202248211

(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 202248211 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：111104438 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 02 月 07 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/18 (2006.01)* *C07K16/28 (2006.01)*
*A61K39/395 (2006.01)* *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/02/02 歐洲專利局 EP 21154786.4
2021/12/23 世界智慧財產權組織 PCT/EP2021/087618

(71)申請人：瑞士商Ｎｕｍａｂ治療公司 (瑞士) NUMAB THERAPEUTICS AG (CH)
瑞士

(72)發明人：查特吉 比西 CHATTERJEE, BITHI (CH)；斯內爾 丹尼爾 SNELL, DANIEL (CH)；西蒙尼 亞力山卓 SIMONIN, ALEXANDRE (FR)；斯比家 法比奧 馬里奧 SPIGA, FABIO MARIO (IT)；岡蒂 媞 GUNDE, TEA (CH)；賀斯 克利先 HESS, CHRISTIAN (CH)；渥木 史丹分 WARMUTH, STEFAN (CH)；布拉克 馬休斯 BROCK, MATTHIAS (CH)；蒂茨 朱莉婭 TIETZ, JULIA (CH)；約翰遜 瑪麗亞 JOHANSSON, MARIA (SE)

(74)代理人：祁明輝；林素華；涂綺玲

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：19 共 343 頁

(54)名稱

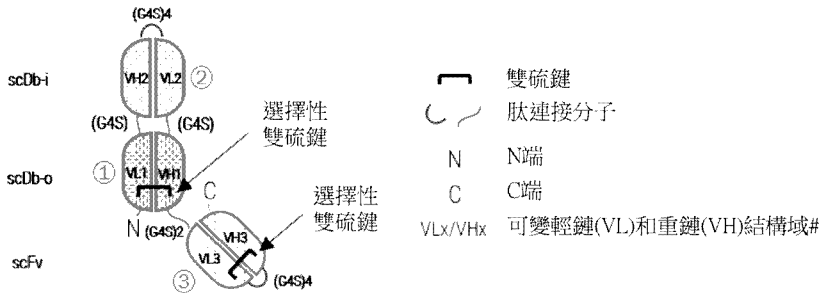
針對ＲＯＲ１與ＣＤ３之多特異性抗體

(57)摘要

本發明是有關於一種多特異性抗體，此多特異性抗體包括與 ROR1 特異性結合的一至二個抗體基結合域(ROR1-BD）和與 CD3 特異性結合的一抗體基結合域(CD3-BD）；其中多特異性抗體不包括免疫球蛋白 Fc 區多肽。本發明更有關於此多特異性抗體的核酸編碼、包含核酸的載體、包含核酸或載體的宿主細胞、以及生產多特異性抗體的方法。此外，本發明是有關於包括多特異性抗體的藥物組合物及其使用方法。

The present invention relates to a multispecific antibody comprising one or two binding domains, which specifically bind to the extracellular domain of ROR1 (ROR1-BDs), and one binding domain, which specifically binds to CD3 (CD3-BD), wherein the multispecific antibody does not comprise an immunoglobulin Fc region. The present invention further relates to nucleic acids encoding said multispecific antibody, vector(s) comprising said nucleic acids, host cell(s) comprising said nucleic acids or said vector (s), and a method of producing said multispecific antibody. Additionally, the present invention relates to pharmaceutical compositions comprising said multispecific antibody and methods of use thereof.

指定代表圖：




符號簡單說明：

G:甘胺酸

S:絲胺酸

scDb:單鏈雙抗體

scFv:單鏈變異區片段

VH:重鏈可變域

VL:輕鏈可變域

第 3 圖

# 【發明摘要】

【中文發明名稱】 針對ROR1與CD3之多特異性抗體

【英文發明名稱】 MULTISPECIFIC ANTIBODIES HAVING SPECIFICITY FOR ROR1 AND CD3

【中文】

本發明是有關於一種多特異性抗體，此多特異性抗體包括與ROR1 特異性結合的一至二個抗體基結合域(ROR1-BD）和與CD3 特異性結合的一抗體基結合域(CD3-BD）； 其中多特異性抗體不包括免疫球蛋白 Fc 區多肽。本發明更有關於此多特異性抗體的核酸編碼、包含核酸的載體、包含核酸或載體的宿主細胞、以及生產多特異性抗體的方法。此外，本發明是有關於包括多特異性抗體的藥物組合物及其使用方法。

【英文】

The present invention relates to a multispecific antibody comprising one or two binding domains, which specifically bind to the extracellular domain of ROR1 (ROR1-BDs), and one binding domain, which specifically binds to CD3 (CD3-BD), wherein the multispecific antibody does not comprise an immunoglobulin Fc region. The present invention further relates to nucleic acids encoding said multispecific antibody, vector(s) comprising said nucleic acids, host cell(s) comprising said nucleic acids or said vector(s), and a method of producing said multispecific

antibody. Additionally, the present invention relates to pharmaceutical compositions comprising said multispecific antibody and methods of use thereof.

【指定代表圖】　　第3圖。

【代表圖之符號簡單說明】

G:甘胺酸

S:絲胺酸

scDb:單鏈雙抗體

scFv:單鏈變異區片段

VH:重鏈可變域

VL:輕鏈可變域

【特徵化學式】

無

# 【發明說明書】

【中文發明名稱】 針對ROR1與CD3之多特異性抗體

【英文發明名稱】 MULTISPECIFIC ANTIBODIES HAVING SPECIFICITY FOR ROR1 AND CD3

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種多特異性抗體，此抗體包括與ROR1 胞外區特異性結合的一至二個抗體基結合域(ROR1-BDs)和與CD3 特異性結合的一抗體基結合域(CD3-BD)；其中多特異性抗體不包括免疫球蛋白 Fc 區多肽。本發明更有關於該多特異性抗體的核酸編碼、包含核酸的載體、包含核酸或載體的宿主細胞、 以及生產多特異性抗體的方法。此外，本發明是有關於包括多特異性抗體的藥物組合物及其使用方法。

【先前技術】

【0002】 酪胺酸蛋白激酶(tyrosine-protein kinase)跨膜受體ROR1是類似受體酪胺酸激酶(receptor tyrosine kinase-like)孤兒受體(ROR)家族的其中之一。ROR1 受體的胞外結構域由三個不同的結構域組成：膜遠端類似免疫球蛋白的結構域、中界處捲曲的結構域(intervening Frizzled Domain)和膜近端的 Kringle 結構域。ROR1 是胚胎發育過程中所需的一種瘤胎抗原(onco-fetal antigen)。具有ROR1 同型合子(homozygous)基因剔除的小鼠由於呼吸功能障礙而在圍產期死亡(Borcherding 等人 2014)。ROR1 在正常成人組織中的

表達僅限於脂肪組織、胰腺和肺中的某些細胞，以及中介層 B 細胞(intermediate B cells)的一部分(Baskar等人2008；Hudecek等人2010；Bicocca等人，2012)。然而，它表達在一些血液和實體癌症以及一些癌症幹細胞上。此外，一些研究表明ROR1在癌症進展和轉移中扮演重要角色(參見例如Cui等人，2013)。因此，ROR1 是腫瘤特異性治療的一個有吸引力的標靶。

【0003】 ROR1是一種細胞表面蛋白，透過與其配體的結合來傳遞信號，這些配體相信應是Wnt5a和NKX1-2。Wnt5a已被證實與ROR1胞外部分的捲曲結構域結合，並且在轉染的細胞中，已被證實可調節NF-κB的活化和正常和肺腫瘤細胞株的增殖。NKX1-2與ROR1的結合已被證實其會透過激酶依賴性和激酶非依賴性機制在肺癌細胞株的存活上扮演一定角色。

【0004】 分化團3(CD3)是在某些T細胞表面上表達的I型跨膜蛋白，為T細胞活化所必需。它參與T細胞受體(TCR)複合物並與該複合物的其他結構域相互作用。在哺乳動物中，CD3擁有三個不同的鏈(γ、δ和ε)，以及ζ2(CD247)鏈或ζ/η鏈。CD3鏈和ζ鏈加上TCR一起形成所謂的T細胞受體複合物。針對CD3的抗體，例如針對CD3ε的抗體，已被證實可引發CD3在T細胞上的聚集，使T細胞活化。

【0005】 在先前技術中已經描述過一些針對 ROR1 及 CD3 的雙特異性抗體。

【0006】 例如，WO2017/127499(A1)揭露了抗ROR1xCD3(anti-ROR1xCD3)的雙特異性抗體，即DuoBody®分子，其可特異性地結合於ROR1胞外結構域中的免疫球蛋白樣結構域(Ig-like domain)、Frizzled結構域或Kringle結構域。DuoBody®分子對T細胞導引之殺滅表達ROR1之修飾SK-MES-1細胞的$EC_{50}$值在0.2至17nM範圍內，最大殺滅率通常在20至40%範圍內。改良的雙特異性抗ROR1xCD3 DuoBody®分子RORxCD3 D1和ROR1xCD3 D2在T細胞導引殺滅表達ROR1的癌細胞MAVER-1、JeKo-1和Z-138時表現出的$EC_{50}$值為0.2至1nM，通常最大殺滅率低於50%。

【0007】 WO2017/142928(A1)揭露了抗ROR1xCD3雙特異性雙抗體，其由針對兩個標靶抗原具有特異性之兩個相交聯且由二硫鍵穩定的Fv結構域所組成，並且連接到免疫球蛋白Fc區(DART®形式)。進一步揭露的是幾種這些DART抗體針對表達ROR1的不同癌細胞株的T細胞導引殺滅細胞毒性測試。殺死這些癌細胞的$EC_{50}$值通常在10至100pM之間，最大殺滅率為10至40%，但有一些例外。然而，只有一個最大殺滅率略高於60%的例子被顯示，最好的DART抗體DART-D，報告的$EC_{50}$值在1.3至56pM範圍內。

【0008】 WO2019/008379(A1)揭露了抗ROR1xCD3雙特異性BiTE，即雙特異性抗體，其由兩個透過短接頭連接的scFv片段組成。最佳範例的BiTE是殖株F(Clone F)，它在0.01微克/毫升的濃度下即對ROR1陽性B-1643和B-7神經母細胞瘤細胞表現出顯著的細胞毒性。

【0009】 WO 2020/237173(A1)揭露了抗ROR1xCD3雙特異性抗體，其具有五種不同的以免疫球蛋白為基礎的雙特異構型。20 個基於免疫球蛋白的雙特異性抗體被製備以分析其內化(internalization)和它們誘導以T細胞為媒介殺死各種表達ROR1的癌細胞的能力。儘管速度不同，所有20個構築體(construct)都被內化了。此 20個構築體表現出以T細胞為媒介殺滅所述表達ROR1之癌細胞的$EC_{50}$值通常在幾pM至50pM的範圍內，最大殺滅率為10至50%。僅一例報告具有超過60%最大殺滅率。

【0010】 WO2014/167022(A1) 和後續專利申請WO2016/055592(A1)揭露了雙特異性抗體，其包含一個與人類CD3ε特異性結合的Fab片段和一個或兩個另外的Fab片段結合至人類ROR1的胞外結構域，其中所述雙特異性抗體在細胞測定中表現出低內化率。以對ROR1是單價或二價並包含免疫球蛋白Fc區的雙特異性抗體構築體來舉例說明，並對其進行內化實驗。內化實驗的結果表明，對ROR1為二價的抗體構築體在原代B-CLL 細胞中表現出比對ROR1為單價的相應抗體構築體更快的內化速率。以這些雙特異性抗體針對表達ROR1的RPMI8226 MM 標靶細胞進行的T細胞導引細胞毒性測試表明，在100pM的抗體濃度下，最大標靶細胞裂解率為30%至40%。WO2016/055592(A1)進一步揭露了使用對ROR1二價的改良抗體Mab2-TCBcv進行的T細胞導引細胞毒性測試，其針對數種表達不同水平的ROR1之標靶細胞進行測試。數據顯示，對於表達中等水平

ROR1的Colo-704和OVCAR-5卵巢癌細胞，Mab2-TCBcv的最大標靶細胞裂解率為20%至50%，對於表達低水平ROR1的SKOV3卵巢癌細胞的最大標靶細胞裂解率為20%。

【0011】 從上述文獻可以明顯看出，針對表達低水平ROR1的癌細胞，先前技術的抗 ROR1xCD3抗體通常表現出顯著降低的效力。此外，這些先前技術抗體在針對許多表達ROR1的癌細胞，特別是針對低表達ROR1的癌細胞的細胞毒性測定中，通常表現出較低的最大殺滅百分率—通常遠低於50%，這表明它們的作用模式並不理想。

【0012】 因此，顯然需要新穎的和改良的抗ROR1xCD3治療性抗體。

【0013】 所述治療性抗體應該對高表達ROR1的癌細胞以及對較低水平表達ROR1的癌細胞具有高效力。此外，它們應該表現出對於這些癌細胞合理的最大殺滅百分率，例如40%，甚至更多。同時，它們應表現出可耐受的安全性，以將受限於劑量的副作用保持在低水平。此外，希望所述治療性抗體具有優異的生物物理特性，例如高穩定性，以促進可開發性和高產量的可生產性。

【發明內容】

【0014】 本發明的一個目的是提供一種藥物以改善表達ROR1的癌症的治療。特別的是，本發明的一個目的是提供新穎的和改良的治療性抗體，其也能夠有效地根除表達低水平ROR1的癌細胞。本發明的另一個目的是鑑識出有更佳作用模式的抗ROR1xCD3抗體，即其

在細胞毒性測定中表現出針對表達ROR1的癌細胞高百分比的最大殺滅力。所述新穎的和改良的治療性抗體應進一步具有可耐受的安全性，亦即不應影響健康細胞或不應透過與CD3的非特異性結合而全身性活化T細胞而引起劑量限制性的毒性。

【0015】 本發明人現已發現如本文所定義的多特異性抗體，其包含一個或兩個特異性標靶於ROR1的結合域(ROR1-BDs)和一個特異性標靶於CD3的結合域(CD3-BDs)，尤其是由特定的序列特徵表示出的結合域，在殺死高到低水平表達ROR1的癌細胞方面表現出驚人的高效力。此外，很驚訝地發現，如本文定義、包含一個ROR1-BD之多特異性抗體在針對高至低水平表達ROR1的癌細胞之T細胞導引細胞毒性測定中通常表現出60%和更高的最大殺滅力。

【0016】 因此，在第一方面，本發明是關於多特異性抗體，其包含：

a) 一個或兩個結合域，特異結合於ROR1的胞外區域(ROR1-BDs)；

b) 一個結合域，特異結合於CD3(CD3-BD)；其中

-多特異性抗體不包含免疫球蛋白Fc區；

-所述ROR1-BDs彼此獨立地包含選自由下列所組成的一組CDR序列：

SEQ ID NO: 1的HCDR1序列，

SEQ ID NO: 2的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 3的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 4的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 5的LCDR2序列，

SEQ ID NO: 6的LCDR3序列；

和/或由下列所組成的一組CDR序列： SEQ ID NO: 13或14的HCDR1序列，

SEQ ID NO: 15的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 16的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 17的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 18的LCDR2序列，和

SEQ ID NO: 19的LCDR3序列；

-所述CD3-BD包含由下列所組成的一組CDR序列：

SEQ ID NO: 30的HCDR1序列，

SEQ ID NO: 31的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 32的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 33的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 34的LCDR2序列，和

SEQ ID NO: 35的LCDR3序列。

【0017】 在第二方面，本發明是關於特異地結合於ROR1結合域。

【0018】 在第三方面，本發明是關於編碼此發明之多特異性抗體或特異性ROR1結合域的一種核酸或兩種核酸。

【0019】 在第四方面，本發明是關於一種或兩種載體，其包含此發明的一種或兩種核酸。

【0020】 在第五方面，本發明是關於一種宿主細胞或多種宿主細胞，其包含本發明的載體或兩種載體。

【0021】 在第六方面，本發明是關於生產本發明之多特異性抗體的方法，包括(i)提供本發明的核酸或兩種核酸，或本發明的載體或兩種載體，表達所述一種或多種核酸，或所述一種或多種載體，並從表達系統中收集所述多特異性抗體或所述特異性結合域，或(ii)提供本發明的一種或多種宿主細胞，培養所述宿主細胞或所述多種宿主細胞；從細胞培養物中收集所述多特異性抗體或所述特異性結合域。

【0022】 在第七方面，本發明是關於一種藥物組合物，其包含本發明的多特異性抗體和藥學上可接受的載體。

【0023】 在第八方面，本發明是關於使用本發明的多特異性抗體作為藥物。

【0024】 在第九方面，本發明是關於將本發明的多特異性抗體用於治療疾病，更特別是選自癌症的人類疾病，特別是表達ROR1的癌症。

【0025】 在第十方面，本發明是關於一種用於治療疾病，尤其是人類疾病，更特別是選自癌症的人類疾病之方法，其包括將本發明之多特異性抗體投予至有需要的病人的步驟。

【0026】 本發明的各個方面、有利特徵和優先實施方式概括於下列各項中，其分別各自或連合起來可進一步有助於解決本發明的目標：

1. 一種多特異性抗體，包括：

a) 一個或兩個結合域，其特異地結合於ROR1的胞外區

域(ROR1-BDs)；和

b) 一個結合域，其特異地結合於CD3(CD3-BD)；

其中

-所述ROR1-BDs彼此獨立地包含一組CDR序列，該CDR序列選自由下列所組成的集合

SEQ ID NO: 1的HCDR1序列，

SEQ ID NO: 2的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 3的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 4的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 5的LCDR2序列，和

SEQ ID NO: 6的LCDR3序列；

和/或下列所組成的集合

SEQ ID NO: 13或14的HCDR1序列，

SEQ ID NO: 15的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 16的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 17的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 18的LCDR2序列，和

SEQ ID NO: 19的LCDR3序列；

-所述CD3-BD包含由下列組成的一組CDR序列

SEQ ID NO: 30的HCDR1序列，

SEQ ID NO: 31的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 32的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 33的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 34的LCDR2序列，和

SEQ ID NO: 35的LCDR3序列。

2. 項目1的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體包括：

a) 一個或兩個結合域，其特異地結合於ROR1的胞外區域(ROR1-BDs)；和

b) 一個結合域，其特異地結合於CD3(CD3-BD)；

其中

-所述ROR1-BDs彼此獨立地包含一組CDR序列，該CDR序列選自由下列所組成的集合

SEQ ID NO: 1的HCDR1序列，

SEQ ID NO: 2的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 3的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 4的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 5的LCDR2序列，和

SEQ ID NO: 6的LCDR3序列；

或由以下組成的集合

SEQ ID NO: 13或14 的 HCDR1 序列，

SEQ ID NO: 15的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 16的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 17的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 18的LCDR2序列，和

SEQ ID NO: 19的LCDR3序列；

-所述CD3-BD包含一組由下列組成的CDR序列

SEQ ID NO: 30的HCDR1序列，

SEQ ID NO: 31的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 32的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 33的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 34的LCDR2序列，和

SEQ ID NO: 35的LCDR3序列。

3. 項目1或2的多特異性抗體，其中所述的多特異性抗體具有以下特徵1)至3)的一項或多項：

1)所述的多特異性抗體不包含免疫球蛋白Fc區；

2)所述的多特異性抗體不包含CH1和/或CL區；

3)所述的多特異性抗體是人源化的，特別是所述多特異性抗體是人源化的並且包含來自於兔子的CDR。

4. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述一個或兩個ROR1-BD與ROR1的Ig樣結構域結合和/或不阻斷Wnt5α與ROR1的結合。

5. 前述項目中任一項的多特異性抗體，在所述多特異性抗體包含兩個ROR1-BD的情況下，所述兩個ROR1-BD包含兩組不同的CDR，即一個ROR1-BD包含SEQ ID NO：1至6的CDR，另一個ROR1-BD包含SEQ ID NO：13/14至19的CDR，或所述兩個ROR1-BD包含兩組相同的CDR，亦即兩個ROR1-BD都包含SEQ ID NO：1至6的CDR或SEQ ID NO：13/14至19的CDR，特別是所述兩個ROR1-BD包含兩組相同的CDR。

6. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中多特異性抗體是三特異性的。

7. 項目6的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體包含一個結合域，其特異地結合於人類血清白蛋白(hSA-BD)。

8. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中多特異性抗體是三特異性和三價的或三特異性和四價的。

9. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體的形式是選自由下列所組成的群組：串聯三單鏈變異區片段(tandem tri-scFv)(三聯體(triplebody))；三鏈抗體(triabody)；單鏈雙抗體-單鏈變異區片段(scDb-scFv)；與異二聚化結構域的N-和/或C-末端而非異二聚化$F_c$結構域融合的串聯tri-scFv或scDb-scFv；和MATCH。

10. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體的形式選自scDb-scFv、scMATCH3、MATCH3和MATCH4。

11. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述一個或兩個ROR1-BD中，當其每個為scFv形式時：

    a. 會與人類ROR1的胞外結構域結合，透過表面電漿共振(SPR)量得單價解離常數($K_D$)為1pM至2nM，特別是$K_D$為1pM至1nM，尤其是1至500pM;

    b. 會與表達人類ROR1的MDA-MB-231細胞結合，$EC_{50}$為5pM至10nM，特別是$EC_{50}$為5pM至5nM，特別是$EC_{50}$為5pM至4 nM，特別是$EC_{50}$為5pM至3nM;

c. 其熔化溫度($T_m$)透過差示掃描螢光法(DSF)測定為至少58°C，特別是至少59°C，特別是至少60°C，特別是至少61°C，尤其是其中所述scFv配製在含有150mM NaCl、pH6.4的50mM磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液中；

d. 在4°C下儲存4週後，單體含量的損失小於3%，特別是小於2%，尤其是小於1%，此時所述scFv的起始濃度為10mg/ml，特別是其中所述scFv配製在含有150mM NaCl、pH6.4的50mM磷酸檸檬酸鹽緩衝液中；和/或

e. 在 40°C 下儲存 4 週後，單體含量的損失小於 10%，特別是小於 2%，尤其是小於 1%，此時所述 scFv 的起始濃度為 10mg/ml，特別是其中所述 scFv 配製在含有 150mM NaCl、pH6.4 的 50mM 磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液中；和/或

f. 在 4°C or 40°C 下儲存 4 週後，蛋白質含量的損失小於 1%，此時所述 scFv 的起始濃度為 10 mg/ml，特別是其中所述 scFv 配製在含有 150mM NaCl、pH6.4 的 50mM 磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液中。

12. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述一個或兩個ROR1-BD包含VH1a、VH1b、VH3或VH4結構域框架序列FR1至FR4；特別是VH3或VH4結構域框架序列FR1至FR4；特別是VH3結構域框架序列FR1至FR4。

13. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述一種或兩種ROR1-BD還具有以下特徵1)和2)中的一種或兩種：

1) 一個包含框架區FR1、FR2和FR3的VL結構域，其選自Vκ亞型，特別是選自Vκ1和Vκ3亞型，特別是Vκ1亞型，和框架FR4，其選自一個Vλ FR4，特別是Vλ FR4，其包含一胺基酸序列與SEQ ID NO: 76至SEQ ID NO: 83中的任一個有至少70、80、90%相同，更特別地是選自SEQ ID NO: 76至SEQ ID NO:83的一個Vλ FR4，特別是根據 SEQ ID NO: 76或83的Vλ FR4；

2) 一個包含VH框架區FR1、FR2、FR3和FR4的VH結構域，其選自VH框架亞型，特別是選自VH框架亞型VH1a、VH1b、VH3和VH4，特別是選自VH框架亞型VH3和VH4，尤其是VH3亞型；其中所述VH框架區FR1、FR2、FR3和FR4具有下列取代方式(AHo編號)：在胺基酸位置12的精胺酸(R)；在胺基酸位置103的蘇胺酸(T)和胺基酸位置144的麩醯胺酸(Q)。

14. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述一種或兩種ROR1-BD包含

a) 一VH序列，與選自SEQ ID NO：7和10的任一胺基酸序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的相同性；和

b) 一VL序列，與選自SEQ ID NO: 9和12的任一胺基酸序列具有至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的相同性；

或

a) 一VH序列，與選自SEQ ID NOs: 20，23，26和28的任一胺基酸序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的相同性；和

b) 一 VL 序列，與選自 SEQ ID NOs: 22，25，27，和 29 的任一胺基酸序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%的相同性；

或

a) 一 VH 序列，與選自 SEQ ID NOs: 8 和 11 的任一胺基酸序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%的相同性；和

b) 一 VL 序列，與選自 SEQ ID NOs: 9 and 12 的任一胺基酸序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%的相同性；

或

a) 一 VH 序列，與選自 SEQ ID NOs: 21 和 24 的任一胺基酸序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%的相同性；和

b) 一 VL 序列，與選自 SEQ ID NOs: 22 和 25 的任一胺基酸序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%的相同性。

15. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述一種或兩種 ROR1-BD包含

a) 一 VH 序列與選自 SEQ ID NOs: 7, 20 和 26 的任一胺基酸序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%的相同性；和

b) 一 VL 序列與選自 SEQ ID NOs: 9, 22 和 27 的任一胺基酸序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%的相同性；

或

1) 一 VH 序列與選自 SEQ ID NOs: 8, 11 和 24 的任一胺基酸序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 的相同性；和

2) 一 VL 序列與選自 SEQ ID NOs: 9, 12 和 25 的任一胺基酸序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%的相同性。

16. 項目1至14中任一項的多特異性抗體，其中所述一種或兩種 ROR1-BD包含

a) 一個選自SEQ ID NOs: 7和10的VH序列，

b) 一個選自SEQ ID NOs: 9和12的VL序列；

或

a) 一個選自 SEQ ID NOs: 20, 23, 26 和 28 的 VH 序列，

b) 一個選自 SEQ ID NOs: 22, 25, 27 和 29 的 VL 序列；

或

a) 一個選自 SEQ ID NOs: 8, 11 和 14 的 VH 序列，

b) 一個選自 SEQ ID NOs: 9, 12 和 25 的 VL 序列。

17. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述一種或兩種ROR1-BD包含

a) SEQ ID NO: 7的VH序列和SEQ ID NO: 9的VL序列；或

b) SEQ ID NO: 10 的 VH 序列和 SEQ ID NO:12 的 VL 序列；或

c) SEQ ID NO: 20 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 22 的 VL 序列；或

d) SEQ ID NO: 23 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 25 的 VL 序列；或

e) SEQ ID NO: 8 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 9 的 VL 序列；或

f) SEQ ID NO: 11 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 12 的 VL 序列；或

g) SEQ ID NO: 21 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 22 的 VL 序列；或

h) SEQ ID NO: 24 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 25 的 VL 序列；或

i) SEQ ID NO: 26 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 27 的 VL 序列；或

j) SEQ ID NO: 28 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 29 的 VL 序列；

特別是其中所述一種或兩種 ROR1-BD 包含

a) SEQ ID NO: 7 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 9 的 VL 序列；或

b) SEQ ID NO: 10 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 12 的 VL 序列；或

c) SEQ ID NO: 23 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 25 的 VL 序列；或

d) SEQ ID NO: 8 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 9 的 VL 序列；或

e) SEQ ID NO: 11 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 12 的 VL 序列；或

f) SEQ ID NO: 24 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 25 的 VL 序列。

18. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述CD3-BD結合於CD3ε。

19. 前述項目中任一項的多特異性抗體，當其中所述CD3-BD為scFv形式時；

a) 由SPR量得其結合於CD3ε上的解離常數($K_D$)小於50nM，$K_D$值特別是0.1至50nM，特別是0.1至30nM，特別是0.1至15nM，特別是0.1至10nM；

b) 由SPR量得其結合於食蟹獼猴(Cynomolgus)CD3上的解離常數($K_D$)小於50nM，$K_D$值特別是0.1至50nM，特別是0.1至30nM，特別是0.1至15nM，特別是0.1至10nM；和

c) 具有之熔化溫度(Tm)透過差示掃描螢光法(DSF)測定為至少60℃，特別是至少65℃，更特別是至少67℃。

20. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述CD3-BD包含VH1a、VH1b、VH3或VH4結構域框架序列FR1至FR4；特別是VH3或VH4結構域框架序列FR1至FR4；特別是VH3結構域框架序列FR1至FR4。

21. 項目18至20項的多特異性抗體，其中所述CD3-BD具有以下特徵1)和2)中的一項或兩項：

1) 一包含框架區FR1、FR2和FR3和框架區FR4的VL結構域，其框架區FR1、FR2和FR3選自Vκ亞型，特別是選自Vκ1和Vκ3亞型，特別是Vκ1亞型，而框架區FR4選自Vλ FR4，特別是一個Vλ FR4，其包含一胺基酸序列，此胺基酸序列與SEQ ID NO: 76至SEQ ID NO: 83中的任一個至少70、80、90%相同，更特別的是一個Vλ FR4，

其選自SEQ ID NO: 76至SEQ ID NO: 83中的任一個，特別是根據SEQ ID NO: 76或83的Vλ FR4；

2) 一VH結構域，包含VH框架區FR1、FR2、FR3和FR4的，此些框架區選自VH框架亞型，特別是選自VH框架亞型VH1a、VH1b、VH3和VH4，特別是選自VH框架亞型VH3和VH4，尤其是VH3亞型；其中所述VH框架區FR1、FR2、FR3和FR4具有以下的取代方式(AHo編號)：在胺基酸位置12處的精胺酸(R)；在胺基酸位置103胺基酸的蘇胺酸(T)和在胺基酸位置 144的麩醯胺酸(Q)。

22. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述CD3-BD包含

a) 一VH序列，與選自SEQ ID NO: 36或37的任一胺基酸序列至少有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同；和

b) 一VL序列，與選自 SEQ ID NO: 38 的任一胺基酸序列至少有 90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同。

23. 項目22的多特異性抗體，其中所述CD3-BD包含

a) 一VH結構域，包含包含SEQ ID NO: 36或37的胺基酸序列，和

b) 一VL結構域，包含包含SEQ ID NO: 38的胺基酸序列。

24. 項目22或23的多特異性抗體，其中所述VH序列包含C51胺基酸殘基(AHo編號)並且所述VL序列包含C141胺基酸殘基(AHo編號)。

25. 項目7的多特異性抗體，其中所述hSA-BD包含

(i) 分別為SEQ ID NO：39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列，以及人類VH框架區序列FR1、FR2、FR3和FR4，這些序列選自VH框架亞型，特別是選自VH框架的亞型VH1a、VH1b、VH3和VH4，特別是來自VH框架亞型VH3和VH4，特別是VH3亞型；其中所述VH框架區FR1、FR2、FR3和FR4可任選地以下取代方式(AHo編號)：在胺基酸位置12的精胺酸(R)；胺基酸位置103位的蘇胺酸(T)和胺基酸位置144位的麩醯胺酸(Q)；和

(ii) 分別為 SEQ ID NO: 42、43 和 44 的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列，以及人類抗體 VL 框架區序列 FR1、FR2 和 FR3，這些序列選自 Vκ 亞型，特別是選自 Vκ1 和 Vκ3 亞型，尤其是 Vκ1 亞型，以及人抗體 VL 框架區 FR4 序列，為一個 Vλ FR4 序列，特別是選自 SEQ ID NO: 76 至 SEQ ID NO: 83 中任一個的 Vλ FR4 序列，特別是根據 SEQ ID NO: 76 或 83 的 Vλ FR4 序列；

或

(i) 分別為 SEQ ID NO：49、50 和 51 的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列，以及人類 VH 框架區序列 FR1、FR2、FR3 和 FR4，這些序列選自 VH 框架亞型，特別是選自 VH 框架的亞型 VH1a、VH1b、VH3 和 VH4，特別是來自 VH 框架亞型 VH3 和 VH4，特別是 VH3 亞型；其中所述 VH 框架區 FR1、FR2、FR3 和 FR4 可任選地以下取代方式(AHo 編號)：在胺基酸位置 12 的精胺酸(R)；胺基酸位置 103 位的蘇胺酸(T)和胺基酸位置 144 位的麩醯胺酸(Q)；和

(ii) 分別為 SEQ ID NO: 52、53 和 54 的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列，以及人類抗體 VL 框架區序列 FR1、FR2 和 FR3，這些序列選自 Vκ 亞型，特別是選自 Vκ1 和 Vκ3 亞型，尤其是 Vκ1 亞型，以及人抗體 VL 框架區 FR4 序列，為一個 Vλ FR4 序列，特別是選自 SEQ ID NO: 76 至 SEQ ID NO: 83 中任一個的 Vλ FR4 序列，特別是根據 SEQ ID NO: 76 或 83 的 Vλ FR4 序列；

或

(i) 分別為 SEQ ID NO：59、60 和 61 的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列，以及人類 VH 框架區序列 FR1、FR2、FR3 和 FR4，這些序列選自 VH 框架亞型，特別是選自 VH 框架的亞型 VH1a、VH1b、VH3 和 VH4，特別是來

自 VH 框架亞型 VH3 和 VH4，特別是 VH3 亞型；其中所述 VH 框架區 FR1、FR2、FR3 和 FR4 可任選地以下取代方式(AHo 編號)：在胺基酸位置 12 的精胺酸(R)；胺基酸位置 103 位的蘇胺酸(T)和胺基酸位置 144 位的麩醯胺酸(Q)；和

(ii) 分別為 SEQ ID NO: 62、63 和 74 的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列，以及人類抗體 VL 框架區序列 FR1、FR2 和 FR3，這些序列選自 Vκ 亞型，特別是選自 Vκ1 和 Vκ3 亞型，尤其是 Vκ1 亞型，以及人抗體 VL 框架區 FR4 序列，為一個 Vλ FR4 序列，特別是選自 SEQ ID NO: 76 至 SEQ ID NO: 83 中任一個的 Vλ FR4 序列，特別是根據 SEQ ID NO:76 或 83 的 Vλ FR4 序列。

26. 項目7或25的多特異性抗體，其中所述hSA-BD包含

(i) 一個包含SEQ ID NO：45的胺基酸序列的VH結構域和一個包含SEQ ID NO：46的胺基酸序列的VL結構域；或

(ii) 一個包含 SEQ ID NO：47 的胺基酸序列的 VH 結構域和一個包含 SEQ ID NO：48 的胺基酸序列的 VL 結構域；或

(iii) 一個包含 SEQ ID NO：55 的胺基酸序列的 VH 結構域和一個包含 SEQ ID NO：56 的胺基酸序列的 VL 結構域；或

(iv) 一個包含 SEQ ID NO：57 的胺基酸序列的 VH 結構域和一個包含 SEQ ID NO：58 的胺基酸序列的 VL 結構域；或

(v) 一個包含 SEQ ID NO：65 的胺基酸序列的 VH 結構域和一個包含 SEQ ID NO：67 的胺基酸序列的 VL 結構域；或

(vi) 一個包含 SEQ ID NO：66 的胺基酸序列的 VH 結構域和一個包含 SEQ ID NO：67 的胺基酸序列的 VL 結構域；或

(vii) 一個包含 SEQ ID NO：68 的胺基酸序列的 VH 結構域和一個包含 SEQ ID NO：70 的胺基酸序列的 VL 結構域；或

(viii) 一個包含 SEQ ID NO：69 的胺基酸序列的 VH 結構域和一個包含 SEQ ID NO：70 的胺基酸序列的 VL 結構域。

27. 項目7或25的多特異性抗體，其中所述hSA-BD包含

(i) 一個包含 SEQ ID NO：47 的胺基酸序列的 VH 結構

域和一個包含 SEQ ID NO：48 的胺基酸序列的 VL 結構域；或

(ii) 一個包含 SEQ ID NO：57 的胺基酸序列的 VH 結構域和一個包含 SEQ ID NO：58 的胺基酸序列的 VL 結構域；或

(iii) 一個包含 SEQ ID NO：68 的胺基酸序列的 VH 結構域和一個包含 SEQ ID NO：70 的胺基酸序列的 VL 結構域；或

(iv) 一個包含 SEQ ID NO：69 的胺基酸序列的 VH 結構域和一個包含 SEQ ID NO：70 的胺基酸序列的 VL 結構域。

28. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述結合域獨立地選自一群組，其包含Fab、F(ab)2、Fv、scFv、dsFv和scAb，特別是選自此一群組，其包含 Fv、scFv和dsFv。

29. 項目28的多特異性抗體，其中所述每個結合域皆獨立地選自

a) VL結構域和VH結構域(Fv片段)的同源對；或

b) VL結構域和VH結構域的同源對，其透過寡肽或多肽連接分子(scFv片段)連接。

30. 項目1至29中任一項的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體包含：

a) 一個ROR1-BD;

b) 一個CD3-BD;和

c) 一個hSA-BD。

31. 項目30的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體是單鏈蛋白，其中所述單鏈蛋白包含由以下組成的胺基酸序列：

(i) 第一VL結構域，

(ii) 第一多肽連接分子，

(iii) 第一VH結構域，

(iv) 第二多肽連接分子，

(v) 第二VL結構域，

(vi) 第三多肽連接分子

(vii) 第二VH結構域。

按所述順序接連排列，

其中所述第一VL結構域與所述第二VH結構域連合以形成第一結合域，並且所述第二VL結構域與所述第一VH結構域連合以形成第二結合域，

並且其中所述單鏈蛋白還包含

(viii) 第三結合域，由第三VL結構域和第三VH結構域透過第四多肽連接分子的連接形成，其中所述第三結合域透過第五多肽連接分子在C端或N端與所述胺基酸序列融合，

其中所述三個結合域具有以下特異性：

a) 一個特異地結合於人類ROR1的結合域(ROR1-BD)；

b) 另一個特異地結合於CD3的結合域(CD3-BD)；和

c) 剩餘的一個結合域，其特異地結合於hSA(hSA-BD)。

32. 項目31的多特異性抗體，其中所述的三個結合結構域具有以下特異性：

a) 第一和第二結合域中的一個特異地結合於人類血清白蛋白(hSA-BD)；

b) 第一和第二結合域中的另一個特異地結合於人類CD3 (CD3-BD)；和

c) 第三結合域特異地結合於 ROR1 (ROR1-BD)；

尤其是這三個結合結構域具有以下特異性：

a) 第一結合域特異地結合於人類血清白蛋白(hSA-BD)；

b) 第二結合域特異地結合於人類CD3 (CD3-BD)；和

c) 第三結合域特異地結合於 ROR1 (ROR1-BD)。

33. 項目30的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體是包含第一和第二單鏈蛋白的異二聚體蛋白，其中所述第一單鏈蛋白包含由以下組成的第一胺基酸序列(從N端到C端)

(ia) 第一VL結構域，

(iia) 第一多肽連接分子，和

(iiia) 第二VL結構域,和

其中所述第二單鏈蛋白包含由以下組成的第二胺基酸序列(從N-端到C-端)

(ib) 第一VH結構域，

(iib) 第二多肽接頭，和

(iiib) 第二個VH結構域，和

其中所述第一VL結構域與所述第一或所述第二VH結構域連合以形成第一結合域，並且所述第二VL結構域與所述VH結構域中的另一個連合以形成第二結合域，

並且其中所述第一和第二單鏈蛋白中的至少一個還包含

(iv) 第三結合域，其由第三VL結構域和第三VH結構域透過第三多肽連接分子所形成，其中所述第三結合域透過第四多肽連接分子與所述第一或第二胺基酸序列融合，

其中所述三個結合域具有以下特異性：

a) 一個特異地結合於人類CD3的結合域(CD3-BD)；

b) 另一個特異地結合於ROR1的結合域(ROR1-BD)；和

c) 剩餘的一個結合域，其特異地結合於hSA(hSA-BD)。

34. 項目30至33中任一項的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體：

a. 透過表面電漿共振(SPR)量得，以單價解離常數($K_D$)小於5nM與人類ROR1的胞外結構域結合，特別是單價$K_D$為1pM至5nM，特別是$K_D$為1pM至1nM，特別是1至500pM；

b. 透過SPR量得，以小於20nM的(單價)$K_D$結合於人類CD3ε，特別是單價$K_D$為0.1至20nM，特別是0.1至15nM，特別是0.1至10nM；

c. 透過SPR量得，與食蟹獼猴 (Cynomolgus)CD3ε有交叉反應，特別是以30nM或更小的單價$K_D$與食蟹獼猴CD3ε結合，特別是單價$K_D$為0.1至30nM，特別是0.1至20nM;

d. 與表達人類ROR1的MDA-MB-231細胞結合，$EC_{50}$為0.01至50nM，特別是$EC_{50}$為0.01至30nM，特別是$EC_{50}$為0.01至20nM，特別是$EC_{50}$為0.01至10nM,特別是$EC_{50}$為0.01至5nM;

e. 由T細胞驅動攻擊標靶細胞的細胞毒性試驗測得，其殺滅表達人類ROR1的MDA-MB-231標靶細胞的$EC_{50}$小於5nM，特別是1pM至5nM，特別是1pM至2nM，特別是1pM至1nM；

f. 透過差示掃描螢光法測定具有一熔化溫度(Tm)至少55°C、傾向是至少58°C、更恰當是至少60°C的，特別是其中所述抗原結合片段是在含300mM D(+)-蔗糖，pH6.5， 50mM磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液中；

g. 在4°C下儲存4週後，單體含量的損失小於1%，例如小於0.5%、小於0.3%、小於0.2%，此時所述scFv的起始濃度為1 mg/ml時，特別是其中所述scFv配製在含有300 mM D(+)蔗糖、pH 6.5的50mM磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液時；和/或

h. 在 40°C 下儲存 4 週後，單體含量的損失小於 5%，例如小於 4%，此時所述 scFv 的起始濃度為 1 mg/ml 時，特

別是其中所述 scFv 配製在含有 300mM D(+)蔗糖、pH 6.5 的 50mM 磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液時。

35. 項目30、31、33 和 34 中任一項的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體選自由SEQ ID NO: 87、88、89、90、91、92、93、94、107和108所定義的抗體。

36. 項目1至29中任一項的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體包含：

a) 兩個ROR1-BD；

b) 一個CD3-BD；和

c) 一個hSA-BD。

37. 項目36的多特異性抗體，其中兩個ROR1-BD結合ROR1胞外域上的相同表位或ROR1胞外域上不同表位，特別是ROR1胞外域上相同表位。

38. 項目36或37的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體是包含第一和第二單鏈蛋白的異二聚體蛋白，其中所述第一單鏈蛋白包含由以下組成的第一胺基酸序列(從N端到C端)：

(ia) 第一VL結構域，

(iia) 第一多肽連接分子，和

(iiia) 第二VL結構域，和

其中所述第二單鏈蛋白包含由以下組成的第二胺基酸序列(從N-端到C-端)：

(ib) 第一VH結構域，

(iib) 第二多肽連接分子，和

(iiib) 第二VH結構域，和

其中所述第一VL結構域與所述第一或所述第二VH結構域連合以形成第一結合域，並且所述第二VL結構域與所述VH結構域中的另一個連合以形成第二結合域，

並且其中所述第一和第二單鏈蛋白中的至少一個進一步包含

(iv) 第三結合域，由第三VL結構域和第三VH結構域透過第三多肽連接分子而形成，其中所述第三結合域透過第四多肽連接分子與所述第一或第二胺基酸序列融合，

並且其中所述第一和第二單鏈蛋白中的至少一個進一步包含

(v) 第四結合域，由第四VL結構域和第四VH結構域透過第五多肽連接分子而形成，其中所述第四結合域透過第六多肽連接分子與所述第一或第二胺基酸序列融合，

其中四個結合域具有以下特異性：

a) 一個特異地結合於人類CD3的結合域 (CD3-BD)；

b) 另外兩個特異地結合於ROR1 的結合域(ROR1-BD)；和

c) 剩餘的一個結合域，特異地結合於人類血清白蛋白(hSA-BD)。

39. 項目38的多特異性抗體，其中第三結合域與第一或第二胺基酸序列融合，第四結合域與兩個所述胺基酸序列中的另一個融合。

40. 項目38或39的多特異性抗體，其中所述第四結合域具有以下特異性：

a) 第一結合域特異地結合於人類CD3(CD3-BD)；

b) 第二結合域特異地結合於人類血清白蛋白(hSA-BD)；和

c) 第三和第四結合域特異地結合於ROR1(ROR1-BD)。

41. 項目36至40中任一項的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體：

a) 透過表面電漿共振(SPR)量得，以單價解離常數($K_D$)小於10nM與人類ROR1的胞外結構域結合，特別是單價$K_D$為10pM至5nM，特別是$K_D$為10pM至7nM，特別是10pM至5nM；

b) 透過SPR量得，以小於20nM的單價$K_D$結合於人類CD3ε，特別是單價$K_D$為0.1至20nM，特別是0.1至15nM，特別是0.1至10nM；

c) 透過SPR量得，與食蟹獼猴(Cynomolgus)CD3ε有交叉反應，特別是以30nM或更小的單價$K_D$與食蟹獼猴CD3ε結合，特別是單價KD為0.1至30nM，特別是0.1至20 nM;

d) 與表達人類ROR1的MDA-MB-231細胞結合，$EC_{50}$為0.01至10 nM，特別是$EC_{50}$為0.01至10nM，特別是$EC_{50}$為0.01至5nM，特別是$EC_{50}$ 為0.01至3nM,特別是$EC_{50}$為0.01至2nM;

e) 由T細胞驅動攻擊標靶細胞的細胞毒性試驗測得，其殺滅表達人類ROR1的MDA-MB-231標靶細胞的$EC_{50}$小

於500pM，特別是0.1pM至500pM，特別是0.1pM至200pM，特別是0.1pM至100pM，特別是0.1pM至50 pM；

f) 由T細胞驅動攻擊標靶細胞的細胞毒性試驗測得，其殺滅表達人類 ROR1 的 JEKO-1 標靶細胞的 $EC_{50}$ 小於20pM，特別是 0.01pM 至 20 pM，特別是 0.01pM 至10pM，特別是0.01pM至5pM，特別是0.01pM至3pM；

g) 由T細胞驅動攻擊標靶細胞的細胞毒性試驗測得，其殺滅表達人類 ROR1 的 SKOV-3 標靶細胞的 $EC_{50}$ 小於1000pM，特別是 0.1pM 至 1000pM，特別是 0.1 pM 至500 pM，特別是 0.01pM 至 200pM，特別是 0.01pM 至100pM；

h) 透過差示掃描螢光法測定具有一熔化溫度(Tm)至少53°C、傾向是至少55°C、更恰當是至少58°C的，特別是其中所述抗原結合片段是配製在含300 mM蔗糖，pH6.5，50mM磷酸檸檬酸鹽緩衝液中；

i) 在4°C下儲存2週後，單體含量的損失小於1%，特別是小於0.5%，此時所述多特異性抗體的起始濃度為1 mg/ml時，特別是其中所述多特異性抗體配製在含有300 mM D(+)蔗糖，pH6.5的50mM磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液時；和/或

j) 在40°C下儲存至少4週後，單體含量的損失小於5%，此時所述多特異性抗體的起始濃度為1 mg/ml時，特別是

其中所述多特異性抗體配製在含有300mM D(+)蔗糖，pH6.5的50mM磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液時。

42. 項目36至41中任一項的多特異性抗體，其中

所述第一單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 95的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 95組成，並且

所述第二單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 96的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 96組成；或者

所述第一單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 97的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 97組成，並且

所述第二單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 98的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 98組成；或者

所述第一單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 99的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 99組成，並且

所述第二單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 100的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 100組成；或者

所述第一單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 101的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 101組成，並且所述第二單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 102的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 102組成；或者

所述第一單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 103的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 103組成，並且

所述第二單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 104的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 104組成；或者

所述第一單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 105的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 105組成，並且所述第二單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 106的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 106組成；或者

所述第一單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 109的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 109組成，並且所述第二單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 110的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 110組成；或者

所述第一單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 111的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 111組成，並且所述第二單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 112的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 112組成；或者

所述第一單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 113的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 113組成，並且所述第二單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 114的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 114組成；或者

所述第一單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 115的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 115組成，並且

所述第二單鏈蛋白包含SEQ ID NO: 116的胺基酸序列，更確切地是由胺基酸序列SEQ ID NO: 116組成。

43. 項目32和38至41中任一項的多特異性抗體，其中所述異二聚體蛋白質不包含第一和第二蛋白交互作用結構域的關聯對，所述第一和第二VL和VH結構域除外，其中所述第一蛋

白質相互作用結構域包含在所述第一單鏈蛋白質中，並且其中所述第二蛋白質相互作用結構域包含在所述第二單鏈蛋白質中。

44. 項目43中任一項的多特異性抗體，其中所述第一單鏈蛋白和所述第二單鏈蛋白以平行方位異二聚化，即所述第一VL結構域與所述第一VH結構域相連合並且所述第二VL結構域與所述第二VH結構域相連合。

45. 項目43中任一項的多特異性抗體，其中所述第一單鏈蛋白和所述第二單鏈蛋白以反平行方位異二聚化，即所述第一VL結構域與所述第二VH結構域相連合並且所述第二VL結構域與所述第一VH結構域相連合。

46. 項目30至45中任一項的多特異性抗體，所述單鏈蛋白或異二聚體蛋白中的任何結合域是免疫球蛋白可變域(immunoglobulin variable domains)，排列在所述第一和第二單鏈蛋白中，並且通常透過連接分子作連接。

47. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中至少一個所述抗體可變域中包含源自親代兔子抗體(parental rabbit antibody)的CDR區。

48. 前述項目中任一項的多特異性抗體，其中所述ROR1-BD，或者在所述多特異性抗體中存在兩種ROR1-BD的情況下，至少一個所述的ROR1-BD和CD3-BD能夠同時與其各自的抗原結合，或者，在多特異性抗體中存在兩個ROR1-BD的

情況下，兩個ROR1-BD和CD3-BD都能夠同時與其各自的抗原結合。

49. 項目1、4和11至17中任一項所定義的ROR1-BD。

50. 一種多特異性抗體，包括

a) 一個或兩個第49項定義的ROR1-BD；

b) 至少一個結合域，其特異地結合不同於ROR1的標靶。

51. 一種核酸或兩種核酸，其編碼成項目1至48和50中任一項的多特異性抗體或項目49的ROR1-BD。

52. 一種載體或兩種載體，其包含項目51的核酸或兩種核酸。

53. 一種宿主細胞或多種宿主細胞，其包含項目52的載體或兩種載體。

54. 一種生產項目1至48和50中任一項的多特異性抗體或生產項目49的ROR1-BD的方法，包括(i)提供項目51的核酸或兩種核酸，或項目52的載體或兩種載體，表達所述一種或多種核酸，或所述一種或多種載體，並從表達系統中收集所述多特異性抗體或所述ROR1-BD，或(ii)根據項目53提供一種或多種宿主細胞，培養所述一種宿主細胞或所述多種宿主細胞；並從細胞培養物中收集所述多特異性抗體或所述ROR1-BD。

