(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118786146 A
(43)申请公布日 2024.10.15

(21)申请号 202380023138.0
(22)申请日 2023.02.24
(66)本国优先权数据
202210172397.7 2022.02.24 CN
202210916833.7 2022.08.01 CN
202211183393.5 2022.09.27 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/078127 2023.02.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/160651 ZH 2023.08.31

(71)申请人 苏州信诺维医药科技股份有限公司
地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期22栋
(72)发明人 胡永韩 徐林峰 吴振伟 阮卡 王文贵
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 张莉 黄革生

(51)Int.Cl.
C07K 16/36(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(54)发明名称

一种抗体及其药物偶联物和用途

(57)摘要

本发明涉及抗体和抗体-药物偶联物,更具体地涉及靶向组织因子的抗体和抗体-药物偶联物(ADC)以及含有所述抗体或ADC的组合物及其治疗应用。

CN 118786146 A

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2023 年 8 月 31 日 (31.08.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/160651 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/36 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/078127

(22) 国际申请日: 2023 年 2 月 24 日 (24.02.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210172397.7 2022年2月24日 (24.02.2022) CN
202210916833.7 2022年8月1日 (01.08.2022) CN
202211183393.5 2022年9月27日 (27.09.2022) CN

(71) 申请人: 苏州信诺维医药科技股份有限公司(EVOPOINT BIOSCIENCES CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期22栋, Jiangsu 215000 (CN)。

(72) 发明人: 胡永韩(HU, Yonghan); 中国江苏省苏州市苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期22栋, Jiangsu 215000 (CN)。 徐林峰(XU, Linfeng); 中国江苏省苏州市苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期22栋, Jiangsu 215000 (CN)。 吴振伟(WU, Zhenwei); 中国江苏省苏州市苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期22栋, Jiangsu 215000 (CN)。 阮卡(RUAN, Ka); 中国江苏省苏州市苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期22栋, Jiangsu 215000 (CN)。 王文贵(WANG, Wengui); 中国江苏省苏州市苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期22栋, Jiangsu 215000 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

WO 2023/160651 A1

(54) **Title:** ANTIBODY, AND DRUG CONJUGATE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种抗体及其药物偶联物和用途

(57) **Abstract:** The present invention relates to an antibody and an antibody-drug conjugate, and more particularly to an antibody and an antibody-drug conjugate (ADC) targeting a tissue factor, and a composition containing the antibody or the ADC and the therapeutic use thereof.

(57) 摘要: 本发明涉及抗体和抗体-药物偶联物，更具体地涉及靶向组织因子的抗体和抗体-药物偶联物(ADC)以及含有所述抗体或ADC的组合物及其治疗应用。

一种抗体及其药物偶联物和用途

技术领域

本发明涉及抗体以及抗体-药物偶联物，更具体地涉及靶向组织因子（Tissue Factor，TF）的抗体及抗体-药物偶联物（ADC）以及含有所述抗体或 ADC 的组合物及其治疗应用。

背景技术

组织因子（Tissue Factor，TF）又称促凝血酶原激酶(thromboplastin)、CD142、或凝血因子 3。作为一种跨膜糖蛋白，TF 由胞外域、跨膜区和胞内域组成。

TF 是外源凝血事件启动的必需分子，以功能形式表达在细胞表面。作为血浆中凝血因子 VII (FVII，一种丝氨酸蛋白酶)的高亲和力受体，TF 在与 VII 的活化形式 VIIa 形成复合体后，引发催化事件，通过特定的有限蛋白裂解，激活因子 IX 或 X，启动凝血蛋白酶级联。在正常生理条件下，TF 位于血管壁外膜细胞、包绕血管的成纤维细胞等上，而在血管中膜或内膜层却很稀少。只有当血管壁的完整性遭到破坏时 TF 才暴露于循环血液，通过激活凝固级联反应发挥止血作用。在该过程中，TF 依靠其与细胞膜的紧密结合发挥“锚”作用，使生理性凝血局限于损伤部位，而不从血液凝固的起始部位向远处播散。

与正常组织和细胞上有限的表达相反，已经证实，TF 在多种恶性肿瘤上过表达，包括宫颈癌、胰腺癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌等。因此，TF 可以作为抗体类药物和 ADC（抗体-药物偶联物）药物开发的靶点。Seagen Inc. (SGEN)/ Genmab A/S (GMAB)公司开发的靶向 TF 的 ADC 药物 Tivdak（Tisotumab Vedotin），已于 2021 年 9 月获批用于宫颈癌适应症，并且在卵巢癌等其它适应症中的应用也已经处于临床 II 期。

然而，目前开发的许多抗 TF 抗体或抗体类药物，尽管在癌症治疗上表现出一定的功效，但同时也已经检测到对凝血的干扰或抑制，和由此引发的相关副反应（Chenard-Poirier M, Hong DS, Coleman R, de Bono J, Mau-Sorensen M, Collins D, et al. A phase I/II safety study of tisotumab vedotin (HuMax-TFADC) in patients with solid tumors. Ann Oncol 2017;28:v403–v27；Zhang X, Li Q, Zhao H, Ma L, Meng T, Qian J, et al. Pathological expression of tissue factor confers promising antitumor response to a novel therapeutic antibody SC1 in triple negative breast cancer and pancreatic adenocarcinoma. Oncotarget 2017;8:59086–102.）。

因此，本领域仍然存在着开发新的 TF 抗体以及包含其的新 ADC 药物的需求，所述的 TF 抗体应具有特异性靶向肿瘤细胞表面 TF 的能力，但同时对正常组织中 TF 介导的凝血反应具有最小影响，以便为癌症患者提供更广更优的用药选择。

发明概述

为满足上述的本领域需要，本发明人经过深入研究，提供了新的 TF 抗体及由其构成的抗体-药物偶联物(ADC)。如实施例所示，本发明的抗 TF 抗体不仅对 TF 阳性肿瘤细胞展示出高结合亲和力和高特异性，能够快速有效地被肿瘤细胞内吞，且对 TF 介导的凝血影响小。进一步地，如实施例所示，由本发明 TF 抗体构成的 ADC 不仅具有良好的物理性质，无明显的聚集现象，且在动物模型中展示了显著的抑瘤生长活性和良好的动物用药耐受性。

因此，在第一方面，本发明提供了具有下式(I)的抗体-药物偶联物(ADC)或其可药用盐或溶剂化物：

$Ab\text{-}[L\text{-}D]_q$ (I)

其中，

Ab 表示抗 TF 抗体，

L 表示连接体，

D 表示细胞毒性或细胞抑制性药物，例如，拓扑异构酶 I 抑制剂，且

q=1 至 20，例如，q=1-10、1-8、3-8、4-8、或 6-8，

其中，所述 Ab 包含：

-SEQ ID NO: 1 的重链可变区(VH)序列的三个 CDR 和 SEQ ID NO: 2 的轻链可变区(VL)序列的三个 CDR，

-SEQ ID NO: 3 的重链可变区(VH)序列的三个 CDR 和 SEQ ID NO: 4 的轻链可变区(VL)序列的三个 CDR，

-SEQ ID NO: 5 的重链可变区(VH)序列的三个 CDR 和 SEQ ID NO: 6 的轻链可变区(VL)序列的三个 CDR，或者

-SEQ ID NO: 7 的重链可变区(VH)序列的三个 CDR 和 SEQ ID NO: 8 的轻链可变区(VL)序列的三个 CDR，

其中优选地，所述 CDR 根据 Chothia、AbM、Kabat、IMGT 或其任意组合进行定义，

更优选地，所述 Ab 包含 SEQ ID NO: 7 的重链可变区(VH)序列的三个 CDR 和 SEQ ID NO: 8 的轻链可变区(VL)序列的三个 CDR。

在第二方面，本发明提供了包含本发明 ADC 或其可药用盐或溶剂化物的组合物。

在第三方面，本发明提供了本发明 ADC 或其可药用盐或溶剂化物及其组合物在治疗或预防 TF 阳性肿瘤中的用途，以及在制备用于所述治疗或预防的药物中的用途。

在第四方面，本发明提供了抗 TF 抗体、及其药物组合物和用途。

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

附图说明

图 1A-1D 显示，通过基于抗原蛋白的 ELSIA 测定，检测本发明示例性抗体与人 TF 或猴 TF 的结合亲和力。BM 为参照抗体。

图 2A-2D 显示，通过流式细胞术，检测本发明示例性抗体与不同的 TF 阳性肿瘤细胞（NCI-H358 和 KYSE520）的细胞结合亲和力。BM 为参照抗体。

图 3 A-3C 显示，通过 IL-8 释放抑制实验，检测本发明人源化抗体对 TF/FVIIa 复合物介导的下游信号通路的阻断活性。

图 4A-4B 显示，与参照抗体 BM 相比，本发明人源化抗体对凝血的影响。图 4A：2 mM Ca^{2+}, 50 μg/mL 抗体浓度；图 4B：5 mM Ca^{2+}, 20 μg/mL 抗体浓度。

图 5A-5B 显示，在人血清中 37℃孵育一段时间后，本发明人源化抗体的血清稳定性检测结果。

图 6A-6B 显示，在将抗 TF 人源化抗体与毒素-Linker (B81，即，DL-01 分子)偶联前后，通过 ELISA 测定的抗体亲和力变化。

图 7A-7B 显示，本发明 ADC 的体外杀伤活性检测结果。

图 8 显示，本发明 ADC，22F11H5-hz1 和 30G11B7 在偶联药物-连接体(B81)之后，在小鼠体内的抑瘤效果。

图 9 显示，包含本发明抗体 22F11H5-hz1 和 30G11B7 的 ADC 偶联物在施用后对小鼠体重的影响。

图 10 显示，本发明 ADC，2B12B10-hz1 和 27H8H3-hz1 在偶联 B81 之后，在小鼠体内的抑瘤效果。

图 11 显示，包含本发明抗体 2B12B10-hz1 和 27H8H3-hz1 的 ADC 偶联物在施用后对小鼠体重的影响。

发明详述

定义

除非另有定义，否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域一般技术人员通常所理解的含义相同的含义。为了本发明的目的，下文定义了以下术语。

当在本文中使用商品名时，除非上下文另有指出，否则该商品名包括商品名产品的产品配方、通用名药物和活性药物成分。

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

用于连接两个或两个以上可选项的术语“和/或”，应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或多项的组合。

如本文中所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

在本文中，术语“组织因子”或“TF”可互换使用，并且除非另有说明，否则包括人组织因子的任何变体，包括序列变体，尤其是天然存在的变体、等位基因变体，以及翻译后修饰变体和构象变体，并涵盖其物种同源物。此外，应理解，该术语不仅涵盖由细胞天然或重组表达的 TF 或在天然或重组细胞上表达的 TF，也涵盖重组表达的包含 TF 胞外域的融合蛋白。组织因子的一个例子是包含 UniProtKB - P13726 下的氨基酸序列的人 TF 蛋白，或包含所述蛋白胞外域的重组蛋白。组织因子的另一个例子是包含 UniProtKB - A0A2K5VXA0 下的氨基酸序列的猴 TF 蛋白，或包含所述蛋白胞外域的重组蛋白。在本文中，在不特别指明的情况下，术语“组织因子”或“TF”是指来源于人的组织因子。

在本文中，术语“TF 阳性”细胞是指，呈 TF 细胞表面表达阳性的细胞，例如癌细胞、经改造的癌细胞或经改造的非肿瘤细胞。可以通过本领域已知用于确定细胞表面抗原表达水平的任何常规方法，例如，FACS 检测方法或免疫荧光染色方法，确定细胞表面的 TF 表达水平。TF 在多种肿瘤细胞上具有显著高于正常组织/细胞上的表达水平，例如，MDA-MB-231(乳腺癌；>大约 350,000 个 TF 分子/细胞)，BxPC-3 (胰腺癌；>大约 350,000 个 TF 分子/细胞)。优选地，在本文中，TF 阳性细胞是 TF 阳性肿瘤细胞。

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

在本文中，“全抗体”（在本文中可与“全长抗体”、“完全抗体”和“完整抗体”互换使用）是指，包含至少两条重链(H)和两条轻链(L)的免疫球蛋白分子。每条重链由重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成。可变区是抗体的重链或轻链中参与抗体与其抗原结合的结构域。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是显示出多种效应子功能。抗体的轻链可以基于其恒定区的氨基酸序列归为两种类型（称为 kappa（κ）和 lambda（λ））。抗体的重链可以基于其恒定区的氨基酸序列而划分为主要 5 种不同的类型：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，并且这些类型中的几种

可以进一步划分成亚类，如，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4、IgA1 以及 IgA2。

在本文中，术语抗体的 “抗体片段”和“抗原结合片段”可互换使用，是指并非完整抗体的分子，其包含完整抗体中用于结合该完整抗体所结合的抗原的部分。如本领域技术人员理解的，为实现抗原结合目的，抗体片段通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。可以通过重组 DNA 技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗体片段。抗体片段的例子包括但不限于，Fab、scFab、二硫键连接的 scFab、Fab’、F(ab’)2、Fab’-SH、Fv、scFv、二硫键连接的 scFv、线性抗体、双链抗体(diabody)、三链抗体(triabody)、四链抗体(tetrabody)、微型抗体(minibody)。在根据本发明的一些实施方案中，抗体片段包含用于在轻链和重链之间或重链与重链之间形成链间二硫键的半胱氨酸残基部分，例如，IgG1 抗体 Fab 区和/或铰链区的半胱氨酸残基，以提供可用于巯基偶联化学的氨基酸残基位点。在根据本发明的另一些实施方案中，抗体片段包含引入 Fc 区的半胱氨酸残基，以提供可用于巯基偶联化学的氨基酸残基位点。

在本文中，术语“免疫球蛋白”指具有天然存在抗体的结构的蛋白质。例如，IgG 类免疫球蛋白是由二硫键键合的两条轻链和两条重链组成的约 150,000 道尔顿的异四聚体蛋白。从 N 端至 C 端，每条免疫球蛋白重链具有一个重链可变区(VH)，也称作重链可变结构域，随后是三个重链恒定结构域(CH1、CH2 和 CH3)。从 N 端至 C 端，每条免疫球蛋白轻链具有一个轻链可变区(VL)，也称作轻链可变结构域，随后是一个轻链恒定结构域(CL)。相应地，在本文中，提及一个抗体是 IgG 抗体，是指该抗体是具有 IgG 类免疫球蛋白结构的异四聚体蛋白。在 IgG 抗体中，通常重链的 VH-CH1 与轻链的 VL-CL 配对形成特异性结合抗原的 Fab 片段。因此，一个 IgG 抗体基本上由借助免疫球蛋白铰链区连接的两个 Fab 分子和两个二聚化的 Fc 区组成。IgG 免疫球蛋白可以基于重链恒定区的序列，划分成亚类，例如 γ1(IgG1)、γ2(IgG2)、γ3(IgG3)、和 γ4(IgG4)。IgG 免疫球蛋白的轻链也可以基于其恒定结构域的氨基酸序列而划分成两种类型，称作 κ 和 λ。在一些实施方案中，根据本发明的抗体是 IgG 抗体，例如 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 抗体。在另一些实施方案中，根据本发明的抗体是 IgGκ 或 IgGλ 抗体，例如，IgG1κ 或 IgG1λ 抗体。

在本文中，术语“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR” 或“高变区”可互换使用，是指抗体可变结构域中在序列上高度可变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。在本文中，抗体重链和轻链的 CDR 从 N-端开始顺序编号，通常称作 CDR1、CDR2 和 CDR3。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 也称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 则称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，可以采用本领域公知的多种方案确定其 CDR 序列。例如，可以在 http://www.abysis.org/abysis/，获得给定的轻链可变区或重链可变区中 CDR 的注释，包括基于 Kabat、AbM、Chothia、Contact、IMGT 定义的 CDR 序列。此外，CDR 也可以基于与参考 CDR 序列具有相同的 Kabat 编号位置而确定。除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区中的残基位置（包括重链可变区残基和轻链可变区残基）时，是指根据 Kabat 编号系统（Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）的编号位置。

在本文中，“可变区”或“可变结构域”是抗体的重链或轻链中参与抗体与其抗原的结合的结构域。重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)可以进一步再划分为高变区（HVR，又称作互补决定区(CDR)），其间插有较保守的区域（即，构架区(FR)）。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和 4 个 FR 组成，从氨基端到羧基端以如下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。在一些方面，可以对抗体的两个可变区之一或两者(即 VH 和/或 VL)中的一个或多个残基进行修饰，例如，对一个或多个 CDR 区和/或对一个或多个构架区进行残基修改，尤其是保守残基取代，以获得仍基本上保持改变之前的该亲本抗体的至少一个生物学特性(例如，抗原结合能力) 的抗体变体。在再一些方面，可以通过 CDR 移植，修饰抗体可变区。由于 CDR 序列负责大多数抗体-抗原相互作用，故可以构建模拟已知抗体的性质的重组抗体变体。在此类抗体变体中，来自已知抗体的 CDR 序列被移植到具有不同性质的不同抗体的构架区上。可以在体外或体内测定试验中评估突变和/修饰后的抗体或包含其的 ADC 偶联物的性质，例如靶抗原结合性质或其它期望的功能性质，例如内吞活性、凝血影响、药代动力学、和体内肿瘤杀伤活性。

在本文中，术语“嵌合抗体”是指可变区序列源自一个物种、恒定区序列源自另一物种的抗体，例如，

其中可变区序列源自小鼠抗体、恒定区序列源自人抗体的抗体。

术语“人源化抗体”是指将源自非人哺乳动物物种例如小鼠种系的 CDR 序列嫁接到人构架序列上的抗体。可以在人构架序列内进行额外的构架区修饰，和/或在 CDR 序列中进行额外的氨基酸修饰，例如以进行抗体的亲和力成熟。在本文中，在一些实施方案中，本发明的人源化抗体具有“来源于”特定的人种系序列的构架区序列。在此，“来源于”是指，所述抗体构架区的氨基酸序列与由所述人种系免疫球蛋白基因编码的相应构架区氨基酸序列具有至少 90%，更优选至少 95%，甚至更优选至少 96%、97%、98%或 99%同一性，并且所述抗体保持抗原结合活性。

在本文中，术语“分离的”抗体是已经与它的天然环境中的组分分离的抗体。在一些实施方案中，抗体被纯化至大于 90%、95%或 99%纯度，所述纯度可以通过例如电泳（例如，SDS-PAGE、等电聚焦（IEF）、毛细管电泳）或色谱（例如，离子交换或反相 HPLC）确定。

在本文中，术语“表位”是指抗体所结合的抗原区域。表位可以由连续的氨基酸形成或者由通过蛋白的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。在本发明中，优选地，根据本发明的抗体结合人 TF 的天然表位，更优选地，结合细胞表面表达的人 TF 胞外域的天然表位。

在本文中，术语“亲和力”(affinity)或“结合亲和力”指，反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中实施例描述的基于抗原蛋白或细胞的 ELISA 测定法，另一具体方法是本文中实施例描述的流式细胞测定法。也可以使用基于生物膜层光学干涉（BLI）技术，进行抗体的动态亲和力评价。

术语“结合”或“特异性结合”，在涉及抗体与关联抗原（在本文中，TF 抗原）结合的上下文中，用于指具有大约 10^{-6} M 或更小的 K_D 值亲和力的结合，例如，K_D 值为大约 10^{-7} M 或更小，或大约 10^{-8} M 或更小。与非特异性抗原（例如，无关抗原，如 BSA）的结合 K_D 值相比，抗体与其关联抗原的结合 K_D 值，优选低至少 100 倍或例如至少 1000 倍。K_D 值的测量是本领域已知的，例如基于生物膜层光学干涉（BLI）技术。可以在例如 ForteBio Octet® 仪器中，使用抗体为配体，使用抗原（例如，包含 TF 胞外域的融合蛋白，如 TF-His）为分析物，进行所述测定。

术语“K_D”(M)在本文中指，特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。亲和力(affinity)与 K_D 值成反相关，即，亲和力越高，K_D 值越小；反之，亲和力越低，K_D 值越高。一般，K_D 值取决于相互作用的抗体-抗原对之间的解离速率常数(Kd 或 Kdis, sec^{-1})和结合速率常数(Ka, $M^{-1} \times sec^{-1}$)。

如本领域技术人员理解，特异性结合人 TF 的抗体，可以与来自其它物种的 TF 蛋白具有交叉反应性。在本文中，术语“交叉反应”是指抗体结合来自不同物种的 TF 的能力。例如，在一些实施方案中，特异于人 TF 的根据本发明的抗体，还可结合来自其它物种的 TF (例如，食蟹猴 TF)。测定交叉反应性的方法包括实施例中所述的方法以及本领域已知的标准测定法，例如通过使用流式细胞术或细胞 ELISA 技术测定。抗体的物种交叉反应性在一些情况下是有利的。例如，当目标抗体对临床前实验动物，例如灵长类动物具有物种交叉反应性时，将促进目标抗体在人体治疗或诊断应用之前的临床前安全性和功效评价。

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

在本文中，术语“天然序列 Fc 区”涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 区序列，例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区序列(Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.)。在一些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区具有自 Cys226 或自 Pro230 延伸至重链羧基端的氨基酸序列。然而，Fc 区的 C 端末端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。在再一些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区在 N 端带有天然免疫球蛋白的铰链序列或部分铰链序列，例如根据 EU 编号，E216 到 T225 的序列或 D221 到 T225 的序列。

在本文中，术语“变体序列Fc区”是指，相对于天然序列Fc区多肽包含修饰的Fc区多肽。所述的修饰可以是氨基酸残基的添加，缺失或取代。取代可以包括天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸。修饰的目的可以是旨在改变由Fc区与其受体的结合及其由此引发的效应子功能。

术语“效应子功能”是指，可归因于抗体的Fc-区的那些生物活性，其随抗体类别而改变。已经已知IgG Fc区可以介导几种重要的效应子功能，例如细胞因子诱导、ADCC、吞噬作用、补体依赖性细胞毒性(CDC)、以及抗体和抗原-抗体复合物的半衰期/清除速率。在一些情况下，取决于治疗目的，这些效应子功能对于治疗性抗体是理想的，但在其他情况下可能是不必要的。因此，在一个实施方案中，本发明提供具有引起效应子功能例如ADCC或CDC的Fc区的抗体，从而在携带TF抗原的肿瘤细胞中诱导肿瘤细胞凋亡、细胞裂解、和/或抑制携带抗原TF的肿瘤细胞的增殖、播散和/或转移。在另一些实施方案中，本发明提供具有改变的效应子功能的Fc区的抗体。可以通过对抗体的Fc区进行序列改变，以改变效应子功能。或者，可制备Fc区具有改变类型的糖基化的抗体，例如具有减小量的岩藻糖基残基的低或无岩藻糖化抗体或具有增加的等分GlcNac结构的抗体。这类改变的糖基化模式已显示可增加抗体的ADCC能力。也可以考虑在与Fc区连接的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体，这样的抗体变体可具有提高的CDC功能。Fc区糖基化模式的改变可通过改变Fc区的氨基酸序列以便产生或移除一或多个糖基化位点而方便地实现。

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

在本文中，“序列同一性”是指在比较窗中以逐个核苷酸或逐个氨基酸为基础的序列相同的程度。可以通过以下方式计算“序列同一性百分比”：将两条最佳比对的序列在比较窗中进行比较，确定两条序列中存在相同核酸碱基(例如，A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置的数目以得到匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数(即，窗大小)，并且将结果乘以100，以产生序列同一性百分比。为了确定序列同一性百分比而进行的最佳比对，可以按本领域已知的多种方式实现，例如，使用可公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数，包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。

在本发明中，就抗体序列而言，氨基酸序列同一性百分比通过将候选抗体序列与给定抗体序列最佳比对后，在一个优选方案中按照Kabat编号规则进行最佳比对后，予以确定。在本文中，在不指定比较窗(即待比较的目标抗体区域)的情况下，将适用于在给定抗体序列的全长上进行比对。

在本文中，除非另有说明，否则参照抗体（BM）是指，采用来自于专利CN 103119065 B中公布的Tisotumab抗体部分的重链和轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NOs: 107和108)构建的抗TF抗体。在涉及与参照抗体比较的上下文中，所述参照抗体将与待比较的抗体在可变区之外的部分具有相同的抗体结构，例如在两者均具有重链和轻链恒定区结构时，具有相同的重链和轻链恒定区序列。

在本文中，术语“卤素”通常是指氟、氯、溴、碘，例如可以是氟、氯。

本文所用的术语“烷基”是指由碳原子和氢原子组成的直链或支链的饱和烃基团。具体地，烷基具有1-10个碳原子，例如1至8个、1至6个、1至5个、1至4个、1至3个或1至2个碳原子。例如，如本文中所使用，术语“C_1-C_6烷基”指具有1至6个碳原子的直链或支链的饱和烃基团，其实例例如甲基、乙基、丙基(包括正丙基和异丙基)、丁基(包括正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基)、戊基(包括正戊基、异戊基、新戊基)、己基(包括正己基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、3,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、2-乙基丁基)，等。

本文所用的术语“烯基”是指由碳原子和氢原子组成的包含至少一个双键的直链或支链的不饱和烃基团。

具体地，烯基具有 2-8 个，例如 2 至 6 个、2 至 5 个、2 至 4 个或 2 至 3 个碳原子。例如，如本文中所使用，术语“C_2-C_6 烯基”指具有 2 至 6 个碳原子的直链或支链的烯基，例如乙烯基、丙烯基、烯丙基、1-丁烯基、2-丁烯基、1,3-丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,4-己二烯基等。

本文所用的术语“炔基”是指由碳原子和氢原子组成的包含至少一个叁键的直链或支链的不饱和烃基团。具体地，炔基具有 2-8 个，例如 2 至 6 个、2 至 5 个、2 至 4 个或 2 至 3 个碳原子。例如，如本文中所使用，术语“C_2-C_6 炔基”指具有 2 至 6 个碳原子的直链或支链的炔基，例如乙炔基、丙炔基、炔丙基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-甲基-1-戊炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、5-甲基-2-己炔基、等。

本文所用的术语“亚烷基”是指，从直链或支链的饱和烷烃的相同或两个不同碳原子上移去两个氢原子得到的二价基团。具体地，亚烷基具有 1-10 个碳原子，例如 1 至 6 个、1 至 5 个、1 至 4 个、1 至 3 个或 1 至 2 个碳原子。例如，如本文中所使用，术语“C_1-C_6 亚烷基”指具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链的亚烷基，包括，但不限于，亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基，等。

本文所用的术语“亚烯基”是指，从包含至少一个双键的直链或支链的不饱和烯烃的相同或两个不同碳原子上移去两个氢原子得到的二价基团。具体地，亚烯基具有 2-8 个，例如 2 至 6 个、2 至 5 个、2 至 4 个或 2 至 3 个碳原子。例如，如本文中所使用，术语“C_2-C_6 亚烯基”指具有 2 至 6 个碳原子的直链或支链的亚烯基，例如亚乙烯基、亚丙烯基、亚烯丙基、亚丁烯基、亚戊烯基、和亚己烯基。

本文所用的术语“亚炔基”是指，从包含至少一个叁键的直链或支链的不饱和炔烃的相同或两个不同碳原子上移去两个氢原子得到的二价基团。具体地，亚炔基具有 2-8 个，例如 2 至 6 个、2 至 5 个、2 至 4 个或 2 至 3 个碳原子。例如，如本文中所使用，术语“C_2-C_6 亚炔基”指具有 2 至 6 个碳原子的直链或支链的亚炔基，例如亚乙炔基、亚丙炔基、亚炔丙基、亚丁炔基、亚戊炔基和亚己炔基。

本文所用的术语“环烷基”是指具有指定环原子数的单环、稠合多环、桥接多环或螺环非芳族单价烃环结构，其可以是饱和或不饱和的，例如包含 1 个或多个双键。环烷基基团在环中可包含 3 个或更多个例如 3-18、3-10、或 3-8 个碳原子，例如 C_{3-10} 环烷基、C_{3-8} 环烷基、C_{3-6} 环烷基、C_{5-6} 环烷基。环烷基基团的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基。

