



(21) 申請案號：112146634

(22) 申請日：中華民國 112 (2023) 年 11 月 30 日

(51) Int. Cl. :

C07K16/28 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

C12N5/10 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2022/12/02

世界智慧財產權組織

PCT/CN2022/136246

(71) 申請人：大陸商百奧賽圖(北京)醫藥科技股份有限公司(中國大陸) (CN)

中國大陸

(72) 發明人：胡益清 HU, YI QING (CN)；張麗君 ZHANG, LI JUN (CN)；趙會珍 ZHAO, HUI

ZHEN (CN)；姚佳維 YAO, JIA WEI (CN)；沈月雷 SHEN, YUE LEI (CN)

(74) 代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：39 項 圖式數：6 共 112 頁

(54) 名稱

抗 TFR1 抗體及其用途

(57) 摘要

本發明涉及抗 TFR1 (運鐵蛋白受體 1) 抗體、其抗原結合片段、及用途。

指定代表圖：

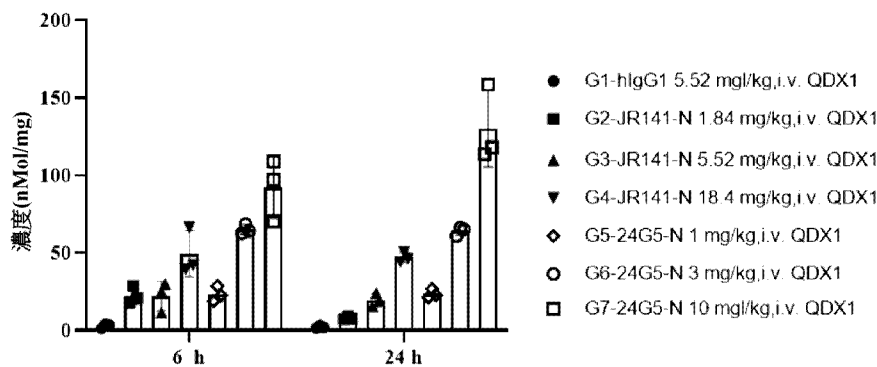


圖 6

【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗TFR1抗體及其用途

【中文】

本發明涉及抗TFR1 (運鐵蛋白受體1)抗體、其抗原結合片段、及用途。

【指定代表圖】 圖6

【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗TFR1抗體及其用途

【技術領域】

【0001】 本申請案主張於2022年12月2日所提出之PCT申請案第PCT/CN2022/136246號之權益。上揭申請案之全文內容以引用方式併入本文。

【0002】 本發明涉及抗TFR1(運鐵蛋白受體1)抗體、其抗原結合片段、及用途。

【先前技術】

【0003】 治療抗體係成長最快速的治療化合物類別之一，其成長速度迅速超越小分子藥物。例如，單株抗體為癌症療法帶來了革命性的變化。然而，由於習知抗體的體積龐大，使其在體內向腫瘤細胞遞送時受到阻礙。習知抗體的最小標靶辨識模組係由兩個非共價結合的可變域(VH及VL)組成。VH及VL域固有的疏水性相互作用，限制了經工程改造之抗體的穩定性及溶解度，常導致V域聚集及/或錯誤配對。

【0004】 重鏈抗體的發現，對癌症療法的影響已然帶來前所未有的機會。此等獨特形式的駱駝科衍生之抗體缺乏整個輕鏈及CH1域，僅由單可變域(即VHH)組成。重組VHH體積小(15至20 kDa)，且嚴

格單體化；其以nM親和性結合其標靶，且可在廣泛的pH及溫度範圍內保持穩定。VHH亦更容易進行分子操作；此相較於由於聚集及親和性降低而存在問題的習知重組抗體及其片段，更有利於生產多價形式的單株抗體。此外，VHH通常結合至對習知抗體而言免疫原性較低的表位。

【0005】 通常而言，治療抗體係人類或人源化抗體。人類或人源化抗體可藉由嚙齒類抗體(例如小鼠抗體)的人源化或藉由使用噬菌體展示庫來產生。然而，此等動物或噬菌體展示庫通常無法產生重鏈抗體。反之，重鏈抗體通常係自駱駝科重鏈抗體中獲得。此等駱駝科重鏈抗體需要加以人源化。人源化過程可能會對結合親和性產生不利影響，並向抗體引入免疫原性表位。改善此等抗體的特性通常需要進行反覆且耗時的實驗。在某些情況下，此等抗體亦可能對患者產生免疫原性，導致其功效隨著時間推移而減弱。因此，需要開發更多形式的抗體來治療或預防人類疾病。

【發明內容】

發明概要

【0006】 本發明涉及一種抗體或其抗原結合片段，其結合至運鐵蛋白受體1 (TFR1)，包含：重鏈單可變域(VHH)，其包含互補決定區(complementarity determining region, CDR) 1、2、及3，在一些實施例中，該VHH CDR1區包含與所選之VHH CDR1胺基酸

序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的胺基酸序列，該VHH CDR2區包含與所選之VHH CDR2胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的胺基酸序列，且該VHH CDR3區包含與所選之VHH CDR3胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的胺基酸序列；在一些實施例中，該等所選之VHH CDR 1、2、及3胺基酸序列係以下中之一者：

- (1) 該等所選之VHH CDR 1、2、3胺基酸序列分別記載於SEQ ID NO：1、2、及3；
- (2) 該等所選之VHH CDR 1、2、3胺基酸序列分別記載於SEQ ID NO：4、5、及6；
- (3) 該等所選之VHH CDR 1、2、3胺基酸序列分別記載於SEQ ID NO：7、8、及9；
- (4) 該等所選之VHH CDR 1、2、3胺基酸序列分別記載於SEQ ID NO：10、11、及12；
- (5) 該等所選之VHH CDR 1、2、3胺基酸序列分別記載於SEQ ID NO：13、14、及15；
- (6) 該等所選之VHH CDR 1、2、3胺基酸序列分別記載於SEQ ID NO：16、17、及18；

(7) 該等所選之VHH CDR 1、2、3胺基酸序列分別記載於SEQ ID NO：19、20、及21；以及

(8) 該等所選之VHH CDR 1、2、3胺基酸序列分別記載於SEQ ID NO：22、23、及24。

【0007】 在一些實施例中，該VHH包含CDR 1、2、3，其等具有分別記載於SEQ ID NO：1、2、及3的胺基酸序列。在一些實施例中，該VHH包含CDR 1、2、3，其等具有分別記載於SEQ ID NO：4、5、及6的胺基酸序列。在一些實施例中，該VHH包含CDR 1、2、3，其等具有分別記載於SEQ ID NO：7、8、及9的胺基酸序列。在一些實施例中，該VHH包含CDR 1、2、3，其等具有分別記載於SEQ ID NO：10、11、及12的胺基酸序列。

【0008】 在一態樣中，本發明涉及一種抗體或其抗原結合片段，其結合至TFR1，包含：重鏈單可變區(VHH)，其包含與所選之VHH序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的胺基酸序列，在一些實施例中，該所選之VHH序列選自由SEQ ID NO：25、26、27、及28所組成的群組。在一些實施例中，該VHH包含SEQ ID NO：25的序列。在一些實施例中，該VHH包含SEQ ID NO：26的序列。在一些實施例中，該VHH包含SEQ ID NO：27的序列。在一些實施例中，該VHH包含SEQ ID NO：28的序列。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段特異性結

合至人類TFR1、猴TFR1、小鼠TFR1、或嵌合TFR1。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係人類或人源化抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。

【0009】 在一態樣中，本發明涉及一種抗體或其抗原結合片段，其包含如本文所述之抗體或其抗原結合片段的VHH CDR 1、2、3。

【0010】 在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類IgG Fc(例如人類IgG1 Fc)。在一些實施例中，該人類IgG Fc在根據EU編號的位置297包含非天冬醯胺酸殘基(例如丙胺酸)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含二或多個重鏈單可變域。

【0011】 在一態樣中，本發明涉及一種核酸，其包含編碼如本文所述之抗體或其抗原結合片段的多核苷酸。在一些實施例中，該核酸係cDNA。

【0012】 在一態樣中，本發明涉及一種載體，其包含如本文所述之核酸中之一或多者。

【0013】 在一態樣中，本發明涉及一種細胞，其包含如本文所述之載體。在一些實施例中，該細胞係CHO細胞。在一態樣中，本發明涉及一種細胞，其包含本文所述之核酸中之一或多者。

【0014】 在一態樣中，本發明涉及一種產生抗體或其抗原結合片段的方法，該方法包括：**(a)**在足以使如本文所述之細胞產生該抗體

或其抗原結合片段的條件下培養該細胞；以及(b)收集該細胞所產生的該抗體或其抗原結合片段。

【0015】 在一態樣中，本發明涉及一種抗體-藥物接合物，其包含如本文所述之抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段共價結合至治療劑。在一些實施例中，該治療劑係細胞毒性劑(cytotoxic agent)或細胞生長抑制劑(cytostatic agent)。

【0016】 在一態樣中，本發明涉及一種治療患有腦部疾病(例如腦癌)之對象的方法，該方法包含向該對象投予治療有效量之組成物，該組成物包含如本文所述之抗體或其抗原結合片段，或抗體-藥物接合物。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段，或該抗體-藥物接合物可穿過該對象的血腦障壁(blood-brain barrier, BBB)。

【0017】 在一態樣中，本發明涉及一種治療患有癌症之對象的方法，該方法包含向該對象投予治療有效量之組成物，該組成物包含如本文所述之抗體或其抗原結合片段，或抗體-藥物接合物。在一些實施例中，該癌症係腦癌、肺癌、胃癌、結腸直腸癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、白血病、或乳癌。在一態樣中，本發明涉及一種辨識患有腦部疾病(例如腦癌)之對象的方法，該方法包含藉由如本文所述之抗體或其抗原結合片段，檢測自患有該腦部疾病之該對象所收集的樣本，從而辨識該對象患有該腦部疾病。在一些實施例中，該

樣本係來自該對象的腦實質樣本。在一些實施例中，本文所述之對象係人類對象。

【0018】 在一態樣中，本發明涉及一種遞送藥劑穿過血腦障壁的方法，該方法包含向對象投予藥劑，該藥劑共價連結至如本文所述之抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該藥劑係抗體或抗體-藥物接合物。在一些實施例中，該藥劑係抗類澱粉蛋白抗體(anti-amyloid antibody)。

【0019】 在一態樣中，本發明涉及一種醫藥組成物，其包含如本文所述之抗體或其抗原結合片段，及醫藥上可接受的載劑。在一態樣中，本發明涉及一種醫藥組成物，其包含如本文所述之抗體-藥物接合物，及醫藥上可接受的載劑。

【0020】 在一態樣中，本發明涉及一種抗體或其抗原結合片段，其與如本文所述之抗體或其抗原結合片段交叉競爭(cross-compete)。

【0021】 在一態樣中，本發明提供一種製造抗體的方法，該抗體特異性結合至抗原。該方法涉及將如本文所述之動物暴露於抗原；在表現特異性結合至該抗原之嵌合重鏈抗體的細胞中，獲得編碼人類重鏈免疫球蛋白可變區之核酸的序列(例如藉由定序)；及在細胞中，將編碼該人類重鏈免疫球蛋白可變區的該核酸與編碼人類重鏈免疫球蛋白恆定區的核酸可操作地連結。

【0022】 除非另有定義，本文中所有技術及科學術語，其含義與本發明所屬技術領域中具有通常知識者通常理解之含義相同。本文中描述用於本發明的方法及材料；此外，亦可使用本技術領域已知的其他合適的方法及材料。材料、方法、及示例僅供說明之用，而非旨在限制本發明。本文中提及之所有刊物、專利申請案、專利、序列、資料庫條目、及其他參考文獻，其等全文內容均以引用方式併入本文。如有衝突，則以本說明書(包括定義)為準。

【0023】 本發明之其他特徵及優點將於實施方式及圖式，以及申請專利範圍中顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0024】

圖1列出根據Kabat編號之抗TFR1抗體的重鏈可變區的CDR序列。

圖2列出根據IMGT編號之抗TFR1抗體的重鏈可變區的CDR序列。

圖3列出本發明所探討之胺基酸序列。

圖4A示出靜脈內(i.v.)投予hIgG1 (G1)、JR141-N (G2)、23B8-N (G3)、24A1-N (G4)、24G5-N (G5)、或24C9-N (G6)之72小時內，hTFR1小鼠之腦總量蛋白質中的抗體濃度。

圖4B示出靜脈內(i.v.)投予hIgG1 (G1)、JR141-N (G2)、23B8-N (G3)、24A1-N (G4)、24G5-N (G5)、或24C9-N (G6)之72小時內，hTFR1小鼠之腦總量蛋白質中的抗體濃度對血清抗體濃度的比率。

圖4C示出靜脈內(i.v.)投予hIgG1 (G1)、JR141-N (G2)、23B8-N (G3)、24A1-N (G4)、24G5-N (G5)、或24C9-N (G6)之72小時內，hTFR1小鼠之腦實質中的抗體濃度。

圖4D示出靜脈內(i.v.)投予hIgG1 (G1)、JR141-N (G2)、23B8-N (G3)、24A1-N (G4)、24G5-N (G5)、或24C9-N (G6)之72小時內，hTFR1小鼠之腦實質中的抗體濃度對血清抗體濃度的比率。

圖5A示出靜脈內(i.v.)投予hIgG1 (G1)、JR141-N (G2)、23B8-N (G3)、24A1-N (G4)、或24G5-N (G5)後24小時，腦實質中的抗體濃度測試結果。

圖5B示出靜脈內(i.v.)投予hIgG1 (G1)、JR141-N (G2)、23B8-N (G3)、24A1-N (G4)、或24G5-N (G5)後24小時，腦總量蛋白質(全腦)中的抗體濃度測試結果。

圖6示出靜脈內(i.v.)投予JR141-N (G2至G4)或24G5-N (G5至G7)後6小時或24小時的抗體濃度結果，其中使用hIgG1作為陰性對照。

【實施方式】

【0025】 重鏈抗體[或僅含重鏈(heavy chain-only)之抗體]係僅具有重鏈(一般係兩個重鏈)且缺乏抗體中常見的兩個輕鏈的抗體。在軟骨魚類(cartilaginous fishes)(例如鯊魚)及駱駝科[例如駱馬(llama)]中，已發現天然存在的重鏈抗體。例如，在軟骨魚類中，免疫球蛋白新抗原受體(IgNAR)即係重鏈抗體。IgNAR在結構上與其他抗體具有顯著差異。其每個鏈具有五個恆定域(CH)，而非通常的三個；在不尋常的位置具有數個雙硫鍵；且互補決定區3 (CDR3)形成延伸的環，該環覆蓋其他抗體中結合至輕鏈的位址。此等差異與軟骨魚的系統發育年齡相組合，導致以下假設：相較於哺乳動物免疫球蛋白，IgNAR可能與原生(primordial)抗原結合蛋白質更加密切相關。

【0026】 唯一具有重鏈(似IgG)抗體的哺乳動物係駱駝科，諸如單峰駱駝、駱駝、駱馬、及羊駝。如同所有哺乳動物，駱駝科(例如駱馬)可產生習知抗體(例如IgG1)，其由兩個重鏈及兩個輕鏈以雙硫鍵結合成Y形所組成。然而，駱駝科亦可產生兩個獨特的IgG亞類別：IgG2及IgG3，亦稱為重鏈IgG。此等抗體僅由兩個重鏈所組成，缺乏CH1區，但在其等N端仍帶有抗原結合域(例如VHH)。習知Ig需要來自重鏈與輕鏈的可變區進行結合，才能實現高度多樣性的抗原-抗體交互作用。儘管分離的重鏈及輕鏈仍然顯示出此種能力，但其等

相較於經配對的重鏈及輕鏈仍展現出非常低的親和性。重鏈IgG的獨特特徵，在於其等單體抗原結合區無需與另一個區配對，即能夠以相當於習知抗體的特異性、親和性、及尤其係多樣性結合至抗原。此特徵主要係由於兩個重鏈之可變區的胺基酸序列中的幾個主要變異，此等變異相較於習知Ig引起了深層的構形變化。可變區中的主要取代防止輕鏈結合至重鏈，同時亦防止未結合的重鏈被免疫球蛋白結合蛋白質回收。

【0027】 此等重鏈抗體[稱為VHH、sdAb、或奈米抗體(nanobody)]的單可變域係由後天免疫系統所產生的最小抗原結合域。此等抗體之可變區的互補決定區3 (CDR3)已發現通常係習知抗體的兩倍長。這導致與抗原相互作用的表面增大，亦增加了抗原-抗體相互作用的多樣性，從而彌補輕鏈的缺失。藉由長互補決定區3 (CDR3)，VHH即可延伸至習知抗體無法觸及的蛋白質縫隙中，包括具有功能意義的位址，諸如酵素的活性位址或病毒表面的受體結合峽谷。此外，額外的半胱胺酸殘基使結構更加穩定，從而增加了相互作用的強度。