55. 一種藥物組合物，包含項目1至48和50中任一項的多特異性抗體和製藥上可接受的載體。

56. 項目1至48和50中任一項的多特異性抗體作為藥物使用。

57. 項目1至48和50中任一項的多特異性抗體，用於治療疾病，特別是人類疾病，更特別是選自癌症的人類疾病。

58. 項目1至48和50中任一項的多特異性抗體，用於如項目57的疾病治療，其中所述疾病是表達ROR1的癌症。

59. 項目58的多特異性抗體，其中所述表達ROR1的癌症選自慢性淋巴細胞白血病/小淋巴細胞淋巴瘤(CLL/SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴性細胞白血病(ALL)、套細胞淋巴瘤(MCL)、毛細胞白血病、濾泡性淋巴瘤(FL)、邊緣區淋巴瘤(MZL)、瀰漫性大型B細胞淋巴瘤(DLBCL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、Richter綜合徵(RS)、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、大腸癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、膠質母細胞瘤、睾丸癌、子宮癌、腎上腺癌、黑色素瘤、神經母細胞瘤、肉瘤和腎癌。

60. 一種治療疾病，特別是人類疾病，更特別是選自癌症的人類疾病的方法，包括將項目1至48中任一項的多特異性抗體施用於有需要的患者的步驟。

61. 項目60的方法，其中所述疾病是表達ROR1的癌症。

62. 項目61的方法，其中所述表達ROR1的癌症選自慢性淋巴細胞白血病/小淋巴細胞淋巴瘤(CLL/SLL)、急性骨髓性細胞白血病(AML)、急性淋巴性細胞白血病(ALL)、套細胞淋巴瘤(MCL)、毛細胞白血病、濾泡性淋巴瘤(FL)、邊緣區淋巴瘤(MZL)、瀰漫性大型B細胞淋巴瘤(DLBCL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、Richter綜合徵(RS)、肺癌、胰腺癌、前列

腺癌、大腸癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、膠質母細胞瘤、睾丸癌、子宮癌、腎上腺癌、黑色素瘤、神經母細胞瘤、肉瘤和腎癌。

【圖式簡單說明】

【0027】

第1圖繪示透過流式細胞術，抗ROR1 scFvs PRO2060(A、B)和PRO2062對在MDA-MB-231細胞上表達的人類ROR1和對ROR1陰性MCF-7細胞的濃度反應曲線。PRO2060和PRO2062與ROR1陽性的MDA-MB-231細胞結合(A、C)，卻未觀察到其與ROR1陰性的MCF-7 細胞結合(B、D)。與參考Fab片段PRO221相比，PRO2060的$EC_{50}$結合值低約三倍，PRO2062的$EC_{50}$結合值高約三倍。圖中的數據點代表兩次技術重複(technical replicates)的平均值。

第2圖繪示透過流式細胞術，最佳化的抗ROR1 scFvs PRO2271(A、B)以及PRO2291和PRO2292(C、D)對在MDA-MB-231細胞上表達的人類ROR1和對ROR1陰性MCF-7細胞的濃度-反應曲線。所有scFv均表現出與ROR1陽性MDA-MB-231細胞(A、C)的結合，卻未發現與ROR1陰性MCF-7細胞(B、D)的結合。與PRO2062相比，最佳化的PRO2271的$EC_{50}$結合值降低了約兩倍。與PRO2060和PRO2062相比，PRO2060和PRO2062的變異體(包括用於穩定的VL-VH域間二硫鍵)，

PRO2291和PRO2292，表現出相似的$EC_{50}$結合值。圖中的數據點代表兩次技術重複的平均值。

第3圖繪示三特異性scMATCH3形式的示意圖。

第4圖繪示透過流式細胞術，抗ROR1xhSAxCD3 scMATCH3分子PRO2286、PRO2287(A、B)和PRO2257(C、D)對表達在MDA-MB-231細胞上的人類ROR1和對ROR1陰性的MCF-7細胞的濃度-反應曲線。所有三種scMATCH3分子均表現出與ROR1陽性之MDA-MB-231細胞(A、C)的結合，而未發現與ROR1陰性之MCF-7 細胞(B、D)的結合。PRO2213被包括作為參考之抗ROR1抗體。圖中的數據點代表兩次技術重複的平均值。

第5圖繪示透過流式細胞術抗ROR1xhSAxCD3 scMATCH3分子PRO2507、PRO2508、PRO2509、PRO2510和PRO2668對表達在MDA-MB-231細胞上的人類ROR1和對ROR1陰性MCF-7細胞的濃度-反應曲線。所有scMATCH3分子均顯示與ROR1陽性之MDA-MB-231細胞(A、B、C)結合，而未發現與ROR1陰性之MCF-7細胞結合(D)。PRO2510的最佳化變異體PRO2668顯示出與MDA-MB-231(E)細胞的結合，而未發現與ROR1陰性之MCF-7細胞(F)的結合。PRO2213被包括作為參考之抗ROR1抗體。圖中的數據點代表兩次技術重複的平均值。

第6圖繪示MDA-MB-231和MCF7細胞的ROR1表達和結合位點的定量結果。(A)ROR1表達程度是透過對所示腫瘤細胞的ROR1抗體染色來確定，然後用流式細胞術測定。藍色直方圖表示ROR1的表達量，而對照組以紅色表示。(B)使用Quantum Simply

Cellular抗小鼠IgG試劑盒對ROR1表面分佈量進行量化。數字表示在細胞表面計算的結合位點的數量。

第7圖繪示以ROR1為標靶的scMATCH3分子介導的細胞毒性和CD8 T細胞活化。(A)PBMC與MDA-MB-231細胞(頂部)或MCF7細胞(底部)以10:1的效應物(effector)與標靶物(target)的比例共培養40小時。對照組包括單獨的標靶細胞(自發裂解)，以及在實驗開始或實驗結束時用1%Triton處理的標靶細胞。從繪製於(A)的資料對可知，(B)CD8 T細胞活化和(C)CD4 T細胞活化，如CD69+細胞的頻率所示。三個具有代表性的實驗之一呈現於此。

第8圖繪示以ROR1為標靶的scMATCH3分子介導的細胞毒性和CD8 T細胞活化。(A)PBMC與MDA-MB-231細胞(頂部)或MCF7細胞(底部)以10:1的效應物(effector)與標靶物(target)的比例共培養40小時。對照組包括單獨的標靶細胞(自發裂解)，以及在實驗開始或實驗結束時用1%Triton處理的標靶細胞。由繪製於(A)的資料對可知，(B)CD8 T細胞活化和(C)CD4 T 細胞活化，如CD69+細胞的頻率所示。二個實驗之一呈現於此。

第 9 圖繪示 MATCH4 形式的示意圖。

第10圖繪示透過流式細胞術，二價抗ROR1 MATCH4分子PRO2589、PRO2590、PRO2591和PRO2592對在MDA-MB-231細胞上表達的人類ROR1(A、B)，對在JIMT-1細胞上表達的人類ROR1(C、D)，和對ROR1陰性之MCF-7細胞的濃度-反應曲線(E)。所有MATCH4分子均顯示與ROR1陽性MDA-MB-231細胞(A、B)和ROR1陽性JIMT-1細胞(C、D)的結合，而未發現與ROR1

陰性MCF-7細胞(E)的結合。PRO2590的最佳化變異體PRO2670表現出與MDA-MB-231(F)細胞的結合，而未發現與ROR1陰性MCF-7細胞(G)的結合。Fab片段PRO2213被包含在內作為參考的抗ROR1抗體。圖中的數據點代表兩次技術重複的平均值。

第11圖繪示透過對所示腫瘤細胞的ROR1抗體染色，隨後透過流式細胞術測定的ROR1表面表達程度。藍色直方圖表示ROR1的表達量，而陰性對照組以紅色表示。

第12圖繪示在幾種表達ROR1的細胞株中由感興趣的scMATCH3和MATCH4分子介導的細胞毒性。Pan-T細胞與MDA-MB-231細胞(A、左上)、JIMT-1(A、左下)、SKOV-3(A、右下)或Jeko-1 細胞(A、右上)以 10:1 的效應物與標靶物的比例共培養 40 小時。對照包括單獨的標靶細胞(自發裂解)，以及在實驗開始或實驗結束時用1%Triton處理的標靶細胞。MATCH4分子為PRO2589、PRO2590、PRO2591和PRO2592，並且曲線按結構域進行顏色編碼；scMATCH3分子是PRO2507、PRO2510和PRO2557。四個實驗中之呈現於此。MCF7用作參考細胞(B)，亦即為ROR1陰性細胞，並按照第12A圖所述進行處理。誤差線表示實驗重複之間的差異。

第13圖繪示在幾個表達ROR1的細胞株中由感興趣的MATCH分子介導的T細胞活化。Pan-T細胞與MDA-MB-231細胞(A)、JIMT-1(B)或SKOV-3(C)細胞以10:1的效應物與標靶物的比例共培養40小時。分析上清液的LD 釋放，並透過流式細胞術分析這些細胞是否存在活化的T 細胞，如CD69表達細胞的頻率所示。

上圖對應於CD8 T細胞，而下圖對應於CD4 T細胞。MATCH4分子是PRO2589、PRO2590、PRO2591和PRO2592，並且曲線按結構域進行顏色編碼；scMATCH3分子是PRO2507、PRO2510和PRO2557。3組(SKOV-3)或4組(MDA-MB-231, JIMT-1)中的一項實驗呈現於此。誤差線代表實驗重複之間的差異。

第14圖繪示在21個人類血清樣品中對於PRO2668(A)、PRO2669(B)、PRO2510(C)和PRO2589(D)預先存在的ADA的吸收程度，是透過描述於示例10中的基於ELISA對預先存在的ADA結合測定來確定。使用添加(spiked)和未添加(unspiked)的血清樣品進行測量(確認測定設置)。進一步顯示了添加所述分子之人類血清樣品的吸光程度(抑制(%))的相應降低(E)。

第15圖繪示由ROR1為標靶的scMATCH3和scMATCH4分子介導的細胞毒性和CD8 T細胞活化。Pan-T細胞與MDA-MB-231細胞(A 頂部)或JIMT-1細胞(A 底部)以10:1的效應物與標靶物的比例共培養40小時。對照組包括單獨的標靶細胞(自發裂解)，以及在實驗開始或實驗結束時用1%Triton處理的標靶細胞。由繪製於(A)的資料對可知，CD8 T細胞的活化如CD8+CD69+細胞的頻率所示(B)。至少兩個獨立實驗中的一個代表性實驗呈現於此。

第16圖繪示由T細胞介導的示例性實體腫瘤細胞株的消耗而產生之PRO2668介導的細胞毒性(A)。圖表說明在不同實體腫瘤細胞株的$EC_{50}$值與ROR1受體密度的關係(B)。T細胞介導的血液腫瘤細胞株耗竭而產生的細胞毒性(C)。將腫瘤細胞株與T細胞共培養40小時，並使用相對於對照組的乳酸脫氫酶釋放來評估細胞毒

性。細胞表面上ROR1受體的平均數量以及細胞毒性的平均$EC_{50}$值顯示在圖表插圖中。

第17圖繪示在第6天PRO2668介導的CD8活化和增殖，其使用MDA-MB-231或JIMT-1作為實體腫瘤標靶細胞(A)，和在第3天介導的CD8的活化和增殖，其由Z-138作為血液腫瘤標靶細胞(B)。標靶細胞和CellTrace紫羅蘭色標記的健康T細胞以5:1的E:T比率共培養。增殖細胞的頻率是透過相對於對照組的CellTrace紫色稀釋來確定。活化細胞是透過CD25標記來鑑定。兩個之中的一個代表性實驗呈現於此。

第18圖繪示CLL細胞和分裂活躍的Jeko-1細胞之直方圖(A)。CLL細胞樣本不會增殖。對比於CLL患者PBMC(淺灰色直方圖，在分裂活躍的Jeko-1腫瘤細胞系(深灰色直方圖)上評估5-乙炔基-2'-脫氧尿苷(EdU)的加入。EdU的加入代表細胞分裂。CLL 患者PBMC的ROR1表面表達和量化(白色直方圖，相對於黑色的陰性對照)呈現於此(B)。PRO2668與圈取之CLL患者腫瘤細胞的結合(C)。來自CLL患者的PBMC與同種異體健康T細胞以5:1的E:T比共培養40小時。特異性殺滅(D)由經過處理後AnnexinV和活/死染料陽CLL細胞的比例確定。來自D的T細胞針對活化標記CD69進行染色(E)。使用基於細胞計數珠陣列的多重因子(multiplex)系統評估來自D之上清液的細胞激素釋放(F)。描述於此的數據是四個獨立的捐助者/實驗之一。

第19圖繪示在不同劑量的scMATCH3 PRO2668和scMATCH4 PRO2670分子存在下的縱向腫瘤生長抑制(中位數)。免疫功能低

下的小鼠皮下植入Jeko-1細胞，3天後植入PBMC。在腫瘤體積達到80-100mm$^3$後，將動物隨機分組並開始投藥。每五天投藥一次。使用混合效應模型分析縱向數據，然後進行Tukey的多重比較測試。於實驗結束時相較於對照組IgG(Palivizumab)；ns：不顯著； **p≤0.01；* p≤0.05。

【實施方式】

【0028】 許多血液和實體癌症都表達ROR1，這使得表達ROR1的癌症成為癌症治療一個吸引人的目標。然而，迄今為止現有開發的雙特異性抗 ROR1xCD3治療性抗體通常不具備針對這類癌症的預期療效廣度。特別是，這些治療性雙特異性抗ROR1xCD3抗體通常對低水平表達ROR1的癌細胞具有中等效力。此外，這些現有抗體在針對許多表達ROR1之癌細胞的細胞毒性測定中通常表現出低百分比的最大殺滅率——通常遠低於50%，這表明它們的作用方式並不理想。因此，醫學界需要一個改良的抗ROR1xCD3的療法，其具有更高的功效來解決廣泛範圍內具有ROR1表達的癌症，包括以中低水平表達ROR1的癌症。

【0029】 本發明提供了多特異性抗體，其包含一個或兩個特異地結合於ROR1胞外結構域的結合域(ROR1-BDs)和一個特異地結合CD3的結合域(CD3-BD)，其中ROR1-BDs和CD3-BD的CDR區域具有上述定義。本發明的多特異性抗體能夠有效地殺死表達高水平ROR1的癌細胞以及僅以低水平表達ROR1的癌細胞。本發明的一些多特異性抗體，例如PRO2589和PRO2591表現出低於pM的$EC_{50}$，可殺死高

表達ROR1的JEKO-1細胞，以及其中一些多特異性抗體，例如PRO2589和PRO2590，在針對所述標靶細胞之T細胞導引的細胞毒性測定中，表現出低於50pM的$EC_{50}$，用以殺死低表達ROR1的SKOV-3卵巢癌細胞(例如第12和15圖)。

【0030】 此外，本發明的多特異性抗體，如此處定義的包含一個ROR1-BD，對不同ROR1表達之癌細胞，表現出70%及其以上的最大殺滅力，這是T細胞導引針對所述癌細胞的細胞毒性測定中所測得的。例如，PRO2510 針對表達高到低水平ROR1的MDA-MB-231癌細胞、JEKO-1癌細胞、JIMT-1癌細胞和SKOV-3癌細胞表現出約80%的最大殺滅力(例如第12和15圖)。

【0031】 此外，本發明的抗ROR1xCD3多特異性抗體表現出非常有利的生物物理性質，特別是優異的儲存穩定性。

【0032】 因此，本發明的多特異性抗體提供了更勝於常規療法的獨特治療優勢。

【0033】 除非另外定義，否則本文使用的所有技術和科學術語具有與本發明同領域之通常知識者理解的相同含義。

【0034】 除非另有說明，否則術語「包括」和「包含」在本文中以其開放式和非限制性的意義使用。對於此類後面的實施例，術語“包括”因此包括更狹義的術語“由……組成”。

【0035】 在描述本發明的上下文中(尤其是在以下專利申請範圍的上下文中)的術語“一”和“一個”和“該”以及類似的引用被解釋為同時涵蓋單數和複數，除非本文另有說明或與上下文明顯矛盾。例如，

術語“一細胞”包括多個細胞，包括它們的混合物。當複數形式用於化合物、鹽和類似之物時，這也意味著單一化合物、鹽和類似之物。

【0036】 在一方面，本發明是關於一種多特異性抗體，其包含:

a) 一個或兩個結合域，它們特異地結合於ROR1的胞外結構域(ROR1-BDs)；和

b) 一個結合域，其特異地結合於CD3(CD3-BD)；

其中所述ROR1-BD和所述CD3-BD包含如上定義的CDR序列。

【0037】 在更進一步的層面，本發明涉及多特異性抗體，其包含：

a) 一個或兩個結合域，特異地結合於ROR1的胞外結構域(ROR1-BDs)；和

b) 一個結合域，特異地結合於CD3(CD3-BD)；

其中所述ROR1-BD和所述CD3-BD包含如上定義的CDR序列;並且其中多特異性抗體不包含免疫球蛋白Fc區。

【0038】 如本文所引用，術語“抗體”和類似之物，包括完整抗體或其單鏈；及其任何抗原結合片段(即“抗原結合部分”)或其單鏈；以及包含抗體CDR、VH區或VL區的分子(包括但不限於多特異性抗體)。天然存在的“完整抗體”是一個醣蛋白，其包含透過二硫鍵相互連接的至少兩條重(H)鏈和輕(L)鏈。每條重鏈由重鏈可變區(本文縮寫為VH)和重鏈恆定區組成。重鏈恆定區由三個結構域CH1、CH2和CH3組成。每條輕鏈由輕鏈可變區(本文縮寫為VL)和輕鏈恆定區組成。輕鏈恆定區由一個結構域CL組成。VH和VL區可以進一步細分為高度變異區，稱為互補決定區(CDR)，兩側是較為保守的區域，稱為框架區

(FR)。每個VH和VL由三個CDR和四個FR組成，從胺基端到羧基端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈和輕鏈的可變區包含與抗原相互作用的結合域。抗體的恆定區可以導引免疫球蛋白與宿主組織或因子的結合，包括免疫系統的各種細胞(例如，作用細胞(effector cells))和經典補體系統的第一成份(Clq)。

【0039】 如本文所引用，術語“免疫球蛋白Fc區”或“Fc區”，用於定義免疫球蛋白重鏈的C端區，即重鏈恆定區的 CH2 和 CH3 結構域。術語“Fc區”包括天然序列Fc區和變異Fc區，即經改造以表現出某些所需特性的Fc區，例如經過改變的Fc受體結合功能和/或減少或抑制的Fab臂交換。這種經改造的Fc區的一個例子是旋鈕入孔(KiH) 技術(參見例如Ridgway等人，Protein Eng. 9:617-21 (1996) 和 Spiess 等人，J Biol Chem. 288 (37):26583-93 (2013))。天然序列Fc區包括人類IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。“Fc受體”或“FcR”描述了與抗體Fc區結合的受體。特別地，FcR是天然序列人類的FcR，其結合於IgG抗體(γ受體)並且其包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII受體亞型，包括這些受體的等位基因變異和可變剪接形式，FcγRII受體包括FcγRIIA(“活化受體”)和FcγRIIB(“抑制受體”)，它們具有相似的胺基酸序列，主要不同在於細胞質區的結構域。活化受體FcγRIIA在其細胞質結構域中含有一個免疫受體酪胺酸的活化模體 (ITAM)。抑制受體FcγRIIB在其細胞質結構域中含有基於免疫受體酪胺酸的抑制模體(ITIM)，(參見M.Daeron， Annu. Rev. Immunol. 5:203-234 (1997)。FcR的文獻回顧見於Ravetch和Kinet，Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)；Capet等人，Immunomethods 4:25-34 (1994)；和de Haas等

人，J.Lab. Clin. Med. 126: 330-41(1995)。其他FcR(包括未來將被確認的那些)皆包括在本文中的術語“FcR”中。術語“Fc受體”或“FcR”還包括新生兒受體FcRn，它負責母體IgG對胎兒的轉移(Guyer等人，J. Immunol. 117：587(1976)和Kim等人，J. Immunol. 24:249(1994))。測量與FcRn結合的方法是已知的(參見，例如，Ghetie and Ward，Immunol. Today 18: (12): 592-8(1997)；Ghetie等人，Nature Biotechnology 15 (7): 637-40(1997)；Hinton等人，J. Biol. Chem. TJI(8): 6213-6(2004); WO2004/92219(Hinton等人)。活體內與FcRn的結合和對人類FcRn高親和力結合多肽的血清半衰期可以測定，例如，給予具有變異Fc區的多肽於表達人類FcRn的轉基因小鼠或轉染的人類細胞株中，或於靈長類動物中。WO2004/42072(Presta)描述了改善或減少與FcR結合的抗體變異體。另見，例如，Shields等人，J. Biol. Chem. 9(2)：6591-6604(2001)。

【0040】 如本文所引用，術語「結合域」、「其抗原結合片段」、抗體的「抗原結合部分」等是指完整抗體的一個或多個片段，其保有特異性結合於給定抗原的能力(例如，ROR1、CD3、hSA)。抗體的抗原結合功能可以透過完整抗體的片段來執行。具體而言，在本發明之多特異性抗體的例子中，本文所用的術語「結合域」、「其抗原結合片段」、「抗原結合部分」等是指Fab片段，亦即由VL、VH、CL和CH1結構域組成的單價片段；一個$F(ab)_2$片段，亦即包含兩個透過二硫鍵在鉸鏈區連接之Fab片段的二價片段；由抗體單臂的VL和VH結構域組成的Fv片段；一個透過二硫鍵穩定的Fv片段(dsFv)；一個單鏈Fv片段(scFv) 和一個scAb，亦即由抗體單臂的VL、VH和CL結構域

組成的單鏈。較佳的是，本發明的抗體的結合域彼此獨立地選自Fv片段、scFv片段和單鏈Fv片段(scFv)。在特定實施例中，本發明抗體的結合域彼此獨立地選自單鏈Fv片段(scFv)。在其他具體實施例中，scFv片段的VL和VH結構域透過結構域間二硫鍵以達到穩定，特別是所述VH序列在51位置(AHo編號)包含單個半胱胺酸殘基，並且所述VL序列在位置141包含單個半胱胺酸殘基(AHo編號)。

【0041】 在一個實施例中，本發明的多特異性抗體不包含CH1和/或CL區。在特定實施方例中，本發明的多特異性抗體既不包含免疫球蛋白Fc區也不包含CH1和CL區。

【0042】 術語「互補決定區」(“CDR”)是指胺基酸序列，其邊界可使用許多熟知的方法中之任一種來確定，包括由Kabat等人描述的方法(1991)，「免疫學感興趣的蛋白質序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(“Kabat”編號方法)； Al-Lazikani等人，(1997) JMB 273，927-948(“Chothia”編號方法)；ImmunoGenTics(IMGT)編號(Lefranc, M.-P.，The Immunologist，7，132-136 (1999)；Lefranc, M.-P.等人，Dev. Comp. Immunol.，27，55-77(2003)(“IMGT”編號方案)；以及Honegger和Plückthun描述的編號方案，J. Mol Biol. 309 (2001) 657-670(“AHo”編號)。例如，對於經典形式，在Kabat之下，重鏈可變域(VH)中的CDR胺基酸殘基被編號為31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3)；輕鏈可變域(VL)中的CDR胺基酸殘基被編號為24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。在Chothia之下，VH中的CDR胺基

酸被編號為26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和95-102(HCDR3)；VL中的胺基酸殘基編號為24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。透過結合Kabat和Chothia對CDR的定義，CDR由人類VH中的胺基酸殘基26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)及95-102(HCDR3)和人類VL中的胺基酸殘基24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)及89-97(LCDR3)所組成。用IMGT的方法，VH中的CDR胺基酸殘基編號約為26-35(HCDR1)、51-57(HCDR2)和93-102(HCDR3)，VL中的CDR胺基酸殘基編號約為27-32(LCDR1)、50-52 (LCDR2)和89-97(LCDR3)(依照“Kabat”編號)。在IMGT之下，一個抗體的CDR可以用程序IMGT/DomainGap Align來確定。

【0043】 在本發明的上下文中，除非另有特別說明，否則使用Honegger和Plückthun(“AHo”)建議的編號系統(Honegger和Plückthun, J. Mol. Biol. 309(2001) 657-670)。具體而言，根據AHo編號方法，以下殘基被定義為CDR：LCDR1(也稱為CDR-L1)：L24-L42；LCDR2(也稱為CDR-L2)：L58-L72；LCDR3(也稱為CDR-L3)：L107-L138；HCDR1(也稱為CDR-H1)：H27-H42；HCDR2(也稱為CDR-H2)：H57-H76；HCDR3(也稱為CDR-H3)：H108-H138。為了清楚起見，Honegger和Plückthun的編號系統考慮了長度多樣性，並且在序列中給出了間隔，長度多樣性可見於天然抗體中的不同VH和VL亞家族中(特別是在CDR中)。因此，在給定的抗體可變結構域中，通常並非所有1至149的位置都有胺基酸殘基。

【0044】 如本文所引用，術語“結合特異性”是指個別抗體與一種抗原決定位(antigenic determinant)而非與不同的抗原決定位反應的能力。如本文所引用，術語“特異地結合於”或“特異於”是指可測量和可重複的相互作用，例如標靶和抗體之間的結合，其決定此標靶在不均質的一群分子中之存在，這些分子包括生物分子。例如，特異地結合於標靶(其可以是表位)的抗體是一種以更高的親和力(affinity)、結合力(avidity)、更容易和/或更長的持續時間結合於該標靶上的抗體。在其最一般的形式中(並且當沒有提及定義的參考時)，“特異性結合”是指抗體區分感興趣的標靶和不相關分子的能力，其透過測定而決定，例如依照本領域已知特異性測定的方法。此類方法包括但不限於Western blots、ELISA、RIA、ECL、IRMA、SPR(表面電漿共振)測試和胜肽掃描(peptide scans)。例如，可以進行標準的ELISA測定。可以透過標準呈色(例如，二抗與辣根過氧化物和四甲基聯苯胺與過氧化氫(horseradish peroxide and tetramethyl benzidine with hydrogen peroxide)進行評分。某些孔的反應由光密度評分，例如在450nm的光密度。典型的背景(=陰性反應)可能約為0.1OD；典型的陽性反應可能約為1OD。這意味著正分數和負分數之間的比率可以是10倍或更高。在更進一步的例子中，可以進行SPR測定，其中背景和信號間至少10倍，特別是至少100倍的差異代表著特異性結合。通常，結合特異性的測定不是透過使用單個參考分子，而是透過使用一組大約三到五個不相關的分子，例如奶粉、運鐵蛋白等來進行。

【0045】 更恰當地說，本發明的抗體是分離的抗體。如本文所引用，術語“分離的抗體”是指實質上不含帶有不同抗原特異性之其他

抗體的抗體(例如，特異地結合ROR1和CD3的分離抗體基本上不含特異地結合ROR1和CD3以外抗原的抗體)，或特異地結合ROR1、CD3和hSA的分離抗體，基本上不含特異地結合除ROR1、CD3和hSA之外抗原的抗體。此外，分離的抗體可以實質上不含其他細胞材料和/或化學物質。

【0046】 更恰當地說，本發明的抗體是單株抗體。如本文所引用，術語“單株抗體”是指具有實質上相同的胺基酸序列或相同基因來源的抗體。單株抗體顯示出對一個或多個特定表位的結合特異性和親和力。

【0047】 本發明的抗體包括但不限於嵌合抗體、人類和人源化抗體。

【0048】 如本文所引用，術語“嵌合抗體”(或其抗原結合片段)是指抗體分子(或其抗原結合片段)，其中(a)恆定區或其一部分被改變、代替或交換，以使抗原結合位點(可變區)連接至不同或改變的類別、效應物功能和/或物種的一恆定區；(b)可變區或其一部分被改變、代替或交換為具有不同或改變之抗原特異性的可變區。例如，小鼠抗體的恆定區可以替換成來自人類免疫球蛋白的恆定區。透過用人類恆定區替代，嵌合抗體可以保留其辨識抗原的特異性，同時與原始小鼠抗體相比在人類中具有降低的抗原性。

【0049】 如本文所引用，術語“人類抗體”(或其抗原結合片段)旨在包括其可變區中的框架區和CDR區均來源於人類序列的抗體(及其抗原結合片段)。此外，如果抗體含有恆定區，該恆定區也來源於這樣的人類序列，例如，人類種系(germline)序列，或人類種系序列的

突變形式。本發明的人類抗體及其抗原結合片段可以包括不是由人類序列編碼成的胺基酸殘基(例如，透過隨機或定點體外突變(mutagenesis)或透過體內體細胞突變引發的突變)。此人類抗體的定義特別排除了一種人源化抗體，其包含非人類抗原結合殘基。人類抗體可使用本領域已知的各種技術產生，包括噬菌體展示庫(Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol, 227:381(1992)；Marks等人, J. Mol. Biol, 222:581(1991))。也可用於製備人類單株抗體的是Cole等人描述的方法，單株抗體與癌症治療(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)，Alan R. Liss，p. 77(1985)；Boemer等人，J. Immunol，147(1)：86-95(1991)。另見van Dijk 和 van de Winkel，Curr. Opin. Pharmacol，5：368-74(2001)。人類抗體可以透過將抗原施用於基因轉殖動物來製備，該基因轉殖動物已被修飾能產生此類抗體以回應抗原攻擊，但其內在基因座(endogenous loci)已被停用，例如，免疫的異種小鼠(參見，例如，關於XENOMOUSE™技術的US6,075,181和US6,150,584)。亦參見，例如，關於透過人類B細胞融合瘤技術產生的人類抗體，Li等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557- 3562(2006)。

【0050】 如本文所引用，術語“人源化”抗體(或其抗原結合片段)是指保留非人類抗體的反應性同時在人類中免疫原性較低的抗體(或其抗原結合片段)。例如，這可以透過保留非人類CDR區並將此抗體其他部分用人類抗體之相對應部份(即恆定區以及可變區的框架部分)來替換而實現。額外的框架區修飾可以在人類框架序列內以及在源自另一個哺乳動物物種的種系之CDR序列內進行。本發明的人源化抗體

可包括不由人類序列編碼成的胺基酸殘基(例如透過隨機或定點體外誘變或透過體內體細胞突變引發的突變，或促進穩定性或製造的保守取代方式)。參見，例如，Morrison等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA，81:6851-6855,1984; Morrison and Oi ， Adv. Immunol. ，44:65-92,1988; Verhoeyen et al.， Science，239: 1534-1536，1988；Padlan, Molec. Immun. ，28:489-498 ， 1991 ；和Padlan, Molec. Immun.,31: 169-217，1994。其他人體工程技術的例子包括但不限於在US 5,766,886 中揭露的Xoma技術。

【0051】 如本文所引用，術語“重組人源化抗體”包括透過重組方式製備、表達、產生或分離的所有人類抗體，例如從轉化以表達人源化抗體之宿主細胞中分離的抗體，如，來自轉染瘤，以及透過任何其他方式製備、表達、產生或分離的抗體，這些方式包括剪接全部或部分人類免疫球蛋白的基因序列到其他DNA序列。

【0052】 較佳的是，本發明的多特異性抗體是人源化的。更佳的是，本發明的多特異性抗體是人源化的並且包含兔子來源的CDR。

【0053】 如本文所引用，術語“多特異性抗體”是指結合於至少兩個或更多個不同標靶(例如，ROR1和CD3)上的兩個或更多個不同表位的抗體。術語“多特異性抗體”包括雙特異性、三特異性、四特異性、五特異性和六特異性。較佳的是，本發明的多特異性抗體是雙特異性抗體或三特異性抗體，特別是三特異性抗體。如本文所引用，術語“雙特異性抗體”是指結合於兩個不同標靶(例如，ROR1和CD3)上的至少兩個不同表位的抗體。如本文所引用，術語“三特異性抗體”是指結合

於三個不同標靶(例如，ROR1、CD3和hSA)上的至少三個不同表位的抗體。

【0054】 術語“表位”是指能夠特異地結合於抗體的蛋白質決定位。表位通常由化學性活躍的表面分子群所組成，諸如胺基酸或糖側鏈，並且通常具有特定的三維結構特徵以及特定的電荷特徵。“構形”和“線性”表位的區別在於，在變性溶劑的存在下會失去與前者的結合，但不會失去與後者的結合。

【0055】 如本文所引用，術語“構形表位”是指當多肽鏈折疊形成天然蛋白質時，在表面聚集在一起的抗原之胺基酸殘基。

【0056】 術語“線性表位”是指一種表位，其中蛋白質和相互作用分子(例如抗體)之間的所有相互作用點沿著蛋白質的一級胺基酸序列線性地發生(連續的)。

【0057】 如本文所引用，術語“識別”是指抗體其抗原結合片段發現構形表位並與其相互作用(例如，結合)。

【0058】 如本文所引用，術語“結合力(avidity)”是指抗體-抗原複合物之整體穩定性或強度的信息量度。它受三個主要因素控制：抗體表位親和力；抗原和抗體的價數；以及交互作用部分的結構配置。最終，這些因素決定了抗體的特異性，即該特定抗體與精確抗原表位結合的可能性。

【0059】 本發明的多特異性抗體包含一種或兩種ROR1-BD。

【0060】 術語“ROR1”特別是指具有UniProt ID號Q01973的人類ROR1。適當地，本發明的ROR1-BD靶向於人類ROR1，特別是ROR1的胞外結構域(ECD)，其序列顯示在表6(SEQ ID NO：117)。在特定實施例中，ROR1-BD與ROR1的Ig樣結構域結合。ROR1的Ig樣結構域由SEQ ID NO: 117的殘基42至147所定義，與UniProt ID號Q01973一致。在其他特定實施例中，ROR1-BD並不會阻斷Wnt5α與ROR1的結合。

【0061】 適當地，當ROR1-BDs為scFv形式時，其特徵為以下參數中的一個或多個：

a. 透過表面電漿共振(SPR)測量，其與人類 ROR1 的胞外結構域結合，單價解離常數($K_D$)為 1pM 至 2nM，特別是 $K_D$ 為 1pM 至 1nM，特別是 1 至 500pM;

b. 與表達人類 ROR1 的 MDA-MB-231 細胞結合，$EC_{50}$ 為 5pM 至 10nM，特別是 $EC_{50}$ 為 5pM 至 5nM，特別是 $EC_{50}$ 為 5pM 至 4nM，特別是 $EC_{50}$ 為 5pM 至 3nM。

【0062】 如本文所引用，術語“MDA-MB-231細胞”是指表達ROR1的乳腺癌細胞株。MDA-MB-231細胞是可以商業方式購得的，並且可作為乳癌(腺癌)的細胞株模型。

【0063】 如本文所引用，術語“親和力”是指抗體和抗原在單一抗原位點的相互作用強度。在每個抗原位點內，抗體“臂”的可變區透

過微弱的非共價力在多處與抗原相互作用；相互作用越多，親和力越強。

【0064】 “結合親和力”通常是指分子(例如，抗體)的單個結合位點與其結合對象(例如，抗原或更具體地，抗原表位)之間非共價作用力的總和。除非另有說明，如本文所引用，「結合親和力」、「結合至」是指反映出兩者(例如，抗體片段和抗原)之間1:1相互作用固有的結合親和力。分子X和其對象Y的親和力通常可以用解離常數 ($K_D$)表示。親和力可透過本領域已知的常用方法而測得，包括本文所述的那些。低親和力抗體通常與抗原結合較慢且易於解離，而高親和力抗體通常與抗原結合較快且結合時間較久。測量結合親和力的多種方法在本領域中是已知的，其中任何一種都可以適用於本發明的目的。用於測量結合親和力(即結合強度)的具體說明性和示例性實施例如下所述。

【0065】 如本文所引用，術語“$K_{assoc}$”、“$K_a$”或“$K_{on}$”意指特定抗體-抗原相互作用的結合率，而術語“$K_{dis}$”、“$K_d$”或“$K_{off}$”，如本文所引用，意指特定抗體-抗原相互作用的解離速率。在一個實施例中，如本文所引用，術語“$K_D$”用來指解離常數，其由$K_d$與$K_a$的比值(即$K_d/K_a$)而獲得並可表示為莫耳濃度(M)。依據本發明的“$K_D$”或“$K_D$值”或“KD”或“KD值”在一個實施例中是透過表面電漿共振測定以測得。

【0066】 如段落[0176]和[0192](scFvs)；和[0219]和[0242]至[0244](多特異性分子)中所述，對重組人類ROR1的親和力可透過表面

電漿共振(SPR)測量確定。如段落[0208](scFvs)；和[0221]和[0247](多特異性分子)中所述，對重組人類CD3、重組食蟹獼猴CD3和重組狨猴CD3的親和力可透過表面電漿共振(SPR)測量確定。如段落[0213](scFvs)；和[0223]和[0249](多特異性分子)中所述，對重組人類血清白蛋白(hSA)、食蟹獼猴血清白蛋白(cSA)和小鼠血清白蛋白(mSA)的親和力可透過表面電漿共振(SPR)測量確定。

【0067】 在一些實施例中，本發明的 ROR1-BD 或本發明的多特異性抗體中存在的 ROR1-BD 並不阻斷 Wnt5α 與 ROR1 的結合。

【0068】 適當地，本發明之多特異性抗體的ROR1-BDs，當是scFv形式時，進一步以下列參數中的一個或多個為特徵：

c. 具有一熔化溫度(Tm)，透過差示掃描螢光法(DSF)測定至少是58°C，特別是至少59°C，特別是至少60°C，特別是至少61°C，尤其是其中所述scFv配製在含有150mM NaCl、pH 6.4的50mM磷酸檸檬酸鹽緩衝液中；

d. 在 4°C 下儲存 4 週後，單體含量的損失小於 3%，特別是小於 2%，尤其是小於 1%，此時所述 scFv 的起始濃度為 10mg/ml，特別是其中所述 scFv 配製在含有 150mM NaCl、pH 6.4 的 50mM 磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液中；和/或

e. 在 40°C 下儲存 4 週後，單體含量的損失小於 10%，此時所述 scFv 的起始濃度為 10mg/ml，特別是其中所述 scFv 配製在

含有 150mM NaCl、pH 6.4 的 50mM 磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液中；和/或

f. 在 4°C 或 40°C 下儲存 4 週後，蛋白質含量的損失小於 1%，此時所述 scFv 的起始濃度為 10mg/ml，特別是其中所述 scFv 配製在含有 150mM NaCl、pH 6.4 的 50mM 磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液中。

【0069】 對於大多數測量，奈米 DSF(Prometheus NT.48, NaonTemper)方法用於確定 scFv 和多特異性抗體的熱力學性質，例如在段落[0197]和[0206](scFv)和段落[0234]和[261](多特異形式)中所述。在 CD3-BD(scFvs)的情況下，如 Egan，et al.，MAbs，9(1) (2017)，68-84； Niesen，et al.，Nature Protocols，2(9) (2007) 2212-2221 所描述，使用了一種 DSF 方法。在該方法中，透過差示掃描螢光法並使用螢光染料 SYPRO® Orange 確定了 scFv 構築體(constructs)熱解折疊(thermal unfolding)的轉變中點(參見 Wong 和 Raleigh， Protein Science 25 (2016) 1834-1840)。在 pH6.4 的磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液中製備樣品，使得最終蛋白質濃度為 50µg/ml，並在總體積 100µl 中包含最終濃度為 5x 的 SYPRO® Orange。將 25µl 製備好的樣品以三重複的方式添加到白色的 AB gene PCR 盤中。該測定在用作熱循環儀的 qPCR 機器中進行，並使用軟體的自定義染料校準程序檢測螢光發射。包含測試樣品的 PCR 盤以 1°C 的增量從 25°C 升溫至 96°C，每

次升溫後暫停 30 秒。總測定時間約為 2 小時。 Tm 由軟體 GraphPad Prism 使用數學二階導數方法計算曲線反曲點而求得。報告的 Tm 是三個測量值的平均值。

【0070】 單體含量的損失是透過SE-HPLC層析圖曲線下的面積計算來確定。 SE-HPLC是一種基於固體固定相和液體流動相的分離技術，如美國藥典(USP)第 621 章所述。該方法根據分子的大小和形狀，利用疏水固定相和水性流動相分離分子。分子的分離發生在特定管柱的空隙體積($V_0$)和總滲透體積($V_T$)之間。SE-HPLC的量測是在配備自動樣品注入和檢測280nm波長的UV檢測器的Chromaster HPLC系統(Hitachi High-Technologies Corporation)上進行。該設備是由軟體EZChrom Elite(Agilent Technologies，版本 3.3.2 SP2)所控制，該軟體還支持分析量取的層析圖。蛋白質樣品通過離心澄清後，在注入前，先在自動進樣器中保持於 4-6°C 的溫度下。對於scFv樣品的分析，使用Shodex KW403-4F管柱(Showa Denko Inc.，#F6989202)和流動相的標準緩衝生理鹽水(50 mM 磷酸鈉 pH 6.5，300 mM 氯化鈉)，其建議流速為0.35毫升/分鐘。每次進樣的目標上樣量為 5 µg。樣品由波長設置為280 nm的UV檢測器所檢測，數據由合適的軟體套件記錄。得到的層析圖在$V_0$到$V_T$的範圍內進行分析，因此排除了洗出時間>10分鐘的基質相關峰值(matrix associated peaks)。

【0071】 適當地，本發明之多特異性抗體的ROR1-BD是提供在本公開內容的結合域。本發明多特異性抗體的ROR1-BDs包括但不限於序列列於表1的人源化ROR1-BDs。

【0072】 此外，本發明的多特異性抗體包含一種CD3-BD。在特定實施例中，所述CD3-BD與CD3ε結合。特別的是，本發明的多特異性抗體包含一種靶向人類和食蟹獼猴(Macaca fascicularis)CD3ε的CD3BD。

【0073】 適當地，本發明中使用的CD3-BD，當是scFv 形式時，其特徵為以下參數中的一個或多個：

a. 透過SPR測量，與人類CD3ε結合，其解離常數($K_D$)小於50nM，特別是$K_D$介於0.1至50nM，特別是0.1至30nM，特別是0.1至15nM，特別是0.1至10nM。
b. 透過 SPR 測量，與食蟹獼猴(Cynomolgus)CD3 結合，其$K_D$小於 50nM，特別是 $K_D$介於 0.1 至 50nM 的 $K_D$，特別是 0.1 至 30 nM，特別是 0.1 至 15nM，特別是 0.1 至 10nM；和
c. 具有一熔化溫度(Tm)，透過差示掃描螢光法(DSF)測定至少是 60°C，特別是至少 65°C，更特別是至少 67°C。

【0074】 適當地，本發明之多特異性抗體的CD3-BD是提供在本揭露內容的結合域。本發明多特異性抗體的CD3-BD包括但不限於序列列於表2的人源化CD3-BD。

【0075】 為了增加相同或更低分子量之特異性/功能性的數量，有利的是使用包含抗體片段的抗體，例如Fv和Fab片段以及其他抗體片段。與整個免疫球蛋白分子相比，這些較小的分子保留了整個抗體的抗原結合活性，並且還表現出更佳的組織穿透度和藥物動力學特性。雖然這些片段似乎表現出優於全免疫球蛋白的一些優點，但它們也遇到血清清除率增加的問題，因為它們缺乏賦予體內長半衰期的Fc結構域(Medasan等人，1997，J. Immunol. 158:2211-2217)。具有較低分子量的分子更有效地穿透到標靶組織(例如實體癌)中，因此有望在相同或更低劑量下提高療效。

【0076】 本發明人現已發現，在本發明的多特異性抗體添加人類血清白蛋白結合域(hSA-BD)不會干擾其他結合域結合其各自標靶的能力。這一發現是令人意外的，因為先前並不預期所有三個或四個結合域在複雜的活體內多靶點、多細胞的情況下，仍能保持功能而沒有空間或其他方式相互抑制。

【0077】 術語“hSA”特別是指UniProt ID號P02768的人類血清白蛋白。人類血清白蛋白(hSA) 是一個66.4kDa，在人類血清中很豐富的蛋白質(佔總蛋白質的50%)，其由585個胺基酸組成(Sugio，Protein Eng，Vol. 12，1999，439-446)。多功能hSA蛋白與其結構相關，該結構允許結合和運送多種代謝物，例如脂肪酸、金屬離子、膽紅素和一些藥物(Fanali，Molecular Aspects of Medicine，Vol. 33，2012，209-290)。血清中的HSA濃度約為3.5-5g/dl。與白蛋白結合的

抗體及其片段可用於，例如延長與其接合的藥物或蛋白質的體內血清半衰期。

【0078】 在一些實施例中，hSA-BD是源自單株抗體或抗體片段。

【0079】 包含在本發明之多特異性抗體中合適的hSA-BD是提供在本公開內容的結合域。包含在本發明之多特異性抗體中的hSA-BD包括(但不限於)序列列於表3中的人源化hSA結合域。

【0080】 在特定實施例中，包含在本發明之多特異性抗體中的hSA-BD特異地結合於hSA和食蟹獼猴血清白蛋白(cSA)。

【0081】 在其他特定實施例中，包含在本發明之多特異性抗體中的hSA-BD特異地結合於hSA、cSA和小鼠血清白蛋白(mSA)。在這些特定實施例中，包含在本發明之多特異性抗體中的hSA-BD，當為scFv形式時，其特徵為以下參數中的一個或多個：

a) 透過SPR在pH 5.5和pH7.4下測量，與人類血清白蛋白(hSA)結合，其解離常數($K_D$)介於 0.1 至 10 nM，特別是介於 0.1 至 5nM ；

b) 透過 SPR 在 pH5.5 和 pH7.4 下測量，與食蟹獼猴(Cynomolgus)血清白蛋白(cSA)結合，其解離常數($K_D$)介於 0.1 至 10nM，特別是介於 0.1 至 5nM；

c) 透過 SPR 在 pH5.5 和 pH7.4 下測量，與老鼠血清白蛋白(mSA)結合，其解離常數($K_D$)介於 0.1 至 20nM，特別是介於 0.1 至 10nM 。

【0082】 用於本發明之多特異性抗體的其他合適的hSA-BD包括或源自於一抗體，其選自下列組成的群組：(i)結合於血清白蛋白的多肽(參見，例如，Smith 等人，2001，Bioconjugate Chem. 12:750-756；EP0486525；US6,267,964；WO2004/001064；WO 2002/076489；和WO2001/45746)；(ii)抗血清白蛋白結合單一可變結構域，描述於Holt 等人，Protein Engineering，Design & Selection，vol 21，5， pp283-288，WO2004/003019，WO2008/096158，WO2005/118642，WO2006/0591056和WO2011/006915；(iii)抗血清白蛋白抗體，描述於 WO2009/040562，WO2010/035012 和 WO2011/086091。

【0083】 在特定的實施例中，本發明的多特異性抗體包含：(i)一個ROR1-BD；(ii)一個CD3-BD；(iii)一個hSA-BD，即這些特定實施例的多特異性抗體對於所有三種ROR1、CD3和hSA的特異性都是單價的。

【0084】 在進一步的具體實施例中，本發明的多特異性抗體包含：(i)兩個ROR1-BD； (ii)一個CD3-BD；(iii)一個hSA-BD，即這些特定實施例的多特異性抗體對於ROR1的特異性是二價的，對於CD3和hSA的特異性都是單價的。

【0085】 術語“多價抗體”是指具有多於一價的單一結合分子，其中“價數”被描述為與標靶分子上之表位結合的抗原結合部分體(antigen-binding moieties)的數量。因此，由於存在多於一個的相應抗原結合部分，單個結合分子可以結合一個標靶分子上的多個結合位點和/或多個標靶分子。多價抗體的實例包括但不限於二價抗體、三價抗體、四價抗體、五價抗體、六價抗體等。

【0086】 如本文所引用，術語“單價抗體”是指結合於單個標靶分子，更具體的是結合於標靶分子上單個表位的抗體。此外，如本文所引用，術語“結合域”或“單價結合域”是指與標靶分子上單個表位結合的結合域。

【0087】 在本發明的多特異性抗體包含兩個ROR1-BD的情況下，所述兩個ROR1-BD結合於ROR1胞外結構域上的相同表位或不同表位。較傾向是，兩個ROR1-BD結合ROR1胞外域上的相同表位。

【0088】 如本文所引用，術語“相同表位”是指蛋白質上能夠與多於一個抗體產生特異性結合的單個蛋白質決定位，其中該單個蛋白質決定位是相同的，即由相同的化學活性表面基團組成，例如胺基酸或糖側鏈，其具有相同的三維結構特徵，以及對每種所述抗體相同的電荷特徵。如本文所引用，針對一明確的標靶蛋白，術語“不同表位”是指蛋白質上的單個蛋白質決定位，每個都能夠與不同的抗體產生特異性結合，在這裡這些單獨蛋白質決定位對於不同的抗體是不相同的，即由不同的化學活性表面基團組成，例如胺基酸或糖側鏈，其具有不同的三維結構特徵以及不同的電荷特徵。這些不同的表位可以重疊或不重疊。

【0089】 在特定實施例中，本發明的多特異性抗體是雙特異性和二價的。

【0090】 在進一步的具體實施例中，本發明的多特異性抗體是雙特異性和三價的。

【0091】 在進一步的具體實施例中，本發明的多特異性抗體是三特異性和三價的。

【0092】 在進一步的具體實施例中，本發明的多特異性抗體是三特異性和四價的。

【0093】 本發明中使用的其他可變結構域包括已突變的胺基酸序列，但其CDR區，與表1、2和3中所述序列描述的CDR區相比，至少有80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的相同性。本發明中使用的其他可變結構域包括突變胺基酸序列，與表 1、2和3中所述序列描述的CDR區相比，其CDR區不超過1、2、3、4 或5個已突變的胺基酸。

【0094】 適當地，本發明之多特異性抗體的結合域的VH結構域屬於或選自人類抗體VH家族。在優先的實施例中，本發明之多特異性抗體的一個或兩個ROR1-BD、CD3-BD和hSA-BD(如果存在)的VH結構域屬於VH框架亞型VH1a、VH1b、VH3或VH4。在一個具體實施例中，所述VH結構域屬於VH框架亞型VH3或VH4，特別是VH框架亞型VH3。

【0095】 在本發明的上下文中，術語“屬於VHx框架亞型(或VκX/Vλ框架亞型)”或“選自VHx框架亞型(或VκX/Vλ框架亞型)”是指

VH/VL框架序列FR1至FR4(本文也稱為VH/VL框架區FR1至FR4)與所述人類抗體VHx或VκX/Vλ框架亞型顯示出最高程度的同源性。

【0096】 VH1a、VH1b、VH3和VH4序列的示例以及其他VHx 序列的示例可見於Knappik 等人，J. Mol.Biology. 296 (2000) 57-86，或在WO2019/057787中。屬於VH3家族之VH結構域的具體示例由SEQ ID NO：71表示，屬於VH1a、VH1b或VH4框架亞型之VH結構域的具體示例由SEQ ID NO：72、73和74表示(表4，框架區以非粗體標記)。特別地，框架區FR1至FR4取自屬於VH3家族的SEQ ID NO：71(表4，以非粗體標記的區域)。適當地，如本文所引用，屬於VH3家族的VH包含FR1至FR4，其和SEQ ID NO:71的FR1至FR4，具有至少85%、特別是至少90%、更特別是至少95%序列相同性。VH3和VH4序列的替代示例，以及其他VH 序列的示例，可見於Knappik等人，J. Mol.Biology. 296 (2000) 57-86或在WO2019/057787 中。

