



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202430221 A

(43)公開日：中華民國 113 (2024) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：112139754 (22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 10 月 18 日

(51)Int. Cl. : *A61K47/68 (2017.01)* *A61K31/4745(2006.01)*
C07K16/28 (2006.01) *C07D491/22 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2022/10/19 世界智慧財產權組織 PCT/CN2022/126273
2023/09/12 世界智慧財產權組織 PCT/CN2023/118363

(71)申請人：中國商普眾發現醫藥科技（上海）有限公司（中國大陸）MULTITUDE
THERAPEUTICS INC. (CN)
中國大陸

(72)發明人：孟 遜 MENG, XUN (US)；劉 淑惠 LIU, SHU-HUI (US)；史靜 SHI, JING
(CN)；翁煒寧 WENG, WEINING (CN)

(74)代理人：洪澄文；洪茂

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：31 共 175 頁

(54)名稱
抗體－藥物複合體及其製備方法與用途

(57)摘要

本揭露提供了抗體-藥物複合體及其製備方法與用途。抗體-藥物複合體中包括抗體、具有細胞毒性的有效負載及式 I 所示的连接子，式 I 所示连接子透過琥珀醯亞胺基與抗體鏈間二硫鏈還原後的巰基部分形成硫醚鍵連接；连接子的酯基中的羰基與有效負載中的胺基連接。抗體-藥物複合體具有在製備診斷、預防、治療腫瘤疾病的治療劑中的用途。

The present disclosure provides an antibody-drug conjugate, preparation method and use thereof. The antibody-drug conjugate includes an antibody, a cytotoxic payload and a linker of formula I, wherein a succinimidyl group of the linker of formula I forms a thioether bond with a thiol group obtained by a reduction of an interchain disulfide chain of the antibody, a carbonyl group in an ester group of the linker is connected to an amino group of the payload. The antibody-drug conjugate has use in the manufacture of a therapeutic agent for diagnosis, prevention and treatment of neoplastic disease.

指定代表圖：

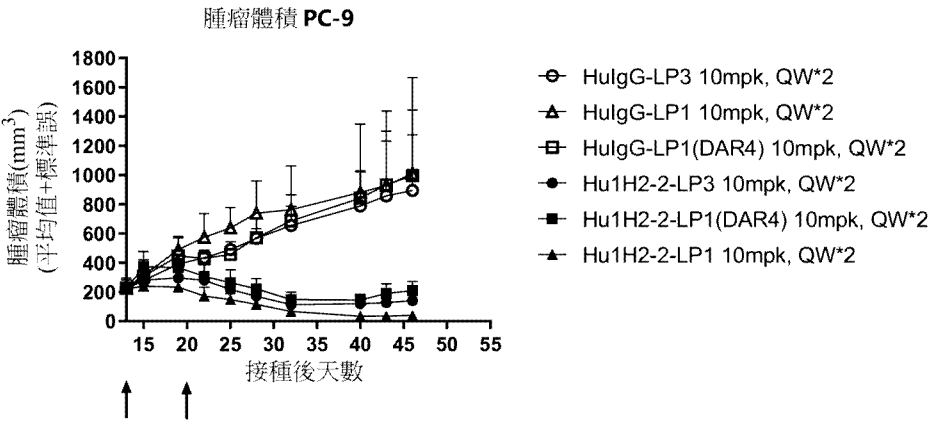


圖 22

【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗體-藥物複合體及其製備方法與用途

【英文發明名稱】 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE, PREPARATION

METHOD AND USE THEREOF

【中文】

本揭露提供了抗體-藥物複合體及其製備方法與用途。抗體-藥物複合體中包括抗體、具有細胞毒性的有效負載及式I所示的连接子，式I所示连接子透過琥珀醯亞胺基與抗體鏈間二硫鏈還原後的巯基部分形成硫醚鍵連接；连接子的酯基中的羰基與有效負載中的胺基連接。抗體-藥物複合體具有在製備診斷、預防、治療腫瘤疾病的治療劑中的用途。

【英文】

The present disclosure provides an antibody-drug conjugate, preparation method and use thereof. The antibody-drug conjugate includes an antibody, a cytotoxic payload and a linker of formula I, wherein a succinimidyl group of the linker of formula I forms a thioether bond with a thiol group obtained by a reduction of an interchain disulfide chain of the antibody, a carbonyl group in an ester group of the linker is connected to an amino group of the payload. The antibody-drug conjugate has use in the manufacture of a therapeutic agent for diagnosis, prevention and treatment of neoplastic disease.

【指定代表圖】 圖22

第 1 頁，共 2 頁(發明摘要)

P230241300TWF

【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】 抗體-藥物複合體及其製備方法與用途

【英文發明名稱】 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE, PREPARATION

METHOD AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本揭露涉及抗體-藥物複合體，其透過連接子連接抗體及抗腫瘤活性的藥物或毒素，以腫瘤細胞為標靶發揮抗腫瘤作用。

【先前技術】

【0002】 本部分中的敘述僅提供與本揭露相關的背景資訊，並不一定構成現有技術。

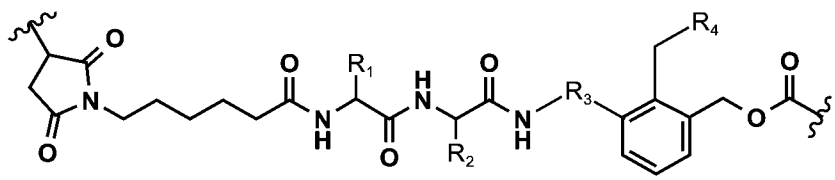
【0003】 抗體-藥物複合體（Antibody-Drug Conjugate; ADC）是一種載體化（vectorized）的化療，能夠選擇性地向腫瘤/癌細胞遞送有效的細胞毒性藥物（Antibody-Drug Conjugates: The Last Decade，Nicolas Joubert等，Pharmaceuticals (Basel). 2020 Sep 14;13(9):245.）。隨著藥物傳遞技術的發展，ADC靶向傳遞技術可有效克服喜樹鹼類藥物的水溶性差，組織分佈不足等帶來的副作用。已上市的ADC藥物Enhertu及Sacituzumab govitecan在治療腫瘤尤其是惡性腫瘤方面具有優越的效果。Enhertu及Sacituzumab govitecan均使用疏水性強於微管蛋白抑制劑（例如MMAE, MMAF）的DNA拓撲異構酶抑制劑喜樹鹼衍生物為細胞毒性藥物。Sacituzumab govitecan以MCC-triazole spacer-PEG7-lysine-PABC為連接子，在細胞溶酶體中分解釋放喜樹鹼SN38（US13/948,732）。阿斯利康/第一三

共研發的Enhertu以組織蛋白酶B活化的GGFG(由透過肽鍵連接的甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸組成的胺基酸序列)四肽作為連接子，並引入自裂解結構，釋放出依喜替康(Exatecan)衍生物Dxd(Yusuke Ogitani等, Clin Cancer Res (2016) 22 (20): 5097–5108.)。然而上述細胞毒性藥物MMAE，SN38及Dxd均為P-糖蛋白(P-gp)的基質(Front Pharmacol 2019;10:749)，對於部分P-gp高表現的腫瘤可能存在藥物耐藥的問題。

【0004】 因此，仍然存在向腫瘤/癌細胞遞送細胞毒性藥物的新的抗體-藥物複合體的需求。

【發明內容】

【0005】 本揭露提供了一種抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物、或其組合，包括抗MUC18或抗CD44v7/8抗體或其抗原結合片段，有效負載(payload)及式I所示的連接子，



式 I

所述式I所示連接子透過琥珀醯亞胺基與抗體或其抗原結合片段鏈間二硫鍵還原後的巯基部分形成硫醚鍵連接；

所述式I所示連接子的酯基中的羰基與有效負載中的胺基連接；

R1，R2各自獨立地選自氫，甲基或異丙基；

R3表示-(CR5HCONH)n¹-(CH2CONH)n²或單鍵，R5選自氫或苯甲基，n¹表示0~2的整數，n²表示0~2的整數；

R_4 表示甲胺基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示1~20的整數。

【0006】 在一些實施方式中， R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示8~15的整數。

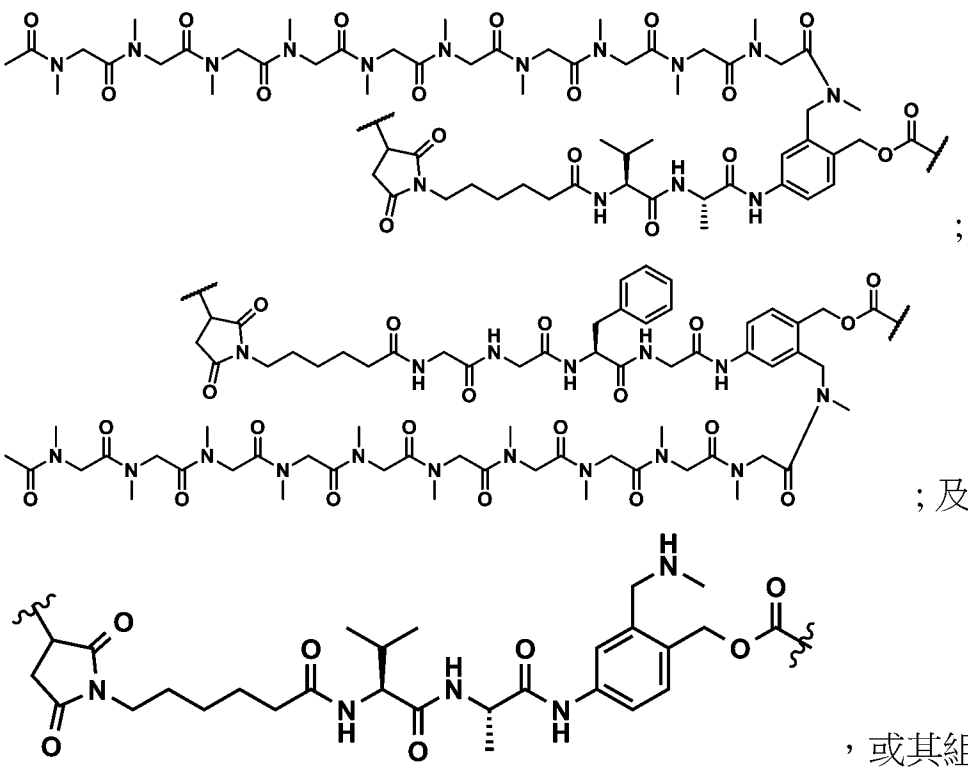
【0007】 在一些實施方式中， R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示10~12的整數。

【0008】 在一些實施方式中， R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2$ -或單鍵， R_5 選自苯甲基， n^1 表示1或2， n^2 表示1或2， R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示8~15的整數。

【0009】 在一些實施方式中， R_3 表示單鍵； R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示8~15的整數。

【0010】 在一些實施方式中， R_3 表示單鍵； R_4 表示甲胺基。

【0011】 在一些實施方式中，所述連接子選自以下組中的一種：

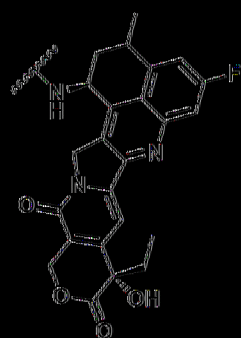


【0012】 在一些實施方式中，所述有效負載選自包括細胞毒劑，標記物，

核酸，放射性核種，激素，免疫調節劑，前體藥物轉化酶，核糖核酸酶，激動性抗體（agonistic antibody），拮抗性抗體及其片段，融合蛋白或衍生物的組中的至少一種。

〔0013〕 在一些實施方式中，所述細胞毒劑包括微管蛋白抑制劑及/或拓撲異構酶抑制劑，所述微管蛋白抑制劑包括奧瑞他汀或其衍生物，美登素或其衍生物，所述拓撲異構酶抑制劑包括喜樹鹼及其衍生物。

〔0014〕 在一些實施方式中，所述有效負載為式III所示的依喜替康，以環己烷環上胺基的氮原子與連接子連接，



式III。

〔0015〕 在一些實施方式中，抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括以下結構的任一：

如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 16所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 28所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 38所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 52所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 1所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 11所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 23所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 34所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為LAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 46所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 1所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 12所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 23所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 35所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為LAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 47所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 2所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 13所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 24所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 36所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為NAK的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 48所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 3所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 14所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 25所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 37所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為FAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 49所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 15所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 26所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 38所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 50所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 15所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 27所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 39所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 51所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 5所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 17所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 29所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID

NO: 40所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 53所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 6所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 18所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 29所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 41所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 53所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 7所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 19所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 30所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 42所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為RTS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 54所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 8所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 20所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 31所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 43所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 55所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 9所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 21所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 32所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 44所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 56所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；及

如SEQ ID NO: 10所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 22所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 33所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 45所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為LMS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 57所示胺基酸序列的輕鏈CDR3。

【0016】 在一些實施方式中，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括：

如SEQ ID NO: 84所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 85所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；

如SEQ ID NO: 86所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 87所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或者

如SEQ ID NO: 88所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 89所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

【0017】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段特異性結合人CD44 v7/8結合肽，結合肽包括如SEQ ID NO: 90所示的胺基酸序列。

【0018】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段不結合人CD44 v7/8如SEQ ID NO: 91及/或如SEQ ID NO: 92所示胺基酸序列的結合肽。

【0019】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括：如SEQ ID NO: 93所示胺基酸序列的HCDR1，如SEQ ID NO: 94所示胺基酸序列的HCDR2，如SEQ ID NO: 95所示胺基酸序列的HCDR3；及如SEQ ID NO: 96所示胺基酸序列的LCDR1，胺基酸序列為RAN的LCDR2，如SEQ ID NO: 97所示胺基酸序列的LCDR3

【0020】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括：

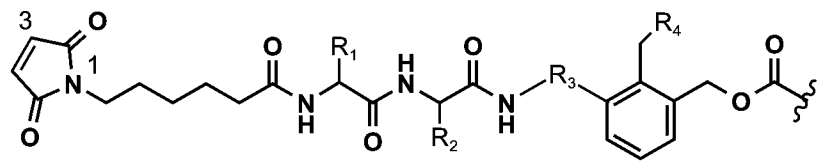
如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 101所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或

如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO:

104所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

【0021】 在一些實施方式中，藥物抗體比（DAR）為1~10。在一些實施方式中，DAR為4~10。

【0022】 本申請提供了一種上述抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、其溶劑化物或其組合的製備方法，包括以下步驟：抗MUC18抗體或CD44v7/8 抗體或其抗原結合片段經還原處理後二硫鍵至少部分被還原，與式III所示連接子的馬來醯亞胺-N-基的3位碳原子進行反應，



式 III

所述連接子-有效負載中，式III所示連接子的酯基中的羰基與有效負載的胺基連接；

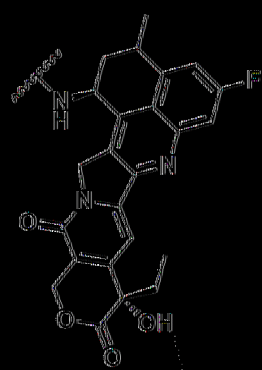
R₁，R₂各自獨立地選自氫，甲基或異丙基；

R₃表示-(CR₅HCONH)^{n¹}-(CH₂CONH)^{n²}-或單鍵，R₅選自氫或苯甲基，n¹表示0~2的整數，n²表示0~2的整數；

R₄表示甲胺基或-(NCH₃COCH₂)^{n³}-NCH₃COCH₃，n³表示1~20的整數。

【0023】 在一些實施方式中，所述方法還包括：抗體或其抗原結合片段在含有螯合劑的緩衝溶液中與還原劑反應，加入式III所示連接子的連接子-有效負載的溶解液，調節反應溶液pH。

【0024】 在一些實施方式中，所述有效負載為式II所示的依喜替康，以環己烷環上胺基的氮原子與式III中酯基的羰基連接，



式III。

[(0025)] 在一些實施方式中，DAR為1~10，可選擇地，為4~10。

[(0026)] 本揭露提供了藥物組合物，包括上述的抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、其溶劑化物或其組合，以及藥學上可接受的賦形劑。

[(0027)] 本揭露提供了套組，其包括上述抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、其溶劑化物或其組合。

[(0028)] 本揭露提供了上述抗體-藥物複合體，透過上述方法製備的抗體-藥物複合體，含有上述抗體-藥物複合體的藥物組合物或套組在製造用於診斷、預防及治療腫瘤疾病的治療劑中的用途。在一些實施方式中，腫瘤疾病包括表現MUC18及/或CD44v//8的良性腫瘤及惡性腫瘤。

[(0029)] 在一些實施方式中，腫瘤疾病包括黑色素瘤、咽癌症、三陰性乳腺癌症、食管腺癌、食管鱗狀細胞癌、肝癌、卵巢癌症、子宮頸癌症、尿路上皮癌症、膀胱神經內分泌腫瘤、小細胞肺癌癌症、非小細胞肺癌癌症、皮膚鱗狀細胞癌、膽管癌、轉移性胰腺癌、肺鱗狀細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌及/或食管鱗狀細胞癌。

[(0030)] 本揭露提供了上述抗體-藥物複合體，透過上述方法製備的抗體-藥物複合體，含有上述抗體-藥物複合體的藥物組合物或套組在製備靶向MUC18

及/或CD44v7/8的治療劑中的用途。

【0031】 本揭露提供了一種診斷，預防及治療腫瘤性疾病的方法，其包括向受試者施用治療有效量的治療劑，其中所述治療劑包括上述抗體-藥物複合體，透過上述方法製備的抗體-藥物複合體或上述藥物組合物。

【圖式簡單說明】

【0032】

圖1A示出02-1裸抗(naked antibody)的體積排阻色譜圖；圖1B示出Hu1H2-2裸抗的體積排阻色譜圖。

圖2A示出02-1裸抗的疏水層析色譜圖；圖2B示出Hu1H2-2裸抗的疏水層析色譜圖。

圖3A示出實施例5製備的抗體-藥物複合體02-1-LP1中的體積排阻色譜圖；圖3B示出該抗體-藥物複合體02-1-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖4A示出實施例6製備的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的體積排阻色譜圖；圖4B示出該抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖5A示出實施例7製備的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的體積排阻色譜圖；圖5B示出該抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖6A示出實施例8製備的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2的體積排阻色譜圖；圖6B示出該抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2的疏水層析檢測圖譜。

圖7A示出實施例9製備的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3的體積排阻色譜圖；圖7B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3的疏水層析檢測圖譜。

圖8A示出對比例1製備的抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE的體積排阻色譜

圖；圖8B示出該抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE的疏水層析檢測圖譜。

圖9A示出對比例2製備的抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE的體積排阻色譜圖；圖9B示出該抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE的疏水層析檢測圖譜。

圖10A示出對比例3製備的抗體-藥物複合體Rituximab-LP1的體積排阻色譜圖；圖10B示出抗體-藥物複合體Rituximab-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖11A示出對比例4製備的抗體-藥物複合體人類（Human）IgG-DXD的體積排阻色譜圖；圖11B示出抗體-藥物複合體人類IgG-DXD的疏水層析檢測圖譜。

圖12A示出對比例5製備的抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的體積排阻色譜圖；圖12B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖13A示出對比例6製備的抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的聚集體的體積排阻色譜圖；圖13B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖14A示出對比例7製備的抗體-藥物複合體人類IgG-LP2的體積排阻色譜圖；圖14B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP2的疏水層析檢測圖譜。

圖15A示出對比例8製備的抗體-藥物複合體人類IgG-LP3的體積排阻色譜圖；圖15B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP3的疏水層析檢測圖譜。

圖16A示出對比例9製備的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-DXD的體積排阻色譜圖；圖16B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-DXD的疏水層析檢測圖譜。

圖17示出A375細胞，HMOVII細胞，SK-MEL-2細胞及GAK細胞對抗體-藥物複合體02-1-LP1內吞的時間-螢光強度統計圖。

圖 18A1 示出黑色素瘤模型小鼠接受抗體 - 藥物複合體 Rituximab-vc-MMAE，02-1-vc-MMAE，Rituximab-LP1及02-1-LP1治療後的腫瘤

體積-時間變化曲線圖；圖 18A2 為圖 16A1 的局部圖，示出 02-1-LP1，02-1-vc-MMAE 及載體（Vehicle）組的腫瘤體積-時間變化曲線圖。

圖 18B1 示出黑色素瘤模型小鼠接受抗體-藥物複合體 Rituximab-vc-MMAE，02-1-vc-MMAE，Rituximab-LP1 及 02-1-LP1 治療後的體重-時間變化曲線圖；圖 18B2 為圖 18B1 的局部圖，示出 02-1-LP1，02-1-vc-MMAE 及載體組的體重-時間變化曲線圖。

圖 19 示出抗體-藥物複合體對頭頸部鱗癌細胞系 Detroit562 的體外殺傷曲線；圖 19A1 為圖 19 的局部圖，示出 Hu1H2-2-LP2，Hu1H2-2-LP1 及 Hu1H2-2-DXD 的體外殺傷曲線；圖 19A2 為圖 19 的局部圖，示出人類 IgG-LP2，人類 IgG-LP1 及人類 IgG-DXD 的體外殺傷曲線。

圖 20 示出頭頸部鱗癌模型小鼠接受抗體-藥物複合體 Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP2 以及人類 IgG-LP1 治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。

圖 21 示出頭頸部鱗癌模型小鼠接受抗體-藥物複合體 Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP2 以及人類 IgG-LP1 治療後的體重-時間變化曲線圖；

圖 22 示出肺癌模型小鼠接受抗體-藥物複合體 Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP1(DAR4)，Hu1H2-2-LP3，人類 IgG-LP1，人類 IgG-LP1（DAR4）及人類 IgG-LP3 治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。

圖 23 示出肺癌模型小鼠接受抗體-藥物複合體 Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP1(DAR4)，Hu1H2-2-LP3，人類 IgG-LP1，人類 IgG-LP1（DAR4）及人類 IgG-LP3 治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖 24A 示出 SCC-9 人頭頸鱗癌 CDX 模型接受抗體-藥物複合體 Rituximab-LP1 及 02-1-LP1 治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖 24B 示出 SCC-9 人頭頸鱗癌

CDX模型接受抗體-藥物複合體Rituximab-LP1及02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖25A示出Huh-7人肝癌CDX模型接受抗體-藥物複合體人類IgG-LP1及02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖25B示出Huh-7人肝癌CDX模型接受抗體-藥物複合體人類IgG-LP1及02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖26A示出LD1-0015-200617人食管鱗狀細胞癌PDX模型接受抗體-藥物複合體IgG-LP1及02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖26B示出LD1-0015-200617人食管鱗狀細胞癌PDX模型接受抗體-藥物複合體抗體-藥物複合體人類IgG-LP1及02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖27A示出LD1-0016-390730人食管腺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖27B示LD1-0016-390730人食管腺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖28A示出LD1-2025-362797人小細胞肺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖28B示出LD1-2025-362797人小細胞肺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖29A示出LD1-2009-362263人三陰乳腺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖29B示出LD1-2009-362263人三陰乳腺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖30A示出LD1-0060-200770人膽管癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖30B示出LD1-0060-200770人膽

管癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖31A示出OV-10-0073人卵巢癌PDX模型接受抗體-藥物複合體人類IgG-LP1及02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖31B示出OV-10-0073人卵巢癌PDX模型接受抗體-藥物複合體人類IgG-LP1及02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

【實施方式】

【0033】除非另有說明，否則在本說明書及申請專利範圍中使用的表示含量，濃度，比例，質量，體積，時間，溫度，厚度，技術效果等的所有數字在任何情況下均應理解為由術語“約”或“大致”修飾。因此，除非有相反的指示，否則以下說明書及所附申請專利範圍中列出的數字參數是近似值。對於本案所屬技術領域中具有通常知識者來說，其可以根據透過本揭露尋求獲得的期望性質及效果而變化，應根據有效數字位數及常規捨入方法或者本案所屬技術領域中具有通常知識者理解的方式來解釋每個數值參數。

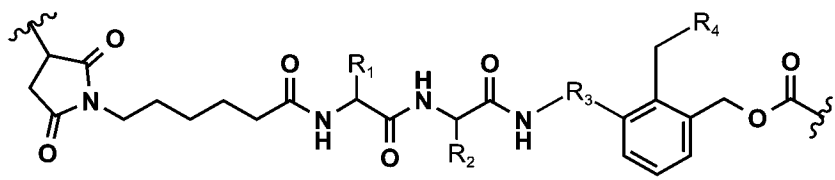
【0034】儘管闡述了本揭露的廣泛範圍的數值範圍及參數是近似值，但是盡可能精確地提供了在具體實施例中闡述的數值。然而，任何數值都會固有地包含某些誤差，這些誤差由於在其相應的測試測量中發現的標準偏差而必然地導致的。本說明書給出的每個數值範圍將包括落入該較寬數值範圍內的每個較窄數值範圍，就如同這些較窄數值範圍均在本文中明確寫出一樣。

【0035】ADC分子中，連接子作為連接抗體及有效負載的連接結構，是成功構建ADC分子的關鍵因素。就藥代動力學(PK)/藥效學(PD)及治療窗口而言，連接子的分子設計及性質是ADC發揮功效的關鍵決定因素。為了發揮最佳的效

力，理想的連接子應該具備如下特性：(1)連接子血漿中足夠穩定，ADC 分子可以在血流中循環並定位到腫瘤部位而不至於過早裂解。不穩定的連接子會導致毒性有效負載過早釋放，並損害非目標健康細胞，從而造成全身中毒及不良反應。(2)連接子需要具備快速被切割的能力，一旦ADC被內化到靶腫瘤細胞中，能夠快速釋放出游離的毒性有效負載。(3)連接子設計還需考慮疏水性。疏水連接子與疏水有效負載的結合通常會促進ADC分子的聚集，不但不利於ADC藥效，還可能導致肝中毒或是引發不希望的免疫反應（ Kyoji Tsuchikama et al., Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistrie, Protein Cell. 2018 Jan;9(1):33-46）。

【0036】 抗體-藥物複合體

本揭露提供了一種抗體-藥物複合體(ADC)，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合，包括抗體或其抗原結合片段，有效負載及式I所示的連接子，



式I

所述式I所示連接子透過琥珀醯亞胺基與抗體或其抗原結合片段鏈間二硫鏈還原後的巯基部分形成硫醚鍵連接；

所述式I所示連接子的酯基中的羰基與有效負載中的胺基連接；

式I中，R₁，R₂各自獨立地選自氫，甲基或異丙基；

R₃表示-(CR₅HCONH)^{n¹}-(CH₂CONH)^{n²}-或單鍵，R₅選自氫或苯甲基，n¹表示0~2的整數，n²表示0~2的整數；

R_4 表示甲胺基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示1~20的整數。

【0037】術語“抗體-藥物複合體”或“ADC”是指本文所述的與有效負載共價連接的抗MUC18/CD44v7/8抗體或其抗原結合片段的複合體。通常，抗體-藥物複合體可以包括抗體或其抗原結合片段，有效負載，以及任選地抗體或其抗體結合片段與有效負載之間的連接子。ADC可以透過將有效負載遞送到抗體或其抗原結合片段靶向的MUC18及/或CD44v7/8細胞，特別是MUC18或CD44v4/8腫瘤細胞來提供治療效果。抗體-藥物複合體可以透過本領域已知的用於製備抗體-藥物複合體的各種方法製備。

【0038】如本文所用，“抗體”是指與抗原結合的免疫球蛋白（Ig）家族的多肽。例如，天然存在的IgG型“抗體”是一種四聚體，其包含至少兩個透過二硫鍵相互連接的重（H）鏈及兩個輕（L）鏈。每個重鏈由重鏈可變區（在此縮寫為VH）及重鏈恆定區組成。重鏈恆定區由CH1，CH2及CH3三個結構域組成。每個輕鏈由輕鏈可變區（本文縮寫為VL）及輕鏈恆定區（本文簡寫為CL）組成。輕鏈恆定區由一個域組成。VH及VL區可以進一步細分為高變區，稱為互補決定區（CDR），中間穿插著更保守的區域，稱為框架區（FR）。每個VH及VL由三個CDR及四個FR組成，從胺基末端到羧基末端按以下順序排列：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。重鏈及輕鏈的可變區包含與抗原相互作用的結合結構域。

【0039】如本揭露所用，術語“抗原結合片段”是指抗體片段，包括雙抗體，Fab，Fab'，F(ab')₂，Fv片段，二硫鍵穩定的Fv片段（dsFv），（dsFv）₂，雙特異性dsFv（dsFv-dsFv'），二硫鍵穩定的雙抗體（ds雙抗體），單鏈Fv（scFv），scFv二聚體（二價雙抗體），由抗體的一部分形成的多特異性抗體，所述抗體包

括一個或多個CDR，駱駝化單結構域抗體，奈米體，結構域抗體，二價結構域抗體或與抗原結合但不包括完整抗體結構的任何其他抗體片段。抗原結合片段能夠與親本（parent）抗體或親本抗體片段（例如，親本scFv）結合的相同抗原。

【0040】“異構體”一詞是指分子式相同但結構不同的化合物，也稱為結構異構體，通常包括結構異構體及立體異構體。結構異構體是指由分子中原子的連接順序不同或鍵合性質不同引起的異構體，較佳為包括互變異構體。互變異構體是指原子在分子中兩個位置上快速移動產生的官能團異構體。立體異構體是指由分子中的原子或原子團以相同的順序及鍵相互連接，但在空間排列上不同而引起的異構體，較佳為包括光學異構體。光學異構體是指由於分子中不存在反軸對稱性而具有不同光學性質的立體異構體，如對映異構體（enantiomer）、非對映異構物（diastereomer）、外消旋體（racemate）及內消旋體（mesomer）。

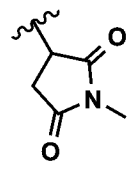
【0041】術語“前藥”是指透過改變藥物的化學結構而獲得的化合物，該化合物在體外是無活性的或活性較低的，並在體內透過酶促或非酶促轉化釋放活性藥物以發揮藥理作用。在本文中，前藥可以是ADC分子或有效負載。

【0042】術語“有效負載”包括從抗體-藥物複合體中釋放後具有細胞毒性或能夠殺死細胞的化合物，具有放射性標記的化合物、放射性核種或多肽，作為檢測標記或細胞殺傷作用的螢光團、生色團，顯像劑及/或金屬離子，調節機體免疫活性（包括活化或抑制作用）的化合物、核酸、多肽或蛋白質、酶、激素或核酸。

【0043】在一些理想情況下，抗體-藥物複合體中複合的有效負載幾乎沒有細胞毒性或細胞毒性小至有效治療劑量的ADC給藥後不會由於複合的有效負載引起受試者的全身毒性反應。所述有效負載可以是已經經過臨床驗證的用於治

療特定疾病的藥物，或者為在臨床使用條件下具有可接受的藥理活性的化合物、放射性核種、核酸、蛋白或多肽。

【0044】 本揭露中，所述式I所示的端部琥珀醯亞胺基與抗體或其抗原結合片段鏈間二硫鍵還原後的巰基部分形成硫醚鍵連接。所述琥珀醯亞胺基為

，其在3位與抗體或其抗原結合片段鏈間二硫鍵還原後的巰基部分形成硫醚鍵連接。本揭露中，結構式中的帶有  的鍵表示與其他基團連接的化學鍵。

【0045】 本揭露中，抗體或其抗原結合片段的二硫鍵包括鏈間二硫鍵及鏈內二硫鍵，較佳地，鏈間二硫鍵經過處理，例如，活化成為巰基後與連接子鍵合。抗體或其抗原結合片段中與連接子中的琥珀醯亞胺基進行化學鍵合的胺基酸包括賴胺酸、組胺酸、酪胺酸及半胱胺酸中的一種或其組合。任選地，抗體或其抗原結合片段中的化學結合胺基酸是半胱胺酸。在一些實施方式中，式I所示連接子可以連接於抗體的鉸鏈區、可變區及/或恆定區。

【0046】 在一些實施方式中，式I所示的連接子中， R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示1~20的整數。所述 n^3 可以選取例如1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19及20中的任一整數。

【0047】 在一些實施方式中， R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示8~15的整數。在一些實施方式中， R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示10~12的整數。在一些實施方式中， R_4 表示甲胺基。

【0048】 本揭露中，式I所示的連接子中含有親水性胺基集團 R_4 ，其包含有聚肌胺酸基團或甲胺基，增加了抗體-藥物複合體的親水性。親水性胺基基團的引入有利於改善與疏水性有效負載複合的ADC的親水性。ADC分子的親水性提

高有助於降低製備過程中ADC分子的聚集，進而提高抗體-藥物複合體的穩定性、均一性及純度。

【0049】 在一些實施方式中，式I所示的連接子中， R_3 表示單鍵。

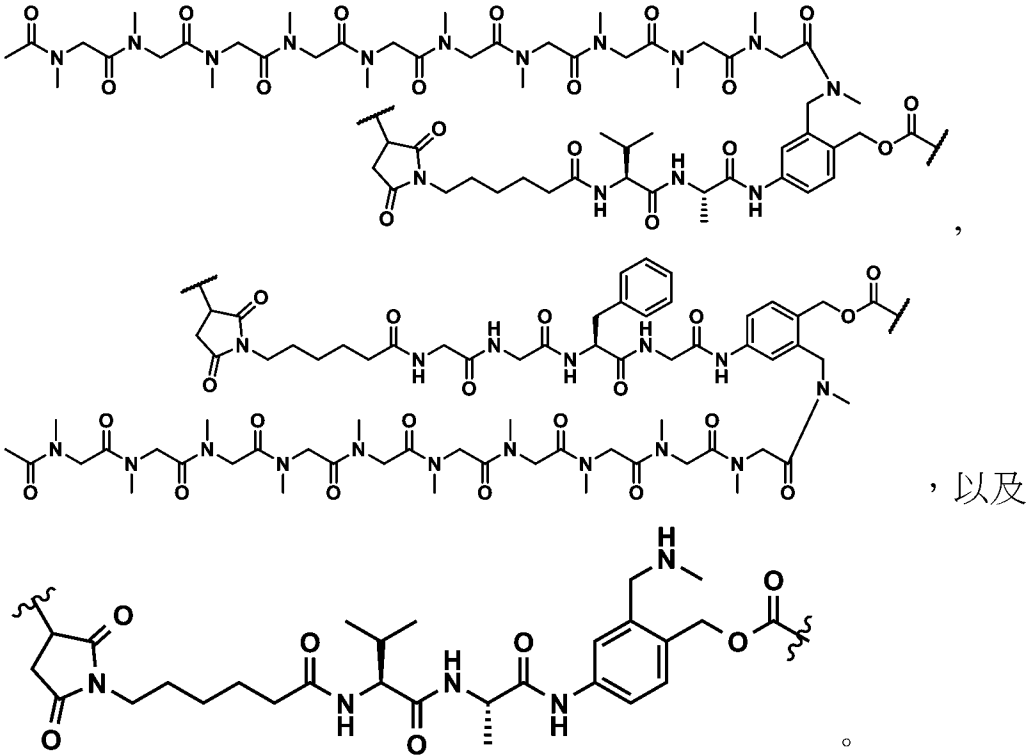
【0050】 在一些實施方式中， R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ ， R_5 為苯甲基， n^1 表示1~2的整數， n^2 表示1~2的整數。

【0051】 在一些實施方式中， R_3 表示 $-CR_5HCONH-$ ， $-CH_2CONH-$ ， $-CR_5H_2CONH-CH_2CONH-$ ， $-(CR_5HCONH)_2-CH_2CONH-$ ， $-CR_5HCONH-(CH_2CONH)_2-$ ，或者， $-(CR_5HCONH)_2-(CH_2CONH)_2-$ ； R_5 為苯甲基。

【0052】 在一些實施方式中， R_1 為氫。在一些實施方式中， R_1 為異丙基。

【0053】 在一些實施方式中， R_2 為氫。在一些實施方式中， R_2 為甲基。

【0054】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的連接子選自以下組



【0055】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的有效負載為含有放射性標記、螢光團、生色團、顯像劑及/或金屬離子為檢測標記的標記物，所述

標記物包括但不限於化學合成的有機化合物、放射性核種、金屬錯合物或多肽。其中，放射性標記是指用放射性核種取代化合物分子的一種或幾種原子而使它能被識別並可用作示蹤劑的標記化合物，包括胺基酸、多肽、蛋白質、碳水化合物、核苷酸、核苷、嘌呤、嘧啶、甾族、類脂化合物，以及醫學研究用的腫瘤抗原、激素、受體、維生素及藥物等。放射性核種通常為能自發放出射線的核種，包括但不限於氚、碘125、碘131、硫35、磷32及碳14。螢光團通常為包括共軛雙鍵的基團，當分子從激發態恢復到基態時，螢光團會發出螢光。生色團是指分子中含有的，能對光輻射產生吸收、具有躍遷的不飽和基團及其相關的化學鍵。顯像劑通常指在核醫學中指引入體內後能進行臟器、組織或分子顯像的放射性藥物。

【0056】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的有效負載為核酸，所述核酸可以為核糖核酸及/或去氧核糖核酸。

【0057】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的有效負載為激素、生長因子、凝血因子、纖維蛋白酶（例如能夠將前體藥物轉化為活性藥物的前體藥物轉化酶、核糖核酸酶）。

【0058】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的有效負載為免疫調節劑（包括具有影響免疫作用的細胞因子及趨化因子），具有生物活性的激動性抗體或拮抗性抗體。

【0059】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中有效負載為細胞毒性化合物。在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的有效負載具有抗腫瘤活性，或者為抗腫瘤藥物。所述有效負載選自DNA拓撲異構酶抑制劑或選自微管蛋白抑制劑。所述DNA拓撲異構酶抑制劑可以為拓撲異構酶I抑制劑或拓撲異構

酶II抑制劑。

【0060】 本揭露中，術語“拓撲異構酶抑制劑”通常指抑制拓撲異構酶活性的化合物。拓撲異構酶I抑制劑的化合物對拓撲異構酶I具有活性，拓撲異構酶II抑制劑對拓撲異構酶II具有活性。一些化合物對拓撲異構酶I及拓撲異構酶II都有活性，稱為拓撲異構酶I/II抑制劑。

【0061】 術語“微管蛋白抑制劑”通常指抑制真核細胞微管系統，干擾細胞分裂及抑制細胞增殖的化合物。

【0062】 在一些實施方式中，所述有效負載為具有拓撲異構酶抑制作用的喜樹鹼或其衍生物。術語“衍生物”指母體化合物分子中的原子或原子團被其他原子或原子團取代所形成的化合物，稱為該母體化合物的衍生物。術語“喜樹鹼及其衍生物”通常包括喜樹鹼（camptothecin）及喜樹鹼衍生物，喜樹鹼透過不可逆地抑制拓撲異構酶I發揮其藥理作用。所述喜樹鹼衍生物包括依喜替康（exatecan）、伊立替康（irinotecan）、托泊替康（topotecan）、魯托替康（lurtotecan）、斯蘭替康（silatecan）、依替立替康聚乙二醇（etirinotecan pegol）、TAS 103、9-胺基喜樹鹼（9-aminocamptothecin）、7-乙基喜樹鹼（7-ethylcamptothecin）、10-羥基喜樹鹼（10-hydroxycamptothecin）、9-硝基喜樹鹼（9-nitrocamptothecin）、10,11-亞甲二氧基喜樹鹼（10,11-methylenedioxycamptothecin）、9-胺基-10,11-亞甲基二氧基喜樹鹼（9-amino-10,11-methylenedioxycamptothecin）、9-氯-10,11-亞甲基二氧基喜樹鹼（9-chloro-10,11-methylenedioxycamptothecin）、7-(4-甲基哌嗪亞甲基)-10, 11-亞乙基二氧基-20(S)-喜樹鹼（7-(4-methylpiperazinomethylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin）、7-(4-甲基哌嗪亞甲基)-10, 11-亞甲基二氧基-20(S)-喜樹鹼

(7-(4-methylpiperazinomethylene)-10, 11-methylenedioxy-20(S)-camptothecin)，
7-(2-(N-異丙基胺基)乙基)-(20S)-喜樹鹼 (7-(2-(N-isopropylamino)ethyl)-(20S)-camptothecin) 等及其立體異構體、鹽及酯。喜樹鹼
及喜樹鹼類似物或衍生物的合成方法是已知的，並且在美國專利號5,244,903中
進行了總結及闡述，該專利透過引用整體併入本文。

【0063】 在一些實施方式中，所述有效負載為具有微管蛋白抑制作用的奧
瑞他汀或其衍生物，美登素或其衍生物。術語“奧瑞他汀及其衍生物”通常包括奧
瑞他汀F及奧瑞他汀F衍生物，所述奧瑞他汀F衍生物包括單甲基奧瑞他汀E
(monomethyl auristatin E, MMAE) 及單甲基奧瑞他汀F (monomethyl auristatin F,
MMAF)。術語“美登素及其衍生物”通常包括美登素及美登素衍生物，所述美登
素衍生物包括美登素DM1，美登素DM2及美登素DM4。

【0064】 在一些實施方式中，所述有效負載為喜樹鹼衍生物依喜替康，作
為拓撲異構酶抑制劑能夠作用於整個細胞週期，對生長緩慢實體瘤具有強的穿
透性及良好的療效。而且，細胞內標靶數量遠低於微管蛋白抑制劑的標靶數量，
在ADC分子攜帶相同數量的有效負載進入細胞時能夠起到更好的殺傷效果。依
喜替康 (Exatecan) 分子不是P-gp的基質，有利於降低或緩解藥物耐藥的問題。

【0065】 在一些實施方式中，所述有效負載為式II所示的喜樹鹼，其透過
環己烷環上胺基的氮原子與連接子連接，

R_4 表示甲胺基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示1~20的整數。

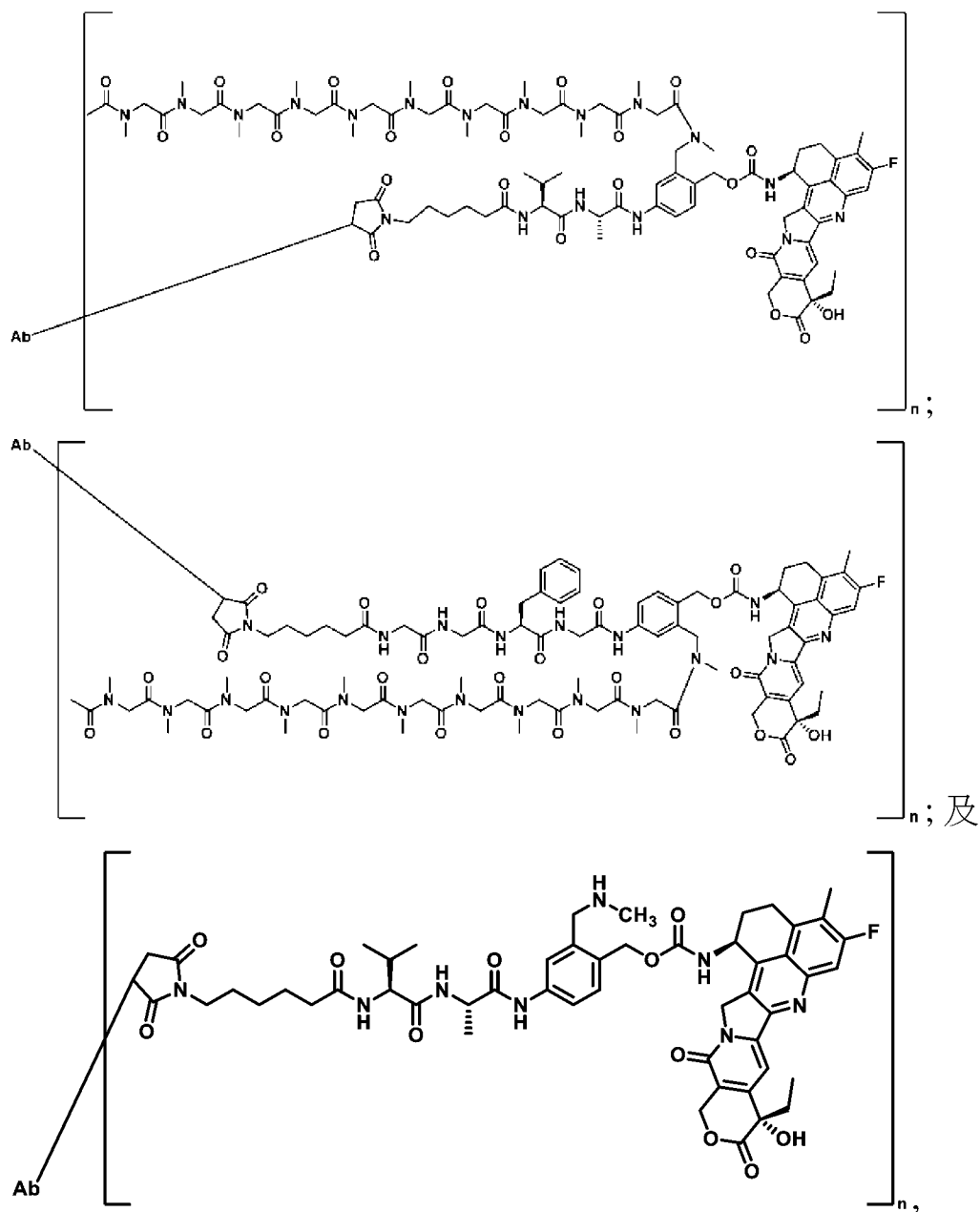
【0069】 所述式IV所示的中間體或活性代謝產物中的PABC (para-amino benzyloxycarbonyl)基團繼而發生1,6-消除並釋放出依喜替康(參見, Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 7492-7509.)。因此，本揭露提供的ADC分子中的連接子-有效負載結構具有良好的體內穩定性與生物活性。