本文所用的术语“杂环”或“杂环基”是指，具有 1-4 个独立地选自 N、O 或 S 的杂原子环成员的 5-20 元(例如 5-14 元、5-8 元、5-6 元)的芳族或非芳族单环、二环、或多环环系。杂环中的一个或多个 N、C 或 S 原子可被氧化。优选地，杂环是 5-10 元环系，为单环或稠合双环。代表性实例包括但不限于吡咯烷、氮杂环丁烷、哌啶、吗啉、四氢呋喃、四氢吡喃、苯并呋喃、苯并噻吩、吲哚、苯并吡唑、吡咯、噻吩(噻吩)、呋喃、噻唑、咪唑、吡唑、嘧啶、吡啶、吡嗪、哒嗪、异噻唑和异噁唑。应该理解，该术语包含本文所定义的杂芳基。

术语"芳基"指在环部分具有 6-20 例如 6-12 个碳原子的单环或多环芳香烃基团。优选地，芳基是(C_6-C_{10})芳基。非限制性示例包括苯基、联苯基、萘基或四氢萘基，它们各自可以任选被 1-4 个取代基取代，所述取代基例如烷基、三氟甲基、环烷基、卤素、羟基、烷氧基、酰基、烷基-C(O)-O-、芳基-O-、杂芳基-O-、氨基、巯基、烷基-S-、芳基-S-、硝基、氰基、羧基、烷基-O-C(O)-、氨基甲酰基、烷基-S(O)-、磺酰基、磺酰氨基、杂环基等。

术语"杂芳基"指含有选自 N、O 或 S 的 1-4 个杂原子的 5-20 元(例如 5-14 元、5-8 元、5-6 元)的芳族单环状或多环状环系，其可以是取代的或未取代的。优选地，杂芳基是 5-10 元环系，为单环或稠合双环。代表性的杂芳基基团包括 2-或 3-噻吩基、2-或 3-呋喃基、2-或 3-吡咯基、2-、4-或 5-咪唑基、3-、4-或 5-吡唑基、2-、4-或 5-噻唑基、3-、4-或 5-异噻唑基、2-、4-或 5-噁唑基、3-、4-或 5-异噁唑基、3-或 5-1,2,4-三唑基、4-或 5-1,2,3-三唑基、四唑基、2-、3-或 4-吡啶基、3-或 4-哒嗪基、3-、4-或 5-吡嗪基、2-吡嗪基、2-、4-或 5-嘧啶基。

术语“杂烷基”是指完全饱和或含 1 至 3 个不饱和度、由所示数量的碳原子和一至十个、优选一至三个选自 O、N、Si 和 S 的杂原子组成的稳定的直链或支链烃，其中的氮和硫原子可任选被氧化并且氮杂原子可任选被季铵化。杂原子 O、N、Si 和 S 可位于杂烷基基团的任何内部位置处或位于杂烷基基团与分子的其余部分连接的位置处。杂烷基的代表性实例包括–CH2-CH2-O-CH3、 -CH2-CH2-NH-CH3、 -CH2-CH2-N(CH3)-CH3、-CH2-S-CH2-CH3、-CH2-CH2-S(O)-CH3、-NH-CH2-CH2-NH-C(O)-CH2-CH3、-CH2-CH2-S(O)2-CH3、 -CH＝CH-O-CH3、 -Si(CH3)3、 -CH2-CH＝N-O-CH3 和–CH＝CH-N(CH3)-CH3。至多两个杂原子可以是连续的，如例如-CH2-NH-OCH3 和–CH2-O-Si(CH3)3。通常，C1 至 C4 杂烷基或亚杂烷基具有 1 至 4 个碳原子和 1 或 2 个杂原子，C1 至 C3 杂烷基或亚杂烷基具有 1 至 3 个碳原子和 1 或 2 个杂原子。在一些方面，杂烷基和亚杂烷基是饱和的。

除非另外指出，否则本文定义各个基团时所使用的术语“被取代的”，是指相应基团可以被例如但不限于以下的基团取代：烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、卤素、氰基、硝基、叠氮基、羧基、羟基、巯基、氨基、单或二烷基氨基、单或二环烷基氨基、单或二芳基氨基、单或二杂环基氨基、单或二杂芳基氨基、烷基-或环烷基-或杂环基-或杂芳基-或芳基-氧基、烷基-或环烷基-或杂环基-或杂芳基-或芳基-硫基、烷基-或环烷基-或杂环基-或杂芳基-或芳基-酰基、烷基-或环烷基-或杂环基-或杂芳基-或芳基-酰氨基、烷基-或环烷基-或杂环基-或杂芳基-或芳基-酰氧基、烷基-或环烷基-或杂环基-或杂芳基-或芳基-磺酰基、烷基-或环烷基-或杂环基-或杂芳基-或芳基-磺酰氧基、烷基-或环烷基-或杂环基-或杂芳基-或芳基-磺酰氨基、或上述任选取代的氨基-甲酰基，以及其各自被其余可选取代基进一步取代的基团，其中的各类基团如本文所定义。取代基的实例包括但不限于一个或多个独立地选自以下的基团：卤素、OH、SH、CN、NH_2、$NHCH_3$、$N(CH_3)_2$、NO_2、N_3、$C(O)CH_3$、COOH、C(O)-氨基、$OCOCH_3$、甲基、乙基、丙基、异-丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、环丙基、甲氧基、乙氧基、丙氧基、氧代基、三氟甲基、二氟甲基、磺酰基氨基、甲磺酰基氨基、SO、SO_2、苯基、哌啶基、哌嗪基和嘧啶基。

本文所用的术语“取代”或“取代的”是指所指定的原子上的一个或多个(例如 1、2、3 或 4 个)氢被所指定的基团代替，条件是未超出所指定原子在当前情况下的正常价键并且形成稳定的化合物，取代基和变量的组合仅当这种组合形成稳定的化合物时才是允许的。

在本文中，术语“连接体”是指在药物-抗体偶联物中将药物与抗体相连的双官能部分。本发明的连接体可以具有多个组分(例如，在一些实施方式中具有负责与抗体偶联的连接基；可降解的肽单元；以及任选地间隔基)。

在本文中，术语“PEG 单元”是指包含重复的乙烯氧基亚单元(PEG 或 PEG 亚单元)的有机部分，其可以是多分散的、单分散的或离散的(即，具有离散数目的乙烯-氧基亚单元)。多分散 PEG 为大小和分子量的非均匀混合物，而单分散 PEG 通常是从非均匀混合物纯化的并因此具有单一的链长和分子量。优选的 PEG 单元包含离散的 PEG，其是以逐步的方式而非经由聚合过程合成的化合物。离散的 PEG 提供具有限定和指定链长的单一分子。

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

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

在根据上下文无矛盾的情况下，本文中“药学上可接受的”和“药用”可互换使用。

术语“药物:抗体比”或“DAR”是指，在 ADC 偶联物中，偶联于本文所述的 Ab 部分上的药物部分(D)与 Ab 部分的比例。在本文所述的一些实施方案中，DAR 可由式 I 中的 q 确定，例如 DAR 可以为 1 至 20，例如 2-18、4-16、5-12、6-10、2-8、3-8、2-6、4-6、6-10，例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15。DAR 也可被计算为产品中分子群体的平均 DAR，即通过检测方法(例如通过常规方法如质谱法、ELISA 测定、电泳和/或 HPLC)测得的产品中偶联于本文所述的 Ab 部分的小分子药物部分(D)与 Ab 部分的总体比例，此 DAR 在文中称为平均 DAR。在一些实施方案中，本发明偶联物的平均 DAR 值是 1 至 20，例如 2-18、4-16、5-12、6-10、2-8、3-8、2-6、4-6、6-10，例如 1.0-8.0，2.0-6.0，例如 1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8.0、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 或 10.0，以及以这些数值中的两个作为端点的范围。

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

术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂的实例包含但不限于喜树碱类药物、奥瑞他汀、金霉素、美登木素生物碱、蓖麻毒素、蓖麻毒素 A 链、卡贝塔汀(combrestatin)、倍癌霉素、海兔毒素、多柔比星、道诺霉素、他克唑、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、二羟基蒽二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒素 A 链、α-帚曲霉素(sarcin)、白树毒素、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(retstrictocin)、酚霉素、伊诺霉素、麻疯树毒素(curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草(Sapaonariaofficinalis)抑制剂和糖皮质激素和其它化学治疗剂，以及放射性同位素，例如 At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212 或 213、P32，以及 Lu 的放射性同位素，包含 Lu177。

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

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

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

术语“药物组合”是指非固定组合产品或固定组合产品，包括但不限于药盒、药物组合物。术语“非固定组合”意指两种或更多种活性成分（例如，(i)本发明的 ADC 分子或本发明的抗体、以及(ii)其他治疗剂）以分开的实体被同时地或依次地，不受特定时间限制或以相同或不同的时间间隔，施用于患者，其中这类施用在患者体内提供预防或治疗有效水平的所述两种或更多种活性成分。术语“固定组合”意指两种或更多种活性成分以单个实体的形式被同时施用于患者。在涉及药物组合的一些情况下，优选对两种或更多种活性成分的施用剂量和/或时间间隔进行选择，从而使各成分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。包含在药物组合中的各成分可以各自呈单独的制剂形式，并且其制剂形式可以相同也可以不同。在一些实施方案中，药物组合中使用的本发明的 ADC 分子或本发明的抗体和其他治疗剂以不超过它们单独使用时的水平施用。

术语“组合疗法”或“治疗组合”是指施用两种或更多种治疗剂或治疗方式（例如放射疗法或手术）以治疗本文所述疾病。这种施用包括以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂，例如施用具有固定比例的两种或多种活性成分的单一胶囊。或者，这种施用包括对于在多种制剂(例如片剂、胶囊、粉末和液体)中的

或在分开的容器中的两种或多种活性成分的共同施用。粉末和/或液体可以在施用前重构或稀释至所需剂量。此外，这种施用还包括以大致相同的时间或在不同的时间以顺序的方式使用每种类型的治疗剂。在任一情况下，治疗方案将提供所述的治疗组合在治疗本文所述的病症或病状中的有益作用。

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

术语“肿瘤”和“癌症”在本文中可互换地使用，是指哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。该术语涵盖肿瘤的原发性形式和转移性形式。该术语也涵盖所有赘生性(neoplastic)的细胞生长和增殖，无论是恶性的还是良性的，及所有癌前(pre-cancerous)和癌性的细胞和组织。

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

用于本文时，“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。

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

用于本文时，术语“有效量”指药物(例如，本发明的抗体药物偶联物或可药用盐或溶剂化物、或本发明的抗体或其抗原结合片段、或其组合物或药物组合)的这样的量，所述的量以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。

用于本文时，术语“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的一个量，其中在将所述量施用于受试者时，由所述施用带来的任何有毒或有害作用将不及其带来的治疗有益作用。相对于未治疗的个体，“治疗有效量”优选地对可度量参数(例如肿瘤体积)实现至少约 30%、甚至更优选地至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%甚至 100%的改善。

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

本发明的各方面将在下面各小节中进一步详述。

本发明的抗体-药物偶联物

I. 抗体-药物偶联物

在一个方面，本发明提供了具有下式(I)的抗体-药物偶联物(ADC)或其可药用盐或溶剂化物：

$Ab\text{-}[L\text{-}D]_q$ (I)

其中，

Ab 表示抗 TF 抗体，

L 表示连接体，

D 表示细胞毒性或细胞抑制性药物，例如，拓扑异构酶 I 抑制剂，且

q 表示 1 至 20 的整数或小数，例如，q=1-10、1-8、3-8、4-8、或 6-8。

以下就本发明 ADC 偶联物的组件及由其组成的本发明 ADC 偶联物分别进行详述描述。本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，这些组件的任何技术特征的任何组合均在本发明考虑范畴之中。并且，本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，本发明的 ADC 偶联物可以包含任何这样

的组合特征。

抗体 Ab 单元

在一些方面，本发明提供了抗体-药物偶联物(ADC)，其包含特异性结合 TF 的本发明抗体作为本发明式 I 偶联物的 Ab 单元。用作 Ab 单元的本发明抗 TF 抗体可以是全长抗体或是抗体片段。在一些实施方案中，本发明式（I）中的 Ab 是包含重链恒定区和轻链恒定区的全长抗体。在一些实施方案中，本发明式（I）中的 Ab 具有由两条轻链和两条重链形成的四聚体结构。在再一些实施方案中，本发明式（I）中的 Ab 是 IgG 抗体，尤其是 IgG1 抗体。在进一步的实施方案中，本发明式（I）中的 Ab 是人源化抗体。

抗体性质

用于本发明 ADC 中的本发明抗 TF 抗体具有以下一个或多个特性：

（i）以高亲和力与人 TF 胞外域结合；

（ii）以高亲和力与 TF 阳性肿瘤细胞结合；

（iii）具有与食蟹猴 TF 的交叉反应性；

（iv）具有 TF 受体介导的内吞活性；

（v）阻断 TF 阳性细胞中由 TF/FVIIa 复合物介导的下游信号通路；和

（vi）基本不影响由细胞表面 TF 起始的凝血或具有降低的凝血影响。

优选地，所述抗 TF 抗体与抗体-药物偶联物能够以高亲和力与 TF 阳性肿瘤细胞结合，且具有基本不影响由细胞表面 TF 起始的凝血或具有降低的凝血影响。

关于用于本发明 ADC 中的本发明抗 TF 抗体的性质，也参见下文“本发明的抗 TF 抗体”部分提供的详细描述。

抗体 CDR 区

CDR 是抗体中主要负责与抗原表位结合的区域。在一些实施方案中，用于本发明 ADC 中的抗 TF 抗体包含如下 CDR 序列：

（i）如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列，或者

（ii）如 SEQ ID NO:3 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:4 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列，或者

（iii）如 SEQ ID NO:5 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:6 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列，或者

（iv）如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列。

优选地，所述 CDR 根据 Chothia、AbM、Kabat、IMGT 或其任意组合进行定义。再优选地，所述 CDR 根据 Kabat 或 IMGT 或其组合进行定义，更优选地，所述 CDR 根据 IMGT 定义。但应当明了，所述的 CDR 也可以采用本领域已知的任何其他方式定义。

此外，本领域知晓，尽管 CDR 在抗体与抗体之间是不同的，但是 CDR 内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用 Kabat, Chothia, AbM 和 Contact 方法中的至少两种，可以确定最小重叠区域，从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。这样的最小结合单位可以是 CDR 的一个子部分。而 CDR 序列其余部分的残基，正如本领域技术人员明了，可以通过抗体的结构和蛋白折叠予以确定。因此，本发明也考虑本文所给出的任何 CDR 的变体。例如，在一个 CDR 的变体中，最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变，而其余 CDR 残基可以被替代。

在一些实施方案中，优选地，用于本发明 ADC 中的抗 TF 抗体包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，其中：

（i）根据 Chothia 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ

ID NO:21 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列或由其组成；或者

（ii）根据 AbM 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iii）根据 Kabat 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iv）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，优选地，用于本发明 ADC 中的抗 TF 抗体包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，其中：

（i）根据 Chothia 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:46 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:47 的氨基酸序列或由其组成；或者

（ii）根据 AbM 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:48 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iii）根据 Kabat 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iv）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:56 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，优选地，用于本发明 ADC 中的抗 TF 抗体包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，其中：

（i）根据 Chothia 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:58 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:69 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:70 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:71 的氨基酸序列或由其组成；或者

（ii）根据 AbM 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:61 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:72 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:73 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:74 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iii）根据 Kabat 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:63 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:64 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:75 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:76 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:77 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iv）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:66 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:67 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:68 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:78 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:79 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:80 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，优选地，用于本发明 ADC 中的抗 TF 抗体包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，其中：

（i）根据 Chothia 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:81 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:82 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:83 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:93 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:94 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:95 的氨基酸序列或由其组成；或者

（ii）根据 AbM 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:84 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:85 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:86 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:96 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:97 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:98 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iii）根据 Kabat 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:87 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:89 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:99 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:100 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:101 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iv）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:90 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:91 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:92 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:102 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:103 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:104 的氨基酸序列或由其组成。

抗体可变区

“可变区”或“可变结构域”是抗体的重链或轻链中参与抗体与其抗原的结合的结构域。在一些实施方案中，用于本发明 ADC 中的本发明抗 TF 抗体包含：本发明示例性抗体 2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1 和 27H8H3-hz1 之任一的重链和轻链可变区序列或其变体，例如，具有与所述示例性抗体之一相同的 CDR 序列，并具有相同或不同的构架区序列的抗体或其片段，例如人源化抗体。对于构架区的替代，可以使用序列相似性检索工具，例如 Gapped BLAST，比较亲本抗体蛋白序列与数据库中的蛋白序列；选择与待进行改变的亲本抗体的构架序列具有高度结构相似性，例如，具有序列同一性至少 80%，85%，90%，或 95%、96%、97%、98%、99%以上的数据库构架序列，用于构架区替代。在一些情况下，在构架区替代后，可以基于需要，对替代的构架序列进行 1 至几个残基突变，例如回复突变，并在体外或体内测定试验

中评估突变后的抗体的抗原结合性质或其它功能性质的保持或改善情况。

在一个实施方案中，用于本发明ADC中的本发明抗TF抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区包含：

（i）SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列、或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（ii）SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列、或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（iii）SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列、或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列，

（iv）SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列、或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

在另一个实施方案中，用于本发明ADC中的抗TF抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：所述述轻链可变区包含：

（i）SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列、或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（ii）SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列、或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（iii）SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列、或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列，

（iv）SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列、或与其具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些优选的实施方案中，所述抗TF抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含SEQ ID NO: 1所述的氨基酸序列或与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列，且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列、或与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。优选地，所述抗体或抗原结合片段包含SEQ ID No:1的重链可变区和SEQ ID No:2的轻链可变区，或由其组成。

在一些优选的实施方案中，所述抗TF抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含SEQ ID NO: 3所述的氨基酸序列或与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列，且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列、或与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。优选地，所述抗体或抗原结合片段包含SEQ ID No:3的重链可变区和SEQ ID No:4的轻链可变区，或由其组成。

在一些优选的实施方案中，所述抗TF抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含SEQ ID NO: 5所述的氨基酸序列或与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列，且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列、或与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。优选地，所述抗体或抗原结合片段包含SEQ ID No:5的重链可变区和SEQ ID No:6的轻链可变区，或由其组成。

在一些优选的实施方案中，所述抗TF抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:7所述的氨基酸序列或与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列，且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列、或与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。优选地，所述抗体或抗原结合片段包含SEQ ID No:7的重链可变区和SEQ

ID No:8 的轻链可变区，或由其组成。

抗体重链和轻链

用于本发明 ADC 中作为 Ab 单元的本发明抗 TF 抗体，在一些情况下，可以包含重链恒定区和/或轻链恒定区。优选地，所述重链恒定区为来源于人免疫球蛋白的重链恒定区。优选地，所述轻链恒定区为来源于人免疫球蛋白的轻链恒定区。在一些实施方案中，包含在所述抗 TF 抗体中的重链恒定区可以为任何同种型或亚型，例如 IgG1, IgG2，IgG3 或 IgG4 同种型的重链恒定区。在一些实施方案中，所述抗 TF 抗体优选包含 IgG1 重链恒定区，尤其是人 IgG1 重链恒定区，例如 SEQ ID NO: 106 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。在另一些实施方案中，包含在所述抗 TF 抗体中的轻链恒定区可以为 κ 轻链恒定区或 λ 轻链恒定区。在一些实施方案中，所述抗 TF 抗体包含来源于人的 κ 轻链恒定区或 λ 轻链恒定区，优选地人 κ 轻链恒定区，例如，SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

本发明也考虑上述任何抗体实施方案的变体。可用作根据本发明的 Ab 单元的抗体变体优选保持引入改变前的亲本抗体的至少 60%, 70%, 80%, 90%, 或 100%的生物学活性(例如抗原结合能力)。更优选地，所述改变不导致抗体变体丧失对抗原的结合，但任选地赋予诸如提高的抗原亲和力等性质。可以理解的，抗体的重链可变区或轻链可变区、或各 CDR 区或构架区可以单独改变或组合改变。此外，也可以对抗体的 Fc 区进行改变。Fc 区的改变可以单独进行，或与构架区和/或 CDR 区的改变相组合。可以改变 Fc 区，例如，以改变抗体的一种或多种效应子功能，例如血清半衰期，补体固定、Fc 受体结合、和/或抗原依赖性细胞毒性。此外，还可以对本发明抗体进行化学修饰(例如，与 PEG 连接)或改变其糖基化模式。

为形成 ADC 偶联物，根据本发明的抗体可以利用其上的一些天然连接位点与毒素-连接体偶联。这样的天然连接位点有半胱氨酸的巯基和赖氨酸的氨基。通常，应用抗体的链间二硫桥可以实现较为确定的药物-抗体比(DAR)。因此，在一个实施方案中，在还原抗体的链间二硫键后，通过巯基化学，将毒素偶联到本发明抗体上，形成式(I)的 ADC 偶联物。此外，也可以考虑在抗体中引入人工连接位点，实现更为定点的偶联。

药物 D 单元

抗体-药物偶联物的药物 D 单元在本文中也称作 ADC 药物的有效载荷(payload)。可用于本发明 ADC 中的药物 D 并无特别限制，可以为任何对细胞具有毒性或抑制性的药物或其前药。本领域技术人员可以根据所需的 ADC 药物起效机制和细胞杀伤效果，选择合适的药物分子作为 ADC 的有效载荷。

在一些实施方案中，药物 D 是细胞毒性剂。在本领域中，已经报道了多种不同机制的适用作有效载荷的细胞毒性剂，包括，但不限于，

(1) 微管抑制/破坏剂：例如，但不限于，auristatin 类（例如，MMAE 或 MMAF），美登素衍生物(例如 DM2，DM4)，微管溶素(Tubulysins)，隐粘菌素(Cryptomycins)，抗有丝分裂 EG5 抑制剂(例如，纺锤体驱动蛋白 KSP 抑制剂)；

(2) DNA 损伤剂：例如，但不限于，吡咯并苯并二氮杂卓类（Pyrrolobenzodiazepines）(例如，吡咯并[2,1-c][1,4] 苯并二氮杂卓 (PBD))，杜卡霉素, Indolinobenzodiazepine；Duocarmycins；Calicheamicin 类；

(3) 拓扑异构酶抑制剂：例如，但不限于，喜树碱类(例如，依喜替康及其衍生物 Dxd)；

(4) 其他： 凋亡诱导剂(Bcl-xL 抑制剂)，thailanstatin 及其类似物，鹅膏毒素，烟酰胺磷酸核糖基转移酶（NAMPT）抑制剂，卡马霉素。

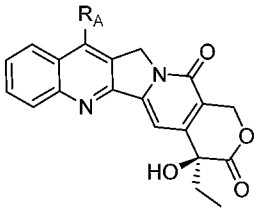
本发明式（I）中的药物 D 可以是选自上述的任何化合物。在一些实施方案中，药物 D 为选自美登素衍生物、卡里奇霉素衍生物、奥瑞他汀衍生物的抗肿瘤生长抑制剂。在一个实施方案中，药物 D 为微管蛋白抑制剂/稳定性破坏剂，例如长春花生物碱类、长春新碱、紫杉醇和多西他赛。在一个实施方案中，药物 D 为 DNA 合成抑制剂，例如，甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、巯基嘌呤、喷司他丁、氟达拉滨、克拉屈滨。在一个实施方案中，药物 D 为 DNA 拓扑异构酶抑制剂，例如，拓扑异构酶 I 抑制剂（例

如，喜树碱类）和拓扑异构酶 II 抑制剂（例如，放线菌素 D、阿霉素、米托蒽醌）。

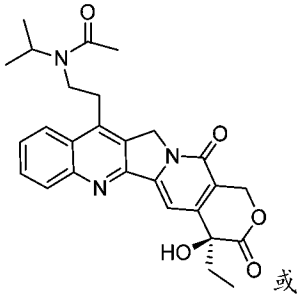
在一些优选的实施方案中，根据本发明的 ADC 的药物 D 为拓扑异构酶 I 抑制剂。拓扑异构酶 I 抑制剂的一个典型例子是喜树碱类药物，例如，但不限于，喜树碱(CPT)、羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、exatecan, topotecan, belotecan, irinotecan，SN-38，和 FL118，及其衍生物。参见例如 Vesela Kostova 等, The Chemistry Behind ADCs，Pharmaceuticals 2021, 14, 442. https://doi.org/10.3390/ph14050442; 和 WO2019/195665，所述文献在此并入本文作为参考。

在本发明的一些实施方案中，本发明 ADC 的药物 D 为选自以下的喜树碱类药物：

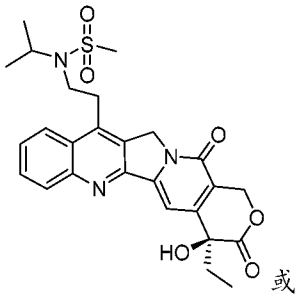
-喜树碱及其衍生物，例如，



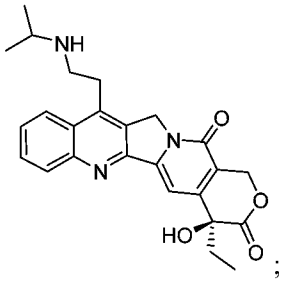
，其中 R_A 选自例如：氢、任选被取代的烷基，其中取代基包括但不限于羟基、氨基，其中氨基部分或羟基部分可以是取代或未取代的，例如被烷基、烷基酰基、或烷基磺酰基取代；在一个实施方案中，所述药物 D 为



或

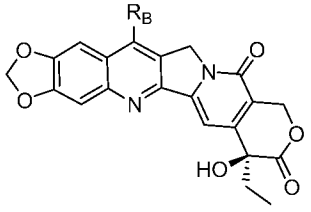


或

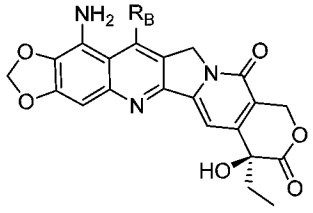


；

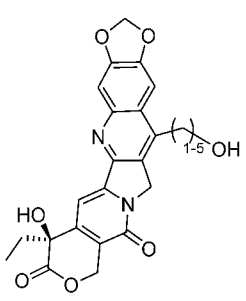
-10,11-methylenedioxy CPT （也简称为 MDCPT 或 FL118）及其衍生物，例如，



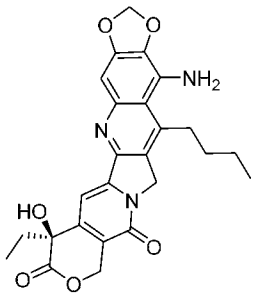
或



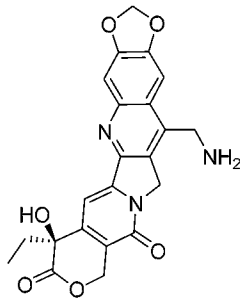
，其中 R_B 选自例如：氢、环烷基、苯基、任选被取代的烷基，其中取代基包括但不限于卤素、羟基、任选被取代的烷氧基、环烷基、杂环烷基、苯基、氨基，其中氨基部分可以任选被取代；在一个实施方案中，所述药物 D 为



或

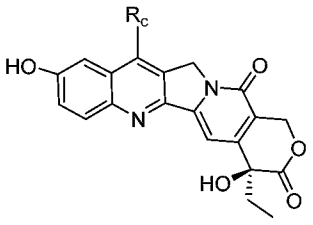
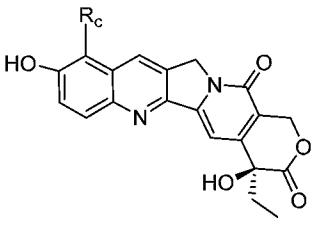
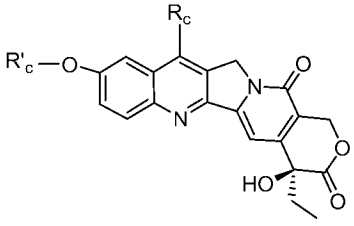


或

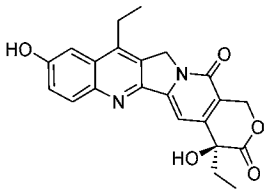
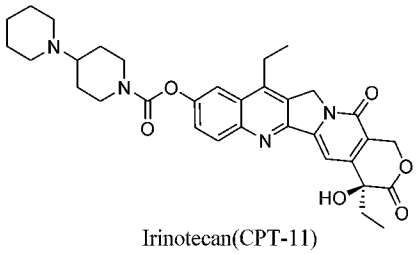
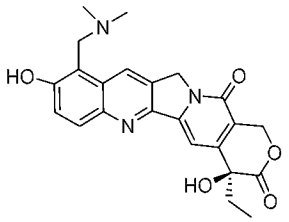