【0097】 適當地，本發明中使用之結合域的VL結構域包括：Vκ框架FR1、FR2和FR3，特別是Vκ1或Vκ3框架，特別是Vκ1框架FR1至FR3，和框架FR4，其選自Vκ FR4。在所述結合域為scFv形式的情況下，所述結合域包括：Vκ框架FR1、FR2和FR3，特別是Vκ1或Vκ3框架，特別是Vκ1框架FR1至FR3，和框架FR4(其選自VλFR4)。

【0098】 合適的Vκ1框架FR1至FR3以及示例性Vλ FR4列述於SEQ ID NO: 75(表4，框架區以非粗體標記)。Vκ1序列的替代示例，以及Vκ2、Vκ3或Vκ4序列的示例，可見於Knappik 等人，J. Mol.Biol. 296 (2000) 57-86。合適的Vκ1框架FR1至FR3包含的胺基酸序列，具有與取自SEQ ID NO:75中對應於FR1至FR3之胺基酸序列至少85、

90、95%相同性(表4，框架區以非粗體標記)。合適的Vλ FR4如SEQ ID NO: 76 至 SEQ ID NO: 82 和 SEQ ID NO: 83中所列述，包含單個半胱胺酸殘基，特別是在相應的VH鏈中存在第二個單個半胱胺酸的情況下，特別是在VH的51位置(AHo編號)中，用於形成域間二硫鍵。在一個實施例中，本發明之多特異性抗體的結合域的VL結構域在為scFv形式時包含Vλ FR4，其包含的胺基酸序列，與選自SEQ ID NO: 76 至 SEQ ID NO: 83，特別是SEQ ID NO:76或83的胺基酸序列，具有至少85、90、95%的相同性。

【0099】 特別地，本發明之多特異性抗體的結合域包含列於表1、2和3中的VH結構域。合適地，本發明使用的結合域包含列於表1、2、3中之一的VH胺基酸序列，其中框架序列(即不是CDR序列的序列)中不超過10個胺基酸已被突變(其中，作為各種非限制性示例，突變是添加、替代或刪除)。合適地，本發明之多特異性抗體的結合域包含表1、2和3之一中列出的VH胺基酸序列，其中在框架序列(即，不是CDR序列的序列)裡，不超過7個胺基酸，特別是不超過5、4、3或2個胺基酸，特別是不超過1個胺基酸已被突變(其中，作為各種非限制性示例，突變是添加、替代或刪除)。本發明中使用的其他結合域包括已突變的胺基酸，但在VH區中與描述於表1、2和3之一中相應序列之VH區，至少有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的相同性，包括一些VH結構域，此些VH結構域包含表1、2和3所示序列之一的至少位置5至140(AHo編號)，特別是至少位置3至145，更特別是至少位置2至147，此類VH 結構域具有前述第11和19項中定義的功能特徵。

【0100】 在特定實施例中，本發明之多特異性抗體的一種或兩種ROR1-BD、CD3-BD和如果存在的hSA-BD包含如上定義的VH結構域，其中所述VH結構域的框架區FR1、FR2、FR3和FR4具有以下取代方式(AHo編號)：胺基酸位置12處的精胺酸(R)；胺基酸位置103處的蘇胺酸(T)和胺基酸位置144處的麩醯胺酸(Q)。所述VH結構域在本文中可稱為“變異的VH結構域”或“修飾的VH結構域”或“改良的VH結構域”。同樣，包含所述VH結構域的結合域在本文中可稱為“變異的結合域”或“修飾的結合域”或“改良的結合域”。此類變異的VH結構域的具體實例是SEQ ID NO：8、11、21、24、37、66和69的VH結構域。

【0101】 發明人已經發現，當與不包含以上所指VH框架區取代方式的ROR1-、CD3-和hSA-BDs結合域相比時，修飾的ROR1-、CD3-和hSA-BDs在為scFv形式時表現出顯著降低的免疫原性。更具體地，當與不包含以上所指VH框架區取代方式的所述結合域相比時，所述修飾的ROR1-、CD3-和hSA-BDs在為scFv形式時，表現出與人類血清中的預先存在的抗藥物抗體(ADA)的結合減少，特別是與預先存在的ADAs的結合減少，如在預先存在的ADA結合測定(pre-existing ADA binding assay)中所測定的，特別是如在示例10中定義的預先存在的ADA結合測定中測定的那樣。

【0102】 具體地，本發明人已經發現，與本發明之多特異性抗體其不包含修飾結合域的版本相比，本發明中包含所述修飾的ROR1-、CD3-和hSA-BDs之多特異性抗體表現出顯著降低的免疫原性。更具體地，當與本發明之多特異性抗體其不包含所述修飾結合域的版本相比時，包含所述修飾的ROR1-、CD3-和hSA-BDs的本發明

之多特異性抗體表現出與人類血清中的預先存在的抗藥物抗體(ADA)的結合減少，特別是與預先存在的ADAs的結合減少。如在預先存在的ADA結合測定中測定的，特別是如在示例10中定義的預先存在的ADA結合測定中測定的那樣。

【0103】 免疫原性，即治療性蛋白質在患者體內誘導抗體反應的傾向，例如可以透過其被已存在於健康和未經治療個體的人之血清中的抗藥物抗體(ADAs)識別之能力來預測，本文稱為“預先存在的ADAs”。

【0104】 因此，為了本發明的目的，本文引用的術語“免疫原性”是指治療性蛋白質(例如抗體、抗體片段或抗體結合域)被人類血清樣品中預先存在的ADA識別的能力。不受理論束縛，一般相信，在治療期間與預先存在的ADA結合以及誘導ADA的形成與治療性蛋白上B細胞和/或T細胞表位的出現有關。這種免疫原性的程度可以透過ELISA測定來確定，並且可以透過人類血清樣品相對於被測人類血清的總數的百分比(陽性血清樣本的百分比)表示，該人類血清樣品包含可測量的預先存在的ADAs和/或治療期間形成的ADAs，其可識別(即結合於)探討中的治療性蛋白。治療性蛋白質和被修飾以降低其免疫原性的相應治療性蛋白質之間免疫原性的降低可以透過比較針對修飾的治療性蛋白質的陽性血清樣品之百分比與針對原本治療性蛋白質的陽性血清樣品之百分比來測量。修飾的治療性蛋白質之陽性血清樣品較低的數量或百分比表明相對於原本治療性蛋白質的免疫原性降低。

【0105】 當ELISA信號超過某個臨界值時，血清樣品確定含有可測量的預先存在的ADA。該臨界值在本文中也稱為篩選截止點(screening cut-point)(SCP)。SCP可以如下定義計算或設置為相對於測試血清得到之最大ELISA信號的任意值(例如測試的血清中得到的最大ELISA信號的30%、25%、20%、15%、10%或5%)。較佳地，SCP按如下定義計算。

【0106】 特別地，本發明之多特異性抗體的結合域包含表 1、2 和 3 之一中列出的 VL 結構域。適當地，本發明之多特異性抗體的結合域包含列出在表 1、2 和 3 之一中的 VL 胺基酸序列，其中框架序列(即非 CDR 序列的序列)中不超過約 10 個胺基酸已被突變(其中，作為各種非限制性實例，突變是添加、替代或刪除)。合適地，本發明之多特異性抗體的結合域包含表 1、2 和 3 之一中列出的 VL 胺基酸序列，其中不超過約 10 個胺基酸，特別是不超過 7 個胺基酸，特別是不超過 5、4、3、2 個胺基酸，特別是框架序列(即非 CDR 序列的序列)中的不超過 1 個胺基酸已被突變(其中突變是，作為各種非限制性實例，添加，替代或刪除)。本發明中使用的其他結合域包括已突變的胺基酸，但在 VL 區中與表 1、2 和 3 中描述的序列所表示的 VL 結構域，至少有 90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%的相同性，包含一些 VL 結構域，此些 VL 結構域包含表 1、2 和 3 所示序列之一的至少位置 5 至 140(AHo 編號)，特別是至少位置 3 至 145，

更特別是至少位置 2 至 147，前提是此類 VL 結構域具有前述第 11 和 19 項中定義的功能特徵。

【0107】 在本發明的上下文中，術語“本發明中使用的結合域”關於結合域本身，即獨立於多特異性的脈絡，並且特別地，關於包含在多特異性構築體中的結合域，例如包含在雙特異性、三特異性或四特異性構築體中的結合域之一。

【0108】 適當地，本發明之多特異性抗體的結合域彼此獨立地選自由Fab、F(ab)2、Fv、scFv、dsFv和scAb所組成的群組；特別是選自由Fv、scFv和dsFv所組成的群組。特別地，本發明的多特異性抗體的結合域是scFv。

【0109】 適當地，本發明之多特異性抗體的結合域是可操作地連接的(operably linked)。本發明的多特異性抗體的結合域能夠同時結合它們各自的抗原或受體。如本文所引用，術語“同時”是指ROR1-BDs的至少一個和CD3-BD同時結合它們各自的抗原，或者在多特異性抗體中存在兩個ROR1-BD的情況下，術語“同時”是指兩個ROR1-BD和CD3-BD同時結合到它們各自的抗原。

【0110】 本發明的多特異性抗體包含一或兩個ROR1-BD、一CD3-BD和任選的一hSA-BD，其中所述一或兩個ROR1-BD、所述CD3-BD和所述任選的hSA-BD可操作地連接於彼此(operably linked to each other)。

【0111】 如本文所引用，術語“可操作地連接”(operably linked)表示兩個分子(例如，多肽、結構域、結合域)以每個分子保留功能活性的方式連接。兩個分子可以“可操作地連接”，無論它們是直接連接

還是間接連接(例如，透過連接分子(linker)、透過部分體(moiety)、透過連接分子與部分體)。術語「連接分子」是指非必須地(optionally)位於本發明中的結合域或抗體片段之間的胜肽或其他部分體(moiety)。許多策略可用於將分子共價連接在一起。這些包括但不限於蛋白質或蛋白質結構域N-和C-末端之間的多肽連接、透過二硫鍵和透過化學交聯劑的連接。在該實施例的一個方面，連接分子是透過重組技術或胜肽合成產生的肽鍵。為連接兩條多肽鏈的特定情況選擇合適的連接分子取決於各種參數，包括但不限於兩條多肽鏈的性質(例如，它們是否自然寡聚)、N端和要連接的C端的距離(如果已知)，和/或連接分子對於蛋白水解和氧化的穩定性。此外，連接分子可以包含提供靈活性的胺基酸殘基。

【0112】 在本發明的上下文中，術語“多肽連接分子”是指由透過肽鍵連接的胺基酸殘基鏈組成的連接分子，其連接兩個結構域，每個結構域連接到分子的一端。多肽連接分子的長度應足以使兩個分子以一種「彼此之間呈現正確的構象，從而保持所需的活性」的方式連接。在特定實施例中，多肽連接分子具有2至30個的胺基酸殘基連續鏈(例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個胺基酸殘基)。此外，被選於包含在多肽連接分子中的胺基酸殘基應該表現出不會顯著干擾多肽活性的特性。因此，胜肽連接分子總體上不應顯示出與多肽活性不一致的電荷，或干擾內部折疊，或與一個或多個單體中的胺基酸殘基形成鍵或其他相互作用，這將嚴重阻礙受體單體結構域的結合。在特定實施例中，多肽連接分子是非結構化多肽。

有用的連接分子包括甘胺酸-絲胺酸或GS連接分子。“Gly-Ser”或“GS”連接分子是指甘胺酸和絲胺酸串接的聚合物(包括，例如，(Gly-Ser)n、(GSGGS)n[SEQ ID NO: 118]、(GGGGS)n[SEQ ID NO: 119]和(GGGS)n[SEQ ID NO: 120]，其中n是至少1的整數)、甘胺酸-丙胺酸聚合物、丙胺酸-絲胺酸聚合物和其他可伸縮的連接分子(flexible linkers)，例如震盪鉀離子通道的繫鏈分子(the tether for the shaker potassium channel)，和如本領域通常知識者將理解的，大量其他可伸縮的連接分子。甘胺酸-絲胺酸聚合物是比較好的，因為包含這些胺基酸的寡肽是相對非結構化的，因此可以充當構件之間的中性繫鏈。其次，絲胺酸是親水的，因此能夠溶解可能是球狀甘胺酸鏈的物質。第三，類似的鏈結已被證明可有效連接重組蛋白的次單元，例如單鏈抗體。

【0113】 在一組實施例中，多特異性抗體的形式選自本領域已知的任何合適形式，其至少是三特異性的並且不包含免疫球蛋白Fc區和CH1和/或CL區。作為非限制性示例，這包括基於串聯tri-scFv(三聯體(triplebody))、三鏈抗體、scDb-scFv的形式；與異二聚化Fc結構域以外的異二聚化結構域之N-和/或C-末端融合的串聯tri-scFv或scDb-scFv，以及MATCH(描述於WO2016/0202457；Egan T.等人，MABS9(2017) 68-84)。具體地，多特異性抗體的形式選自一scDb-scFv、一scMATCH3、MATCH3和一MATCH4。

【0114】 術語“scDB”或“單鏈雙抗體”是指具有兩個抗原結合位點的抗體片段，這些片段包含與同一多肽鏈中的VL連接的VH(VH-VL)。透過使用過短而無法使同一鏈上的兩個結構域配對的連接

分子，這些結構域被迫與另一條鏈的互補結構域配對以產生兩個抗原結合位點。單鏈雙抗體可以是二價的或雙特異性的，比較好的是雙特異性的。單鏈雙抗體可見於更完整的描述，例如在EP404097，WO93/01161，Hudson等人，Nat.Med. 9:129-134 (2003)和Hollinger等人，Proc Natl. Acad. Sci. USA 90：6444-6448 (1993)。

【0115】 雙特異性scDb，特別是雙特異性單體scDb，具體包含兩個可變重鏈結構域(VH)或其片段和兩個可變輕鏈結構域(VL)或其片段，透過連接分子L1、L2和L3依次連接VHA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VLA、VHA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VLA、VLA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VHA、VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA、VHB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VLB、VHB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VLB、VLB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VHB 或 VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB，其中VLA和VHA結構域共同形成第一抗原的抗原結合位點，VLB和VHB共同形成第二抗原的抗原結合位點。

【0116】 連接分子L1特別的是2-10個胺基酸的胜肽，更特別是3-7個胺基酸，最特別是5個胺基酸，而連接分子L3特別是1-10個胺基酸的胜肽，更特別是2-7個胺基酸，最特別是5個胺基酸。在特定實施例中，連接分子L1和/或L3包含一個或兩個單元，由四(4)個甘胺酸殘基和一(1)個絲胺酸殘基 (GGGGS)n[SEQ ID NO:121]組成，其中n＝1 [SEQ ID NO: 85]或2[SEQ ID NO: 86]，特別是n=1。

【0117】 中間連接分子L2特別是10-40個胺基酸的胜肽，更特別是15-30個胺基酸，最特別是20-25個胺基酸。在特定的實施例中，所述連接分子L2包含一個或多個單元的四(4)個甘胺酸殘基和一(1)個

絲胺酸殘基(GGGGS)n[SEQ ID NO:122]，其中n＝1、2、3、4、5、6、7或8,特別是n=4[SEQ ID NO: 84]。

【0118】 在一個實施例中，本發明之多特異性抗體包含一ROR1-BD、一CD3-BD和一hSA-BD並且是一個具有scDb-scFv或scMATCH3形式的單鏈蛋白。術語“scDb-scFv”是指一種抗體形式，其中單鏈Fv(scFv)片段透過可伸縮的Gly-Ser連接分子與單鏈雙抗體(scDb)融合。在一個實施例中，所述可伸縮的Gly-Ser連接分子是2至40個胺基酸的胜肽，例如，2至35、2至30、2至25、2至20、2至15、2至10個胺基酸，特別是10個胺基酸。在具體的實施例中，所述連接分子包含一個或多個單元的四(4)個甘胺酸殘基和一(1)個絲胺酸殘基(GGGGS) n [SEQ ID NO: 122]，其中n=1、2、3， 4、5、6、7或8，特別是n=2[SEQ ID NO: 86]。特別地，本實施例的單鏈多特異性抗體為scMATCH3形式。

【0119】 本發明之scMATCH3多特異性抗體的具體但非限制性實例是PRO2286、PRO2287、PRO22507、PRO2508、PRO2509、PRO2510、PRO2557、PRO2596、PRO2667和PRO2668，其序列列於表5中。

【0120】 在另一個實施例中，本發明之多特異性抗體包含兩個ROR1-BD、一個CD3-BD和一個hSA-BD，並且是WO 2016/0202457中描述的MATCH4形式之異二聚體蛋白；EganT.等人，MABS9 (2017) 68-84。

【0121】 本發明之異二聚體MATCH4多特異性抗體的具體但非限制性實例是PRO2589、PRO2590、PRO2591、PRO2592、PRO2658、PRO2659、PRO2669和PRO2670，其序列列於表5中。

【0122】 本發明之多特異性抗體或其片段或其結合域，例如RORl-BDs可以使用本領域已知之任何方便的抗體製造方法生產(參見例如，Fischer, N.和Leger, O ., Pathobiology 74 (2007) 3-14 關於雙特異性構築體的生產；Hornig, N. & Färber-Schwarz, A., Methods Mol. Biol. 907 (2012)713-727 和WO99/57150關於雙特異性雙抗體和串聯scFv)。用於製備雙特異性構築體的合適方法之具體實例除了其他外還包括，Genmab(參見Labrijn等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110(2013) 5145-5150)和Merus(參見de Kruif等人，Biotechnol. Bioeng. 106 (2010) 741-750)技術。

【0123】 這些方法通常涉及單株抗體的產生，以及使用已知的分子選殖(molecular cloning)技術，組合兩種或更多種不同單株抗體的抗原結合域或其片段或部分，以產生雙特異性或多特異性構築體。

【0124】 本發明的多特異性抗體可以透過使用本領域已知的方法接合此組成結合特異區(the constituent binding specificities)來製備。例如，雙特異性分子的每種結合特異區可以單獨產生，然後再彼此接合。當結合特異區是蛋白質或胜肽時，多種耦合劑(coupling)或交聯劑(cross-linking)可用於共價接和(covalent conjugation)。交聯劑的實例包括蛋白質A、碳二亞胺(carbodiimide)、N-琥珀醯亞胺-5-乙醯硫代乙酸酯(N-succinimidyl-5-acetyl-thioacetate，SATA)、5,5'-二硫代雙(2硝基苯甲酸)(5,5'-dithiobis(2nitrobenzoic acid),

DTNB)、鄰苯二馬來醯亞胺(o-phenylenedimaleimide, oPDM)、3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, SPDP)和4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸3-硫代-N-琥珀醯亞胺鈉鹽(sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate, sulfo-SMCC) (參見例如，Karpovsky等人，1984 J. Exp. Med. 160: 1686；Liu,M A 等人，1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括如下的描述，Paulus，1985 Behring Ins. Mitt. No. 78，118-132；Brennan等人，1985 Science 229：81-83，和Glennie等人，1987 J. Immunol.139：2367-2375。接合劑是SATA和sulfo-SMCC，兩者都可從Pierce Chemical Co.(Rockford, IL, USA)取得。

【0125】 當結合特異區(binding specificities)是抗體時，它們可以透過兩條重鏈的C-末端鉸鏈區的硫醇鍵合(sulfhydryl bonding)來接合。在一個具體實施例中，在接合前，鉸鏈區被修飾以包含奇數個硫醇殘基，例如一個。

【0126】 或者，兩種或更多種結合特異區可以編碼於相同的載體中並在相同的宿主細胞中表達和組裝。當雙特異性分子是mAb x Fab、mAb x scFv、mAb x dsFv 或 mAb x Fv融合蛋白時，該方法特別有用。製備多特異性抗體和分子的方法描述於例如US5,260,203；US5,455,030；US4,881,175；US5,132,405；US5,091,513；US5,476,786；US5,013,653；US5,258,498；和US5,482,858。

【0127】 多特異性抗體與其特異性標靶的結合可以透過例如酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)、放射免疫測定(REA)、FACS分析、生物測定(例如生長抑制)或西方墨點法來確認。這些測定中的每一種通常使用標定試劑，以檢測特定感興趣的蛋白質-抗體複合物的存在。

【0128】 在更進一層方面，本發明提供了一種核酸或兩種核酸，其編碼成本發明的多特異性抗體或其片段或其結合域(例如ROR1-BDs)。此類核酸可被優化以利於哺乳動物細胞中的表達。

【0129】 術語“核酸”在本文中可與術語「多核苷酸」互換使用，是指單股或雙股形式的一種或多種去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。該術語包括某些核酸，其含有已知核苷酸類似物或修飾的骨架殘基(modified backbone residues)或連結(linkages)，它們是合成的、天然存在的和非天然存在的，具有與參考核酸相似的結合特性，並且其代謝方式類似於參考核苷酸。此類類似物的實例包括但不限於硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、膦酸甲酯、手性(chiral)-甲基磷酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。除非另有說明，特定的核酸序列還隱含地包括其保守修飾(conservatively modified variants)的變異體(例如，簡併密碼子取代(degenerate codon substitution))和互補序列，以及明確指出的序列。具體而言，如下列所詳述，簡併密碼子取代可透過產生其中一個或多個選定(或所有)密碼子的第三位被混合鹼基和/或脫氧肌苷殘基取代的序列來實現(Batzer等人，Nucleic Acid Res . 19:5081，1991; Ohtsuka等人，J. Biol. Chem. 260:2605-2608，1985；和 Rossolini等人，Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994)。

【0130】 本發明提供了基本上純化的核酸分子，其編碼成包含如上所述多特異性抗體的片段或結構域的多肽分子，例如ROR1-BDs。當被合適的表達載體表達出來時，由這些核酸分子編碼成的多肽分子能夠表現出本發明之多特異性抗體或ROR1-BD的抗原結合能力。

【0131】 多核苷酸序列可以透過從頭開始(de novo)的固相DNA合成或透過對現存序列作PCR誘變產生，這些序列(例如，以下實施例中描述的序列)編碼成本發明的多特異性抗體或其片段或其結合域，例如本發明的ROR1-BD。核酸的直接化學合成可以透過本領域已知的方法完成，例如Narang等人的磷酸三酯法，1979，Meth.Enzymol. 68:90；Brown等人的磷酸二酯方法，Meth.Enzymol. 68: 109, 1979; Beaucage等人的二乙基亞磷醯胺法，Tetra. Lett.，22: 1859，1981；以及US4,458,066的固體支持方法。透過PCR對多核苷酸序列引入突變可如以下描述施行，例如，PCR技術：DNA擴增的原理和應用，H. A. Erlich(主編)，Freeman Press，NY，N.Y.，1992；PCR協議：方法和應用指南，Innis等人(主編)，Academic Press， San Diego， Calif， 1990; Mattila 等人，Nucleic Acids Res. 19:967， 1991；和Eckert等人，PCR方法和應用 1:17， 1991。

【0132】 本發明還提供了表達載體和宿主細胞，其用於產生本發明之多特異性抗體或其片段或其結合域，例如ROR1-BDs。

【0133】 術語“載體”用來指一多核苷酸分子，其能夠運送與其連接的另一多核苷酸。一種類型的載體是“質體”，它是指可以連接額外DNA片段的環狀雙股DNA圈。另一種類型的載體是病毒載體，其中

額外的DNA片段可以連接到病毒基因組中。某些載體能夠在它們被引入的宿主細胞中自主複製(例如，具有細菌複製起點的細菌載體和游離型哺乳動物載體)。其他載體(例如，非游離型哺乳動物載體)可以在引入宿主細胞後整合到宿主細胞的基因組中，因而與宿主基因組一起複製。

【0134】 此外，某些載體能夠指導與其可操作地連接(operatively linked)的基因之表達。此類載體在本文中稱為“重組表達載體”(或簡稱為「表達載體」)。通常，在重組DNA技術中有用的表達載體通常是質體的形式。在本說明書中，「質體」和「載體」可以互換使用，因為質體是最常用的載體形式。然而，本發明旨在包括其他形式的表達載體，例如病毒載體(例如，複製缺陷型反轉錄病毒、腺病毒和腺相關病毒)，它們具有相同的功能。在此特定上下文中，術語「可操作地連接」是指兩個或更多個多核苷酸(例如，DNA)區段之間的功能關係。通常，它是指轉錄調控序列與被轉錄序列的功能關係。例如，如果在適當的宿主細胞或其他表達系統中，啟動子或增強子序列刺激或調節編碼序列的轉錄，則它與編碼序列可操作地連接。通常，當啟動子轉錄調控序列可操作地連接於轉錄序列時，其與轉錄序列在實體上是連續的，即它們是順式作用的。然而，一些轉錄調控序列，例如增強子，不需要在實體上是連續的或位於它們增強轉錄的編碼序列附近。

【0135】 可以使用多種表達載體來表達此些多核苷酸，其編碼成多特異性抗體鏈或其片段或其結合域，例如ROR1-BD。基於病毒和非病毒的表達載體均可用於在哺乳動物宿主細胞中以製造抗體。非病

毒載體和系統包括質體、游離型載體，通常帶有用於表達蛋白質或RNA的表達盒(expression cassette)，以及人類人工染色體(參見，例如，Harrington 等人，Nat Genet. 15:345，1997)。例如，非病毒載體，其可用於與IL-4R結合之多核苷酸和多肽在哺乳動物(例如人類)細胞中的表達，這些載體包括pThioHis A、B和C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、B和C，( Invitrogen, San Diego, USA)、MPS V 載體和本領域已知的用於表達其他蛋白質的許多其他載體。有用的病毒載體包括基於反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、皰疹病毒、基於SV40的載體、乳突病毒、HBP Epstein Barr病毒、牛痘病毒載體和Semliki Forest病毒(SFV)的載體。參見，Brent等人，同上；Smith，Annu. Rev. Microbiol. 49:807，1995；49:807，1995；和Rosenfeld等人，Cell 68: 143，1992。

【0136】 表達載體的選擇取決於預定的宿主細胞，在其中載體可被表達出來。通常，表達載體含有啟動子和其他調節序列(例如，增強子)，它們可操作地連接到編碼成多特異性抗體鏈或片段的多核苷酸。在一個實施例中，除了在誘導條件下以外，誘導型啟動子用於防止插入序列的表達。誘導型啟動子包括，例如，阿拉伯糖、lacZ、金屬硫蛋白啟動子或熱休克啟動子(heat shock promoter)。轉化生物的培養物可以在非誘導條件下擴增，而不會使群體偏向於其表達產物更為宿主細胞耐受的編碼序列。除了啟動子之外，為了多特異性抗體鏈或片段的有效表達，也可能需要或希望有其他調節元素。這些元素通常包括 ATG 起始密碼子和相鄰的核糖體結合位點或其他序列。此外，表達效率可以透過加入適用於所用細胞系統的增強子來提高(參見，例如，Scharf等人，Results Probl. Cell Differ. 20:125， 1994；和Bittner

等人，Meth. Enzymol.，153:516，1987)。例如，SV40增強子或CMV增強子可用於增加哺乳動物宿主細胞中的表達。

【0137】 要使用的載體通常編碼成多特異性抗體輕鏈和重鏈可變域。在某些情況下，它們還編碼形成恆定區或其部分。此類載體允許可變區表達為恆定區的融合蛋白，從而引領產生完整抗體及其抗原結合片段。通常，這種恆定區是人類的。

【0138】 術語「重組宿主細胞」(或簡稱「宿主細胞」)是指其中已引入重組表達載體的細胞。應當理解的是，這些術語不僅是指特定的受試細胞，而且是指這種細胞的後代。因為某些修飾可能由於突變或環境影響而在後代中發生，所以這種後代實際上可能與親代細胞不同，但仍包括在本文所用術語「宿主細胞」的範圍內。

【0139】 用於容納和表達本發明的多特異性抗體或其片段或其結合域，例如ROR1-BDs的宿主細胞可以是原核的或真核的。大腸桿菌是一種可用於選殖和表達本發明的多核苷酸的原核宿主。適用的其他微生物宿主包括桿菌，例如枯草芽孢桿菌，以及其他腸桿菌科，例如沙門氏菌、沙雷氏菌和各種假單胞菌。在這些原核宿主中，人們還可以製作表達載體，其通常包含與宿主細胞相容的表達控制序列(例如，複製起點)。此外，任意數量的多種眾所周知的啟動子將存在其中，例如乳糖啟動子系統、色胺酸(trp)啟動子系統、β-內醯胺酶啟動子系統或來自λ噬菌體的啟動子系統。啟動子通常控製表達，可以使用或不使用操縱子序列，並具有核糖體結合位點序列等，用於啟動和完成轉錄和轉譯。其他微生物，例如酵母，也可用於表達本發明的多特異性抗體。與桿狀病毒載體組合的昆蟲細胞也可以作為此用。

【0140】 在一個實施例中，哺乳動物宿主細胞用於表達和產生本發明的多特異性抗體或其片段或其結合域，例如ROR1-BDs。例如，它們可以是表達內源性免疫球蛋白基因的融合瘤細胞株或含有外源性表達載體的哺乳動物細胞株。這些包括任何正常的會死亡細胞或正常或異常之動物或人類的永生細胞。例如，一些能夠分泌完整免疫球蛋白的合適宿主細胞株已被開發，包括CHO細胞株、各種COS細胞株、HeLa細胞、骨髓瘤細胞株、轉化的B細胞和融合瘤。使用哺乳動物組織細胞培養物來表達多肽的大致討論可見於，例如，Winnacker，從基因到殖株(FROM GENES TO CLONES), VCH Publishers， N.Y., N.Y.， 1987。哺乳動物宿主細胞的表達載體可以包括表達控制序列，例如複製起點、啟動子和增強子(參見，例如，Queen等人, Immunol. Rev. 89:49-68， 1986)，以及必要的處理信息位點，例如核糖體結合位點、RNA剪接位點、多聚腺苷酸化位點和轉錄終止序列。這些表達載體通常含有源自哺乳動物基因或哺乳動物病毒的啟動子。合適的啟動子可以是組成型的、細胞類型特異性的、階段特異性的和/或可調控的或可調節的。有用的啟動子包括但不限於金屬硫蛋白啟動子、組成型腺病毒主要晚期啟動子、地塞米松誘導型(dexamethasone-inducible)MMTV啟動子、SV40啟動子、MRP pol III啟動子、組成型MPS V啟動子、四環素誘導型CMV啟動子(例如人類立即早期CMV啟動子)、組成型CMV啟動子和本領域已知的啟動子-增強子組合。

【0141】 用於引入含有感興趣的多核苷酸之表達載體的方法取決於細胞宿主的類型。例如，氯化鈣轉染通常用於原核細胞，而磷酸

鈣處理或電穿孔可用於其他細胞宿主。(大致參見Green, M. R.和Sambrook, J.，分子選殖：實驗室手冊(第四版)，Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012))。其他方法包括，例如，電穿孔、磷酸鈣處理、脂質體為媒介的轉化、注射和顯微注射、彈道方法、病毒體、免疫脂質體、聚陽離子-核酸接合物(conjugates)、裸露DNA、人工病毒體、與皰疹病毒結構蛋白VP22的融合(Elliot和O' Hare, Cell 88:223, 1997)、試劑增強的DNA攝取和離體轉導。對於重組蛋白長期、高產量的生產，通常需要穩定的表達。例如，穩定表達本發明中之多特異性抗體或其片段或其結合域(例如ROR1-BD)的細胞株可以使用本發明之表達載體來準備，這些載體含有病毒複製起點或內源性表達元素和可選擇的標記基因。引入載體後，可以讓細胞在滋養培養基(enriched media)中生長1至2天，然後再轉換為選擇性培養基。選擇標記的目的是賦予對選擇的抗性，並且它的存在使得那些在選擇培養基中成功表達引入序列的細胞得以生長。可以使用適合細胞類型的組織培養技術來使穩定轉染、有抵抗性的細胞增殖。因此，本發明提供了產生本發明的多特異性抗體或其抗原結合片段(例如ROR1-BD)的方法，其中所述方法包括培養宿主細胞的步驟，所述宿主細胞包含核酸或載體，其編碼成本發明之多特異性抗體或其抗原結合片段，例如ROR1-BD，由此表達本揭露內容中所述之多特異性抗體或其抗原結合片段，例如ROR1-BD。

【0142】 在一個方面，本發明涉及生產本發明的多特異性抗體或ROR1-BD的方法，該方法包括培養表達編碼多特異性抗體或ROR1-BD的核酸的宿主細胞的步驟。具體而言，本發明涉及產生本發

明的多特異性抗體或ROR1-BD的方法，該方法包括(i)提供編碼本發明的多特異性抗體或ROR1-BD的核酸或兩種核酸或編碼本發明的多特異性抗體或ROR1-BD的一種載體或兩種載體，表達所述一種或多種核酸，或所述一種或多種載體，並從表達系統中收集所述多特異性抗體或所述ROR1-BD，或(ii)提供一種或多種表達編碼本發明的多特異性抗體或ROR1-BD的一種或多種核酸的宿主細胞，培養所述一種或多種宿主細胞；從細胞培養物中收集所述多特異性抗體或所述ROR1-BD。

【0143】 在更進一步方面，本發明是關於一藥物組成物，其包含本發明之多特異性抗體和藥學上可接受的載體。“藥學上可接受的載體”是指不干擾抗體結構的介質或稀釋劑。藥學上可接受的載體增強或穩定組成物，或促進組合物的製備。藥學上可接受的載體包括生理上相容的溶劑、分散介質、塗層、抗菌劑和抗真菌劑、等滲透壓劑和吸收延遲劑等。

【0144】 某些這樣的載體能夠使藥物組成物配製成例如錠劑、丸劑、糖衣錠、膠囊、液體、凝膠、糖漿、漿液、懸浮劑和口含錠以供受試者口服。某些這樣的載體能夠配製用於注射、輸液或局部外用的藥物組成物。例如，藥學上可接受的載體可以是無菌水溶液。

【0145】 本發明的藥物組成物可以透過本領域已知的多種方法給藥。給藥途徑和/或方式取決於所需的結果。給藥可以是靜脈內、肌肉內、腹膜內或皮下，或在標靶位點附近給藥。藥學上可接受的載體應適合於靜脈內、肌肉內、皮下、腸胃外、脊髓或表皮給藥(例如，透過注射或輸注)，特別是肌肉內或皮下給藥。根據給藥途徑，活性化合

物(即本發明之多特異性抗體)可以被包覆在材料中以保護化合物免受酸和其他可能使化合物失活的自然情況的作用。

【0146】 本發明的藥物組成物可以根據本領域熟知和常規實施方法來製備。參見，例如，Remington: 藥學的科學與實踐(The Science and Practice of Pharmacy), Mack Publishing Co.，第20版，2000；和持續和控制釋放藥物遞送系統(Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems)，J. R. Robinson主編，Marcel Dekker，Inc.，New York，1978。藥物組成物較佳的情況是在GMP條件下製造。通常，本發明之多特異性抗體的治療有效劑量或有效劑量被用於本發明的藥物組成物中。透過本領域通常知識者已知之常規方法將本發明之多特異性抗體配製成藥學上可接受的劑型。劑量範圍透過調整以提供最佳所需反應(例如，治療反應)。例如，可以單次大劑量施用，可以隨時間分為幾個劑量施用，或者可以根據治療情況的緊急情況按比例減少或增加劑量。將非腸道組成物配製成劑量單位形式是特別有利的，有助於給藥並促成劑量的均勻性。如本文所用的劑量單位形式是指實際個別單位，適合作為待治療對象的單位劑量；每個單位含有預定量活性化合物與其所需的藥物載體，經計算可產生所需的治療效果。

【0147】 本發明藥物組成物中活性成分的實際劑量水平可以改變，以使特定患者、組合物和給藥方式有效取得所需的治療反應，而對患者沒有毒性。選擇的劑量水平取決於多種藥物動力學因素，包括所使用的本發明之特定組成物或其酯、鹽或醯胺的活性、給藥途徑、給藥時間、使用的特定化合物之排泄速率、治療的持續時間、與使用

的特定組成物合併使用的其他藥物、化合物和/或材料、被治療患者的年齡、性別、體重、狀況、一般健康和既往病史等因素。

【0148】 本發明的多特異性抗體通常是多次施用。單次劑量間的間隔可以是每週、每月或每年。如透過測量患者體內的本發明之多特異性抗體的血液水平所指示的，間隔也可以是不規則的。或者，本發明的多特異性抗體可以作為緩釋製劑給藥，在這種情況下需要較少的給藥頻率。劑量和頻率取決於抗體在患者體內的半衰期。一般來說，人源化抗體的半衰期比嵌合抗體和非人類抗體長。給藥的劑量和頻率可以根據治療是預防性的還是治療性的而變化。在預防性應用中，是以相對不頻繁的間隔在長時間內施用相對低的劑量。一些患者在他們的餘生中繼續接受治療。在治療應用中，有時需要在相對短的間隔中使用相對高的劑量，直到疾病的進展減緩或終止，並且最好是直到患者表現出疾病症狀部分或完全的改善。此後，可以對患者進行預防性治療。

【0149】 在一方面，本發明是關於用作藥物的本發明之多特異性抗體或本發明之藥物組合物。在一個合適的實施例中，本發明提供了多特異性抗體或藥物組成物，用於在有需要的受試者中以治療增殖性疾病，特別是癌症，更特別是表達ROR1的癌症。

【0150】 在另一方面，本發明提供了用於製備用於治療增殖性疾病藥物的藥物組合物，此增殖性疾病特別是癌症，更特別是表達ROR1的癌症。

【0151】 另一方面，本發明是關於多特異性抗體或藥物組成物的使用，以在有需要的受試者中治療增殖性疾病，特別是癌症，更特別是表達ROR1的癌症。

【0152】 另一方面，本發明是關於治療受試者的方法，包括向受試者施用治療有效量的本發明之多特異性抗體。在一個合適的實施例中，本發明是關於一種方法，該方法包括在受試者中向受試者施用治療有效量的本發明之多特異性抗體，以治療增殖性疾病，特別是癌症，更特別是表達ROR1的癌症。

【0153】 術語「受試者」包括人類和非人類之動物。

【0154】 術語「動物」包括所有脊椎動物，例如，非人類哺乳動物和非哺乳動物，例如非人類靈長類動物、羊、狗、牛、雞、兩棲動物和爬行動物。除非另有說明，否則術語「患者」或「受試者」在本文中可互換使用。

【0155】 如本文所引用，術語「治療」、「治療的」等是指獲得期望的藥理學和/或生理學效果，該效果可以是治療性的，正如疾病和/或歸因於疾病的副作用得到部分或完全治愈或延遲疾病進展。如本文所引用，「治療」涵蓋哺乳動物，例如在人類中疾病的任何治療，並且包括：(a) 抑制疾病，即阻止其發展；(b) 緩解疾病，即使疾病消退。

【0156】 術語「治療有效量」或「有效量」是指當給予哺乳動物或其他受試者此藥劑的量以治療疾病時，足以影響對疾病的此種治療。「治療有效量」會根據該藥劑、疾病及其嚴重程度以及年齡、體重等而變化。

【0157】 在一個實施例中，增殖性疾病是癌症。術語「癌症」是指以異常細胞快速且不受控制地生長為特徵的疾病。癌細胞可以在局部或透過血流和淋巴系統擴散到身體的其他部位。術語「腫瘤」和「癌症」在本文中可互換使用，例如，這兩個術語都包括固體和液體(例如，瀰漫性或循環性)腫瘤。如本文所引用，術語「癌症」或「腫瘤」包括惡變前以及惡性癌症和腫瘤。術語「癌症」在本文中用於表示廣泛範圍的腫瘤，包括所有實體和血液惡性腫瘤。特別是此癌症是表達ROR1的癌症。

【0158】 表達 ROR1 的癌症的非限制性實例是：慢性淋巴細胞白血病/小淋巴細胞淋巴瘤(CLL/SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴性細胞白血病(ALL)、套細胞淋巴瘤(MCL)、毛細胞白血病，濾泡性淋巴瘤(FL)、邊緣區淋巴瘤(MZL)、瀰漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)、Richter 綜合徵(RS)、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、大腸癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、膠質母細胞瘤、睾丸癌、子宮癌、腎上腺癌、黑色素瘤、神經母細胞瘤、肉瘤和腎癌。

【0159】本發明之多特異性抗體或藥物組成物抑制實體瘤的生長，但也抑制液體瘤的生長。本發明之多特異性抗體或藥物組合物也適用於預防癌症受試者腫瘤的轉移性擴散和微轉移的生成或發展。

## 序列表(依照 AHo 編號方案指定的突變；依照 Numab CDR 定義所定出的 CDR，除非另有說明)。

**表 1.本發明之 ROR1 結合域的示例(如果存在修飾，則以粗體顯示；CDR 殘基以粗體和斜體字母顯示)。**

| **SEQ ID 號碼** | 抗體區 | 序列 |
|---|---|---|
| 55-38-D07 | | |
| SEQ ID NO: 1 | **HCDR1** (H27-H42; AHo 編號) | ***GFDLSSYAVS*** |
| SEQ ID NO: 2 | **HCDR2** (H57-H76; AHo 編號) | ***IIYPRANTYYASWAKG*** |
| SEQ ID NO: 3 | **HCDR3** (H108-H138; AHo 編號) | ***RDRYDSGAYLYTTYFNL*** |
| SEQ ID NO: 4 | **LCDR1** (L24-L42; AHo 編號) | ***RASENIYSGLA*** |
| SEQ ID NO: 5 | **LCDR2** (L58-L72; AHo 編號) | ***RASTLAS*** |
| SEQ ID NO: 6 | **LCDR3** (L107-L138; AHo 編號) | ***QGGYYSSSSTYIA*** |
| SEQ ID NO: 7 | **VH** (55-38-D07-sc02) (PRO2060) | QSQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS***GFDLSSYAVS***WVRQAPGKGLEWIG***IIYPRANTYYASWAKG***RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCA***RDRYDSGAYLYTTYFNL***WGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 8 | **VH** (55-38-D07-sc02) 突變 L12R, V103T, L144Q | QSQVVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVS***GFDLSSYAVS***WVRQAPGKGLEWIG***IIYPRANTYYASWAKG***RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCA***RDRYDSGAYLYTTYFNL***WGQGT**Q**VTVSS |
| SEQ ID NO: 9 | **VL** (55-38-D07-sc02) (PRO2060) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***RASENIYSGLA***WYQQKPGKPPKLLIY***RASTLAS***GVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***QGGYYSSSSTYIA***FGTGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 10 | **VH** (55-38-D07-sc06) 突變 G51C (PRO2291) | QSQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS***GFDLSSYAVS***WVRQAPGK**C**LEWIG***IIYPRANTYYASWAKG***RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCA***RDRYDSGAYLYTTYFNL***WGQGTLVTVSS |

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID NO: 11 | **VH**<br>(55-38-D07-sc06)突變 L12R, G51C, V103T, L144Q | QSQVVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVS***GFDLSSYAVS***WVRQAPGK**C**LEWIG***IIYPRANTYYA SWAKG***RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCA***RDRYDSGAYLYTTYFNL***WGQGT**Q**VTVSS |
| SEQ ID NO: 12 | **VL**<br>(55-38-D07-sc06) 突變 T141C (PRO2291) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***RASENIYSGLA***WYQQKPGKPPKLLIY***RASTLAS***GVSSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***QGGYYSSSSTYIA***FG**C**GTKVTVLG |
| 55-39-G02 | | |
| SEQ ID NO: 13 | **HCDR1**<br>(H27-H42; AHo 編號)<br>(出現在 55-39-G02-sc02 和 55-39-G02-sc05) | ***GLSLSRNAMS*** |
| SEQ ID NO: 14 | **HCDR1**<br>(H27-H42; AHo 編號)<br>(出現在 55-39-G02-sc03 和 55-39-G02-sc06) | ***GIDLSRNAMS*** |
| SEQ ID NO: 15 | **HCDR2**<br>(H57-H76; AHo 編號) | ***IILTSGSTYYASWAKG*** |
| SEQ ID NO: 16 | **HCDR3**<br>(H108-H138; AHo 編號) | ***RGIASSSLKSF*** |
| SEQ ID NO: 17 | **LCDR1**<br>(L24-L42; AHo 編號) | ***QASQNVWNNNYLS*** |
| SEQ ID NO: 18 | **LCDR2**<br>(L58-L72; AHo 編號) | ***TASTLAS*** |
| SEQ ID NO: 19 | **LCDR3**<br>(L107-L138; AHo 編號) | ***AGGFSGEIRA*** |
| SEQ ID NO: 20 | **VH**<br>(55-39-G02-sc02)<br>(PRO2062) | QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS***GLSLSRNAMS***WVRQAPGKGLEWIG***IILTSGSTYYAS WAKG***RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCV***RGIASSSLKSF***WGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 21 | **VH**<br>(55-39-G02-sc02) 突變 L12R, V103T, L144Q | QSQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVS***GLSLSRNAMS***WVRQAPGKGLEWIG***IILTSGSTYYA SWAKG***RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCV***RGIASSSLKSF***WGQGT**Q**VTVSS |
| SEQ ID NO: 22 | **VL**<br>(55-39-G02-sc02) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITC***QASQNVWNNNYLS***WFQQKPGKPPKLLIV***TASTLAS***GVS SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***AGGFSGEIRA***FGTGTKVTVLG |

| | | |
|---|---|---|
| | (PRO2062) | |
| SEQ ID NO: 23 | **VH**<br>(55-39-G02-sc05) 突變 G51C<br>(PRO2292) | QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS***GLSLSRNAMS***WVRQAPGK**C**LEWIG***IILTSGSTYYAS WAKG***RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCV***RGIASSSLKSF***WGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 24 | **VH**<br>(55-39-G02-sc05) 突變 L12R, G51C, V103T, L144Q | QSQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVS***GLSLSRNAMS***WVRQAPGK**C**LEWIG***IILTSGSTYYA SWAKG***RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCV***RGIASSSLKSF***WGQGT**Q**VTVSS |
| SEQ ID NO: 25 | **VL**<br>(55-39-G02-sc05) 突變 T141C<br>(PRO2292) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITC***QASQNVWNNNYLS***WFQQKPGKPPKLLIV***TASTLAS***GVS SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***AGGFSGEIRA***FG**C**GTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 26 | **VH**<br>(55-39-G02-sc03)<br>(PRO2271) | QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS***GIDLSRNAMS***WVRQAPGKGLEWIG***IILTSGSTYYAS WAKG***RFTISKTSTTLDLQMNSLRAEDTAVYFCV***RGIASSSLKSF***WGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 27 | **VL**<br>(55-39-G02-sc03)<br>(PRO2271) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITC***QASQNVWNNNYLS***WFQQKPGKPPKLLIV***TASTLAS***GVS SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***AGGFSGEIRA***FGTGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 28 | **VH**<br>(55-39-G02-sc06) 突變 G51C | QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS***GIDLSRNAMS***WVRQAPGK**C**LEWIG***IILTSGSTYYAS WAKG***RFTISKTSTTLDLQMNSLRAEDTAVYFCV***RGIASSSLKSF***WGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 29 | **VL**<br>(55-39-G02-sc06) 突變 T141C | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITC***QASQNVWNNNYLS***WFQQKPGKPPKLLIV***TASTLAS***GVS SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***AGGFSGEIRA***FG**C**GTKVTVLG |

**表 2.本發明中使用之 CD3 結合域的示例(如果存在修飾，則以粗體顯示；CDR 殘基以粗體和斜體字母顯示)。**

| **SEQ ID 號碼** | 抗體區 | 序列 |
|---|---|---|
| **28-21-D09** | | |
| SEQ ID NO: 30 | **HCDR1**<br>(H27-H42; AHo 編號) | ***GFSLSSYDMS*** |
| SEQ ID NO: 31 | **HCDR2**<br>(H57-H76; AHo 編號) | ***ASYASGPTYYASWAKG*** |

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID NO: 32 | **HCDR3**<br>(H108-H138; AHo 編號) | ***RGGWTGTSHSNI*** |
| SEQ ID NO: 33 | **LCDR1**<br>(L24-L42; AHo 編號) | ***QSSQSVFSNNYLA*** |
| SEQ ID NO: 34 | **LCDR2**<br>(L58-L72; AHo 編號) | ***SASTLAS*** |
| SEQ ID NO: 35 | **LCDR3**<br>(L107-L138; AHo 編號) | ***LGSYACSSADCYV*** |
| SEQ ID NO: 36 | **VH**<br>(28-21-D09-sc04)<br>PRO726 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFSLSSYDMS***WVRQAPGKGLAWIG***ASYASGPTYY ASWAKG***RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCA***RGGWTGTSHSNI***WGQGTLVTVS S |
| SEQ ID NO: 37 | **VH**<br>(28-21-D09-sc04) 突變<br>L12R, L144Q | EVQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAAS***GFSLSSYDMS***WVRQAPGKGLAWIG***ASYASGPTYY ASWAKG***RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCA***RGGWTGTSHSNI***WGQGT**Q**VTVS S |
| SEQ ID NO: 38 | **VL**<br>(28-21-D09-sc04)<br>PRO726 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***QSSQSVFSNNYLA***WFQQKPGQSPKRLIY***SASTLAS***GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***LGSYACSSADCYV***FGTGTKVTVLG |

**表 3.本發明中使用之人類血清白蛋白(hSA)結合域的示例(如果存在修飾，則以粗體顯示；CDR 殘基以粗體和斜體字母顯示)。**

| **SEQ ID 號碼** | **抗體區** | **序列** |
|---|---|---|
| **19-01-H04** | | |
| SEQ ID NO: 39 | **HCDR1**<br>(H27-H42; AHo 編號) | ***GFSLSSNAMG*** |
| SEQ ID NO: 40 | **HCDR2**<br>(H57-H76; AHo 編號) | ***IISVGGFTYYASWAKG*** |
| SEQ ID NO: 41 | **HCDR3**<br>(H108-H138; AHo 編號) | ***RDRHGGDSSGAFYL*** |
| SEQ ID NO: 42 | **LCDR1**<br>(L24-L42; AHo 編號) | ***QSSESVYSNNQLS*** |
| SEQ ID NO: 43 | **LCDR2**<br>(L58-L72; AHo 編號) | ***DASDLAS*** |
| SEQ ID NO: 44 | **LCDR3**<br>(L107-L138; AHo 編號) | ***AGGFSSSSDTA*** |
| SEQ ID NO: 45 | **VH**<br>(19-01-H04-sc03)<br>(PRO325) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFSLSSNAMG***WVRQAPGKGLEYIG***IISVGGFTYYASWAKG***RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCA***RDRHGGDSSGAFYL***WGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 46 | **VL**<br>(19-01-H04-sc03)<br>(PRO325) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***QSSESVYSNNQLS***WYQQKPGQPPKLLIY***DASDLAS***GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***AGGFSSSSDTA***FGGGTKLTVLG |
| SEQ ID NO: 47 | **VH**<br>(19-01-H04-sc03) 突變 G51C<br>(PRO325_Cys) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFSLSSNAMG***WVRQAPGK**C**LEYIG***IISVGGFTYYASWAKG***RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCA***RDRHGGDSSGAFYL***WGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 48 | **VL**<br>(19-01-H04-sc03) 突變 G141C<br>(PRO325_Cys) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***QSSESVYSNNQLS***WYQQKPGQPPKLLIY***DASDLAS***GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***AGGFSSSSDTA***FG**C**GTKLTVLG |
| **23-13-A01** | | |