【0070】 連接子-有效負載結構中的酶切位點，不受任何理論的束縛，可以是連接子中的醯胺鍵，例如， R_2 表示的取代基所在的碳原子及 R_3 表示的基團之間的醯胺鍵，或者， R_3 表示的基團中的醯胺鍵。

【0071】 在一些實施方式中，抗體-藥物複合體中，複合的有效負載的分子數相對每一分子抗體或抗原結合的比值（藥物抗體比或DAR）為1~10。在一些實施方式中，DAR為1~2，2~4，4~6，2~8，4~8，4~10，6~10，7~10或者8~10，示例性的DAR值如4, 6, 7.8, 9.2或者9.92。

【0072】 DAR表示每個抗體分子的複合有效負載或藥物分子數的平均值，即複合藥物分子數的平均值。在抗體-藥物複合體中，DAR是影響其療效及安全性的關鍵因素。抗體-藥物複合體的生產是透過指定反應條件如反應所用的起始原料及試劑的量來進行的，以達到恆定的複合有效負載分子數。通常抗體-藥物複合體製備時會得到含有不同數量的複合有效負載分子的混合物。除非另有說明，本揭露中DAR定義為平均值，即複合有效負載或藥物分子的平均數。

【0073】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體包括具有以下結構中的任一種：



Ab表示抗體或抗原結合片段； n 與DAR相同。

【0074】 抗體或其抗原結合片段透過還原的反應性巯基與連接子連接，任選地，抗體或其抗體結合片段的鉸鏈區中的二硫鍵被還原為反應性巯基，然後連接至連接子。

【0075】 在一些實施方式中，抗體-藥物複合體中的抗體或其抗原結合片段靶向MUC18。MUC18，也稱為CD146或黑色素瘤細胞黏附分子(MCAM)，是一種跨膜糖蛋白，主要在細胞黏附中起作用。它在血管組織(包括血管平滑肌)內的

內皮細胞中以可檢測的水平表現。值得注意的是，MUC18在人類惡性黑色素瘤中過度表現，特別是在轉移性病變及晚期原發性腫瘤中。

【0076】 在本揭露中，抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括重鏈（H）及輕鏈（L），重鏈及輕鏈的CDR如表1所示。

表1：CDR序列（採用IMGT方案編號）

抗體編號	H/L	CDR1	CDR2	CDR3
CL070336	H	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 1)	MHYSATP (SEQ ID NO: 11)	SRSLNWDVLDY (SEQ ID NO: 23)
	L	KSVRTSGYNY (SEQ ID NO: 34)	LAS	QHSREFPFT (SEQ ID NO: 46)
CL070335	H	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 1)	IHYSTTT (SEQ ID NO: 12)	SRSLNWDVLDY (SEQ ID NO:23)
	L	KSVRTSGYSY (SEQ ID NO: 35)	LAS	QHTREFPFT (SEQ ID NO: 47)
CL070333	H	GFTFTGY Y (SEQ ID NO: 2)	IYPGNVNT (SEQ ID NO: 13)	ARSGYFASSYEFAY (SEQ ID NO: 24)
	L	ENIYSY (SEQ ID NO: 36)	NAK	QHHYGTPLT (SEQ ID NO: 48)
CL070319	H	GYTFTEYA (SEQ ID NO: 3)	ITAYSGDA (SEQ ID NO: 14)	ARGLGRPNYGM DY (SEQ ID NO: 25)
	L	QSLN SRYQKNY (SEQ ID NO: 37)	FAS	QQHYGTPFT (SEQ ID NO: 49)
CL070321	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGGT (SEQ ID NO: 15)	ARSGYDDYYAFDY (SEQ ID NO: 26)
	L	SSVGY (SEQ ID NO: 38)	STS	HQWSSYPST (SEQ ID NO: 50)
CL070320	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGGT (SEQ ID NO: 15)	ARSGYDNYYALDY (SEQ ID NO: 27)
	L	STVGY (SEQ ID NO: 39)	STS	HQWSSYPCT (SEQ ID NO: 51)
CL070324	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGAT (SEQ ID NO: 16)	TRSGYDDYYALDY (SEQ ID NO: 28)
	L	SSVGY (SEQ ID NO: 38)	STS	HQWSNYPST (SEQ ID NO: 52)
CL070341	H	GFTFSTYG (SEQ ID NO: 5)	INSRASYT (SEQ ID NO: 17)	ARHRRDWDSYYAMDY (SEQ ID NO: 29)
	L	QSVLYNSNQKNY (SEQ ID NO: 40)	WAS	HQYLSSWT (SEQ ID NO: 53)
CL070350	H	GFTFN NYG (SEQ ID NO: 6)	INRGGSYT (SEQ ID NO: 18)	ARHRRDWDSYYAMDY (SEQ ID NO: 29)
	L	RSVLYNSNQKNY (SEQ ID NO: 41)	WAS	HQYLSSWT (SEQ ID NO: 53)
CL070349	H	GYSITSGFY (SEQ ID NO: 7)	INFGGTN (SEQ ID NO: 19)	ARGGNDGGFTY (SEQ ID NO: 30)
	L	SSVSSTY (SEQ ID NO: 42)	RTS	HQWSGYPYT (SEQ ID NO: 54)
CL070348	H	GYSITSDYA (SEQ ID NO: 8)	ITYSGST (SEQ ID NO: 20)	ARRIRRTGDWYFDV (SEQ ID NO: 31)
	L	QNLLNSVNQKNF (SEQ ID NO: 43)	WAS	QNDYIYPYT (SEQ ID NO: 55)
CL070370	H	GYTFTDYS (SEQ ID NO: 9)	INTETGEP (SEQ ID NO: 21)	VSYDYDAVSY (SEQ ID NO: 32)

	L	QYVGAA (SEQ ID NO: 44)	WAS	QQYGNYRT (SEQ ID NO: 56)
J253	H	GYTFTSYD (SEQ ID NO: 10)	IFPGDGST (SEQ ID NO: 22)	ARYHFFDN (SEQ ID NO: 33)
	L	KSLLYKDGKTY (SEQ ID NO: 45)	LMS	QQLVEYPYT (SEQ ID NO: 57)

【0077】 如本揭露所用，術語“CDR”或“互補性決定區”是指重鏈及/或輕鏈可變區內的非連續抗原結合位點。CDR殘基編號遵循IMGT的命名法，參見Lefranc M. P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27: 55-77 (2003)，當相互比較時，定義包括胺基酸殘基的重疊或亞群。然而，應用任何一個定義來指代抗體或其抗原結合片段或其移植抗體或變體的CDR旨在本文定義及使用的術語的範圍內。

【0078】 在一些實施方式中，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包含編號為CL070336、CL070335、CL070333、CL070319、CL070321、CL070320、CL070324、CL070341、CL070350、CL070349、CL070348、CL070370或J253的抗體中的重鏈CDR及輕鏈CDR。

【0079】 在一些實施方式中，抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的HCDR1（重鏈CDR1）、如SEQ ID NO:16所示胺基酸序列的HCDR2（重鏈CDR2）、如SEQ ID NO:28所示胺基酸序列的HCDR3（重鏈CDR3）；及如SEQ ID NO:38所示胺基酸序列的LCDR1（輕鏈CDR1），胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO:52所述胺基酸序列的LCDR3（輕鏈CDR3）。

【0080】 在一些實施方式中，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括與表2中示出的參考抗體序列中的任一VH具有至少85%或者90%同一性的重鏈可變區（VH，heavy chain variable region），及/或，與表2中示出的參考抗體序列中的任一VL具有至少85%或者90%同一性的輕鏈可變區（VL，light chain variable

region)。

【0081】 所述同一性可以使用Karlin及Altschul Proc .Natl .Acad .Sci .USA 87:2264-68,1990 的演算法來確定，該演算法如在 Karlin 及 Altschul Proc .Natl .Acad .Sci .USA 90:5873-77 ,1993中進行了修改。此類演算法併入至 Altschul等人，J .Mol .Biol .215:403-10 ,1990的NBLAST及XBLAST程式(2 .0版)中。可以用BLAST程式(分數=50，字長=3)來進行BLAST蛋白質搜索，以獲得與感興趣的蛋白質分子同源的胺基酸序列。在兩個序列之間存在缺口的情況下，可以如在Altschul等人，Nucleic Acids Res .25(17):3389-3402 ,1997中所描述的那樣採用Gapped BLAST。當採用BLAST及Gapped BLAST程式時，可以使用各自程式(例如，XBLAST及NBLAST)的預設參數。

【0082】 在一些實施方式中，在框架區內不存在突變或存在不影響抗體可變區與抗原結合的突變，該突變可以提高抗體與抗原的結合親和力，或者保持大致不變。在一些實施方式中，抗MUC18或CD44v7/8抗體或其抗原結合片段還包含保守修飾的變體，所述保守修飾的變體包括對多肽序列的單獨取代、缺失或添加，其導致胺基酸被化學上相似的胺基酸取代。提供功能相似的胺基酸的保守置換表是本領域熟知的。這種保守修飾的變體是對多態性變體、種間同源物及等位基因的補充且不排除這些變體。以下八組含有相互保守取代的胺基酸：1) 丙胺酸 (A)、甘胺酸 (G)；2) 天冬胺酸 (D)、谷胺酸 (E)；3) 天冬醯胺 (N)、穀氨醯胺 (Q)；4) 精胺酸 (R)、賴胺酸 (K)；5) 異亮胺酸 (I)、亮胺酸 (L)、蛋胺酸 (M)、纈胺酸 (V)；6) 苯丙胺酸 (F)、酪胺酸 (Y)、色胺酸 (W)；7) 絲胺酸 (S)、蘇胺酸 (T)；及 8) 半胱胺酸 (C)、甲硫胺酸 (M) (參見，例如，Creighton, Proteins (1984))。在一些實施方式中，術語“保守序列修飾”用於指不顯著影響或改變包含胺基酸序列

的抗體的結合特徵的胺基酸修飾。

【0083】 表2 參考抗體序列

抗體編號	VH	VL	Antibody Code 抗體編號	VH	VL
CL070336	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 59	CL070341	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73
CL070335	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 61	CL070350	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75
CL070333	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63	CL070349	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 77
CL070319	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	CL070348	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 79
CL070321	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	CL070370	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 81
CL070320	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 69	J253	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83
CL070324	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	/	/	/

【0084】 在一些實施方式中，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包含的VH序列與表3中示出的VH序列至少具有85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%同一性；VL序列與表3中示出的VL序列至少具有85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%同一性。表3中所示的抗體分別是CL070324及J253的人源化序列。

【0085】 表3 人源化抗體序列

抗體編號	VH	VL
人源化 CL070324 (02-1)	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 85
人源化 hJ253-03-1	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 87
人源化 hJ253-03-7	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 89

【0086】 在一些實施方式中，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括如SEQ ID NO: 84所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 85所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列。

【0087】 在一些實施方式中，抗MUC18抗體或其抗原結合片段是人源化CL070324、人源化 hJ253-03-1、或人源化 hJ253-03-7，或其保守變體。

【0088】 其中，SEQ ID NO: 1~89所示的抗MUC18抗體的CDR序列及抗體

可變區序列已記載在美國專利US2022041749（SEQ ID NO: 8~90，SEQ ID NO: 1~6）中，該專利透過引用整體併入本揭露。

【0089】 在一些實施方式中，所述抗體或抗原結合片段靶向CD44v7/8。CD44，也被稱為HCAM(歸巢細胞黏附分子)、Pgp-1(吞噬糖蛋白-1)、Hermes抗原、淋巴細胞歸巢受體、ECM-III或HUTCH-1，是一種細胞表面糖蛋白，其主要在細胞黏附及細胞間相互作用中發揮功能。已知CD44的若干剪接變體，包括CD44 v7/8，其是一種包含外顯子7及外顯子8的變體。CD44是透明質酸的蛋白受體，並且已進一步顯示與骨橋蛋白、膠原蛋白、基質金屬蛋白酶及其它類似配體結合或以其它方式相互作用。

【0090】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段特異性結合人CD44 v7/8中包括QAGRRMDMDSSHSIT（SEQ ID NO: 90）的胺基酸序列的結合肽。

【0091】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段不結合人CD44 v7/8中 PISHPMGRGHQAGRR（SEQ ID NO: 91）及 / 或 SHSITLQPTANPNTG（SEQ ID NO: 92）的胺基酸序列的結合肽。

【0092】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段的重鏈包括：如SEQ ID NO: 93所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 94所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 95所示胺基酸序列的重鏈CDR3；輕鏈包括：如SEQ ID NO: 96所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為RAN的CDR2，如SEQ ID NO: 97所示胺基酸序列的輕鏈CDR3。抗CD44v7/8抗體或其抗原結合片段的CDR序列如表4所示：

表4 CDR序列(採用IMGT方案編號)

抗體		CDR1	CDR2	CDR3
HIS1H2-2	重鏈	GYTFTNYW (SEQ ID NO: 93)	IYPSDSYT (SEQ ID NO: 94)	TKWGDSDY (SEQ ID NO: 95)
	輕鏈	QDINRY (SEQ ID NO: 96)	RAN	LQYDEFPFT (SEQ ID NO: 97)

【0093】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括與表5中示出的參考抗體序列的VH具有至少85%或者90%同一性的VH，及/或，與表5中示出的參考抗體序列的VL具有至少85%或者90%同一性的VL。

【0094】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括與表5中示出的參考抗體人源化序列的HIS1H2-2a或HIS1H2-2的VH具有至少具有85%，90%，92%，94%，95%，96%，97%，98%，99%的同一性的VH；及與HIS1H2-2a或 HIS1H2-2的VL序列具有至少85%，90%，92%，94%，95%，96%，97%，98%，99%的同一性的VL。

【0095】 表5 抗CD44 v7/8抗體的輕/重鏈可變區序列

抗體編號	VH	VL
參考抗體 HIS1H2-2	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 99
人源化抗體 HIS1H2-2a	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 101
人源化抗體 HIS1H2-2	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 104

【0096】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 101或SEQ ID NO: 104所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

【0097】 結合肽序列，不結合的肽序列，CDR序列及SEQ ID NO: 90~101所示的抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段的抗體可變區序列已記載在PCT專利申請WO2020159754（SEQ ID NO: 2~14）中，該專利透過引用整體併入本文。

【0098】 本揭露提供的抗體-藥物複合體對腫瘤細胞顯示出優異的殺傷活

性，並且對具有高表現MUC18或CD44v7/8的腫瘤細胞顯示極高的殺傷活性。

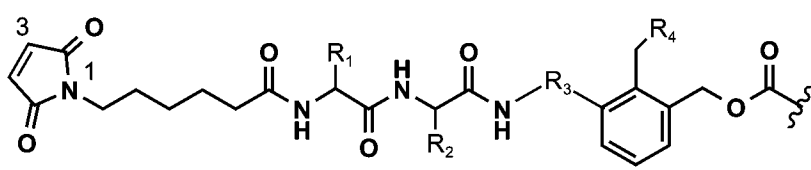
【0099】 本揭露提供的抗體-藥物複合體顯示出優異的抗腫瘤活性。在一些實施方案中，抗體-藥物複合體對患有具有不同MUC18表現水平（低、中、高）的腫瘤性疾病的受試者顯示出優異的抗腫瘤活性。MUC18的表現水平可以透過本案所屬技術領域中具有通常知識者已知的H-Score方法來測量。分數範圍為0-300，分數越高，表現越高。例如，低（H-Score=10-99）、中等（H-Score=100-99）及高（H-Score=200-300）。此外，抗體-藥物複合體在體內沒有顯示出明顯的不良反應。

【0100】 需要說明的是，本揭露的抗體-藥物複合體由於在大氣中放置、或進行重結晶而有吸收水分、保持吸附的水的情況、或成為水合物的情況，這樣的含有水的化合物及鹽也包含在本揭露之內。另外，本揭露中也包括用各種放射性或非放射性同位素標記的同位素變體化合物。構成本揭露的抗體-藥物複合體的原子中的一種以上，也可以含有非天然比例的原子同位素。作為原子同位素，可舉出例如氘(2H)、氚(3H)、碘-125(125I)或碳-14(14C)等。另外，本揭露化合物可以用例如氚(3H)、碘-125(125I)或碳-14(14C)之類的放射性同位素進行放射性標記。經放射性標記的化合物作為治療或預防劑、研究試劑例如檢驗試劑、及診斷劑、例如體內圖像診斷劑。對於本揭露的抗體-藥物複合體的所有同位素變體而言，無論是否具有放射性，均包含於本揭露的範圍內。

【0101】 製備方法

本揭露提供了一種抗體-藥物複合體的製備方法，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、其溶劑化物或其組合，以及藥學上可接收的賦形劑，包括以下步驟：抗體或其抗原結合片段經還原處理後鏈間二硫鍵至少部分被還

原，與連接子-有效負載中的式III所示連接子的馬來醯亞胺-N-基的3位碳原子進行反應，



式III

所述式III所示連接子的酯基中的羰基與抗體-藥物複合體中有效負載的胺基連接；

R_1 、 R_2 各自獨立地選自氫、甲基或異丙基；

R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 或單鍵， R_5 選自氫或苯甲基， n^1 表示0~2的整數， n^2 表示0~2的整數；

R_4 表示甲胺基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示1~20的整數。

【0102】 在抗體-藥物複合體中，鏈間二硫鍵被還原為巯基，然後與連接子-有效負載中由式III表示的連接子的反應基團反應。在很多實際情況下，帶有有效負載的上述式III所示結構的連接子連接到具有反應活性巯基的同一個抗體或其抗原結合片段分子上。在一些實施方式中，抗體或其抗原結合片段與還原劑反應如二硫蘇糖醇（DTT）、2-巯基乙醇或三(2-羧乙基)鹽酸鹽磷（TCEP）反應，使抗體或其抗原結合片段上的二硫鍵形成活性巯基。所述還原劑的用量可以為抗體或其抗原結合片段莫耳數的0.3~10倍當量，例如，1~10, 3~10, 5~10, 7~10倍抗體或其抗原結合片段莫耳當量。

【0103】 在一些實施方式中，所述方法還包括：抗體或其抗原結合片段在含有螯合劑的緩衝溶液中與還原劑反應，之後加入連接子-有效負載的溶解液，進行反應。連接子-有效負載具體為式III所示連接子及有效負載鍵合後形成的化

合物，其中有效負載中的胺基（一級胺基）與III所示連接子的酯基中的羰基連接。在連接子-有效負載中，有效負載選自[抗體-藥物複合體]部分中描述的有效負載。術語“螯合劑”是指能夠與金屬原子或離子透過配位鍵結合，生成具有環狀結構的錯合物。

【0104】 在一些實施方式中，還原劑在含有螯合劑的緩衝溶液中與抗體或其抗原結合片段反應，得到鏈間二硫鍵被部分或者完全還原的抗體或其抗原結合片段。所述螯合劑包括但不限於乙二胺四乙酸(EDTA)及二乙三胺五乙酸(DTPA)。螯合劑的使用濃度為1 mM~20 mM，例如，2 mM~20 mM，5 mM~20 mM，8 mM~20 mM，1 mM~15 mM或者1 mM~10 mM。所述緩衝溶液的成分可以是本領域常用的緩衝鹽，例如磷酸鈉、硼酸鈉、乙酸鈉或者類似緩衝鹽。

【0105】 抗體或其抗原結合片段與還原劑的反應在調節的pH條件下進行。在一些實施方式中，抗體或其抗原結合片段與還原劑反應時溶液的pH為5~9，可選為pH 6~8，pH 6~7，pH 6.5~7.5或者pH 7~8，例如在溶液約為pH7時進行反應。可以使用具有酸性或鹼性的化學物質調節溶液pH值，示例性的具有酸性或鹼性的化學物質包括醋酸、鹽酸、磷酸、硫酸、碳酸氫鈉、碳酸鈉、氫氧化鈉及三乙胺。

【0106】 抗體或其抗原結合片段與還原劑的反應在調節的溫度條件下進行，示例性的反應溫度為-10~40°C，-10~10°C，5~40°C，10~40°C，25~40°C，30~40°C，35~38°C，如約37°C。

【0107】 連接子-有效負載可以溶解於有機溶劑，所述有機溶劑選自二甲亞砜（DMSO，dimethyl sulfoxide）、二甲基甲醯胺（DMF，dimethylformamide）、二甲基乙醯胺（DMA，dimethylacetamide）及N-甲基-2-吡咯烷酮（NMP，

N-methyl-2-pyrrolidone) 中的任意一種或組合。

【0108】 在一些實施方式中，連接子-有效負載的溶解液以1%至20%體積比的量加入到經還原處理或含有具有活性巰基的抗體或其抗原結合片段的緩衝溶液中，基於抗體或其抗原結合片段緩衝液的體積計。在一些實施方式中，加入的連接子-有效負載的溶解液的體積比為1~20%，2~20%，5~20%，10~20%，15~20%，1~18%，1~15%，1~13%，1~10%或者5~15%，基於抗體或其抗原結合片段緩衝液的體積計。

【0109】 在一些實施方式中，連接子-有效負載的與抗體或其抗原結合片段的莫耳用量比值為4~20，可選為8~20。在一些實施方式中，連接子-有效負載的與抗體或其抗原結合片段的莫耳用量比值為10~20，14~20，16~20或者18~20。

【0110】 在一些實施方式中，抗體或其抗原結合片段與連接子-有效負載進行反應的溫度為-10~40°C或者0~37°C。在一些實施方式中，反應溫度為-10~10°C，5~40°C，5~37°C，10~37°C，10~25°C或者15~30°C。

【0111】 在一些實施方式中，抗體或其抗原結合片段與連接子-有效負載進行反應的時間為0.5~2小時。在一些實施方式中，抗體或其抗原結合片段與連接子-有效負載進行反應的時間為0.5~1.75小時，0.5~1.5小時，0.5~1.25小時，0.75~2小時或者1~2小時。

【0112】 該反應可以透過使用含巰基的試劑使未反應的連接子-有效負載的反應活性失活而終止。所述含有巰基的試劑包括但不局限於半胱胺酸或者N-乙醯-(L)-半胱胺酸(NAC)。更具體的說，向反應溶液中加入莫耳當量為連接子-有效負載莫耳當量1~2倍的含有巰基的試劑，並在室溫(10~30°C)下培養10~30分鐘，如此可以終止反應。

【0113】 在抗體或抗原結合片段具有巰基的情況下，抗體-藥物複合體還可以透過使用已知方法反應化合物獲得(例如，可透過專利公開文獻US2016/297890中描述的方法獲得(例如，可透過段落[0336]至[0374]中描述的方法獲得))。具有巰基的抗體或其抗原結合片段可以透過本案所屬技術領域中具有通常知識者熟知的方法獲得(Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996))。

【0114】 透過上述製備方法可以獲得本揭露提供的抗體-藥物複合體。在一些實施方式中，製備的抗體-藥物複合體經過純化處理，所述純化處理包括但不限于凝膠過濾，例如使用凝膠柱進行純化。

【0115】 套組

本揭露提供了一種套組，其包括上述抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合。套組可以進一步包括本揭露所述的抗體-藥物複合體在本揭露的方法中的使用說明，例如在治療腫瘤性疾病的方法中的使用說明。

【0116】 合適的容器包括，例如，瓶子、小瓶（例如，雙腔小瓶）、注射器（例如單腔或雙腔注射器）及試管。容器可以由諸如玻璃或塑膠的各種材料形成。容器中裝有製劑。容納製劑的容器可以是一次性小瓶或多次用小瓶，允許重複施用重構製劑。

【0117】 套組可以進一步包括標籤或包裝插入物，其在容器上或與容器有關，可以標示複溶及/或使用製劑的用法說明。標籤或包裝插入物可以進一步標示該製劑用於或打算用於皮下、靜脈內（例如，靜脈內輸注），或用於治療受試者的腫瘤性疾病（例如，癌症）的其他給藥模式。套組還可以包括從商業、

治療及用戶的角度出發所需的其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針頭、注射器及帶有使用說明的包裝插入物。

【0118】藥物組合物

本揭露提供了一種藥物組合物，包括上文所述的抗體-藥物複合體，或其異構體，同位素變體，藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合，以及藥學上可接受的輔料。

【0119】本揭露的抗體-藥物複合體或藥物組合物可以根據藥學上可接受的輔料的具體適用形式、理化特徵等，選擇合適的給予方式。在一些實施方式中，所述藥物組合物可以以冷凍乾燥製劑或液狀製劑的形式形成製劑，所述製劑中可以含有本領域中適當的製劑添加物。例如，上述藥物組合物中，代表性地，含有1種以上的藥學載體，例如滅菌的液體，如水及油(包含石油、動物、植物、或合成來源的油(例如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等))。在靜脈內給予上述藥物組合物的情況下，水是更具有代表性的載體。另外，食鹽水溶液、葡萄糖水溶液及甘油溶液也可作為液體載體，尤其是可用於注射用溶液。適當藥學賦形劑在該領域中是已知的。根據需要，上述組合物中還可以含有微量的潤濕劑或乳化劑、或pH緩衝化劑。所述藥物組合物的給藥方式通常選用腸胃外的給藥，可以為皮內、肌肉內、腹腔內、靜脈內或皮下注射，但不限於這些，例如可以利用輸液或快速注射(bolus injection)進行給予藥物。參見例如，the Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000), 其全部內容透過引用併入本文。 Remington 's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), 其全部內容透過引用併入本文。

【0120】 本發明的藥物組合物，可以是僅含有本申請的抗體－藥物複合體的藥物組合物，也可以是含有抗體－藥物複合體及至少一種其他治療劑（例如癌治療劑）的藥物組合物。在一些實施方式中，也可將本揭露的抗體－藥物複合體與其他癌治療劑一同給予以增強抗癌效果。出於這種目的使用的其他抗癌劑，可與抗體－藥物複合體同時地、分別地或序貫地向個體給予，也可改變給予間隔而進行給予。示例性的其他癌治療劑如紫杉醇、順鉑、長春鹼等，只要是具有抗腫瘤活性的藥劑，就不受限制。

【0121】 關於本揭露，活性劑或包含活性劑的藥物組合物可以透過任何合適的給藥途徑給藥於受試者。例如，活性劑可以透過胃腸外、鼻腔、口腔、肺部、局部、陰道或直腸給藥而給藥於受試者。提供以下關於給藥途徑的討論僅僅是為了說明各種實施方案，而不應被解釋為以任何方式限制範圍。

【0122】 在一些實施方案中，將本揭露的抗體-藥物複合體給予受試者。如本文所用，術語“受試者”是指人類及非人類動物。非人類動物包括所有脊椎動物，如老鼠、兔子、貓、狗、豬、猴子、黑猩猩、大猩猩等。在一些實施例中，受試者是人。

【0123】 使用方法

本揭露提供了抗體-藥物複合體、透過上述方法製備的抗體-藥物複合體、包括抗體-藥物複合體的藥物組合物或本文提供的套組在製備用於診斷、預防及治療腫瘤性疾病的治療劑中的用途。

【0124】 腫瘤性疾病包括良性腫瘤及惡性腫瘤（例如癌症）。在一些實施方式中，良性腫瘤及惡性腫瘤表現MUC18及/或CD44v7/8。

【0125】 應用抗體-藥物複合體的腫瘤性疾病的類型不限於上述癌症細

胞，只要其是表現抗體-藥物複合體的抗體或其抗原結合片段可識別的蛋白質的癌症細胞即可。在一些實施方案中，腫瘤性疾病是表現MUC18及/或CD44v7/8的實體瘤。

【0126】 在一些實施方式中，腫瘤性疾病包括黑色素瘤、咽癌症、三陰乳腺癌、食管腺癌、食管鱗狀細胞癌、肝癌、卵巢癌症、子宮頸癌症、尿路上皮癌症、膀胱神經內分泌腫瘤、小細胞肺癌癌症、非小細胞肺癌、皮膚鱗狀細胞癌，膽管癌、轉移性胰腺癌、肺鱗狀細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌及/或食管鱗狀細胞癌。

【0127】 本揭露提供抗體-藥物複合體、透過上述方法製備的抗體-藥物複合體、包括抗體-藥物複合體的藥物組合物，或套組在製備靶向MUC18及/或CD44v7/8的治療劑中的用途。

【0128】 本揭露提供了診斷、預防及治療腫瘤性疾病的方法，包括給受試者施用治療有效量的上述治療劑。

【0129】 如本文所用，術語“治療有效量”是指本文所述的ADC足以誘導預期效果的活性成分的量，包括但不限於本文所定義的疾病治療。抗體-藥物複合體的治療劑量根據所治療的特定病況、病況的嚴重程度、個體患者參數(包括年齡、身體狀況、大小、性別及體重)、治療持續時間、同時療法(如有)的性質、具體的施用途徑、以及健康執業醫師的知識等因素而變化。在一些實施方式中，可以在已給予一次或多次抗體或其抗原結合片段施用的個體中根據經驗來確定上述抗體-藥物複合體的劑量。在一些實施方式中，抗體-藥物複合體的可接受的治療劑量為0.1~30 mg/kg，0.5~30 mg/kg，1~30 mg/kg，1~25 mg/kg，0.1~25 mg/kg，0.1~20 mg/kg，1~20 mg/kg或者0.5~20 mg/kg。在一些實施方式中，給藥頻率為

每12小時一次、每天一次、每週一次、每2週一次、每隔4週一次，每隔5週一次、每隔6週一次、每隔7週一次、每隔8週一次、每隔9週一次或每隔10週一次；或每月一次、每2個月一次或每3個月一次，或更長時間。所述治療劑量及給藥頻率可以隨治療方案的變化而改變。

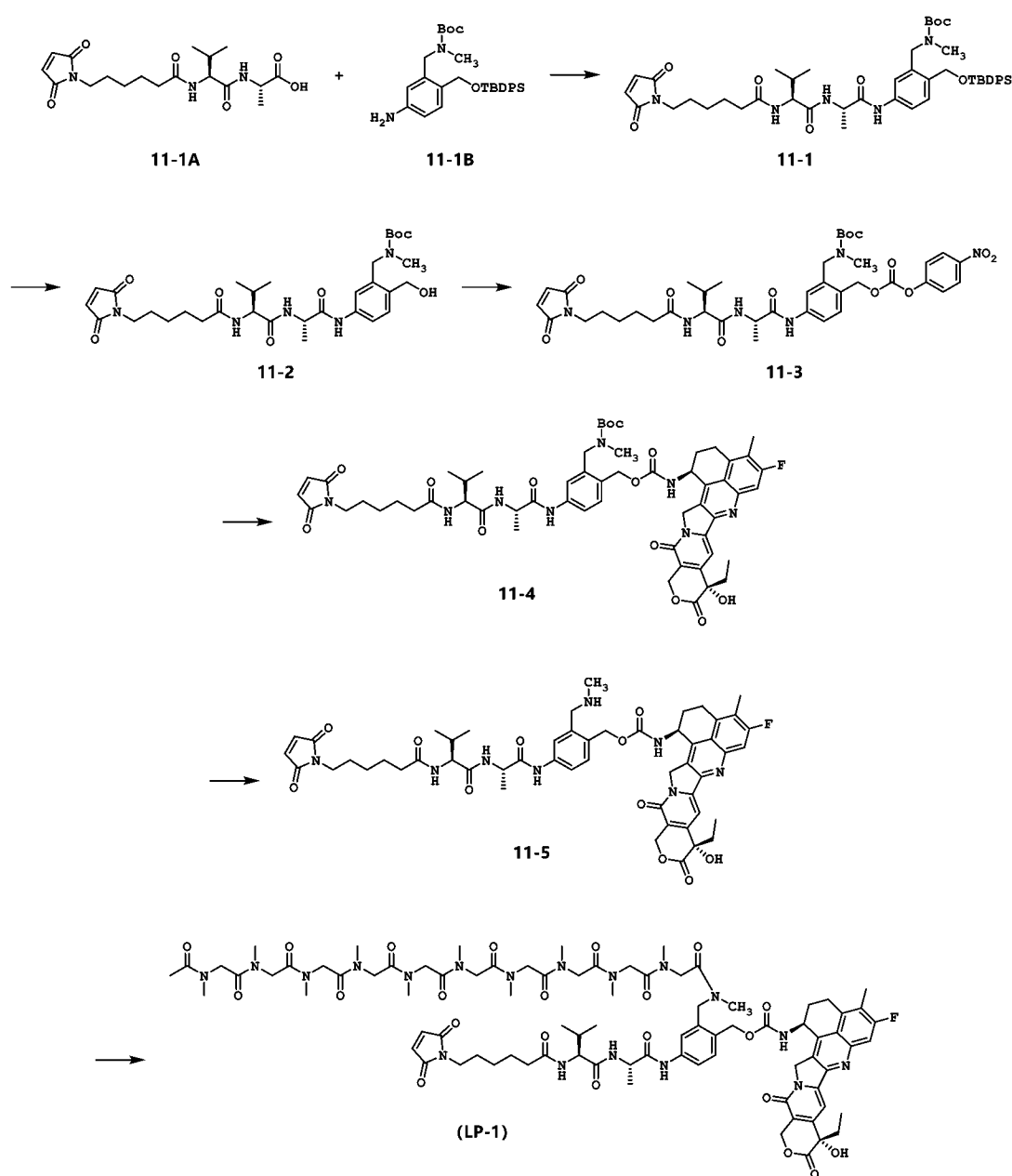
【0130】 本揭露的各種實施方式及較佳項可以相互組合，只要它們彼此之間不是內在矛盾的，由此組合而形成的各種實施方式都視為本案揭露的一部分。

【0131】 下面將結合實施例以例證的方式更清楚、明確地闡述本揭露的技術方案。應該理解的是，這些實施例僅用於例證的目的，絕不旨在限制本揭露的保護範圍。本揭露下面將結合實施例以例證的方式更清楚、明確地闡述本揭露的技術方案。的保護範圍僅透過請求項來限定。

【0132】 實施例

透過以下所示的實施例具體地說明本揭露，但本揭露不受它們的限制。另外，不對這些實施例進行任何方式的限定性解釋。另外，本說明書中，沒有特別記載的試劑、溶劑及起始材料可由市售的供給源容易地獲得。

【0133】 實施例1：製備化合物LP-1



【0134】 步驟1: 合成中間體11-1

化合物11-1A (Mc-Val-Ala-OH, 購自上海皓元生物醫藥科技有限公司, 2.4 g, 6.29 mmol) 以及化合物11-1B (3.18 g, 6.29 mmol) 混合溶液中, 在室溫下加入DCM (二氯甲烷):MeOH (甲醇) (v:v=2:1, 90 mL)以及 EEDQ (2-乙氧基-1-乙氧碳醯基-1,2-二氫喹啉) (1.86 g, 7.55 mmol)。將反應溶液在室溫攪拌24小時, 真空除去溶劑, 粗殘餘物透過快速色譜法 (flash chromatography)進一步純化, 得到化合物11-1 (3.9g, 71%)。LC-MS (ESI, m/z) : 868.49 (M+H)。

【0135】 步驟2: 合成中間體11-2

將化合物11-1 (2 g, 2.3 mmol) 溶解於無水四氫呋喃THF (50 mL) 中，在氬氣環境下於0°C加入氟化氫-吡啶 (4.6 g, 46 mmol)，然後將反應混合物於0°C攪拌，持續2個小時。透過加入水淬滅反應 (quenching reaction)，用DCM萃取，乾燥有機相，濃縮。殘餘物透過矽膠色譜法純化，得到化合物11-2 (1.1g, 76%)。LC-MS (ESI, m/z) : 630.31 (M+H)。

【0136】 步驟3: 合成中間體11-3

將化合物11-2 (700 mg, 1.11 mmol) 溶解在無水N,N-二甲基甲醯胺DMF (4 mL) 中，在氬氣環境下於室溫加入 N,N-二異丙基乙胺DIPEA (0.39 ml, 2.23 mmol) 以及4,4'-碳酸二硝基二苯酯(406 mg, 1.33 mmol)，然後將反應混合物在環境溫度下攪拌過夜。濃縮除去溶劑，獲得甲基三級丁基醚MTBE沉澱產物，過濾收集黃色固體，乙醚洗滌，乾燥得到化合物11-3。LC-MS (ESI, m/z) : 795.41 (M+H)。

【0137】 步驟4: 合成中間體11-4

將化合物11-3 (300 mg, 0.44 mmol)溶解於無水DMF (4 mL)中，加入乾燥的吡啶(1 mL)，然後加入甲磺酸依喜替康 (購自上海皓元生物醫藥科技有限公司, 234 mg, 0.44 mmol)及1-羥基苯並三唑HOBt (60mg, 0.44mmol)。將反應混合物在氬氣下於室溫攪拌過夜。產物透過pre-HPLC純化，得到中間體11-4 (230mg, 48%)。LC-MS (ESI, m/z) : 1091.53 (M+H)。

【0138】 步驟5: 合成中間體11-5

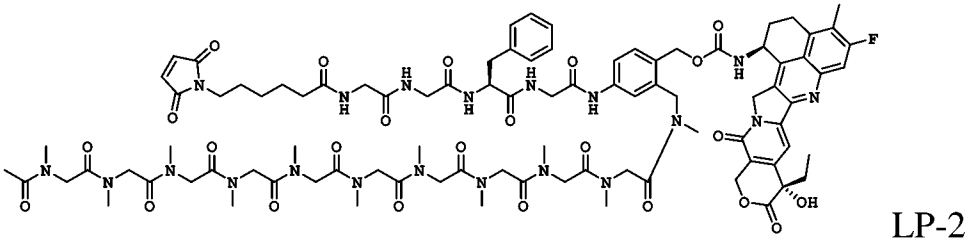
將化合物11-4 (200mg,0.183mmol) 溶於1mL無水DCM中，0°C加入300μL TFA (trifluoroacetic acid)，反應混合物室溫攪拌30min，濃縮除去溶劑，得到中間體11-5的TFA鹽，無需進一步純化即可用於下一步。LC-MS (ESI, m/z) : 991.47

(M+H)。

【0139】 步驟6: 合成化合物LP-1

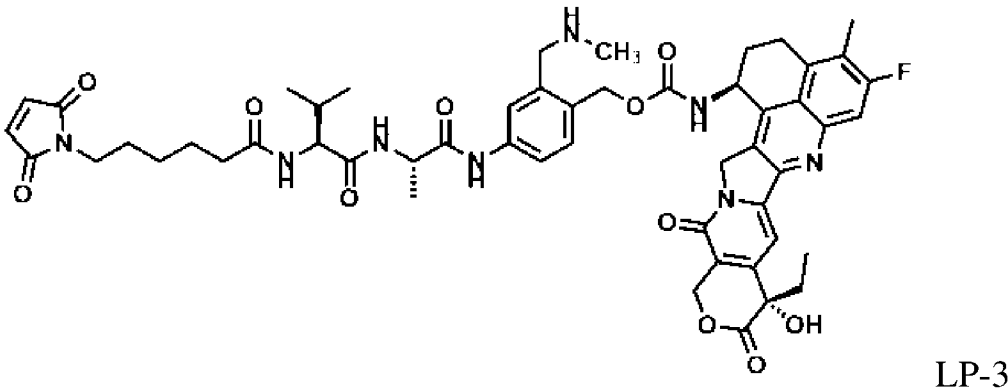
將化合物 11-5 (120 mg, 0.109 mmol) 溶解在 1mL 無水 DMF 中，加入 Ac-Sar10-COOH (N-Acetyl Decasarcosine，84 mg, 0.109 mmol)，然後加入 2-(7-氮雜苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 HATU (50 mg, 0.130 mmol) 及 DIPEA (38μL，0.22 mmol)，將反應混合物在室溫攪拌過夜，濃縮除去溶劑，粗產物透過製備型高效液相色譜 (pre-HPLC) 純化，得到化合物 LP-1 (74 mg，38%)。LC-MS (ESI，m/z)：1743.85 (M+H)。

【0140】 實施例2：製備化合物LP-2



化合物 LP-2 的合成按照化合物 LP-1 的步驟，將起始原料 11-1A 替換為 Mc-GGFG-OH（購自上海皓元生物醫藥科技有限公司，GGFG 表示由透過肽鍵連接的甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸組成的胺基酸序列），得到化合物 LP-2，為米色無定形固體。LC-MS (ESI, m/z): 1891.90 (M+H)。

【0141】 實施例3：製備化合物LP-3



化合物LP-3為LP-1的中間體，去除步驟6，中間體11-5即為LP-3。

【0142】 實施例4：抗體-藥物複合體的檢測方法

抗體-藥物複合體按照以下方法進行濃縮、換液、純化以及測量抗體濃度、計算每個抗體所攜帶的藥物分子的平均分子數以鑑別抗體-藥物複合體。

【0143】 操作A：抗體或抗體-藥物複合體的濃縮

取超濾管（Amicon Ultra，50000 MWCO，密理博公司），加入需要濃縮的抗體或者抗體-藥物複合體的溶液，離心至抗體或者抗體-藥物複合體溶液達到需要體積後取出。

【0144】 操作B：抗體濃度的測量

使用酶標儀（Multiskan GO, 賽默飛世爾公司），根據製造商定義的方法測量抗體的吸收值，該吸收值與抗體在該波長下的吸收係數的比值即為抗體的濃度。

【0145】 操作C：抗體的換液

根據製造商（賽默飛公司）提供的說明書，將zeba脫鹽柱（5mL, 40K MWCO）事先用含有氯化鈉（50 mM）及EDTA（2 mM）的磷酸鹽緩衝液（簡稱“PBS7.0/EDTA”，50 mM, pH 7.0）平衡。每個zeba脫鹽柱上樣2 mL，離心（1000g，4分鐘），收集流穿部分並透過操作A進行濃縮，透過操作B測定抗體濃度，用PBS7.0/EDTA對抗體濃度進行調整。

【0146】 操作D：抗體-藥物複合體的純化

根據製造商（賽默飛公司）提供的說明書，將zeba脫鹽柱（5mL, 40K MWCO）事先用存儲緩衝液進行平衡。存儲緩衝液使用含有150 mM氯化鈉的組胺酸-醋酸緩衝液（20 mM組胺酸，pH5.5）或含有50 mM氯化鈉的磷酸緩衝液（50 mM, pH