，

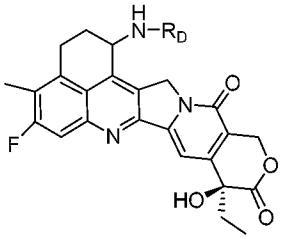
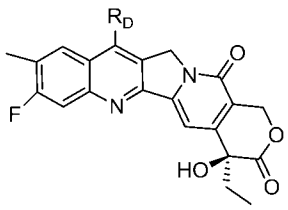
- 10-hydroxy CPT（也简称为 HCPT）及其衍生物，例如，

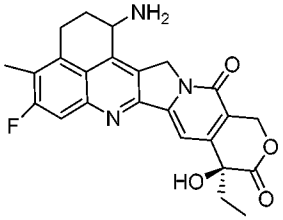
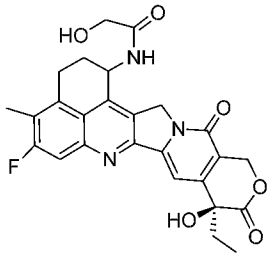
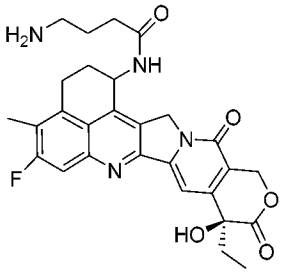

或

或


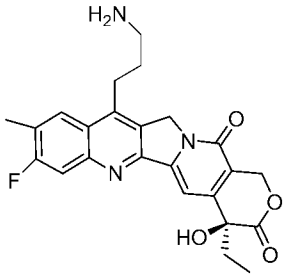
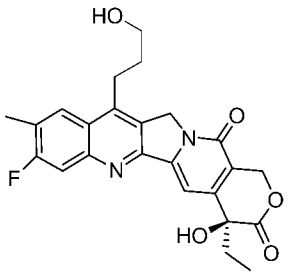
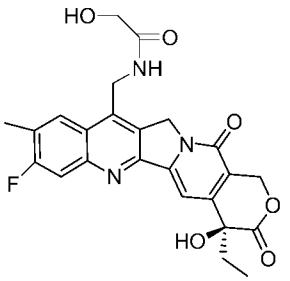
其中，R_C选自例如任选被取代的烷基和环烷基；R'$_C$选自例如 H、烷酰基或任选取代的杂环烷基酰基；在一个实施方案中，所述药物 D 为 7-乙基-10-羟基 CPT (SN-38)或其前药伊立替康(irinotecan, CPT-11)，或所述药物 D 为拓扑替康


SN-38 ，

Irinotecan(CPT-11) ，

topotecan ，

- Exatecan 及其衍生物，例如，


或

其中，R_D选自例如 H、任选被取代的烷基、任选被取代的烷基-C(=O)-，所述取代基为例如-OH 或取代或未取代的氨基；在一个实施方案中，所述药物 D 为:


Exatecan 、

Dxd(1) 或

Dxd(2)；在另一个实施方案中，所述药物 D 为:

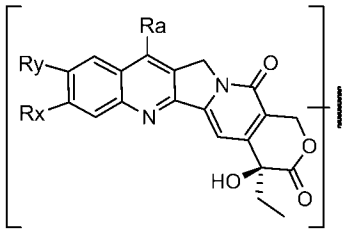

、

或

。

F118（(20S)-10,11-methylenedioxy 喜树碱）通过高通量筛选化合物文库获得。与其他喜树碱衍生物相比，FL118 已经在许多不同的癌症类型中被证实具有高得多的体内和体外抗癌活性。除抑制拓扑异构酶 I 外，FL118 也可以选择性抑制抗凋亡蛋白，例如 survivin, XIAP, cIAP2 和 Mcl-1 的基因启动子活性和内源性表达。参见 Xiang Ling 等, A Novel Small Molecule FL118 That Selectively Inhibits Survivin, Mcl-1, XIAP and cIAP2 in a p53-Independent Manner, Shows Superior Antitumor Activity, PLoS ONE 7(9): e45571.

doi:10.1371/journal.pone.0045571。尽管 FL118 的单独应用由于其极差的水溶性和毒性副作用而受到严重阻碍，但如实施例所示，由该化合物与本发明抗体和连接体组合形成的偶联物，不仅有效地发挥了该化合物的肿瘤杀死效果，且克服了该化合物的缺陷，所形成的偶联物的聚集度小并具有良好的动物耐受性。

因此，在本发明的一些优选实施方案中，本发明 ADC 的药物 D 为 FL118 衍生物，尤其是 7 位取代的 FL118。

在一些实施方案中，本发明的式(I)中的药物 D 为包含以下式 D 结构的喜树碱类药物：



(D)，

其中，

R_x、R_y 各自独立地选自 H、卤素、-OH、C_1-C_6 烷基，或者 R_x 和 R_y 与各自连接的碳原子一起形成具有 1 或 2 个选自 N、S 和 O 的 5-6 元杂环；

R_a 选自 H、卤素、-OH、任选取代的 C_1-C_8 烷基或 C_3-C_8 炔基或 C_3-C_8 烯基、任选取代的 C_1-C_8 烷氧基、任选取代的 C_3-C_8 环烷基、任选取代的苯基、任选取代的杂环烷基、任选取代的杂芳基，

优选地，其中，R_a 选自：

氢；

C_3-C_8 环烷基；

苯基；

任选被选自以下的取代基取代的 C_1-C_8 烷基或 C_3-C_8 炔基或 C_3-C_8 烯基：卤素、羟基、任选被 NH_2、$NH(C_1$-C_4 烷基)和 $N(C_1$-C_4 烷基)$_2$ 取代的 C_1-C_4 烷氧基、C_3-C_8 环烷基、杂环烷基、苯基、和 NR^1R^2，

其中 R^1 和 R^2 彼此独立地选自

氢；

任选地被选自以下的取代基取代的 C_1-C_8 烷基：羟基、氨基、被一个或两个 C_1-C_4 烷基取代的氨基、被一个或两个 C_1-C_4 羟烷基取代的氨基、被(C_1-C_4 羟烷基)和(C_1-C_4 烷基)取代的氨基；

被 1 或 2 个 C_3-C_{10} 环烷基、C_3-C_{10} 杂环烷基、苯基或杂芳基取代的 C_1-C_4 烷基；

C_3-C_{10} 环烷基；

C_3-C_{10} 杂环烷基

C_2-C_6 杂烷基；

杂芳基；

任选卤代的苯基；

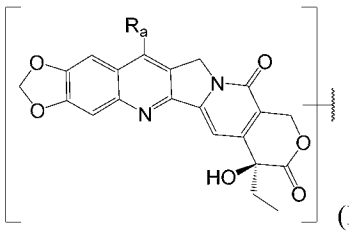
任选被羟基或氨基取代的 C_1-C_8 烷基-C(=O)-；

或者，R^1 和 R^2 与各自连接的氮原子组合形成具有 0 至 3 个取代基的 5-、6-或 7-元杂环，所述取代基选自卤素、C_1-C_4 烷基、OH、C_1-C_4 烷氧基、NH_2、$NH(C_1$-C_4 烷基)和 $N(C_1$-C_4 烷基)$_2$，

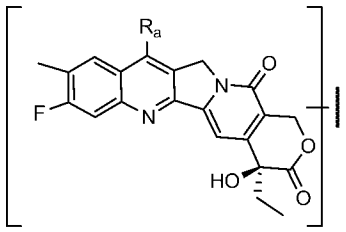
其中环烷基、杂环烷基、苯基、杂芳基在每次出现时各自独立地任选被 0-3 个选自以下的取代基取代：OH、C_1-C_4 烷基、C_1-C_4 烷氧基、NH_2、$NH(C_1$-C_4 烷基)和 $N(C_1$-C_4 烷基)$_2$ 取代。

在一些优选实施方案中，R_x 和 R_y 各自独立地为 H。在另一些优选实施方案中，R_x 为 F 且 R_y 为甲基。在再一些优选实施方案中，R_x 和 R_y 与各自连接的碳原子一起形成含有 2 个 O 的 5 元杂环。

在一些实施方案中，本发明的式(I)中的药物 D 为包含以下式 D_a 或式 D_b 结构的喜树碱类药物：



(D_a) 或



(D_b)，尤其是式(D_a)的喜树碱类药物，

其中，R_a选自：

氢；

C_3-C_8环烷基；

苯基；

任选被选自以下的取代基取代的C_1-C_8烷基、C_3-C_8炔基或C_3-C_8烯基：卤素、羟基、任选被NH_2、$NH(C_1$-C_4烷基)和$N(C_1$-C_4烷基$)_2$取代的C_1-C_4烷氧基、C_3-C_8环烷基、杂环烷基、苯基、和NR^1R^2，

其中R^1和R^2彼此独立地选自

氢；

任选地被选自以下的取代基取代的C_1-C_8烷基：羟基、氨基、被一个或两个C_1-C_4烷基取代的氨基、被一个或两个C_1-C_4羟烷基取代的氨基、被(C_1-C_4羟烷基)和(C_1-C_4烷基)取代的氨基；

被1或2个C_3-C_{10}环烷基、C_3-C_{10}杂环烷基、苯基或杂芳基取代的C_1-C_4烷基；

C_3-C_{10}环烷基；

C_3-C_{10}杂环烷基

C_2-C_6杂烷基；

杂芳基；

任选卤代的苯基；

任选被羟基或氨基取代的C_1-C_8烷基-C(=O)-；

或者，R^1和R^2与各自连接的氮原子组合形成具有0至3个取代基的5-、6-或7-元杂环，所述取代基选自卤素、C_1-C_4烷基、OH、C_1-C_4烷氧基、NH_2、$NH(C_1$-C_4烷基)和$N(C_1$-C_4烷基$)_2$，

其中环烷基、杂环烷基、苯基、杂芳基在每次出现时各自独立地任选被0-3个选自以下的取代基取代：OH、C_1-C_4烷基、C_1-C_4烷氧基、NH_2、$NH(C_1$-C_4烷基)和$N(C_1$-C_4烷基$)_2$取代。

在一些实施方案中，R_a是氢。

在一些实施方案中，R_a是C_3-C_8环烷基（例如，环丙基，环庚基，环戊基）。

在一些实施方案中，R_a是苯基。在另一些实施方案中，R_a是被NH_2或$NH(C_1$-C_4烷基)取代的苯基。

在一些实施方案中，R_a是C_1-C_6烷基，例如，甲基，乙基，丙基， 2-甲基丙基，丁基，异丁基，2,2-二甲基-丙基，2,2-二甲基-丁基，正己基，正戊基，3-乙基-戊基。

在一些实施方案中，R_a是C_1-C_4烷基，其任选地被羟基或C_1-C_4烷氧基取代，其中烷氧基任选地进一步被-NH_2、-$NH(C_1$-C_4烷基)和-$N(C_1$-C_4烷基$)_2$取代。

在一些实施方案中，R_a是C_2-C_4烯基或C_2-C_4炔基，其任选地被羟基或氨基取代。

在一些实施方案中，R_a是被具有1或2个选自N、S和O的5-6元杂环烷基取代的C_1-C_4烷基，其中杂环烷基部分任选地被C_1-C_4烷基进一步取代，优选地，所述杂环烷基为哌嗪基或吗啉基。

在一些实施方案中，R_a是被-NR^1R^2取代的C_1-C_4烷基，尤其是-亚甲基-NR^1R^2，其中R^1和R^2彼此独立地选自：

氢；

-C_1-C_4烷基；

被以下取代基取代的-C_1-C_4烷基：

-OH；-NH_2；-NH(C_1-C_4烷基)；-N(C_1-C_4烷基)$_2$；-苯基；-亚苯基-NH_2；-亚苯基-C_1-C_4烷氧基；-二苯基；-C_3-C_{10}环烷基；-C_3-C_{10}亚环烷基-C_1-C_4烷基；-C_3-C_{10}杂环烷基，其中所述杂环烷基具有1或2个选自N、S和O的杂原子，优选所述杂环烷基为哌啶基；

苯基；卤代的苯基；

C_3-C_{10}环烷基；

-C(=O)-C_1-C_4烷基-OH; -C(=O)-C_1-C_4烷基-NH_2。

在一些实施方案中，R_a是被-NR^1R^2取代的C_1-C_4烷基，尤其是-亚甲基-NR^1R^2，其中R^1和R^2与各自连接的氮原子组合形成5-、6-或7-元杂环烷基环。在一些方面，R^1和R^2与各自连接的氮原子组合形成6-元环。在一些方面，所述6-元环为吗啉基或哌嗪基。

在一些优选实施方案中，R_a选自： -C_1-C_4亚烷基-OH、-C_1-C_4亚烷基-O-C_1-C_4亚烷基-NH_2、-C_1-C_4亚烷基-NH_2、-C_1-C_4亚烷基-NH(C_1-C_4羟烷基)、-C_1-C_4亚烷基-N(C_1-C_4羟烷基)$_2$、-C_1-C_4亚烷基-N(C_1-C_4氨烷基)(C_1-C_4羟烷基)、-C_1-C_4亚烷基-NH(C_1-C_4氨烷基)、-C_1-C_4亚烷基-NH-C(=O)-C_1-C_4亚烷基-OH; -C_1-C_4亚烷基-NH-C(=O)-C_1-C_4亚烷基-NH_2、-C_1-C_4亚烷基-N(C_1-C_4烷基)(C(=O)-C_1-C_4亚烷基-OH); -C_1-C_4亚烷基-N(C_1-C_4烷基)(C(=O)-C_1-C_4亚烷基-NH_2)。

在一些再优选的实施方案中，R_a为-C_1-C_4亚烷基-NH-C(=O)-C_1-C_4亚烷基-OH; -C_1-C_4亚烷基-NH-C(=O)-C_1-C_4亚烷基-NH_2。

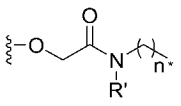
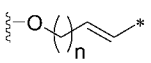
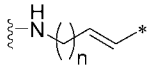
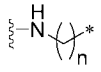
在一些再优选的实施方案中，R_a为-C_2-C_4亚烯基-NH_2或-C_2-C_4亚烯基-OH，例如，-CH=CH-CH_2-NH_2或-CH=CH-CH_2-OH。

在一些再优选的实施方案中，R_a为-C_1-C_4亚烷基-OH、-C_1-C_4亚烷基-O-C_1-C_4亚烷基-NH_2、或-C_1-C_4亚烷基-NH_2。

在一些更优选的实施方案中，R_a为-C_1-C_4亚烷基-OH。在一些方面，R_a为羟甲基。在一些方面，R_a为羟乙基。在一些方面，R_a为羟丙基。

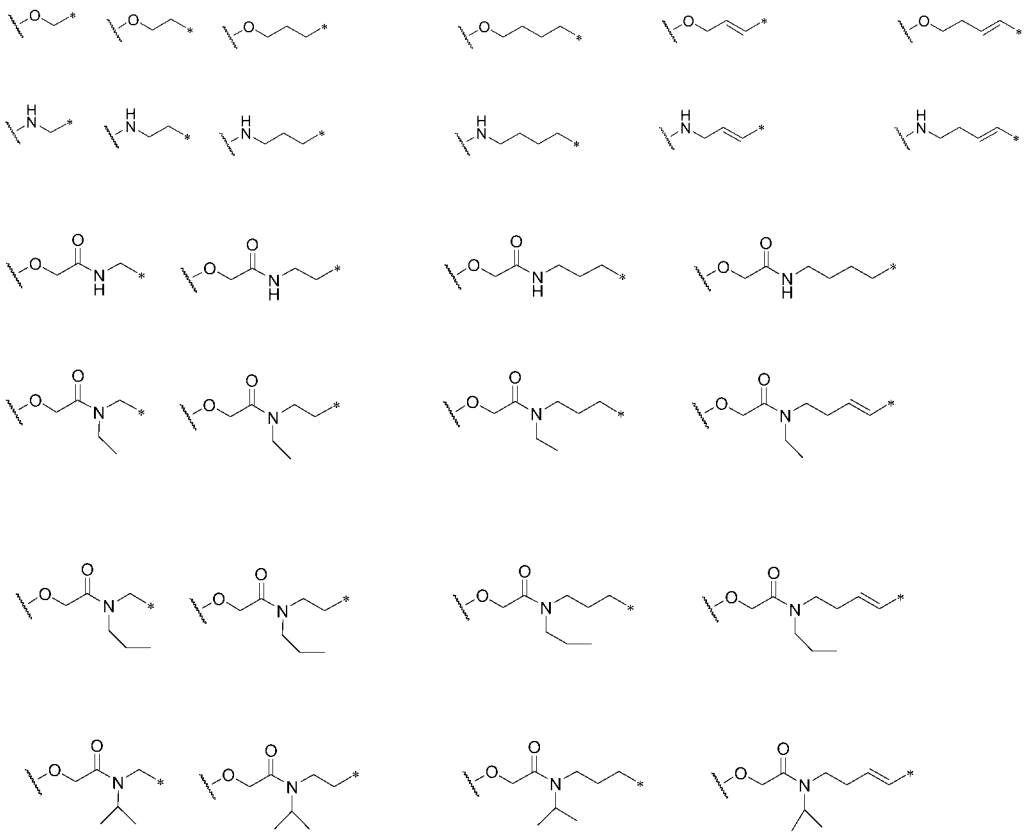
在另一些更优选的实施方案中，R_a为-C_1-C_4亚烷基-NH_2。在一些方面，R_a为氨基甲基。在一些方面，R_a为氨基乙基。在一些方面，R_a为氨基丙基。

优选地，药物D通过其上的游离羟基或氨基基团，与连接体L连接，以偶联到抗体上。更优选地，式D或式D_a或D_b的药物D通过R_a上的羟基或氨基基团，与连接体L连接，以偶联到抗体上。优选地，在与连接体连接后R_a具有选自以下的结构：

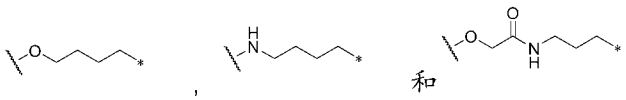

，

，

，

，

，其中，n为1-4的整数，优选n=2或3，其中R’为H或C_1-C_4烷基，优选为H，其中，左侧波浪线表示与连接体L连接的位置，右侧星号表示与喜树碱母核连接的位置；

更优选地，与连接体连接后的R_a具有选自以下的结构：

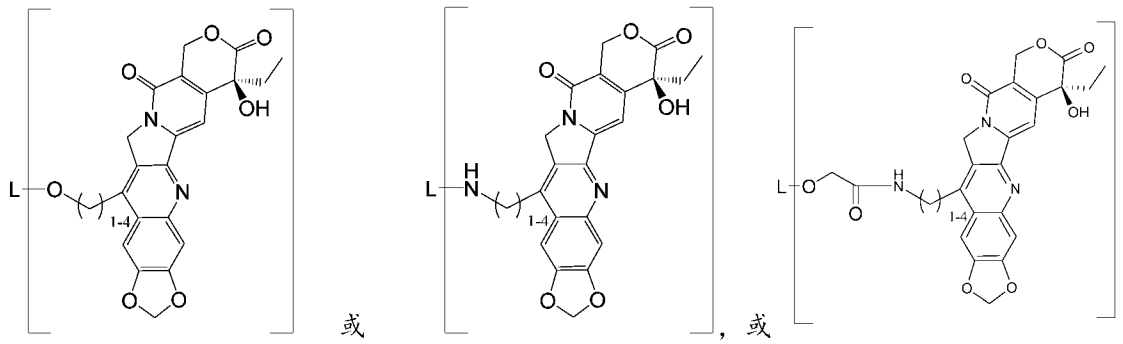


最优选地，与连接体连接后的 R_a 具有选自以下的结构：

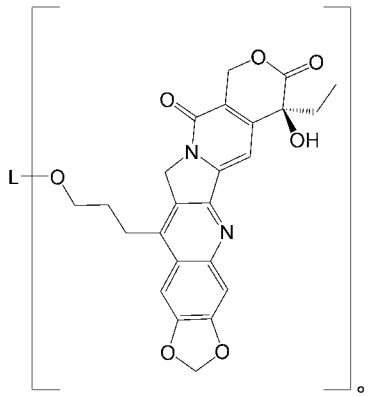


其中，左侧波浪线表示与连接体 L 连接的位置，右侧星号表示与喜树碱母核连接的位置。

在一些优选的实施方案中，本发明的式(I)中的 L-D 单元包含以下结构：



更优选地，式(I)中的 L-D 单元包含以下结构：



连接体 L 单元

适用于本发明的连接体 L 可以是能够实现将本发明抗体与药物偶联的任何连接体。适宜地，连接体的加入应保证本发明的 ADC 在循环系统中的充分稳定性，同时可以在靶位点(例如肿瘤细胞或肿瘤环境)中提供快速和有效的毒性药物活性形式的释放。

在一些实施方案中，本发明式(I)中的连接体是不可降解型连接体。不可降解型连接体的例子包括，但不限于，N-琥珀酰亚胺基-4-（N-马来酰亚胺甲基）环己烷-1-羧酸盐（SMCC）。通常，包含此类连接体的 ADC 必须被细胞内化，由细胞内溶酶体蛋白酶降解 ADC 的抗体部分，释放药物活性分子。

在再一些实施方案中，本发明式(I)中的连接体是可降解型连接体。包含此类连接体的 ADC 的药物释放由连接体中的切割位点的性质触发。因此，可以根据靶治疗位点(例如，肿瘤细胞溶酶体和/或肿瘤环境)的特点，设计此类连接体的切割位点。在大多数情况下，可降解连接体可以由偶联部分、可降解部分、和任选地间隔基部分组成。偶联部分负责抗体与连接体-药物的连接，可以根据期望采用的抗体偶联化学来进行选择。可降解部分在基于酶的释放机制下将包含可被酶识别的肽或肽类似物，例如，可被蛋白水解酶降解的 Val-Ala, Val-Cit, Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Gly-Phe-Gly, 环丁基-Ala, 环丁基-Cit 等寡肽或寡肽类似物。在一些情况下，可以通过在连接体中邻近酶切割位点的肽残基位置引入修饰，来改善 ADC 的性质，例如，ADC 在血液循环中的稳定性和/或 ADC 在靶位点的药效。在一些情况下，也可以根据需要，在连接体的可降解部分与药物 D 之间引入间隔基，来促进药物活性分子自偶联物的其余部分的释放（尤其是，无痕释放），例如，在酸性介质中可自发消除的对氨基苄基氨基甲酸酯（PABA）或氨基甲基(-$NHCH_2$-)间隔基。此外，在药物疏水性高时，在一些情况下，可以考虑（但不是必需）加入诸如 PEG 单元，来改善 ADC 的性质，例如减少沉淀和聚集。可适用于本发明的连接体包括但不限于 WO2022/170971 中公开的连接体（该文献特此并入作为参考）。

在一些实施方案中，本发明式(I)中的连接体 L 具有以下式(II)的结构：

-Z-Y-M- (II)，

其中

Z 为与 Ab 连接的连接基，

Y 是 2-5 个氨基酸的肽，优选二肽、三肽或四肽，

M 不存在，或是用于与药物 D 连接的间隔基。

Z 连接基

通常，抗体半胱氨酸的硫基，以二硫键的形式存在。打开抗体的二硫键，可以提供自由巯基作为偶联位点。通过与抗体巯基进行偶联形成 ADC 的一种方式是，使抗体上的自由巯基与杂环类(例如马来酰亚胺类)连接体发生 Michael 加成反应。另一种方式是，使包含离去基团取代的杂芳环的连接体与抗体分子中的自由巯基进行亲核取代反应，来获得抗体-药物偶联物。两种方式均适用于本发明的 ADC 偶联物。因此，根据本发明的连接体在一些方面可以包含杂环类(例如马来酰亚胺类)或杂芳环类(例如嘧啶类)的 Z 连接基；

并且，在一些情况中，优选包含杂芳环类(例如嘧啶类)连接基，以提供在血液循环中具有更高稳定性的偶联物。

在一些实施方案中，式(II)中的 Z 具有以下结构：

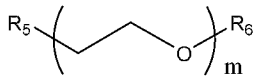
$-Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-$，

其中 Z_1 为 Ab 中的硫原子，

Z_2 为 5-10 元杂环基，优选地含 1 或 2 个选自 N, S 和 O 的杂原子；

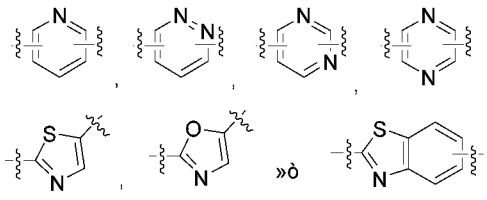
Z_3 选自键、-C(=O)-、$-C_1-C_{10}$ 亚烷基-C(=O)-、$-C_3-C_{10}$ 亚炔基-C(=O)-、$-C_3-C_{10}$ 亚烯基-C(=O)-、$-C_1-C_{10}$ 亚杂烷基-C(=O)-、$-C_3-C_8$ 亚环烷基-C(=O)-、 $-O-C_1-C_8$ 亚烷基-C(=O)-、 -亚芳基-C(=O)-、$-C_1-C_{10}$ 亚烷基-亚芳基-C(=O)-、-亚芳基-C_1-C_{10} 亚烷基-C(=O)-、 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-C_3-C_8 亚环烷基-C(=O)-、 $-C_3-C_8$ 亚环烷基-C_1-C_{10} 亚烷基-C(=O)-、 $-C_3-C_8$ 亚杂环基-C(=O)-、 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-C_3-C_8 亚杂环基-C(=O)-、$-C_3-C_8$ 亚杂环基-C_1-C_{10} 亚烷基-C(=O)-、-亚杂芳基-C(=O)-、$-C_1-C_{10}$ 亚烷基-亚杂芳基-C(=O)-、-亚杂芳基-C_1-C_{10} 亚烷基-C(=O)-、，

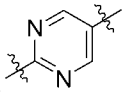
Z_4 是键或是下式表示的 PEG 单元，

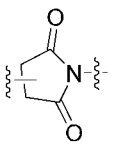


，其中，R_5 选自 C_{1-4} 亚烷基、-NH-、-NH-C_{1-4} 亚烷基-杂芳基-，其中杂芳基为 5 元或 6 元的含氮杂芳基，优选三唑基；R_6 为-C(=O)-、$-C_{1-4}$ 亚烷基、$-C_{1-4}$ 亚烷基-C(=O)-、-NH-C(=O)-(CH_2OCH_2)-C(=O)-、$-C_{1-4}$ 亚烷基-NH-C(=O)-(CH_2OCH_2)-C(=O)-，其中 m 为 2-12 的整数，例如 m=2, 4, 6, 或 8。

在一个实施方案中，Z_2 为 5-10 元杂芳基。在一个实施方案中，Z_2 选自任选被一个或多个独立地选自氢、卤素、硝基、C_{1-6} 烷基和卤代 C_{1-6} 烷基取代的嘧啶、噻唑、苯丙噻唑、噁唑、喹唑啉和吡咯并[2,3d]嘧啶。在一些实施方案中，Z_2 为选自如下的杂芳基，

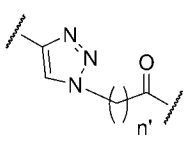
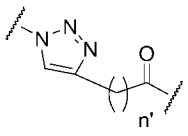
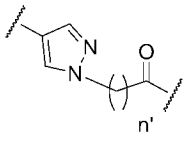
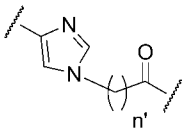


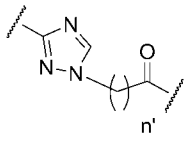
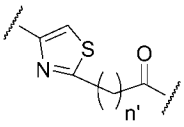
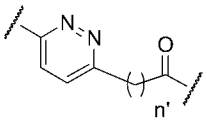
，其中，Z_2 通过与杂原子相邻的碳原子与 Z_1 连接。在一个优选实施方案中，Z_2 为亚嘧啶基，优选 ，更优选 ，其中左侧波浪线表示与 Z_1 连接的位置；右侧波浪线表示与 Z_3 连接的位置。