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID NO: 49 | **HCDR1**<br>(H27-H42; AHo 編號) | ***GFSFSSSYWIC*** |
| SEQ ID NO: 50 | **HCDR2**<br>(H57-H76; AHo 編號) | ***CVFTGDGTTYYASWAKG*** |
| SEQ ID NO: 51 | **HCDR3**<br>(H108-H138; AHo 編號) | ***RPVSVYYYGMDL*** |
| SEQ ID NO: 52 | **LCDR1**<br>(L24-L42; AHo 編號) | ***QASQIISSRSA*** |
| SEQ ID NO: 53 | **LCDR2**<br>(L58-L72; AHo 編號) | ***QASKLAS*** |
| SEQ ID NO: 54 | **LCDR3**<br>(L107-L138; AHo 編號) | ***QCTYIDSNFGA*** |
| SEQ ID NO: 55 | **VH**<br>(23-13-A01-sc03)<br>(PRO459) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFSFSSSYWIC***WVRQAPGKGLEWVG***CVFTGDGTTYYASWAKG***RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCA***RPVSVYYYGMDL***WGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 56 | **VL**<br>(23-13-A01-sc03)<br>(PRO459) | DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITC***QASQIISSRSA***WYQQKPGQPPKLLIY***QASKLAS***GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***QCTYIDSNFGA***FGGGTKLTVLG |
| SEQ ID NO: 57 | **VH**<br>(23-13-A01-sc03) 突變 G51C<br>(PRO459_Cys) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFSFSSSYWIC***WVRQAPGK**C**LEWVG***CVFTGDGTTYYASWAKG***RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCA***RPVSVYYYGMDL***WGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 58 | **VL**<br>(23-13-A01-sc03) 突變 G141C<br>(PRO459_Cys) | DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITC***QASQIISSRSA***WYQQKPGQPPKLLIY***QASKLAS***GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***QCTYIDSNFGA***FG**C**GTKLTVLG |
| **19-04-A10** | | |

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID NO: 59 | **HCDR1**<br>(H27-H42; AHo 編號) | ***GFSLSSYAMN*** |
| SEQ ID NO: 60 | **HCDR2**<br>(H57-H76; AHo 編號) | ***HINAGDIAYYATWAKG*** |
| SEQ ID NO: 61 | **HCDR3**<br>(H108-H138; AHo 編號) | ***RGAGGFSTGPFKL*** |
| SEQ ID NO: 62 | **LCDR1**<br>(L24-L42; AHo 編號) | ***QASESINSRLA*** |
| SEQ ID NO: 63 | **LCDR2**<br>(L58-L72; AHo 編號) | ***DASDLTS*** |
| SEQ ID NO: 64 | **LCDR3**<br>(L107-L138; AHo 編號) | ***QGYGGSSTTT*** |
| SEQ ID NO: 65 | **VH**<br>(19-04-A10-sc02)<br>(PRO2155) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFSLSSYAMN***WVRQAPGKGLEWIG***HINAGDIAYY ATWAKG***RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCA***RGAGGFSTGPFKL***WGQGTLVT VSS |
| SEQ ID NO: 66 | **VH**<br>(19-04-A10-sc02) 突變<br>L12R, V103T, L144Q | EVQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAAS***GFSLSSYAMN***WVRQAPGKGLEWIG***HINAGDIAYY ATWAKG***RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YYCA***RGAGGFSTGPFKL***WGQGT**Q**VT VSS |
| SEQ ID NO: 67 | **VL**<br>(19-04-A10-sc02)<br>(PRO2155) | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITC***QASESINSRLA***WYQQKPGQPPKLLIY***DASDLTS***GVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***QGYGGSSTTT***FGGGTKLTVLG |
| SEQ ID NO: 68 | **VH**<br>(19-04-A10-sc06) 突變 G51C<br>(PRO2317) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFSLSSYAMN***WVRQAPGK**C**LEWIG***HINAGDIAYY ATWAKG***RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCA***RGAGGFSTGPFKL***WGQGTLVT VSS |
| SEQ ID NO: 69 | **VH**<br>(19-04-A10-sc06) 突變<br>L12R, G51C, V103T, L144Q | EVQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAAS***GFSLSSYAMN***WVRQAPGK**C**LEWIG***HINAGDIAYY ATWAKG***RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCA***RGAGGFSTGPFKL***WGQGT**Q**VT VSS |
| SEQ ID NO: 70 | **VL**<br>(19-04-A10-sc06) 突變 G141C<br>(PRO2317) | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITC***QASESINSRLA***WYQQKPGQPPKLLIY***DASDLTS***GVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***QGYGGSSTTT***FG**C**GTKLTVLG |

**表 4. 與本發明相關的其他序列。**

| SEQ ID 號碼 | 抗體區 | 序列 |
|---|---|---|
| SEQ ID NO: 71 | VH3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFSFSANYYPC***WVRQAPGKGLEWIG***CIYGGSSDITY DANWTK***GRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA***RSAWYSGWGGDL***WGQGTLVT VSS |
| SEQ ID NO: 72 | VH1a | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS***GIDFNSNYYMC***WVRQAPGQGLEWMG***CIYVGSHVN TYYANWAKG***RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA***TSGSSVLYFKF***WGQGTLVTVS S |
| SEQ ID NO: 73 | VH1b | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS***GIDFNSNYYMC***WVRQAPGQGLEWMG***CIYVGSHV NTYYANWAKG***RVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCA***TSGSSVLYFKF***WGQGTLVT VSS |
| SEQ ID NO: 74 | VH4 | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVS***GFSFSNSYWIC***WIRQPPGKGLEWIG***CTFVGSSDSTYY ANWAKG***RVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA***RHPSDAVYGYANNL***WGQGTLVTV SS |
| SEQ ID NO: 75 | Vkappa1 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***QASQSINNVLA***WYQQKPGKAPKLLIY***RASTLAS***GVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***QSSYGNYGD***FGTGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 76 | 基於 Vλ 種系的 FR4 (Sk17) | FGTGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 77 | 基於 Vλ 種系的 FR4 (Sk12) | FGGGTKLTVLG |
| SEQ ID NO: 78 | 基於 Vλ 種系的 FR4 | FGGGTQLIILG |
| SEQ ID NO: 79 | 基於 Vλ 種系的 FR4 | FGEGTELTVLG |
| SEQ ID NO: 80 | 基於 Vλ 種系的 FR4 | FGSGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 81 | 基於 Vλ 種系的 FR4 | FGGGTQLTVLG |
| SEQ ID NO: 82 | 基於 Vλ 種系的 FR4 | FGGGTQLTALG |
| SEQ ID NO: 83 | 基於 Vλ 種系的 FR4_G141C | FGCGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 84 | 連接分子 | GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS |
| SEQ ID NO: 85 | 連接分子 | GGGGS |
| SEQ ID NO: 86 | 連接分子 | GGGGSGGGGS |

表 5. 本發明之多特異性抗體的示例(修飾和連接分子以粗體顯示)。

| SEQ ID 號碼 | 抗體形式 | 序列 |
|---|---|---|
| **PRO2286** | | |
| SEQ ID NO: 87 | scMATCH3 | DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQIISSRSAWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQCTYIDSNFGAFGCGTKLTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLR AEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**DIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSSYWICWVRQAPGKCLEWVGCVFTGDGTTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA TYFCARPVSVYYYGMDLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ NVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFS GEIRAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSL SRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFC VRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS |
| **PRO2287** | | |
| SEQ ID NO: 88 | scMATCH3 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSESVYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSSSSDTAFGCGTKLTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMN SLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**DIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFSLSSNAMGWVRQAPGKCLEYIGIISVGGFTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA TYFCARDRHGGDSSGAFYLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQAS QNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGF SGEIRAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLS LSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYF CVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS |
| **PRO2507** | | |
| SEQ ID NO: 89 | scMATCH3 | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**DIQMT |

| | | |
|---|---|---|
| | | QSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFT<br>LTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC<br>AASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA<br>EDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**DVQMTQSPSSLSASVGDRVTIT<br>CRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQG<br>GYYSSSSTYIAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QSQVVESGGGLVQPGGSLRLSCA<br>VSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAED<br>TAVYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTLVTVSS |
| **PRO2508** | | |
| SEQ ID NO: 90 | scMATCH3 | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGT<br>DFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC<br>AASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA<br>EDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**DIQMTQSPSSLSA<br>SVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSL<br>SSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYF<br>CARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIY<br>SGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSST<br>YIAFGCGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QSQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFDLSS<br>YAVSWVRQAPGKCLEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR<br>DRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTLVTVSS |
| **PRO2509** | | |
| SEQ ID NO: 91 | scMATCH3 | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGT<br>DFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC<br>AASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA<br>EDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**DIQMTQSPSSLSA<br>SVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSL<br>SSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYF<br>CARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNV<br>WNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEI<br>RAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QSQLVESGGGL<br>VQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNSKNTV |

| | | |
|---|---|---|
| | | YLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS |
| **PRO2510** | | |
| SEQ ID NO: 92 | scMATCH3 | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGT<br>DFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC<br>AASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA<br>EDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**DIQMTQSPSSLSA<br>SVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSL<br>SSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYF<br>CARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNV<br>WNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEI<br>RAFGCGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLSR<br>NAMSWVRQAPGKCLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVR<br>GIASSSLKSFWGQGTLVTVSS |
| **PRO2557** | | |
| SEQ ID NO: 93 | scMATCH3 | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGT<br>DFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC<br>AASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA<br>EDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**DIQMTQSPSSLSA<br>SVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSL<br>SSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYF<br>CARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNV<br>WNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEI<br>RAFGCGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSR<br>NAMSWVRQAPGKCLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKTSTTLDLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIA<br>SSSLKSFWGQGTLVTVSS |
| **PRO2596** | | |
| SEQ ID NO: 94 | scMATCH3 | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGT<br>DFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC<br>AASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA<br>EDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**DIQM |

| | | |
|---|---|---|
| | | TQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG**GGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS<br>CAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLR<br>AEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**AQQLTQSPSSLSASVGDRVTIT<br>CQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC<br>AGGFSGEIRAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA<br>VSGIDLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKTSTTLDLQMNSLRAEDTAV<br>YFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS |
| **PRO2589** | | |
| SEQ ID NO: 95 | MATCH4<br>(chain_1) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSG<br>TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS<br>QVVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFTI<br>SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGG**<br>**S**AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSG<br>TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGSGGS**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI<br>TCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC<br>LGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 96 | MATCH4<br>(chain_2) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSG<br>TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS<br>QVVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFTI<br>SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGG**<br>**S**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAK<br>GRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGSGGGSGG**<br>**GSG**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATW<br>AKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS |
| **PRO2590** | | |
| SEQ ID NO: 97 | MATCH4<br>(chain_1) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSG<br>TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGCGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS<br>QVVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKCLEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFTI<br>SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGG**<br>**S**AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSG<br>TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGSGGS**DIQMTQSPS<br>SLSASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>SLQPEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG |

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID NO: 98 | MATCH4 (chain_2) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGCGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QVVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKCLEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGG S**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAK GRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGSGGGSGG GSG**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATW AKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS |
| **PRO2591** | | |
| SEQ ID NO: 99 | MATCH4 (chain_1) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTI SKTSTTLDLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**AFELTQSPSS LSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGSGGS**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSN NYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSAD CYVFGTGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 100 | MATCH4 (chain_2) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTI SKTSTTLDLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSK NTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGSGGGSGGGSG**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS |
| **PRO2592** | | |
| SEQ ID NO: 101 | MATCH4 (chain_1) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGCGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKCLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTI SKTSTTLDLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**AFELTQSPSS LSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGSGGS**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVFSN NYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSAD CYVFGTGTKVTVLG |

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID NO: 102 | MATCH4<br>(chain_2) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGS<br>GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGCGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS<br>QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKCLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTI<br>SKTSTTLDLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**EVQLVESGG<br>GLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSK<br>NTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGSGGGSGGGSG**EVQLVES<br>GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN<br>SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS |
| **PRO2658** | | |
| SEQ ID NO: 103 | MATCH4<br>(chain_1) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGS<br>GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS<br>QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTI<br>SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**AFELTQS<br>PSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS<br>LQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGSGGS**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVF<br>SNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSA<br>DCYVFGTGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 104 | MATCH4<br>(chain_2) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGS<br>GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS<br>QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTI<br>SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**EVQLVE<br>SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRD<br>NSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGSGGGSGGGSG**EVQL<br>VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTIS<br>RDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS |
| **PRO2659** | | |
| SEQ ID NO: 105 | MATCH4<br>(chain_1) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGS<br>GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGCGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS<br>QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKCLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTI<br>SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**AFELTQS<br>PSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS<br>LQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFGCGTKLTVLG**GGSGGS**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVF<br>SNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSYACSSA<br>DCYVFGTGTKVTVLG |

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID NO: 106 | MATCH4 (chain_2) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGCGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKCLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRGIASSSLKSFWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGS**EVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRD NSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARGGWTGTSHSNIWGQGTLVTVSS**GGGSGGGSGGGSG**EVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGAGGFSTGPFKLWGQGTLVTVSS |
| **PRO2667** | | |
| SEQ ID NO: 107 | scMATCH3 | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFG**C**GTKLTVLG**GGGGS**EVQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSC AASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA EDTA**T**YFCARGGWTGTSHSNIWGQGT**Q**VTVSS**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**DIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG**GGGGS**EVQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAASGFS LSSYAMNWVRQAPGK**C**LEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**Y FCARGAGGFSTGPFKLWGQGT**Q**VTVSS**GGGGSGGGGS**DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENI YSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSS TYIAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QSQVVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVSGFDL SSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFC ARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGT**Q**VTVSS |
| **PRO2668** | | |
| SEQ ID NO: 108 | scMATCH3 | AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFG**C**GTKLTVLG**GGGGS**EVQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSC AASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRA EDTA**T**YFCARGGWTGTSHSNIWGQGT**Q**VTVSS**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**DIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG**GGGGS**EVQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAASGFS LSSYAMNWVRQAPGK**C**LEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**Y FCARGAGGFSTGPFKLWGQGT**Q**VTVSS**GGGGSGGGGS**AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNV WNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEI RAFG**C**GTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QSQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVSGLSLSR NAMSWVRQAPGK**C**LEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCVR GIASSSLKSFWGQGT**Q**VTVSS |

| | | |
|---|---|---|
| **PRO2669** | | |
| SEQ ID NO: 109 | MATCH4 (chain_1) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGTGTKVTVLG***GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS***QSQ VVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFTIS KDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWGQGT**Q**VTVSS**GGGGSGGGGS** AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFG**C**GTKLTVLG**GGSGGS**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL GSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 110 | MATCH4 (chain_2) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QVVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFT ISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWG**Q**GTQVTVSS**GGGGSGGG** **GS**EVQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWA KGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARGGWTGTSHSNIWG**Q**GTQVTVSS**GGGSGGGSG** **GGSG**EVQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGK**C**LEWIGHINAGDIAYYAT WAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARGAGGFSTGPFKLWGQGT**Q**VTVSS |
| **PRO2670** | | |
| SEQ ID NO: 111 | MATCH4 (chain_1) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFG**C**GTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QVVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGK**C**LEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFT ISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWG**Q**GTQVTVSS**GGGGSGGG** **GS**AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFG**C**GTKLTVLG**GGSGGS**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 112 | MATCH4 (chain_2) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFG**C**GTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QVVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGK**C**LEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFT ISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWG**Q**GTQVTVSS**GGGGSGGG** **GS**EVQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWA KGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARGGWTGTSHSNIWG**Q**GTQVTVSS**GGGSGGGSG** **GGSG**EVQLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGK**C**LEWIGHINAGDIAYYAT WAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARGAGGFSTGPFKLWGQGT**Q**VTVSS |

| | | |
|---|---|---|
| **PRO2677** | | |
| SEQ ID NO: 113 | MATCH4 (chain_1) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QVVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFT ISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWG**Q**GTQVTVSS**GGGGSGGG GS**AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFG**C**GTKLTVLG**GGSGGS**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 114 | MATCH4 (chain_2) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVSGLSLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTI SKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCVRGIASSSLKSFWG**Q**GQLVTVSS**GGGGSGGGGS**EVQLVE SGGG**R**VQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRD NSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARGGWTGTSHSNIWG**Q**GTQVTVSS**GGGSGGGSGGGSG**EVQL VESGGG**R**VQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARGAGGFSTGPFKLWG**Q**GTQVTVSS |
| **PRO2678** | | |
| SEQ ID NO: 115 | MATCH4 (chain_1) | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSGLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVSSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYYSSSSTYIAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QVVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVSGFDLSSYAVSWVRQAPGKGLEWIGIIYPRANTYYASWAKGRFT ISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTA**T**YFCARDRYDSGAYLYTTYFNLWG**Q**GTQVTVSS**GGGGSGGG GS**AFELTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESINSRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGYGGSSTTTFG**C**GTKLTVLG**GGSGGS**DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQSSQSVFSNNYLAWFQQKPGQSPKRLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CLGSYACSSADCYVFGTGTKVTVLG |
| SEQ ID NO: 116 | MATCH4 (chain_2) | AQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVWNNNYLSWFQQKPGKPPKLLIVTASTLASGVSSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSGEIRAFGTGTKVTVLG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QS QLVESGGG**R**VQPGGSLRLSCAVSGIDLSRNAMSWVRQAPGKGLEWIGIILTSGSTYYASWAKGRFTI SKTSTTLDLQMNSLRAEDTA**T**YFCVRGIASSSLKSFWG**Q**GTQVTVSS**GGGGSGGGGS**EVQLVESGG G**R**VQPGGSLRLSCAASGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLAWIGASYASGPTYYASWAKGRFTISRDNSK NTVYLQMNSLRAED**T**ATYFCARGGWTGTSHSNIWG**Q**GTQVTVSS**GGGSGGGSGGGSG**EVQLVES GGG**R**VQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMNWVRQAPGKCLEWIGHINAGDIAYYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAED**T**ATYFCARGAGGFSTGPFKLWG**Q**GTQVTVSS |

**表 6. 依照 UniProtKB - Q01973，人類 ROR1 胞外結構域(殘基 30-407)包括 N 端信號胜肽(殘基 1-29)的序列(胞外部分以斜體字母顯示；Ig 樣結構域的殘基，即殘基 42-147，以粗體和斜體字母顯示)。**

| **SEQ ID 號碼** | 序列 |
|---|---|
| SEQ ID NO: 117 | MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAA*QETELSVSAELV**PTSSWNISSELNKDSYLTLDEPMNNITTSLGQTAELHCKVSG**<br>**NPPPTIRWFKNDAPVVQEPRRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLF**VKFGPPPTASPGYSDEYEED*<br>*GFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCRDECEIL*<br>*ENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDYRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYP*<br>*HTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILY* |

【0160】 在申請書的正文中，如果說明書正文(例如表1至表6)與序列表之間存在差異，則應以說明書正文為準。

【0161】 應當理解的是，為了清楚起見，在不同實施例的上下文中描述的本發明之某些特徵也可以合起來提供於單個實施例中。反之，為了簡潔起見，在單個實施例的上下文中描述的本發明之各種特徵也可以單獨提供或以任何合適的組合提供。屬於本發明的實施例的所有組合都特別地包含在本發明裡並且在本文中被揭露，就好像每個組合被單獨地和明確地揭露一樣。此外，各種實施例及其元素的所有子組合也都特別地包含在本發明裡並在本文中公開，如同每個這樣的子組合在本文中單獨且明確地公開一樣。

【0162】 本發明不受限本文所述的特定實施例的範圍。的確，除了本文所述的那些之外，從先前的描述，本發明的各種修改對於本領域通常知識者而言將變得顯而易見。此類修改旨在落入所附申請專利的範圍內。實際上，除了本文所述的那些之外，本發明的各種修改對於本領域技術人員而言從前面的描述將變得顯而易見。此類修改目的是希望能落於所附申請專利範圍內。

【0163】 在相應專利法的可能範圍內，本文引用的所有專利、申請、出版物、測試方法、文獻和其他材料均以參考資料併入本文。

【0164】 以下示例說明了上述本發明，但是其目的不在於以任何方式限制本發明的範圍。本領域通常知識者已知的其他測試模型也可以確立所請發明(claimed invention)的優越效果。

**示例**

## 示例1: 產生和測試抗ROR1分子

### 本計畫的目的

【0165】 該計畫的目標是產生能特異地結合於人類ROR1胞外結構域的人源化單株抗體片段。更進一步的目標是鑑定足夠有效和穩定的抗ROR1抗體片段，以納入多特異性抗體形式。

### 1.1 免疫作用

【0166】 用人類ROR1胞外域(ECD)免疫九隻兔子。六隻兔子按照Numab的標準程序進行免疫，該程序是在70天內四次的抗原注射，另外三隻兔子按照延伸程序免疫，該程序與標準程序有相同的初始時間表，而最後一次抗原注射是在第112天程序結束的4天前。

### 1.2 分類和識別初選化合物(hit)

【0167】 使用 ROR1胞外結構域，透過FACS，將源自按Numab標準免疫程序免疫的六隻兔子的3,740個單B細胞(single B cells)進行分類。培養單B細胞，並在4週的時間內收集含有分泌出目標抗體的B細胞上清液。在這3,740個分選的B細胞中，993殖株透過ELISA顯示與重組人類ROR1結合。接著測試陽性植株(clones)與ROR1表達細胞結合的能力，627個殖株顯示與表達高ROR1水平(MDA-MB-231)的癌細胞結合，其中99個殖株對人類ROR1 ECD的親和力低於800pM。檢索來自這些殖株的重鏈和輕鏈序列，並選擇透過SPR測量具有最佳結合親和力的15個ROR1結合殖株以用於兔子中生產重組IgG。

### 1.3 生產重組兔子IgG

【0168】 在選擇用於初選化合物確認的殖株之後，兔子抗體被轉殖、表達和純化出來以用於進一步的特性分析。相應之輕鏈和重鏈可變結構域的轉殖需要將DNA片段在體外連接到合適的哺乳動物表達載體(pFUSE，Invivogen)中。將兔子抗體重鏈和輕鏈的表達載體轉染到哺乳動物懸浮細胞株(CHO-S)中以用於短暫異體表達(transient heterologous expression)(50 ml 規模，Mirus CHOgro 表達試劑盒)。隨後，將分泌的兔子IgG進行親和純化(蛋白A親和純化)，將緩衝液更換為PBS pH7.4，並透過十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE，數據未顯示)、280nm處紫外光的吸收度和尺寸排阻高效液相層 (SE-HPLC)來分析最終產物，以驗證身份、含量和純度。在選定的15種兔子 IgG 中，成功生產了13種。

### 1.4 重組兔子IgG(rIgG)的初選化合物確認

【0169】 透過CELISA評估13個成功生產的rIgG對表達ROR1的細胞的結合親和力，並且透過SPR評估其對重組ROR1的結合親和力。此外，rIgG結合於ROR1上的結合區域是透過評估兔子IgG與三種嵌合ROR1/ROR2變異體的結合來定義。

*以CELISA量測與表達 ROR1 的細胞結合*

【0170】 使用MDA-MB-231細胞(ATCC，cat.HTB-26，表達高水平人類ROR1的人類乳腺癌細胞)和MCF-7(ATCC，cat.HTB- 22，不表達人類ROR1的人類乳腺癌細胞)以評估與表達ROR1的細胞之結

合。將40,000個細胞分配到平底且經過組織培養處理(tissueculture treated)的96孔盤中。第二天，用每孔450µl清洗液(PBS，0.2 %BSA)以溢出模式清洗盤子3次，每個測試點各加入50µl測試之兔子IgG的序列稀釋液和抗ROR1參考抗體PRO1842(一人類IgG抗體，包含如專利申請US 2017/0306018 A1中揭露的SEQ-ID NO：129和130的VH-/VL-序列)，並將盤子以溫和的攪動在室溫(RT)下孵育(incubate)1.5小時。在用450µl清洗液洗滌 次後，將50µl耦合HRP的goat anti-rabbit IgG或rabbit anti-human IgG抗體添加到各個孔中。在室溫下旋轉混合器(nutating mixer)上孵育1小時後，盤子先以450µl清洗液洗滌3次，再加入50µlTMB(3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，KPL，Cat.第53-00-00號)。顯影10分鐘後，每孔添加50µl 1M HCl終止酵素反應，在450nm處讀取盤子的值並使用690nm作為參考波長。為了PRO1842的重組生產，從Gene Universal(Newark DE，United States)訂購哺乳動物表達質體(pcDNA3.1，宿主：CHO-S)。PRO1842的表達和純化以上文第1.3節所述類似的方式進行，並生產出足夠的材料和純度(SE-HPLC 測定的單體含量>98%)用於預期用途。

【0171】 11個殖株顯示與ROR1表達細胞的結合，這些殖株中的8個以與參考抗體PRO1842相似或更好的$EC_{50}$與ROR1結合(參見表6)。

*以SPR量測結合親和力*

【0172】 兔子IgG與重組人類ROR1蛋白(His Tag，Acro Biosystems)的結合動力學(包括親和力)透過在Mass2設備(Sierra

sensor，Bruker)上的SPR分析來確定。兔子IgG分子透過抗兔子IgG抗體(goat anti-rabbit IgG-Fc，Bethyl)被抓取到特定位點，而抗兔子IgG抗體是以共價方式固定在羧甲基化葡聚醣表面(HCA sensorchip；Sierra sensors，Bruker)，而後以重組人類ROR1的序列滴定液作為分析物注入。在每個分析物注射行程後，晶片感測器上的每個點都被再生(regenerated)(Glycine-HCl，pH 1.5)，隨後重新抓取另一個新的兔子IgG。使用多循環動力學測定法(multi-cycle kinetic assay)測量與人類ROR1的結合動力學，分析物濃度共有10組，範圍為0.176至90nM，是以流通之緩衝液(running buffer)(HEPES緩衝生理鹽水，0.05% Tween-20，pH 7.5；Bioconcept)來稀釋。外顯(apparent)解離(kd)和結合(ka)速率常數和外顯(apparent)解離平衡常數($K_D$)是以Sierra 感測器分析軟體(Sierra analyzer，Sierra sensor，Bruker)使用一對一的Langmuir結合模型作計算得到，其擬合品質的好壞是從相對$Chi^2$來監測。結合水平是由所達到的最大穩定性結合對Rmax理論值作歸一化(normalized to the theoretical $R_{max}$)而算得。

【0173】 測定了11種兔子IgG對重組ROR1的親和力。一個殖株沒有觀察到結合，測得的最佳結合親和力為1.06nM。結果總結在表7中。參考抗ROR1抗體PRO1776(該人類IgG4抗體包含如專利申請WO2014/031174中公開的SEQ-ID NO：5和7的VH-/VL-序列)也用類似的設置作量測。為了PRO1776的重組生產，從Gene Universal(Newark DE，美國)訂購了哺乳動物表達質粒(pcDNA3.1，宿主：CHO-S)。PRO1776的表達和純化以上文第1.3節所述類似的方

式進行，並生產出足夠的材料和純度(SE-HPLC 測定的單體含量>98%)用於預期用途。

*鑑定ROR1上的兔子IgG(rIgG)結合區*

【0174】 為了定義在ROR1上rIgG結合的區域，透過CELISA評估與瞬間轉染(transiently transfected)三種嵌合ROR1/ROR2變異體的HEK293T細胞之結合程度。ROR1/ROR2變異體的生成是透過以ROR2中的相應區域交換ROR1的三個結構域，即ROR1的Ig樣結構域(區域1)、ROR1的捲曲結構域(區域2)和ROR1的Kringle結構域(區域3)。為了排除可能與ROR2結合的結合物，首先透過ELISA評估與ROR2 的結合；使用該測定法未鑑定出與ROR2結合的結合物。

【0175】 然後在以poly-D lysine處理的平底96孔盤上的每孔內植入25,000個細胞。第二天，用相應的構築體轉染細胞並在37°C、5% $CO_2$下孵育。24小時後，用450µl清洗液(PBS，0.2% BSA)沖洗細胞，加入樣品(10 µg/ml rIgG)並在室溫下以溫和攪拌孵育1.5小時。用450µl清洗液沖洗3 次後，每孔加入50 µl耦合HRP的goat anti-rabbit IgG抗體。在室溫下旋轉混合器上孵育1小時後，用450µl清洗液清洗盤子三次，之後加入50µlTMB(3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，KPL，Cat.第53-00-00號)。10分鐘後，每孔添加50µl 1M HCl來停止酵素反應的進行，在450 nm處讀取盤子的值並使用690 nm作為參考波長。rIgG的結合水平以相對於兔子IgG與wt ROR1的結合來計算。與wt ROR1蛋白相比，rIgG與特定變異體的結合水平明顯降低，這表示了 rIgG表位是位在人類ROR1 片段內，但卻被相應的ROR2序列取代。

【0176】 從12種兔子IgG鑑定出了明確定義的結合區。九個rIgG與區域1(ROR1的Ig樣結構域)結合，三個抗體與區域2(ROR1的捲曲結構域)結合。沒有rIgG與區域3(ROR1的Kringle結構域)結合。結果總結在表7中。

**表 7：透過SPR 和 CELISA量得15個兔子IgG的結合特徵。**

| | SPR 量到的對 hROR1 的親和力 | | | 與表現 ROR1 細胞的結合 (MDA-MB-231) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Clone ID** | **$k_a$ (1/Ms)** | **$k_d$ (1/s)** | **$K_D$ (M)** | **$EC_{50}$ (nM)** | **rel. $EC_{50}$ ($EC_{50}$, 參考組/ $EC_{50}$, 樣品)** | **結合區域** |
| **55-06-E06** | 2.68E+05 | 3.50E-03 | 1.31E-08 | 0.04 | 1.92 | 1 |
| 55-18-H06 | Not producible | | | | | |
| **55-19-D06** | 1.37E+05 | 3.61E-04 | 2.63E-09 | 0.05 | 1.72 | 1 |
| **55-21-E10** | 2.45E+05 | 2.87E-04 | 1.17E-09 | 0.09 | 1.06 | 1 |
| 55-29-G11 | Not measured | | | 2.17 | 0.04 | 2 |
| 55-32-E10 | Not measured | | | NB | NA | 2 |
| **55-33-A06** | 2.05E+05 | 4.12E-04 | 2.01E-09 | 0.05 | 2.49 | 1 |
| 55-35-D08 | 6.82E+04 | 7.34E-04 | 1.08E-08 | 1.70 | 0.07 | 2 |
| **55-38-D07** | 2.21E+05 | 2.97E-04 | 1.34E-09 | 0.06 | 1.94 | 1 |
| 55-38-F04 | NB | NB | NB | NB | NA | NB |
| 55-39-A08 | 3.55E+04 | 3.75E-05 | 1.06E-09 | 0.31 | 0.29 | 1 |
| **55-39-G02** | 2.29E+05 | 3.37E-04 | 1.47E-09 | 0.06 | 1.42 | 1 |
| 55-40-E06 | Not producible | | | | | |
| 55-42-D02 | 6.70E+04 | 4.32E-04 | 6.44E-09 | 0.08 | 1.01 | 1 |
| **55-42-E05** | 1.82E+05 | 5.51E-04 | 3.03E-09 | 0.03 | 2.48 | 1 |
| PRO1776 | 3.06E+05 | 1.73E-02 | 5.65E-08 | NA | NA | 1 |
| PRO1842 | Not measured | | | 12.38 | 1 | Not assessed |

NA: 不適用

NB: 無結合

PRO1776: 參考抗體 (包含如專利申請 WO 2014/031174 中揭露的 SEQ-ID NO：5 和 7 之 VH-/VL-序列的人類 IgG4 抗體)

PRO1842: 參考抗體 (包含如專利申請 US 2017/0306018 A1 中揭露的 SEQ-ID NOs: 129 和 130 之 VH-/VL-序列的人類 IgG 抗體)

【0177】 八個殖株對表達ROR1的MDA-MB-231細胞表現出比抗ROR1參考抗體PRO1842更好或相當的結合親和力。從這八個殖株

中，選擇七個最好的殖株以表達為Numab框架上的兩個版本的人源化單鏈Fvs。

### 1.5 ScFv產生

*ScFv產生*

【0178】 序列人源化的目的是降低我們感興趣的分子之免疫原性風險並穩定抗體可變結構域(Fv片段)，以使其能作為組裝成多特異性形式的構成單元。因此，人源化涉及將重要殘基從供應者(donor)(兔子)的互補決定區(CDR)序列轉移到人類接受者的受體框架上，以增加近於人類的性質和提高穩定性，而不會顯著影響功能。

【0179】 對於先導(lead)ROR1 scFv 結構域的產生，選擇了七個兔子單株抗體殖株，如表7所示。這些殖株的人源化包括將兔子CDR轉移至Numab專有的人類可變結構域受體支架的其中之一。在此過程中，使用Numab的CDR定義(表 8)對六個CDR區域的胺基酸序列進行了特徵分析，並移植到Numab專有且高度穩定的全人類VH3/Vk1-λ-capped受體框架上；這些構築體被稱為「CDR移植物」。

**表 8：相對於 AHo(Honegger) 和 Kabat 編號 Numab CDR 定義**

| 區域 | Aho 編號 | Kabat 編號 |
|---|---|---|
| CDR1-VL | 24-42 | 24-34 |
| CDR2-VL | 58-72 | 50-56 |
| CDR3-VL | 107-138 | 89-97 |
| CDR1-VH | 27-42 | 26-35A/35B/… |
| CDR2-VH | 57-76 | 50-65 |
| CDR3-VH | 108-138 | 94-102 |

【0180】 單獨地將兔子CDRs移植到人類受體框架上是最基本的移植策略，本文稱為「CDR移植物」。除了CDR移植物外，還設計了一種額外的移植變異體，其中包含兔子框架殘基的定義模式，本文稱為「完全移植物」。這些移植變異體的細節如下：

**CDR移植**：使用Numab的CDR定義在Numab的受體框架上植入兔子CDR。供應者框架殘基沒有回復突變(back-mutation)。

**全移植物**：最多的移植物，其包含供應者Fv核心殘基、供應者VL/VH界面殘基以及可能與抗原作用的供應者框架殘基。

【0181】 表9總結了ROR1人源化結構域的CDR和完全移植物。移植到人類框架上的兔子框架殘基分別列在VL和VH結構域(使用AHo編號)。

【0182】 從Gene Universal訂購1mg人源化scFv構築體的哺乳動物表達質體(pcDNA3.1，宿主：CHO-S)。質體用於瞬時轉染 CHO-S 細胞，如下所述。

*ScFv製造*

【0183】 使用CHOgro瞬時轉染試劑盒(Mirus)在CHO-S細胞中進行哺乳動物scFv構築體的表達。在37°C下最多表達7天後(或當細胞存活率<70%時)透過離心和過濾收集培養物。透過蛋白質L親和層析從澄清的培養上清液中純化出蛋白質。透過SE-HPLC分析評估，除了殖株55-06-E06衍生的scFv之外，抓取後所有分子都表現出的單體含量>95%的成分。經由透析將所有分子直接重新緩衝至具有150mM NaCl的50mM磷酸鹽-檸檬酸鹽緩衝液，pH6.4。殖株55-42-E05(PRO2065)

的CDR移植物表現出低表達效價(titer)，因此無法再繼續進行。對於製造材料的品質控制，應用了標準分析方法，例如SE-HPLC、UV280和SDS-PAGE。人源化抗ROR1 scFv 分子的製造總結在表10中。

【0184】 由於一種scFv不能被表達(55-42-E05-sc01/PRO2065)，因此14個scFv中只有13個進行了隨後的藥效學(pharmacodynamics)特徵分析。

表 9：ROR1 人源化結構域的 CDR 和完全移植物概述；供應者框架回復突變分別就 VL 和 VH 結構域表示出。

| PRO ID | 描述 | 框架 | 移植策略 | 被移植的兔子框架殘基，VL | 被移植的兔子框架殘基，VH |
|---|---|---|---|---|---|
| PRO2055 | 55-06-E06-sc01 | Vk1/VH3 | CDR | - | - |
| PRO2056 | 55-06-E06-sc02 | Vk1/VH3 | Full | D1A, I2Q, M4L, A51P | E1Q, V2S, L4V, A25V, R82K, Y105F |
| PRO2057 | 55-33-A06-sc01 | Vk1/VH3 | CDR | - | - |
| PRO2058 | 55-33-A06-sc02 | Vk1/VH3 | Full | D1A, A51P, F89Y | E1Q, V2S, L4V, A25V, R82K, Y105F |
| PRO2059 | 55-38-D07-sc01 | Vk1/VH3 | CDR | - | - |
| PRO2060 | 55-38-D07-sc02 | Vk1/VH3 | Full | I2V, A51P | E1Q, V2S, L4V, A25V, R82K, Y105F |
| PRO2061 | 55-39-G02-sc01 | Vk1/VH3 | CDR | - | - |
| PRO2062 | 55-39-G02-sc02 | Vk1/VH3 | Full | D1A, I2Q, M4L, Y44F, A51P, Y57V | E1Q, V2S, A25V, R82K, Y105F, A107V |
| PRO2063 | 55-19-D06-sc01 | Vk1/VH3 | CDR | - | - |
| PRO2064 | 55-19-D06-sc02 | Vk1/VH3 | Full | D1A, I2Q, M4L, Y44F, A51P, P52L, L54V | E1Q, V2S, L4V, A25V, R82K, Y105F |
| PRO2065 | 55-42-E05-sc01 | Vk1/VH3 | CDR | - | - |
| PRO2066 | 55-42-E05-sc02 | Vk1/VH3 | Full | D1A, I2Q, M4L, A51P | E1Q, V2S, L4V, A25V, W54Y, R82K, Y105F |
| PRO2067 | 55-21-E10-sc01 | Vk1/VH3 | CDR | - | - |
| PRO2068 | 55-21-E10-sc02 | Vk1/VH3 | Full | A51P, L54Q, G82R, | E1Q, V2S, G56A, R82K, Y105F |

表 10：7個選取的兔子殖株之人源化CDR和完整移植物的ScFv製造。

| Protein ID | 描述 | 抓取後效價 (Titer post capture) [mg/L] | 最終效價 (Final titer)[mg/l Expression] | SE-HPLC 得到的純度 [% 單體] |
|---|---|---|---|---|
| PRO2055 | 55-06-E06-sc01 | 33.5 | 18.8 | 90.6 |
| PRO2056 | 55-06-E06-sc02 | 9.5 | 7.1 | 92.4 |
| PRO2057 | 55-33-A06-sc01 | 33.5 | 32.0 | 99.2 |
| PRO2058 | 55-33-A06-sc02 | 37.0 | 34.9 | 99.4 |
| PRO2059 | 55-38-D07-sc01 | 44.0 | 43.6 | 94.2 |
| PRO2060 | 55-38-D07-sc02 | 34.0 | 30.6 | 94.3 |
| PRO2061 | 55-39-G02-sc01 | 3.5 | 3.1 | 95.5 |
| PRO2062 | 55-39-G02-sc02 | 13.0 | 11.0 | 99.8 |
| PRO2063 | 55-19-D06-sc01 | 13.5 | 11.3 | 99.5 |
| PRO2064 | 55-21-E10-sc01 | 50.0 | 14.3 | 99.8 |
| PRO2066 | 55-42-E05-sc02 | 8.5 | 8.0 | 98.5 |
| PRO2067 | 55-19-D06-sc02 | 13.0 | 53.6 | 99.1 |
| PRO2068 | 55-21-E10-sc02 | 18.0 | 17.5 | 98.2 |

### 1.6 ScFv 特徵分析

*以流式細胞儀量測與表達 ROR1 之 MDA-MB-231 細胞的結合*

【0185】 獲取MDA-MB-231細胞(ATCC, cat. HTB-26,表達高水平人類ROR1的人類乳腺癌細胞)和MCF-7 (ATCC, cat. HTB-22,不表達人類ROR1的人類乳腺癌細胞)並確定其細胞數。將細胞懸浮液以400 x g離心5分鐘，然後將100µl細胞懸浮液(50,000個細胞)稀釋在PBS-EB(1xDPBS、2%FCS H.I.、2mM EDTA)中並添加到非結合96-孔盤的指定位孔中。在用PBS-EB清洗三次後，把細胞離心下來並吸除清洗液。以3倍序列稀釋scFv和參考抗ROR1 Fab片段PRO2213(包含SEQ-ID NO：129和130的VH-/VL-序列的人類Fab片段，如專利申請US2017/0306018A1中所揭露)製備序列稀釋液，然後將其加到帶有細胞的盤中。在4°C孵育1小時後，用100µlPBS-EB將盤子清洗3次。將加入scFv的細胞重新懸浮在100µlNumab的框架特異性檢測抗體(PRO2268，兔子IgG)溶液中，並在4°C下孵育30分鐘。清洗步驟後，

接著添加濃度為2μg/ml APC標記的抗兔子IgG抗體以檢測PRO2268，並在4°C下孵育1小時。將加入參考Fab片段PRO2213的細胞重新懸浮在100 μl山羊抗人類(goat anti-human)F(ab')2接合Alexa Fluor 647的抗體(Jackson Immuno Research, cat. 109-606-097)溶液中，其抗體濃度2.8μg/ml，並在4°C下孵育1小時。接下來，以每孔100μlPBS-EB再清洗細胞3次。沉澱的細胞用50μlPBS-EB重新懸浮，並用NovoCyte 2060流式細胞儀進行分析。記錄每個樣品的APC通道螢光強度，並計算螢光強度的幾何平均值 (MFI)。數據是單一參考的(僅減去與檢測試劑一起孵育的細胞上之螢光強度)，隨後的濃度-反應曲線使用4-PL擬合(GraphPad Prism軟體)進行擬合。PRO2213是透過木瓜蛋白酶分解人類IgG PRO1842而產生。其可產出足夠數量和純度的PRO2213(SE-HPLC測定的單體含量>98%)以用於預期用途。

【0186】 對與細胞表面人類ROR1的外顯結合親和力(apparent binding affinity)進行評估，四個scFv與人類ROR1表達細胞結合的$EC_{50}$不低於參考Fab片段PRO2213的三分之一。兩個scFv未表現出與表達人類ROR1的細胞結合(表11)。為了測試非特異性結合，以流式細胞儀中測試了所有scFv與人類ROR1陰性之MCF-7細胞的結合，並且沒有一個測試的scFv表現出與MCF-7細胞的結合。至於抗ROR1 scFvs PRO2060和PRO2062對細胞膜上人類ROR1的外顯結合親和力，則分別在三個和兩個獨立的流式細胞實驗中評估。在這些實驗中獲得的PRO2060和PRO2062的平均$EC_{50}$和平均相對$EC_{50}$值也顯示在表11中。兩種scFv均表現出與人類ROR1陽性之MDA-MB-231細胞的特異性結合，而未發現與ROR1陰性之MCF-7細胞(見第1圖)。與參考Fab

片段PRO2213相比，PRO2060的外顯結合親和力低約三倍，而PRO2062的外顯結合親和力高約三倍。

**表11：以流式細胞儀量測抗ROR1 scFv對表達於MDA-MB-231細胞膜上人類ROR1的外顯結合親和力。**

| 蛋白質 ID | 殖株描述 | $EC_{50}$ [nM] | 相對 $EC_{50}$ ($EC_{50,\ PRO2213}$/ $EC_{50,\ scFv}$) | 相對最大結合值 ($MFI_{scFv}$/$MFI_{PRO2213}$) |
|---|---|---|---|---|
| PRO2055 | 55-06-E06-sc01 | 2.26 | 0.29 | 0.49 |
| PRO2056 | 55-06-E06-sc02 | 3.13 | 0.21 | 0.31 |
| PRO2057 | 55-33-A06-sc01 | no binding | | |
| PRO2058 | 55-33-A06-sc02 | not calculable | | 0.26 |
| PRO2059 | 55-38-D07-sc01 | 3.5 | 0.33 | 0.54 |
| PRO2061 | 55-39-G02-sc01 | 25.63 | 0.02 | 0.13 |
| PRO2063 | 55-19-D06-sc01 | 30.8 | 0.02 | 0.13 |
| PRO2064 | 55-21-E10-sc01 | 16.4 | 0.04 | 0.41 |
| PRO2066 | 55-42-E05-sc02 | 0.59 | 1.21 | 0.89 |
| PRO2067 | 55-19-D06-sc02 | no binding | | |
| PRO2068 | 55-21-E10-sc02 | 19.75 | 0.05 | 0.08 |
| PRO2060 | 55-38-D07-sc02 | 2.93 | 0.33 | 1.00 |
| PRO2062 | 55-39-G02-sc02 | 0.26 | 2.77 | 0.85 |

【0187】 PRO2060和PRO2062分別在三個和兩個獨立實驗中測量，計算出平均$EC_{50}$、平均相對$EC_{50}$，平均相對最大結合值。PRO2213用作為參考抗ROR1抗體。

*以SPR量測結合親和力*

【0188】 以T200設備(Biacore，Cytiva)的SPR分析來決定scFv與重組人類ROR1蛋白(Fc-Tag，Acro Biosystems)的結合動力學(包括親和力)。將重組人類ROR1分子共價固定在羧甲基化葡聚醣表面(CM5感測器晶片；Biacore，Cytiva)上，並將每個scFv的滴定序列液作為分析物注入。在每個分析物注入行程完後，感測器晶片上的每個流道

都被再生(甘胺酸，pH 2.0)，之後注入新濃度的scFv。使用多循環動力學(multi-cycle kinetics)測定法測量與人類ROR1的結合動力學，以流通之緩衝液(HEPES緩衝生理鹽水，0.05% Tween-20，pH7.5；Bioconcept)稀釋成九個分析物濃度，其範圍為0.005至30 nM，外顯解離(kd)和結合(ka)速率常數和外顯解離平衡常數($K_D$)是以Biacore分析軟體(Biacore評估軟體版本3.2，Cytiva)使用一對一的Langmuir結合模型計算得到，其擬合的品質好壞是從Chi2和U值來監測，它們是曲線擬合品質好壞的衡量標準。結合水平是由所達到的最大穩定性結合對Rmax理論值作歸一化(normalized to the theoretical $R_{max}$)而算得。

【0189】 評估所有13個scFv對ROR1表達細胞和重組hROR1的結合親和力。將數據相互關聯並顯示在表12中。

【0190】 測定8個scFv對hROR1的親和力。親和力範圍為160nM至0.098nM。三個scFv表現出比Fab參考片段PRO2213更好的親和力。對於三個scFv，由於技術原因無法確定其親和力，另2個scFv則沒有觀察到結合(表12)。

**表 12：選取的scFv對hROR1的親和力測量總結。**

| 蛋白質 ID | 描述 | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M) |
|---|---|---|---|---|
| PRO2055 | 55-06-E06-sc01 | | 無法計算 | |
| PRO2056 | 55-06-E06-sc02 | | 無法計算 | |
| PRO2057 | 55-33-A06-sc01 | | 無結合 | |
| PRO2058 | 55-33-A06-sc02 | 4.28E+05 | 9.37E-03 | 2.19E-08 |
| PRO2059 | 55-38-D07-sc01 | 2.18E+05 | 4.09E-04 | 1.88E-09 |
| PRO2060 | 55-38-D07-sc02 | 2.50E+05 | 9.79E-05 | 4.16E-10 |
| PRO2061 | 55-39-G02-sc01 | 1.24E+06 | 2.00E-01 | 1.61E-07 |
| PRO2062 | 55-39-G02-sc02 | 4.45E+06 | 4.55E-04 | 1.03E-10 |
| PRO2063 | 55-19-D06-sc01 | 1.83E+07 | 1.66E-01 | 9.07E-09 |
| PRO2064 | 55-21-E10-sc01 | | 無法計算 | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| PRO2066 | 55-42-E05-sc02 | 3.39E+06 | 7.99E-04 | 2.36E-10 |
| PRO2067 | 55-19-D06-sc02 | | 無法計算 | |
| PRO2068 | 55-21-E10-sc02 | 7.16E+05 | 8.68E-02 | 1.21E-07 |
| PRO2213 | n/a | 6.61E+05 | 3.95E-04 | 5.98E-10 |

【0191】 那些未結合(SPR和細胞結合)或不確定數據的結構域從進一步的分析中被排除。選擇來自三個不同殖株的四個scFv，它們表現出與人類ROR1表達細胞最佳的結合以及經SPR確認對重組人類ROR1 ECD的最高親和力，將其用於進一步的生物物理特徵分析。這些結構域包括PRO2060、PRO2062、PRO2059和PRO2066。

【0192】 由於食蟹獼猴ROR1與人類ROR1100%相同，因此不需要進一步的結合評估來顯示這些結構域的跨物種結合。

### 1.7 scFv結構域的生物物理特徵分析(儲存穩定性和DSF)

*儲存穩定性*

【0193】 對人源化scFv進行為期4週的穩定性研究，其中將scFv配製在水性緩衝液(50mM NaCiP、150mM NaCl、pH6.4)中，濃度為10mg/ml，並儲存在<80°C,4°C和40°C的溫度下28 天。透過加總研究過程中不同時間點的SE-HPLC尖峰面積來評估製劑中單體和寡聚物的分量(fractions)。表13總結了單體含量百分比和相對於第0天的單體損失百分比。在研究過程中的蛋白質濃度變化是以280nm處的UV-Vis測量作監測。然而，由於相對於第0天，在任何樣品中均未觀察到顯著的蛋白質濃度變化，因此未顯示數據。透過nDSF(NanoTemper)分析熱穩定性以確定解折疊(unfolding)的起始點($T_{onset}$)和解折疊的中點($T_m$)。結果如表13所示。

【0194】 PRO2059和PRO2060(殖株55-38-D07的衍生物)表現出良好的穩定性概貌(profile)，在所有測試溫度下僅有些微的單體損失，並且在四種分子的總體熱穩定性最好。PRO2062(殖株55-39-G02的衍生物)在40°C下單體損失程度和熱穩定性方面不如PRO2059和PRO2060。PRO2066(殖株55-42-E05的衍生物)在4°C和40°C下表現出相當大的單體損失，因此可被視為本研究中最不穩定的分子(儘管其熱穩定性尚可接受，Tm為70.6°C)。

【0195】 總之，PRO2060和PRO2062被進一步當作先導結構域(lead domain)。這些結構域被選擇為優於其他結構域是基於藥效學和生物物理特性的綜合特徵。兩種分子都與ROR1 ECD區域1的不同表位結合，允許額外的標的多樣性。這些先導結構域更進一步透過蛋白質工程進行最佳化，以提高T細胞數和穩定性，如下一節所述。

### 1.8 最佳化單鏈結構域的產生

【0196】 PRO2062具有相當高的電腦模擬T細胞數(T cell score)(1,662)，這表明當其引入人體時刺激免疫反應的可能性更高。為了降低T細胞數，其中一個CDR(CDR1H)被修改。在兔子體內，CDR1H的前半部分更加保守，而後半部分則更加多變。與所有其他常見的CDR定義(IMGT、Chothia和Honegger)相反，Kabat CDR定義僅包括CDR1H可變的後半部分。為了盡量減少破壞結合的風險，在保守的CDR1H部分中引入了兩個突變，因為可變的CDR1H部分可能對與抗原的相互作用更重要。透過分析來自同一項目的序列，可以鑑定出來自另一個殖株的CDR1H序列，該序列降低了T細胞數，並且在保守