7.0)。將含有抗體-藥物複合體的反應液（大約2 mL）加入zeba脫鹽柱，離心（1000g，4分鐘）後收集流穿部分（大約2 mL），重複兩次洗脫過程，除去未結合的连接子-有效負載及包括還原劑的低分子量化合物。

【0147】 操作E：測量抗體-藥物複合體中抗體的濃度以及平均每個抗體上連接的藥物分子個數（DAR值） - （1）

抗體-藥物複合體上複合的藥物濃度可以透過測量抗體-藥物複合體水溶液在280 nm及370 nm下的紫外吸收值並透過下面的公式計算而得到。

【0148】 在任何給定的波長下，一個體系的總吸光度等於該系統中存在的所有吸光化學物質的吸光度之和（吸光度的可加和性）。因此，假設抗體與藥物在複合前後，抗體與藥物的莫耳吸收係數不變，則抗體-藥物複合體中的抗體濃度及藥物濃度可以用如下公式表示。

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A \quad \text{等式 (1)}$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370}C_D + \epsilon_{A,370}C_A \quad \text{等式(2)}$$

【0149】 A_{280} 代表抗體-藥物複合體水溶液在280 nm下的總吸收值， A_{370} 代表抗體-藥物複合體水溶液在370 nm下的總吸收值。 $A_{A,280}$ 代表抗體在280 nm下的吸收值， $A_{A,370}$ 代表抗體在370 nm下的吸收值， $A_{D,280}$ 代表結合前體（藥物）在280 nm下的吸收值， $A_{D,370}$ 代表結合前體在370 nm下的吸收值， $\epsilon_{A,280}$ 代表抗體在280 nm下的莫耳消光係數， $\epsilon_{A,370}$ 代表抗體在370 nm下的莫耳消光係數， $\epsilon_{D,280}$ 代表結合前體在280 nm下的莫耳消光係數， $\epsilon_{D,370}$ 代表結合前體在370 nm下的莫耳消光係數， C_A 代表抗體-藥物複合體中抗體的濃度， C_D 代表抗體-藥物複合體中藥物分子的濃度。

【0150】 在這種情況下， $\epsilon_{A,280}$ ， $\epsilon_{A,370}$ ， $\epsilon_{D,280}$ 及 $\epsilon_{D,370}$ 都是已知的數值（透過

抗體的序列計算得到或者化合物的UV吸收測量得到）。比如， $\epsilon_{A,280}$ 可以透過抗體的胺基酸序列利用一種已知的方法計算得到（蛋白質科學（Protein Science），1995年，第4卷，第2411-2423頁）。抗體在370 nm下通常沒有吸收，所以 $\epsilon_{A,370}$ 通常是0。 $\epsilon_{D,280}$ 及 $\epsilon_{D,370}$ 的值可以透過測量結合前體分別在280 nm及370 nm下吸光度隨濃度的變化值，利用朗伯-比爾定律（吸光度=莫耳濃度×莫耳消光係數×光程）計算得到。 C_A 及 C_D 可以透過測量抗體-藥物複合體在280 nm及370 nm下的吸光值 A_{280} 及 A_{370} ，然後解二元一次方程組等式（1）及（2）得到。另外，透過 C_D 除以 C_A ，可以得到平均每個抗體上連接的藥物分子的數量（DAR值）。

【0151】 操作F：平均每個抗體上連接的藥物分子個數（DAR值） - （2）

抗體-藥物複合體中每個抗體分子平均複合的藥物分子數，除前述“操作E”外，還可以採用液相色譜-質譜聯用(LC-MS)分析方法進行測定，如下：

高效液相色譜-質譜（LC-MS）分析樣品的製備（抗體-藥物複合體的還原）

向抗體-藥物複合體（大約5 mg/mL，6 μ L）中加入3 μ L 100 mM的還原劑二硫蘇糖醇（DTT）以及21 μ L的去離子水。反應液在37°C水浴鍋中溫育30分鐘，抗體-藥物複合體中輕重鏈間以及重鏈間的二硫鍵被完全打開，所得樣品可用於LC-MS檢測分析。

【0152】 高效液相色譜參數

色譜柱型號：Agilent PLRP-S, 1000 Å, 50 × 2.1 mm, 8 μ m

檢測波長：280 nm

波段寬度：4 nm

色譜柱溫度：80 °C

樣品盤溫度：5 °C

流速：0.5 mL/min

進樣體積：5μL

流動相A：0.05% TFA, H₂O

流動相B：0.05% TFA, ACN

洗脫程序 (B %：25%-34% (0-0.7分鐘), 34%-45% (0.7-5分鐘), 45%-90% (5-6分鐘), 90% (6-7分鐘), 90%-25% (7-7.10分鐘), 25% (7.10-10分鐘)

MS參數

霧化氣溫度：350 °C

霧化氣氣流：13L/min

噴霧器：45 psig

毛細管電壓：5000 V

碎裂電壓：350 V

質荷比範圍：500-8000 m/z

採集速率：1 spectra/s

【0153】數據分析

輕鏈複合*i*個藥物分子表示為Li，重鏈複合*i*個小分子表示為Hi，可以根據質譜的ESI掃描圖確定。

【0154】將各鏈的峰面積百分比（%）帶入到下式中可以得到修正後的峰面積比。

輕鏈複合*i*個藥物分子的峰面積比 = $100\% \times A_{Li}/(A_{L0} + A_{L1})$

重鏈複合*i*個藥物分子的峰面積比 = $100\% \times A_{Hi}/(A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3})$

【0155】每個抗體上平均複合的藥物分子的個數可以透過下面的公式進行

計算。

平均複合藥物分子數 = (L0峰面積比×0+L1峰面積比×1+H0峰面積比×0+H1峰面積比×1+H2峰面積比×2+H3峰面積比×3)×2

【0156】 操作G：平均每個抗體上連接的藥物分子個數（DAR值）-（3）

抗體-藥物複合體中每個抗體分子平均複合的藥物分子數，除了前面提到的“操作E”及“操作F”可以測量，還可以採用下述疏水層析色譜圖(HIC)分析方法進行測定。

【0157】 抗體-藥物複合體在疏水層析柱上的洗脫是基於洗脫液中鹽離子濃度的差異而分離的—隨著鹽離子濃度的降低，洗脫出的抗體-藥物複合體中小分子藥物的結合數目增多，既低DAR值的抗體-藥物複合體優先被洗脫。各組分的出峰順序依次為D0（未複合上任何連接子-有效負載的抗體）、D2（複合2個連接子-有效負載的抗體）、D4（複合4個連接子-有效負載的抗體）、D6（複合6個連接子-有效負載的抗體）、D8（複合8個連接子-有效負載的抗體）。可以透過測量各個峰的峰面積佔比來獲得各個組分的百分含量。則相應的樣品的HIC-DAR的計算方式如下：

平均複合藥物分子數 = D0峰面積比×0+D2峰面積比×2+D4峰面積比×4+D6峰面積比×6+D8峰面積比×8

【0158】 操作H: 抗體-藥物複合體中聚集體的測量

使用高效液相色譜中體積排阻色譜檢測抗體-藥物複合體中的聚集體，方法如下：

高效液相色譜系統：Agilent 1260 Infinity II HPLC system

檢測器：Ultraviolet absorption spectrometer (檢測波長：280 nm)

色譜柱型號: TOSOH TSKgel G3000SWXL (7.8×300 mm, 5 μm)

流動相：200 mmol/L KHPO₄, 150 mmol/L NaCl, 15% (v/v) 異丙醇, pH7.0

流速：0.75 mL/min

分析時間：18 min

柱溫：室溫

進樣量：50 μg

【0159】數據分析：

質控品（QC，02-1裸抗，即沒有複合連接子-有效負載的編號為02-1的抗體）的體積排阻色譜圖如圖1A所示；質控品（QC，Hu1H2-2裸抗，即沒有複合連接子-有效負載的編號為hu1H2-2的抗體）的體積排阻色譜圖如圖1B所示，Hu1H2-2裸抗的聚集體含量為1.17%。150 kDa的質控品的主峰（單峰）的保留時間在9.5-10.5分鐘之間。聚集體的保留時間應該早於上述單體的保留時間。

【0160】操作I：抗體-藥物複合體疏水性的比較

使用高效液相色譜疏水層析色譜法（HIC）分析抗體-藥物複合體的疏水性，方法如下：

高效液相色譜系統：Agilent 1260 Infinity II HPLC system

檢測器：Ultraviolet absorption spectrometer (檢測波長：280 nm)

色譜柱型號：TOSOH TSKgel Butyl-NPR (4.6 mm I.D. × 3.5 cm, 2.5μm)

流動相A：mol/L (NH₄)₂SO₄, 50 mmol/L KHPO₄, pH7.0

流動相B：50 mmol/L KHPO₄, 25% (v/v)異丙醇, pH7.0

分析時間：25 min

柱溫：室溫

洗脫程序 (B %) : 0%-25% (0-1分鐘), 25% (1-3分鐘), 25%-80% (3-13分鐘), 80% (13-17分鐘), 80%-0% (17-17.10分鐘), 0% (17.10-25分鐘)

進樣量 : 10 μ L

數據分析：質控品 (QC, 02-1裸抗) 的疏水層析色譜圖如圖2A所示。質控品 (QC, Hu1H2-2裸抗) 的疏水層析色譜圖如圖2B所示, 其保留時間為3.387 min。保留時間越短的樣品的疏水性越弱, 相比於未複合藥物分子的裸抗, 抗體-藥物複合體的疏水性更高, 因此其保留時間更長。

【0161】 實施例5：製備抗體-藥物複合體02-1-LP1(DAR 8)

抗體的還原：透過實施例4中操作B (抗體在280 nm下的消光係數採用1.523 mLmg⁻¹ cm⁻¹) 及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液, 換液後的抗體濃度為23.2 mg/mL。在2.155 mL的02-1抗體的水溶液中加入0.482 mL的5 mM的TCEP溶液 (相當於抗體含量的7倍當量), 同時加入4.31 mL的50 mM的磷酸鹽緩衝液 (pH7.0, PBS7.0) 以及69.47 μ L 200 mM的EDTA溶液。在確認溶液pH為7.0 $\pm$ 0.1後, 將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0162】 02-1抗體的VH序列為SEQ ID NO: 84所示的胺基酸序列, VL序列為SEQ ID NO: 85所示的胺基酸序列。出於實施例製備及/或檢測的目的, 02-1抗體的恆定區使用人IgG1恆定區序列, 重鏈恆定區序列選用SEQ ID NO: 102所示的胺基酸序列; 輕鏈恆定區序列選用SEQ ID NO: 103所示的胺基酸序列。

【0163】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C環境中培養10分鐘, 實施例1製備的連接子-有效負載LP-1溶解在N,N二甲基乙醯胺 (DMA) 後加入混合液中, 加入體積為0.489 mL (相當於抗體含量的14.2倍當量), 混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0164】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體02-1-LP1。

【0165】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=6384$ 及 $\epsilon_{D,370}=16180$ ），操作F，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0166】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為12.13mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為7.78。透過操作F測量得到每個抗體上平均複合的有效負載個數為7.80。圖3A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體02-1-LP1的聚集體含量為1.18%。圖3B示出抗體-藥物複合體02-1-LP1的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體02-1-LP1的保留時間為6.499 min。

【0167】 實施例6：製備抗體-藥物複合體Hu1H2-LP1（DAR 8）

抗體的還原：透過實施例4的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.54 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為9.37 mg/mL。在640.34 μL 的Hu1H2-2 (HIS1H2-2)抗體的水溶液中加入80 μL 的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的10倍當量），同時加入0.2 mL的50 mM的PBS7.0以及79.66 μL 的去離子水。在確認溶液PH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0168】 Hu1H2-2抗體的VH序列為SEQ ID NO: 100所示的胺基酸序列，VL序列為SEQ ID NO: 104所示的胺基酸序列。出於實施例製備及/或檢測的目的，Hu1H2-2 抗體的重鏈恆定區序列選用SEQ ID NO: 102所示的胺基酸序列；輕鏈恆定區序列選用SEQ ID NO: 103所示的胺基酸序列。

【0169】 抗體與連接子-有效負載之間的複合：將上述混合液置於4°C環境

中培養10分鐘，實施例1製備的连接子-有效負載LP-1溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為72 μL （相當於抗體含量的18倍當量），混合液於22°C環境中繼續反應30分鐘。

【0170】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1。

【0171】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4的操作E（ $\epsilon_{\text{D},280}=6384$ 及 $\epsilon_{\text{D},370}=16180$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0172】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為6.74 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為9.20。圖4A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的聚集體含量為1.24%。圖4B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的保留時間為6.239 min。

【0173】 實施例7：製備抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1（DAR 4）

抗體的還原：透過實施例4的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用1.54 $\text{mLmg}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為23 mg/mL。在456.52 μL 的Hu1H2-2抗體的水溶液中加入23.52 μL 的5 mM的TCEP溶液，同時加入0.28 mL的50 mM的PBS7.0以及639.96 μL 的去離子水。在確認溶液PH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0174】 抗體與连接子-有效負載之間的複合：將上述混合液置於4°C環境中培養10分鐘，實施例1製備的连接子-有效負載LP-1溶解在DMA 中後加入混合液中，加入體積為112 μL （相當於抗體含量的8倍當量），混合液於22°C環境中繼續反應30分鐘。

【0175】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4的操作E（ $\epsilon_{D,280}=6384$ 及 $\epsilon_{D,370}=16180$ ）及操作H對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0176】 製備得到的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1（DAR4）透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為6.14 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為3.59。圖5A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1（DAR4）的聚集體含量為0.44%。圖5B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的疏水層析檢測圖譜。

【0177】 實施例8：製備抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2（DAR 8）

抗體的還原：實施例8還原方法與實施例6中抗體的還原方法相同。實施例8中的Hu1H2-2抗體的胺基酸序列與實施例6中Hu1H2-2抗體的胺基酸序列相同。

【0178】 抗體與連接子-有效負載的複合：將抗體還原步驟中的混合液置於4°C環境中培養10分鐘，實施例2製備的連接子-有效負載LP-2溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為72 μ L（相當於抗體含量的18倍當量），混合液於22°C環境中繼續反應30分鐘

【0179】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2。

【0180】 抗體-藥物複合體的表徵：採用上述的操作E（ $\epsilon_{D,280}=5814$ 及 $\epsilon_{D,370}=14742$ ），操作F，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0181】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為6.64 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為9.92。圖6A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2的聚集體含量為1.37%。圖6B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2的疏水層析檢測圖譜，

透過操作I測量的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2的保留時間為6.561 min。

【0182】 實施例9：製備抗體-藥物複合體Hu029-LP3（DAR 8）

抗體的還原：透過實施例4的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.54 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為23.07 mg/mL。在325.10 μL 的Hu1H2-2抗體的水溶液中加入70 μL 的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的7倍當量），同時加入0.3 mL的50 mM的PBS7.0以及804.90 μL 的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0183】 Hu1H2-2 抗體的胺基酸序列與實施例6中Hu1H2-2 抗體的胺基酸序列相同。

【0184】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C環境中培養10分鐘，實施例3製備的連接子-有效負載LP-3溶解在DMA中後加入到混合液中，加入體積為90 μL （相當於抗體含量的18倍當量），混合液於22°C環境中繼續反應30分鐘。

【0185】 抗體-藥物複合體的純化：將上述的反應液採用操作D中描述的方法進行純化，最終獲得抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3。

【0186】 抗體-藥物複合體的表徵：採用上述的操作E（ $\epsilon_{D,280}=5186$ 及 $\epsilon_{D,370}=13688$ ），操作F，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0187】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為4.10 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為8.50。圖7A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3的聚集體含量為3.37%。圖7B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3的疏水層析檢測圖譜，

透過操作I測量的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3的保留時間為5.878min。

【0188】 對比例1：製備抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE (DAR 4)

抗體的還原：透過實施例4中的操作B(抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.523 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為31.6 mg/mL。在0.759 mL的02-1抗體的水溶液中加入0.076 mL的5 mM的TCEP溶液(相當於抗體含量的2.3倍當量)，同時加入0.48 mL的50 mM的PBS7.0以及1.084 mL的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。02-1抗體序列與實施例5中02-1抗體的序列相同。

【0189】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C環境中培養10分鐘，連接子-有效負載vc-MMAE (DC Chemicals, DC50025)溶解在DMA中後加入到混合液中，加入體積為0.322 mL (相當於抗體含量的7倍當量)，混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0190】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE。

【0191】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中的操作B，操作G，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0192】 透過操作B測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為9.71 mg/mL。圖8A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE的聚集體含量為2.74%。圖8B示出抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE的疏水層析檢測圖譜，透過操作G及操作I計算出抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE中每個抗體上平均複合的有效負載的個數為3.99 (HIC-DAR)。

【0193】 對比例2：製備抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE (DAR 4)

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.5 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為 12 mg/mL 。在 0.438 mL 的Rituximab抗體（購自上海旻凱生物科技有限公司）的水溶液中加入 0.015 mL 的 5 mM 的TCEP溶液（相當於抗體含量的2.2倍當量），同時加入 0.14 mL 的 50 mM 的PBS7.0以及 0.107 mL 的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於 37°C 環境中反應2小時。

【0194】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於 4°C 條件下培養10分鐘，連接子-有效負載vc-MMAE溶解在DMA後加入到混合液中，加入體積為 0.049 mL （相當於抗體含量的7倍當量），將混合液於 22°C 條件下繼續反應30分鐘。

【0195】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE。

【0196】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中的操作B，操作G，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0197】 透過操作B測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為 3.78 mg/mL 。圖9A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE的聚集體含量為 3.78% 。圖9B示出抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE的疏水層析檢測圖譜，透過操作G及操作I計算出抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE中每個抗體上平均複合的有效負載的個數為4.39（HIC-DAR）。

【0198】 對比例3：製備抗體-藥物複合體Rituximab-LP1 (DAR 8)

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 1.5

$\text{mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為11.8 mg/mL。在6.05 mL的Rituximab抗體的水溶液中加入0.667 mL的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的7倍當量），同時加入1.02 mL的100 mM的PBS7.0以及2.46 mL的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0199】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C條件下培養10分鐘，連接子-有效負載LP-1溶解在DMA後加入混合液中，加入體積為0.667 mL（相當於抗體含量的14倍當量），將混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0200】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體Rituximab-LP1。

【0201】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=6384$ 及 $\epsilon_{D,370}=16180$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0202】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為6.23 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為7.30。圖10A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Rituximab-LP1的聚集體含量為4.70%。圖10B示出抗體-藥物複合體Rituximab-LP1的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體Rituximab-LP1的保留時間為7.094 min。

【0203】 對比例4：製備抗體-藥物複合體人類IgG-GGFG-DXd（DAR 8）

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.35 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為10 mg/mL。在2.45 mL的人類IgG蛋白（購自北京索萊寶科技有限公司，產品號：SP001）的水溶液中加入0.327 mL的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的10倍

當量)，同時加入0.7 mL的50 mM的PBS7.0以及23 μ L的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0204】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C條件下培養10分鐘，連接子-有效負載GGFG-DXd(購自DC Chemicals, DC50025)溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為0.294 mL(相當於抗體含量的18倍當量)，將混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0205】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體人類IgG-GGFG-DXd(簡稱“Human IgG-DXD”)。人類IgG及HuIgG在本揭露中可互換使用。

【0206】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E($\epsilon_{D,280}=5178$ 及 $\epsilon_{D,370}=20217$)，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0207】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為8.20 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為7.08。圖11A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體人類IgG-DXD的聚集體含量為4.25%。圖11B示出抗體-藥物複合體人類IgG-DXD的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體人類IgG-DXD的保留時間為8.222 min。

【0208】 對比例5：製備抗體-藥物複合體人類IgG-LP1 (DAR 8)

抗體的還原：透過實施例4中的操作B(抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.35 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為10 mg/mL。在1.33 mL的人類IgG蛋白(購自北京索萊寶科技有限公司，產品號：SP001)的水溶液中加入0.267 mL的5 mM的TCEP溶液(相當於抗體含量的10倍當量)，同時加入0.4 mL的50 mM的PBS7.0。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混

合液置於37°C環境中反應2小時。

【0209】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C條件下培養10分鐘，連接子-有效負載LP-1溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為0.2 mL（相當於抗體含量的15倍當量），將混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0210】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體人類IgG-LP1。

【0211】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=6384$ 及 $\epsilon_{D,370}=16180$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0212】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為11.08 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為9.15。圖12A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的聚集體含量為4.38%。圖12B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的保留時間為6.213 min。

【0213】 對比例6：製備抗體-藥物複合體人類IgG-LP1（DAR 4）

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.35 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為15 mg/mL。在0.7 mL的人類IgG蛋白（購自北京索萊寶科技有限公司，產品號：SP001）的水溶液中加入34.02 μL 的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的2.43倍當量），同時加入0.28 mL的50 mM的PBS7.0。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0214】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C條件下培養

10分鐘，連接子-有效負載LP-1溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為0.112 mL（相當於抗體含量的8倍當量），將混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0215】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體人類IgG-LP1（DAR4）。

【0216】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=6384$ 及 $\epsilon_{D,370}=16180$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0217】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為5.75 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為3.53。圖13A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體人類IgG-LP1（DAR4）的聚集體含量為1.90%。圖13B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP1（DAR4）的疏水層析檢測圖譜。

【0218】 對比例7：製備抗體-藥物複合體人類IgG-LP2（DAR 8）

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.35 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為10 mg/mL。在0.467 mL的人IgG蛋白（購自北京索萊寶科技有限公司，產品號：SP001）的水溶液中加入0.093 mL的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的10倍當量），同時加入0.2 mL的50 mM的PBS7.0以及0.24 mL的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0219】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C條件下培養10分鐘，連接子-有效負載LP-2溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為0.07 mL（相當於抗體含量的15倍當量），將混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0220】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D

的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體人類IgG-LP2。

【0221】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=5814$ 及 $\epsilon_{D,370}=14742$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0222】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為4.68 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為9.18。圖14A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體人類IgG-LP2的聚集體含量為2.92%。圖14B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP2的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體人類IgG-LP2的保留時間為6.506 min。

【0223】 對比例8：製備抗體-藥物複合體人類IgG-LP3（DAR 8）

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.35 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為18 mg/mL。在4 mL的人IgG蛋白（購自北京索萊寶科技有限公司，產品號：SP001）的水溶液中加入0.672 mL的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的7倍當量），同時加入1.44 mL的50 mM的PBS7.0以及1.088 mL的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。人IgG1蛋白的來源與對比例4中人IgG蛋白的來源相同。

【0224】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C條件下培養10分鐘，連接子-有效負載LP-3溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為0.672 mL（相當於抗體含量的14倍當量），將混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0225】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體人類IgG-LP3。

【0226】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=5186$ 及

$\epsilon_{D,370}=13688$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0227】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為7.42 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為7.28。圖15A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體人類IgG-LP3的聚集體含量為5.37%。圖15B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP3的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體人類IgG-LP3的保留時間為6.450 min。

【0228】 對比例9：製備抗體-藥物複合體Hu1H2-2-GGFG-DXD (DAR 8)

抗體的還原：對比例9中抗體的還原方法與實施例6中相同。Hu1H2-2抗體的序列與實施例6中Hu1H2-2抗體的序列相同。

【0229】 抗體與藥物連接子之間的複合：將上述混合液置於4°C上培養10分鐘。連接子-有效負載GGFG-DXd溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為72 μ L（相當於抗體含量的18倍當量）。將混合液放置於22°C環境中繼續反應30分鐘。

【0230】 抗體-藥物複合體的純化：將上述的反應液採用操作D中描述的方法進行純化，最終獲得抗體-藥物複合體Hu1H2-2-GGFG-DXd（簡稱“Hu1H2-2-DXD”）。

【0231】 抗體-藥物複合體的表徵：採用上述的操作E（ $\epsilon_{D,280}=5178$ 及 $\epsilon_{D,370}=20217$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0232】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為6.53mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為6.75。透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Hu1H2-2-DXD的聚集體含量為1.70%，如圖16A所示。透過操作I測量的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-DXD的保留時間為7.764

min，如圖16B所示。

【0233】 試驗例1：高表現MUC18的腫瘤細胞對02-1-LP1的內吞

將50 µg/mL 02-1-LP1分別與A375細胞（購自中國科學院上海生命科學研究院）、HMOVII細胞（購自Biovector NTCC典型培養物保藏中心）、SK-MEL-2細胞（購自上海勳慶生物科技有限公司）及GAK細胞（購自Biovector NTCC典型培養物保藏中心）結合，洗去多餘的ADC後，將細胞放在37°C培養箱中培養。在0, 0.5, 1, 2, 4, 8小時時，利用流式實驗檢測中位螢光強度（MFI）。如圖17所示，02-1-LP1能夠被A375 (A)，HMOVII (B)，SK-MEL-2 (C)，GAK (D)細胞內吞。

【0234】 試驗例2：A375移植瘤的體內抑制效果及小鼠體重變化的影響

6週齡的Balb/c小鼠購買自江蘇集萃藥康生物科技股份有限公司，每隻小鼠皮下接種四百萬A375細胞構建MUC18陽性的A375黑色素瘤小鼠移植瘤模型。在接種後第24天（平均腫瘤體積約230mm³），分別靜脈注射對比例2製備的Rituximab-vc-MMAE（6 mpk (mg/kg)）；對比例1製備的02-1-vc-MMAE（1.5, 3, 6 mpk）；對比例3製備的Rituximab-LP1（2.5, 5 mpk）以及實施例5製備的02-1-LP1（2.5, 5 mpk）；並設置溶媒組（載體組）作為陰性對照。給藥後利用游標卡尺每週測量兩次腫瘤體積，並按照如下公式計算腫瘤體積： $TV=(長 \times 寬)^2/2$ 。由於A375細胞幾乎不表現CD20，此時Rituximab作為02-1抗體的同型對照。

【0235】 圖18A1及18A2顯示了靶向MUC18的抗體-藥物複合體02-1-LP1及02-1-vc-MMAE對於A375移植瘤的生長抑制作用。圖18A1顯示，02-1-vc-MMAE降低了腫瘤生長速度；而02-1-LP1引起了腫瘤體積明顯消除。圖18A2為圖18A1的局部圖，示出02-1-LP1、02-1-vc-MMAE及載體組的曲線，以使活性成分的趨勢圖更清晰。

【0236】 圖18B1及18B2顯示靶向MUC18的抗體-藥物複合體02-1-LP1及02-1-vc-MMAE未對小鼠體重造成明顯影響。圖18B2為18B1的局部圖，示出02-1-LP1、02-1-vc-MMAE及載體組的曲線，以使活性成分的趨勢圖更清晰。

【0237】 試驗例3：02-1-LP1及02-1-vc-MMAE 對於食蟹猴的毒理實驗

02-1-LP1（實施例5製備）食蟹猴重複給藥實驗：6隻食蟹猴（購自廣西前沿生物技術有限公司）被隨機分為3組，每組雌雄各一隻。在第1天，第22天及第43天，分別靜脈輸注溶媒、10 mg/kg 02-1-LP1及30 mg/kg 02-1-LP1。在實驗期間，觀察動物是否有任何異常；並採集血樣進行血液學以及血液生化指標分析。在第50天，對動物進行安樂死並取樣進行病理分析。如表6所示，在本實驗中，所有劑量的供試物都沒有引起動物死亡，供試物相關的靶器官為網織紅血球（reticulocyte）、消化道、腎及脾。未見嚴重毒性最大劑量（highest non-severely toxic dose, HNSTD）為30 mg/kg。

【0238】 02-1-vc-MMAE（對比例1製備）食蟹猴重複給藥實驗：6隻食蟹猴被隨機分為3組，每組雌雄各一隻。在第1天，第22天分別靜脈輸注3 mg/kg 02-1-vc-MMAE、6mg/kg 02-1-vc-MMAE及10 mg/kg 02-1-vc-MMAE。在實驗期間，觀察動物是否有任何異常；並採集血樣進行血液學以及血液生化指標分析。在第43天，對動物進行安樂死並取樣進行病理分析。如表6所示，在本實驗中，高劑量組（10 mg/kg）的兩隻動物在第一次給藥後第10天死亡，3 mg/kg及6 mg/kg兩個組的動物未出現死亡，供試物相關的靶器官為網織紅血球、白血球及皮膚。HNSTD（未見嚴重毒性最大劑量）為6 mg/kg。

表6. 02-1-LP1及02-1-vc-MMAE在食蟹猴重複給藥毒理實驗結果匯總

實驗動物	食蟹猴	食蟹猴
------	-----	-----

受試物	02-1-vc-MMAE 3, 6 及10 mg/kg 靜脈注射 第1天及第22天給藥(共2次)	02-1-LP1 0, 10 及30 mg/kg 靜脈注射 第1天， 第22天及第43天給藥 (共3次)
動物數量	每組雌雄各一隻	每組雌雄各一隻
至死劑量	10 mg/kg	> 30 mg/kg
體重變化	ADC未引起動物體重變化	ADC未引起動物體重變化
血液學指標	3 mg/kg: 網織紅血球輕微增加 6 mg/kg: 白血球、血紅蛋白輕微 降低; 網織紅血球數量波動	≥10 mg/kg: 網織紅血球數量波 動
血液生化	≤6 mg/kg: 正常	≤30 mg/kg: 正常
HNSTD劑量	6 mg/kg: 胸骨骨髓	
時靶向毒性 器官	10 mg/kg: 消化道，腹股溝淋巴 結及皮膚	30 mg/kg: 消化道器官、腎及脾
HNSTD*	6 mg/kg	30 mg/kg

HNSTD*:未見嚴重毒性最大劑量

【0239】 結果表明，實施例5製備的02-1-LP1的安全性明顯優於對比例1製備的02-1-vc-MMAE。

【0240】 結合試驗例2可知，02-1-LP1比02-1-vc-MMAE的耐受劑量更高，安全性更好；同時更低劑量的02-1-LP1就能達到更好的抗腫瘤效果。

【0241】 試驗例4：ADC對Detroit562細胞的體外殺傷實驗

培養Detroit562細胞（購自南科佰生物技術有限公司）使細胞密度達到80%，收集細胞，鋪96孔板，調整細胞密度至 $2-5 \times 10^4$ /ml。每孔鋪100 μL，ADC分子以300nM為起始濃度進行3倍梯度稀釋，稀釋完成後將ADC分子加入細胞培養液中，靜置培養5天，期間定期觀察細胞凋亡情況。5天後，向96孔板中加入15μL

CCK-8套組原液，37°C培養箱反應0.5-2h，測量450nm處吸光度，根據光密度OD(optical density) 讀數值以及ADC稀釋梯度繪製細胞存活曲線。

【0242】 ADC分子選用對比例4製備的人類IgG-DXD,對比例5製備的人類IgG-LP1，對比例7製備的人類IgG-LP2,實施例6製備的Hu1H2-2-LP1，實施例8製備的Hu1H2-2-LP2及對比例9製備的Hu1H2-2-DXD。其中，人類IgG作為Hu1H2-2抗體的同型對照；DXD作為陽性藥物。

【0243】 圖19示出上述ADC分子對頭頸部鱗癌細胞系Detroit562的體外殺傷作用，圖19A1及圖19A2為圖19的局部圖。圖19A1表明，及陽性對照Hu1H2-2-DXD相比，本揭露的Hu1H2-2-LP2以及Hu1H2-2-LP1對Detroit562的體外殺傷作用更為優秀。圖19A2顯示，人類IgG-LP2及人類IgG-LP1具有比人類IgG-DXD更優秀的體外殺傷作用，表明相較GGFG-DXd，連接子-有效負載LP-1及LP-2對Detroit562的體外殺傷作用更為優秀。

【0244】 試驗例5：ADC對於Detroit562構建的CDX小鼠模型體內藥效及小鼠體重變化的影響

6週齡的Balb/c裸鼠購買自江蘇集萃藥康生物科技股份有限公司。每隻小鼠皮下接種五百萬Detroit562細胞構建細胞來源的異種移植物（cell derived xenograft, CDX）小鼠模型，在接種後第10天（平均腫瘤體積約 150mm^3 ），分別靜脈注射對比例5製備的人類IgG-LP1(10 mg/kg)；實施例6製備的Hu1H2-2-LP1(10 mg/kg)；實施例8製備的Hu1H2-2-LP2(10 mg/kg)。給藥之後利用游標卡尺每週測量兩次腫瘤體積，並按照如下公式計算腫瘤體積： $\text{TV}=(\text{長}\times\text{寬})^2/2$ 。

【0245】 圖20顯示Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP2以及人類IgG-LP1對

Detroit562細胞構建的頭頸部鱗癌模型小鼠的體內藥效數據。結果表明，Hu1H2-2-LP1及Hu1H2-2-LP2可以有效抑制小鼠腫瘤增長。

【0246】圖21顯示Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP2以及人類IgG-LP1對於小鼠體重的影響。在實驗週期內，Hu1H2-2-LP1組及Hu1H2-2-LP2組的小鼠體重持續上升；而對照組人類IgG-LP1體重存在波動變化，結果表明，Hu1H2-2-LP1及Hu1H2-2-LP2對小鼠體重變化的影響比較小。

【0247】試驗例6：ADC對於PC-9構建的CDX小鼠模型體內藥效及小鼠體重變化的影響

6週齡的Balb/c裸鼠購買自江蘇集萃藥康生物科技股份有限公司。每隻小鼠皮下接種五百萬PC-9細胞（購自浙江美森細胞科技有限公司）以得到CDX模型。在接種後第13天（平均腫瘤體積約 200mm^3 ），分別靜脈注射對比例5製備的人類IgG-LP1,對比例6製備的人類IgG-LP1（DAR4），對比例8製備的人類IgG-LP3，實施例6製備的Hu1H2-2-LP1；實施例7製備的Hu1H2-2-LP1(DAR4)，實施例9製備的Hu1H2-2-LP3。給藥劑量均為 $10\text{ mpk}(\text{mg/kg})$ ，每週1次，給藥2次（ $\text{QW}\times 2$ ）。給藥之後利用游標卡尺每週測量兩次腫瘤體積，並按照如下公式計算腫瘤體積： $\text{TV}=(\text{長}\times\text{寬})^2/2$ 。

【0248】圖22顯示上述ADC對於PC-9細胞構建的肺癌模型小鼠的體內藥效數據。結果表明，Hu1H2-2-LP1、Hu1H2-2-LP1(DAR4)及Hu1H2-2-LP3可以有效抑制小鼠腫瘤的增長。

【0249】圖 23顯示上述ADC對於PC-9細胞構建的肺癌模型小鼠體重的影響。結果表明Hu1H2-2-LP1、Hu1H2-2-LP1(DAR4)及Hu1H2-2-LP3對小鼠體重影響不大，無明顯的消化道毒性作用。

【0250】 試驗例7：對SCC-9人頭頸部鱗狀細胞癌CDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

6週齡Balb/c裸鼠購自上海必凱科翼生物科技有限公司。每隻小鼠皮下接種800萬個SCC-9細胞（購自ATCC）以獲得CDX模型。在接種後第29天（平均腫瘤體積約為 200mm^3 ），分別靜脈注射對比例3中製備的Rituximab-LP1(10mpk)及實施例5中制得的02-1-LP1 (2.5, 5, 10 mpk)。DPBS（Dulbecco磷酸鹽緩衝鹽水）為陰性對照。每週給藥1次，共2次（QW×2）。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積： $TV = (\text{長} \times \text{寬})^2 / 2$ 。

【0251】 圖24A顯示02-1-LP1在SCC-9 CDX模型中可以有效抑制腫瘤生長。圖24B顯示02-1-LP1對SCC-9模型小鼠的體重幾乎沒有影響。

【0252】 試驗例8：對Huh-7人癌症CDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

6週齡Balb/c裸鼠購自上海必凱科翼生物科技有限公司。每隻小鼠皮下接種500萬Huh-7細胞（購自上海生物基因生物技術有限公司），獲得CDX模型。在接種後第9天（平均腫瘤體積約為 230mm^3 ），分別靜脈注射對比例5中製備的人IgG-LP1及實施例5中製成的02-1-LP1。給藥劑量均為10mpk，每週1次，共2次（QW×2）。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積： $TV = (\text{長} \times \text{寬})^2 / 2$ 。

【0253】 圖25A顯示02-1-LP1可以有效抑制Huh-7 CDX模型中的腫瘤生長。圖25B顯示02-1-LP1對Huh-7模型中小鼠的體重幾乎沒有影響。

【0254】 試驗例9：對LD1-0015-200617人食管鱗狀細胞癌PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

LD1-0015-200617 (LideBiotech CO., LTD) 是表現人MUC18 (H-Score = 75) 的人食管鱗狀細胞癌患者來源的異種移植物模型。6-8週Nu/Nu小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將LD1-0015-200617的腫瘤切成約3mm×3mm×3mm的片段，並皮下植入小鼠的側腹 (flank)。在植入後第39天 (平均腫瘤大小~171mm³)，分別靜脈注射對比例5中製備的人類IgG-LP1及實施例5中製備的02-1-LP1。給藥劑量均為10mpk，每週1次，共3次 (QW×3)。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積：TV= (長×寬)²/2。

【0255】圖26A顯示02-1-LP1在LD1-0015-200617 PDX模型中可以有效抑制腫瘤生長。圖26B顯示，在LD1-0015-200617 PDX模型中，02-1-LP1對小鼠體重幾乎沒有影響。

【0256】試驗例10：對LD1-0016-390730人食管腺癌PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

LD1-0016-390730 (LideBiotech CO., LTD) 是表現人MUC18 (H-Score = 115) 的人食管腺癌患者來源的異種移植物模型。6-8週Nu/Nu小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將LD1-0016-390730的腫瘤切成約3mm×3mm×3mm的片段，並皮下植入小鼠的側腹。在植入後第45天 (平均腫瘤大小~191 mm³)，靜脈注射實施例5中製備的02-1-LP1。給藥劑量為10mpk，每週1次，共2次 (QW×2)。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積：TV= (長×寬)²/2。

【0257】圖27A顯示02-1-LP1在LD1-0016-390730 PDX模型中可以有效抑制腫瘤生長。圖27B顯示，在LD1-0016-390730 PDX模型中，02-1-LP1對小鼠體

重幾乎沒有影響。

【0258】 試驗例11:LD1-2025-362797人小細胞肺癌癌症PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

LD1-2025-362797(LideBiotech CO., LTD)是表現人MUC18(H-Score = 110)的人小細胞肺癌患者來源的異種移植物模型。6-8週Nu/Nu小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將LD1-2025-362797的腫瘤切成約3mm×3mm×3mm的片段，並皮下植入小鼠的側腹。在植入後第21天（平均腫瘤大小~144mm³），靜脈注射第一劑量的實施例5中製備的10mpk 02-1-LP1。當腫瘤體積恢復到約700mm³時（第一次給藥後第49天），靜脈注射10mpk 02-1-LP1的第二次給藥。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積： $TV = (長 \times 寬)^2 / 2$ 。

【0259】 圖28A顯示，在LD1-2025-362797 PDX模型中，02-1-LP1可以有效抑制腫瘤生長。值得注意的是，在第二劑02-1-LP1後，腫瘤再次減少，表明02-1-LP1對再生腫瘤仍然具有活性。圖28B顯示，在LD1-2025-362797 PDX模型中，02-1-LP1對小鼠體重幾乎沒有影響。

【0260】 試驗例12：對LD1-2009-362263人三陰乳腺癌PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

LD1-2009-362263(LideBiotech CO., LTD)是表現人MUC18(H-Score = 240)的人三陰性乳腺癌症患者來源的異種移植物模型。6-8週Nu/Nu小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將LD1-2025-362797的腫瘤切成約3mm×3mm×3mm的片段，並皮下植入小鼠的側腹。植入後第49天（平均腫瘤大小~152mm³），靜脈注射實施例5中製備的02-1-LP1。給藥劑量為10mpk，每週1

次，共2次（QW×2）。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積： $TV = (\text{長} \times \text{寬})^2 / 2$ 。

【0261】圖29A顯示02-1-LP1在LD1-2009-362263 PDX模型中可以有效抑制腫瘤生長。圖29B顯示，在LD1-2009-362263 PDX模型中，02-1-LP1對小鼠體重幾乎沒有影響。

【0262】試驗例13：對LD1-0060-200770人膽管癌PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

LD1-0060-200770（LideBiotech CO.，LTD）是表現人MUC18（H-Score = 15）的人膽管癌患者來源的異種移植物模型。6-8週Nu/Nu小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將LD1-0060-200770的腫瘤切成約3mm×3mm×3mm的片段，並皮下植入小鼠的側腹。在植入後第42天（平均腫瘤大小~155mm³），靜脈注射實施例5中製備的02-1-LP1。給藥劑量為10mpk，每週1次，共2次（QW×2）。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積： $TV = (\text{長} \times \text{寬})^2 / 2$ 。

【0263】圖30A顯示02-1-LP1在LD1-0060-200770 PDX模型中可以有效抑制腫瘤生長。圖30B顯示02-1-LP1對LD1-0060-200770 PDX模型中小鼠的體重幾乎沒有影響。

【0264】試驗例14：對OV-10-0073人卵巢癌症PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

OV-10-0073（藥明康德（上海）有限公司）是一種表現人MUC18（H-Score = 40）的人卵巢癌症患者來源的異種移植物模型。6-8週小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將OV-10-0073的腫瘤切成約30mm³的片段，並皮下植

入小鼠的側腹。在植入後第34天（平均腫瘤大小~185mm³），分別靜脈注射單劑量的對比例5中製備的人類IgG-LP1（2.5，5mpk）及實施例5中備的02-1-LP1（1.25，2.5，5mpk）。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積：TV=（長×寬）²/2。

【0265】圖31A顯示02-1-LP1可以有效抑制OV-10-0073 PDX模型中的腫瘤生長。圖31B顯示02-1-LP1對OV-10-0073 PDX模型中小鼠的體重幾乎沒有影響。

【0266】由上述實驗結果可知，本揭露提供的ADC中，連接子與依喜替康鍵合後，透過簡單的化學方法與靶向MUC18或CD44v7/8的抗體複合。與傳統的隨機複合方式相比，應用這種連接子得到的抗MUC18或CD44v7/8抗體-藥物複合體的DAR值更高（DAR8）。透過HIC檢測顯本揭露的ADC色譜峰較連接子-有效負載為vc-MMAE或GGFG-DXd的色譜峰更窄，提示生成的產品均一性及親水性好。與傳統的vc-MMAE及GGFG-DXd複合體相比，此公開複合體的體外腫瘤細胞增殖抑制活性在生物學活性及安全性方面改善或維持。

【0267】本揭露中製備的ADC具有特異性MUC18或CD44v7/8依賴性抗腫瘤活性，並且對具有高表現MUC18或者CD44v7/8的腫瘤細胞具有極高的殺傷活性。本揭露中製備的具有MUC18特異性的ADC具有增加的HNSTD，表明安全性提高並且毒性及副作用減少。令人驚訝的是，試驗例9-14的結果還顯示，本揭露中製備的具有MUC18特異性的ADC對具有不同MUC18表現水平（低、中、高）的腫瘤細胞顯示出優異的殺傷活性。

【0268】本揭露製備的ADC具有較複合vc-MMAE或GGFG-DXd的ADC具有更為優異的體內抗腫瘤藥效，同時在安全性方面表現出明顯優於vc-MMAE的ADC，並與GGFG-DXd ADC具有相似的MTD（maximum tolerated dose）（Yusuke

Ogitani Clin, et al., Cancer Res. 2016 Oct 15;22(20):5097-5108.)。預期該藥物複合體將比現有臨床分子vc-MMAE或GGFG-DXd具有更高的治療窗口。

