性：(一)Cys-220 沒有形成重鏈間二硫鍵，其側鏈巰基 (-SH) 會與環境中(如細胞質)的含巰基分子(如谷胱甘肽)形成二硫鍵；(二)如同 Cys-226 或 Cys-229 那樣，Cys-220 形成兩條重鏈之間的鏈間二硫鍵，因此鉸鏈區會形成三個二硫鍵。

【0302】本實施例研究了數個含有 Cys-220 的抗原結合蛋白(包括重鏈抗體 HCAb 和單鏈抗體 scFv-Fc 等結構)分子中 Cys-220 位點二硫鍵的形成。

【0303】實施例3.1研究HCAb PR000020中Cys-220

本實施例採用不同的實驗方法來鑑定在 HCAb PR000020(分子資訊見表 1-1)中 Cys-220 的狀態。

【0304】利用 LC-MS 分子量分析來鑑定 Cys-220

如果 Cys-220 沒有形成重鏈間二硫鍵(假設 1)，而是其側鏈巰基與環境中的其他含巰基分子形成二硫鍵，那麼該 HCAb 的非還原分子量(即完整分子量)會大於形成重鏈間二硫鍵時的分子量理論值(假設 2)。按照假設 2，PR000020 的非還原分子量理論值為 77,640 Da；按照假設 1，其非還原分子量可能為 77,878 Da(增加了 2 個半胱胺酸(+119 Da × 2))或 78,250 Da(增加了 2 個谷胱甘肽(+305 Da × 2))。

【0305】將純化的 HCAb PR000020 蛋白用糖苷酶 PNGase F 作去糖處理，並用實施例 2.4 該方法(LC 儀器：Waters Acquity UPLC；MS 儀器：Waters Xevo G2-XS Q-TOF)測定其非還原分子量，結果為 77,643 Da(反褶積分子量圖譜見圖 4)，與按照假設 2 的預測分子量幾乎一致。由此，可以推斷 Cys-220 形成了重鏈間二硫鍵。

PR000020 分子量	假設 1	假設 2	實驗分子量
	Cys-220 沒有形成重鏈間二硫鍵，但是與細胞中含巰基分子(如，谷胱甘肽)形成二硫鍵。	Cys-220 形成重鏈間二硫鍵。	

還原分子量 (Da)	38,823	38,823	38,826
非還原分子量 (Da)	77,878 ~ 78,250	**77,640**	**77,643**

表 3-1 HCAb PR000020 不同的假設的分子量

【0306】 利用木瓜蛋白酶 Papain 酶切分析來鑑定 Cys-220

木瓜蛋白酶 Papain 可以較特異地水解位於鉸鏈區的 His-224 和 Thr-225 之間的肽鍵(參見 Endo, S., & Arata, Y. (1985).)。將純化的 HCAb PR000020 蛋白用 Papain 進行酶切。由圖 5 (A) 所示，如果 Cys-220 沒有形成重鏈間二硫鍵(假設 1)，那麼 Papain 水解 HCAb 將會產生約 13 KDa 的片段(單個 VH 結構域)和約 50 KDa 的 Fc 片段；如果 Cys-220 形成重鏈間二硫鍵(假設 2)，那麼 Papain 水解 HCAb 將會產生約 27 KDa 的片段(由 Cys-220 的二硫鍵連接在一起的兩個 VH 結構域)和約 50 KDa 的 Fc 片段。圖 5 (B) 顯示了酶切產物的非還原 SDS-PAGE 的結果；HCAb 的酶切產物(對應第 3 和第 4 泳道)在 28 KDa 附近有明顯條帶，而在 14 KDa 附近沒有條帶，因此證實了假設 2 的成立，即 Cys-220 形成了重鏈間二硫鍵。

【0307】 綜上該，利用 LC-MS 分子量分析方法和 Papain 酶切分析方法都證明瞭 Cys-220 形成了重鏈間二硫鍵。

【0308】 實施例3.2研究scFv-Fc PR002129中Cys-220

本實施例研究在 scFv-Fc PR002129(表 1-1)中 Cys-220 的狀態。PR002129 的胺基酸序列如 SEQ ID NO: 71 所示，其含有人 IgG1 鉸鏈區序列(SEQ ID NO: 73)。PR002129 是含有重鏈 Fc 的二聚體結構，其每一條多肽鏈(重鏈)包含一個單鏈可

變區片段 scFv，一個連接肽序列和人的 IgG1 重鏈 Fc 序列；其中，scFv 來源於抗 ROR1 的抗體 1015M2-H4 的 VH 和 VL 序列，連接肽序列包含人 IgG1 鉸鏈區序列和一段 GGGAS 序列(為了引入合適的限制性內切酶位點)。

【0309】 在 PR002129 及其他類似的 scFv-Fc 結構中，Cys-220 的狀態也有如圖 37 (A) 中所示的兩種可能性：形成或者不形成鏈間二硫鍵。如果 Cys-220 沒有形成重鏈間二硫鍵，其側鏈巰基 (-SH) 會與環境中的含巰基分子(如，半胱胺酸或者谷胱甘肽)形成二硫鍵，使其實際分子量明顯大於理論分子量。

【0310】 利用 LC-MS 分子量分析來鑑定 Cys-220

將純化的 PR002129 蛋白用糖苷酶 PNGase F 作去糖處理，並用實施例 2.4 該方法(LC 儀器：Agilent 1290 UPLC；MS 儀器：AB Sceix X500B)測定其非還原分子量(圖 37 (B) 所示其反褶積分子量圖譜)，結果為 104,510 Da，與不同假設的預測分子量進行比較(表 3-2)，推斷出 Cys-220 沒有聯結其他含巰基分子，因此 Cys-220 形成了重鏈間二硫鍵。

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)
PR002129	104,508	104,510	+2
PR002129 聯結 2 個半胱胺酸	104,746		
PR002129 聯結 2 個谷胱甘肽	105,118		

表 3-2 PR002129 非還原分子量 LC-MS 分析

【0311】 實施例3.3鉸鏈區序列分析和Cys-220的二硫鍵

人的不同 IgG 同種型的鉸鏈區序列是已知的，鉸鏈區結構和二硫鍵也做了較充分的研究，例如人 IgG1 經由輕鏈的最後一個 Cys(即 Eu 編碼的 Cys-214)和

重鏈的第五個 Cys(即 Eu 編碼的 Cys-220)形成鏈間二硫鍵，而 IgG2、IgG3 和 IgG4 則是經由輕鏈的最後一個 Cys 和重鏈的第三個 Cys 形成鏈間二硫鍵(參見，Liu, H.等人 mAbs (2012), 4(1), 17–23)。

【0312】 本申請發明人進一步對 IgG1 的晶體結構(PDB 登錄號 1HZH)進行分析，Cys-220 與輕鏈 Cys-214 形成穩定的二硫鍵，而且兩個重鏈鉸鏈區的 Cys-220 的 Cβ 原子之間位置相對較遠，從該 IgG1 結構上推測這兩個 Cys-220 之間難以形成二硫鍵。但是另一方面，前述研究已經驗證了在缺失輕鏈的結構中 Cys-220 形成重鏈間二硫鍵的事實。因此，推測為：Cys-220 可以像 Cys-226 或 Cys-229 那樣形成重鏈間二硫鍵，但是其二硫鍵的穩定性可能比 Cys-226 的或 Cys-229 的要弱。因此經由優化可以使其特定地打開 Cys-220 的二硫鍵而保持其他二硫鍵不變；這樣，Cys-220 有可能為半胱胺酸偶聯提供了定點偶聯用的錨點。

【0313】 本申請發明人再進一步研究不同物種的 IgG 抗體鉸鏈區序列和二硫鍵結構(圖 44)發現，人和小鼠以及羊駝的鉸鏈區序列差異很大，其鉸鏈區序列長度和所含 Cys 的數量都不相同(圖 44 (A))。發明人利用已知的 IgG 全長抗體晶體結構分析鉸鏈區的二硫鍵結構，如圖 44 (B) 顯示了人 IgG1 鉸鏈區(PDB 登錄號 1HZH)；圖 44 (C) 顯示了人 IgG4 鉸鏈區(PDB 登錄號 5DK3)；圖 44 (D) 顯示了小鼠 IgG1 鉸鏈區(PDB 登錄號 1IGY)；圖 44 (E) 顯示了小鼠 IgG2a 鉸鏈區(PDB 登錄號 1IGT)。在已知的晶體結構中，只有人 IgG1 和小鼠 IgG1 的鉸鏈區貢獻了重鏈和輕鏈之間的二硫鍵，人 IgG1 經由 Cys-220(Eu 編號)作為鉸鏈區的第一個 Cys 與輕鏈形成二硫鍵，小鼠 IgG1 經由 Cys-235(殘基編號)作為鉸鏈區的第一個 Cys 與輕鏈形成二硫鍵；但是，不同的是，在人 IgG1 鉸鏈區中，第一個 Cys(Cys-220，Eu 編號)和第二個 Cys(Cys-226，Eu 編號)之間相隔了 5 個其他種類胺基酸

殘基，而在小鼠IgG1鉸鏈區中，第一個Cys(Cys-235，殘基編號)和第二個Cys(Cys-237，殘基編號)之間相隔了1個其他種類胺基酸殘基。

【0314】本申請發明人進一步推測人 IgG1 重鏈的 Cys-220 在缺失輕鏈時可以形成較弱的重鏈間二硫鍵，而這一特性可能與 Cys-220 相對於 Cys-226 之間的距離(即第一 Cys 和第二 Cys 之間的距離)相關；第一 Cys 和第二 Cys 之間可能需要間隔一定數目的其他種類胺基酸殘基才能使兩個 Cys 分別形成不同的二硫鍵且二硫鍵的穩定性(或鍵能)有差異。在後續的實施例中，進一步研究了兩個 Cys 之間的間隔和由鉸鏈區序列衍生的變體連接肽序列，以及利用第一個 Cys 進行藥物偶聯的應用。在圖 44 (A) 所示鉸鏈區序列中，只有小鼠 IgG2c 的鉸鏈區中 Cys 的數目和排列與人 IgG1 的相似，可以推測小鼠 IgG2c 的鉸鏈區序列中第一個 Cys 可能和人 IgG1 鉸鏈區的 Cys-220 有相似的能力。

【0315】實施例3.4Cys-220的二硫鍵缺失並不影響分子穩定性

本實施例為了研究 Cys-220 的二硫鍵對於分子結構穩定性的影響。本實施例選取了數個 HCAb 分子，製備其 C220S 突變衍生分子(將鉸鏈區 Cys-220 突變成絲胺酸 Ser 以破壞其二硫鍵的形成)，或者以實施例 4 該方法製備藥物偶聯衍生物(ADC)；然後利用實施例 2.5 該 Uncle 方法或實施例 2.6 該 DSC 方法測定分子熔解溫度(Tm)，以表徵其熱穩定性。該 HCAb 分子來自表 1-1。

【0316】圖 38 顯示了 HCAb PR000184 及其衍生分子的 DSC 熱力學分析曲線圖；圖 39 顯示了 HCAb PR000453 及其衍生分子的 DSC 熱力學分析曲線圖；圖 40 顯示了 HCAb PR004432 及其衍生分子的 Uncle 熱力學分析曲線圖；結果總結於表 3-3，其列出了每個樣品的最低熔解溫度(Tm1)。由此可見，C220S 突變

並沒有對分子結構的熱穩定性帶來明顯的影響；而且，利用 Cys-220 的偶聯也沒有對熱穩定性造成顯著的改變。

靶點	VH 株號	分子名稱	突變/修飾	樣品號	Tm 測定方法	Tm_1 (℃)
CTLA4	CL5v3	PR000184		170922005	DSC	58.5
CTLA4	CL5v3	PR000184(C220S)	C220S 突變	YYX20180628	DSC	58.4
BCMA	269A37917	PR000453		ZW180411003	DSC	68.5
BCMA	269A37917	PR000453(C220S)	C220S 突變	YYX20180628	DSC	68.6
5T4	1041P014H2	PR004432		C20200427-0507PB0507	Uncle	70.66
5T4	1041P014H2	PR004432(C220S)	C220S 突變	YYX20191018	Uncle	70.76
5T4	1041P014H2	PR004432-ADC	MMAE 偶聯	200527	Uncle	70.43

表 3-3 HCAb 及衍生分子的熔解溫度，Tm_1 為最低熔解溫度。

【0317】 由此可見，Cys-220 的二硫鍵缺失並不影響分子穩定性。

【0318】 實施例4偶聯反應、純化

實施例4.1偶聯反應

基於半胱胺酸殘基的藥物偶聯過程包括由“還原”、“再氧化”和“偶聯”等不同反應過程組成的一個或多個步驟的組合。在這些反應過程中，反應條件如反應溫度、反應時間、反應緩衝液類型及pH、還原劑類型及用量、偶聯物分子類型及用量等都對整個偶聯反應的效率和終產物的品質產生重大影響。這些反應條件包括不同參數的組合，本實施例僅列舉其中代表性方法；本領域技術人員也可以如

本實施例所教導方法結合採用不同的參數條件並經過實驗摸索以建立相似的偶聯反應過程。

【0319】 **還原**

本實施例嘗試使用還原劑為強還原劑 DTT (dithiothreitol) 或還原能力適中的 TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine)。還原劑的用量為 x 莫耳倍數 (x = 1 ~ 50)；還原反應時長為 y 小時 (y = 1 ~ 17)；反應的溫度為 0 ~ 40 ℃，反應的緩衝液 pH 為 4.0 ~ 9.0。

【0320】 **再氧化**

本實施例還可能嘗試使用氧化劑 DHAA (dehydroascorbic acid) 對樣品進行處理。

【0321】 **偶聯**

本實施例還嘗試使用的藥物偶聯物為 mc-vc-PAB-MMAE (也稱為 VcMMAE，分子結構見圖 6，分子量為 1315.78 Da；生產商：聯寧生物製藥，貨號：SET0201)，該化合物含有一個馬來醯亞胺活性反應基團，可以與巯基發生加成反應，形成穩定的硫醚鍵。本實施例嘗試的藥物偶聯物用量為 z 莫耳倍數 (z = 1 ~ 20) ；偶聯反應時長為 h 小時 (h = 0.5 ~ 3)；反應溫度為 25 ~ 30 ℃，pH 為 4.0 ~ 9.0。偶聯結束之後，經由脫鹽管柱將產物去除多餘藥物偶聯物，同時置換到合適的緩衝液中保存。

【0322】 本申請的多個具體實施方式可能使用了多種偶聯反應條件和步驟，包括但不限於本實施例該方法中的一個或者多個步驟的組合。

【0323】 實施例4.2利用HIC(疏水相互作用)純化偶聯產物

本實施例使用疏水相互作用將偶聯產物中各組分進行分離。將偶聯所得樣品，經由 AKTA pure 層析系統 (Cytiva Life Sciences, AKTA pure)，利用 ToyoScreen Phenyl-600M 疏水作用色譜層析管柱 (Tosoh Bioscience, #21892) 進行純化。在 30 個管柱體積內，將疏水相從 0% 線性提升到 100% ，期間對各組峰分別收集。所收集組分，經過 HIC-HPLC 檢測(實施例 2.2 該方法)後，進行合併、濃縮、換液得到偶聯產物。

【0324】 實施例5HCAb PR000020的偶聯和分析

本實施例研究了抗 CTLA4 的 HCAb 抗體 PR000020(SEQ ID NO: 64)與 mc-vc-PAB-MMAE 利用半胱胺酸偶聯到 Cys-220 位點來製備具有均一 DAR 值的抗體偶聯藥物。

【0325】 實施例5.1偶聯反應條件優化

本實施例先用實施例 1.6 中該方法生產和純化 HCAb PR000020 重組蛋白；然後利用實施例 4.1 中該方法，使用多個不同的還原、再氧化和偶聯條件的組合條件，對純化的 HCAb PR000020 進行偶聯反應(表 5-1)，試圖得到較優的反應條件。所使用的還原劑為 TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine) 或 DTT (dithiothreitol)；氧化劑為 DHAA (dehydroascorbic acid)；藥物偶聯物為 mc-vc-PAB-MMAE(生產商：聯寧生物製藥，貨號：SET0201)。平行用 6 組條件對 HCAb PR000020 進行偶聯，以及使用 trastuzumab(第 7 組實驗)作為 IgG1 對照。在本實驗中，還原或偶聯反應的 pH 為 6.5-7.0，溫度為室溫(25-30℃)。每組實驗的偶聯的產物用實施例 2.2 該 HIC-HPLC 分析方法分析其偶聯產物的組分，列於表 5-2。

實驗#	抗體	還原條件	再氧化條件	偶聯條件

		還原劑	還原劑莫耳倍數	反應時長	氧化劑莫耳倍數	反應時長	偶聯物莫耳倍數	反應時長
1#	PR000020	TCEP	2 x	4 小時	50x	4 小時	7 x	2.5 小時
2#	PR000020	DTT	50 x	17 小時	50x	3 小時	7 x	1 小時
3#	PR000020	TCEP	10 x	17 小時	無	無	7 x	2 小時
4#	PR000020	DTT	50 x	17 小時	無	無	7 x	2 小時
5#	PR000020	TCEP	1.5 x	3 小時	無	無	7 x	1.5 小時
6#	PR000020	TCEP	2.5 x	3 小時	無	無	10 x	1.5 小時
7#	trastuzumab	TCEP	2.75 x	3 小時	無	無	7 x	1.5 小時

表 5-1 嘗試的不同的偶聯反應條件

實驗#	**抗體**	**HIC-HPLC 分析結果**
1#	PR000020	經過還原和再氧化的過程，沒有產生可用於反應的巰基，偶聯無法發生。
2#	PR000020	
3#	PR000020	鉸鏈區的所有 6 個半胱胺酸的巰基都用於反應，偶聯上了化合物；但是產物是不均一的且不穩定的。
4#	PR000020	
5#	PR000020	主要產物是偶聯了 2 個化合物的 HCAb (DAR=2)，占比 92 %。
6#	PR000020	主要產物是偶聯了 2 個化合物的 HCAb (DAR=2)，占比 76 %。
7#	trastuzumab	trastuzumab-MMAE 偶聯產物, 平均 DAR 值為 4.1。

表 5-2 不同的偶聯反應條件的產物的 HIC-HPLC 分析結果

【0326】結合表 5-1 和表 5-2，實驗條件 5 和 6 產生的主要產物是偶聯了 2 個化合物分子的抗體偶聯藥物(DAR=2)。因此，初步確定的優化偶聯反應條件為：還原劑選擇還原能力適中的 TCEP，還原劑的用量在 1.5-2.5 莫耳倍數之間，還原反應的溫度為 25-30℃，反應 pH 為 6.5-7.0，反應時長為 3 小時；偶聯所用的藥物偶聯物 mc-vc-PAB-MMAE 的用量為 7-10 莫耳倍數之間，溫度為 25-30℃，pH 為 6.5-7.0，反應時長為 1-2 小時。

【0327】偶聯結束之後，經由脫鹽管柱將產物去除多餘藥物偶聯物，並用實施例 4.2 該 HIC 方法純化偶聯產物，得到 DAR=2 的主要產物。

【0328】實施例5.2偶聯產物分析

本實施例利用高效液相色譜和質譜等技術對純化的重組 HCAb PR000020 和其偶聯產物 PR000020-ADC(包括偶聯後產物和經過一步 HIC 純化後的產物)進行定量分析，以確定其偶聯產物組分的構成。

【0329】利用實施例 2.2 中該 HIC-HPLC 方法對上述樣品進行分析。圖 8 和下表分別顯示了 HCAb PR000020 及其偶聯產物 PR000020-ADC 的 HIC-HPLC 分析結果：(A) HCAb 偶聯前；(B) 偶聯後，純化前；(C) 偶聯及一步 HIC 純化後。表 5-3 顯示 HCAb PR000020 偶聯前的樣品純度高達 95%；表 5-4 顯示 HCAb PR000020 經實施例 5.1 偶聯細胞毒化合物後的產物中，75%的組分是偶聯了 2 個化合物的產物(DAR=2)；表 5-5 顯示了該偶聯產物經過一步 HIC 純化(實施例 4.2)後得到的產物中，99%的組分是偶聯了 2 個化合物的產物。

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
7.22	95.76	HCAb 主峰

8.26	4.00	抗體雜質
9.56	0.24	抗體雜質

表 5-3 HCAb PR000020 (lot.# HSP302) 的 HIC-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
7.53	6.87	HCAb 裸抗峰
8.53	1.61	DAR=1 組分峰
9.54	75.15	DAR=2 組分峰
11.25	3.29	聚體雜質或 DAR>2 組分峰
12.14	13.07	未反應的細胞毒化合物峰

表 5-4 PR000020-ADC 純化前樣品 (lot.# HSP302-170814) 的 HIC-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
7.73	0.31	HCAb 裸抗峰
9.44	99.69	DAR=2 組分峰

表 5-5 PR000020-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP302-170814PA0815) 的 HIC-HPLC 分析結果

【0330】 利用實施例 2.3 中該 RP-HPLC 方法(使用分析型色譜管柱 Zorbax RRHD 300-Diphenyl)對上述樣品進行分析。圖 9 和下表分別顯示了 HCAb PR000020 及其偶聯產物 PR000020-ADC 的 RP-HPLC 分析結果：(A) HCAb 偶聯前；(B) 偶聯後，純化前；(C) 偶聯及一步 HIC 純化後。表 5-6 顯示 HCAb PR000020

偶聯前的樣品純度高達 99%；表 5-7 顯示 HCAb PR000020 經實施例 5.1 偶聯細胞毒化合物後的產物中，75%的組分是偶聯了 2 個化合物的產物(DAR=2)；表 5-8 顯示了該偶聯產物經過一步 HIC 純化(實施例 4.2)後得到的產物中，96%的組分是偶聯了 2 個化合物的產物。

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
35.46	99.06	HCAb 主峰
36.99	0.94	抗體雜質

表 5-6 HCAb PR000020 (lot.# HSP302) 的 RP-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
35.48	8.71	HCAb 裸抗峰
36.22	2.89	DAR=1 組分峰
37.10	75.88	DAR=2 組分峰
38.34	1.12	偶聯產物雜質峰
39.39	7.86	未反應細胞毒化合物峰
41.96	3.54	未知

表 5-7 PR000020-ADC 純化前樣品 (lot.# HSP302-170814) 的 RP-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
35.68	0.73	HCAb 裸抗峰
36.54	3.09	DAR=1 組分峰

37.22	96.18	DAR=2 組分峰

表 5-8 PR000020-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP302-170814PA0815) 的 RP-HPLC 分析結果

【0331】 利用實施例 2.4 中該方法(LC 儀器：Waters Acquity UPLC；MS 儀器：Waters Xevo G2-XS Q-TOF)對偶聯產物 PR000020-ADC 的純化後樣品進行分子量分析。在進行 LC-MS 分析之前，待測樣品經過去糖處理。圖 10 分別顯示了偶聯產物 PR000020-ADC 的分子量分析的質譜反褶積處理圖譜：(A) 非還原樣品；(B) 還原樣品。用 PR000020 的胺基酸序列計算其完整分子量(非還原分子量)和重鏈分子量(還原分子量)的理論值；偶聯物 mc-vc-PAB-MMAE 的分子量為 1315.78 Da；推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量理論值。對圖譜中的峰和對應分子量進行分析，並經由積分計算峰面積以推測相應組分的含量(下表)。表 5-9 顯示了 DAR=2 的組分是主要成分；相應地，如表 5-10 所示，在還原樣品中，近 90%的重鏈偶聯有 1 個化合物(+1 D)。

組分	**理論值 (Da)**	**實驗值 (Da)**	**偏差 (Da)**	**含量**
PR000020 裸抗	77,640			
PR000020 DAR=1	78,956			
PR000020 DAR=2	80,272	80,281	+9	主要成分
PR000020 DAR=3	81,588			

表 5-9 PR000020-ADC 純化後樣品非還原分子量 LC-MS 分析

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR000020 重鏈	38,823	38,827	+4	9.5 %
PR000020 重鏈 + 1 D	40,139	40,145	+6	87.6 %
PR000020 重鏈 + 2 D	41,455	41,460	+5	2.9 %

表 5-10 PR000020-ADC 純化後樣品還原分子量 LC-MS 分析

【0332】 綜合以上多種分析手段的結果，可以推論出：利用半胱胺酸偶聯，偶聯產物中主要成分是 DAR=2 的組分，經過進一步 HIC 純化，可以得到純度 >90%的 DAR=2 高均質性的產物。

【0333】 實施例5.3用LC-MS肽圖分析化合物偶聯位點

本實施例利用 LC-MS 來分析 ADC 偶聯位點。簡言之，將未偶聯的 HCAb PR000020 和偶聯產物 PR000020-ADC 的純化後樣品，用 DTT (dithiothreitol) 還原；然後，半胱胺酸的活性巯基用碘代乙醯胺 (iodoacetamide, IAM) 進行封閉；接著，用胰蛋白酶 trypsin 消化酶切樣品；將酶切產物肽段用 LC-MS 分析。最後，將所得到的資料採用軟體 Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc.) 進行搜庫，經由將偶聯藥物可能發生於半胱胺酸 Cys 上設置為可變修飾，結合原始的二級質譜圖資訊，並經由提取離子流色譜圖(XIC)進行比對，最終確定藥物偶聯位點。

【0334】 如果 Cys 與 mc-vc-PAB-MMAE 發生反應形成穩定的硫醚鍵，那麼該 Cys 位點就不能經由前述的還原烷基化處理方法形成 IAM 修飾。HCAb PR000020 的每一條重鏈上有 9 個 Cys(按照胺基酸序列順序位置編號，分別為：C23, C96, C124, C130, C133, C165, C225, C271, C329)，其中 C124 對應 Eu 編號是 220。經分析，在未偶聯的 PR000020 樣品中，所有 9 個 Cys 中，除 C225 由

於前後較為密集的胰酶酶切位點分佈導致未被檢出，其餘 8 個位點上的 Cys 均被檢測到由於還原烷基化處理帶來較高程度的 IAM 修飾，圖 11 (C) 列出了未偶聯樣品中所鑑定到的含有 IAM 修飾的 Cys (Cys-IAM) 的肽段列表。在偶聯產物 PR000020-ADC 樣品中，總共檢測到 1 個藥物偶聯位點，為 C124(即 Eu 編號的 Cys-220)，而其它 8 個 Cys 均被檢測到 IAM 修飾，圖 11 (B) 列出了偶聯樣品中所鑑定到的含有 IAM 修飾的 Cys (Cys-IAM) 的肽段列表，這些肽段在圖 11 (A) 的 PR000020-ADC 的胺基酸序列上用灰色背景標識。由此可見，在 PR000020-ADC 樣品中，C124(即 Cys-220)沒有發生 IAM 修飾。

【0335】 採用 Peaks Studio 進行搜庫時，將偶聯藥物(mc-vc-PAB-MMAE，品質差異為 1315.78 Da)可能發生於 Cys 上的情況設置為可變修飾。搜庫結果顯示僅在偶聯樣品中鑑定到含 C124(即 Cys-220)的肽段 PHGSDIWGQGTMVTVSSEPKSC#DK (#表示修飾位點)發生了修飾(即藥物偶聯)。該肽段的二級質譜圖如圖 35 所示 (m/z=966.2409, z=4, RT=83.77 min)。由於在實驗過程中 mc-vc-PAB-MMAE 會發生碎裂(如圖 6 (B) 所示特徵碎片結構)，導致了 y 離子的缺失，因此可以在該肽段二級譜圖的低品質端觀察到其特徵碎片離子的存在，也由此進一步證實了 C124(即 Cys-220)的偶聯修飾。經由比對 PR000020-ADC 樣品與 PR000020 單抗樣品中該肽段的提取離子流色譜圖(XIC 圖，圖 36)發現，發生藥物偶聯的肽段 (RT=83.77 min)的信號僅在 ADC 樣品中檢出，而作為對照的單抗樣品中沒有檢測到相應的信號，這就進一步證明瞭該半胱胺酸殘基為藥物偶聯位點。

【0336】 綜上該，利用 LC-MS 肽圖分析 PR000020-ADC 偶聯產物證實了藥物偶聯發生在位點 Cys-220。

【0337】 實施例5.4結合CTLA4高表達細胞

本實施例是為了研究 HCAb 抗體 PR000020 和其偶聯產物 PR000020-ADC 結合高表達 CTLA4 的細胞的活性。

【0338】 利用流式細胞術 FACS 測試抗體分子與高表達人 CTLA4 的 HEK293T 細胞株 HEK293/hCTLA4 (和鉑醫藥構建) 等細胞的結合能力。具體地，消化 HEK293/hCTLA4 細胞並用 DMEM 培養基重新懸浮；將細胞密度調整為 $1x10^6$ 細胞/mL。未表達 CTLA4 的 HEK293 細胞作為陰性對照。接著將細胞以 100 μL/孔接種於 96 孔 V 底板 (Corning, #3894)，4℃下離心 5 分鐘，棄上清。隨後將梯度稀釋的抗體分子以 100 μL/孔加入 96 孔板並混合均勻，抗體分子可以從最高終濃度為 500 nM 按照 3 倍濃度梯度稀釋的共 12 個濃度。將細胞放置於 4℃，避光孵育 1 小時。然後，加入 100 μL/孔預冷的 FACS 緩衝液(含有 0.5% BSA 的 PBS 緩衝液)漂洗細胞兩次，4℃下 500g 離心 5 分鐘，棄上清。接著，再加入 100 μL/孔螢光二抗 (Alexa Fluor 488 anti-human IgG Fc, Biolegend, #409322, 1 : 1000 稀釋)，放置於 4℃，避光孵育 1 小時。隨後以 200 μL/孔加入預冷的 FACS 緩衝液漂洗細胞兩次，然後於 4℃下 500 g 離心 5 分鐘，棄上清。最後，以 200 μL/孔加入預冷的 FACS 緩衝液重新懸浮細胞。使用 BD FACS CANTOII 流式細胞儀讀取螢光發光信號值，並用軟體 FlowJo v10 (FlowJo, LLC) 處理和分析資料。

【0339】 應用軟體 GraphPad Prism 8 進行資料處理和作圖分析，經由四參數非線性擬合，得到抗體對靶細胞的結合曲線及 EC50 值等參數。

【0340】 圖 7 中所示，抗體 PR000020 及其純化後的偶聯產物 PR000020-ADC 都與 HEK293/hCTLA4 細胞有較強的特異性結合活性。

【0341】 實施例6HCAb PR000759的偶聯和分析

本實施例研究了抗 MSLN 的 HCAb 抗體 PR000759(SEQ ID NO: 67)與 mc-vc-PAB-MMAE 利用半胱胺酸偶聯到 Cys-220 位點來製備具有均一 DAR 值的抗體偶聯藥物。

【0342】 實施例6.1偶聯反應條件優化

以實施例 5.1 所得到的初步確定的優化偶聯反應條件為基礎，針對該抗體分子做進一步優化。如表 6-1 所示，平行用 5 組條件對純化的 HCAb PR000759 重組蛋白進行偶聯；還原劑選擇 TCEP，選擇的藥物偶聯物為 mc-vc-PAB-MMAE，偶聯所用的藥物偶聯物用量為 5 - 18 莫耳倍數，反應時長為 1 - 2 小時。在本實驗中，還原或偶聯反應的 pH 為 6.5-7.0，溫度為室溫(25-30℃)。每組實驗的偶聯的產物用實施例 2.2 該 HIC-HPLC 分析方法分析其偶聯產物的組分，列於表 6-1。在本實施例中，實驗組#2 的偶聯反應條件可以實現 DAR=2 組分(表 6-1 中的'D2 %')占比最高。偶聯結束之後，經由脫鹽管柱將產物去除多餘藥物偶聯物，並用實施例 4.2 該 HIC 方法純化偶聯產物，得到 DAR=2 的主要產物。

實驗#	**HCAb 濃度**	**TCEP 用量**	**VcMMAE 用量**	**偶聯產物 HIC-HPLC 分析結果**		
				平均 DAR	裸抗 %	D2 %
1	5.0 mg/ml	1.2 x	5.0 x	1.15	43.2%	50.3%
2	5.0 mg/ml	1.5 x	5.0 x	1.83	18.7%	65.2%
3	5.0 mg/ml	5.0 x	18.0 x	2.44	8.6%	52.6%
4	5.0 mg/ml	2.0 x	5.0 x	1.52	34.6%	37.0%
5	5.0 mg/ml	2.0 x	5.0 x	1.83	25.0%	40.4%

表 6-1 HCAb PR000759 的偶聯反應條件

【0343】 實施例6.2偶聯產物分析

本實施例利用高效液相色譜和質譜等技術對純化的重組 HCAb PR000759 和其偶聯產物 PR000759-ADC(包括偶聯後產物和經過一步 HIC 純化後的產物)進行定量分析，以確定其偶聯產物組分的構成。

【0344】 利用實施例 2.1 中該 SEC-HPLC 方法和實施例 2.2 中該 HIC-HPLC 方法對上述樣品進行分析。圖 12 和表 6-2 顯示了 HCAb PR000759 重組蛋白偶聯前的樣品的 SEC-HPLC 分析結果，顯示其純度高達 95%。圖 13 和表 6-3 顯示了偶聯產物 PR000759-ADC 經過一步 HIC 純化(實施例 4.2)後得到的產物的 HIC-HPLC 分析結果，顯示其 94%的組分是偶聯了 2 個化合物的產物(DAR=2)。

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
5.68	3.14	
7.22	1.43	
8.38	95.43	HCAb 主峰

表 6-2 HCAb PR000759 (lot.# HSP307A PA1222 F3-4) 的 SEC-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
7.39	0.20	HCAb 裸抗峰
8.40	2.12	DAR=1 組分峰
9.44	93.91	DAR=2 組分峰
10.73	1.29	雜質或 DAR>2 組分峰
11.34	2.47	

表 6-3 PR000759-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP307A-181229 MIX) 的 HIC-HPLC 分析結果

【0345】 利用實施例 2.4 中該方法對 HCAb PR000759 和 PR000759-ADC 的純化後樣品進行分子量分析。在進行 LC-MS 分析之前，待測樣品經過去糖處理。圖 15 顯示了分子量分析的質譜反褶積處理圖譜：(A) PR000759 的非還原樣品；(B) PR000759-ADC 的非還原樣品；(C) PR000759-ADC 的還原樣品。按照實施例 5.2 中該分子量分析方法過程推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量及其在樣品中的含量(下表)。表 6-4 顯示了 HCAb PR000759 的實際測定分子量。表 6-5 顯示了在 PR000759-ADC 的非還原樣品中，DAR=2 的組分是主要成分(占 91%)，推算出 PR000759-ADC 產物的平均 DAR 值為 2.10。相應地，如表 6-6 所示，在 PR000759-ADC 的還原樣品中，偶聯有 1 個化合物的重鏈(+1 D)是主要成分，推算出 PR000759-ADC 產物的平均 DAR 值為 1.98。

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR000759 單抗	78,645	78,648~78,776	+3~+131*	主要成分

表 6-4 HCAb PR000759 (lot.# HSP307A PA1222 F3-4) 非還原分子量 LC-MS 分析

(* 可能含有 1 個 C'末端 Lys 未剪切 (+ 128 Da))

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR000759 裸抗	78,645	78,650	+5	0.8 %
PR000759 DAR=1	79,961	79,971	+10	2.4 %
PR000759 DAR=2	81,277	81,284	+7	90.6 %

PR000759 DAR=3	82,593	82,607	+14	1.8 %
PR000759 DAR=4	83,909	83,922	+13	2.3 %
PR000759 DAR=6	86,541	86,554	+13	2.0 %

表 6-5 PR000759-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP307A-181229 MIX) 非還原分子量 LC-MS 分析

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR000759 重鏈	39,324	39,330	+6	10.2 %
PR000759 重鏈 + 1D	40,639	40,646	+7	83.0 %
PR000759 重鏈 + 2D	41,955	41,964	+9	4.5 %
PR000759 重鏈 + 3D	43,271	43,280	+9	2.3 %

表 6-6 PR000759-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP307A-181229 MIX) 還原分子量 LC-MS 分析

【0346】 綜合以上多種分析手段的結果，可以推論出：利用半胱胺酸偶聯，偶聯產物中主要成分是 DAR=2 的組分，經過進一步 HIC 純化，可以得到純度 >90%的 DAR=2 高均質性的產物。

【0347】 實施例6.3用LC-MS肽圖分析化合物偶聯位點

本實施例利用 LC-MS 來分析 ADC 偶聯位點。第一步，預處理待測樣本 PR000759-ADC。將樣品轉移至 10 KD 超濾管中，經三次超濾後將樣品置換到含 8 M 尿素的緩衝液；再加入終濃度為 20 mM 的 DTT (dithiothreitol)，於 37℃反應 1 小時；隨後加入終濃度為 50 mM 的吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)，於室

溫下避光反應 30 分鐘；再次超濾後置換到含 50 mM 碳酸氫銨的緩衝液，並以樣品：酶 = 50：1 的比例加入胰蛋白酶 trypsin，於 37℃過夜酶解。第二步，分析待測樣品。樣品經胰酶酶切後經由 LC-MS/MS 進行鑑定，採用軟體 Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc.) 進行搜庫，其參數設置為：trypsin 酶解；碎片離子品質容許誤差：0.05 Da；母離子品質容許誤差：10 ppm；最大漏切數：2；可變修飾為：Carbamidomethylation 57.02，Oxidation (M) 15.99，Deamidation (NQ) 0.98，Pyroglutamate formation (N-term E) -18.01，ADC drug 1315.78。

【0348】 搜庫結果經嚴格卡值過濾後得到可信肽段(-10lgP ≥ 20)，其序列覆蓋率近 100%。從肽段列表中，篩選出帶有 mc-vc-PAB-MMAE 偶聯位點的三條肽段(圖 14)，結果顯示 PR000759-ADC 在第 127 位(Eu 編號為 220)、第 136 位(Eu 編號為 229)和第 168 位(Eu 編號為 261)的半胱胺酸上鑑定到帶有偶聯修飾(如圖 14 中粗體的 C 所示)。進一步對這三條肽段的對應的二級譜圖進行了逐一核對，證實在其發生 Δmass=1315.78 Da 的修飾均為高度可信的；另外，將二級譜圖的低品質端進行放大，可以清楚的看到 mc-vc-PAB-MMAE 發生碎裂後產生的特徵碎片離子的存在，也進一步證實了偶聯修飾位點。

【0349】 在該肽圖分析中，無法精確定量每一種偶聯位點在產物中所占比例；但是結合之前的 HIC-HPLC 和 LC-MS 分子量分析，證明絕大多數偶聯發生在 PR000759 的第 127 位的半胱胺酸(即 Cys-220)以形成 DAR=2 的偶聯產物。

【0350】 實施例7 HCAb PR001046的偶聯和分析

本實施例研究了抗 BCMA 的 HCAb 抗體 PR001046(SEQ ID NO: 68)與 mc-vc-PAB-MMAE 利用半胱胺酸偶聯到 Cys-220 位點來製備具有均一 DAR 值的抗體偶聯藥物。

【0351】 實施例7.1 偶聯反應條件優化

以實施例 5.1 所得到的初步確定的優化偶聯反應條件為基礎，針對該抗體分子做進一步優化。如表 7-1 所示，平行用 6 組條件對純化的 HCAb PR001046 重組蛋白進行偶聯；還原劑選擇 TCEP，選擇的藥物偶聯物為 mc-vc-PAB-MMAE，偶聯所用的藥物偶聯物用量為 5 - 8 莫耳倍數，反應時長為 1 - 3 小時。在本實驗中，還原或偶聯反應的 pH 為 6.5-7.0，溫度為室溫(25-30℃)。每組實驗的偶聯的產物用實施例 2.2 該 HIC-HPLC 分析方法分析其偶聯產物的組分，列於表 7-1。當 TCEP 用量在 1.3 - 1.5 莫耳倍數時，DAR=2 組分得率(表 7-1 中的'D2 %')最高。偶聯結束之後，經由脫鹽管柱將產物去除多餘藥物偶聯物，並用實施例 4.2 該 HIC 方法純化偶聯產物，得到 DAR=2 的主要產物。

實驗#	**HCAb 濃度**	**TCEP 用量**	**VcMMAE 用量**	**偶聯產物 HIC-HPLC 分析結果**		
				平均 DAR	裸抗%	D2%
1	5.0 mg/ml	1.3 x	8.0 x	1.82	16.9%	64.8%
2	5.0 mg/ml	1.5 x	8.0 x	1.98	12.3%	64.9%
3	5.0 mg/ml	1.7 x	8.0 x	2.06	10.7%	62.8%
4	5.0 mg/ml	2.0 x	8.0 x	2.22	8.5%	57.4%
5	5.0 mg/ml	1.5 x	5.0 x	1.97	12.6%	65.4%
6	2.0 mg/ml	1.5 x	5.0 x	1.77	17.9%	67.1%

表 7-1 HCAb PR001046 的偶聯反應條件

【0352】 實施例7.2偶聯產物分析

本實施例利用高效液相色譜和質譜等技術對純化的重組 HCAb PR001046 和其偶聯產物 PR001046-ADC(包括偶聯後產物和經過一步 HIC 純化後的產物)進行定量分析，以確定其偶聯產物組分的構成。

【0353】 利用實施例 2.1 中該 SEC-HPLC 方法和實施例 2.2 中該 HIC-HPLC 方法對上述樣品進行分析。圖 16 和表 7-2 顯示了 HCAb PR001046 重組蛋白偶聯前的樣品的 SEC-HPLC 分析結果，顯示其純度高達 98%。圖 17 和表 7-3 顯示了偶聯產物 PR001046-ADC 經過一步 HIC 純化(實施例 4.2)後得到的產物的 HIC-HPLC 分析結果，顯示其 88%的組分是偶聯了 2 個化合物的產物(DAR=2)。

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
< 7	0.28	
7.31	1.59	
8.30	98.13	HCAb 主峰

表 7-2 HCAb PR001046 (lot.# HSP307B PA1222 F11-12) 的 SEC-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
7.58	0.87	HCAb 裸抗峰
8.58	1.20	DAR=1 組分峰
9.50	88.19	DAR=2 組分峰
10.65	3.47	雜質或 DAR>2 組分峰
11.06	6.27	

表 7-3 PR001046-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP307B-181229 MIX) 的 HIC-HPLC 分析結果

【0354】 利用實施例 2.4 中該方法對 HCAb PR001046 和 PR001046-ADC 的純化後樣品進行分子量分析。在進行 LC-MS 分析之前，待測樣品經過去糖處理。圖 19 顯示了分子量分析的質譜反褶積處理圖譜：(A) PR001046 的非還原樣品；(B) PR001046-ADC 的非還原樣品；(C) PR001046-ADC 的還原樣品。按照實施例 5.2 中該分子量分析方法過程推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量及其在樣品中的含量(下表)。表 7-4 顯示了 HCAb PR001046 的實際測定分子量。表 7-5 顯示了在 PR001046-ADC 的非還原樣品中，DAR=2 的組分是主要成分(占 81%)，推算出 PR001046-ADC 產物的平均 DAR 值為 2.39。相應地，如表 7-6 所示，在 PR001046-ADC 的還原樣品中，偶聯有 1 個化合物的重鏈(+1 D) 是主要成分，推算出 PR001046-ADC 產物的平均 DAR 值為 2.20。

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR001046 單抗	78,735	78,738 ~ 78,866	+3 ~ +131 *	主要成分

表 7-4 HCAb PR001046 (lot.# HSP307B PA1222 F11-12) 非還原分子量 LC-MS 分析

(* 可能含有 1 個 C'末端 Lys 未剪切 (+ 128 Da))

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR001046 裸抗	78,735	78,739	+4	1.3 %
PR001046 DAR=1	80,051	80,057	+6	0.5 %
PR001046 DAR=2	81,367	81,373	+6	81.2 %

PR001046 DAR=3	82,683	82,691	+8	3.9 %
PR001046 DAR=4	83,999	84,009	+10	6.7 %
PR001046 DAR=5	85,315	85,331	+16	0.4 %
PR001046 DAR=6	86,631	86,643	+12	6.0 %

表 7-5 PR001046-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP307B-181229 MIX) 非還原分子量 LC-MS 分析

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR001046 重鏈	39,369	39,375	+6	7.8 %
PR001046 重鏈 + 1D	40,685	40,692	+7	79.3 %
PR001046 重鏈 + 2D	42,001	42,009	+8	8.3 %
PR001046 重鏈 + 3D	43,317	43,325	+8	4.7 %

表 7-6 PR001046-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP307B-181229 MIX) 還原分子量 LC-MS 分析

【0355】 綜合以上多種分析手段的結果，可以推論出：利用半胱胺酸偶聯，偶聯產物中主要成分是 DAR=2 的組分，經過進一步 HIC 純化，可以得到純度 >80%的 DAR=2 高均質性的產物。

【0356】 實施例7.3用LC-MS肽圖分析化合物偶聯位點

本實施例利用實施例 6.3 中該方法來分析 PR001046-ADC 的偶聯位點。

【0357】 圖 18 列出了帶有 mc-vc-PAB-MMAE 偶聯位點的三條肽段，結果顯示 PR001046-ADC 在第 127 位(Eu 編號為 220)、第 136 位(Eu 編號為 229)和第

168 位(Eu 編號為 261)的半胱胺酸上鑑定到帶有偶聯修飾(如圖 18 中粗體的 C 所示)。進一步對這三條肽段的對應的二級譜圖進行了逐一核對，證實在其發生 Δmass=1315.78 Da 的修飾均為高度可信的；例如，圖 70 顯示了含有 C220 偶聯位點的肽段的二級譜圖。

【0358】 在該肽圖分析中，無法精確定量每一種偶聯位點在產物中所占比例；但是結合之前的 HIC-HPLC 和 LC-MS 分子量分析，證明絕大多數偶聯發生在 PR001046 的第 127 位的半胱胺酸(即 Cys-220)以形成 DAR=2 的偶聯產物。

【0359】 實施例7.4結合BCMA高表達細胞

本實施例是為了研究 HCAb 抗體 PR001046 和其偶聯產物 PR001046-ADC 結合高表達 BCMA 的細胞的活性。

【0360】 利用流式細胞術 FACS 測試抗體分子與高表達人 BCMA 的 HEK293T 細胞株 HEK293T-hBCMA (北京康源博創, KC-0233) 的結合能力。具體地，消化細胞並用 DMEM 完全培養基重新懸浮，調整細胞密度為 $1x10^6$ 細胞/mL。以 10 μL 細胞/孔接種於 96 孔 V 底板 (Corning, #3894)，隨後加入 100 μL /孔，2 倍於終濃度的 3 倍濃度梯度稀釋的待測抗體。將細胞放置於 4℃，避光孵育 1 小時。之後，加入 100 μL /孔預冷 PBS 漂洗細胞兩次，於 500 g、4℃下離心 5 分鐘，棄上清。再加入 100 μL /孔螢光二抗 (Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific, Jackson ImmunoResearch Inc., #109-545-098, 1：500 稀釋)，4℃，避光孵育 30 分鐘。用 100 μL /孔預冷 PBS 洗滌細胞兩次，於 500 g、4℃下離心 5 分鐘，棄上清。最後，200 μL /孔預冷 PBS 重新懸浮細胞，使用 BD FACS CANTOII 流式細胞儀讀取螢光發光信號值，並用軟體 FlowJo v10 (FlowJo, LLC) 處理和分析資料。

【0361】 應用軟體 GraphPad Prism 8 進行資料處理和作圖分析，經由四參數非線性擬合，得到抗體對靶細胞的結合曲線及 EC50 值等參數。

【0362】 圖 20 中所示，抗體 PR001046 及其純化後的偶聯產物 PR001046-ADC 都與 HEK293T-hBCMA 細胞有較強的特異性結合活性。

【0363】 實施例7.5細胞毒性殺傷實驗

本實施例為了研究抗 BCMA 的抗體偶聯產物 PR001046-ADC 對高表達人 BCMA 的細胞系 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 的特異性細胞殺傷活性，並且對不表達人 BCMA 的 SNU-16 (ATCC, CRL-5974) 細胞沒有殺傷活性。