【0028】 相較於攜帶習知抗體之可變域(VH及VL)的習知抗體，VHH具有許多其他優勢，包括更高的穩定性、溶解度、表現產量、及再摺疊能力，以及最佳的體內組織滲透性。此外，不同於習知抗體的VH域，VHH在本質上不傾向於結合至輕鏈。這有利於在功能性

輕鏈基因座存在的情況下誘導重鏈抗體。此外，由於VHH不結合至VL域，因此相較於含有習知VH-VL對或基於VH域之單一域的構築體，將VHH重新格式化(reformat)為雙特異性抗體構築體更加容易。

【0029】 駱駝科VHH與人類VH域之間的顯著差異係CDR3環的長度及方向。CDR3對應於抗體分子的獨特區，該區係由B細胞發育過程中新生的DNA元件編碼。基因重組導致D元件與旁側的V及J元件融合。在重組過程中，藉由在連接處加入核苷酸及/或使其缺失，來產生進一步的基因多樣性。因此，CDR3環對抗體多樣性及特異性提供了主要的貢獻。一些早期基因轉殖重鏈抗體動物中，可變區基因(IGHV、IGHD、及IGHJ)的數量有限，導致儘管野生型動物具有有效的抗原反應，此等動物仍無法辨識某些抗原(Janssens, Rick, et al. "Generation of heavy-chain-only antibodies in mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.41 (2006):15130-15135)。本發明提供全人源化重鏈抗體，其等係藉由具有完整人類重鏈抗體庫的經基因修飾之動物所產生。

【0030】 如本文所用，術語「抗體(antibody)」係指含有至少一個(例如一個、兩個、三個、四個、五個、或六個)互補決定區(CDR)(例如來自免疫球蛋白輕鏈的三個CDR中之任一者，或來自免疫球蛋白重鏈的三個CDR中之任一者)且能夠特異性結合至表位(epitope)的

任何抗原結合分子。抗體的非限制性示例包括：單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、單鏈抗體、重鏈抗體、嵌合抗體、人類抗體、及人源化抗體。在一些實施例中，抗體可含有人類抗體的Fc區。術語抗體亦包括衍生物，例如雙特異性抗體、單鏈抗體、雙抗體(diabody)、線性抗體、及由抗體片段形成的多特異性抗體。

【0031】 如本文所用，術語「抗原結合片段(antigen-binding fragment)」係指全長抗體的一部分，其中該部分能夠特異性結合至抗原。在一些實施例中，抗原結合片段含有至少一個可變域(例如重鏈可變域或輕鏈可變域)。抗體片段的非限制性示例包括例如：Fab、Fab'、F(ab')₂、及Fv片段。

【0032】 如本文所用，術語「人類抗體(human antibody)」係指藉由存在於人類中之核酸(例如重新排序之人類免疫球蛋白重鏈或輕鏈基因座)編碼的抗體。在一些實施例中，人類抗體係收集自人類，或在人類細胞培養[例如人類融合瘤(hybridoma)細胞]中產生。在一些實施例中，人類抗體係在非人類細胞(例如小鼠或倉鼠細胞株)中產生。在一些實施例中，人類抗體係在細菌或酵母菌細胞中產生。在一些實施例中，人類抗體係在含有未重新排序或重新排序之人類免疫球蛋白基因座(例如重鏈或輕鏈人類免疫球蛋白基因座)的基因轉殖之非人類動物(例如小鼠)中產生。

【0033】如本文所用，術語「嵌合抗體(chimeric antibody)」係指含有存在於至少兩種不同抗體中之序列的抗體(例如來自兩種不同哺乳動物物種的抗體，諸如人類及小鼠抗體)。嵌合抗體的非限制性示例係含有人類抗體之可變域序列(例如輕鏈及/或重鏈可變域序列之全部或部分)及非人類抗體之恆定域的抗體。嵌合抗體的其他示例描述於本文中，且係本技術領域眾所周知。

【0034】如本文所用，術語「人源化抗體(humanized antibody)」係指含有衍生自非人類(例如小鼠)免疫球蛋白之序列及含有衍生自人類免疫球蛋白之序列的非人類抗體。

【0035】如本文所用，術語「單鏈抗體(single-chain antibody)」係指含有至少兩個免疫球蛋白可變域(例如哺乳動物免疫球蛋白重鏈或輕鏈的可變域)的單一多肽，其能夠特異性結合至抗原。

【0036】如本文所用，術語「重鏈抗體(heavy-chain antibody)」係指僅由重鏈(通常係兩個重鏈)組成且不具有任何輕鏈的抗體分子。

【0037】如本文所用，術語“VHH”係指衍生自重鏈抗體的可變域。VHH無需與VL配對即可特異性辨識抗原。在一些實施例中，本文所述之VHH(亦稱為sdAb或奈米抗體)係衍生自本文所述之人源化重鏈抗體中之任一者。在一些實施例中，本文所述之VHH、sdAb、

或奈米抗體係衍生自藉由本文所述之經基因修飾之非人類動物中之任一者所產生的重鏈抗體。

【0038】 如本文所用，術語「對象(subject)」及「患者(patient)」於本說明書全文內容中可互換使用，且係描述動物(人類或非人類)。本發明考量了獸醫及非獸醫之應用。人類患者可係成年人或青少年(例如18歲以下的人類)。除了人類之外，患者亦包括但不限於：小鼠、大鼠、倉鼠、豚鼠、兔、雪貂、貓、狗、及靈長類。包括例如：非人類靈長類(例如猴、黑猩猩、大猩猩等)、嚙齒類(例如大鼠、小鼠、沙鼠、倉鼠、雪貂、兔)、兔形類(lagomorph)、豬類(例如豬、小型豬)、馬類(equine)、犬類(canine)、貓類(feline)、牛類(bovine)、及其他家養、農場、及動物園動物。

【0039】 如本文所用，當提及抗體時，短語「特異性結合(specifically binding, specifically binds)」意指抗體與其標靶分子的相互作用相較於與其他分子相互作用更佳，因為相互作用取決於目標分子上是否存在特定結構[即抗原決定位(antigenic determinant)或表位]；亦即，試劑係辨識並結合至包括特定結構的分子，而非一般的所有分子。特異性結合至標靶分子的抗體可稱為標靶特異性抗體。

【0040】 如本文所用，術語「多肽(polypeptide)」、「肽(peptide)」、及「蛋白質(protein)」可互換使用，係指任何長度之至少兩個胺基酸的胺基酸聚合物。

【0041】 如本文所用，術語「多核苷酸(polynucleotide)」、「核酸分子(nucleic acid molecule)」、及「核酸序列(nucleic acid sequence)」在本文中可互換使用，係指任何長度之至少兩個核苷酸的核苷酸聚合物，且包括但不限於DNA、RNA、DNA/RNA混成物(hybrid)、及其修飾。

抗體及抗原結合片段

【0042】 本發明提供藉由本文所述之方法產生的抗體及其抗原結合片段(例如重鏈抗體、人源化重鏈抗體、或多特異性抗體)。

【0043】 一般而言，習知抗體係由兩類別之多肽鏈組成：輕鏈及重鏈。本發明之非限制性抗體可係完整的四免疫球蛋白鏈抗體，其包含兩個重鏈及兩個輕鏈。抗體的重鏈可係任何同型(包括IgM、IgG、IgE、IgA、或IgD)或亞類別(包括IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE1、IgE2等)。輕鏈可係 κ 輕鏈或 λ 輕鏈。抗體可包含兩個相同的輕鏈複製體及兩個相同的重鏈複製體。各重鏈皆包含一個可變域(或可變區 V_H)及多個恆定域(或恆定區)，且經由其恆定域內的雙硫鍵相互結合，以形成抗體的「主幹(stem)」。各輕鏈皆包含一個可變域(或可變區 V_L)及一個恆定域(或恆定區)，且各自經

由雙硫鍵結合至一個重鏈。各輕鏈的可變區與其所結合之重鏈的可變區對齊。輕鏈及重鏈的可變區皆含有三個包夾於較保守構架區(FR)之間的高度可變區(hypervariable region)。

【0044】此等高度可變區[稱為互補決定區(CDR)]形成環，其包含抗體的主要抗原結合表面。四個構架區(framework region)主要呈 β 折片構形(beta-sheet conformation)，且CDR形成連接 β 折片構形的環，且在某些情況下形成 β 折片構形的一部分。各鏈中的CDR均由構架區保持緊密相鄰，並與另一個鏈的CDR促成抗原結合區的形成。

【0045】藉由分析抗體的胺基酸序列來辨識抗體的CDR區的方法係眾所周知，且常用多種CDR的定義。Kabat定義係基於序列可變性，而Chothia定義係基於結構環區的位置。此等方法及定義描述於例如Martin, "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains," Antibody engineering, Springer Berlin Heidelberg, 2001.422-439；Abhinandan, et al."Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains," Molecular immunology 45.14 (2008):3832-3839；Wu, T.T. and Kabat, E.A.(1970) J. Exp.Med.132:211-250；Martin et al., Methods Enzymol.203:121-53 (1991)；Morea et al., Biophys

Chem.68(1-3):9-16 (Oct. 1997); Morea et al., J Mol Biol.275(2):269-94 (Jan .1998); Chothia et al., Nature 342(6252):877-83 (Dec. 1989); Ponomarenko and Bourne, BMC Structural Biology 7:64 (2007); 其等之全文內容以引用方式併入本文。

【0046】 CDR對於辨識抗原表位至關重要。如本文所用，「表位 (epitope)」係能夠被抗體的抗原結合域特異性結合之標靶分子的最小部分。表位的最小大小可係約三個、四個、五個、六個、或七個胺基酸，但此等胺基酸不必係抗原之一級結構的連續線性序列，因為表位可能取決於抗原的三維組態，該三維組態係基於抗原的二級及三級結構。

【0047】 在一些實施例中，抗體係完整的免疫球蛋白分子(例如 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4、IgM、IgD、IgE、IgA)。IgG亞類別(IgG1、IgG2、IgG3、及IgG4)高度保守，但在其等之恆定區，尤其係其等之樞紐及上CH2域中存在差異。IgG亞類別的序列及差異在本技術領域係眾所周知，且描述於例如 Vidarsson, et al, "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions."Frontiers in immunology 5 (2014); Irani, et al."Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic

monoclonal antibodies against infectious diseases." *Molecular immunology* 67.2 (2015):171-182 ; Shakib, Farouk, ed. *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation*. Elsevier, 2016 ; 其等之全文內容以引用方式併入本文。重鏈抗體中的重鏈恆定區可衍生自本文所述之任何免疫球蛋白分子(例如IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4、IgM、IgD、IgE、IgA)。

【0048】 抗體亦可係衍生自任何物種(例如人類、嚙齒類、小鼠、大鼠、駱駝科)的免疫球蛋白分子。本文所揭示之抗體亦包括但不限於：多株、單株、單特異性、多特異性抗體、及包括融合至另一多肽之免疫球蛋白結合域的嵌合抗體。術語「抗原結合域(antigen binding domain)」或「抗原結合片段(antigen binding fragment)」係抗體的一部分，其保留完整抗體的特異性結合活性，即能夠與完整抗體之標靶分子上的表位特異性結合之抗體的任何部分。其包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂、以及此等片段的變異體。因此，在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段可係例如：scFv、Fv、Fd、dAb、雙特異性抗體、雙特異性scFv、雙抗體、線性抗體、單鏈抗體分子、由抗體片段形成的多特異性抗體、以及包括結合域的任何多肽，該結合域係抗體結合域或與之同源。抗原結合域的非限制性示例包括例如：完整抗體的重鏈及/或輕鏈CDR、完整抗體的重

鏈及/或輕鏈可變區、完整抗體的全長重鏈或輕鏈、或來自完整抗體之重鏈或輕鏈的單獨CDR。

【0049】 在一些實施例中，抗原結合片段可形成嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor, CAR)的一部分。在一些實施例中，嵌合抗原受體係如本文所述之VHH的融合物，其融合至CD3- ζ 跨膜域及膜內域(endodomain)。

【0050】 藉由本文所述之方法產生的抗體及其抗原結合片段(例如人源化抗體或嵌合抗體)具有諸多優點。在一些實施例中，不需要進一步最佳化來獲得所欲之特性(例如結合親和性、熱穩定性、及/或受限的聚集)。

【0051】 在一些實施例中，抗體(或其抗原結合片段)以小於 0.1 s^{-1} 、小於 0.01 s^{-1} 、小於 0.001 s^{-1} 、小於 0.0001 s^{-1} 、或小於 0.00001 s^{-1} 的解離速率(koff)特異性結合至標靶。在一些實施例中，解離速率(koff)大於 0.01 s^{-1} 、大於 0.001 s^{-1} 、大於 0.0001 s^{-1} 、大於 0.00001 s^{-1} 、或大於 0.000001 s^{-1} 。

【0052】 在一些實施例中，動力學結合速率(kon)大於 $1\times 10^2/\text{Ms}$ 、大於 $1\times 10^3/\text{Ms}$ 、大於 $1\times 10^4/\text{Ms}$ 、大於 $1\times 10^5/\text{Ms}$ 、或大於 $1\times 10^6/\text{Ms}$ 。在一些實施例中，動力學結合速率(kon)小於 $1\times 10^5/\text{Ms}$ 、小於 $1\times 10^6/\text{Ms}$ 、或小於 $1\times 10^7/\text{Ms}$ 。

【0053】 親和性可推導自動力學速率常數的商($KD=k_{off}/k_{on}$)。在一些實施例中， KD 小於 1×10^{-6} M、小於 1×10^{-7} M、小於 1×10^{-8} M、小於 1×10^{-9} M、或小於 1×10^{-10} M。在一些實施例中， KD 小於50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、15 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、或1 nM。在一些實施例中， KD 大於 1×10^{-7} M、大於 1×10^{-8} M、大於 1×10^{-9} M、大於 1×10^{-10} M、大於 1×10^{-11} M、或大於 1×10^{-12} M。在一些實施例中，抗體以小於或等於約0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、或0.1 nM的 KD 結合至標靶。

【0054】 在一些實施例中，測定了熱穩定性。如本文所述之抗體或抗原結合片段可具有大於60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C的 T_m 。

【0055】 在各種實施例中，對親代重鏈抗體序列進行取代，以製造變異體重鏈抗體。一般而言，親代重鏈抗體的重鏈抗體變異體對特定抗原所具有的抗原結合親和性，係親代重鏈抗體之結合親和性的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少100%(例如至少150%、至少200%、至少500%、至少1000%、或多達至少10,000%)。在一些

實施例中，相較於親代重鏈抗體，變異體重鏈抗體包含單一取代。然而，在其他實施例中，相較於親代重鏈抗體序列，有數個胺基酸(例如多達約5個或10個或更多)被取代，此等胺基酸衍生自在特定位置具有同一性的其他人類重鏈序列。在各種實施例中，測試所得之變異體重鏈抗體，以確認所欲之結合親和性及/或特異性未因置換殘基而顯著降低。在一些實施例中，經改良之變異體重鏈抗體係藉由取代來自不同人類重鏈序列的胺基酸而產生。在各種實施例中，VHH與親代VHH具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性。

【0056】 本文所述之VHH可用於製造多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。在一態樣中，本發明提供多特異性抗體，其包含：第一抗原結合部分及第二抗原結合部分。在一些實施例中，第一抗原結合部分包含重鏈可變域(VH)及輕鏈可變域(VL)，其中VH及VL共同形成結合第一表位的抗原結合位址。在一些實施例中，第一抗原結合部分包含特異性結合第一表位的VHH。在一些實施例中，第二抗原結合部分包含特異性結合第二表位的VHH。在一些實施例中，第一表位及第二表位來自相同抗原。在一些實施例中，第一表位及第二表位來自不同抗原。

【0057】 在一些實施例中，第一抗原結合部分係由兩個重鏈及兩個輕鏈組成的全長抗體。在一些實施例中，第一抗原結合部分係包含重鏈及輕鏈的抗體片段，該重鏈包含VH，且該輕鏈包含VL。在一些實施例中，第二抗原結合部分包含單一多肽鏈。在一些實施例中，第二抗原結合部分的C端融合至第一抗原結合部分之至少一重鏈的N端。在一些實施例中，第二抗原結合部分的C端融合至第一抗原結合部分之至少一輕鏈的N端。在一些實施例中，第二抗原結合部分的N端融合至第一抗原結合部分之至少一重鏈的C端。在一些實施例中，第二抗原結合部分的N端融合至第一抗原結合部分之至少一輕鏈的C端。在一些實施例中，第二抗原結合部分係包含第一多肽鏈及第二多肽鏈的似Fab域，該第一多肽鏈包含融合至CH1域的第一VHH，且該第二多肽鏈包含融合至CL域的第二VHH。