【0269】本揭露提供的ADC在體外具有更好的穩定性，並且在製備過程中的聚集體減少。具有式I連接體的ADC在血漿中具有更好的穩定性，預計ADC在體內可能具有更好的藥物代謝特性，例如更長的半衰期、較低量的游離小分子毒素等。

【符號說明】

無。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3"
fileName="5370-P230241300-TW_Sequence Listing.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.3.0" productionDate="2024-01-31">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>112139754</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-10-18</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>5370-P230241300-TW</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>CN</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>PCT/CN2022/126273</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-10-19</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">中國商普眾發現醫藥科技（上海）有限公司
</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>MULTITUDE THERAPEUTICS INC.</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="en">ANTIBODY-DRUG CONJUGATE, PREPARATION METHOD
AND USE THEREOF</InventionTitle>
  <InventionTitle languageCode="zh">抗體-藥物複合體及其製備方法與用途
</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>104</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```

    <INSDQualifier id="q2">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GYSITSGYS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q3">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GFTFTGY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q4">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GYTFTEYA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q5">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GYTFTDYN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q6">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GFTFSTYG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q7">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GFTFNYYG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 7" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GYSITSGFY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
  <INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q9">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GYSITSDYA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q10">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GYTFTDYS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql1">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GYTFTSYD</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```
<INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql2">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MHYSATP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql3">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>IHYSTTT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql4">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>IYPGNVNT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>IYPGNVNT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<INSDQualifier id="q15">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ITAYSGDA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q16">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>INPNNGGT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql7">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>INPNNGAT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
```

```

    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>INSRASYT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql9">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>INRGGSYT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q20">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>INFGGTN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q21">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ITYSGST</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q22">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>INTETGEP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="22">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q23">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>IFPGDGST</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 23" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q24">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SRSLNWDVLDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 24" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```
<INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q25">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ARSGYFASSYEFAY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q26">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ARGLGRPNYGMDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 26" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q27">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ARSGYDDYYAFDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 27" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ARSGYDDYYAFDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<INSDQualifier id="q28">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ARSGYDNYALDY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q29">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>TRSGYDDYYALDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q30">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ARHRRDWSYYAMDY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q31">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ARGGNDGGFTY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 31">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q32">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ARRIRRRTGDWYFDV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 32">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q33">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>VSYDYDAVS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="33">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q34">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ARYHFFDN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
  <INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q35">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>KSVRTSGYNY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q36">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>KSVRTSGYSY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 36" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q37">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ENIYSY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 37" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```
<INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q38">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSLNSRYQKNY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="38">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q39">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SSVGY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 39" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q40">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>STVGY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 40" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>STVGY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<INSDQualifier id="q41">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSVLYNSNQKNY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q42">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>RSVLYNSNQKNY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="42">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q43">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SSVSSTY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="43">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q44">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QNLLNSVNQKNF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 44">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q45">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QYVGAA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 45">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q46">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>KSLLYKDGKTY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="46">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q47">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QHSREFPFT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="47">
  <INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q48">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QHTREFPFT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 48">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q49">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QHHYGTPLT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 49" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q50">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QQHYGTPFT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 50" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```
<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q51">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HQWSSYPST</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="51">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q52">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>HQWSSYPCT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 52" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q53">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>HQWSNYPST</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 53" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>HQWSNYPST</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<INSDQualifier id="q54">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HQYLSSWT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="54">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q55">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>HQWSGYPT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="55">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q56">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QNDYIYPYT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="56">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q57">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQYGNRYRT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 57">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q58">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQLVEYPYT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 58">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q59">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DVQLQESGPDLVKPYQSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWLGVMHYSATPNYNP
SLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCSRSLNWDVLDYWGQGTTLIVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="59">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q60">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DIVLTQSPAYLPVSLGQRATISCRASKSVRTSGYNYLHWYQQKPGQPPKLLIYLASNPESGV
PGRFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDSATYYCQHSREFPFTFGGGTQLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber=" 60">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q61">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWMGYIHYSTTTNYP
    SLKSRISITRDTSKNQFFLQLSSVTTEDTATYFCRSLNWDVLDYWGQGTTLIVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 61">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<INSDQualifier id="q62">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVLTQSPAYLPVSLGQRATISCRASKSVRTSGYSYLHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGV
PDRFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHTREFPFTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 62">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>121</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..121</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q63">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGFTFTGYLHWLQKRPQGQLEWIGWIYPGNVNTEFNE
KFKGQATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSGYFASSYEFAYWGQGLVTVSA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 63">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q64">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRF
SVSGSGTHFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGTPLTFGAGTKLELK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="64">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q65">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQQSGAELLRPGVSVKISCKGSGYTFTEYAMHWVKQSHAKSLEWIGVITAYSGDAFYNL
KFKGKATVTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARGLRPNYGM DYWGQGTSTVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 65">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q66">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNLSRYQKNYLAWYQQKPGQSPKLLLYFASTRES
GVPDRFIGSGSGTDFLTITSSVQAEDLADYFCQQHYGTPFTFGSGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 66">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q67">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNIDWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTLYNQ
KFKAKATMTVDKSSSTAYMELRSLTSDDTAVYYCARSGYDDYYAFDYWGQGTSTVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="67">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q68">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVLTQSPA IMSAFLGEKITLTCSASSSVGYLHWYQQKSGTSPKLLIYSTSNVASGVPSRFS
GSGSGTFYSLKISSVEAEDAADYYCHQWSSYPSTFGAGTRLELK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 68" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q69">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>EVLLQQSGPELVQPGTSVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTLYNQ
KFKGKATLSVDKSSSTAYMELRSLTSEDAAVYYCARSGYDNYYALDYWGQGTSVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 69" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q70">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIVLTQSPPIMSASLGEEITLTCSASSTVGYMHWFQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFS
GSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSSYPCTFGAGTKLELK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="70">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q71">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGATLYNQ
NFRGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED TAVYYCTRSGYDDYYALDYWGQGTSTVTVSS</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="71">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q72">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QTVLTQSPA IMSASLGEEITLTCSASSSVGYMHWYQQKSGTSPKLLIYSTSNLASGVPSRFS
    GRGSGTFYSLTISTVEAEDAADYYCHQWSNYPSTFGTGTKLELK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="72">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q73">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGDLVRPGGSLKLSCAASGFTFSTYGMSWVRQSPDKRLEWVATINSRASYTTYPD
SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSED TGLYFCARHRRDWDSYYAMDYWGQGTSTVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="73">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q74">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>NIMLTQSPSSLAVSTGDKVTMNCKSSQSVLYNSNQKNYLAWYQQKPGQSPTLLIYWASTSES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLSSWTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="74">
```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q75">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>AVQLVESGGDLLRPGGSLKLSCVASGFTFNNGMSWVRQTPDKRLEWVATINRGGSYTTYTD
  SVKGRFTISRDNAKKTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHRRDWDSYYAMDYWGQGTSTTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="75">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q76">
```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>NIMMTQSPSSLAVSAGDKVAMSCKSSRSVLNSNQKNYLAWYQLKPGQSPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLSSWTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="76">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q77">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGFYWNWIRQLPGNKLEWLGYNIFGGTNYNP
SLKIRGSITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARGGNDGGFTYWGGTLTVTSA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="77">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q78">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ENVLTQSPAIVAASLGQKVTMTCRASSSVSSTYFHWYQQKSGASPKPLLHRTSNLASGVPAR
FSGSGSGTSYSLTISSEVAEDDATYYCHQWSGYPTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="78">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q79">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DVQLQESGGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWHWIRQCPGNKLEWMAYITYSGSTSYNP
SLKGRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDSATYYCARRIRRTGDWYFDVWGAGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 79" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q80">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DIVMTQSPSSLTVTAGEKATMSCKSSQNLLNSVNQKNFLTWYQQKPGQPPELLIYWASARES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYIYPYTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 80" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>117</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..117</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q81">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGYTFDYSMHVVKQAPRKGLKWMGWINTETGEPTYAD
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLRNEDTATYFCVSYDYDAVSYWGQGLTVTVSA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="81">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q82">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQYVGA AVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRF
TGSGSGTDFTLTINNVSQEDLADYFCQQYGNRYRTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 82" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>115</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..115</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q83">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTDYNE
KFKGKATLTLDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARYHFFDNWGQGTTLTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 83" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q84">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVITQDELSNPVTSGESVSI SCRSSKSLLYKDGKTYLSWFLQRPQGSPQLLIYLMSTRASG
VSDRFSGSGSGTDFTLISR VKAEDVGVYYCQQLVEYPYTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="84">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q85">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TDYNMDWVRQSPGQSLEWMGDINPNNGATLYNQ
NFRGRVTITRDTSA STAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSGYDDYYALDYWGQGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 85">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q86">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DTQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSASSSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFS
    GSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCHQWSNYPSTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 86">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>115</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..115</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q87">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGWIFPGDGSTDYNE
KFKGRVTMTTDKSSSTAYMELSRLRSDDTAVYYCARYHFFDNWGQGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="87">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q88">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DIVMTQSPLSLAVSLGERATINCRSSKSLLYKDGKTYLSWFQQKPGQPPLLIYLMSTRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQLVEYPYTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="88">
  <INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>115</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..115</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q89">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGWIFPGDGSTDYNE
KFKGRAVLSTDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARYHFFDNWGQGTITVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="89">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q90">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVITQSPLSLAVSLGERATINCRSSKSLLYKDGKTYLSWFQQKPGQPPQLLIYLMSTRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQLVEYPYTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="90">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q91">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QAGRRMDMDSSHSIT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="91">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q92">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PISHPMGRGHQAGRR</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="92">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q93">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>SHSITLQPTANPNTG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 93" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q94">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GYTFTNYW</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 94" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q95">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>IYPSDSYT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="95">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q96">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>TKWGDSY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="96">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q97">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QDINRY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="97">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q98">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>LQYDEFPFT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 98" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>115</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..115</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q99">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QVHLQQGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWVKQRPQGGLWIGNIYPSDSYTNYNQ
  KFKDKATLTVDKSSSTAYVHLSSPTSEDSAVYYCTKWGSDYWGQGTTLTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 99" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```
<INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q100">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINRYLRWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF
SGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIIYYCLQYDEFPFTFGSGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="100">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>115</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..115</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q101">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWMGNIYPSDSYTNYNQ
KFKDRAVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTKWGSDYWGQGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="101">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q102">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLRWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF
    SGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPFTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="102">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>330</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..330</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```