【0364】 將 NCI-H929 細胞和 SNU-16 細胞分別接種於 96 孔板 (Perkin Elmer, #6005225)，接種細胞數量分別為：10000 細胞/50 μL/孔 (NCI-H929)、5000 細胞/50 μL/孔 (SNU-16)、 10000 細胞 NCI-H929 和 5000 細胞 SNU-16 /100 μL/孔混合 (NCI-H929 + SNU-16)。然後，以 50 μL/孔加入預先梯度稀釋的待測樣品，PR001046 和 PR001046-ADC 的濃度為 1 μg/ml、0.1 μg/ml 和 0.01 μg/ml，mc-vc-PAB-MMAE 的濃度為 10 nM、1 nM 和 0.1 nM。接著，在 37℃和 5% CO2 環境下孵育 72 小時，加入 CellTiter-Glo 細胞活力檢測試劑 (Promega, #G7573)，室溫下孵育至少 10 分鐘得到穩定發光信號，酶標儀檢測發光值。應用軟體 GraphPad Prism 8 進行資料處理和作圖分析。本實施例中，使用了多組不同的 PR001046-ADC 樣品，包括純化前或純化後的含有不同 DAR=2 (D2) 組分百分比的樣品。

【0365】 圖 21 中所示，0.1 μg/ml 及以上濃度的 PR001046-ADC 可以特異性地殺傷 BCMA 陽性細胞 NCI-H929 以及 NCI-H929 與 SNU-16 的混合細胞，但是不能殺傷 BCMA 陰性細胞 SNU-16。如圖 21 (A) 所示，未偶聯的 PR001046 或

mc-vc-PAB-MMAE 化合物不能對細胞產生有效的殺傷。另一方面，如圖 21 (B)所示，偶聯產物主要成分(DAR=2)的純度對於殺傷能力沒有顯著影響。

【0366】 實施例8HCAb PR004432的偶聯和分析

本實施例研究了抗 5T4 的 HCAb 抗體 PR004432(SEQ ID NO: 69)與 mc-vc-PAB-MMAE 利用半胱胺酸偶聯到 Cys-220 位點來製備具有均一 DAR 值的抗體偶聯藥物。

【0367】 實施例8.1偶聯反應條件優化

以實施例 5.1 所得到的初步確定的優化偶聯反應條件為基礎，針對該抗體分子做進一步優化。如表 8-1 所示，平行用 2 組條件對純化的 HCAb PR004432 重組蛋白進行偶聯；還原劑選擇 TCEP，TCEP 用量為 4 莫耳倍數，選擇的藥物偶聯物為 mc-vc-PAB-MMAE，偶聯所用的藥物偶聯物用量為 12 莫耳倍數，反應時長為 1 -2 小時。在本實驗中，還原或偶聯反應的 pH 為 6.5-7.0，溫度為室溫(25-30℃)。每組實驗的偶聯的產物用實施例 2.3 該 RP-HPLC 分析方法(使用分析型色譜管柱 PLRP-S 1000A)分析其偶聯產物的組分，列於表 8-1；DAR=2 組分得率('D2 %')約 60%。偶聯結束之後，經由脫鹽管柱將產物去除多餘藥物偶聯物，並用實施例 4.2 該 HIC 方法純化偶聯產物，得到 DAR=2 的主要產物。

實驗#	**HCAb 濃度**	**TCEP 用量**	**VcMMAE 用量**	**偶聯產物 RP-HPLC 分析結果**		
				平均 DAR	裸抗 %	D2 %
20052501	5.0 mg/ml	4.0 x	12.0 x	2.1		61.1%
20060301	5.0 mg/ml	4.0 x	12.0 x	2.1		62.6%

表 8-1 HCAb PR004432 的偶聯反應條件

【0368】 實施例8.2偶聯產物分析

本實施例利用高效液相色譜和質譜等技術對純化的重組 HCAb PR004432 和其偶聯產物 PR004432-ADC(包括偶聯後產物和經過一步 HIC 純化後的產物)進行定量分析，以確定其偶聯產物組分的構成。

【0369】 利用實施例 2.1 中該 SEC-HPLC 方法和實施例 2.3 中該 RP-HPLC 方法(使用分析型色譜管柱 PLRP-S 1000A)對上述樣品進行分析。圖 22 和表 8-2 顯示了 HCAb PR004432 重組蛋白偶聯前的樣品的 SEC-HPLC 分析結果，顯示其純度高達 98%。圖 23 和表 8-3 顯示了偶聯產物 PR004432-ADC 經過一步 HIC 純化(實施例 4.2)後得到的產物的 RP-HPLC 分析結果，顯示其 90.6%的組分是偶聯了 2 個化合物的產物(DAR=2)。

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
6.90	0.59	
7.32	0.76	
7.70	98.64	HCAb 主峰

表 8-2 HCAb PR004432 (lot.# HSP314-01 K20200427-0507PB0507) 的 SEC-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
15.55	4.48	HCAb 裸抗峰
16.90	3.50	DAR=1 組分峰
18.15	90.63	DAR=2 組分峰

20.07	1.36	雜質或 DAR>2 組分峰
21.40	0.04	

表 8-3 PR004432-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP31401-ADC-20200609) 的 RP-HPLC 分析結果

【0370】利用實施例 2.4 中該方法(LC 儀器：Agilent 1290 UPLC；MS 儀器：AB Sceix X500B)對 PR004432-ADC 的純化後樣品進行分子量分析。在進行 LC-MS 分析之前，待測樣品經過去糖處理。圖 25 顯示了分子量分析的質譜反褶積處理圖譜：(A) PR004432-ADC 的非還原樣品；(B) PR004432-ADC 的還原樣品。按照實施例 5.2 中該分子量分析方法過程推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量及其在樣品中的含量(下表)。表 8-4 顯示了在 PR004432-ADC 的非還原樣品中，DAR=2 的組分是主要成分(占 98.3%)，推算出 PR004432-ADC 產物的平均 DAR 值為 1.97。相應地，如表 8-5 所示，在 PR004432-ADC 的還原樣品中，偶聯有 1 個化合物的重鏈(+1 D)是主要成分(占 96.5%)，推算出 PR004432-ADC 產物的平均 DAR 值為 1.93。

組分	**理論值 (Da)**	**實驗值 (Da)**	**偏差 (Da)**	**含量**
PR004432 裸抗	80,531	80,534 ~ 80,549	+3 ~ +18	1.7 %
PR004432 DAR=1	81,847			
PR004432 DAR=2	83,163	83,138 ~ 83,397	-25 ~ +234*	98.3 %
PR004432 DAR=3	84,479			

表 8-4 PR004432-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP31401-ADC-20200609) 非還原分子量 LC-MS 分析

(* 可能包含 C'端未剪切 Lys (+ 128 Da) 或其他修飾帶來的分子量偏差)

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR004432 重鏈	40,266	40,199 ~ 40,399	-67 ~ +133	3.5 %
PR004432 重鏈 + 1D	41,582	41,448 ~ 41,714	-134 ~ +132 *	96.5 %
PR004432 重鏈 + 2D	42,898			

表 8-5 PR004432-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP31401-ADC-20200609) 還原分子量 LC-MS 分析

(* 可能包含 C'端未剪切 Lys (+ 128 Da) 或其他修飾帶來的分子量偏差)

【0371】 綜合以上多種分析手段的結果，可以推論出：利用半胱胺酸偶聯，偶聯產物中主要成分是 DAR=2 的組分，經過進一步 HIC 純化，可以得到純度 >90%的 DAR=2 高均質性的產物。

【0372】 實施例8.3用LC-MS肽圖分析化合物偶聯位點

本實施例利用實施例 6.3 中該方法來分析 PR004432-ADC 的偶聯位點。簡言之，PR004432-ADC 樣品經 trypsin 酶解後用 LC-MS/MS 鑑定，所得資料用軟體 BioPharmView (SCIEX) 搜庫，搜庫參數設置為：trypsin 酶解；碎片離子品質容許誤差：0.05 Da；母離子品質容許誤差：10 ppm；最大漏切數：1；可變修飾：Carbamidomethylation 57.02，Oxidation (M) 15.99，Deamidation (NQ) 0.98，mc-vc-PAB-MMAE 1315.78。找到帶有化合物偶聯修飾(分子量差異 1315.78)的相關目標肽段，查看相應二級譜圖進一步確認。偶聯位點佔有率(該位點聯結有化合物的比例)用下面公式計算：

【0373】 $偶联率\% = \frac{该位点联结有化合物的肽段峰面积之和}{该位点所有肽段峰面积之和}$

【0374】 圖 24 顯示了利用 LC-MS 肽譜圖分析 PR004432-ADC 的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的 3 條肽段，以及相應的偶聯位點覆蓋率。分析所有含有 Cys 位點並發生偶聯修飾的肽段，每一條肽段對應的二級譜圖也經過逐一核對，以證實其發生的偶聯修飾均為高度可信的。例如，含有 SC(+1315.78)DK 的肽段占比 97.12%，這說明，97.12%的 Cys-220 位點被偶聯有化合物。類似地，只有 1.5%的 Cys-226 或 Cys-229 位點發生偶聯。

【0375】 實施例8.4結合5T4高表達細胞

本實施例是為了研究 HCAb 抗體 PR004432 和其偶聯產物 PR004432-ADC 結合高表達 BCMA 的細胞的活性。

【0376】 利用流式細胞術 FACS 測試抗體分子與高表達人 5T4 的人乳腺癌細胞株 HCC1954 (ATCC, CRL-2338) 的結合能力。具體地，調整細胞密度為 1x10^{6}細胞/mL，以 100 μL 細胞/孔接種於 96 孔 V 底板 (Corning, #3894)，隨後加入 100 μL/孔，2 倍於終濃度的 3 倍濃度梯度稀釋的待測抗體。將細胞放置於 4℃，避光孵育 1 小時。之後，加入 100 μL/孔預冷 PBS 漂洗細胞兩次，於 500 g、4℃下離心 5 分鐘，棄上清。再加入 100 μL/孔螢光二抗 (Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific, Jackson ImmunoResearch Inc., #109-545-098, 1 : 500 稀釋)，4℃，避光孵育 30 分鐘。用 100 μL/孔預冷 PBS 洗滌細胞兩次，於 500 g、4℃下離心 5 分鐘，棄上清。最後，200 μL/孔預冷 PBS 重新懸浮細胞，使用 BD FACS CANTOII 流式細胞儀讀取螢光發光信號值，並用軟體 FlowJo v10 (FlowJo, LLC) 處理和分析資料。

【0377】 應用軟體 GraphPad Prism 8 進行資料處理和作圖分析，經由四參數非線性擬合，得到抗體對靶細胞的結合曲線及 EC50 值等參數。

【0378】 圖 26 中所示，抗體 PR004432 及其純化後的偶聯產物 PR004432-ADC 都與 HCC1954 細胞有較強的特異性結合活性。

【0379】 實施例8.5細胞毒性殺傷實驗

本實施例為了研究抗 5T4 的抗體偶聯產物 PR004432-ADC 對高表達人 5T4 的人乳腺癌細胞株 HCC1954 (ATCC, CRL-2338) 的細胞殺傷活性。

【0380】 將 HCC1954 細胞以 4000 細胞/50 μL/孔接種於 96 孔板 (Perkin Elmer, #6005225)，於 37℃和 5% CO2 下孵育過夜。然後，以 50 μL/孔加入預先梯度稀釋的待測樣品，PR004432、PR004432-ADC 和 PR004433-ADC 從最高終濃度為 30 nM 以 3 倍濃度梯度稀釋，mc-vc-PAB-MMAE 從最高終濃度為 60 nM 以 3 倍濃度梯度稀釋；另設置不加待測樣品的孔為對照孔。接著，在 37℃和 5% CO2 環境下孵育 72 小時，加入 CellTiter-Glo 細胞活力檢測試劑 (Promega, #G7573)，室溫下孵育至少 10 分鐘得到穩定發光信號，酶標儀檢測發光值。將發光值按如下公式計算細胞活率：

$$細胞活率\ (\%) = (A / B) \times 100\%$$

其中：A＝實驗孔(靶細胞+待測樣品+培養基)；B＝對照孔(靶細胞+培養基)

【0381】 應用軟體 GraphPad Prism 8 進行資料處理和作圖分析，經由四參數非線性擬合，得到抗體對靶細胞的結合曲線及 EC50 值等參數。

【0382】 圖 27 顯示了抗 5T4 的 HCAb PR004432 及其偶聯產物 PR004432-ADC、抗 BCMA 的 HCAb PR004433 的偶聯產物 PR004433-ADC、未偶聯的細胞毒化合物 mc-vc-PAB-MMAE 等待測樣品對高表達人 5T4 的細胞 HCC1954 的細胞毒性殺傷。僅 PR004432-ADC 能夠對 HCC1954 產生有效的特異性的細胞毒性殺傷，且呈現抗體濃度依賴性；mc-vc-PAB-MMAE 僅在最高濃度(60 nM)時有

殺傷效果，而其他分子都不能對細胞產生有效的殺傷。此結果證實了 PR004432-ADC 的靶點依賴的高特異性和高效力。

【0383】 實施例9HCAb PR004433的偶聯和分析

本實施例研究了抗 BCMA 的 HCAb 抗體 PR004433(SEQ ID NO: 70)與 mc-vc-PAB-MMAE 利用半胱胺酸偶聯到 Cys-220 位點來製備具有均一 DAR 值的抗體偶聯藥物。

【0384】 實施例9.1偶聯反應條件優化

以實施例 5.1 所得到的初步確定的優化偶聯反應條件為基礎，針對該抗體分子做進一步優化。如表 9-1 所示，平行用 6 組條件對純化的 HCAb PR004433 重組蛋白進行偶聯；還原劑選擇 TCEP，TCEP 用量在 1.7 – 2.1 莫耳倍數，選擇的藥物偶聯物為 mc-vc-PAB-MMAE，偶聯所用的藥物偶聯物用量為 7 莫耳倍數，反應時長為 2 小時。在本實驗中，還原或偶聯反應的 pH 為 6.5-7.0，溫度為室溫(25-30℃)。每組實驗的偶聯的產物用實施例 2.2 該 HIC-HPLC 分析方法分析其偶聯產物的組分，尤其是 DAR=2 的組分含量('D2 %')，列於表 9-1。偶聯結束之後，經由脫鹽管柱將產物去除多餘藥物偶聯物，並用實施例 4.2 該 HIC 方法純化偶聯產物，得到 DAR=2 的主要產物。

實驗#	**HCAb 濃度**	**TCEP 用量**	**VcMMAE 用量**	**偶聯產物 HIC-HPLC 分析結果**		
				平均 DAR	裸抗 %	D2 %
20041501	5.0 mg/ml	2.0 x	7.0 x	2.2		52.4%
20041601	5.0 mg/ml	1.7 x	7.0 x	2.1		52.7%
20042101	5.0 mg/ml	2.0 x	7.0 x	2.2		61.0%

20050601	5.0 mg/ml	2.1 x	7.0 x	2.0		53.9%
20050801	5.0 mg/ml	2.1 x	7.0 x	2.0		50.6%
20051201	5.0 mg/ml	2.1 x	7.0 x	1.8		56.1%

表 9-1 HCAb PR004433 的偶聯反應條件

【0385】 實施例9.2偶聯產物分析

本實施例利用高效液相色譜和質譜等技術對純化的重組 HCAb PR004433 和其偶聯產物 PR004433-ADC(包括偶聯後產物和經過一步 HIC 純化後的產物)進行定量分析，以確定其偶聯產物組分的構成。

【0386】 利用實施例 2.1 中該 SEC-HPLC 方法和實施例 2.2 中該 HIC-HPLC 方法對上述樣品進行分析。圖 28 和表 9-2 顯示了 HCAb PR004433 重組蛋白偶聯前的樣品的 SEC-HPLC 分析結果，顯示其純度高達 98%。圖 29 和表 9-3 顯示了偶聯產物 PR004433-ADC 經過一步 HIC 純化(實施例 4.2)後得到的產物的 HIC-HPLC 分析結果，顯示其 90.8%的組分是偶聯了 2 個化合物的產物(DAR=2)。圖 30 和下表分別顯示了 HCAb PR004433 及其偶聯產物 PR004433-ADC 的 HIC-HPLC 分析結果：(A) PR004433 偶聯前(表 9-4)；(B) 偶聯後，純化前(表 9-5)；(C) 偶聯及一步 HIC 純化後(表 9-6)。

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
< 6.5	0.86	
6.86	1.12	

7.73	98.02	HCAb 主峰

表 9-2 HCAb PR004433 (lot.# HSP314-02 K20200330-0409PA0409) 的 SEC-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
7.39	0.24	HCAb 裸抗峰
8.50	2.07	DAR=1 組分峰
9.38	90.80	DAR=2 組分峰
11.00	5.77	雜質或 DAR>2 組分峰
11.93	1.12	

表 9-3 PR004433-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP31402-ADC-20200521) 的 HIC-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
7.07	0.11	
7.77	99.89	HCAb 主峰

表 9-4 HCAb PR004433 (lot.# HSP314-02 K20200330-0409PA0409) 的 HIC-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
7.81	15.3	HCAb 裸抗峰
8.84	1.17	DAR=1 組分峰

9.78	52.74	DAR=2 組分峰
11.43	17.87	雜質或 DAR>2 組分峰
12.43	12.91	

表 9-5 PR004433-ADC 純化前樣品 (lot.# HSP31402-20041601) 的 HIC-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
8.45	1.77	DAR=1 組分峰
9.37	93.85	DAR=2 組分峰
11.02	4.38	雜質或 DAR>2 組分峰

表 9-6 PR004433-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP31402-20041601PA0416) 的 HIC-HPLC 分析結果

【0387】 利用實施例 2.4 中該方法(LC 儀器：Agilent 1290 UPLC；MS 儀器：AB Sceix X500B)對 PR004433-ADC 的純化後樣品進行分子量分析。在進行 LC-MS 分析之前，待測樣品經過去糖處理。圖 31 顯示了分子量分析的質譜反褶積處理圖譜：(A) PR004433-ADC 的非還原樣品；(B) PR004433-ADC 的還原樣品。按照實施例 5.2 中該分子量分析方法過程推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量及其在樣品中的含量(下表)。表 9-7 顯示了在 PR004433-ADC 的非還原樣品中，DAR=2 的組分是主要成分(占 98%)，推算出 PR004433-ADC 產物的平均 DAR 值為 2.02。相應地，如表 9-8 所示，在 PR004433-ADC 的還原樣品中，偶聯有 1 個化合物的重鏈(+1D)是主要成分(占 90.5%)，推算出 PR004433-ADC 產物的平均 DAR 值為 2.02。

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR004433 裸抗	78,797			0 %
PR004433 DAR=1	80,113	80,119	+ 6	0.8 %
PR004433 DAR=2	81,429	81,405~ 81,693	-24 ~ +264 *	98.1 %
PR004433 DAR=4	84,065	84,070	+ 5	0.5 %
PR004433 DAR=6	86,701	86,704	+ 3	0.5 %

表 9-7 PR004433-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP31402-ADC-20200521) 非還原分子量 LC-MS 分析

(* 可能包含 C'端未剪切 Lys (+ 128 Da) 或其他修飾帶來的分子量偏差)

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR004433 重鏈	39,400	39,403 ~ 39,503	+3 ~ +103	4.7 %
PR004433 重鏈 + 1D	40,716	40,585 ~ 40,847	-131 ~ +131 *	90.5 %
PR004433 重鏈 + 2D	42,032	42,037 ~ 42,164	+5 ~ +127	4.1 %
PR004433 重鏈 + 3D	43,348	43,353	+5	0.7 %

表 9-8 PR004433-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP31402-ADC-20200521) 還原分子量 LC-MS 分析

(* 可能包含 C'端未剪切 Lys (+ 128 Da) 或其他修飾帶來的分子量偏差)

【0388】 綜合以上多種分析手段的結果，可以推論出：利用半胱胺酸偶聯，偶聯產物中主要成分是 DAR=2 的組分，經過進一步 HIC 純化，可以得到純度 >90%的 DAR=2 高均質性的產物。

【0389】 實施例9.3用LC-MS肽圖分析化合物偶聯位點

本實施例利用實施例 8.3 中該方法來分析 PR004433-ADC 的偶聯位點。

【0390】 圖 34 顯示了利用 LC-MS 肽譜圖分析 PR004433-ADC 的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的 3 條肽段，以及相應的偶聯位點覆蓋率。分析所有含有 Cys 位點並發生偶聯修飾的肽段，每一條肽段對應的二級譜圖也經過逐一核對，以證實其發生的偶聯修飾均為高度可信的。例如，含有 SC(+1315.78)DK 的肽段占比 98%，這說明，98%的 Cys-220 位點被偶聯有化合物。類似地，只有 4%的 Cys-226 或 Cys-229 位點發生偶聯。

【0391】 實施例9.4結合BCMA高表達細胞

本實施例利用實施例 7.4 中該方法研究 HCAb 抗體 PR004433 或其偶聯產物 PR004433-ADC 與高表達人 BCMA 的 HEK293T 細胞株 HEK293T-hBCMA (北京康源博創, KC-0233) 、高表達人 BCMA 的細胞系 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 或不表達人 BCMA 的細胞系 SNU-16 (ATCC, CRL-5974) 等細胞的結合能力。

【0392】 圖 32 中所示， PR004433 和 PR004433-ADC 都可以與 HEK293T-hBCMA 細胞(圖 32 (A))和 NCI-H929 細胞(圖 32 (B))有較強的特異性結合；而且，PR004433 不能結合 BCMA 陰性細胞 SNU-16(圖 32 (C))。

【0393】 實施例9.5細胞毒性殺傷實驗

本實施例為了研究抗 BCMA 的抗體偶聯產物 PR004433-ADC 對高表達人 BCMA 的 HEK293T 細胞株 HEK293T-hBCMA (北京康源博創, KC-0233) 和高表達人 BCMA 的腫瘤細胞系 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 的特異性細胞殺傷活性，並且對不表達人 BCMA 的細胞 HEK293T (ATCC, CRL-11268) 和 SNU-16 (ATCC, CRL-5974) 沒有殺傷活性。

【0394】將 HEK293T-hBCMA、NCI-H929、HEK293T 和 SNU-16 細胞分別接種於 96 孔板 (Perkin Elmer, #6005225)，接種細胞數量分別為： 2500 細胞/50 μL/孔 (HEK293T-hBCMA) ，5000 細胞/50 μL/孔 (NCI-H929)，2500 細胞/50 μL/孔 (HEK293T)，5000 細胞/50 μL/孔 (SNU-16)。隨後於 37℃和 5% CO2 下孵育過夜。然後，以 50 μL/孔加入預先梯度稀釋的待測樣品，PR004433、PR004433-ADC 和 PR004432-ADC 從最高終濃度為 10 nM 以 3 倍濃度梯度稀釋，mc-vc-PAB-MMAE 從最高終濃度為 20 nM 以 3 倍濃度梯度稀釋；另設置不加待測樣品的孔為對照孔。接著，在 37℃和 5% CO2 環境下孵育 72 小時，加入 CellTiter-Glo 細胞活力檢測試劑 (Promega, #G7573)，室溫下孵育至少 10 分鐘得到穩定發光信號，酶標儀檢測發光值。將發光值按如下公式計算細胞活率：

$$細胞活率\ (\%) = (A / B) \times 100\%$$

其中：A = 實驗孔(靶細胞+待測樣品+培養基)；B = 對照孔(靶細胞+培養基)

【0395】應用軟體 GraphPad Prism 8 進行資料處理和作圖分析，經由四參數非線性擬合，得到抗體對靶細胞的結合曲線及 EC50 值等參數。

【0396】圖 33 顯示了抗 BCMA 的 HCAb PR004433 及其偶聯產物 PR004433-ADC、抗 5T4 的 HCAb PR004432 的偶聯產物 PR004432-ADC、未偶聯的細胞毒化合物 mc-vc-PAB-MMAE 等待測樣品對 BCMA 陽性細胞(HEK293T-hBCMA 和 NCI-H929)和 BCMA 陰性細胞(HEK293T 和 SNU-16)的細胞毒性殺傷。僅 PR004433-ADC 能夠對 BCMA 陽性細胞 HEK293T-hBCMA(圖 33 (A))和 NCI-H929(圖 33 (C))產生有效的特異性的細胞毒性殺傷，且呈現抗體濃度依賴性，對 BCMA 陰性細胞沒有細胞毒性；而其他分子都不能對細胞產生有效的殺傷。此結果證實了 PR004433-ADC 的靶點依賴的高特異性和高效力。

【0397】 實施例10HCAb PR004433的偶聯反應條件優化

在實施例 9 中已經研究了抗 BCMA 的 HCAb 抗體 PR004433(SEQ ID NO: 70)與 mc-vc-PAB-MMAE 利用半胱胺酸偶聯到 Cys-220 位點來製備具有均一 DAR 值的抗體偶聯藥物；但是如實施例 9.1 該實驗過程和表 9-1 所列出的反應條件和結果所示，其經過一步偶聯後的產物中，DAR=2 的組分含量('D2 %')約為 50-60%，需要經過一步 HIC 純化(實施例 4.2 該方法)來去除非主要組分得到高純度的 DAR=2 組分。

【0398】 本實施例進一步優化偶聯反應條件，使得經過一步偶聯後的產物中，DAR=2 的組分含量提高，減少了進一步純化的需求；更佳地，經過偶聯步驟後無需額外純化步驟即可以得到純度大於 90 % 的 DAR=2 高均質性的產物。

【0399】 實施例10.1偶聯反應條件優化

由於在還原和偶聯等反應過程中，多種反應條件如反應溫度、反應時間、反應緩衝液類型及 pH、還原劑類型及用量、偶聯物分子類型及用量等都可能帶來很大影響，因此在實施例 4.1 中該方法的基礎上，本實施例設計了一系列實驗，固定其中一些實驗條件參數，而對另一些實驗條件參數進行改變，嘗試得到更優的反應條件。具體地，本實施例使用了 17 組不同的還原和偶聯條件的組合對 HCAb PR004433 進行偶聯反應並對偶聯產物進行分析，相較於實施例 9 ，本實施例還進一步考察了反應緩衝液 pH 和還原反應溫度等參數對偶聯的影響。在本實驗中，PR004433 的濃度為 5 mg/ml；反應緩衝液為 20mM His-HCl，其 pH 可調節；還原劑為 TCEP，其莫耳當量可變；還原反應溫度和反應時長為變數；偶聯藥物分子為 mc-vc-PAB-MMAE(生產商：聯寧生物製藥，貨號：SET0201)，其莫耳當量可變；偶聯反應溫度為室溫，反應時長為 30 分鐘。表 10-1 列出了該 17

組實驗及其各反應條件參數。對於每組實驗，其偶聯產物利用實施例2.4中該方法(LC儀器：Agilent 1290 UPLC；MS儀器：AB Sceix X500B；樣品未經去糖預處理)進行非還原樣品的完整分子量分析，並利用每個樣品的質譜圖中的總離子流圖(TIC)並結合實施例 5.2 使用的分子量分析過程來推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量及其在樣品中的含量；分析結果列於表 10-2。在表 10-2 中，“D0 %”、“D2 %”、“D4 %”和“D6 %”分別表示沒有偶聯化合物(DAR=0)、偶聯了 2 個化合物(DAR=2)、偶聯了 4 個化合物(DAR=4)和偶聯了 6 個化合物(DAR=6)的組分的含量，並據此計算出平均 DAR 值。其中，實驗#8、#9、#11 和#12 產生的偶聯產物中 DAR=2 組分含量超過了 85%，其平均 DAR 值也非常接近 2.0；這四組實驗的偶聯產物樣品的質譜圖的 TIC 圖分別對應於圖 45 的(A)-(D)。

實驗#	**PR004433**	**反應緩衝液**	**還原反應條件**			**偶聯反應條件**		
	抗體濃度 (mg/ml)	20mM His-HCl, **pH**=	TCEP (當量)	溫度 (℃)	時長 (小時)	偶聯物 (當量)	溫度 (℃)	時長 (小時)
#1	5	5.0	1.5	37	2	7.0	室溫	0.5
#2	5	5.0	1.5	37	2	3.0	室溫	0.5
#3	5	5.0	1.9	37	2	7.0	室溫	0.5
#4	5	5.0	1.9	37	2	3.0	室溫	0.5
#5	5	5.0	2.1	37	2	7.0	室溫	0.5
#6	5	5.5	1.2	室溫	2	3.0	室溫	0.5

#7	5	5.5	1.2	0	2	3.0	室溫	0.5
#8	5	5.5	2.1	37	2	7.0	室溫	0.5
#9	5	5.5	2.1	37	2	3.0	室溫	0.5
#10	5	6.0	2.1	37	2	7.0	室溫	0.5
#11	5	6.0	3.0	0	1.5	3.0	室溫	0.5
#12	5	6.0	3.0	室溫	1.5	3.0	室溫	0.5
#13	5	6.5	2.1	37	2	7.0	室溫	0.5
#14	5	6.5	2.5	37	2	7.0	室溫	0.5
#15	5	6.5	3.0	37	2	7.0	室溫	0.5
#16	5	7.0	2.1	37	2	7.0	室溫	0.5
#17	5	8.0	2.1	37	2	7.0	室溫	0.5

表 10-1 PR004433 的偶聯反應條件

實驗#	**偶聯產物分析結果**					
	D0 %	D2 %	D4 %	D6 %	平均 DAR	圖 45 子圖
#1	16.7 %	78.4 %	2.2 %	2.7 %	1.82	
#2	22.3 %	72.1 %	2.5 %	3.0 %	1.72	
#3	7.4 %	84.0 %	3.3 %	5.3 %	2.13	
#4	8.6 %	81.0 %	4.3 %	6.0 %	2.15	
#5	2.1 %	80.5 %	6.0 %	11.4 %	2.53	

#6	36.6 %	63.4 %	0.0 %	0.0 %	1.27	
#7	63.6 %	36.4 %	0.0 %	0.0 %	0.73	
#8	**2.9 %**	**89.1 %**	**3.6 %**	**4.4 %**	**2.19**	**(A)**
#9	**3.9 %**	**87.3 %**	**4.7 %**	**4.1 %**	**2.18**	**(B)**
#10	17.1 %	82.9 %	0.0 %	0.0 %	1.66	
#11	**7.6 %**	**89.3 %**	**3.1 %**	**0.0 %**	**1.91**	**(C)**
#12	**2.8 %**	**93.5 %**	**2.8 %**	**1.0 %**	**2.04**	**(D)**
#13	34.2 %	65.8 %	0.0 %	0.0 %	1.32	
#14	31.1 %	68.9 %	0.0 %	0.0 %	1.38	
#15	31.3 %	68.7 %	0.0 %	0.0 %	1.37	
#16	80.4 %	19.6 %	0.0 %	0.0 %	0.39	
#17	84.7 %	15.3 %	0.0 %	0.0 %	0.31	

表 10-2 PR004433 偶聯後產物(不經過 HIC 純化)利用 LC-MS 分析其各組分的結果

【0400】特別地，實驗#12 產生的偶聯產物中 DAR=2 組分含量超過了 90%，其他組分含量極低，說明 HCAb PR004433 利用實驗#12 的反應條件可以產生高純度的偶聯產物，無需經過額外純化步驟，即可得到 DAR 值確定的高均一性的產物。這相較於實施例 9 中的偶聯方法是顯著的進步。

【0401】對實驗#12 產生的偶聯產物進一步利用實施例 9.3 中該方法來分析抗體偶聯藥物分子的偶聯位點，結果表明，96.22%的 Cys-220 位點被偶聯；類

似地，只有 6%的 Cys-226 或 Cys-229 位點發生偶聯。因此，實驗#12 產生的偶聯產物中是高均一性的定點偶聯於 Cys-220 的抗體偶聯藥物分子。

【0402】 本實施例充分地說明瞭，本申請的發明人對整個偶聯過程的各種反應條件進行了多次的嘗試和優化，找到了更優化的反應條件組合，在一些反應條件組合下，Cys-220 的二硫鍵可以被有效地打開而其他二硫鍵保持完整，使得 Cys-220 成為幾乎唯一的游離半胱胺酸殘基，進而作為特異性的偶聯位點。

【0403】 實施例11人IgG1鉸鏈區序列的變化

本實施例研究了基於人 IgG1 抗體重鏈鉸鏈區的天然序列(SEQ ID NO: 73)產生的連接肽變體序列中第一個 Cys(Cys1)和第二個 Cys(Cys2)之間所間隔的胺基酸的數目和種類，和對第一個 Cys 作為特異性定點偶聯位元點產生均一 CAR 值(偶聯物/抗原結合蛋白比)的偶聯產物的影響。

【0404】 實施例11.1改變HCAb PR004433的鉸鏈區連接肽以產生變體序列

本實施例在 HCAb PR004433 的基礎上，針對鉸鏈區設計了不同長度的隨機化引子經由蛋白工程改造產生一系列具有不同鉸鏈區連接肽的抗原結合蛋白。例如，利用表 11-1 中該引子，可以在 Cys1 和 Cys2 之間插入分別為 3、4、5、6、7、8、9 或 10 個任意胺基酸，以產生如 SEQ ID NOs: 74-81 任一所示連接肽序列。然後，每一種長度的連接肽隨機挑選 3 種不同突變序列進一步研究 Cys1 和 Cys2 之間的不同胺基酸組成，且 Cys1 和 Cys2 之間的胺基酸不能是半胱胺酸。隨後，在後續實施例中，具有不同長度和胺基酸組成的連接肽的抗原結合蛋白(PR004433 變體序列)利用前述方法進行表達純化，並與藥物偶聯物 mc-vc-PAB-MMAE 偶聯，分析偶聯產物的組分和偶聯位點。表 11-2 列出了一系列由隨機化產生的不同長度的連接肽序列。將 HCAb PR004433 的鉸鏈區序列替換成表

11-2 中的連接肽序列以產生多種 PR004433 衍生的抗原結合蛋白變體序列(表 11-3)，這些抗原結合蛋白的可變區和 Fc 恆定區之間的連接肽具有不同的長度和胺基酸組成。

引子	引子序列	SEQ ID NO
正向引子-3	5‘-ATTAGGTCACCGTCTCCTCAGAGCCCAAATCTTGTNNKNNNKNNKTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT -3'	136
正向引子-4	5‘-ATTAGGTCACCGTCTCCTCAGAGCCCAAATCTTGTNNKNNNKNNKNNKTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT -3'	137
正向引子-5	5‘-ATTAGGTCACCGTCTCCTCAGAGCCCAAATCTTGTNNKNNNKNNKNNKNNKTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT -3'	138
正向引子-6	5‘-ATTAGGTCACCGTCTCCTCAGAGCCCAAATCTTGTNNKNNNKNNKNNKNNKNNKTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT -3'	139
正向引子-7	5‘-ATTAGGTCACCGTCTCCTCAGAGCCCAAATCTTGTNNKNNNKNNKNNKNNKNNKNNKTGCCCACCGTGCCCAGCA	140

	CCTGAACTCCT -3'	
正向引子-8	5‘-ATTAGGTCACCGTCTCCTCAGAGCCCAAATCTTGTNNKNNNKNNNKNNNKNNNKNNNKNNNKTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT -3'	141
正向引子-9	5‘-ATTAGGTCACCGTCTCCTCAGAGCCCAAATCTTGTNNKNNNKNNNKNNNKNNNKNNNKNNNKNNNKTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT -3'	142
正向引子-10	5‘-ATTAGGTCACCGTCTCCTCAGAGCCCAAATCTTGTNNKNNNKNNNKNNNKNNNKNNNKNNNKNNNKNNNKTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT -3'	143
反向引子	5‘- ACTCGACTCGAGTCCCCCGGGATG -3’	144

表 11-1 隨機化引子列表 **(正向引子序列中 N 表示 A/T/G/C 中任一種鹼基，K 表示 G/T 中任一種鹼基)**

連接肽標識	**Cys1 和 Cys2 間隔的胺基酸數目**	**連接肽序列**	**SEQ ID NO**
hIgG1_hinge	5	EPKSCDKTHTCPPCP	73
Hinge3_5	3	EPKSCQPRCPPCP	82
Hinge3_6	3	EPKSCAGWCPPCP	83

Hinge3_18	3	EPKSCNVACPPCP	84
Hinge4_1	4	EPKSCTGKMCPPCP	85
Hinge4_6	4	EPKSCRDARCPPCP	86
Hinge4_15	4	EPKSCRGTLCPPCP	87
Hinge5_2	5	EPKSCQAESRCPPCP	88
Hinge5_12	5	EPKSCKDYGRCPPCP	89
Hinge5_13	5	EPKSCSDNHDCPPCP	90
Hinge6_4	6	EPKSCAPVRPWCPPCP	91
Hinge6_15	6	EPKSCSGPSTLCPPCP	92
Hinge6_18	6	EPKSCSAVPRRCPPCP	93
Hinge7_2	7	EPKSCAVLPEIGCPPCP	94
Hinge7_3	7	EPKSCWLYISDKCPPCP	95
Hinge7_19	7	EPKSCSYLFGRVCPPCP	96
Hinge8_8	8	EPKSCMPRLLFHSCPPCP	97
Hinge8_18	8	EPKSCSSDVVGGRCPPCP	98
Hinge8_20	8	EPKSCRMTVYGSRCPPCP	99
Hinge9_5	9	EPKSCLALPGVMSPCPPCP	100
Hinge9_7	9	EPKSCASMNRGGGGCPPCP	101
Hinge9_14	9	EPKSCGGGPFLWLVCPPCP	102

Hinge10_3	10	EPKSCQMSVFARHFPCPPCP	103
Hinge10_5	10	EPKSCSVGRFGSMLECPPCP	104
Hinge10_7	10	EPKSCITEWSVRDLQCPPCP	105

表 11-2 不同長度的連接肽

抗原結合蛋白	連接肽標識	連接肽 SEQ ID NO	多肽鏈 SEQ ID NO
PR004433	hIgG1_hinge	73	70
PR006031	Hinge3_5	82	106
PR006032	Hinge3_6	83	107
PR006033	Hinge3_18	84	108
PR006034	Hinge4_1	85	109
PR006035	Hinge4_6	86	110
PR006036	Hinge4_15	87	111
PR006037	Hinge5_2	88	112
PR006038	Hinge5_12	89	113
PR006039	Hinge5_13	90	114
PR006040	Hinge6_4	91	115
PR006041	Hinge6_15	92	116
PR006042	Hinge6_18	93	117
PR006310	Hinge7_2	94	118

PR006311	Hinge7_3	95	119
PR006312	Hinge7_19	96	120
PR006313	Hinge8_8	97	121
PR006314	Hinge8_18	98	122
PR006315	Hinge8_20	99	123
PR006316	Hinge9_5	100	124
PR006317	Hinge9_7	101	125
PR006318	Hinge9_14	102	126
PR006319	Hinge10_3	103	127
PR006320	Hinge10_5	104	128
PR006321	Hinge10_7	105	129

表 11-3 HCAb PR004433 的鉸鏈區序列替換成多種連接肽序列以產生不同衍生變體序列

【0405】 實施例11.2HCAb PR004433衍生的變體分子的表達和鑑定

表 11-3 中的 PR004433 衍生的抗原結合蛋白按照實施例 1.6 中該方法進行表達純化，並利用實施例 2.1 中該 SEC-HPLC 方法分析純度和利用實施例 2.7 中該 DSF 方法確定其最低熔解溫度(Tm1)。抗原結合蛋白的表達純化和熱穩定性分析結果列於表 11-4；由此可見，當 HCAb PR004433 的鉸鏈區序列替換成各種連接肽的變體序列後，且當 Cys1 和 Cys2 之間間隔至少 3 個其他胺基酸時，

PR004433 衍生的變體序列都能夠有效的表達，且絕大多數變體分子的表達產量和熱穩定性 Tm1 沒有受到影響。

抗原結合蛋白	連接肽標識	表達體系和體積	SEC-HPLC 純度 (%)	第一步純化後產量 (mg/L)	DSF Tm_1 (℃)
PR004433	hIgG1 hinge	CHO (1000ml)	98.86	35.2	55.8
PR006031	Hinge3_5	HEK293 (100ml)	99.05	186.6	54.8
PR006032	Hinge3_6	HEK293 (100ml)	96.89	180.7	56.6
PR006033	Hinge3_18	HEK293 (100ml)	95.66	218.3	54.6
PR006034	Hinge4_1	HEK293 (100ml)	99.65	184.8	55.2
PR006035	Hinge4_6	HEK293 (100ml)	99.33	206.5	54.4
PR006036	Hinge4_15	HEK293 (100ml)	99.55	202.7	54.2
PR006037	Hinge5_2	HEK293 (100ml)	98.95	207.5	55.4
PR006038	Hinge5_12	HEK293 (100ml)	99.58	227.9	54.6
PR006039	Hinge5_13	HEK293 (100ml)	99.23	106.2	55.6
PR006040	Hinge6_4	HEK293 (100ml)	98.65	142.4	54.6
PR006041	Hinge6_15	HEK293 (100ml)	99.12	166.8	55.2
PR006042	Hinge6_18	HEK293 (100ml)	99.05	167.2	54.4
PR006310	Hinge7_2	HEK293 (100ml)	98.68	218.0	55.0
PR006312	Hinge7_19	HEK293 (100ml)	99.18	171.9	52.8

PR006313	Hinge8_8	HEK293 (100ml)	97.28	79.0	49.2
PR006314	Hinge8_18	HEK293 (100ml)	99.34	201.9	55.2
PR006315	Hinge8_20	HEK293 (100ml)	99.38	99.4	51.8
PR006316	Hinge9_5	HEK293 (100ml)	99.15	89.7	53.6
PR006317	Hinge9_7	HEK293 (100ml)	99.33	170.6	55.0
PR006318	Hinge9_14	HEK293 (100ml)	86.91	18.7	47.4
PR006319	Hinge10_3	HEK293 (100ml)	100.00	114.6	52.8
PR006320	Hinge10_5	HEK293 (100ml)	97.80	145.4	53.6
PR006321	Hinge10_7	HEK293 (100ml)	94.49	193.8	55.2

表 11-4 PR004433 及其變體分子的表達純化和熱穩定性分析

【0406】本實施例進一步利用實施例 3.2 中該 LC-MS 分子量分析方法來確定不同的連接肽變體序列中 Cys1 的狀態。在 PR004433 衍生的變體序列中，Cys1(或 Cys-220)的狀態有如圖 3 所示的兩種可能性：形成或者不形成鏈間二硫鍵。如果 Cys1 沒有形成重鏈間二硫鍵，其側鏈巰基 (-SH) 會與環境中的含巰基分子(如，半胱胺酸或者谷胱甘肽)形成二硫鍵，使其實際分子量明顯大於理論分子量。將純化的抗原結合蛋白用糖苷酶 PNGase F 作去糖處理，並用實施例 2.4 該方法(LC 儀器：Agilent 1290 UPLC；MS 儀器：AB Sceix X500B)測定其完整(非還原)分子量，與相應的理論分子量進行比較；表 11-5 顯示了分子量的理論值和測定值是非常一致的，因此，該抗原結合蛋白的 Cys1 沒有聯結其他含巰基分子。

由此推斷出，當 Cys1 和 Cys2 之間間隔 3 個至 10 個其他胺基酸時，Cys1 能夠形成重鏈間二硫鍵(即第一連接肽的 Cys1 和第二連接肽的 Cys1 之間形成二硫鍵)。

抗原結合蛋白	連接肽標識	理論值 (Da)	測定值 (Da)	偏差 (Da)
PR006031	Hinge3_5	78,395	78,395.6	0.6
PR006032	Hinge3_6	78,261	78,261.4	0.4
PR006033	Hinge3_18	78,201	78,201.5	0.5
PR006034	Hinge4_1	78,467	78,467.8	0.8
PR006035	Hinge4_6	78,629	78,629.9	0.9
PR006036	Hinge4_15	78,487	78,487.9	0.9
PR006037	Hinge5_2	78,775	78,776.0	1
PR006038	Hinge5_12	78,871	78,872.2	1.2
PR006039	Hinge5_13	78,769	78,770.2	1.2
PR006040	Hinge6_4	79,046	79,046.7	0.7
PR006041	Hinge6_15	78,717	78,718.2	1.2
PR006042	Hinge6_18	78,966	78,966.9	0.9
PR006310	Hinge7_2	78,992	78,991.6	-0.4
PR006312	Hinge7_19	79,278	79,278.0	0
PR006313	Hinge8_8	79,596	79,596.3	0.3
PR006314	Hinge8_18	79,148	79,147.7	-0.3

PR006316	Hinge9_5	79,364	79,364.4	0.4
PR006317	Hinge9_7	79,208	79,207.8	-0.2
PR006318	Hinge9_14	79,486	79,486.5	0.5
PR006319	Hinge10_3	80,035	80,035.0	0
PR006320	Hinge10_5	79,760	79,760.7	0.7
PR006321	Hinge10_7	80,089	80,088.9	-0.1

表 11-5 PR004433 變體分子的純化後樣品的完整分子量 LC-MS 測定結果

【0407】本實施例還進一步利用實施例 9.4 中該方法研究 HCAb 抗體 PR004433 及其變體分子與高表達人 BCMA 的 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 細胞的結合能力。如圖 46 中所示，PR004433 變體分子結合 NCI-H929 的能力與親本分子 PR004433 的結合能力幾乎相同，說明對 PR004433 的鉸鏈區(連接肽)序列的改變不會影響其抗原結合片段與靶點的結合。

【0408】實施例11.3 HCAb PR004433衍生的變體分子的偶聯產物分析

本實施例還進一步利用實施例 10 中該偶聯方法對表 11-4 中所列的 PR004433 衍生的變體分子進行偶聯反應，在實施例 10.1 所得到的較優的反應條件參數的基礎上，經由改變還原劑 TCEP 的用量，來產生不同的偶聯反應產物。在本實驗中，具有不同連接肽的 PR004433 衍生的變體分子(PR006031、PR006034、PR006037、PR006040、PR006312、PR006314、PR006317 和 PR006320)的濃度為 5 mg/ml，反應緩衝液為含 20mM His-HCl 的 pH 6.0 緩衝液，還原劑 TCEP 的用量從 1.5 到 6.0 倍莫耳當量變化，還原反應於室溫 2 小時，偶聯物 mc-

vc-PAB-MMAE 的用量為 7.0 莫耳倍數，偶聯反應於室溫 0.5 小時；其偶聯產物不經過 HIC 純化步驟。進一步地，偶聯產物也利用實施例 10.1 所使用的分子量分析方法來推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量及其在樣品中的含量，分析結果列於表 11-6；例如，PR006031 中的連接肽的 Cys1 和 Cys2 間隔了 3 個胺基酸，當使用 2.0 當量的 TCEP 作為還原劑並利用上述反應參數進行偶聯，其偶聯產物中的 DAR=2 組分含量為 84.3%，偶聯產物的平均 DAR 值為 2.12；又例如，PR006320 中的連接肽的 Cys1 和 Cys2 間隔了 10 個胺基酸，當使用 3.0 當量的 TCEP 作為還原劑並利用上述反應參數進行偶聯，其偶聯產物中的 DAR=2 組分含量為 94.8%，偶聯產物的平均 DAR 值為 1.99。

抗原結合蛋白	連接肽標識	TCEP 當量	D2 %	(D4+D6) %	平均 DAR
PR006031	Hinge3_5	1.5	75.4%	2.8%	1.64
		2.0	84.3%	9.1%	2.12
		3.0	73.6%	25.1%	2.65
		4.0	61.4%	37.3%	3.02
		5.0	49.9%	47.8%	3.41
		6.0	42.8%	55.2%	3.69
PR006034	Hinge4_1	1.5	62.7%	2.2%	1.53
		2	69.7%	6.0%	1.90
		3	66.0%	16.5%	2.41
		4	57.2%	29.0%	2.94

		5	50.2%	36.8%	3.21
		6	41.1%	47.1%	3.69
PR006037	Hinge5_2	1.5	63.9%	0.0%	1.30
		2	63.0%	1.9%	1.36
		3	72.2%	4.7%	1.68
		4	80.9%	8.4%	2.03
		5	81.9%	11.6%	2.20
		6	80.1%	15.4%	2.35
PR006040	Hinge6_4	1.5	76.0%	2.4%	1.63
		2	83.0%	5.6%	1.91
		3	82.9%	13.1%	2.25
		4	73.6%	25.6%	2.60
		5	69.3%	29.8%	2.71
		6	60.4%	38.7%	2.95
PR006312	Hinge7_19	1.5	90.1%	2.9%	1.98
		2	89.4%	5.6%	2.10
		3	84.8%	13.9%	2.36
		4	79.2%	19.4%	2.53
		5	81.6%	17.4%	2.52

PR006314	Hinge8_18	1.5	51.9%	3.1%	1.18
		2	59.3%	5.2%	1.44
		3	65.0%	10.8%	1.84
		4	72.5%	17.0%	2.31
		5	68.7%	24.4%	2.59
PR006317	Hinge9_7	1.5	75.4%	7.7%	1.90
		2	78.8%	15.1%	2.36
		3	63.1%	32.7%	2.90
		4	58.3%	36.9%	3.21
		5	44.8%	49.9%	3.68
PR006320	Hinge10_5	1.5	78.7%	0.6%	1.66
		2	88.4%	0.9%	1.87
		3	94.8%	1.1%	1.99
		4	96.0%	1.5%	2.03
		5	97.1%	1.6%	2.03