【0058】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段係三特異性抗體。在一些實施例中，三特異性抗體係三特異性VHH-Fc。在一些實施例中，三特異性抗體包含相同VHH。在一些實施例中，三特異性抗體包含不同VHH。在一些實施例中，VHH結合至相同表位。在一些實施例中，VHH結合至不同表位。

【0059】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段具有四個或多於四個VHH。在一些實施例中，為了增加可開發性，故在未加入IgG Fc域的情況下組合至少四個VHH，以構築四特異性VHH。儘管缺乏

Fc效應子功能，但相較於雙特異性及三特異性VHH-Fc，此等分子具有對抗原的親和性及親留性(avidity)增加的額外優勢。

【0060】 在一些實施例中，此等抗體或其抗原結合片段(例如包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、或多於10個)具有功能性Fc。

【0061】 在一些實施例中，由本文所述之經基因修飾之非人類動物所產生的重鏈抗體具有VHH域，其包括CDR1、CDR2、及CDR3。在一些實施例中，CDR3的長度介於6至23之間，例如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、或23。在一些實施例中，CDR3的長度係至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、或至少23。

運鐵蛋白受體1 (TFR1)

【0062】 TFR1 [亦稱為分化簇71 (CD71)]廣泛表現，並可以高親和性結合至運鐵蛋白(Tf)。人類TFR1係90 kDa的第II型跨膜醣蛋白，其由760個胺基酸組成，在細胞表面上以雙硫鍵連結之二聚體(180 kDa)的形式存在。TFR1單體係由包含671個胺基酸的大型細胞外C端域(含有Tf結合位址)、跨膜域(28個胺基酸)、及細胞內N端域(61個胺基酸)組成。C端細胞外域含有三個連結N之醣基化位址，其等位於天冬醯胺酸殘基251、317、及727處；及一個連結O之醣基

化位址，其位於蘇胺酸104處，此等醮基化位址對於受體充分發揮功能而言皆係不可或缺者。

【0063】 運鐵蛋白(Tf)係80 kDa的醮蛋白，其由兩個40 kDa的次單元組成，稱為N葉(N-lobe)及C葉(C-lobe)，由短連結子序列分隔。各次單元能夠結合至一個遊離三價鐵(Fe^{3+})，並因此，Tf至多可附接有兩個鐵原子。無鐵形式的Tf (apo-Tf)會在血液中高效地結合 Fe^{3+} ，並經由與TFR1的相互作用將其轉運至細胞表面進行內化作用(internalization)。作為調節引入鐵的膜蛋白質，TFR1係TFR家族的成員，其對結合至 Fe^{3+} 的運鐵蛋白(Tf)表現出奈米莫耳的親和性。Tf-TFR1的組成物經由格形蛋白(clathrin)媒介之胞吞作用進行內化，且當pH降至5.5時， Fe^{3+} 即自Tf解離。在此pH下，apo-Tf與TFR1仍保持結合並經循環至具有生理pH的細胞表面，從而使前者(apo-Tf)受到釋放。

【0064】 運鐵蛋白受體所攝取的鐵係癌細胞吸收鐵的重要途徑，因此越來越多的證據表明，TFR1參與了腫瘤的發生及進展，且在許多癌症中其表現明顯失調。TFR1與癌症之間的關係已被揭示，使TFR1成為在干預癌症方面有價值的藥物標靶。

【0065】 在血腦障壁內皮細胞上表現的TFR1亦用於臨床前研究，以將包括抗體的大分子能夠遞送至腦內。TFR1標靶抗體可穿過血腦障壁，而不會干擾鐵的攝取。

【0066】 TFR1、Tf、及其等功能的詳細描述可參見例如 Candelaria, P. V., et al. "Antibodies targeting the transferrin receptor 1 (TfR1) as direct anti-cancer agents." *Frontiers in Immunology* 12 (2021):607692 ; 及 Shen, Y., et al. "Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy." *American Journal of Cancer Research* 8.6 (2018):916 ; 該等文獻之全文內容皆以引用方式併入本文。

重鏈單可變域(VHH)抗體

【0067】 單株及重組抗體係醫學及生物技術中的重要工具。如同所有哺乳動物，駱駝科(例如駱馬)可產生習知抗體(例如IgG1)，其由兩個重鏈及兩個輕鏈以雙硫鍵結合成Y形所組成。然而，駱駝科亦可產生兩個獨特的IgG亞類別：IgG2及IgG3，亦稱為重鏈IgG。此等抗體僅由兩個重鏈所組成，缺乏CH1區，但在其等N端仍帶有稱為VHH (或奈米抗體)的抗原結合域。習知Ig需要來自重鏈與輕鏈的可變區進行結合，才能實現高度多樣性的抗原-抗體交互作用。儘管分離的重鏈及輕鏈仍然顯示出此種能力，但其等相較於經配對的重鏈及輕鏈仍展現出非常低的親和性。重鏈IgG的獨特特徵，在於其等單體抗原結合區無需與另一個區配對，即能夠以相當於習知抗體的特異性、親和性、及尤其係多樣性結合至抗原。此特徵主要係由於兩個重鏈之可變區的胺基酸序列中的幾個主要變異，此等變異相較於

習知Ig引起了深層的構形變化。可變區中的主要取代防止輕鏈結合至重鏈，同時亦防止未結合的重鏈被免疫球蛋白結合蛋白質回收。

【0068】 此等抗體(稱為VHH、sdAb、或奈米抗體)的單可變域係由後天免疫系統所產生的最小抗原結合域。此等抗體之可變區的第三互補決定區(CDR3)已發現係習知抗體的兩倍長。這導致與抗原相互作用的表面增大，亦增加了抗原-抗體相互作用的多樣性，從而彌補輕鏈的缺失。藉由長互補決定區3 (CDR3)，VHH即可延伸至習知抗體無法觸及的蛋白質縫隙中，包括具有功能意義的位址，諸如酵素的活性位址或病毒表面的受體結合峽谷。

【0069】 相較於攜帶習知抗體之可變域(VH及VL)的習知抗體，VHH具有許多其他優勢，包括更高的穩定性、溶解度、表現產量、及再摺疊能力，以及更佳的體內組織滲透性及內化作用。此外，不同於習知抗體的VH域，VHH在本質上不傾向於結合至輕鏈。由於VHH不結合至VL域，因此相較於含有習知VH-VL對或基於VH域之單一域的構築體，將VHH重新格式化為多特異性抗體(例如雙特異性抗體)構築體更加容易。

【0070】 本發明提供例如抗TFR1抗體、其經修飾之抗體、其嵌合抗體、及其人源化抗體。

【0071】 23B8、及23B8衍生之抗體(例如人源化抗體)的CDR序列包括分別記載於SEQ ID NO：1、2、及3之VHH域的CDR，其等

係如Kabat編號所定義。該等CDR亦可由IMGT系統定義。根據IMGT編號，VHH域的CDR分別記載於SEQ ID NO：13、14、及15。

【0072】 24A1、及24A1衍生之抗體(例如人源化抗體)的CDR序列包括分別記載於SEQ ID NO：4、5、及6之VHH域的CDR，其等係如Kabat編號所定義。該等CDR亦可由IMGT系統定義。根據IMGT編號，VHH域的CDR分別記載於SEQ ID NO：16、17、及18。

【0073】 24C9、及24C9衍生之抗體(例如人源化抗體)的CDR序列包括分別記載於SEQ ID NO：7、8、及9之VHH域的CDR，其等係如Kabat編號所定義。該等CDR亦可由IMGT系統定義。根據IMGT編號，VHH域的CDR分別記載於SEQ ID NO：19、20、及21。

【0074】 24G5、及24G5衍生之抗體(例如人源化抗體)的CDR序列包括分別記載於SEQ ID NO：10、11、及12之VHH域的CDR，其等係如Kabat編號所定義。該等CDR亦可由IMGT系統定義。根據IMGT編號，VHH域的CDR分別記載於SEQ ID NO：22、23、及24。

【0075】 23B8抗體的VHH域的胺基酸序列係記載於SEQ ID NO：25。24A1抗體的VHH域的胺基酸序列係記載於SEQ ID NO：

26。24C9抗體的VHH域的胺基酸序列係記載於SEQ ID NO：27。

24G5抗體的VHH域的胺基酸序列係記載於SEQ ID NO：28。

【0076】 本文亦提供各種經修飾或人源化VHH的胺基酸序列。由於可採用不同的方法將重鏈抗體修飾或人源化(例如可使用不同的胺基酸取代來修飾序列)，因此重鏈抗體的VHH域可具有多於一個之版本的人源化序列。在一些實施例中，人源化VHH域與SEQ ID NO：25至28中之任何序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性。

【0077】 此外，在一些實施例中，本文所述之抗體或其抗原結合片段亦可含有一個、兩個、或三個選自SEQ ID NO：1至3、SEQ ID NO：4至6、SEQ ID NO：7至9、SEQ ID NO：10至12、SEQ ID NO：13至15、SEQ ID NO：16至18、SEQ ID NO：19至21、及SEQ ID NO：22至24之群組的VHH域CDR。

【0078】 在一些實施例中，抗體可具有重鏈單可變域(VHH)，其包含互補決定區(CDR) 1、2、3，其中CDR1區包含與所選之VHH CDR1胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、或95%同一性的胺基酸序列或由其所組成，CDR2區包含與所選之VHH CDR2胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、或95%同一性的胺基酸序列或由其所組成，及CDR3區包含與所選之VHH CDR3胺基酸序列具有至少

80%、85%、90%、或95%同一性的胺基酸序列或由其所組成。該等所選之VHH CDR 1、2、3胺基酸序列如圖1及圖2所示。

【0079】 在一些實施例中，本文所述之抗體或抗原結合片段可含有重鏈單可變域(VHH)，其含有以下中之一、二、或三者：具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的VHH CDR1；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的VHH CDR2；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的VHH CDR3，其中VHH CDR1、VHH CDR2、及VHH CDR3選自圖3中的CDR。

【0080】 在一些實施例中，本文所述之抗體或抗原結合片段可含有重鏈單可變域(VHH)，其含有以下中之一個、兩個、或三個CDR：具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：1；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：2；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：3。

【0081】 在一些實施例中，本文所述之抗體或抗原結合片段可含有重鏈單可變域(VHH)，其含有以下中之一個、兩個、或三個CDR：具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：4；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：5；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：6。

【0082】 在一些實施例中，本文所述之抗體或抗原結合片段可含有重鏈單可變域(VHH)，其含有以下中之一個、兩個、或三個CDR：具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：7；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：8；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：9。

【0083】 在一些實施例中，本文所述之抗體或抗原結合片段可含有重鏈單可變域(VHH)，其含有以下中之一個、兩個、或三個CDR：具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：10；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：11；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：12。

【0084】 在一些實施例中，本文所述之抗體或抗原結合片段可含有重鏈單可變域(VHH)，其含有以下中之一個、兩個、或三個CDR：具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：13；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：14；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：15。

【0085】 在一些實施例中，本文所述之抗體或抗原結合片段可含有重鏈單可變域(VHH)，其含有以下中之一個、兩個、或三個CDR：

具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：16；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：17；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：18。

【0086】 在一些實施例中，本文所述之抗體或抗原結合片段可含有重鏈單可變域(VHH)，其含有以下中之一個、兩個、或三個CDR：具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：19；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：20；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：21。

【0087】 在一些實施例中，本文所述之抗體或抗原結合片段可含有重鏈單可變域(VHH)，其含有以下中之一個、兩個、或三個CDR：具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：22；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：23；具有零個、一個、或兩個胺基酸插入、缺失、或取代的SEQ ID NO：24。

【0088】 插入、缺失、及取代可位於CDR序列內，或位於CDR序列之一個或兩個末端。在一些實施例中，CDR係基於Kabat編號方案而確定。在一些實施例中，CDR係基於Chothia編號方案而確定。

在一些實施例中，CDR係基於組合編號方案而確定。在一些實施例中，CDR係基於IMGT編號方案而確定。

【0089】 本發明亦提供結合至TFR1 (人類TFR1)的抗體或其抗原結合片段。抗體或其抗原結合片段含有：重鏈單可變區(VHH)，其包含與所選之VHH序列具有至少80%、85%、90%、或95%同一性的胺基酸序列或由其所組成。在一些實施例中，所選之VHH序列係SEQ ID NO：25。在一些實施例中，所選之VHH序列係SEQ ID NO：26。在一些實施例中，所選之VHH序列係SEQ ID NO：27。在一些實施例中，所選之VHH序列係SEQ ID NO：28。

【0090】 為了確定兩個胺基酸序列或兩個核酸序列的同一性百分比，出於最佳比較目的將序列對齊(例如可在第一胺基酸/核酸序列及第二胺基酸/核酸序列中之一或兩者中引入缺口(gap)以進行最佳對齊，且出於比較目的可忽略非同源序列)。接著比較位於對應胺基酸位置或核苷酸位置的胺基酸殘基或核苷酸。當第一序列中的一位置被與第二序列中對應位置的相同胺基酸殘基或核苷酸佔據時，則分子在該位置係相同。兩個序列之間的同一性百分比係由序列所共享之同一位置的數量而決定，並考慮對兩個序列進行最佳對齊所需引入之缺口數，及各缺口的長度。為了便於說明，可例如使用Blossum 62得分矩陣(Blossum 62 scoring matrix)來完成序列的

比較及兩個序列之間同一性百分比的確定，其中缺口罰分係12、缺口延伸罰分係4、及框移缺口罰分(frameshift gap penalty)係5。

【0091】 本發明亦提供核酸，其包含編碼多肽的多核苷酸，該多肽包含免疫球蛋白重鏈單可變域(VHH)。VHH包括如圖1及圖2所示之CDR，或具有如圖3所示之序列。

【0092】 抗體及抗原結合片段亦可係抗體或抗體片段、及多特異性(例如雙特異性)抗體或抗體片段的抗體變異體(包括衍生物及接合物)。本文所提供之其他抗體係多株、單株、多特異性(多聚體，例如雙特異性)、人類抗體、嵌合抗體(例如人類-小鼠嵌合體)、單鏈抗體、細胞內製造抗體[即胞內抗體(intrabodies)]、及其抗原結合片段。

【0093】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段包含Fc域，其可源自多種類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及IgA2)、或亞類別。在一些實施例中，Fc域源自IgG抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，Fc域包含一個、兩個、三個、四個、或更多個重鏈恆定區。

【0094】 本發明亦提供一種抗體或其抗原結合片段，其與如本文所述之任何抗體或抗原結合片段交叉競爭。交叉競爭測定法係本技術領域眾所周知，且描述於例如Moore et al., "Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus

type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein."Journal of virology 70.3 (1996):1863-1872，其全文內容以引用方式併入本文。在一態樣中，本發明亦提供一種抗體或其抗原結合片段，其與如本文所述之任何抗體或抗原結合片段結合至相同的表位或區。表位分箱測定法(epitope binning assay)係本技術領域眾所周知，且描述於例如Estep et al."High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning."MAbs.Vol. 5.No. 2.Taylor & Francis, 2013，其全文內容以引用方式併入本文。

【0095】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段包含選自SEQ ID NO：1、4、7、10、13、16、19、及22的重鏈單可變域(VHH) CDR1。

【0096】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段包含選自SEQ ID NO：2、5、8、11、14、17、20、及23的重鏈單可變域(VHH) CDR2。

【0097】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段包含選自SEQ ID NO：3、6、9、12、15、18、21、及24的重鏈單可變域(VHH) CDR3。

抗體特徵

【0098】 TFR1經由與結合鐵之TF相互作用，在細胞對鐵的攝取中發揮關鍵作用。鐵對於多種細胞過程皆係不可或缺者，並且對於DNA合成及所致之細胞增生而言至關重要。由於TFR1在癌細胞病理學中的核心作用，惡性細胞通常會過度表現TFR1，且此種表現增加可能與不同類型之癌症的預後不良相關。在惡性細胞上升高的TFR1表現位準，加上其細胞外可及性、內化能力、以及在癌細胞病理學中的核心作用，使此受體在抗體媒介之療法中成為富具吸引力的標靶。

【0099】 在一些實施例中，本文所述之抗體或其抗原結合片段不可阻斷TFR1與TF之間的結合。在一些實施例中，本文所述之抗體或其抗原結合片段可阻斷TFR1與TF之間的結合。在一些實施例中，本文所述之抗體或其抗原結合片段可接合至藉由受體媒介之胞吞作用進行內化的抗癌劑。在一些實施例中，本文所述之抗體或其抗原結合片段可瓦解(disrupt)受體的功能。在一些實施例中，本文所述之抗體或其抗原結合片段不可誘導Fc效應子功能，從而防止或改善其等對正常細胞的負面效應。