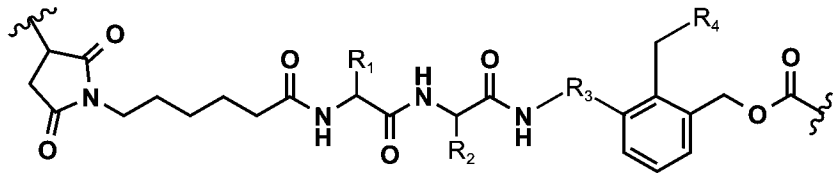
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q103">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="103">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q104">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq_sequence>

```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="104">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql06">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLRWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF
    SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPFTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體（isotopic variant）、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物，或其組合，包括抗MUC18或抗CD44v7/8抗體或其抗原結合片段、有效負載（payload）及式I所示的连接子，其中：



式 I

所述式I所示连接子透過琥珀醯亞胺基與抗體或其抗原結合片段鏈間二硫鏈還原後的巰基部分形成硫醚鍵連接；

所述式I所示连接子的酯基中的羰基與有效負載中的胺基連接；

R₁、R₂各自獨立地選自氫、甲基或異丙基；

R₃表示-(CR₅HCONH)n¹-(CH₂CONH)n²-或單鍵，R₅選自氫或苯甲基，n¹表示0~2的整數，n²表示0~2的整數；

R₄表示甲胺基或-(NCH₃COCH₂)n³-NCH₃COCH₃，n³表示1~20的整數。

【請求項2】 如請求項1所述的抗體-藥物複合體，R₄表示-(NCH₃COCH₂)n³-NCH₃COCH₃，n³表示8~15的整數。

【請求項3】 如請求項1或2所述的抗體-藥物複合體，R₄表示-(NCH₃COCH₂)n³-NCH₃COCH₃，n³表示10~12的整數。

【請求項4】 如請求項1-3中任一項所述的抗體-藥物複合體，R₃表示-(CR₅H₂CONH)n¹-(CH₂CONH)n²-或單鍵，R₅選自苯甲基，n¹表示1或2，n²表示1或2；

R₄表示-(NCH₃COCH₂)^{n³}-NCH₃COCH₃，n³表示8~15的整數。

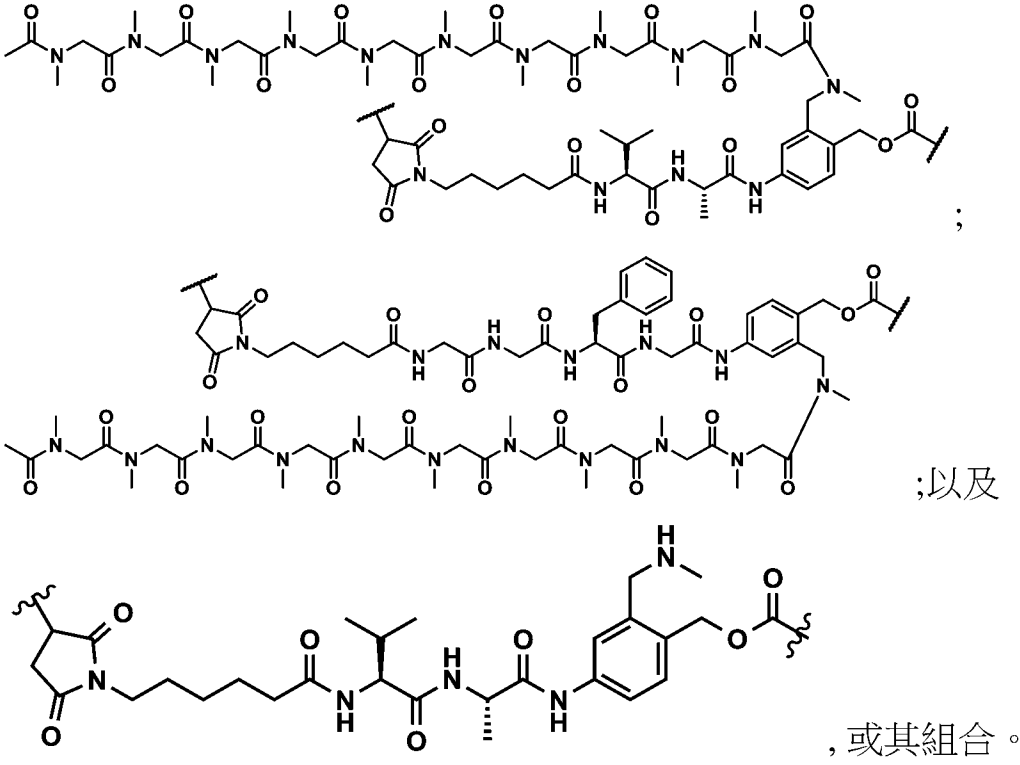
【請求項5】 如請求項1-4中任一項所述的抗體-藥物複合體，R₃表示單鍵；

R₄表示-(NCH₃COCH₂)^{n³}-NCH₃COCH₃，n³表示8~15的整數。

【請求項6】 如請求項1-5中任一項所述的抗體-藥物複合體，R₃表示單鍵；

R₄表示甲胺基。

【請求項7】 如請求項1-6中任一項所述抗體-藥物複合體，所述連接子選自以下組中的任一種：



【請求項8】 如請求項1-7中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述有效負載選自包括細胞毒劑，標記物，核酸，放射性核種，激素，免疫調節劑，前體藥物轉化酶，核糖核酸酶，激動性抗體（agonistic antibody），拮抗性抗體及其片段，融合蛋白或衍生物的組中的至少一種。

【請求項9】 如請求項8所述的抗體-藥物複合體，所述細胞毒劑包括微管蛋白抑制劑及/或拓撲異構酶抑制劑；所述微管蛋白抑制劑包括奧瑞他汀或其衍生

如SEQ ID NO: 2所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 13所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 24所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 36所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為NAK的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 48所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 3所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 14所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 25所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 37所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為FAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 49所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 15所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 26所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 38所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 50所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 15所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 27所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 39所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 51所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 5所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 17所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 29所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 40所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 53所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 6所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 18所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 29所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID

NO: 41所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 53所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 7所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 19所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 30所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 42所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為RTS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 54所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 8所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 20所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 31所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 43所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 55所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 9所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 21所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 32所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 44所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 56所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；或者，

如SEQ ID NO: 10所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 22所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 33所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 45所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為LMS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 57所示胺基酸序列的輕鏈CDR3。

【請求項12】 如請求項1-11中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括：

如SEQ ID NO: 84所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 85所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；

如SEQ ID NO: 86所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 87所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或者

如SEQ ID NO: 88所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 89所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

【請求項13】 如請求項1-10中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段特異性結合人CD44 v7/8結合肽，所述結合肽包括如SEQ ID NO:90所示的胺基酸序列。

【請求項14】 如請求項1-10及13中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段不結合人CD44v7/8如SEQ ID NO:91，及/或如SEQ ID NO:92所示胺基酸序列的結合肽。

【請求項15】 如請求項13或14所述的抗體-藥物複合體，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括：如SEQ ID NO: 93所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 94所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 95所示胺基酸序列的重鏈CDR3；以及如SEQ ID NO: 96所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為RAN的CDR2，如SEQ ID NO: 97所示胺基酸序列的輕鏈CDR3。

【請求項16】 如請求項13-15中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括：

如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 101所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或

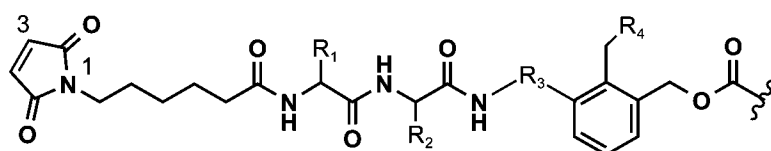
如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 104所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

【請求項17】 如請求項1-16中任一項所述的抗體-藥物複合體，DAR為

1~10。

【請求項18】 如請求項1-17中任一項所述的抗體-藥物複合體，DAR為4~10。

【請求項19】 一種如請求項1-18中任一項所述的抗體-藥物複合體、或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合、以及藥學上可接受的賦形劑的製備方法，包括以下步驟：抗MUC18或抗CD44v7/8抗體或其抗原結合片段經還原處理後二硫鍵至少部分被還原，與式III所示連接子的馬來醯亞胺-N-基的3位碳原子進行反應，



式III，

其中

所述連接子-有效負載中，式III所示連接子的酯基中的羰基與有效負載的胺基連接；

R_1 、 R_2 各自獨立地選自氫、甲基或異丙基；

R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 或單鍵， R_5 選自氫或苯甲基， n^1 表示0~2的整數， n^2 表示0~2的整數；以及

R_4 表示甲胺基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示1~20的整數。

【請求項20】 如請求項19所述的製備方法，所述方法還包括：抗體或其抗原結合片段在含有螯合劑的緩衝溶液中與還原劑反應，加入連接子-有效負載的溶解液，連接子具有式III的結構，調節反應溶液pH值。

【請求項21】 如請求項19或20所述的製備方法，所述方法還包括：所述有

效負載為式III所示的依替替康，以其環己基環上胺基的金原子與式III中羰基的羧基連接，



式 III。

〔請求項22〕 如請求項19-21中任一項所述的製備方法，DAR為1~10。

〔請求項23〕 如請求項19-22中任一項所述的製備方法，

所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包含如SEQ ID NO: 84所示的胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ IDNO: 85所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；

如SEQ ID NO: 86所示的胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 87所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或

如SEQ ID NO:88所示的胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ IDNO:89所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體；

所述抗CD44v/8抗體或其抗原結合片段包含如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 101所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或

如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 104所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

〔請求項24〕 一種藥物組合物，其包含如請求項1-18中任一項的抗體-藥物複合體，或如請求項19-23中任一項所述的方法製備的抗體-藥物複合體，或其具

構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合，以及藥學上可接受的賦形劑。

【請求項25】 一種套組，其包含如請求項1-18中任一項的抗體-藥物複合體，或如請求項19-23中任一項所述的方法製備的抗體-藥物複合體，如請求項24的藥物組合物，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合。

【請求項26】 一種如請求項1-18中任一項的抗體-藥物複合體、如請求項19-23中任一項所述的方法製備的抗體-藥物複合體、如請求項24的藥物組合物、或如請求項25的套組在製備用於診斷、預防及治療腫瘤性疾病的治療劑中的用途。

【請求項27】 如請求項26所述的用途，其中所述腫瘤性疾病包括表現MUC18及/或CD44v7/8的良性腫瘤及惡性腫瘤。

【請求項28】 如請求項26或27所述的用途，其中所述腫瘤性疾病包括黑色素瘤、咽癌、三陰性乳癌、食管腺癌、食管鱗狀細胞癌、肝癌、卵巢癌、子宮頸癌、尿路上皮癌、膀胱神經內分泌瘤、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、皮膚鱗狀細胞癌、膽管癌、轉移性胰腺癌、肺鱗狀細胞癌，頭頸部鱗狀細胞癌及/或食管鱗狀細胞癌。

【請求項29】 一種如請求項1-18中任一項中所述的抗體-藥物複合體、如請求項19-23中任一項所述方法製備的抗體-藥物複合體、如請求項24的藥物組合物、或者如請求項25的套組在製備靶向MUC18及/或CD44v7/8的治療劑中的用途。

【請求項30】 一種診斷、預防及治療腫瘤性疾病的方法，包括向受試者給

與治療有效量的治療劑，所述治療劑包括請求項1-18中任一項中所述的抗體-藥物複合體，如請求項19-23中任一項所述方法製備的抗體-藥物複合體，或者如請求項24所述的藥物組合物。

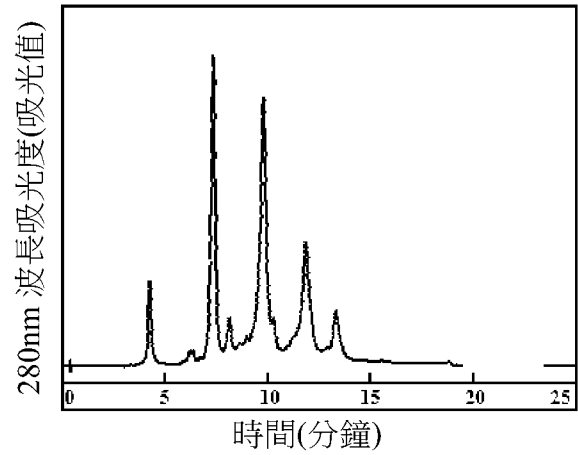


圖 8B

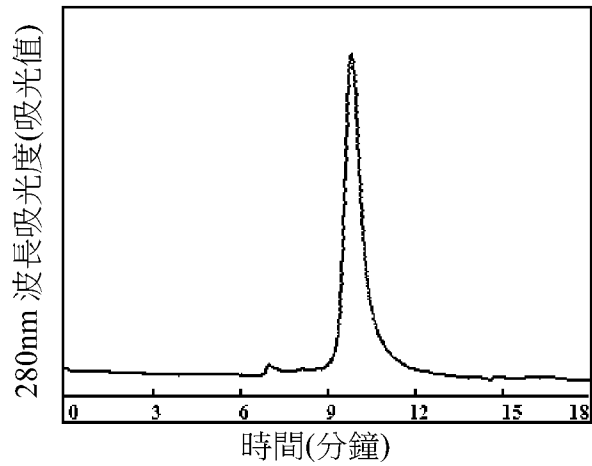


圖 9A

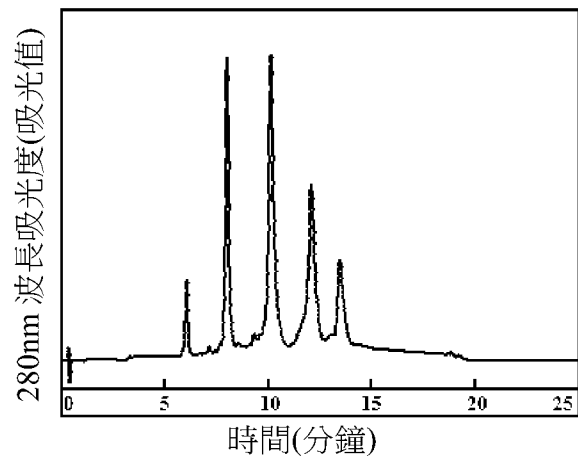


圖 9B

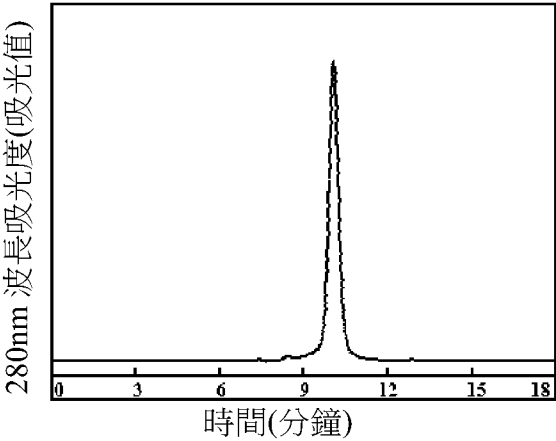


圖 10A

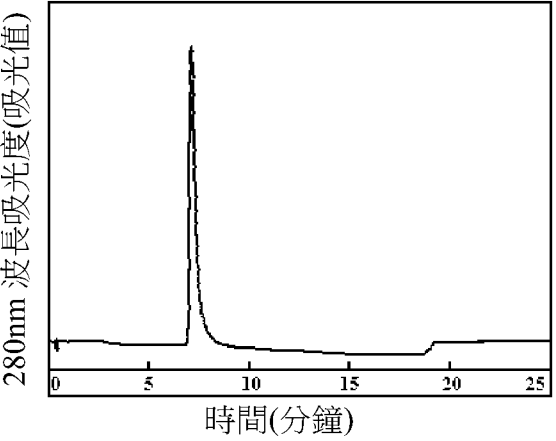


圖 10B

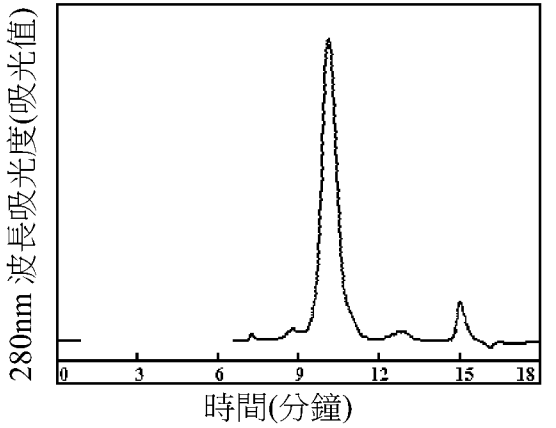
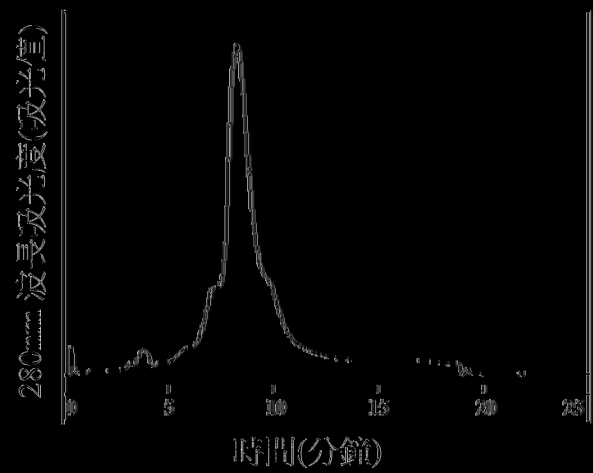
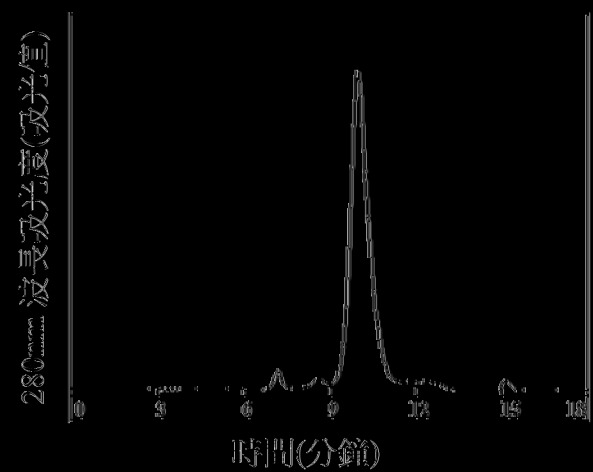


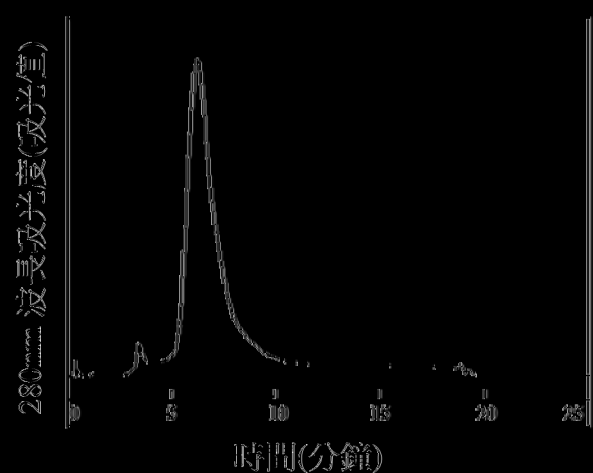
圖 11A



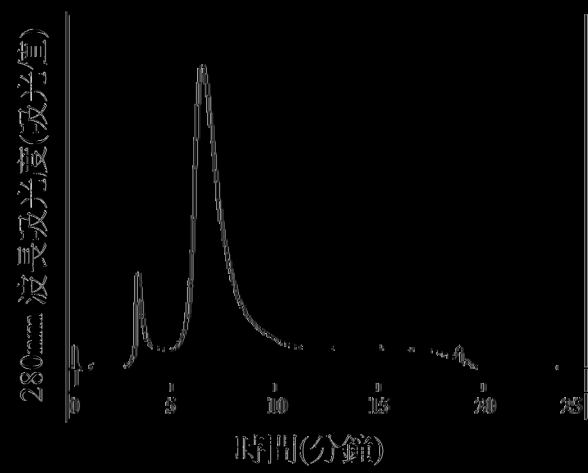
11B



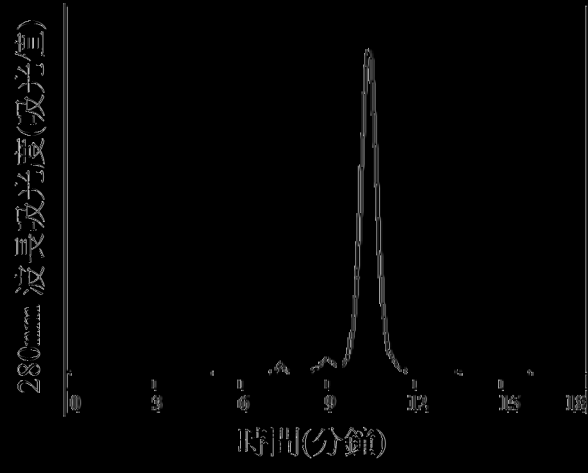
12A



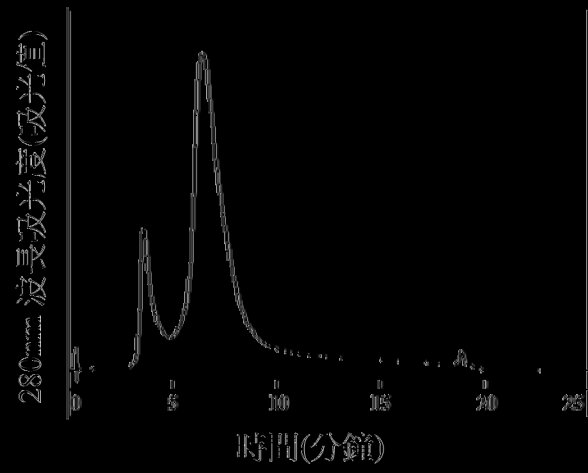
12B



14B



15A



15B

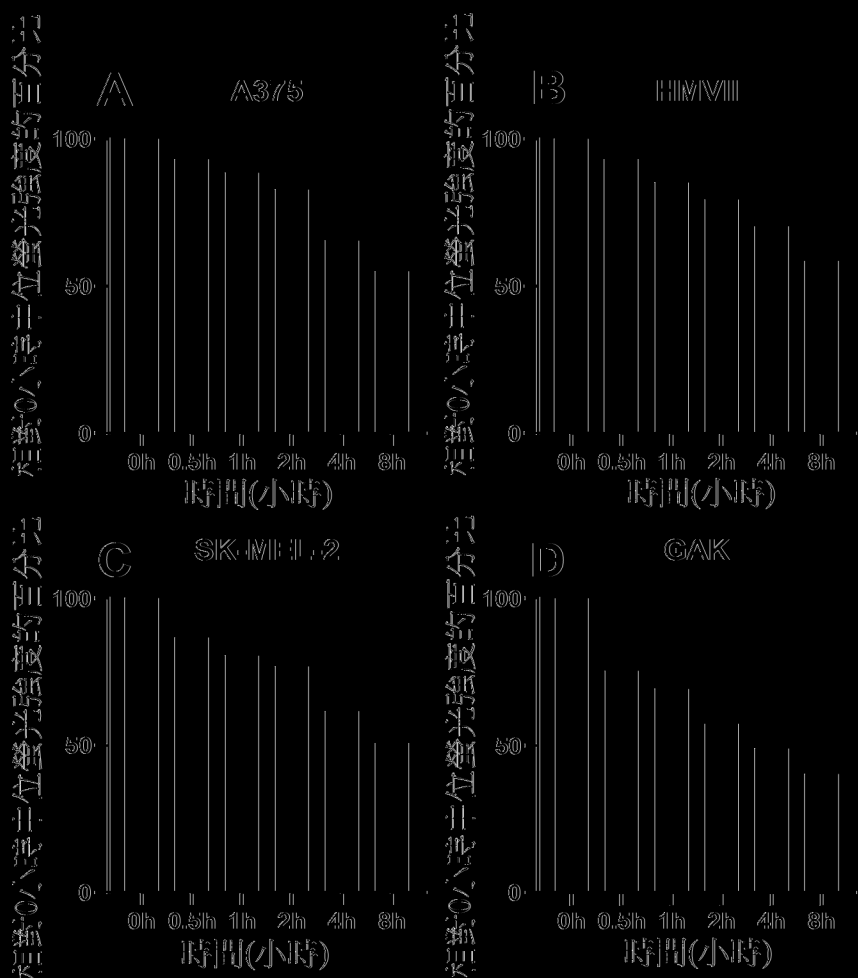


圖 17

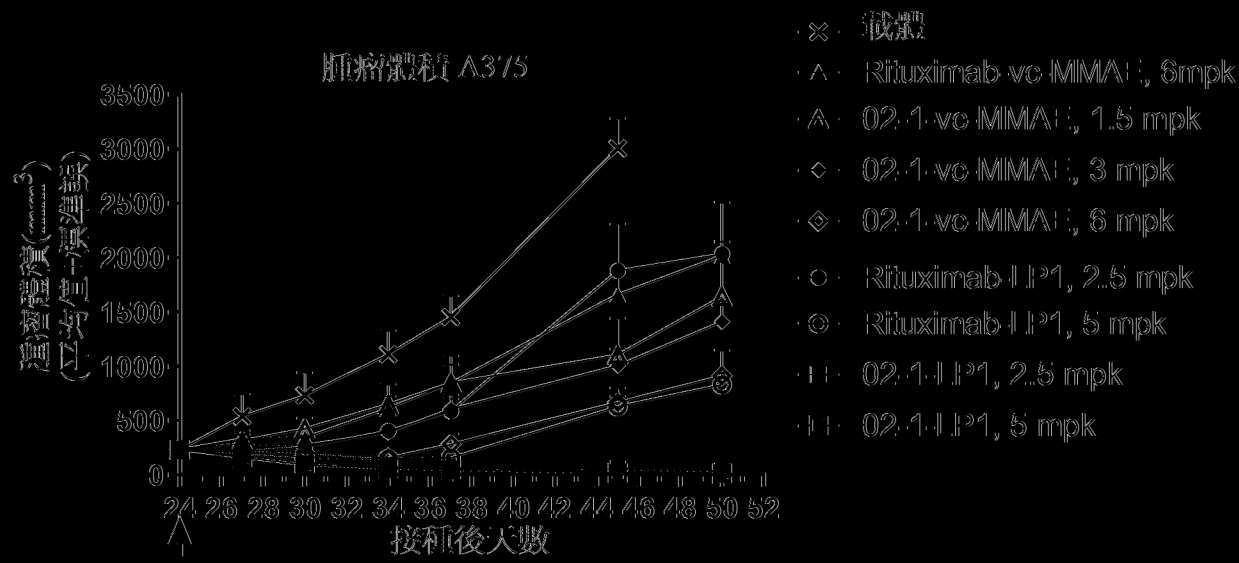
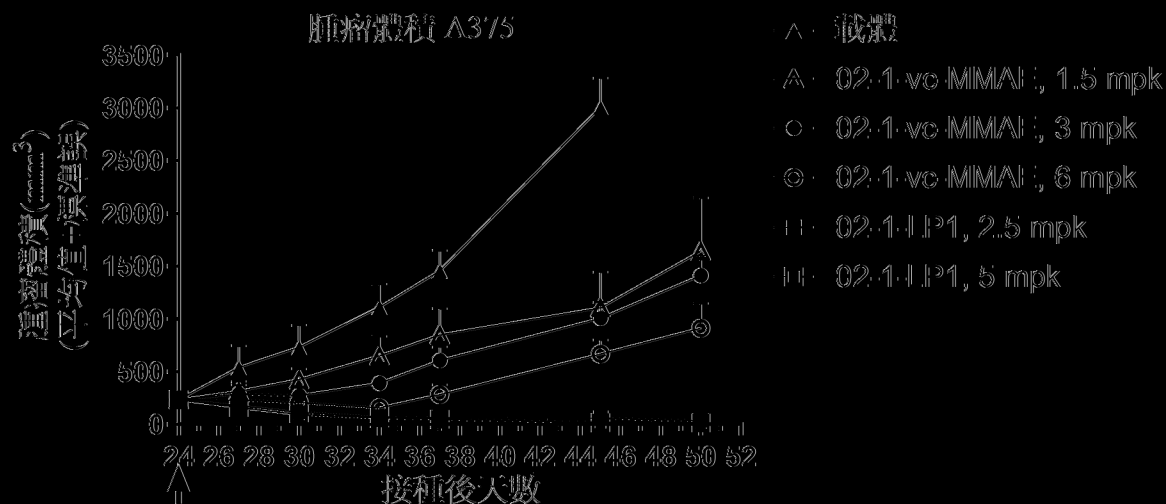
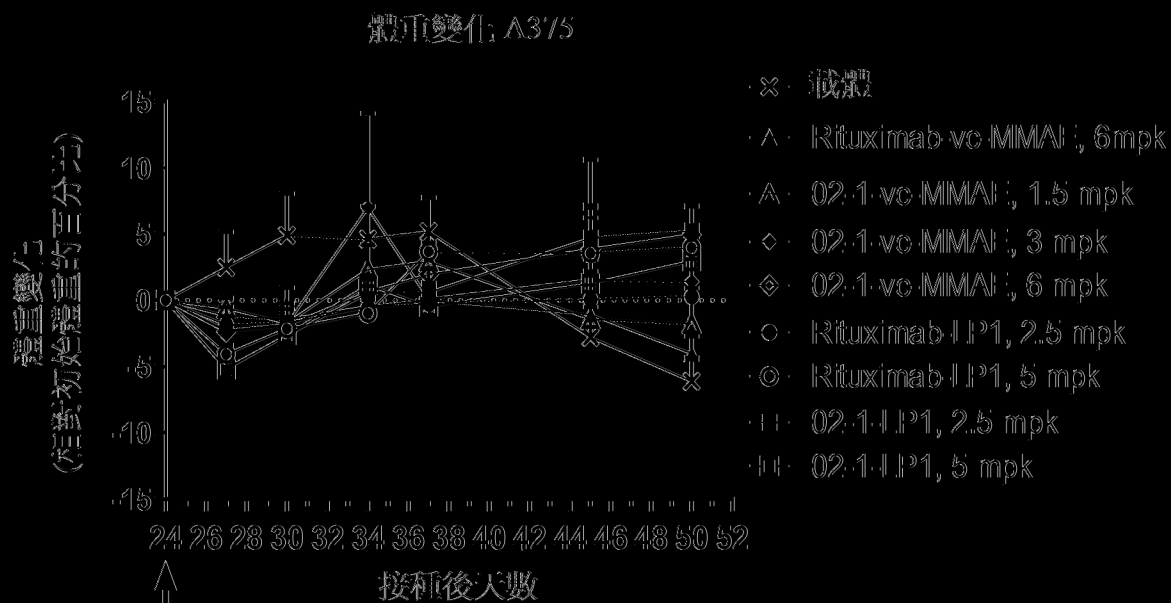


圖 18A



18A2



18B1

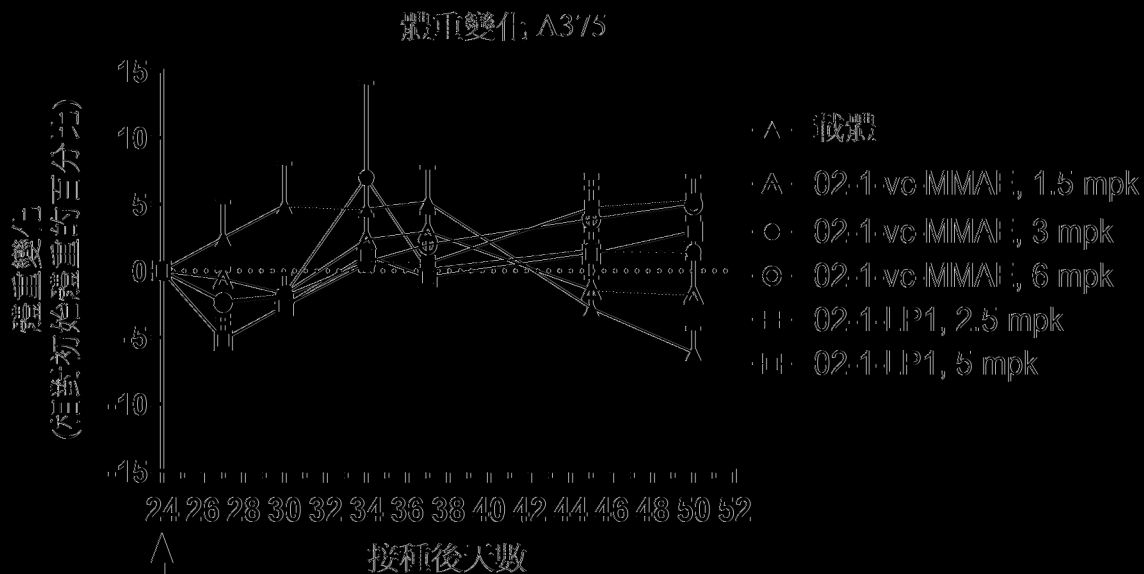


圖 18B2

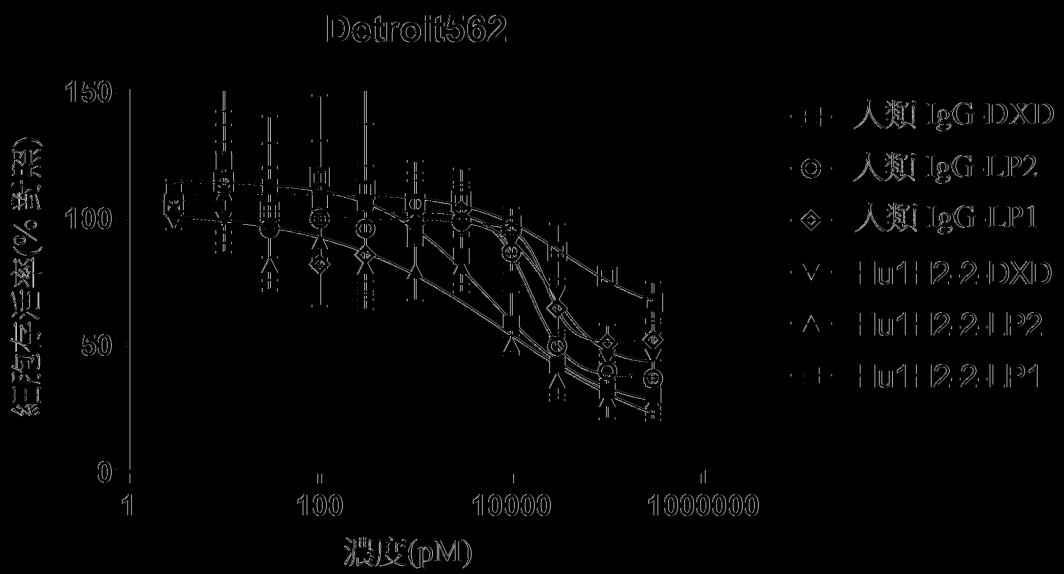


圖 19

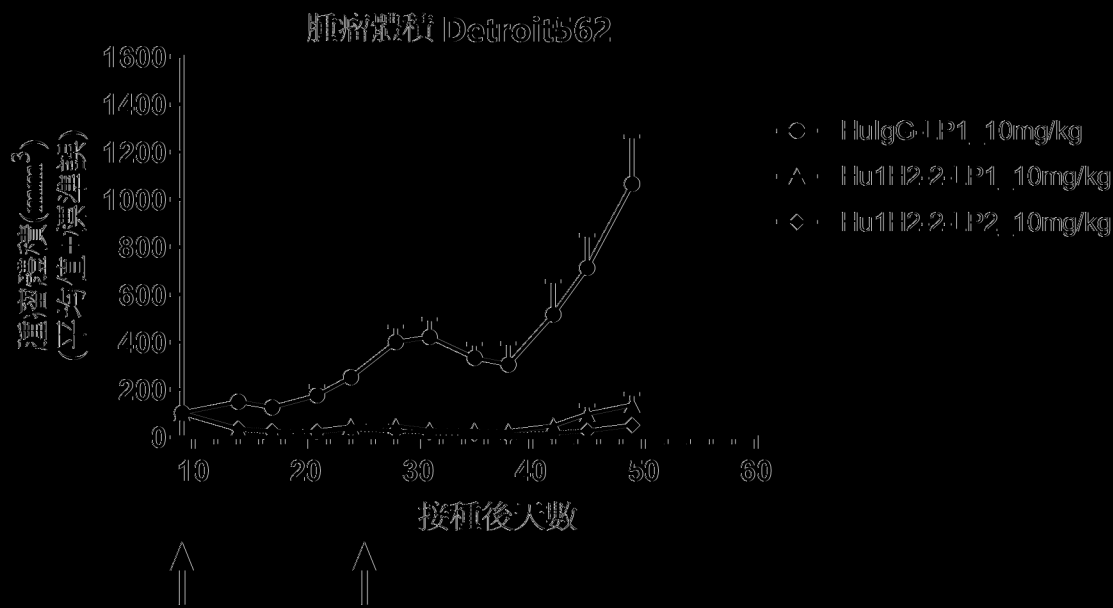


圖 20

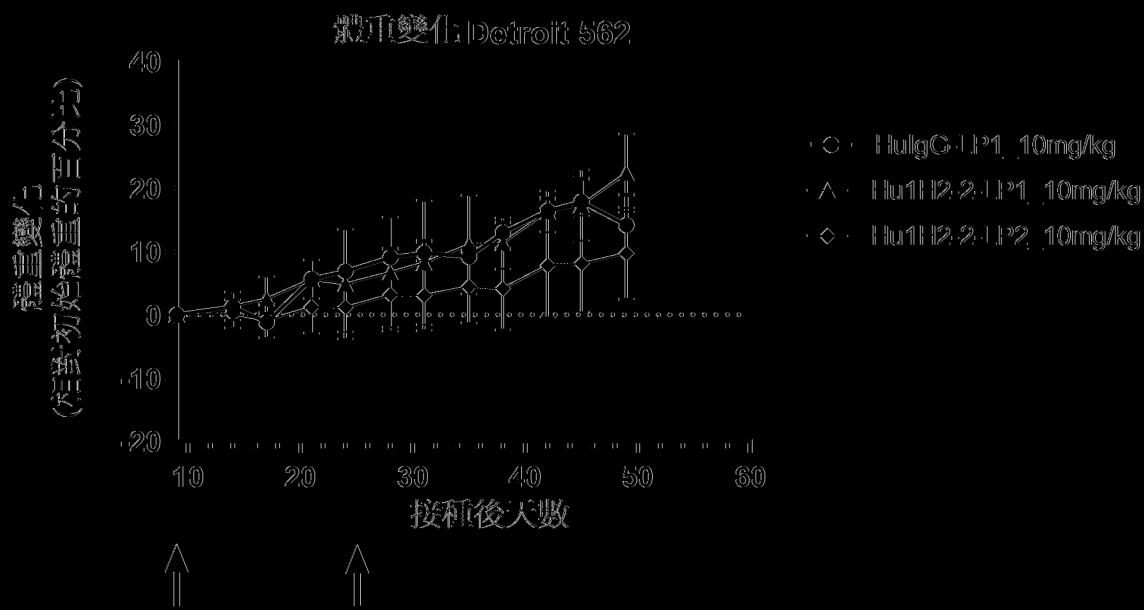
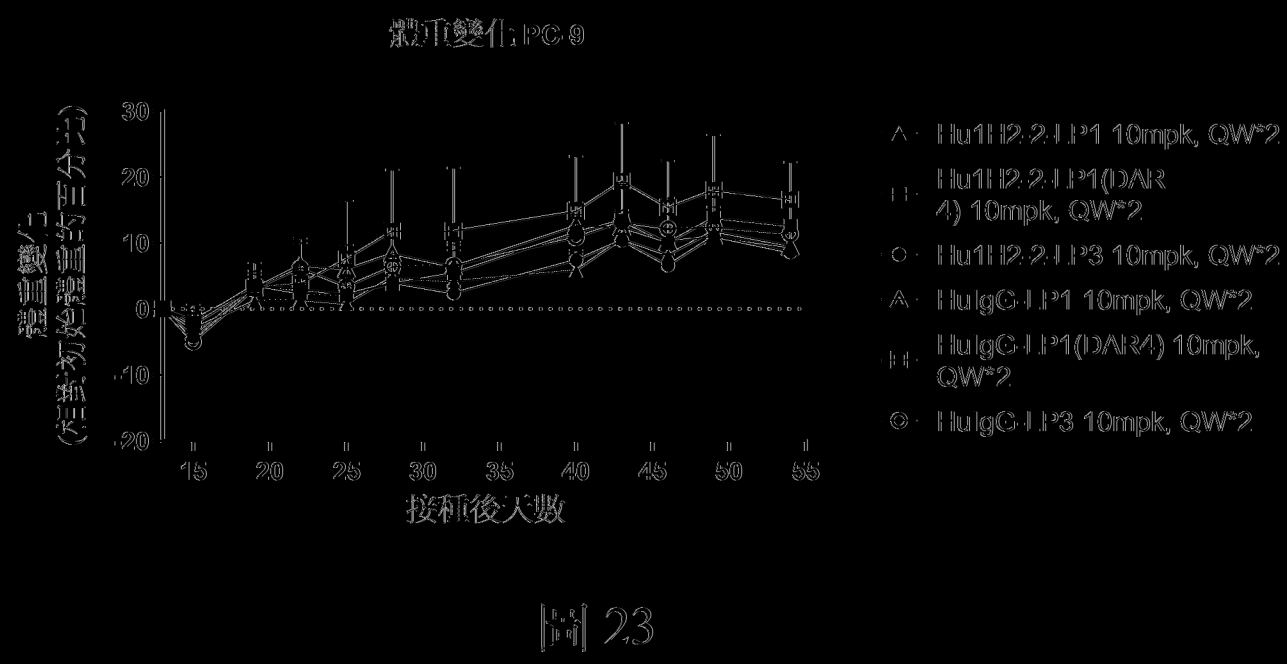
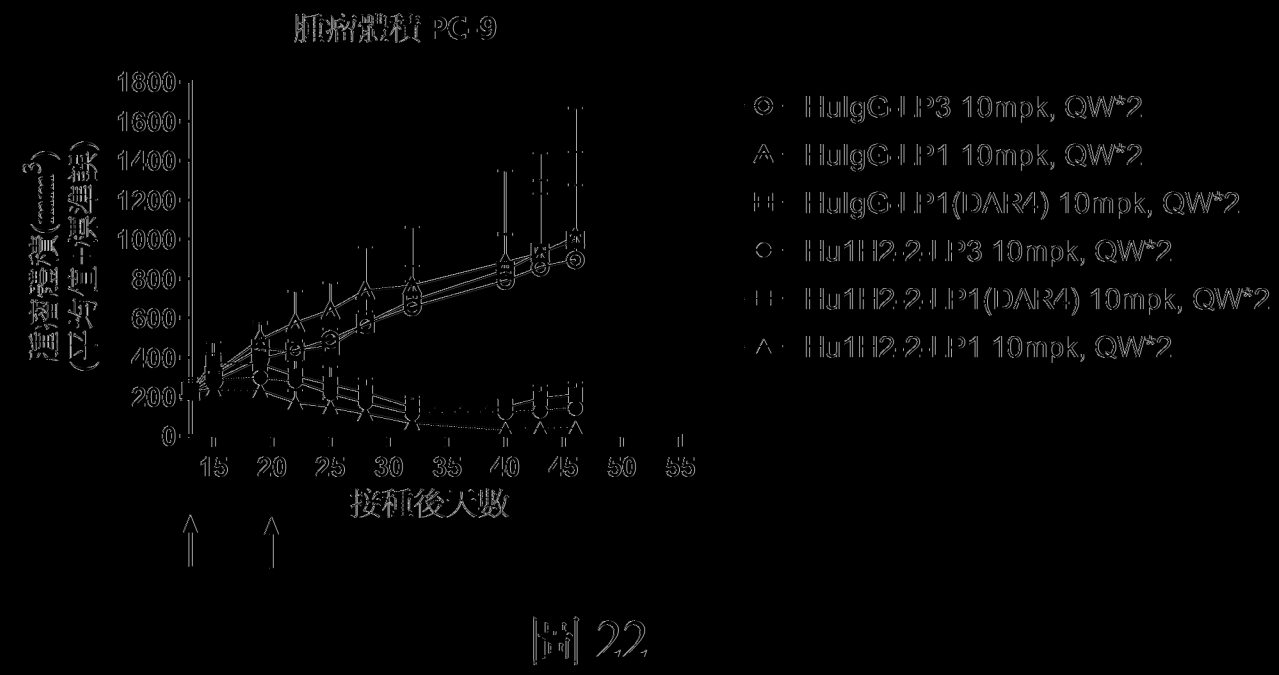
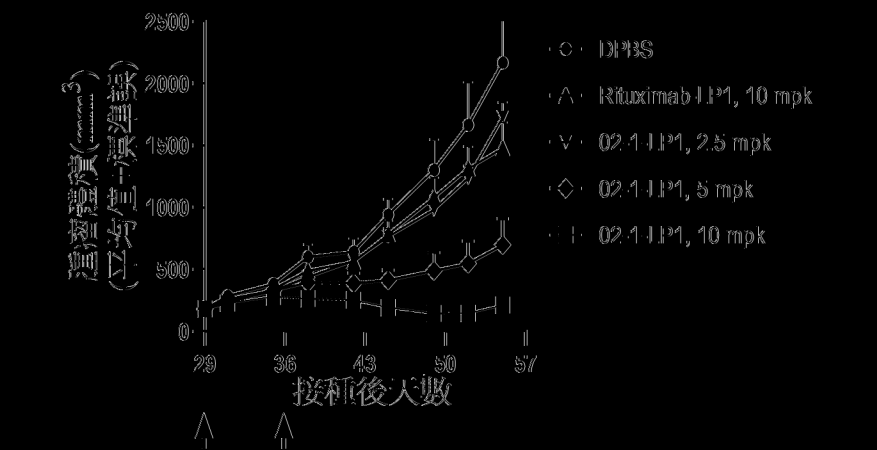
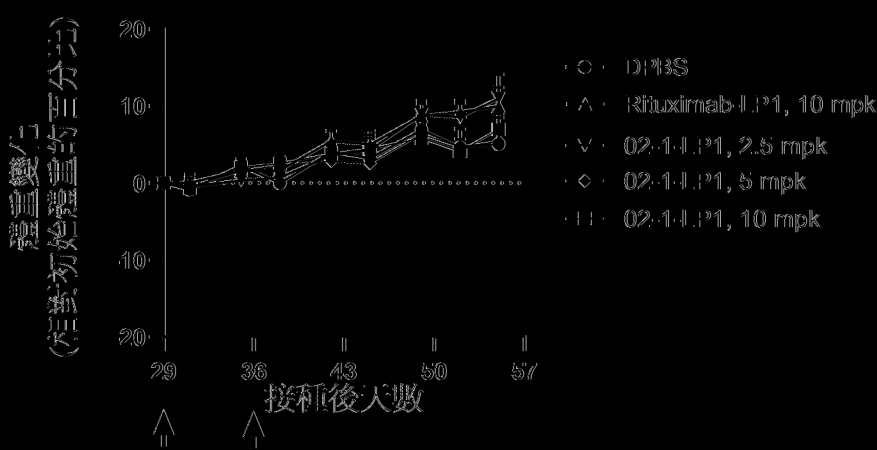


圖 21

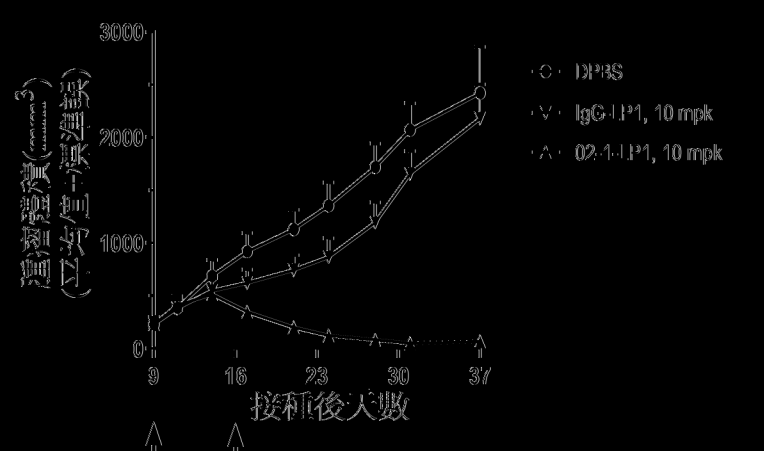




24A



24B



25A

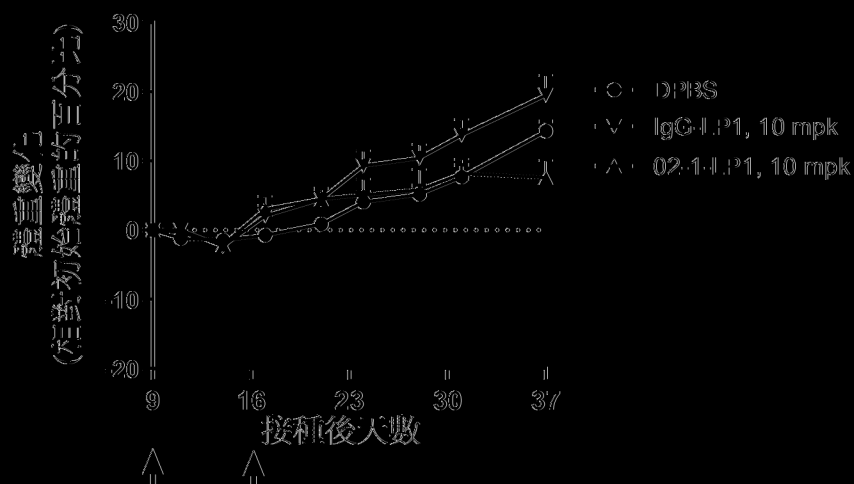


圖 25B

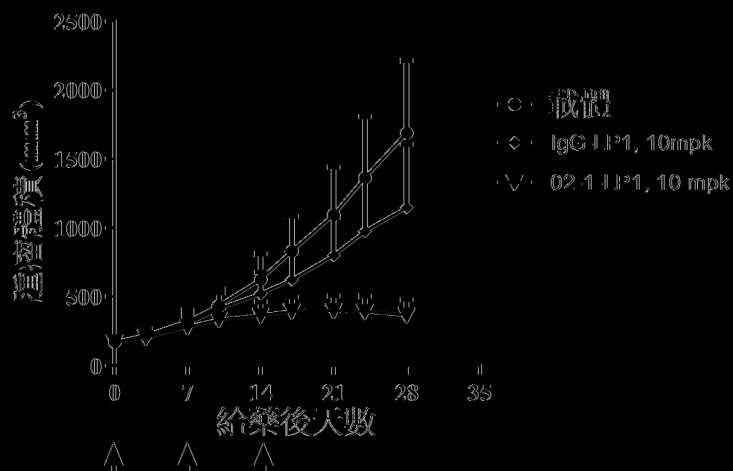


圖 26A

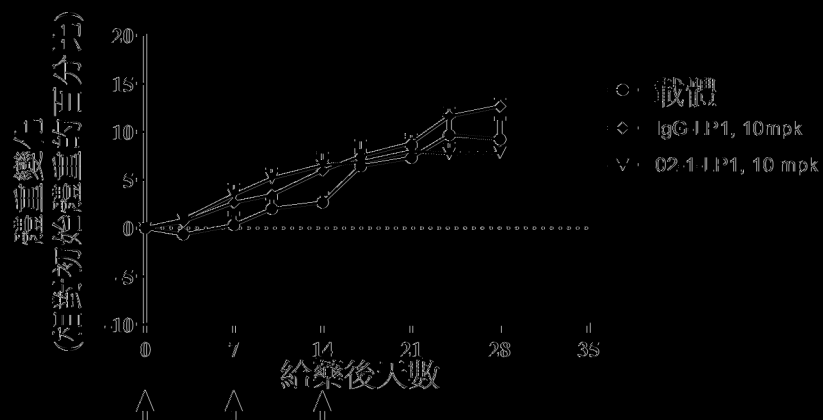


圖 26B

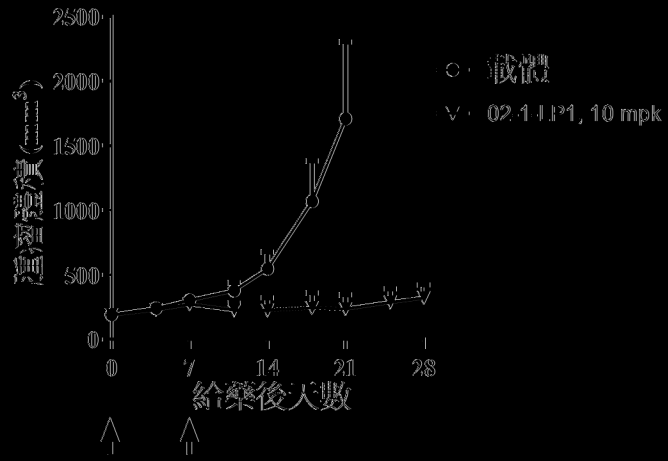


圖 27A

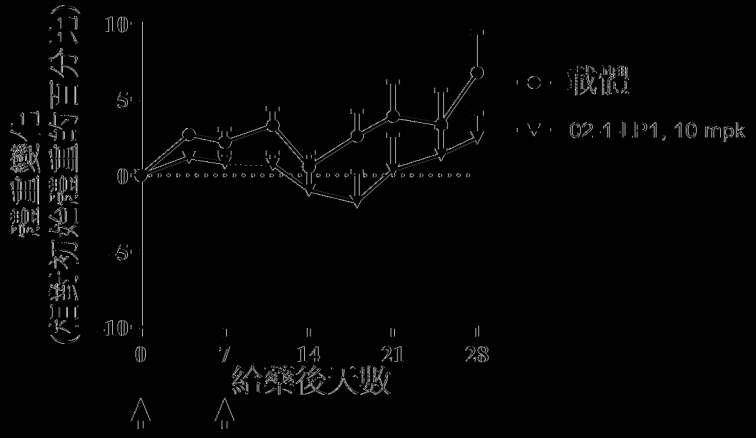


圖 27B

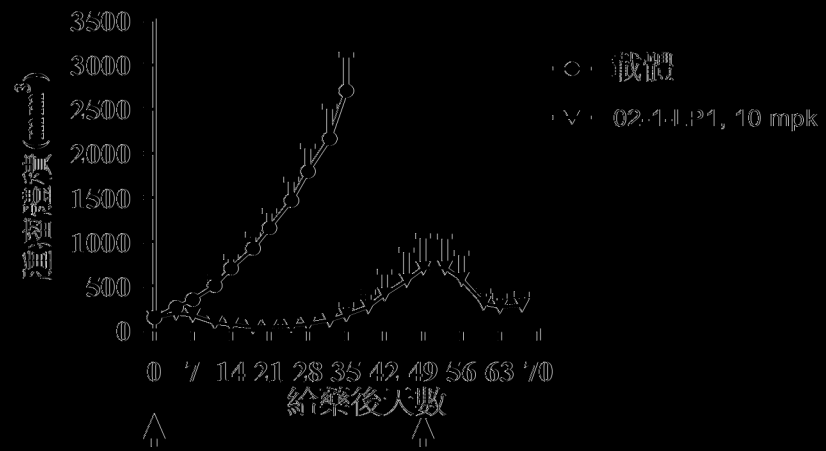


圖 28A

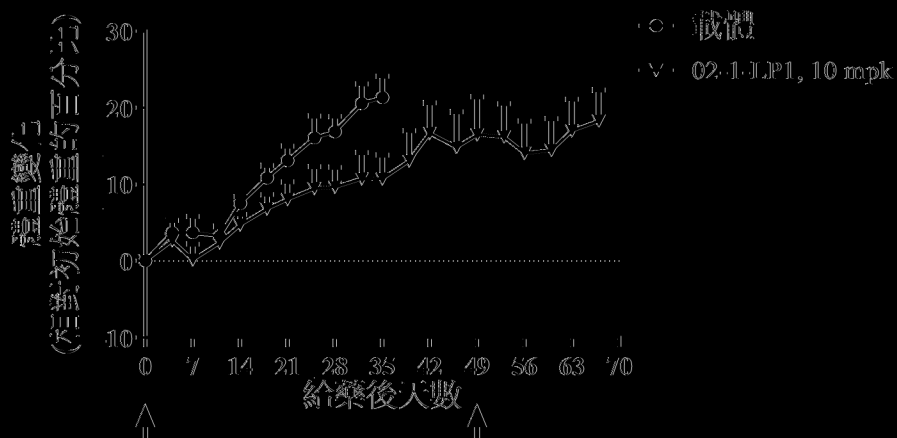


圖 28B

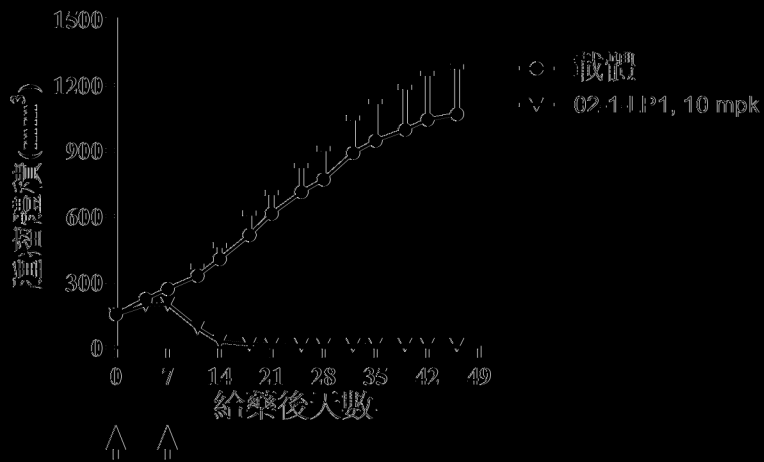


圖 29A

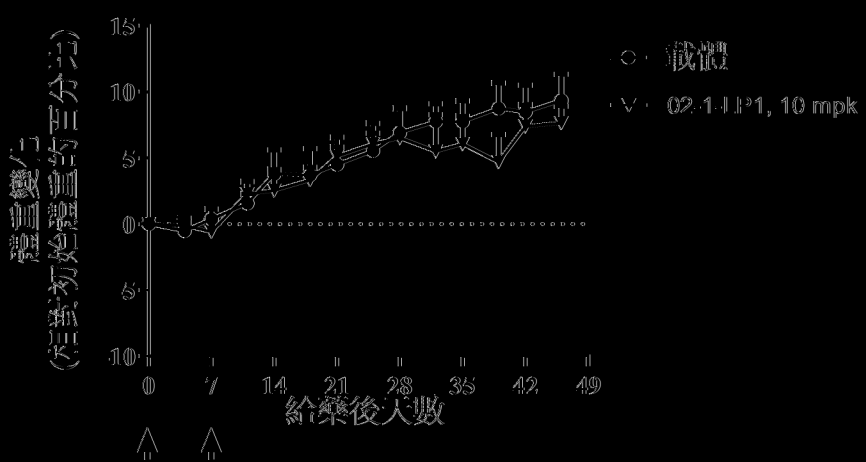


圖 29B

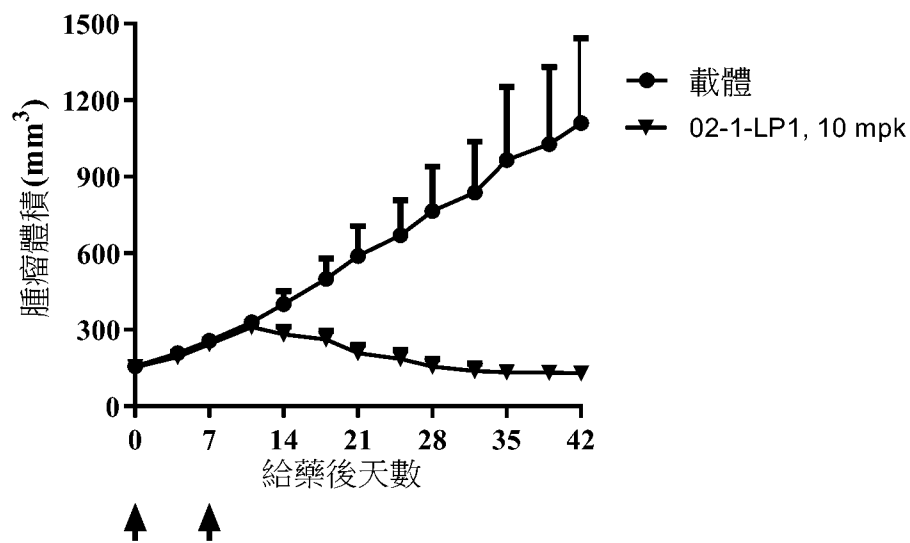


圖 30A

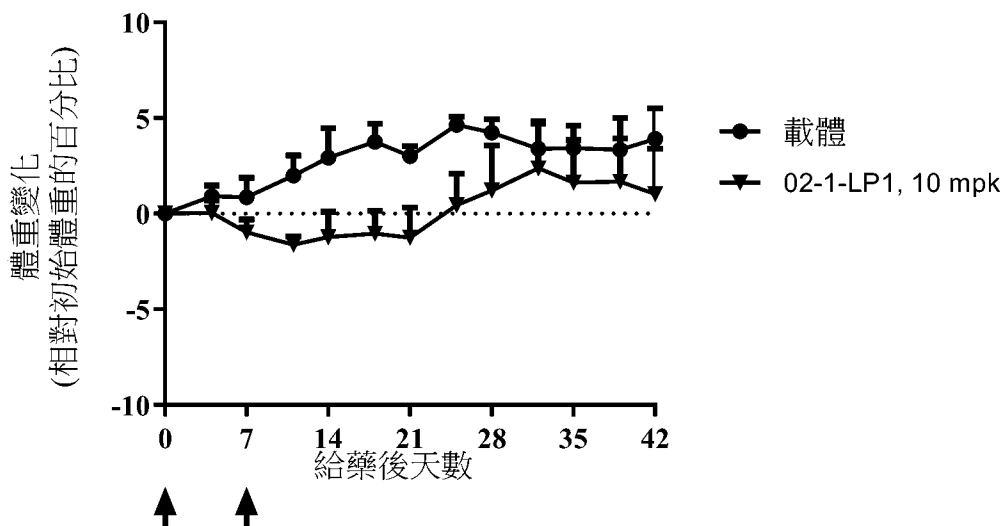


圖 30B

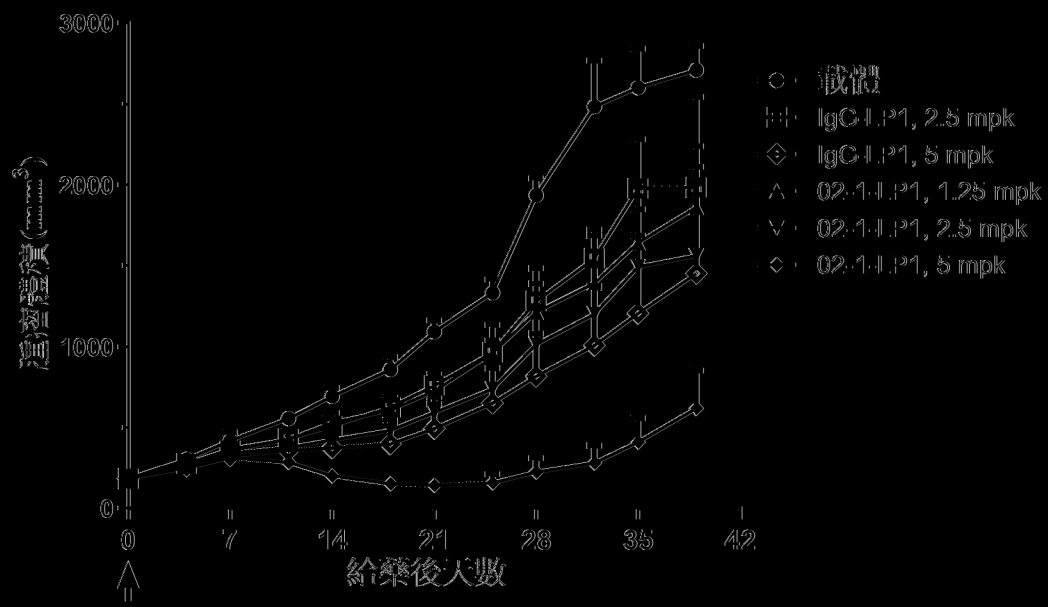


圖 31A

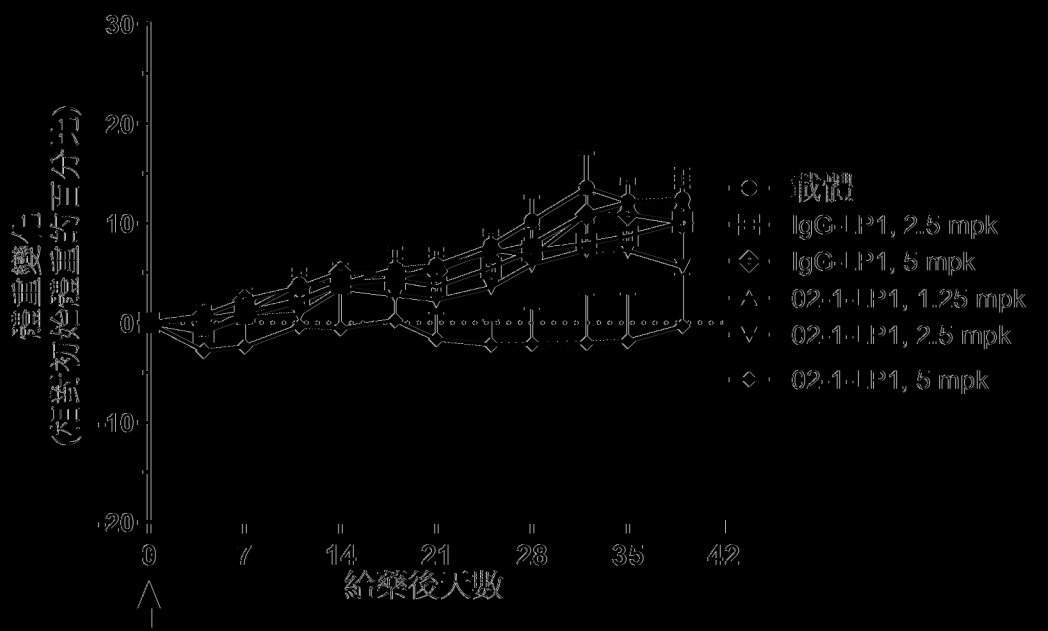


圖 31B

【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗體-藥物複合體及其製備方法與用途

【英文發明名稱】 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE, PREPARATION

METHOD AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本揭露涉及抗體-藥物複合體，其透過連接子連接抗體及抗腫瘤活性的藥物或毒素，以腫瘤細胞為標靶發揮抗腫瘤作用。

【先前技術】

【0002】 本部分中的敘述僅提供與本揭露相關的背景資訊，並不一定構成現有技術。

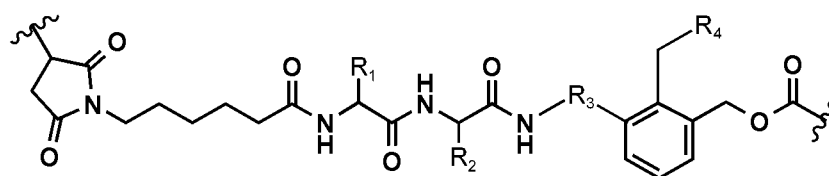
【0003】 抗體-藥物複合體（Antibody-Drug Conjugate; ADC）是一種載體化（vectorized）的化療，能夠選擇性地向腫瘤/癌細胞遞送有效的細胞毒性藥物（Antibody-Drug Conjugates: The Last Decade，Nicolas Joubert等，Pharmaceuticals (Basel). 2020 Sep 14;13(9):245.）。隨著藥物傳遞技術的發展，ADC靶向傳遞技術可有效克服喜樹鹼類藥物的水溶性差，組織分佈不足等帶來的副作用。已上市的ADC藥物Enhertu及Sacituzumab govitecan在治療腫瘤尤其是惡性腫瘤方面具有優越的效果。Enhertu及Sacituzumab govitecan均使用疏水性強於微管蛋白抑制劑（例如MMAE, MMAF）的DNA拓撲異構酶抑制劑喜樹鹼衍生物為細胞毒性藥物。Sacituzumab govitecan以MCC-triazole spacer-PEG7-lysine-PABC為連接子，在細胞溶酶體中分解釋放喜樹鹼SN38（US13/948,732）。阿斯利康/第一三

共研發的Enhertu以組織蛋白酶B活化的GGFG(由透過肽鍵連接的甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸組成的胺基酸序列)四肽作為連接子，並引入自裂解結構，釋放出依喜替康(Exatecan)衍生物Dxd(Yusuke Ogitani等, Clin Cancer Res (2016) 22 (20): 5097-5108.)。然而上述細胞毒性藥物MMAE, SN38及Dxd均為P-糖蛋白(P-gp)的基質(Front Pharmacol 2019;10:749)，對於部分P-gp高表現的腫瘤可能存在藥物耐藥的問題。

【0004】因此，仍然存在向腫瘤/癌細胞遞送細胞毒性藥物的新的抗體-藥物複合體的需求。

【發明內容】

【0005】本揭露提供了一種抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物、或其組合，包括抗MUC18或抗CD44v7/8抗體或其抗原結合片段，有效負載(payload)及式I所示的連接子，



式 I

所述式I所示連接子透過琥珀醯亞胺基與抗體或其抗原結合片段鏈間二硫鍵還原後的巯基部分形成硫醚鍵連接；

所述式I所示連接子的酯基中的羰基與有效負載中的胺基連接；

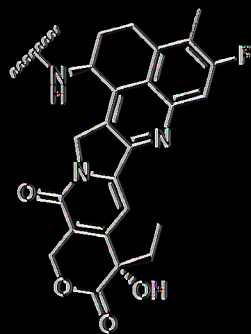
R1, R2各自獨立地選自氫，甲基或異丙基；

R3表示-(CR₅HCONH)^{n¹}-(CH₂CONH)^{n²}或單鍵，R₅選自氫或苯甲基，n¹表示0~2的整數，n²表示0~2的整數；

核酸，放射性核種，激素，免疫調節劑，前體藥物轉化酶，核糖核酸酶，激動性抗體（agonistic antibody），拮抗性抗體及其片段，融合蛋白或衍生物的組中的至少一種。

[(0013)] 在一些實施方式中，所述細胞因子劑包括微管蛋白抑制劑及/或拓撲異構酶抑制劑，所述微管蛋白抑制劑包括奧瑞他汀或其衍生物，美登素或其衍生物，所述拓撲異構酶抑制劑包括喜樹鹼及其衍生物。

[(0014)] 在一些實施方式中，所述有效負載為式II所示的依喜替康，以環己基環上胺基的氮原子與連接子連接。



式II。

[(0015)] 在一些實施方式中，抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括以下結構的任一：

如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 16所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 28所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 38所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 52所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 1所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 11所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 23所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 34所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為LAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID

NO: 46所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 1所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 12所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 23所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 35所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為LAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 47所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 2所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 13所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 24所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 36所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為NAK的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 48所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 3所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 14所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 25所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 37所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為FAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 49所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 15所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 26所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 38所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 50所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 15所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 27所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 39所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 51所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 5所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 17所示胺基酸

序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 29所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 40所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 53所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 6所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 18所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 29所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 41所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 53所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 7所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 19所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 30所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 42所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為RTS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 54所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 8所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 20所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 31所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 43所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 55所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 9所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 21所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 32所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 44所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 56所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；及

如SEQ ID NO: 10所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 22所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 33所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 45所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為LMS的輕鏈CDR2，如SEQ

ID NO: 57所示胺基酸序列的輕鏈CDR3。

【0016】 在一些實施方式中，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括：
如SEQ ID NO: 84所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 85
所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；

如SEQ ID NO: 86所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 87
所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或者

如SEQ ID NO: 88所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 89
所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

【0017】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段特異
性結合人CD44 v7/8結合肽，結合肽包括如SEQ ID NO: 90所示的胺基酸序列。

【0018】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段不結
合人CD44 v7/8如SEQ ID NO: 91及/或如SEQ ID NO: 92所示胺基酸序列的結合
肽。

【0019】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包
括：如SEQ ID NO: 93所示胺基酸序列的HCDR1，如SEQ ID NO: 94所示胺基酸
序列的HCDR2，如SEQ ID NO: 95所示胺基酸序列的HCDR3；及如SEQ ID NO: 96
所示胺基酸序列的LCDR1，胺基酸序列為RAN的LCDR2，如SEQ ID NO: 97所示
胺基酸序列的LCDR3

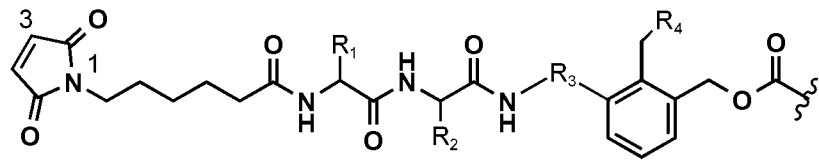
【0020】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包
括：

如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO:
101所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或

如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 104所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

【0021】 在一些實施方式中，藥物抗體比（DAR）為1~10。在一些實施方式中，DAR為4~10。

【0022】 本申請提供了一種上述抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、其溶劑化物或其組合的製備方法，包括以下步驟：抗MUC18抗體或CD44v7/8 抗體或其抗原結合片段經還原處理後二硫鍵至少部分被還原，與式III所示連接子的馬來醯亞胺-N-基的3位碳原子進行反應，



式 III

所述連接子-有效負載中，式III所示連接子的酯基中的羰基與有效負載的胺基連接；

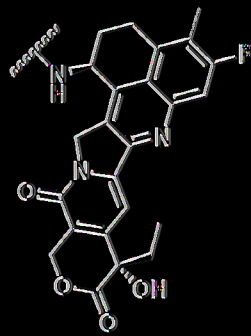
R_1 ， R_2 各自獨立地選自氫，甲基或異丙基；

R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 或單鍵， R_5 選自氫或苯甲基， n^1 表示0~2的整數， n^2 表示0~2的整數；

R_4 表示甲胺基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示1~20的整數。

【0023】 在一些實施方式中，所述方法還包括：抗體或其抗原結合片段在含有螯合劑的緩衝溶液中與還原劑反應，加入式III所示連接子的連接子-有效負載的溶解液，調節反應溶液pH。

【0024】 在一些實施方式中，所述有效負載為式II所示的依喜替康，以環己烷環上胺基的氮原子與式III中酯基的羰基連接，



式III。

[(0025)] 在一些實施方式中，DAR為1~10，可選擇地，為4~10。

[(0026)] 本揭露提供了藥物組合物，包括上述的抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、其溶劑化物或其組合，以及藥學上可接受的賦形劑。

[(0027)] 本揭露提供了套組，其包括上述抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、其溶劑化物或其組合。

[(0028)] 本揭露提供了上述抗體-藥物複合體，透過上述方法製備的抗體-藥物複合體，含有上述抗體-藥物複合體的藥物組合物或套組在製造用於診斷、預防及治療腫瘤疾病的治療劑中的用途。在一些實施方式中，腫瘤疾病包括表現MUC18及/或CD44v//8的良性腫瘤及惡性腫瘤。

[(0029)] 在一些實施方式中，腫瘤疾病包括黑色素瘤、咽癌症、三陰性乳腺癌症、食管腺癌、肝癌、卵巢癌症、子宮頸癌症、尿路上皮癌症、膀胱神經內分泌腫瘤、小細胞肺癌癌症、非小細胞肺癌癌症、皮膚鱗狀細胞癌、膽管癌、轉移性胰腺癌、肺鱗狀細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌及/或食管鱗狀細胞癌。

[(0030)] 本揭露提供了上述抗體-藥物複合體，透過上述方法製備的抗體-藥物複合體，含有上述抗體-藥物複合體的藥物組合物或套組在製備靶向MUC18及/或CD44v//8的治療劑中的用途。

【0031】 本揭露提供了一種診斷，預防及治療腫瘤性疾病的方法，其包括向受試者施用治療有效量的治療劑，其中所述治療劑包括上述抗體-藥物複合體，透過上述方法製備的抗體-藥物複合體或上述藥物組合物。

【圖式簡單說明】

【0032】

圖1A示出02-1裸抗(naked antibody)的體積排阻色譜圖；圖1B示出Hu1H2-2裸抗的體積排阻色譜圖。

圖2A示出02-1裸抗的疏水層析色譜圖；圖2B示出Hu1H2-2裸抗的疏水層析色譜圖。

圖3A示出實施例5製備的抗體-藥物複合體02-1-LP1中的體積排阻色譜圖；圖3B示出該抗體-藥物複合體02-1-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖4A示出實施例6製備的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的體積排阻色譜圖；圖4B示出該抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖5A示出實施例7製備的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的體積排阻色譜圖；圖5B示出該抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖6A示出實施例8製備的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2的體積排阻色譜圖；圖6B示出該抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2的疏水層析檢測圖譜。

圖7A示出實施例9製備的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3的體積排阻色譜圖；圖7B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3的疏水層析檢測圖譜。

圖8A示出對比例1製備的抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE的體積排阻色譜圖；圖8B示出該抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE的疏水層析檢測圖譜。

圖9A示出對比例2製備的抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE的體積排阻色譜圖；圖9B示出該抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE的疏水層析檢測圖譜。

圖10A示出對比例3製備的抗體-藥物複合體Rituximab-LP1的體積排阻色譜圖；圖10B示出抗體-藥物複合體Rituximab-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖11A示出對比例4製備的抗體-藥物複合體人類（Human）IgG-DXD的體積排阻色譜圖；圖11B示出抗體-藥物複合體人類IgG-DXD的疏水層析檢測圖譜。

圖12A示出對比例5製備的抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的體積排阻色譜圖；圖12B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖13A示出對比例6製備的抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的聚集體的體積排阻色譜圖；圖13B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的疏水層析檢測圖譜。

圖14A示出對比例7製備的抗體-藥物複合體人類IgG-LP2的體積排阻色譜圖；圖14B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP2的疏水層析檢測圖譜。

圖15A示出對比例8製備的抗體-藥物複合體人類IgG-LP3的體積排阻色譜圖；圖15B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP3的疏水層析檢測圖譜。

圖16A示出對比例9製備的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-DXD的體積排阻色譜圖；圖16B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-DXD的疏水層析檢測圖譜。

圖17示出A375細胞，HMOVII細胞，SK-MEL-2細胞及GAK細胞對抗體-藥物複合體02-1-LP1內吞的時間-螢光強度統計圖。

圖 18A1 示出黑色素瘤模型小鼠接受抗體 - 藥物複合體 Rituximab-vc-MMAE，02-1-vc-MMAE，Rituximab-LP1及02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖；圖 18A2 為圖 16A1 的局部圖，示出 02-1-LP1，

02-1-vc-MMAE及載體（Vehicle）組的腫瘤體積-時間變化曲線圖。

圖 18B1 示出黑色素瘤模型小鼠接受抗體-藥物複合體 Rituximab-vc-MMAE，02-1-vc-MMAE，Rituximab-LP1 及 02-1-LP1 治療後的體重-時間變化曲線圖；圖 18B2 為圖 18B1 的局部圖，示出 02-1-LP1，02-1-vc-MMAE 及載體組的體重-時間變化曲線圖。

圖 19 示出抗體-藥物複合體對頭頸部鱗癌細胞系 Detroit562 的體外殺傷曲線；圖 19A1 為圖 19 的局部圖，示出 Hu1H2-2-LP2，Hu1H2-2-LP1 及 Hu1H2-2-DXD 的體外殺傷曲線；圖 19A2 為圖 19 的局部圖，示出人類 IgG-LP2，人類 IgG-LP1 及人類 IgG-DXD 的體外殺傷曲線。

圖 20 示出頭頸部鱗癌模型小鼠接受抗體-藥物複合體 Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP2 以及人類 IgG-LP1 治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。

圖 21 示出頭頸部鱗癌模型小鼠接受抗體-藥物複合體 Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP2 以及人類 IgG-LP1 治療後的體重-時間變化曲線圖；

圖 22 示出肺癌模型小鼠接受抗體-藥物複合體 Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP1(DAR4)，Hu1H2-2-LP3，人類 IgG-LP1，人類 IgG-LP1（DAR4）及人類 IgG-LP3 治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。