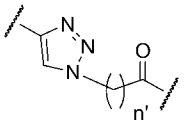
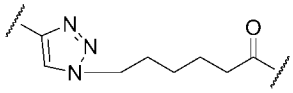
在一些实施方案中，Z_2 为亚马来酰亚胺基， ，其中左侧波浪线表示与 Z_1 连接的位置；右侧波浪线表示与 Z_3 连接的位置。

在一些实施方案中， Z_3 为-C_3-C_8 亚杂环基-C(=O)-、 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-C_3-C_8 亚杂环基-C(=O)-、$-C_3-C_8$ 亚杂环基-C_1-C_{10} 亚烷基-C(=O)-，优选地，其中所述亚杂环基中的杂环是杂芳环，例如三唑、吡唑、噻唑、噁唑、异噁唑、或哒嗪的杂芳环基。在一些实施方案中，Z_3 为-亚杂芳基-C(=O)-、 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-亚杂芳基-C(=O)-、-亚杂芳基-C_1-C_{10} 亚烷基-C(=O)-。

在一些实施方案中，Z_3 为-亚杂芳基-C_1-C_{10} 亚烷基-C(=O)-，尤其是，

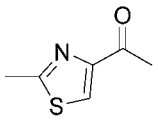
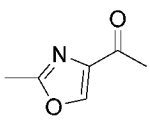
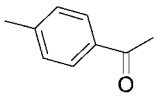

，
，
，
，


，
，
，

其中 n’为 1-6，优选地，Z_3 为，更优选，

其中左侧波浪线表示与 Z_2 连接的位置，右侧波浪线表示与 Z_4 连接的位置，且其中优选地，Z_2 为亚嘧啶基。

在一些实施方案中， Z_3 为亚芳基-或亚杂芳基-C(=O)-，尤其是，

，，或，其中 Z_3 通过-C-(=O)-与 Z_4 连接，且其中优选地，Z_2 为亚嘧啶基。

在另一些实施方案中，Z_3 为-(C≡C)-C_{1-5} 亚烷基-C(=O)-，-(CH=CH)-C_{1-5} 亚烷基-C(=O)-，-C_{1-6} 亚烷基-C(=O)-，或-C_{3-8} 亚环烷基-C(=O)- ，其中 Z_3 通过-C-(=O)-与 Z_4 连接。

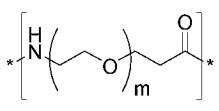
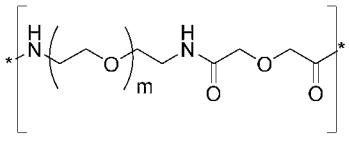
在一些优选实施方案中，Z_2 为亚嘧啶基，Z_3 为-C(=O)-。

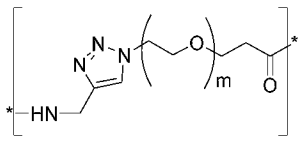
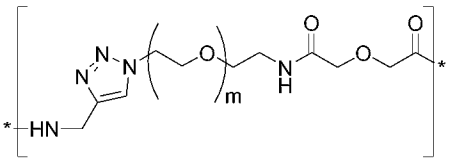
在一些优选实施方案中，Z_2 为亚嘧啶基，Z_3 为-(C≡C)-C_{1-5} 亚烷基-C(=O)-或-(CH=CH)-C_{1-5} 亚烷基-C(=O)-，尤其是-(C≡C)-C_{1-5} 亚烷基-C(=O)-。

在一些优选实施方案中，Z_2 为亚马来酰亚胺基，Z_3 为-C_{1-6} 亚烷基-C(=O)-，或-C_{3-8} 亚环烷基-C(=O)-。

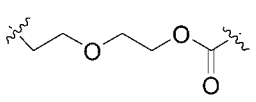
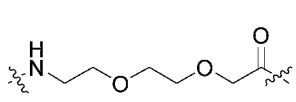
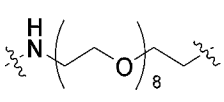
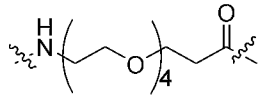
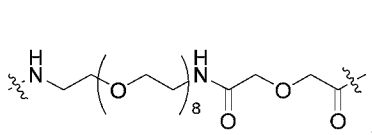
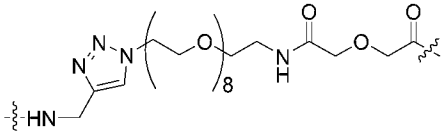
在一些实施方案中，Z_4 为键，Z_3 与式(II)中的 Y 直接连接。

在一些实施方案中，Z_4 为包含 2-12 个 PEG 的单元。在一些实施方案中，Z_4 为

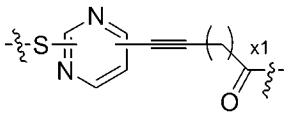
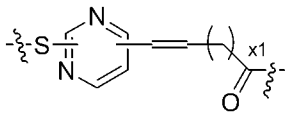
，或或

或，其中 m=1-8，例如，2, 3, 4, 5, 6,7 或 8。

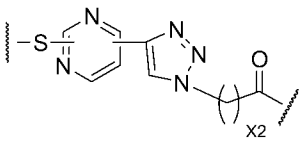
在一些实施方案中，Z_4 选自：


，

，

，

，

，和

，其中左侧波浪线表示与 Z_3 连接的位置；右侧波浪线表示与式 II 中的 Y 连接的位置。

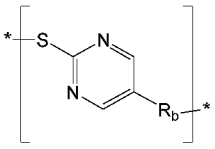
在一些实施方案中，本发明式(I)中的 Z 具有以下结构：


，或

，其中，x_1=1-8，例如，x_1=3。

在一些实施方案中，本发明式(I)中的 Z 具有以下结构：

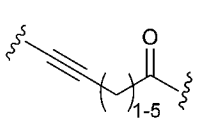
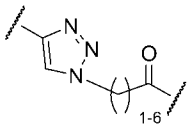

，其中，x_2=1-6。

在一些优选的实施方案中，本发明式(I)中的 Z 具有以下结构：


，

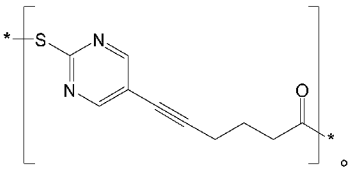
其中 S 为 Ab 中的硫原子，且 R_b 为未取代的或取代的-C_{3-10} 炔基-C(=O)-或-C_{3-10} 烯基-C(=O)- 或-亚杂芳基-C_1-C_{10} 亚烷基-C(=O)-，

优选地，R_b 是

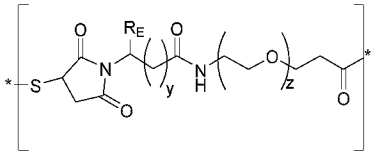

，或


其中，左侧波浪线表示与嘧啶基连接的位置；右侧波浪线表示与 Y 连接的位置；

更优选地，Z 具有结构：

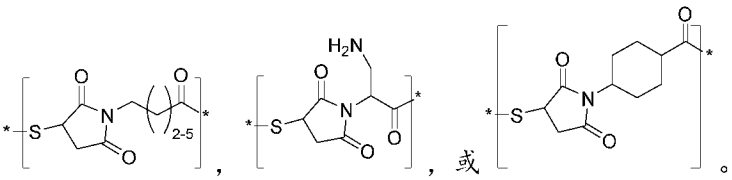

。

在一些实施方案中，本发明式(I)中的 Z 具有以下结构：


，其中 R_E 是氢、C_{1-6} 烷基、C_{1-6} 氨基烷基、C_{1-6} 卤代烷基、C_{1-6} 羟基烷基，其中 y=0-4，例如，0，2，或 5，其中烷基、氨基和羟基部分任选地被取代；在一些实施方案中，R_E 是任选被

取代的氨基烷基，例如被-C_{1-4}亚烷基-NH_2、-C_{1-4}亚烷基 NHR_F和-C_{1-4}亚烷基 $N(R_F)_2$所取代，其中每个 R_F独立地选自 C_{1-6}烷基和 C_{1-6}卤代烷基，或者两个 R_F基团与它们所附连的氮组合形成氮杂环丁烷基、吡咯烷基或哌啶基基团。

在一些实施方案中，本发明式(I)中的 Z 具有以下结构：


，或

。

Y 含肽单元

出于限制或最小化 ADC 的非靶向毒性，同时保证毒素分子在靶肿瘤位置释放的目的，在一些方面，有利的是，设计抗体-药物偶联物，以使其在高选择性地靶向肿瘤细胞的同时，能够被肿瘤细胞或环境中的蛋白水解酶(尤其是，相对于血液，在肿瘤细胞和/或肿瘤环境中具有显著更高活性的酶)降解。为此，可以在此类 ADC 偶联物的连接体中包含可以被此类蛋白水解酶识别和切割的寡肽或寡肽类似物。

在一个实施方案中，因此，作为本发明连接体一部分的 Y 单元是含肽的可降解部分，例如，含有两个或更多个(例如，2-12，例如 2, 3, 4, 5,或 6 个)连续或不连续的氨基酸的可降解肽接头。含肽单元的每个氨基酸可以彼此独立地选自天然氨基酸或非天然氨基酸，例如选自：丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、组氨酸、甘氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、赖氨酸、取代的赖氨酸、亮氨酸、丝氨酸、酪氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、色氨酸、缬氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、硒代半胱氨酸、鸟氨酸、β-丙氨酸、瓜氨酸、及其衍生物。在一些实施方式中，每个氨基酸独立地选自丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、组氨酸、甘氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、 赖氨酸、亮氨酸、丝氨酸、酪氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、色氨酸、缬氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸及其衍生物。在一些实施方式中，每个氨基酸独立地选自丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、组氨酸、甘氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、赖氨酸、亮氨酸、丝氨酸、酪氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸、N-甲基甘氨酸、β-丙氨酸、及其衍生物。在一些方面，ADC 在内化进入肿瘤细胞中后，Y 单元中的酰胺键将被肿瘤细胞溶酶体中的酶识别并降解，释放出药物部分 D。在另一些方面，Y 单元中的酰胺键可以被肿瘤环境中的酶识别并降解，释放出药物部分 D。通过设计偏向肿瘤分布的抗体-药物偶联物，具有此类 Y 含肽单元的连接体将促进毒素分子在肿瘤细胞和环境中的释放。

在一些实施方案中，Y 为包含选自以下的单元： Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala, Val-Lys-Gly, Ala-Ala-Ala, Val-Ala, Gly-Phe-Leu-Gly, Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Gly-Phe-Gly, 环丁基-Ala, 环丁基-Cit。在一些实施方案中，Y 为包含选自以下的单元：Val, Cit, Phe, Lys, D-Val, Leu, Gly, Ala, Asn, Cit-Val, Val-Ala, Lys-Val, Val-Lys(Ac), Phe-Lys, Phe-Lys(Ac), D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn。

在一些优选的实施方案中，Y 为包含取代的赖氨酸的二肽、三肽、四肽或五肽。在一个实施方案中，所述取代的赖氨酸为：



其中，R_3和R_4彼此独立地选自：H，C_{1-6}烷基，-CO-NH_2，-CONH(C_{1-6}烷基)，和-CONH(C_{1-6}烷基)$_2$，其中所述烷基任选地被选自以下的基团取代： 卤素、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}卤代烷基、C_{3-6}环烷基、6-10 元芳基和 5-14 元杂芳基。

在一些优选实施方案中，Y 为从 N 端到 C 端具有下式氨基酸序列的肽：

Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Xaa_5，

其中 Xaa_1 不存在，或为选自缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸和谷氨酸的氨基酸；

Xaa_2 为选自苯丙氨酸、亮氨酸、丙氨酸和缬氨酸的氨基酸，优选缬氨酸；

Xaa_3 为未取代的或取代的赖氨酸；

Xaa_4 为选自亮氨酸、甘氨酸和丙氨酸的氨基酸；

Xaa_5 不存在，或为选自甘氨酸和丙氨酸的氨基酸；

其中，所述氨基酸序列的 N 端与连接体的 Z 单元连接，且 C 端与 M 单元连接或与药物 D 直接连接，

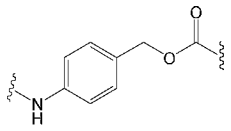
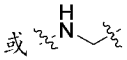
优选地，Xaa_3 为 ε-氨基被 C_1-C_3 烷基单取代或二取代的赖氨酸，

再优选地，Y 为选自以下的肽：Phe-Lys-Gly、Leu-lys-Gly、Gly-Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Ala、Val-Lys-Leu，其中 Lys 残基为未取代的或被 C_1-C_3 烷基单取代或二取代的赖氨酸。

M 间隔基

在一些实施方式中，本发明的 ADC 偶联物在可释放的含肽单元(Y)与药物(D)之间具有间隔基(M)。间隔基可以是促进含肽单元(Y)与药物 D 连接的官能团，或者可以提供附加的结构组分以进一步促进药物 D 从偶联物的其余部分释放(例如，自消解基团，如对氨基苄基(PAB)组分)。

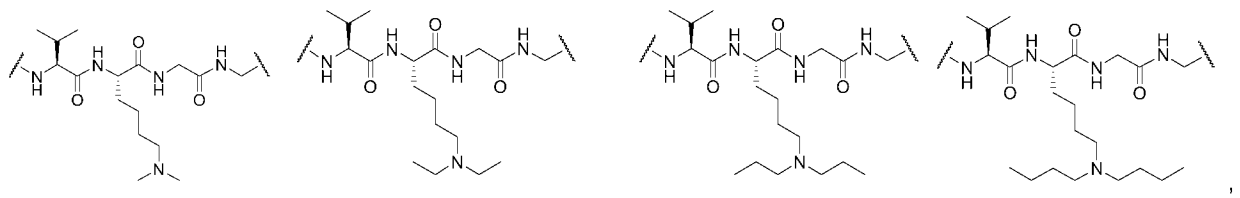
在一些实施方案中，连接 Y 和药物 D 单元之间的 M 间隔基可以选自：


或，且优选为，

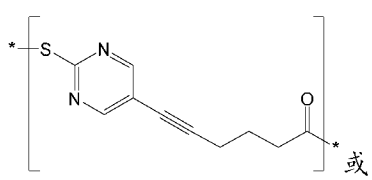
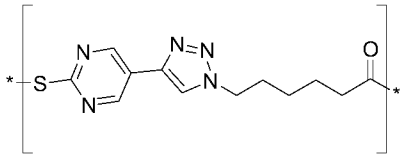
其中左侧波浪线表示与 Y 连接，右侧波浪线表示与药物 D 单元连接。

在另一些实施方案中，M 为共价键，式 I 中的 Y 和药物 D 之间直接连接，如通过酰胺键连接。

在一个优选实施方案中，连接体 L 中的 Y-M 单元包含以下结构：

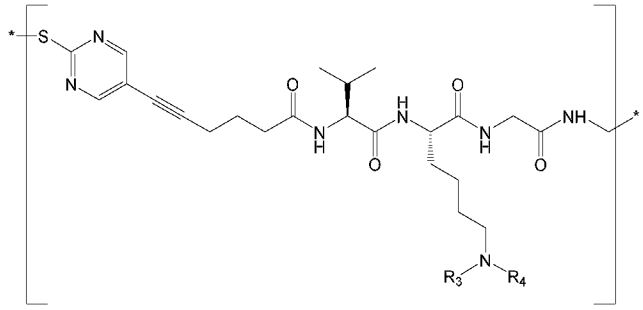

，

且优选地，所述 Y-M 单元与如下 Z 单元连接：


或

。

示例性连接体 L

在一些优选的实施方案中，本发明式(I)中的 L 为包含如下结构的连接体：



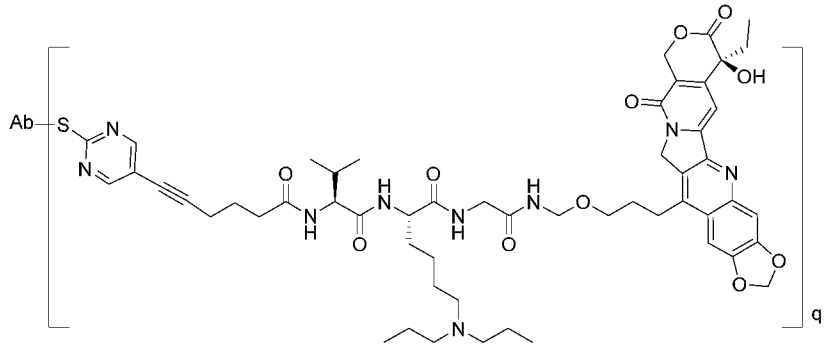
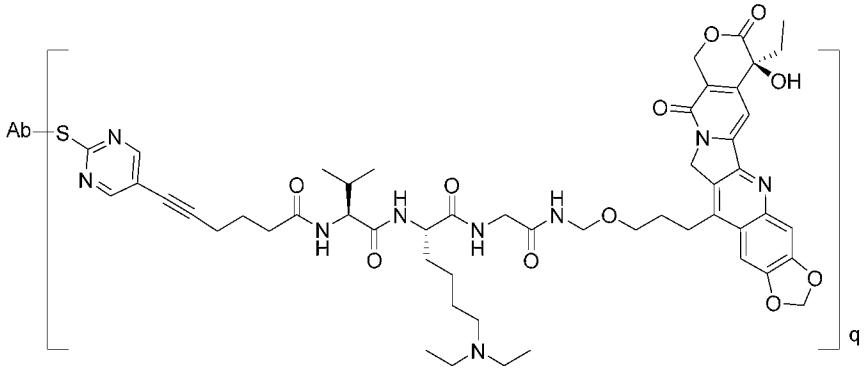
其中，R_3 和 R_4 各自独立地选自甲基、乙基、丙基。

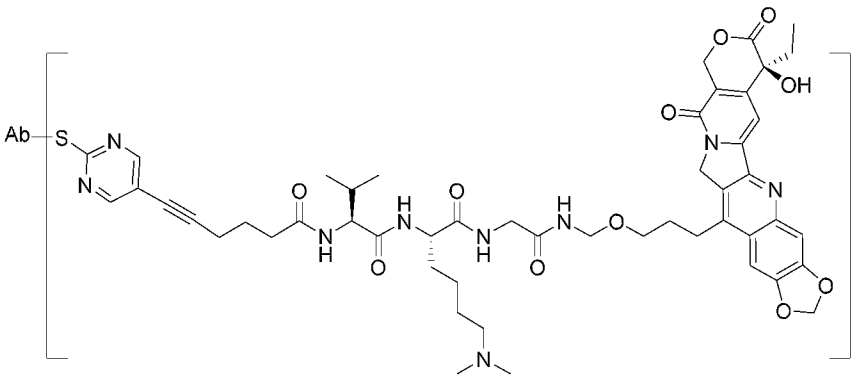
在一些更优选的实施方案中， R_3 和 R_4 均为甲基；或 R_3 和 R_4 均为乙基；或 R_3 和 R_4 均为丙基。

在一些实施方案中，本发明式 I 的 L-D 单元通过与 Ab 的轻链和/或重链的自由半胱氨酸的巯基形成硫醚键，从而与抗体连接。

示例性 ADC 偶联物

在一些实施方案中，本发明提供了具有以下结构的 ADC 偶联物或其可药用盐或溶剂化物：


或

或



其中，q 表示 1-20 的平均 DAR 值，例如大约 2、3、4、6 和 8 的平均 DAR 值。

在一些实施方案中，根据本发明的 ADC 具有至少一项或多项以下优点：
-相对于 ADC 的血液循环中分布，显著地促进 ADC 向肿瘤环境的分布和富集；
-有效地限制了有效载荷在血浆中的过早释放，具有较高的血液循环稳定性，
-能在肿瘤环境中提供有效的毒性药物活性形式释放；
-赋予高效的动物体内肿瘤杀伤效果；和
-良好的动物耐受性。

在再一些实施方案中，根据本发明的 ADC 还可以具有至少一项或多项以下优点：
-毒素-连接体的加入不诱导聚集，并可以实现高的载药量， DAR 可以高达 8；和
-可接受的 PK 特性。

II. 抗体-药物偶联物制备

抗体-药物偶联物的生成可以通过本领域的技术人员已知的任何技术来完成。在一些方面，通过与抗体的氨基酸残基反应来完成药物-连接体与抗体的偶联。在一些实施方案中，应用带离去基团的杂芳基连接体 L，将药物 D 偶联到抗体的半胱氨酸残基上，以制备本发明式 I 的偶联物。在一些实施方案中，可以通过控制以还原剂例如三(2-羟乙基)膦(TCEP)处理抗体的条件，破坏抗体的链间二硫键并暴露自由巯基用于与杂芳基连接体-药物偶联。对于 IgG1 型抗体，至多可以还原四个链接二硫键，从而生成至多 8 个反应性巯基基团用于偶联。通过此方法制备的偶联物可以在每个抗体分子中含有零个、一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个药物。

在制备的偶联物是具有不同药物偶联位点和/或个数的偶联物的组合物时，偶联物的载药量由平均 DAR 表示，其为平均每抗体的药物分子数。可以通过常规手段，例如质谱、ELISA 测定和 HPLC，表征制备产生的抗体-药物偶联物组合物的平均每抗体的药物数。在另一些实施方案中，也可以确定抗体-药物偶联物以 q 表示的定量分布。可以通过如反相 HPLC 或电泳等手段实现其中 q 为某一值的同质抗体-药物偶联物与具有其它载药量的抗体-药物偶联物的分离、纯化和表征。

因此，在本发明的一个方面，q 表示偶联在一个单独的抗体(Ab)上的药物-连接体(L-D)部分的数目，并且优选为 1 至 16、1 至 12、1 至 10、或 1 至 8 的整数。在此情况下，单独的 ADC 偶联物也可称为 ADC 化合物。在任何本文的实施方式中，在根据本发明的 ADC 化合物上，可以有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 个药物连接体部分偶联到一个单独的抗体上。

在本发明的另一个方面，q 表示制备的偶联物组合物的平均 DAR。在此情况下中，q 可以为在 1 至约 16、1 至约 12、1 至约 10、或 1 至约 8、2 至约 16、2 至约 12、2 至约 10、或 2 至约 8 的范围内的整数或小数。在一些方面，q 表示约 3 的平均 DAR。在一些方面，q 表示约 6 的平均 DAR。在一些方面，q 表示约 8 的平均 DAR。

III. 药物组合物

在一些实施方案中，本发明提供包含本文所述的任何 ADC 或其可药用盐或溶剂化物的组合物，优选地组合物为药物组合物或药物制剂。在一个实施方案中，所述组合物还包含药用辅料。在一个实施方案中，组合物，例如，药物组合物，包含本发明的 ADC 或其可药用盐或溶剂化物以及一种或多种其它治疗剂的组合。

本发明还包括包含本发明的ADC或其可药用盐或溶剂化物的组合物(包括药物组合物)。这些组合物还可以包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。

如本文所用，“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。

对于药用辅料的使用及其用途，亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”, 第八版，R.C.Rowe,P.J.Seskey 和 S.C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。

本发明的组合物可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型，如液态溶液剂(例如，可注射用溶液剂和可输注溶液剂)、散剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。

可以通过将具有所需纯度的本发明的 ADC 或其可药用盐或溶剂化物与一种或多种任选的药用辅料混合来制备包含本文所述的 ADC 的药物，优选地以冻干制剂或水溶液的形式。

本发明的药物组合物或制剂还可以包含超过一种活性成分，所述活性成分是被治疗的特定适应证所需的，优选具有不会不利地彼此影响的互补活性的那些活性成分。例如，理想的是还提供其它治疗剂，包括化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂）等。所述活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质，所述基质呈成形物品，例如薄膜或微囊形式。

IV. 药物组合和药盒

在一些实施方案中，本发明还提供了药物组合或药物组合产品，其包含本发明的或其可药用盐或溶剂化物以及一种或多种其它治疗剂。

本发明的另一个目的是提供一种成套药盒，其包含本发明的药物组合，优选地所述药盒为药物剂量单元形式。由此可以依据给药方案或药物施用间隔提供剂量单元。

在一个实施方案中，本发明的成套药盒在同一包装内包含：
- 含有包含本发明的 ADC 或其可药用盐或溶剂化物的药物组合物的第一容器；
- 含有包含其它治疗剂的药物组合物的第二容器。

根据待治疗的疾病以及个体状况等因素，本领域技术人员可以确定组合成品之各组分的施用方式和施用顺序。本发明的组合产品可用于本发明的治疗方法中。在一些实施方案中，本发明提供组合产品，其中所述其它治疗剂为例如有效刺激免疫反应从而进一步增强、刺激或上调受试者的免疫反应的治疗剂如抗体。在一些实施方案中，所述组合产品用于预防或治疗 TF 阳性肿瘤。

本发明的抗 TF 抗体

通过筛选具有序列独特性和高抗原结合特异性的抗体序列；并进一步通过对所获抗体的性质，包括亲和力、内吞活性、信号通路阻断、凝血影响、稳定性、药代动力学等进行评价，本发明人鉴定了具有优良性质的根据本发明的人源化抗 TF 单克隆抗体。本发明的抗体不仅对 TF 阳性肿瘤细胞展示出高结合亲和力和高特异性，能够快速有效地被肿瘤细胞内吞，且对 TF 介导的凝血影响小，因此不仅适宜单独或与其他抗癌药物组合用于癌症治疗、也适宜作为分子组件用于形成靶向癌症组织的新抗癌分子。

因此，在一些方面，本发明也提供了具有多种优良性质的人源化抗 TF 单克隆抗体、其编码核酸、包含所述核酸的载体和宿主细胞、以及包含所述抗体的免疫缀合物、多特异性抗体、药物组合物和用途。

I. 本发明抗体及其性质

以下就本发明的抗 TF 抗体及其性质进行详述描述。如本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，否则在此部分中述及的任何抗体技术特征（包括，结构特征和性质特征）及其任何组合，也同样适用于作为本发明 ADC 偶联物的 Ab 单元的本发明抗体。

本发明的抗 TF 抗体

本发明提供特异性地结合 TF ，优选人 TF 蛋白质的抗体或其抗原结合片段，尤其是人源化抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，本发明提供抗 TF 抗体或其抗原结合片段，其包含：

（i）如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列，或者

（ii）如 SEQ ID NO:3 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:4 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列，或者

（iii）如 SEQ ID NO:5 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:6 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列，或者

（iv）如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列，或者

(v) (i)-(iv)任一项的 CDR 组合的变体，优选地，所述变体在 6 个 CDR 区上共包含 1-10 个氨基酸改变(包括但不限于，插入、缺失和/或取代，优选氨基酸取代，优选保守取代)，且优选地重链 CDR3 保持不变。

优选地，上述 CDR 根据 Kabat 或 IMGT 或其组合进行定义，更优选地，根据 IMGT 定义。但也可以采用本领域已知的任何其他方式定义所述的 CDR。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，其中：

（i）根据 Chothia 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列或由其组成；或者

（ii）根据 AbM 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iii）根据 Kabat 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iv）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID

NO:19 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，其中：

（i）根据 Chothia 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:46 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:47 的氨基酸序列或由其组成；或者

（ii）根据 AbM 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:48 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iii）根据 Kabat 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iv）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:56 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，其中：

（i）根据 Chothia 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:58 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:69 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:70 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:71 的氨基酸序列或由其组成；或者

（ii）根据 AbM 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:61 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:72 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:73 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:74 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iii）根据 Kabat 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:63 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:64 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:75 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:76 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:77 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iv）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:66 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:67 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:68 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:78 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:79 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:80 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，其中：

（i）根据 Chothia 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:81 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:82 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:83 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:93 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:94 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:95 的氨基酸序列或由其组成；或者

（ii）根据 AbM 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:84 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:85 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:86 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:96 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:97 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:98 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iii）根据 Kabat 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:87 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:89 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:99 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:100 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:101 的氨基酸序列或由其组成；或者

（iv）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:90 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:91 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:92 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:102 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:103 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:104 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区包含：

（i）SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（ii）SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（iii）SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，

（iv）SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中：所述述轻链可变区包含：

（i）SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（ii）SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（iii）SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，

（iv）SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含：

（i）SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（ii）SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，

和/或其中所述轻链可变区包含：

（i）SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（ii）SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区包含：

（i）SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（ii）SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，

和/或其中所述轻链可变区包含：

（i）SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，或者

（ii）SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一些优选的实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 1 所述的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，且其中所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。优选地，所述抗体或抗原结合片段包含 SEQ ID No:1 的重链可变区和 SEQ ID No:2 的轻链可变区。