表 11-6 PR004433 變體分子的偶聯產物(不經過 HIC 純化)利用 LC-MS 分析其各組分的結果

【0409】 本實施例說明瞭，當連接肽的 Cys1 和 Cys2 之間相隔至少 3 個其他胺基酸時，Cys1 能夠形成重鏈間二硫鍵(即第一連接肽的 Cys1 和第二連接肽的 Cys1 之間形成二硫鍵，此二硫鍵稱為“Cys1-Cys1”)，而且 Cys2 也能夠形成重鏈間二硫鍵(即第一連接肽的 Cys2 和第二連接肽的 Cys2 之間形成二硫鍵，此二硫鍵稱為“Cys2-Cys2”)。但是，二硫鍵 Cys1-Cys1 的穩定性可能弱於其他二硫鍵。在一些反應條件組合下，二硫鍵 Cys1-Cys1 可以被有效地打開而其他二硫鍵(例如，Cys2-Cys2)保持完整，使得 Cys1 成為幾乎唯一的游離半胱胺酸殘基，進而作為特異性的偶聯位點。使用含該連接肽的抗原結合蛋白產生的蛋白-藥物偶聯物，其偶聯位點在 Cys1 且 CAR(或 DAR)約為 2。

【0410】 實施例12 位於小鼠 IgG2c 鉸鏈區的偶聯和分析

本實施例研究了利用小鼠 IgG2c 抗體重鏈鉸鏈區(SEQ ID NO: 147)與 mc-vc-PAB-MMAE 經由半胱胺酸偶聯來製備抗體偶聯藥物。小鼠 IgG2c 的鉸鏈區具有三個半胱胺酸，第一半胱胺酸(Cys1)和第二半胱胺酸(Cys2)之間間隔了 5 個其他胺基酸殘基。

【0411】 在 HCAb PR004433(SEQ ID NO: 70)的基礎上，將其人 IgG1 鉸鏈區(SEQ ID NO: 73)部分替換成小鼠 IgG2c 抗體鉸鏈區序列(SEQ ID NO: 147)；即，將 PR004433 的 VH(SEQ ID NO: 62)與小鼠 IgG2c 抗體鉸鏈區(SEQ ID NO: 147)以及人 IgG1 重鏈恆定區 CH2 和 CH3 序列進行融合表達，得到新的 HCAb 分子 PR006468(SEQ ID NO: 148)。

【0412】 實施例12.1 PR006468的偶聯和分析

將 PR006468 按照實施例 1.6 中該方法進行表達純化，並利用實施例 2.1 中該 SEC-HPLC 方法分析純度。然後，進一步利用實施例 10 中該偶聯方法對純化的 PR006468 重組蛋白進行偶聯反應。

【0413】 在本實驗中，PR006468 的濃度為 1.75 mg/ml，反應緩衝液為含 20mM His-HCl pH 6.0 緩衝液，還原劑 TCEP 的用量為 7.0 倍莫耳當量，還原反應於 37°C 2 小時，偶聯物 mc-vc-PAB-MMAE 的用量為 7.0 莫耳當量，偶聯反應於室溫 0.5 小時。偶聯結束之後，經由脫鹽管柱將產物去除多餘藥物偶聯物，並用實施例 4.2 該方法純化偶聯產物 PR006468-ADC。

【0414】 利用實施例 2.4 中該方法(LC 儀器：Agilent 1290 UPLC；MS 儀器：AB Sceix X500B)對 PR006468-ADC 的純化後樣品進行分子量分析。在進行 LC-MS 分析之前，待測樣品經過去糖處理。圖 47 顯示了 PR006468-ADC 的非還原分子量分析的質譜反褶積處理圖譜。按照實施例 5.2 中該分子量分析方法過程推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量及其在樣品中的含量。表 12-1 顯示了在 PR006468-ADC 的非還原樣品中，DAR=2 的組分是主要成分(占 95.5 %)，並推算出 PR006468-ADC 產物的平均 DAR 值為 2.09。

組分	**理論值 (Da)**	**實驗值 (Da)**	**偏差 (Da)**	**含量**
PR006468 裸抗	80,091			0 %
PR006468 DAR=2	82,723	81,965~ 83,675	-758~+952 [*1]	95.5 %
PR006468 DAR=4	85,354	84,624	-730 [*2]	4.5 %

表 12-1 PR006468-ADC 純化後樣品 (lot.# CY20210203) 非還原分子量 LC-MS 分析

[*1] 可能存在 O 糖基化(+947 Da)；[*2] mc-vc-PAB-MMAE 可能發生部分斷裂(-762 Da)。

【0415】 實施例12.2用LC-MS肽圖分析化合物偶聯位點

本實施例利用實施例 8.3 中該方法來分析 PR006468-ADC 的偶聯位點。

【0416】 圖 48 顯示了利用 LC-MS 肽譜圖分析 PR006468-ADC 的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的 3 條肽段，以及相應的偶聯位點覆蓋率。分析所有含有 Cys 位點並發生偶聯修飾的肽段，每一條肽段對應的二級譜圖也經過逐一核對，以證實其發生的偶聯修飾均為高度可信的。例如，含有 C(+1315.78)PPLK 的肽段占比 90.8%(圖 71 顯示了該肽段的二級譜圖)，這說明，90.8%的小鼠鉸鏈區 Cys1 位點被偶聯有化合物。類似地，僅有 5.8%的 Cys2 位點發生偶聯。

【0417】 因而，小鼠 IgG2c 鉸鏈區序列也可以用於本發明所述的位點特異的半胱胺酸偶聯。

【0418】 實施例12.3結合BCMA高表達細胞

本實施例利用實施例 7.4 中該方法研究抗原結合蛋白 PR006468(包含小鼠 IgG2c 鉸鏈區)、PR004433(包含人 IgG1 鉸鏈區)及其偶聯產物 PR006468-ADC 和 PR004433-ADC 與高表達人 BCMA 的腫瘤細胞 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 的結合能力。

【0419】 圖 49 中所示，PR006468 和 PR004433 有相似的結合能力，相應地，PR006468-ADC 和 PR004433-ADC 也有相似的結合能力。這說明瞭，將抗原結合蛋白中的人 IgG1 鉸鏈區序列替換成小鼠 IgG2c 鉸鏈區序列，不會影響抗原結合蛋白及其偶聯產物的靶點結合能力。

【0420】 實施例12.4細胞毒性殺傷實驗

本實施例利用實施例 9.5 中該方法研究抗原結合蛋白 PR006468(包含小鼠 IgG2c 鉸鏈區)、PR004433(包含人 IgG1 鉸鏈區)及其偶聯產物 PR006468-ADC 和 PR004433-ADC 對高表達人 BCMA 的腫瘤細胞 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 的特異性細胞殺傷活性。

【0421】 圖 50 中所示，PR006468-ADC 和 PR004433-ADC 都對 NCI-H929 產生有效的特異性的細胞毒性殺傷，且呈現抗體濃度依賴性，而其他分子不能對細胞產生有效的殺傷；且 PR006468-ADC 和 PR004433-ADC 的靶細胞殺傷效力幾乎一致。這也說明瞭，具有小鼠 IgG2c 鉸鏈區序列的偶聯產物也能保留原有的功能。

【0422】 實施例13 scFv-Fc PR002129的偶聯和分析

本實施例研究了抗 ROR1 的抗原結合蛋白 PR002129(SEQ ID NO: 71)與 mc-vc-PAB-MMAE 利用半胱胺酸偶聯到 Cys-220 位點來製備具有均一 DAR 值的抗體偶聯藥物。PR002129 的序列來源於實施例 1.5 ，其含有人 IgG1 鉸鏈區序列。

【0423】 實施例13.1 偶聯反應條件優化

以實施例 5.1 所得到的初步確定的偶聯反應條件為基礎，並結合實施例 10.1 所得到的較優的反應條件參數，對該抗原結合蛋白進行偶聯。如表 13-1 所示，平行多組條件對純化的 scFv-Fc PR002129 重組蛋白進行偶聯。每組實驗的偶聯的產物用實施例 2.2 該 HIC-HPLC 分析方法分析其偶聯產物的組分，尤其是 DAR=2 的組分含量('D2 %')。偶聯結束之後，經由脫鹽管柱將產物去除多餘藥物偶聯物；並可選地，使用實施例 4.2 該方法純化偶聯產物，得到 DAR=2 的主要產物。其中，實驗#20210202-2 使用的反應條件為：反應緩衝液為含 20mM His-

HCl pH 6.0 緩衝液，還原劑 TCEP 的用量為 2.3 倍莫耳當量，還原反應於室溫 2 小時，偶聯物 mc-vc-PAB-MMAE 的用量為 7.0 莫耳當量，偶聯反應於室溫 0.5 小時。

實驗#	**蛋白濃度**	**TCEP 用量**	**VcMMAE 用量**	**偶聯產物 HIC-HPLC 分析結果**		
				平均 DAR	裸抗 %	D2 %
20081401	3.0 mg/ml	2.2 x	7.0 x		18.5%	59.2%
20210202-1	6.5 mg/ml	1.9 x	7.0 x			67.0%
20210202-2	6.5 mg/ml	2.3 x	7.0 x	2.07	10.3%	73.2%
20210202-3	6.5 mg/ml	2.5 x	7.0 x			68.0%

表 13-1 PR002129 的偶聯反應條件

【0424】 實施例13.2 偶聯產物分析

本實施例利用高效液相色譜和質譜等技術對純化的重組 PR002129 和其偶聯產物 PR002129-ADC(包括偶聯後產物和經過一步 HIC 純化後的產物)進行定量分析，以確定其偶聯產物組分的構成。

【0425】 利用實施例 2.2 中該 HIC-HPLC 方法對上述樣品進行分析。圖 51 和下表分別顯示了 PR002129 的偶聯產物 PR002129-ADC 的 HIC-HPLC 分析結果：(A) 偶聯後，純化前(表 13-2)；(B) 偶聯及一步 HIC 純化後(表 13-3)。偶聯產物 PR002129-ADC 在 HIC 純化前，其 DAR=2 的組分占比 73.2%，推算出的平均 DAR 值為 2.07；經過一步 HIC 純化後，其 97.9%的組分是 DAR=2。

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
11.86	10.28	DAR=0 組分峰
13.34	1.36	DAR=1 組分峰
15.54	73.2	DAR=2 組分峰
19.99	15.17	DAR=4 組分峰

表 13-2 PR002129-ADC 純化前樣品 (lot.# CY20210202) 的 HIC-HPLC 分析結果

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
8.30	97.9	DAR=2 組分峰

表 13-3 PR002129-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP31405-20200820) 的 HIC-HPLC 分析結果

【0426】 利用實施例 2.4 中該方法(LC 儀器：Agilent 1290 UPLC；MS 儀器：AB Sceix X500B)對 PR002129-ADC 的純化前和純化後樣品進行分子量分析。在進行 LC-MS 分析之前，待測樣品經過去糖處理。圖 52 顯示了分子量分析的質譜反褶積處理圖譜：(A) HIC 純化前樣品的非還原分子量；(B) HIC 純化後樣品的還原分子量；(C) HIC 純化後樣品的非還原分子量。按照實施例 5.2 中該分子量分析方法過程推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量及其在樣品中的含量(下表)。表 13-4 顯示了在 HIC 純化前的 PR002129-ADC 的非還原樣品中，DAR=2 的組分占比 74.1%，推算出的平均 DAR 值為 2.03。表 13-5 顯示了在純化後的 PR002129-ADC 的非還原樣品中，DAR=2 的組分是主要成分；相應地，如表 13-6 所示，在其還原樣品中，偶聯有 1 個化合物的重鏈(+1 D)是主要成分(占 88%)，推算出 PR002129-ADC 產物的平均 DAR 值為 1.9。

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR002129 裸抗	104,508	104,479 ~ 104,510	-29 ~ +2	13.8 %
PR002129 DAR=2	107,140	107,145 ~ 107,306	+5 ~ +166 [*1]	74.1 %
PR002129 DAR=4	109,771	109,780	+ 9	9.0 %
PR002129 重鏈 +3D [*2]	56,202	56,206	+ 4	3.1 %

表 13-4 PR002129-ADC 純化前樣品 (lot.# CY20210202) 非還原分子量 LC-MS 分析

[*1] 可能有部分糖化(+162Da)修飾存在；[*2] 由於鏈間的三個二硫鍵全部打開，在變性條件下以單條重鏈形式存在，因此重鏈+3D 即對應為 DAR=6 的組分。

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR002129 裸抗	104,508			
PR002129 DAR=1	105,824	105,848	+ 24 *	
PR002129 DAR=2	107,140	107,163	+ 23 *	主要

表 13-5 PR002129-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP31405-20200820) 非還原分子量 LC-MS 分析

(* 可能包含某些基團的氧化修飾帶來的分子量偏差)

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR002129 重鏈	52,255	52,258	+ 3	10 %
PR002129 重鏈 +1D	53,571	53,575	+ 4	88 %

PR002129 重鏈 +2D	54,887	54,892	+ 5	2 %

表 13-6 PR002129-ADC 純化後樣品 (lot.# HSP31405-20200820) 還原分子量 LC-MS 分析

【0427】 綜合以上多種分析手段的結果，可以推論出：利用半胱胺酸偶聯，偶聯產物中主要成分是 DAR=2 的組分，經過進一步 HIC 純化，可以得到純度約為 90%的 DAR=2 高均質性的產物。

【0428】 實施例13.3 用LC-MS肽圖分析化合物偶聯位點

本實施例利用實施例 8.3 中該方法來分析 PR002129-ADC 的偶聯位點。

【0429】 圖 53 顯示了利用 LC-MS 肽譜圖分析 PR002129-ADC 的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的 3 條肽段，以及相應的偶聯位點覆蓋率。分析所有含有 Cys 位點並發生偶聯修飾的肽段，每一條肽段對應的二級譜圖也經過逐一核對，以證實其發生的偶聯修飾均為高度可信的。例如，含有 SC(+1315.78)DK 的肽段占比 88%，這說明，88%的 Cys-220 位點被偶聯有化合物。

【0430】 實施例13.4 結合ROR1高表達細胞

本實施例是為了研究抗原結合蛋白 PR002129 及其偶聯產物 PR002129-ADC 結合高表達 ROR1 的細胞的活性。

【0431】 利用流式細胞術 FACS 測試抗原結合蛋白與高表達人 ROR1 的腫瘤細胞 PanC-1(ATCC, CRL-1469)的結合能力。具體地，消化細胞並用 DMEM 完全培養基重新懸浮，調整細胞密度為 1×10^{6} 細胞/mL。以 100 μL 細胞/孔接種於 96 孔 V 底板 (Corning, #3894)，隨後加入 100 μL /孔，2 倍於終濃度的 3 倍濃度梯度稀釋的待測結合蛋白。將細胞放置於 4℃，避光孵育 1 小時。之後，加入 100

μL /孔預冷 PBS 漂洗細胞兩次，於 500 g、4℃下離心 5 分鐘，棄上清。再加入 100 μL /孔螢光二抗 (Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific, Jackson ImmunoResearch Inc., #109-545-098, 1 : 500 稀釋)，4℃，避光孵育 30 分鐘。用 100 μL /孔預冷 PBS 洗滌細胞兩次，於 500 g、4℃下離心 5 分鐘，棄上清。最後，200 μL /孔預冷 PBS 重新懸浮細胞，使用 BD FACS CANTOII 流式細胞儀讀取螢光發光信號值，並用軟體 FlowJo v10 (FlowJo, LLC) 處理和分析資料。

【0432】 應用軟體 GraphPad Prism 8 進行資料處理和作圖分析，經由四參數非線性擬合，得到抗體對靶細胞的結合曲線及 EC50 值等參數。

【0433】 圖 54 中所示，PR002129 及其偶聯產物 PR002129-ADC 都與 PanC-1 細胞有很強的特異性結合活性，且結合能力相當。

【0434】 實施例14 SIRPa-Fc 融合蛋白的偶聯和分析

本實施例將本發明申請的藥物偶聯方法應用到非抗體類的融合蛋白上，利用該連接肽的第一個 Cys(例如，人 IgG1 鉸鏈區的 Cys-220)對融合蛋白進行位點特異性的偶聯。這是一種全新的嘗試，將藥物偶聯不局限於抗體，而是擴展到任意融合蛋白，只需要其含有該連接肽的結構；這說明瞭本發明申請的藥物偶聯方法具有通用性。

【0435】 ALX148 是人 SIRPa 的高親和力變體融合蛋白(Kauder SE 等人，PLoS ONE (2018) 13(8): e0201832)，其序列公開於專利 US10829771B2。與人 SIRPa 野生型序列相比，ALX148 與 CD47 親和力提高了約 3000 倍。

【0436】本實施例將 ALX148 中 SIRPa 變體部分序列與含有人 IgG1 鉸鏈區和 Fc 的序列(SEQ ID NO: 72)進行融合表達，得到 SIRPa-Fc 融合蛋白 PR006345(SEQ ID NO: 149)。隨後對 PR006345 進行偶聯和分析。

【0437】實施例14.1 偶聯反應條件優化

本實施例利用實施例 10 中該偶聯方法對 SIRPa-Fc 融合蛋白 PR006345 進行偶聯反應，在實施例 10.1 所得到的較優的反應條件參數的基礎上，經由改變還原劑 TCEP 的用量，來產生不同的偶聯反應產物。在本實驗中，PR006345 的濃度為 4.1 mg/ml，反應緩衝液為含 20mM His-HCl pH 6.0 緩衝液，還原劑 TCEP 的用量從 1.5 到 3.0 倍莫耳當量變化，還原反應於室溫 2 小時，偶聯物 mc-vc-PAB-MMAE 的用量為 7.0 莫耳倍數，偶聯反應於室溫 0.5 小時；其偶聯產物不經過 HIC 純化步驟。進一步地，偶聯產物也利用實施例 10.1 所使用的分子量分析方法來推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量及其在樣品中的含量，分析結果列於表 14-1。

實驗 #	TCEP 當量	D2 %	平均 DAR
1	1.5	88%	1.89
2	2.0	89%	2.23
3	3.0	74%	2.91

表 14-1 融合蛋白 PR006345 在不同反應條件的偶聯產物(不經過 HIC 純化)利用 LC-MS 分析其各組分的結果

【0438】 實驗#2 產生的偶聯產物利用 LC-MS 分子量分析方法測定出 DAR=2 組分含量為 89%，偶聯產物的平均 DAR 值為 2.23。

【0439】 實施例14.2偶聯產物分析

本實施例利用高效液相色譜和質譜等技術對 SIRPa-Fc 融合蛋白 PR006345 和實驗#2 產生的偶聯產物 PR006345-ADC(不經過 HIC 純化)進行分析，以確定其偶聯產物組分的構成。

【0440】 利用實施例 2.2 中該 HIC-HPLC 方法對上述樣品進行分析。圖 54 和表 14-2 顯示了未純化的偶聯產物 PR006345-ADC 的 HIC-HPLC 分析結果；其 DAR=2 的組分占比 75.4%，推算出的平均 DAR 值為 1.83。

【0441】 利用實施例 2.4 中該方法(LC 儀器：Agilent 1290 UPLC；MS 儀器：AB Sceix X500B)對未純化的偶聯產物 PR006345-ADC 進行分子量分析。在進行 LC-MS 分析之前，待測樣品經過去糖處理。圖 56 顯示了分子量分析的質譜反褶積處理圖譜。按照實施例 5.2 中該分子量分析方法過程推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量及其在樣品中的含量(表 14-3)；其 DAR=2 的組分占比 89%，推算出的平均 DAR 值為 2.23。

滯留時間 (分鐘)	**峰面積%**	**峰說明**
10.36	14.66	DAR=0 組分峰
12.27	2.67	DAR=1 組分峰
14.82	75.37	DAR=2 組分峰
19.68	7.30	DAR=4 組分峰

表 14-2 PR006345-ADC 純化前樣品 (lot.# CY20210202) 的 HIC-HPLC 分析結果

組分	理論值 (Da)	實驗值 (Da)	偏差 (Da)	含量
PR006345 DAR=0	78,640	78,640	0	3 %
PR006345 DAR=2	81,272	81,152 ~81,439	-120 ~ +167 [*1]	89 %
PR006345 DAR=4	83,904	83,910	+6	2 %
PR006345 重鏈 +3D [*2]	43,268	43,272	+4	7 %

表 14-3 PR006345-ADC 純化前樣品 (lot.# CY20210202) 非還原分子量 LC-MS 分析

[*1] 可能有部分糖化(+162Da)修飾存在；[*2] 由於鏈間的三個二硫鍵全部打開，在變性條件下以單條重鏈形式存在，因此重鏈+3D 即對應為 DAR=6 的組分。

【0442】 綜合以上多種分析手段的結果，可以推論出：利用半胱胺酸偶聯，SIRPa-Fc 融合蛋白的偶聯產物中主要成分是 DAR=2 的組分。

【0443】 實施例14.3 用LC-MS肽圖分析化合物偶聯位點

本實施例利用實施例 8.3 中該方法來分析 PR006345-ADC 的偶聯位點。

【0444】 圖 57 顯示了利用 LC-MS 肽譜圖分析 PR006345-ADC 的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的 3 條肽段，以及相應的偶聯位點覆蓋率。分析所有含有 Cys 位點並發生偶聯修飾的肽段，每一條肽段對應的二級譜圖也經過逐一核對，以證實其發生的偶聯修飾均為高度可信的。例如，含有 SC(+1315.78)DK 的肽段占比 92.45%，這說明，92.45%的 Cys-220 位點被偶聯有化合物。

【0445】 實施例14.4 結合CD47高表達細胞

本實施例是為了研究SIRPa-Fc融合蛋白PR006345及其偶聯產物PR006345-ADC結合高表達CD47的細胞的活性。

【0446】 利用流式細胞術 FACS 測試抗原結合蛋白與高表達人 CD47 的 CHOK1-hCD47 細胞(GenScript, M00581)的結合能力。具體地，消化細胞並用 DMEM 完全培養基重新懸浮，調整細胞密度為 1×10^{6}細胞/mL。以 100 μL 細胞/孔接種於 96 孔 V 底板 (Corning, #3894)，隨後加入 100 μL /孔，2 倍於終濃度的 3 倍濃度梯度稀釋的待測結合蛋白。將細胞放置於 4℃，避光孵育 1 小時。之後，加入 100 μL /孔預冷 PBS 漂洗細胞兩次，於 500 g、4℃下離心 5 分鐘，棄上清。再加入 100 μL /孔螢光二抗 (Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific, Jackson ImmunoResearch Inc., #109-545-098, 1 : 500 稀釋)，4℃，避光孵育 30 分鐘。用 100 μL /孔預冷 PBS 洗滌細胞兩次，於 500 g、4℃下離心 5 分鐘，棄上清。最後，200 μL /孔預冷 PBS 重新懸浮細胞，使用 BD FACS CANTOII 流式細胞儀讀取螢光發光信號值，並用軟體 FlowJo v10 (FlowJo, LLC) 處理和分析資料。

【0447】 應用軟體 GraphPad Prism 8 進行資料處理和作圖分析，經由四參數非線性擬合，得到抗體對靶細胞的結合曲線及 EC50 值等參數。

【0448】 圖 58 中所示，PR006345 及其偶聯產物 PR006345-ADC 都與 CD47 有很強的特異性結合活性，且結合能力相當。

【0449】 實施例15雙特異性抗原結合蛋白PR005744的偶聯和分析

本實施例利用抗原結合片段 VH 和抗原結合片段 Fab 構建了具有如圖 59 所示的四價雙特異性 Fab-HCAb 結構，並將本申請的藥物偶聯方法應用到該結構

上，利用該連接肽的第一個 Cys(例如，人 IgG1 鉸鏈區的 Cys-220)對其進行位點特異性的偶聯。

【0450】 該結構屬於如圖 42 (B) 所示的雙特異性對稱結構，其中一種抗原結合片段是 Fab，而另一種抗原結合片段是 VH。該結構雖然有兩條不同的多肽鏈(稱為短鏈和長鏈)，但是短鏈並不與長鏈的連接肽上的第一個 Cys(Cys-220)形成二硫鍵；因而在一些反應條件組合下，該 Cys 的二硫鍵可以被有效地打開而其他二硫鍵保持完整，使得該 Cys 可以作為定點偶聯位元點。

【0451】 實施例15.1 PR005744的構建和製備

本實施例利用抗 BCMA 的 HCAb PR004433 的 VH 序列(SEQ ID NO: 62)和抗 BCMA 的 IgG 抗體 PR000892 的 VH(SEQ ID NO: 130)和 VL 序列(SEQ ID NO: 131)構建如圖 59 所示的具有四價 Fab-HCAb 結構的雙特異性(雙結合表位)的抗原結合蛋白 PR005744。其中，PR000892 的序列公開於發明專利 CN111234020B。PR004433、PR000892 和 PR005744 的序列編號列於表 15-1 和表 15-2。

抗原結合蛋白	類型	VH	VL	重鏈	輕鏈
PR004433	HCAb	62		70	
PR000892	IgG1	130	131	132	133

表 15-1 本實施例所使用的單抗的序列編號表。

抗原結合蛋白	結構	短鏈	長鏈
PR005744	Fab-HCAb	134	135

表 15-2 本實施例所構建的雙特異性抗體的序列編號表。

【0452】 抗原結合蛋白 PR005744 利用實施例 1.6 中該方法進行製備。隨後，測試其結合 BCMA 的能力和其在 BCMA 高表達細胞 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 上內化的能力。

【0453】 實施例15.2 PR005744的內化作用

本實施例是為了研究靶向 BCMA 的抗原結合蛋白內化介導對表達人 BCMA 的細胞的殺傷。具體地，將 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 細胞以 2×10^5 個/孔接種至 96-孔板 (Beyotime, # FT018)；隨後加入用 FACS 緩衝液稀釋的 200 nM 待測抗原結合蛋白；然後置於 4℃孵育 1 小時；接著，取樣品於 37℃分別孵育不同時間(如 30 分鐘、1 小時、2 小時和 4 小時)；然後，離心並重新懸浮細胞，加入螢光二抗 (Jackson ImmunoResearch Inc., #109-545-098) 後再於 4℃孵育 30 分鐘。最後，使用流式細胞儀讀取螢光發光信號值，並用軟體 FlowJo v10 (FlowJo, LLC) 處理和分析資料。以 37℃孵育 0 分鐘(T0)時的螢光信號 MFI 為基線，不同孵育時間的樣品的 MFI 與 T0 的基線進行扣減並計算相對減少量，以此反映抗原結合蛋白的內化作用的效率。應用軟體 GraphPad Prism 8 進行資料處理和作圖分析。

【0454】 圖 60 中所示，雙特異性抗原結合蛋白 PR005744 顯示很強的內化作用，其在 30 分鐘內可以使超過 60%的 BCMA 被內化。

【0455】 實施例 15.3 PR005744的偶聯產物分析

進一步地，利用實施例 9.1 或實施例 10.1 中該方法對 PR005744 進行偶聯。在本實驗中，反應緩衝液為 20mM His-HCl pH 6.0；還原劑為 TCEP，其莫耳當量可變；還原反應於室溫 2 小時，偶聯物 mc-vc-PAB-MMAE 的用量為 7.0 莫耳倍數，偶聯反應於室溫 0.5 小時。對於每組實驗，其偶聯產物利用實施例 2.4 中該方法(LC 儀器：Agilent 1290 UPLC；MS 儀器：AB Sceix X500B)進行非還原樣

品去糖處理的完整分子量分析，並利用每個樣品的質譜圖中的總離子流圖或反褶積圖來推算出偶聯了不同數目的化合物的組分的分子量及其在樣品中的含量；分析結果列於表 15-3。例如，當使用該反應條件參數的組合(反應緩衝液為含 20mM His-HCl 的 pH 6.0 緩衝液，還原劑 TCEP 用量為 3.5 莫耳倍數，還原反應於室溫 2 小時，偶聯物 mc-vc-PAB-MMAE 的用量為 7.0 莫耳倍數，偶聯反應於室溫 0.5 小時)時，其偶聯產物中約 84%的組分是偶聯有 2 個藥物偶聯物的(即 DAR=2，D2 %)。

TCEP 當量	D0 %	D2 %	D4 %	D6 %	平均 DAR
2.0	23.1 %	71.8 %	4.0 %	1.1 %	1.66
2.5	21.2 %	72.6 %	5.1 %	1.1 %	1.72
3.5	6.4 %	84.1 %	7.1 %	2.4 %	2.11

表 15-3 PR005744 偶聯後產物(不經過 HIC 純化)利用 LC-MS 分析其各組分的結果

【0456】 實施例15.4 用LC-MS肽圖分析化合物偶聯位點

本實施例利用實施例 8.3 中該方法來分析 PR005744-ADC 的偶聯位點。

【0457】 圖 61 顯示了利用 LC-MS 肽譜圖分析 PR005744-ADC 的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的 3 條肽段，以及相應的偶聯位點覆蓋率。分析所有含有 Cys 位點並發生偶聯修飾的肽段，每一條肽段對應的二級譜圖也經過逐一核對，以證實其發生的偶聯修飾均為高度可信的。例如，含有 SC(+1315.78)DK 的肽段占比 99.07%，這說明，幾乎所有的 Cys-220 位點被偶聯

有化合物。這證實了藥物偶聯特異地發生於 PR005744 中連接肽的第一個 Cys(即 Cys-220)。

【0458】 實施例15.5 結合BCMA高表達細胞

本實施例利用實施例 7.4 中該方法研究 PR005744 及其偶聯產物 PR005744-ADC 與高表達人 BCMA 的腫瘤細胞 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 的結合能力。

【0459】 圖 62 中所示，PR005744 及其偶聯產物 PR005744-ADC 都能夠與 NCI-H929 細胞特異性地結合，且結合能力相當。

【0460】 實施例15.6細胞毒性殺傷實驗

本實施例利用實施例 9.5 中該方法研究 PR005744 及其偶聯產物 PR005744-ADC 對高表達人 BCMA 的腫瘤細胞 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 的特異性細胞殺傷活性。

【0461】 圖 63 中所示，PR005744-ADC 對 NCI-H929 產生有效的特異性的細胞毒性殺傷，且呈現濃度依賴性，而 PR005744 不能對細胞產生有效的殺傷。

【0462】 實施例16 HCAb PR004433-PROTAC的偶聯和分析

本實施例研究了抗 BCMA 的 HCAb 抗體 PR004433(SEQ ID NO: 70)與蛋白降解靶向嵌合體(PROTAC)利用半胱胺酸偶聯到 Cys-220 位點來製備抗體偶聯藥物。

【0463】 PROTAC 是一類能夠經由誘導靶蛋白的多聚泛素化而導致靶蛋白降解的化合物。PROTAC 的作用機理與傳統的細胞毒性小分子化合物如 MMAE 有很大的不同，分子結構也更為複雜。目前，PROTAC 雖然對不少靶點有較好的藥效，但是其組織選擇性卻比較有限，而且難以區分不同的細胞類型。有文獻報導，將 PROTAC 偶聯到結合 HER2 的抗體上，可以增強 PROTAC 的選

擇性，使其只能降解 HER2 陽性的腫瘤細胞中的靶點(Maneiro MA 等人，ACS Chem Biol. 2020;15(6):1306-1312.)。

【0464】本實施例使用的 PROTAC 是一種 BRD4 蛋白降解劑(結構如圖 64 所示)，其包含靶向 BET 的 PROTAC GNE-987 和含二硫化物的連接子。將該 PROTAC 作為藥物偶聯物，利用本發明申請的藥物偶聯方法對 HCAb 抗體 PR004433 進行位點特異性的偶聯。這是一種全新的嘗試，將藥物偶聯物不局限於傳統的細胞毒性化合物如 MMAE，而是擴展到其他載荷藥物類型；這說明瞭本發明申請的藥物偶聯方法具有通用性。

【0465】實施例16.1 PROTAC的偶聯反應和分析

本實施例利用實施例 10 中該偶聯方法及進一步改變的條件對 HCAb PR004433 進行偶聯反應，藥物偶聯物為一種 BRD4 蛋白降解劑化合物(結構見圖 64，分子量 1306.58 Da；生產商：MedChemExpress，貨號：HY-129938)，該化合物在本實施例中簡稱為 PROTAC。在偶聯實驗中，PR004433 的濃度為 5.0 mg/ml，反應緩衝液為含 20mM His-HCl pH 6.0 緩衝液，還原劑 TCEP 的用量為 3.0 莫耳當量，還原反應於室溫 2 小時；還原反應後用 30 kd 超濾管將產物置換到含 50mM Tris-HCl 的 pH 8.0 緩衝液中；偶聯物 PROTAC 的用量為 10.0 到 15.0 莫耳當量，偶聯反應於室溫 2 小時；其偶聯產物(PR004433-PROTAC)不經過 HIC 純化步驟。

【0466】在偶聯反應時，該 PROTAC 分子的甲碸基(Methylsulfonyl，CH3SO2)斷裂，暴露出反應性巯基，進而與抗體上的反應性巯基形成二硫鍵。因此，每一個 PROTAC 偶聯到抗體上使得總分子量增加 1226 Da。

【0467】 進一步地，利用實施例 2.4 中該方法(LC 儀器：Agilent 1290 UPLC；MS 儀器：AB Sceix X500B)對偶聯產物 PR004433-PROTAC 進行分子量分析。在進行 LC-MS 分析之前，待測樣品經過去糖處理。圖 65 顯示了 PR004433-PROTAC 的非還原分子量分析的質譜反褶積處理圖譜，並據此推算出偶聯了不同數目的 PROTAC 的組分的分子量及其在樣品中的含量。表 16-1 顯示了在 PR004433-PROTAC 的非還原樣品中，DAR=2 的組分是主要成分(占 66.4 %)，並推算出偶聯產物的平均 DAR 值為 1.6。

組分	**理論值 (Da)**	**實驗值 (Da)**	**偏差 (Da)**	**含量**
PR004433 裸抗	78,797	78,798	+ 1	28.4 %
PR004433 DAR=2	81,249	81,225 ~ 81,414	-24 ~ +165 [*]	66.4 %
PR004433 DAR=4	83,701	83,708	+ 7	3.5 %

表 16-1 PR004433-PROTAC 純化前樣品 (lot.# CY20210203) 非還原分子量 LC-MS 分析

[*] 可能有部分糖化(+162 Da)修飾存在。

【0468】 實施例16.2 結合BCMA高表達細胞

本實施例利用實施例 7.4 中該方法研究 HCAb PR004433 及其偶聯產物 PR004433-PROTAC 與高表達人 BCMA 的腫瘤細胞 NCI-H929 (ATCC, CRL-9068) 的結合能力。

【0469】 圖 66 中所示，PR004433 及其偶聯產物 PR004433-PROTAC 都能夠與 NCI-H929 細胞特異性地結合。

【0470】 實施例17 雙特異性抗原結合蛋白2129/4433的偶聯和分析

本實施例利用抗 BCMA 的 HCAb PR004433 的 VH 序列(SEQ ID NO: 62)和抗 ROR1 的抗體 PR002129 的 scFv 序列(具有如 SEQ ID NO: 60 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 63 所示的 VL)構建如圖 67 所示的具有非對稱結構的二價雙特異性的抗原結合蛋白 2129/4433。並將本發明申請的藥物偶聯方法應用到該結構上，利用該連接肽的第一個 Cys(例如，人 IgG1 鉸鏈區的 Cys-220)對其進行位點特異性的偶聯。

【0471】 該結構屬於如圖 42 (A) 所示的結構，但是其第一抗原結合片段和第二抗原結合片段具有不同的結構和胺基酸序列，該第一抗原結合片段是 VH 結構，該第二抗原結合片段是 scFv 結構，因而它是含有兩條不同多肽鏈的非對稱結構。第一多肽鏈含有第一連接肽(包含人 IgG1 鉸鏈區序列)，第二多肽鏈含有第二連接肽(包含人 IgG1 鉸鏈區序列)。第一連接肽上的第一個 Cys(Cys-220)和第二連接肽上的第一個 Cys(Cys-220)形成二硫鍵；因而在一些反應條件組合下，Cys-220 的二硫鍵可以被有效地打開而其他二硫鍵保持完整，使得該 Cys 可以作為定點偶聯位元點。

【0472】 實施例17.1 2129/4433的構建和製備

將編碼 PR004433 多肽鏈(SEQ ID NO: 70)的質粒和編碼 PR002129 多肽鏈(SEQ ID NO: 71)的質粒共轉染並按照實施例 1.6 中該方法進行表達和一步親和純化，其產物中有 PR004433 的同源二聚體(4433/4433)和 PR002129 的同源二聚體(2129/2129)以及 PR004433 和 PR002129 的各一條鏈形成的異源二聚體(2129/4433，圖 67)。其中，異源二聚體蛋白 2129/4433 是本實驗的目的蛋白。由於這三個組分(4433/4433，2129/2129，2129/4433)有不同的分子量和不同的等電

點(表 17-1)，因而可以利用離子交換層析或者分子尺寸排阻層析等方法對產物做進一步的分離，以得到純化的異源二聚體目的蛋白 2129/4433。

【0473】 進一步地，利用實施例 3.2 中該 LC-MS 分子量分析方法確認了異源二聚體蛋白 2129/4433 中 2129-鏈和 4433-鏈上的 Cys-220 之間形成了重鏈間二硫鍵。

組分	分子量理論值 (Da)	等電點預測值
2129/2129	104,508	9.40
4433/4433	78,797	7.14
2129/4433	91,652	8.92

表 17-1 計算不同二聚體組分的分子量和等電點

【0474】 實施例17.2 2129/4433的偶聯產物分析

利用實施例 10.1 中該方法對純化的異源二聚體蛋白 2129/4433 進行偶聯。在本實驗中，2129/4433 的濃度為 3.2 mg/ml，反應緩衝液為含 20mM His-HCl pH 6.0 緩衝液，還原劑 TCEP 的用量為 2.1～2.5 莫耳當量，還原反應於室溫 2 小時，偶聯物 mc-vc-PAB-MMAE 的用量為 7.0 莫耳當量，偶聯反應於室溫 0.5 小時。偶聯結束之後，經由脫鹽管柱將產物去除多餘藥物偶聯物，得到偶聯產物 2129/4433-ADC。可選地，進一步用實施例 4.2 該 HIC 方法純化偶聯產物。

【0475】 然後，利用實施例 2.2 中該 HIC-HPLC 方法對未經 HIC 純化的 2129/4433-ADC 樣品進行分析。圖 68 和表 17-2 顯示了 2129/4433-ADC 純化前樣

品的 HIC-HPLC 分析結果：在 HIC 純化前，其 DAR=2 的組分占比 68.7%，推算出的平均 DAR 值為 2.26。

滯留時間 (分鐘)	峰面積%	峰說明
12.88	7.05	DAR=0 組分峰
15.65	3.05	DAR=1 組分峰
17.12	68.72	DAR=2 組分峰
20.81	18.43	DAR=4 組分峰

表 17-2 偶聯產物 2129/4433-ADC 純化前樣品 (lot.# CY20210202) 的 HIC-HPLC 分析結果

【0476】 實施例17.3 用LC-MS肽圖分析化合物偶聯位點

本實施例利用實施例 8.3 中該方法來分析 2129/4433-ADC 的偶聯位點。

【0477】 圖 69 顯示了利用 LC-MS 肽譜圖分析 2129/4433-ADC 經 HIC 純化後樣品(DAR=2 的組分占比 100%)的化合物偶聯位點，包括篩選出的帶有偶聯位點的 3 條肽段，以及相應的偶聯位點覆蓋率。分析所有含有 Cys 位點並發生偶聯修飾的肽段，每一條肽段對應的二級譜圖也經過逐一核對，以證實其發生的偶聯修飾均為高度可信的。例如，含有 SC(+1315.78)DK 的肽段占比 99.6%(圖 72 顯示了該肽段的二級譜圖)；這說明，幾乎所有的 Cys-220 位點被偶聯有化合物。

【0478】 實施例18偶聯免疫調節激動劑分子

Toll 樣受體 9(TLR9)是廣泛表達於樹突狀細胞和巨噬細胞等免疫細胞中的重要受體分子，在人體先天免疫中發揮重要作用。CpG 寡核苷酸是 TLR9 的天然的激動型配體，TLR9 結合 CpG 後可以啟動免疫細胞。本實施例將 CpG 寡核苷酸

經由含馬來醯亞胺基團或巰基的連接子利用半胱胺酸偶聯到前述實施例中的抗原結合蛋白上得到偶聯產物。例如，抗 5T4 的 HCAb PR004432 與含 3'-端巰基修飾的 CpG 寡核苷酸 CpG-1826(序列 5'-tccatgacgttcctgacgtt-3')利用本發明該方法偶聯到該連接肽的 Cys1 位點(例如，Cys-220)來製備偶聯藥物 PR004432-CpG；抗 ROR1 的結合蛋白 PR002129 與 CpG 偶聯到 Cys-220 位點來製備偶聯藥物 PR002129-CpG；SIRPa-Fc 融合蛋白 PR006345 與 CpG 偶聯到 Cys-220 位點來製備偶聯藥物 PR006345-CpG。這些 CpG 偶聯藥物特異地識別腫瘤上的抗原靶點，利用腫瘤微環境內的免疫細胞上 Fc 受體介導內化並經由 CpG 啟動 TLR9，進一步啟動免疫細胞，利用多種機制提高抗腫瘤效果。

【0479】 前述詳細說明是以解釋和舉例的方式提供的，並非要限制所附申請專利範圍的範圍。目前本申請所列舉的實施方式的多種變化對本領域普通技術人員來說是顯而易見的，且保留在所附的申請專利範圍和其等同方案的範圍內。

【符號說明】無

【序列表】

<110> 大陸商和鉑醫藥(上海)有限責任公司(HARBOUR BIOMED (SHANGHAI) CO., LTD)

<120> 蛋白-藥物偶聯物和定點偶聯方法

<130> 0113-PA-025TW

<160> 149

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000020 HFWR1 Chothia, PR001046 HFWR1 Chothia, PR004433 HFWR1 Chothia

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 2
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000184 HFWR1 Chothia

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PR000453 HFWR1 Chothia

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000759 HFWR1 Chothia

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 5
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 HFWR1 Chothia

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 6
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004432 HFWR1 Chothia

<400> 6

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser
20 25

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000020 HCDR1 Chothia

<400> 7

Gly Leu Asn Val Ser Arg His
1 5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000184 HCDR1 Chothia

<400> 8

Gly Phe Thr Val Ser Lys Asn
1 5

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000453 HCDR1 Chothia

<400> 9

Gly Arg Thr Phe
1

<210> 10
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000759 HCDR1 Chothia

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
1 5

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR001046 HCDR1 Chothia

<400> 11

Gly Phe Thr Val Ser Asp Asn
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 HCDR1 Chothia

<400> 12

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004432 HCDR1 Chothia

<400> 13

Gly Asp Ser Val Ser Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 14

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004433 HCDR1 Chothia

<400> 14

Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
1 5

<210> 15
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000020 HFWR2 Chothia

<400> 15

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Ile

<210> 16
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000184 HFWR2 Chothia

<400> 16

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10 15

Ser Val Val

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PR000453 HFWR2 Chothia

<400> 17

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
1 5 10 15

Ala Ala Ile

<210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000759 HFWR2 Chothia

<400> 18

Ala Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
1 5 10 15

Ala Val Ile

<210> 19
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR001046 HFWR2 Chothia, PR004433 HFWR2 Chothia

<400> 19

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10 15

Ser Val Ile

<210> 20
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 HFWR2 Chothia

<400> 20

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Ile

<210> 21
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PRO04432 HFWR2 Chothia

<400> 21

Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
1 5 10 15

Gly Arg Thr

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PRO00020 HCDR2 Chothia

<400> 22

Tyr Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PRO00184 HCDR2 Chothia

<400> 23

Tyr Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000453 HCDR2 Chothia

<400> 24

Ser Leu Ser Pro Thr Leu
1 5

<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000759 HCDR2 Chothia

<400> 25

Trp Tyr Asp Gly Arg Asn
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR001046 HCDR2 Chothia

<400> 26

Phe Ser Gly Gly Asn
1 5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 HCDR2 Chothia

<400> 27

Trp Tyr Asp Gly Ser Asn

1 5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004432 HCDR2 Chothia

<400> 28

Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
1 5

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004433 HCDR2 Chothia

<400> 29

Phe Ser Gly Gly Arg
1 5

<210> 30
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000020 HFWR3 Chothia

<400> 30

Ile Glu Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Thr Glu
20 25 30

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

<210> 31
<211> 41

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000184 HFWR3 Chothia

<400> 31

Lys Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

<210> 32
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000453 HFWR3 Chothia

<400> 32

Ala Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Thr Val Val Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala
35 40

<210> 33
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000759 HFWR3 Chothia

<400> 33

Glu Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

<210> 34
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR001046 HFWR3 Chothia

<400> 34

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

<210> 35
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 HFWR3 Chothia

<400> 35

Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

<210> 36
<211> 41

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004432 HFWR3 Chothia

<400> 36

Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp
1 5 10 15

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Arg Val Thr Pro Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

<210> 37
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004433 HFWR3 Chothia

<400> 37

Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000020 HCDR3 Chothia

<400> 38

Ala Ile Pro Arg Pro His Gly Ser Asp Ile
1 5 10

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000184 HCDR3 Chothia

<400> 39

Ala Val Pro His Ser Pro Ser Ser Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000453 HCDR3 Chothia

<400> 40

Asp Arg Lys Ser Val Met Ser Ile Arg Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 41
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000759 HCDR3 Chothia

<400> 41

Gly Arg Gly Val Leu Gly Asp Thr Arg Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR001046 HCDR3 Chothia, PR004433 HCDR3 Chothia

<400> 42

Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 HCDR3 Chothia

<400> 43

Glu Gln Ala Arg Ser Phe Asp Leu
1 5

<210> 44
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004432 HCDR3 Chothia

<400> 44

Asp Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Pro Val Asp Ala Leu Asp Ile
1 5 10 15

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000020 HFWR4 Chothia, PR000184 HFWR4 Chothia, PR000759 HFWR4 Chothia

<400> 45

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000453 HFWR4 Chothia

<400> 46

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 HFWR4 Chothia

<400> 47

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 48
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 LFWR1 Chothia

<400> 48

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Tyr Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 LCDR1 Chothia

<400> 49

Arg Ala Ser Gln Thr Ile Asn Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 50
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 LFWR2 Chothia

<400> 50

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 LCDR2 Chothia

<400> 51

Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 52
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 LFWR3 Chothia

<400> 52

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 LCDR3 Chothia

<400> 53

Gln Gln Tyr Lys Leu Tyr Ser Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 LFWR4 Chothia

<400> 54

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 55
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000020 VH

<400> 55

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Asn Val Ser Arg His
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Tyr Ser Gly Gly Gly Ile Glu Tyr Val Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Arg Ser Leu Arg Thr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Ile Pro Arg Pro His Gly Ser Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 56
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000184 VH

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Val Ser Lys Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Val Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Val Pro His Ser Pro Ser Ser Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000453 VH

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Thr Met Gly
            20                  25                  30

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
        35                  40                  45

Ser Leu Ser Pro Thr Leu Ala Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg
    50                  55                  60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Val Leu Gln Met
65                  70                  75                  80

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp
                85                  90                  95

Arg Lys Ser Val Met Ser Ile Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 58
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000759 VH

<400> 58

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
            20                  25                  30

Ala Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Glu Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Gly Val Leu Gly Asp Thr Arg Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR001046 VH

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Asn
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 VH

<400> 60

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gln Ala Arg Ser Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004432 VH

<400> 61

```
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1               5                   10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Asn Asn
            20                  25                  30

Tyr Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
    50                  55                  60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65                  70                  75                  80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Arg Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
                85                  90                  95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Pro Val
            100                 105                 110

Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 62
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004433 VH

<400> 62

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
```

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 VL

<400> 63

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Tyr Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Leu Tyr Ser Pro
85 90 95

Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 64
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000020 HC

<400> 64

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Asn Val Ser Arg
20 25 30

His Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ala Val Ile Tyr Ser Gly Gly Gly Ile Glu Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Thr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Ile Pro Arg Pro His Gly Ser Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
115 120 125