圖 23 示出肺癌模型小鼠接受抗體-藥物複合體 Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP1(DAR4)，Hu1H2-2-LP3，人類 IgG-LP1，人類 IgG-LP1（DAR4）及人類 IgG-LP3 治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖 24A 示出 SCC-9 人頭頸鱗癌 CDX 模型接受抗體-藥物複合體 Rituximab-LP1 及 02-1-LP1 治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖 24B 示出 SCC-9 人頭頸鱗癌 CDX 模型接受抗體-藥物複合體 Rituximab-LP1 及 02-1-LP1 治療後的體重-時間變

化曲線圖。

圖25A示出Huh-7人肝癌CDX模型接受抗體-藥物複合體人類IgG-LP1及02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖25B示出Huh-7人肝癌CDX模型接受抗體-藥物複合體人類IgG-LP1及02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖26A示出LD1-0015-200617人食管鱗狀細胞癌PDX模型接受抗體-藥物複合體IgG-LP1及02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖26B示出LD1-0015-200617人食管鱗狀細胞癌PDX模型接受抗體-藥物複合體抗體-藥物複合體人類IgG-LP1及02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖27A示出LD1-0016-390730人食管腺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖27B示LD1-0016-390730人食管腺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖28A示出LD1-2025-362797人小細胞肺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖28B示出LD1-2025-362797人小細胞肺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖29A示出LD1-2009-362263人三陰乳腺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖29B示出LD1-2009-362263人三陰乳腺癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖30A示出LD1-0060-200770人膽管癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖30B示出LD1-0060-200770人膽管癌PDX模型接受抗體-藥物複合體02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

圖31A示出OV-10-0073人卵巢癌PDX模型接受抗體-藥物複合體人類IgG-LP1及02-1-LP1治療後的腫瘤體積-時間變化曲線圖。圖31B示出OV-10-0073人卵巢癌PDX模型接受抗體-藥物複合體人類IgG-LP1及02-1-LP1治療後的體重-時間變化曲線圖。

【實施方式】

【0033】 除非另有說明，否則在本說明書及申請專利範圍中使用的表示含量，濃度，比例，質量，體積，時間，溫度，厚度，技術效果等的所有數字在任何情況下均應理解為由術語“約”或“大致”修飾。因此，除非有相反的指示，否則以下說明書及所附申請專利範圍中列出的數字參數是近似值。對於本案所屬技術領域中具有通常知識者來說，其可以根據透過本揭露尋求獲得的期望性質及效果而變化，應根據有效數字位數及常規捨入方法或者本案所屬技術領域中具有通常知識者理解的方式來解釋每個數值參數。

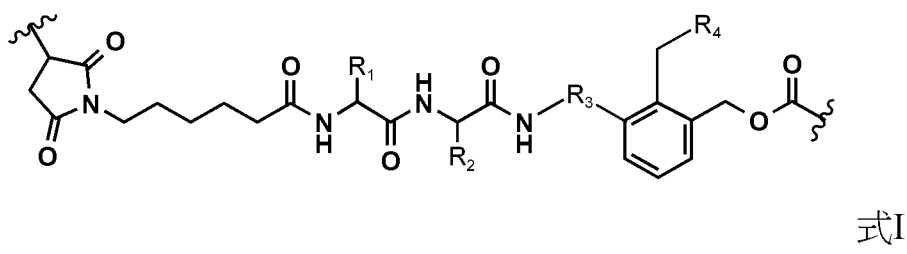
【0034】 儘管闡述了本揭露的廣泛範圍的數值範圍及參數是近似值，但是盡可能精確地提供了在具體實施例中闡述的數值。然而，任何數值都會固有地包含某些誤差，這些誤差由於在其相應的測試測量中發現的標準偏差而必然地導致的。本說明書給出的每個數值範圍將包括落入該較寬數值範圍內的每個較窄數值範圍，就如同這些較窄數值範圍均在本文中明確寫出一樣。

【0035】 ADC分子中，連接子作為連接抗體及有效負載的連接結構，是成功構建ADC分子的關鍵因素。就藥代動力學(PK)/藥效學(PD)及治療窗口而言，連接子的分子設計及性質是ADC發揮功效的關鍵決定因素。為了發揮最佳的效力，理想的連接子應該具備如下特性：(1)連接子血漿中足夠穩定，ADC分子可

以在血流中循環並定位到腫瘤部位而不至於過早裂解。不穩定的連接子會導致毒性有效負載過早釋放，並損害非目標健康細胞，從而造成全身中毒及不良反應。(2)連接子需要具備快速被切割的能力，一旦ADC被內化到靶腫瘤細胞中，能夠快速釋放出游離的毒性有效負載。(3)連接子設計還需考慮疏水性。疏水連接子與疏水有效負載的結合通常會促進ADC分子的聚集，不但不利於ADC藥效，還可能導致肝中毒或是引發不希望的免疫反應（Kyoji Tsuchikama et al., Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistrie, Protein Cell. 2018 Jan;9(1):33-46）。

【0036】 抗體-藥物複合體

本揭露提供了一種抗體-藥物複合體(ADC)，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合，包括抗體或其抗原結合片段，有效負載及式I所示的連接子，



所述式I所示連接子透過琥珀醯亞胺基與抗體或其抗原結合片段鏈間二硫鏈還原後的巰基部分形成硫醚鍵連接；

所述式I所示連接子的酯基中的羰基與有效負載中的胺基連接；

式I中，R₁，R₂各自獨立地選自氫，甲基或異丙基；

R₃表示-(CR₅HCONH)^{n¹}-(CH₂CONH)^{n²}-或單鍵，R₅選自氫或苯甲基，n¹表示0~2的整數，n²表示0~2的整數；

R₄表示甲胺基或-(NCH₃COCH₂)^{n³}-NCH₃COCH₃，n³表示1~20的整數。

【0037】術語“抗體-藥物複合體”或“ADC”是指本文所述的與有效負載共價連接的抗MUC18/CD44v7/8抗體或其抗原結合片段的複合體。通常，抗體-藥物複合體可以包括抗體或其抗原結合片段，有效負載，以及任選地抗體或其抗體結合片段與有效負載之間的連接子。ADC可以透過將有效負載遞送到抗體或其抗原結合片段靶向的MUC18及/或CD44v7/8細胞，特別是MUC18或CD44v4/8腫瘤細胞來提供治療效果。抗體-藥物複合體可以透過本領域已知的用於製備抗體-藥物複合體各種方法製備。

【0038】如本文所用，“抗體”是指與抗原結合的免疫球蛋白（Ig）家族的多肽。例如，天然存在的IgG型“抗體”是一種四聚體，其包含至少兩個透過二硫鍵相互連接的重（H）鏈及兩個輕（L）鏈。每個重鏈由重鏈可變區（在此縮寫為VH）及重鏈恆定區組成。重鏈恆定區由CH1，CH2及CH3三個結構域組成。每個輕鏈由輕鏈可變區（本文縮寫為VL）及輕鏈恆定區（本文簡寫為CL）組成。輕鏈恆定區由一個域組成。VH及VL區可以進一步細分為高變區，稱為互補決定區（CDR），中間穿插著更保守的區域，稱為框架區（FR）。每個VH及VL由三個CDR及四個FR組成，從胺基末端到羧基末端按以下順序排列：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。重鏈及輕鏈的可變區包含與抗原相互作用的結合結構域。

【0039】如本揭露所用，術語“抗原結合片段”是指抗體片段，包括雙抗體，Fab，Fab'，F(ab')₂，Fv片段，二硫鍵穩定的Fv片段（dsFv），（dsFv）₂，雙特異性dsFv（dsFv-dsFv'），二硫鍵穩定的雙抗體（ds雙抗體），單鏈Fv（scFv），scFv二聚體（二價雙抗體），由抗體的一部分形成的多特異性抗體，所述抗體包括一個或多個CDR，駱駝化單結構域抗體，奈米體，結構域抗體，二價結構域

抗體或與抗原結合但不包括完整抗體結構的任何其他抗體片段。抗原結合片段能夠與親本（parent）抗體或親本抗體片段（例如，親本scFv）結合的相同抗原。

【0040】“異構體”一詞是指分子式相同但結構不同的化合物，也稱為結構異構體，通常包括結構異構體及立體異構體。結構異構體是指由分子中原子的連接順序不同或鍵合性質不同引起的異構體，較佳為包括互變異構體。互變異構體是指原子在分子中兩個位置上快速移動產生的官能團異構體。立體異構體是指由分子中的原子或原子團以相同的順序及鍵相互連接，但在空間排列上不同而引起的異構體，較佳為包括光學異構體。光學異構體是指由於分子中不存在反軸對稱性而具有不同光學性質的立體異構體，如對映異構體（enantiomer）、非對映異構物（diastereomer）、外消旋體（racemate）及內消旋體（mesomer）。

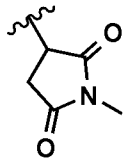
【0041】術語“前藥”是指透過改變藥物的化學結構而獲得的化合物，該化合物在體外是無活性的或活性較低的，並在體內透過酶促或非酶促轉化釋放活性藥物以發揮藥理作用。在本文中，前藥可以是ADC分子或有效負載。

【0042】術語“有效負載”包括從抗體-藥物複合體中釋放後具有細胞毒性或能夠殺死細胞的化合物，具有放射性標記的化合物、放射性核種或多肽，作為檢測標記或細胞殺傷作用的螢光團、生色團，顯像劑及/或金屬離子，調節機體免疫活性（包括活化或抑制作用）的化合物、核酸、多肽或蛋白質、酶、激素或核酸。

【0043】在一些理想情況下，抗體-藥物複合體中複合的有效負載幾乎沒有細胞毒性或細胞毒性小至有效治療劑量的ADC給藥後不會由於複合的有效負載引起受試者的全身毒性反應。所述有效負載可以是已經經過臨床驗證的用於治療特定疾病的藥物，或者為在臨床使用條件下具有可接受的藥理活性的化合

物、放射性核種、核酸、蛋白或多肽。

【0044】本揭露中，所述式I所示的端部琥珀醯亞胺基與抗體或其抗原結合片段鏈間二硫鍵還原後的巰基部分形成硫醚鍵連接。所述琥珀醯亞胺基為



，其在3位與抗體或其抗原結合片段鏈間二硫鍵還原後的巰基部分形成硫醚鍵連接。本揭露中，結構式中的帶有  的鍵表示與其他基團連接的化學鍵。

【0045】本揭露中，抗體或其抗原結合片段的二硫鍵包括鏈間二硫鍵及鏈內二硫鍵，較佳地，鏈間二硫鍵經過處理，例如，活化成為巰基後與連接子鏈合。抗體或其抗原結合片段中與連接子中的琥珀醯亞胺基進行化學鍵合的胺基酸包括賴胺酸、組胺酸、酪胺酸及半胱胺酸中的一種或其組合。任選地，抗體或其抗原結合片段中的化學結合胺基酸是半胱胺酸。在一些實施方式中，式I所示連接子可以連接於抗體的鉸鏈區、可變區及/或恆定區。

【0046】在一些實施方式中，式I所示的連接子中， R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示1~20的整數。所述 n^3 可以選取例如1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19及20中的任一整數。

【0047】在一些實施方式中， R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示8~15的整數。在一些實施方式中， R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示10~12的整數。在一些實施方式中， R_4 表示甲胺基。

【0048】本揭露中，式I所示的連接子中含有親水性胺基集團 R_4 ，其包含有聚肌胺酸基團或甲胺基，增加了抗體-藥物複合體的親水性。親水性胺基基團的引入有利於改善與疏水性有效負載複合的ADC的親水性。ADC分子的親水性提高有助於降低製備過程中ADC分子的聚集，進而提高抗體-藥物複合體的穩定

性、均一性及純度。

【0049】 在一些實施方式中，式I所示的连接子中， R_3 表示單鍵。

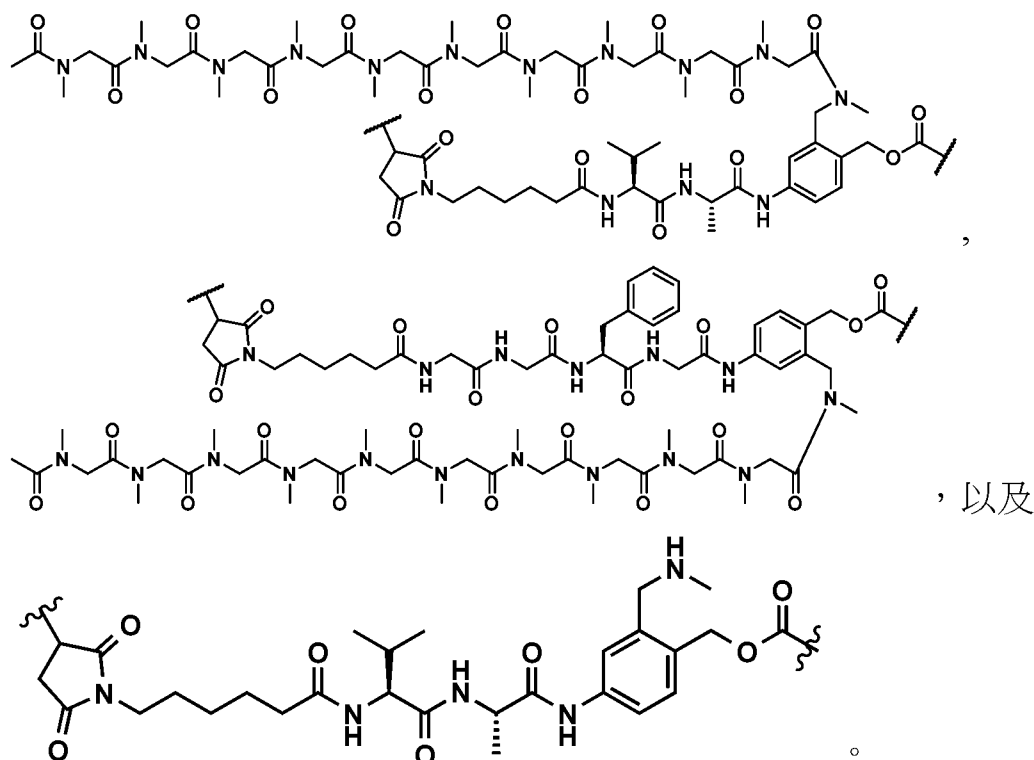
【0050】 在一些實施方式中， R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ ， R_5 為苯甲基， n^1 表示1~2的整數， n^2 表示1~2的整數。

【0051】 在一些實施方式中， R_3 表示 $-CR_5HCONH-$ ， $-CH_2CONH-$ ， $-CR_5H_2CONH-CH_2CONH-$ ， $-(CR_5HCONH)_2-CH_2CONH-$ ， $-CR_5HCONH-(CH_2CONH)_2-$ ，或者， $-(CR_5HCONH)_2-(CH_2CONH)_2-$ ； R_5 為苯甲基。

【0052】 在一些實施方式中， R_1 為氫。在一些實施方式中， R_1 為異丙基。

【0053】 在一些實施方式中， R_2 為氫。在一些實施方式中， R_2 為甲基。

【0054】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的连接子選自以下組



【0055】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的有效負載為含有放射性標記、螢光團、生色團、顯像劑及/或金屬離子為檢測標記的標記物，所述標記物包括但不限於化學合成的有機化合物、放射性核種、金屬錯合物或多肽。

其中，放射性標記是指用放射性核種取代化合物分子的一種或幾種原子而使它能被識別並可用作示蹤劑的標記化合物，包括胺基酸、多肽、蛋白質、碳水化合物、核苷酸、核苷、嘌呤、嘧啶、甾族、類脂化合物，以及醫學研究用的腫瘤抗原、激素、受體、維生素及藥物等。放射性核種通常為能自發放出射線的核種，包括但不限於氚、碘125、碘131、硫35、磷32及碳14。螢光團通常為包括共軛雙鍵的基團，當分子從激發態恢復到基態時，螢光團會發出螢光。生色團是指分子中含有的，能對光輻射產生吸收、具有躍遷的不飽和基團及其相關的化學鍵。顯像劑通常指在核醫學中指引入體內後能進行臟器、組織或分子顯像的放射性藥物。

【0056】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的有效負載為核酸，所述核酸可以為核糖核酸及/或去氧核糖核酸。

【0057】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的有效負載為激素、生長因子、凝血因子、纖維蛋白酶（例如能夠將前體藥物轉化為活性藥物的前體藥物轉化酶、核糖核酸酶）。

【0058】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的有效負載為免疫調節劑（包括具有影響免疫作用的細胞因子及趨化因子），具有生物活性的激動性抗體或拮抗性抗體。

【0059】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中有效負載為細胞毒性化合物。在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體中的有效負載具有抗腫瘤活性，或者為抗腫瘤藥物。所述有效負載選自DNA拓撲異構酶抑制劑或選自微管蛋白抑制劑。所述DNA拓撲異構酶抑制劑可以為拓撲異構酶I抑制劑或拓撲異構酶II抑制劑。

【0060】 本揭露中，術語“拓撲異構酶抑制劑”通常指抑制拓撲異構酶活性的化合物。拓撲異構酶I抑制劑的化合物對拓撲異構酶I具有活性，拓撲異構酶II抑制劑對拓撲異構酶II具有活性。一些化合物對拓撲異構酶I及拓撲異構酶II都有活性，稱為拓撲異構酶I/II抑制劑。

【0061】 術語“微管蛋白抑制劑”通常指抑制真核細胞微管系統，干擾細胞分裂及抑制細胞增殖的化合物。

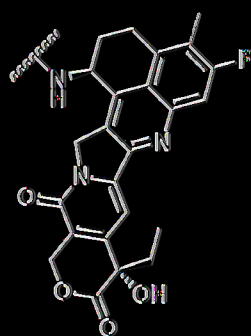
【0062】 在一些實施方式中，所述有效負載為具有拓撲異構酶抑制作用的喜樹鹼或其衍生物。術語“衍生物”指母體化合物分子中的原子或原子團被其他原子或原子團取代所形成的化合物，稱為該母體化合物的衍生物。術語“喜樹鹼及其衍生物”通常包括喜樹鹼（camptothecin）及喜樹鹼衍生物，喜樹鹼透過不可逆地抑制拓撲異構酶I發揮其藥理作用。所述喜樹鹼衍生物包括依喜替康（exatecan）、伊立替康（irinotecan）、托泊替康（topotecan）、魯托替康（lurtotecan）、斯蘭替康（silatecan）、依替立替康聚乙二醇（etirinotecan pegol）、TAS 103、9-胺基喜樹鹼（9-aminocamptothecin）、7-乙基喜樹鹼（7-ethylcamptothecin）、10-羥基喜樹鹼（10-hydroxycamptothecin）、9-硝基喜樹鹼（9-nitrocamptothecin）、10,11-亞甲二氧基喜樹鹼（10,11-methylenedioxycamptothecin）、9-胺基-10,11-亞甲基二氧基喜樹鹼（9-amino-10,11-methylenedioxycamptothecin）、9-氯-10,11-亞甲基二氧基喜樹鹼（9-chloro-10,11-methylenedioxycamptothecin）、7-(4-甲基哌嗪亞甲基)-10, 11-亞乙基二氧基-20(S)-喜樹鹼（7-(4-methylpiperazinomethylene)-10, 11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin）、7-(4-甲基哌嗪亞甲基)-10, 11-亞甲基二氧基-20(S)-喜樹鹼（7-(4-methylpiperazinomethylene)-10, 11-methylenedioxy-20(S)-camptothecin），

7-(2-(N-異丙基胺基)乙基)(20S)-喜樹鹼 (7-(2-(N-isopropylamino)ethyl) (20S)-camptothecin) 等及其立體異構體、鹽及酯。喜樹鹼及喜樹鹼類似物或衍生物的合成方法是已知的，並且在美國專利號5,244,903中進行了總結及闡述，該專利透過引用整體併入本文。

[(0063)] 在一些實施方式中，所述有效負載為具有微管蛋白抑制作用的奧瑞他汀或其衍生物，美登素或其衍生物。術語“奧瑞他汀及其衍生物”通常包括奧瑞他汀及奧瑞他汀衍生物，所述奧瑞他汀衍生物包括單甲基奧瑞他汀B (monomethyl auristatin B, MMAE) 及單甲基奧瑞他汀F (monomethyl auristatin F, MMAF)。術語“美登素及其衍生物”通常包括美登素及美登素衍生物，所述美登素衍生物包括美登素DM1，美登素DM2及美登素DM4。

[(0064)] 在一些實施方式中，所述有效負載為喜樹鹼衍生物依喜替康，作為多藥異構酶抑制劑能夠作用於整個細胞週期，對生長緩慢實體瘤具有強的穿透性及良好的療效。而且，細胞內標靶數量遠低於微管蛋白抑制劑的標靶數量，在ADC分子攜帶相同數量的有效負載進入細胞時能夠起到更好的殺傷效果。依喜替康 (Ixabecan) 分子不是P-gp的基質，有利於降低或緩解藥物耐藥的問題。

[(0065)] 在一些實施方式中，所述有效負載為式II所示的依喜替康，其透過環己烷環上胺基的氮原子與連接子連接，

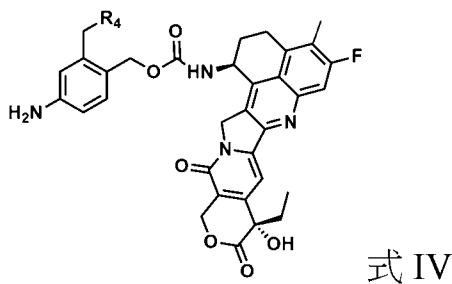


式II。

【0066】 依喜替康分子的結構具有剛性且親水性差，與現有技術中常用的 GGFG 四肽連接子連接後製備 ADC 時容易引起 ADC 分子間的聚合，不符合 ADC 藥物的開發要求（Bioorg. Med. Chem. Lett. 26 (2016) 1542-1545）。因此，連接子及有效負載的選擇及匹配對 ADC 藥物的安全性及穩定性是有影響的。

【0067】 不受任何理論的束縛，本揭露提供的抗體-藥物偶合物中，由於連接子中具有多個親水性基團，改善了連接子-有效負載結構中的親水性，可以在一定程度上降低由於疏水性有效負載引起的 ADC 分子的聚集、沉澱等現象。

【0068】 ADC 分子內吞進入細胞後，根據連接子是否降解釋放出有效負載或連接子（或部分連接子）-有效負載結構的化合物。在一些實施方式中，式 II 所示的依喜替康的環己烷環上胺基與式 I 所示的連接子的酯基中的羰基鍵合後形成包括胺基甲酸酯（carbamate）的連接子-有效負載結構。不受任何理論的束縛，本揭露提供的連接子-有效負載結構中，ADC 分子內吞進入細胞後，連接子經組織蛋白酶（例如，Cathepsin B）酶解後，形成如下式 IV 所示的中間體或活性代謝產物，



R_4 表示甲胺基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示 1~20 的整數。

【0069】 所述式 IV 所示的中間體或活性代謝產物中的 PABC (para-amino benzyloxycarbonyl) 基團繼而發生 1,6-消除並釋放出依喜替康(參見, Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 7492-7509.)。因此，本揭露提供的 ADC 分子中的連接子-有效負

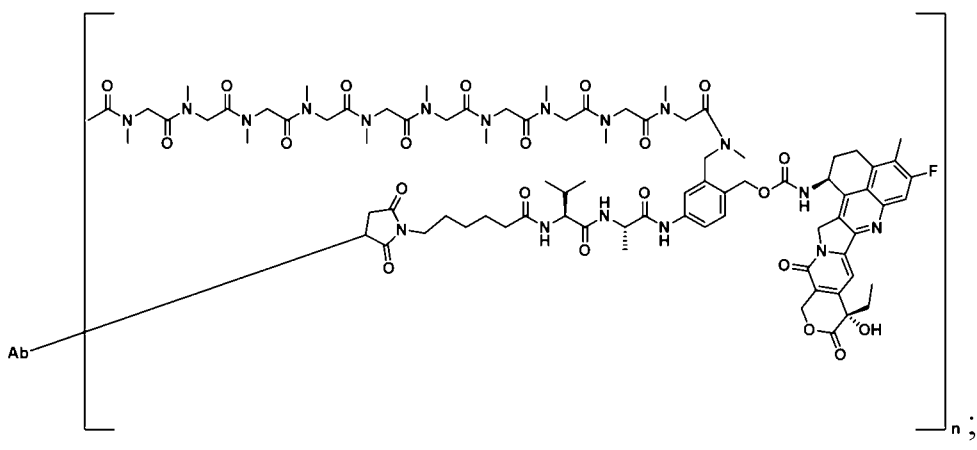
載結構具有良好的體內穩定性與生物活性。

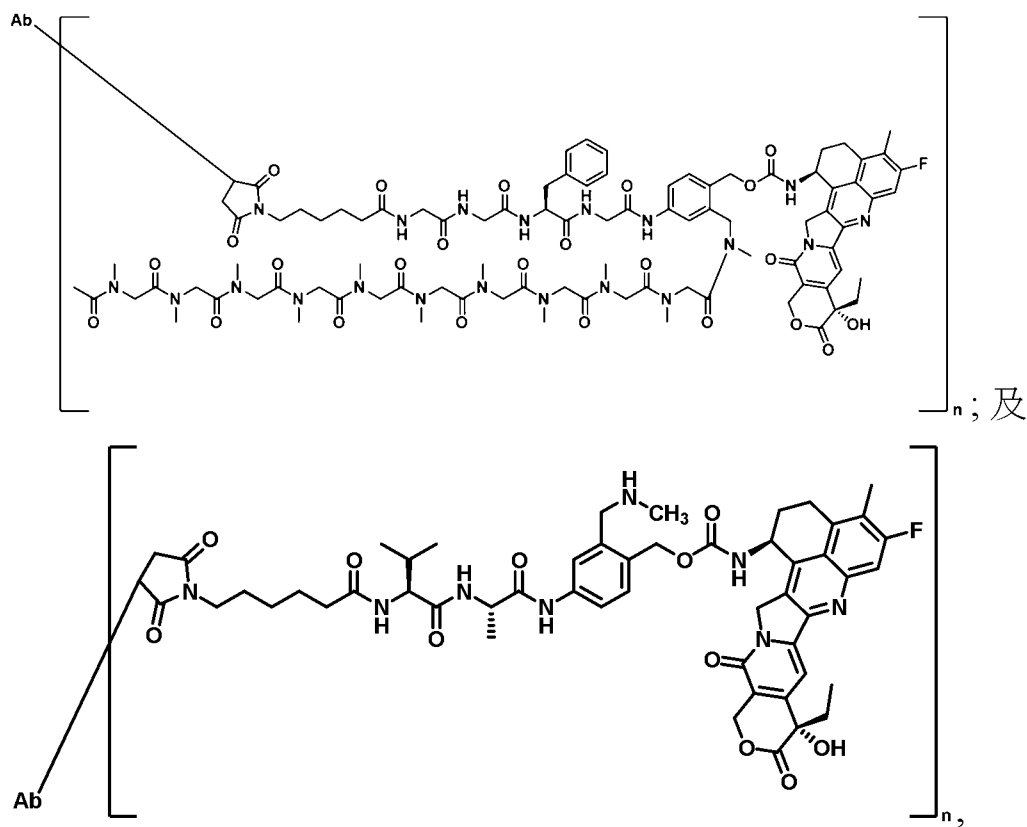
【0070】 連接子-有效負載結構中的酶切位點，不受任何理論的束縛，可以是連接子中的醯胺鍵，例如， R_2 表示的取代基所在的碳原子及 R_3 表示的基團之間的醯胺鍵，或者， R_3 表示的基團中的醯胺鍵。

【0071】 在一些實施方式中，抗體-藥物複合體中，複合的有效負載的分子數相對每一分子抗體或抗原結合的比值（藥物抗體比或DAR）為1~10。在一些實施方式中，DAR為1~2，2~4，4~6，2~8，4~8，4~10，6~10，7~10或者8~10，示例性的DAR值如4, 6, 7.8, 9.2或者9.92。

【0072】 DAR表示每個抗體分子的複合有效負載或藥物分子數的平均值，即複合藥物分子數的平均值。在抗體-藥物複合體中，DAR是影響其療效及安全性的關鍵因素。抗體-藥物複合體的生產是透過指定反應條件如反應所用的起始原料及試劑的量來進行的，以達到恆定的複合有效負載分子數。通常抗體-藥物複合體製備時會得到含有不同數量的複合有效負載分子的混合物。除非另有說明，本揭露中DAR定義為平均值，即複合有效負載或藥物分子的平均數。

【0073】 在一些實施方式中，所述抗體-藥物複合體包括具有以下結構中的任一種：





Ab表示抗體或抗原結合片段； n 與DAR相同。

【0074】 抗體或其抗原結合片段透過還原的反應性巰基與連接子連接，任選地，抗體或其抗體結合片段的鉸鏈區中的二硫鍵被還原為反應性巰基，然後連接至連接子。

【0075】 在一些實施方式中，抗體-藥物複合體中的抗體或其抗原結合片段靶向MUC18。MUC18，也稱為CD146或黑色素瘤細胞黏附分子(MCAM)，是一種跨膜糖蛋白，主要在細胞黏附中起作用。它在血管組織(包括血管平滑肌)內的內皮細胞中以可檢測的水平表現。值得注意的是，MUC18在人類惡性黑色素瘤中過度表現，特別是在轉移性病變及晚期原發性腫瘤中。

【0076】 在本揭露中，抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括重鏈（H）及輕鏈（L），重鏈及輕鏈的CDR如表1所示。

表1：CDR序列（採用IMGT方案編號）

抗體編號	H/L	CDR1	CDR2	CDR3
CL070336	H	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 1)	MHYSATP (SEQ ID NO: 11)	SRSLNWDVLDY (SEQ ID NO: 23)
	L	KSVRTSGYNY (SEQ ID NO: 34)	LAS	QHSREFPFT (SEQ ID NO: 46)
CL070335	H	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 1)	IHYSTTT (SEQ ID NO: 12)	SRSLNWDVLDY (SEQ ID NO:23)
	L	KSVRTSGYSY (SEQ ID NO: 35)	LAS	QHTREFPFT (SEQ ID NO: 47)
CL070333	H	GFTFTGY Y (SEQ ID NO: 2)	IYPGNVNT (SEQ ID NO: 13)	ARSGYFASSYEFAY (SEQ ID NO: 24)
	L	ENIYSY (SEQ ID NO: 36)	NAK	QHHYGTPLT (SEQ ID NO: 48)
CL070319	H	GYTFTEYA (SEQ ID NO: 3)	ITAYSGDA (SEQ ID NO: 14)	ARGLGRPNYGM DY (SEQ ID NO: 25)
	L	QSLN SRYQKNY (SEQ ID NO: 37)	FAS	QQHYGTPFT (SEQ ID NO: 49)
CL070321	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGGT (SEQ ID NO: 15)	ARSGYDDYYAFDY (SEQ ID NO: 26)
	L	SSVGY (SEQ ID NO: 38)	STS	HQWSSYPST (SEQ ID NO: 50)
CL070320	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGGT (SEQ ID NO: 15)	ARSGYDNYYALDY (SEQ ID NO: 27)
	L	STVGY (SEQ ID NO: 39)	STS	HQWSSYPCT (SEQ ID NO: 51)
CL070324	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGAT (SEQ ID NO: 16)	TRSGYDDYYALDY (SEQ ID NO: 28)
	L	SSVGY (SEQ ID NO: 38)	STS	HQWSNYPST (SEQ ID NO: 52)
CL070341	H	GFTFSTYG (SEQ ID NO: 5)	INSRASYT (SEQ ID NO: 17)	ARHRRDWDSYYAMDY (SEQ ID NO: 29)
	L	QSVLYNSNQKNY (SEQ ID NO: 40)	WAS	HQYLSSWT (SEQ ID NO: 53)
CL070350	H	GFTFN NYG (SEQ ID NO: 6)	INRGGSYT (SEQ ID NO: 18)	ARHRRDWDSYYAMDY (SEQ ID NO: 29)
	L	RSVLYNSNQKNY (SEQ ID NO: 41)	WAS	HQYLSSWT (SEQ ID NO: 53)
CL070349	H	GYSITSGFY (SEQ ID NO: 7)	INFGGTN (SEQ ID NO: 19)	ARGGNDGGFTY (SEQ ID NO: 30)
	L	SSVSSTY (SEQ ID NO: 42)	RTS	HQWSGYPYT (SEQ ID NO: 54)
CL070348	H	GYSITSDYA (SEQ ID NO: 8)	ITYSGST (SEQ ID NO: 20)	ARRIRRTGDWYFDV (SEQ ID NO: 31)
	L	QNLLNSVNQKNF (SEQ ID NO: 43)	WAS	QNDYIYPYT (SEQ ID NO: 55)
CL070370	H	GYTFTDYS (SEQ ID NO: 9)	INTETGEP (SEQ ID NO: 21)	VSYDYDAVS Y (SEQ ID NO: 32)

	L	QYVGAA (SEQ ID NO: 44)	WAS	QQYGNYRT (SEQ ID NO: 56)
J253	H	GYTFTSYD (SEQ ID NO: 10)	IFPGDGST (SEQ ID NO: 22)	ARYHFFDN (SEQ ID NO: 33)
	L	KSLLYKDGKTY (SEQ ID NO: 45)	LMS	QQLVEYPYT (SEQ ID NO: 57)

【0077】 如本揭露所用，術語“CDR”或“互補性決定區”是指重鏈及/或輕鏈可變區內的非連續抗原結合位點。CDR殘基編號遵循IMGT的命名法，參見Lefranc M. P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27: 55-77 (2003)，當相互比較時，定義包括胺基酸殘基的重疊或亞群。然而，應用任何一個定義來指代抗體或其抗原結合片段或其移植抗體或變體的CDR旨在本文定義及使用的術語的範圍內。

【0078】 在一些實施方式中，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包含編號為CL070336、CL070335、CL070333、CL070319、CL070321、CL070320、CL070324、CL070341、CL070350、CL070349、CL070348、CL070370或J253的抗體中的重鏈CDR及輕鏈CDR。

【0079】 在一些實施方式中，抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的HCDR1（重鏈CDR1）、如SEQ ID NO:16所示胺基酸序列的HCDR2（重鏈CDR2）、如SEQ ID NO:28所示胺基酸序列的HCDR3（重鏈CDR3）；及如SEQ ID NO:38所示胺基酸序列的LCDR1（輕鏈CDR1），胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO:52所述胺基酸序列的LCDR3（輕鏈CDR3）。

【0080】 在一些實施方式中，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括與表2中示出的參考抗體序列中的任一VH具有至少85%或者90%同一性的重鏈可變區（VH，heavy chain variable region），及/或，與表2中示出的參考抗體序列中的任一VL具有至少85%或者90%同一性的輕鏈可變區（VL，light chain variable

region)。

【0081】所述同一性可以使用Karlin及Altschul Proc .Natl .Acad .Sci .USA 87:2264-68,1990 的演算法來確定，該演算法如在 Karlin 及 Altschul Proc .Natl .Acad .Sci .USA 90:5873-77 ,1993中進行了修改。此類演算法併入至 Altschul等人，J .Mol .Biol .215:403-10 ,1990的NBLAST及XBLAST程式(2.0版)中。可以用BLAST程式(分數=50，字長=3)來進行BLAST蛋白質搜索，以獲得與感興趣的蛋白質分子同源的胺基酸序列。在兩個序列之間存在缺口的情況下，可以如在Altschul等人，Nucleic Acids Res .25(17):3389-3402 ,1997中所描述的那樣採用Gapped BLAST。當採用BLAST及Gapped BLAST程式時，可以使用各自程式(例如，XBLAST及NBLAST)的預設參數。

【0082】在一些實施方式中，在框架區內不存在突變或存在不影響抗體可變區與抗原結合的突變，該突變可以提高抗體與抗原的結合親和力，或者保持大致不變。在一些實施方式中，抗MUC18或CD44v7/8抗體或其抗原結合片段還包含保守修飾的變體，所述保守修飾的變體包括對多肽序列的單獨取代、缺失或添加，其導致胺基酸被化學上相似的胺基酸取代。提供功能相似的胺基酸的保守置換表是本領域熟知的。這種保守修飾的變體是對多態性變體、種間同源物及等位基因的補充且不排除這些變體。以下八組含有相互保守取代的胺基酸：1) 丙胺酸 (A)、甘胺酸 (G)；2) 天冬胺酸 (D)、谷胺酸 (E)；3) 天冬醯胺 (N)、穀氨醯胺 (Q)；4) 精胺酸 (R)、賴胺酸 (K)；5) 異亮胺酸 (I)、亮胺酸 (L)、蛋胺酸 (M)、纈胺酸 (V)；6) 苯丙胺酸 (F)、酪胺酸 (Y)、色胺酸 (W)；7) 絲胺酸 (S)、蘇胺酸 (T)；及 8) 半胱胺酸 (C)、甲硫胺酸 (M) (參見，例如，Creighton, Proteins (1984))。在一些實施方式中，術語“保守序列修飾”用於指不顯著影響或改變包含胺基酸序列

的抗體的結合特徵的胺基酸修飾。

【0083】 表2 參考抗體序列

抗體編號	VH	VL	Antibody Code 抗體編號	VH	VL
CL070336	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 59	CL070341	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73
CL070335	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 61	CL070350	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75
CL070333	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63	CL070349	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 77
CL070319	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	CL070348	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 79
CL070321	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	CL070370	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 81
CL070320	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 69	J253	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83
CL070324	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	/	/	/

【0084】 在一些實施方式中，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包含的 VH序列與表3中示出的VH序列至少具有85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%同一性；VL序列與表3中示出的VL序列至少具有85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%同一性。表3中所示的抗體分別是CL070324及J253的人源化序列。

【0085】 表3 人源化抗體序列

抗體編號	VH	VL
人源化 CL070324 (02-1)	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 85
人源化 hJ253-03-1	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 87
人源化 hJ253-03-7	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 89

【0086】 在一些實施方式中，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括如 SEQ ID NO: 84所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 85所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列。

【0087】 在一些實施方式中，抗MUC18抗體或其抗原結合片段是人源化 CL070324、人源化 hJ253-03-1、或人源化 hJ253-03-7，或其保守變體。

【0088】 其中，SEQ ID NO: 1~89所示的抗MUC18抗體的CDR序列及抗體

可變區序列已記載在美國專利US2022041749（SEQ ID NO: 8~90，SEQ ID NO: 1~6）中，該專利透過引用整體併入本揭露。

【0089】 在一些實施方式中，所述抗體或抗原結合片段靶向CD44v7/8。CD44，也被稱為HCAM(歸巢細胞黏附分子)、Pgp-1(吞噬糖蛋白-1)、Hermes抗原、淋巴細胞歸巢受體、ECM-III或HUTCH-1，是一種細胞表面糖蛋白，其主要在細胞黏附及細胞間相互作用中發揮功能。已知CD44的若干剪接變體，包括CD44 v7/8，其是一種包含外顯子7及外顯子8的變體。CD44是透明質酸的蛋白受體，並且已進一步顯示與骨橋蛋白、膠原蛋白、基質金屬蛋白酶及其它類似配體結合或以其它方式相互作用。

【0090】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段特異性結合人CD44 v7/8中包括QAGRRMDMDSSHSIT（SEQ ID NO: 90）的胺基酸序列的結合肽。

【0091】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段不結合人CD44 v7/8中 PISHPMGRGHQAGRR（SEQ ID NO: 91）及 / 或 SHSITLQPTANPNTG（SEQ ID NO: 92）的胺基酸序列的結合肽。

【0092】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段的重鏈包括：如SEQ ID NO: 93所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 94所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 95所示胺基酸序列的重鏈CDR3；輕鏈包括：如SEQ ID NO: 96所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為RAN的CDR2，如SEQ ID NO: 97所示胺基酸序列的輕鏈CDR3。抗CD44v7/8抗體或其抗原結合片段的CDR序列如表4所示：

表4 CDR序列(採用IMGT方案編號)

抗體		CDR1	CDR2	CDR3
HIS1H2-2	重鏈	GYTFTNYW (SEQ ID NO: 93)	IYPSDSYT (SEQ ID NO: 94)	TKWGDSDY (SEQ ID NO: 95)
	輕鏈	QDINRY (SEQ ID NO: 96)	RAN	LQYDEFPFT (SEQ ID NO: 97)

【0093】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括與表5中示出的參考抗體序列的VH具有至少85%或者90%同一性的VH，及/或，與表5中示出的參考抗體序列的VL具有至少85%或者90%同一性的VL。

【0094】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括與表5中示出的參考抗體人源化序列的HIS1H2-2a或HIS1H2-2的VH具有至少具有85%，90%，92%，94%，95%，96%，97%，98%，99%的同一性的VH；及與HIS1H2-2a或 HIS1H2-2的VL序列具有至少85%，90%，92%，94%，95%，96%，97%，98%，99%的同一性的VL。

【0095】 表5 抗CD44 v7/8抗體的輕/重鏈可變區序列

抗體編號	VH	VL
參考抗體 HIS1H2-2	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 99
人源化抗體 HIS1H2-2a	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 101
人源化抗體 HIS1H2-2	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 104

【0096】 在一些實施方式中，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 101或SEQ ID NO: 104所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

【0097】 結合肽序列，不結合的肽序列，CDR序列及SEQ ID NO: 90~101所示的抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段的抗體可變區序列已記載在PCT專利申請WO2020159754（SEQ ID NO: 2~14）中，該專利透過引用整體併入本文。

【0098】 本揭露提供的抗體-藥物複合體對腫瘤細胞顯示出優異的殺傷活

性，並且對具有高表現MUC18或CD44v7/8的腫瘤細胞顯示極高的殺傷活性。

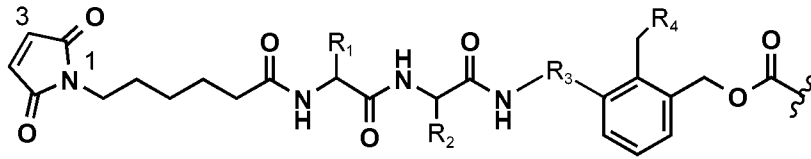
【0099】 本揭露提供的抗體-藥物複合體顯示出優異的抗腫瘤活性。在一些實施方案中，抗體-藥物複合體對患有具有不同MUC18表現水平（低、中、高）的腫瘤性疾病的受試者顯示出優異的抗腫瘤活性。MUC18的表現水平可以透過本案所屬技術領域中具有通常知識者已知的H-Score方法來測量。分數範圍為0-300，分數越高，表現越高。例如，低（H-Score=10-99）、中等（H-Score=100-99）及高（H-Score=200-300）。此外，抗體-藥物複合體在體內沒有顯示出明顯的不良反應。

【0100】 需要說明的是，本揭露的抗體-藥物複合體由於在大氣中放置、或進行重結晶而有吸收水分、保持吸附的水的情況、或成為水合物的情況，這樣的含有水的化合物及鹽也包含在本揭露之內。另外，本揭露中也包括用各種放射性或非放射性同位素標記的同位素變體化合物。構成本揭露的抗體-藥物複合體的原子中的一種以上，也可以含有非天然比例的原子同位素。作為原子同位素，可舉出例如氘(2H)、氚(3H)、碘-125(125I)或碳-14(14C)等。另外，本揭露化合物可以用例如氚(3H)、碘-125(125I)或碳-14(14C)之類的放射性同位素進行放射性標記。經放射性標記的化合物作為治療或預防劑、研究試劑例如檢驗試劑、及診斷劑、例如體內圖像診斷劑。對於本揭露的抗體-藥物複合體的所有同位素變體而言，無論是否具有放射性，均包含於本揭露的範圍內。

【0101】 製備方法

本揭露提供了一種抗體-藥物複合體的製備方法，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、其溶劑化物或其組合，以及藥學上可接收的賦形劑，包括以下步驟：抗體或其抗原結合片段經還原處理後鏈間二硫鍵至少部分被還

原，與連接子-有效負載中的式III所示連接子的馬來醯亞胺-N-基的3位碳原子進行反應，



式III

所述式III所示連接子的酯基中的羰基與抗體-藥物複合體中有效負載的胺基連接；

R₁、R₂各自獨立地選自氫、甲基或異丙基；

R₃表示-(CR₅HCONH)n¹-(CH₂CONH)n²-或單鍵，R₅選自氫或苯甲基，n¹表示0~2的整數，n²表示0~2的整數；

R₄表示甲胺基或-(NCH₃COCH₂)n³-NCH₃COCH₃，n³表示1~20的整數。

【0102】 在抗體-藥物複合體中，鏈間二硫鍵被還原為巯基，然後與連接子-有效負載中由式III表示的連接子的反應基團反應。在很多實際情況下，帶有有效負載的上述式III所示結構的連接子連接到具有反應活性巯基的同一個抗體或其抗原結合片段分子上。在一些實施方式中，抗體或其抗原結合片段與還原劑反應如二硫蘇糖醇（DTT）、2-巯基乙醇或三(2-羧乙基)鹽酸鹽磷（TCEP）反應，使抗體或其抗原結合片段上的二硫鍵形成活性巯基。所述還原劑的用量可以為抗體或其抗原結合片段莫耳數的0.3~10倍當量，例如，1~10, 3~10, 5~10, 7~10倍抗體或其抗原結合片段莫耳當量。

【0103】 在一些實施方式中，所述方法還包括：抗體或其抗原結合片段在含有螯合劑的緩衝溶液中與還原劑反應，之後加入連接子-有效負載的溶解液，進行反應。連接子-有效負載具體為式III所示連接子及有效負載鍵合後形成的化

合物，其中有效負載中的胺基（一級胺基）與III所示連接子的酯基中的羰基連接。在連接子-有效負載中，有效負載選自[抗體-藥物複合體]部分中描述的有效負載。術語“螯合劑”是指能夠與金屬原子或離子透過配位鍵結合，生成具有環狀結構的錯合物。

【0104】 在一些實施方式中，還原劑在含有螯合劑的緩衝溶液中與抗體或其抗原結合片段反應，得到鏈間二硫鍵被部分或者完全還原的抗體或其抗原結合片段。所述螯合劑包括但不限於乙二胺四乙酸(EDTA)及二乙三胺五乙酸(DTPA)。螯合劑的使用濃度為1 mM~20 mM，例如，2 mM~20 mM，5 mM~20 mM，8 mM~20 mM，1 mM~15 mM或者1 mM~10 mM。所述緩衝溶液的成分可以是本領域常用的緩衝鹽，例如磷酸鈉、硼酸鈉、乙酸鈉或者類似緩衝鹽。

【0105】 抗體或其抗原結合片段與還原劑的反應在調節的pH條件下進行。在一些實施方式中，抗體或其抗原結合片段與還原劑反應時溶液的pH為5~9，可選為pH 6~8，pH 6~7，pH 6.5~7.5或者pH 7~8，例如在溶液約為pH7時進行反應。可以使用具有酸性或鹼性的化學物質調節溶液pH值，示例性的具有酸性或鹼性的化學物質包括醋酸、鹽酸、磷酸、硫酸、碳酸氫鈉、碳酸鈉、氫氧化鈉及三乙胺。

【0106】 抗體或其抗原結合片段與還原劑的反應在調節的溫度條件下進行，示例性的反應溫度為-10~40°C，-10~10°C，5~40°C，10~40°C，25~40°C，30~40°C，35~38°C，如約37°C。

【0107】 連接子-有效負載可以溶解於有機溶劑，所述有機溶劑選自二甲亞砜（DMSO，dimethyl sulfoxide）、二甲基甲醯胺（DMF，dimethylformamide）、二甲基乙醯胺（DMA，dimethylacetamide）及N-甲基-2-吡咯烷酮（NMP，

N-methyl-2-pyrrolidone) 中的任意一種或組合。

【0108】 在一些實施方式中，連接子-有效負載的溶解液以1%至20%體積比的量加入到經還原處理或含有具有活性巰基的抗體或其抗原結合片段的緩衝溶液中，基於抗體或其抗原結合片段緩衝液的體積計。在一些實施方式中，加入的連接子-有效負載的溶解液的體積比為1~20%，2~20%，5~20%，10~20%，15~20%，1~18%，1~15%，1~13%，1~10%或者5~15%，基於抗體或其抗原結合片段緩衝液的體積計。

【0109】 在一些實施方式中，連接子-有效負載的與抗體或其抗原結合片段的莫耳用量比值為4~20，可選為8~20。在一些實施方式中，連接子-有效負載的與抗體或其抗原結合片段的莫耳用量比值為10~20，14~20，16~20或者18~20。

【0110】 在一些實施方式中，抗體或其抗原結合片段與連接子-有效負載進行反應的溫度為-10~40°C 或者0~37°C。在一些實施方式中，反應溫度為-10~10°C，5~40°C，5~37°C，10~37°C，10~25°C或者15~30°C。

【0111】 在一些實施方式中，抗體或其抗原結合片段與連接子-有效負載進行反應的時間為0.5~2小時。在一些實施方式中，抗體或其抗原結合片段與連接子-有效負載進行反應的時間為0.5~1.75小時，0.5~1.5小時，0.5~1.25小時，0.75~2小時或者1~2小時。

【0112】 該反應可以透過使用含巰基的試劑使未反應的連接子-有效負載的反應活性失活而終止。所述含有巰基的試劑包括但不局限於半胱胺酸或者N-乙醯-(L)-半胱胺酸(NAC)。更具體的說，向反應溶液中加入莫耳當量為連接子-有效負載莫耳當量1~2倍的含有巰基的試劑，並在室溫(10~30°C)下培養10~30分鐘，如此可以終止反應。

【0113】 在抗體或抗原結合片段具有巰基的情況下，抗體-藥物複合體還可以透過使用已知方法反應化合物獲得(例如，可透過專利公開文獻US2016/297890中描述的方法獲得(例如，可透過段落[0336]至[0374]中描述的方法獲得))。具有巰基的抗體或其抗原結合片段可以透過本案所屬技術領域中具有通常知識者熟知的方法獲得(Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996))。

【0114】 透過上述製備方法可以獲得本揭露提供的抗體-藥物複合體。在一些實施方式中，製備的抗體-藥物複合體經過純化處理，所述純化處理包括但不限于凝膠過濾，例如使用凝膠柱進行純化。

【0115】 套組