在一些优选的实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 3 所述的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，且其中所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。优选地，所述抗体或抗原结合片段包含 SEQ ID No:3 的重链可变区和 SEQ ID No:4 的轻链可变区。

在一些优选的实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 5 所述的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，且其中所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列、或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。优选地，所述抗体或抗原结合片段包含 SEQ ID No:5 的重链可变区和 SEQ ID No:6 的轻链可变区。

在一些优选的实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO:7 所述的氨基酸序列或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列，且其中所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列、或与其具有至少

95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。优选地，所述抗体或抗原结合片段包含 SEQ ID No:7 的重链可变区和 SEQ ID No:8 的轻链可变区。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段包含本发明示例性抗体 2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1 和 27H8H3-hz1 之任一的重链和轻链可变区序列或其变体，例如，具有与所述示例性抗体之一相同的 CDR 序列，并具有相同或不同的构架区序列的抗体。优选地，所述抗体为人源化抗体。更优选地，所述抗体的重链可变区具有来源于人种系的构架区序列。

根据本发明的抗体可以包含重链恒定区和/或轻链恒定区。优选地，所述重链恒定区为来源于人免疫球蛋白的重链恒定区。优选地，所述轻链恒定区为来源于人免疫球蛋白的轻链恒定区。包含在本发明抗体中的重链恒定区可以为任何同种型或亚型，例如 IgG1, IgG2，IgG3 或 IgG4 同种型的重链恒定区。在一些实施方案中，因此，本发明提供了抗 TF 抗体，其包含 IgG1, IgG2，IgG3 或 IgG4 重链恒定区，优选地 IgG1 重链恒定区，尤其是人 IgG1 重链恒定区，例如 SEQ ID NO: 106 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。包含在本发明抗体中的轻链恒定区可以为 κ 轻链恒定区或 λ 轻链恒定区。在一些实施方案中，因此，本发明提供了包含 κ 轻链恒定区或 λ 轻链恒定区的抗 TF 抗体，优选地本发明抗体包含人 κ 轻链恒定区，例如，SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，本发明抗 TF 抗体或其片段的重链和/或轻链还包含信号肽序列。

在一些方面，本发明也提供在本文中所述及的根据本发明的任何抗体的变体，尤其是本发明示例性抗体 2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1 和 27H8H3-hz1 之任一的变体。

在本文中，与抗体相关的术语“变体”指，与给定的亲本抗体相比，包含已经通过至少 1 个，例如 1-30，或 1-20 或 1-10 个，例如 1 或 2 或 3 或 4 或 5 个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的目标抗体区域的抗体，其中变体基本上保持亲本抗体分子的至少一个生物学特性(例如，抗原结合能力)。目标抗体区域可以是抗体全长、或重链可变区或轻链可变区或其组合、或(一个或多个)重链 CDR 区或(一个或多个)轻链 CDR 区或其组合。本发明的具体示例性抗体的此类变体，在本发明的考虑中。

在一些实施方案中，本发明的抗体变体优选保持引入改变或修饰前的亲本抗体的至少 60%, 70%, 80%, 90%, 或 100%的生物学活性(例如，基本相同的抗原结合能力和/或受体内吞活性，或对凝血的影响程度基本相同)。可以理解的，根据本发明的抗体的重链可变区或轻链可变区或各个 CDR 区或构架区，均可以单独改变或组合改变，以产生本发明的抗体变体。此外，也可以对根据本发明的抗体的 Fc 区进行改变。Fc 区的改变可以单独进行，或与构架区和/或 CDR 区和/或重链可变区和/或轻链可变区上的改变相组合。可以根据抗体分子的具体应用，选择性改变 Fc 区，以例如赋予抗体的一种或多种改变的效应子功能，例如改变的血清半衰期，补体固定、Fc 受体结合、和/或抗原依赖性细胞毒性。此外，还可以对本发明抗体进行化学修饰(例如，与 PEG 连接)或改变其糖基化模式。

在一些实施方案中，相对于本发明示例性抗体之任一，根据本发明的抗体变体在重链序列和/或轻链序列上具有氨基酸改变。优选地，所述变体在重链序列或轻链序列或两者上，与对应的抗体相比，包含至少一个，两个或三个，但不超过 20 个，10 个或 5 个氨基酸改变的氨基酸序列，或具有至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。优选地，氨基酸改变不发生在 CDR 区，更优选地不发生在可变区。在一些实施方案中，包含在抗体变体中的至少一些或全部氨基酸改变为保守氨基酸取代。“保守性取代”是指导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸的氨基酸改变。可以通过本领域已知的标准方法，例如定点诱变和 PCR 介导的诱变，将氨基酸修饰如取代引入本发明的抗体中，以实现保守性取代。

在再一些方面，本发明也提供，相对于前述根据本发明的任何给定抗体(尤其是本发明示例性抗体

2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1 和 27H8H3-hz1 之任一)，具有以下一个或多个特性的抗组织因子(TF)抗体或其抗原结合片段：(i)与根据本发明的给定抗体结合相同或重叠的表位；(ii) 与根据本发明的给定抗体竞争结合人组织因子 TF；(iii) 抑制(例如，竞争性抑制)根据本发明的给定抗体与细胞表面表达人组织因子的细胞的结合；且优选地，与根据本发明的给定抗体显示相同或相似的结合亲和力和/或特异性。

在本文中，与给定抗体"竞争结合 TF 抗原"的抗体是指这样的抗体，所述抗体在竞争检验中阻断给定抗体与抗原 TF 结合的 50%或更多，并且反过来，给定抗体在竞争检验中也阻断该抗体与抗原 TF 结合的 50%或更多。示例性竞争检验描述于："Antibodies", Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)。竞争结合的抗体可以与给定抗体结合相同的表位区，例如相同表位、相邻表位或重叠表位。

在本文中，抑制（例如竞争性抑制）给定抗体与其抗原的结合的抗体是指这样的抗体，其抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述给定抗体与其抗原的结合；并且反过来，所述给定抗体也抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。抗体与其抗原的结合可以使用结合亲和力衡量。测定亲和力的方法是本领域已知的。

在本文中，与给定抗体显示相同或相似的结合亲和力和/或特异性的抗体是指这样的抗体，其能够具有给定抗体的至少 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的结合亲和力和/或特异性。这可以通过本领域已知的任何测定结合亲和力和/或特异性的方法进行测定。

在一些实施方案中，根据本发明的抗体是 IgG1 抗体，更特别地 IgG1κ 或 IgG1λ 同种型。再优选地，根据本发明的 IgG1 抗体具有人 IgG1 恒定区，更优选地具有人 IgG1κ 同种型。

本发明抗 TF 抗体的特性

本发明抗 TF 抗体具有以下一个或多个特性：
（i）以高亲和力与人 TF 胞外域结合；
（ii）以高亲和力与 TF 阳性肿瘤细胞结合；
（iii）具有与食蟹猴 TF 的交叉反应性；
（iv）具有 TF 受体介导的内吞活性；
（v）阻断 TF 阳性细胞中由 TF/FVIIa 复合物介导的下游信号通路；和
（vi）基本不影响由细胞表面 TF 起始的凝血或具有降低的凝血影响。

在一些方面，本发明的抗体对 TF 具有高结合亲和力和高结合特异性。可以通过 FACS 或 ELSA 测定(例如实施例中所述的测定)，确定本发明抗体对 TF 胞外域和/或对 TF 阳性肿瘤细胞的结合 EC50 值。或者，可以通过生物膜层干涉技术测定抗体的结合动力学参数，以表征抗体的结合亲和力和特异性。在一些实施方案中，通过生物膜层干涉技术(BIL)测定，本发明抗 TF 抗体具有小于 10^{-7}M 的 K_D值，例如大约 10^{-8}M 或更小的 K_D 值，优选地，小于 5×10^{-8}M。在另一些实施方案中，通过生物膜层干涉技术(BIL)测定，本发明抗体具有大约 10^{-1} 至 $10^{-3}s^{-1}$ 的 K_d值，例如大约 10^{-2} 或大约 $10^{-3}s^{-1}$ 的 K_d 值。优选地，采用实施例描述的 ForteBio 测定方法，确定抗体的结合动力学参数，例如 K_D 值和 K_d 值；并任选地，与在同一测定中的参照抗体进行比较。在一些实施方案中，抗体与参照抗体相比具有相同或相似，或更小的结合动力学 K_D 值。在另一些实施方案中，抗体与参照抗体相比具有相对较快的解离速率(K_d 值)。之前的研究已经显示，在一些情况下，具有较快的解离速率的抗体可以更为有效地浸润肿瘤，以利于抗体在实体肿瘤中的分布。(参见，Influence of Affinity and Antigen Internalization on the Uptake and Penetration of Anti-HER2 Antibodies in Solid Tumors; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-2277)

在一些实施方案中，本发明抗 TF 抗体与 TF 阳性肿瘤细胞强结合。可以通过细胞 ELISA 或流式细胞术测定，测定抗体的细胞结合 EC50 值（即，细胞结合的半最大有效浓度）和/或最大结合量，并与参照抗体进行比较，来反映抗体的细胞结合亲和力。在一些实施方案中，在至少一种 TF 阳性肿瘤细胞，例如 NIC-H358 细胞或 KYSE50 细胞上，本发明抗体的 EC_{50} 值为参照抗体的 EC_{50} 值的大约 50%至大约 160%，例如大约 80%、大约 90%、大约 100%、大约 110%、大约 120%或大约 130%。

在一些实施方案中，本发明抗 TF 抗体表现出对人和猴 TF 的交叉反应性。在一些实施方案中，本发明抗体与人 TF 结合的 K_D 值，与所述抗体与猴 TF 结合的 K_D 值大约相当，例如，两者之 K_D 比值在 1-10 之间，例如 1-5 之间，更优选地大约 1-3 之间。在再一些实施方案中，所述抗体与人 TF 结合的 K_d 值，与所述抗体与猴 TF 结合的 K_d 值大约相当，例如，两者的 K_d 比值在 1-10 之间，例如 1-5 之间，更优选地大约 1-3 之间。

在一些实施方案中，本发明抗体具有 TF 受体介导的内吞活性。可以在基于细胞的测定试验中，如在实施例所述的测定试验中，进行抗体的内吞活性评价。在一些实施方案中，在基于 TF 阳性细胞的测定试验中，将待测抗体与 TF 阳性细胞（尤其是 TF 阳性肿瘤细胞）在 37℃孵育一段时间（例如，2 小时或 4 小时）后，相对于保持在 4℃相同时间的阴性对照，通过流式细胞术，荧光检测细胞表面结合的 TF 抗体量的变化，以确定抗体的内吞率。在一些实施方案中，与参照抗体相比，本发明抗体具有基本相当或更优的内吞率。在另一些实施方案中，在等同的测定条件下，本发明抗体的内吞率是参考抗体的内吞率的大约 50%-200%或更高，例如，大约 70%或以上，例如大约 80%或以上，优选地大约 100%或以上，或大约 110%或以上，更优选地大约 120%或以上，例如大约 130%或以上，大约 150%或以上，或大约 200%或以上。在再一些实施方案中，与参照抗体相比，本发明抗体表现出更快速的内吞，例如，在更短的时间达到大约 30%、40%或 50%内吞。在再一些实施方案中，在如实施例中所述的内吞活性评价测定试验中，本发明抗体的内吞率为，例如，在 37℃ 2 小时孵育后，至少 10%，例如，15-20%，优选地，至少 25%，例如 20-35%，再优选地 35%以上，例如大约 40%或 45%或以上。

在一些实施方案中，本发明抗体基本上不影响凝血，或具有降低的凝血影响。可以通过基于细胞的体外凝血测定试验，检测在 Ca^{2+}离子和人血浆存在下，抗体对 TF 阳性细胞起始的凝血的干扰作用，确定抗体对凝血的影响。在一些实施方案中，相比于无抗体的阴性对照，本发明抗体基本不影响由细胞表面 TF 起始的凝血；或相比于参照抗体，具有降低的凝血影响。可以相对于无抗体的阴性对照和/或参照抗体，检测抗体引起的凝血时间的变化，由此反映抗体对凝血的影响。优选地，按照实施例所述凝血测定试验，检测在包含 TF 阳性细胞以及高或低浓度的游离 Ca^{2+}离子和待测抗体的溶液中加入人血浆后，405nm 吸光度随时间的变化，估计达半最大 OD405 吸光值所需的凝血时间(V50)，以表征抗体对 TF 介导的凝血过程的影响。用于检测的 Ca^{2+}离子浓度可以为选自 1-5mM 的一个或多个浓度，例如，2mM 和 5mM。用于检测的抗体浓度可以为选自 10-50μg/ml 的一个或多个浓度，例如，20μg/ml 和 50μg/ml。在一些实施方案中，在 5mM Ca^{2+}和 20μg/ml 抗体存在下测定抗体对凝血的影响。在另一些实施方案中，在 2mM Ca^{2+}和 50μg/ml 抗体存在下测定抗体对凝血的影响。在一些实施方案中，如果在至少一个测定条件下，例如在 5mM Ca^{2+}和 20ug/ml 抗体存在下，相对于无抗体的阴性对照，抗体引起的凝血时间(V50)延迟不超过 50 秒，优选地不超过 40 秒、不超过 30 秒、不超过 20 秒、10 秒、或 5 秒，则可以认为所述抗体基本不影响凝血，或具有降低的凝血影响。在另一些实施方案中，如果在至少一个测定条件下，例如在 5mM Ca^{2+}和 20ug/ml 抗体存在下，相对于参照抗体，抗体不引起凝血时间(V50)延迟，或优选地，凝血时间(V50)减少大约 10%或以上，或更优选地大约 20%或 30%或 40%或以上，再优选大约 50%或 60%或以上，则可以认为所述抗体基本不影响凝血或具有降低的凝血影响。在再一些实施方案中，如果在至少一个测定条件下，例如在 2mM Ca^{2+}和 50ug/ml 抗体存在下，相对于参照抗体，抗体不引起凝血时间(V50)延迟，或优选地，凝血时间(V50)减少大约 10%、20%、或 30%或以上，则可以认为所述抗体基本不影响凝血，或具有降低的凝血影响。

在再一些实施方案中，本发明抗体具有阻断 TF 阳性肿瘤细胞中由 TF/FVIIa 复合物介导的下游信号通路的能力。可以通过检测由该通路激活导致的 IL-8 释放水平，确定抗 TF 抗体对该 TF 下游信号通路的阻断活性。在一些实施方案中，按照实施例所述的信号通路阻断活性评价试验，本发明的抗体对 TF 信号通路显示抑制作用。在一些实施方案中，本发明抗体的 TF 信号通路阻断活性 IC_{50} 值小于 500ng/ml 或 150ng/ml，且最大抑制率达到 90%以上，优选地 95%以上。在一些实施方案中，本发明抗体的 TF 信号通路阻断活性 IC_{50} 值，与参照抗体相当（±10%）或更小。

在再一些实施方案中，本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段还具有以下一个或多个特性：(vii) 良好的生产性能；(viii) 良好的稳定性；和(ix)有利的药代动力学性质。

在一些实施方案中，在采用蛋白 A 亲和层析从重组哺乳动物细胞产生的抗体产物中一步纯化后，根据 SEC-HPLC 测定，纯化的本发明抗体可以达到 90%以上的纯度；且在 HIC 测定中，表现出良好的亲水性。

在再一些实施方案中，本发明抗体具有良好的稳定性，包括热稳定性和反复冻融稳定性。在一些实施方案中，按实施例的加速稳定性测定，在 37℃放置 3-14 天后，本发明抗体的 SEC-HPLC 纯度（即，SEC-HPCL 测定的抗体单体百分数）均保持在 90%以上或优选地 95%以上，或降低不超过 5%或优选地不超过 3%；在另一些实施方案中，CE-SDS 非还原纯度（即，主峰百分数）均保持在 85%以上或优选地 90%以上，CE-SDS 还原纯度（即，LC+HC 百分数）在 90%或优选地 95%以上，或所述非还原纯度和还原纯度的降低均不超过 5%或 4%。在再一些实施方案中，按实施例的反复冻融测定，在反复冻融 4-8 次后，本发明抗体的 SEC 纯度均保持在 95%以上，或纯度降低不超过 5%或优选地不超过 3%。

在再一些实施方案中，本发明抗体具有血清稳定性。可以按实施例的血清稳定性测定试验，测定抗体在血清中 37℃孵育一段时间后对 TF 抗原的亲和力变化，确定抗体的血清稳定性。如果所述亲和力的变化不显著，则可以认为抗体具有血清稳定性。在一些实施方案中，本发明抗体可以在人血清中保持至少 14 天，其抗原结合亲和力保留 90%或以上。

II. 多核苷酸、载体和宿主

再一方面，本发明提供编码以上任何抗 TF 抗体或其片段的核酸。还提供包含所述核酸的载体；和包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。

在一些实施方案中，本发明提供包含如下多核苷酸的核酸分子，所述多核苷酸编码来自上文所述的结合 TF 的抗体的重链 VH 或轻链 VL 序列的至少一个 CDR 区和通常全部三个 CDR 区。在一些进一步的实施方案中，本发明提供包含编码上文所述的抗 TF 抗体的重链和/或轻链的完整或基本上完整可变区序列的多核苷酸的核酸分子。如本领域技术人员明了的，因为密码子简并性，每一个抗体或多肽氨基酸序列可以由多种核酸序列编码。

在一个实施方案中，本发明提供包含本发明核酸的一个或多个载体，包括克隆载体和表达载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。可用于本发明的载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

在一个实施方案中，本发明提供包含本发明载体的宿主细胞。用于克隆或表达编码抗体的载体的适当宿主细胞包括原核或真核细胞。例如，抗体可在细菌中产生，特别当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。在细菌例如大肠杆菌中表达后，抗体可以从可溶级分中的细菌细胞糊状物分离，并且可以进一步纯化。在再一个实施方案中，宿主细胞是真核细胞。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例包括，用 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚肾系(293HEK 或 293 细胞)；中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞，包括 DHFR- CHO 细胞；以及骨髓瘤细胞系如 Y0，NS0 和 Sp2/0。

III. 抗体的制备

在再一方面，本发明提供了制备本发明抗 TF 抗体的方法。

在一个实施方案中，本发明的方法包括，在适合抗体表达的条件下，培养包含编码本发明抗体的核酸的宿主细胞，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。为了重组产生抗 TF 抗体，可以将分离的或人工合成的或重组合成的编码抗体(例如上文所描述的抗体)的核酸，插入一个或多个载体，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。

在再一个实施方案中，本发明体也提供具有以下一个或多个特性的抗 TF 抗体或其抗原结合片段、及其制备方法：

(i) 与根据本发明的任一抗体结合相同或重叠的表位；

(ii) 与根据本发明的任一抗体竞争结合人 TF；

(iii) 抑制(例如，竞争性抑制)根据本发明的任一抗体与细胞表面表达人 TF 的细胞的结合；

其中，所述根据本发明的抗体尤其是抗体 2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1 或 27H8H3-hz1，

优选地，所述制备方法包括：利用根据本发明的抗体作为参照，在结合亲和力测定试验中，从抗体混合物中筛选具有上述特性的抗体。在此可以使用的抗体混合物包括，但不限于，来自 TF 免疫动物的抗血清、或为酵母或哺乳动物展示抗体文库。

IV. 测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的抗 TF 抗体进行鉴定，筛选，或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

可用于确定抗体与 TF 抗原的结合的适宜方法是本领域已知的。例如，可以使用本领域技术人员已知的常规技术，容易地确定抗体对包含 TF 胞外域的蛋白（例如融合蛋白）或 TF 阳性肿瘤细胞的亲和力。所述方法包括但不限于，采用 ELISA 的测定试验；使用 BIAcore 2000 仪器或 ForteBio Octet® 仪器的测定方法；或通过使用经放射性标记的靶抗原的放射免疫测定试验；或本申请实施例中描述的细胞 ELISA 或 FACS 技术或生物膜层干涉技术。在本文中，优选地，亲和力参数的测量按照或基本上按照实施例中描述的方式进行。

适用于测定抗体的内吞活性的方法是本领域已知的。例如，可以在基于细胞的测定中，尤其是基于 TF 阳性肿瘤细胞的测定中，确定抗体在与所述细胞表面结合后的内吞率。在本文中，优选地，抗体的内吞活性按照或基本上按照实施例中描述的方式进行。

适用于测定抗体对凝血的影响的方法是本领域已知的。例如，可以相对于对照（例如阴性对照或阳性对照），测定在抗体存在时凝血参数例如凝血时间的变化，来反映抗体的凝血影响。在本文中，优选地，抗体对凝血的影响，按照或基本上按照实施例中描述的方式进行。

V. 免疫缀合物和免疫融合物

再一方面，本发明提供通过将本发明抗体融合或缀合于异源分子而产生的免疫融合物或免疫缀合物。

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

在一个实施方案中，在免疫缀合物中，本发明的抗体(或其抗原结合片段)与治疗剂或诊断剂或可检测剂缀合。在一些实施方案中，本发明抗体可以以全长抗体或抗体片段的形式与异源分子缀合。在缀合物中，可以使用接头来共价连接缀合物的不同实体。适宜的接头包括化学接头或肽接头。有利地的是，接头是利于多肽在递送至靶位点后释放的“可裂解接头”。例如，可以使用酸不稳定性接头、肽酶敏感性接头、光不稳定性接头、二甲基接头或含二硫化物的接头。

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

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

VI. 多特异性抗体

在再一方面，本发明提供特异性地结合 TF 的多特异性（包括双特异性）抗体分子。在一个实施方案

中，在多特异性抗体中，本发明的抗体(或其抗原结合片段)形成针对 TF 的第一结合特异性。在再一实施方案中，所述多特异性抗体还包含第二结合特异性、或还包含针对两种不同分子的第二和第三结合特异性。所述的第二、第三结合特异性例如可以针对肿瘤细胞表面上表达的另一抗原、或针对 T 细胞表面表达的抗原。

在此类多特异性分子中，结合特异性优选由抗体的“结合位点”或“抗原结合位点”（抗体分子中与抗原实际结合的区域）提供。更优选地，抗原结合位点由抗体轻链可变结构域(VL)和抗体重链可变结构域(VH)组成的 VH/VL 对构成。

VII. 药物组合物和药物制剂

本发明还提供，包含抗 TF 抗体或其免疫缀合物/融合物或多特异性抗体的组合物(包括药物组合物或药物制剂)和包含编码抗 TF 抗体或其免疫缀合物/融合物或多特异性抗体的多核苷酸的组合物。这些组合物还可以任选地包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。对于赋形剂的使用及其用途，可参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，第五版，R.C.Rowe, P.J.Seskey 和 S.C.Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。在一些实施方案中，可以通过将具有所需纯度的本发明的抗 TF 抗体、免疫缀合物或多特异性抗体，与一种或多种任选的药用辅料(Remington′ s Pharmaceutical Sciences，第 16 版，Osol，A. 编(1980)) 混合，来制备包含本发明的药物制剂。

在本发明的药物组合物和药物制剂中，本发明的抗体可以是唯一的活性剂，或可以与其它治疗剂联合。可以与本发明抗体联合的治疗剂包括但不限于对于待治疗的疾病和/或病症具有有益治疗功效的治疗剂。例如，所述活性成分可以是被治疗的特定适应症所需的，优选具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些活性成分。例如，可以提供抗癌活性的其它药物成分。本发明抗体与活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在于药物组合物和药物制剂中。

VIII. 组合产品

在再一方面，本发明还提供了组合产品，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段、多特异性抗体或免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂（例如化疗剂、其他抗体、细胞毒性剂、抗肿瘤药等）。构成组合产品的各组分，例如本发明抗体与其他治疗剂，可以分别配制在不同的制剂中，并优选地容纳在不同的容器中。根据待治疗的疾病以及个体状况等因素，本领域技术人员可以确定组合成品之各组分的施用方式和施用顺序。本发明的组合产品可用于本发明的治疗方法中。在一些实施方案中，本发明提供组合产品，其中所述其它治疗剂为例如有效刺激免疫反应从而进一步增强、刺激或上调受试者的免疫反应的治疗剂如抗体。在一些实施方案中，所述组合产品用于预防或治疗 TF 阳性肿瘤。

IX. 方法和用途

在一方面，本发明提供应用本发明 TF 抗体或其抗原结合片段的方法和用途，例如，体内和体外用于：

(1) 靶向性结合 TF 阳性肿瘤细胞; 和/或

(2) 阻断 TF 阳性肿瘤细胞中由 TF/VIIa 介导的下游信号通路，以及

(3) 抑制和/或杀伤 TF 阳性肿瘤细胞。

在一些实施方案中，本发明的方法和用途涉及在受试者个体的疾病治疗。在另一些实施方案中，本发明的方法和用途涉及在来自例如受试者的样品中检测 TF 的存在。在再一些实施方案中，本发明也提供本发明抗 TF 抗体或其抗原结合片段在制备用于上述用途的产品(例如药物组合物或药物产品或组合产品或检测产品)中的用途。

在一个方面，本发明提供了应用本发明抗体或抗原结合片段在受试者中预防和/或治疗 TF 阳性肿瘤的方法和用途，包括以预防和/或治疗有效量施用本发明的抗体或抗原结合片段。在另一方面，本发明也提供了应用本发明抗体或抗原结合片段在受试者中治疗或预防与细胞膜 TF 表达上升相关的其他疾病的方法和用途，包括向有需要的受试者施用本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段。

在再一方面，本发明提供了检测样品中 TF 的方法和试剂盒，其中所述方法包括：(a)将所述样品与本

发明抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物/融合物接触；和(b)检测所述抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物和 TF 蛋白之间复合物的形成。在一些实施方案中，样品来自癌症患者。所述检测可以是体外的或体内的。

术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测，示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术(例如，FACS)、抗体分子复合的磁珠、ELISA 测定法、PCR-技术(例如，RT-PCR)。在某些实施方案中，生物样品是血、血清或生物来源的其他液体样品。在某些实施方案中，生物样品包含细胞或组织。在一些实施方案中，生物样品来自过度增生性或癌性病灶。在某些实施方案中，待检测的 TF 是人 TF。

在一个实施方案中，抗 TF 抗体被用于选择适合利用抗 TF 抗体治疗的受试者。在再一个实施方案中，可以使用本发明抗体诊断癌症或肿瘤，例如评价(例如监测)受试者中本文所述疾病(例如，过度增生性或癌性疾病)的治疗或进展、其诊断和/或分期。

在某些实施方案中，提供标记的抗 TF 抗体。标记包括但不限于，被直接检测的标记或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记)，以及被间接检测的部分，如酶或配体，例如，通过酶促反应或分子相互作用。示例性标记包括但不限于，放射性同位素 32P、14C、125I、3H 和 131I，荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物，罗丹明及其衍生物，丹酰(dansyl)，伞形酮(umbelliferone)，荧光素酶(luceriferase)，例如，萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利号 4,737,456)，荧光素，2，3-二氢酞嗪二酮，辣根过氧化物酶(HR)，碱性磷酸酶，β-半乳糖苷酶，葡糖淀粉酶，溶解酶，糖类氧化酶，例如，葡萄糖氧化酶，半乳糖氧化酶，和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，以及利用过氧化氢氧化染料前体的酶如 HR，乳过氧化物酶，或微过氧化物酶(microperoxidase)，生物素/亲和素，自旋标记，噬菌体标记，稳定的自由基，等等。

本发明的治疗方法和用途

基于本发明抗 TF 抗体或本发明 ADC 对于 TF 的良好靶向性以及上述优良性质，本发明也提供了本发明 ADC 和本发明抗体在 TF 相关疾病治疗和预防中的应用和方法。

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

在再一个方面，本发明也提供了在受试者中预防或治疗 TF 阳性肿瘤的方法，包括向有需要的受试者施用本发明的 ADC 或其可药用盐或溶剂化物、或向有需要的受试者施用本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段。

适用于本发明方法和应用的 TF 阳性肿瘤可以选自：骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)、急性成淋巴细胞白血病、慢性成淋巴细胞白血病、急性髓性白血病(AML)和非霍奇金淋巴瘤、中枢神经系统肿瘤、神经胶质瘤、脑癌、头颈癌，如头颈鳞状细胞癌、胃肠道癌症、泌尿生殖系统癌症、肺癌如 NSCLC、食道癌、胃癌、肝胆癌、胰腺癌、结直肠癌、直肠癌、膀胱癌、肾癌、乳腺癌，尤其是三阴性乳腺癌、前列腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、黑素瘤、肉瘤、和皮肤癌。