【0100】 本發明提供抗體或其抗原結合片段，其等包含人類Fc域，相較於不存在如本文所述之抗體或其抗原結合片段時，該等抗體或其抗原結合片段誘導至少或約1倍、至少或約2倍、至少或約3倍、至少或約4倍、至少或約5倍、至少或約6倍、至少或約7倍、至

少或約8倍、至少或約9倍、至少或約10倍、至少或約20倍、至少或約30倍、至少或約40倍、至少或約50倍、或者至少或約100倍的Fc依賴性效應子功能。

【0101】 本發明提供抗體或其抗原結合片段，其等包含人類Fc域，相較於不存在如本文所述之抗體或其抗原結合片段時，該等抗體或其抗原結合片段誘導至少或約1倍、至少或約2倍、至少或約3倍、至少或約4倍、至少或約5倍、至少或約6倍、至少或約7倍、至少或約8倍、至少或約9倍、至少或約10倍、至少或約20倍、至少或約30倍、至少或約40倍、至少或約50倍、或者至少或約100倍的宿主免疫反應。

【0102】 本發明提供抗體或其抗原結合片段，其等可以內化至人類腦細胞(例如皮質微血管內皮細胞)內，該等抗體或其抗原結合片段的胞吞率係至少50%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%。在一些實施例中，本文所述之抗體或其抗原結合片段相較於同型對照抗體的胞吞率係至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、50倍、100倍、500倍、或1000倍。

【0103】 在一些實施例中，本文提供一種抗體或其抗原結合片段，其包含單一重鏈。在一些實施例中，本文提供一種抗體或其抗原結

合片段，其包含一對重鏈。在一些實施例中，重鏈對係藉由雙硫鍵連結。在一些實施例中，重鏈對包含洞中癩(knob-in-hole)修飾。在一些實施例中，重鏈包含人類IgG Fc域。在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段在各重鏈中包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10個VHH域。在一些實施例中，各重鏈中的VHH域特異性結合至相同表位。在一些實施例中，各重鏈中的VHH域特異性結合至不同表位。在一些實施例中，各重鏈中的VHH域結合至至少1、2、3、4、或5種不同表位。

【0104】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段係雙特異性抗體，或三特異性抗體。在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段可特異性結合至至少4、5、或6種抗原。

【0105】 在一些實施例中，抗體(或其抗原結合片段)以小於 0.1 s^{-1} 、小於 0.01 s^{-1} 、小於 0.001 s^{-1} 、小於 0.0001 s^{-1} 、或小於 0.00001 s^{-1} 的解離速率(koff)特異性結合至TFR1。在一些實施例中，解離速率(koff)大於 0.01 s^{-1} 、大於 0.001 s^{-1} 、大於 0.0001 s^{-1} 、大於 0.00001 s^{-1} 、或大於 0.000001 s^{-1} 。

【0106】 在一些實施例中，動力學結合速率(kon)大於 $1\times 10^2/\text{Ms}$ 、大於 $1\times 10^3/\text{Ms}$ 、大於 $1\times 10^4/\text{Ms}$ 、大於 $1\times 10^5/\text{Ms}$ 、或大於 $1\times 10^6/\text{Ms}$ 。在一些實施例中，動力學結合速率(kon)小於 $1\times 10^5/\text{Ms}$ 、小於 $1\times 10^6/\text{Ms}$ 、或小於 $1\times 10^7/\text{Ms}$ 。

【0107】 親和性可推導自動力學速率常數的商($KD=k_{off}/k_{on}$)。在一些實施例中， KD 小於 1×10^{-6} M、小於 1×10^{-7} M、小於 1×10^{-8} M、小於 1×10^{-9} M、或小於 1×10^{-10} M。在一些實施例中， KD 小於50 nM、30 nM、20 nM、15 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、或1 nM。在一些實施例中， KD 大於 1×10^{-7} M、大於 1×10^{-8} M、大於 1×10^{-9} M、大於 1×10^{-10} M、大於 1×10^{-11} M、或大於 1×10^{-12} M。

【0108】 用於測量抗體對抗原之親和性的一般技術包括例如酵素連結免疫吸附測定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、放射免疫測定法(radioimmunoassay, RIA)、及表面電漿子共振(surface plasmon resonance, SPR)。在一些實施例中，抗體結合至人類TFR1、猴TFR1、小鼠TFR1、或嵌合TFR1。在一些實施例中，抗體不結合至人類TFR1、猴TFR1、小鼠TFR1、或嵌合TFR1。

【0109】 在一些實施例中，測定了熱穩定性。如本文所述之抗體或抗原結合片段可具有大於55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C的 T_m (熔化溫度)。在一些實施例中， T_m 小於55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、

68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C。如本文所述之抗體或抗原結合片段可具有大於55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C的Tagg [聚集溫度，例如於266 nm之Tagg (Tagg266)或於473 nm之Tagg (Tagg473)]。在一些實施例中，Tagg小於55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C。

【0110】 在一些實施例中，Fc區係人類IgG1、人類IgG2、人類IgG3、或人類IgG4。

【0111】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段具有功能性Fc區。在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段包含人類IgG1 Fc區。在一些實施例中，人類IgG1 Fc區包含與SEQ ID NO：34具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的胺基酸序列。

【0112】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段不具有Fc區。例如，抗體(或其抗原結合片段)係包含藉由連結子肽相互連接之一或

多個VHH域的多肽。在一些實施例中，抗體包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10個VHH域。在一些實施例中，VHH域特異性結合至相同表位。在一些實施例中，VHH域結合至不同表位。在一些實施例中，VHH域結合至至少1、2、3、4、或5種不同表位。

【0113】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段不具有功能性Fc區。在一些實施例中，Fc區具有LALA突變(EU編號中之L234A及L235A突變)，或LALA-PG突變(EU編號中之L234A、L235A、P329G突變)。在一些實施例中，Fc區根據EU編號具有位於位置297的突變(例如N297A)。在一些實施例中，突變之人類IgG1 Fc區包含與SEQ ID NO:35具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的胺基酸序列。

【0114】 在一些實施例中，向對象投予本文所述之抗體或其抗原結合片段後6小時、12小時、24小時、36小時、48小時、60小時、或72小時，其於腦部(例如全腦或腦實質)中的濃度可大於投予後立即(例如0.5小時)測量之濃度的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、或80%。在一些實施例中，向對象投予本文所述之抗體或其抗原結合片段後6小時、12小時、24小時、36小時、48小時、60小時、或72小時，其於腦部(例如全腦或腦實質)中的濃度可係對照抗體(例如hIgG1或JR141-N)之濃度或對象之血清中濃度的至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、

40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、或10000倍。

製造抗TFR1抗體的方法

【0115】 本文所述之抗體或抗原結合片段的變異體可藉由將適當的核苷酸變化引入編碼本文所述之人類、人源化、或嵌合抗體、或其抗原結合片段的DNA中來製備，或藉由肽合成來製備。此類變異體包括例如構成抗體或抗原結合域之抗原結合位址的胺基酸序列內部殘基的缺失、插入、或取代。在此類變異體之群體中，一些抗體或抗原結合片段對標靶蛋白質(例如TFR1)具有增加的親和性。缺失、插入、及/或組合中之任何組合皆可進行，以實現對標靶具有增加之結合親和性的抗體或其抗原結合片段。引入抗體或抗原結合片段中的胺基酸變化亦可改變轉譯後修飾或將新的轉譯後修飾引入抗體或抗原結合片段中，諸如改變(例如增加或減少)醣基化位址的數量、改變醣基化位址的類型(例如改變胺基酸序列，從而使不同的糖藉由細胞中存在的酵素進行附接)、或引入新的醣基化位址。在一些實施例中，本文所述之重鏈抗體或其抗原結合片段係藉由將任何經基因修飾之動物(例如具有完整人類重鏈可變域之原位取代、並組合經修飾之恆定區的小鼠)免疫來獲得，其描述於例如PCT/CN2022/119188。

【0116】 人源化抗體包括具有衍生自人類免疫球蛋白支架(scaffold)序列之人類生殖系(germline)免疫球蛋白序列之可變區及恆定區(或具有與衍生自人類免疫球蛋白支架序列之人類生殖系免疫球蛋白序列相同之胺基酸序列)的抗體。人源化抗體可包括不由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基[例如藉由體外隨機或定點誘變(site-specific mutagenesis)或藉由體內體細胞(somatic)突變所引入的突變]。因此，「人源化(humanized)」抗體係嵌合抗體，其中來自非人類物種的序列由對應的人類序列取代。

【0117】 一般而言，人類、人源化、或嵌合抗TFR1抗體的胺基酸序列變異體將含有與原始抗體之VHH域中所存在的序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%百分比同一性的胺基酸序列。

【0118】 相對於原始序列的同一性或同源性通常係指在對齊序列並引入缺口(如有必要)以實現最大百分比序列同一性之後，候選序列中存在之與人類、人源化、或嵌合抗TFR1抗體或片段中存在之序列相同的胺基酸殘基的百分比，且任何保守取代皆不考慮為序列同一性的一部分。

【0119】 亦可對抗TFR1抗體或抗原結合片段進行其他修飾。例如，可將半胱胺酸殘基引入Fc區，從而可在此區形成鏈間雙硫鍵。由此產生的同源二聚體抗體在體外及/或體內的半衰期可增加。亦可

使用異質雙功能性交聯劑來製備具有增加之體外及/或體內半衰期的同源二聚體抗體，其描述於例如 Wolff et al. Wolff et al. ("Monoclonal antibody homodimers: enhanced antitumor activity in nude mice." *Cancer research* 53.11 (1993):2560-2565)。替代地，亦可工程改造抗體以具有雙Fc區。

【0120】 在一些實施例中，可對抗TFR1抗體或其抗原結合片段進行共價修飾。此等共價修飾可藉由化學或酵素合成、或藉由酵素或化學裂解來進行。其他類型之抗體或抗體片段的共價修飾，係藉由使抗體或片段的標靶胺基酸殘基與能夠與所選之側鏈或N-或C-端殘基反應的有機衍生劑(derivatization agent)反應，從而引入分子中。

【0121】 在一些實施例中，所提供之抗體變異體具有缺乏(直接或間接)附接至Fc區之岩藻醣的碳水化合物結構。例如，此類抗體組成物中之岩藻醣的量可係從1%至80%、從1%至65%、從5%至65%、或從20%至40%。例如，岩藻醣的量係藉由計算位於Asn297之糖鏈內岩藻醣的平均量相對於附接至Asn297之所有糖結構(例如錯合物、混成物、及高甘露糖結構)的總和來確定，其係藉由MALDI-TOF質譜測定法所測量，如WO 2008/077546中所述。Asn297係指位於Fc區中約位置297 (Fc區殘基的Eu編號；或Kabat編號中的位置314)的天冬醯胺酸殘基；然而，由於抗體中的微小序列變化，

Asn297亦可位於位置297的上游或下游約 ± 3 個胺基酸，即位置294與300之間。此類岩藻醣化作用變異體可能具有改善的ADCC功能。在一些實施例中，為了減少多醣異質性，可進一步工程改造抗體的Fc區以使用丙胺酸替代位置297的天冬醯胺酸(N297A)。

【0122】 本發明亦提供：重組載體(例如表現載體)，其包括本文所揭示之分離多核苷酸(例如編碼本文所揭示之多肽的多核苷酸)；將重組載體引入其中的宿主細胞(即，使宿主細胞含有多核苷酸及/或包含多核苷酸的載體)；及藉由重組技術產生重組抗體多肽或其片段。

【0123】 如本文所用，「載體(vector)」係當將載體引入宿主細胞時，能夠將一或多種所關注之多核苷酸遞送至宿主細胞的任何構築體。「表現載體(expression vector)」能夠在已引入表現載體的宿主細胞中遞送一或多種所關注之多核苷酸及將其表現為經編碼之多肽。因此，在表現載體中，所關注之多核苷酸藉由與載體內或位於宿主細胞基因組中的所關注之多核苷酸之整合位址(integration site)處或附近或側翼(flanking)之調節元件(regulatory elements)[諸如啟動子、增強子、及/或多腺苷酸尾(poly-A tail)]可操作地連結，從而定位在載體中以用於表現，從而使所關注之多核苷酸在引入表現載體的宿主細胞中轉譯。

【0124】 載體可藉由本技術領域已知的方法引入宿主細胞，例如電穿孔、化學轉染(例如DEAE-葡聚糖)、轉化、轉染、及感染及/或傳遞(例如使用重組病毒)。因此，載體的非限制性示例包括：病毒載體(其可用於產生重組病毒)、裸DNA或RNA、質體、黏質體、噬菌體載體、及與陽離子縮合劑關聯之DNA或RNA表現載體。

【0125】 在一些實施例中，使用病毒表現系統(例如牛痘或其他痘病毒、反轉錄病毒、或腺病毒)引入本文所揭示之多核苷酸(例如編碼本文所揭示之多肽的多核苷酸)，其可涉及使用非致病型(缺陷型)、複製勝任型(replication competent)病毒，或可使用複製缺陷型(replication defective)病毒。在後者的情況下，病毒繁殖通常僅發生在互補的病毒包裝細胞中。合適的系統揭示於例如Fisher-Hoch et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:317-321；Flexner et al., 1989, Ann.N.Y.Acad Sci.569:86-103；Flexner et al., 1990, Vaccine, 8:17-21；美國專利第4,603,112、4,769,330、及5,017,487號；WO 89/01973；美國專利第4,777,127號；GB 2,200,651；EP 0,345,242；WO 91/02805；Berkner-Biotechniques, 6:616-627, 1988；Rosenfeld et al., 1991, Science, 252:431-434；Kolls et al., 1994, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 91:215-219；Kass-Eisler et al., 1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:11498-11502；Guzman et

al., 1993, *Circulation*, 88:2838-2848 ; 及 Guzman et al., 1993, *Cir.Res.*, 73:1202-1207。將DNA併入此類表現系統的技術係所屬技術領域中具有通常知識者眾所周知。DNA亦可係「裸露的(naked)」,其描述於例如Ulmer et al., 1993, *Science*, 259:1745-1749 ; 及Cohen, 1993, *Science*, 259:1691-1692。藉由將DNA塗覆至可有效轉運至細胞中的可生物降解的珠(bead)上,即可增加裸DNA的吸收。

【0126】 為有利於表現,可將包含本文所揭示之編碼抗體或編碼多肽之多核苷酸的DNA插入物(DNA insert)可操作地連結至適當的啟動子(例如異源啟動子),諸如噬菌體 λ PL啟動子、大腸桿菌(*E. coli*) lac、trp、及tac啟動子、SV40早發型及晚發型啟動子、及反轉錄病毒LTR之啟動子等。其他合適的啟動子係所屬技術領域中具有通常知識者眾所周知。在一些實施例中,啟動子係巨細胞病毒(cytomegalovirus, CMV)啟動子。表現構築體可進一步含有用於轉錄起始、終止的位址、及在轉錄區中用於轉譯的核糖體結合位址。藉由構築體表現之成熟轉錄物的編碼部分可包括位於待轉譯多肽之開頭的轉譯起始位址,及位於末端之適當位置的終止密碼子(UAA、UGA、或UAG)。

【0127】 如上所述,表現載體可包括至少一個可選擇標記(marker)。此類標記包括用於真核細胞培養的二氫葉酸還原酶

(dihydrofolate reductase)或新黴素抗性基因，及用於在大腸桿菌及其他細菌中培養的四環素或胺苄青黴素(ampicillin)抗性基因。適當宿主的代表性示例包括但不限於：細菌細胞，諸如大腸桿菌、鏈黴菌(*Streptomyces*)、及鼠傷寒沙氏桿菌(*Salmonella typhimurium*)細胞；真菌細胞，諸如酵母細胞；昆蟲細胞，諸如果蠅S2及夜蛾(*Spodoptera*) Sf9細胞；動物細胞，諸如CHO、COS、鮑斯黑素瘤(Bowes melanoma)、及HK 293細胞；以及植物細胞。適用於本文所述之宿主細胞的培養基及條件在本技術領域係眾所周知。

【0128】 用於細菌的非限制性載體包括：pQE70、pQE60、及pQE-9(可購自Qiagen)；pBS載體、Phagescript載體、Bluescript載體、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(可購自Stratagene)；及ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(可購自Pharmacia)。非限制性真核載體包括：pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、及pSG(可購自Stratagene)；及pSVK3、pBPV、pMSG、及pSVL(可購自Pharmacia)。其他合適的載體對於所屬技術領域中具有通常知識者而言係顯而易見的。

【0129】 適合使用的非限制性細菌啟動子包括：大腸桿菌lacI及lacZ啟動子、T3及T7啟動子、gpt啟動子、 λ PR及PL啟動子、及trp啟動子。合適的真核啟動子包括：CMV立即早發型啟動子、HSV胸