的CDR1H部分中僅存在兩個胺基酸的差異。此外，該CDR1H序列與PRO2062可變的CDR1H序列相似，表明保守CDR1H部分中的兩個突變(L27I和S28D)可以很好地擬合蛋白質結構。此外，電腦模擬誘變(mutagenesis)表明這兩種突變不會破壞穩定。除了T細胞減少的突變外，還移植了供應者重鏈的所謂外環(outer loop of the heavy chain of the donor)，因為這對於CDR3H的正確定位很重要，並且可以作為對CDR1H修飾的補償。簡而言之，FW3H中的片段(AHo殘基82-87)被KTST(R82K、D83T、N84S、N87T(框架中的S85和K86被刪除))替換，AHo89從Val變為Leu(VH3一致(consensus))，並且AHo90從Tyr更改為Asp(供應者)。帶有在CDR1H的T細胞數降低突變(T cell score reducing mutations)和外環的PRO2271，其T細胞數結果為1,160。另一種變異體(PRO2272、55-39-G02-sc04)與PRO2271具有相同的T細胞數降低突變和外環，但供應者殘基比PRO2271少。PRO2292，即在AHo141VL-51VH之間具有二硫鍵的PRO2062，具有相對高的T細胞數(1,662)。

**表 13：以 10 mg/mL 和-80°C、4°C 和 40°C 的溫度下儲存 28 天的穩定性研究及透過 DSF 量得的 CDR 和完全移植物的熱穩定性。**

| 蛋白質 ID | 描述 | 溫度 [°C] | 濃度 [mg/ml] | 單體含量 [%] | | | | | %單體含量損失 | | | | DSF | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | d0 | d1 | d7 | d14 | d28 | d1 | d7 | d14 | d28 | Tm [°C] | Tonset [°C] |
| PRO2059 | 55-38-D07-sc01 | -80 | 9.47 | 94.3 | 94.3 | 94.3 | 94.3 | 94.2 | 0.0 | 0.0 | -0.1 | 0.0 | 85.6 | 69.7 |
| | | 4 | | 94.3 | 94.5 | 94.9 | 96 | 94.2 | -0.3 | -0.6 | -1.9 | 0.1 | | |
| | | 40 | | 94.3 | 94.5 | 94.1 | 93.7 | 92.9 | -0.3 | 0.2 | 0.6 | 1.4 | | |
| PRO2060 | 55-38-D07-sc02 | -80 | 10.2 | 98.1 | 98.1 | 98.2 | 98.3 | 98.3 | 0.0 | -0.1 | -0.3 | -0.2 | 74.4 | 58.8 |
| | | 4 | | 98.1 | 98.1 | 98.2 | 98.2 | 98.2 | 0.0 | -0.1 | -0.2 | -0.1 | | |
| | | 40 | | 98.1 | 97.9 | 97.5 | 96.8 | 95.2 | 0.2 | 0.6 | 1.3 | 3 | | |
| PRO2062 | 55-39-G02-sc02 | -80 | 9.4 | 99.3 | 99.3 | 99.2 | 99.3 | 99.2 | 0.0 | 0.1 | 0 | 0.1 | 61.7 | 56.0 |
| | | 4 | | 99.3 | 99.3 | 99.2 | 99.2 | 99.1 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | | |
| | | 40 | | 99.3 | 94.3 | 90.5 | 90.7 | 90.3 | 5.0 | 8.8 | 8.7 | 9.1 | | |
| PRO2066 | 55-42-E05-sc02 | -80 | 9.54 | 96.1 | 95.8 | 95.2 | 95.4 | 94.8 | 0.4 | 1.0 | 0.8 | 1.4 | 70.6 | 61.0 |
| | | 4 | | 96.1 | 94.9 | 90.6 | 88.1 | 85.8 | 1.3 | 5.8 | 8.3 | 10.8 | | |
| | | 40 | | 96.1 | 88.4 | 87.9 | 87.9 | 87.4 | 8.1 | 8.6 | 8.6 | 9.1 | | |

NA: 未量測到, ND: 無法決定

【0197】 PRO2060具有949的T細胞數，因此不需要T細胞數最佳化。PRO2291，即在AHo 141VL-51VH之間具有二硫鍵的PRO2060，具有相同的T細胞數 949。最佳化的變異體總結在表14中。

**表 14：PRO2062 和 PRO2060 變異體概覽。**

| PRO ID | 結構域 ID | T 細胞數 | CDR 突變 | VL FW 突變 | VH FW 突變 |
|---|---|---|---|---|---|
| PRO2062 | 55-39-G02-sc02 | 1,662 | - | 見上列表 | 見上列表 |
| PRO2271 | 55-39-G02-sc03 | 1,160 | L27I, S28D | PRO2062 突變 | PRO2062 突變 + R82K, D83T, N84S, N87T, Y90D (框架中的 S85 和 K86 被刪除); V89L (回到 VH3 一致) |
| PRO2292 | 55-39-G02-sc05 | 1,662 | - | PRO2062 突變 + T141C | PRO2062 突變 + G51C |
| PRO2060 | 55-38-D07-sc02 | 949 | - | see table above | see table above |
| PRO2291 | 55-38-D07-sc06 | 949 | - | PRO2060 突變 + T141C | PRO2060 突變 + G51C |

## 1.9 最佳化單鏈結構域的特徵分析

*以流式細胞儀量測最佳化的scFv與表達ROR1MDA-MB-231細胞的細胞結合*

【0198】 如上所述，透過流式細胞儀量測最佳化的scFv(optimized scFv)與表達人類ROR1之MDA-MB-231細胞的細胞膜結合。簡而言之，抗ROR1殖株55-39-G02(PRO2271、PRO2292)和55-38-D07(PRO2291)以及參考Fab片段PRO2213的最佳化scFv作5倍序列稀釋，起始濃度為40nM，然後將其添加到帶有細胞的盤子中。在4°C孵育1小時後，清洗盤子並與特異性檢測抗體一起孵育。使用

NovoCyte 2060流式細胞儀記錄每個樣品的APC通道螢光強度，並計算螢光強度的幾何平均值MFI。

【0199】 在流式細胞術實驗中評估最佳化的scFv PRO2271、PRO2291和PRO2292與細胞膜上人類ROR1的外顯結合親和力。透過這些實驗而計算得出的$EC_{50}$、相對$EC_{50}$以及相對最大結合值顯示在表15中。如第2圖所示，所有scFv都顯現了與ROR1陽性之MDA-MB-231細胞的結合，而沒有觀察到與ROR1陰性之MCF-7細胞的結合。PRO2271是PRO2062的變異體，具有T細胞數最佳化和外環移植，與原本scFvPRO2062相比，外顯結合親和力低約兩倍。PRO2291和PRO2292是PRO2060和PRO2062的變異體，包括VL-VH結構域間之二硫鍵以作穩定之用，其顯示出與親代(parental)scFvPRO2060和PRO2062相當的外顯結合親和力

**表15：以流式細胞儀量測最佳化的抗ROR1 scFvs PRO2271、PRO2291和PRO2292對在MDA-MB-231細胞上表達的人類ROR1的外顯結合親和力。PRO2213用作為參考抗ROR1抗體。**

| 蛋白質 ID | 描述 | $EC_{50}$ [nM] | 相對 $EC_{50}$ ($EC_{50,\ PRO2213}$/ $EC_{50,\ scFv}$) | 相對最大結合值 ($MFI_{scFv}$/$MFI_{PRO2213}$) |
|---|---|---|---|---|
| PRO2271 | 55-39-G02-sc03 | 0.63 | 1.34 | 0.87 |
| PRO2291 | 55-38-D07-sc06 | 2.74 | 0.27 | 1.18 |
| PRO2292 | 55-39-G02-sc05 | 0.27 | 2.61 | 1.18 |

*以SPR量測結合親和力*

【0200】 透過T200機型(Biacore，Cytiva)的SPR分析來確定最佳化的scFv PRO2071、PRO2291和PRO2292與重組人類ROR1蛋白

(Fc-Tag，Acro Biosystems)的結合動力學(包括親和力)，如章節中所述1.6。

【0201】 確定對人類ROR1的親和力，同時量測非最佳化版本以作比較。SPR分析的結果總結在表16中。

**表16：最佳化的scFv對照於非最佳化的(在同一實驗中)對hROR1的親和力測量總結。**

| 蛋白質 # | 蛋白質描述 | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | $K_D$ (M) | 以 $R_{max}$ 理論值歸一化的結合量 (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| PRO2271 | 55-39-G02-sc03 | 1.59E+06 | 5.78E-04 | 3.64E-10 | 52.7 |
| PRO2291 | 55-38-D07-sc06 | 2.69E+05 | 3.02E-04 | 1.12E-09 | 26.9 |
| PRO2292 | 55-39-G02-sc05 | 6.80E+06 | 6.16E-04 | 9.06E-11 | 49.6 |
| PRO2060 | 55-38-D07-sc02 | 3.35E+05 | 9.56E-05 | 2.85E-10 | 17.3 |
| PRO2062 | 55-39-G02-sc02 | 5.29E+06 | 4.90E-04 | 9.26E-11 | 57.8 |

### 1.10 scFv結構域的生物物理特徵分析

【0202】 對人源化scFv的最佳化變異體進行為期4週的穩定性研究，將scFv配製在水性緩衝液(50mM NaCiP，150mM NaCl，pH6.4)中，濃度為10mg/ml，並儲存在≤-80°C、4°C和40°C下，持續4週。透過加總研究過程中不同時間點的SE-HPLC尖峰面積來評估製劑中單體和寡聚物的分量。表17總結了單體含量的百分比和相對於d0的單體損失百分比。在研究過程中的蛋白質濃度變化是以280nm處的UV-Vis測量作監測。由於相對於d0，在任何樣品中均未觀察到顯著的蛋白質濃度變化，因此未顯示數據。透過nDSF(NanoTemper)分析熱穩定性以確定解折疊的起始點($T_{onset}$)和解折疊的中點($T_m$)。結果如表17所示。

【0203】 殖株55-39-G02(PRO2271)的最佳化衍生物表現出與PRO2062相似的穩定性。具有VL-VH間二硫鍵的殖株55-38-D07和55-39-G02的衍生物(PRO2291和PRO2292)，與其不含二硫化物的對

應物(PRO2060和PRO2062)相比，表現出更高的穩定性，並且被認為是總體上最穩定的scFv結構域。

示例 2：抗 CD3 分子的產生和測試：

【0204】 按照專利申請WO2018/224441的描述，進行抗CD3兔子IgG殖株28-21-D09的鑑定、選擇和人源化以及相應的人源化抗CD3 scFv 28-21-D09-sc04(PRO726)的產生和特徵分析，該專利申請作為參考資料被併入本文。以下簡要概述了抗CD3 scFv PRO726的特徵分析。

**2.1 抗 CD3 scFv 28-21-D09-sc04(PRO726)的特徵分析**

*結合親和力和物種交叉反應性 (FS)*

【0205】 以T200設備(Biacore，Cytiva)之SPR分析所選結合域28-21-D09-sc04(PRO726)與重組人類CD3ε胞外域蛋白(hCD3ε ；His-Tag，SinoBiological)的結合動力學(包括親和力)。將重組hCD3ε分子共價固定到羧甲基化葡聚醣表面(CM5 感測器晶片；Biacore，Cytiva)，並注入PRO726滴定序列液作為分析物。在每個分析物注入行程後，感測器晶片上的每個流道都被再生(甘胺酸，pH2.0)，並注入新濃度的PRO726。

**表 17：以 10mg/mL 和-80°C、4°C 和 40°C 的溫度下儲存 28 天的穩定性研究和 DSF 對最佳化的 scFv 結構域的熱穩定性研究。**

| PRO ID | 描述 | 溫度 [°C] | 濃度 [mg/ml] | 單體含量 [%] | | | | | % 單體含量損失 | | | | DSF | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | d0 | d1 | d7 | d14 | d28 | d1 | d7 | d14 | d28 | Tm [°C] | Tonset [°C] |
| | | -80 | | 99.5 | 99.5 | 99.6 | 99.5 | 99.3 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | | |
| PRO2271 | 55-39-G02-sc03 | 4 | 10.0 | 99.5 | 99.5 | 99.3 | 99.2 | 99.0 | 0.0 | 0.2 | 0.3 | 0.6 | ND | ND |
| | | 40 | | 99.5 | 90.5 | 90.6 | 90.5 | 90.7 | 9.1 | 9.0 | 9.1 | 8.9 | | |
| | | -80 | | 99.6 | NA | NA | NA | 99.6 | NA | NA | NA | 0.0 | | |
| PRO2291 | 55-38-D07-sc06 | 4 | 9.3 | 99.6 | 99.6 | NA | 99.6 | 99.6 | 0.0 | NA | 0.0 | 0.0 | 72.0 | 57.7 |
| | | 40 | | 99.6 | 99.6 | NA | NA | 98.5 | 0.0 | NA | NA | 1.1 | | |
| | | -80 | | 96.6 | NA | NA | NA | 96.6 | NA | NA | NA | 0.0 | | |
| PRO2292 | 55-39-G02-sc05 | 4 | 9.5 | 96.6 | 96.5 | 96.6 | 96.7 | 96.6 | 0.1 | -0.1 | -0.1 | 0.0 | ND | 59.7 |
| | | 40 | | 96.6 | 96.6 | 96.5 | 96.5 | 96.3 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.3 | | |

NA: 未量測到, ND: 無法決定

**表 18：所選 scFvPRO726(結構域 28-21D09-sc04)對 hCD3ε 和 cCD3ε 的親和力測量總結。**

| 蛋白質 ID | 配體 | $k_{a1}$ (1/Ms) | $k_{d1}$ (1/s) | $K_{D1}$ (M) | $k_{a2}$ (1/Ms) | $k_{d2}$ (1/s) | $K_{D2}$ (M) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO726 | hCD3ε | 6.5E+05 | 5.5E-03 | 8.3E-09 | 1.4E-03 | 2.4E-03 | 1.8E+00 | 5.3E-09 |
| PRO726 | cCD3ε | 8.2E+05 | 6.2E-03 | 7.5E-09 | 1.5E-03 | 2.6E-03 | 1.8E+00 | 4.8E-09 |

【0206】 使用多循環動力學測定法測量與hCD3ε的結合動力學，共八個分析物濃度，其範圍為0.7至90nM，以流通之緩衝液1:2比例稀釋(HEPES緩衝生理鹽水，0.05%Tween-20，pH7.5；Bioconcept)。外顯解離($k_{d1}$)和結合($k_{a1}$)速率常數、第二反應常數($k_{a2}$和$k_{d2}$)和外顯解離平衡常數($K_D$)是以Biacore分析軟體(Biacore Evaluation software Version 3.2, Cytiva)使用兩態結合模型(two-state binding model)計算得出，其擬合的品質好壞是從相對的Chi2值來監測。結合水平是由所達到的最大穩定性結合對Rmax理論值作歸一化而算得。

【0207】 與重組食蟹獼猴CD3ε(cCD3ε；His-Tag；SinoBiological)的結合動力學如上文所述對hCD3ε的測量進行，不同之處在於使用cCD3ε代替hCD3ε。結果總結在表18中。

*生物物理特徵分析*

【0208】 對人源化CD3結合域進行為期4週的穩定性研究，將scFv 配製在水性緩衝液(50mM NaCiP、150mM NaCl、pH6.4) 中，濃度為10mg/ml，並儲存在<-80°C、4°C和40°C，持續4週。透過加總研究過程中不同時間點的SE-HPLC尖峰面積來評估製劑中單體和寡聚物的分量。表19總結了單體含量的百分比和相對於d0的單體損失百分比。在研究過程中的蛋白質濃度變化是以280nm處的UV-Vis測量作監測。相對於d0，在任何樣品中均未觀察到顯著的蛋白質濃度變化，因此未顯示數據。

【0209】 從差示掃描螢光法(DSF)測量獲得的熱解折疊數據顯示在表19中。得到的熱解折疊中點(Tm)和解折疊的起始溫度(Tonset)已透過將數據擬合到Boltzmann方程來確定。

**表 19：28-21-D09-sc04結構域四星期的穩定性研究。**

| 蛋白質 ID | 描述 | 溫度 [°C] | 濃度 [mg/ml] | [% 單體含量] | | | | | % 單體損失 | | | | Tm [°C] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | d0 | d1 | d7 | d14 | d28 | d1 | d7 | d14 | d28 | |
| PRO726 | 28-21-D09-sc04 | -80.0 | 10.0 | 93.9 | 93.1 | 93.3 | NA | 93.1 | 0.8 | 0.7 | NA | 0.9 | 68.1 |
| | | 4.0 | | 93.9 | 88.0 | 86.8 | 85.8 | 86.0 | 6.3 | 7.6 | 8.7 | 8.4 | |
| | | 40.0 | | 93.9 | 86.4 | 87.1 | 86.7 | 85.8 | 8.1 | 7.3 | 7.7 | 8.7 | |

NA: 未量測到

## 示例 3: 抗 hSA 分子的產生和測試：

【0210】 按照專利申請EP 19 206 959.9的描述，進行人源化抗hSA結合域19-01-H04-sc03(PRO0325)和23-13-A01-sc03(PRO0459)的鑑定、選擇和人源化以及生產和特徵分析，該專利申請作為參考資料被併入本文。以類似於專利申請EP 19 206 959.9中描述的程序，進行人源化抗-hSA結合域19-04-A10-sc02(PRO2155)的鑑定、選擇、人源化以及生產和特徵分析。以下簡要概述了抗CD3 scFv PRO2155的特徵分析。

### 3.1抗hSA scFvs 19-04-A10-sc02(PRO2155)的特徵分析

*結合親和力和物種交叉反應性*

【0211】 在pH7.4和pH5.5下，以T200設備(Biacore，Cytiva)之SPR分析來決定所選結構域19-04-A10-sc02 與人類血清白蛋白(hSA,

Sigma-Aldrich A3782)的結合動力學(包括親和力)。hSA分子共價固定在羧甲基化葡聚醣表面(CM5 感測器晶片 ，Biacore，Cytiva)上，並將每個scFv的滴定序列液作為分析物注入。在每個分析物注入行程完後，感測器晶片上的每個流道都被再生(甘胺酸，pH 2.0)，之後注入新濃度的scFv。使用多循環動力學測定法測量與hSA的結合動力學，以流通之緩衝液(PBS0.05% Tween-20,或PBS0.05% Tween-20, pH 5.5)於濃度0.044到45 nM(1:2)之間稀釋為十一個分析物濃度。外顯解離($k_d$)和結合($k_a$)速率常數，以及外顯解離平衡常數 ($K_D$)是以Biacore分析軟體(Biacore評估軟體版本3.2，Cytiva)使用一對一的Langmuir結合模型計算得到，其擬合的品質好壞是從相對的Chi2值來監測。結合水平是由所達到的最大穩定性結合對Rmax理論值作歸一化而算得。

【0212】 所選scFv對於食蟹獼猴血清白蛋白(cSA, Molecular Innovations CYSA)和小鼠血清白蛋白(mSA, Sigma-Aldrich A3559)的結合動力學也如上述的方式確定，區別在於cSA或mSA被用來代替hSA。在pH5.5和pH7.4下與hSA、mSA和cSA的結合動力學總結在表20中。

**表20：血清白蛋白結合scFv分子PRO2155(結構域19-04-A10-sc02)對hSA、cSA和mSA的親和力測量總結。**

| 蛋白質 #ID | 蛋白質描述 | 測試 pH | 抗原 | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO2155 | 19-04-A10-sc02 | pH5.5 | CSA | 9.1E+05 | 2.1E-03 | 2.3E-09 |
| PRO2155 | 19-04-A10-sc02 | pH5.5 | HSA | 9.0E+05 | 3.0E-03 | 3.3E-09 |
| PRO2155 | 19-04-A10-sc02 | pH5.5 | MSA | 7.8E+04 | 2.0E-04 | 2.5E-09* |
| PRO2155 | 19-04-A10-sc02 | pH7.4 | CSA | 5.8E+05 | 9.1E-04 | 1.6E-09 |
| PRO2155 | 19-04-A10-sc02 | pH7.4 | HSA | 5.5E+05 | 1.2E-03 | 2.2E-09 |
| PRO2155 | 19-04-A10-sc02 | pH7.4 | MSA | 3.2E+04 | 2.9E-04 | 9.0E-09* |

*在 1:1 擬合中以容積修正(bulk correction)訂正雙相(biphasic)結合，造成了最大反應量的降低

*生物物理特徵分析*

【0213】 對 HSA- 結 構 域 19-04-A10-sc02(PRO2155) 和 19-04-A10-sc06(sc02 結 構 域 具 有 VL-VH 二 硫 鍵 ， VL-T141C/VH-G51C，AHo編號；PRO2317)進行為期4週的穩定性研究，將scFv配製在水性緩衝液(50 mM NaCiP，150mM NaCl，pH 6.4)中，濃度為10mg/ml，並儲存在≤-80°C、4°C和40°C下，持續4週。透過加總研究過程中不同時間點的SE-HPLC尖峰面積來評估製劑中單體和寡聚物的分量。表21總結了單體含量的百分比和相對於d0的單體損失百分比。在研究過程中的蛋白質濃度變化是以280nm處的UV-Vis測量作監測。由於相對於d0，任何樣品都沒有觀察到明顯的蛋白質含量損失，因此未顯示數據。透過nDSF(NanoTemper)分析熱穩定性以確定解折疊的起始點(Tonset)和解折疊的中點(Tm)。DSF結果如表21所示。

**表21: 抗hSA結構域19-04-A10-sc02和19-04-A10-sc06的4週穩定性研究。**

| 蛋白質 ID | 描述 | 溫度 [°C] | 濃度 [mg/ml] | 單體含量[%] | | | | | %單體損失 | | | | Tm [°C] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | d0 | d1 | d7 | d14 | d28 | d1 | d7 | d14 | d28 | |
| PRO2155 | 19-04-A10-sc02 | -80 | 10.4 | 99.4 | NA | NA | NA | 99.5 | NA | NA | NA | -0.1 | 75.3 |
| | | 4.0 | | 99.4 | 99.4 | NA | NA | 99.1 | 0.1 | NA | NA | 0.3 | |
| | | 40.0 | | 99.4 | 98.6 | NA | NA | 89.1 | -0.8 | NA | NA | 10.4 | |
| PRO2317 | 19-04-A10-sc06 | 40.0 | 10.5 | 99.2 | 98.8 | 98.7 | 98.6 | 98.4 | 0.4 | 0.6 | 0.7 | 0.9 | 78.4 |

NA: 未量測到

**示例4. scMATCH3抗ROR1xCD3xhSA多特異性抗體的產生和生產**

【0214】 HSA-結合域、CD3-結合域和ROR1-結合域以三特異性scMATCH3形式合併在一起。scMATCH3形式全由不同長度GS連接分子連接的可變結構域所組成，如第3所示。在這種形式中，分裂的可變結構域位於單個肽鏈(sc)上，這些肽鏈組裝成功能齊全的三特異性分子。與scFv結構域類似，可以加入VL/VH二硫鍵以穩定各個結構域。ScMATCH3分子可以在哺乳動物細胞中重組表達，並且可以使用常規的親和層析步驟對其進行純化。

【0215】 使用CHOgro瞬時轉染試劑盒(Mirus)在CHO-S細胞中進行哺乳動物scMATCH3構築體的表達。在37°C表達5-7天後(當達到細胞存活率<70%)透過離心和過濾收集培養物。透過蛋白質L親和層析從澄清的培養上清液中純化出蛋白質，然後在50mM磷酸鹽-檸檬酸鹽緩衝液和300mM蔗糖(pH6.5)中進行尺寸排阻層析(SEC)。以SE-HPLC分析來評估SEC分量(fractions)的單體含量，並將單體含量>95%的分量合併成一起。對於製造材料的品質控制，應用了標準分析方法，例如SE-HPLC、UV280和SDS-PAGE。scMATCH3分子的分子結構域組成和製造摘要顯示在表22中。

【0216】 scMATCH3分子PRO2667和RPO2668，其包含修飾或改良的ROR1-結合域、CD3-結合域和hSA-結合域，由Evitria AG(Schlieren，Switzerland)使用其專有的哺乳動物表達系統以1l規模生產。透過蛋白質L(CaptoL, Cytiva)親和層析從澄清的培養上清液中

把蛋白質純化出，然後在50mM磷酸鹽-檸檬酸鹽緩衝液和300 mM蔗糖(pH 6.5)中進行SEC。以SE-HPLC分析來評估SEC分量(fractions)的單體含量，並將單體含量>95%的分量合併成一起。對於製造材料的品質控制，應用了標準分析方法，例如SE-HPLC、UV280和SDS-PAGE。這些scMATCH3分子的製造摘要顯示在表23中。分子的熱穩定性是使用Prometheus NT.48 設備(NanoTemper)的nDSF進行評估。

**示例5：scMATCH3分子的藥效學特徵分析**

**5.1以SPR量測結合親和力**

【0217】 以SPR測試九種多特異性scMATCH3分子與人類ROR1(hROR1)、人類CD3ε(hCD3ε)和hSA三個標靶的結合動力學。

*以SPR量測與hROR1的結合親和力*

【0218】 如第1.6節所述，以T200設備(Biacore，Cytiva)的SPR分析確定九個scMATCH3分子與重組人類ROR1蛋白(Fc-Tag，AcroBiosystems)的結合動力學(包括親和力)。將重組人類ROR1分子共價固定在羧甲基化的葡聚醣表面(CM5感測器晶片；Biacore，Cytiva)上，並將每個MATCH3分子的滴定序列液作為分析物注射。在每個分析物的注入行程之後，感測器晶片上的每個流道都被再生(甘胺酸，pH2.0和3M $MgCl_2$)，並注入新濃度的MATCH3分子。使用多循環動力學測定法測量與人類ROR1的結合動力學，九個分析物濃度範圍為

0.088至45nM，在流通之緩衝液中1:2稀釋(HEPES緩衝生理鹽水，0.05%Tween-20，pH7.5；Bioconcept)。外顯解離(kd)和結合(ka)速率常數和外顯解離平衡常數($K_D$)是以Biacore分析軟體(Biacore評估軟體版本 3.2，Cytiva)使用一對一的Langmuir結合模型作計算，其擬合的品質好壞是從Chi2和U值來監測，它們是曲線擬合品質好壞的衡量標準。結合水平是由所達到的最大穩定性結合對Rmax理論值作歸一化而算得。

【0219】 測定九個scMATCH3與hROR1的結合動力學，親和力範圍為1.6nM至0.12nM(表24)。所有測試的scMATCH3分子與hROR1的親和力和各自的親代scFv相似。

**表24：scMATCH3分子與hROR1的親和力測量總結。**

| 蛋白質 ID | 蛋白質描述 | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M) |
|---|---|---|---|---|
| PRO2287 | 19-01-H04-sc02/3 diS scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv | 1.3E+06 | 4.0E-04 | 3.2E-10 |
| PRO2507 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-38-D07-sc02-scFv | 8.2E+04 | < 1.00E-05 | 1.2E-10 |
| PRO2508 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-38-D07-sc06-scFv | 7.6E+04 | < 1.00E-05 | 1.3E-10 |
| PRO2509 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02-scFv | 1.3E+06 | 4.7E-04 | 3.6E-10 |
| PRO2510 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc05-scFv | 1.3E+06 | 6.0E-04 | 4.6E-10 |
| PRO2286 | 23-13-A01-sc02 diS scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02-scFv | 1.4E+06 | 4.5E-04 | 3.3E-10 |
| PRO2557 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc06-scFv | 4.2E+05 | 6.7E-04 | 1.6E-09 |
| PRO2667 | 19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/28-21-D09-sc04 (RTQ) scDb-i/55-38-D07-sc02(RTQ)-scFv | 9.5E+04 | 9.2E-05 | 9.7E-10 |
| PRO2668 | 19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/28-21-D09-sc04 (RTQ) scDb-i/55-39-G02-sc05(RTQ)-scFv | 2.0E+06± 7.6E+04 | 5.6E-04± 6.7E-05 | 2.8E-10± 2.2E-11 |

*以SPR量測與hCD3ε的結合親和力*

【0220】 以T200設備(Biacore，Cytiva)的SPR分析確定九個scMATCH3分子與重組人類CD3ε胞外域蛋白(hCD3ε ；His-Tag, SinoBiological)的結合動力學(包括親和力)。將重組hCD3ε分子共價固定在羧甲基化的葡聚醣表面(CM5感測器晶片；Biacore，Cytiva)上，並將每個MATCH3分子的滴定序列液作為分析物注射。在每個分析物的注入行程之後，感測器晶片上的每個流道都被再生(甘胺酸，pH 2.0和3M $MgCl_2$)，並注入新濃度的MATCH3分子。使用多循環動力學測定法測量與hCD3ε的結合動力學，九個分析物濃度範圍為 0.088至45nM，在流通之緩衝液中1:2 稀釋(HEPES緩衝生理鹽水，0.05% Tween-20，pH 7.5；Bioconcept)。外顯解離($k_{d1}$)和結合($k_{a1}$) 速率常數、第二反應常數($k_{a2}$ 和 $k_{d2}$)和外顯解離平衡常數($K_D$)是以Biacore分析軟體(Biacore Evaluation software Version 3.2, Cytiva)使用兩態結合模型(two-state binding model)計算得出，其擬合的品質好壞是從相對的Chi2值來監測。結合水平是由所達到的最大穩定性結合對Rmax理論值作歸一化而算得。

【0221】 測定9個MATCH3與hCD3ε的結合動力學，親和力範圍為9.4nM至1.5nM(表25)。所有測試的MATCH3分子與hCD3ε的親和力與親代scFv 28-21-D09-sc04相似。

**表25：所選的scMATCH3分子與hROR1的親和力測量總結。**

| 蛋白質 #ID | 蛋白質描述 | $k_{a1}$ (1/Ms) | $k_{d1}$ (1/s) | $k_{a2}$ (1/s) | $k_{d2}$ (1/s) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO2287 | 19-01-H04-sc02/3 diS scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv | 8.7E+05 | 3.4E-03 | 1.7E-03 | 2.0E-03 | 2.1E-09 |
| PRO2507 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-38-D07-sc02 scFv | 3.4E+05 | 6.0E-03 | 6.9E-03 | 7.8E-03 | 9.4E-09 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO2508 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-38-D07-sc06 scFv | 3.8E+05 | 6.2E-03 | 6.8E-03 | 7.4E-03 | 8.5E-09 |
| PRO2509 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv | 1.0E+06 | 3.4E-03 | 9.6E-04 | 1.6E-03 | 2.1E-09 |
| PRO2510 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc05 scFv | 1.0E+06 | 3.6E-03 | 1.3E-03 | 2.0E-03 | 2.1E-09 |
| PRO2286 | 23-13-A01-sc02 diS scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv | 1.1E+06 | 2.7E-03 | 6.9E-04 | 1.1E-03 | 1.5E-09 |
| PRO2557 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc06 scFv | 4.3E+05 | 3.1E-03 | 4.2E-04 | 1.4E-03 | 5.5E-09 |
| PRO2667 | 19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/ 28-21-D09-sc04 (RTQ) scDb-i/ 55-38-D07-sc02(RTQ)-scFv | 5.4E+05 | 4.1E-03 | 4.5E-03 | 6.1E-03 | 4.4E-09 |
| PRO2668 | 19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/ 28-21-D09-sc04 (RTQ) scDb-i/ 55-39-G02-sc05(RTQ)-scFv | 2.5E+06± 1.4E+06 | 4.7E-03± 8.5E-04 | 4.9E-03± 1.6E-03 | 2.3E-03± 7.2E-04 | 1.8E-09± 9.2E-10 |

*以SPR量測與hSA的結合親和力*

【0222】 以T200設備(Biacore，Cytiva)的SPR分析確定七個選定的scMATCH3分子與人類血清白蛋白(hSA, Sigma-Aldrich)的結合動力學(包括親和力)。將hSA分子共價固定在羧甲基化的葡聚醣表面(CM5感測器晶片；Biacore，Cytiva)上，並將每個MATCH3分子的滴定序列液作為分析物注射(Exp.ND032-0033)。在每個分析物的注入行程之後，感測器晶片上的每個流道都被再生(甘胺酸，pH2.0)，並注入新濃度的MATCH3分子。使用多循環動力學測定法測量與hSA的結合動力學，十個分析物濃度範圍為0.352至180nM，在流通之緩衝液中1:2稀釋(PBS，0.05% Tween-20，pH 5.5)。外顯解離(kd)和結合(ka)速率常數和外顯解離平衡常數($K_D$)是以Biacore分析軟體(Biacore評估軟體版本3.2，Cytiva)使用一對一的Langmuir結合模型作計算，其擬合的品質好壞是從相對Chi2和U值來監測，它們是曲線擬合品質好壞的衡

量標準。結合水平是由所達到的最大穩定性結合對Rmax理論值作歸一化而算得。

【0223】 測定七個MATCH3分子與hSA的結合動力學，親和力範圍為9.4nM至1.5nM(表26)。所有測試的MATCH3分子在pH5.5下對hSA親和力被認為足以延長MATCH3分子的全身半衰期。

**表26：所選的scMATCH3分子與hSA的親和力測量總結。**

| 蛋白質 #ID | 蛋白質描述 | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|
| PRO2287 | 19-01-H04-sc02/3 diS scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv | 1.7E+06 | 3.0E-04 | 1.7E-10 |
| PRO2507 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-38-D07-sc02 scFv | 4.0E+05 | 1.7E-03 | 4.3E-09 |
| PRO2508 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-38-D07-sc06 scFv | 4.2E+05 | 1.8E-03 | 4.3E-09 |
| PRO2509 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv | 9.4E+05 | 2.0E-03 | 2.1E-09 |
| PRO2510 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc05 scFv | 1.0E+06 | 2.1E-03 | 2.0E-09 |
| PRO2286 | 23-13-A01-sc02 diS scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc02 scFv | 1.1E+06 | 6.7E-05 | 6.2E-11 |
| PRO2557 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/55-39-G02-sc06 scFv | 4.5E+05 | 2.0E-03 | 4.4E-09 |
| PRO2558 | 19-04-A10-sc06 scDb-o/28-21-D09-sc04 scDb-i/56-22-A05-sc02 scFv | 4.6E+05 | 2.0E-03 | 4.4E-09 |
| PRO2667 | 19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/28-21-D09-sc04 (RTQ) scDb-i/55-38-D07-sc02(RTQ)-scFv | 3.8E+05 | 1.2E-03 | 3.2E-09 |
| PRO2668 | 19-04-A10-sc06(RTQ) scDb-o/28-21-D09-sc04 (RTQ) scDb-i/55-39-G02-sc05(RTQ)-scFv | 1.1E+06± 3.9E+05 | 1.5E-03± 2.0E-04 | 1.4E-09± 3.6E-10 |

## 5.2 以流式細胞儀量測 scMATCH3 分子與人類 ROR1 的細胞結合

【0224】 如第1.6節所述，透過流式細胞儀進行抗ROR1scMATCH3分子與表達ROR1的MDA-MB-231細胞的細胞結合。簡言之，將scMATCH3分子從40nM(PRO2286、PRO2287)開始或120nM開始(PRO2507、PRO2508、PRO2509、PRO2510、PRO2557)

以5倍序列濃度稀釋，並且參考Fab片段PRO2213也以40nM或120nM開始同樣製備，然後將這些稀釋液加到帶有細胞的盤中。在存在1mg/ml人類血清白蛋白(hSA)的情況下，在4°C下孵育1小時後，清洗盤子並與特異性檢測抗體一起孵育。使用NovoCyte 2060流式細胞儀記錄每個樣品的APC通道螢光強度，並計算螢光強度MFI的幾何平均值。

【0225】 透過流式細胞術評估抗ROR1xhSAxCD3 scMATCH3分子與細胞膜上人類ROR1的結合。透過這些實驗中計算出的$EC_{50}$、相對$EC_{50}$以及相對最大結合值顯示在表27中。如第4圖所示，scMATCH3分子PRO2286和PRO2287，這兩種分子都具有相同的抗ROR1-BD55-39-G02-sc02但不同的抗hSA-BD，顯現出與ROR1陽性MDA-MB-231細胞的結合，而未發現與ROR1陰性MCF-7細胞結合。與親代scFv PRO2062(抗ROR1結構域 55-39-G02-sc02)的相對$EC_{50}$值相比，兩種scMATCH3分子均顯示出低約五倍的$EC_{50}$結合值(PRO2286的相對$EC_{50}$=0.63，PRO2287的相對$EC_{50}$=0.47；PRO2062的平均相對$EC_{50}$=2.77)。據推測，scMATCH3分子的$EC_{50}$結合減少是由於hSA與scMATCH3分子結合引起的立體阻礙(steric hindrance)。類似地，其他含有抗ROR1結構域55-39-G02-sc02 (PRO2509)或其最佳化變異體的scMATCH3分子(PRO2510: 55-39-G02-sc05, PRO2557: 55-39-G02-sc06)顯示的$EC_{50}$結合，與它們各自的scFv相比，減少了5到10倍。詳細地說，PRO2509、PRO2510和PRO2557的相對$EC_{50}$值分別為0.53(對應的scFv，PRO2062為2.77)、0.3(PRO2292為2.61)和0.21。

【0226】 以相同的流式細胞儀實驗設置測量PRO2510的最佳化變異體PRO2668。在該實驗中，如相似的結合效力和相對最大結合值所指出，PRO2668與MDA-MB-231細胞的結合和PRO2510相近。這些抗ROR1xhSAxCD3 scMATCH3分子的劑量反應曲線見第4圖和第5圖。關於以抗ROR1結構域55-38-D07-sc02(PRO2507)和55-38-D07-sc06(PRO2508)建構的scMATCH3分子，與它們各自的scFv相比，發現它們的$EC_{50}$結合也降低了。詳細地說，PRO2507和PRO2508的相對$EC_{50}$值分別為0.03(對應的scFv，PRO2060為0.33)和0.04(PRO2291為0.27)。這些抗ROR1xhSAxCD3 scMATCH3分子的濃度-反應曲線見第5圖。

【0227】 總之，所有scMATCH3分子都表現出與人類ROR1表達細胞的特異性結合，並且帶有抗ROR1殖株55-39-G02的分子表現出比帶有抗ROR1殖株55-38-D07更高的$EC_{50}$結合。可能是由於hSA與scMATCH3分子結合造成的立體阻礙，與相應的scFv相比，scMATCH3分子的結合率降低了5到10倍。細胞結合數據的結果總結在表27中。其顯示了計算出的$EC_{50}$，相對$EC_{50}$以及相對最大結合值。Fab片段PRO2213用作為抗ROR1參考抗體。

**表27：以流式細胞儀量測抗ROR1xhSAxCD3 scMATCH3分子PRO2286、PRO2287、PRO2507、PRO2508、PRO2509、PRO2510、PRO2557和PRO2668與MDA-MB-231細胞上表達的人類ROR1的結合。**

| 蛋白質 ID | 形式 | 結構域 1, scDb-o 位置 (hSA) | 結構域 2, scDb-i 位置 (CD3) | 結構域 3, scFv 位置(ROR1) | $EC_{50}$ [nM] | 相對 $EC_{50}$ ($EC_{50,\ PRO2213}$/ $EC_{50,\ scMATCH3}$) | 相對最大結合值 ($MFI_{scMATCH3}$/$MFI_{PRO2213}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO2286 | scMATCH3 | 23-13-A01-sc02 diS | 28-21-D09-sc04 | 55-39-G02-sc02 | 1.33 | 0.63 | 1.87 |
| PRO2287 | scMATCH3 | 19-01-H04-sc02 diS | 28-21-D09-sc04 | 55-39-G02-sc02 | 1.83 | 0.46 | 1.98 |
| PRO2507 | scMATCH3 | 19-04-A10-sc06 | 28-21-D09-sc04 | 55-38-D07-sc02 | 26.86 | 0.03 | 2.88 |
| PRO2508 | scMATCH3 | 19-04-A10-sc06 | 28-21-D09-sc04 | 55-38-D07-sc06 | 18.74 | 0.04 | 3.00 |
| PRO2509 | scMATCH3 | 19-04-A10-sc06 | 28-21-D09-sc04 | 55-39-G02-sc02 | 1.12 | 0.53 | 2.57 |
| PRO2510 | scMATCH3 | 19-04-A10-sc06 | 28-21-D09-sc04 | 55-39-G02-sc05 | 1.36 | 0.30 | 2.61 |
| PRO2557 | scMATCH3 | 19-04-A10-sc06 | 28-21-D09-sc04 | 55-39-G02-sc06 | 3.27 | 0.21 | 2.43 |
| PRO2668 | scMATCH3 | 19-04-A10-sc06 | 28-21-D09-sc04 | 55-39-G02-sc05 | 0.74 | 0.52 | 2.89 |

## 示例6:效力評估：由scMATCH3分子介導的標靶細胞細胞毒性和T細胞活化

【0228】 為了了解這些scMATCH3分子促進腫瘤細胞殺滅和CD8 T細胞活化的能力，我們進行了一系列細胞毒性測定以比較我們的先導物(lead)候選者之間的效力和T細胞活化概貌(T cell activation profiles)。

【0229】 首先，測試了幾種細胞株上ROR1的表達水平，以及表面上相對受體水平的量化(第6圖)。將細胞依次序與Zombie NIR活/死APC-Cy7(Biolegend, 1:500)在4°C下孵育20分鐘，之後進行洗滌步驟，然後在4°C下使用抗ROR1 PE(Biolegend, 1:25)20分鐘，之後在Novocyte流式細胞儀(ACEA)上清洗和讀取。第6A圖顯示MDA-MB-231和MCF7細胞表面的ROR1表達。按照製造商的說明，使用Quantum Simply Cellular抗小鼠IgG試劑盒(Bangs Laboratories)對受體水平進行量化。在Attune NxT流式細胞儀(ThermoFisher)上採集珠子和細胞，並使用FlowJo軟體(BD)分析數據。與MCF7細胞相比，MDA-MB-231細胞上ROR1的相對表面水平更高。MCF7細胞上ROR1的表面水平被認為非常低，與人類中健康成人的組織相當。因此，MCF7細胞被用作陰性對照組(第6B圖)。

【0230】 這些測定是用從膚色血球層(buffy coat)分離的周邊血液單核細胞(PBMC)來進行，其分離使用帶有Lymphoprep(StemCell Technologies)的SepMate管，按照製造商的說明建立密度梯度。

【0231】 將分離的PBMCs與感興趣之ROR1陽性和陰性腫瘤細胞以10:1的效應物與標靶物的比例共培養40小時。共培養後，吸出

100µl上清液，使用Roche的細胞毒性檢測試劑盒測試濒死細胞中乳酸脫氫酶(LDH)的釋放。剩餘的上清液冷凍在-80°C，以用於下游多重細胞激素(multiplexed cytokine)之分析。細胞用以下試劑或抗體(均來自Biolegend)作標記，以用於特定T細胞活化的流式細胞術分析：可固定活/死Aqua、抗人類CD4 APC-Cy7(殖株OKT4)、抗人類CD11c PE-Cy7(殖株Bu15)、抗人類CD8PerCP-Cy5.5(殖株SK1)和抗人類CD69 PE(殖株FN50)。在流式細胞儀(Attune，ThermoFisher Scientific)上採集細胞，並使用FlowJo軟體(BD)分析CD69的向上調控(upregulation)，作為CD4和CD8 T細胞活化的衡量標準。

【0232】 所有測試的scMATCH3分子導致ROR1陽性細胞如MDA-MB-231的特異性殺滅，並且在ROR1陰性細胞株MCF7上觀察到最小或沒有活性(第7A圖)。與源自PRO2062的分子PRO2509和PRO2510相比，源自PRO2060的scMATCH3分子PRO2507和PRO2508表現出稍差的效力，這與觀察到的對PRO2062更高的親和力一致。CD8和CD4 T細胞活化與細胞毒性數據密切相關(第7B和7C圖)。

【0233】 scMATCH3分子PRO2557，其結構域源自PRO2062並且經過T細胞數最佳化以降低免疫原性，也介導著ROR1陽性細胞的特異性殺滅(第8A圖)。與其他scMATCH3分子非常相似，CD8和CD4 T細胞活化與觀察到的細胞毒性相關(分別為第8B和8C圖)。表28總結了跨實驗得到的scMATCH3分子對MDA-MB-231細胞特異性殺滅的平均$EC_{50}$值。

**表 28：以 PBMC 進行之scMATCH3研究的關鍵細胞毒性數據總結。**

| PRO ID | 形式 | ROR1 結構域 | #實驗 (n) | $EC_{50}$ (nM) 細胞毒性 (MDA-MB-231) |
|---|---|---|---|---|
| PRO2507 | scMATCH3 | PRO2060 | 4 | 1.0 |
| PRO2508 | scMATCH3 | PRO2060 + diS | 2 | 1.7 |
| PRO2509 | scMATCH3 | PRO2062 | 4 | 0.31 |
| PRO2510 | scMATCH3 | PRO2062 + diS | 4 | 0.43 |
| PRO2557 | scMATCH3 | PRO2271 (PRO2062 with T cell score modification) | 2 | 3.1 |

## 示例 7: scMATCH3 分子生物物理特徵分析

【0234】 對 ScMATCH3分子進行為期4週的穩定性研究，其中將分子配製在水性緩衝液(50mM NaCiP、300mM NaCl、pH6.5)中，濃度為1mg/ml，並儲存在<80°C,4°C和40°C持續四個星期。透過加總研究過程中不同時間點的SE-HPLC尖峰面積來評估製劑中單體和寡聚物的分量。表29總結了單體含量的百分比和相對於d0的單體損失百分比。在研究過程中的蛋白質濃度變化是以280nm處的UV-Vis測量作監測，並顯示在表30中。透過nDSF(NanoTemper)分析熱穩定性以確定解折疊(unfolding)的起始點(Tonset)和解折疊的中點(Tm)。Nano DSF解折疊的中點結果顯示在表29的最後一欄中。

**表 29：濃度為1mg/ml的ScMATCH3穩定性評估，單體含量隨時間的變化。**

| 蛋白質 ID | 溫度 [°C] | 濃度 [mg/ml] | 單體含量[%] | | | | % 單體含量損失 | | | Tm [°C] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | d0 | d7 | d14 | d28 | d7 | d14 | d28 | |
| PRO2507 | -80 | 1.05 | 98.5 | NA | NA | 98.8* | NA | NA | -0.4* | 63.7 |
| | 4.0 | | 98.5 | 98.6 | 98.8 | 98.8 | -0.1 | -0.4 | -0.4 | |
| | 40.0 | | 98.5 | 98.0 | 97.7 | 96 | 0.5 | 0.8 | 2.5 | |
| PRO2508 | -80 | 1.02 | 98.4 | NA | NA | 98.8* | NA | NA | -0.4* | 65.1 |
| | 4.0 | | 98.4 | 98.6 | 98.7 | 98.7 | -0.2 | -0.3 | -0.3 | |
| | 40.0 | | 98.4 | 98.0 | 97.7 | 96.2 | 0.5 | 0.7 | 2.3 | |
| PRO2509 | -80 | 1.03 | 98.4 | NA | NA | 98.7* | NA | NA | -0.3* | 61.4 |
| | 4.0 | | 98.4 | 98.5 | 98.7 | 98.5 | 0.0 | -0.3 | -0.1 | |
| | 40.0 | | 98.4 | 97.5 | 97.2 | 95.1 | 0.9 | 1.2 | 3.4 | |
| PRO2510 | -80 | 1.04 | 98.2 | NA | NA | 98.5* | NA | NA | -0.3* | 63.8 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4.0 | 98.2 | 98.4 | 98.6 | 98.5 | -0.2 | -0.4 | -0.2 |
| 40.0 | 98.2 | 97.8 | 97.7 | 96.1 | 0.5 | 0.5 | 2.2 |

*樣品在測試前經歷了5次重複的冷凍/解凍循環
NA：未測到

表30：濃度為1mg/ml的ScMATCH3穩定性評估，蛋白質含量隨時間的變化。

| 蛋白質ID | 溫度 [°C] | 濃度 [mg/mL] | 蛋白質濃度 [mg/ml] | | | | % 含量損失 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | d0 | d7 | d14 | d28 | d7 | d14 | d28 |
| PRO2507 | -80 | 1.1 | 1.05 | NA | NA | 1.02* | NA | NA | 3.2* |
| | 4.0 | | 1.05 | 1.12 | 1.07 | 1.01 | -6.4 | -1.7 | 3.8 |
| | 40.0 | | 1.05 | 1.11 | 1.07 | 1.02 | -5.3 | -1.7 | 3.6 |
| PRO2508 | -80 | 1.0 | 1.02 | NA | NA | 0.96* | NA | NA | 6.1* |
| | 4.0 | | 1.02 | 1.10 | 0.98 | 0.94 | -7.5 | 3.9 | 8.0 |
| | 40.0 | | 1.02 | 1.06 | 1.02 | 0.97 | -4.0 | 0.3 | 4.8 |
| PRO2509 | -80 | 1.0 | 1.03 | NA | NA | 0.94* | NA | NA | 8.5* |
| | 4.0 | | 1.03 | 1.05 | 0.98 | 0.92 | -2.3 | 4.5 | 10.3 |
| | 40.0 | | 1.03 | 1.03 | 1.00 | 1.09 | -0.6 | 3.0 | -6.5 |
| PRO2510 | -80 | 1.0 | 1.04 | NA | NA | 1.05* | NA | NA | -0.6* |
| | 4.0 | | 1.04 | 1.00 | 0.97 | 1.03 | 3.4 | 6.5 | 0.5 |
| | 40.0 | | 1.04 | 0.99 | 0.93 | 1.03 | 5.0 | 10.2 | 1.0 |

*樣品在測試前經歷了5次重複的冷凍/解凍循環
NA：未測到

[0235] 在濃度為1mg/ml時，含有55.38.D07衍生之抗ROR1結構域(PRO2507和PRO2508)的分子和含有55.39.G02衍生之抗ROR1結構域(PRO2509和PRO2510)的分子在28天的過程中表現出非常相似的單體穩定性。在-80°C和4°C的溫度下以及在SE-HPLC/UV測量之前對第28天/-80°C的樣品進行反覆凍融(5×)後，單體含量沒有顯著變化。

[0236] 第0天(d0)和第28天(d28)樣品的SDS-PAGE分析顯示，除了對應於一典分子之計算分子量的主帶之外，在本研究的d0所有(減少的)樣本中都存在著低分子量(LMW)物質。它們發生的原因尚不完全清楚，但可能跟用於分子製造時，適用的、未最佳化的表達和純化條件或不利的SDS-PAGE樣品製備條件有關。當比較d28樣品和

d0樣品時，隨著時間變化，在4°C和40°C樣品中通常不會檢測到LWM物質顯著的增加。在加速條件(40°C)下孵育28天的所有樣品中，LMW種類的部分(fraction)明顯增加，表明scMATCH3分子之片段化對時間和溫度的依賴性。由於所有分子都表現出類似的有利穩定性之概貌(profile)，因此並不預想基於加速條件的穩定性數據而取消選擇分子。