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

在一些实施方案中，根据本发明方法治疗的 TF 阳性肿瘤选自：宫颈癌、胰腺癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、头颈癌、胃癌，包括原发性或晚期或转移性癌症。在再一个实施方案中，所述 TF 阳性肿瘤是宫颈癌。在另一个实施方案中，所述 TF 阳性肿瘤是非小细胞肺癌。在再一实施方案中，所述 TF 阳性肿瘤是食道鳞状细胞癌。在再一实施方案中，所述 TF 阳性肿瘤是乳腺癌。

在一些实施方案中，根据本发明方法治疗的 TF 阳性肿瘤具有至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%的 TF 阳性细胞。 可以通过免疫组织化学，评估肿瘤活检物上的组织因子表达水平。已经在多种癌症活检物上检测到高的 TF 阳性细胞百分比，例如，宫颈癌(100%)、非小细胞肺癌(34-88%)、子宫内膜癌(14-100%)、前列腺癌(47-75%)、卵巢癌(75-100%)、食道癌(43-91%)和膀胱癌(78%)。

优选地，在一些实施方案中，根据本发明的方法用于治疗具有高百分比的 TF 阳性细胞的肿瘤，例如，具有至少 25%、50%、75%或 100%的 TF 阳性细胞的肿瘤，例如，具有范围在 25-50%至 75-100%的 TF 阳性细胞的肿瘤，例如，膀胱癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌和宫颈癌。在一些实施方案中，本发明方法在所述癌症中的应用，诱导肿瘤消退。

在再一些实施方案中，根据本发明的方法也可以用于治疗 TF 阳性细胞百分比低于 25%或 20% 的癌症。在一些实施方案中，本发明方法在所述癌症中的应用，导致肿瘤生长抑制。

在再一方面，本发明也提供了用于预防或治疗与细胞膜 TF 表达上升相关的其他疾病的方法，包括向有需要的受试者施用本发明的抗 TF 抗体或其抗原结合片段、或向有需要的受试者施用本发明的 ADC 或其可药用盐或溶剂化物。所述疾病包括但不限于，例如，良性肿瘤、神经纤维瘤、血管瘤；动脉粥样硬化；血管疾病，例如，视网膜病和黄斑变性；炎症疾病，例如类风湿性关节炎、骨关节炎、强直性脊柱炎；自身免疫炎症例如多发性硬化。

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

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

为了预防或治疗疾病，根据本发明的抗体或其结合片段和根据本发明的 ADC 或其可药用盐或溶剂化物的合适剂量(当单独或与一种或多种其他的治疗剂组合使用时)，将取决于待治疗疾病的类型、所用药物的具体类型、疾病的严重性和进程、所述药物是以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答，和主治医师的判断力。根据本发明的抗体或其结合片段和根据本发明的 ADC 或其可药用盐或溶剂化物，可以以一次治疗或经过一系列治疗施用于患者。

在一些实施方案中，在接受本发明方法治疗之前，所述受试者正在接受或已经接受过其它治疗，例如化疗治疗和/或放射疗法、或其他免疫疗法。

在上述本发明方法和应用的任何实施方案中，可以替代本发明抗体或其抗原结合部分或替代本发明的 ADC 或其可药用盐或溶剂化物，施用本发明的组合物、多特异性抗体或免疫缀合物/融合物、或组合产品。或者，在这些方法中，除了施用本发明抗体或其抗原结合部分或本发明的 ADC 或其可药用盐或溶剂化物，还可以进一步施用本发明的组合物、多特异性抗体或免疫缀合物/融合物、或组合产品。

在一些实施方案中，本发明也提供本发明的 ADC 或其可药用盐或溶剂化物在制备用于前述治疗和预防方法的药物中的用途。在另一些实施方案中，本发明也提供了，本发明抗体或抗原结合片段、组合物、免疫缀合物/融合物、多特异性抗体在制备用于前述治疗和预防方法的药物中的用途。

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

实施例

实施例 I 抗 TF 人源化抗体的制备和表征

一般方法

细胞因子抗原重组表达

人组织因子的氨基酸序列参考 Uniprot 蛋白数据库中的 P13726，其胞外段为 aa 33-aa 251；食蟹猴组织因子的氨基酸序列参考 Uniprot 蛋白数据库中的 A0A2K5VXA0，其胞外段为 aa 33 -aa 252。

以上胞外段氨基酸序列经由安徽通用公司进行密码子优化，合成于表达载体 pTT5-His 上。通过 PEImax (Polysciences，24765-1)瞬时转染 HEK293-EBNA 细胞，表达 7 天后，通过镍柱纯化，获得人 TF-his (h.TF-His)和食蟹猴 TF-his (c.TF-His)抗原。该重组表达并纯化的 TF 抗原在后续实施例中用作免疫原或用于 ELISA 测定。

基于抗原蛋白的 ELISA

用 50mM 碳酸盐包被缓冲液(CBS 包被液)中的 TF 抗原(h.TF-His 或 c.TF-His 抗原)，以包被浓度 1 ug/mL，体积 100 uL，4℃包被 ELISA 板过夜。第二天去除包被液，每孔用 300 uL PBS 洗一次，每孔加入 100 uL 在 PBS 中的 2% BSA （Biotopped，A6020），37℃封闭 2 小时。用在 PBS 中的 2% BSA 梯度稀释待测样品，建立 11 个浓度点。 取梯度稀释的样品 100 uL 加入板中，37℃孵育 2 小时；去除上清，每孔用 300 uL PBST 洗三次，每孔加入 100 uL 在 2% BSA 中的 HRP 缀合的二抗，37℃孵育 1 小时。对于来自杂交瘤的鼠源抗体，采用 HRP 标记的抗小鼠二抗（Jackson，115-035-003）；对于人源化抗体，采用 HRP 标记的抗人二抗（Jackson，109-035-088）。在孵育结束后，去除二抗，每孔用 300 uL PBST 洗五次，随后每孔加入 100 uL TMB 底物（湖州英创，TMB-S-004），显色 5-20 分钟；每孔加入 50 uL 2N HCl 终止反应，酶标仪（厂家：MD，型号：SpectraMax）读取 OD450nM 读数，导入到 GraphPad 软件进行拟合作图，确定样品对 TF 抗原蛋白的结合。

基于细胞的 ELISA

实验前一天将 TF 抗原阳性细胞（MDA-MB-231 或 NCI-H358 细胞）铺至 96 孔板中，每孔 5×10^4 细胞。实验当天去除培养上清，每孔用 300 uL PBS 洗一次，每孔加入 100 uL 4% 多聚甲醛室温固定 20 分钟。去除多聚甲醛，每孔用 300 uL PBS 洗两次，每孔加入 100 uL 在 PBS 中的 2% BSA，37℃封闭 2 小时。封闭完成后，每孔加入 30 uL 待测样品（杂交瘤上清或纯化抗体），37℃孵育 2 小时。去除液体，每孔用 300 uL PBST 洗三次；每孔加入 100 uL 在 2% BSA 中的 HRP 缀合的二抗，37℃孵育 1 小时。在待测样品为杂交瘤或鼠源抗体的情况下，采用 HRP 标记的抗小鼠二抗（Jackson，115-035-003）；在待测样品为人源化抗体的情况下，采用 HRP 标记的抗人二抗（Jackson，109-035-088）。去除二抗，每孔用 300 uL PBST 洗五次，随后每孔加入 100 uL TMB 底物(湖州英创，TMB-S-004)，显色 5-20 分钟；每孔加入 50 uL 2N HCl 终止反应，酶标仪（厂家：MD，型号：SpectraMax）读取 OD450nm 数值，确定样品对 TF 阳性细胞的结合。

SEC-HPLC 检测抗体纯度

经重组表达和纯化的抗体，采用 SEC-HPLC 检测抗体纯度。检测方法如下进行：

仪器：Waters Alliance e2695 HPLC；

色谱柱：Thermo MabPac SEC-1，5 um，7.8*300mm ；

流动相：61 mmol/L Na_2HPO_4，39 mmol/L NaH_2PO_4，200 mmol/L NaCl，5%IPA；

仪器参数：样品室温度：8℃；柱温：30℃；流速：0.5ml/min；进样量：20 ug；检测波长：280nm；等度运行：30min。

HIC 检测抗体亲疏水性

经重组表达和纯化的抗体，采用 HIC 检测抗体亲疏水性。检测方法如下进行：

利用东曹公司的疏水色谱柱（TOSOH Tskgel Buty-NPR(2.5)，4.6*100），在安捷伦 HPLC 设备上进行亲疏水性检测，流动相 A 为 1.5M $(NH_4)_2SO_4$，流动相 B 为 25 mM Na_2HPO_4(pH=7.0)+25%IPA。仪器参数设置为样品室温度：8℃，柱温：30℃， 流速：0.5 mL/min， 检测波长：280nm。将待测样品用流动相 A 稀释至终浓度 1mg/mL，进样 20 uL 进行梯度洗脱。洗脱梯度如下：

T/min	0	2	39	41	42	45
A%	95	95	0	0	95	95
B%	5	5	100	100	5	5

实施例 1：抗人 TF 鼠源单克隆抗体的制备

选用 Balb/C、昆明（KM）以及 CD01 3 个品系各 3 只 5-6 周龄雌性小鼠。采用人 TF-his 蛋白和食蟹猴 TF-his 蛋白进行免疫。免疫方案如表 1 所示。

表 1.小鼠免疫方案

免疫流程	免疫抗原*
初免（Primary）	100 ug h.TF1-His++10 ug CpG+CFA
第一次加强免疫（Boost 1st）	100 ug h.TF1-His+IFA
第二次加强免疫（Boost 2nd）	50 ug h.TF1-His+IFA
终免（Final Boost）	2 ug h.TF1-His+2 ug c.TF1-His

*: CFA: 弗氏完全佐剂；IFA：弗氏不完全佐剂；CpG：CpG 寡脱氧核苷酸佐剂。

在 2 次加强免疫过后，通过基于抗原蛋白的 ELISA 测定，按照一般方法中所述，采用分别包被 h.TF-His 和 c.TF-His 抗原的 ELISA 板，检测免疫动物的血清效价。基于检测结果，综合考虑与人和猴 TF 的亲和力，选取 CD1 免疫小鼠和 Balb/c 免疫小鼠用于杂交瘤融合，并在杂交瘤融合前，进行最后的加强免疫。

取小鼠脾脏、淋巴结制备细胞悬液，与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞 1：1 比例进行混合，采用细胞电融合缓冲液进行重悬，使用 BTX-ECM2001 细胞电融合仪进行电融合反应。电融合反应后，用完全融合培养基（RPMI160+15%FBS +1×HAT）重悬，按每孔 2 万-2.5 万个细胞分至 96 孔细胞培养板中，37℃、5% CO_2 培养。

培养 7 天后，先后通过使用包被人 TF-his 和食蟹猴 TF-his 的 ELISA 板，进行 ELISA 复筛；并采用 TF 阳性肿瘤细胞（MDA-MB-231 或 NCI-H358）进行细胞 ELISA 复筛。挑选出阳性母克隆用于亚克隆。

每个母克隆取 75 个细胞分至 96 孔板中，进行亚克隆培养。之后，取亚克隆上清，先后通过包被人 TF-his、食蟹猴 TF-his、大鼠 TF-his 蛋白及 NCI-H358 细胞，进行 ELISA 和细胞 ELISA 筛选。基于筛选结果，选取共 119 个阳性克隆，采用无血清培养基进行放大培养。收集培养的杂交瘤单克隆的上清，通过抗体纯化介质 ProA(GE, Mabselect XL)填料进行纯化，获得鼠源抗体。

对纯化的鼠源抗体，先后通过包被人 TF-his、食蟹猴 TF-his 蛋白及 NCI-H358 细胞，进行 ELISA 和细胞 ELISA 评价。实验方法如一般方法中所述，其中，鼠源抗体按照 10 ug/mL 起始，3 倍梯度稀释，建立 11 个浓度点。基于测定结果，选取亲和力高的 13 个杂交瘤单克隆，用于抗体序列确定和人源化。

实施例 2 抗 TF 鼠源单克隆抗体序列确定和人源化

收集约 1×10^5 个候选杂交瘤细胞，通过 Trizol(Invitrogen，15596026)提取 RNA，然后使用 PrimeScript RT reagent 试剂盒(TAKARA，RR047A)通过 PolyA 进行反转录获得 cDNA。分别于重链、轻链上游设计上

游引物，并于重链 CH1 区域、轻链 CL 区域设计下游引物。通过 PCR 扩增产物后，采用琼脂糖胶回收试剂盒进行片段回收；送样北京擎科生物技术有限公司进行测序，获得鼠源抗体序列。

采用 CDR grafting 的方法，进行鼠源抗原序列的人源化。首先通过常规 BLAST 方法，找到同原始鼠源序列同源性最高的人 germline 序列，作为模板；将鼠源抗体的 CDR 移植到人源模板上，构建成嵌合体；根据结构分析鼠源抗体中能保留其原始构象的 FR 氨基酸，将嵌合体中相应的氨基酸回复突变为鼠源氨基酸以保持原有亲和力；将构建的人源化抗体进行计算及免疫原性分析，找到高免疫原性片段，进行低免疫原性片段的替换。获得 17 种人源化抗体的序列。

实施例 3 人源化抗体表达和纯化

将上述各人源化抗体以及参照抗体（Benchmark，简称 BM，为 Genmab 公司的 Tisotumab，序列来自于专利 CN 103119065 B 的 SEQ ID NO:5（VH） 和 SEQ ID NO:45（VL））的重、轻可变区氨基酸序列提交给通用生物进行基因合成，进行密码子优化后，构建到 PTT5 载体上。质粒合成好后，通过 PEImax 转染 HEK293E 细胞，表达 7 天左右，离心收集上清。上清采用 MabSelectSure ProActive 亲和填料（GE，货号 17547401）进行纯化。表达的参照抗体与人源化抗体具有相同的人 IgG1 重链恒定区(SEQ ID NO: 106)和人 Kappa 轻链恒定区(SEQ ID NO: 105)。纯化好的抗体全部超滤到 PBS 缓冲液中，测定浓度，-20°C保存。

实施例 4 人源化抗体的 ELISA 亲和力评价

基于抗原蛋白的 ELISA 检测

如一般方法中所述进行所述检测。简言之，将分别包被有人 TF-his 蛋白或食蟹猴 TF-his 蛋白的 ELISA 板，采用 2% BSA 在 37°C 封闭 2 小时，加入梯度稀释的抗体（10 ug/mL 起始，3 倍梯度稀释，11 个浓度点），37°C 孵育 2 小时。之后，加入抗人二抗（Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L), Jackson，109-035-088），37°C 孵育 1 小时，加入 TMB 底物（湖州英创，TMB-S-004）显色。终止显色反应后上机读取 450nM 吸光值并用 GraphPad 软件拟合曲线。

基于细胞的 ELISA 检测：

如一般方法中所述进行所述检测。简言之，胰酶消化收集 TF 抗原阳性细胞 NCI-H358 细胞，每孔 5×10^4 个细胞铺至 96 孔板中过夜，之后 4%多聚甲醛固定细胞。去除多聚甲醛并用 PBS 洗涤细胞后，使用 2% BSA 在 37°C 封闭板 2 小时。加入梯度稀释的抗体（10 ug/mL 起始，3 倍梯度稀释，11 个浓度点），37°C 孵育 2 小时。之后，加入抗人二抗（Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L), Jackson，109-035-088），37°C 孵育 1 小时，加入 TMB 底物(湖州英创，TMB-S-004)显色，终止显色反应后上机读取 450nM 吸光值并用 GraphPad 软件拟合曲线。

实验结果如表 2 以及图 1 所示。选取与人/食蟹猴 TF-his 以及 TF 阳性细胞显示出良好的结合活性的人源化抗体，2B12B10-hz1、4F6C3-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1、27B9F2-hz1 及 27H8H3-hz1，进行后续评价。

表 2.人源化抗体 ELISA 检测结果

序号	抗体编号	h.TF-His	c.TF-His	NCI-H358
		EC50 (ng/mL)	EC50 (ng/mL)	EC50(ng/mL)
1	1H12G8-hz1	116.4	4105	65.61
2	1H12G8-hz2	3785	10948	1537
3	2B12B10-hz1	6.724	13.63	3.877
4	2B12B10-hz2	17.06	917.1	18.27
5	4F6C3-hz1	3.571	5.679	3.007
6	24A8B7-hz1	5.478	19.54	5.862
7	24A8B7-hz2	8.051	259.1	4.417

8	30G11B7-hz1	7.912	20.79	4.727
9	9H4B4-hz1	19.52	18.64	未测
10	10E11H9-hz1	1604	2593	未测
11	12E4C11-hz1	17.3	20.66	弱结合
12	22F11H5-hz1	8.577	11.41	11.95
13	27B9F2-hz1	14.55	18.9	19.56
14	27H8H3-hz1	8.147	11.37	34.79
15	28E10A3-hz1	40.36	313.4	弱结合
16	28E10A3-hz2	804.2	1326	弱结合
17	10E11H9-hz2	320.4	478.2	弱结合
	Benchmark	14.43±7.32 (n=2)	18.45±7.71 (n=2)	21.62±2.00 (n=2)

实施例 5 人源化抗体质量鉴定

上述经重组表达和蛋白 A 亲和纯化的人源化抗体，按照一般方法中所述，通过 SEC-HPLC 鉴定抗体的纯度；并通过 HIC 检测抗体的亲疏水性。SEC 及 HIC 检测结果如表 3 所示。SEC 结果表明选取的 6 种人源化抗体纯度较高，均＞90%；HIC 结果表明选取的 6 种人源化抗体与疏水色谱柱子结合较弱，保留时间较短，亲水性都较好。

表 3.人源化抗体质量鉴定

抗体编号	SEC			HIC (min)
	HMW%	Main peak%	LMW %	
2B12B10-hz1	2.56	97.44	0	12.56
4F6C3-hz1	1.13	98.87	0	11.86
30G11B7-hz1	1.55	98.45	0	12.02
22F11H5-hz1	3.76	96.24	0	10.89
27B9F2-hz1	7.63	92.37	0	10.13
27H8H3-hz1	0.93	99.07	0	10.43

实施例 6 人源化抗体的流式亲和力评价

胰酶消化离心收集 TF 中低表达细胞系 NCI-H358(来源：南京科佰，CBP60136)及 TF 高表达细胞系 KYSE520 细胞(来源：南京科佰，CBP60658)，预冷 PBS 洗三次，1% BSA 重悬细胞，每孔 3×10^5 个细胞铺至 96 孔尖底板中。加入梯度稀释的抗体，4℃孵育 1 小时，预冷 PBS 洗三次后，每孔加入 1 μL 抗人荧光二抗（APC anti-human IgG Fc Antibody，Biolegend，410712），4℃孵育 0.5 小时。预冷 PBS 洗三次后重悬细胞，流式细胞仪（Sony，LE-SA3800GA）检测，将数据导入 GraphPad 软件拟合曲线。

实验结果如表 4 和图 2 所示，6 个候选人源化抗体与肿瘤细胞均有较强结合。

表 4.人源化抗体流式检测结果

序号	抗体编号	NCI-H358 (EC50, ng/mL)	KYSE520 (EC50, ng/mL)
1	2B12B10-hz1	187.4	140.3
2	4F6C3-hz1	63.48	96.69
3	30G11B7-hz1	145.1	138.3
4	22F11H5-hz1	67.09	35.7
5	27B9F2-hz1	126.5	68.67
6	27H8H3-hz1	99.06	59.43
	BM	97.81±39.73 (n=2)	77.48±50.24 (n=2)

实施例 7 人源化抗体的动态亲和力评价

通过 ForteBio 测定人源化抗体的动态亲和力。实验步骤如下：取出 ProA 传感器（18-5010，Octet），用 PBST 稀释液（PH7.4）将传感器预湿 10min。将需要固定化的抗体稀释至 5μg/ml；抗原 h.TF-His 和 c.TF-His 从 75nM 起始，2 倍稀释，4 个浓度点，设置 0 浓度点。设置程序，放入传感器板和样品板，开始程序，传感器用 20mM 甘氨酸溶液（pH 1.7）再生。使用 Octet 分析软件分析数据，导出结果图。实验结果如表 5 所示，6 个候选人源化抗体与人、猴 TF 均有较高亲和力。

表 5.人源化抗体动态亲和力检测结果

抗体编号	h.TF-his			c.TF-his		
	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)
2B12B10-hz1	1.38E-08	2.09E+05	2.89E-03	3.38E-08	3.44E+05	1.16E-02
4F6C3-hz1	1.77E-08	1.81E+05	3.20E-03	2.18E-08	3.55E+05	7.72E-03
30G11B7-hz1	2.58E-08	1.97E+05	5.06E-03	1.46E-07	3.64E+05	5.30E-02
22F11H5-hz1	9.80E-09	3.02E+05	2.96E-03	1.27E-08	3.24E+05	4.11E-03
27B9F2-hz1	6.32E-09	1.85E+05	1.17E-03	2.97E-08	1.72E+05	5.09E-03
27H8H3-hz1	4.25E-08	2.73E+05	1.16E-02	4.25E-08	2.95E+05	1.25E-02
BM	1.42E-08	1.66E+05	2.34E-03	2.05E-08	1.79E+05	3.66E-03

实施例 8 人源化抗体的内吞活性评价

通过流式细胞技术(FACS),检测人源化单克隆抗体的内吞活性。实验步骤如下:胰酶消化离心收集 NCI-H358 细胞，用浓度为 10 μg/mL 的待检测抗体 4℃孵育 1 小时。PBS 洗 3 次，用 RPMI1640+10% FBS 重悬细胞，分成 3 份分别在 37℃孵育 0、2、4 小时。PBS 洗三次后加入 1 μL 抗人荧光二抗（APC anti-human IgG Fc Antibody，Biolegend，410712），4℃孵育 0.5 小时，PBS 洗三次后重悬细胞上机。使用同型对照阴性抗体 HLE IgG1 作为阴性对照。按照以下公式计算内吞率：内吞率（%）=【1-（该时间点检测样品平均荧光值 - 该时间点阴性对照样品平均荧光值）/（0 小时检测样品平均荧光值 -0 小时阴性对照样品平均荧光值）】×100。

实验结果如表 6 所示，2B12B10-hz1、4F6C3-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1、27B9F2-hz1 内吞率与参照抗体基本相当，27H8H3-hz1 内吞率优于参照抗体。

表 6.人源化抗体内吞检测结果

内吞率(%)							
时间	2B12B10-hz1	4F6C3-hz1	30G11B7-hz1	22F11H5-hz1	27B9F2-hz1	27H8H3-hz1	BM
2h	34.32	17.03	19.77	34.32	19.35	49.17	20.26
4h	49.63	47.67	46.10	56.07	54.95	73.37	56.17

实施例 9 人源化抗体的信号通路阻断活性评价

FVIIa 与 TF 阳性肿瘤细胞 MDA-MB-231 表面的组织因子结合，将激活 TF 下游信号通路，导致 IL-8 的释放。因此通过检测 IL-8 的释放，能够反映抗 TF 人源化抗体对该 TF 信号通路的阻断活性。

实验步骤如下：将 FVIIa （40nM，Haematologic Technologies Inc，HCVIIA-0031）、梯度稀释的抗 TF 人源化抗体（60 μg/mL 起始，3 倍梯度稀释，11 个浓度点）与 MDA-MB-231 细胞（5×10^4 细胞/孔，南京

科佰，CBP60382）共孵育 5 小时后，收集上清，通过 IL-8 检测试剂盒（MABTECH，3114-1H-20）检测 IL-8 的释放。IL-8 检测步骤如下：实验前一晚，将在 PBS 中的捕获抗体 MT8H6 按 200 ng/孔包被在 96 孔板中，4℃过夜；去除包被液，300 μL PBST 洗 1 遍，所有 96 孔板每孔加入 100 μL 在 PBS 中的 2% BSA，37℃封闭 2 小时；直接加 50μL 细胞培养上清，37℃孵育 2 小时；去除上清，每孔用 300 uL PBST 洗三次，每孔加入 100 uL（1 ug/ml） MT8F19-biotin 二抗（在 2% BSA 中），37℃孵育 1 小时；去除上清，每孔用 300 μL PBST 洗四次，每孔加入 100 μL 过氧化物酶缀合的链霉亲和素（1：10000 稀释），37℃孵育 1 小时；去除上清，每孔用 300 μL PBST 洗五次，随后每孔加入 100 μL TMB 底物，显色 5-20 分钟；每孔加入 50 μL 2N HCl 终止反应，酶标仪读取 OD450mm 读数。将结果导入 GraphPad 作图并计算抑制率和 IC50。

实验结果如表 7 和图 3 所示，除 27B9F2-hz1 外，其余 5 个人源化抗体均对 TF 信号通路有较强抑制作用。

表 7.人源化抗体 IL-8 释放阻断活性检测结果

抗体编号	IC50 (ng/mL)	最大抑制率 (%)
2B12B10-hz1	128.1	94.06
4F6C3-hz1	120.9	100
30G11B7-hz1	129.4	100
22F11H5-hz1	179.7	94.3
27B9F2-hz1	弱	弱
27H8H3-hz1	463.3	100
BM	225.37±118.10 (n=3)	100

实施例 10 评价人源化抗体对凝血的影响

用含有 $CaCl_2$ 的 HEPES 溶液稀释抗 TF 人源化抗体，随后与 50000 个 TF 阳性细胞 MDA-MB-231 细胞在 37℃孵育 30 分钟，然后加入 50 μL 人血浆，迅速混匀，立刻连续读取 405nm 吸光值，以计算对细胞表面 TF 起始凝血的抗凝作用。将结果导入 GraphPad 作图。共进行两次实验，第一次实验 $CaCl_2$ 浓度为 2 mM，抗体终浓度为 50 μg/mL；第二次实验 $CaCl_2$ 浓度为 5 mM，抗体终浓度为 20 μg/mL。实验结果如图 4 (图 4A :2 mM Ca^{2+} , 50 μg/mL 抗体浓度；图 4B：5 mM Ca^{2+} , 20 μg/mL 抗体浓度)和下表 8 所示。综合两次实验结果，在测试的抗体中， 27H8H3-hz1 和 2B12B10-hz1 对人凝血影响最小，且优于参照抗体。

表 8：人源化抗体对凝血时间 V50 的影响

抗体编号	第一次实验 2 mM Ca2+ , 50 μg/mL 抗体 V50 (秒)	第二次实验 5 mM Ca2+ , 20 μg/mL 抗体 V50 (秒)
2B12B10-hz1	882.5	24.25
*4F6C3-hz1	-	94.69
30G11B7-hz1	1446	29.16
22F11H5-hz1	1643	49.36
27B9F2-hz1	1542	115.2
27H8H3-hz1	750.5	26.20
BM	1141	74.88
空白对照	19.96	~ 29.96

*：在 2 mM Ca2+ 和 50 μg/mL 抗体 4F6C3-hz1 存在下，在 2000 秒内基本上无凝血发生。

实施例 11 人源化抗体的稳定性评价

人源化抗体的加速稳定性评价

将抗 TF 人源化抗体样品超滤置换至 PBS（PH=7.4）中，浓度 5 mg/mL，过滤除菌，分别在 37℃放置 0、3、7、14 天及反复冻融 4 次、8 次。随后，按照一般方法中所述，检测样品的 SEC-HPLC 及 CE-SDS 纯度。

实验结果显示，在加速及反复冻融情况下，进行检测的 22F11H5-hz1 与 27H8H3-hz1 人源化抗体拥有良好的稳定性。在加速稳定性及反复冻融试验后，两种人源化抗体的 SEC 纯度均保持在 95%以上；CE-SDS 非还原纯度均保持在 87%以上，CE-SDS 还原纯度在 95%以上。

人源化抗体 Tm 值测定

采用 DSF 测定人源化抗体 Tm 值，以反映抗体的热稳定性。实验步骤如下：将待测抗体样品用 PBS 稀释到 1 mg/mL；将染料 SYPRO Orange dye（Thermo#56651）用 ddH_2O 稀释至 40 倍；反应体系：样品 12.5 μL +40X 染料 2.5μL + ddH_2O 5 μL；封膜，瞬时离心；通过 Q-PCR 检测，Q-PCR 参数设置：Target（ROX），程序（25℃，3 min； 1%速率，95℃；95℃，2min）。