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
130 135 140

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
145 150 155 160

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
165 170 175

```
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
            180                 185                 190

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
        195                 200                 205

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
    210                 215                 220

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
225                 230                 235                 240

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
                245                 250                 255

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
            260                 265                 270

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
        275                 280                 285

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
    290                 295                 300

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
305                 310                 315                 320

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
                325                 330                 335

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 65
<211> 351
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000184 HC

<400> 65

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Val Ser Lys Asn
            20                  25                  30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Val Val Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Ala Val Pro His Ser Pro Ser Ser Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
        115                 120                 125

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
    130                 135                 140

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
145                 150                 155                 160

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
                165                 170                 175

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
            180                 185                 190

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
        195                 200                 205

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
    210                 215                 220
```

```
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
225                 230                 235                 240

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
                245                 250                 255

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
            260                 265                 270

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
        275                 280                 285

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
    290                 295                 300

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
305                 310                 315                 320

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
                325                 330                 335

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 66
<211> 350
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000453 HC

<400> 66

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Thr Met Gly
            20                  25                  30

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
        35                  40                  45
```

Ser Leu Ser Pro Thr Leu Ala Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Val Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp
85 90 95

Arg Lys Ser Val Met Ser Ile Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
115 120 125

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
130 135 140

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
145 150 155 160

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
165 170 175

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
180 185 190

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
195 200 205

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
210 215 220

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
225 230 235 240

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
245 250 255

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
260 265 270

```
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
        275                 280                 285

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
    290                 295                 300

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
305                 310                 315                 320

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
                325                 330                 335

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 67
<211> 354
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000759 HC

<400> 67

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
            20                  25                  30

Ala Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Glu Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

```
Ala Arg Gly Arg Gly Val Leu Gly Asp Thr Arg Ala Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp
        115                 120                 125

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
    130                 135                 140

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
145                 150                 155                 160

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
                165                 170                 175

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
            180                 185                 190

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
        195                 200                 205

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
    210                 215                 220

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
225                 230                 235                 240

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
                245                 250                 255

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
            260                 265                 270

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
        275                 280                 285

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
    290                 295                 300

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
305                 310                 315                 320
```

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
325 330 335

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
340 345 350

Gly Lys

<210> 68
<211> 354
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR001046 HC

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Asn
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp
115 120 125

```
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
    130                 135                 140

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
145                 150                 155                 160

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
                165                 170                 175

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
            180                 185                 190

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
        195                 200                 205

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
    210                 215                 220

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
225                 230                 235                 240

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
                245                 250                 255

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
            260                 265                 270

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
        275                 280                 285

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
    290                 295                 300

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
305                 310                 315                 320

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
                325                 330                 335

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
            340                 345                 350
```

Gly Lys

<210> 69
<211> 360
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004432 HC

<400> 69

```
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Asn Asn
            20                  25                  30

Tyr Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
    50                  55                  60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65                  70                  75                  80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Arg Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
                85                  90                  95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Pro Val
            100                 105                 110

Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
    130                 135                 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145                 150                 155                 160
```

```
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
                165                 170                 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
            180                 185                 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
        195                 200                 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
    210                 215                 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225                 230                 235                 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
                245                 250                 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
            260                 265                 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
        275                 280                 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
    290                 295                 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305                 310                 315                 320

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
                325                 330                 335

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
            340                 345                 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        355                 360
```

<210> 70
<211> 354

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR004433 HC

<400> 70

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp
        115                 120                 125

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
    130                 135                 140

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
145                 150                 155                 160

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
                165                 170                 175

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
            180                 185                 190
```

```
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
        195                 200                 205

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
    210                 215                 220

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
225                 230                 235                 240

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
                245                 250                 255

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
            260                 265                 270

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
        275                 280                 285

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
    290                 295                 300

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
305                 310                 315                 320

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
                325                 330                 335

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
            340                 345                 350

Gly Lys
```

<210> 71
<211> 478
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR002129 SCFV

<400> 71

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Gln Ala Arg Ser Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Tyr Ser Leu Ser
    130                 135                 140

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr
145                 150                 155                 160

Ile Asn Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
                165                 170                 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
            180                 185                 190

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
        195                 200                 205

Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys
    210                 215                 220
```

```
Leu Tyr Ser Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
225                 230                 235                 240

Lys Gly Gly Gly Ala Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
                245                 250                 255

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
            260                 265                 270

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
        275                 280                 285

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
    290                 295                 300

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
305                 310                 315                 320

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
                325                 330                 335

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
            340                 345                 350

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
        355                 360                 365

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
    370                 375                 380

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
385                 390                 395                 400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
                405                 410                 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
            420                 425                 430

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
        435                 440                 445
```

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
450 455 460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 72
<211> 232
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<223> 人 IgG1 Fc (包括鉸鍊區)

<400> 72

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 73
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<223> 人 IgG1 鉸鍊區

<400> 73

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人 IgG1 鉸鍊區 var. C220-X3

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(8)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 74

Glu Pro Lys Ser Cys Xaa Xaa Xaa Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 75
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人 IgG1 鉸鍊區 var. C220-X4

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(9)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 75

Glu Pro Lys Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人 IgG1 鉸鍊區 var. C220-X5

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(10)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 76

Glu Pro Lys Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 77
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人 IgG1 鉸鍊區 var. C220-X6

<220>
<221> misc_feature

<222> (6)..(11)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 77

Glu Pro Lys Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 78
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人 IgG1 鉸鍊區 var. C220-X7

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(12)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 78

Glu Pro Lys Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

Pro

<210> 79
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人 IgG1 鉸鍊區 var. C220-X8

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(13)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 79

Glu Pro Lys Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro

<210> 80
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人 IgG1 鉸鍊區 var. C220-X9

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(14)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 80

Glu Pro Lys Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro

<210> 81
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人 IgG1 鉸鍊區 var. C220-X10

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(15)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 81

Glu Pro Lys Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
1 5 10 15

Pro Pro Cys Pro
20

<210> 82
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge3_5

<400> 82

Glu Pro Lys Ser Cys Gln Pro Arg Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 83
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge3_6

<400> 83

Glu Pro Lys Ser Cys Ala Gly Trp Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 84
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge3_18

<400> 84

Glu Pro Lys Ser Cys Asn Val Ala Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 85
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge4_1

<400> 85

Glu Pro Lys Ser Cys Thr Gly Lys Met Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 86
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge4_6

<400> 86

Glu Pro Lys Ser Cys Arg Asp Ala Arg Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 87
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge4_15

<400> 87

Glu Pro Lys Ser Cys Arg Gly Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 88
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge5_2

<400> 88

Glu Pro Lys Ser Cys Gln Ala Glu Ser Arg Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 89
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge5_12

<400> 89

Glu Pro Lys Ser Cys Lys Asp Tyr Gly Arg Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 90
<211> 15
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge5_13

<400> 90

Glu Pro Lys Ser Cys Ser Asp Asn His Asp Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 91
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge6_4

<400> 91

Glu Pro Lys Ser Cys Ala Pro Val Arg Pro Trp Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 92
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge6_15

<400> 92

Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Pro Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 93
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge6_18

<400> 93

Glu Pro Lys Ser Cys Ser Ala Val Pro Arg Arg Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 94
<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge7_2

<400> 94

Glu Pro Lys Ser Cys Ala Val Leu Pro Glu Ile Gly Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

Pro

<210> 95
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge7_3

<400> 95

Glu Pro Lys Ser Cys Trp Leu Tyr Ile Ser Asp Lys Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

Pro

<210> 96
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge7_19

<400> 96

Glu Pro Lys Ser Cys Ser Tyr Leu Phe Gly Arg Val Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

Pro

<210> 97
<211> 18
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge8_8

<400> 97

Glu Pro Lys Ser Cys Met Pro Arg Leu Leu Phe His Ser Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro

<210> 98
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge8_18

<400> 98

Glu Pro Lys Ser Cys Ser Ser Asp Val Val Gly Gly Arg Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro

<210> 99
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge8_20

<400> 99

Glu Pro Lys Ser Cys Arg Met Thr Val Tyr Gly Ser Arg Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro

<210> 100
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge9_5

<400> 100

Glu Pro Lys Ser Cys Leu Ala Leu Pro Gly Val Met Ser Pro Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro

<210> 101
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge9_7

<400> 101

Glu Pro Lys Ser Cys Ala Ser Met Asn Arg Gly Gly Gly Gly Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro

<210> 102
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge9_14

<400> 102

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Pro Phe Leu Trp Leu Val Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro

<210> 103
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge10_3

<400> 103

Glu Pro Lys Ser Cys Gln Met Ser Val Phe Ala Arg His Phe Pro Cys
1 5 10 15

Pro Pro Cys Pro
20

<210> 104
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge10_5

<400> 104

Glu Pro Lys Ser Cys Ser Val Gly Arg Phe Gly Ser Met Leu Glu Cys
1 5 10 15

Pro Pro Cys Pro
20

<210> 105
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Hinge10_7

<400> 105

Glu Pro Lys Ser Cys Ile Thr Glu Trp Ser Val Arg Asp Leu Gln Cys
1 5 10 15

Pro Pro Cys Pro
20

<210> 106
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PR006031 鏈

<400> 106

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Gln
        115                 120                 125

Pro Arg Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
    130                 135                 140

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
        195                 200                 205
```

```
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
    290                 295                 300

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 107
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006032 鏈

<400> 107

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30
```

```
Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Ala
        115                 120                 125

Gly Trp Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
    130                 135                 140

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
        195                 200                 205

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255
```

```
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
    290                 295                 300

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305                 310                 315                 320

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                325                 330                 335

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340                 345                 350
```

<210> 108
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006033 鏈

<400> 108

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80
```

```
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asn
        115                 120                 125

Val Ala Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
    130                 135                 140

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145                 150                 155                 160

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                165                 170                 175

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            180                 185                 190

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
        195                 200                 205

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    210                 215                 220

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225                 230                 235                 240

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                245                 250                 255

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            260                 265                 270

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        275                 280                 285

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
    290                 295                 300
```

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305 310 315 320

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
325 330 335

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340 345 350

<210> 109
<211> 353
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006034 鏈

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Thr
115 120 125

```
Gly Lys Met Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
    130                 135                 140

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
145                 150                 155                 160

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                165                 170                 175

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
            180                 185                 190

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
        195                 200                 205

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
    210                 215                 220

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
225                 230                 235                 240

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                245                 250                 255

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
            260                 265                 270

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
        275                 280                 285

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
    290                 295                 300

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
305                 310                 315                 320

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
                325                 330                 335

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350
```

Lys

<210> 110
<211> 353
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006035 鏈

<400> 110

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Arg
115 120 125

Asp Ala Arg Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
145 150 155 160

```
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                165                 170                 175

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
            180                 185                 190

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
        195                 200                 205

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
    210                 215                 220

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
225                 230                 235                 240

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                245                 250                 255

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
            260                 265                 270

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
        275                 280                 285

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
    290                 295                 300

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
305                 310                 315                 320

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
                325                 330                 335

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            340                 345                 350

Lys
```

<210> 111
<211> 353
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006036 鏈

<400> 111

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Arg
        115                 120                 125

Gly Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
    130                 135                 140

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
145                 150                 155                 160

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                165                 170                 175

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
            180                 185                 190
```

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
195 200 205

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
210 215 220

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
225 230 235 240

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
245 250 255

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
260 265 270

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
275 280 285

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
290 295 300

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
305 310 315 320

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
325 330 335

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
340 345 350

Lys

<210> 112
<211> 354
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006037 鏈

<400> 112

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

```
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Gln
        115                 120                 125

Ala Glu Ser Arg Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
    130                 135                 140

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
145                 150                 155                 160

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
                165                 170                 175

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
            180                 185                 190

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
        195                 200                 205

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
    210                 215                 220
```

```
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
225                 230                 235                 240

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
                245                 250                 255

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
            260                 265                 270

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
        275                 280                 285

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
    290                 295                 300

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
305                 310                 315                 320

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
                325                 330                 335

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
            340                 345                 350

Gly Lys
```

<210> 113
<211> 354
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006038 鏈

<400> 113

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
```

35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Lys
115 120 125

Asp Tyr Gly Arg Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
165 170 175

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
180 185 190

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
195 200 205

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
210 215 220

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
225 230 235 240

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
245 250 255

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
260 265 270

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
275 280 285

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
290 295 300

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
305 310 315 320

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
325 330 335

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
340 345 350

Gly Lys

<210> 114
<211> 354
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006039 鏈

<400> 114

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Ser
115 120 125

Asp Asn His Asp Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
145 150 155 160

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
165 170 175

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
180 185 190

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
195 200 205

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
210 215 220

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
225 230 235 240

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
245 250 255

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
260 265 270

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
275 280 285

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
290 295 300

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
305 310 315 320

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
325 330 335

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
340 345 350

Gly Lys

<210> 115
<211> 355
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006040 鏈

<400> 115

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Ala
115 120 125

Pro Val Arg Pro Trp Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
145 150 155 160

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
165 170 175

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
180 185 190

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
195 200 205

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
210 215 220

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
225 230 235 240

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
245 250 255

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
260 265 270

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
275 280 285

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
290 295 300

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
305 310 315 320

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
325 330 335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
340 345 350

Pro Gly Lys
355

<210> 116
<211> 355
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006041 鏈

<400> 116

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Ser
115 120 125

Gly Pro Ser Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

```
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
145                 150                 155                 160

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
                165                 170                 175

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
            180                 185                 190

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
        195                 200                 205

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
    210                 215                 220

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
225                 230                 235                 240

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
                245                 250                 255

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
            260                 265                 270

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
        275                 280                 285

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
    290                 295                 300

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
305                 310                 315                 320

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
                325                 330                 335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
            340                 345                 350
```

Pro Gly Lys
355

<210> 117
<211> 355
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006042 鏈

<400> 117

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Ser
115 120 125

Ala Val Pro Arg Arg Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
145 150 155 160

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

165 170 175

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
180 185 190

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
195 200 205

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
210 215 220

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
225 230 235 240

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
245 250 255

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
260 265 270

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
275 280 285

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
290 295 300

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
305 310 315 320

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
325 330 335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
340 345 350

Pro Gly Lys
355

<210> 118
<211> 356
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉
〈223〉 PR006310 鏈

〈400〉 118

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Ala
        115                 120                 125

Val Leu Pro Glu Ile Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
    130                 135                 140

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
145                 150                 155                 160

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
                165                 170                 175

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
            180                 185                 190

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
```

```
        195                 200                 205

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
    210                 215                 220

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
                245                 250                 255

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
            260                 265                 270

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
        275                 280                 285

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
    290                 295                 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
305                 310                 315                 320

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
                325                 330                 335

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
            340                 345                 350

Ser Pro Gly Lys
        355
```

<210> 119
<211> 356
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006311 鏈

<400> 119

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15
```

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Trp
        115                 120                 125

Leu Tyr Ile Ser Asp Lys Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
    130                 135                 140

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
145                 150                 155                 160

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
                165                 170                 175

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
            180                 185                 190

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
        195                 200                 205

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
    210                 215                 220

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
```

225 230 235 240

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
245 250 255

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
260 265 270

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
275 280 285

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
290 295 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
305 310 315 320

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
325 330 335

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
340 345 350

Ser Pro Gly Lys
355

<210> 120
<211> 356
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006312 鏈

<400> 120

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Ser
115 120 125

Tyr Leu Phe Gly Arg Val Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
130 135 140

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
145 150 155 160

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
165 170 175

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
180 185 190

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
195 200 205

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
210 215 220

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
225 230 235 240

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
245 250 255

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

260 265 270

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
275 280 285

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
290 295 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
305 310 315 320

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
325 330 335

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
340 345 350

Ser Pro Gly Lys
355

<210> 121
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006313 鏈

<400> 121

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

```
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Met
        115                 120                 125

Pro Arg Leu Leu Phe His Ser Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
    130                 135                 140

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145                 150                 155                 160

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
                165                 170                 175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
            180                 185                 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
        195                 200                 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
    210                 215                 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
225                 230                 235                 240

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
                245                 250                 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
            260                 265                 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
        275                 280                 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
```

290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 122
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006314 鏈

<400> 122

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

```
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Ser
        115                 120                 125

Ser Asp Val Val Gly Gly Arg Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
    130                 135                 140

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145                 150                 155                 160

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
                165                 170                 175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
            180                 185                 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
        195                 200                 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
    210                 215                 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
225                 230                 235                 240

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
                245                 250                 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
            260                 265                 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
        275                 280                 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
    290                 295                 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305                 310                 315                 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
```

325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 123
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006315 鏈

<400> 123

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Arg
115 120 125

Met Thr Val Tyr Gly Ser Arg Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
130 135 140

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145 150 155 160

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
165 170 175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
195 200 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
225 230 235 240

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
245 250 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
275 280 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 124
<211> 358
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006316 鏈

<400> 124

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Leu
115 120 125

Ala Leu Pro Gly Val Met Ser Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
130 135 140

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
165 170 175

```
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
            180                 185                 190

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
        195                 200                 205

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
    210                 215                 220

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
225                 230                 235                 240

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                245                 250                 255

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
            260                 265                 270

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
        275                 280                 285

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
    290                 295                 300

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
305                 310                 315                 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
                325                 330                 335

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
            340                 345                 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        355
```

<210> 125
<211> 358
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006317 鏈

<400> 125

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Ala
        115                 120                 125

Ser Met Asn Arg Gly Gly Gly Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
    130                 135                 140

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
145                 150                 155                 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
                165                 170                 175

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
            180                 185                 190

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
        195                 200                 205
```

```
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
    210                 215                 220

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
225                 230                 235                 240

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                245                 250                 255

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
            260                 265                 270

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
        275                 280                 285

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
    290                 295                 300

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
305                 310                 315                 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
                325                 330                 335

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
            340                 345                 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        355
```

<210> 126
<211> 358
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006318 鏈

<400> 126

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15
```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Gly
115 120 125

Gly Gly Pro Phe Leu Trp Leu Val Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
130 135 140

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
165 170 175

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
180 185 190

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
195 200 205

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
210 215 220

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
225 230 235 240

```
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                245                 250                 255

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
            260                 265                 270

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
        275                 280                 285

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
    290                 295                 300

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
305                 310                 315                 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
                325                 330                 335

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
            340                 345                 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        355
```

<210> 127
<211> 359
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006319 鏈

<400> 127

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
            20                  25                  30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
```

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Gln
115 120 125

Met Ser Val Phe Ala Arg His Phe Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
130 135 140

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
145 150 155 160

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
165 170 175

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
180 185 190

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
195 200 205

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
210 215 220

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
225 230 235 240

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
245 250 255

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
260 265 270

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
275 280 285

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
290 295 300

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
305 310 315 320

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
325 330 335

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
340 345 350

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 128
<211> 359
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006320 鏈

<400> 128

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

```
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Ser
        115                 120                 125

Val Gly Arg Phe Gly Ser Met Leu Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
    130                 135                 140

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
145                 150                 155                 160

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
                165                 170                 175

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
            180                 185                 190

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
        195                 200                 205

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
    210                 215                 220

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
                245                 250                 255

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
            260                 265                 270

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
        275                 280                 285

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
    290                 295                 300
```

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
305 310 315 320

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
325 330 335

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
340 345 350

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 129
<211> 359
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006321 鏈

<400> 129

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Ile
115 120 125

Thr Glu Trp Ser Val Arg Asp Leu Gln Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
130 135 140

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
145 150 155 160

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
165 170 175

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
180 185 190

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
195 200 205

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
210 215 220

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
225 230 235 240

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
245 250 255

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
260 265 270

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
275 280 285

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
290 295 300

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
305 310 315 320

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
325 330 335

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
340 345 350

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 130
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000892 VH

<400> 130

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Thr Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Asn
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Leu Pro Met Ala Ser Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Leu
100 105 110

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 131
<211> 107
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000892 VL

<400> 131

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Leu Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 132
<211> 458
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000892 HC

<400> 132

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Thr Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

```
Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Asn
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Arg Leu Pro Met Ala Ser Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Leu
            100                 105                 110

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                165                 170                 175

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
```

260 265 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
355 360 365

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 133
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR000892 LC

<400> 133

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Leu Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 134
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR005744 鏈

<400> 134

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Thr Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Asn
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Leu Pro Met Ala Ser Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Leu
100 105 110

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

```
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                165                 170                 175

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230
```

<210> 135
<211> 568
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR005744 鏈

<400> 135

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Thr
65                  70                  75                  80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Leu Phe
                85                  90                  95
```

```
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly
    210                 215                 220

Leu Ile Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
225                 230                 235                 240

Phe Thr Val Ser Asp Ser Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
                245                 250                 255

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr
            260                 265                 270

Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        275                 280                 285

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
    290                 295                 300

Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr
305                 310                 315                 320
```

```
Asp Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
                325                 330                 335

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
            340                 345                 350

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
        355                 360                 365

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
    370                 375                 380

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
385                 390                 395                 400

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
                405                 410                 415

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
            420                 425                 430

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
        435                 440                 445

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
    450                 455                 460

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
465                 470                 475                 480

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                485                 490                 495

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
            500                 505                 510

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
        515                 520                 525

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
```

530 535 540

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
545 550 555 560

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565

<210> 136
<211> 73
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 正向引子-3

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(40)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(43)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<400> 136
attaggtcac cgtctcctca gagcccaaat cttgtnnknn knnktgccca ccgtgcccag 60

cacctgaact cct 73

<210> 137
<211> 76
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 正向引子-4

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(40)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(43)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(46)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<400> 137
attaggtcac cgtctcctca gagcccaaat cttgtnnknn knnknnktgc ccaccgtgcc 60

cagcacctga actcct 76

<210> 138
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 正向引子-5

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(40)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(43)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(46)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(49)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<400> 138
attaggtcac cgtctcctca gagcccaaat cttgtnnknn knnknnknnk tgcccaccgt 60

gcccagcacc tgaactcct 79

<210> 139
<211> 82
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 正向引子-6

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(40)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(43)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(46)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(49)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(52)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<400> 139
attaggtcac cgtctcctca gagcccaaat cttgtnnknn knnknnknnk nnktgcccac 60

cgtgcccagc acctgaactc ct 82

<210> 140
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 正向引子-7

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(40)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(43)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(46)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(49)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(52)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(55)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<400> 140
attaggtcac cgtctcctca gagcccaaat cttgtnnknn knnknnknnk nnknnktgcc 60

caccgtgccc agcacctgaa ctcct 85

<210> 141
<211> 88
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 正向引子-8

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(40)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(43)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(46)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(49)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(52)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(55)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)..(58)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<400> 141
attaggtcac cgtctcctca gagcccaaat cttgtnnknn knnknnknnk nnknnknnkt 60

gcccaccgtg cccagcacct gaactcct 88

<210> 142
<211> 91
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 正向引子-9

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(40)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(43)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(46)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(49)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(52)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(55)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)..(58)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(61)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<400> 142
attaggtcac cgtctcctca gagcccaaat cttgtnnknn knnknnknnk nnknnknnkn 60

nktgcccacc gtgcccagca cctgaactcc t 91

<210> 143
<211> 94
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 正向引子-10

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(40)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(43)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(46)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(49)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(52)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(55)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)..(58)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(61)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(64)
<223> n 為 a, c, g 或 t

<400> 143
attaggtcac cgtctcctca gagcccaaat cttgtnnknn knnknnknnk nnknnknnkn 60

nknnktgccc accgtgccca gcacctgaac tcct 94

<210> 144
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 反向引子

<400> 144
actcgactcg agtcccccgg gatg 24

<210> 145
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人 IgG1 鉸鍊區 var. (GS)2-C220

<400> 145

Gly Ser Gly Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 146
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人 IgG1 鉸鍊區 var. (G4S)-C220

<400> 146

Gly Gly Gly Gly Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 147
<211> 21
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<220>
<223> 鼠 IgG2c 鉸鍊區

<400> 147

Glu Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro Pro Leu Lys Glu
1 5 10 15

Cys Pro Pro Cys Ala
20

<210> 148
<211> 360
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006468 鏈

<400> 148

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Ser
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Thr Arg Gly Thr Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Arg Val Pro Ile
115 120 125

Thr Gln Asn Pro Cys Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala
130 135 140

```
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145                 150                 155                 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
                165                 170                 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
            180                 185                 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
        195                 200                 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
    210                 215                 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225                 230                 235                 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
                245                 250                 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
            260                 265                 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
        275                 280                 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
    290                 295                 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305                 310                 315                 320

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
                325                 330                 335

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
            340                 345                 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        355                 360
```

<210> 149
<211> 356
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> PR006345 鏈

<400> 149

Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
1 5 10 15

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45

Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60

Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
85 90 95

Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110

Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Gly Gly Gly Ala Ser Glu Pro Lys Ser
115 120 125