【0237】 PRO2509和PRO2510的熱穩定性方面似乎略好於PRO2507和PRO2508，正如nDSF所評估，含有55-39-G02衍生的ROR1結構域的分子，它們解折疊(unfolding)的起始點($T_{onset}$)相當高。

**示例8：MATCH4抗ROR1xCD3xhSA多特異性抗體的產生和生產**

【0238】 來自scMATCH3分子的ROR1結合域被併入MATCH4分子形式，以透過使用兩個ROR1結合域進一步增強效力。這將形成類似於傳統全長抗體的二價標靶，但具有T細胞靶向(CD3結構域)和半衰期延長(hSA結構域)的額外好處。

【0239】 MATCH4是由Numab開發的一種形式，其僅由以不同長度的GS-連接分子(linkers)連接的可變結構域組成，其僅允許匹配結構域的特定配對。MATCH4形式可以從哺乳動物細胞中重組表達。至於純化，可以使用常規的親和層析步驟。ND032 MATCH4分子的結構如第9圖所示。這種形式要求二聚體次單元(dimer subunits)由兩個分裂的可變結構域對的核心(split variable domain pairs)組成，每個各別的次單元擁有兩個串聯的VL結構域或兩個VH結構域，從而驅動異二聚化兩條蛋白質鏈。在各別MATCH4鏈上以形成二聚體的串聯可變結構域以與其對應鏈反平行的N端-C端方向組織起來。兩條鏈在哺乳動

物細胞中共同表達成功能齊全的四特異性分子。可變域之間的傳統Gly-Ser連接分子用於連接它們。此外，如第9圖所示，反平行MATCH4形式適用於在核心域之一中引入二硫鍵。可以包含額外的VL/VH二硫鍵以穩定各個結構域。

【0240】 哺乳動物MATCH4構築體的表達已在Evitria AG (Schlieren, Switzerland)使用其專有的哺乳動物表達系統以1l規模進行。透過蛋白質L親和層析從澄清的培養上清液中把蛋白質純化出，然後在50mM磷酸鹽-檸檬酸鹽緩衝液中進行SEC，其中含有300mM 蔗糖，pH6.5。以SE-HPLC分析來評估SEC分量的單體含量，並將單體含量>95%的分量合併成一起。對於製造材料的質量控制，應用了標準分析方法，例如SE-HPLC、UV280和SDS-PAGE。MATCH4分子的分子組成和製造摘要顯示在表31中。包含修飾或改良之ROR1-、CD3-和hSA結合域的MATCH4分子PRO2669和RPO2670的製造摘要顯示在表32中。

**表 31：以SE-HPLC測定的MATCH4分子結構、最終效價和單體純度。**

| PRO ID | 結構域 1 (ROR1) | 結構域 2 (SA) | 結構域 3 (CD3) | 結構域 4 (ROR1) | 效價 [mg/l culture] | 最終效價 [mg/l culture] | 單體含量 [%] (SEC1/SEC2) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO2589 | 55-38-D07-sc02 | 19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06) | 28-21-D09-sc04 | 55-38-D07-sc02 | 129.3 | 28.8 | 95.2/96.4* |
| PRO2590 | 55-38-D07-sc06 | 19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06) | 28-21-D09-sc04 | 55-38-D07-sc06 | 53.4 | 23.0 | 98.3/96.6* |
| PRO2591 | 55-39-G02-sc03 | 19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06) | 28-21-D09-sc04 | 55-39-G02-sc03 | 107.4 | 54.8 | 89.0/96.4* |
| PRO2592 | 55-39-G02-sc06 | 19-04-A10-sc02 diS (19-04-A10-sc06) | 28-21-D09-sc04 | 55-39-G02-sc06 | 125.8 | 41.7 | 95.1/NA |

*尚未合併的材料已經進行了兩次尺寸排阻液相層析(SEC)拋光運行，具有較高單體含量的材料用於進一步之分子特徵分析

**表32：MATCH4分子PRO2669和RPO2670的製造。**

| 蛋白質 ID | 形式 | 抓取效價 [mg/l] | 效價 [mg/l] | SE-HPLC 純度 [% 單體] | nDSF $T_{M1}$ [°C] | nDSF $T_{M2}$ [°C] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO2669 | MATCH4 | 99.1 | 15.4 | 98.5 | 63.1 | 71.2 |
| PRO2670 | MATCH4 | 50.2 | 21.0 | 98.7 | 61.5 | 76.2 |

## 示例9：MATCH4分子的藥效學特徵分析

### 9.1 以SPR量測結合親和力

【0241】 以SPR測試四種多特異性MATCH4分子與三種標靶hROR1、hCD3ε和hSA的結合動力學。

*以SPR量測 hROR1的結合親和力*

【0242】 以T200設備(Biacore，Cytiva)的SPR分析，透過兩種不同的測定設計以確定四個sMATCH4分子與重組人類ROR1蛋白的具結合力和不具結合力(with avidity and without avidity)之結合動力學(binding kinetics)(包括親和力affinity)。

【0243】 使用固定在羧甲基化葡聚醣表面(CM5感測器晶片；Biacore，Cytiva)的專有抗框架(anti-framework)兔子IgG(rIgG21-57-20-B11)抓取MATCH4分子到表面，以確定沒有結合力(without avidity)的結合親和力。以人類ROR1(Peprotech 160-054)分子的滴定序列作為分析物注入。在每個抓取物-分析物的注入行程後，感測器晶片上的每個流道都被再生(3M $MgCl_2$)，並再次抓取MATCH4分子，然後再通入不同濃度的人類ROR1。使用多循環動力學測定法測量與人類ROR1的結合動力學，十個分析物濃度範圍為0.088至90

nM，在流通之緩衝液中1:2稀釋(HEPES緩衝生理鹽水，0.05% Tween-20，pH 7.5；Bioconcept)。

【0244】 以類似於第1.6節中描述的步驟測定具結合力的結合(binding with avidity)。將重組人類ROR1分子(Fc-Tag，Acro Biosystems RO1-H5250)共價固定在羧甲基化葡聚醣表面(CM5感測器晶片；Biacore，Cytiva)上，以每個MATCH4分子的滴定序列作為分析物注入。在每個分析物注入行程後，感測器晶片上的每個流道都被再生(甘胺酸，pH 2.0和3M $MgCl_2$)，並注入新濃度的MATCH4分子。使用多循環動力學測定法測量與人類ROR1的結合動力學，九個分析物濃度範圍為0.088至45nM，在流通之緩衝液中1:2 稀釋(HEPES緩衝生理鹽水，0.05% Tween-20，pH 7.5；Bioconcept)。

【0245】 對於兩種測定，外顯解離(kd)和結合(ka)速率常數和外顯解離平衡常數($K_D$)是以Biacore分析軟體(Biacore評估軟體版本3.2，Cytiva)使用一對一的Langmuir結合模型，其擬合的品質好壞是從Chi2和U值來監測，它們是曲線擬合品質好壞的衡量標準。結合水平是由所達到的最大穩定性結合對理論$R_{max}$作歸一化而算得。

【0246】 測定四個MATCH4與hROR1的結合動力學，其親和力範圍為5nM至1.2nM。在四個MATCH4分子上測定了具結合力的hROR1親和力(hROR1 affinities with avidity)，範圍為136 pM至22 pM。SPR結果總結在表33中。

*以SPR量測與hCD3ε的結合親和力*

【0247】 以T200設備(Biacore，Cytiva)的SPR分析來確定四種MATCH4分子與重組人類CD3ε胞外域蛋白(hCD3ε；His-Tag，SinoBiological)的結合動力學(包括親和力)。將重組hCD3ε分子共價固定在羧甲基化葡聚醣表面(CM5感測器晶片；Biacore，Cytiva)上，並將每個MATCH4分子的滴定序列作為分析物注入。在每個分析物注入行程後，感測器晶片上的每個流道都被再生(甘胺酸，pH2.0和3M $MgCl_2$)，並注入新濃度的MATCH4 分子。使用多循環動力學測定法測量與hCD3ε的結合動力學，九個分析物濃度範圍為0.088至45nM，在流通之緩衝液中1:2稀釋(HEPES緩衝生理鹽水，0.05% Tween-20，pH 7.5；Bioconcept)。外顯解離($k_{d1}$)和結合($k_{a1}$)速率常數、第二反應常數($k_{a2}$ 和 $k_{d2}$)和外顯解離平衡常數($K_D$)是以Biacore分析軟體(Biacore Evaluation software Version 3.2, Cytiva)使用兩態結合模型(two-state binding model)計算得出，其擬合的品質好壞是從相對的Chi2值來監測。結合水平是由所達到的最大穩定性結合對理論 Rmax作歸一化而算得。

【0248】 測定四個MATCH4與hCD3ε的結合動力學，親和力範圍為6.3nM至4.7 nM(表34)。所有測試的MATCH4分子與hCD3ε親和力和親代scFv 28-21-D09-sc04相似。

*以SPR量測與hSA的結合親和力*

【0249】 以T200設備(Biacore，Cytiva)的SPR分析來確定四種MATCH4分子與人類血清白蛋白(hSA；Sigma-Aldrich A3782)的結合動力學(包括親和力)。將人類血清白蛋白分子共價固定在羧甲基化葡

聚醣表面(CM5 感測器晶片；Biacore，Cytiva)上，並將每個MATCH4分子的滴定序列作為分析物注入。在每個分析物注入行程之後，感測器晶片上的每個流道都被再生(甘胺酸脈衝，pH1.5和3M MgCl2)，並注入新濃度的MATCH4 分子。使用多循環動力學測定法測量與hSA 的結合動力學，十個分析物濃度範圍為0.18至90nM，在流通之緩衝液中以1:2稀釋(PBS-P+ pH 5.5，PBS至pH5.5，含HCl，0.05% Tween20)。外顯解離(kd)和結合(ka)速率常數和外顯解離平衡常數 ($K_D$)是以Biacore 分析軟體(Biacore評估軟體版本 3.2，Cytiva)使用一對一的Langmuir結合模型計算得到，其擬合的品質好壞是從Chi2和U值來監測，它們是曲線擬合品質好壞的衡量標準。結合水平是由所達到的最大穩定性結合對理論$R_{max}$作歸一化而算得。

【0250】 測定四個MATCH4與hSA的結合動力學，親和力範圍為6.7nM至5.5nM(表35)。所有測試的MATCH4分子與hSA親和力和親代scFv 19-04-A10-sc02相似。

### 9.2 以流式細胞儀量測 MATCH4 分子與人類 ROR1 的細胞結合

【0251】 如前面所述，以流式細胞儀進行抗ROR1 MATCH4分子(PRO2589、PRO2590、PRO2591、PRO2592和PRO2658)與表達ROR1之MDA-MB-231細胞的細胞結合。簡言之，製備從120nM開始MATCH4 分子的5 倍連續稀釋液和從120nM 開始參考Fab片段PRO2213的稀釋液，然後將其添加到具有細胞的盤中。在存在1 mg/ml人類血清白蛋白(hSA)的情況下，在4°C下孵育1小時後，清洗盤並與

特異性檢測抗體一起孵育。使用NovoCyte 2060流式細胞儀記錄每個樣品的APC通道螢光強度，並計算螢光強度MFI的幾何平均值。

【0252】 以流式細胞術評估MATCH4分子與基於細胞膜上人類ROR1的結合。透過這些實驗計算出的$EC_{50}$、相對$EC_{50}$以及相對最大結合值顯示在表36中。Fab片段PRO2213用作抗ROR1參考抗體。所有MATCH4分子均顯示與ROR1陽性MDA-MB-231細胞結合，而未發現與ROR1陰性MCF-7細胞結合(見第10圖)。與相應之scMATCH3分子的$EC_{50}$值相比，含有ROR1殖株55-38-D07(PRO2589和PRO2590)的MATCH4分子的$EC_{50}$結合值增加了10倍。例如，PRO2589的相對$EC_{50}$為0.45，大約是scMATCH3 PRO2507之相對$EC_{50}$值(0.03)的十倍。類似地，含有ROR1殖株55-39-G02(PRO2591和PRO2592)的MATCH4分子的$EC_{50}$結合值增加了5倍(比較PRO2592的相對$EC_{50}$與PRO2557的相對$EC_{50}$)。據信，結合的增加是由於MATCH4分子的二價性質導致的結合力效應(avidity effects)。在MATCH4分子中，PRO2591(ROR1結構域：55-39-G02-sc03)表現出最佳的$EC_{50}$結合，大約是參考Fab片段PRO2213的2.5倍。使用相同的實驗設置在流式細胞儀中測量PRO2590的最佳化變異體PRO2670。在這個實驗中，透過相似的相對$EC_{50}$值，我們發現PRO2670與MDA-MB-231細胞結合的效力與PRO2590相當。

【0253】 總之，所有MATCH4分子都表現出與人類ROR1表達細胞的特異性結合，並且與一系列以抗ROR1殖株55-38-D07建構的分子相比，帶有抗ROR1殖株的55-39-G02的分子有著更高的結合。可能由

於結合力效應(avidity effects)，與相應的單價scMATCH3分子相比，所有二價MATCH4分子都表現出增加的$EC_{50}$結合。

**表33：對具有和不具有結合力(with and without avidity)的MATCH4分子與hROR1的親和力(affinity)測量總結。**

| 蛋白質 #ID | 蛋白質描述 | 親和力/結合力 | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|---|
| PRO2589 | 55-38-D07-sc02 scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc02_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 親和力 | 9.4E+04 | 1.1E-04 | 1.2E-09 |
| PRO2590 | 55-38-D07-sc02 diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 親和力 | 5.9E+04 | 1.7E-04 | 2.9E-09 |
| PRO2591 | 55-39-G02-sc03_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc03_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 親和力 | 1.1E+05 | 3.4E-04 | 3.2E-09 |
| PRO2592 | 55-39-G02-sc06_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 親和力 | 9.8E+04 | 4.9E-04 | 5.0E-09 |
| PRO2669 | 55-38-D07-sc02(RTQ) scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc02(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) _(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH | 親和力 | 5.66E+04 | <1.00E-05 | 1.77E-10 |
| PRO2670 | 55-38-D07-sc02(RTQ) diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc06(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) _(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH | 親和力 | 4.60E+04 | 1.32E-04 | 2.87E-09 |
| PRO2589 | 55-38-D07-sc02 scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc02_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 結合力 | 7.55E+05 | 7.02E-05 | 9.30E-11 |
| PRO2590 | 55-38-D07-sc02 diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 結合力 | 4.53E+05 | 6.15E-05 | 1.36E-10 |
| PRO2591 | 55-39-G02-sc03_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc03_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 結合力 | 1.81E+06 | 4.10E-05 | 2.27E-11 |
| PRO2592 | 55-39-G02-sc06_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 結合力 | 1.98E+06 | 5.69E-05 | 2.87E-11 |
| PRO2669 | 55-38-D07-sc02(RTQ) scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc02(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) _(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH | 結合力 | 1.0E+06 | 2.6E-05 | 2.6E-11 |
| PRO2670 | 55-38-D07-sc02(RTQ) diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc06(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) _(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH | 結合力 | 7.6E+05 | 8.1E-05 | 1.1E-10 |

**表34：所選MATCH4分子與hCD3ε之親和力測量總結。**

| 蛋白質 # | 蛋白質描述 | $k_{a1}$ (1/Ms) | $k_{d1}$ (1/s) | $k_{a2}$ (1/s) | $k_{d2}$ (1/s) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO2589 | 55-38-D07-sc02 scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc02_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 4.4E+05 | 6.5E-03 | 6.3E-03 | 4.2E-03 | 5.9E-09 |
| PRO2590 | 55-38-D07-sc02 diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 4.5E+05 | 5.8E-03 | 5.5E-03 | 4.3E-03 | 5.7E-09 |
| PRO2591 | 55-39-G02-sc03_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc03_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 4.2E+05 | 4.23E-03 | 2.7E-03 | 2.4E-03 | 4.7E-09 |
| PRO2592 | 55-39-G02-sc06_(G4S)2_19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-39-G02-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 4.3E+05 | 5.5E-03 | 3.6E-03 | 3.6E-03 | 6.3E-09 |
| PRO2669 | 55-38-D07-sc02(RTQ) scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc02(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) _(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH | 8.1E+05 | 4.7E-03 | 5.6E-03 | 4.7E-03 | 2.7E-09 |
| PRO2670 | 55-38-D07-sc02(RTQ) diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02(RTQ) diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) VL/55-38-D07-sc06(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ) _(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ) diS VH | 8.2E+05 | 4.8E-03 | 5.4E-03 | 4.7E-03 | 2.7E-09 |

**表35：所選MATCH4分子與hSA之親和力測量總結。**

| 蛋白質 #ID | 蛋白質描述 | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|
| PRO2589 | 55-38-D07-sc02 scFv (Gword4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc02_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 3.3E+05 | 1.8E-03 | 5.5E-09 |
| PRO2590 | 55-38-D07-sc02 diS scFv (G4S)2 19-04-A10-sc02 diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04 VL/55-38-D07-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04 _(G3S)3G_19-04-A10-sc02 diS VH | 2.9E+05 | 2.0E-03 | 6.7E-09 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| PRO2591 | 55-39-G02-sc03_(G4S)2_19-04-A10-sc02.diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04<br>VL/55-39-G02-sc03_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02.diS VH | 3.3E+05 | 1.9E-03 | 5.6E-09 |
| PRO2592 | 55-39-G02-sc06_(G4S)2_19-04-A10-sc02.diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04<br>VL/55-39-G02-sc06_(G4S)2_28-21-D09-sc04_(G3S)3G_19-04-A10-sc02.diS VH | 3.6E+05 | 2.3E-03 | 6.3E-09 |
| PRO2669 | 55-38-D07-sc02(RTQ)-sclv-(G4S)2-19-04-A10-sc02(RTQ)-diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)<br>VL/55-38-D07-sc02(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)_(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ)-diS VH | 4.1E+05 | 1.3E-03 | 3.0E-09 |
| PRO2670 | 55-38-D07-sc02(RTQ)-diS-sclv-(G4S)2-19-04-A10-sc02(RTQ)-diS_(G2S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)-VL/55-38-D07-sc06(RTQ)_(G4S)2_28-21-D09-sc04(RTQ)_(G3S)3G_19-04-A10-sc02(RTQ)-diS VH | 3.7E+05 | 1.3E-03 | 3.5E-09 |

表36：以流式細胞儀測定抗ROR1 MATCH4分子PRO2589、PRO2590、PRO2591、PRO2592和PRO2670與表達在MDA-MB-231細胞上之人類ROR1的結合。

| PRO ID | 結構域 1 (ROR1) | 結構域 2 (hSA) | 結構域 3 (CD3) | 結構域 4 (ROR1) | $EC_{50}$ [nM] | 相對 $EC_{50}$ ($EC_{50,\ PRO2213}$/ $EC_{50,\ MATCH4}$) | 相對最大結合值 ($MFI_{MATCH4}$/ $MFI_{PRO2213}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO2589 | 55-38-D07-sc02 | 19-04-A10-sc02.diS (19-04-A10-sc06) | 28-21-D09-sc04 | 55-38-D07-sc02 | 1.55 | 0.45 | 2.67 |
| PRO2590 | 55-38-D07-sc06 | 19-04-A10-sc02.diS (19-04-A10-sc06) | 28-21-D09-sc04 | 55-38-D07-sc06 | 1.23 | 0.56 | 2.76 |
| PRO2591 | 55-39-G02-sc03 | 19-04-A10-sc02.diS (19-04-A10-sc06) | 28-21-D09-sc04 | 55-39-G02-sc03 | 0.28 | 2.45 | 2.21 |
| PRO2592 | 55-39-G02-sc06 | 19-04-A10-sc02.diS (19-04-A10-sc06) | 28-21-D09-sc04 | 55-39-G02-sc06 | 0.72 | 0.94 | 2.41 |
| PRO2670 | 55-38-D07-sc06 | 19-04-A10-sc02(RTQ)-diS (19-04-A10-sc06(RTQ)) | 28-21-D09-sc04 (RTQ) | 55-38-D07-sc06 (RTQ) | 0.85 | 0.39 | 2.68 |

### 9.3 MATCH4分子介導的靶細胞細胞毒性和T細胞活化

【0254】 為了了解MATCH4分子促進腫瘤細胞殺滅和CD8 T細胞活化的能力，進行了一系列細胞毒性測定以比較我們的先導候選物的效力和T細胞活化概況。

【0255】 首先，同時測試幾種細胞株上的ROR1表達水平。簡而言之，將細胞依次序與Zombie NIR活/死APC-Cy7(Biolegend，1:500)在4°C下孵育20分鐘，之後是清洗步驟，然後是抗ROR1 PE(Biolegend，1:25)在4°C下20分鐘，然後在Attune流式細胞儀(Thermofisher Scientific)上清洗和讀取。在MDA-MB-231、Jeko-1、JIMT-1、SKOV-3和MCF7細胞上測量的表面ROR1表達如第11圖所示。在MDA-MB-231和Jeko-1細胞上發現了最高的ROR1 水平，JIMT-1和SKOV-3細胞的ROR1表達水平較低，而MCF7細胞的ROR1表達水平非常低。因此，MCF7細胞用作ROR1的陰性對照組。

【0256】 細胞毒性測定是使用Pan-T細胞，其分離自從膚色血球層(buffy coat)分離出的周邊血液單核細胞(PBMCs)。PBMCs的分離是用帶有Lymphoprep (StemCell Technologies)的SepMate管，以按照製造商的說明建立密度梯度。PBMC 分離後，按照製造商的說明，使用來自Miltenyi的Pan-T分離試劑盒分離出Pan-T細胞。

【0257】 將分離的 Pan-T 細胞與感興趣的 ROR1 陽性和陰性腫瘤細胞以 10:1 的效應物與標靶物的比率共培養 40 小時。共培養後，吸出 100µl 上清液，使用 Roche 的細胞毒性檢測試劑盒檢測瀕死細胞釋放的乳酸脫氫酶(LDH)。剩餘的上清液在冷凍-80°C，以用於下游多重細胞因子分析。剩餘的細胞用以下試劑或抗體(均來自 Biolegend)

進行標記：可固定活/死 Aqua、抗人類 CD4 APC-Cy7(殖株 OKT4)、抗人類 CD11c PE-Cy7(殖株 Bu15)、抗人類 CD8 PerCP-Cy5.5(殖株 SK1)和抗人類 CD69 PE(殖株 FN50)。在流式細胞儀(Attune，Thermo Fisher Scientific)上採集細胞，並使用 FlowJo 軟體(BD)分析 CD69 的向上調控，作為 CD4 和 CD8 T 細胞活化的衡量標準。

【0258】 所有測試的MATCH4分子均導致對高ROR1陽性細胞的特異性殺滅，例如MDA-MB-231和Jeko-1(參見第12A圖)，並且在ROR1陰性細胞MCF7只觀察到最小或沒有活性(參見第12B圖)。MATCH4分子的$EC_{50}$值優於相應的scMATCH3(PRO2589和PRO2590對比於PRO2507、PRO2591和PRO2592對比於PRO2557/PRO2510)。然而，對於低ROR1表達細胞，即JIMT-1和SKOV-3(第12A圖底部)，與PRO2591和PRO2592(ROR1結構域PRO2271)相比，PRO2589和PRO2590(源自PRO2060的ROR1結構域)似乎具有更好的$EC_{50}$值。與scMATCH3分子PRO2507相比，在低ROR1表達細胞上，PRO2060衍生的MATCH4分子表現出稍佳的$EC_{50}$值，然而比較PRO2271衍生的MATCH4和scMATCH3分子時似乎不存在這種差異。有趣的是，在表達低水平ROR1的細胞上，與scMATCH3分子相比，MATCH4 分子似乎表現出總體較低的最大殺滅力(第12A圖底部)。細胞毒性結果總結在表37中。

【0259】 此外，T細胞活化可透過表達CD69之細胞的頻率增加來測量。基於CD8(第13圖頂部)和基於CD4(第13圖底部)的T細胞活化與細胞毒性數據非常接近。活化CD8和CD4 T細胞的最高頻率是透過MDA-MB-231細胞獲得的，其也表達了最高水平的ROR1(第13A圖)。

與基於PRO2271的MATCH4分子相比，基於PRO2060的MATCH4分子具有更低的$EC_{50}$值。然而，與MATCH4分子相比，在檢驗scMATCH3分子時，這些T細胞群具有整體更高頻率的活化細胞。結果總結在表38和39中。

【0260】 MATCH4分子活性的最大差異似乎存在於低ROR1表達細胞上，即SKOV-3和JIMT-1 細胞。由於患者和腫瘤適應症之間ROR1 表達水平的預期異質性，有效地標靶於具有較低ROR1表達水平的腫瘤將是有利的。基於這些數據，PRO2592似乎具有最低的效力(細胞毒性和T細胞活化)以及最低的最大值。

### 9.4 MATCH4 分子的生物物理特徵分析

*儲存穩定性與熔化溫度*

【0261】 對MATCH4分子進行14天穩定性研究，其中將分子配製在水性緩衝液(50mM磷酸鹽-檸檬酸鹽緩衝液和300mM蔗糖於pH6.5下)中，濃度為1mg/ml，並儲存在<-80°C、4°C和40°C，持續14天。透過加總研究過程中不同時間點的SE-HPLC尖峰面積來評估製劑中單體和寡聚物的分量。表40總結了單體含量百分比和相對於第0天的單體損失百分比。在研究過程中的蛋白質濃度變化是以280nm處的UV-Vis測量作監測，並顯示在表41中。透過nDSF(NanoTemper)分析熱穩定性以確定解折疊(unfolding)的起始點(Tonset)和解折疊的中點(Tm)。Tm結果如表40所示。

【0262】 所有四種MATCH4分子都表現出優異的穩定性曲線，並且在14天孵育後沒有表現出顯著的單體含量損失或蛋白質含量損

失。在-80°C和4°C的溫度下以及在SE-HPLC/UV測量之前對第14天/-80°C的樣品進行反覆凍融(5x)時，單體含量沒有顯著變化。

**示例 10：預先存在的ADA結合測定**

**10.1 一般測定程序：**

【0263】 在Numab開發了一種使用直接測定形式檢測人類血清中預先存在的抗藥物抗體的方法。

【0264】 96孔半面積盤以100ng/ml的測試分子(MATCH3或scFv形式)在室溫下覆蓋(coated)2小時。盤子以含有0.2% Tween和1% BSA的PBS封閉(blocked)1小時。然後各別的人類血清以1:20(5% 血清)或1:100(1% 血清)稀釋並加入，其中未添加(unspiked)(篩選試驗)或添加(spiked)(確認試驗)與覆蓋於相應孔中的相同分子。添加的濃度範圍為60至115nM，添加的樣品預先孵育1小時。抗體與覆蓋在盤上的分子結合，然後用100ng/ml兔子抗人IgG-HRP檢測1小時。加入TMB作為受質，並在短暫孵育後，用1M HCl終止酵素反應。在450nm處讀取每個孔的光密度。所有步驟均在室溫下進行。在每個步驟之間，用450µl清洗液清洗盤子3次。除封閉和清洗步驟外，所有分析的部分均以25µl/孔的體積添加，並使用兩份。孵育步驟則是將ELISA盤置於旋轉混合器(40 rpm)上。通常使用未添加的人類血清進行第一輪測量(篩選試驗)。然後計算每個的篩選截止點(SCP)。信號低於SCP的未添加樣品被稱為“篩檢陰性”，在確認分析中不予考慮。信號高於SCP的未添加樣品稱為“篩檢陽性”。

表37: 用來自MATCH4的Pan-T細胞和選定的scMATCH3分子進行的關鍵細胞毒性數據的總結。

| PRO ID | 形式 | 結構域 3, scFv 位置 (ROR1) | 平均 $EC_{50}$ (nM) 細胞毒性 (MDA-MB-231) | 平均 % 最大裂解 (MDA-MB-231) | 平均 $EC_{50}$ (nM) CD8 T 細胞活化 (MDA-MB-231) | 平均 $EC_{50}$ (nM) 細胞毒性 (SKOV3) | 平均 % 最大裂解 (SKOV3) | 平均 $EC_{50}$ (nM) CD8 T 細胞活化 (SKOV3) | 平均 $EC_{50}$ (nM) 細胞毒性 (JIMT-1) | 平均 % 最大裂解 (JIMT-1) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO2589 | MATCH4 | PRO2060 | 0.015 | 56.9 | 0.012 | 0.043 | 54.6 | 0.031 | 0.10 | 41 |
| PRO2590 | MATCH4 | PRO2291 (PRO2060 + diS) | 0.016 | 52.2 | 0.013 | 0.049 | 51.8 | 0.034 | 0.13 | 38.6 |
| PRO2591 | MATCH4 | PRO2271 | 0.011 | 47.2 | 0.010 | 3.5 | 58.7 | 0.68 | 2.4 | 34.5 |
| PRO2592 | MATCH4 | PRO2271 + diS | 0.008 | 47.1 | 0.011 | 5.37 | 44.7 | 1.6 | 3.3 | 24.9 |
| PRO2507 | scMATCH3 | PRO2060 | 0.47 | 64.6 | 0.36 | 0.42 | 79.1 | 0.34 | 2. | 63.9 |
| PRO2510 | scMATCH3 | PRO2062 | 0.14 | 65.5 | 0.087 | 0.25 | 83.1 | 0.19 | 1.1 | 72.1 |
| PRO2557 | scMATCH3 | PRO2271 + diS | 0.74 | 78.2 | 0.52 | 1.3 | 88 | 1.2 | 3.4 | 83 |

表38：從選定的MATCH4和選定的scMATCH3分子的細胞毒性測定得到的CD8 T細胞活化數據總結。

| 蛋白質 ID | 形式 | ROR1 結構域 | 平均 $EC_{50}$(nM) CD8 T 細胞活化 (MDA-MB-231) n=3-5 | 平均 %最大 CD8 T 細胞活化 (MDA-MB-231) | 平均 $EC_{50}$(nM) CD8 T 細胞活化 (SKOV3) n=2-3 | 平均 %最大 CD8 T 細胞活化 (SKOV3) | 平均 EC50(nM) CD8 T 細胞活化 (JIMT-1) n=3-5 | 平均 %最大 CD8 T 細胞活化 (JIMT-1) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO2589 | MATCH4 | 55-38-D07-sc02 | 0.012 | 68.5 | 0.032 | 66.7 | 0.08 | 23.8 |
| PRO2590 | MATCH4 | 55-38-D07-sc06 | 0.013 | 68.8 | 0.034 | 63.7 | 0.09 | 22.5 |
| PRO2591 | MATCH4 | 55-39-G02-sc03 | 0.010 | 67.5 | 0.68 | 62.7 | 4.6 | 20.3 |
| PRO2592 | MATCH4 | 55-39-G02-sc06 | 0.011 | 67 | 1.6 | 54.7 | 9.8 | 15.5 |
| PRO2507 | scMATCH3 | 55-38-D07-sc02 | 0.36 | 68 | 0.34 | 64.3 | 2.9 | 40.8 |
| PRO2510 | scMATCH3 | 55-39-G02-sc05 | 0.087 | 70.4 | 0.19 | 79.3 | 1.1 | 47.6 |
| PRO2557 | scMATCH3 | 55-39-G02-sc06 | 0.52 | 65.3 | 1.2 | 81.5 | 5.4 | 48.7 |

表39: 從選定的MATCH4和選定的scMATCH3分子的細胞毒性測定得到的CD4 T細胞活化數據總結。

| 蛋白質 ID | 形式 | ROR1 結構域 | 平均 EC50(nM) CD4 T 細胞活化 (MDA-MB-231) n=3-5 | 平均 % 最大 CD4 T 細胞活化 (MDA-MB-231) | 平均 EC50(nM) CD4 T 細胞活化 (SKOV3) n=2-3 | 平均 % 最大 CD4 T 細胞活化 (SKOV3) | 平均 EC50(nM) CD4 T 細胞活化 (JIMT-1) n=3-5 | 平均 %最大 CD4 T 細胞活化 (JIMT-1) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PRO2589 | MATCH4 | 55-38-D07-sc02 | 0.006 | 79 | 0.02 | 80.3 | 0.09 | 36.7 |
| PRO2590 | MATCH4 | 55-38-D07-sc06 | 0.007 | 79.3 | 0.02 | 78.3 | 0.11 | 35.3 |
| PRO2591 | MATCH4 | 55-39-G02-sc03 | 0.005 | 80.3 | 0.38 | 78.7 | 3.9 | 30.5 |
| PRO2592 | MATCH4 | 55-39-G02-sc06 | 0.005 | 79 | 0.76 | 75 | 9.1 | 23 |
| PRO2507 | scMATCH3 | 55-38-D07-sc02 | 0.14 | 81.8 | 0.22 | 83.3 | 2.4 | 63.2 |
| PRO2510 | scMATCH3 | 55-39-G02-sc05 | 0.036 | 82 | 0.13 | 87.3 | 0.8 | 68 |
| PRO2557 | scMATCH3 | 55-39-G02-sc06 | 0.20 | 77.7 | 0.55 | 87.5 | 3.3 | 69.3 |

表40：濃度為1mg/ml的MATCH4穩定性評估，單體含量隨時間的變化。

| 蛋白質 ID | 溫度 [°C] | 濃度 [mg/ml] | 單體含量[%]* | | | | %單體含量損失 | | | nDSF (Nano Temper) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | d0 | d1 | d7 | d14 | d1 | d7 | d14 | $T_m$ [°C] |
| PRO2589 | -80 | 1.02 | 96.2 | NA | NA | 97.1* | NA | NA | -0.9* | 62.0 |
| | 4 | | 96.2 | 96.6 | 96.9 | 98 | -0.5 | -0.7 | -1.9 | |
| | 40 | | 96.2 | 96.4 | 96.9 | 97.1 | -0.2 | -0.7 | -0.9 | |
| PRO2590 | -80 | 1.06 | 98.9 | NA | NA | 99.2* | NA | NA | -0.2* | 62.9 |
| | 4 | | 98.9 | 98.9 | 99.0 | 99 | 0.0 | -0.1 | -0.1 | |
| | 40 | | 98.9 | 99.1 | 98.7 | 98.5 | -0.2 | 0.2 | 0.5 | |
| PRO2591 | -80 | 1.09 | 94.2 | NA | NA | 95.6* | NA | NA | -1.4* | 55.0 |
| | 4 | | 94.2 | 95.2^ | 96.4^ | 96.8^ | -1.1^ | -2.3^ | -2.7^ | |
| | 40 | | 94.2 | 97.4^ | 97.5^ | 95.1^ | -3.4^ | -3.5^ | -1^ | |
| PRO2592 | -80 | 1.06 | 96.8 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 96.8 | 96.9 | 97.6 | 97.8 | -0.1 | -0.8 | -1 | 58.4 |
| 40 | 96.8 | 97.1 | 96.8 | 97.1 | -0.3 | 0.0 | -0.3 | |

*樣品在測量前經過 5 次重複的凍融循環

^與研究的 d0 相比，單體含量顯著增加，可能是由於將較高濃度的初始樣品稀釋至研究的濃度 1mg/ml

NA: 未量測到, ND: 無法決定

**表 41：1mg/ml 濃度下的 MATCH4 穩定性評估，蛋白質含量隨時間的變化。**

| 蛋白質 ID | 溫度[°C] | 濃度[mg/ml] | 蛋白濃度[mg/ml] | | | | %含量損失 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | d0 | d1 | d7 | d14 | d1 | d7 | d14 |
| PRO2589 | -80 | 1.02 | 1.0 | NA | NA | 1.0* | NA | NA | 1.2* |
| | 4 | | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.1 | -1.1 | 5.9 | -11.1 |
| | 40 | | 1.0 | 0.9 | 1.0 | 1.1 | 10.6 | 6.6 | -12.8 |
| PRO2590 | -80 | 1.06 | 1.1 | NA | NA | 1.0* | NA | NA | 3.9* |
| | 4 | | 1.1 | 1.0 | 1.0 | 1.1 | 1.4 | 8.7 | -4.3 |
| | 40 | | 1.1 | 1.0 | 1.1 | 1.1 | 1.9 | -6.5 | -2.9 |
| PRO2591 | -80 | 1.09 | 1.1 | NA | NA | 1.0* | NA | NA | 5.9* |
| | 4 | | 1.1 | 1.0 | 1.1 | 1.1 | 5.2 | -2.2 | 0.1 |
| | 40 | | 1.1 | 1.0 | 1.1 | 1.1 | 5.9 | 0.0 | 3.2 |
| PRO2592 | -80 | 1.06 | 1.1 | NA | NA | 1.0* | NA | NA | 6.6* |
| | 4 | | 1.1 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 6.2 | 2.6 | 7.3 |
| | 40 | | 1.1 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 6.9 | 5.3 | 6.1 |

*樣品在測量前經過 5 次重複的凍融循環

【0265】 對於這些“篩選陽性”樣品中的大多數，用添加的人類血清進行第二輪測量(確認測定)，以確定在各個血清樣品中最初檢測到的抗體結合是否對測試分子具有特異性。添加孔中吸光度信號的降低表明在初始篩選測定的未添加孔中觀察到的信號對覆蓋(coated)在盤上的分子具有特異性。確認特異性所需的所得抑制百分比(%抑制)設置為 20 至 30%或以百分比(%CCP)計算確認的臨界點。在後一種情況下，只有抑制百分比高於 CCP 的樣品才被確認為陽性。%抑制計算為未添加血清(篩選測定)獲得的初始信號的減少，如下所示：%CCP =初始信號(1-(添加血清/未添加血清信號))*100。

【0266】 在替代程序中，不進行初始篩選測定。取而代之的是，使用驗證性分析程序直接分析測試樣品。然而，對於數據分析，進行了相同的計算，這至少涉及 SCP 和%CCP 的計算。

**10.2 篩選截止點(SCP)、歸一化因子(NF)和浮動截止點(FCP)的確定/計算**

【0267】 對於每種測試化合物，分析了 40 個健康未治療的受試者的個別人類血清樣品。在其他情況下，對 20 個健康未治療的受試者的個別人類血清樣本進行了分析。

***篩選截止點(SCP)***

【0268】 篩選截止點(SCP)是信號被認為是陽性(篩選陽性)的閾值(threshold)。計算為包括 5%的偽陽性血清。

【0269】 篩選截止點(SCP)計算如下：

SCP =平均 N +1.645 x SDN

其中：

-“平均 N”等同於針對特定測試化合物測量的所有未添加的 個別血清之 平均信號；

-“SDN”等同於針對特定測試化合物測量的所有未添加的個別血清之標準偏差。

***歸一化因子(NF)***

【0270】 歸一化因子(NF)計算如下：

NF=SCP– 陰性對照平均值

其中：

-“SCP”定義如上；和

-“陰性對照平均值”等同於來自陰性對照的平均信號(合併的個別血清，每個盤子上相同)，每個盤子上兩組分析(即 2 個孔)。

【0271】 計算歸一化因子時必須考慮至少兩個 NC 樣品(即 4 個孔)。

***計算浮動截止點(SCP)***

【0272】 在確定 SCP 和 NF 之後，將每個盤子的浮動截止點(FCP)用作參考截止點。FCP 考慮到每次分析運作的分析變異性，透過將 SCP 與盤子的陰性對照進行歸一化。每次分析運作的 FCP 計算如下：

FCP =NF +平均 NC

其中：

-“平均 NC”是指陰性對照樣品的平均信號；

-“NF”是指歸一化因子，如上定義。

### 10.3 對改良之多特異性抗體變異體的預先存在的 ADA 結合測定結果：

【0273】 變異體 PRO2668 和 PRO2669 以及作為比較的相應未修飾參考物 PRO2510 和 PRO2589，已經使用上述預先存在的 ADA 結合測定法測量了它們的免疫原性。此測量是使用 20 個人類血清樣本(在 PRO2589 的情況下為 19 個)在驗證性測定設置中直接進行。

【0274】 陽性血清進一步以考慮 30%的%CCP 分析篩選。表 42 總結了每個測試分子的陽性血清樣本數。人類血清中預先存在的 ADA 的吸收水平，以及對 PRO2741 和參考組 PRO2660 之添加的人類血清(ADA 結合抑制)的吸光度水平降低的圖表如第 14 圖所示。

**表 42：PRO2668 和 PRO2669 以及參考組 PRO2510 和 PRO2589 高於 30% CCP 的陽性血清樣本數量：**

| PRO Number | 大於 30 % CCP 陽性血清樣本數 | % 所有測試血清樣本的陽性數 |
|---|---|---|
| PRO2668 | 0 | 0 |
| PRO2510 | 3 | 15 |
| PRO2669 | 1 | 5 |
| PRO2589 | 10 | 52.6 |

### 示例 11：由 scMATCH3 和 MATCH4 變異體 PRO2667、PRO2668、PRO2669 和 PRO2670 介導的標靶細胞細胞毒性和 T 細胞活化

*方法*

【0275】 這些測定是使用分離自膚色血球層的人類周邊血液單核細胞 (PBMC)進行的，其分離是用帶有 Lymphoprep(StemCell Technologies)的

SepMate 管，以按照製造商的說明建立密度梯度。根據製造商的說明，使用來自 Miltenyi Biotec 的 Pan T 細胞分離試劑盒從 PBMCs 中分離 Pan T 細胞。

【0276】 將分離的 Pan-T 與感興趣的 ROR1 陽性和陰性腫瘤細胞共培養 40 小時，其中效應物與標靶物的比率是對吸附型細胞的 10:1，或是對懸浮型細胞的 5 : 1。共培養後，吸出 100µl 上清液，使用 Roche 的細胞毒性檢測試劑盒測試瀕死細胞中乳酸脫氫酶(LDH)的釋放。剩餘的上清液冷凍在 -80°C，以用於下游多重細胞因子分析。細胞用以下試劑或抗體(均來自 Biolegend)進行標記，以用於特定 T 細胞活化的流式細胞術分析：可固定活/死 Aqua、抗人類 CD4 APC-Cy7(殖株 OKT4)、抗人類 CD11c PE-Cy7(殖株 Bu15)、抗人類 CD8 PerCP-Cy5.5( 殖株 SK1)和抗人類 CD69 PE(殖株 FN50)。在流式細胞儀(Attune，ThermoFisher Scientific)上採集細胞，並使用 FlowJo 軟體(BD)分析 CD69 的向上調控(upregulation)，作為 CD4 和 CD8 T 細胞活化的衡量標準。

*結果*

【0277】 使用所有測試的 scMATCH3(PRO2667 和 PRO2668)和 MATCH4(PRO2669 和 PRO2670)分子導致 ROR1 陽性的 MDA-MB-231 和 JIMT-1 細胞的特異性殺滅，如第 15A 圖所示。MATCH4 分子的效力優於 scMATCH3 分子，但在使用 scMATCH3 分子時，在表達 ROR1 較低的 JIMT-1 細胞上實現的最大裂解程度更高。在檢查 CD8 T 細胞活化時獲得了類似的結果，其活化是透過表達 CD69 的 CD8 T 細胞的頻率來衡量(第 15B 圖)。

**示例 12：PRO2668 誘導特異性 T 細胞介導的 ROR1 陽性實體和血液癌細胞株裂解的效力**

【0278】 PRO2668 介導的細胞毒性在代表固體(第 16A 和 16B 圖)和血液惡性腫瘤(第 16C 圖)的細胞株上進行評估。使用 ROR1 陽性細胞株作為標靶觀察到細胞毒性，而 ROR1 陰性細胞株 HCC1954 未裂解，表明 PRO2668 的 ROR1 依賴性(第 16A 圖)。隨著 ROR1 密度的增加，特異性裂解的效力整體提高(第 16B 圖)。也觀察到了套細胞淋巴瘤細胞株 Mino 和 Z-138 的特異性殺滅(第 16C 圖)。這些數據表明 PRO2668 能夠介導對一系列表達 ROR1 的腫瘤細胞株的特異性殺滅。

**示例 13：PRO2668 介導 ROR1 依賴性 CD8 T 細胞活化和增殖的效力**

*方法:*

【0279】 分離出的健康 Pan-T 細胞按照製造商的說明以 CellTrace Violet 進行標記，並與 ROR1 陽性腫瘤細胞以 5:1 效應物與標靶物的比例共培養 3-6 天。共培養 3 天和/或 6 天後，用以下試劑或抗體(均來自 Biolegend)標記細胞，以用於特定 T 細胞活化的流式細胞術分析：可固定活/死 Aqua、抗人類 CD4 APC-Cy7(殖株 OKT4)、抗人類 CD19 PE(殖株 HIB19)、抗人類 CD8 PerCP-Cy5.5(殖株 SK1)、抗人類 CD3 Alexa Fluor 488(殖株 OKT3)和抗人類 CD25 BV650(殖株 BC96 )。在流式細胞儀(Attune，Thermo Fisher Scientific)上採集細胞，並使用 FlowJo 軟體(BD)進行分析。與非分裂細胞(染劑稀釋)相比，分裂細胞的螢光水平降低。CD25 頻率的向上調控被用作 CD8T 細胞活化的衡量標準。

*結果*

【0280】 在與表達 ROR1 的乳腺癌細胞株 MDA-MB-231 和 JIMT-1 共培養時觀察到 CD8 T 細胞活化(第 17A 圖)。活化程度似乎與 ROR1 表達相關，因為觀察到較高頻率的活化 T 細胞具有較高的 ROR1 表達。在檢查分裂細胞(CellTrace Violet 螢光降低的細胞)的頻率或每微升的分裂細胞數時，觀察到 CD8 T 細胞增殖，其為對兩種表達 ROR1 的細胞株的反應。當使用具有更高 ROR1 表達的標靶時，增殖程度更高。在對套細胞淋巴瘤系 Z-138 的反應中，還觀察到了 CD8 T 細胞活化和增殖(第 17B 圖)。這些數據指出，表達 ROR1 的標靶與 T 細胞在 PRO2668 下的交互作用導致了 T 細胞活化和增殖。

**示例 14：PRO2668 介導非有絲分裂、低 ROR1 表達的原代(primary)人類 CLL 患者樣品特異性裂解的效力**

*方法*

【0281】 使用 CLL 患者樣品(IQBiosciences)和分離自周邊血液單核細胞(PBMC)的健康人類 Pan-T 細胞進行這些測定。PBMCs 是分離自膚色血球層(buffy coat)，是使用帶有 Lymphoprep(StemCell Technologies)的 SepMate 管，按照製造商的說明建立密度梯度。根據製造商的說明，使用來自 Miltenyi Biotec 的 PanT 細胞分離試劑盒從 PBMC 中分離 Pan T 細胞。

【0282】 使用 Click-It Plus 流式細胞術測定試劑盒並遵循製造商的說明檢驗 5-乙炔基-2'-脫氧尿苷(EdU)的摻入，以評估 CLL 患者樣品的分裂能力。與非分裂細胞相比，分裂細胞被標記為陽性。使用上述程序評估受體密度，例如第 9.3 節所概述。在人類血清白蛋白存在下滴定濃度遞增的 PRO2668，接著是徹底的清洗，並以設計來檢測框架的螢光標定之二級試劑作檢測，以

評估 PRO2668 的細胞結合。在流式細胞儀上採集樣品並使用 FlowJo 進行分析。

【0283】 將分離的 Pan-T 與 CLL 患者樣品以 5:1 的效應物:標靶物比率共培養 40 小時。共培養後，將剩餘的上清液冷凍在-80°C，用於下游多重細胞因子分析。細胞用以下試劑或抗體(均來自 Biolegend)作標記，用於流式細胞術對細胞死亡和特異性 T 細胞活化的分析：可固定活/死 Aqua、抗人類 CD4 APC-Cy7(殖株 OKT4)、抗人類 CD3 Alexa Fluor 488(殖株 OKT3)、抗人類 CD8 PerCP-Cy5.5(殖株 SK1)和抗人類 CD69 BV650(殖株 FN50)、抗人類 CD19 BV421(殖株 SJ25C1)、Annexin V APC、抗人類 ROR1 PE(殖株 2A2)。在流式細胞儀(Attune，Thermo Fisher Scientific)上採集細胞，並使用 FlowJo 軟體(BD)分析 CD69 的向上調控，作為 CD4 和 CD8 T 細胞活化的衡量標準。將瀕死的 CLL 細胞圈取(gated)為 CD19+膜聯蛋白 V+ L/D+。細胞因子釋放的評估是用冷凍的上清液，按照製造商的說明，以 LEGENDplexTM Multi-Analyte Flow Assay Kit、Human Essential Immune Response Panel 13-plex 進行。

*結果*

【0284】 CLL PBMC 在周邊的增殖缺乏對需要活性增殖以發揮其活性的藥物造成挑戰(Hu 等人，Blood Adv. 5 (2021) 3152-3162)。以 EdU 的摻入證實了來自周邊血的 CLL 患者樣品缺乏增殖(第 18A 圖)。與活躍分裂的 Jeko-1 細胞株相比，CLL 患者樣本沒有分裂。這些樣品表達了低水平的 ROR1(每個細胞 8,000 個受體，第 18B 圖)。在這些細胞上觀察到 ROR1 受體的飽和(第 18C 圖)。在以健康同種異體(allogenic)Pan-T 細胞和 CLL 患者

樣品共培養後，觀察到特異性裂解(第 18D 圖)和伴隨的 CD8 和 CD4 活化(第 18E 圖)。一些細胞因子(IFNg 和 TNFa)的釋放是不多的，而對於其他細胞因子，如 IL-6，則沒有觀察到(第 18F 圖)。這些數據指出 PRO2668 能夠結合並且使非分裂性 CLL 患者樣本發生特異性裂解，從而導致 T 細胞活化和適度水平的細胞因子釋放。

**示例 15：PRO2668 和 PRO2670 的體內功效**

*方法*

【0285】 冷凍的 PBMC 在 37°C 水浴中解凍，離心，重新懸浮在 PBS 中，並儲存在冰上以用於接種(inoculation)。JeKo-1 腫瘤細胞維持在體外補充有 20%胎牛血清的 RPMI1640 培養基和 37ºC 和 5%$CO_2$ 的環境中。在指數生長期採集細胞，並在腫瘤接種前使用細胞計數器進行定量。

【0286】 每個治療組由五隻動物組成。把 0.1ml 混有使腫瘤發育之 Matrigel 的 PBS，其中含有 5 x$10^6$ JeKo-1 腫瘤細胞，以皮下方式接種在每隻小鼠的右上側區域。腫瘤接種後 3 天，將 1×$10^7$PBMC 植入腹膜內。當平均腫瘤大小達到 80-100 $mm^3$ 時進行隨機化。

【0287】 在隨機化(第 0 天)時開始給藥，此後每 5 天給藥一次。腫瘤接種後，每天檢查動物的發病率和死亡率。在常規監測期間，檢查動物的腫瘤生長和治療對行為的任何影響，例如活動能力、食物和水的消耗、體重增加/減少(隨機分組後每週測量兩次體重)、眼睛/毛髮纏結和任何其他異常。詳細記錄個別動物的死亡率和觀察到的臨床症狀。