结果显示，5 个候选人源化抗体 2B12B10-hz1、4F6C3-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1、27H8H3-hz1 均有较高的 Tm 值（均高于 70℃），表明其拥有较好的热稳定性。

实施例 12 人源化抗体的血清稳定性评价

用人血清将抗 TF 人源化抗体稀释至 20 μg/mL，在 37℃放置 14 天，随后通过基于抗原蛋白的 ELISA 检测亲和力的变化。ELISA 方法的实验步骤如一般方法中所述。实验结果如图 5A 和 5B 显示，22F11H5-hz1 与 27H8H3-hz1 在人血清中放置 14 天后亲和力没有明显变化。

实施例 13 人源化抗体大鼠体内 PK 检测

将待检测样品通过尾静脉注射给予雄性大鼠（成都达硕），每组 3 只，给药剂量为 10 mg/kg。给药后采集 30min、1h、2h、6h、24h、48h、96h、168h、336h 血清样品。用含阴性大鼠血清的 2% BSA 稀释相应抗体，1 μg/mL 起始，2 倍梯度稀释，11 个浓度点，以此作为标准曲线样品。通过基于抗原蛋白的 ELISA 检测血药浓度，ELISA 方法如一般方法中所述。实验结果显示，人源化抗体 22F11H5-hz1 和 27H8H3-hz1 在大鼠体内的半衰期为大约 120 小时以上。

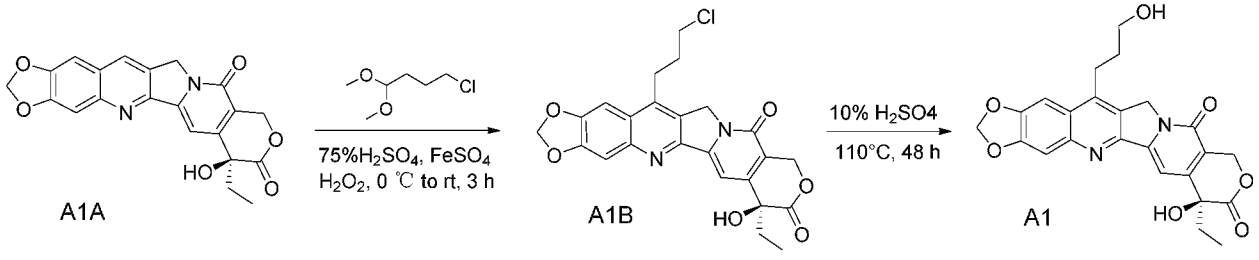
根据前述抗体表征，确定 4 种候选人源化抗体，2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1 和 27H8H3-hz1，用于后续的 ADC 构建和性能表征。序列表中显示了所选 4 种抗体的序列。

实施例 II 抗体偶联药物(ADC)的制备和表征

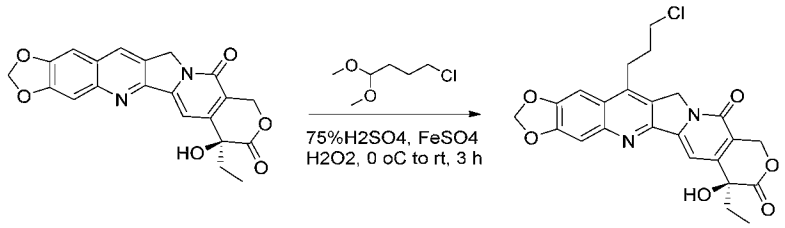
实施例 1 抗体偶联药物(ADC)的制备

实施例 1.1：在“药物-连接体化合物”合成中使用的中间体的合成

实施例 1.1.1： (S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-羟基丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1）的合成



步骤一：(S) -7-乙基-7-羟基-14-(3-氯丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 (A1B) 的合成

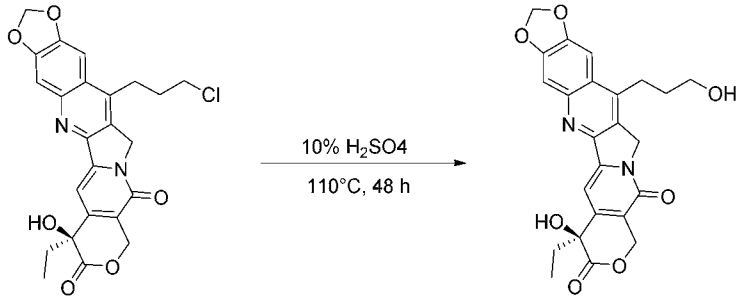


冰浴条件下，向化合物(S)-7-乙基-7-羟基-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1A，Cas No.：151636-76-9，500 mg）的 75%硫酸溶液（5 mL）中，加入七水合硫酸亚铁（570 mg 七水合硫酸亚铁溶于 1mL 水中)和 4,4-二甲氧基氯丁烷（3.89 g），反应液搅拌三分钟后滴加双氧水（29%，2.5 mL）。反应液在 0 ºC 下搅拌反应 5 分钟后升至室温，并搅拌反应 3 小时。反应液加入水（50 mL）稀释，乙酸乙酯（80 mL×2）萃取，有机相用饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩得到粗产品。粗产品用 C18 柱（乙腈/0.05%甲酸的水溶液：5%-60%）进一步纯化，得到目标化合物 A1B（黄色固体，400 mg，收率：67%）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：468.9；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.65 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 3.81 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.22 (s, 2H), 1.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 4H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)。

步骤二：(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-羟基丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮 （A1）的合成

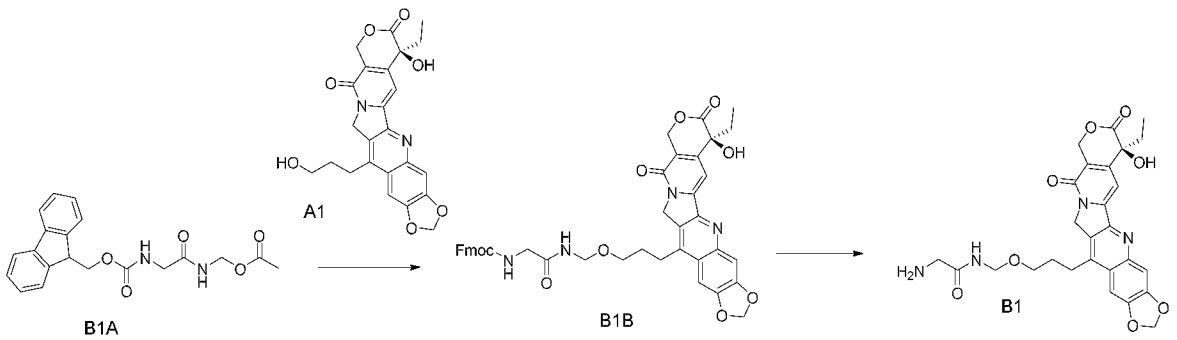


将化合物(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-氯丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（100 mg，0.213 mmol）溶于 10%硫酸（5 mL）溶液中，反应在 110°C 下反应 48 小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠（30 mL）溶液，用二氯甲烷（10 mL×5）萃取，无水硫酸钠干燥，抽滤，减压浓缩得到粗产品。经高效液相制备纯化（乙腈/水含 0.05%甲酸），得到(S)-7-乙基-7-羟基-14-(3-羟基丙基)-10,13-二氢-11H-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-8,11(7H)-二酮（A1，1.78 mg）。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：451.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 7.63 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.47 – 5.37 (m, 2H), 5.32 – 5.19 (m, 2H), 3.51 – 3.46 (m, 2H), 3.17 – 3.13 (m, 2H), 1.92 – 1.76 (m, 4H), 0.90 – 0.84 (m, 3H)。

实施例 1.1.2：(S)-2-氨基-N-((3-(7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)丙氧基)甲基)乙酰胺（B1）的合成



步骤一：化合物（B1A）（Cas No.：1599440-06-8，368mg）、化合物（A1）（440mg）和对甲苯磺酸吡啶盐（PPTS）（25mg）在二氯甲烷（20ml）中回流 20 小时，然后用碳酸氢钠水溶液和盐酸水溶液分别洗涤，减压除去有机溶剂，得到粗产物。粗产品经柱层析分离纯化 (二氯甲烷:甲醇=10/1)，得到目标化合物 B1B（240 mg）。

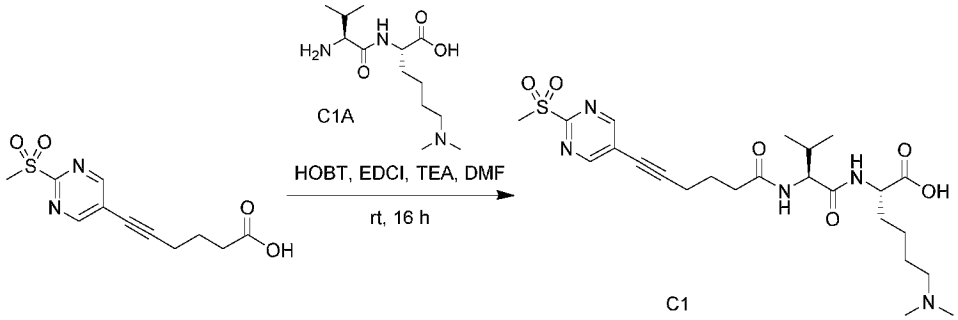
LCMS (ESI) $[M+H]^+$：759.5。

步骤二：B1B （240mg）溶于 DMF（5ml），加入哌啶（1ml），化合物搅拌 20 分钟，溶液减压除去低沸点组分，残留物直接用于下步合成。少量粗产物经反相色谱 (乙腈/0.05%FA 的水溶液: 5%到 50%) 纯化后得目标化合物 B1。

ESI-MS (m/z): 537.4 $[M+H]^+$;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 (t, 1H), 8.04 (br, 2H), 7.58(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.25(s, 1H), 6.29(s, 2H), 5.43(S, 2H), 5.21(s, 2H), 4.65(d, 2H), 3.63(m, 2H), 3.53(m, 2H), 3.11(m, 2H), 1.87(m, 4H), 0.88(t, 3H)。

实施例 1.1.3：N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C1）

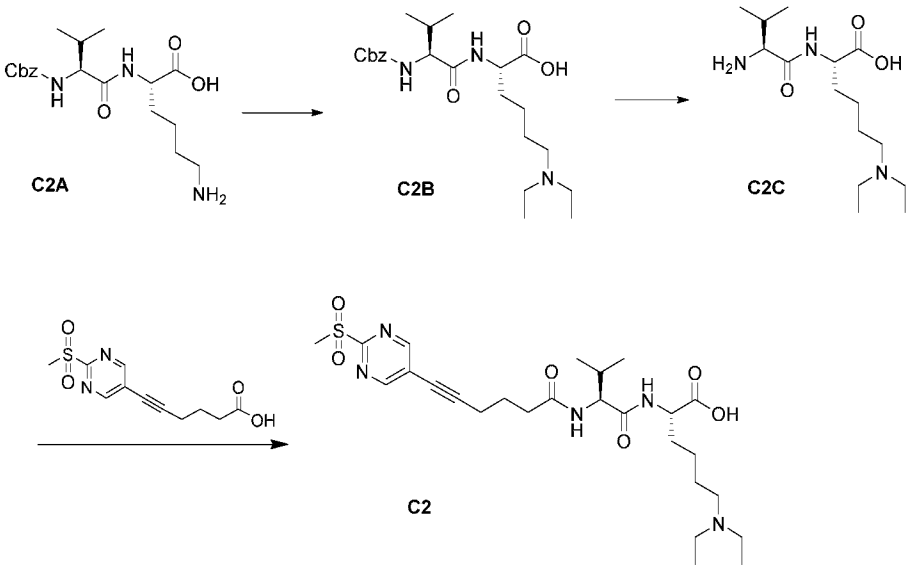


将 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (268 mg，Cas No. 2356229-58-6)、化合物 C1A (328 mg)、三乙胺 (322 mg) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (5 mL)。然后再加入 1-羟基苯并三唑(HOBT，162 mg)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI, 229 mg), 反应液室温搅拌 16 小时。反应液直接经过 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液体系）提纯，得到目标化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C1，白色固体，327 mg)。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$：524.4。

^{1}H NMR (400 MHz,) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 4.21 (dd, J = 8.8, 6.9 Hz, 1H), 4.08 – 4.03 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.55 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.42 – 2.32 (m, 4H), 2.27 (s, 6H), 1.98 (dd, J = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.74 – 1.55 (m, 2H), 1.47 – 1.37 (m, 2H), 1.31 – 1.23 (m, 2H), 0.85 (dd, J = 12.8, 6.8 Hz, 6H)。

实施例 1.1.4：N^6,N^6-二乙基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C2）



步骤一：

将化合物 C2A（5.0 g, 12.05 mmol，Cas：1872-06-8）溶在二氯甲烷（100 mL）中，向反应液中加入乙醛（3.2 g, 72.3 mmol），室温下搅拌反应 10 分钟，再向反应液中加入三乙酰氧基硼氢化钠（12.8 g, 60.25 mmol），反应在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时，旋干，过滤后滤液用 C18 柱反向分离纯化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)，得到目标化合物 C2B (4.57 g, 收率 82.0%)为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 436.4;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.70 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.38 – 7.26 (m, 5H), 5.08 – 4.99 (m, 2H), 4.00 (dd, *J* = 12.6, 6.5 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J* = 8.6, 6.8 Hz, 1H), 2.74 (dd, *J* = 14.0, 6.9 Hz, 4H), 2.64 – 2.54 (m, 2H), 2.05 – 1.94 (m, 1H), 1.72 – 1.52 (m, 2H), 1.52 – 1.38 (m, 2H), 1.38 – 1.18 (m, 2H), 1.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.87 – 0.81 (m, 6H)。

步骤二：

室温下，将化合物 C2B（1.6 g，3.68 mmol）溶于甲醇（80 mL）中，然后向反应液中加入 Pd/C（0.16 g），氢气下室温下搅拌反应 12 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤，滤液减压浓缩得到目标化合物 C2C（900 mg，收率 82%），为米白色固体。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.04 (br s, 1H), 4.02 – 3.99 (m, 1H), 3.10 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 2.65 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.55 – 2.51 (m, 2H), 2.06 – 1.93 (m, 1H), 1.73 – 1.54 (m, 2H), 1.47 – 1.38 (m, 2H), 1.30 – 1.21 (m, 2H), 1.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.89 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

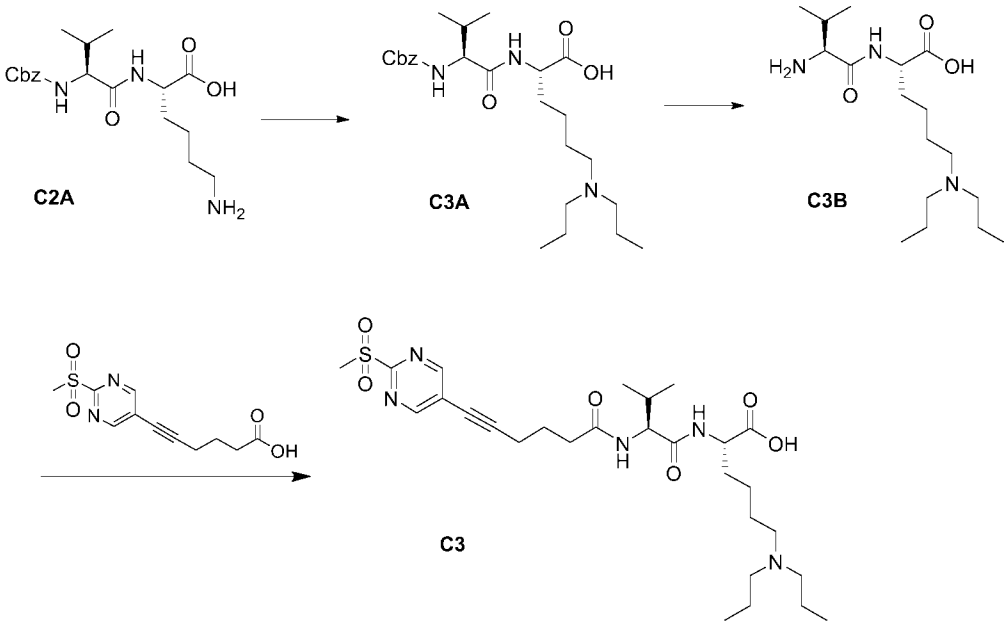
步骤三：

将化合物 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (268 mg, 1 mmol)溶于 DMF（8 mL）中，依次加入 HATU（380 mg, 1 mmol）和三乙胺（322 mg, 2.5 mmol），室温搅拌 20 分钟后加入化合物 C2C（301 mg, 1 mmol），室温继续搅拌 30 分钟。LCMS 检测反应完成后，反应液直接经过 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液体系）提纯得到目标化合物 C2 (280 mg，收率 51%)，为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 552.3；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 (s, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 8.8, 6.8 Hz, 1H), 4.02 (dd, *J* = 12.8, 7.2 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.74 – 2.69 (m, 4H), 2.62 – 2.52 (m, 4H), 2.44 – 2.29 (m, 2H), 2.04 – 1.94 (m, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 2H), 1.51 – 1.39 (m, 2H), 1.33 – 1.23 (m, 2H), 1.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.87 – 0.82 (m, 6H)。

实施例 1.1.5：N^6,N^6-二正丙基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸（C3）



步骤一：

将化合物 C2A（5.0 g，12 mmol）溶在二氯甲烷（100 mL）中，向反应液中加入正丙醛（4.2 g，72.3 mmol），室温下搅拌反应 10 分钟，再向反应液中加入三乙酰氧基硼氢化钠（12.8 g，60.25 mmol），反应在室温下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完全。向反应液中加入氯化铵饱和水溶液搅拌一个小时，旋干，过滤后滤液用 C18 柱反向分离纯化(乙腈比 0.05%的甲酸水溶液: 5%到 55%)得到目标化合物 C3A (4.57 g, 收率 82.0%)，为白色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 464.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.81 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 5H), 5.04 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 4.12 – 4.02 (m, 1H), 3.94 – 3.82 (m, 1H), 2.65 – 2.52 (m, 6H), 2.06 – 1.94 (m, 1H), 1.76 – 1.64 (m, 1H), 1.64 – 1.53 (m, 1H), 1.52 – 1.40 (m, 6H), 1.34 – 1.18 (m, 2H), 0.92 – 0.80 (m, 12H)。

步骤二：

室温下，将化合物 C3A（2.0 g，4.32 mmol）溶于甲醇（80 mL）中，然后向反应液中加入 Pd/C（0.16 g），氢气下室温下搅拌反应 12 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液过滤，滤液减压浓缩得到目标化合物 C3B（1.2 g，收率 85.5%），为白色固体。

步骤三：

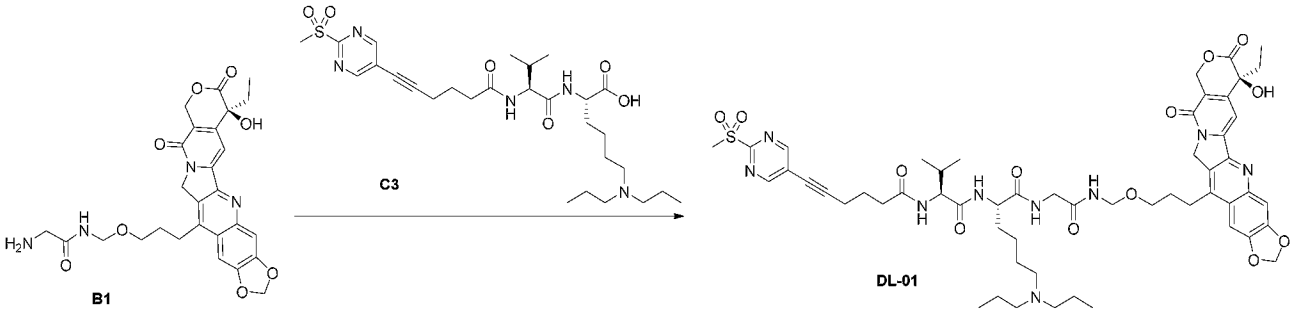
将化合物 6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酸 (100 mg, 0.373 mmol)，溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (1 mL)，然后加入 HATU (142 mg, 0.373 mmol)和 N,N-二异丙基乙胺 (120 mg, 0.93 mmol)，该体系搅拌 30 分钟，然后加入化合物 C3B (122 mg，0.371 mmol)，反应液室温搅拌 1 小时。LCMS 检测反应完成后，反应液直接经过 C18 柱反相（乙腈和 0.05%的甲酸水溶液体系）提纯得到目标化合物 N^6,N^6-二正丙基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)- L-缬氨酸)-L-赖氨酸(C3，50 mg，收率 28%)，为淡黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 580.0；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.24 (s, 2H), 7.98 – 7.93 (m, 2H), 4.24 – 4.16 (m, 1H), 4.10 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.79 – 2.64 (m, 6H), 2.55 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.45 – 2.26 (m, 2H), 2.06 – 1.91 (m, 1H), 1.89 – 1.78 (m, 2H), 1.76 – 1.66 (m, 1H), 1.64 – 1.57 (m, 1H), 1.57 – 1.42 (m, 6H), 1.37 – 1.24 (m, 2H), 0.93 – 0.78 (m, 12H)。

实施例 1.2 药物-连接体化合物的合成

实施例 1.2.1：N-((11S,14S)-11-(4-(二正丙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环烯烷并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-01）

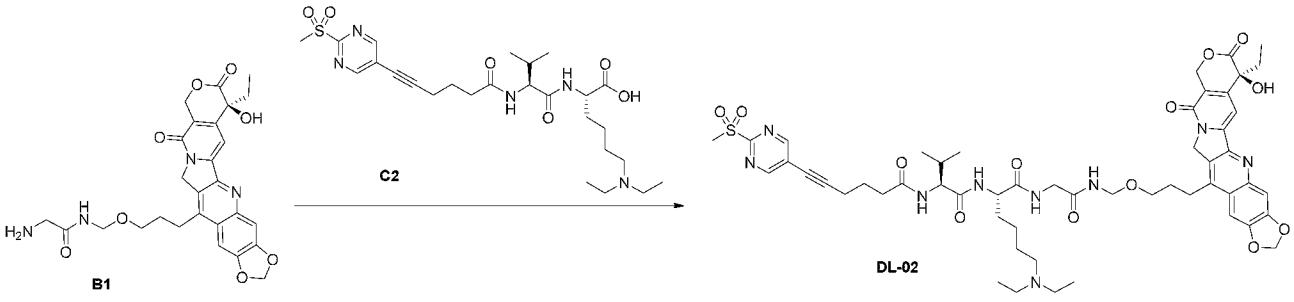


将化合物 C3 (43 mg, 0.074 mmol)、化合物 B1 (40 mg，0.075 mmol)，溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (1 mL)，然后依次加入 HBTU (28 mg, 0.075 mmol)和 N,N-二异丙基乙胺 (24 mg, 0.187 mmol)， 反应液室温搅拌 1 小时。LCMS 检测反应完成后，反应液直接经制备色谱(0.01% 三氟乙酸水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物（DL-01，8.5 mg，收率 10%），为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1098.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10 (s, 2H), 9.03 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.19 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.66 – 4.52 (m, 2H), 4.31 – 4.21 (m, 1H), 4.19 – 4.10 (m, 1H), 3.74 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.49 – 3.48 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.15 – 3.06 (m, 2H), 3.02 – 2.95 (m, 6H), 2.59 – 2.52 (m, 3H), 2.41 – 2.29 (m, 2H), 2.05 – 1.90 (m, 2H), 1.91 – 1.77 (m, 6H), 1.63 – 1.57 (m, 6H), 1.31 – 1.29 (m, 2H), 0.92 – 0.80 (m, 15H)。

实施例 1.2.2：N-((11S,14S)-11-(4-(二乙基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-02）



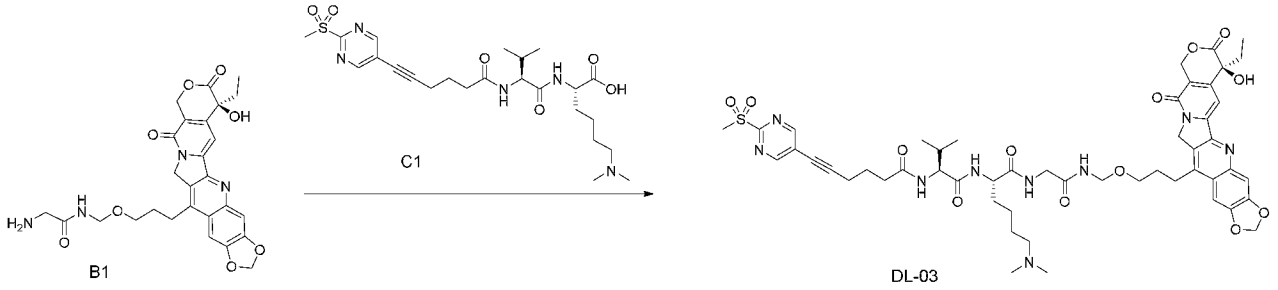
将化合物 C2 (40 mg, 0.075 mmol)、化合物 B1 (41 mg, 0.075 mmol) 溶于 DMF (1 mL)，然后再加入 HOBt (15.2 mg, 0.113 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (21.5 mg, 0.113 mmol)，然后再加入三乙胺 (23 mg, 0.225mmol)，加完后反应液室温搅拌 16 小时。LCMS 检测反应完成后，将反应液浓缩得粗产品。粗产品经制备色谱(0.01% TFA 水溶液，乙腈) 纯化得到目标化合物(DL-02, 16 mg, 收率 20%)，为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1070.6；

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 – 9.08 (m, 2H), 9.01 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.20 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.65 – 4.53 (m, 2H), 4.26 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.20 – 4.10 (m, 1H), 3.74 (d,

J = 5.5 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.14 – 3.07 (m, 6H), 2.98 (s, 2H), 2.55 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.41 – 2.29 (m, 2H), 2.03 – 1.89 (m, 2H), 1.89 – 1.77 (m, 7H), 1.61 – 1.56 (m, 2H), 1.32 (s, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.91 – 0.78 (m, 9H)。

实施例 1.2.3： N-((11S,14S)-11-(4-(二甲基氨基)丁基)-1-((S)-7-乙基-7-羟基-8,11-二氧代-7,8,11,13-四氢-10H-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-g]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-14-基)-15-甲基-7,10,13-三氧代-4-氧杂-6,9,12-三氮杂十六烷-14-基)-6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰胺（DL-03）

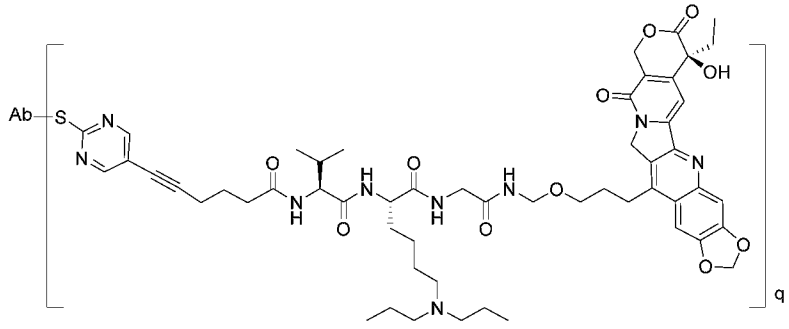


将化合物B1 (100 mg, 0.186 mmol)和化合物 N^6,N^6-二甲基-N^2-((6-(2-(甲磺酰基)嘧啶-5-基)己-5-炔酰基)-L-缬氨酸)-L-赖氨酸 (C1，100 mg，0.191 mmol) 溶于 DMF (2 mL)。然后再加入 1-羟基苯并三唑(38 mg, 0.280 mmol)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(53 mg, 0.280 mmol)，然后再加入三乙胺 (56 mg, 0.559mmol) ，加完后反应液室温搅拌 16 小时。LCMS 检测反应完成后，将反应液经制备色谱(0.01% TFA 水溶液，乙腈)纯化得到目标化合物(DL-03，20 mg，收率 10%)，为黄色固体。

LCMS (ESI) $[M+H]^+$ = 1042.5;