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
130 135 140

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
145 150 155 160

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
165 170 175

```
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
            180                 185                 190

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
        195                 200                 205

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
    210                 215                 220

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
                245                 250                 255

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
            260                 265                 270

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
        275                 280                 285

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
    290                 295                 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
305                 310                 315                 320

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
                325                 330                 335

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
            340                 345                 350

Ser Pro Gly Lys
        355
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種蛋白-藥物偶聯物，其包含抗原結合蛋白部分和藥物偶聯物部分；該抗原結合蛋白部分包括一個或多個抗原結合片段，以及與該抗原結合片段直接或間接連接的至少兩個連接肽；該至少兩個連接肽包括第一連接肽和第二連接肽；其中該第一連接肽包含第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2，該藥物偶聯物部分經由該 Cys1 偶聯至該第一連接肽；且該第二連接肽包含第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2，該藥物偶聯物部分經由該 Cys1 偶聯至該第二連接肽；

其中該第一連接肽和該第二連接肽源自人 IgG1 鉸鏈區或其衍生序列、小鼠 IgG2c 鉸鏈區或其衍生序列；該 Cys1 為人 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-220 或衍生序列中與之對應的半胱胺酸，或者小鼠 IgG2c 鉸鏈區的第一個半胱胺酸；

其中該一個或多個抗原結合片段包括第一抗原結合片段和第二抗原結合片段，其中該第一抗原結合片段和第二抗原結合片段不包含含有 Eu 編號的恆定區 Cys-214 的輕鏈或輕鏈片段；

該第一連接肽和該第二連接肽分別自 N 端至 C 端包含 Cys1-(X)n-Cys2 所示的胺基酸序列，其中，n 為大於或等於 3 的整數，X 是除半胱胺酸以外的任意胺基酸；

其中該第一連接肽的該 Cys2 與該第二連接肽的該 Cys2 之間經由二硫鍵連接。

【請求項2】 如請求項 1 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該一個或多個抗原結合片段中不包含能夠影響藥物偶聯物與該第一連接肽和該第二連接肽在 Cys1 處進行偶聯的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物，該影響表

現為顯著降低藥物偶聯物在 Cys1 位點的偶聯機率。

【請求項3】 如請求項 2 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該一個或多個抗原結合片段不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物。

【請求項4】 如請求項 3 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該一個或多個抗原結合片段不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的半胱胺酸或者前述半胱胺酸與其他藥物偶聯物形成的綴合物。

【請求項5】 如請求項 1 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一連接肽與該第二連接肽相同或不同。

【請求項6】 如請求項 1 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該人 IgG1 鉸鏈區的序列如 SEQ ID NO: 73 所示；且該小鼠 IgG2c 鉸鏈區的序列如 SEQ ID NO: 147 所示。

【請求項7】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一連接肽和該第二連接肽的序列各自獨立地為 SEQ ID NOs: 73-105、145-147 中任一項所示的胺基酸序列。

【請求項8】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該多個抗原結合片段連接於同一該連接肽或分別連接於不同的該連接肽。

【請求項9】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該多個抗原結合片段可以部分或全部相同或彼此均不同。

【請求項10】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該多個抗原結合片段進一步包含第三抗原結合片段和/或第四抗原結合片段。

【請求項11】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該一

個或多個抗原結合片段可以各自獨立地為 VHH 結構域、VH、VL、Fab、ScFv、受體蛋白可溶性胞外區、配體蛋白、脂質運載蛋白 lipocalins、神經細胞黏附分子 NCAM、 纖維結合蛋白 fibronectin 和/或錨蛋白重複片段蛋白 DARPins。

【請求項12】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該一個或多個抗原結合片段能夠特異性結合腫瘤抗原或非腫瘤抗原。

【請求項13】 如請求項 12 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該腫瘤抗原包括 CD19、BCMA、TSHR、CD171、CS-1、CLL-1、GD3、Tn Ag、FLT3、CD38、CD123、CD44v6、B7H3、B7H4、KIT、IL-13Ra2、IL-11Ra、PSCA、PSMA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR-beta、SSEA-4、MUC1、EGFR、NCAM、CAIX、LMP2、EphA2、岩藻糖基 GM1(fucosyl GM1)、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、GD2、FOLR1、FOLR2、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、多聚唾液酸(polysialic acid)、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TAARP、WT1、ETV6-AML、SPA17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、FOSL1、hTERT、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS 融合基因)、NA17、PAX3、AR(雄激素受體)、細胞週期蛋白 B1(Cyclin B1)、MYCN、RhoC、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、CD20、CD30、HER2、ROR1、FLT3、TAAG72、CD22、CD33、GD2、gp100Tn、FAP、酪胺酸酶(tyrosinase)、EPCAM、CEA、IGF-1R、EphB2、間皮素(mesothelin)、鈣黏蛋白 17(Cadherin17)、CD32b、EGFRvIII、GPNMB、GPR64、HER3、LRP6、LYPD8、NKG2D、SLC34A2、SLC39A6、SLITRK6、GUCY2C、5T4 和/或

TACSTD2。

【請求項14】如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該一個或多個抗原結合片段各自獨立地包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且該抗原結合片段包含選自下述的任意一組胺基酸序列：(1)HCDR1：SEQ ID NO: 7，HCDR2：SEQ ID NO: 22，HCDR3：SEQ ID NO: 38；(2)HCDR1：SEQ ID NO: 10，HCDR2：SEQ ID NO: 25，HCDR3：SEQ ID NO: 41；(3)HCDR1：SEQ ID NO: 11，HCDR2：SEQ ID NO: 26，HCDR3：SEQ ID NO: 42；(4)HCDR1：SEQ ID NO: 13，HCDR2：SEQ ID NO: 28，HCDR3：SEQ ID NO: 44；(5)HCDR1：SEQ ID NO: 14，HCDR2：SEQ ID NO: 29，HCDR3：SEQ ID NO: 42；(6)HCDR1：SEQ ID NO: 9，HCDR2：SEQ ID NO: 24，HCDR3：SEQ ID NO: 40；和(7)HCDR1：SEQ ID NO: 8，HCDR2：SEQ ID NO: 23，HCDR3：SEQ ID NO: 39。

【請求項15】如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該一個或多個抗原結合片段各自獨立地包含 VH，且該 VH 包括 SEQ ID NOs: 55-59、61 和 62 中任一項所示的胺基酸序列。

【請求項16】如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該一個或多個抗原結合片段各自獨立地包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，且該 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分別依次包含 SEQ ID NO: 12，SEQ ID NO: 27，SEQ ID NO: 43，SEQ ID NO: 49，SEQ ID NO: 51 和 SEQ ID NO: 53 所示的胺基酸序列。

【請求項17】如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該一個或多個抗原結合片段包含至少一對 VH 和 VL，且該一對 VH 和 VL 分別包括 SEQ ID NO: 60 和 SEQ ID NO: 63 所示的胺基酸序列；或者該一個或多個抗原結

合片段包含至少一對 VH 和 VL 和/或另一種 VH，且該一對 VH 和 VL 分別包括 SEQ ID NO: 130 和 SEQ ID NO: 131 所示的胺基酸序列，和該另一種 VH 包括 SEQ ID NO: 62 所示的胺基酸序列。

【請求項18】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其還包含與該連接肽直接或間接連接的配對單元部分，該配對單元包含至少第一配對亞單元和第二配對亞單元，且該第一配對亞單元可以經由共價鍵或者非共價鍵與該第二配對亞單元相互作用。

【請求項19】 如請求項 18 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該配對單元為抗體 Fc 片段或突變的 Fc 片段。

【請求項20】 如請求項 18 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該第一配對亞單元的 N 端與該第一連接肽的 C 端連接，且該第二配對亞單元的 N 端與該第二連接肽的 C 端連接；或者，該第一配對亞單元的 N 端與該第二連接肽的 C 端連接，且該第二配對亞單元的 N 端與該第一連接肽的 C 端連接。

【請求項21】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其包含 SEQ ID NOs: 64-71、106-129、148 和 149 中任一項所示的胺基酸序列，或 SEQ ID NOs: 134 和 135 所示的胺基酸序列的組合。

【請求項22】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該藥物偶聯物部分包括分別與第一連接肽和第二連接肽連接的兩個藥物偶聯物，該藥物偶聯物包含載荷藥物。

【請求項23】 如請求項 22 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該藥物偶聯物還包含連接子。

【請求項24】 如請求項 22 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該載荷藥物包含小

分子化合物、寡核苷酸、蛋白降解靶向嵌合體(PROTAC)、親和配體、螢光標記基團、核素標記基團、毒素分子、抗生素分子、免疫調節劑和/或多肽。

【請求項25】 如請求項 23 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該連接子包含可斷裂的連接子或非可斷裂的連接子。

【請求項26】 如請求項 25 所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該可斷裂的連接子包含蛋白酶可切割的連接子。

【請求項27】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其中該藥物偶聯物包括 mc-vc-PAB-MMAE 和/或 PROTAC。

【請求項28】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，其為抗體-藥物偶聯物。

【請求項29】 一種製備如請求項 1 至 28 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物的方法，其包括使該藥物偶聯物與該第一連接肽和該第二連接肽上的該 Cys1 的反應性巰基進行共價結合。

【請求項30】 一種製備蛋白-藥物偶聯物的方法，該蛋白-藥物偶聯物包含抗原結合蛋白部分和藥物偶聯物部分，該抗原結合蛋白部分包括一個或多個抗原結合片段，以及與該抗原結合片段直接或間接連接的至少兩個連接肽；該兩個連接肽包含第一連接肽和第二連接肽，其中該第一連接肽包含第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2，該第二連接肽包含第一半胱胺酸 Cys1 和第二半胱胺酸 Cys2；

其中該第一連接肽和該第二連接肽源自人 IgG1 鉸鏈區或其衍生序列、小鼠 IgG2c 鉸鏈區或其衍生序列；該 Cys1 為人 IgG1 鉸鏈區根據 EU 編碼的 Cys-220 或衍生序列中與之對應的半胱胺酸，或者小鼠 IgG2c 鉸鏈區的第一個半胱胺酸；

其中該一個或多個抗原結合片段包括第一抗原結合片段和第二抗原結合片段，其中該第一抗原結合片段和第二抗原結合片段不包含含有 Eu 編號的恆定區 Cys-214 的輕鏈或輕鏈片段；

該第一連接肽和該第二連接肽分別自 N 端至 C 端包含 Cys1-(X)n-Cys2 所示的胺基酸序列，其中，n 為大於或等於 3 的整數，X 是除半胱胺酸以外的任意胺基酸；其中該第一連接肽的該 Cys2 與該第二連接肽的該 Cys2 之間經由二硫鍵連接，

該方法包括使該藥物偶聯物部分經由該第一連接肽的該 Cys1 與該第一連接肽聯結，和使該藥物偶聯物部分經由該第二連接肽的該 Cys1 與該第二連接肽聯結。

【請求項31】 如請求項 30 所述的方法，其中該一個或多個抗原結合片段中不包含能夠影響藥物偶聯物與該第一連接肽和該第二連接肽在 Cys1 處進行偶聯的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物，該影響表現為顯著降低藥物偶聯物在 Cys1 位點的偶聯機率。

【請求項32】 如請求項 30 所述的方法，其中該一個或多個抗原結合片段不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的官能團或者前述官能團與其他藥物偶聯物形成的綴合物。

【請求項33】 如請求項 30 所述的方法，其中該一個或多個抗原結合片段不包含能夠與該第一連接肽的該 Cys1 和該第二連接肽的該 Cys1 形成二硫鍵的半胱胺酸或者前述半胱胺酸與其他藥物偶聯物形成的綴合物。

【請求項34】 如請求項 30 所述的方法，其中該第一連接肽和該第二連接肽相同或不同。

【請求項35】 如請求項 30 所述的方法，其中該衍生序列為經由對抗體鉸鏈區序列進行改造獲得，該改造不涉及抗體鉸鏈區中 Cys1 和 Cys2 的改變。

【請求項36】 如請求項 35 所述的方法，其中該改造為調整抗體鉸鏈區序列中 Cys1 和 Cys2 之間的胺基酸種類、數目和/或在 Cys1 前進行柔性連接胺基酸的添加。

【請求項37】 如請求項 30 至 36 中任一項所述的方法，其中該人 IgG1 鉸鏈區的序列如 SEQ ID NO: 73 所示，且該小鼠 IgG2c 鉸鏈區的序列如 SEQ ID NO: 147 所示。