本揭露提供了一種套組，其包括上述抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合。套組可以進一步包括本揭露所述的抗體-藥物複合體在本揭露的方法中的使用說明，例如在治療腫瘤性疾病的方法中的使用說明。

【0116】 合適的容器包括，例如，瓶子、小瓶（例如，雙腔小瓶）、注射器（例如單腔或雙腔注射器）及試管。容器可以由諸如玻璃或塑膠的各種材料形成。容器中裝有製劑。容納製劑的容器可以是一次性小瓶或多次用小瓶，允許重複施用重構製劑。

【0117】 套組可以進一步包括標籤或包裝插入物，其在容器上或與容器有關，可以標示複溶及/或使用製劑的用法說明。標籤或包裝插入物可以進一步標示該製劑用於或打算用於皮下、靜脈內（例如，靜脈內輸注），或用於治療受試者的腫瘤性疾病（例如，癌症）的其他給藥模式。套組還可以包括從商業、

治療及用戶的角度出發所需的其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針頭、注射器及帶有使用說明的包裝插入物。

【0118】藥物組合物

本揭露提供了一種藥物組合物，包括上文所述的抗體-藥物複合體，或其異構體，同位素變體，藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合，以及藥學上可接受的輔料。

【0119】本揭露的抗體-藥物複合體或藥物組合物可以根據藥學上可接受的輔料的具體適用形式、理化特徵等，選擇合適的給予方式。在一些實施方式中，所述藥物組合物可以以冷凍乾燥製劑或液狀製劑的形式形成製劑，所述製劑中可以含有本領域中適當的製劑添加物。例如，上述藥物組合物中，代表性地，含有1種以上的藥學載體，例如滅菌的液體，如水及油(包含石油、動物、植物、或合成來源的油(例如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等))。在靜脈內給予上述藥物組合物的情況下，水是更具有代表性的載體。另外，食鹽水溶液、葡萄糖水溶液及甘油溶液也可作為液體載體，尤其是可用於注射用溶液。適當藥學賦形劑在該領域中是已知的。根據需要，上述組合物中還可以含有微量的潤濕劑或乳化劑、或pH緩衝化劑。所述藥物組合物的給藥方式通常選用腸胃外的給藥，可以為皮內、肌肉內、腹腔內、靜脈內或皮下注射，但不限於這些，例如可以利用輸液或快速注射(bolus injection)進行給予藥物。參見例如，the Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000), 其全部內容透過引用併入本文。 Remington 's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), 其全部內容透過引用併入本文。

【0120】本發明的藥物組合物，可以是僅含有本申請的抗體－藥物複合體的藥物組合物，也可以是含有抗體－藥物複合體及至少一種其他治療劑（例如癌治療劑）的藥物組合物。在一些實施方式中，也可將本揭露的抗體－藥物複合體與其他癌治療劑一同給予以增強抗癌效果。出於這種目的使用的其他抗癌劑，可與抗體－藥物複合體同時地、分別地或序貫地向個體給予，也可改變給予間隔而進行給予。示例性的其他癌治療劑如紫杉醇、順鉑、長春鹼等，只要是具有抗腫瘤活性的藥劑，就不受限制。

【0121】關於本揭露，活性劑或包含活性劑的藥物組合物可以透過任何合適的給藥途徑給藥於受試者。例如，活性劑可以透過胃腸外、鼻腔、口腔、肺部、局部、陰道或直腸給藥而給藥於受試者。提供以下關於給藥途徑的討論僅僅是為了說明各種實施方案，而不應被解釋為以任何方式限制範圍。

【0122】在一些實施方案中，將本揭露的抗體-藥物複合體給予受試者。如本文所用，術語“受試者”是指人類及非人類動物。非人類動物包括所有脊椎動物，如老鼠、兔子、貓、狗、豬、猴子、黑猩猩、大猩猩等。在一些實施例中，受試者是人。

【0123】使用方法

本揭露提供了抗體-藥物複合體、透過上述方法製備的抗體-藥物複合體、包括抗體-藥物複合體的藥物組合物或本文提供的套組在製備用於診斷、預防及治療腫瘤性疾病的治療劑中的用途。

【0124】腫瘤性疾病包括良性腫瘤及惡性腫瘤（例如癌症）。在一些實施方式中，良性腫瘤及惡性腫瘤表現MUC18及/或CD44v7/8。

【0125】應用抗體-藥物複合體的腫瘤性疾病的類型不限於上述癌症細

胞，只要其是表現抗體-藥物複合體的抗體或其抗原結合片段可識別的蛋白質的癌症細胞即可。在一些實施方案中，腫瘤性疾病是表現MUC18及/或CD44v7/8的實體瘤。

【0126】 在一些實施方式中，腫瘤性疾病包括黑色素瘤、咽癌症、三陰乳腺癌、食管腺癌、肝癌、卵巢癌症、子宮頸癌症、尿路上皮癌症、膀胱神經內分泌腫瘤、小細胞肺癌癌症、非小細胞肺癌、皮膚鱗狀細胞癌，膽管癌、轉移性胰腺癌、肺鱗狀細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌及/或食管鱗狀細胞癌。

【0127】 本揭露提供抗體-藥物複合體、透過上述方法製備的抗體-藥物複合體、包括抗體-藥物複合體的藥物組合物，或套組在製備靶向MUC18及/或CD44v7/8的治療劑中的用途。

【0128】 本揭露提供了診斷、預防及治療腫瘤性疾病的方法，包括給受試者施用治療有效量的上述治療劑。

【0129】 如本文所用，術語“治療有效量”是指本文所述的ADC足以誘導預期效果的活性成分的量，包括但不限於本文所定義的疾病治療。抗體-藥物複合體的治療劑量根據所治療的特定病況、病況的嚴重程度、個體患者參數(包括年齡、身體狀況、大小、性別及體重)、治療持續時間、同時療法(如有)的性質、具體的施用途徑、以及健康執業醫師的知識等因素而變化。在一些實施方式中，可以在已給予一次或多次抗體或其抗原結合片段施用的個體中根據經驗來確定上述抗體-藥物複合體的劑量。在一些實施方式中，抗體-藥物複合體的可接受的治療劑量為0.1~30 mg/kg，0.5~30 mg/kg，1~30 mg/kg，1~25 mg/kg，0.1~25 mg/kg，0.1~20 mg/kg，1~20 mg/kg或者0.5~20 mg/kg。在一些實施方式中，給藥頻率為每12小時一次、每天一次、每週一次、每2週一次、每隔4週一次，每隔5週一次、

每隔6週一次、每隔7週一次、每隔8週一次、每隔9週一次或每隔10週一次；或每月一次、每2個月一次或每3個月一次，或更長時間。所述治療劑量及給藥頻率可以隨治療方案的變化而改變。

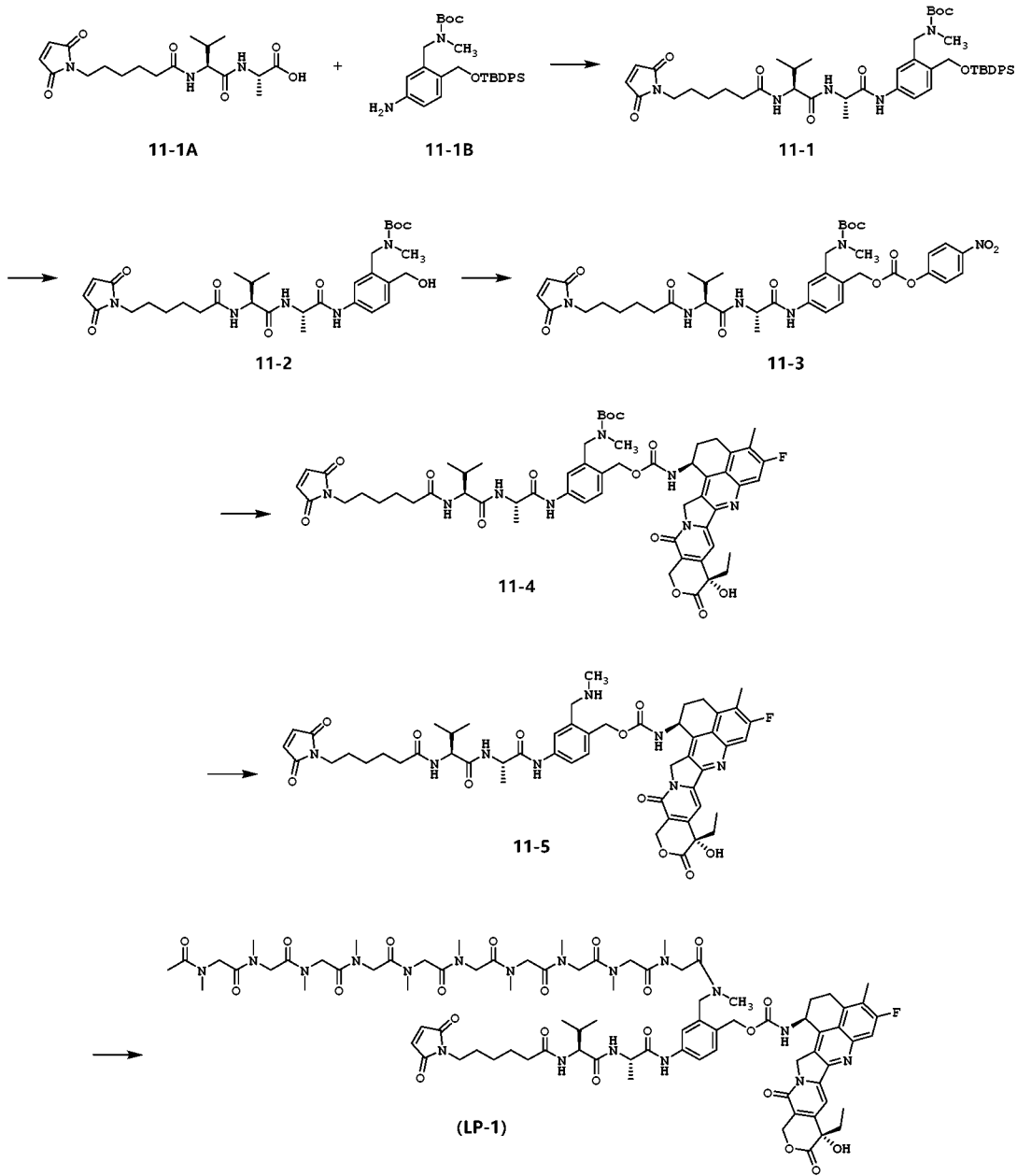
【0130】 本揭露的各種實施方式及較佳項可以相互組合，只要它們彼此之間不是內在矛盾的，由此組合而形成的各種實施方式都視為本案揭露的一部分。

【0131】 下面將結合實施例以例證的方式更清楚、明確地闡述本揭露的技術方案。應該理解的是，這些實施例僅用於例證的目的，絕不旨在限制本揭露的保護範圍。本揭露下面將結合實施例以例證的方式更清楚、明確地闡述本揭露的技術方案。的保護範圍僅透過請求項來限定。

【0132】 實施例

透過以下所示的實施例具體地說明本揭露，但本揭露不受它們的限制。另外，不對這些實施例進行任何方式的限定性解釋。另外，本說明書中，沒有特別記載的試劑、溶劑及起始材料可由市售的供給源容易地獲得。

【0133】 實施例1：製備化合物LP-1



【0134】 步驟1: 合成中間體11-1

化合物11-1A (Mc-Val-Ala-OH, 購自上海皓元生物醫藥科技有限公司, 2.4 g, 6.29 mmol) 以及化合物11-1B (3.18 g, 6.29 mmol) 混合溶液中, 在室溫下加入DCM (二氯甲烷):MeOH (甲醇) (v:v=2:1, 90 mL)以及 EEDQ (2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氫喹啉) (1.86 g, 7.55 mmol)。將反應溶液在室溫攪拌24小時, 真空除去溶劑, 粗殘餘物透過快速色譜法 (flash chromatography)進一步純化, 得到化合物11-1 (3.9g, 71%)。LC-MS (ESI, m/z) : 868.49 (M+H)。

【0135】 步驟2: 合成中間體11-2

將化合物11-1 (2 g, 2.3 mmol) 溶解於無水四氫呋喃THF (50 mL) 中，在氬氣環境下於0°C加入氟化氫-吡啶 (4.6 g, 46 mmol)，然後將反應混合物於0°C攪拌，持續2個小時。透過加入水淬滅反應 (quenching reaction)，用DCM萃取，乾燥有機相，濃縮。殘餘物透過矽膠色譜法純化，得到化合物11-2 (1.1g, 76%)。LC-MS (ESI, m/z) : 630.31 (M+H)。

【0136】 步驟3: 合成中間體11-3

將化合物11-2 (700 mg, 1.11 mmol) 溶解在無水N,N-二甲基甲醯胺DMF (4 mL) 中，在氬氣環境下於室溫加入 N,N-二異丙基乙胺DIPEA (0.39 ml, 2.23 mmol) 以及4,4'-碳酸二硝基二苯酯(406 mg, 1.33 mmol)，然後將反應混合物在環境溫度下攪拌過夜。濃縮除去溶劑，獲得甲基三級丁基醚MTBE沉澱產物，過濾收集黃色固體，乙醚洗滌，乾燥得到化合物11-3。LC-MS (ESI, m/z) : 795.41 (M+H)。

【0137】 步驟4: 合成中間體11-4

將化合物11-3 (300 mg, 0.44 mmol)溶解於無水DMF (4 mL)中，加入乾燥的吡啶(1 mL)，然後加入甲磺酸依喜替康 (購自上海皓元生物醫藥科技有限公司, 234 mg, 0.44 mmol)及1-羥基苯並三唑HOBt (60mg, 0.44mmol)。將反應混合物在氬氣下於室溫攪拌過夜。產物透過pre-HPLC純化，得到中間體11-4 (230mg, 48%)。LC-MS (ESI, m/z) : 1091.53 (M+H)。

【0138】 步驟5: 合成中間體11-5

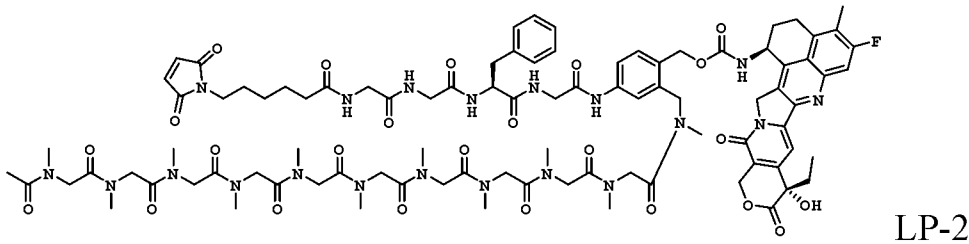
將化合物11-4 (200mg,0.183mmol) 溶於1mL無水DCM中，0°C加入300μL TFA (trifluoroacetic acid)，反應混合物室溫攪拌30min，濃縮除去溶劑，得到中間體11-5的TFA鹽，無需進一步純化即可用於下一步。LC-MS (ESI, m/z) : 991.47

(M+H)。

【0139】 步驟6: 合成化合物LP-1

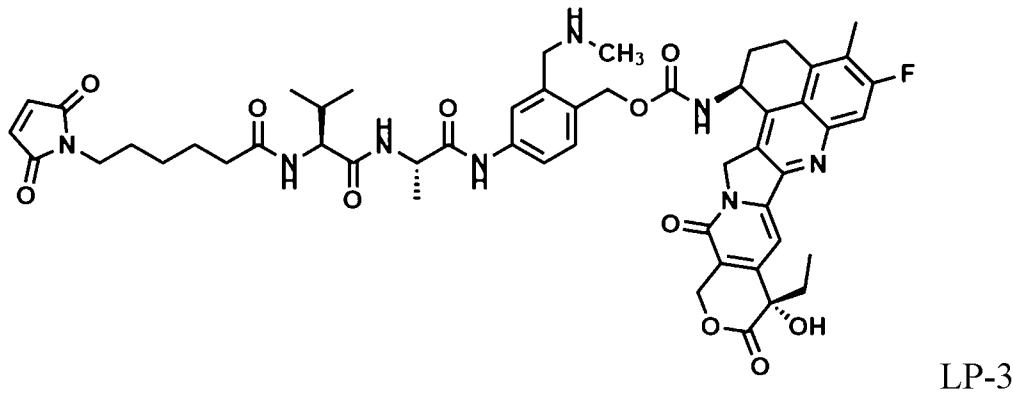
將化合物11-5 (120 mg, 0.109 mmol) 溶解在1mL無水DMF中，加入Ac-Sar10-COOH (N-Acetyl Decasarcosine，84 mg, 0.109 mmol)，然後加入2-(7-氮雜苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯HATU (50 mg, 0.130 mmol) 及DIPEA (38μL，0.22 mmol)，將反應混合物在室溫攪拌過夜，濃縮除去溶劑，粗產物透過製備型高效液相色譜(pre-HPLC)純化，得到化合物LP-1 (74 mg，38%)。LC-MS (ESI，m/z)：1743.85 (M+H)。

【0140】 實施例2：製備化合物LP-2



化合物LP-2的合成按照化合物LP-1的步驟，將起始原料11-1A替換為Mc-GGFG-OH（購自上海皓元生物醫藥科技有限公司, GGFG表示由透過肽鍵連接的甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸組成的胺基酸序列），得到化合物LP-2，為米色無定形固體。LC-MS (ESI, m/z): 1891.90 (M+H)。

【0141】 實施例3：製備化合物LP-3



化合物LP-3為LP-1的中間體，去除步驟6，中間體11-5即為LP-3。

【0142】 實施例4：抗體-藥物複合體的檢測方法

抗體-藥物複合體按照以下方法進行濃縮、換液、純化以及測量抗體濃度、計算每個抗體所攜帶的藥物分子的平均分子數以鑑別抗體-藥物複合體。

【0143】 操作A：抗體或抗體-藥物複合體的濃縮

取超濾管（Amicon Ultra，50000 MWCO，密理博公司），加入需要濃縮的抗體或者抗體-藥物複合體的溶液，離心至抗體或者抗體-藥物複合體溶液達到需要體積後取出。

【0144】 操作B：抗體濃度的測量

使用酶標儀（Multiskan GO, 賽默飛世爾公司），根據製造商定義的方法測量抗體的吸收值，該吸收值與抗體在該波長下的吸收係數的比值即為抗體的濃度。

【0145】 操作C：抗體的換液

根據製造商（賽默飛公司）提供的說明書，將zeba脫鹽柱（5mL, 40K MWCO）事先用含有氯化鈉（50 mM）及EDTA（2 mM）的磷酸鹽緩衝液（簡稱“PBS7.0/EDTA”，50 mM, pH 7.0）平衡。每個zeba脫鹽柱上樣2 mL，離心（1000g，4分鐘），收集流穿部分並透過操作A進行濃縮，透過操作B測定抗體濃度，用PBS7.0/EDTA對抗體濃度進行調整。

【0146】 操作D：抗體-藥物複合體的純化

根據製造商（賽默飛公司）提供的說明書，將zeba脫鹽柱（5mL, 40K MWCO）事先用存儲緩衝液進行平衡。存儲緩衝液使用含有150 mM氯化鈉的組胺酸-醋酸緩衝液（20 mM組胺酸，pH5.5）或含有50 mM氯化鈉的磷酸緩衝液（50 mM, pH

7.0)。將含有抗體-藥物複合體的反應液（大約2 mL）加入zeba脫鹽柱，離心（1000g，4分鐘）後收集流穿部分（大約2 mL），重複兩次洗脫過程，除去未結合的连接子-有效負載及包括還原劑的低分子量化合物。

【0147】 操作E：測量抗體-藥物複合體中抗體的濃度以及平均每個抗體上連接的藥物分子個數（DAR值）-（1）

抗體-藥物複合體上複合的藥物濃度可以透過測量抗體-藥物複合體水溶液在280 nm及370 nm下的紫外吸收值並透過下面的公式計算而得到。

【0148】 在任何給定的波長下，一個體系的總吸光度等於該系統中存在的所有吸光化學物質的吸光度之和（吸光度的可加和性）。因此，假設抗體與藥物在複合前後，抗體與藥物的莫耳吸收係數不變，則抗體-藥物複合體中的抗體濃度及藥物濃度可以用如下公式表示。

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A \quad \text{等式 (1)}$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370}C_D + \epsilon_{A,370}C_A \quad \text{等式(2)}$$

【0149】 A_{280} 代表抗體-藥物複合體水溶液在280 nm下的總吸收值， A_{370} 代表抗體-藥物複合體水溶液在370 nm下的總吸收值。 $A_{A,280}$ 代表抗體在280 nm下的吸收值， $A_{A,370}$ 代表抗體在370 nm下的吸收值， $A_{D,280}$ 代表結合前體（藥物）在280 nm下的吸收值， $A_{D,370}$ 代表結合前體在370 nm下的吸收值， $\epsilon_{A,280}$ 代表抗體在280 nm下的莫耳消光係數， $\epsilon_{A,370}$ 代表抗體在370 nm下的莫耳消光係數， $\epsilon_{D,280}$ 代表結合前體在280 nm下的莫耳消光係數， $\epsilon_{D,370}$ 代表結合前體在370 nm下的莫耳消光係數， C_A 代表抗體-藥物複合體中抗體的濃度， C_D 代表抗體-藥物複合體中藥物分子的濃度。

【0150】 在這種情況下， $\epsilon_{A,280}$ ， $\epsilon_{A,370}$ ， $\epsilon_{D,280}$ 及 $\epsilon_{D,370}$ 都是已知的數值（透過

抗體的序列計算得到或者化合物的UV吸收測量得到）。比如， $\epsilon_{A,280}$ 可以透過抗體的胺基酸序列利用一種已知的方法計算得到（蛋白質科學（Protein Science），1995年，第4卷，第2411-2423頁）。抗體在370 nm下通常沒有吸收，所以 $\epsilon_{A,370}$ 通常是0。 $\epsilon_{D,280}$ 及 $\epsilon_{D,370}$ 的值可以透過測量結合前體分別在280 nm及370 nm下吸光度隨濃度的變化值，利用朗伯-比爾定律（吸光度=莫耳濃度×莫耳消光係數×光程）計算得到。 C_A 及 C_D 可以透過測量抗體-藥物複合體在280 nm及370 nm下的吸光值 A_{280} 及 A_{370} ，然後解二元一次方程組等式（1）及（2）得到。另外，透過 C_D 除以 C_A ，可以得到平均每個抗體上連接的藥物分子的數量（DAR值）。

【0151】 操作F：平均每個抗體上連接的藥物分子個數（DAR值）-（2）

抗體-藥物複合體中每個抗體分子平均複合的藥物分子數，除前述“操作E”外，還可以採用液相色譜-質譜聯用(LC-MS)分析方法進行測定，如下：

高效液相色譜-質譜（LC-MS）分析樣品的製備（抗體-藥物複合體的還原）

向抗體-藥物複合體（大約5 mg/mL，6 μ L）中加入3 μ L 100 mM的還原劑二硫蘇糖醇（DTT）以及21 μ L的去離子水。反應液在37°C水浴鍋中溫育30分鐘，抗體-藥物複合體中輕重鏈間以及重鏈間的二硫鍵被完全打開，所得樣品可用於LC-MS檢測分析。

【0152】 高效液相色譜參數

色譜柱型號：Agilent PLRP-S, 1000 Å, 50 × 2.1 mm, 8 μ m

檢測波長：280 nm

波段寬度：4 nm

色譜柱溫度：80 °C

樣品盤溫度：5 °C

流速：0.5 mL/min

進樣體積：5 μ L

流動相A：0.05% TFA, H₂O

流動相B：0.05% TFA, ACN

洗脫程序 (B %：25%-34% (0-0.7分鐘), 34%-45% (0.7-5分鐘), 45%-90% (5-6分鐘), 90% (6-7分鐘), 90%-25% (7-7.10分鐘), 25% (7.10-10分鐘))

MS參數

霧化氣溫度：350 °C

霧化氣氣流：13L/min

噴霧器：45 psig

毛細管電壓：5000 V

碎裂電壓：350 V

質荷比範圍：500-8000 m/z

採集速率：1 spectra/s

【0153】數據分析

輕鏈複合*i*個藥物分子表示為Li，重鏈複合*i*個小分子表示為Hi，可以根據質譜的ESI掃描圖確定。

【0154】將各鏈的峰面積百分比（%）帶入到下式中可以得到修正後的峰面積比。

輕鏈複合*i*個藥物分子的峰面積比 = $100\% \times A_{Li} / (A_{L0} + A_{L1})$

重鏈複合*i*個藥物分子的峰面積比 = $100\% \times A_{Hi} / (A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3})$

【0155】每個抗體上平均複合的藥物分子的個數可以透過下面的公式進行

計算。

平均複合藥物分子數 = (L0峰面積比×0+L1峰面積比×1+H0峰面積比×0+H1峰面積比×1+H2峰面積比×2+H3峰面積比×3)×2

【0156】 操作G：平均每個抗體上連接的藥物分子個數（DAR值）-（3）

抗體-藥物複合體中每個抗體分子平均複合的藥物分子數，除了前面提到的“操作E”及“操作F”可以測量，還可以採用下述疏水層析色譜圖(HIC)分析方法進行測定。

【0157】 抗體-藥物複合體在疏水層析柱上的洗脫是基於洗脫液中鹽離子濃度的差異而分離的—隨著鹽離子濃度的降低，洗脫出的抗體-藥物複合體中小分子藥物的結合數目增多，既低DAR值的抗體-藥物複合體優先被洗脫。各組分的出峰順序依次為D0（未複合上任何連接子-有效負載的抗體）、D2（複合2個連接子-有效負載的抗體）、D4（複合4個連接子-有效負載的抗體）、D6（複合6個連接子-有效負載的抗體）、D8（複合8個連接子-有效負載的抗體）。可以透過測量各個峰的峰面積佔比來獲得各個組分的百分含量。則相應的樣品的HIC-DAR的計算方式如下：

平均複合藥物分子數 = D0峰面積比×0+D2峰面積比×2+D4峰面積比×4+D6峰面積比×6+D8峰面積比×8

【0158】 操作H: 抗體-藥物複合體中聚集體的測量

使用高效液相色譜中體積排阻色譜檢測抗體-藥物複合體中的聚集體，方法如下：

高效液相色譜系統：Agilent 1260 Infinity II HPLC system

檢測器：Ultraviolet absorption spectrometer (檢測波長：280 nm)

色譜柱型號: TOSOH TSKgel G3000SWXL (7.8×300 mm, 5 μm)

流動相: 200 mmol/L KHPO₄, 150 mmol/L NaCl, 15% (v/v) 異丙醇, pH7.0

流速: 0.75 mL/min

分析時間: 18 min

柱溫: 室溫

進樣量: 50 μg

【0159】數據分析:

質控品 (QC, 02-1裸抗, 即沒有複合連接子-有效負載的編號為02-1的抗體) 的體積排阻色譜圖如圖1A所示; 質控品 (QC, Hu1H2-2裸抗, 即沒有複合連接子-有效負載的編號為Hu1H2-2的抗體) 的體積排阻色譜圖如圖1B所示, Hu1H2-2裸抗的聚集體含量為1.17%。150 kDa的質控品的主峰 (單峰) 的保留時間在 9.5-10.5分鐘之間。聚集體的保留時間應該早於上述單體的保留時間。

【0160】操作I: 抗體-藥物複合體疏水性的比較

使用高效液相色譜疏水層析色譜法 (HIC) 分析抗體-藥物複合體的疏水性, 方法如下:

高效液相色譜系統: Agilent 1260 Infinity II HPLC system

檢測器: Ultraviolet absorption spectrometer (檢測波長: 280 nm)

色譜柱型號: TOSOH TSKgel Butyl-NPR (4.6 mm I.D. × 3.5 cm, 2.5μm)

流動相A: mol/L (NH₄)₂SO₄, 50 mmol/L KHPO₄, pH7.0

流動相B: 50 mmol/L KHPO₄, 25% (v/v)異丙醇, pH7.0

分析時間: 25 min

柱溫: 室溫

洗脫程序 (B %) : 0%-25% (0-1分鐘), 25% (1-3分鐘), 25%-80% (3-13分鐘), 80% (13-17分鐘), 80%-0% (17-17.10分鐘), 0% (17.10-25分鐘)

進樣量 : 10 μ L

數據分析：質控品 (QC, 02-1裸抗) 的疏水層析色譜圖如圖2A所示。質控品 (QC, Hu1H2-2裸抗) 的疏水層析色譜圖如圖2B所示, 其保留時間為3.387 min。保留時間越短的樣品的疏水性越弱, 相比於未複合藥物分子的裸抗, 抗體-藥物複合體的疏水性更高, 因此其保留時間更長。

【0161】 實施例5：製備抗體-藥物複合體02-1-LP1(DAR 8)

抗體的還原：透過實施例4中操作B (抗體在280 nm下的消光係數採用1.523 $\text{mLmg}^{-1} \text{cm}^{-1}$) 及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液, 換液後的抗體濃度為23.2 mg/mL。在2.155 mL的02-1抗體的水溶液中加入0.482 mL的5 mM的TCEP溶液 (相當於抗體含量的7倍當量), 同時加入4.31 mL的50 mM的磷酸鹽緩衝液 (pH7.0, PBS7.0) 以及69.47 μ L 200 mM的EDTA溶液。在確認溶液pH為7.0 $\pm$ 0.1後, 將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0162】 02-1抗體的VH序列為SEQ ID NO: 84所示的胺基酸序列, VL序列為SEQ ID NO: 85所示的胺基酸序列。出於實施例製備及/或檢測的目的, 02-1抗體的恆定區使用人IgG1恆定區序列, 重鏈恆定區序列選用SEQ ID NO: 102所示的胺基酸序列; 輕鏈恆定區序列選用SEQ ID NO: 103所示的胺基酸序列。

【0163】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C環境中培養10分鐘, 實施例1製備的連接子-有效負載LP-1溶解在N,N二甲基乙醯胺 (DMA) 後加入混合液中, 加入體積為0.489 mL (相當於抗體含量的14.2倍當量), 混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0164】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體02-1-LP1。

【0165】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=6384$ 及 $\epsilon_{D,370}=16180$ ），操作F，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0166】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為12.13mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為7.78。透過操作F測量得到每個抗體上平均複合的有效負載個數為7.80。圖3A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體02-1-LP1的聚集體含量為1.18%。圖3B示出抗體-藥物複合體02-1-LP1的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體02-1-LP1的保留時間為6.499 min。

【0167】 實施例6：製備抗體-藥物複合體Hu1H2-LP1（DAR 8）

抗體的還原：透過實施例4的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用1.54 mLmg⁻¹ cm⁻¹）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為9.37 mg/mL。在640.34 μL的Hu1H2-2 (HIS1H2-2)抗體的水溶液中加入80 μL的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的10倍當量），同時加入0.2 mL的50 mM的PBS7.0以及79.66 μL的去離子水。在確認溶液PH為7.0±0.1後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0168】 Hu1H2-2抗體的VH序列為SEQ ID NO: 100所示的胺基酸序列，VL序列為SEQ ID NO: 104所示的胺基酸序列。出於實施例製備及/或檢測的目的，Hu1H2-2 抗體的重鏈恆定區序列選用SEQ ID NO: 102所示的胺基酸序列；輕鏈恆定區序列選用SEQ ID NO: 103所示的胺基酸序列。

【0169】 抗體與連接子-有效負載之間的複合：將上述混合液置於4°C環境

中培養10分鐘，實施例1製備的连接子-有效負載LP-1溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為72 μL （相當於抗體含量的18倍當量），混合液於22°C環境中繼續反應30分鐘。

【0170】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1。

【0171】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4的操作E（ $\epsilon_{\text{D},280}=6384$ 及 $\epsilon_{\text{D},370}=16180$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0172】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為6.74 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為9.20。圖4A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的聚集體含量為1.24%。圖4B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的保留時間為6.239 min。

【0173】 實施例7：製備抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1（DAR 4）

抗體的還原：透過實施例4的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用1.54 $\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為23 mg/mL。在456.52 μL 的Hu1H2-2抗體的水溶液中加入23.52 μL 的5 mM的TCEP溶液，同時加入0.28 mL的50 mM的PBS7.0以及639.96 μL 的去離子水。在確認溶液PH為7.0 $\pm$ 0.1後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0174】 抗體與连接子-有效負載之間的複合：將上述混合液置於4°C環境中培養10分鐘，實施例1製備的连接子-有效負載LP-1溶解在DMA 中後加入混合液中，加入體積為112 μL （相當於抗體含量的8倍當量），混合液於22°C環境中繼續反應30分鐘。

【0175】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4的操作E（ $\epsilon_{D,280}=6384$ 及 $\epsilon_{D,370}=16180$ ）及操作H對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0176】 製備得到的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1（DAR4）透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為6.14 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為3.59。圖5A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1（DAR4）的聚集體含量為0.44%。圖5B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP1的疏水層析檢測圖譜。

【0177】 實施例8：製備抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2（DAR 8）

抗體的還原：實施例8還原方法與實施例6中抗體的還原方法相同。實施例8中的Hu1H2-2抗體的胺基酸序列與實施例6中Hu1H2-2抗體的胺基酸序列相同。

【0178】 抗體與連接子-有效負載的複合：將抗體還原步驟中的混合液置於4°C環境中培養10分鐘，實施例2製備的連接子-有效負載LP-2溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為72 μ L（相當於抗體含量的18倍當量），混合液於22°C環境中繼續反應30分鐘

【0179】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2。

【0180】 抗體-藥物複合體的表徵：採用上述的操作E（ $\epsilon_{D,280}=5814$ 及 $\epsilon_{D,370}=14742$ ），操作F，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0181】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為6.64 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為9.92。圖6A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2的聚集體含量為1.37%。圖6B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2的疏水層析檢測圖譜，

透過操作I測量的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP2的保留時間為6.561 min。

【0182】 實施例9：製備抗體-藥物複合體Hu029-LP3（DAR 8）

抗體的還原：透過實施例4的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.54 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為23.07 mg/mL。在325.10 μL 的Hu1H2-2抗體的水溶液中加入70 μL 的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的7倍當量），同時加入0.3 mL的50 mM的PBS7.0以及804.90 μL 的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0183】 Hu1H2-2 抗體的胺基酸序列與實施例6中Hu1H2-2 抗體的胺基酸序列相同。

【0184】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C環境中培養10分鐘，實施例3製備的連接子-有效負載LP-3溶解在DMA中後加入到混合液中，加入體積為90 μL （相當於抗體含量的18倍當量），混合液於22°C環境中繼續反應30分鐘。

【0185】 抗體-藥物複合體的純化：將上述的反應液採用操作D中描述的方法進行純化，最終獲得抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3。

【0186】 抗體-藥物複合體的表徵：採用上述的操作E（ $\epsilon_{D,280}=5186$ 及 $\epsilon_{D,370}=13688$ ），操作F，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0187】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為4.10 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為8.50。圖7A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3的聚集體含量為3.37%。圖7B示出抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3的疏水層析檢測圖譜，

透過操作I測量的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-LP3的保留時間為5.878min。

【0188】 對比例1：製備抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE (DAR 4)

抗體的還原：透過實施例4中的操作B(抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.523 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為31.6 mg/mL。在0.759 mL的02-1抗體的水溶液中加入0.076 mL的5 mM的TCEP溶液(相當於抗體含量的2.3倍當量)，同時加入0.48 mL的50 mM的PBS7.0以及1.084 mL的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。02-1抗體序列與實施例5中02-1抗體的序列相同。

【0189】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C環境中培養10分鐘，連接子-有效負載vc-MMAE (DC Chemicals, DC50025)溶解在DMA中後加入到混合液中，加入體積為0.322 mL (相當於抗體含量的7倍當量)，混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0190】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE。

【0191】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中的操作B，操作G，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0192】 透過操作B測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為9.71 mg/mL。圖8A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE的聚集體含量為2.74%。圖8B示出抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE的疏水層析檢測圖譜，透過操作G及操作I計算出抗體-藥物複合體02-1-vc-MMAE中每個抗體上平均複合的有效負載的個數為3.99(HIC-DAR)。

【0193】 對比例2：製備抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE (DAR 4)

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.5 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為 12 mg/mL 。在 0.438 mL 的Rituximab抗體（購自上海旻凱生物科技有限公司）的水溶液中加入 0.015 mL 的 5 mM 的TCEP溶液（相當於抗體含量的2.2倍當量），同時加入 0.14 mL 的 50 mM 的PBS7.0以及 0.107 mL 的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於 37°C 環境中反應2小時。

【0194】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於 4°C 條件下培養10分鐘，連接子-有效負載vc-MMAE溶解在DMA後加入到混合液中，加入體積為 0.049 mL （相當於抗體含量的7倍當量），將混合液於 22°C 條件下繼續反應30分鐘。

【0195】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE。

【0196】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中的操作B，操作G，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0197】 透過操作B測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為 3.78 mg/mL 。圖9A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE的聚集體含量為 3.78% 。圖9B示出抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE的疏水層析檢測圖譜，透過操作G及操作I計算出抗體-藥物複合體Rituximab-vc-MMAE中每個抗體上平均複合的有效負載的個數為4.39（HIC-DAR）。

【0198】 對比例3：製備抗體-藥物複合體Rituximab-LP1 (DAR 8)

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 1.5

mLmg⁻¹ cm⁻¹) 及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為 11.8 mg/mL。在6.05 mL的Rituximab抗體的水溶液中加入0.667 mL的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的7倍當量），同時加入1.02 mL的100 mM的PBS7.0以及2.46 mL的去離子水。在確認溶液pH為7.0±0.1後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0199】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C條件下培養10分鐘，連接子-有效負載LP-1溶解在DMA後加入混合液中，加入體積為0.667 mL（相當於抗體含量的14倍當量），將混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0200】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體Rituximab-LP1。

【0201】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=6384$ 及 $\epsilon_{D,370}=16180$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0202】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為6.23 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為7.30。圖10A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Rituximab-LP1的聚集體含量為4.70%。圖10B示出抗體-藥物複合體Rituximab-LP1的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體Rituximab-LP1的保留時間為7.094 min。

【0203】 對比例4：製備抗體-藥物複合體人類IgG-GGFG-DXd（DAR 8）

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用1.35 mLmg⁻¹ cm⁻¹）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為10 mg/mL。在2.45 mL的人類IgG蛋白（購自北京索萊寶科技有限公司，產品號：SP001）的水溶液中加入0.327 mL的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的10倍

當量)，同時加入0.7 mL的50 mM的PBS7.0以及23 μ L的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於 37°C 環境中反應2小時。

【0204】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於 4°C 條件下培養10分鐘，連接子-有效負載GGFG-DXd(購自DC Chemicals, DC50025)溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為0.294 mL(相當於抗體含量的18倍當量)，將混合液於 22°C 條件下繼續反應30分鐘。

【0205】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體人類IgG-GGFG-DXd(簡稱“Human IgG-DXD”)。人類IgG及HuIgG在本揭露中可互換使用。

【0206】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E($\epsilon_{D,280}=5178$ 及 $\epsilon_{D,370}=20217$)，操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0207】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為8.20 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為7.08。圖11A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體人類IgG-DXD的聚集體含量為4.25%。圖11B示出抗體-藥物複合體人類IgG-DXD的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體人類IgG-DXD的保留時間為8.222 min。

【0208】 對比例5：製備抗體-藥物複合體人類IgG-LP1 (DAR 8)

抗體的還原：透過實施例4中的操作B(抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.35 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為10 mg/mL。在1.33 mL的人類IgG蛋白(購自北京索萊寶科技有限公司，產品號：SP001)的水溶液中加入0.267 mL的5 mM的TCEP溶液(相當於抗體含量的10倍當量)，同時加入0.4 mL的50 mM的PBS7.0。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混

合液置於37°C環境中反應2小時。

【0209】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C條件下培養10分鐘，連接子-有效負載LP-1溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為0.2 mL（相當於抗體含量的15倍當量），將混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0210】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體人類IgG-LP1。

【0211】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=6384$ 及 $\epsilon_{D,370}=16180$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0212】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為11.08 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為9.15。圖12A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的聚集體含量為4.38%。圖12B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體人類IgG-LP1的保留時間為6.213 min。

【0213】 對比例6：製備抗體-藥物複合體人類IgG-LP1（DAR 4）

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.35 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為15 mg/mL。在0.7 mL的人類IgG蛋白（購自北京索萊寶科技有限公司，產品號：SP001）的水溶液中加入34.02 μL 的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的2.43倍當量），同時加入0.28 mL的50 mM的PBS7.0。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0214】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C條件下培養

10分鐘，連接子-有效負載LP-1溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為0.112 mL（相當於抗體含量的8倍當量），將混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0215】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體人類IgG-LP1（DAR4）。