昔激酶啟動子、早發型及晚發型SV40啟動子、反轉錄病毒LTR之啟動子[諸如勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV)之啟動子]、及金屬硫蛋白啟動子(諸如小鼠金屬硫蛋白-I啟動子)。

【0130】 在釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中，可使用多種含有組成型或可誘導型啟動子[諸如 α 因子、醇氧化酶(alcohol oxidase)、及PGH]的載體。

【0131】 將構築體引入宿主細胞可藉由磷酸鈣轉染、DEAE-葡聚糖媒介之轉染、陽離子脂質媒介之轉染、電穿孔、傳遞、感染、或其他方法來實現。許多標準實驗室手冊中皆有描述此類方法，例如 Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology (1986)，其全文內容以引用方式併入本文。

【0132】 高等真核生物對編碼本發明之抗體的DNA的轉錄可藉由將增強子序列插入載體來增加。增強子係DNA的順式作用元件(cis-acting element)，通常約係從10至300 bp，其作用係提高給定宿主細胞類型中啟動子的轉錄活性。增強子的示例包括：位於複製起點遲側(late side)、在鹼基對100至270之SV40增強子；細胞巨大病毒早發型啟動子增強子；位於複製起點遲側之多瘤病毒增強子；及腺病毒增強子。

【0133】 為了將經轉譯的蛋白質分泌至內質網的腔(lumen)、週漿間隙(periplasmic space)、或細胞外環境中，可在表現的多肽中

併入適當的分泌訊息。訊息對於多肽可係內源性的，或該等訊息可係異源訊息。

【0134】 多肽(例如抗體)可以經修飾的形式表現，諸如融合蛋白質(例如GST-融合蛋白質)或具有組胺酸標記(histidine-tag)，且不僅可包括分泌訊息，亦可包括其他異源功能區。例如，可將額外的胺基酸(特別係帶電胺基酸)區加入至多肽的N端，以在純化期間或隨後的處理及儲存期間改善在宿主細胞中的穩定性及持續性。另外，可將肽部分加入至多肽中以促進純化。此類區可在多肽的最終製備之前移除。在多肽中加入肽部分以引起分泌或排泄、從而改善穩定性及促進純化等，皆係本技術領域眾所周知的常規技術。

【0135】 本發明亦提供與如本文所述之任何核苷酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列，及與如本文所述之任何胺基酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，本發明涉及編碼本文所述之任何肽的核苷酸序列，或由如本文

所述之任何核苷酸序列編碼的任何胺基酸序列。在一些實施例中，核酸序列小於10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150、200、250、300、350、400、500、或600個核苷酸。在一些實施例中，胺基酸序列小於5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、或200個胺基酸殘基。

【0136】 在一些實施例中，胺基酸序列(i)包含胺基酸序列；或(ii)由胺基酸序列組成，其中胺基酸序列係如本文所述之序列中之任一者。

【0137】 在一些實施例中，核酸序列(i)包含核酸序列；或(ii)由核酸序列組成，其中核酸序列係如本文所述之序列中之任一者。

【0138】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段在酵母菌、昆蟲細胞、或哺乳動物細胞(例如CHO細胞)中表現。

治療及診斷之方法

【0139】 本發明之抗TFR1抗體或抗體或其抗原結合片段可用於各種治療目的。在一態樣中，本發明提供：用於治療對象之腦部疾病(例如腦癌、失智症、或阿茲海默症)的方法、辨識患有腦部疾病(例如腦癌、失智症、或阿茲海默症)之對象的方法、降低對象發展腦部疾病之風險的方法、或降低對象發展其他症狀之風險的方法。在一些實施例中，治療可停止、減緩、延緩、或抑制腦部疾病(例如腦癌、

失智症、或阿茲海默症)的進展。在一些實施例中，治療可導致對象之腦部疾病(例如腦癌、失智症、或阿茲海默症)之一或多種症狀的數量、嚴重程度、及/或持續時間減少。

【0140】 在一態樣中，本發明之特徵在於包括向有需要之對象(例如患有、或經辨識或經診斷為患有腦部疾病的對象)投予治療有效量之本文所揭示之抗體或其抗原結合片段的方法。

【0141】 在一態樣中，本發明之特徵在於攜帶治療劑穿過血腦障壁的方法。在一些實施例中，如本文所述之抗體或其抗原結合片段係連結至治療劑。在一些實施例中，治療劑係抗體、其抗原結合片段、小分子、或抗體-藥物接合物。

【0142】 在一些實施例中，本文所揭示之組成物及方法可用於治療處於腦部疾病(例如腦癌、失智症、或阿茲海默症)風險中的患者。患有腦部疾病(例如腦癌、失智症、或阿茲海默症)的患者可使用本技術領域已知之各種方法加以辨識。

【0143】 在一些實施例中，腦部疾病係腦癌。

【0144】 在一態樣中，本發明涉及降低腫瘤生長速率的方法，其包括使腫瘤細胞與有效量之組成物接觸，該組成物包括本文所述之抗體或其抗原結合片段，或抗體-藥物接合物。在一態樣中，本發明涉及殺傷腫瘤細胞的方法，其包括使腫瘤細胞與有效量之組成物接

觸，該組成物包括本文所述之抗體或其抗原結合片段，或抗體-藥物接合物。

【0145】 如本文所用，「有效量(effective amount)」係指足以產生有益或所需之結果的量或劑量，該等結果包括停止、減緩、延緩、或抑制疾病(例如癌症)的進展。有效量將根據例如待投予抗體、抗原結合片段、編碼抗體之多核苷酸、包含多核苷酸之載體、及/或其組成物之對象的年齡及體重、症狀的嚴重程度及投予途徑等因素而變化，並因此可基於個體情況確定投予方式。

【0146】 有效量可在一或多次投予中投予。例如，抗體或其抗原結合片段的有效量係足以改善、停止、穩定、逆轉、抑制、減緩、及/或延遲患者之疾病之進展的量。如本技術領域所理解者，抗體或抗原結合片段的有效量可變化，其所取決之因素包括但不限於：患者病史；及其他因素，諸如所使用抗體的類型(及/或劑量)。

【0147】 投予本文所揭示之抗體、編碼抗體之多核苷酸、及/或組成物的有效量及時程可根據經驗確定，且做出如此確定係屬於本技術領域之範疇。所屬技術領域中具有通常知識者將理解，必須投予的劑量將根據例如：將接受本文所揭示之抗體、編碼抗體之多核苷酸、及/或組成物的哺乳動物；投予途徑；所使用之本文所揭示之抗體、編碼抗體之多核苷酸、抗原結合片段、及/或組成物的特定類型；及向哺乳動物投予的其他藥物而變化。選擇抗體或抗原結合片段之

適當劑量的指引可參見有關抗體及抗原結合片段之治療用途的文獻，例如，Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., 1985, ch. 22及 pp. 303-357；Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York, 1977, pp. 365-389。

【0148】 抗體之有效量的典型每日劑量係0.01 mg/kg至100 mg/kg。在一些實施例中，劑量可小於100 mg/kg、10 mg/kg、9 mg/kg、8 mg/kg、7 mg/kg、6 mg/kg、5 mg/kg、4 mg/kg、3 mg/kg、2 mg/kg、1 mg/kg、0.5 mg/kg、或0.1 mg/kg。在一些實施例中，劑量可大於10 mg/kg、9 mg/kg、8 mg/kg、7 mg/kg、6 mg/kg、5 mg/kg、4 mg/kg、3 mg/kg、2 mg/kg、1 mg/kg、0.5 mg/kg、0.1 mg/kg、0.05 mg/kg、或0.01 mg/kg。在一些實施例中，劑量係約10 mg/kg、9 mg/kg、8 mg/kg、7 mg/kg、6 mg/kg、5 mg/kg、4 mg/kg、3 mg/kg、2 mg/kg、1 mg/kg、0.9 mg/kg、0.8 mg/kg、0.7 mg/kg、0.6 mg/kg、0.5 mg/kg、0.4 mg/kg、0.3 mg/kg、0.2 mg/kg、或0.1 mg/kg。

【0149】 在本文所述之方法中之任一者中，可至少每週一次(例如每週一次、每週兩次、每週三次、每週四次、每天一次、每天兩次、或每天三次)向對象投予至少一種抗體、其抗原結合片段、或醫藥組

成物(例如本文所述之抗體、抗原結合抗體片段、或醫藥組成物中之任一者)、及可選地至少一種其他治療劑。在一些實施例中，至少兩種不同的抗體及/或抗原結合片段係以相同組成物(例如液體組成物)投予。在一些實施例中，至少一種抗體或抗原結合片段及至少一種其他治療劑係以相同組成物(例如液體組成物)投予。在一些實施例中，至少一種抗體或抗原結合片段及至少一種其他治療劑係以兩種不同組成物(例如含有至少一種抗體或抗原結合片段的液體組成物及含有至少一種其他治療劑的固體口服組成物)投予。在一些實施例中，至少一種其他治療劑係作為丸劑、錠劑、或膠囊投予。在一些實施例中，至少一種其他治療劑係以持續釋放口服配方投予。

【0150】 在一些實施例中，可在投予至少一種抗體、抗原結合抗體片段、或醫藥組成物(例如本文所述之抗體、抗原結合抗體片段、或醫藥組成物中之任一者)之前或之後向對象投予一或多種其他治療劑。在一些實施例中，向對象投予一或多種其他治療劑及至少一種抗體、抗原結合抗體片段、或醫藥組成物(例如本文所述之抗體、抗原結合抗體片段、或醫藥組成物中之任一者)，從而使對象體內之一或多種其他治療劑與至少一種抗體或抗原結合片段(例如本文所述之抗體或抗原結合片段中之任一者)具有生物活性週期重疊。

【0151】 在一些實施例中，可在延長的時間週期內(例如在至少1週、2週、3週、1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7

個月、8個月、9個月、10個月、11個月、12個月、1年、2年、3年、4年、或5年的時間週期內)向對象投予至少一種抗體、抗原結合抗體片段、或醫藥組成物(例如本文所述之抗體、抗原結合抗體片段、或醫藥組成物中之任一者)。熟練的醫療專業人員可使用本文所述之方法中之任一者來確定治療週期的長度，以診斷或追蹤治療的有效性(例如觀察疾病的至少一種症狀)。如本文所述，熟練的醫療專業人員亦可基於對治療有效性的評估(例如使用本文所述及本技術領域已知方法中之任一者)，改變向對象投予之抗體或抗原結合抗體片段(及/或一或多種其他治療劑)的種類(identity)及數量(例如增加或減少)，亦可調整(例如增加或減少)向對象投予之至少一種抗體或抗原結合抗體片段(及/或一或多種其他治療劑)的劑量或頻率。

【0152】 在一些實施例中，可向對象投予一或多種其他治療劑。其他治療劑可包含一或多種抑制劑，其選自由B-Raf之抑制劑、EGFR抑制劑、MEK之抑制劑、ERK之抑制劑、K-Ras之抑制劑、c-Met之抑制劑、退行性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)之抑制劑、磷脂酸肌醇3-激酶(PI3K)之抑制劑、Akt之抑制劑、mTOR之抑制劑、PI3K/mTOR雙抑制劑、布魯東氏酪胺酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, BTK)之抑制劑、及異檸檬酸去氫酶1 (isocitrate dehydrogenase 1, IDH1)及/或異檸檬酸去氫酶2 (IDH2)之抑制劑所組成之群組。

【0153】 在一些實施例中，其他治療劑可包含一或多種抑制劑，其選自由HER3之抑制劑、LSD1之抑制劑、MDM2之抑制劑、BCL2之抑制劑、CHK1之抑制劑、經活化之刺蝟蛋白訊息傳遞路徑之抑制劑，及選擇性降解雌激素受體之藥劑所組成之群組。

【0154】 在一些實施例中，其他治療劑可包含一或多種治療劑，其選自由曲貝替定(Trabectedin)、白蛋白結合型紫杉醇(nab-paclitaxel)、翠巴拉尼(Trebananib)、帕唑帕尼(Pazopanib)、西地尼布(Cediranib)、帕泊昔布(Palbociclib)、依維莫司(everolimus)、氟嘧啶(fluoropyrimidine)、IFL、瑞戈非尼(regorafenib)、雷歐利辛(Reolysin)、愛寧達(Alimta)、色瑞替尼(Zykadia)、舒癌特(Sutent)、坦羅莫司(temsirolimus)、阿西替尼(axitinib)、依維莫司(everolimus)、索拉非尼(sorafenib)、維曲特(Votrient)、帕唑帕尼(Pazopanib)、IMA-901、AGS-003、卡博替尼(cabozantinib)、長春氟寧(Vinflunine)、Hsp90抑制劑、Ad-GM-CSF、替莫唑胺(Temazolomide)、IL-2、IFNa、長春花鹼、沙利度胺(Thalomid)、達卡巴嗪(dacarbazine)、環磷醯胺、來那度胺(lenalidomide)、氮胞嘧啶苷(azacytidine)、來那度胺(lenalidomide)、硼替佐米(bortezomid)、胺柔比星(amrubicine)、卡非佐米(carfilzomib)、普拉曲沙(pralatrexate)、及恩紮他因(enzastaurin)所組成之群組。

【0155】 在一些實施例中，其他治療劑可包含一或多種治療劑，其選自由佐劑、TLR致效劑、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor, TNF) α 、IL-1、HMGB1、IL-10拮抗劑、IL-4拮抗劑、IL-13拮抗劑、IL-17拮抗劑、HVEM拮抗劑、ICOS致效劑、標靶CX3CL1之治療、標靶CXCL9之治療、標靶CXCL10之治療、標靶CCL5之治療、LFA-1致效劑、ICAM1致效劑、及選擇素(Selectin)致效劑所組成之群組。

【0156】 在一些實施例中，向對象投予卡鉑、白蛋白結合型紫杉醇、紫杉醇、順鉑、培美曲塞(pemetrexed)、吉西他濱、FOLFOX、或FOLFIRI。

【0157】 在一些實施例中，其他治療劑係抗PD-1抗體、抗PD-L1抗體、抗LAG-3抗體、抗TIGIT抗體、抗4-1BB抗體、抗CTLA-4抗體、抗CD40抗體、抗OX40抗體、或抗GITR抗體。

醫藥組成物及投予途徑

【0158】 本文亦提供含有至少一種(例如一種、兩種、三種、或四種)本文所述之抗體或抗原結合片段的醫藥組成物。本文所述之抗體或抗原結合片段中之任一者之兩種或多種(例如兩種、三種、或四種)可以任何組合存在於醫藥組成物中。醫藥組成物可以本技術領域已知之任何方法配製。

【0159】醫藥組成物係配製為相容於所預期之投予途徑(例如靜脈內、動脈內、肌內、皮內、皮下、或腹膜內)。組成物可包含：無菌稀釋劑(例如無菌水或鹽水)、不揮發油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇、或其他合成溶劑；抗菌劑或抗真菌劑(諸如苯甲醇或對羥基苯甲酸甲酯、氯丁醇、苯酚、抗壞血酸、硫柳汞等)；抗氧化劑(諸如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉)；螯合劑(諸如乙二胺四乙酸)；緩衝劑(諸如乙酸鹽、檸檬酸鹽、或磷酸鹽)；及等張劑(isotonic agent)[諸如糖(例如右旋糖)、多元醇(例如甘露醇或山梨醇)]；或鹽(例如氯化鈉)；或其任何組合。脂質體(liposomal)懸浮液亦可用作醫藥上可接受之載劑(參見例如美國專利第4,522,811號)。組成物的製劑(preparations)可配製並封裝於安瓿、拋棄式注射器、或多劑量小瓶中。當需要時(例如在可注射配方中)，可藉由例如使用塗層(諸如卵磷脂)或界面活性劑來維持適當的流動性。抗體或其抗原結合片段的吸收可藉由包括延遲吸收的藥劑[例如單硬脂酸酯鋁(aluminum monostearate)及明膠]來延長。替代地，可藉由植入物及微膠囊化遞送系統來實現控制釋放，其等可包括可生物降解、生物相容性聚合物(例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原、原酸酯聚合物、及聚乳酸；Alza Corporation and Nova Pharmaceutical, Inc.)。

【0160】 含有本文所述之抗體或抗原結合片段中之任一者之一或多種的組成物可配製為以劑量單位的形式[即含有預定量之活性化化合物的物理性離散單位(physically discrete unit)，以便於投予及劑量均勻性]用於腸胃外(例如靜脈內、動脈內、肌內、皮內、皮下、或腹膜內)投予。