【請求項38】 如請求項 30 至 36 中任一項所述的方法，其中該第一連接肽和該第二連接肽的序列各自獨立地為 SEQ ID NOs: 73-105、145-147 中任一項所示的胺基酸序列。

【請求項39】 如請求項 30 至 36 中任一項所述的方法，其包括還原和偶聯的步驟。

【請求項40】 如請求項 38 所述的方法，其還包括純化步驟。

【請求項41】 如請求項 39 所述的方法，其中該還原包括在還原劑的條件下使該抗原結合蛋白部分中該第一連接肽的該 Cys1 和該第二連接肽的該 Cys1 之間形成的二硫鍵被斷裂形成反應性巰基，而該第一連接肽的 Cys2 和該第二連接肽的 Cys2 之間形成的二硫鍵被保留。

【請求項42】 如請求項 39 所述的方法，其中該還原包括使用還原劑 DTT 和/或 TCEP。

【請求項43】 如請求項 42 所述的方法，其中該還原劑為 TCEP。

【請求項44】 如請求項 42 或 43 所述的方法，其中該還原劑的用量為 1 至 50

莫耳倍數。

【請求項45】 如請求項 44 所述的方法，其中該還原劑的用量為 1 至 6 莫耳倍數。

【請求項46】 如請求項 39 所述的方法，其中該還原的反應時長為 1 至 17 小時。

【請求項47】 如請求項 46 所述的方法，其中該還原的反應時長為 1.5 至 3 小時。

【請求項48】 如請求項 47 所述的方法，其中該還原的反應時長為 2 小時。

【請求項49】 如請求項 39 所述的方法，其中該還原的反應溫度為 0 至 40 ℃。

【請求項50】 如請求項 49 所述的方法，其中該還原的反應溫度為 0 ℃ 或 25-30 ℃或 37 ℃。

【請求項51】 如請求項 50 所述的方法，其中該還原的反應溫度為 25-30 ℃。

【請求項52】 如請求項 39 所述的方法，其中該還原的反應緩衝液 pH 為 5.0 至 8.0。

【請求項53】 如請求項 52 所述的方法，其中該還原的反應緩衝液 pH 為 5.0 至 7.0。

【請求項54】 如請求項 53 所述的方法，其中該還原的反應緩衝液 pH 為 5.0 至 6.0。

【請求項55】 如請求項 39 所述的方法，其中該偶聯包括使該藥物偶聯物與該第一連接肽的該 Cys1 和該第二連接肽上的該 Cys1 的反應性巰基進行共價結合。

【請求項56】 如請求項 30 至 36 中任一項所述的方法，其中該藥物偶聯物包

括 mc-vc-PAB-MMAE 或 PROTAC。

【請求項57】如請求項 56 所述的方法，其中該藥物偶聯物 mc-vc-PAB-MMAE 的用量為 1 至 50 莫耳倍數。

【請求項58】如請求項 57 所述的方法，其中該藥物偶聯物的用量為 3 至 18 莫耳倍數。

【請求項59】如請求項 58 所述的方法，其中該藥物偶聯物的用量為 3 至 7 莫耳倍數。

【請求項60】如請求項 56 所述的方法，其中該藥物偶聯物 PROTAC 的用量為 10 至 15 莫耳倍數。

【請求項61】如請求項 39 所述的方法，其中該偶聯的反應時長為 0.5 至 10 小時。

【請求項62】如請求項 61 所述的方法，其中該偶聯的反應時長為 0.5 至 3 小時。

【請求項63】如請求項 62 所述的方法，其中該偶聯的反應時長為 0.5 至 2 小時。

【請求項64】如請求項 39 所述的方法，其中該偶聯的反應溫度為 0 至 40 ℃。

【請求項65】如請求項 64 所述的方法，其中該偶聯的反應溫度為 25-30 ℃。

【請求項66】如請求項 39 所述的方法，其中該偶聯的反應緩衝液 pH 為 5.0 至 8.0。

【請求項67】如請求項 66 所述的方法，其中該偶聯的反應緩衝液 pH 為 5.0 至 7.0。

【請求項68】如請求項 67 所述的方法，其中該偶聯的反應緩衝液 pH 為 5.0

至 6.0。

【請求項69】 如請求項 30 至 36 中任一項所述的方法，其中製備所得的蛋白-藥物偶聯物的純度大於 80%。

【請求項70】 一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 至 28 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物，以及藥學上可接受的載體。

【請求項71】 一種如請求項 1 至 28 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物和/或如請求項 70 所述的醫藥組成物在製備藥物中的用途，該藥物用於治療腫瘤或其他疾病。

【請求項72】 一種如請求項 1 至 28 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物和/或如請求項 70 所述的醫藥組成物與其他療法或藥物聯用在製備藥物中的用途，該藥物用於治療腫瘤或其他疾病。

【請求項73】 如請求項 72 所述的用途，其中該其他療法或藥物選自下組：化療、放療、miRNA 和寡核苷酸。

【請求項74】 如請求項 71 至 73 中任一項所述的用途，其中該腫瘤選自下組中的任意一種或多種：淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、卵巢癌、腎癌、子宮內膜癌、黑色素瘤、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、間皮瘤、食管癌、頭頸部腫瘤、膽管癌、膽囊癌、膀胱癌、胸腺癌和結直腸癌。

【請求項75】 如請求項 1 至 28 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物和/或如請求項 70 所述的醫藥組成物在製備用於診斷特定疾病的試劑盒中的用途。

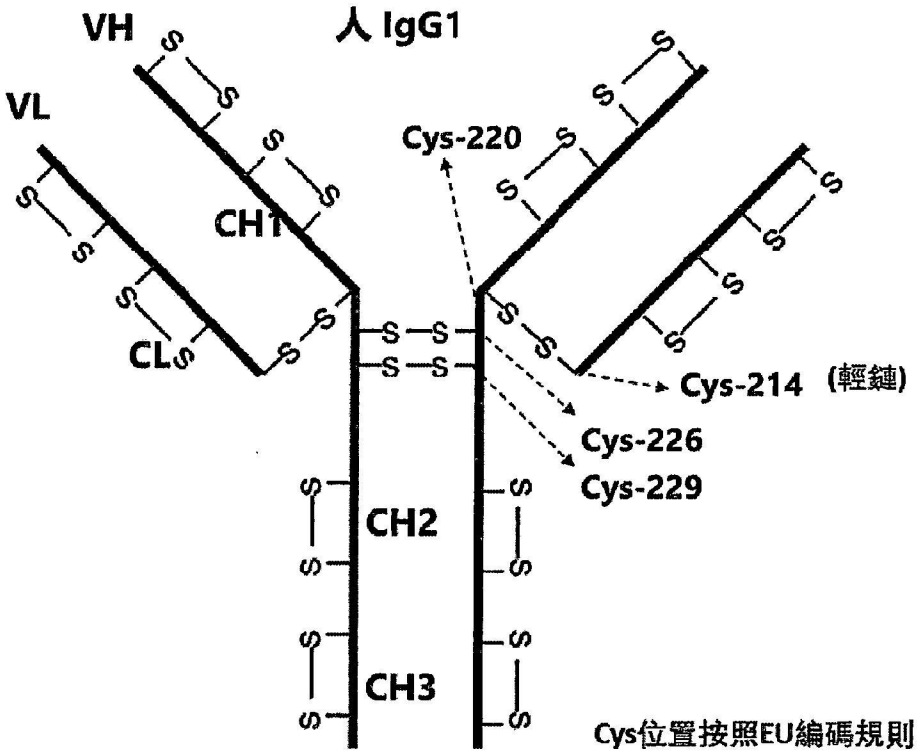
【請求項76】 一種檢測特定靶標的方法，其包括使用如請求項 1 至 28 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物和/或如請求項 70 所述的醫藥組成物，該檢測為非疾病診斷目的。

【請求項77】 一種檢測試劑盒，其包括如請求項 1 至 28 中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物和/或如請求項 70 所述的醫藥組成物。

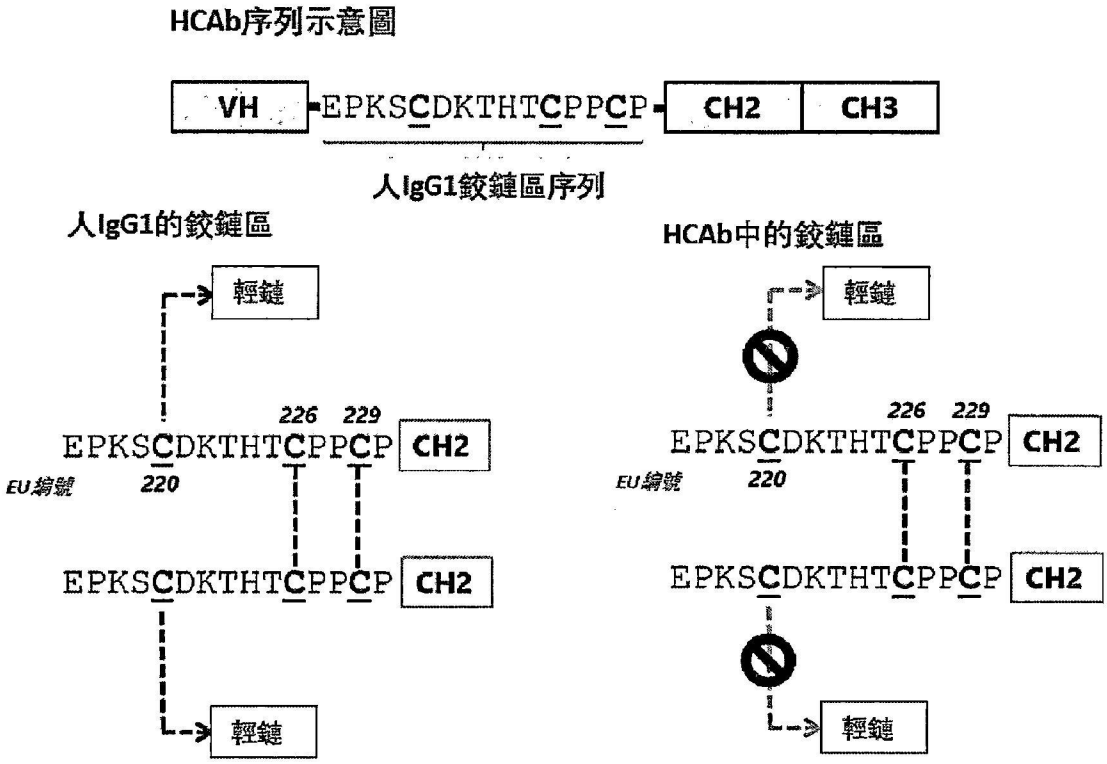
【請求項78】 如請求項77的試劑盒，其還包括使用說明。

【請求項79】 一種給藥裝置，其包括如請求項1至28中任一項所述的蛋白-藥物偶聯物和/或如請求項70所述的醫藥組成物，以及施用該蛋白-藥物偶聯物和/或該醫藥組成物的裝置。

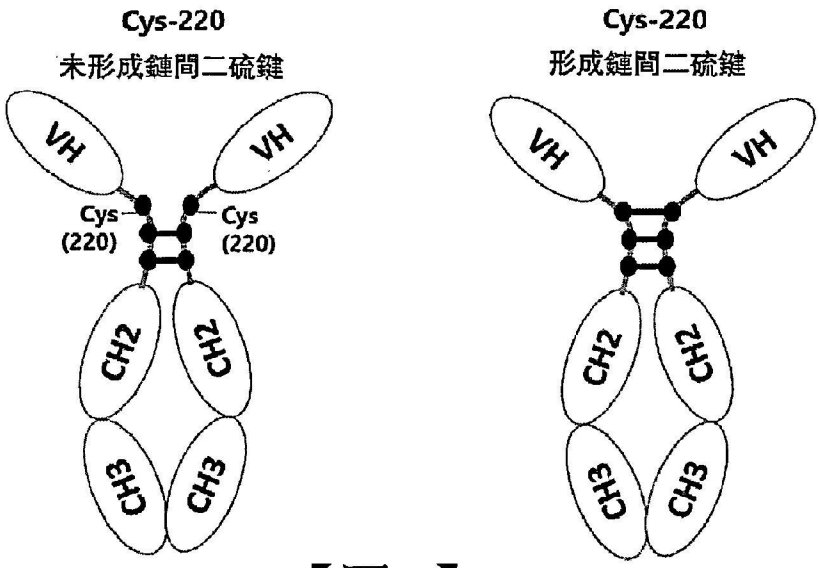
【發明圖式】


VH
人 IgG1
VL
Cys-220
CH1
CL
Cys-214 (輕鏈)
Cys-226
Cys-229
CH2
CH3
Cys位置按照EU編碼規則

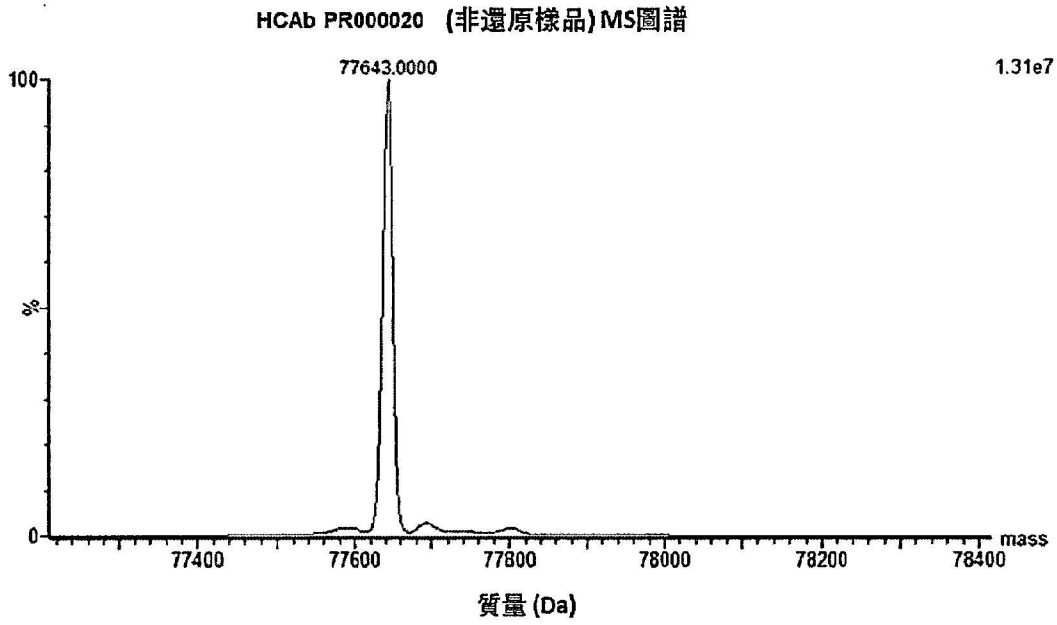
【圖 1】


HCAb序列示意圖
VH
EPKSCDKTHTCPPCP
CH2
CH3
人IgG1鉸鏈區序列
人IgG1的鉸鏈區
HCAb中的鉸鏈區
輕鏈
226
229
EPKSCDKTHTCPPCP
CH2
EU編號
220

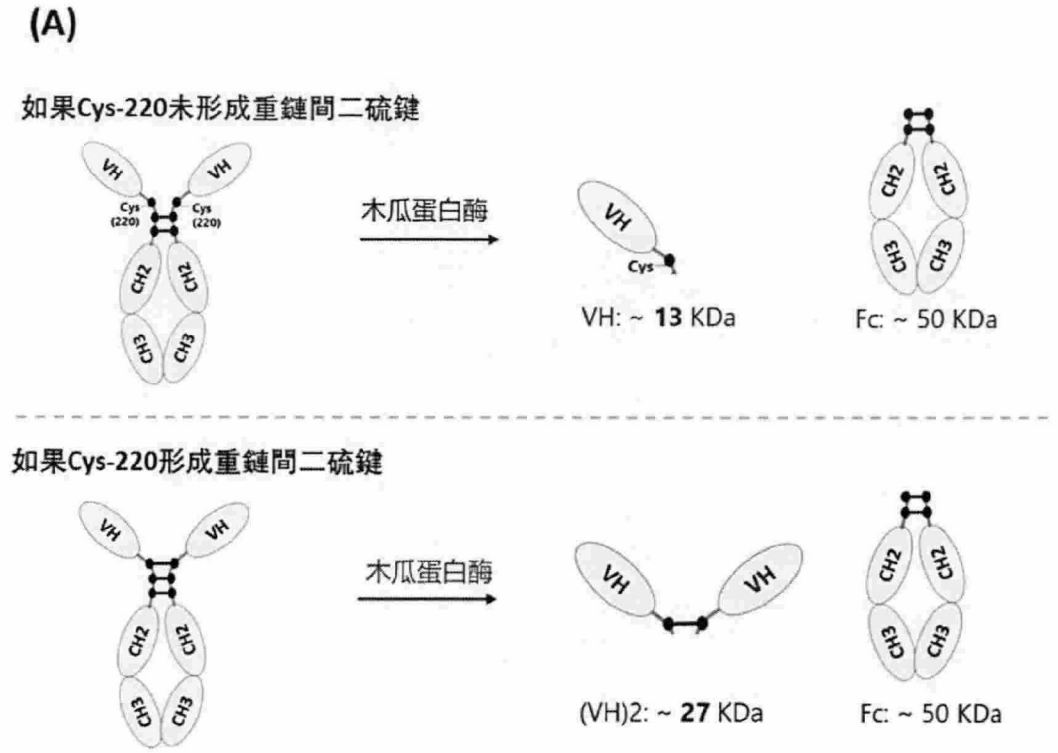
【圖 2】

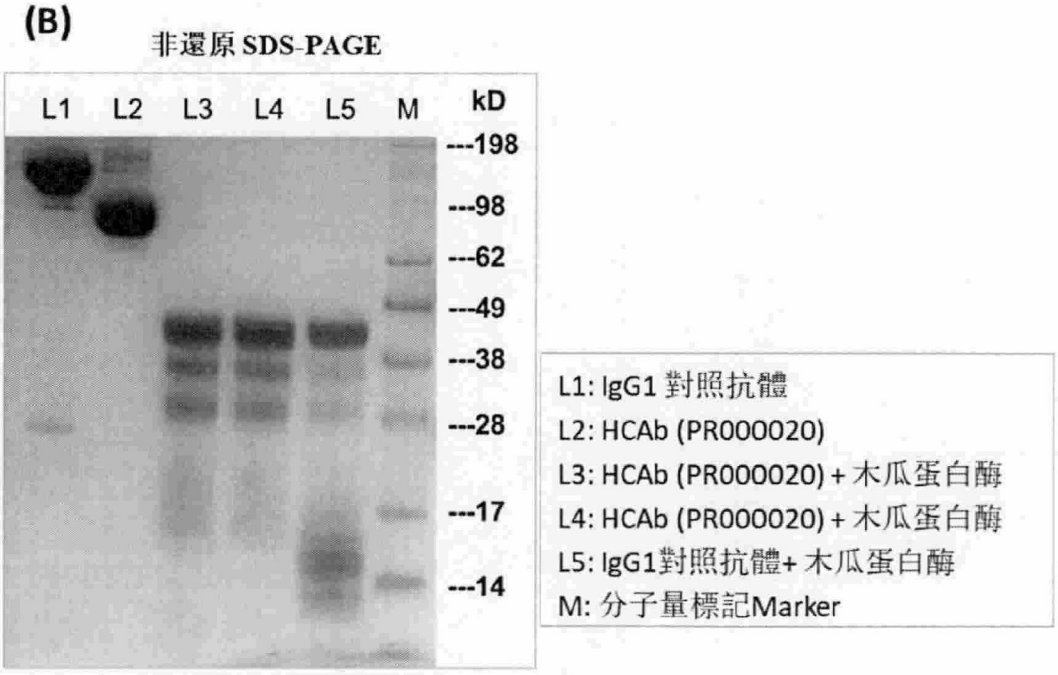

Cys-220
未形成鏈間二硫鍵
VH
VH
Cys
(220)
Cys
(220)
CH2
CH2
CH3
CH3
Cys-220
形成鏈間二硫鍵
VH
VH
CH2
CH2
CH3
CH3

【圖 3】

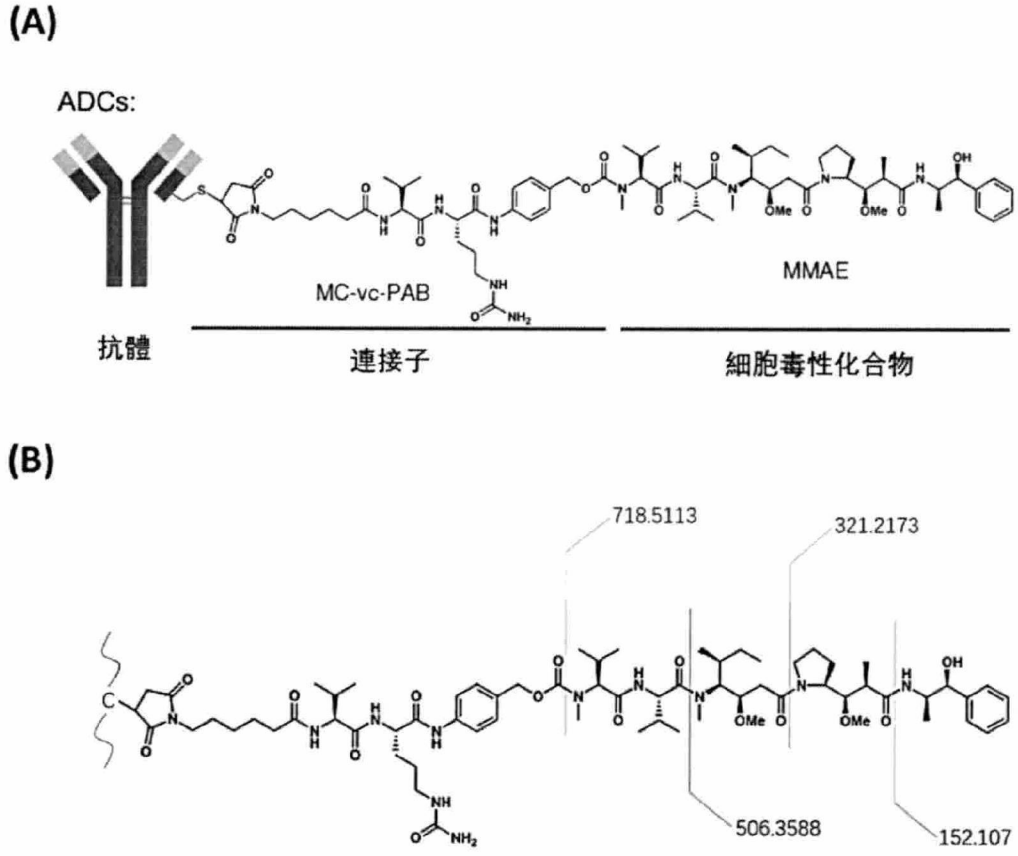

HCAb PR000020 (非還原樣品) MS圖譜
77643.0000
1.31e7
100
%
0
77400
77600
77800
78000
78200
78400
mass
質量 (Da)

【圖 4】

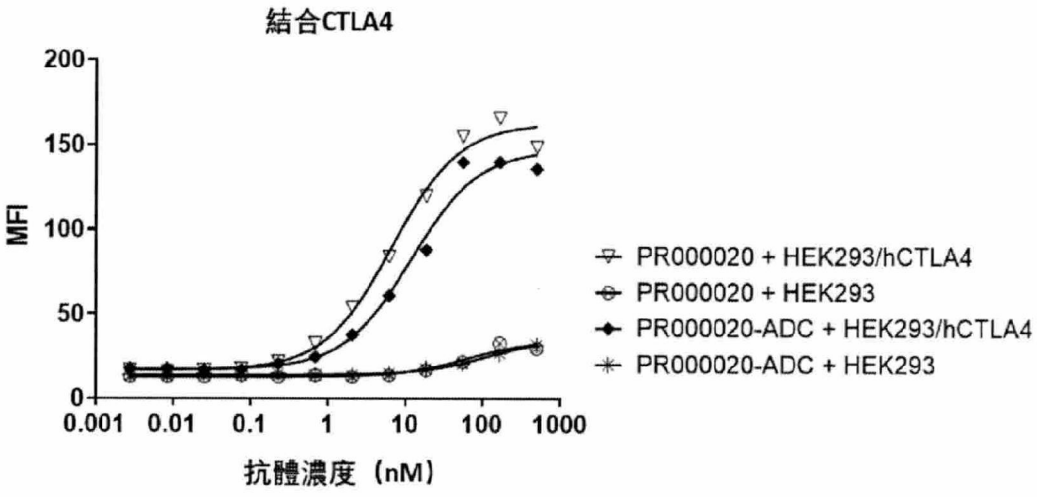

(A)
如果Cys-220未形成重鏈間二硫鍵
VH
VH
Cys (220)
Cys (220)
CH2
CH2
CH3
CH3
木瓜蛋白酶
VH
Cys
VH: ~ 13 KDa
CH2
CH2
CH3
CH3
Fc: ~ 50 KDa
如果Cys-220形成重鏈間二硫鍵
VH
VH
CH2
CH2
CH3
CH3
木瓜蛋白酶
VH
VH
(VH)2: ~ 27 KDa
CH2
CH2
CH3
CH3
Fc: ~ 50 KDa


(B)
非還原 SDS-PAGE
L1
L2
L3
L4
L5
M
kD
---198
---98
---62
---49
---38
---28
---17
---14
L1: IgG1 對照抗體
L2: HCAb (PR000020)
L3: HCAb (PR000020) + 木瓜蛋白酶
L4: HCAb (PR000020) + 木瓜蛋白酶
L5: IgG1對照抗體+ 木瓜蛋白酶
M: 分子量標記Marker

【圖 5】


(A)
ADCs:
MC-vc-PAB
MMAE
抗體
連接子
細胞毒性化合物
(B)
718.5113
321.2173
506.3588
152.107

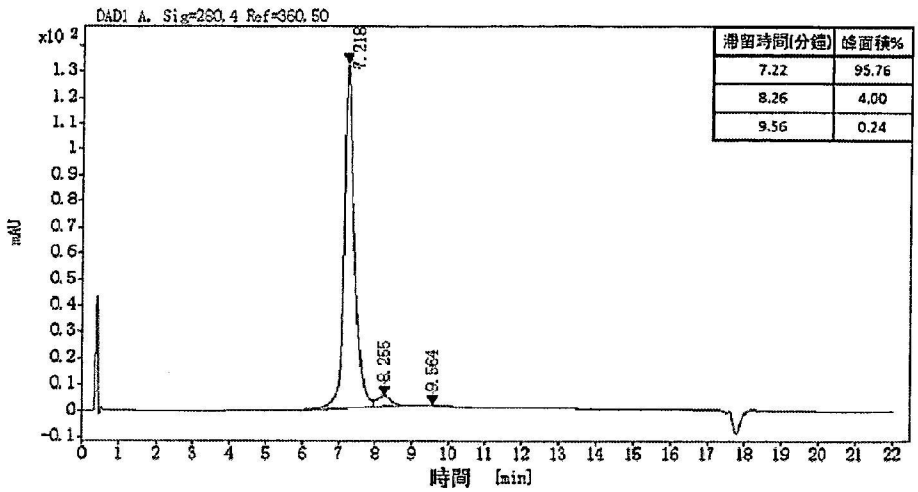
【圖 6】


結合CTLA4
MFI
200
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度（nM）
PR000020 + HEK293/hCTLA4
PR000020 + HEK293
PR000020-ADC + HEK293/hCTLA4
PR000020-ADC + HEK293

【圖 7】

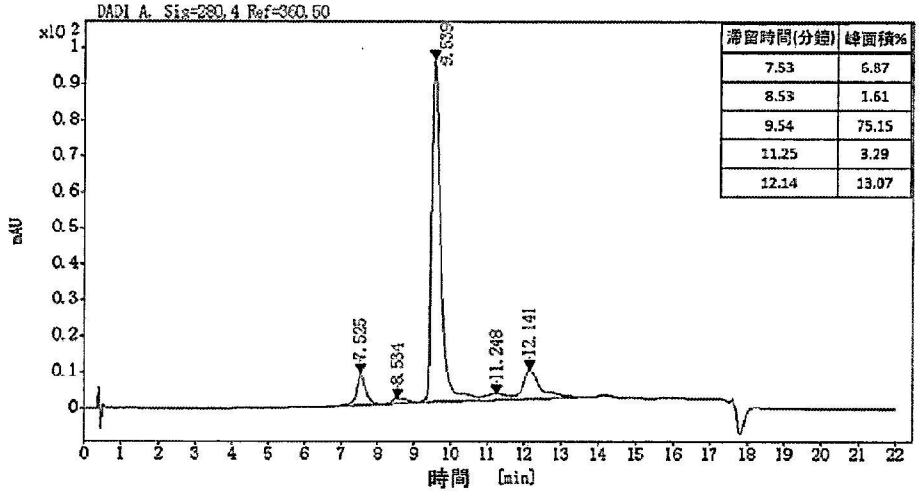
(A)

HCAb PR000020 (lot.# HSP302), HIC-HPLC



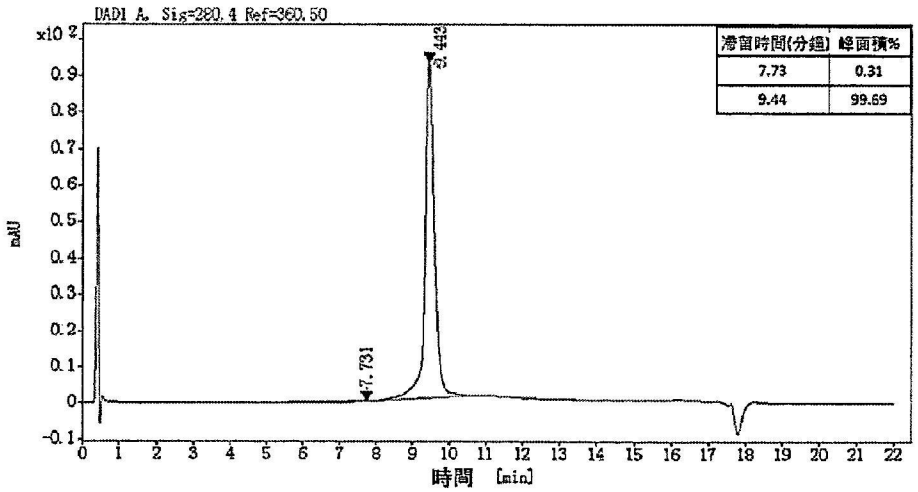
(B)

PR000020-ADC 純化前 (lot.# HSP302-170814), HIC-HPLC



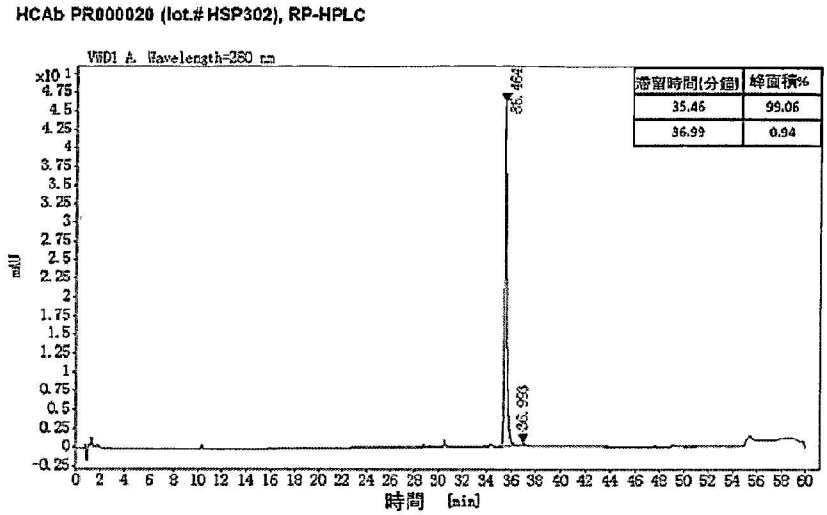
(C)

PR000020-ADC 純化後 (lot.# HSP302-170814PA0815), HIC-HPLC

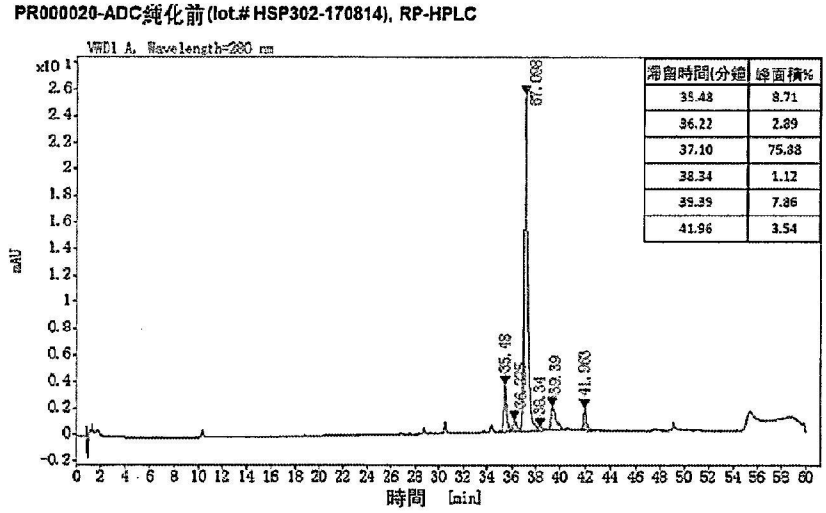


【圖 8】

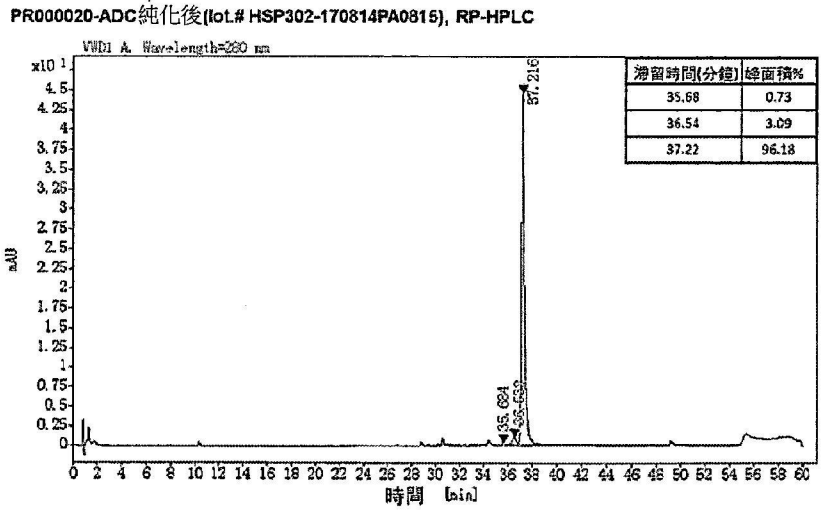
(A)


HCAb PR000020 (lot.# HSP302), RP-HPLC
VWD1 A, Wavelength=280 nm
x10 1
mAU
時間 [min]
滯留時間(分鐘) 峰面積%
35.46 99.06
36.99 0.94

(B)


PR000020-ADC純化前(lot.# HSP302-170814), RP-HPLC
VWD1 A, Wavelength=280 nm
x10 1
mAU
時間 [min]
滯留時間(分鐘) 峰面積%
35.48 8.71
36.22 2.89
37.10 75.88
38.34 1.12
39.39 7.86
41.96 3.54

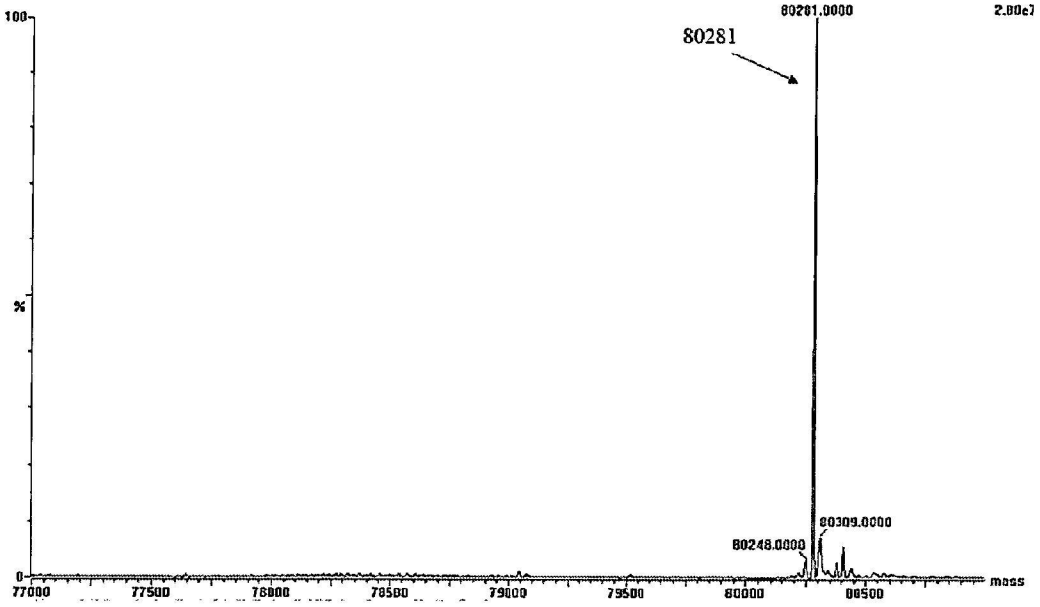
(C)


PR000020-ADC純化後(lot.# HSP302-170814PA0815), RP-HPLC
VWD1 A, Wavelength=280 nm
x10 1
mAU
時間 [min]
滯留時間(分鐘) 峰面積%
35.68 0.73
36.54 3.09
37.22 96.18

【圖 9】

(A)

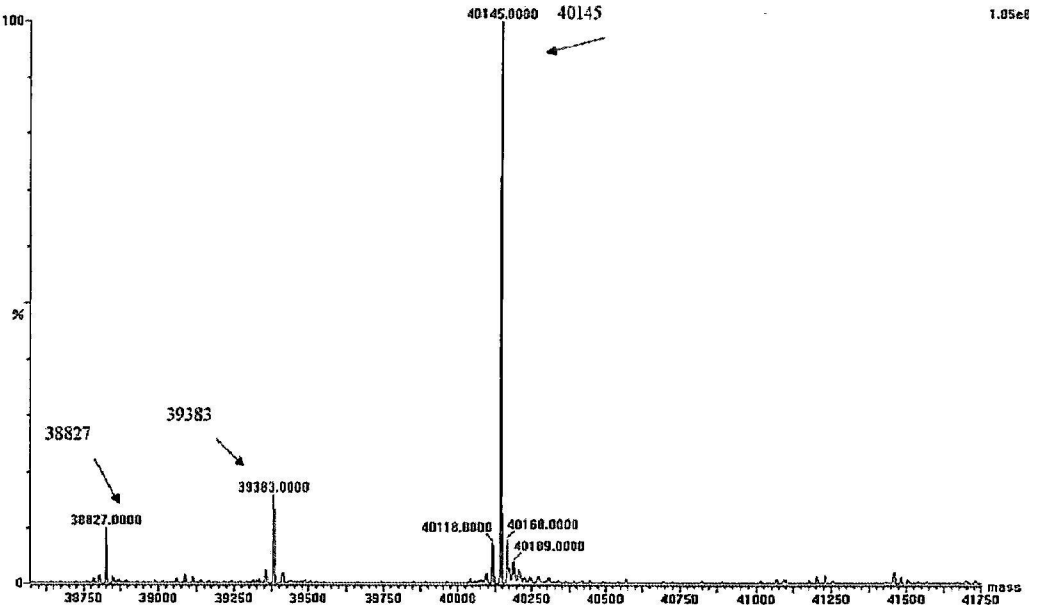
PR000020-ADC (非還原樣品) MS圖譜



質量 (Da)

(B)

PR000020-ADC (還原樣品) MS圖譜



質量 (Da)

【圖 10】

(A)

SEVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGLNVSRHYLSWVRQAPGKGLEWVAVIYS
GGGIEYVDSVKGRFTISRDNANNTLYLQMRSLRTEDSAVYYCARAIPRPHGSDI
WGQGTMVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(B)

PR000020-ADC樣品中含有Cys-IAM的多肽片段

Peptide	-10lgP	Mass	ppm	m/z	z	RT	AScore
R.LSC(+57.02)AASGLN(+.98)VSRHYLSWVR.Q	44.5	2176.08	1.3	545.0292	4	54.89	C3:Carbamidomethylation:1000.00;N9:Deamidation (NQ):1000.00
R.SLRTEDSAVYYC(+57.02)AR.A	62.98	1689.78	0.9	845.8971	2	32.27	C12:Carbamidomethylation:1000.00
K.THTC(+57.02)PPC(+57.02)PAPELLGGPSVFLFPPKPKD.T	77.06	2958.48	1.3	987.1676	3	67.82	C4:Carbamidomethylation:1000.00;C7:Carbamidomethylation:1000.00
T.C(+57.02)VVVDVSHEDPEVK.F	67.15	1610.76	-0.5	806.3874	2	34.74	C1:Carbamidomethylation:1000.00
R.VVSVLTVLHQDWLN(+.98)GKEYKC(+57.02)K.V	23.85	2516.31	1.3	504.2699	5	60.98	N14:Deamidation (NQ):11,12;C20:Carbamidomethylation:1000.00
R.EEMTKNQVSLTC(+57.02)LVK.G	67.92	1778.89	-1	890.4517	2	44.65	C12:Carbamidomethylation:1000.00
R.WQQGNVFSC(+57.02)SVM(+15.99)HEALHNHYTQK.S	75.57	2816.25	1.8	564.2592	5	42.96	C9:Carbamidomethylation:1000.00;M12:Oxidation (M):1000.00

(C)

PR000020樣品中含有Cys-IAM的多肽片段

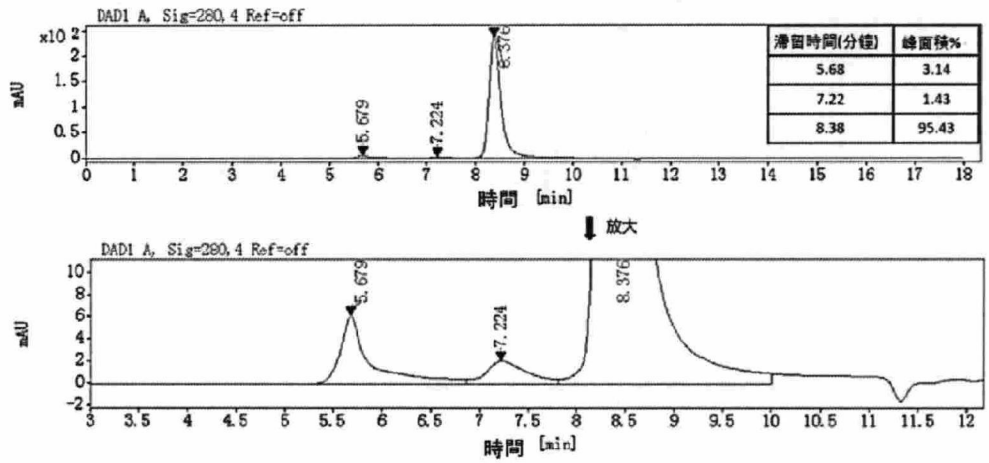
Peptide	-10lgP	Mass	ppm	m/z	z	RT	AScore
R.LSC(+57.02)AASGLN(+.98)VSR.H	62.36	1234.598	2	618.3073	2	31.34	C3:Carbamidomethylation:1000.00;N9:Deamidation (NQ):1000.00
R.TEDSAVYYC(+57.02)AR.A	61.23	1333.561	0.3	667.7879	2	28.85	C9:Carbamidomethylation:1000.00
K.SC(+57.02)DKTHTC(+57.02)PPC(+57.02)PAPELLGGPSVFLFPPK.P	51.68	3108.487	1.2	778.13	4	65.97	C2:Carbamidomethylation:1000.00;C8:Carbamidomethylation:1000.00;C11:Carbamidome
K.THTC(+57.02)PPC(+57.02)PAPELLGGPSVF.L	68.56	2035.95	1.5	1018.984	2	60.96	C4:Carbamidomethylation:1000.00;C7:Carbamidomethylation:1000.00
R.TPEVTC(+57.02)VVVDVSHED.P	71.26	1684.761	1.4	843.3891	2	49.5	C6:Carbamidomethylation:1000.00
K.NQVSLTC(+57.02)LVK.G	53.29	1160.622	0.7	581.3188	2	46.87	C7:Carbamidomethylation:1000.00
R.WQQGNVFSC(+57.02)SVMHEALHNHYTQK.S	82.25	2800.26	1.5	1401.139	2	48.19	C9:Carbamidomethylation:1000.00

上表各列名釋義：

- Peptide：多肽片段胺基酸序列
- -10lgP：該多肽的-10lgP分數
- Mass：單一同位素質量
- ppm：分子量誤差
- m/z：質荷比
- z：電荷數
- RT：滯留時間
- PTM：修飾
- Ascore：該多肽的修飾（PTM）的分數

【圖 11】

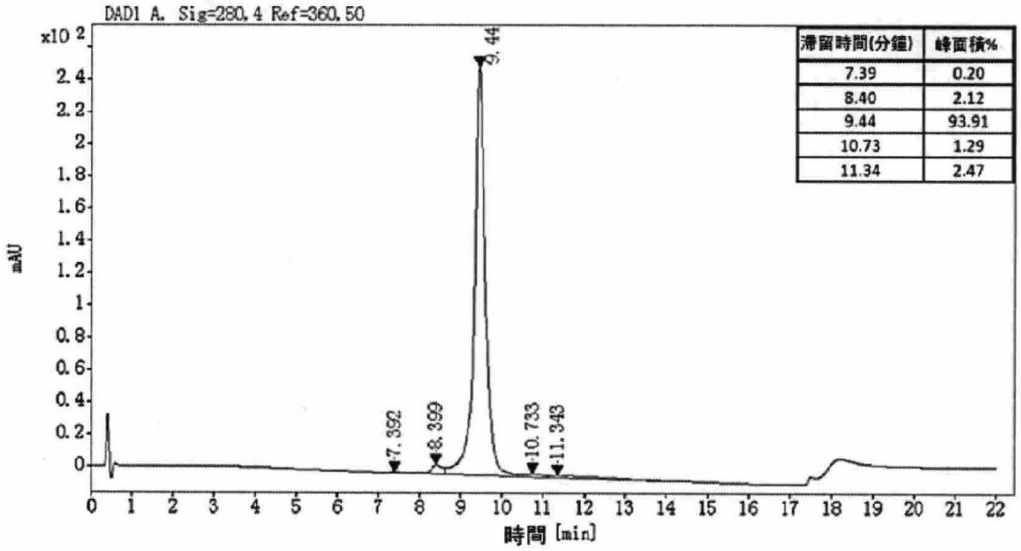
HCAb PR000759 (lot.# HSP307A PA1222 F3-4), SEC-HPLC



滯留時間(分鐘)	峰面積%
5.68	3.14
7.22	1.43
8.38	95.43

【圖 12】

PR000759-ADC 純化後 (lot.# HSP307A-181229 MIX), HIC-HPLC



滯留時間(分鐘)	峰面積%
7.39	0.20
8.40	2.12
9.44	93.91
10.73	1.29
11.34	2.47

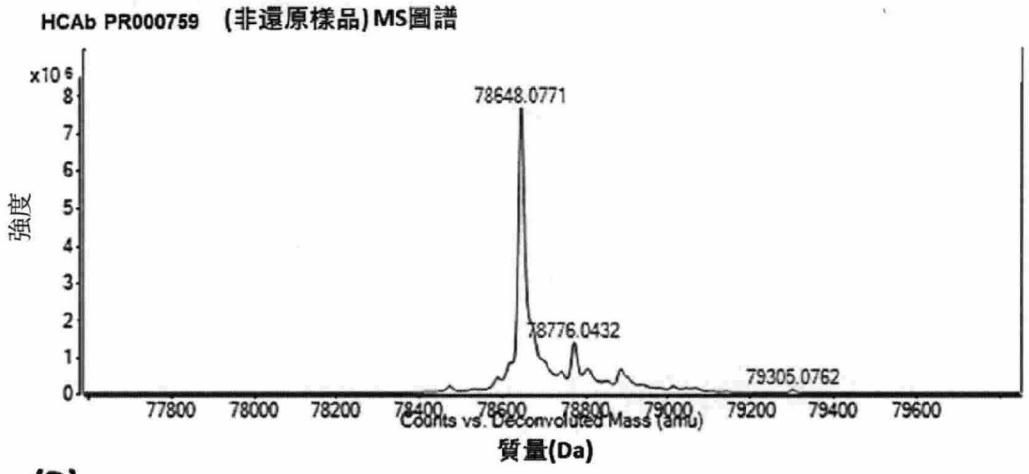
【圖 13】

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFAFHWVRQAPGKGLEGVAVIWYDGRNENYADSVKGRFTISRDNSK
NMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRGVLGDTRAFDIWGQGTMVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

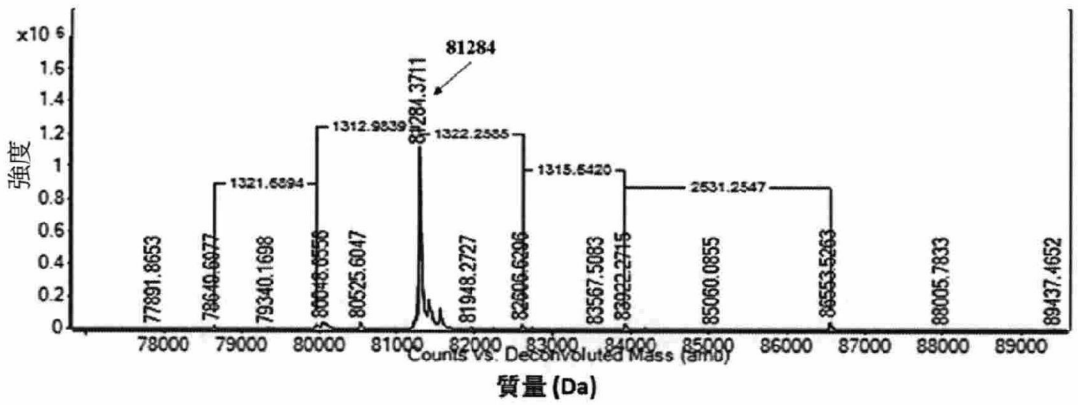
Peptide	-10lgP	Mass	ppm	m/z	RT	PTM
SC(+1315.78)DKTHTC(+57.02)PPC(+57.02)PAPELLGGPSVFLFPPKPK	41.21	4592.3926	-1	1149.1042	61.71	ADC Drug 1316; Carbamidomethylation
THTC(+57.02)PPC(+1315.78)PAPELLGGPSVFLFPPKPK	51.27	4102.208	-3.2	1026.556	61.7	Carbamidomethylation; ADC Drug 1316