【0288】 腫瘤體積在隨機化後每週兩次使用卡尺在二維中測量，並且體積使用以下公式以 $mm^3$ 表示：V =(L x W x W)/2，其中 V 是腫瘤體積，L

是腫瘤長度(最長的腫瘤尺寸)，W 是腫瘤寬度(垂直於 L 的最長腫瘤尺寸)。如果動物的體重相對於治療第一天的體重減輕超過 20%，則犧牲掉該動物；如果個別小鼠的腫瘤體積≥3,000 $mm^3$(犧牲個別小鼠)；或整組的平均腫瘤體積≥2,000 $mm^3$(犧牲掉同一組中的所有小鼠)。

*結果*

【0289】 以 Jeko-1 人類異種移植模型測試 PRO2668 在體內的功效。將 Jeko-1 細胞植入皮下，並在腫瘤植入後 3 天給予人類 PBMC。如第 19 圖所示，與不相關的蛋白質對照組 palivizumab 相比，給予 1mg/kg 和 0.2mg/kg PRO2668 導致顯著的腫瘤生長抑制。對於 0.04 mg/kg PRO2668，未觀察到相對於對照的功效差異。在 1 mg/kg 劑量下觀察到 PRO2670 的抗腫瘤功效，然而較低劑量未顯示出與對照組相比顯著不同的腫瘤體積。雖然這兩種分子似乎都有效，但 PRO2668 在 0.2mg/kg 的較低劑量下也顯示出功效。

**示例 16：scMATCH3 和 MATCH4 變體 PRO2667、PRO2668、PRO2669 和 PRO2670 的生物物理表徵**

*儲存穩定性和熔化溫度*

【0290】 對 MATCH4 分子進行 14 天穩定性研究，其中分子以 1mg/ml 配製在水性緩衝液(50mM 磷酸鹽-檸檬酸鹽緩衝液和 300mM 蔗糖於 pH 6.5 下)中並儲存在<-80°C、4°C 和 40°C，持續 14 天。透過加總研究過程中不同時間點的 SE-HPLC 尖峰面積來評估製劑中單體和寡聚物的分量。表 43 總結了單體含量百分比和相對於第 0 天的單體損失百分比。在研究過程中的蛋白質濃度變化是以 280nm 處的 UV-Vis 測量作監測，並顯示在表 44 中。透過

nDSF(NanoTemper)分析熱穩定性以確定解折疊(unfolding)的起始點 (Tonset)和解折疊的中點(Tm)。Tm 結果如表 43 所示。

【0291】 所有四種 MATCH4 分子都表現出優異的穩定性曲線，並且在 28 天孵育後沒有表現出顯著的單體含量損失或蛋白質含量損失。在-80°C 和 4°C 的溫度下以及在 SE-HPLC/UV 測量之前對第 28 天/-80°C 的樣品進行重複凍融(5x)時，單體含量沒有顯著變化，並且在 40°C 下儲存 28 天後，僅有少量單體含量損失。

**表 43: 濃度為 1mg/ml 的 ScMATCH4 穩定性評估，單體含量隨時間的變化。**

| 蛋白質 ID | 溫度 [°C] | 濃度 [mg/ml] | 單體含量[%] | | | | | 單體含量損失 | | | | nDSF (Nano Temper) $T_m$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | d0 | d1 | d7 | d14 | d28 | d1 | d7 | d14 | d28 | [°C] |
| PRO2667 | -80 | 1.07 | 98.7 | NA | NA | NA | 98.6* | NA | NA | NA | 0.1* | 62.5 |
| | 4 | | 98.7 | 98.5 | 98.6 | 98.8 | 98.6 | 0.2 | 0.1 | -0.1 | 0.2 | |
| | 40 | | 98.7 | 98.5 | 97.2 | 97.0 | 95.6 | 0.2 | 1.5 | 1.8 | 3.2 | |
| PRO2668 | -80 | 1.01 | 98.6 | NA | NA | NA | 99.8* | NA | NA | NA | -1.2* | 64.6 |
| | 4 | | 98.6 | 99.4 | 99.7 | 99.7 | 99.7 | -0.8 | -1.1 | -1.1 | -1.1 | |
| | 40 | | 98.6 | 99.4 | 98.8 | 97.2 | 96.7 | -0.8 | -0.2 | 1.5 | 2.0 | |
| PRO2669 | -80 | 1.06 | 98.5 | NA | NA | NA | 98.9* | NA | NA | NA | -0.4* | 63.1 |
| | 4 | | 98.5 | 98.7 | 98.6 | 99.0 | 98.5 | -0.1 | -0.1 | -0.5 | 0.0 | |
| | 40 | | 98.5 | 98.9 | 97.5 | 97.0 | 92.7 | -0.4 | 1.1 | 1.6 | 5.9 | |
| PRO2670 | -80 | 1.06 | 98.7 | NA | NA | NA | 100* | NA | NA | NA | -1.4* | 61.5 |
| | 4 | | 98.7 | 98.9 | 98.9 | 98.8 | 100.0 | -0.3 | -0.3 | -0.1 | -1.4 | |
| | 40 | | 98.7 | 99.2 | 98.6 | 97.2 | 97.4 | -0.5 | 0.1 | 1.4 | 1.3 | |

*樣品在測量前經過 5 次重複的凍融循環

NA: 未量測到

**表 44: 濃度為 1mg/ml 的 ScMATCH4 穩定性評估，蛋白質含量隨時間的變化。**

| 蛋白質 ID | 溫度 [°C] | 濃度 [mg/ml] | 蛋白質濃度 [mg/mL] | | | | | % 含量損失 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | d0 | d1 | d7 | d14 | d28 | d1 | d7 | d14 | d28 |
| PRO2667 | -80 | 1.07 | 1.07 | NA | NA | NA | 1.04* | NA | NA | NA | 3.0* |
| | 4 | | 1.07 | 1.03 | 1.06 | 1.04 | 1.08 | 3.9 | 0.5 | 2.6 | -1.2 |
| | 40 | | 1.07 | 1.16 | 1.01 | 1.06 | 1.08 | -8.1 | 5.2 | 0.9 | -1.3 |
| PRO2668 | -80 | 1.01 | 1.01 | NA | NA | NA | 1.11* | NA | NA | NA | -10.3* |
| | 4 | | 1.01 | 1.20 | 1.13 | 1.06 | 1.14 | -19.1 | -11.9 | -5.1 | -12.7 |
| | 40 | | 1.01 | 1.09 | 1.02 | 0.99 | 0.99 | -8.1 | -0.7 | 2.5 | 1.5 |
| PRO2669 | -80 | 1.06 | 1.06 | NA | NA | NA | 1.03* | NA | NA | NA | 3.0* |
| | 4 | | 1.06 | 1.10 | 1.02 | 1.03 | 1.13 | -3.6 | 3.6 | 2.2 | -7.2 |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 40 | | 1.06 | 1.06 | 0.99 | 1.04 | 1.04 | -0.2 | 6.1 | 2.0 | 1.5 |
| | -80 | | 1.06 | NA | NA | NA | 1.16* | NA | NA | NA | 0.2* |
| PRO2670 | 4 | 1.06 | 1.06 | 1.18 | 1.08 | 1.08 | 1.15 | -11.4 | -1.5 | -1.7 | -8.7 |
| | 40 | | 1.06 | 1.16 | 1.04 | 0.99 | 1.04 | -9.0 | 1.7 | 6.6 | 2.0 |

*樣品在測量前經過 5 次重複的凍融循環
NA: 未量測到

【符號說明】

【0292】

G:甘胺酸

S:絲胺酸

scDb:單鏈雙抗體

scFv:單鏈變異區片段

VH:重鏈可變域

VL:輕鏈可變域

# 序列表

<110> Numab 治療公司

<120> 針對ROR1與CD3之多特異性抗體

<130> 117181P877TW

<150> EP21154786.4
<151> 2021-02-02

<150> PCT/EP2021/087618
<151> 2021-12-23

<160> 122

<170> 專利版本 3.5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 1

Gly Phe Asp Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser
1 5 10

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 2

Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 3

Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr Thr Tyr Phe Asn
1 5 10 15

Leu

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 4

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 5

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 6

Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ile Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 7

Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr Thr Tyr Phe Asn
100 105 110

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 8

Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr Thr Tyr Phe Asn
100 105 110

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 9

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 10
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 10

Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr Thr Tyr Phe Asn
100 105 110

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 11

Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr Thr Tyr Phe Asn
100 105 110

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 12

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 13

Gly Leu Ser Leu Ser Arg Asn Ala Met Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 14

Gly Ile Asp Leu Ser Arg Asn Ala Met Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 15

Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 16

Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe
1 5 10

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 17

Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn Asn Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 18

Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 19

Ala Gly Gly Phe Ser Gly Glu Ile Arg Ala
1 5 10

<210> 20
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 20

Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Arg Asn
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val
85 90 95

Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 21

Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Arg Asn
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
85 90 95

Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 22

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 23
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 23

Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Arg Asn
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val
85 90 95

Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 24

Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Arg Asn
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
85 90 95

Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 25

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 26
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 26

Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Asn
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Leu Asp Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val Arg Gly
85 90 95

Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 27

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 28
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 28

Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Asn
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Leu Asp Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val Arg Gly
85 90 95

Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 29

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 30

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser
1 5 10

<210> 31
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 31

Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 32

Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile
1 5 10

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 33

Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 34

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 基於人工抗體的序列

<400> 35

Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala Asp Cys Tyr Val
1 5 10

<210> 36
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys
85 90 95

Ser Ser Ala Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val
100 105 110

Leu Gly

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 39

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala Met Gly
1 5 10

<210> 40
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 40

Ile Ile Ser Val Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 41
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 41

Arg Asp Arg His Gly Gly Asp Ser Ser Gly Ala Phe Tyr Leu
1 5 10

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 42

Gln Ser Ser Glu Ser Val Tyr Ser Asn Asn Gln Leu Ser
1 5 10

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 43

Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser
1 5

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 44

Ala Gly Gly Phe Ser Ser Ser Ser Asp Thr Ala
1 5 10

<210> 45
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 45

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Ser Val Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Arg His Gly Gly Asp Ser Ser Gly Ala Phe Tyr Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Glu Ser Val Tyr Ser Asn
20 25 30

Asn Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Ser
85 90 95

Ser Ser Asp Thr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 47
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 47

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Ser Val Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Arg His Gly Gly Asp Ser Ser Gly Ala Phe Tyr Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Glu Ser Val Tyr Ser Asn
20 25 30

Asn Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Ser
85 90 95

Ser Ser Asp Thr Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 49

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Trp Ile Cys
1 5 10

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 50

Cys Val Phe Thr Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 51

Arg Pro Val Ser Val Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
1 5 10

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 52

Gln Ala Ser Gln Ile Ile Ser Ser Arg Ser Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 53

Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 54

Gln Cys Thr Tyr Ile Asp Ser Asn Phe Gly Ala
1 5 10

<210> 55
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 55

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Cys Val Phe Thr Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Arg Pro Val Ser Val Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 56

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ile Ile Ser Ser Arg
20 25 30

Ser Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Ile Asp Ser Asn
85 90 95

Phe Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 57
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Cys Val Phe Thr Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Arg Pro Val Ser Val Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 58

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ile Ile Ser Ser Arg
20 25 30

Ser Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Ile Asp Ser Asn
85 90 95

Phe Gly Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 59

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn
1 5 10

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 60

His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 61
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 61

Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys Leu
1 5 10

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 62

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 63

Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser
1 5

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 64

Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr Thr Thr
1 5 10

<210> 65
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 65

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys Leu Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 120

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys Leu Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 67

Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 68
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys Leu Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 69

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys Leu Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 70

Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 71
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 71

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ala Asn
20 25 30

Tyr Tyr Pro Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Cys Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Asp Ile Thr Tyr Asp Ala Asn
50 55 60

Trp Thr Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Trp Tyr Ser Gly Trp Gly Gly Asp Leu Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 72
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 72

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Ser Asn
20 25 30

Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Cys Ile Tyr Val Gly Ser His Val Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Thr Ser Gly Ser Ser Val Leu Tyr Phe Lys Phe Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 73
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 基於人工抗體的序列

<400> 73

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Ser Asn
20 25 30

Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Cys Ile Tyr Val Gly Ser His Val Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Thr Ser Gly Ser Ser Val Leu Tyr Phe Lys Phe Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 74
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 74

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

```
Ile Gly Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn
    50                  55                  60

Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Asn Gln
65                  70                  75                  80

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Ala Arg His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly Tyr Ala Asn Asn
            100                 105                 110

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 75
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 75

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Val
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly Asn Tyr Gly
                85                  90                  95

Asp Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
            100                 105
```

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 76

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 77

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 78

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ile Ile Leu Gly
1 5 10

<210> 79
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 79

Phe Gly Glu Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 80
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 80

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 81

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 82

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Ala Leu Gly
1 5 10

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 83

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 84
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 84

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 85
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 85

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 86

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 87
<211> 753
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 87

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ile Ile Ser Ser Arg
20 25 30

Ser Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Ile Asp Ser Asn
85 90 95

Phe Gly Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
130 135 140

Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Ala Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser
165 170 175

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
180 185 190

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
195 200 205

Phe Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp
210 215 220

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
245 250 255

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
260 265 270

Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr
275 280 285

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile
290 295 300

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
325 330 335

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser
340 345 350

Ala Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
370 375 380

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
385 390 395 400

Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
405 410 415

Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly Cys Val Phe Thr Gly Asp Gly Thr Thr
420 425 430

Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
435 440 445

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
450 455 460

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Val Ser Val Tyr Tyr Tyr Gly
465 470 475 480

Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
485 490 495

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro
500 505 510

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln
515 520 525

Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln
530 535 540

Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu
545 550 555 560

Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
565 570 575

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
580 585 590

Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly Glu Ile Arg Ala Phe Gly Thr Gly
595 600 605

Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
610 615 620

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val
625 630 635 640

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
645 650 655

Cys Ala Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val
660 665 670

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr
675 680 685

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile
690 695 700

Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
705 710 715 720

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val Arg Gly Ile Ala Ser
725 730 735

Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
740 745 750

Ser

<210> 88
<211> 755
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 88

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Glu Ser Val Tyr Ser Asn
20 25 30

Asn Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Ser
85 90 95

Ser Ser Asp Thr Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
115 120 125

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
130 135 140

```
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Gly Leu Ala Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr
                165                 170                 175

Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn
    210                 215                 220

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
                245                 250                 255

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
            260                 265                 270

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn
        275                 280                 285

Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg
    290                 295                 300

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
305                 310                 315                 320

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
                325                 330                 335

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys
            340                 345                 350

Ser Ser Ala Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val
        355                 360                 365

Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
    370                 375                 380
```

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
385 390 395 400

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro
405 410 415

Gly Lys Cys Leu Glu Tyr Ile Gly Ile Ile Ser Val Gly Gly Phe Thr
420 425 430

Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
435 440 445

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
450 455 460

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg His Gly Gly Asp Ser Ser
465 470 475 480

Gly Ala Phe Tyr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
485 490 495

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Gln Leu Thr Gln
500 505 510

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
515 520 525

Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Phe
530 535 540

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Val Thr Ala Ser
545 550 555 560

Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
565 570 575

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
580 585 590

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly Glu Ile Arg Ala Phe Gly
595 600 605

```
Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    610                 615                 620

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln
625                 630                 635                 640

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                645                 650                 655

Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Arg Asn Ala Met Ser
            660                 665                 670

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile
        675                 680                 685

Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe
    690                 695                 700

Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
705                 710                 715                 720

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val Arg Gly Ile
                725                 730                 735

Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            740                 745                 750

Val Ser Ser
        755
```

<210> 89
<211> 758
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 89

```
Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg
            20                  25                  30
```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
115 120 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
130 135 140

Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
165 170 175

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
180 185 190

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
195 200 205

Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
245 250 255

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
260 265 270

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
275 280 285

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
290 295 300

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
305 310 315 320

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
325 330 335

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
340 345 350

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
370 375 380

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
385 390 395 400

Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
405 410 415

Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala
420 425 430

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
435 440 445

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
450 455 460

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys
465 470 475 480

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
485 490 495

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
500 505 510

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
515 520 525

Glu Asn Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
530 535 540

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
545 550 555 560

Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
565 570 575

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly
580 585 590

Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Thr Gly Thr
595 600 605

Lys Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
610 615 620

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu
625 630 635 640

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
645 650 655

Ala Val Ser Gly Phe Asp Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg
660 665 670

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg
675 680 685

Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
690 695 700

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
705 710 715 720

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser
725 730 735

Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr
740 745 750

Leu Val Thr Val Ser Ser
755

<210> 90
<211> 758
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 90

Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
115 120 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
130 135 140

Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
165 170 175

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
180 185 190

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
195 200 205

Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
245 250 255

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
260 265 270

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
275 280 285

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
290 295 300

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
305 310 315 320

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
325 330 335

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
340 345 350

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
370 375 380

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
385 390 395 400

Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
405 410 415

Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala
420 425 430

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
435 440 445

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
450 455 460

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys
465 470 475 480

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
485 490 495

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
500 505 510

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
515 520 525

Glu Asn Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
530 535 540

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
545 550 555 560

Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
565 570 575

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly
580 585 590

Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Cys Gly Thr
595 600 605

Lys Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
610 615 620

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu
625                 630                 635                 640

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                645                 650                 655

Ala Val Ser Gly Phe Asp Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg
            660                 665                 670

Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg
        675                 680                 685

Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    690                 695                 700

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
705                 710                 715                 720

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser
                725                 730                 735

Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr
            740                 745                 750

Leu Val Thr Val Ser Ser
        755
```

<210> 91
<211> 751
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 91

```
Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
```

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
115 120 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
130 135 140

Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
165 170 175

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
180 185 190

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
195 200 205

Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
245 250 255

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
260 265 270

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
275 280 285

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
290 295 300

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
305 310 315 320

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
325 330 335

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
340 345 350

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
370 375 380

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
385 390 395 400

Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
405 410 415

Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala
420 425 430

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
435 440 445

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
450 455 460

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys
465 470 475 480

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
485 490 495

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
500 505 510

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
515 520 525

Gln Asn Val Trp Asn Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro
530 535 540

Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
545 550 555 560

Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
565 570 575

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
580 585 590

Ala Gly Gly Phe Ser Gly Glu Ile Arg Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys
595 600 605

Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
610 615 620

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
645 650 655

Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln
660 665 670

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly
675 680 685

Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys
690 695 700

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
705 710 715 720

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser
725 730 735

Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
740 745 750

<210> 92
<211> 751
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 92

Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
115 120 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
130 135 140

Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
165 170 175

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
180 185 190

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
195 200 205

Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
245 250 255

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
260 265 270

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
275 280 285

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
290 295 300

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
305 310 315 320

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
325 330 335

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
340 345 350

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
370 375 380

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
385 390 395 400

Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
405 410 415

Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala
420 425 430

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
435 440 445

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
450 455 460

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys
465 470 475 480

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
485 490 495

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
500 505 510

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
515 520 525

Gln Asn Val Trp Asn Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro
530 535 540

Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
545 550 555 560

Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
565 570 575

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
580 585 590

Ala Gly Gly Phe Ser Gly Glu Ile Arg Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys
595 600 605

Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
610 615 620

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
645 650 655

Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln
660 665 670

Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly
675 680 685

Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys
690 695 700

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
705 710 715 720

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser
725 730 735

Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
740 745 750

<210> 93
<211> 749
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 93

Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
115 120 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
130 135 140

Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
165 170 175

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
180 185 190

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
195 200 205

Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
245 250 255

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
260 265 270

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
275 280 285

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
290 295 300

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
305 310 315 320

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
325 330 335

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
340 345 350

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
370 375 380

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
385 390 395 400

Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
405 410 415

Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala
420 425 430

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
435 440 445

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
450 455 460

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys
465 470 475 480

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
485 490 495

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
500 505 510

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
515 520 525

Gln Asn Val Trp Asn Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro
530 535 540

Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
545 550 555 560

Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
565 570 575

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
580 585 590

Ala Gly Gly Phe Ser Gly Glu Ile Arg Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys
595 600 605

Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
610 615 620

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
645 650 655

Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln
660 665 670

Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly
675 680 685

Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys
690 695 700

Thr Ser Thr Thr Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
705 710 715 720

Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys
725 730 735

Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
740 745

<210> 94
<211> 749
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 基於人工抗體的序列

<400> 94

```
Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr
                85                  90                  95

Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
            100                 105                 110

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
    130                 135                 140

Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160

Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
                165                 170                 175

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
            180                 185                 190

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
        195                 200                 205

Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly
    210                 215                 220
```

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
245 250 255

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
260 265 270

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
275 280 285

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
290 295 300

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
305 310 315 320

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
325 330 335

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
340 345 350

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
370 375 380

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
385 390 395 400

Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
405 410 415

Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala
420 425 430

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
435 440 445

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
450 455 460

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys
465 470 475 480

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
485 490 495

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
500 505 510

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
515 520 525

Gln Asn Val Trp Asn Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro
530 535 540

Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
545 550 555 560

Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
565 570 575

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
580 585 590

Ala Gly Gly Phe Ser Gly Glu Ile Arg Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys
595 600 605

Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
610 615 620

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
645 650 655

Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln
660 665 670

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly
675 680 685

Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys
690 695 700

Thr Ser Thr Thr Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
705 710 715 720

Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys
725 730 735

Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
740 745

<210> 95
<211> 495
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 95

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp
145 150 155 160

Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Phe Glu Leu Thr Gln
260 265 270

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
275 280 285

Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
290 295 300

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu
305 310 315 320

Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
325 330 335

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
340 345 350

Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr Thr Thr Phe Gly Cys Gly
355 360 365

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln
370 375 380

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
385 390 395 400

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
405 410 415

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
420 425 430

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
435 440 445

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
450 455 460

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
465 470 475 480

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
485 490 495

<210> 96
<211> 518
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 96

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp
145 150 155 160

Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
260 265 270

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
275 280 285

```
Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg
    290                 295                 300

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser
305                 310                 315                 320

Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
            340                 345                 350

Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly
        355                 360                 365

Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
    370                 375                 380

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val
385                 390                 395                 400

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
                405                 410                 415

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met
            420                 425                 430

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His
        435                 440                 445

Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg
    450                 455                 460

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
465                 470                 475                 480

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
                485                 490                 495

Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys Leu Trp Gly Gln Gly Thr
            500                 505                 510
```

Leu Val Thr Val Ser Ser
515

<210> 97
<211> 495
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 97

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp
145 150 155 160

Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Phe Glu Leu Thr Gln
260 265 270

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
275 280 285

Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
290 295 300

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu
305 310 315 320

Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
325 330 335

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
340 345 350

Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr Thr Thr Phe Gly Cys Gly
355 360 365

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln
370 375 380

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
385 390 395 400

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
405 410 415

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
420 425 430

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
435 440 445

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
450 455 460

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
465 470 475 480

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
485 490 495

<210> 98
<211> 518
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 98

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp
145 150 155 160

Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
260 265 270

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
275 280 285

Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg
290 295 300

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser
305 310 315 320

Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
325 330 335

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
340 345 350

Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly
355 360 365

Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
370 375 380

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val
385 390 395 400

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
405 410 415

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met
420 425 430

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His
435 440 445

Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg
450 455 460

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
465 470 475 480

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
485 490 495

Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys Leu Trp Gly Gln Gly Thr
500 505 510

Leu Val Thr Val Ser Ser
515

<210> 99
<211> 486
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 99

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu
145 150 155 160

Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Leu Asp
195 200 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
210 215 220

Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
260 265 270

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser
275 280 285

Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
290 295 300

Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
305 310 315 320

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
325 330 335

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser
340 345 350

Thr Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
355 360 365

Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
370 375 380

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser
385 390 395 400

Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
405 410 415

Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
420 425 430

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
435 440 445

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
450 455 460

Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr
465 470 475 480

Lys Val Thr Val Leu Gly
485

<210> 100
<211> 509
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 100

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu
145 150 155 160

Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Leu Asp
195 200 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
210 215 220

Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
260 265 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser
275 280 285

Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala Trp
290 295 300

Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
325 330 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
340 345 350

Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly Gln
355 360 365

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
385 390 395 400

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
405 410 415

Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
420 425 430

Cys Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr
435 440 445

Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
450 455 460

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
465 470 475 480

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe
485 490 495

Lys Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
500 505

<210> 101
<211> 486
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 101

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu
145 150 155 160

Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Leu Asp
195 200 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
210 215 220

Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
260 265 270

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser
275 280 285

Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
290 295 300

```
Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
305                 310                 315                 320

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
                325                 330                 335

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser
            340                 345                 350

Thr Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
        355                 360                 365

Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
    370                 375                 380

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser
385                 390                 395                 400

Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
                405                 410                 415

Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
            420                 425                 430

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
        435                 440                 445

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
    450                 455                 460

Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr
465                 470                 475                 480

Lys Val Thr Val Leu Gly
                485
```

<210> 102
<211> 509
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 102

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu
145 150 155 160

Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Leu Asp
195 200 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
210 215 220

Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
260 265 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser
275 280 285

Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala Trp
290 295 300

Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
325 330 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
340 345 350

Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly Gln
355 360 365

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
385 390 395 400

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
405 410 415

Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
420 425 430

Cys Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr
435 440 445

Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
450 455 460

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
465 470 475 480

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe
485 490 495

Lys Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
500 505

<210> 103
<211> 488
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 103

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Ser Leu
145 150 155 160

Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Phe Cys Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
260 265 270

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile
275 280 285

Asn Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
290 295 300

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg
305 310 315 320

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
325 330 335

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly
340 345 350

Ser Ser Thr Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
370 375 380

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser
385 390 395 400

Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro
405 410 415

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
420 425 430

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
435 440 445

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
450 455 460

Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr
465 470 475 480

Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
485

<210> 104
<211> 511
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 104

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Ser Leu
145 150 155 160

Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Phe Cys Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
260 265 270

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
275 280 285

Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
290 295 300

```
Ala Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser
305                 310                 315                 320

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
                325                 330                 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
            340                 345                 350

Phe Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp
        355                 360                 365

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
385                 390                 395                 400

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                405                 410                 415

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
            420                 425                 430

Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala
        435                 440                 445

Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    450                 455                 460

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
465                 470                 475                 480

Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly
                485                 490                 495

Pro Phe Lys Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            500                 505                 510
```

<210> 105
<211> 488
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 基於人工抗體的序列

<400> 105

```
Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
            20                  25                  30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
        35                  40                  45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65                  70                  75                  80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
                85                  90                  95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
    130                 135                 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Ser Leu
145                 150                 155                 160

Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
                165                 170                 175

Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
            180                 185                 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
        195                 200                 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
    210                 215                 220
```

Phe Cys Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
260 265 270

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile
275 280 285

Asn Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
290 295 300

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg
305 310 315 320

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
325 330 335

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly
340 345 350

Ser Ser Thr Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
370 375 380

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser
385 390 395 400

Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro
405 410 415

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
420 425 430

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
435 440 445

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
450 455 460

Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr
465 470 475 480

Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
485

<210> 106
<211> 511
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 106

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Ser Leu
145 150 155 160

Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Phe Cys Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
260 265 270

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
275 280 285

Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
290 295 300

Ala Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser
305 310 315 320

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
340 345 350

Phe Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp
355 360 365

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
385 390 395 400

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
405 410 415

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
420 425 430

Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala
435 440 445

Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
450 455 460

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
465 470 475 480

Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly
485 490 495

Pro Phe Lys Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
500 505 510

<210> 107
<211> 758
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 107

Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro
115 120 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
130 135 140

Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
165 170 175

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
180 185 190

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
195 200 205

Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
245 250 255

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
260 265 270

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
275 280 285

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
290 295 300

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
305 310 315 320

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
325 330 335

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
340 345 350

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val
370 375 380

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
385 390 395 400

Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
405 410 415

Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala
420 425 430

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
435 440 445

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr
450 455 460

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys
465 470 475 480

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
485 490 495

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
500 505 510

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
515 520 525

Glu Asn Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
530 535 540

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
545 550 555 560

Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
565 570 575

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly
580 585 590

Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Thr Gly Thr
595 600 605

Lys Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
610 615 620

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu
625 630 635 640

Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
645 650 655

Ala Val Ser Gly Phe Asp Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg
660 665 670

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg
675 680 685

Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
690 695 700

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
705 710 715 720

Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser
725 730 735

Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr
740 745 750

Gln Val Thr Val Ser Ser
755

<210> 108
<211> 751
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 108

Ala Phe Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro
115 120 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
130 135 140

Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
165 170 175

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
180 185 190

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
195 200 205

Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
245 250 255

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
260 265 270

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
275 280 285

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
290 295 300

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
305 310 315 320

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
325 330 335

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
340 345 350

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val
370 375 380

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
385 390 395 400

Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
405 410 415

Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala
420 425 430

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
435 440 445

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr
450 455 460

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys
465 470 475 480

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
485 490 495

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
500 505 510

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
515 520 525

Gln Asn Val Trp Asn Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro
530 535 540

Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
545 550 555 560

Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
565 570 575

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
580 585 590

Ala Gly Gly Phe Ser Gly Glu Ile Arg Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys
595 600 605

Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
610 615 620

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
645 650 655

Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln
660 665 670

Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly
675 680 685

Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys
690 695 700

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
705 710 715 720

Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser
725 730 735

Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
740 745 750

<210> 109
<211> 495
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 109

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val
130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp
145 150 155 160

Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Phe Glu Leu Thr Gln
260 265 270

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
275 280 285

Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
290 295 300

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu
305 310 315 320

Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
325 330 335

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
340 345 350

Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr Thr Thr Phe Gly Cys Gly
355 360 365

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln
370 375 380

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
385 390 395 400

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
405 410 415

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
420 425 430

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
435 440 445

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
450 455 460

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
465 470 475 480

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
485 490 495

<210> 110
<211> 518
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 110

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val
130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp
145 150 155 160

Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
260 265 270

Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
275 280 285

Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg
290 295 300

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser
305 310 315 320

Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
325 330 335

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
340 345 350

Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly
355 360 365

Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
370 375 380

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val
385 390 395 400

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
405 410 415

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met
420 425 430

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His
435 440 445

Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg
450 455 460

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
465 470 475 480

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
485 490 495

Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys Leu Trp Gly Gln Gly Thr
500 505 510

Gln Val Thr Val Ser Ser
515

<210> 111
<211> 495
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 111

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val
130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp
145 150 155 160

Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Phe Glu Leu Thr Gln
260 265 270

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
275 280 285

Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
290 295 300

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu
305 310 315 320

Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
325 330 335

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
340 345 350

Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr Thr Thr Phe Gly Cys Gly
355 360 365

```
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln
    370                 375                 380

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
385                 390                 395                 400

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
                405                 410                 415

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
            420                 425                 430

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
        435                 440                 445

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
    450                 455                 460

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
465                 470                 475                 480

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
                485                 490                 495
```

<210> 112
<211> 518
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 112

```
Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val
130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp
145 150 155 160

Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys
165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
260 265 270

Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
275 280 285

Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg
290 295 300

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser
305 310 315 320

Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
325 330 335

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
340 345 350

Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly
355 360 365

Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
370 375 380

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val
385 390 395 400

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
405 410 415

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met
420 425 430

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His
435 440 445

Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg
450 455 460

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
465 470 475 480

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
485 490 495

Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe Lys Leu Trp Gly Gln Gly Thr
500 505 510

Gln Val Thr Val Ser Ser
515

<210> 113
<211> 495
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 113

```
Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
                85                  90                  95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val
    130                 135                 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp
145                 150                 155                 160

Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                165                 170                 175

Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
            180                 185                 190
```

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Phe Glu Leu Thr Gln
260 265 270

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
275 280 285

Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
290 295 300

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu
305 310 315 320

Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
325 330 335

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
340 345 350

Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr Thr Thr Phe Gly Cys Gly
355 360 365

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln
370 375 380

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
385 390 395 400

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
405 410 415

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
420 425 430

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
435 440 445

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
450 455 460

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
465 470 475 480

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
485 490 495

<210> 114
<211> 511
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 114

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Ser Leu
145 150 155 160

Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
210 215 220

Phe Cys Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Gln Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln
260 265 270

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
275 280 285

Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
290 295 300

Ala Trp Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser
305 310 315 320

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
340 345 350

Phe Cys Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp
355 360 365

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
385 390 395 400

Gly Arg Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
405 410 415

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
420 425 430

Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala
435 440 445

Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
450 455 460

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
465 470 475 480

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly
485 490 495

Pro Phe Lys Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
500 505 510

<210> 115
<211> 495
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 115

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Tyr Ile Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val
130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp
145 150 155 160

Leu Ser Ser Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Arg Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala
180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr
210 215 220

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Tyr Leu Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Phe Glu Leu Thr Gln
260 265 270

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
275 280 285

Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asn Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
290 295 300

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu
305 310 315 320

Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
325 330 335

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
340 345 350

Tyr Cys Gln Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Thr Thr Thr Phe Gly Cys Gly
355 360 365

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln
370 375 380

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
385 390 395 400

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Ser Asn Asn Tyr Leu
405 410 415

Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
420 425 430

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
435 440 445

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
450 455 460

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ala Cys Ser Ser Ala
465 470 475 480

Asp Cys Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
485 490 495

<210> 116
<211> 509
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<400> 116

Ala Gln Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Trp Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Ser Gly
85 90 95

Glu Ile Arg Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu
145 150 155 160

Ser Arg Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Ile Ile Leu Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Leu Asp
195 200 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
210 215 220

Val Arg Gly Ile Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ser Phe Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg Val Gln Pro Gly
260 265 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser
275 280 285

Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala Trp
290 295 300

Ile Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
325 330 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
340 345 350

Ala Arg Gly Gly Trp Thr Gly Thr Ser His Ser Asn Ile Trp Gly Gln
355 360 365

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Arg
385 390 395 400

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
405 410 415

Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
420 425 430

Cys Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr
435 440 445

Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
450 455 460

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
465 470 475 480

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Ser Thr Gly Pro Phe
485 490 495

Lys Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
500 505

<210> 117
<211> 406
<212> PRT
<213> 現代人種(Homo sapiens)

<400> 117

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Gln Glu Thr
20 25 30

Glu Leu Ser Val Ser Ala Glu Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Ile
35 40 45

Ser Ser Glu Leu Asn Lys Asp Ser Tyr Leu Thr Leu Asp Glu Pro Met
50 55 60

Asn Asn Ile Thr Thr Ser Leu Gly Gln Thr Ala Glu Leu His Cys Lys
65 70 75 80

Val Ser Gly Asn Pro Pro Pro Thr Ile Arg Trp Phe Lys Asn Asp Ala
85 90 95

Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Leu Ser Phe Arg Ser Thr Ile Tyr
100 105 110

Gly Ser Arg Leu Arg Ile Arg Asn Leu Asp Thr Thr Asp Thr Gly Tyr

115 120 125

Phe Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly
130 135 140

Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Pro Pro Thr Ala Ser Pro Gly Tyr
145 150 155 160

Ser Asp Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile
165 170 175

Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu Ser Leu
180 185 190

His Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Gln Ile Thr Ala Ala Phe Thr Met
195 200 205

Ile Gly Thr Ser Ser His Leu Ser Asp Lys Cys Ser Gln Phe Ala Ile
210 215 220

Pro Ser Leu Cys His Tyr Ala Phe Pro Tyr Cys Asp Glu Thr Ser Ser
225 230 235 240

Val Pro Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Ile Leu Glu
245 250 255

Asn Val Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn Pro Met
260 265 270

Ile Leu Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Cys Glu Asp Leu Pro Gln Pro
275 280 285

Glu Ser Pro Glu Ala Ala Asn Cys Ile Arg Ile Gly Ile Pro Met Ala
290 295 300

Asp Pro Ile Asn Lys Asn His Lys Cys Tyr Asn Ser Thr Gly Val Asp
305 310 315 320

Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Lys Ser Gly Arg Gln Cys Gln Pro
325 330 335

Trp Asn Ser Gln Tyr Pro His Thr His Thr Phe Thr Ala Leu Arg Phe
340 345 350

Pro Glu Leu Asn Gly Gly His Ser Tyr Cys Arg Asn Pro Gly Asn Gln
355 360 365

Lys Glu Ala Pro Trp Cys Phe Thr Leu Asp Glu Asn Phe Lys Ser Asp
370 375 380

Leu Cys Asp Ile Pro Ala Cys Asp Ser Lys Asp Ser Lys Glu Lys Asn
385 390 395 400

Lys Met Glu Ile Leu Tyr
405

<210> 118
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<220>
<221> 重複
<222> (1)..(5)
<223> n重複，n是至少為1的整數

<400> 118

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<220>
<221> 重複
<222> (1)..(5)
<223> n重複，n是至少為1的整數

<400> 119

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 120

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<220>
<221> 重複
<222> (1)..(4)
<223> n重複，n是至少為1的整數

<400> 120

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 121
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<220>
<221> 重複
<222> (1)..(5)
<223> n重複，n是1或2

<400> 121

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 122
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基於人工抗體的序列

<220>
<221> 重複
<222> (1)..(5)
<223> n重複，n是1, 2, 3, 4, 5, 6, 7或 8

<400> 122

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

# 【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種多特異性抗體，包括：

a) 一個或兩個結合域，特異地結合於ROR1的胞外域(ROR1-BD)；和

b) 一個結合域，特異地結合於CD3(CD3-BD)；

其中

-該多特異性抗體不包含免疫球蛋白Fc區；

-該ROR1-BD彼此獨立地包含選自由下列所組成的一組CDR序列：

SEQ ID NO: 1的HCDR1序列，

SEQ ID NO: 2的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 3的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 4的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 5的LCDR2序列，和

SEQ ID NO: 6的LCDR3序列；

和/或選自由下列所組成的一組CDR序列：

SEQ ID NO: 13或14的HCDR1序列，

SEQ ID NO: 15的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 16的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 17的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 18的LCDR2序列，和

SEQ ID NO: 19的LCDR3序列；

該CD3-BD包含選自由下列所組成的一組CDR序列：

SEQ ID NO: 30的HCDR1序列，

SEQ ID NO: 31的HCDR2序列，

SEQ ID NO: 32的HCDR3序列，

SEQ ID NO: 33的LCDR1序列，

SEQ ID NO: 34的LCDR2序列，和

SEQ ID NO: 35的LCDR3序列。

【請求項2】如請求項1所述的多特異性抗體，其中在該多特異性抗體包含兩個ROR1-BD的情況下，該兩個ROR1-BD包含相同的CDR組，即兩個ROR1-BD都包含SEQ ID NO: 1至6的CDR或SEQ ID NO: 13/14至19的CDR。

【請求項3】如請求項1或2所述的多特異性抗體，其中該多特異性抗體進一步包含特異地結合於人類血清白蛋白的一結合域(hSA-BD)。

【請求項4】如上述請求項之任一項所述的多特異性抗體，其中該多特異性抗體具有以下特徵1)至5)中的一個或多個：

1) 該多特異性抗體不包含CH1和/或CL區；

2) 如果存在的話，該一個或兩個ROR1-BD、該CDR-BD和該hSA-BD包含VH1a、VH1b、VH3或VH4結構域之框架序列FR1至FR4；特別是VH3或VH4結構域之框架序列FR1至FR4；特別是VH3結構域之框架序列FR1至FR4；或者

如果存在的話，該一個或兩個ROR1-BD、該CDR-BD和該hSA-BD包含一VH結構域，該VH結構域包含VH框架區FR1、FR2、FR3和FR4，該些VH框架區FR1、FR2、FR3和FR4選自VH框架亞型，特別是選自VH框架亞型VH1a、VH1b、VH3和VH4，特別是選自VH框架亞型VH3和VH4，特別是VH3亞型；其中該些VH框架區FR1、FR2、FR3和FR4具有以下取代方式(AHo編號)：在胺基酸位置12的精胺酸(R)； 胺基酸位置103的蘇胺酸(T)和胺基酸位置144的麩醯胺酸(Q)；

3) 如果存在的話，該一個或兩個ROR1-BD、該CDR-BD和該hSA-BD包含一VL結構域，該VL結構域包含VL框架區FR1、FR2和FR3，該些VL框架區FR1、FR2和FR3選自Vκ亞型，特別是選自Vκ1和Vκ3亞型，特別是Vκ1亞型；該VL結構域還包括VL框架FR4，該框架FR4是Vλ FR4，特別是一Vλ FR4，其包含與SEQ ID NO：76至SEQ ID NO:83中的任一個具有至少70、80、90%相同性的胺基酸序列，更特別是選自SEQ ID NO: 76至SEQ ID NO: 83 中任一個的Vλ FR4，特別是依照 SEQ ID NO: 76或83的Vλ FR4；

4) 該多特異性抗體是人源化的，特別是所述多特異性抗體是人源化的並且包含兔子來源的CDR；

5) 該多特異性抗體是三特異性的，特別是三特異性和三價或三特異性和四價。

【請求項5】如上述請求項之任一項所述的多特異性抗體，其中所述多特異性抗體的形式是選自scDb-scFv、scMATCH3、MATCH3和MATCH4。

【請求項6】如上述請求項之任一項的多特異性抗體，其中該一個或兩個ROR1-BD包括：

a) 一VH序列，與選自SEQ ID NO：7和10的任一胺基酸序列至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同；和

b) 一VL序列，與選自SEQ ID NO: 9和12的任一胺基酸序列至少90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 相同；

或

a) 一VH序列，與選自SEQ ID NO: 20, 23, 26和28的任一胺基酸序列至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99% 相同；和

b) 一VL序列，與選自SEQ ID NO: 22, 25, 27和29的任一胺基酸序列至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同；

或

a) 一VH序列，與選自SEQ ID NO: 8和11的任一胺基酸序列至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同；和

b) 一VL序列，與選自SEQ ID NO: 9和12的任一胺基酸序列至少90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 相同；

或

a) 一VH序列，與選自SEQ ID NO: 21和24的任一胺基酸序列至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同；和

b) 一VL序列，與選自SEQ ID NO: 22和25的任一胺基酸序列至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同。

【請求項7】如上述請求項之任一項所述的多特異性抗體，其中該一個或兩個ROR1-BD包括

a) SEQ ID NO: 7的VH序列和SEQ ID NO: 9的VL序列；或

b) SEQ ID NO: 10的VH序列和SEQ ID NO: 12的VL序列；或

c) SEQ ID NO: 20的VH序列和SEQ ID NO: 22的VL序列；或

d) SEQ ID NO: 23的VH序列和SEQ ID NO: 25的VL序列；或

e) SEQ ID NO: 8的VH序列和SEQ ID NO: 9的VL序列；或

f) SEQ ID NO: 11的VH序列和SEQ ID NO: 12的VL序列；或

g) SEQ ID NO: 21的VH序列和SEQ ID NO: 22的VL序列；或

h) SEQ ID NO: 24的VH序列和SEQ ID NO: 25的VL序列；或

i) SEQ ID NO: 26的VH序列和SEQ ID NO: 27的VL序列；或

j) SEQ ID NO: 28的VH序列和SEQ ID NO: 29的VL序列；

特別是其中該一個或兩個ROR1-BD包括

a) SEQ ID NO: 7 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 9 的 VL 序列；或

b) SEQ ID NO: 10 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 12 的 VL 序列；或

c) SEQ ID NO: 23 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 25 的 VL 序列；或

d) SEQ ID NO: 8 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 9 的 VL 序列；或

e) SEQ ID NO: 11 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 12 的 VL 序列；或

f) SEQ ID NO: 24 的 VH 序列和 SEQ ID NO: 25 的 VL 序列。

【請求項8】如上述請求項之任一項所述的多特異性抗體，其中該CD3-BD包括

a) 一VH序列，與選自SEQ ID NO: 36或37的任一胺基酸序列至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同；和

b) 一VL序列，與選自SEQ ID NO: 38的任一胺基酸序列至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同；

特別是

a) 一VH結構域，包含SEQ ID NO: 36或37的胺基酸序列，和

b) 一VL結構域，包含SEQ ID NO: 38的胺基酸序列。

【請求項9】如請求項4所述的多特異性抗體，其中該hSA-BD包括：

(i) 包括SEQ ID NO: 47的胺基酸序列的一VH結構域及包括SEQ ID NO: 48的胺基酸序列的一VL結構域；或

(ii) 包括 SEQ ID NO: 45 的胺基酸序列的一 VH 結構域及包括 SEQ ID NO: 46 的胺基酸序列的一 VL 結構域；或

(iii) 包括 SEQ ID NO: 55 的胺基酸序列的一 VH 結構域及包括 SEQ ID NO: 56 的胺基酸序列的一 VL 結構域；或

(iv) 包括 SEQ ID NO: 57 的胺基酸序列的一 VH 結構域及包括，SEQ ID NO: 58 的胺基酸序列的一 VL 結構域；或

(v) 包括 SEQ ID NO: 65 的胺基酸序列的一 VH 結構域及包括 SEQ ID NO: 67 的胺基酸序列的一 VL 結構域；或

(vi) 包括 SEQ ID NO: 66 的胺基酸序列的一 VH 結構域及包括 SEQ ID NO: 67 的胺基酸序列的一 VL 結構域；或

(vii) 包括 SEQ ID NO: 68 的胺基酸序列的一 VH 結構域及包括 SEQ ID NO: 70 的胺基酸序列的一 VL 結構域；或

(viii) 包括 SEQ ID NO: 69 的胺基酸序列的一 VH 結構域及包括 SEQ ID NO: 70 的胺基酸序列的一 VL 結構域；或

特別是

(v) 包括 SEQ ID NO: 65 的胺基酸序列的一 VH 結構域及包括 SEQ ID NO: 67 的胺基酸序列的一 VL 結構域；或

(vi) 包括 SEQ ID NO: 66 的胺基酸序列的一 VH 結構域及包括 SEQ ID NO: 67 的胺基酸序列的一 VL 結構域；或

(vii) 包括 SEQ ID NO: 68 的胺基酸序列的一 VH 結構域及包括 SEQ ID NO: 70 的胺基酸序列的一 VL 結構域；或

(viii) 包括 SEQ ID NO: 69 的胺基酸序列的一 VH 結構域及包括 SEQ ID NO: 70 的胺基酸序列的一 VL 結構域。

【請求項10】一種如請求項1、4、6和7中任一項所定義的ROR1-BD。

【請求項11】一種或兩種核酸，編碼如請求項1至9中任一項所述的多特異性抗體或如請求項10所述的ROR1-BD。

【請求項12】一種或兩種載體，包括如請求項11所述的一種或兩種核酸。

【請求項13】一種或多種宿主細胞，包含如請求項12所述的一種或兩種載體。

【請求項14】一種藥物組合物，包括請求項1至9中任一項所述的多特異性抗體和藥學上可接受的載體。

【請求項15】如請求項1至9中任一項所述的多特異性抗體或如請求項14所述的藥物組合物，用於治療表達ROR1的癌症，特別是表達ROR1的癌症係選自慢性淋巴細胞白血病/小淋巴細胞淋巴瘤(CLL/SLL)、急性骨髓性細胞白血病(AML)、急性淋巴性細胞白血病(ALL)、套細胞淋巴瘤(MCL) 、毛細胞白血病、濾泡性淋巴瘤(FL) 、邊緣區淋巴瘤(MZL) 、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL) 、瀰漫性大型B 細胞淋巴瘤(DLBCL) 、Richter綜合徵(RS) 、 肺癌、胰腺癌、前列腺癌、大腸癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、膠質母細胞瘤、睾丸癌、子宮癌、腎上腺癌、黑色素瘤、神經母細胞瘤、肉瘤和腎癌。

# 【發明圖式】

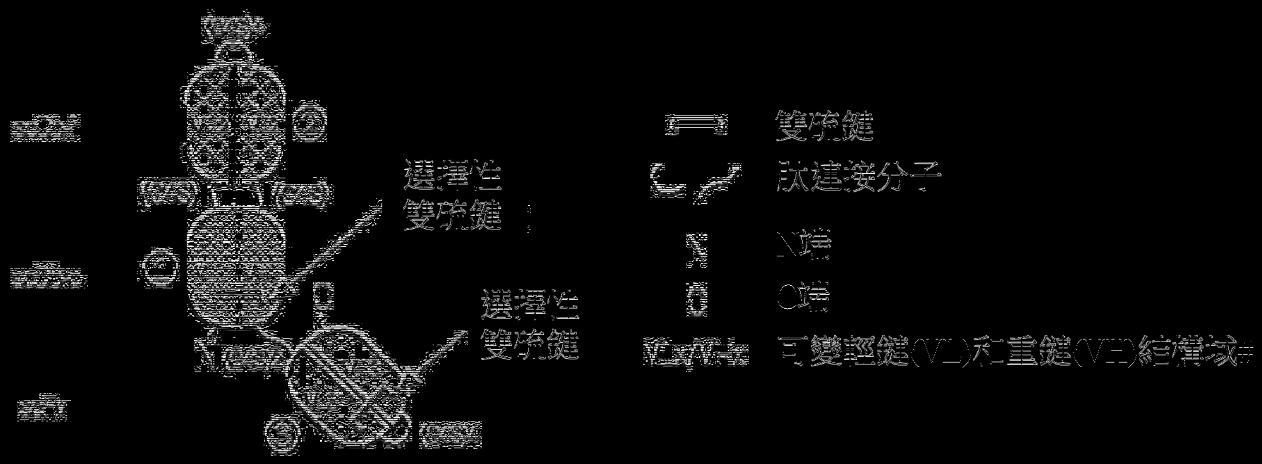

第一部
幾何水平向
A-M-D
第一幾何水平向
第一幾何垂直向
第一幾何水平向
第一幾何垂直向
第一幾何水平向
第一幾何垂直向
第一幾何水平向
第一幾何垂直向

第一圖
第一實施例VOR-A-VB-28-E型航管台
航向
[ILS/DME] 儀降水刊發


第二圖
第二實施例VOR-A-VB-28-E型航管台
航向
[ILS/DME] 儀降水刊發


第三圖
第三實施例VOR-A-VB-28-E型航管台
航向
[ILS/DME] 儀降水刊發


第四圖
第四實施例VOR-A-VB-28-E型航管台
航向
[ILS/DME] 儀降水刊發

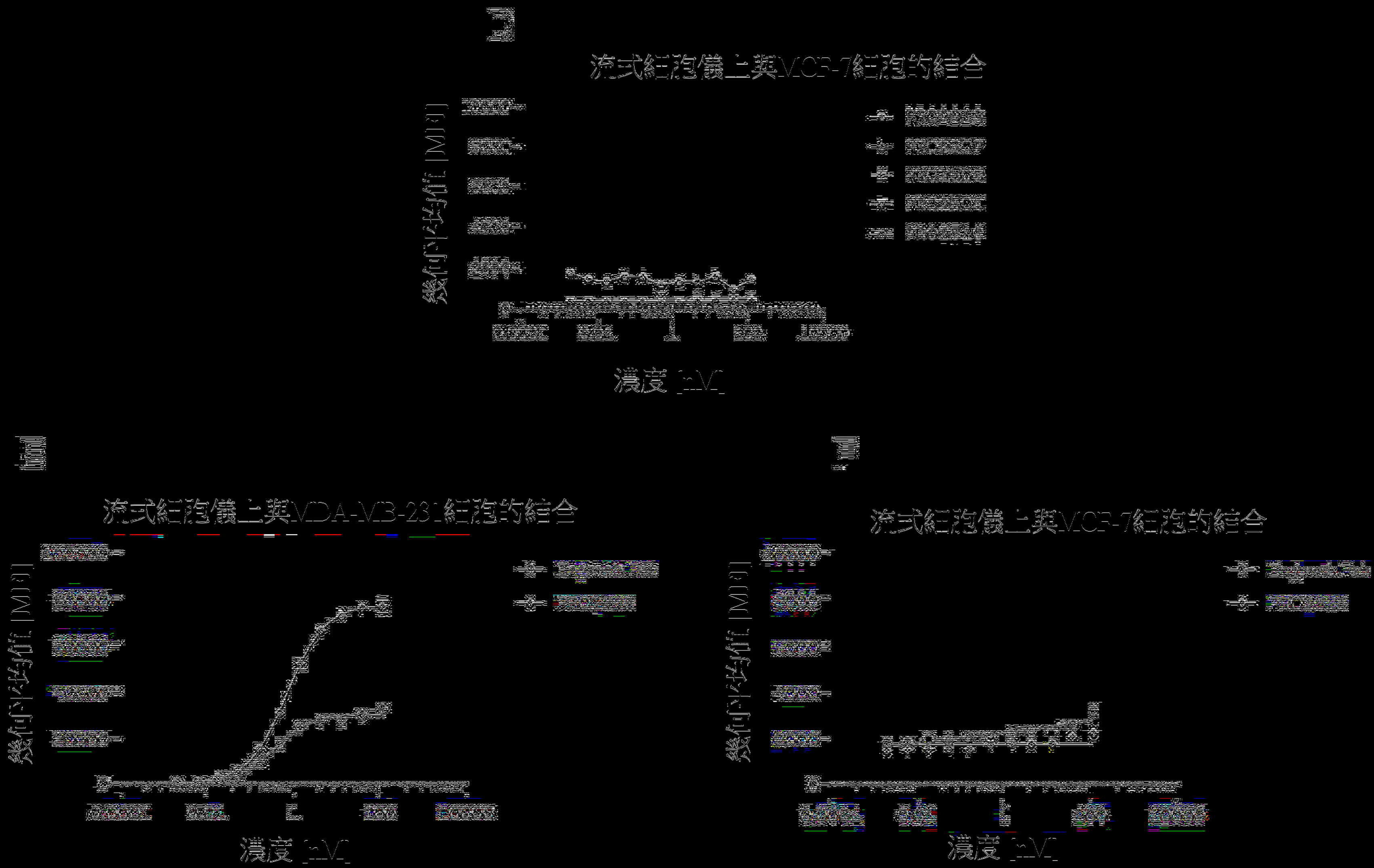



第 3 圖

圖 4
載板
基板
PRO2557 (ROR1 結合劑)
55-39-G02-sc06
PRO2286 (ROR1 結合劑)
55-39-G02-sc02
PRO2287 (ROR1 結合劑)
55-39-G02-sc02
第一活性藥物結合物
第二活性藥物結合物
第三活性藥物結合物
第一載藥連接子-酶可裂解單元-間隔單元-VDA-VB-23
第二載藥連接子-酶可裂解單元-間隔單元-VDA-VB-23
第三載藥連接子-酶可裂解單元-間隔單元-VDA-VB-23
載體分子 [VM1]
載體分子 [VM2]
載體分子 [VM3]