【0161】 組成物的毒性及治療功效可藉由標準製藥程序在細胞培養或實驗動物(例如猴)中確定。例如，可確定LD50 (族群之50%的致死劑量)及ED50 (族群之50%的治療有效劑量)：治療指數係LD50:ED50的比率。展現出高治療指數的藥劑係較佳者。當藥劑展現出非所欲之副作用時，應注意盡量減少潛在的損害(即減少不必要的副作用)。毒性及治療功效可藉由其他標準製藥程序來確定。

【0162】 從細胞培養測定法及動物研究獲得的資料可用於配製任何給定藥劑的適當劑量，以用於對象(例如人類)。一或多種(例如一種、兩種、三種、或四種)抗體或其抗原結合片段(例如本文所述之抗體或抗體片段中之任一者)的治療有效量係治療對象，或經辨識為處於發展疾病之風險的對象之疾病、降低對象(例如人類)之疾病的一或多種症狀的嚴重程度、頻率、及/或持續時間的量。本文所述之抗體或抗原結合片段中之任一者的有效性及用劑可由醫療照護專業人員或獸醫專業人員使用本技術領域已知之方法，及藉由觀察對象(例如人類)之疾病的一或多種症狀來確定。某些因素可能影響有效治療

對象所需之劑量及時間(例如疾病或病症的嚴重程度、先前的治療、對象的整體健康狀況及/或年齡、及其他疾病的存在)。

【0163】 示例性劑量包括每公斤對象體重之毫克或微克量的本文所述之抗體或抗原結合片段中之任一者(例如約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至約500 mg/kg ;約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至約500 mg/kg ;約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至約50 mg/kg ;約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至約5 mg/kg ;約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至約0.5 mg/kg ;或約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。儘管此等劑量涵蓋寬廣的範圍，惟所屬技術領域中具有通常知識者將理解，治療劑(包括抗體及其抗原結合片段)之效力各有變化，且有效量可藉由本技術領域已知之方法確定。一般而言，首先係投予相對低之劑量，且主治醫療照護專業人員或獸醫專業人員(在治療應用的情況下)或研究人員(當仍處於開發階段時)可隨後逐漸增加劑量，直至獲得適當的反應。此外，應當理解，任何特定對象的具體劑量位準將取決於多種因素，包括：所採用之具體化合物的活性，對象的年齡、體重、整體健康狀況、性別、及飲食，抗體或抗體片段的投予時間、投予途徑、排泄速率、及體內半衰期。

【0164】 醫藥組成物可與投予指示一起包括於容器、包裝、或分配器中。本發明亦提供製造用於本文所述之各種用途的抗體或其抗原結合片段的方法。

實例

【0165】 以下實例中進一步描述本發明，此等實例並不限制申請專利範圍中所述之本發明的範圍。

實例1.產生人類抗TFR1抗體

【0166】 RenNano™小鼠(百奧賽圖，完整人類重鏈可變域之原位取代、並組合經修飾之恆定區)。使用His標記之人類TFR1(運鐵蛋白受體1)蛋白質(hTFR1-His, ACROBiosystems，目錄編號：CD1-H5243)將小鼠(描述於PCT/CN2022/119188，其全文內容以引用方式併入本文)免疫，以獲得抗TFR1抗體。免疫前，收集眼球後(retro-orbital)血液作為陰性對照。第一次免疫使用弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant, CFA)；且第二次及第三次免疫使用弗氏不完全佐劑(Freund's incomplete adjuvant, IFA)。總共進行三次免疫(每兩週一次)。第三次免疫後一週，收集眼球後血液，並藉由FACS檢測血清的抗體效價。

【0167】 在前次免疫後至少十四天，亦進行了增強免疫的程序。藉由腹膜內注射來注射TFR1蛋白質，並經由尾靜脈(tail vein)來注射表現人類TFR1抗原的CHO-S細胞。

【0168】 從經免疫小鼠中分離抗原特異性免疫細胞，以進一步獲得抗TFR1抗體或獲得抗TFR1抗體的重鏈可變區序列。例如，使用單細胞技術(例如使用Beacon® Optofluidic System, Berkeley Lights Inc.)來篩選並尋找分泌抗原特異性單株抗體的血漿細胞。

利用反轉錄及PCR定序來獲得抗體可變區序列。將所獲得之可變區序列用於抗體表現，以使用FACS驗證對TFR1的結合活性。由於缺乏CH1域，故所得之抗體的重鏈可變區(VH)亦稱為重鏈單可變域(VHH)。

【0169】 具體而言，將所得之VHH序列分別連接至人類IgG1恆定區(例如樞紐區、CH2域、及CH3域)。藉由此方法獲得的示例性抗體包括：23B8、24A1、24C9、及24G5。重鏈CDR1至3序列如圖1及圖2所示。23B8、24A1、24C9、及24G5的VHH區序列如圖3所示。

【0170】 可進一步工程改造抗體的恆定區以使用丙胺酸替代位置297的天冬醯胺酸(N297A)。例如，當N297A突變引入24G5的恆定區時，則所得之抗體係命名為24G5-N。

實例2. 抗TFR1抗體之跨物種結合

【0171】 將CHO-S-hTFR1細胞或CHO-S-fasTFR1細胞分別以 10^5 個細胞/孔的密度轉移至96孔盤。將經連續稀釋之樣本抗TFR1抗體加入至96孔盤中，並於4°C培養30分鐘。使用PBS作為陰性對照(NC)。接著，將細胞與二級抗體抗hIgG-Fc-Alexa Fluor™ 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories，目錄編號：109-606-170)於4°C避光培養15分鐘，隨後進行流式細胞術分析。

【0172】 CHO-S-hTFR1細胞或CHO-S-fasTFR1細胞係藉由分別使用表現人類TFR1 (hTFR1, SEQ ID NO: 29)或食蟹獼猴 (*Macaca fascicularis*, crab-eating macaque) TFR1胺基酸序列 (fasTFR1, SEQ ID NO: 30)的載體轉染CHO-S細胞而獲得。測試結果如下表所示。

【0173】 JR141係人源化IgG1抗體，其標靶與人類艾杜糖醛酸鹽-2-硫酸酯酶(iduronate-2-sulfatase)接合的人類TFR1，於2021年3月在日本首次獲得核准，用於第II型黏多醣病(mucopolysaccharidosis)之靜脈內治療。JR141的VH及VL序列分別記載於SEQ ID NO: 31及SEQ ID NO: 32。就陽性對照(JR141-N)而言，JR141的VH及VL係連接至具有N297A突變的人類IgG1恆定區。

表1

抗體	細胞	陽性細胞之百分比	評估
NC	CHO-S-hTFR1	0.1%	無結合
	CHO-S-fasTFR1	0.2%	無結合
JR141-N	CHO-S-hTFR1	45.0%	結合
	CHO-S-fasTFR1	37.2%	結合
23B8	CHO-S-hTFR1	38.8%	結合
	CHO-S-fasTFR1	39.6%	結合
24A1	CHO-S-hTFR1	56.4%	結合
	CHO-S-fasTFR1	50.9%	結合
24C9	CHO-S-hTFR1	45.8%	結合
	CHO-S-fasTFR1	0.35%	無結合
24G5	CHO-S-hTFR1	54.3%	結合
	CHO-S-fasTFR1	51.2%	結合

實例3. 抗TFR1抗體之結合親和性

【0174】 在Biacore™ (Biacore, Inc., Piscataway N.J.)上使用表面電漿子共振(SPR)驗證抗TFR1抗體對人類(hTFR1-His, ACROBiosystems, 目錄編號: CD1-H5243)或猴(fasTFR1-His, ACROBiosystems, 目錄編號: TFR-C524a)之His標記之TFR1蛋白質的結合親和性。8K生物感測器配備有預先固定的蛋白質A感測器晶片。

【0175】 將經純化之抗TFR1抗體捕捉至Protein A晶片(Series S Sensor Chip Protein A)上進行檢測。以10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速率裝載經純化之抗TFR1抗體(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，以結合至hTFR1-His及fasTFR1-His (200 nM)。流動速率係30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。結合及解離時間分別設定為180秒及600秒。在每次滴定的最後一次注射後，使用甘胺酸溶液(pH 2.0)以30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 持續30秒將晶片再生。

【0176】 使用Biacore™ 8K Evaluation Software 3.0將資料整體擬合至1:1朗繆爾結合模型(Langmuir binding model)(Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B., 1994. *Methods Enzymology* 6. 99-110)，從而同時獲得動力學結合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。親和性係推導自動力學速率常數的商($KD=k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$)。

【0177】 如所屬技術領域中具有通常知識者所理解，對每種受試抗體進行相同的方法，並對參數(例如抗體濃度)適當調整。受試抗體的結果概述於下表中。結果表明，所有四種抗TFR1抗體皆可以高親和性結合至人類及猴TFR1。

表2

蛋白質	分析物1溶液	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)
23B8	hTFR1-His	1.51E+04	1.32E-04	8.73E-09
	fasTFR1-His	4.10E+05	7.99E-03	1.95E-08
24A1	hTFR1-His	2.62E+04	7.68E-05	2.93E-09
	fasTFR1-His	4.36E+04	1.01E-04	2.32E-09
24C9	hTFR1-His	2.68E+04	3.83E-04	1.43E-08
	fasTFR1-His	2.78E+04	3.68E-04	1.32E-08
24G5	hTFR1-His	4.24E+04	8.68E-05	2.05E-09
	fasTFR1-His	6.33E+04	8.79E-05	1.39E-09

實例4. 抗TFR1抗體之表位分析

【0178】 於30°C使用ForteBio Octet系統藉由生物膜干涉法(Biolayer Interferometry, BLI)分析標靶蛋白表位在一對經純化之抗TFR1抗體之間的相對位置。實驗全程使用由HBS-EP+緩衝液(10×)稀釋之1×HBS-EP+緩衝液[10 mM 4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、150 mM氯化鈉、3 mM乙二胺四乙酸(EDTA)、及0.05% P20, pH7.4]作為電泳緩衝液。藉由HIS1K (Anti-Penta-HIS)捕捉約10 µg/mL的hTFR1-His蛋白質200秒，並以30 µL/min的流動速率注射200 nM抗體(分析物1)以結合配體。在相同條件下

注射另一抗體(分析物2)，以確定不同抗體的結合是否會相互干擾。
各抗體的結合時間係300秒。

【0179】 使用Data Analysis HT 12.0獲得各抗體的結合值。為了量化一抗體結合至另一抗體的干擾，故計算結合率來比較各對抗體。結合率係定義為第二抗體(分析物2)的結合值除以第一抗體(分析物1)的結合值。各抗體對的結合率概述於下矩陣表中。具體而言，若分析物1對分析物2展現出阻斷效應，則結合率係介於0.0至0.5之間；若分析物1對分析物2未展現出阻斷效應，則結合率係介於0.5至1.4之間。一般而言，相互干擾的抗體對具有相同或重疊的表位。

【0180】 表位結合測定法結果表明，24A1及24G5可辨識相同表位，且23B8、24C9、及JR141-N可辨識不同表位。

表3

分析物2 \ 分析物1	23B8	24A1	24G5	24C9	JR141-N
23B8	0.1	0.2	0.3	1.4	1.1
24A1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.3
24G5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
24C9	0.6	0.1	0.2	0.0	0.8
JR141-N	0.7	0.0	0.0	1.1	0.0

實例5.抗TFR1抗體之內化作用

【0181】 將抗TFR1抗體與pHAb-山羊抗人類IgG二級抗體共同加入至人類皮質微血管內皮細胞(hCMEC/D3細胞)，並培養3小時。培養後，將細胞離心並使用FACS緩衝液洗滌。使用流式細胞儀測量

平均螢光強度(mean fluorescence intensity, MFI)。計算抗體的胞吞率。使用人類IgG1蛋白質(CrownBio, 目錄編號:C0001)作為同型對照(ISO)。結果如下表所示, 表明所有四種抗體皆在人類皮質微血管內皮細胞中展現出良好的胞吞活性。

表4.

抗體	MFI	陽性族群
ISO	4288	0.9%
23B8	11392	67.0%
24A1	26972	96.6%
24C9	37086	96.0%
24G5	26406	96.0%

實例6. 抗TFR1抗體之穩定性分析

【0182】 評估了抗TFR1抗體23B8、24A1、24C9、及24G5的穩定性。具體而言, 進行以下測試:(1)觀察溶液外觀及是否有可見的不溶物;(2)以粒徑排阻超高效液相層析法(SEC-UPLC)檢測抗體之純度的變化[以主峰面積佔所有峰面積之總和的百分比表示(純度, %)];(3)使用疏水性交互作用層析法(Hydrophobic Interaction Chromatography)-高效液相層析法(HIC-HPLC)檢測抗體之表觀疏水性的變化[以主峰的滯留時間(HIC, min)表示];(4)藉由毛細管等電聚焦(Capillary Isoelectric Focusing, cIEF)檢測抗體中之電荷變異體(以主要組分、酸性組分、鹼性組分的百分比表示);及(5)

藉由UNcle系統檢測抗體的熱穩定性[以熔化溫度(T_m)及聚集溫度(T_{agg})表示]。

【0183】 在SEC-UPLC實驗中，使用Agilent 1290層析系統[連接XBridge™ Protein BEH SEC管柱(200 Å, Waters Corporation)]。使用純化水將抗體樣本稀釋至1 mg/mL。使用以下參數：流動相：25 mM磷酸鹽緩衝液(PB)(pH 6.8)+0.3 M NaCl；流動速率：1.8 mL/min；管柱溫度：25°C；檢測波長：280 nm；注射體積：10 µL；樣本盤溫度：6°C；執行時間：7分鐘。

【0184】 在HIC-HPLC實驗中，使用Agilent 1260層析系統[連接ProPac™ HIC-10管柱(4.6×100 mm, Thermo Scientific)]，且使用流動相A將樣本稀釋至0.5 mg/mL。使用以下參數：流動相A：0.9 M硫酸銨，0.1 M PB，10%乙腈，pH 6.5；流動相B：0.1 M PB，10%乙腈，pH 6.5；流動速率：0.8 mL/min；梯度：0 min 100% A、2 min 100% A、32 min 100% B、34 min 100% B、35 min 100% A、及45 min 100% A；管柱溫度：30°C；檢測波長：280 nm；注射體積：10 µg；樣本盤溫度：約6°C；執行時間：45分鐘。

【0185】 在cIEF實驗中，使用Maurice cIEF Method Development Kit (Protein Simple，目錄編號：PS-MDK01-C)進行樣本製備。具體而言，將40 µg蛋白質樣本與套組中的以下試劑混合：1 µL Maurice cIEF pI Marker-4.05、1 µL Maurice cIEF

pI Marker-9.99、35 μ L 1%甲基纖維素溶液、2 μ L Maurice cIEF 500 mM精胺酸、4 μ L兩性電解質(Pharmalyte pH範圍3至10)、及水(加入使最終體積係100 μ L)。在Maurice分析儀(Protein Simple, Santa Clara, CA)上，使用Maurice cIEF盒(Maurice cIEF Cartridges)(PS-MC02-C)產生成像毛細管等電聚焦光譜。樣本經聚焦持續總共10分鐘。使用儀器上安裝的分析軟體對280 nm下經聚焦蛋白質的吸光度進行分析。

【0186】在熱穩定性實驗中，將60 mg/mL的抗體溶液使用1°C的增量從25°C加熱至95°C，每次測量前平衡時間係1分鐘。

【0187】詳細結果如下表所示。結果表明，四種抗體皆具有良好的穩定性及物理化學特性。

表5

抗體	SEC純度(%)	HIC (min)	PI	Tm			Tagg (°C)
				Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	
23B8	92.82	19.909	7.376	58.87	67.80	84.13	56.48
24A1	98.74	2.486	6.795	64.80	73.80	82.20	52.73
24C9	98.20	3.740	8.595	65.38	69.90	78.20	33.63
24G5	98.86	3.829	6.495	60.86	77.66	85.30	76.03

實例7.藥物代謝動力學(PK)分析

【0188】人源化TFR1小鼠模型(hTFR1小鼠)經工程改造以表現嵌合TFR1蛋白質(SEQ ID NO:33)，其中小鼠TFR1蛋白質的細胞外區被對應之人類TFR1細胞外區替換。有關人源化TFR1小鼠模型

之詳細描述可參見PCT申請案第PCT/CN2022/105924號，其全文內容以引用方式併入本文。

【0189】 在hTFR1小鼠中測定了抗TFR1抗體的濃度。具體而言，將小鼠分為不同群組(每組8隻小鼠)，並藉由靜脈內(i.v.)注射投予大約等莫耳劑量的JR141-N (G2)、23B8-N (G3)、24A1-N (G4)、24G5-N (G5)、或24C9-N (G6)。對照組(G1)小鼠係投予人類IgG1 (hIgG1)。投予方案詳細如下表所示。