TPEVTC(+1315.78)VVVDVSHEDPEVK	50.84	3396.7778	-0.3	1133.2662	61.74	ADC Drug 1316

【圖 14】

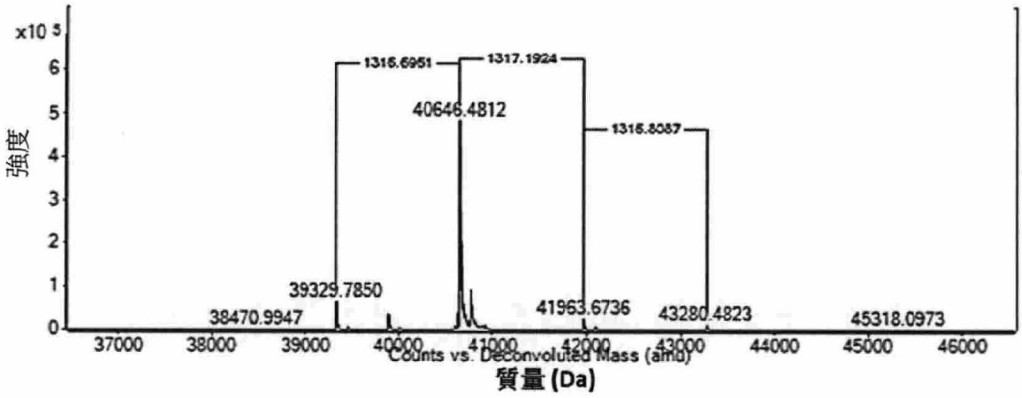
(A)


HCAb PR000759 (非還原樣品) MS圖譜
x10 6
強度
78648.0771
78776.0432
79305.0762
77800
78000
78200
78400
78600
78800
79000
79200
79400
79600
Counts vs. Deconvoluted Mass (amu)
質量(Da)

(B)

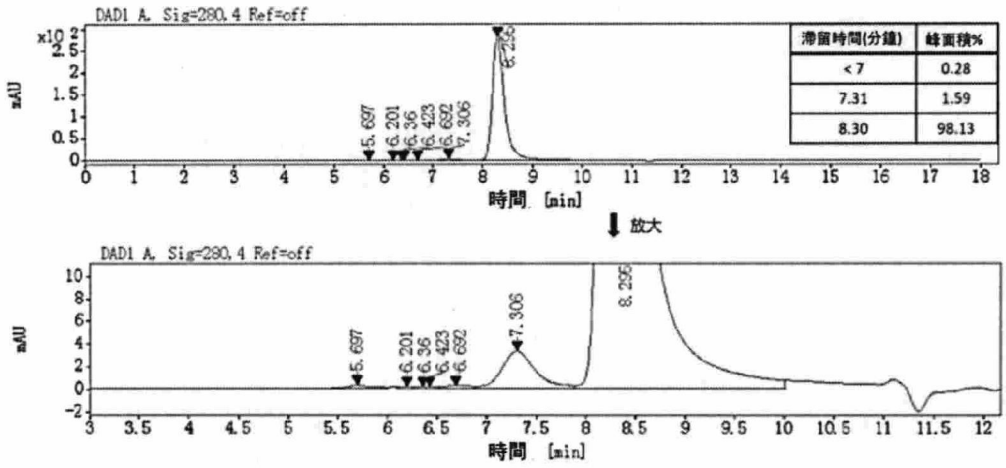

PR000759-ADC (非還原樣品) MS圖譜
x10 6
強度
81284
81284.3711
1312.9839
1322.2555
1321.6894
1315.6420
2531.2547
77891.8653
78640.6077
79340.1698
80525.6047
81948.2727
83567.5083
85060.0855
88005.7833
89437.4652
78000
79000
80000
81000
82000
83000
84000
85000
86000
87000
88000
89000
Counts vs. Deconvoluted Mass (amu)
質量 (Da)

(C)


PR000759-ADC (還原樣品) MS圖譜
x10 5
強度
1316.6951
1317.1924
40646.4812
1316.8087
39329.7850
38470.9947
41963.6736
43280.4823
45318.0973
37000
38000
39000
40000
41000
42000
43000
44000
45000
46000
Counts vs. Deconvoluted Mass (amu)
質量 (Da)

【圖 15】

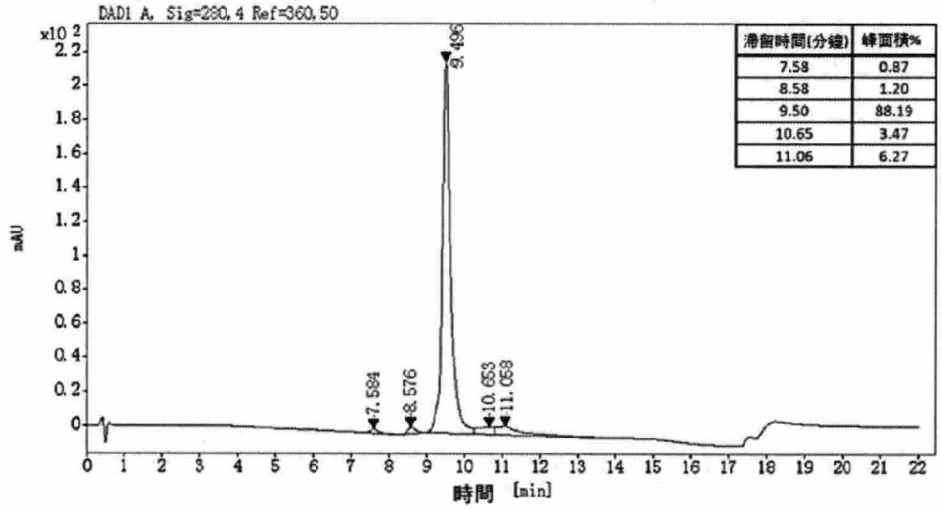
HCAb PR001046 (lot.# HSP307B PA1222 F11-12), SEC-HPLC



滯留時間(分鐘)	峰面積%
< 7	0.28
7.31	1.59
8.30	98.13

【圖 16】

PR001046-ADC 純化後 (lot.# HSP307B-181229 MIX), HIC-HPLC



滯留時間(分鐘)	峰面積%
7.58	0.87
8.58	1.20
9.50	88.19
10.65	3.47
11.06	6.27

【圖 17】

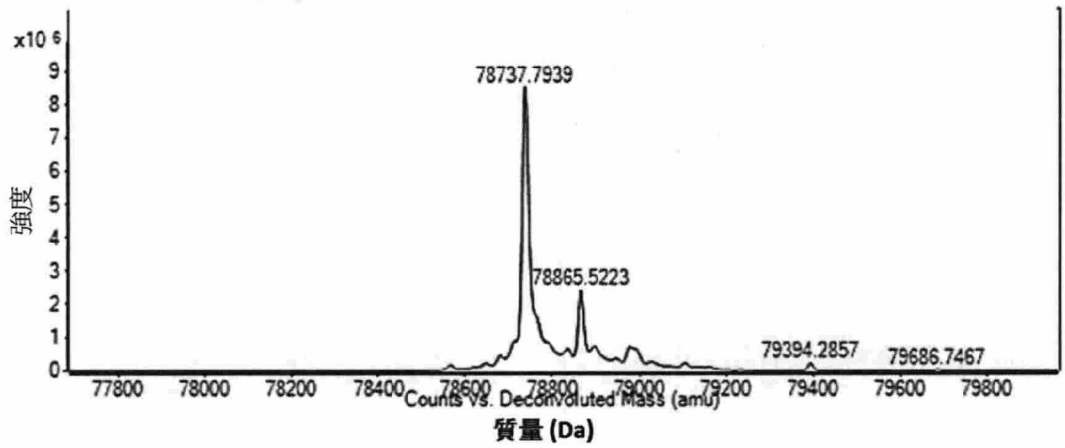
EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSDNYMTWVRQAPGKGLEWVSVIFSGGNTYYADSVKGRFTISRDNAKN
TLYLQMNSLRAEDTALYYCARRNYDDTRGTDVFDIWGQGTMVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Peptide	-10lgP	Mass	ppm	m/z	RT	PTM
TPEVTC(+1315.78)VVVDVSHEDPEVK	40.62	3396.7778	-3.5	850.1988	61.75	ADC Drug 1316
SC(+1315.78)DKTHTC(+57.02)PPC(+57.02)PAPELLGGPSVFLFPPKPK	36.64	4592.3926	7.7	1149.1143	61.71	ADC Drug 1316; Carbamidomethylation
THTC(+57.02)PPC(+1315.78)PAPELLGGPSVFLFPPKPK	48.56	4102.208	2.4	1026.5618	61.7	Carbamidomethylation; ADC Drug 1316

【圖 18】

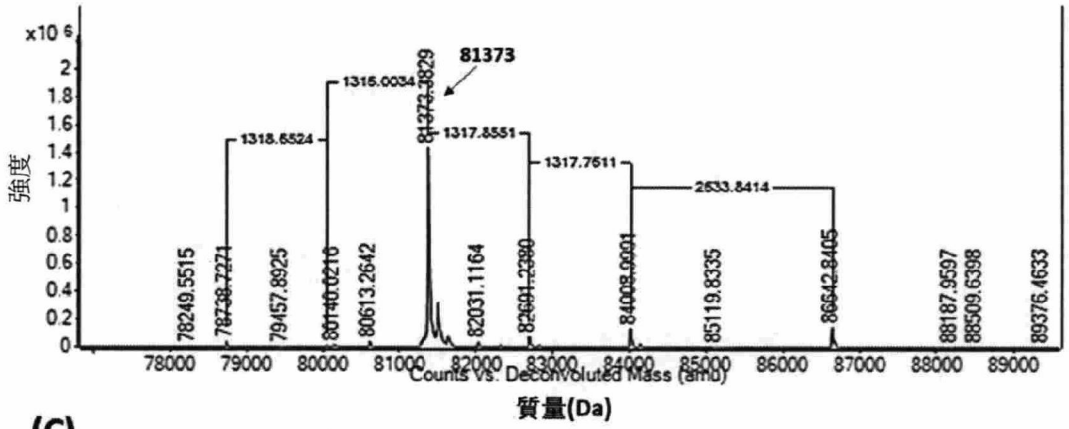
(A)

HCAb PR001046 (非還原樣品) MS圖譜



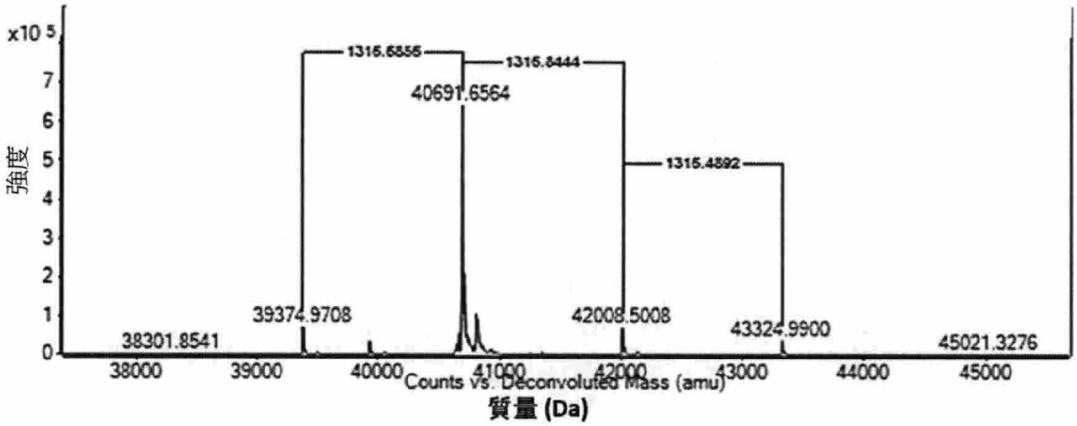
(B)

PR001046-ADC (非還原樣品) MS圖譜

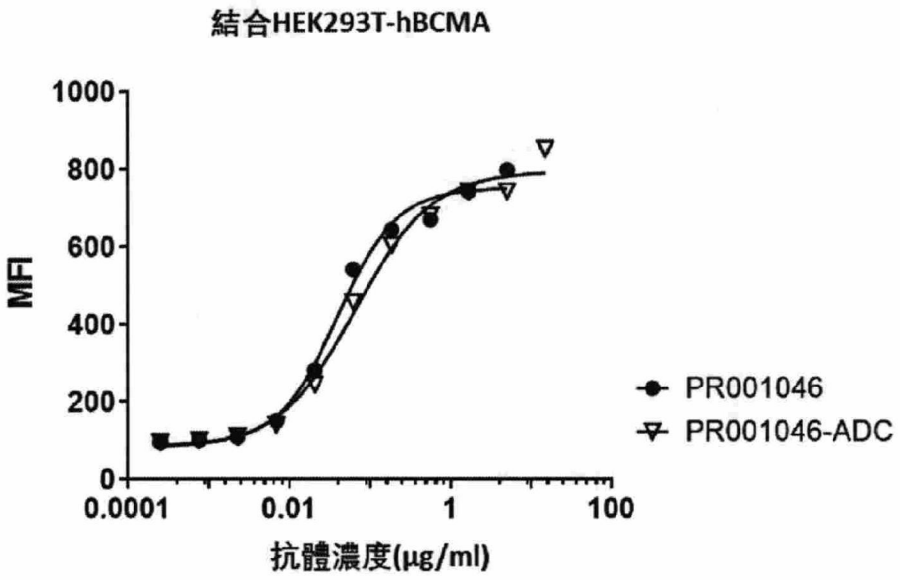


(C)

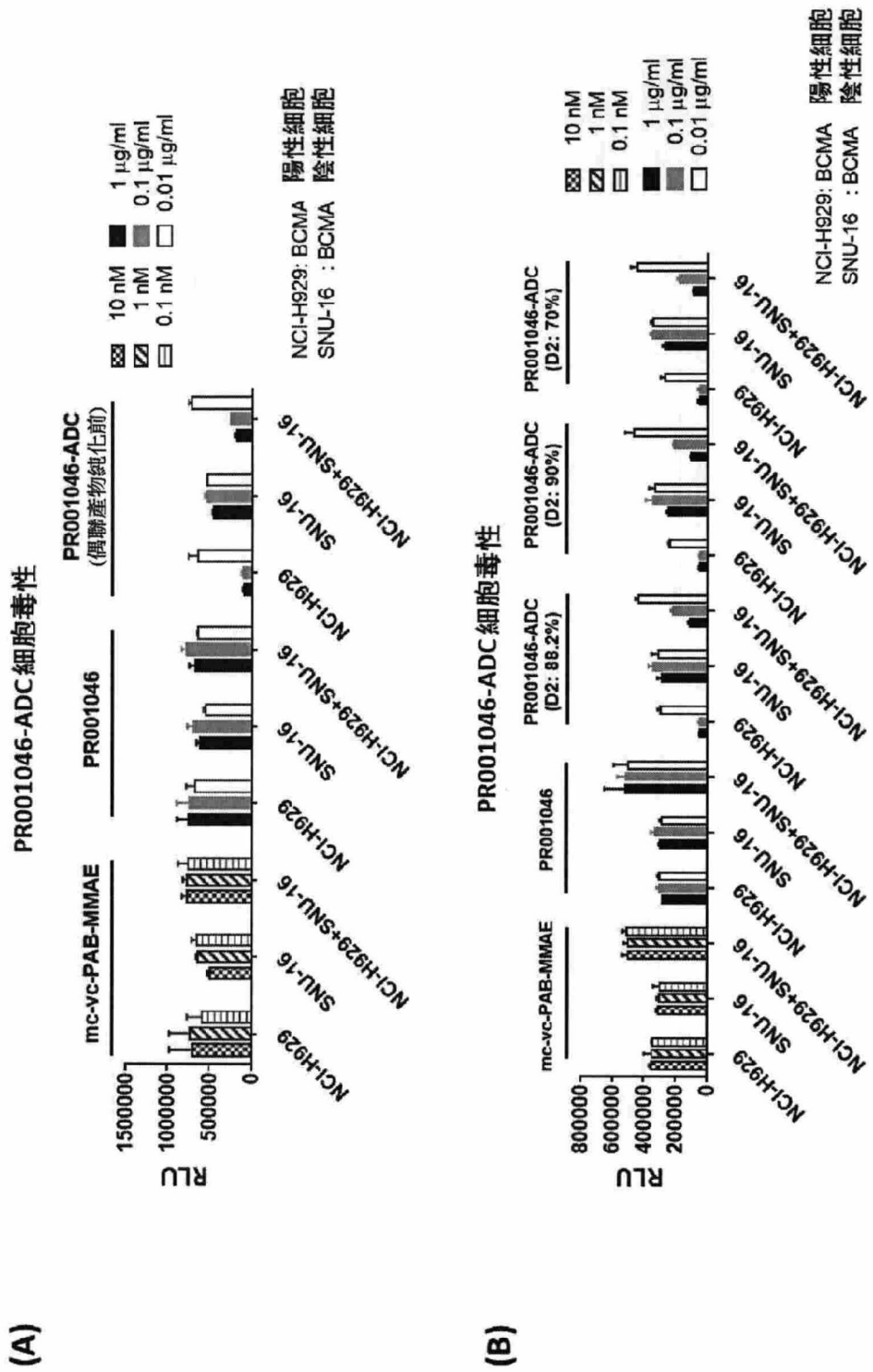
PR001046-ADC (還原樣品) MS圖譜



【圖 19】

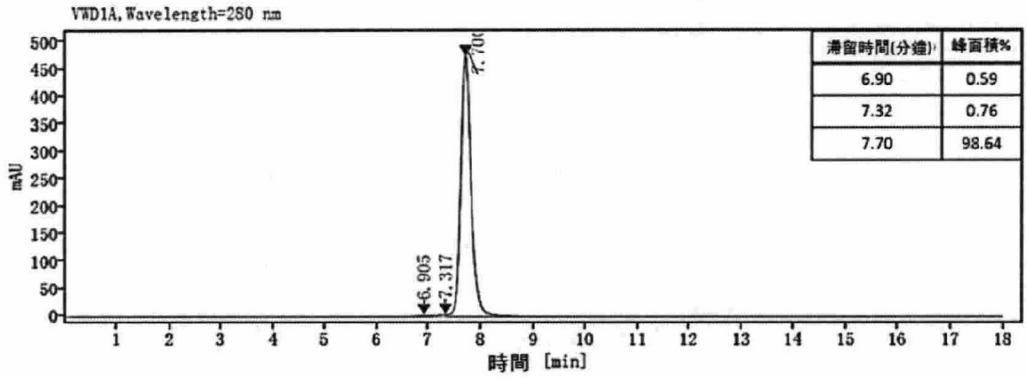

結合HEK293T-hBCMA
1000
800
600
400
200
0
MFI
0.0001
0.01
1
100
抗體濃度(μg/ml)
PR001046
PR001046-ADC

【圖 20】


(A)
PR001046-ADC細胞毒性
mc-vc-PAB-MMAE
PR001046
PR001046-ADC
(偶聯產物純化前)
10 nM
1 nM
0.1 nM
1 μg/ml
0.1 μg/ml
0.01 μg/ml
NCI-H929: BCMA 陽性細胞
SNU-16 : BCMA 陰性細胞
RLU
1500000
1000000
500000
0
NCI-H929
SNU-16
NCI-H929+SNU-16
(B)
PR001046-ADC細胞毒性
PR001046-ADC
(D2: 88.2%)
PR001046-ADC
(D2: 90%)
PR001046-ADC
(D2: 70%)
800000
600000
400000
200000

【圖 21】

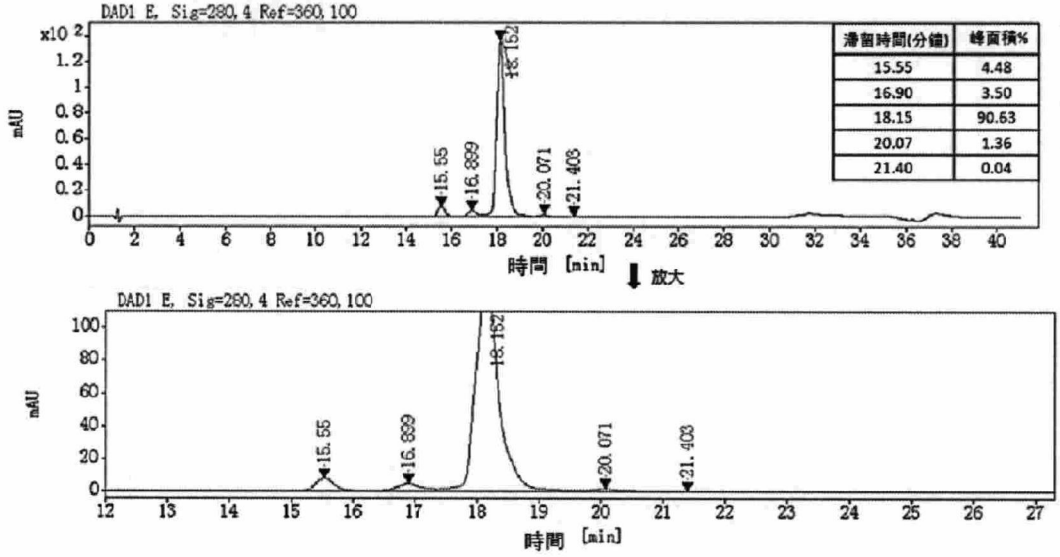
HCAb PR004432 (lot.# HSP314-01 K20200427-0507PB0507), SEC-HPLC



滯留時間(分鐘)	峰面積%
6.90	0.59
7.32	0.76
7.70	98.64

【圖 22】

PR004432-ADC 純化後 (lot.# HSP31401-ADC-20200609), RP-HPLC



滯留時間(分鐘)	峰面積%
15.55	4.48
16.90	3.50
18.15	90.63
20.07	1.36
21.40	0.04

【圖 23】

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSNNYAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVS
VKSRITINPDTSKNQFSLQLNRVTPEDTAVYYCARDNYYGSGSPPVDALDIWGQGTMVTVSSEP
97.12% **1.49%**
KS**C**DKTHT**C**PP**C**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

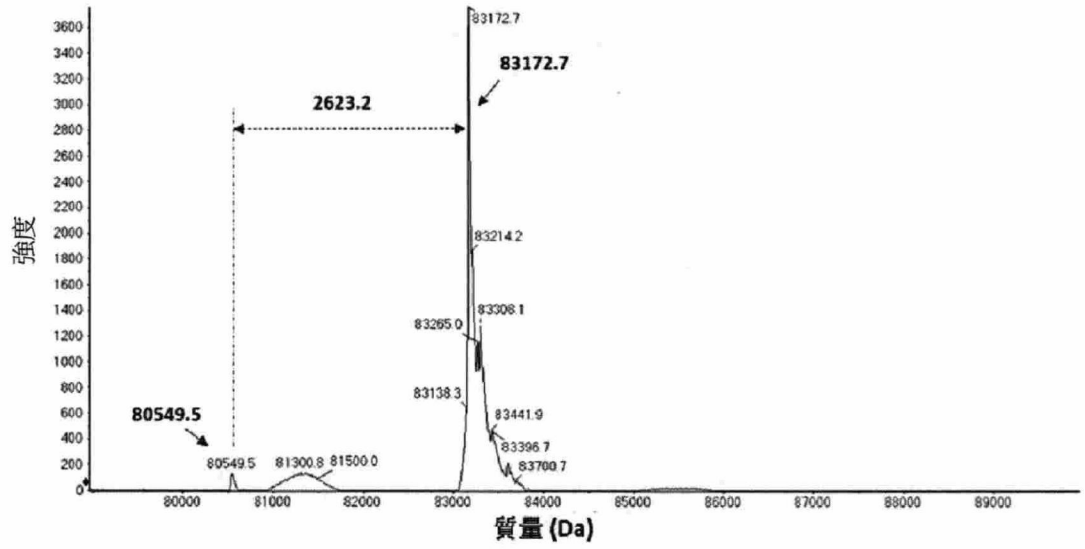
- SC(+1315.78)DK
- SC(+1315.78)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
- THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK

	Attribute Name	Value
1	MMAE "SCDK"	97.12 %
2	MMAE "THTCPPCPAPELLGGPS...	1.49 %

【圖 24】

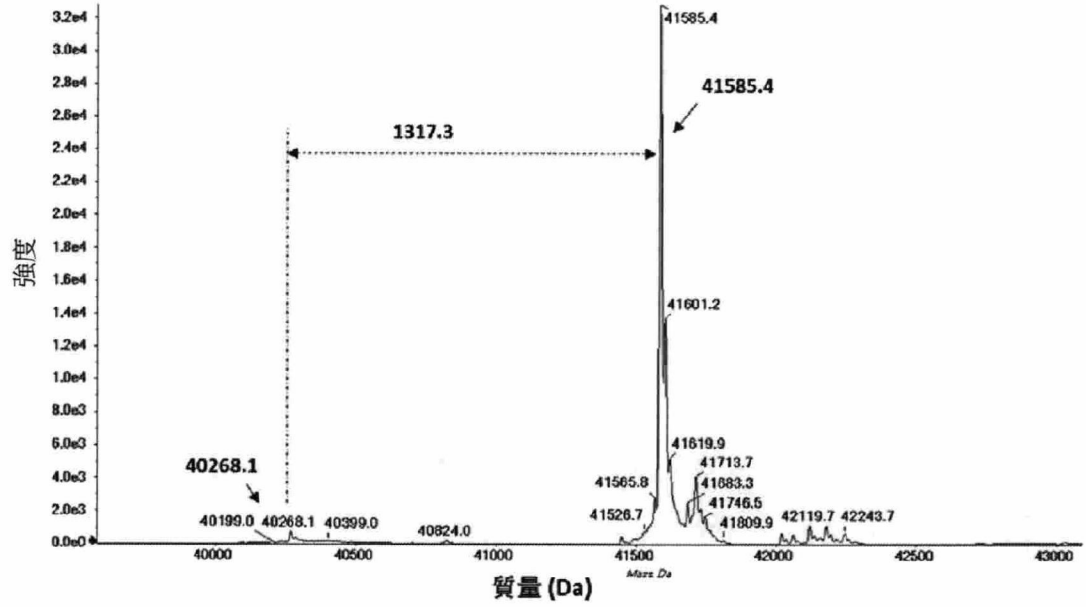
(A)

PR004432-ADC (非還原樣品) MS圖譜

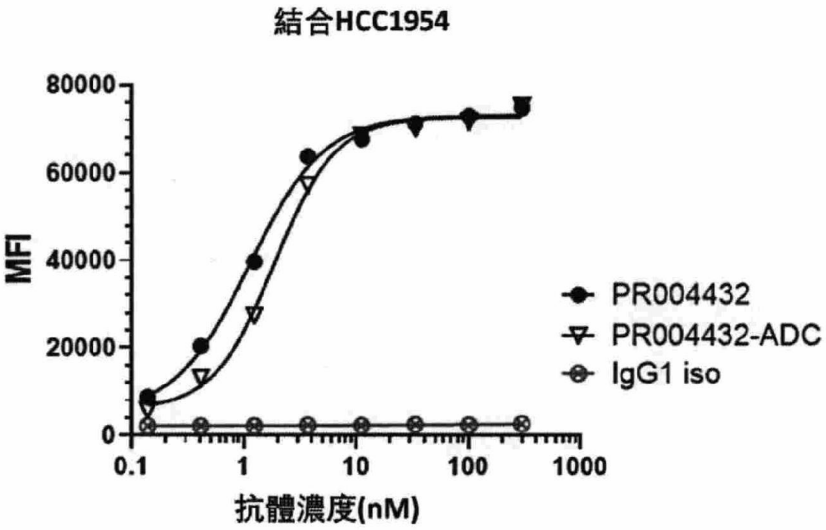


(B)

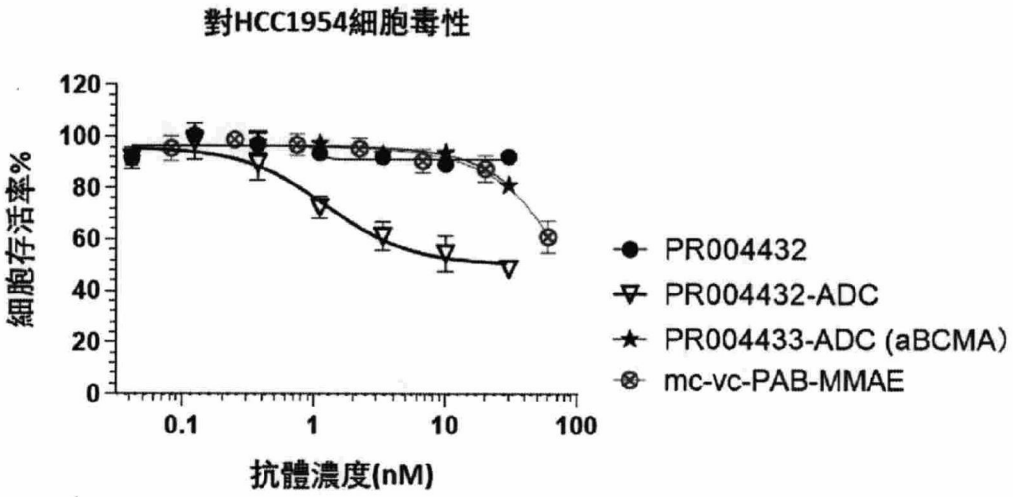
PR004432-ADC (還原樣品) MS圖譜



【圖 25】

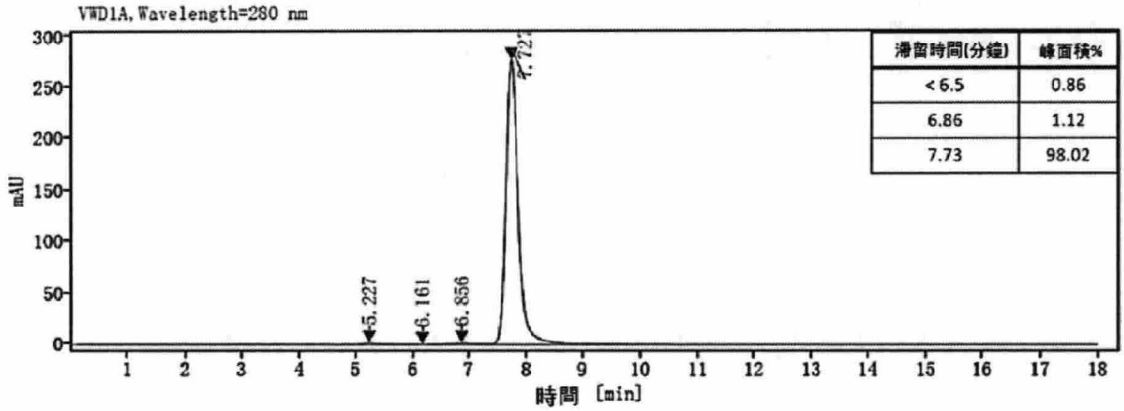

結合HCC1954
MFI
80000
60000
40000
20000
0
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(nM)
PR004432
PR004432-ADC
IgG1 iso

【圖 26】


對HCC1954細胞毒性
細胞存活率%
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
抗體濃度(nM)
PR004432
PR004432-ADC
PR004433-ADC (aBCMA)
mc-vc-PAB-MMAE

【圖 27】

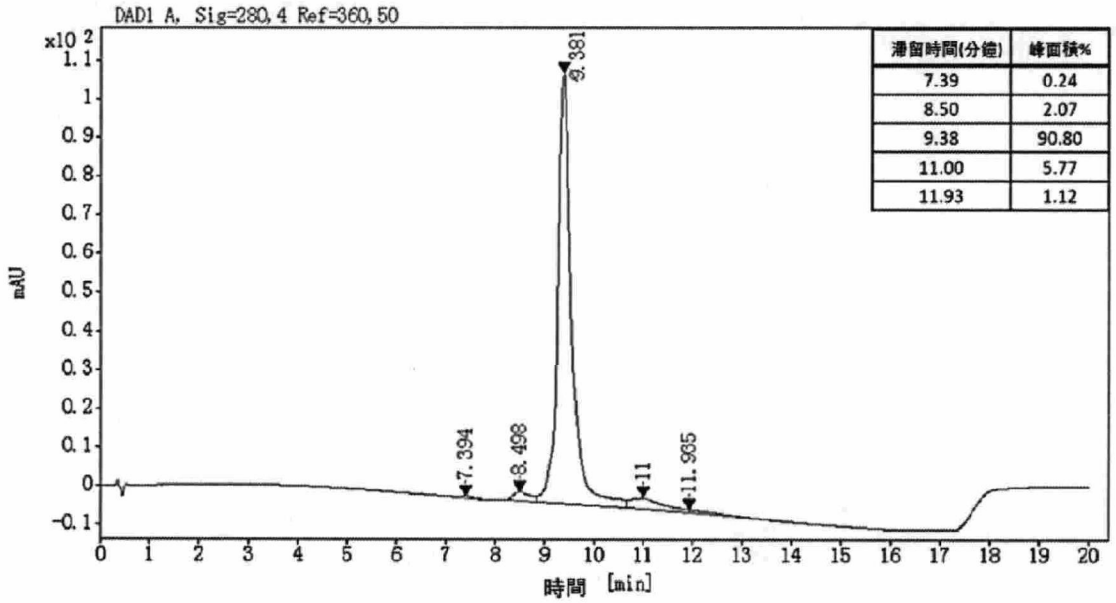
HCAb PR004433 (lot.# HSP314-02 K20200330-0409PA0409), SEC-HPLC



滯留時間(分鐘)	峰面積%
< 6.5	0.86
6.86	1.12
7.73	98.02

【圖 28】

PR004433-ADC 純化後 (lot.# HSP31402-ADC-20200521), HIC-HPLC

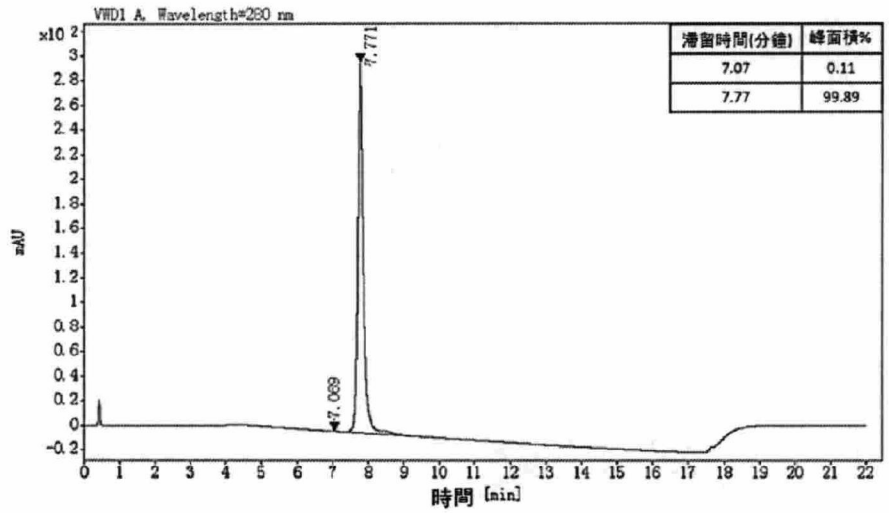


滯留時間(分鐘)	峰面積%
7.39	0.24
8.50	2.07
9.38	90.80
11.00	5.77
11.93	1.12

【圖 29】

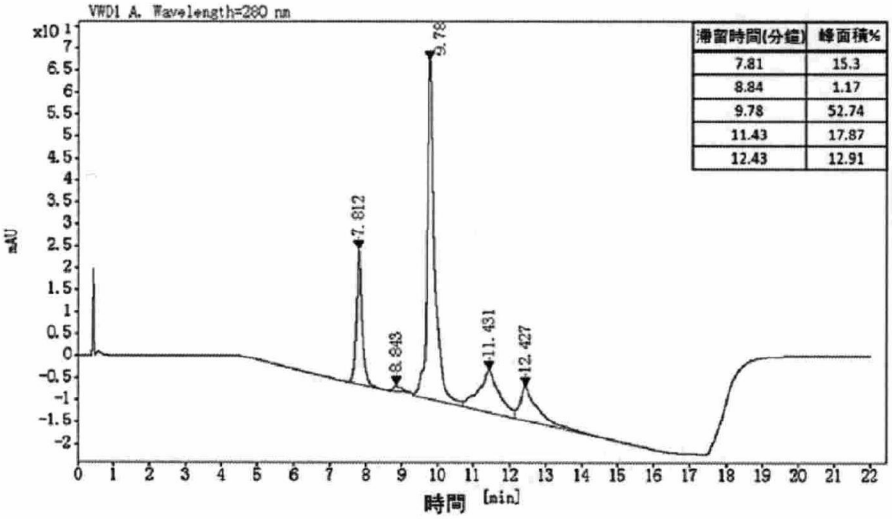
(A)

HCAb PR004433 (lot.# HSP314-02 K20200330-0409PA0409), HIC-HPLC



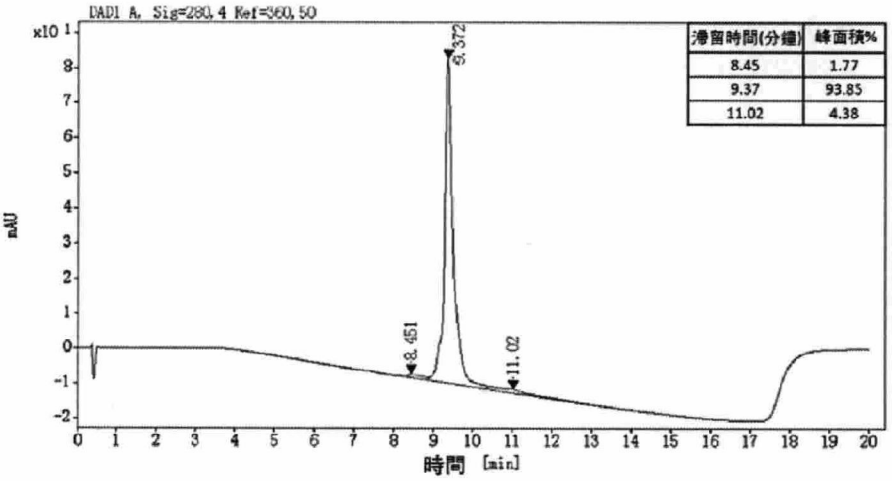
(B)

PR004433-ADC純化前 (lot.# HSP31402-20041601), HIC-HPLC



(C)

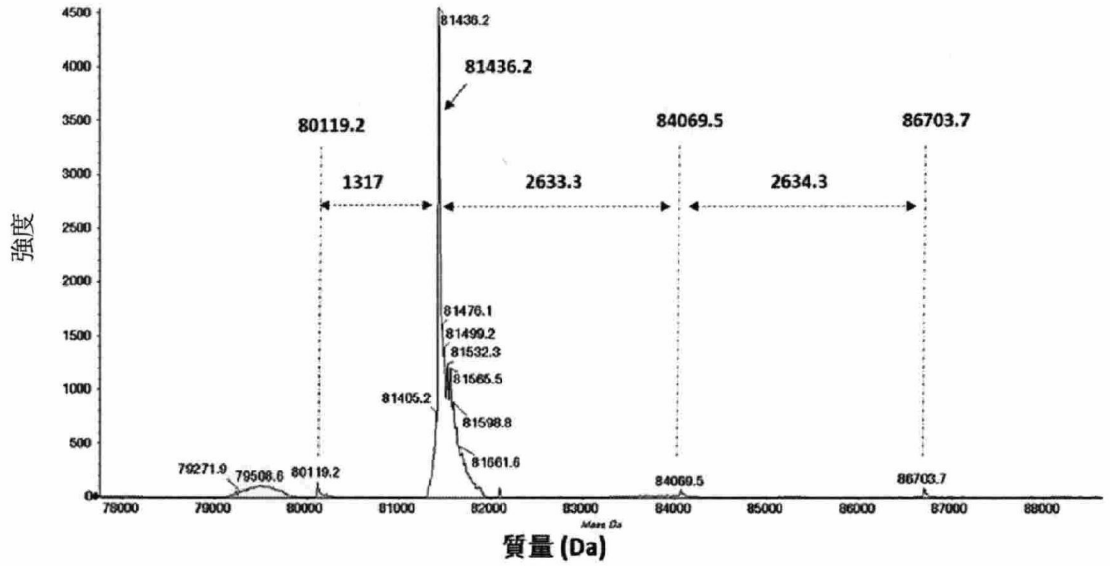
PR004433-ADC 純化後 (lot.# HSP31402-20041601PA0416), HIC-HPLC



【圖 30】

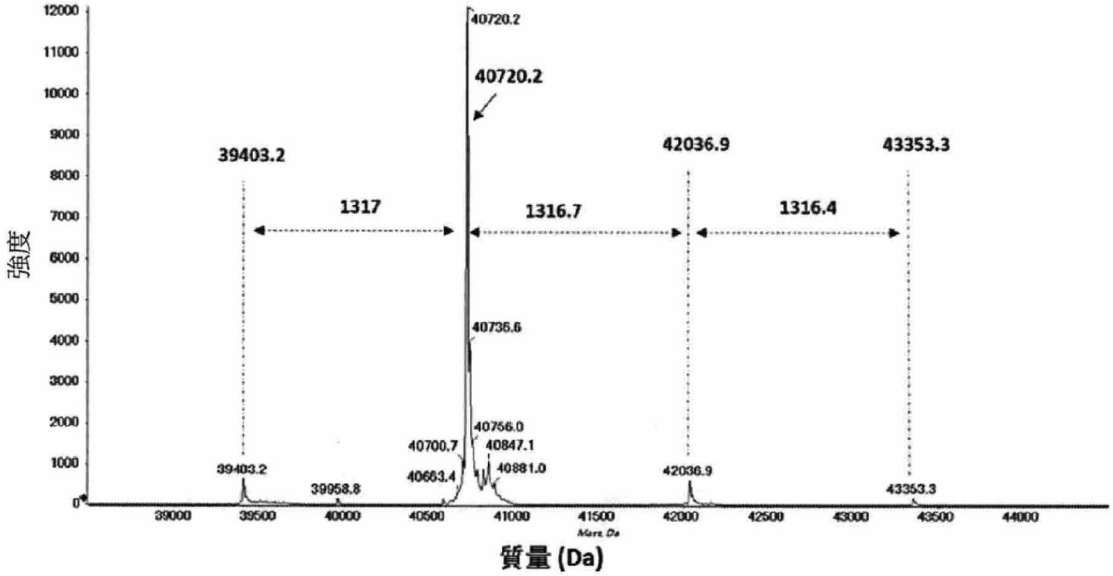
(A)

PR004433-ADC (非還原樣品) MS圖譜

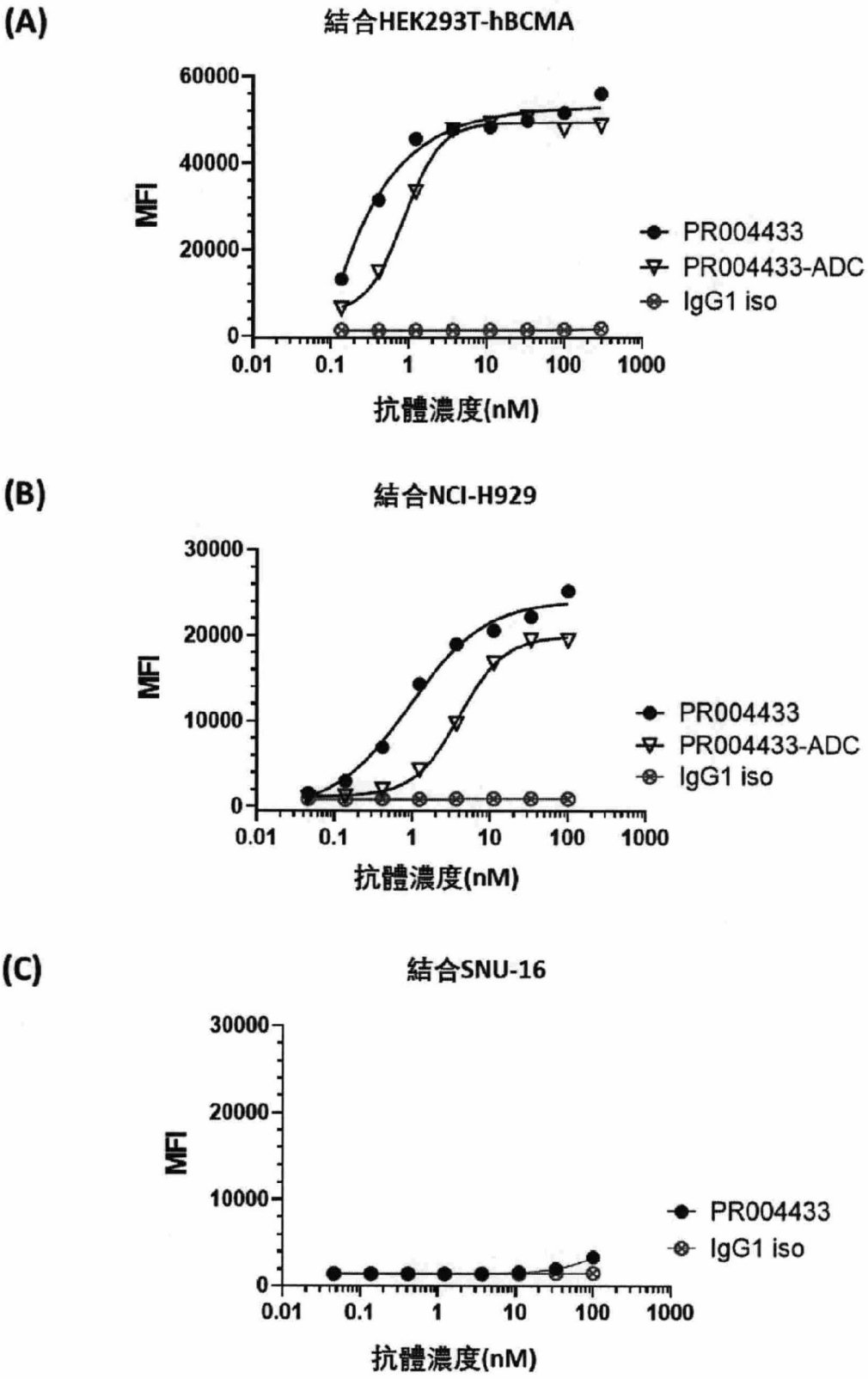


(B)

PR004433-ADC (還原樣品) MS圖譜

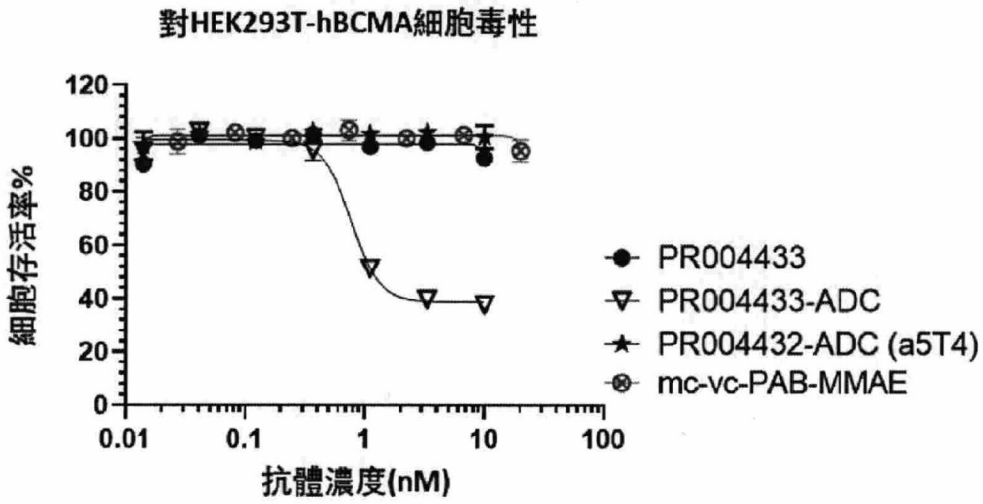


【圖 31】

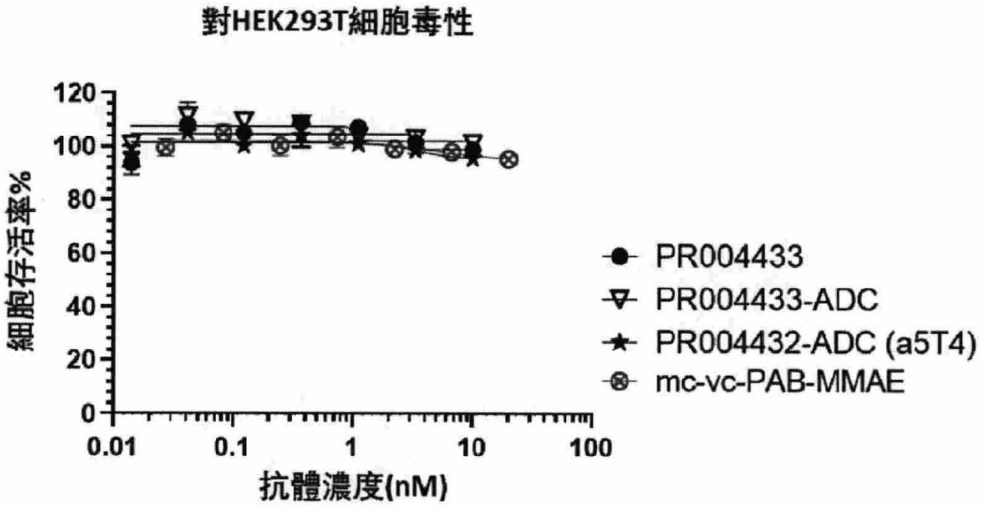

(A)
結合HEK293T-hBCMA
MFI
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(nM)
PR004433
PR004433-ADC
IgG1 iso
(B)
結合NCI-H929
MFI
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(nM)
PR004433
PR004433-ADC
IgG1 iso
(C)
結合SNU-16
MFI
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(nM)
PR004433
IgG1 iso

【圖 32】

(A)


對HEK293T-hBCMA細胞毒性
細胞存活率%
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度(nM)
PR004433
PR004433-ADC
PR004432-ADC (a5T4)
mc-vc-PAB-MMAE

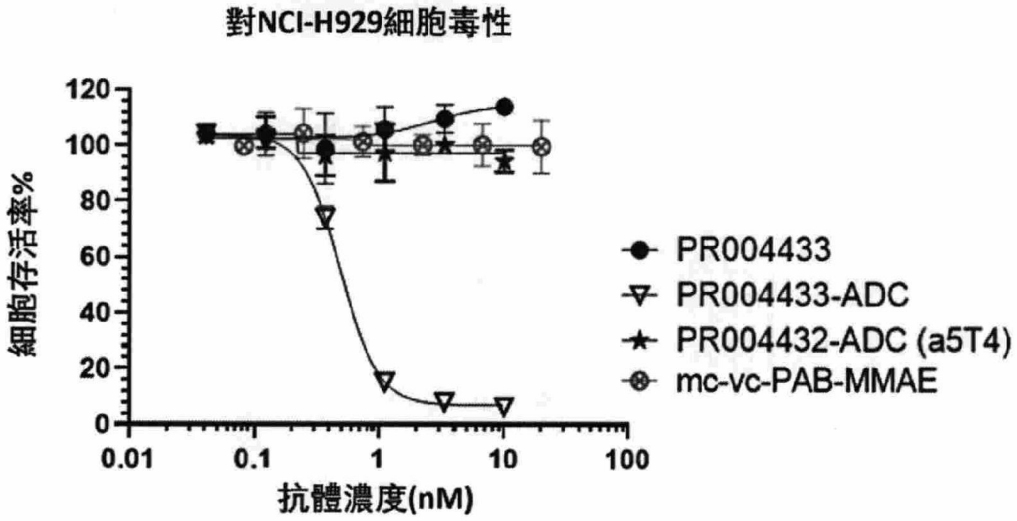
(B)


對HEK293T細胞毒性
細胞存活率%
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度(nM)
PR004433
PR004433-ADC
PR004432-ADC (a5T4)
mc-vc-PAB-MMAE

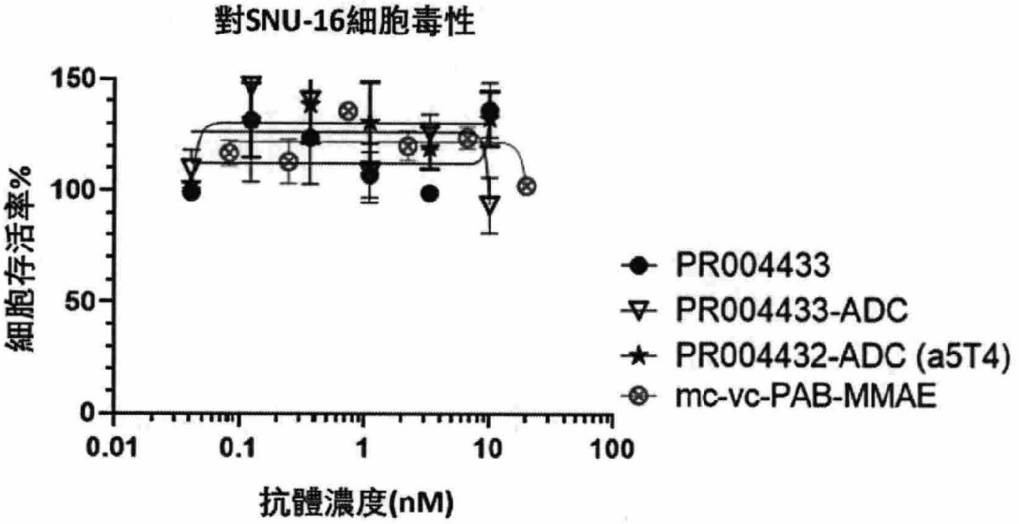
(接下頁)

（續上頁）

(C)


對NCI-H929細胞毒性
細胞存活率%
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度(nM)
PR004433
PR004433-ADC
PR004432-ADC (a5T4)
mc-vc-PAB-MMAE

(D)


對SNU-16細胞毒性
細胞存活率%
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度(nM)
PR004433
PR004433-ADC
PR004432-ADC (a5T4)
mc-vc-PAB-MMAE

【圖 33】

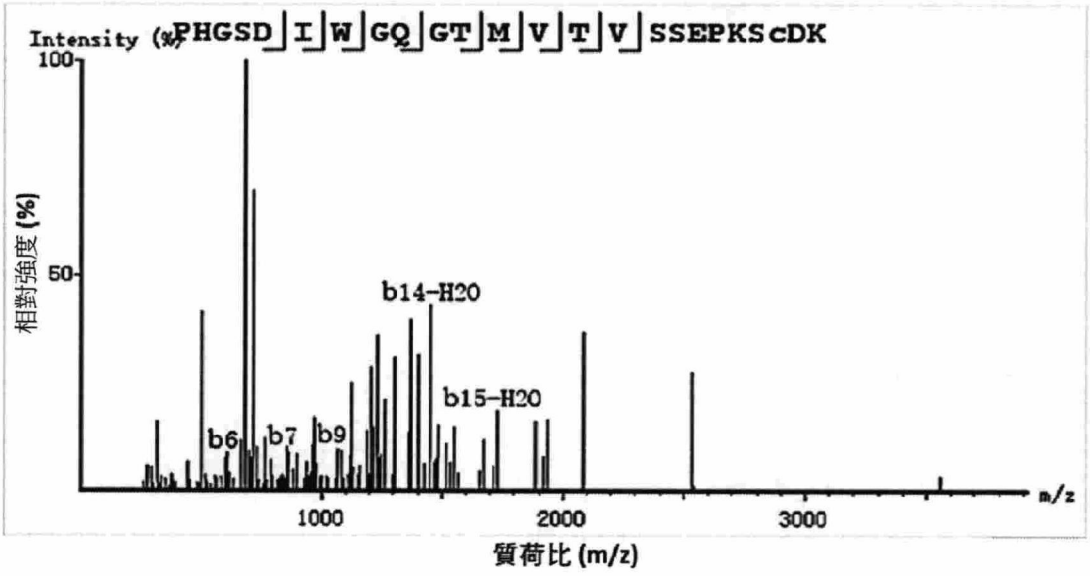
EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSDSYMTWVRQAPGKGLEWVSVIFSGGRTYYSDSV
KGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARRNYDDTRGTDVFDIWGQGTMVTVSSEPK
98% **4%**
S**C**DKTHT**C**PP**C**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- SC(+1315.78)DK
- SC(+1315.78)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
- THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK

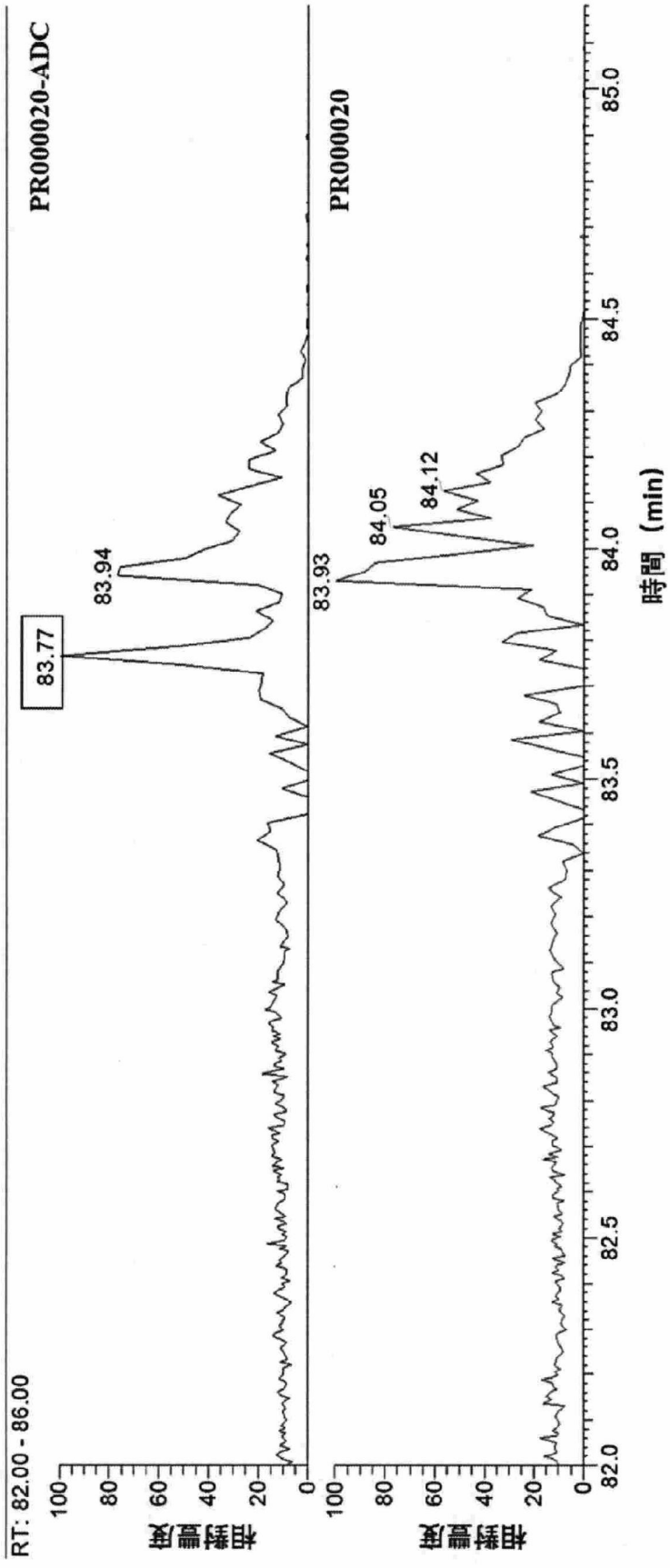
	Attribute Name	Value
1	MMAE "SCDK"	98.03 %
2	MMAE "THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK"	4.01 %

【圖 34】

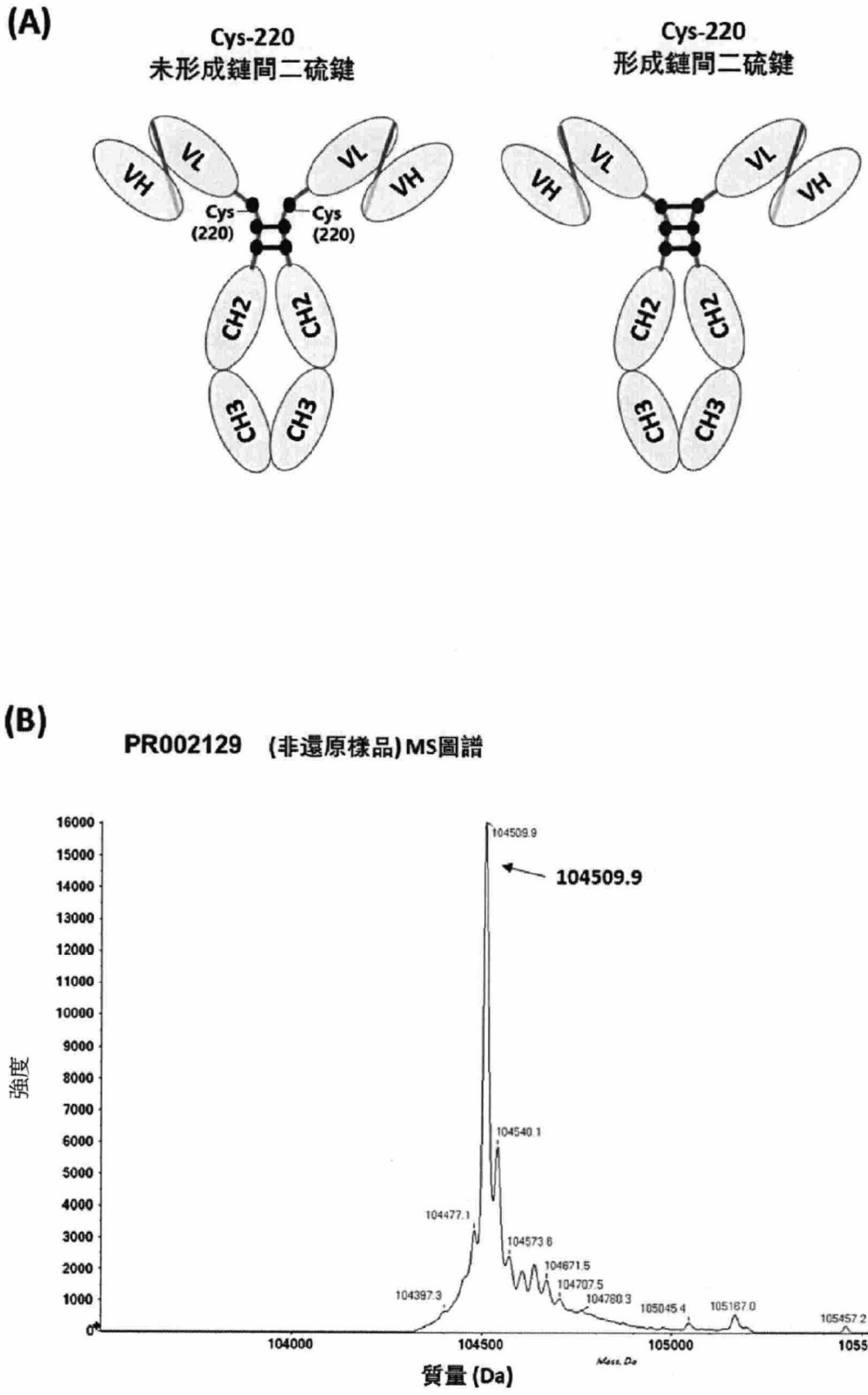
PR000020-ADC 肽段 'PHGSDIWGQGTMVTVSSEPKSC(+1315.78)DK' 二級MS圖譜



【圖 35】

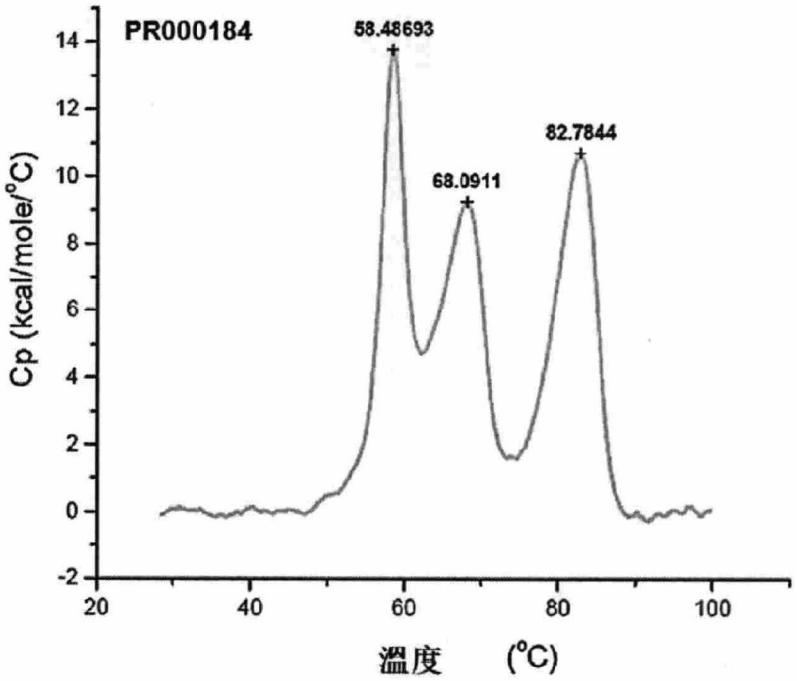

PR000020-ADC
RT: 82.00 - 86.00
83.77
83.94
相對豐度
PR000020
83.93
84.05
84.12
相對豐度
時間 (min)
82.0
82.5
83.0
83.5
84.0
84.5
85.0
0
20
40
60
80
100

【圖 36】

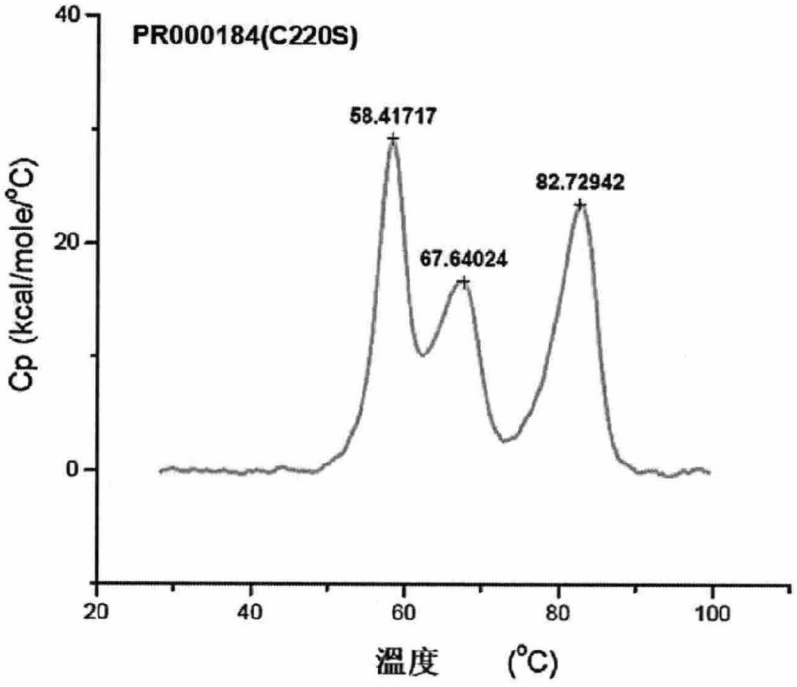

(A)
Cys-220
未形成鏈間二硫鍵
Cys-220
形成鏈間二硫鍵
VH
VL
VL
VH
Cys
(220)
Cys
(220)
CH2
CH2
CH3
CH3
(B)
PR002129 (非還原樣品) MS圖譜
強度
104509.9
104509.9
104540.1
104477.1
104573.6
104671.5
104707.5
104780.3
104397.3
105045.4
105187.0
105457.2
104000
104500
105000
105500
質量 (Da)

【圖 37】

(A)

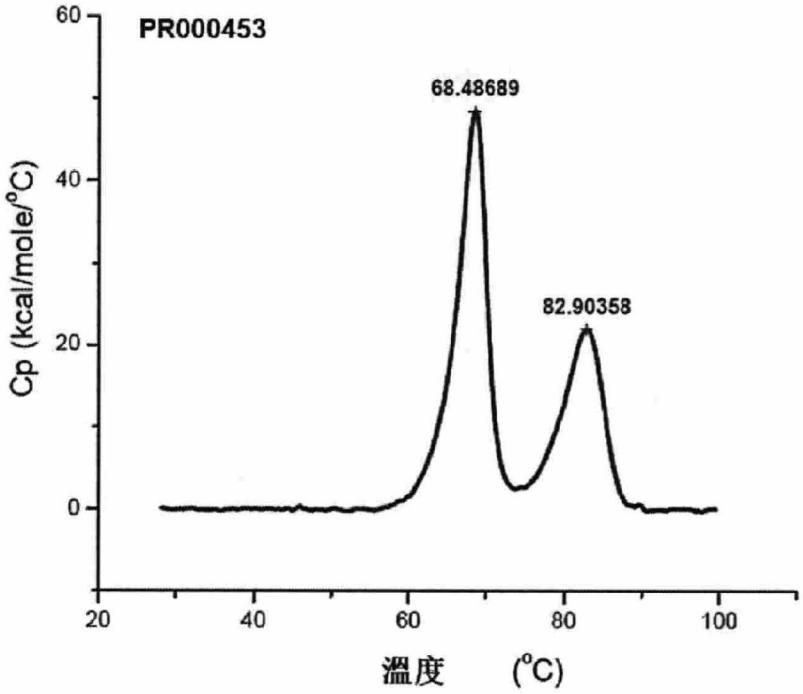

PR000184
58.48693
68.0911
82.7844
Cp (kcal/mole/°C)
溫度 (°C)

(B)

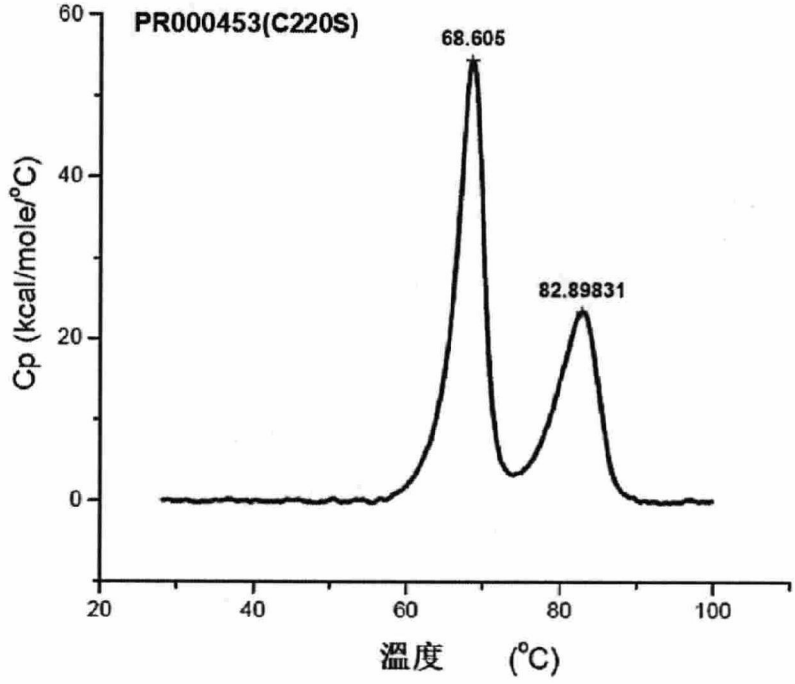

PR000184(C220S)
58.41717
67.64024
82.72942
Cp (kcal/mole/°C)
溫度 (°C)

【圖 38】

(A)

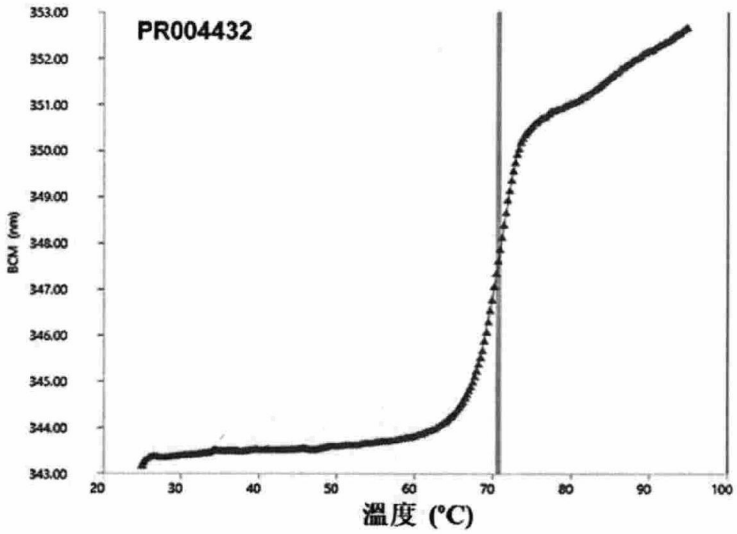

PR000453
68.48689
82.90358
Cp (kcal/mole/°C)
溫度 (°C)
0
20
40
60
20
40
60
80
100

(B)

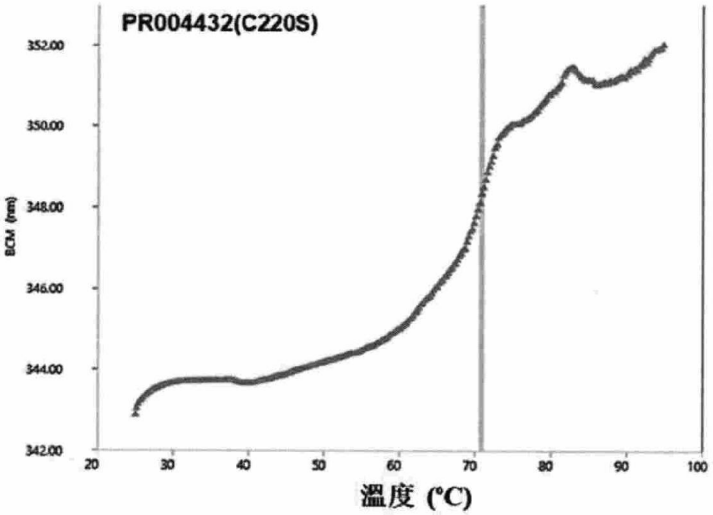

PR000453(C220S)
68.605
82.89831
Cp (kcal/mole/°C)
溫度 (°C)
0
20
40
60
20
40
60
80
100

【圖 39】

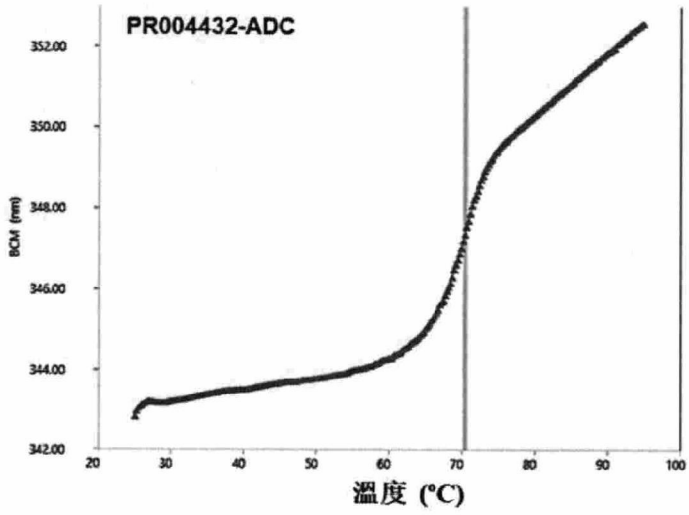
(A)


PR004432
BCM (nm)
353.00
352.00
351.00
350.00
349.00
348.00
347.00
346.00
345.00
344.00
343.00
20
30
40
50
60
70
80
90
100
溫度 (°C)

(B)


PR004432(C220S)
BCM (nm)
352.00
350.00
348.00
346.00
344.00
342.00
20
30
40
50
60
70
80
90
100
溫度 (°C)

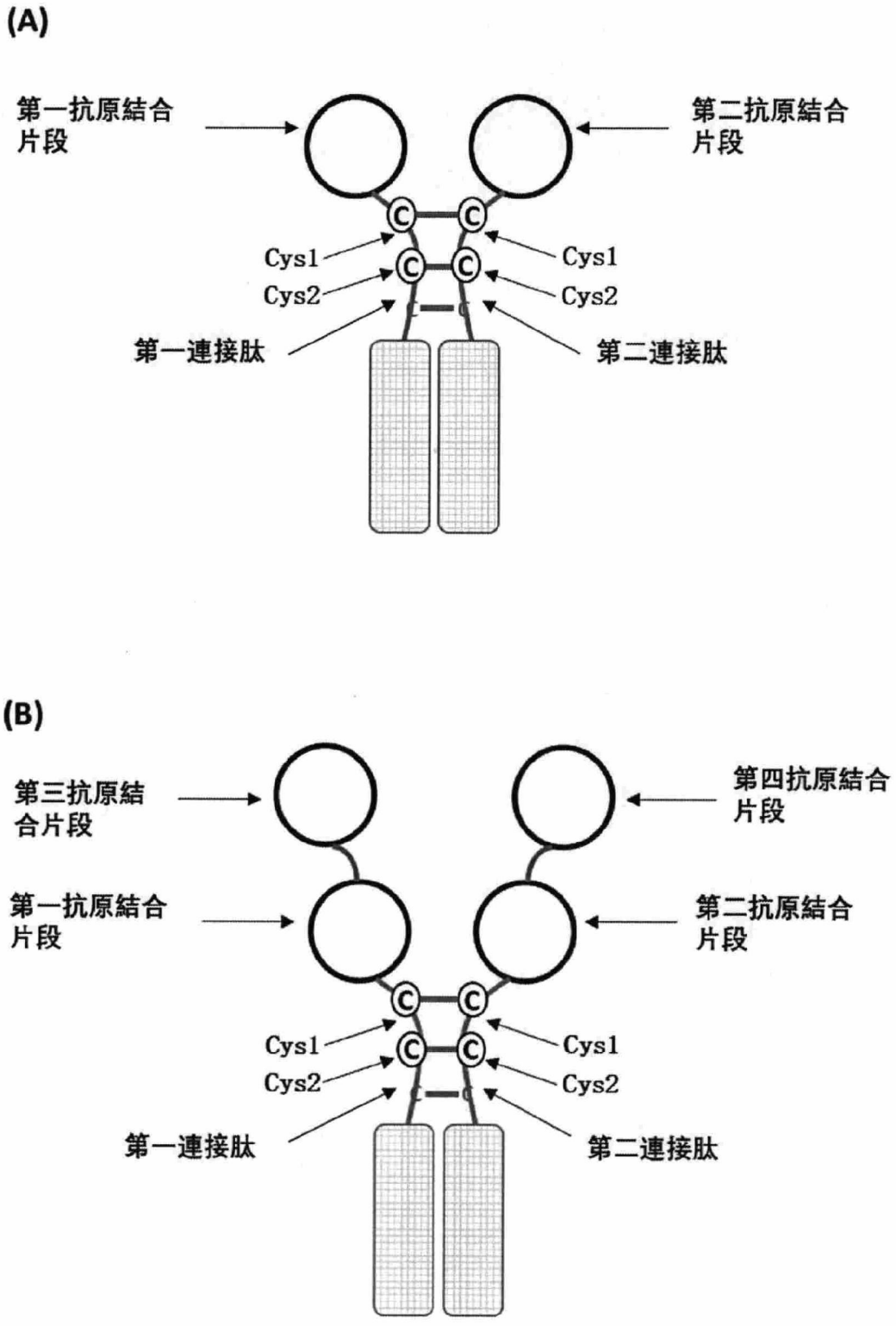
(C)


PR004432-ADC
BCM (nm)
352.00
350.00
348.00
346.00
344.00
342.00
20
30
40
50
60
70
80
90
100
溫度 (°C)

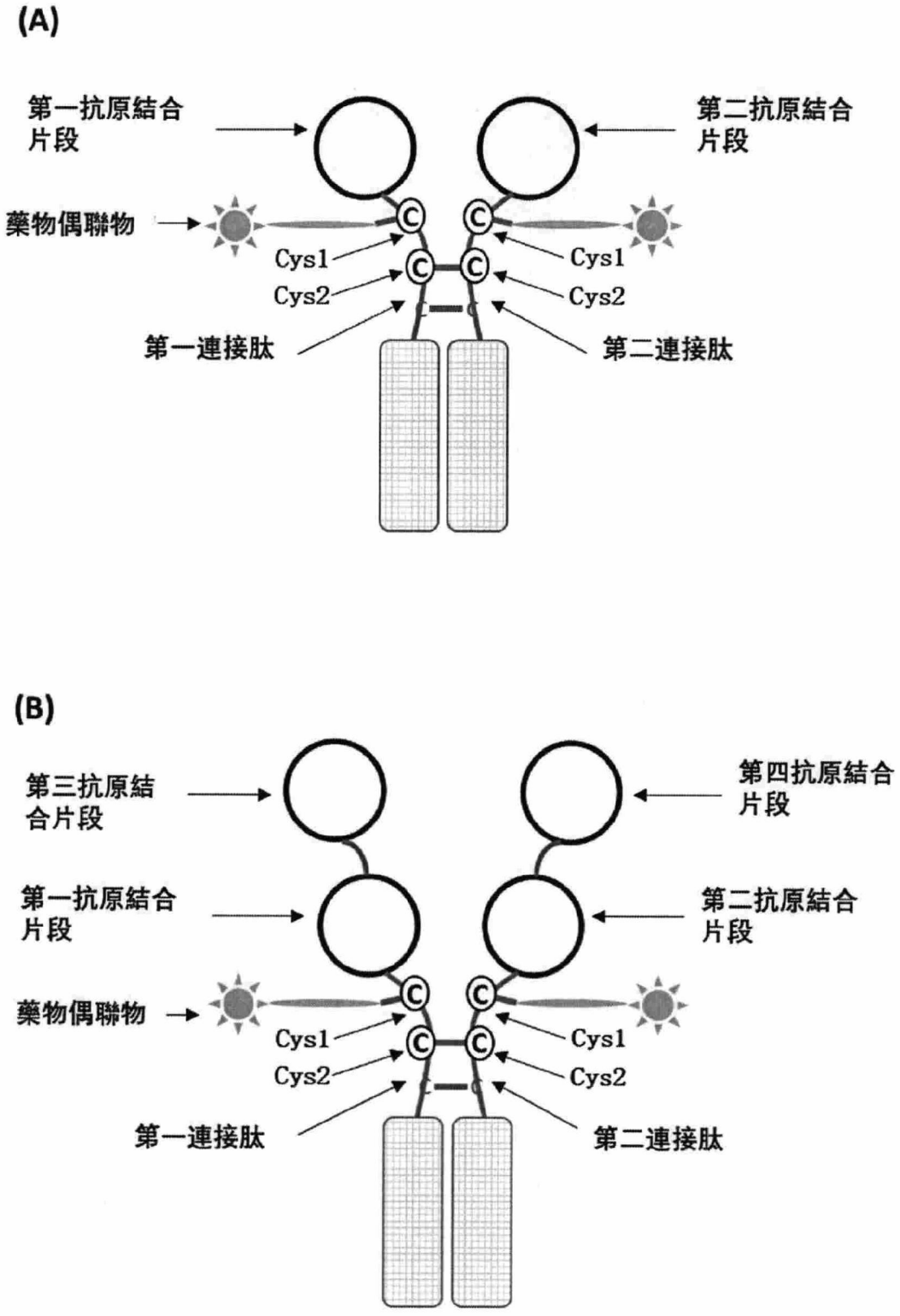
【圖 40】

蛋白-藥物偶聯物
Protein-Drug Conjugates
載荷藥物
Drug moiety
Payload
藥物偶聯物
Drug conjugate
連接子
Linker
抗原結合片段
Antigen-binding fragment
偶聯位點
Coupling site
連接肽
Linker peptide
鏈間二硫鍵
Interchain disulfide bond
配對單元
Pairing Components
抗原結合蛋白
Antigen-binding protein

【圖 41】


(A)
第一抗原結合片段
第二抗原結合片段
Cys1
Cys2
Cys1
Cys2
第一連接肽
第二連接肽
(B)
第三抗原結合片段
第四抗原結合片段
第一抗原結合片段
第二抗原結合片段
Cys1
Cys2
Cys1
Cys2
第一連接肽
第二連接肽

【圖 42】

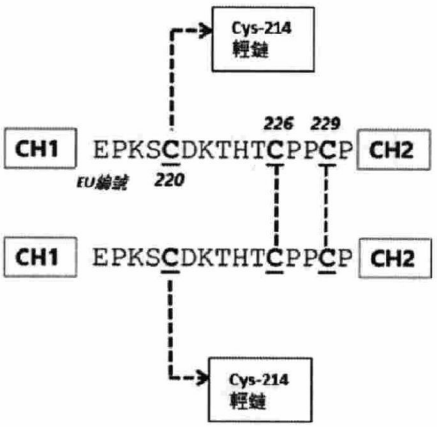