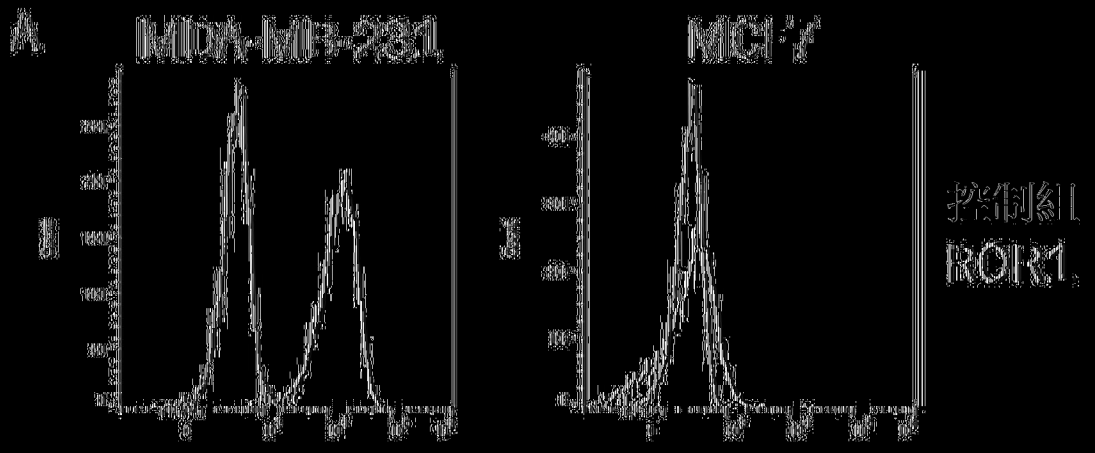
圖 5


(a)
表示經由實施例DA-VB-23之組合物
2RO2509 (ROR1 結構式: 55-39-C02-s02)
經時水平位移 [MD]
抵抗力
(b)
表示經由實施例DA-VB-23之組合物
2RO2510 (ROR1 結構式: 55-39-C02-s05)
經時水平位移 [MD]
抵抗力
(c)
表示經由實施例DA-VB-23之組合物
2RO2507 (ROR1 結構式: 55-38-C07-s02)
2RO2508 (ROR1 結構式: 55-38-C07-s06)
經時水平位移 [MD]
抵抗力



流式細胞儀上與MCF-7細胞的結合
幾何平均值 [MFI]
濃度 [nM]
流式細胞儀上與MDA-MB-231細胞的結合
幾何平均值 [MFI]
濃度 [nM]
流式細胞儀上與MCF-7細胞的結合
幾何平均值 [MFI]
濃度 [nM]


第 5 圖（接續）



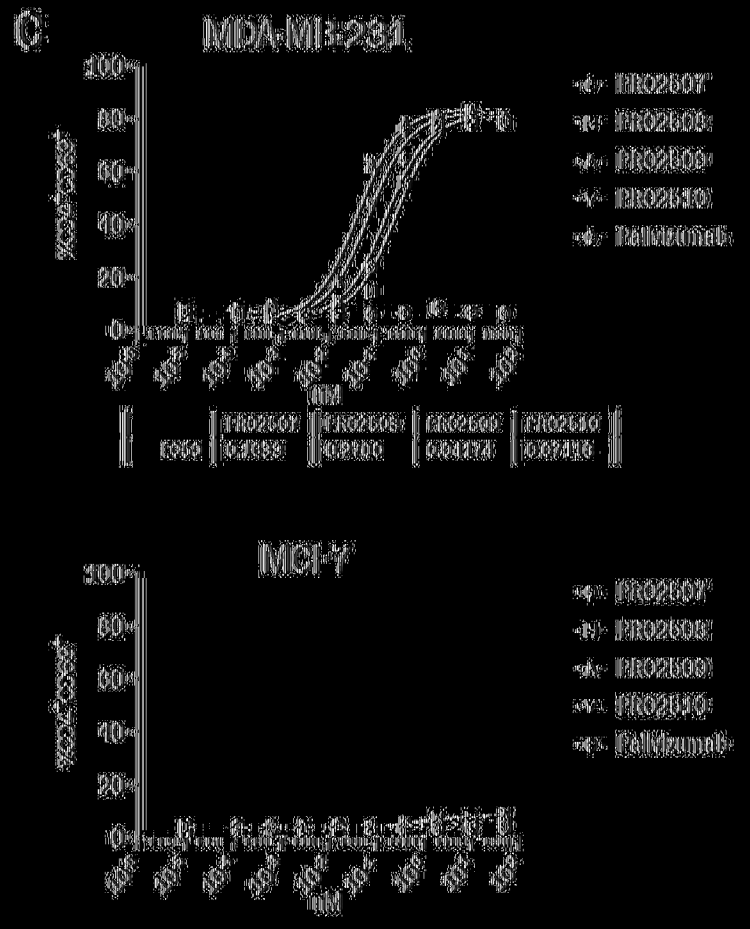

B

| 細胞株 | 相對抗體結合能力 |
| --- | --- |
| MDA-MB-231 | 59,746 |
| MCF-7 | 768 |

第 6 圖

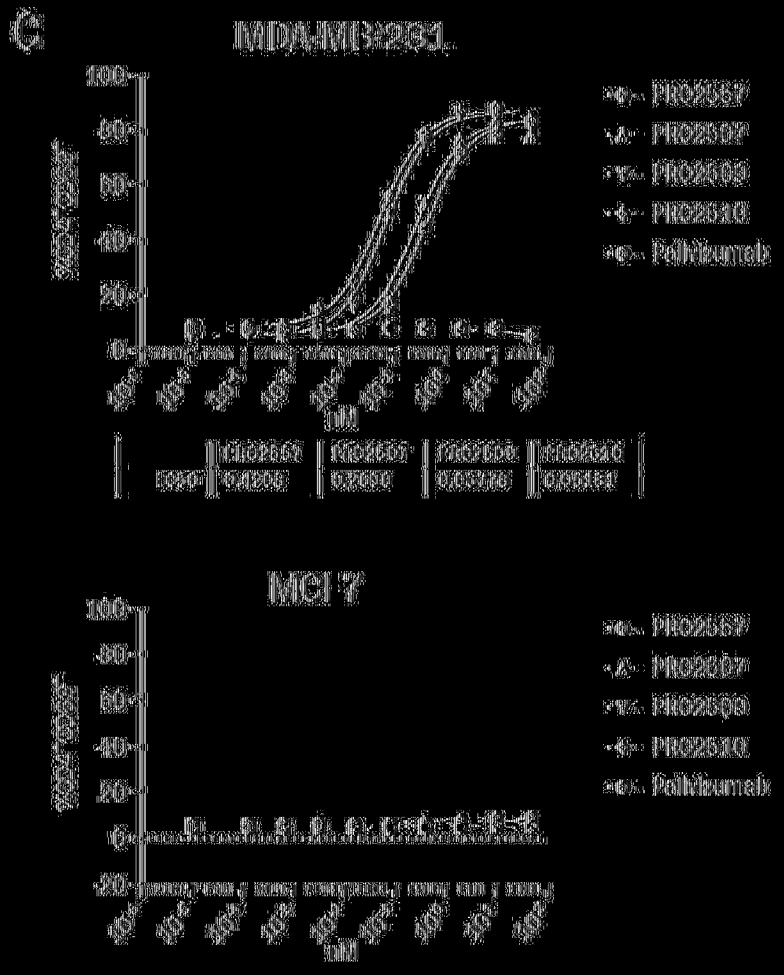
FIG. 1
FRONT VIEW
LEFT SIDE VIEW
REAR VIEW
RIGHT SIDE VIEW
TOP VIEW
BOTTOM VIEW

圖 1

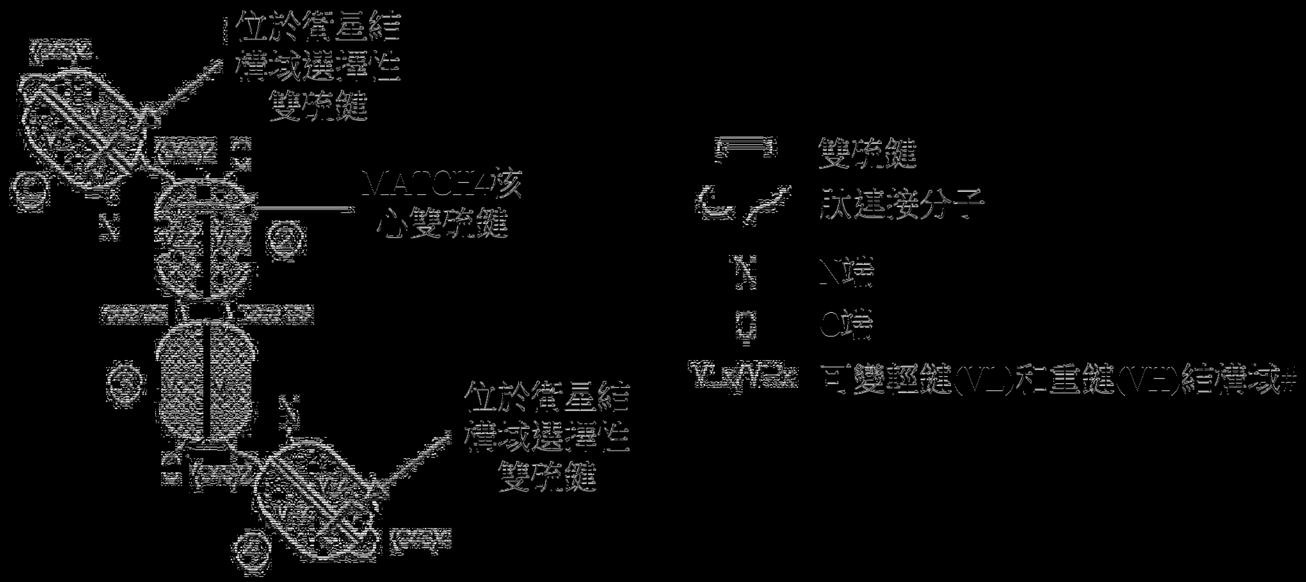

C
MDA-MB-231
100
80
60
40
20
0
nM
PRO2607
PRO2608
PRO2609
PRO2610
Tallizumab
MCF-7
100
80
60
40
20
0
nM
PRO2607
PRO2608
PRO2609
PRO2610
Tallizumab

第 7 圖 (接續)

圖 8
相對於
相對於
相對於
相對於


C
MDA-MB-231
Cell Viability (%)
PRO2567
PRO2507
PRO2509
PRO2520
Pembrolizumab
MCF-7
Cell Viability (%)
PRO2567
PRO2507
PRO2509
PRO2520
Pembrolizumab

第 8 圖 (接續)


位於衛星結
構域選擇性
雙硫鍵
MATCH4核
心雙硫鍵
位於衛星結
構域選擇性
雙硫鍵
N
雙硫鍵
肽連接分子
N端
C端
可變輕鏈(VL)和重鏈(VH)結構域#

第 9 圖

(a)
(b)
(c)
(d)
化合物1
化合物2
化合物3
化合物4
化合物5
化合物6
化合物7
化合物8
化合物9
化合物10
化合物11
化合物12
化合物13
化合物14
化合物15
化合物16
化合物17
化合物18
化合物19
化合物20
化合物21
化合物22
化合物23
化合物24
化合物25
化合物26
化合物27
化合物28
化合物29
化合物30
化合物31
化合物32
化合物33
化合物34
化合物35
化合物36
化合物37
化合物38
化合物39
化合物40
化合物41
化合物42
化合物43
化合物44
化合物45
化合物46
化合物47
化合物48
化合物49
化合物50
化合物51
化合物52
化合物53
化合物54
化合物55
化合物56
化合物57
化合物58
化合物59
化合物60
化合物61
化合物62
化合物63
化合物64
化合物65
化合物66
化合物67
化合物68
化合物69
化合物70
化合物71
化合物72
化合物73
化合物74
化合物75
化合物76
化合物77
化合物78
化合物79
化合物80
化合物81
化合物82
化合物83
化合物84
化合物85
化合物86
化合物87
化合物88
化合物89
化合物90
化合物91
化合物92
化合物93
化合物94
化合物95
化合物96
化合物97
化合物98
化合物99
化合物100
化合物101
化合物102
化合物103
化合物104
化合物105
化合物106
化合物107
化合物108
化合物109
化合物110
化合物111
化合物112
化合物113
化合物114
化合物115
化合物116
化合物117
化合物118
化合物119
化合物120
化合物121
化合物122
化合物123
化合物124
化合物125
化合物126
化合物127
化合物128
化合物129
化合物130
化合物131
化合物132
化合物133
化合物134
化合物135
化合物136
化合物137
化合物138
化合物139
化合物140
化合物141
化合物142
化合物143
化合物144
化合物145
化合物146
化合物147
化合物148
化合物149
化合物150
化合物151
化合物152
化合物153
化合物154
化合物155
化合物156
化合物157
化合物158
化合物159
化合物160
化合物161
化合物162
化合物163
化合物164
化合物165
化合物166
化合物167
化合物168
化合物169
化合物170
化合物171
化合物172
化合物173
化合物174
化合物175
化合物176
化合物177
化合物178
化合物179
化合物180
化合物181
化合物182
化合物183
化合物184
化合物185
化合物186
化合物187
化合物188
化合物189
化合物190
化合物191
化合物192
化合物193
化合物194
化合物195
化合物196
化合物197
化合物198
化合物199
化合物200
化合物201
化合物202
化合物203
化合物204
化合物205
化合物206
化合物207
化合物208
化合物209
化合物210
化合物211
化合物212
化合物213
化合物214
化合物215
化合物216
化合物217
化合物218
化合物219
化合物220
化合物221
化合物222
化合物223
化合物224
化合物225
化合物226
化合物227
化合物228
化合物229
化合物230
化合物231
化合物232
化合物233
化合物234
化合物235
化合物236
化合物237
化合物238
化合物239
化合物240
化合物241
化合物242
化合物243
化合物244
化合物245
化合物246
化合物247
化合物248
化合物249
化合物250
化合物251
化合物252
化合物253
化合物254
化合物255
化合物256
化合物257
化合物258
化合物259
化合物260
化合物261
化合物262
化合物263
化合物264
化合物265
化合物266
化合物267
化合物268
化合物269
化合物270
化合物271
化合物272
化合物273
化合物274
化合物275
化合物276
化合物277
化合物278
化合物279
化合物280
化合物281
化合物282
化合物283
化合物284
化合物285
化合物286
化合物287
化合物288
化合物289
化合物290
化合物291
化合物292
化合物293
化合物294
化合物295
化合物296
化合物297
化合物298
化合物299
化合物300
化合物301
化合物302
化合物303
化合物304
化合物305
化合物306
化合物307
化合物308
化合物309
化合物310
化合物311
化合物312
化合物313
化合物314
化合物315
化合物316
化合物317
化合物318
化合物319
化合物320
化合物321
化合物322
化合物323
化合物324
化合物325
化合物326
化合物327
化合物328
化合物329
化合物330
化合物331
化合物332
化合物333
化合物334
化合物335
化合物336
化合物337
化合物338
化合物339
化合物340
化合物341
化合物342
化合物343
化合物344
化合物345
化合物346
化合物347
化合物348
化合物349
化合物350
化合物351
化合物352
化合物353
化合物354
化合物355
化合物356
化合物357
化合物358
化合物359
化合物360
化合物361
化合物362
化合物363
化合物364
化合物365
化合物366
化合物367
化合物368
化合物369
化合物370
化合物371
化合物372
化合物373
化合物374
化合物375
化合物376
化合物377
化合物378
化合物379
化合物380
化合物381
化合物382
化合物383
化合物384
化合物385
化合物386
化合物387
化合物388
化合物389
化合物390
化合物391
化合物392
化合物393
化合物394
化合物395
化合物396
化合物397
化合物398
化合物399
化合物400
化合物401
化合物402
化合物403
化合物404
化合物405
化合物406
化合物407
化合物408
化合物409
化合物410
化合物411
化合物412
化合物413
化合物414
化合物415
化合物416
化合物417
化合物418
化合物419
化合物420
化合物421
化合物422
化合物423
化合物424
化合物425
化合物426
化合物427
化合物428
化合物429
化合物430
化合物431
化合物432
化合物433
化合物434
化合物435
化合物436
化合物437
化合物438
化合物439
化合物440
化合物441
化合物442
化合物443
化合物444
化合物445
化合物446
化合物447
化合物448
化合物449
化合物450
化合物451
化合物452
化合物453
化合物454
化合物455
化合物456
化合物457
化合物458
化合物459
化合物460
化合物461
化合物462
化合物463
化合物464
化合物465
化合物466
化合物467
化合物468
化合物469
化合物470
化合物471
化合物472
化合物473
化合物474
化合物475
化合物476
化合物477
化合物478
化合物479
化合物480
化合物481
化合物482
化合物483
化合物484
化合物485
化合物486
化合物487
化合物488
化合物489
化合物490
化合物491
化合物492
化合物493
化合物494
化合物495
化合物496
化合物497
化合物498
化合物499
化合物500
化合物501
化合物502
化合物503
化合物504
化合物505
化合物506
化合物507
化合物508
化合物509
化合物510
化合物511
化合物512
化合物513
化合物514
化合物515
化合物516
化合物517
化合物518
化合物519
化合物520
化合物521
化合物522
化合物523
化合物524
化合物525
化合物526
化合物527
化合物528
化合物529
化合物530
化合物531
化合物532
化合物533
化合物534
化合物535
化合物536
化合物537
化合物538
化合物539
化合物540
化合物541
化合物542
化合物543
化合物544
化合物545
化合物546
化合物547
化合物548
化合物549
化合物550
化合物551
化合物552
化合物553
化合物554
化合物555
化合物556
化合物557
化合物558
化合物559
化合物560
化合物561
化合物562
化合物563
化合物564
化合物565
化合物566
化合物567
化合物568
化合物569
化合物570
化合物571
化合物572
化合物573
化合物574
化合物575
化合物576
化合物577
化合物578
化合物579
化合物580
化合物581
化合物582
化合物583
化合物584
化合物585
化合物586
化合物587
化合物588
化合物589
化合物590
化合物591
化合物592
化合物593
化合物594
化合物595
化合物596
化合物597
化合物598
化合物599
化合物600
化合物601
化合物602
化合物603
化合物604
化合物605
化合物606
化合物607
化合物608
化合物609
化合物610
化合物611
化合物612
化合物613
化合物614
化合物615
化合物616
化合物617
化合物618
化合物619
化合物620
化合物621
化合物622
化合物623
化合物624
化合物625
化合物626
化合物627
化合物628
化合物629
化合物630
化合物631
化合物632
化合物633
化合物634
化合物635
化合物636
化合物637
化合物638
化合物639
化合物640
化合物641
化合物642
化合物643
化合物644
化合物645
化合物646
化合物647
化合物648
化合物649
化合物650
化合物651
化合物652
化合物653
化合物654
化合物655
化合物656
化合物657
化合物658
化合物659
化合物660
化合物661
化合物662
化合物663
化合物664
化合物665
化合物666
化合物667
化合物668
化合物669
化合物670
化合物671
化合物672
化合物673
化合物674
化合物675
化合物676
化合物677
化合物678
化合物679
化合物680
化合物681
化合物682
化合物683
化合物684
化合物685
化合物686
化合物687
化合物688
化合物689
化合物690
化合物691
化合物692
化合物693
化合物694
化合物695
化合物696
化合物697
化合物698
化合物699
化合物700
化合物701
化合物702
化合物703
化合物704
化合物705
化合物706
化合物707
化合物708
化合物709
化合物710
化合物711
化合物712
化合物713
化合物714
化合物715
化合物716
化合物717
化合物718
化合物719
化合物720
化合物721
化合物722
化合物723
化合物724
化合物725
化合物726
化合物727
化合物728
化合物729
化合物730
化合物731
化合物732
化合物733
化合物734
化合物735
化合物736
化合物737
化合物738
化合物739
化合物740
化合物741
化合物742
化合物743
化合物744
化合物745
化合物746
化合物747
化合物748
化合物749
化合物750
化合物751
化合物752
化合物753
化合物754
化合物755
化合物756
化合物757
化合物758
化合物759
化合物760
化合物761
化合物762
化合物763
化合物764
化合物765
化合物766
化合物767
化合物768
化合物769
化合物770
化合物771
化合物772
化合物773
化合物774
化合物775
化合物776
化合物777
化合物778
化合物779
化合物780
化合物781
化合物782
化合物783
化合物784
化合物785
化合物786
化合物787
化合物788
化合物789
化合物790
化合物791
化合物792
化合物793
化合物794
化合物795
化合物796
化合物797
化合物798
化合物799
化合物800
化合物801
化合物802
化合物803
化合物804
化合物805
化合物806
化合物807
化合物808
化合物809
化合物810
化合物811
化合物812
化合物813
化合物814
化合物815
化合物816
化合物817
化合物818
化合物819
化合物820
化合物821
化合物822
化合物823
化合物824
化合物825
化合物826
化合物827
化合物828
化合物829
化合物830
化合物831
化合物832
化合物833
化合物834
化合物835
化合物836
化合物837
化合物838
化合物839
化合物840
化合物841
化合物842
化合物843
化合物844
化合物845
化合物846
化合物847
化合物848
化合物849
化合物850
化合物851
化合物852
化合物853
化合物854
化合物855
化合物856
化合物857
化合物858
化合物859
化合物860
化合物861
化合物862
化合物863
化合物864
化合物865
化合物866
化合物867
化合物868
化合物869
化合物870
化合物871
化合物872
化合物873
化合物874
化合物875
化合物876
化合物877
化合物878
化合物879
化合物880
化合物881
化合物882
化合物883
化合物884
化合物885
化合物886
化合物887
化合物888
化合物889
化合物890
化合物891
化合物892
化合物893
化合物894
化合物895
化合物896
化合物897
化合物898
化合物899
化合物900
化合物901
化合物902
化合物903
化合物904
化合物905
化合物906
化合物907
化合物908
化合物909
化合物910
化合物911
化合物912
化合物913
化合物914
化合物915
化合物916
化合物917
化合物918
化合物919
化合物920
化合物921
化合物922
化合物923
化合物924
化合物925
化合物926
化合物927
化合物928
化合物929
化合物930
化合物931
化合物932
化合物933
化合物934
化合物935
化合物936
化合物937
化合物938
化合物939
化合物940
化合物941
化合物942
化合物943
化合物944
化合物945
化合物946
化合物947
化合物948
化合物949
化合物950
化合物951
化合物952
化合物953
化合物954
化合物955
化合物956
化合物957
化合物958
化合物959
化合物960
化合物961
化合物962
化合物963
化合物964
化合物965
化合物966
化合物967
化合物968
化合物969
化合物970
化合物971
化合物972
化合物973
化合物974
化合物975
化合物976
化合物977
化合物978
化合物979
化合物980
化合物981
化合物982
化合物983
化合物984
化合物985
化合物986
化合物987
化合物988
化合物989
化合物990
化合物991
化合物992
化合物993
化合物994
化合物995
化合物996
化合物997
化合物998
化合物999
化合物1000

圖 9

圖式

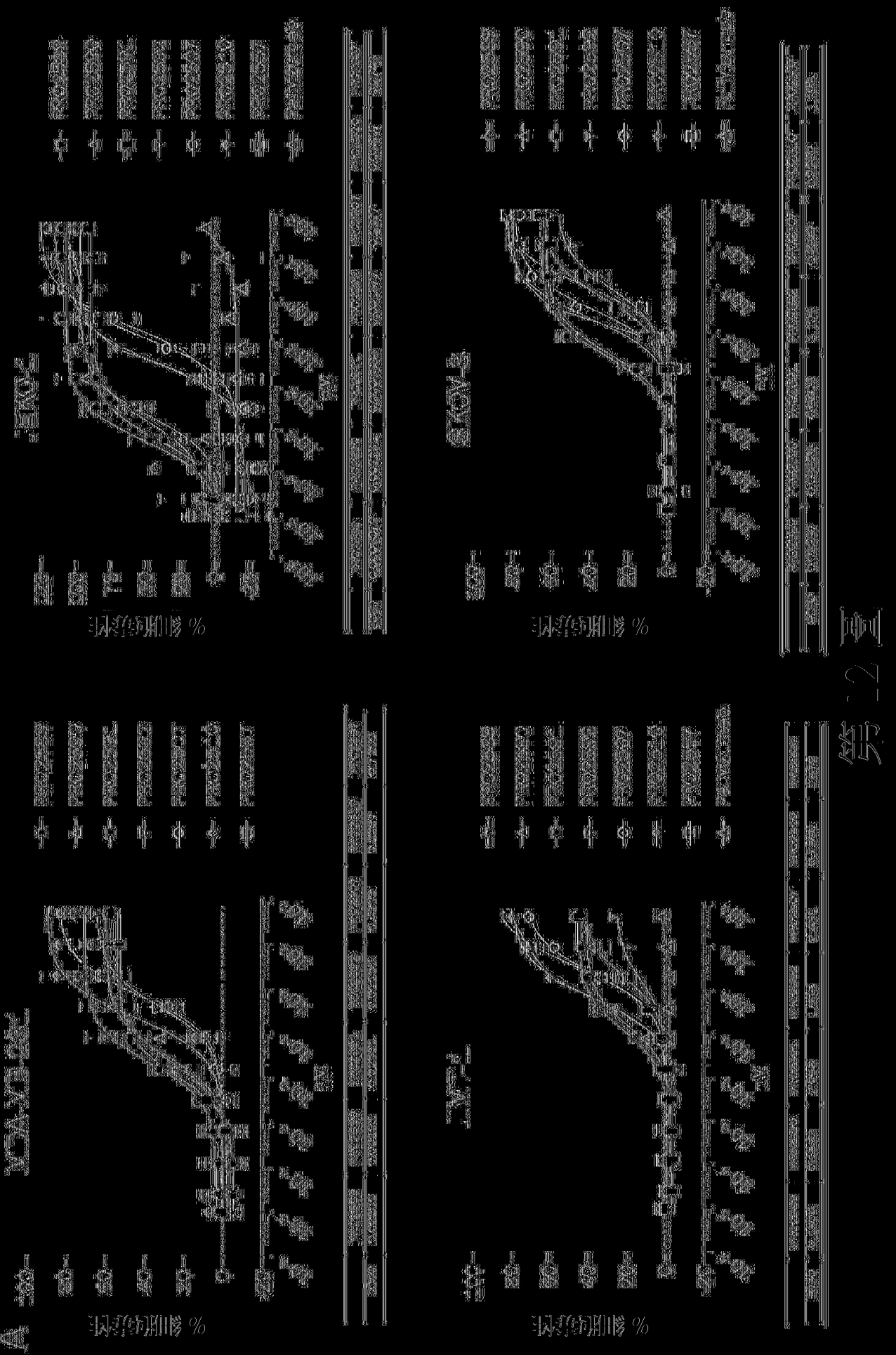
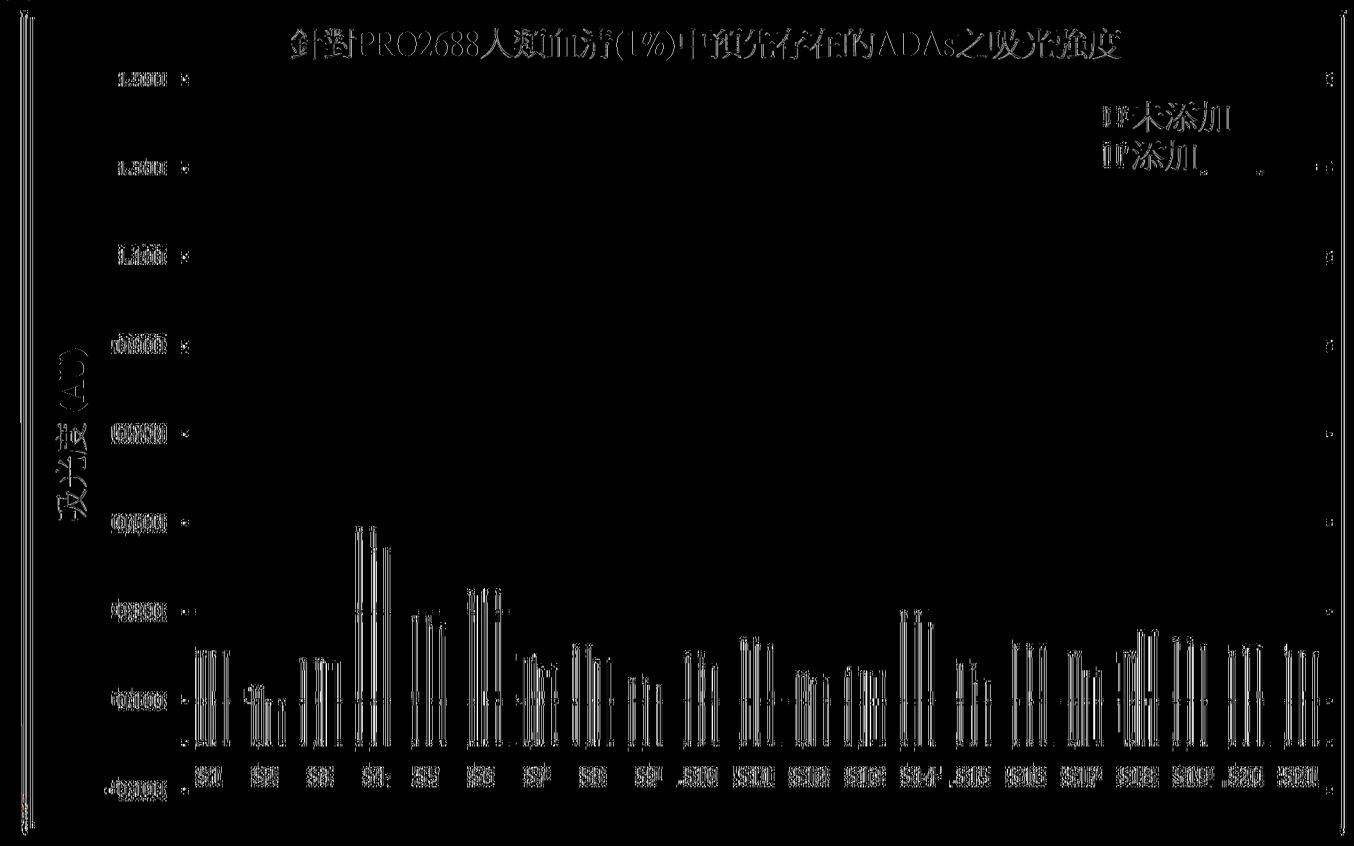
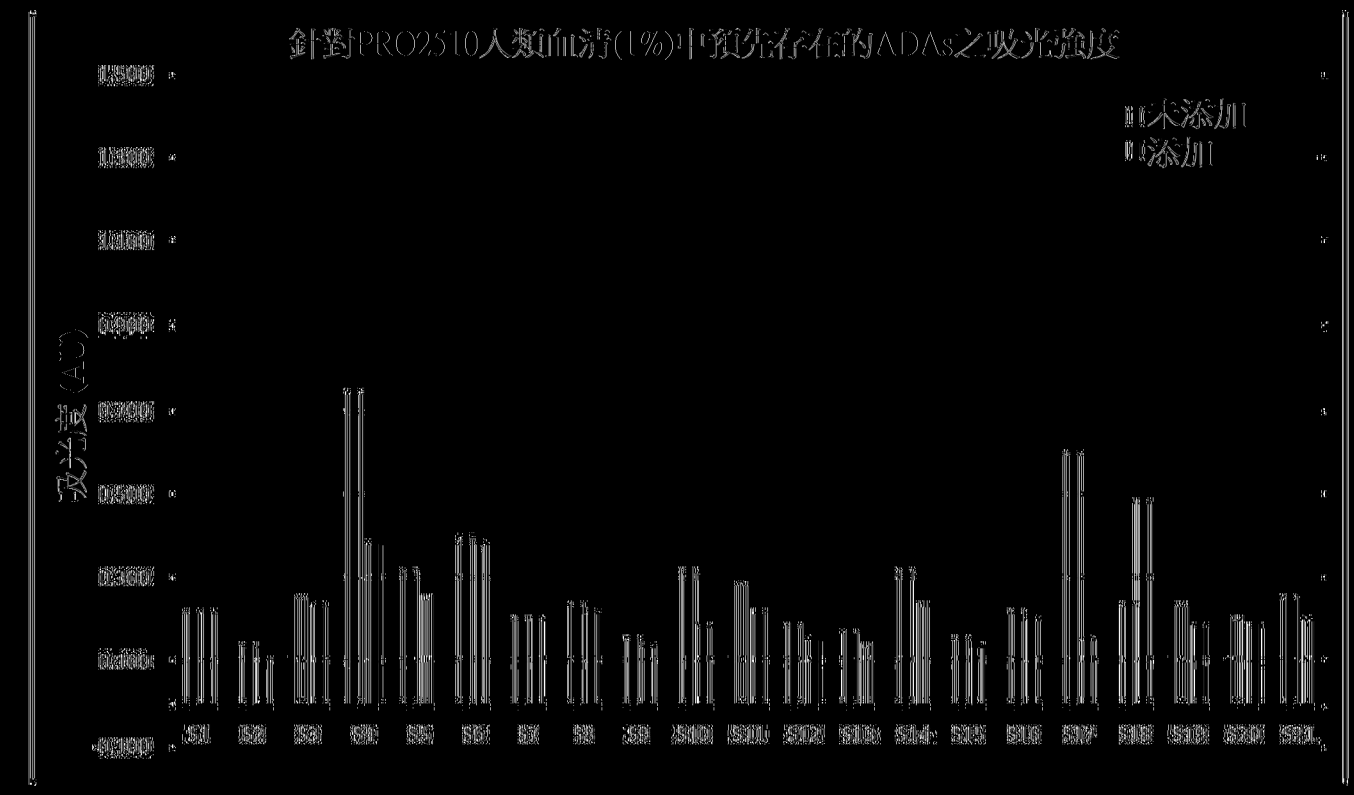


圖 2
LOAD
LOAD
LOAD
LOAD
% 消耗期間

A

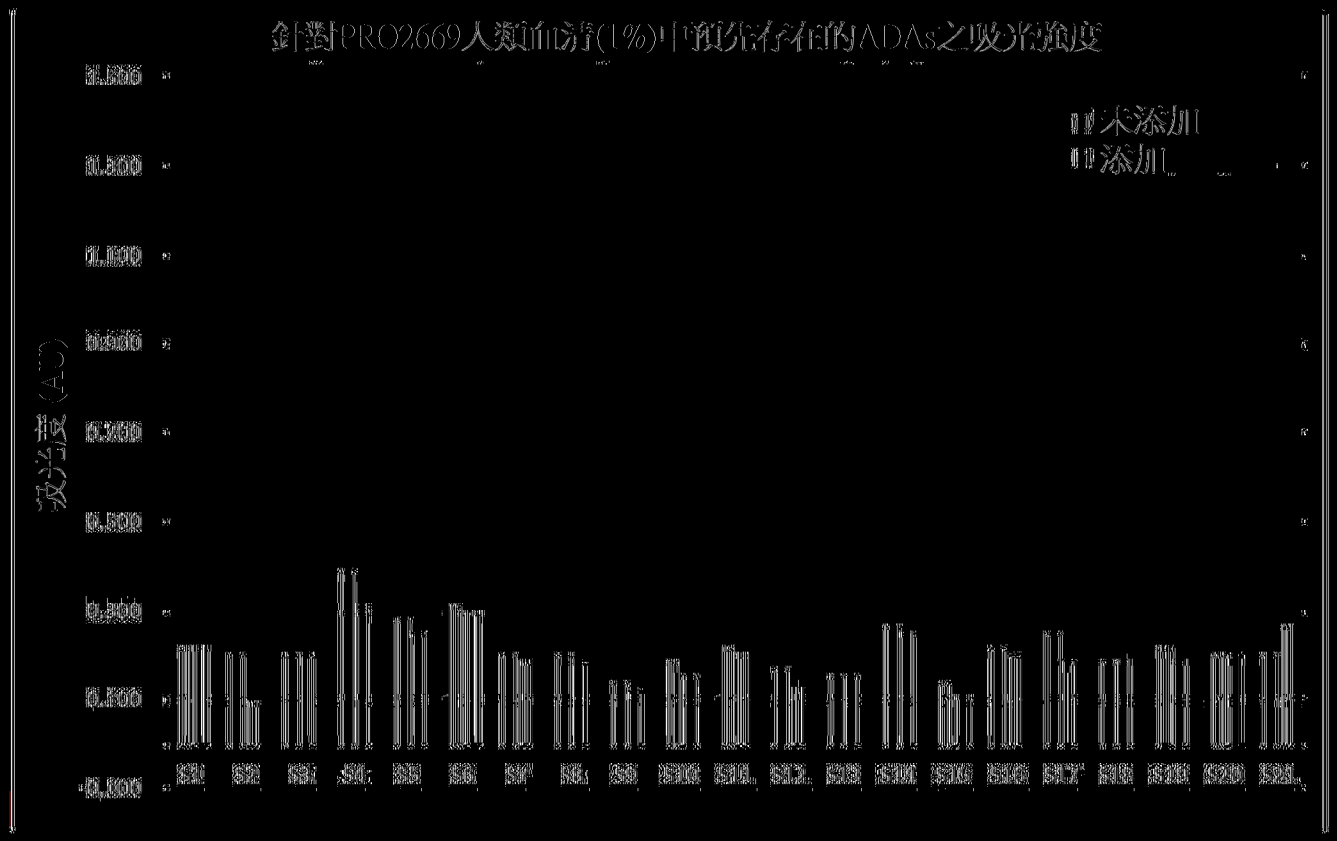

針對PRO2688人類血清(1%)中預先存在的ADAs之吸光強度
未添加
添加
抗藥抗體 (AP)

B

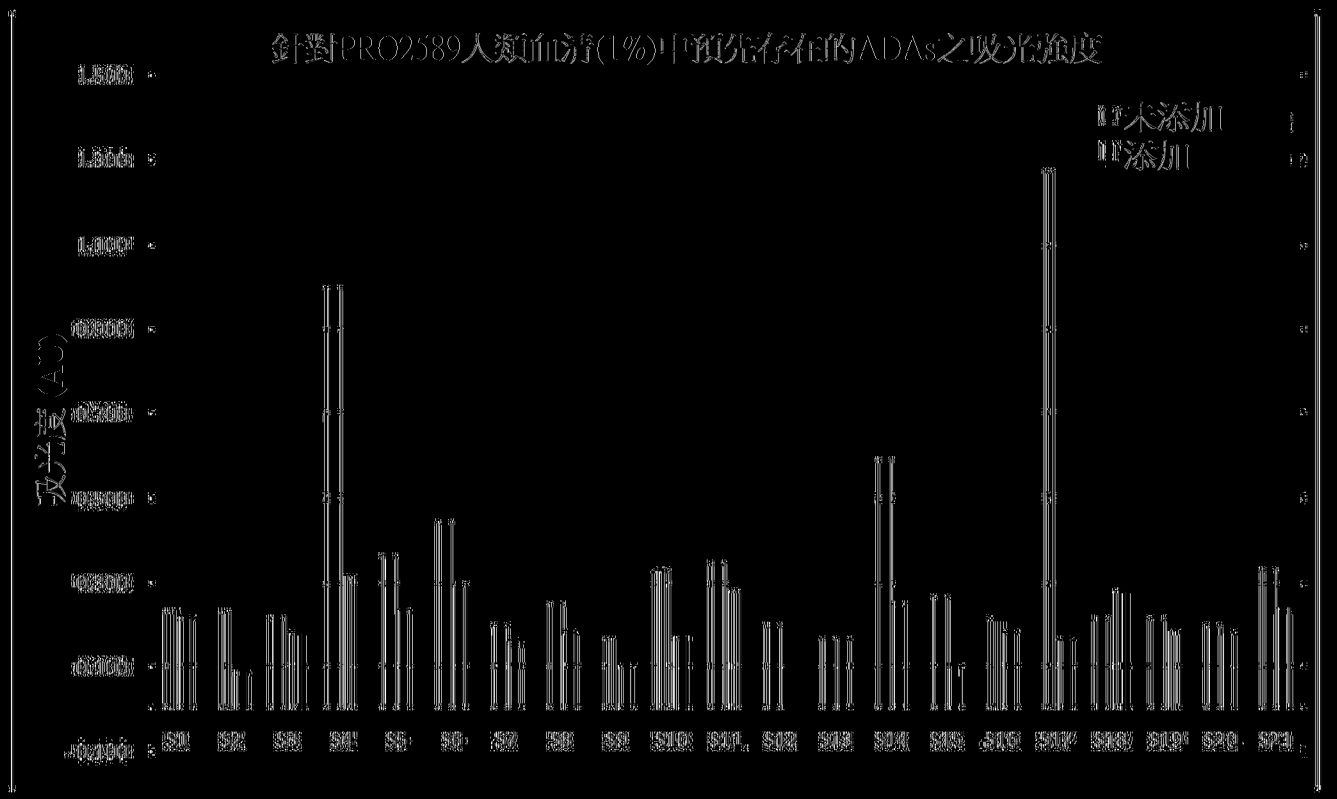

針對PRO2510人類血清(1%)中預先存在的ADAs之吸光強度
未添加
添加
抗藥抗體 (AP)

第 14 圖

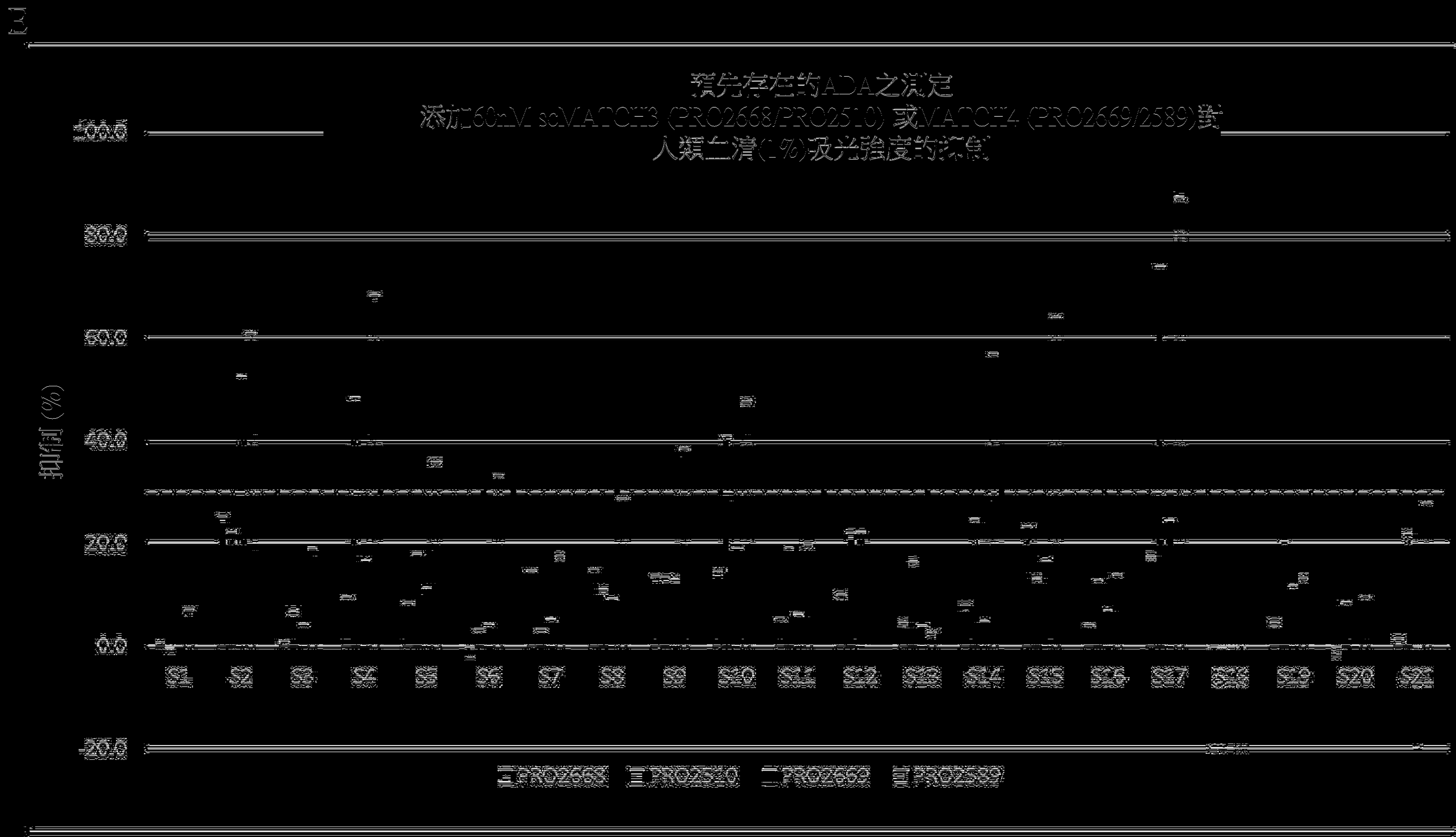
C


針對PRO2669人類血清(1%)中預先存在的ADAs之吸光強度
未添加
添加
吸光度 (A)
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
S13
S14
S15
S16
S17
S18
S19
S20
S21

D


針對PRO2589人類血清(1%)中預先存在的ADAs之吸光強度
未添加
添加
吸光度 (A)
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
S13
S14
S15
S16
S17
S18
S19
S20
S21

# 第 14 圖 (接續)

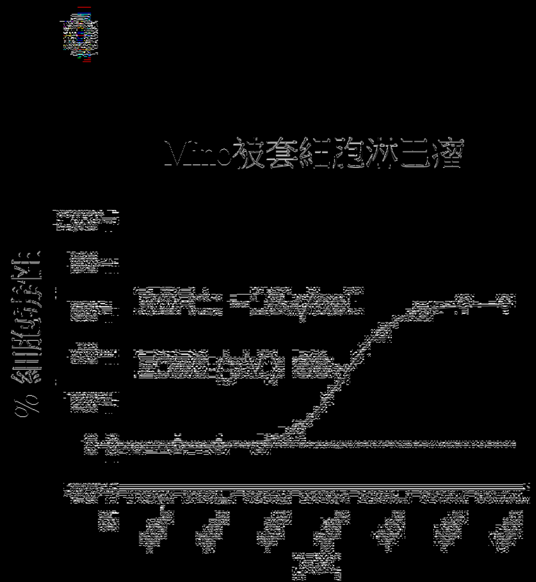

[圖]
預先存在的ADA之測定
添加60nM scMATCH3 (PRO2668/PRO2510) 或MATCH4 (PRO2669/2589)對人類血清(1%)吸光強度的抑制
抑制(%)
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
-20.0
S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10 S11 S12 S13 S14 S15 S16 S17 S18 S19 S20 S21
PRO2668 PRO2510 PRO2669 PRO2589

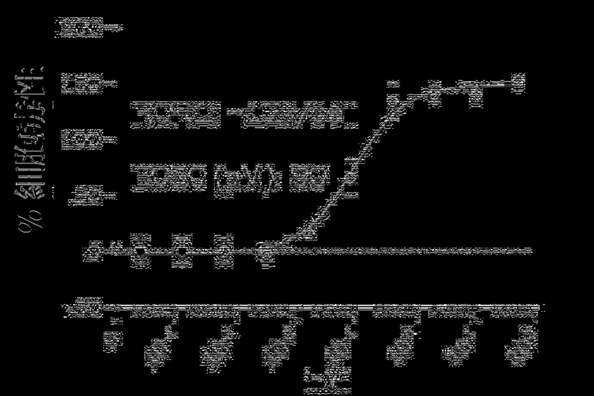
第 14 圖 (接續)

圖 3

圖式
A549
SKOV-3
NCI-H460
MDA-MB-231
抑制率 %
抑制率 %
抑制率 %
抑制率 %

細胞毒性 EC50 vs. ROR1
平均 EC50 (nM)
ROR1受體密度


Mino被套細胞淋巴瘤
% 細胞毒性


Z138被套細胞淋巴瘤
% 細胞毒性

第 16 圖 (接續)

第 17 圖

NM32.2668條件下的
平坦段水流速度


NM32.2668條件下的
平坦段水流速度


NM32.2668條件下的
平坦段水流速度


NM32.2668條件下的
平坦段水流速度


NM32.2668條件下的
平坦段水流速度


NM32.2668條件下的
平坦段水流速度