【0216】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=6384$ 及 $\epsilon_{D,370}=16180$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0217】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為5.75 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為3.53。圖13A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體人類IgG-LP1（DAR4）的聚集體含量為1.90%。圖13B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP1（DAR4）的疏水層析檢測圖譜。

【0218】 對比例7：製備抗體-藥物複合體人類IgG-LP2（DAR 8）

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.35 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為10 mg/mL。在0.467 mL的人IgG蛋白（購自北京索萊寶科技有限公司，產品號：SP001）的水溶液中加入0.093 mL的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的10倍當量），同時加入0.2 mL的50 mM的PBS7.0以及0.24 mL的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。

【0219】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C條件下培養10分鐘，連接子-有效負載LP-2溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為0.07 mL（相當於抗體含量的15倍當量），將混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0220】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D

的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體人類IgG-LP2。

【0221】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=5814$ 及 $\epsilon_{D,370}=14742$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0222】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為4.68 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為9.18。圖14A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體人類IgG-LP2的聚集體含量為2.92%。圖14B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP2的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體人類IgG-LP2的保留時間為6.506 min。

【0223】 對比例8：製備抗體-藥物複合體人類IgG-LP3（DAR 8）

抗體的還原：透過實施例4中的操作B（抗體在280 nm下的消光係數採用 $1.35 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）及操作C將抗體用PBS7.0/EDTA進行換液，換液後的抗體濃度為18 mg/mL。在4 mL的人IgG蛋白（購自北京索萊寶科技有限公司，產品號：SP001）的水溶液中加入0.672 mL的5 mM的TCEP溶液（相當於抗體含量的7倍當量），同時加入1.44 mL的50 mM的PBS7.0以及1.088 mL的去離子水。在確認溶液pH為 7.0 ± 0.1 後，將混合液置於37°C環境中反應2小時。人IgG1蛋白的來源與對比例4中人IgG蛋白的來源相同。

【0224】 抗體與連接子-有效負載的複合：將上述混合液於4°C條件下培養10分鐘，連接子-有效負載LP-3溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為0.672 mL（相當於抗體含量的14倍當量），將混合液於22°C條件下繼續反應30分鐘。

【0225】 抗體-藥物複合體的純化：將上述反應液採用實施例4中的操作D的方法進行純化，獲得抗體-藥物複合體人類IgG-LP3。

【0226】 抗體-藥物複合體的表徵：採用實施例4中操作E（ $\epsilon_{D,280}=5186$ 及

$\epsilon_{D,370}=13688$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0227】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為7.42 mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為7.28。圖15A示出聚集體的檢測圖譜，透過操作H測量得到抗體-藥物複合體人類IgG-LP3的聚集體含量為5.37%。圖15B示出抗體-藥物複合體人類IgG-LP3的疏水層析檢測圖譜，透過操作I測量的抗體-藥物複合體人類IgG-LP3的保留時間為6.450 min。

【0228】 對比例9：製備抗體-藥物複合體Hu1H2-2-GGFG-DXD (DAR 8)

抗體的還原：對比例9中抗體的還原方法與實施例6中相同。Hu1H2-2抗體的序列與實施例6中Hu1H2-2抗體的序列相同。

【0229】 抗體與藥物連接子之間的複合：將上述混合液置於4°C上培養10分鐘。連接子-有效負載GGFG-DXd溶解在DMA中後加入混合液中，加入體積為72 uL（相當於抗體含量的18倍當量）。將混合液放置於22°C環境中繼續反應30分鐘。

【0230】 抗體-藥物複合體的純化：將上述的反應液採用操作D中描述的方法進行純化，最終獲得抗體-藥物複合體Hu1H2-2-GGFG-DXd（簡稱“Hu1H2-2-DXD”）。

【0231】 抗體-藥物複合體的表徵：採用上述的操作E（ $\epsilon_{D,280}=5178$ 及 $\epsilon_{D,370}=20217$ ），操作H及操作I對獲得的抗體-藥物複合體進行表徵。

【0232】 透過操作E測量計算得到抗體-藥物複合體的濃度為6.53mg/mL，透過操作E測量計算得到每個抗體上平均複合的有效負載的個數為6.75。透過操作H測量得到抗體-藥物複合體Hu1H2-2-DXD的聚集體含量為1.70%，如圖16A所示。透過操作I測量的抗體-藥物複合體Hu1H2-2-DXD的保留時間為7.764

min，如圖16B所示。

【0233】 試驗例1：高表現MUC18的腫瘤細胞對02-1-LP1的內容

將50 µg/mL 02-1-LP1分別與A375細胞（購自中國科學院上海生命科學研究院）、HMOVII細胞（購自Biovector NTCC典型培養物保藏中心）、SK-MEL-2細胞（購自上海勳慶生物科技有限公司）及GAK細胞（購自Biovector NTCC典型培養物保藏中心）結合，洗去多餘的ADC後，將細胞放在37°C培養箱中培養。在0, 0.5, 1, 2, 4, 8小時時，利用流式實驗檢測中位螢光強度（MFI）。如圖17所示，02-1-LP1能夠被A375 (A)，HMOVII (B)，SK-MEL-2 (C)，GAK (D)細胞內吞。

【0234】 試驗例2：A375移植瘤的體內抑制效果及小鼠體重變化的影響

6週齡的Balb/c小鼠購買自江蘇集萃藥康生物科技股份有限公司，每隻小鼠皮下接種四百萬A375細胞構建MUC18陽性的A375黑色素瘤小鼠移植瘤模型。在接種後第24天（平均腫瘤體積約230mm³），分別靜脈注射對比例2製備的Rituximab-vc-MMAE（6 mpk (mg/kg)）；對比例1製備的02-1-vc-MMAE（1.5, 3, 6 mpk）；對比例3製備的Rituximab-LP1（2.5, 5 mpk）以及實施例5製備的02-1-LP1（2.5, 5 mpk）；並設置溶媒組（載體組）作為陰性對照。給藥後利用游標卡尺每週測量兩次腫瘤體積，並按照如下公式計算腫瘤體積：TV=(長×寬)²/2。由於A375細胞幾乎不表現CD20，此時Rituximab作為02-1抗體的同型對照。

【0235】 圖18A1及18A2顯示了靶向MUC18的抗體-藥物複合體02-1-LP1及02-1-vc-MMAE對於A375移植瘤的生長抑制作用。圖18A1顯示，02-1-vc-MMAE降低了腫瘤生長速度；而02-1-LP1引起了腫瘤體積明顯消除。圖18A2為圖18A1的局部圖，示出02-1-LP1、02-1-vc-MMAE及載體組的曲線，以使活性成分的趨勢圖更清晰。

【0236】 圖18B1及18B2顯示靶向MUC18的抗體-藥物複合體02-1-LP1及02-1-vc-MMAE未對小鼠體重造成明顯影響。圖18B2為18B1的局部圖，示出02-1-LP1、02-1-vc-MMAE及載體組的曲線，以使活性成分的趨勢圖更清晰。

【0237】 試驗例3：02-1-LP1及02-1-vc-MMAE 對於食蟹猴的毒理實驗

02-1-LP1（實施例5製備）食蟹猴重複給藥實驗：6隻食蟹猴（購自廣西前沿生物技術有限公司）被隨機分為3組，每組雌雄各一隻。在第1天，第22天及第43天，分別靜脈輸注溶媒、10 mg/kg 02-1-LP1及30 mg/kg 02-1-LP1。在實驗期間，觀察動物是否有任何異常；並採集血樣進行血液學以及血液生化指標分析。在第50天，對動物進行安樂死並取樣進行病理分析。如表6所示，在本實驗中，所有劑量的供試物都沒有引起動物死亡，供試物相關的靶器官為網織紅血球（reticulocyte）、消化道、腎及脾。未見嚴重毒性最大劑量（highest non-severely toxic dose, HNSTD）為30 mg/kg。

【0238】 02-1-vc-MMAE（對比例1製備）食蟹猴重複給藥實驗：6隻食蟹猴被隨機分為3組，每組雌雄各一隻。在第1天，第22天分別靜脈輸注3 mg/kg 02-1-vc-MMAE、6mg/kg 02-1-vc-MMAE及10 mg/kg 02-1-vc-MMAE。在實驗期間，觀察動物是否有任何異常；並採集血樣進行血液學以及血液生化指標分析。在第43天，對動物進行安樂死並取樣進行病理分析。如表6所示，在本實驗中，高劑量組（10 mg/kg）的兩隻動物在第一次給藥後第10天死亡，3 mg/kg及6 mg/kg兩個組的動物未出現死亡，供試物相關的靶器官為網織紅血球、白血球及皮膚。HNSTD（未見嚴重毒性最大劑量）為6 mg/kg。

表6. 02-1-LP1及02-1-vc-MMAE在食蟹猴重複給藥毒理實驗結果匯總

實驗動物	食蟹猴	食蟹猴
------	-----	-----

受試物	02-1-vc-MMAE 3, 6 及10 mg/kg 靜脈注射 第1天及第22天給藥(共2次)	02-1-LP1 0, 10 及30 mg/kg 靜脈注射 第1天, 第22天及第43天給藥 (共3次)
動物數量	每組雌雄各一隻	每組雌雄各一隻
至死劑量	10 mg/kg	> 30 mg/kg
體重變化	ADC未引起動物體重變化	ADC未引起動物體重變化
血液學指標	3 mg/kg: 網織紅血球輕微增加 6 mg/kg: 白血球、血紅蛋白輕微 降低; 網織紅血球數量波動	≥10 mg/kg: 網織紅血球數量波 動
血液生化	≤6 mg/kg: 正常	≤30 mg/kg: 正常
HNSTD劑量	6 mg/kg: 胸骨骨髓	
時靶向毒性 器官	10 mg/kg: 消化道, 腹股溝淋巴 結及皮膚	30 mg/kg: 消化道器官、腎及脾
HNSTD*	6 mg/kg	30 mg/kg

HNSTD*: 未見嚴重毒性最大劑量

【0239】 結果表明, 實施例5製備的02-1-LP1的安全性明顯優於對比例1製
備的02-1-vc-MMAE。

【0240】 結合試驗例2可知, 02-1-LP1比02-1-vc-MMAE的耐受劑量更高,
安全性更好; 同時更低劑量的02-1-LP1就能達到更好的抗腫瘤效果。

【0241】 試驗例4: ADC對Detroit562細胞的體外殺傷實驗

培養Detroit562細胞(購自南科佰生物技術有限公司)使細胞密度達到80%,
收集細胞, 鋪96孔板, 調整細胞密度至 $2-5 \times 10^4$ /ml。每孔鋪100 μ L, ADC分子以
300nM為起始濃度進行3倍梯度稀釋, 稀釋完成後將ADC分子加入細胞培養液
中, 靜置培養5天, 期間定期觀察細胞凋亡情況。5天後, 向96孔板中加入15 μ L

CCK-8套組原液，37°C培養箱反應0.5-2h，測量450nm處吸光度，根據光密度OD(optical density) 讀數值以及ADC稀釋梯度繪製細胞存活曲線。

【0242】 ADC分子選用對比例4製備的人類IgG-DXD,對比例5製備的人類IgG-LP1，對比例7製備的人類IgG-LP2,實施例6製備的Hu1H2-2-LP1，實施例8製備的Hu1H2-2-LP2及對比例9製備的Hu1H2-2-DXD。其中，人類IgG作為Hu1H2-2抗體的同型對照；DXD作為陽性藥物。

【0243】 圖19示出上述ADC分子對頭頸部鱗癌細胞系Detroit562的體外殺傷作用，圖19A1及圖19A2為圖19的局部圖。圖19A1表明，及陽性對照Hu1H2-2-DXD相比，本揭露的Hu1H2-2-LP2以及Hu1H2-2-LP1對Detroit562的體外殺傷作用更為優秀。圖19A2顯示，人類IgG-LP2及人類IgG-LP1具有比人類IgG-DXD更優秀的體外殺傷作用，表明相較GGFG-DXd，連接子-有效負載LP-1及LP-2對Detroit562的體外殺傷作用更為優秀。

【0244】 試驗例5：ADC對於Detroit562構建的CDX小鼠模型體內藥效及小鼠體重變化的影響

6週齡的Balb/c裸鼠購買自江蘇集萃藥康生物科技股份有限公司。每隻小鼠皮下接種五百萬Detroit562細胞構建細胞來源的異種移植物（cell derived xenograft, CDX）小鼠模型，在接種後第10天（平均腫瘤體積約 150mm^3 ），分別靜脈注射對比例5製備的人類IgG-LP1(10 mg/kg)；實施例6製備的Hu1H2-2-LP1(10 mg/kg)；實施例8製備的Hu1H2-2-LP2(10 mg/kg)。給藥之後利用游標卡尺每週測量兩次腫瘤體積，並按照如下公式計算腫瘤體積： $TV=(長\times 寬)^2/2$ 。

【0245】 圖20顯示Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP2以及人類IgG-LP1對

Detroit562細胞構建的頭頸部鱗癌模型小鼠的體內藥效數據。結果表明，Hu1H2-2-LP1及Hu1H2-2-LP2可以有效抑制小鼠腫瘤增長。

【0246】圖21顯示Hu1H2-2-LP1，Hu1H2-2-LP2以及人類IgG-LP1對於小鼠體重的影響。在實驗週期內，Hu1H2-2-LP1組及Hu1H2-2-LP2組的小鼠體重持續上升；而對照組人類IgG-LP1體重存在波動變化，結果表明，Hu1H2-2-LP1及Hu1H2-2-LP2對小鼠體重變化的影響比較小。

【0247】試驗例6：ADC對於PC-9構建的CDX小鼠模型體內藥效及小鼠體重變化的影響

6週齡的Balb/c裸鼠購買自江蘇集萃藥康生物科技股份有限公司。每隻小鼠皮下接種五百萬PC-9細胞（購自浙江美森細胞科技有限公司）以得到CDX模型。在接種後第13天（平均腫瘤體積約 200mm^3 ），分別靜脈注射對比例5製備的人類IgG-LP1,對比例6製備的人類IgG-LP1（DAR4），對比例8製備的人類IgG-LP3，實施例6製備的Hu1H2-2-LP1；實施例7製備的Hu1H2-2-LP1(DAR4)，實施例9製備的Hu1H2-2-LP3。給藥劑量均為 $10\text{ mpk}(\text{mg/kg})$ ，每週1次，給藥2次（ $\text{QW}\times 2$ ）。給藥之後利用游標卡尺每週測量兩次腫瘤體積，並按照如下公式計算腫瘤體積： $\text{TV}=(\text{長}\times\text{寬})^2/2$ 。

【0248】圖22顯示上述ADC對於PC-9細胞構建的肺癌模型小鼠的體內藥效數據。結果表明，Hu1H2-2-LP1、Hu1H2-2-LP1(DAR4)及Hu1H2-2-LP3可以有效抑制小鼠腫瘤的增長。

【0249】圖 23顯示上述ADC對於PC-9細胞構建的肺癌模型小鼠體重的影響。結果表明Hu1H2-2-LP1、Hu1H2-2-LP1(DAR4)及Hu1H2-2-LP3對小鼠體重影響不大，無明顯的消化道毒性作用。

【0250】 試驗例7：對SCC-9人頭頸部鱗狀細胞癌CDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

6週齡Balb/c裸鼠購自上海必凱科翼生物科技有限公司。每隻小鼠皮下接種800萬個SCC-9細胞（購自ATCC）以獲得CDX模型。在接種後第29天（平均腫瘤體積約為 200mm^3 ），分別靜脈注射對比例3中製備的Rituximab-LP1(10mpk)及實施例5中制得的02-1-LP1 (2.5, 5, 10 mpk)。DPBS（Dulbecco磷酸鹽緩衝鹽水）為陰性對照。每週給藥1次，共2次（QW×2）。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積： $TV = (\text{長} \times \text{寬})^2 / 2$ 。

【0251】 圖24A顯示02-1-LP1在SCC-9 CDX模型中可以有效抑制腫瘤生長。圖24B顯示02-1-LP1對SCC-9模型小鼠的體重幾乎沒有影響。

【0252】 試驗例8：對Huh-7人癌症CDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

6週齡Balb/c裸鼠購自上海必凱科翼生物科技有限公司。每隻小鼠皮下接種500萬Huh-7細胞（購自上海生物基因生物技術有限公司），獲得CDX模型。在接種後第9天（平均腫瘤體積約為 230mm^3 ），分別靜脈注射對比例5中製備的人IgG-LP1及實施例5中製成的02-1-LP1。給藥劑量均為10mpk，每週1次，共2次（QW×2）。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積： $TV = (\text{長} \times \text{寬})^2 / 2$ 。

【0253】 圖25A顯示02-1-LP1可以有效抑制Huh-7 CDX模型中的腫瘤生長。圖25B顯示02-1-LP1對Huh-7模型中小鼠的體重幾乎沒有影響。

【0254】 試驗例9：對LD1-0015-200617人食管鱗狀細胞癌PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

LD1-0015-200617 (LideBiotech CO., LTD) 是表現人MUC18 (H-Score = 75) 的人食管鱗狀細胞癌患者來源的異種移植物模型。6-8週Nu/Nu小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將LD1-0015-200617的腫瘤切成約3mm×3mm×3mm的片段，並皮下植入小鼠的側腹 (flank)。在植入後第39天 (平均腫瘤大小~171mm³)，分別靜脈注射對比例5中製備的人類IgG-LP1及實施例5中製備的02-1-LP1。給藥劑量均為10mpk，每週1次，共3次 (QW×3)。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積：TV= (長×寬)²/2。

【0255】圖26A顯示02-1-LP1在LD1-0015-200617 PDX模型中可以有效抑制腫瘤生長。圖26B顯示，在LD1-0015-200617 PDX模型中，02-1-LP1對小鼠體重幾乎沒有影響。

【0256】試驗例10：對LD1-0016-390730人食管腺癌PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

LD1-0016-390730 (LideBiotech CO., LTD) 是表現人MUC18 (H-Score = 115) 的人食管腺癌患者來源的異種移植物模型。6-8週Nu/Nu小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將LD1-0016-390730的腫瘤切成約3mm×3mm×3mm的片段，並皮下植入小鼠的側腹。在植入後第45天 (平均腫瘤大小~191 mm³)，靜脈注射實施例5中製備的02-1-LP1。給藥劑量為10mpk，每週1次，共2次 (QW×2)。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積：TV= (長×寬)²/2。

【0257】圖27A顯示02-1-LP1在LD1-0016-390730 PDX模型中可以有效抑制腫瘤生長。圖27B顯示，在LD1-0016-390730 PDX模型中，02-1-LP1對小鼠體

重幾乎沒有影響。

【0258】 試驗例11:LD1-2025-362797人小細胞肺癌癌症PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

LD1-2025-362797(LideBiotech CO., LTD)是表現人MUC18(H-Score=110)的人小細胞肺癌患者來源的異種移植物模型。6-8週Nu/Nu小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將LD1-2025-362797的腫瘤切成約3mm×3mm×3mm的片段，並皮下植入小鼠的側腹。在植入後第21天（平均腫瘤大小~144mm³），靜脈注射第一劑量的實施例5中製備的10mpk 02-1-LP1。當腫瘤體積恢復到約700mm³時（第一次給藥後第49天），靜脈注射10mpk 02-1-LP1的第二次給藥。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積： $TV = (\text{長} \times \text{寬})^2 / 2$ 。

【0259】 圖28A顯示，在LD1-2025-362797 PDX模型中，02-1-LP1可以有效抑制腫瘤生長。值得注意的是，在第二劑02-1-LP1後，腫瘤再次減少，表明02-1-LP1對再生腫瘤仍然具有活性。圖28B顯示，在LD1-2025-362797 PDX模型中，02-1-LP1對小鼠體重幾乎沒有影響。

【0260】 試驗例12：對LD1-2009-362263人三陰乳腺癌PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

LD1-2009-362263(LideBiotech CO., LTD)是表現人MUC18(H-Score=240)的人三陰性乳腺癌症患者來源的異種移植物模型。6-8週Nu/Nu小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將LD1-2025-362797的腫瘤切成約3mm×3mm×3mm的片段，並皮下植入小鼠的側腹。植入後第49天（平均腫瘤大小~152mm³），靜脈注射實施例5中製備的02-1-LP1。給藥劑量為10mpk，每週1

次，共2次（QW×2）。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積： $TV = (\text{長} \times \text{寬})^2 / 2$ 。

【0261】圖29A顯示02-1-LP1在LD1-2009-362263 PDX模型中可以有效抑制腫瘤生長。圖29B顯示，在LD1-2009-362263 PDX模型中，02-1-LP1對小鼠體重幾乎沒有影響。

【0262】試驗例13：對LD1-0060-200770人膽管癌PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

LD1-0060-200770（LideBiotech CO.，LTD）是表現人MUC18（H-Score=15）的人膽管癌患者來源的異種移植物模型。6-8週Nu/Nu小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將LD1-0060-200770的腫瘤切成約3mm×3mm×3mm的片段，並皮下植入小鼠的側腹。在植入後第42天（平均腫瘤大小~155mm³），靜脈注射實施例5中製備的02-1-LP1。給藥劑量為10mpk，每週1次，共2次（QW×2）。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積： $TV = (\text{長} \times \text{寬})^2 / 2$ 。

【0263】圖30A顯示02-1-LP1在LD1-0060-200770 PDX模型中可以有效抑制腫瘤生長。圖30B顯示02-1-LP1對LD1-0060-200770 PDX模型中小鼠的體重幾乎沒有影響。

【0264】試驗例14：對OV-10-0073人卵巢癌症PDX模型的體內抑制作用及其對小鼠體重變化的影響

OV-10-0073（藥明康德（上海）有限公司）是一種表現人MUC18（H-Score=40）的人卵巢癌症患者來源的異種移植物模型。6-8週小鼠購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。將OV-10-0073的腫瘤切成約30mm³的片段，並皮下植

入小鼠的側腹。在植入後第34天（平均腫瘤大小~185mm³），分別靜脈注射單劑量的對比例5中製備的人類IgG-LP1（2.5，5mpk）及實施例5中備的02-1-LP1（1.25，2.5，5mpk）。給藥後，每週用游標卡尺測量兩次腫瘤體積，並根據以下公式計算腫瘤體積：TV=（長×寬）²/2。

【0265】圖31A顯示02-1-LP1可以有效抑制OV-10-0073 PDX模型中的腫瘤生長。圖31B顯示02-1-LP1對OV-10-0073 PDX模型中小鼠的體重幾乎沒有影響。

【0266】由上述實驗結果可知，本揭露提供的ADC中，連接子與依喜替康鍵合後，透過簡單的化學方法與靶向MUC18或CD44v7/8的抗體複合。與傳統的隨機複合方式相比，應用這種連接子得到的抗MUC18或CD44v7/8抗體-藥物複合體的DAR值更高（DAR8）。透過HIC檢測顯本揭露的ADC色譜峰較連接子-有效負載為vc-MMAE或GGFG-DXd的色譜峰更窄，提示生成的產品均一性及親水性高。與傳統的vc-MMAE及GGFG-DXd複合體相比，此公開複合體的體外腫瘤細胞增殖抑制活性在生物學活性及安全性方面改善或維持。

【0267】本揭露中製備的ADC具有特異性MUC18或CD44v7/8依賴性抗腫瘤活性，並且對具有高表現MUC18或者CD44v7/8的腫瘤細胞具有極高的殺傷活性。本揭露中製備的具有MUC18特異性的ADC具有增加的HNSTD，表明安全性提高並且毒性及副作用減少。令人驚訝的是，試驗例9-14的結果還顯示，本揭露中製備的具有MUC18特異性的ADC對具有不同MUC18表現水平（低、中、高）的腫瘤細胞顯示出優異的殺傷活性。

【0268】本揭露製備的ADC具有較複合vc-MMAE或GGFG-DXd的ADC具有更為優異的體內抗腫瘤藥效，同時在安全性方面表現出明顯優於vc-MMAE的ADC，並與GGFG-DXd ADC具有相似的MTD（maximum tolerated dose）（Yusuke

OgitaniClin, et al., Cancer Res. 2016 Oct 15;22(20):5097-5108.)。預期該藥物複合體將比現有臨床分子vc-MMAE或GGFG-DXd具有更高的治療窗口。

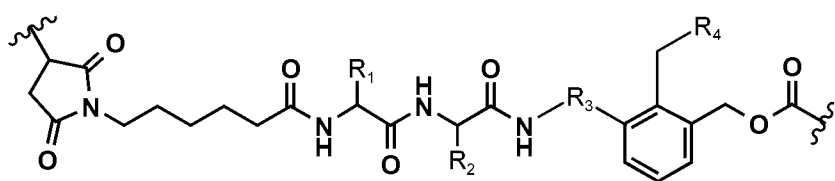
【0269】 本揭露提供的ADC在體外具有更好的穩定性，並且在製備過程中的聚集體減少。具有式I連接體的ADC在血漿中具有更好的穩定性，預計ADC在體內可能具有更好的藥物代謝特性，例如更長的半衰期、較低量的游離小分子毒素等。

【符號說明】

無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體（isotopic variant）、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物，或其組合，包括抗MUC18或抗CD44v7/8抗體或其抗原結合片段、有效負載（payload）及式I所示的连接子，其中：



式 I

所述式I所示连接子透過琥珀醯亞胺基與抗體或其抗原結合片段鏈間二硫鏈還原後的巰基部分形成硫醚鍵連接；

所述式I所示连接子的酯基中的羰基與有效負載中的胺基連接；

R₁、R₂各自獨立地選自氫、甲基或異丙基；

R₃表示-(CR₅HCONH)n¹-(CH₂CONH)n²-或單鍵，R₅選自氫或苯甲基，n¹表示0~2的整數，n²表示0~2的整數；

R₄表示甲胺基或-(NCH₃COCH₂)n³-NCH₃COCH₃，n³表示1~20的整數。

【請求項2】 如請求項1所述的抗體-藥物複合體，R₄表示-(NCH₃COCH₂)n³-NCH₃COCH₃，n³表示8~15的整數。

【請求項3】 如請求項1或2所述的抗體-藥物複合體，R₄表示-(NCH₃COCH₂)n³-NCH₃COCH₃，n³表示10~12的整數。

【請求項4】 如請求項1-3中任一項所述的抗體-藥物複合體，R₃表示-(CR₅HCONH)n¹-(CH₂CONH)n²-或單鍵，R₅選自苯甲基，n¹表示1或2，n²表示1或2；

R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示8~15的整數。

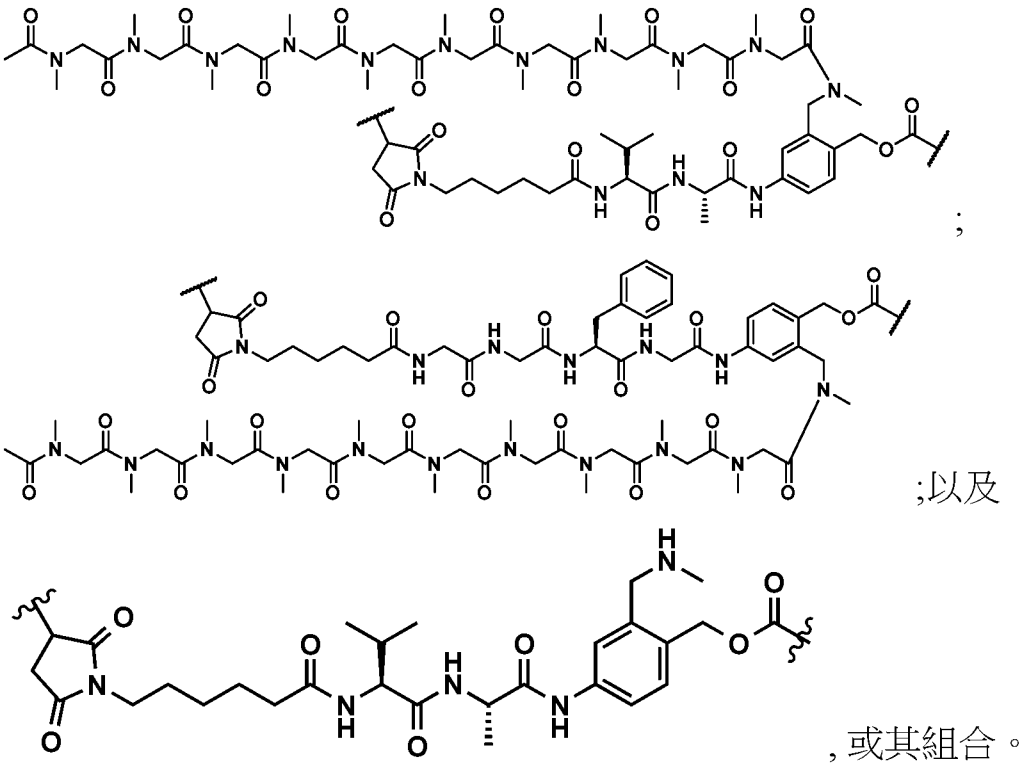
【請求項5】 如請求項1-4中任一項所述的抗體-藥物複合體， R_3 表示單鍵；

R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示8~15的整數。

【請求項6】 如請求項1-5中任一項所述的抗體-藥物複合體， R_3 表示單鍵；

R_4 表示甲胺基。

【請求項7】 如請求項1-6中任一項所述抗體-藥物複合體，所述連接子選自以下組中的任一種：

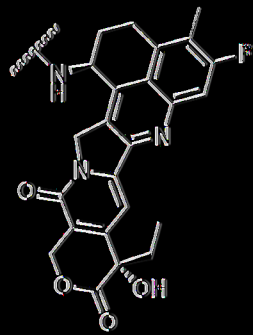


【請求項8】 如請求項1-7中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述有效負載選自包括細胞毒劑，標記物，核酸，放射性核種，激素，免疫調節劑，前體藥物轉化酶，核糖核酸酶，激動性抗體（agonistic antibody），拮抗性抗體及其片段，融合蛋白或衍生物的組中的至少一種。

【請求項9】 如請求項8所述的抗體-藥物複合體，所述細胞毒劑包括微管蛋白抑制劑及/或拓撲異構酶抑制劑；所述微管蛋白抑制劑包括奧瑞他汀或其衍生

物，美登素或其衍生物；所述抑癌異構酶抑制劑包括替替樹鹼及其衍生物。

〔請求項10〕 如請求項1-9中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述有效負載為式II所示的依替替樹鹼，以環己烷環上胺基的氮原子與連接子連接，



式II。

〔請求項11〕 如請求項1-10中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括：

如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 16所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 28所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 38所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 52所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 1所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 11所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 23所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 34所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為LAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 46所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 1所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 12所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 23所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 35所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為LAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 47所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 2所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 13所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 24所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 36所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為NAK的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 48所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 3所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 14所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 25所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 37所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為FAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 49所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 15所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 26所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 38所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 50所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 4所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 15所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 27所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 39所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為STS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 51所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 5所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 17所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 29所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 40所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 53所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 6所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 18所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 29所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID

NO: 41所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 53所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 7所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 19所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 30所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 42所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為RTS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 54所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 8所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 20所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 31所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 43所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 55所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；

如SEQ ID NO: 9所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 21所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 32所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 44所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為WAS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 56所示胺基酸序列的輕鏈CDR3；或者，

如SEQ ID NO: 10所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 22所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 33所示胺基酸序列的重鏈CDR3，及如SEQ ID NO: 45所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為LMS的輕鏈CDR2，如SEQ ID NO: 57所示胺基酸序列的輕鏈CDR3。

【請求項12】 如請求項1-11中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包括：

如SEQ ID NO: 84所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 85所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；

如SEQ ID NO: 86所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 87所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或者

如SEQ ID NO: 88所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 89所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

【請求項13】 如請求項1-10中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段特異性結合人CD44 v7/8結合肽，所述結合肽包括如SEQ ID NO:90所示的胺基酸序列。

【請求項14】 如請求項1-10及13中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段不結合人CD44v7/8如SEQ ID NO:91，及/或如SEQ ID NO:92所示胺基酸序列的結合肽。

【請求項15】 如請求項13或14所述的抗體-藥物複合體，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括：如SEQ ID NO: 93所示胺基酸序列的重鏈CDR1，如SEQ ID NO: 94所示胺基酸序列的重鏈CDR2，如SEQ ID NO: 95所示胺基酸序列的重鏈CDR3；以及如SEQ ID NO: 96所示胺基酸序列的輕鏈CDR1，胺基酸序列為RAN的CDR2，如SEQ ID NO: 97所示胺基酸序列的輕鏈CDR3。

【請求項16】 如請求項13-15中任一項所述的抗體-藥物複合體，所述抗CD44 v7/8抗體或其抗原結合片段包括：

如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 101所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或

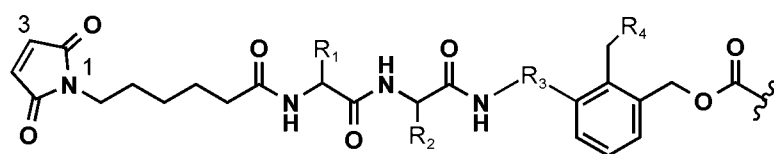
如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 104所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

【請求項17】 如請求項1-16中任一項所述的抗體-藥物複合體，DAR為

1~10。

【請求項18】如請求項1-17中任一項所述的抗體-藥物複合體，DAR為4~10。

【請求項19】一種如請求項1-18中任一項所述的抗體-藥物複合體、或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合、以及藥學上可接受的賦形劑的製備方法，包括以下步驟：抗MUC18或抗CD44v7/8抗體或其抗原結合片段經還原處理後二硫鍵至少部分被還原，與式III所示連接子的馬來醯亞胺-N-基的3位碳原子進行反應，



式III，

其中

所述連接子-有效負載中，式III所示連接子的酯基中的羰基與有效負載的胺基連接；

R_1 、 R_2 各自獨立地選自氫、甲基或異丙基；

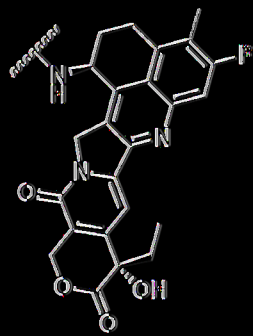
R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 或單鍵， R_5 選自氫或苯甲基， n^1 表示0~2的整數， n^2 表示0~2的整數；以及

R_4 表示甲胺基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$ ， n^3 表示1~20的整數。

【請求項20】如請求項19所述的製備方法，所述方法還包括：抗體或其抗原結合片段在含有螯合劑的緩衝溶液中與還原劑反應，加入連接子-有效負載的溶解液，連接子具有式III的結構，調節反應溶液pH值。

【請求項21】如請求項19或20所述的製備方法，所述方法還包括：所述有

效負載為式II所示的依替替康，以其環己烷環上胺基的金波子與式III中噻基的羧基連接，



式 II。

〔請求項22〕 如請求項19-21中任一項所述的製備方法，DAR為1~10。

〔請求項23〕 如請求項19-22中任一項所述的製備方法，

所述抗MUC18抗體或其抗原結合片段包含如SEQ ID NO: 84所示的胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ IDNO: 85所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；

如SEQ ID NO: 86所示的胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 87所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或

如SEQ ID NO:88所示的胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ IDNO:89所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體；

所述抗CD44v//8抗體或其抗原結合片段包含如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 101所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或

如SEQ ID NO: 100所示胺基酸序列的重鏈可變區序列，以及如SEQ ID NO: 104所示胺基酸序列的輕鏈可變區序列，或其保守變體。

〔請求項24〕 一種藥物組合物，其包含如請求項1-18中任一項的抗體-藥物

複合體，或如請求項19-23中任一項所述的方法製備的抗體-藥物複合體，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合，以及藥學上可接受的賦形劑。

【請求項25】 一種套組，其包含如請求項1-18中任一項的抗體-藥物複合體，或如請求項19-23中任一項所述的方法製備的抗體-藥物複合體，如請求項24的藥物組合物，或其異構體、同位素變體、藥學上可接受的鹽、前藥、溶劑化物或其組合。

【請求項26】 一種如請求項1-18中任一項的抗體-藥物複合體、如請求項19-23中任一項所述的方法製備的抗體-藥物複合體、如請求項24的藥物組合物、或如請求項25的套組在製備用於診斷、預防及治療腫瘤性疾病的治療劑中的用途。

【請求項27】 如請求項26所述的用途，其中所述腫瘤性疾病包括表現MUC18及/或CD44v7/8的良性腫瘤及惡性腫瘤。

【請求項28】 如請求項26或27所述的用途，其中所述腫瘤性疾病包括黑色素瘤、咽癌、三陰性乳癌、食管腺癌、肝癌、卵巢癌、子宮頸癌、尿路上皮癌、膀胱神經內分泌瘤、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、皮膚鱗狀細胞癌、膽管癌、轉移性胰腺癌、肺鱗狀細胞癌，頭頸部鱗狀細胞癌及/或食管鱗狀細胞癌。

【請求項29】 一種如請求項1-18中任一項中所述的抗體-藥物複合體、如請求項19-23中任一項所述方法製備的抗體-藥物複合體、如請求項24的藥物組合物、或者如請求項25的套組在製備靶向MUC18及/或CD44v7/8的治療劑中的用途。

【請求項30】 一種診斷、預防及治療腫瘤性疾病的方法，包括向受試者給與治療有效量的治療劑，所述治療劑包括請求項1-18中任一項中所述的抗體-藥物複合體，如請求項19-23中任一項所述方法製備的抗體-藥物複合體，或者如請求項24所述的藥物組合物。