(A)
第一抗原結合片段
第二抗原結合片段
藥物偶聯物
Cys1
Cys2
Cys1
Cys2
第一連接肽
第二連接肽
(B)
第三抗原結合片段
第四抗原結合片段
第一抗原結合片段
第二抗原結合片段
藥物偶聯物
Cys1
Cys2
Cys1
Cys2
第一連接肽
第二連接肽

【圖 43】

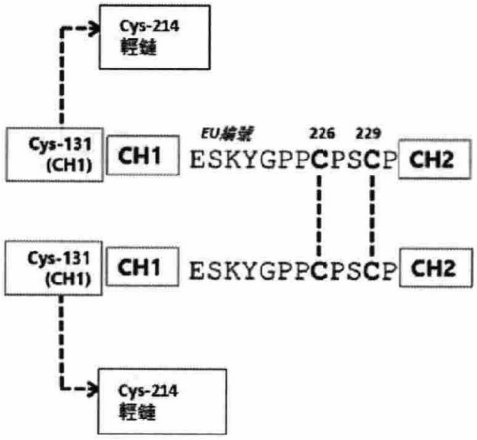
(A)

人 IgG1	EPKSCDKTHTCPPCP
人 IgG2	ERKCCVE CPPCP
人 IgG4	ESKYGPP CPSCP
小鼠 IgG1	VPRDCGCKPCICT
小鼠 IgG2A	EPRGPTIKPCPPCKCP
小鼠 IgG2B	EPSGPISTINPCPPCKECHKCP
小鼠 IgG2C	EPRVPITQNPCPPLKECPPCA
小鼠 IgG3	EPRIPKPSTPPGSSCP
羊駝 IgG1A	ELKTPQPQSQPECRCPKCP
羊駝 IgG1B	EPHGGCTCPQCP
羊駝 IgG2B	EPKTPKPQPQPQPQPQPNPTTESKCPKCP
羊駝 IgG2C	AHHSEDPSSKCPKCP

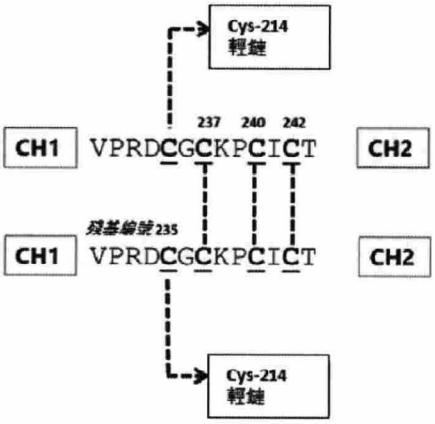
(B)



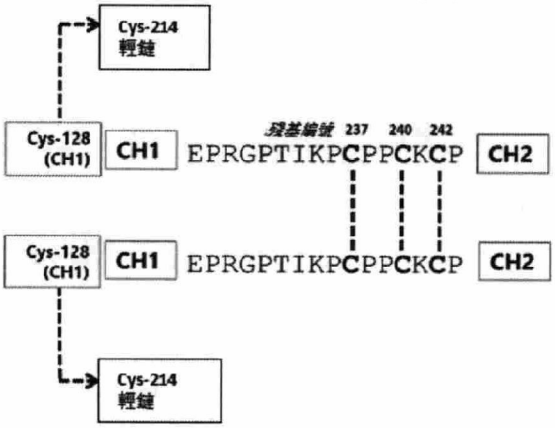
(C)



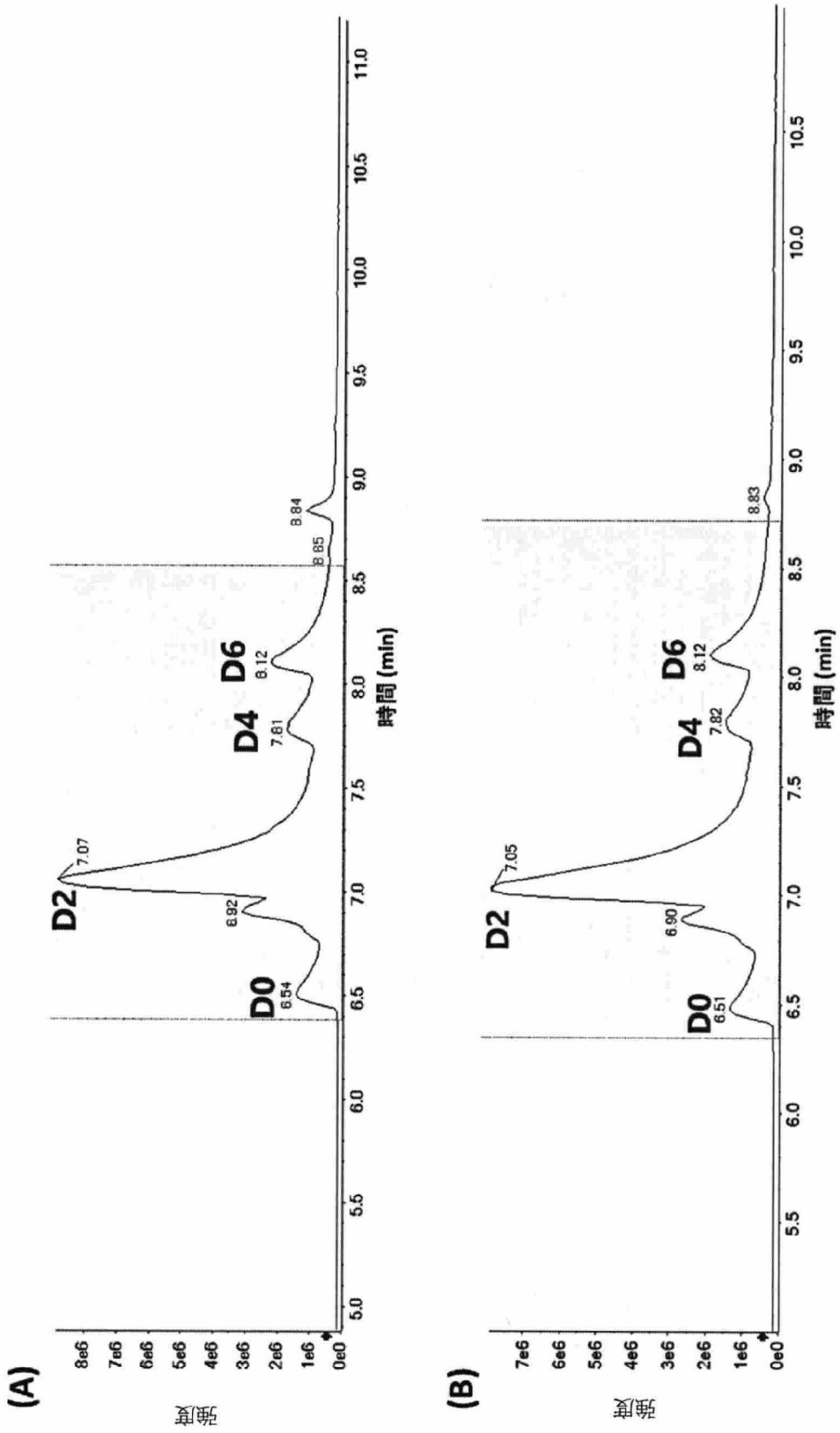
(D)



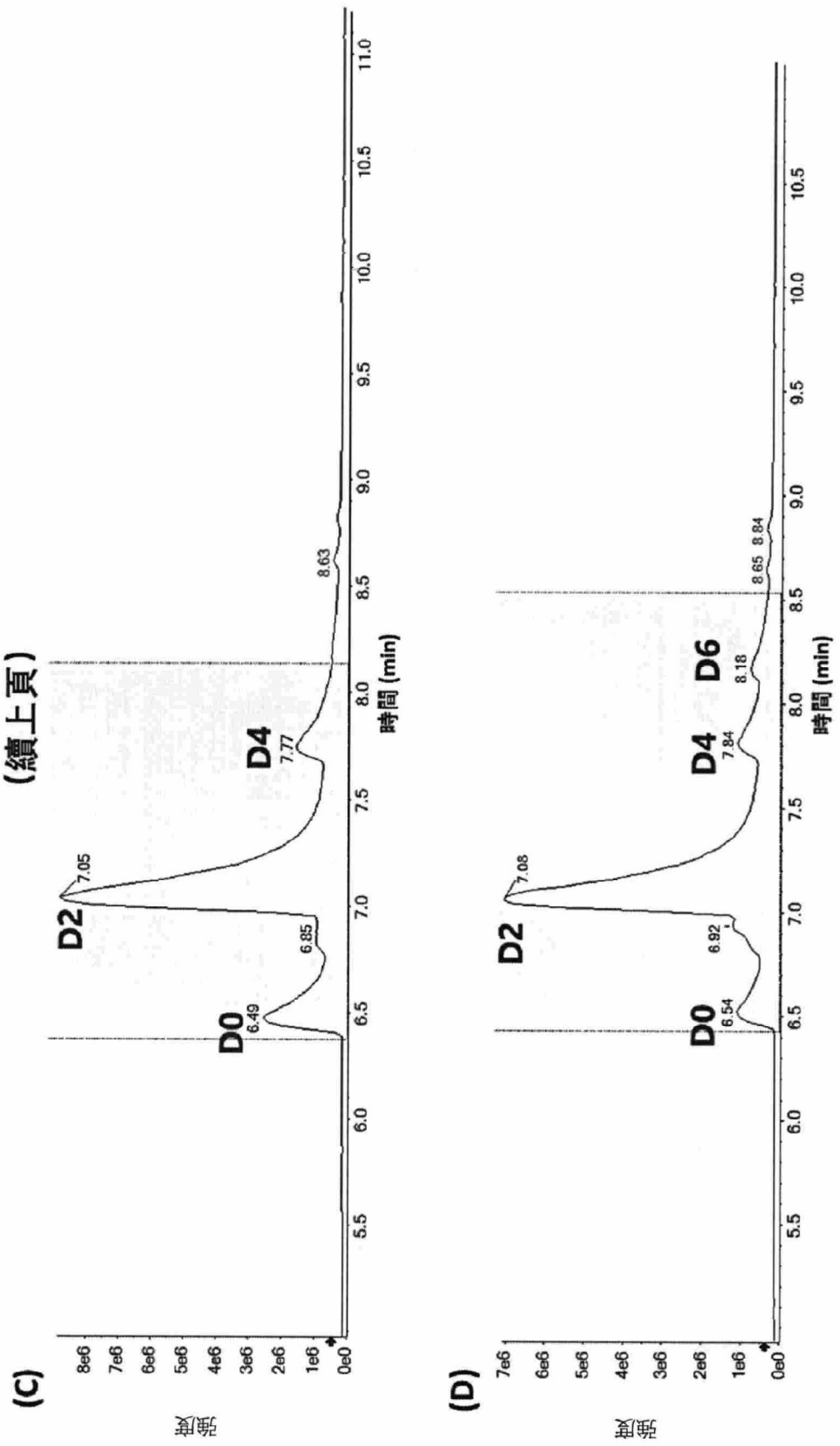
(E)



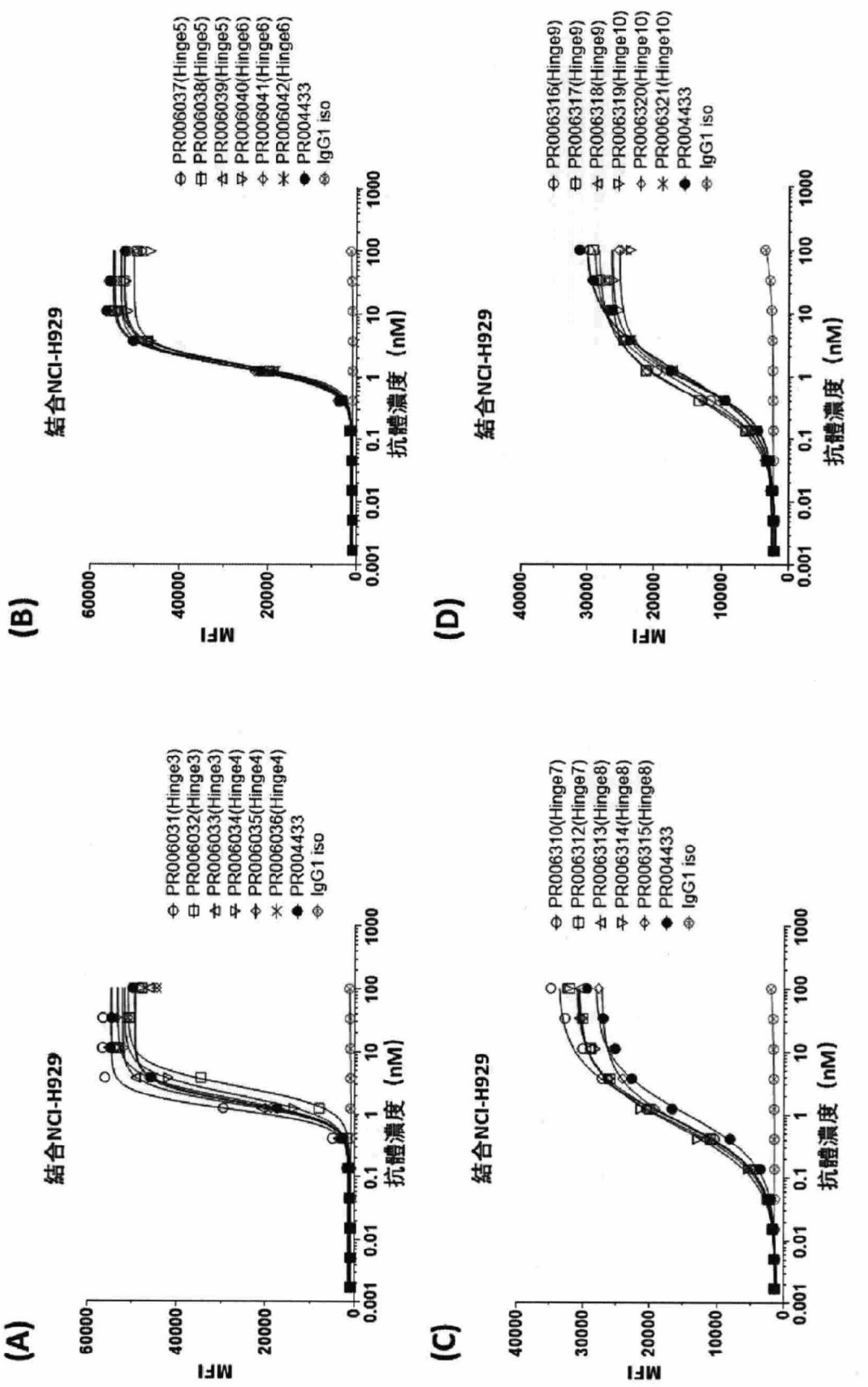
【圖 44】


(A)
強度
時間 (min)
D0
6.54
D2
7.07
6.92
D4
7.81
D6
8.12
8.84
8.85
(B)
強度
時間 (min)
D0
6.51
D2
7.05
6.90
D4
7.82
D6
8.12
8.83

(接下頁)

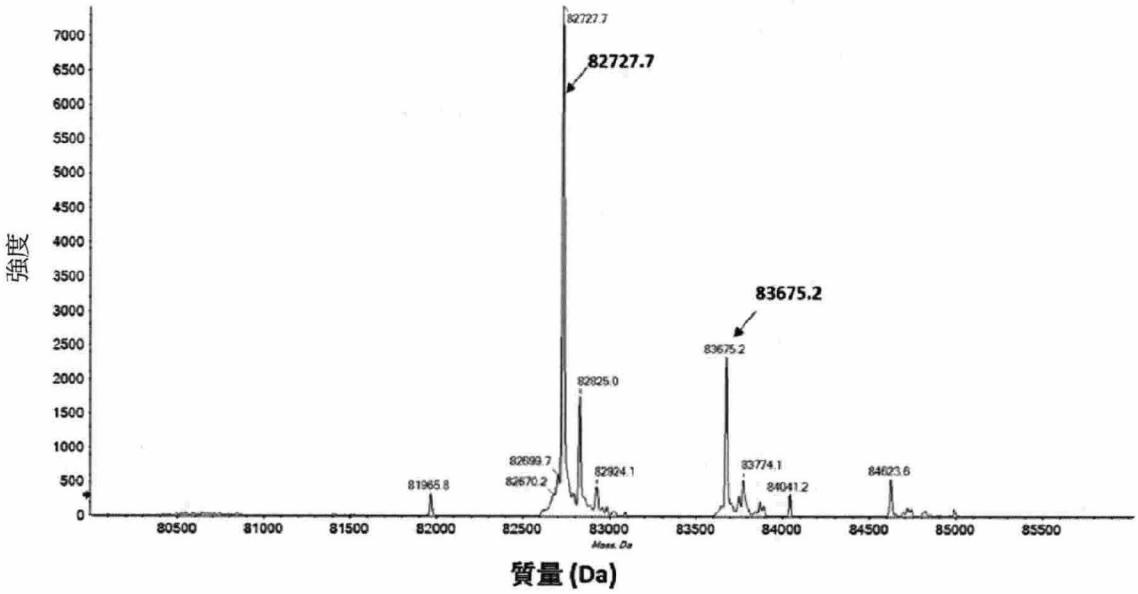

(C)
(續上頁)
強度
時間 (min)
D0
D2
D4
6.49
6.85
7.05
7.77
8.63
(D)
強度
時間 (min)
D0
D2
D4
D6
6.54
6.92
7.08
7.84
8.18
8.65
8.84

【圖 45】


(A)
結合NCI-H929
MFI
抗體濃度（nM）
PR006031(Hinge3)
PR006032(Hinge3)
PR006033(Hinge3)
PR006034(Hinge4)
PR006035(Hinge4)
PR006036(Hinge4)
PR004433
IgG1 iso
(B)
結合NCI-H929
MFI
抗體濃度（nM）
PR006037(Hinge5)
PR006038(Hinge5)
PR006039(Hinge5)
PR006040(Hinge6)
PR006041(Hinge6)
PR006042(Hinge6)
PR004433
IgG1 iso
(C)
結合NCI-H929
MFI
抗體濃度（nM）
PR006310(Hinge7)
PR006312(Hinge7)
PR006313(Hinge8)
PR006314(Hinge8)
PR006315(Hinge8)
PR004433
IgG1 iso
(D)
結合NCI-H929
MFI
抗體濃度（nM）
PR006316(Hinge9)
PR006317(Hinge9)
PR006318(Hinge9)
PR006319(Hinge10)
PR006320(Hinge10)
PR006321(Hinge10)
PR004433
IgG1 iso

【圖 46】

PR006468-ADC （非還原樣品）MS圖譜



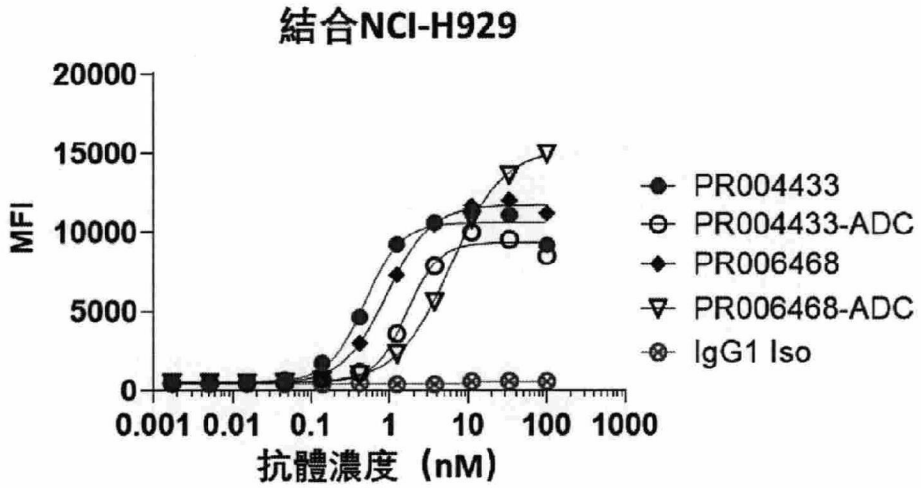
【圖 47】

EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSDSYMTWVRQAPGKGLEWVSVIFSGGRTYYS
DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARRNYDDTRGTDVFDIWGQGTMVTV
90.8% **5.81%**
SSEPRVPITQNPCPPLKECPPCAAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

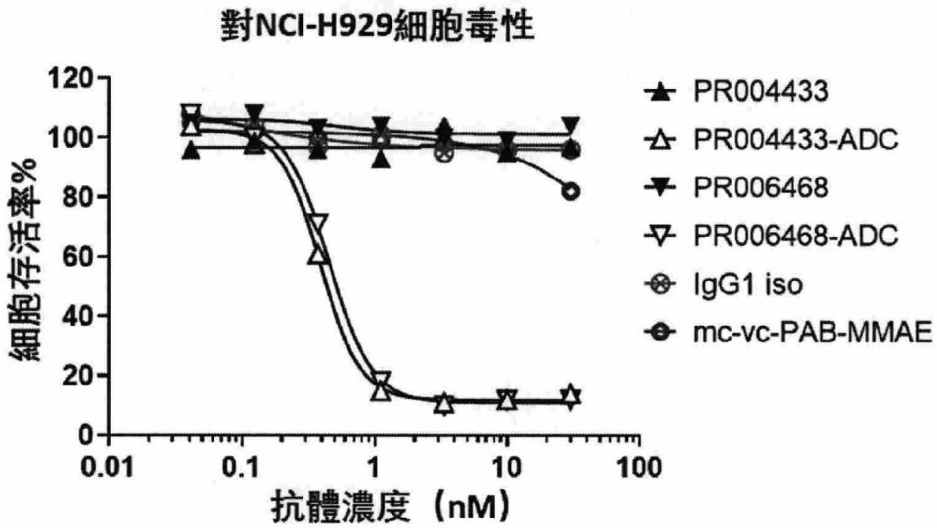
1. VPITQNPC(+1315.78)PPLK
2. VPITQNPC(+1315.78)PPLKECPPCAPELLGGPSVFLFPPKPK
3. EC(+1315.78)PPCAPELLGGPSVFLFPPKPK

	Attribute Name	Value
1	MMAE@CPPLK	90.80 %
2	MMAE@ECPPC	5.81 %

【圖 48】

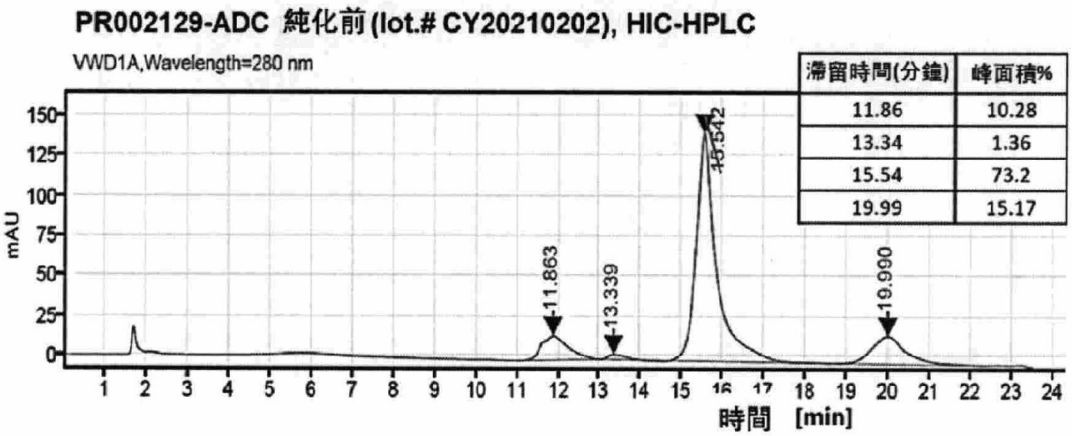

結合NCI-H929
20000
15000
10000
5000
0
MFI
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
抗體濃度（nM）
PR004433
PR004433-ADC
PR006468
PR006468-ADC
IgG1 Iso

【圖 49】

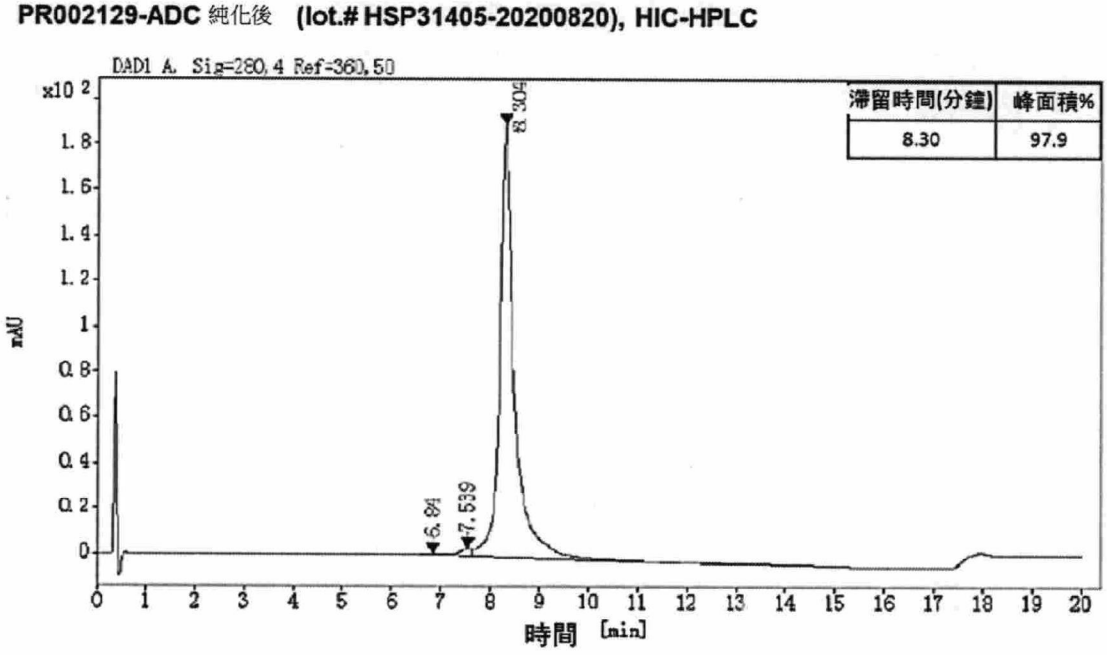

對NCI-H929細胞毒性
120
100
80
60
40
20
0
細胞存活率%
0.01 0.1 1 10 100
抗體濃度（nM）
PR004433
PR004433-ADC
PR006468
PR006468-ADC
IgG1 iso
mc-vc-PAB-MMAE

【圖 50】

(A)

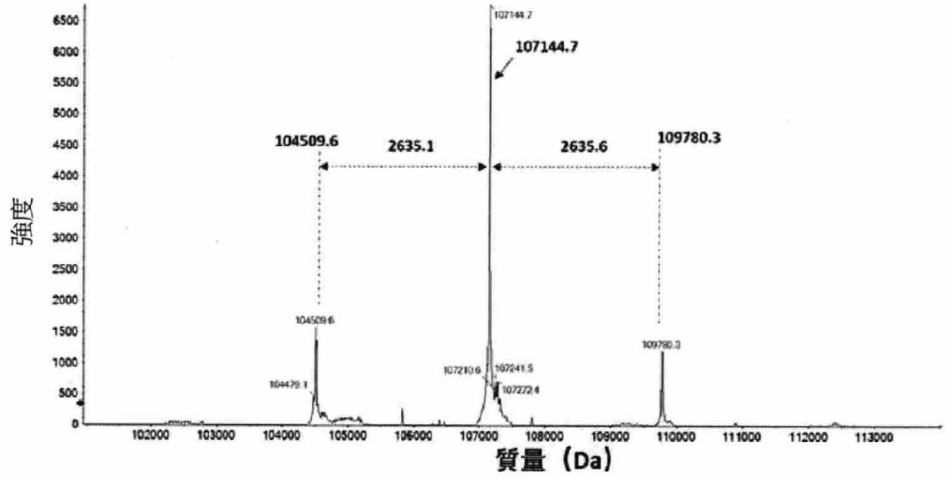

PR002129-ADC 純化前 (lot.# CY20210202), HIC-HPLC
VWD1A,Wavelength=280 nm
mAU
時間 [min]
11.863
13.339
15.542
19.990
滯留時間(分鐘) 峰面積%
11.86 10.28
13.34 1.36
15.54 73.2
19.99 15.17

(B)

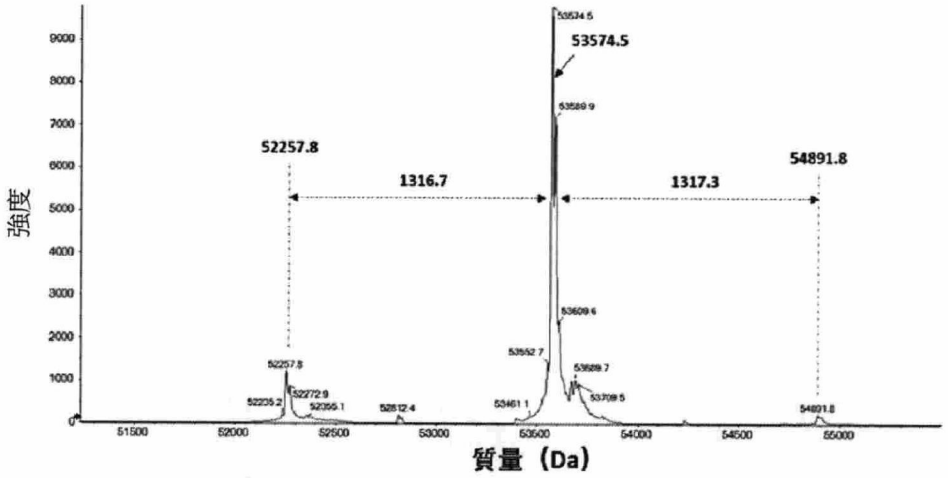

PR002129-ADC 純化後 (lot.# HSP31405-20200820), HIC-HPLC
DAD1 A, Sig=280,4 Ref=360,50
x10 2
mAU
時間 [min]
6.891
7.539
8.305
滯留時間(分鐘) 峰面積%
8.30 97.9

【圖 51】

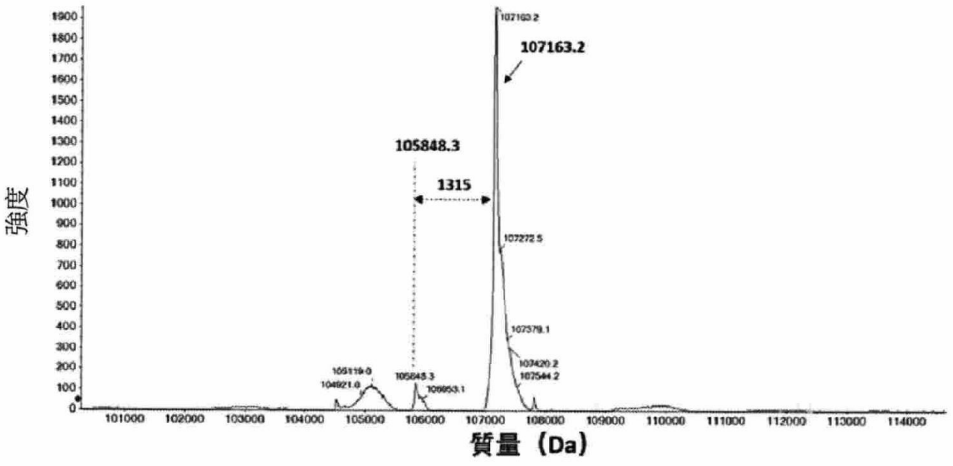
(A) PR002129-ADC （非還原樣品）MS圖譜



(B) PR002129-ADC （還原樣品）MS圖譜



(C) PR002129-ADC （非還原樣品）MS圖譜

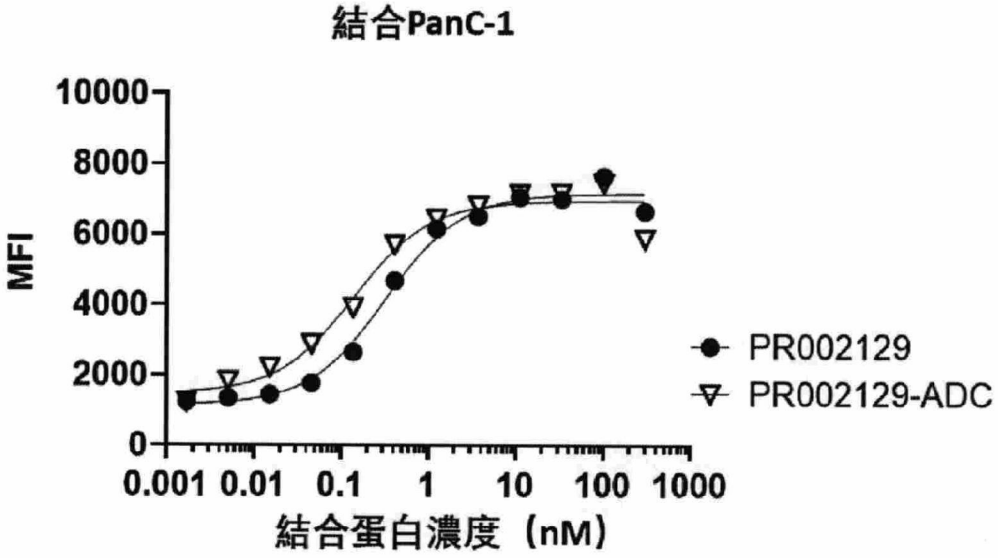


【圖 52】

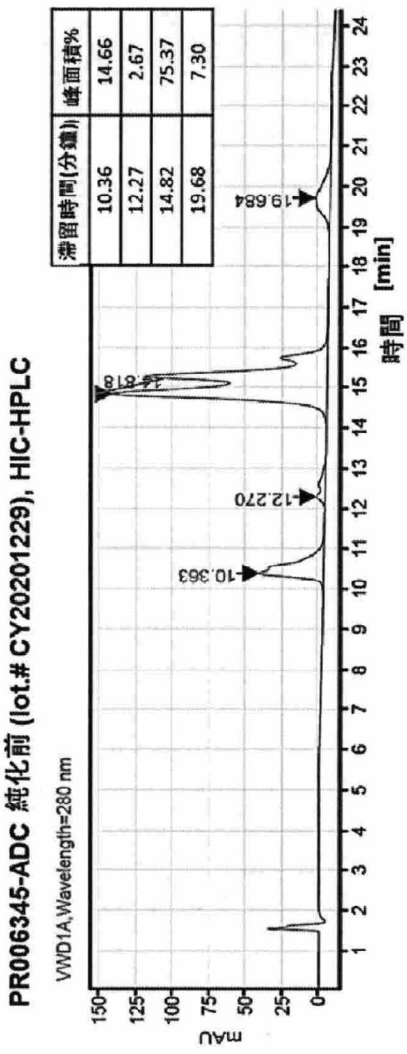
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKDYADSVKGRFTISRD
TSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREQARSFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPYSLSAS
VGDRVTITCRASQTINNWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP
87.9% 7.5%
DDFATYYCQQYKLYSPMYTFGQGTKVEIKGGGASEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

1. SC(+1315.78)DK
2. SC(+1315.78)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
3. SCDKTHTCPPC(+1315.78)PAPELLGGPSVFLFPPK

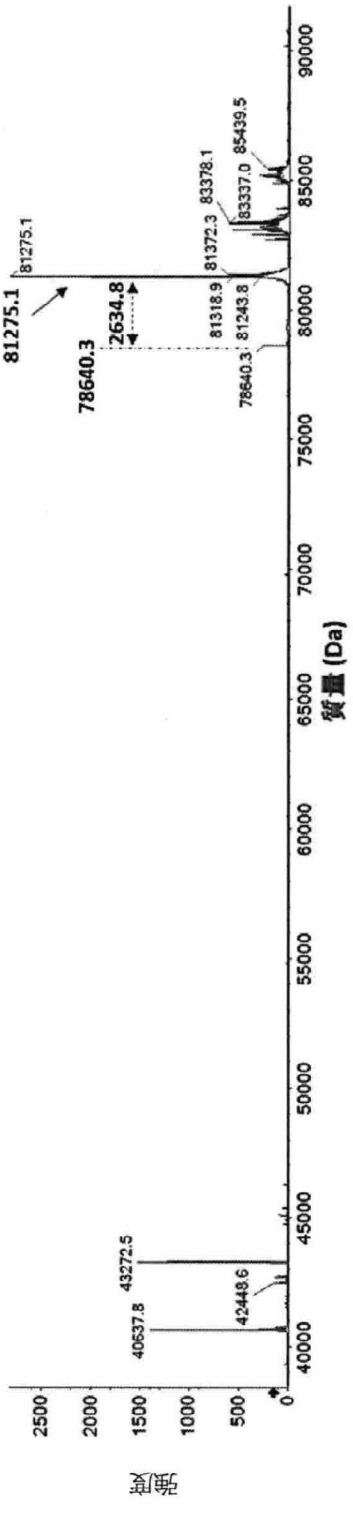
【圖 53】



【圖 54】


PR006345-ADC 純化前 (lot.# CY20201229), HIC-HPLC
VWD1A,Wavelength=280 nm
mAU
時間 [min]
10.363
12.270
19.684
滯留時間(分鐘)
峰面積%
10.36
14.66
12.27
2.67
14.82
75.37
19.68
7.30

【圖 55】


PR006345-ADC （非還原樣品）MS圖譜
強度
質量 (Da)
81275.1
78640.3
2634.8
81318.9
81372.3
83378.1
78640.3
81243.8
83337.0
85439.5
40637.8
43272.5
42448.6

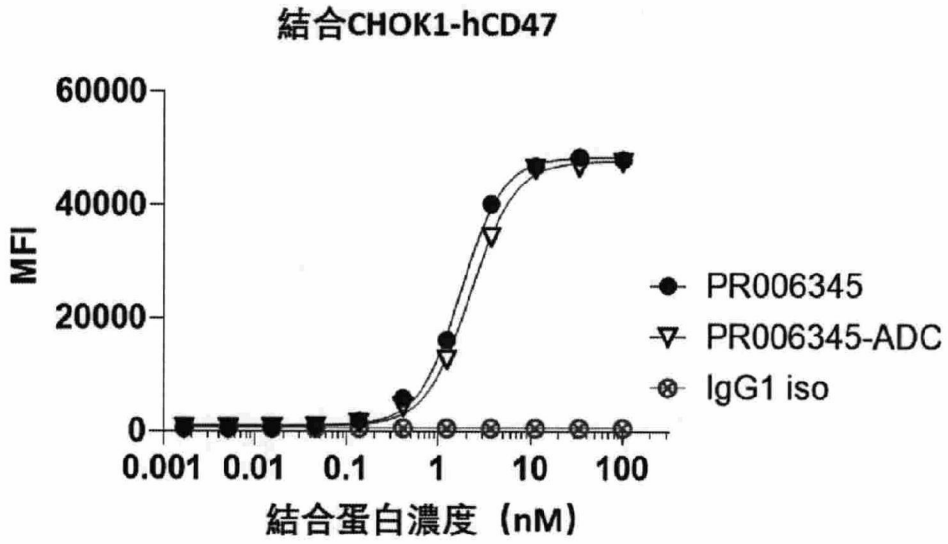
【圖 56】

EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRV
TTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSG
92.45% 1.36%
GGASEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

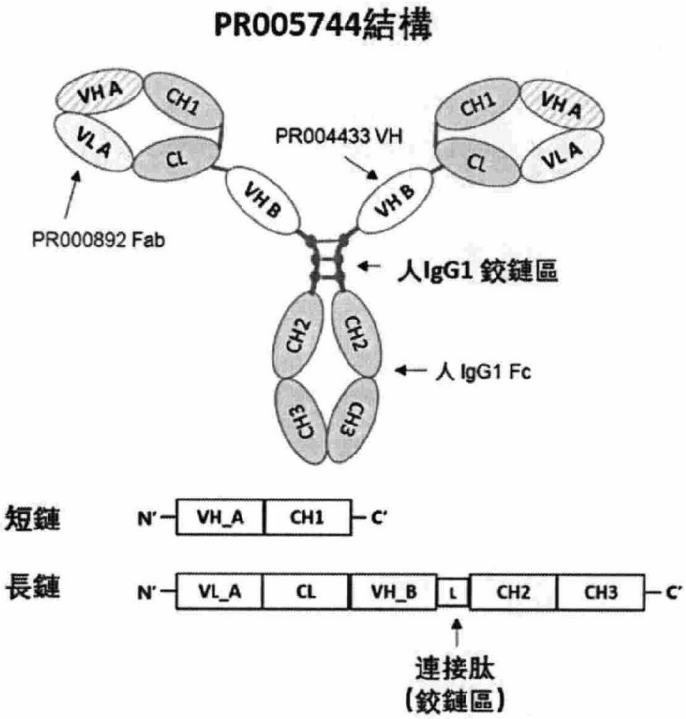
1. SC(+1315.78)DK
2. SC(+1315.78)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
3. THTC(+1315.78)PPCPAPELLGGPSVFLFPPK

	Attribute Name	Value
1	MMAE@SCDK	92.45 %
2	MMAE@THTCPPC	1.36 %

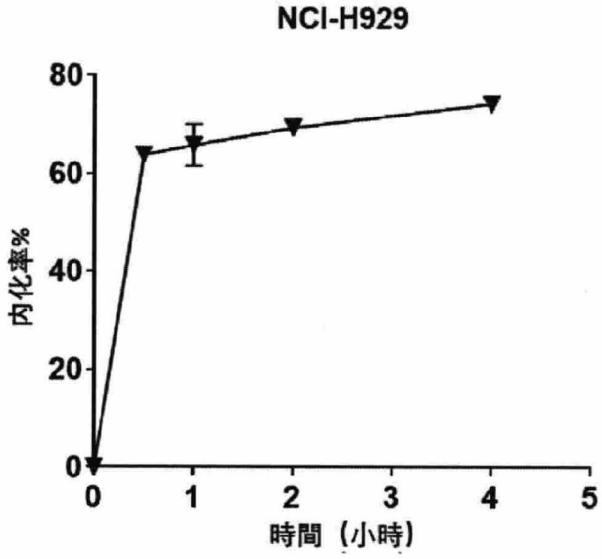
【圖 57】



【圖 58】


PR005744結構
VH A
CH1
VL A
CL
PR000892 Fab
PR004433 VH
VH B
人IgG1 鉸鏈區
CH2
CH3
人 IgG1 Fc
短鏈
N'
VH_A
CH1
C'
長鏈
VL_A
CL
VH_B
L
CH2
CH3
連接肽
(鉸鏈區)

【圖 59】


NCI-H929
內化率%
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
時間（小時）

【圖 60】

PR005744 長鏈:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQTDDFATYYCQQYNSYLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
1.36%
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECEVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASG
FTVSDSYMTWVRQAPGKGLEWVSVIFSGGRTYYSDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLR
99.07% 4.15%
AEDTALYYCARRNYDDTRGTDVFDIWGQGTMVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

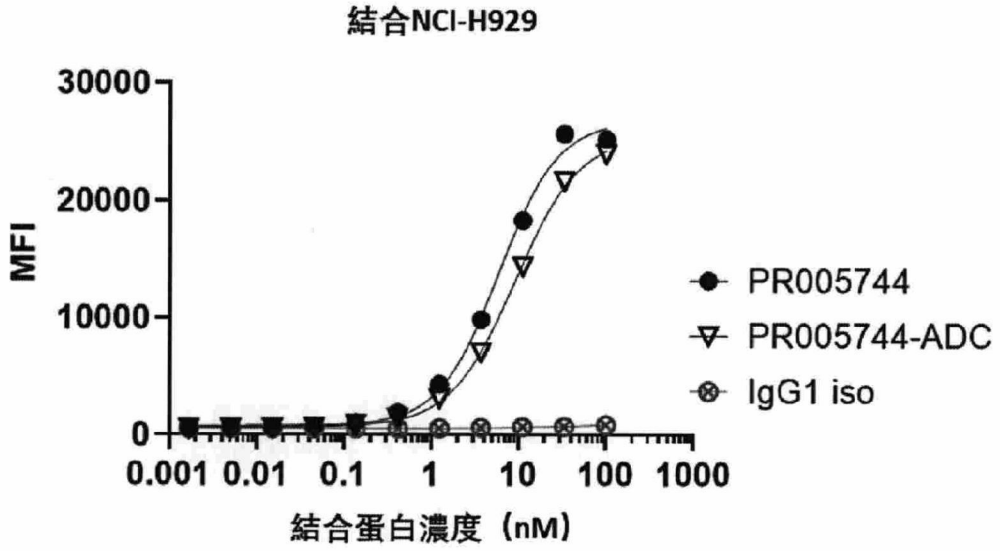
PR005744 短鏈:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAATGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAAIWNDGSNNYY
ADSVKGRFTISRDDSKNTLNLQMNSLRAEDTAMYYCARDRLPMASLRYFDWLGVMDAWGQ
GTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

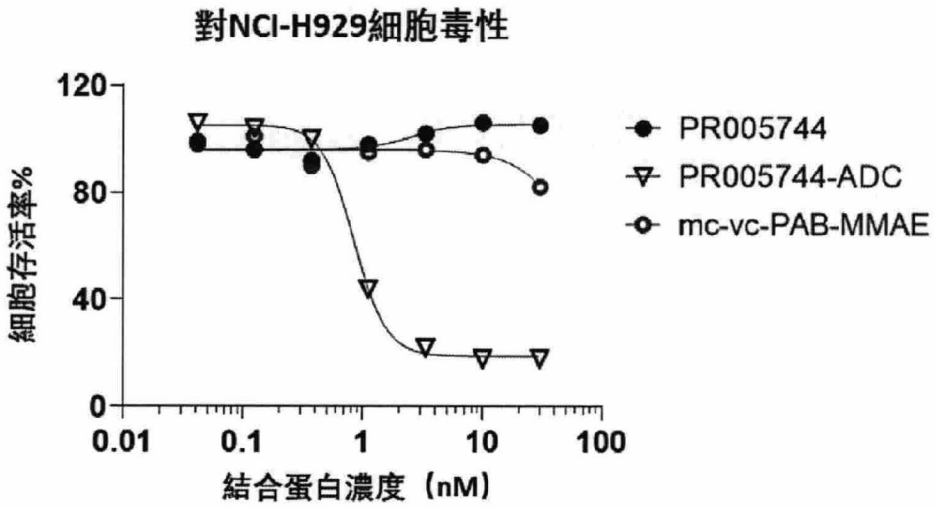
1. SC(+1315.78)DK
2. THTC(+1315.78)PPCPAPELLGGPSVFLFPPK
3. GEC(+1315.78)EVQLETGGGLIQPGGSLR

	Attribute Name	Value
1	MMAE@HC GECEVQ	1.36 %
2	MMAE@HC SCDK	99.07 %
3	MMAE@HC THTCPPC	4.15 %

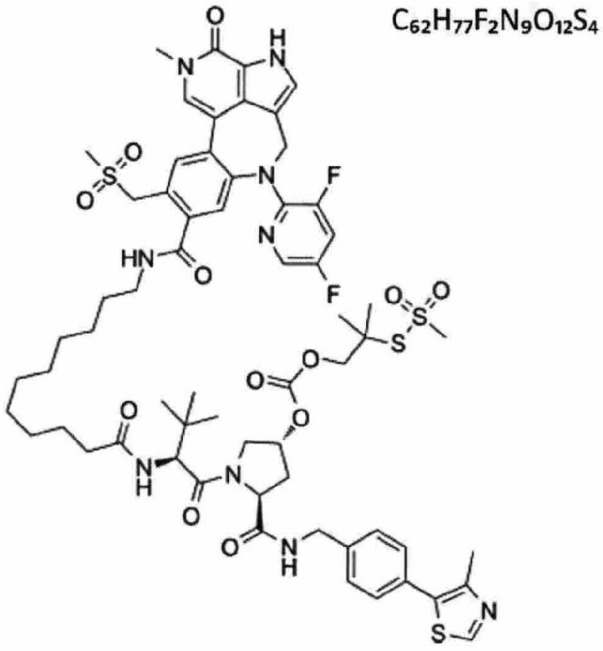
【圖 61】



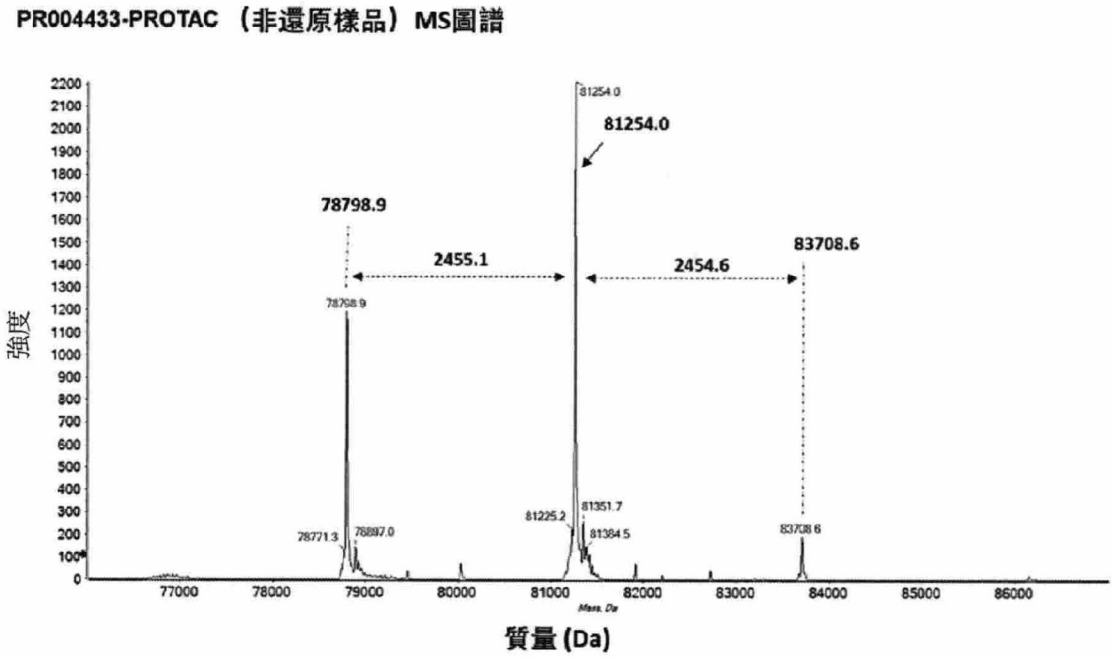
【圖 62】


對NCI-H929細胞毒性
細胞存活率%
120
80
40
0
0.01
0.1
1
10
100
結合蛋白濃度（nM）
PR005744
PR005744-ADC
mc-vc-PAB-MMAE

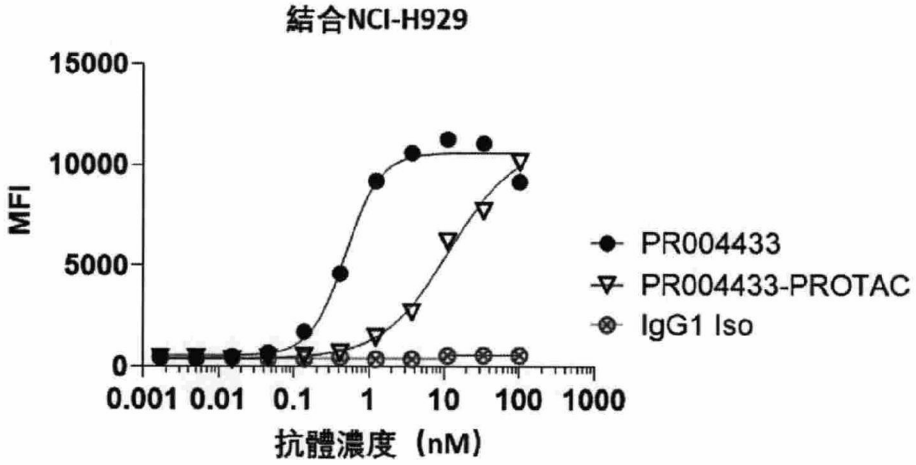
【圖 63】


$C_{62}H_{77}F_2N_9O_{12}S_4$

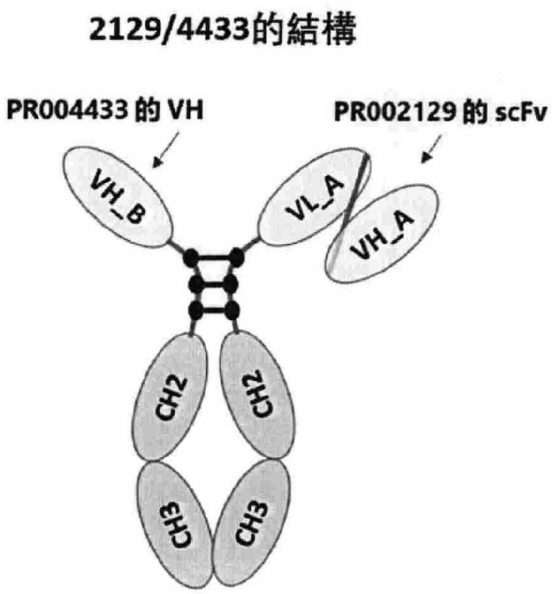
【圖 64】


PR004433-PROTAC （非還原樣品）MS圖譜
81254.0
81254.0
78798.9
2455.1
2454.6
83708.6
78798.9
78771.3
78897.0
81225.2
81351.7
81384.5
83708.6
強度
質量 (Da)

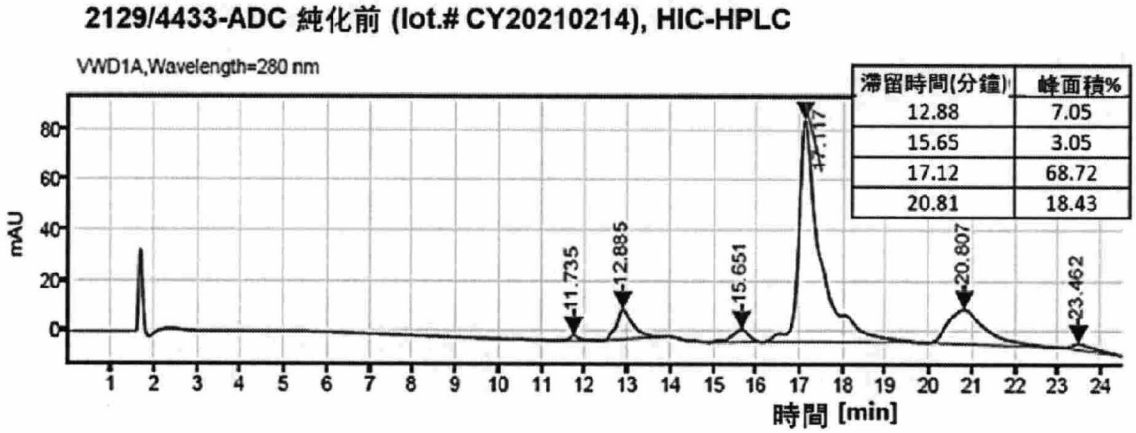
【圖 65】


結合NCI-H929
MFI
抗體濃度（nM）
PR004433
PR004433-PROTAC
IgG1 Iso

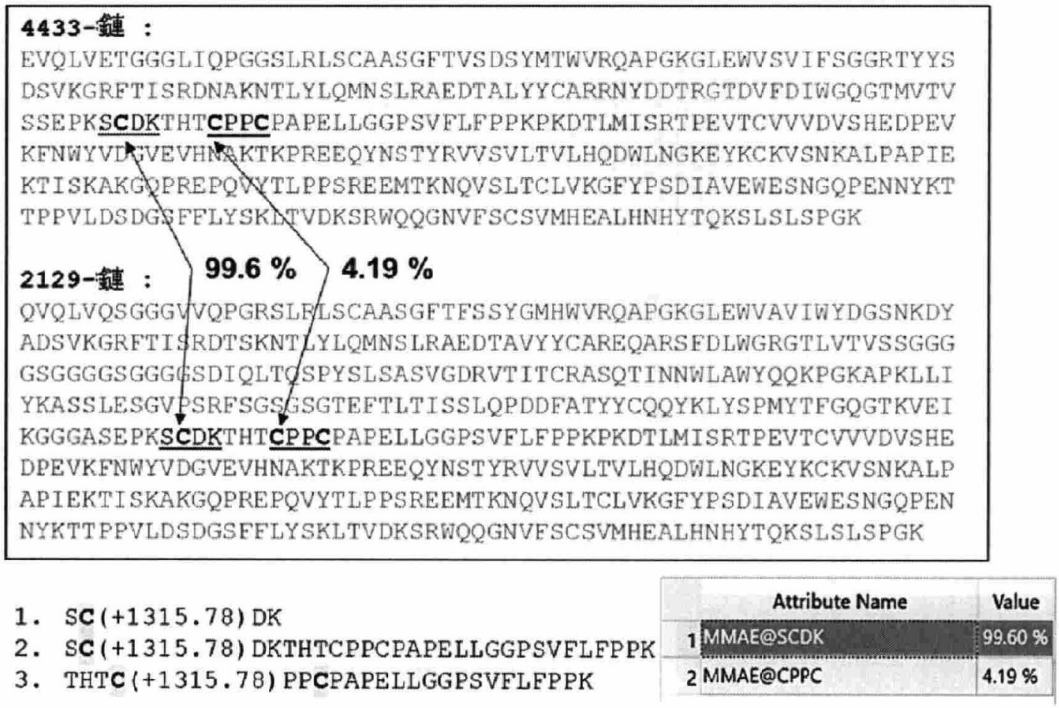
【圖 66】


2129/4433的結構
PR004433 的 VH
PR002129 的 scFv
VH_B
VL_A
VH_A
CH2
CH2
CH3
CH3

【圖 67】


2129/4433-ADC 純化前 (lot.# CY20210214), HIC-HPLC
VWD1A,Wavelength=280 nm
mAU
時間 [min]
11.735
12.885
15.651
17.117
20.807
23.462
滯留時間(分鐘) 峰面積%
12.88 7.05
15.65 3.05
17.12 68.72
20.81 18.43

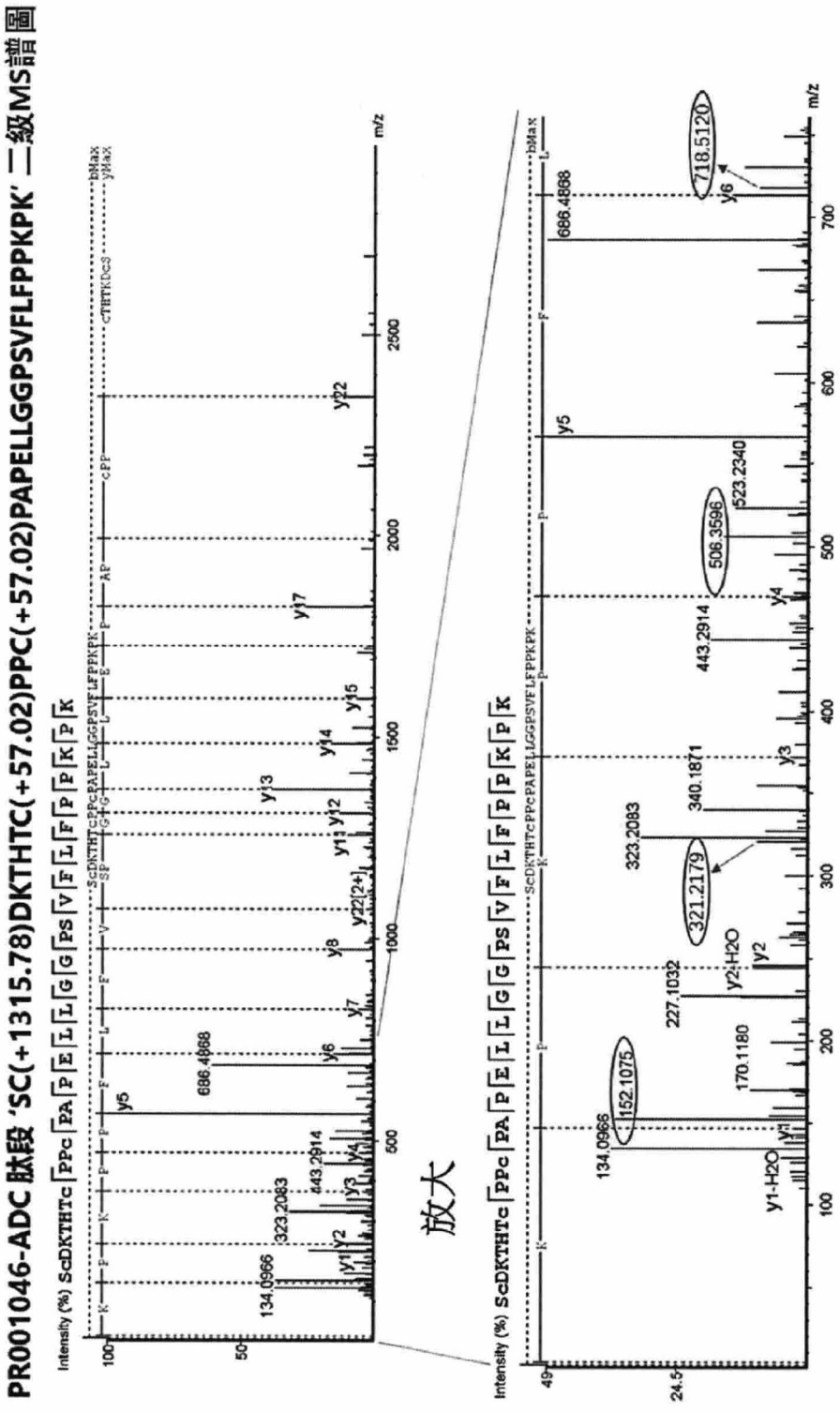
【圖 68】



1. SC(+1315.78)DK
2. SC(+1315.78)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
3. THTC(+1315.78)PPCPAPELLGGPSVFLFPPK

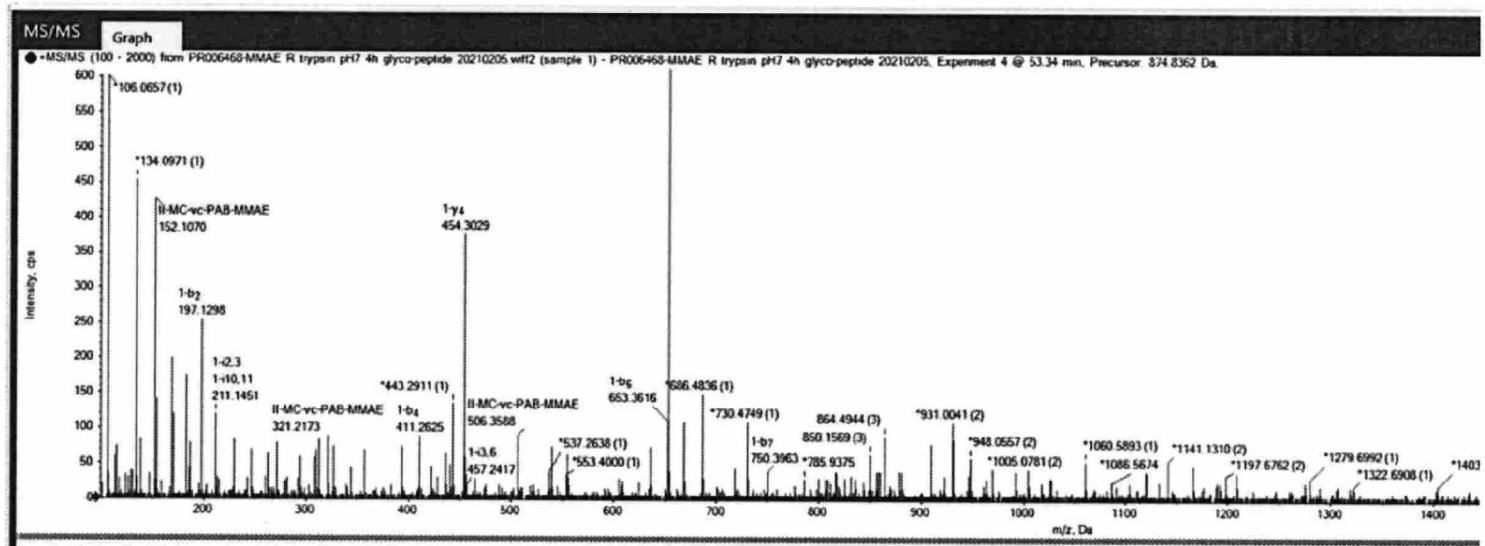
	Attribute Name	Value
1	MMAE@SCDK	99.60 %
2	MMAE@CPPC	4.19 %

【圖 69】


PR001046-ADC 肽段 'SC(+1315.78)DKTHTC(+57.02)PPC(+57.02)PAPELLGGPSVFLFPPKPK' 二級MS譜圖
Intensity (%)
m/z
放大
134.0966
323.2083
443.2914
686.4868
227.1032
170.1180
152.1075
321.2179
340.1871
506.3596
523.2340
718.5120

【圖 70】

PR006468-ADC 肽段 'VPITQNPC (+1315.78) PPLK' 二級 MS 譜圖

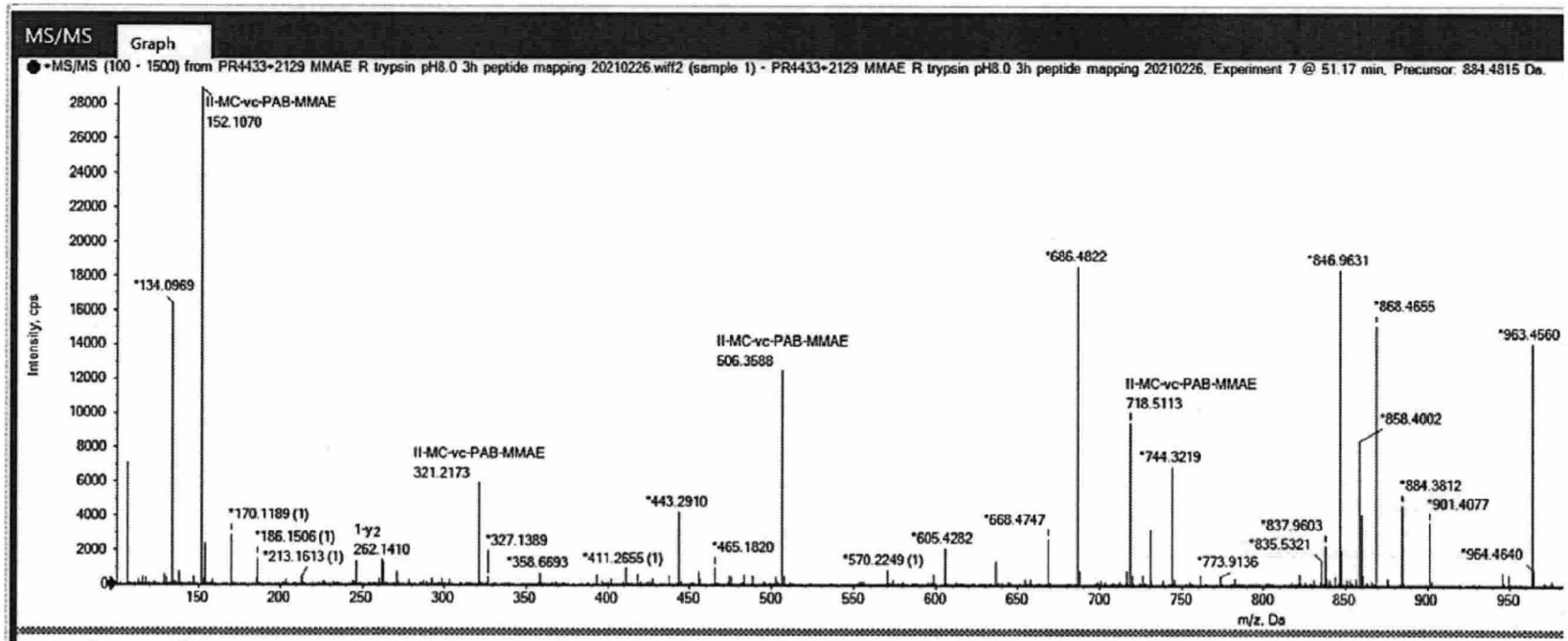


Show: ○ Basic ● Advanced (including internal fragments)

Fragment	Modifications	Type	Neut... Loss	Theoretical Mono m/z	Observed Mono m/z	Error (Da)	Char...	Theoretical Mono Mass
PITQNPCPPL	MC-vc-PAB-MMAE@7	i		1189.1656	1189.1620	-0.0037	2	2376.3167
PITQNPCPP	MC-vc-PAB-MMAE@7	i		1132.6236	1132.6206	-0.0030	2	2263.2326
TQNPCPP	MC-vc-PAB-MMAE@5	i		1027.5552	1027.5875	0.0323	2	2053.0958
NPCPPL	MC-vc-PAB-MMAE@3	i		969.5441	969.5653	0.0212	2	1937.0736
PCP	MC-vc-PAB-MMAE@2	i		1613.9012	1613.8776	-0.0235	1	1612.8939
PCP	MC-vc-PAB-MMAE@2	i		807.4542	807.4384	-0.0158	2	1612.8939
CPP	MC-vc-PAB-MMAE@1	i		1613.9012	1613.8776	-0.0235	1	1612.8939
CPP	MC-vc-PAB-MMAE@1	i		807.4542	807.4384	-0.0158	2	1612.8939
VPITQNP		b		750.4145	750.3963	-0.0182	1	749.4072

【圖 71】

2129/4433-ADC 肽段 'SC (+1315.78) DK' 二級MS譜圖



Show: ○ Basic ◉ Advanced (including internal fragments)

Fragment	Modifications	Type	Neut... Loss	Theoretical Mono m/z	Observed Mono m/z	Error (Da)	Char...	Theoretical Mono Mass
K		y		147.1128	147.1144	0.0016	1	146.1055
DK		y		262.1397	262.1410	0.0012	1	261.1325
SCDK	MC-vc-PAB-MMAE@2	Precursor		884.4837	884.4807	-0.0030	2	1766.9528

【圖 72】