表6

群組	小鼠數量	抗體	劑量	途徑	頻率
G1	8	hIgG1	18.4 mg/kg	i.v.	單次劑量
G2	8	JR141-N	18.4 mg/kg	i.v.	單次劑量
G3	8	23B8-N	10.0 mg/kg	i.v.	單次劑量
G4	8	24A1-N	10.0 mg/kg	i.v.	單次劑量
G5	8	24G5-N	10.0 mg/kg	i.v.	單次劑量
G6	8	24C9-N	10.0 mg/kg	i.v.	單次劑量

【0190】 投予後0.5、6、24、及72小時收集血液及腦部樣本。各時間點對兩隻小鼠進行取樣，並於收集眼球後血液後將小鼠麻醉。為了避免腦內殘餘血液的干擾，故在室溫下將小鼠藉由鹽水灌注10分鐘。具體而言，係經由全身性循環從左腦室向右腦室灌注鹽水。切除腦部樣本，並依矢狀面將其分割為兩個半腦。左半腦對注射的抗體進行定量；而右半腦藉由福馬林固定並使用石蠟包埋，以進行連續切片。將腦部樣本切片，並使用含有1×混合蛋白酶抑制劑的DPBS[杜爾貝科氏(Dulbecco)磷酸鹽緩衝鹽水]加以均質化。將腦

均質物等分以用於蛋白質萃取，隨後藉由電化學發光進行抗體定量。其餘均質物使用15%葡聚糖，在5400 g下進行梯度密度離心 (gradient density centrifugation) 15分鐘以除盡微血管 (capillaries)。離心後，將離心管頂部的部分作為實質保留，並進行蛋白質萃取及抗體定量。圖4A至圖4D示出各時間點腦總量蛋白質中的抗體濃度(圖4A)、腦總量蛋白質中的抗體濃度對血清抗體濃度的比率(圖4B)、腦實質中的抗體濃度(圖4C)、及腦實質中的抗體濃度對血清抗體濃度的比率(圖4D)。此等結果表明，24G5-N (G5群組)在實質或全腦中係豐度最高者。

【0191】 在類似的實驗中，將hTFR1小鼠分為五個群組(每組3隻小鼠)，並藉由靜脈內注射投予18.4 mg/kg JR141-N (G2)、10 mg/kg 23B8-N (G3)、10 mg/kg 24A1-N (G4)，或10 mg/kg 24G5-N (G5)(總共投予1次)。對照組(G1)小鼠係投予hIgG1 (G1)。投予後24小時，收集腦部樣本以確定抗TFR1抗體的濃度。圖5A至圖5B分別示出腦實質及腦總量蛋白質中的抗體濃度測試結果。所有經測試之抗體在腦中的濃度皆高於hIgG1 (G1)，表明相較於陽性對照JR141-N (G2)、23B8-N (G3)、及24G5-N (G5)可更佳地穿過血腦障壁並進入腦實質。

【0192】 在另一類似的實驗中，將hTFR1小鼠分為七個群組(每組6隻小鼠)，並藉由靜脈內(i.v.)注射投予JR141-N (G2至G4)或

24G5-N (G5至G7)。對照組(G1)小鼠係投予hIgG1。投予方案詳細如下表所示。

表 7

群組	小鼠數量	抗體	劑量(mg/kg)	途徑	頻率
G1	6	hIgG1	5.52 mg/kg	i.v.	單次劑量
G2	6	JR141-N	1.84 mg/kg	i.v.	單次劑量
G3	6	JR141-N	5.52 mg/kg	i.v.	單次劑量
G4	6	JR141-N	18.4 mg/kg	i.v.	單次劑量
G5	6	24G5-N	1 mg/kg	i.v.	單次劑量
G6	6	24G5-N	3 mg/kg	i.v.	單次劑量
G7	6	24G5-N	10 mg/kg	i.v.	單次劑量

【0193】投予後6小時及24小時，使用上述方法收集血液及腦部樣本。在各時間點對三隻小鼠進行取樣。組織的處理及抗體的定量亦如上所述進行。腦實質中人源化抗TFR1抗體之濃度的測量結果如圖6所示。結果表明，在各劑量條件下，24G5-N在腦實質中累積的抗體濃度皆顯著高於hIgG1。此外，JR141-N及24G5-N的濃度在腦實質中皆展現出劑量依賴性趨勢。

【0194】為了檢測人源化抗TFR1抗體24G5-N在小鼠腦中的分布，故藉由在上述實驗中所使用之小鼠的右半腦切片上分別對hIgG、hTFR1及mCD31染色來進行免疫螢光測定法。結果表明，mCD31在微血管中標記良好，亦在微血管中檢測出與mCD31共同定位的hTFR1。此外，在實質中的數個神經元上亦檢測出hTFR1的表現。特別係，抗TFR1抗體24G5-N係藉由與DyLight® 488接合的

二級抗IgG抗體進行染色。類似於hTFR1，在微血管及實質中皆檢測出24G5-N，且其訊息與hTFR1訊息重疊。因此，無論係全腦或實質中24G5-N的定量，或實質中24G5-N之免疫螢光的視覺證據，結果皆表明抗TFR1抗體24G5-N可有效穿過血腦障壁(BBB)。

實例8.阻斷測定法

【0195】 於30°C使用ForteBio Octet®系統藉由生物膜干涉法(BLI)測試抗TFR1抗體23B8、24A1、24C9、及24G5對TFR1結合至TF (運鐵蛋白)的阻斷。具體而言，實驗全程使用由HBS-EP+緩衝液(10×)稀釋之1×HBS-EP+緩衝液[10 mM 4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、150 mM氯化鈉、3 mM EDTA、及0.05%界面活性劑P20，pH 7.4]作為電泳緩衝液。藉由AHC (抗人類IgG Fc捕捉)捕捉約10 µg/mL的抗體200秒，並注射800 nM hTFR1-His (ACROBiosystems，目錄編號：CD1-H5243)及hTF-His (人類運鐵蛋白，Kactus Biosystems，目錄編號：TFN-HM101)以結合配體。各抗體的結合時間係300秒。使用Data Analysis HT 12.0獲得各抗體的結合值。結果表明，此四種抗體皆未阻斷TFR1對TF的結合。因此，此類非阻斷抗體不太可能干擾正常細胞中的TFR1-TF交互作用。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="zh"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="NP1666-M.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.2.0" productionDate="2024-02-
05">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>112146634</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-11-30</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>WO</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>PCT/CN2022/136246</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-12-02</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">大陸商百奧賽圖(北京)醫藥科技股份有限公司
</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>Biocytogen Pharmaceuticals(Beijing)Co.,
Ltd.</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">抗TFRI抗體及其用途</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>35</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q2">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>NAWMN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 2" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q4">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HIKSKTDGGTTDYAAPVKG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 3" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q6">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DRAYCGGDCSHYYYHDLDV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SYAMS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 5" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q10">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>EISGSGSSTNYADSVKG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 6" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```
<INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q12">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DDSSGWAFNI</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q14">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>SYGMY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q16">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>FIRFDESKKYADSVKG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 9" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q18">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DGECCYCTNGVCHGLDV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q20">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SFAMS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q22">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>EISDSGGNTYYADSVKG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    <INSDQualifier id="q24">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DDSSGWAFNI</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q26">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GFPFSNAW</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>

```

```
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q28">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>IKSKTDGGTT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q30">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```

    <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>TTDRAYCGGDCSHYYYHDLV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q32">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GFTFSSYA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>

```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q34">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ISGSGSST</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q36">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>AKDDSSGWAFNI</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 19" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id=" q38" >
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GFTLSSYG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 20" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>

```

```
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q40">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>IRFDESKK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q42">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ARDGEGGYCTNGVCHGLDV</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 22" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q44">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GFTFSSFA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 23" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q46">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ISDSGGNT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q48">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>AKDDSSGWAFNI</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>130</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..130</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q50">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QVTLKESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFPFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGHIKSKTDGGTTDY
  AAPVKGRFTISRDDSKNMVFLQMNSLKTEDTAVYYCTTDRAYCGGDCSHYYYHDLDVWGQGTTVTVSS</INSDSeq_se
  quence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q52">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLERVSEISGSGSSTNYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDDSSGWAFNIWDQGT VVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>126</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..126</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q54">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>EVQLVQSGG VVQGRSLRLS CAASGFTLSSYGMWVRQAPGKGREWVAFIRFDESKKYYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGEGGYCTNGVCHGLDVWGQGT VVTVSS</INSDSeq_sequen
ce>
  </INSDSeq>

```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q56">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QLQLQESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSSFAMSWVRQAPGKGLERVSEISDSGGNTYYAD
    SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDDSSGWAFNIWDQGTVVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>760</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..760</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q71">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>人</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MMDQARSASFNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANVTKPKRC
SGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTG
TIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAY
SKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFHGHAH
LGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNI PVQTI SRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLK
EIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVGAQRDAWGPGAAGSGVGTALLLKLQMFSDMVLKDGFPQRSRISIFASWSAGDFGSVG
ATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAF
PFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTMTDYKELIERIPELNKVARAAEVAGQFVIKLTHTVELNLDYERYNSQLLSFV
RDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRRHVFW
GSGSHTLPALLENLKRKQNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>727</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..727</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q72">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Macaca fascicularis</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    <NonEnglishQualifier_value>食蟹獼猴</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGLLLCFTYICLHFSALGGGGSCCKGVEPK
TECERLAGTESPAREEPEEDFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQFRE
FKLSKVWRDQHFVKIQVKDSANSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIV
IVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQ
TISRAAAELKFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPG
AAKSSVGTALLLKLQMFSDMVLKDFQPSRSIFASWSAGDFGSGATEWLEGYLSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFK
VSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKE
LVERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDTELNDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSR
LTTDFRNAEKRDKFMKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPFHRHVFWSGSHTLSALLESLKLRQNNSAFNETLFRNQL
ALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q73">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
<INSDSeq_sequence>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWLGWVRQMPGKGLEWMGDIYPGGDYPTYSE
KFKVQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARSGNYDEVAYWGQGLTVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 32" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q74">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 33" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>760</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..760</INSDFeature_location>
```

```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q75">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGNSHVEMKLAADDEEENADNNMKASVRKPKRF
NGRLCFAAIALVIFFLIGFMSGYLG YCKGV EPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTG
TIKLLNENSYVPREAGSQDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAY
SKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAH
LGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTI SRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLK
EIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVGAQRDAWGPGAAGSGVGTALLLKL AQMFS DMVLK DGFQPSRSIIFASWSAGDFG SVG
ATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGT SNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAF
PFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFV
RDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMMKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPF RHVFW
GSGSHTLPALLENLKRKQNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>227</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..227</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<INSDQualifier id="q76">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>227</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..227</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q77">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成建構物</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK</INSDSeq_sequence>

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種抗體或其抗原結合片段，其結合至運鐵蛋白受體 1 (TFR1)，包含：

重鏈單可變域 (VHH)，其包含互補決定區 (complementarity determining region, CDR) 1、2、及 3，其中該 VHH CDR1 區包含與所選之 VHH CDR1 胺基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的胺基酸序列，該 VHH CDR2 區包含與所選之 VHH CDR2 胺基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的胺基酸序列，且該 VHH CDR3 區包含與所選之 VHH CDR3 胺基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的胺基酸序列；

其中該等所選之 VHH CDR 1、2、及 3 胺基酸序列係以下中之一者：

- (1) 該等所選之 VHH CDR 1、2、3 胺基酸序列分別記載於 SEQ ID NO：1、2、及 3；
- (2) 該等所選之 VHH CDR 1、2、3 胺基酸序列分別記載於 SEQ ID NO：4、5、及 6；
- (3) 該等所選之 VHH CDR 1、2、3 胺基酸序列分別記載於 SEQ ID NO：7、8、及 9；
- (4) 該等所選之 VHH CDR 1、2、3 胺基酸序列分別記載於 SEQ ID NO：10、11、及 12；

第 1 頁，共 6 頁(發明申請專利範圍)

- (5) 該等所選之 VHH CDR 1、2、3 胺基酸序列分別記載於 SEQ ID NO：13、14、及 15；
- (6) 該等所選之 VHH CDR 1、2、3 胺基酸序列分別記載於 SEQ ID NO：16、17、及 18；
- (7) 該等所選之 VHH CDR 1、2、3 胺基酸序列分別記載於 SEQ ID NO：19、20、及 21；以及
- (8) 該等所選之 VHH CDR 1、2、3 胺基酸序列分別記載於 SEQ ID NO：22、23、及 24。

【請求項2】 如請求項 1 之抗體或其抗原結合片段，其中該 VHH 包含 CDR 1、2、3，其等具有分別記載於 SEQ ID NO：1、2、及 3 的胺基酸序列。

【請求項3】 如請求項 1 之抗體或其抗原結合片段，其中該 VHH 包含 CDR 1、2、3，其等具有分別記載於 SEQ ID NO：4、5、及 6 的胺基酸序列。

【請求項4】 如請求項 1 之抗體或其抗原結合片段，其中該 VHH 包含 CDR 1、2、3，其等具有分別記載於 SEQ ID NO：7、8、及 9 的胺基酸序列。

【請求項5】 如請求項 1 之抗體或其抗原結合片段，其中該 VHH 包含 CDR 1、2、3，其等具有分別記載於 SEQ ID NO：10、11、及 12 的胺基酸序列。

【請求項6】 一種抗體或其抗原結合片段，其結合至 TFR1，包含：重鏈單可變區(VHH)，其包含與所選之 VHH 序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的胺基酸序列，其中該所選之 VHH 序

第 2 頁，共 6 頁(發明申請專利範圍)

列選自由 SEQ ID NO：25、26、27、及 28 所組成的群組。

- 【請求項7】** 如請求項 6 之抗體或其抗原結合片段，其中該 VHH 包含 SEQ ID NO：25 的序列。
- 【請求項8】** 如請求項 6 之抗體或其抗原結合片段，其中該 VHH 包含 SEQ ID NO：26 的序列。
- 【請求項9】** 如請求項 6 之抗體或其抗原結合片段，其中該 VHH 包含 SEQ ID NO：27 的序列。
- 【請求項10】** 如請求項 6 之抗體或其抗原結合片段，其中該 VHH 包含 SEQ ID NO：28 的序列。
- 【請求項11】** 如請求項 1 至 10 中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類 TFR1、猴 TFR1、小鼠 TFR1、或嵌合 TFR1。
- 【請求項12】** 如請求項 1 至 11 中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段係人類或人源化抗體或其抗原結合片段。
- 【請求項13】** 如請求項 1 至 12 中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段係多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。
- 【請求項14】** 一種抗體或其抗原結合片段，其包含如請求項 1 至 13 中任一項之抗體或其抗原結合片段的 VHH CDR 1、2、3。

- 【請求項15】 如請求項 1 至 14 中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG Fc（例如人類 IgG1 Fc）。
- 【請求項16】 如請求項 15 之抗體或其抗原結合片段，其中該人類 IgG Fc 在根據 EU 編號的位置 297 包含非天冬醯胺酸殘基(例如丙胺酸)。
- 【請求項17】 如請求項 1 至 16 中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段包含二或多個重鏈單可變域。
- 【請求項18】 一種核酸，其包含編碼如請求項 1 至 17 中任一項之抗體或其抗原結合片段的多核苷酸。
- 【請求項19】 如請求項 18 之核酸，其中該核酸係 cDNA。
- 【請求項20】 一種載體，其包含如請求項 18 或 19 之核酸中之一或多者。
- 【請求項21】 一種細胞，其包含如請求項 20 之載體。
- 【請求項22】 如請求項 21 之細胞，其中該細胞係 CHO 細胞。
- 【請求項23】 一種細胞，其包含如請求項 18 或 19 之核酸中之一或多者。
- 【請求項24】 一種產生抗體或其抗原結合片段的方法，該方法包括：
(a) 在足以使如請求項 21 至 23 中任一項之細胞產生該抗體或其抗原結合片段的條件下培養該細胞；及
(b) 收集該細胞所產生的該抗體或其抗原結合片段。

- 【請求項25】 一種抗體-藥物接合物，其包含如請求項 1 至 17 中任一項之抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段共價結合至治療劑。
- 【請求項26】 如請求項 25 之抗體-藥物接合物，其中該治療劑係細胞毒性劑 (cytotoxic agent) 或細胞生長抑制劑 (cytostatic agent)。
- 【請求項27】 一種治療患有腦部疾病(例如腦癌)之對象的方法，該方法包含向該對象投予治療有效量之組成物，該組成物包含如請求項 1 至 17 中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項 25 或 26 之抗體-藥物接合物。
- 【請求項28】 如請求項 27 之方法，其中該抗體或其抗原結合片段，或該抗體-藥物接合物可穿過該對象的血腦障壁 (blood-brain barrier, BBB)。
- 【請求項29】 一種治療患有癌症之對象的方法，該方法包含向該對象投予治療有效量之組成物，該組成物包含如請求項 1 至 17 中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項 25 或 26 之抗體-藥物接合物。
- 【請求項30】 如請求項 29 之方法，其中該癌症係腦癌、肺癌、胃癌、結腸直腸癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、白血病、或乳腺癌。
- 【請求項31】 一種辨識患有腦部疾病(例如腦癌)之對象的方法，該方法包含藉由如請求項 1 至 17 中任一項之抗體或其抗原結合片段，檢測自患有該腦部疾病之該對象所收集的樣本，從而辨識該對象患有該腦部疾病。

- 【請求項32】 如請求項 31 之方法，其中該樣本係來自該對象的腦實質樣本。
- 【請求項33】 如請求項 27 至 32 中任一項之方法，其中該對象係人類對象。
- 【請求項34】 一種遞送藥劑穿過血腦障壁的方法，該方法包含向對象投予藥劑，該藥劑共價連結至如請求項 1 至 17 中任一項之抗體或其抗原結合片段。
- 【請求項35】 如請求項 34 之方法，其中該藥劑係抗體或抗體-藥物接合物。
- 【請求項36】 如請求項 34 或 35 之方法，其中該藥劑係抗類澱粉蛋白抗體(anti-amyloid antibody)。
- 【請求項37】 一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 至 17 中任一項之抗體或其抗原結合片段，及醫藥上可接受的載劑。
- 【請求項38】 一種醫藥組成物，其包含如請求項 25 或 26 之抗體-藥物接合物，及醫藥上可接受的載劑。
- 【請求項39】 一種抗體或其抗原結合片段，其與如請求項 1 至 17 中任一項之抗體或其抗原結合片段交叉競爭(cross-compete)。

描述	酸法糖序列(SEQ ID NO)
23B8 VIII	QVILKHSGGGLVVKPGGSLRLISCAASGFPPFSNAWMNWVRQAPGKGLIFWVGHHSKIDGGTIDYAAPVKGRFISRDDSKNMVFLQMNLSLKTEDTAVYYCFITDRAYCGGDCSITYYIHDLVWVGQGITVIVSS (SEQ ID NO: 25)
24A1 VIII	EVQLVDSGGGLVQPPGGSLRLICAAASGFIFSSYAMSWVRQAPGKGLERVSIHSGSGSSINYADSVKGRFISRDNNSKNILYLQMNLSLRAIEDTAVYYCAKDDSSGWAFTNWDQGITVIVSS (SEQ ID NO: 26)
24C9 VIII	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLISCAASGFILSSYGMWVRQAPGKGRIFWVAFIRFDIESKKYADSVKGRFISRDNNSKNILYLQMNLSLRAIEDTAVYYCARDGHEGGYCTINGVCHGLDVGQGITVIVSS (SEQ ID NO: 27)
24G5 VIII	QLQLQHSGGGLVQPPGGSLRLICAAASGFIFSSYAMSWVRQAPGKGLERVSIHSDSGGNTYYADSVKGRFISRDNNSKNILYLQMNLSLRAIEDTAVYYCAKDDSSGWAFTNWDQGITVIVSS (SEQ ID NO: 28)
h1FR1	MMDQARSASFNLFGGHPISYTRFSLARQVDGDNSTIVEMKLAVDIEHEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGFAVIVFFLIGFMIGYLYGYCKGVIEPKTECHERLAGTFSPVRIEHPGHEDFPAARRLYWDDDLKRKLSSEKLDSTDFIGITKLLNINISYVPRHAGSQKDENLALYVENQFRIFKLSKVWRDQIIFVKIQVKDSAQNSVITVDKNGRILVYLVENPGGYVAYSKAATVFGKLVITIANIFGTTKKDIEEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAIEKVANAESLNAIGVLYMDQTKIFPIVNAEISIFGHIAIILGTGDPYTPGFPSINIIQIFPPSRSSGLPNIPVQITSRAAAIEKLIIGNMIEGDCPSDWKTDSITCRMVTSISKNVKLIVSNVLKIEKILNIEGVTKGFVIEPDITYVVVGAQRDAWGPAAAKSGVGTALLLKLQAQMFSDMVLKDDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGAIFWLEGYLSSLIHLKAFIYINLIDKAVLGFISNFKVSASPLIYLIEKTMQNVKIPVFGQFLYQDSNWASKVIEKLIIDNAAIFPFLAYSGIPAVSFCFCIEDTDYPYLGITMDITYKELERIPHELNKVARAAAIFVAGQFVIKLITIDVIELNLDYERYNSQLLSIFVRDLNQYRADIKIEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLLITDFIGNAIEKIDRFVMMKKLNDRVMRVIEYIIFLSPYVSPKIESPFRITVIFWGSGSITLIPALLIENLKLKQONNGAFNIEFLFRNQLALATWITQGAANALSGDVWDDIDNIEF (SEQ ID NO: 29)
fas1FR1	MERVQPIIEENVGNAARPRIFERNKLLIVASVIOQGLGLLLCFIYICLIEHSALGGGGSCCKGVIEPKTECHERLAGTFSPARIEPEIIEDFPAAPRIYWDDDLKRKLSSEKLDSTDFISITKLLNININIVPRHAGSQKDENLALYVENQFRIFKLSKVWRDQIIFVKIQVKDSAQNSVITVDKNGGLVYLVINPGGYVAYSKAATVFGKLVITIANIFGTTKKDIEEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAIEKVANAESLNAIGVLYMDQTKIFPIVKADEISIFGHIAIILGTGDPYTPGFPSINIIQIFPPSQSSGLPNIPVQITSRAAAIEKLIIGNMIEGDCPSDWKTDSITCKMVTSENKSVKLIIVSNVLKIEKILNIEGVTKGFVIEPDITYVVVGAQRDAWGPAAAKSSVGTALLLKLQAQMFSDMVLKDDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGAIFWLEGYLSSLIHLKAFIYINLIDKAVLGFISNFKVSASPLIYLIEKTMQDVKIPVFGRSIYQDSNWASKVIEKLIIDNAAIFPFLAYSGIPAVSFCFCIEDTDYPYLGITMDITYKELERIPHELNKVARAAAIFVAGQFVIKLITIDVIELNLDYERYNSQLLSIFVRDLNQYRADVKEIEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLLITDFRNAIEKRDKIFVMMKKLNDRVMRVIEYIFLSPYVSPKIESPFRITVIFWGSGSITLIPALLIENLKLKQONNGAFNIEFLFRNQLALATWITQGAANALSGDVWDDIDNIEF (SEQ ID NO: 30)
JR141 VII	EVQLVQSGAIFVKKPGHSLKISCKGSGYSFINYWLGWVRQMPGKGLIFWVMDIYPCGDYPTYSIEKIFKVQVTSADKSSITAYLQWSSLKASDIAMYYCARSGNYDIFVAYWVGQGITVIVSS (SEQ ID NO: 31)
JR141 VI	DIVMITQIPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNITYLITWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRIFS GVPDRFSGSGSGITDFILKISRVAEIEDVGVVYYCSQSTHVPWTFGQGITKVIIEK (SEQ ID NO: 32)
嵌合1FR1	MMDQARSASFNLFGGHPISYTRFSLARQVDGDNSTIVEMKLAADIEHEENADNNMKASVRKPKRIFNGRLCFAAIALVIFFLIGFMISGYLYGYCKGVIEPKTECHERLAGTFSPVRIEHPGHEDFPAARRLYWDDDLKRKLSSEKLDSTDFIGITKLLNINISYVPRHAGSQKDENLALYVENQFRIFKLSKVWRDQIIFVKIQVKDSAQNSVITVDKNGRILVYLVENPGGYVAYSKAATVFGKLVITIANIFGTTKKDIEEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAIEKVANAESLNAIGVLYMDQTKIFPIVNAEISIFGHIAIILGTGDPYTPGFPSINIIQIFPPSRSSGLPNIPVQITSRAAAIEKLIIGNMIEGDCPSDWKTDSITCRMVTSISKNVKLIVSNVLKIEKILNIEGVTKGFVIEPDITYVVVGAQRDAWGPAAAKSGVGTALLLKLQAQMFSDMVLKDDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGAIFWLEGYLSSLIHLKAFIYINLIDKAVLGFISNFKVSASPLIYLIEKTMQNVKIPVFGQFLYQDSNWASKVIEKLIIDNAAIFPFLAYSGIPAVSFCFCIEDTDYPYLGITMDITYKELERIPHELNKVARAAAIFVAGQFVIKLITIDVIELNLDYERYNSQLLSIFVRDLNQYRADIKIEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLLITDFIGNAIEKIDRFVMMKKLNDRVMRVIEYIIFLSPYVSPKIESPFRITVIFWGSGSITLIPALLIENLKLKQONNGAFNIEFLFRNQLALATWITQGAANALSGDVWDDIDNIEF (SEQ ID NO: 33)

人類IgG1 Fc區	DKTHTTCCPPCPAPHLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVFVFNAAKTKPRLEEQYNSITRVVSVLTVLTIQDWTLSKGIYKCKVSNKALPAPDKITSKA KGQPRLEPQVYTLPPSRHHEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVFWISNGQPENNYKITTPPVLD SDGSHFITYSKLTVDKSRWQQGNNVFSCSVMLTIHLINITYIQKSLISLSPGK (SEQ ID NO: 34)
具有 N29/A突 變之人類 IgG1 Fc區	DKTHTTCCPPCPAPHLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVFVFNAAKTKPRLEEQYASITRVVSVLTVLTIQDWTLSKGIYKCKVSNKALPAPDKITSKA KGQPRLEPQVYTLPPSRHHEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVFWISNGQPENNYKITTPPVLD SDGSHFITYSKLTVDKSRWQQGNNVFSCSVMLTIHLINITYIQKSLISLSPGK (SEQ ID NO: 35)

圖 3

A: 全腦

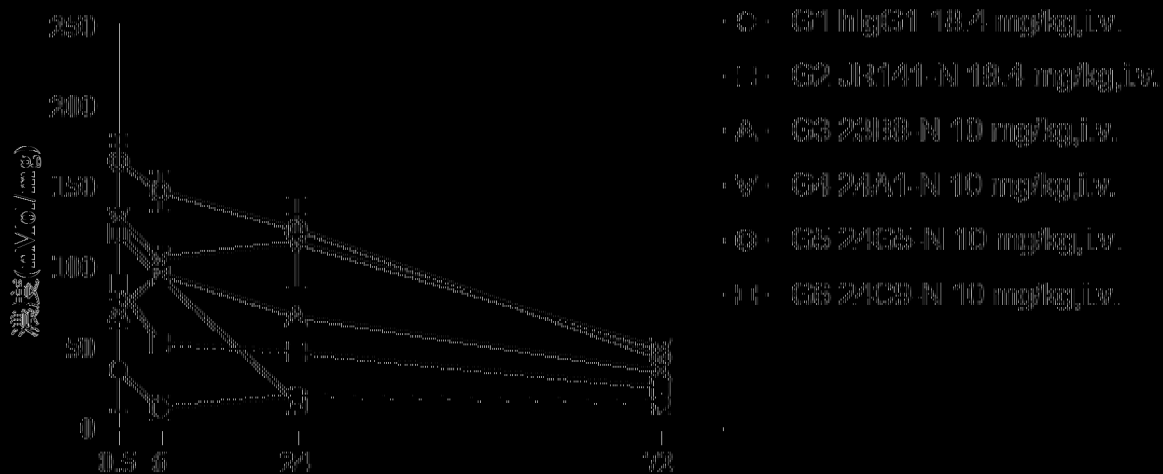
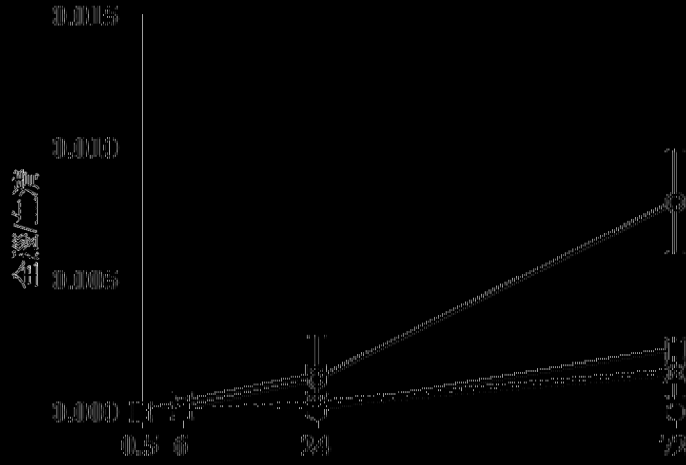


圖 4A

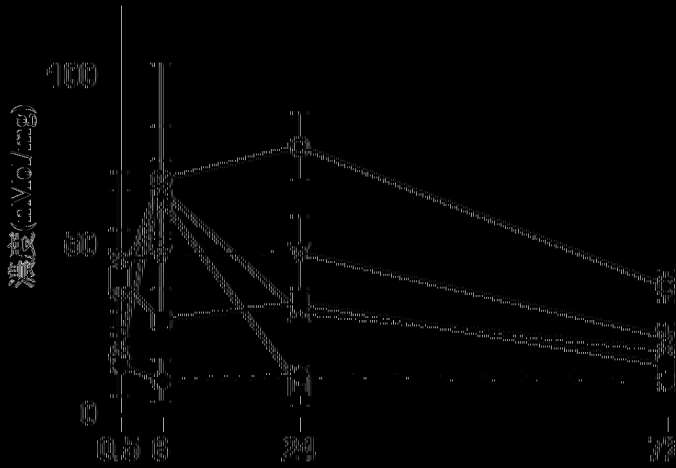
B: 全腦/血清



- G1 hlgG1 18.4 mg/kg, i.v.
- G2 JH141-N 18.4 mg/kg, i.v.
- G3 2313-N 10 mg/kg, i.v.
- G4 24A1-N 10 mg/kg, i.v.
- G5 24C5-N 10 mg/kg, i.v.
- G6 24C9-N 10 mg/kg, i.v.

圖 4B

C: 實質



- G1 hlgG1 18.4 mg/kg, i.v.
- G2 JH141-N 18.4 mg/kg, i.v.
- G3 2313-N 10 mg/kg, i.v.
- G4 24A1-N 10 mg/kg, i.v.
- G5 24C5-N 10 mg/kg, i.v.
- G6 24C9-N 10 mg/kg, i.v.

圖 4C

D : 實質/血清

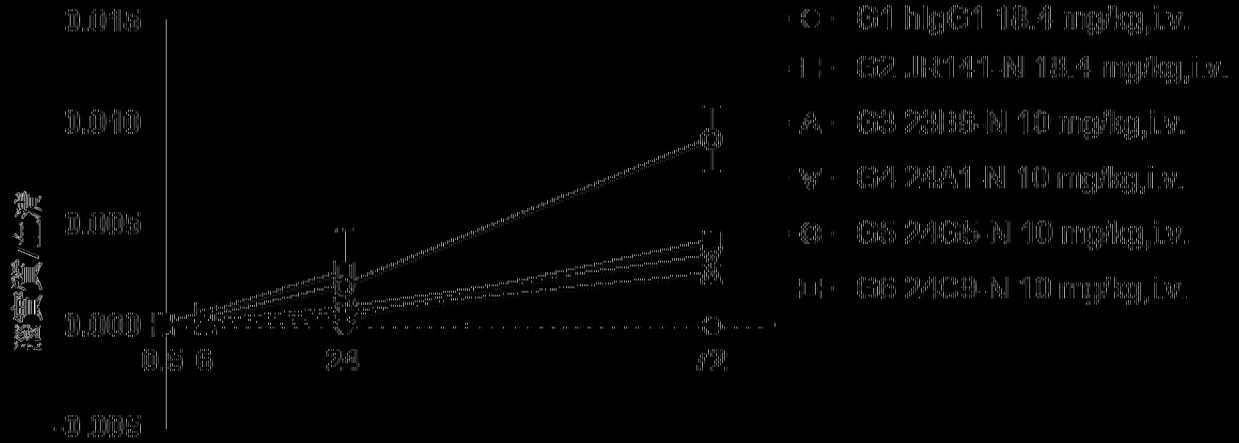


圖 4D

A : 實質

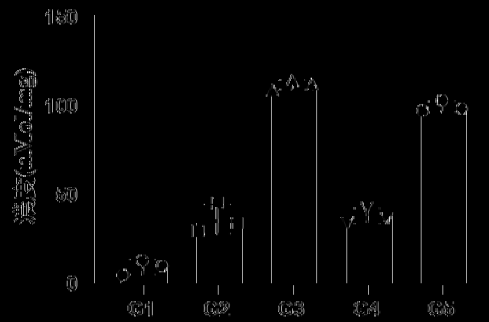


圖 5A