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.28 (s, 1H, TFA), 9.10 (s, 2H), 8.64 (br s, 1H), 8.19 (br s, 1H), 8.09 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.67 – 4.52 (m, 2H), 4.30 – 4.10 (m, 2H), 3.74 (br s, 2H), 3.50 (br s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.17 – 3.07 (m, 2H), 3.04 – 2.91 (m, 2H), 2.75 (s, 6H), 2.46 – 2.24 (m, 3H), 2.04 – 1.66 (m, 9H), 1.63 – 1.46 (m, 3H), 1.32 – 1.29 (m, 2H), 0.87 – 0.82 (m, 9H)。

实施例 1.3 抗 TF 抗体-药物偶联物的制备



Ab 为抗 TF 抗体。

1.3.1 TF-ADC（DAR8）样品制备

将根据实施例 I 制备的抗 TF 抗体 30 mg，用稀释液（20 mM PB，pH 7.5）稀释，加入终浓度为 1 mM 的依地酸钠溶液，混匀；加入抗体 6.0 倍当量的 TCEP 溶液，混匀，室温放置 60 分钟；向上述溶液体系加入抗体 15 倍当量的溶解于二甲基亚砜中的 DL-01，混匀，室温静置 1 小时，得到偶联后样品，反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 6.0 的 20mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有抗 TF 抗体的 ADC 组合物的溶液 TF-ADC（DAR8）。利用实施例 1.4 的质谱法测定 DAR 值

为 8.0。

1.3.2 TF-ADC (DAR3)样品制备

将根据实施例 I 制备的抗 TF 抗体 30 mg，用稀释液（20 mM PB，pH 7.5）稀释，加入终浓度为 1mM 的依地酸钠溶液，混匀；加入抗体 6.0 倍当量的 TCEP 溶液，混匀，室温放置 60 分钟；向上述溶液体系加入抗体 4.0 倍当量的溶解于二甲基亚砜中的 DL-01，混匀，室温静置 1 小时，得到偶联后样品，反应结束后使用 30KDa 的超滤管将样品置换到 pH 为 6.0 的 20mM 组氨酸缓冲液中并去除低分子物质，最后将样品浓缩以获得含有抗 TF 抗体的 ADC 组合物的溶液 TF-ADC (DAR3)。质谱法测定 DAR 值为 3.0。

实施例 1.4 采用质谱法进行偶联后样品的 DAR 值测定

1.4.1 对 TF-ADC（DAR3）进行 LC-MS 分子量和 DAR 值分析

色谱条件：

色谱柱：PLRP-S，2.1*50mm, 5μm；

流动相 A：0.1%FA /H2O; 流动相 B：0.1%FA/ACN

柱温：30℃

样品室温度：8℃

流速：0.6ml/min

进样量：2μl

时间（min）	1	5	5.1	7	10
流动相 A	90	40	10	90	90
流动相 B	10	60	90	10	10

样品处理：分别取样品 50 μg，加入 1M DTT 2μl，加超纯水至 50μl 以稀释至约 1.0 mg/ml 浓度，混匀，室温还原 30min。

LC/MS 型号：Agilent 1290-6545XT Q-TOF

质谱条件：Gas temp：320℃；Drying Gas： Nitrogen；Nebulizer ：35 psi；Sheath Gas Temp ：350℃；sheath Gas Flow ：11 l/min；m/z 500~3000

结果如下表 9 所示：

表 9：理论分子量及实测分子量

肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理论值	23466.8	24484.9	25503.1	26521.3
	实测值	23467	24485	未检出	未检出
HC	理论值	50283.0	51301.1	52319.3	53337.4
	实测值	50284	51302	52320	53338

表 9 中，mAb 表示未偶联的单克隆抗体；LC 代表抗体轻链；HC 代表抗体重链；DAR1 代表包含轻链或重链偶联 1 个毒素分子的偶联物；DAR2 代表包含轻链或重链偶联 2 个毒素分子的偶联物；DAR3 代表包含轻链或重链偶联 3 个毒素分子的偶联物；其中，单抗理论分子量以 G0F 糖型计算。下文中 mAb、LC、HC、DAR1、DAR2、DAR3 如上说明。

检测结果显示，TF-ADC（DAR3）上抗体轻链偶联 0~1 个毒素分子（LC，DAR1 比例分别为 53.8%，46.2%）、重链偶联 0~3 个毒素分子（mAb、DAR1、DAR2、DAR3 的比例分别为 30.6%，42.4%，20.2%，6.8%），由此计算 TF-ADC（DAR3）样品的偶联比（平均 DAR 值）为 3.0。

1.4.2 对 TF-ADC（DAR8）进行 LC-MS 分子量和 DAR 值分析

色谱条件：

色谱柱：Xbridge Protein BEH SEC (2.5μm,4.6*150mm)

流动相 A：0.1%FA /H2O; 流动相 B：0.1%FA/ACN

柱温：30℃

样品室温度：8℃

流速：0.3 ml/min

进样量：1μl

时间（min）	0	5	7	7.1	10
流动相 A	90	20	20	90	90
流动相 B	10	80	80	10	10

样品处理：分别取样品 50 μg，加入 1M DTT 2μl，加超纯水至 50μl 以稀释至约 1.0 mg/ml 浓度，混匀，室温还原 30min。

LC/MS 型号：UPLC（AB SCIEX），高分辨质谱仪（AB SCIEX）

质谱条件： Gas1:45；Gas2:45；CUR：30；TEM：450；ISVF：5000；DP：120；CE：12；质量数范围：600-4000

结果如下表 10 示：

表 10 理论分子量及实测分子量

肽链		mAb	DAR1	DAR2	DAR3
LC	理论值	23466.8	24484.9	25503.1	26521.3
	实测值	未检出	24485.1	未检出	未检出
HC	理论值	50283.0	51301.1	52319.3	53337.4
	实测值	未检出	未检出	未检出	53338.1

检测结果显示，TF-ADC（DAR8）上抗体轻链偶联 0~1 个毒素分子（LC，DAR1 比例分别为 0%，100.0%）、重链偶联 0~3 个毒素分子（mAb、DAR1、DAR2、DAR3 的比例分别为 0%，0%，0%，100.0%），由此计算 TF-ADC（DAR8）样品的偶联比（平均 DAR 值）为 8.0。

实施例 2 抗 TF 抗体 ADC 评价

实施例 2.1 抗 TF ADC 亲和力检测

根据前述实施例中用于制备 ADC 样品 TF-ADC（DAR8）的方法，制备本发明 4 种候选抗体(2B12B10-hz1，30G11B7-hz1，22F11H5-hz1, 27H8H3hz1)以及参照抗体(BM)分别与毒素-Linker (B81，即，DL-01 分子)的 ADC 偶联物。

在将抗 TF 人源化抗体与毒素-Linker (B81，即，DL-01 分子)偶联前后，按照与实施例 I 中所述相似的方法，通过基于抗原蛋白的 ELISA 测定抗体亲和力的变化。

实验结果如表 11 和图 6A 和 6B 所示，4 种人源化抗体在偶联 B81 后，亲和力没有明显变化。

表 11. 人源化抗体 ADC 偶联前后亲和力检测

样品编号	EC50 (ng/mL)
2B12B10-hz1	6.65
2B12B10-hz1-B81	3.76
30G11B7-hz1	7.68
30G11B7-hz1-B81	7.75
22F11H5-hz1	5.15
22F11H5-hz1-B81	8.83
27H8H3-hz1	3.13
27H8H3-hz1-B81	3.43

实施例 2.2 ADC 体外杀伤活性检测

胰酶消化收集 TF 阳性肿瘤细胞 KYSE520 细胞，用 RPMI1640+2% FBS 重悬细胞，每孔铺 2000 个细胞；用 RPMI1640+2% FBS 梯度稀释待测 ADC，50 μg/mL 起始，3 倍稀释，11 个浓度点；将稀释后的 ADC 加入板中，37℃孵育 120 小时；孵育完成后，加入 CCK8 试剂，20 μL/孔，反应 2-4 小时，酶标仪 450 nm 读数并导入 Graphpad Prism 进行曲线拟合。

实验结果如图 7A 和 7B 所示，2B12B10-hz1、30G11B7-hz1、22F11H5-hz1 及 27H8H3-hz1 偶联 B81 之后，均能够有效杀伤 KYSE520 细胞，且杀伤 IC50 值与参照抗体偶联的 ADC 基本相当。

实施例 2.3 ADC 体内药效

为验证抗 TF 人源化 ADC 药物的体内药效，评价受试药物在 KYSE520 皮下异种移植雌性 Balb/c Nude 小鼠模型中的抗肿瘤作用，购买 5-6 周龄的雌性 Balb/c Nude 小鼠。将生长至对数生长期的 KYSE520 细胞采用胰酶消化及 PBS 重悬，每只小鼠皮下接种 $5*10^6$ 细胞。待肿瘤生长至 250 mm^3 大小，采用静脉给药，每周一次，每次 1 mg/kg 或 3 mg/kg，给药待测 ADC，具体方案如下表 13 和 14 所示。本实验的主要观察指标为：1) TGI (%)，计算公式为：TGI（%）=（1-T/C）×100%（T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积）2) 试验终点肿瘤体积大小照片、肿瘤重量。3) ADC 药物对小鼠体重的影响。共开展了 2 次实验。

第一次实验的给药方案和结果如表 12 和图 8 所示，22F11H5-hz1 和 30G11B7 偶联 B81 之后，在小鼠体内均有良好的抑瘤效果，3 mg/kg 剂量下 TGI 与 BM-B81 相当，1 mg/kg 剂量下两者均优于 BM-B81。小鼠体重变化情况如图 9 所示，表明整个给药过程中 2 个 ADC 对小鼠体重无影响。

表 12. 抗 TF ADC 体内药效

分组	小鼠数量	样品	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药频率	TGI (%)
1	5	生理盐水	/	i.v.	QW*3	/
2	5	IgG-B81	3	i.v.	QW*3	18.3
3	5	BM-B81	3	i.v.	QW*3	91.5
4	5	BM-B81	1	i.v.	QW*3	56.9
5	5	30G11B7-hz1-B81	3	i.v.	QW*3	91.8
6	5	30G11B7-hz1-B81	1	i.v.	QW*3	62.6
7	5	22F11H5-hz1-B81	3	i.v.	QW*3	91.4
8	5	22F11H5-hz1-B81	1	i.v.	QW*3	74.7

第二次实验的实验方案和结果如表 13 和图 10 所示，2B12B10-hz1 和 27H8H3-hz1 偶联 B81 之后，在小鼠体内均有良好的抑瘤效果，1 mg/kg 剂量下两者均优于 BM-B81。小鼠体重变化情况如图 11 所示，表明 2 个 ADC 对小鼠体重无影响。

表 13. 抗 TF ADC 体内药效

分组	小鼠数量	样品	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药频率	TGI (%)
1	5	生理盐水	/	*i.v.*	QW*3	/
2	5	BM-B81	1	*i.v.*	QW*3	18.5
3	5	2B12B10-B81	1	*i.v.*	QW*3	41.4
4	5	27H8H3-hz1-B81	1	*i.v.*	QW*3	52.8

序列表：

SEQ ID NO:	描述	序列
1	2B12B10-hz1 重链可变区（VH）序列	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDSGMHW VRQAPGKGLEWVAYISRDSNTIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGRRYYGDYFDY WGQGTLVTVSS
2	2B12B10-hz1 轻链可变区（VL）序列	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQRVTNYLHWY QQKPGQSPRLLIKYASQSISGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYFCQQSYNWPLTFGQGTKVEIK
3	30G11B7-hz1 重链可变区（VH）序列	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMFW VRQAPGKGLEWVAYISRGSTTIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCTRRYYGDYFDYW GQGTLVTVSS
4	30G11B7-hz1 轻链可变区（VL）序列	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSISNYLHWYQ QKPDQSPKLLIKYASQSISGVPSRFSGSGSGTDFTLTI NSLEAEDAATYFCQQSYNWPLTFGQGTKVEIK
5	22F11H5-hz1 重链可变区（VH）序列	QVQLVQSGAEVKQPGASVKVSCKASGYTFTTYWM HWVRQAPGQGLEWMGMIDPSDSYTTYAQKFQGRV TLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSGPGLF AYWGQGTLVTVSS
6	22F11H5-hz1 轻链可变区（VL）序列	DIQETQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYHTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLT ISSLQPEDFATYYCQQGNMPPYTFGQGTKVEIK
7	27H8H3-hz1 重链可变区（VH）序列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWM HWVRQAPGQGLEWMGMIDPSDSYTSYAQKFQGRVT LTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGSGPGLFA YWGQGTLVTVSS
8	27H8H3-hz1 轻链可变区（VL）序列	DIQETQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSVSGTDFTLTI SSLQPEDFATYFCQQGNTLPYTFGQGTKVEIK
9	2B12B10-hz1 重链 CDR1_Chothia	GFAFSDS
10	2B12B10-hz1 重链 CDR2_Chothia	SRDSNT
11	2B12B10-hz1 重链 CDR3_Chothia	RYYGDYFDY
12	2B12B10-hz1 重链 CDR1_Abm	GFAFSDSGMH
13	2B12B10-hz1 重链 CDR2_ Abm	YISRDSNTIY
14	2B12B10-hz1 重链 CDR3_ Abm	RYYGDYFDY
15	2B12B10-hz1 重链 CDR1_Kabat	DSGMH
16	2B12B10-hz1 重链 CDR2_Kabat	YISRDSNTIYYADSVKG
17	2B12B10-hz1 重链 CDR3_Kabat	RYYGDYFDY

18	2B12B10-hz1 重链 CDR1_IMGT	GFAFSDSG
19	2B12B10-hz1 重链 CDR2_IMGT	ISRDSNTI
20	2B12B10-hz1 重链 CDR3_IMGT	GRRYYGDYFDY
21	2B12B10-hz1 轻链 CDR1_Chothia	RASQRVTNYLH
22	2B12B10-hz1 轻链 CDR2_Chothia	YASQSIS
23	2B12B10-hz1 轻链 CDR3_Chothia	QQSYNWPLT
24	2B12B10-hz1 轻链 CDR1_Abm	RASQRVTNYLH
25	2B12B10-hz1 轻链 CDR2_ Abm	YASQSIS
26	2B12B10-hz1 轻链 CDR3_ Abm	QQSYNWPLT
27	2B12B10-hz1 轻链 CDR1_Kabat	RASQRVTNYLH
28	2B12B10-hz1 轻链 CDR2_Kabat	YASQSIS
29	2B12B10-hz1 轻链 CDR3_Kabat	QQSYNWPLT
30	2B12B10-hz1 轻链 CDR1_IMGT	QRVTNY
31	2B12B10-hz1 轻链 CDR2_IMGT	YAS
32	2B12B10-hz1 轻链 CDR3_IMGT	QQSYNWPLT
33	30G11B7-hz1 重链 CDR1_Chothia	GFTFSDY
34	30G11B7-hz1 重链 CDR2_Chothia	SRGSTT
35	30G11B7-hz1 重链 CDR3_Chothia	RYYGDYFDY
36	30G11B7-hz1 重链 CDR1_Abm	GFTFSDYGMF
37	30G11B7-hz1 重链 CDR2_ Abm	YISRGSTTIY
38	30G11B7-hz1 重链 CDR3_ Abm	RYYGDYFDY
39	30G11B7-hz1 重链 CDR1_Kabat	DYGMF
40	30G11B7-hz1 重链 CDR2_Kabat	YISRGSTTIYYADSVKG
41	30G11B7-hz1 重链 CDR3_Kabat	RYYGDYFDY
42	30G11B7-hz1 重链 CDR1_IMGT	GFTFSDYG
43	30G11B7-hz1 重链 CDR2_IMGT	ISRGSTTI
44	30G11B7-hz1 重链 CDR3_IMGT	TRRYYGDYFDY
45	30G11B7-hz1 轻链 CDR1_Chothia	RASQSISNYLH
46	30G11B7-hz1 轻链 CDR2_Chothia	YASQSIS
47	30G11B7-hz1 轻链 CDR3_Chothia	QQSYNWPLT
48	30G11B7-hz1 轻链 CDR1_Abm	RASQSISNYLH
49	30G11B7-hz1 轻链 CDR2_ Abm	YASQSIS
50	30G11B7-hz1 轻链 CDR3_ Abm	QQSYNWPLT

51	30G11B7-hz1 轻链 CDR1_Kabat	RASQSISNYLH
52	30G11B7-hz1 轻链 CDR2_Kabat	YASQSIS
53	30G11B7-hz1 轻链 CDR3_Kabat	QQSYNWPLT
54	30G11B7-hz1 轻链 CDR1_IMGT	QSISNY
55	30G11B7-hz1 轻链 CDR2_IMGT	YAS
56	30G11B7-hz1 轻链 CDR3_IMGT	QQSYNWPLT
57	22F11H5-hz1 重链 CDR1_Chothia	GYTFTTY
58	22F11H5-hz1 重链 CDR2_Chothia	DPSDSY
59	22F11H5-hz1 重链 CDR3_Chothia	GSGPGLFAY
60	22F11H5-hz1 重链 CDR1_Abm	GYTFTTYWMH
61	22F11H5-hz1 重链 CDR2_ Abm	MIDPSDSYTT
62	22F11H5-hz1 重链 CDR3_ Abm	GSGPGLFAY
63	22F11H5-hz1 重链 CDR1_Kabat	TYWMH
64	22F11H5-hz1 重链 CDR2_Kabat	MIDPSDSYTTYAQKFQG
65	22F11H5-hz1 重链 CDR3_Kabat	GSGPGLFAY
66	22F11H5-hz1 重链 CDR1_IMGT	GYTFTTYW
67	22F11H5-hz1 重链 CDR2_IMGT	IDPSDSYT
68	22F11H5-hz1 重链 CDR3_IMGT	ARGSGPGLFAY
69	22F11H5-hz1 轻链 CDR1_Chothia	RASQDIRNYLN
70	22F11H5-hz1 轻链 CDR2_Chothia	HTSRLQS
71	22F11H5-hz1 轻链 CDR3_Chothia	QQGNMPPYT
72	22F11H5-hz1 轻链 CDR1_Abm	RASQDIRNYLN
73	22F11H5-hz1 轻链 CDR2_ Abm	HTSRLQS
74	22F11H5-hz1 轻链 CDR3_ Abm	QQGNMPPYT
75	22F11H5-hz1 轻链 CDR1_Kabat	RASQDIRNYLN
76	22F11H5-hz1 轻链 CDR2_Kabat	HTSRLQS
77	22F11H5-hz1 轻链 CDR3_Kabat	QQGNMPPYT
78	22F11H5-hz1 轻链 CDR1_IMGT	QDIRNY
79	22F11H5-hz1 轻链 CDR2_IMGT	HTS
80	22F11H5-hz1 轻链 CDR3_IMGT	QQGNMPPYT
81	27H8H3-hz1 重链 CDR1_Chothia	GYTFTTY
82	27H8H3-hz1 重链 CDR2_Chothia	DPSDSY
83	27H8H3-hz1 重链 CDR3_Chothia	GSGPGLFAY

84	27H8H3-hz1 重链 CDR1_Abm	GYTFTTYWMH
85	27H8H3-hz1 重链 CDR2_ Abm	MIDPSDSYTS
86	27H8H3-hz1 重链 CDR3_ Abm	GSGPGLFAY
87	27H8H3-hz1 重链 CDR1_Kabat	TYWMH
88	27H8H3-hz1 重链 CDR2_Kabat	MIDPSDSYTSYAQKFQG
89	27H8H3-hz1 重链 CDR3_Kabat	GSGPGLFAY
90	27H8H3-hz1 重链 CDR1_IMGT	GYTFTTYW
91	27H8H3-hz1 重链 CDR2_IMGT	IDPSDSYT
92	27H8H3-hz1 重链 CDR3_IMGT	TRGSGPGLFAY
93	27H8H3-hz1 轻链 CDR1_Chothia	RASQGISNYLN
94	27H8H3-hz1 轻链 CDR2_Chothia	HTSRLHS
95	27H8H3-hz1 轻链 CDR3_Chothia	QQGNTLPYT
96	27H8H3-hz1 轻链 CDR1_Abm	RASQGISNYLN
97	27H8H3-hz1 轻链 CDR2_ Abm	HTSRLHS
98	27H8H3-hz1 轻链 CDR3_ Abm	QQGNTLPYT
99	27H8H3-hz1 轻链 CDR1_Kabat	RASQGISNYLN
100	27H8H3-hz1 轻链 CDR2_Kabat	HTSRLHS
101	27H8H3-hz1 轻链 CDR3_Kabat	QQGNTLPYT
102	27H8H3-hz1 轻链 CDR1_IMGT	QGISNY
103	27H8H3-hz1 轻链 CDR2_IMGT	HTS
104	27H8H3-hz1 轻链 CDR3_IMGT	QQGNTLPYT
105	IgG1 Kappa CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
106	IgG1 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
107	Benchmark 重链可变区(VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS

		WVRQAPGKGLEWVSSISGSGDYTYYTDSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPWGY YLDSWGQGTLVTVSS
108	Benchmark 轻链可变区	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK

权利要求

1. 具有下式(I)的抗体-药物偶联物(ADC)或其可药用盐或溶剂化物：

$Ab-[L-D]_q$ (I)

其中，

Ab 表示抗 TF 抗体，

L 表示连接体，

D 表示细胞毒性或细胞抑制性药物，例如，拓扑异构酶 I 抑制剂，且

q=1-20，例如，q=1-10、1-8、3-8、4-8、或 6-8，

其中，所述 Ab 包含：

-SEQ ID NO: 1 的重链可变区(VH)序列的三个 CDR 和 SEQ ID NO: 2 的轻链可变区(VL)序列的三个 CDR，

-SEQ ID NO: 3 的重链可变区(VH)序列的三个 CDR 和 SEQ ID NO: 4 的轻链可变区(VL)序列的三个 CDR，

-SEQ ID NO: 5 的重链可变区(VH)序列的三个 CDR 和 SEQ ID NO: 6 的轻链可变区(VL)序列的三个 CDR，或者

-SEQ ID NO: 7 的重链可变区(VH)序列的三个 CDR 和 SEQ ID NO: 8 的轻链可变区(VL)序列的三个 CDR，

其中，所述 CDR 根据 Chothia、AbM、Kabat、IMGT 或其任意组合进行定义。

2. 根据权利要求 1 的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，所述 Ab 包含 3 个重链互补决定区(HCDR)以及 3 个轻链互补决定区(LCDR)，其中：

（i）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列或由其组成；或

（ii）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:56 的氨基酸序列或由其组成；或

（iii）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:66 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:67 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:68 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:78 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:79 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:80 的氨基酸序列或由其组成；或

（iv）根据 IMGT 定义，HCDR1 包含 SEQ ID NO:90 的氨基酸序列或由其组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO:91 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:92 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:102 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:103 的氨基酸序列或由其组成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:104 的氨基酸序列或由其组成。

3. 根据权利要求 1-2 任一项的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，所述 Ab 包含：

-包含 SEQ ID NO: 1 或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列的重链可变区；和包含 SEQ ID NO: 2 或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区，或

-包含 SEQ ID NO: 3 或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性

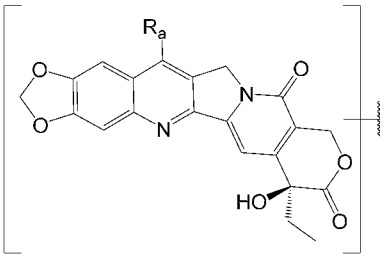
的氨基酸序列的重链可变区；和包含 SEQ ID NO: 4 或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区，或

-包含 SEQ ID NO: 5 或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列的重链可变区；和包含 SEQ ID NO: 6 或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区，或

-包含 SEQ ID NO: 7 或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列的重链可变区；和包含 SEQ ID NO: 8 或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区，

优选地，所述 Ab 为 IgG1 抗体。

4. 根据权利要求 1-3 任一项的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，D 表示喜树碱类药物，优选地，FL118 或其衍生物，例如，包含以下结构的喜树碱类药物：



其中，R_a 选自：

氢；

C_3-C_8 环烷基；

苯基；

任选被选自以下的取代基取代的 C_1-C_8 烷基：卤素、羟基、任选地被 NH_2、$NH(C_1$-C_4 烷基)和 $N(C_1$-C_4 烷基)$_2$ 取代的 C_1-C_4 烷氧基、C_3-C_8 环烷基、杂环烷基、苯基、NR^1R^2，

其中 R^1 和 R^2 彼此独立地选自

氢；

任选地被选自以下的取代基取代的 C_1-C_8 烷基：羟基、氨基、被一个或两个 C_1-C_4 烷基取代的氨基、被一个或两个 C_1-C_4 羟烷基取代的氨基、被(C_1-C_4 羟烷基)和(C_1-C_4 烷基)取代的氨基；

被 1 或 2 个 C_3-C_{10} 环烷基、C_3-C_{10} 杂环烷基、苯基或杂芳基取代的 C_1-C_4 烷基；

C_3-C_{10} 环烷基；

C_3-C_{10} 杂环烷基

C_2-C_6 杂烷基；

杂芳基；

任选卤代的苯基；

任选被羟基或氨基取代的 C_1-C_8 烷基-C(=O)-；

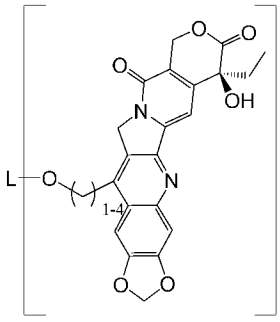
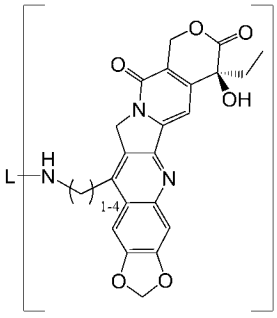
或者，R^1 和 R^2 与各自连接的氮原子组合形成具有 0 至 3 个取代基的 5-、6-或 7-元杂环，所述取代基选自卤素、C_1-C_4 烷基、OH、C_1-C_4 烷氧基、NH_2、$NH(C_1$-C_4 烷基)和 $N(C_1$-C_4 烷基)$_2$，

其中环烷基、杂环烷基、苯基、杂芳基在每次出现时各自独立地任选被 0-3 个选自以下的取代基取代：OH、C_1-C_4 烷基、C_1-C_4 烷氧基、NH_2、$NH(C_1$-C_4 烷基)和 $N(C_1$-C_4 烷基)$_2$ 取代，

优选地，R_a 为-C_1-C_4 烷基-OH、-C_1-C_4 烷基-O-C_1-C_4 烷基-NH_2、或-C_1-C_4 烷基-NH_2，

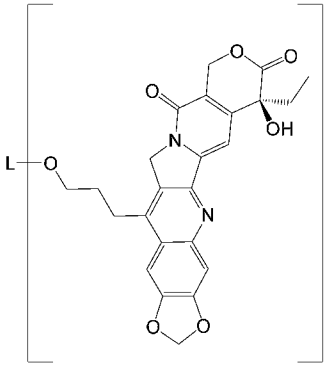
其中，优选地，所述药物 D 单元通过其上存在的羟基或氨基基团，与连接体 L 单元连接。

5. 根据权利要求 1-3 任一项的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，式(I)中的 L-D 单元包含以下结构：

或 ，

优选地，式(I)中的 L-D 单元包含以下结构：



。

6. 根据权利要求 1-5 任一项的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，L 为含肽连接体，并包含下式(II)的结构：

-Z-Y-M-， (II)

其中

Z 为与 Ab 连接的连接基，

Y 是 2-5 个氨基酸的肽，优选二肽、三肽或四肽，

M 不存在，或是用于与药物 D 连接的间隔基。

7. 根据权利要求 6 的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，Y 为从 N 端到 C 端具有下式氨基酸序列的肽；

Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Xaa_5，

其中 Xaa_1 不存在，或为选自缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸和谷氨酸的氨基酸；

Xaa_2 为选自苯丙氨酸、亮氨酸、和缬氨酸的氨基酸，优选缬氨酸；

Xaa_3 为未取代的或取代的赖氨酸；

Xaa_4 为选自亮氨酸、甘氨酸和丙氨酸的氨基酸；

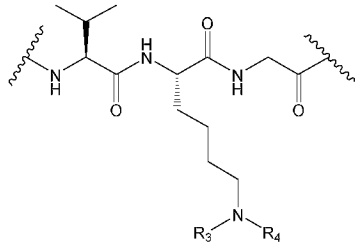
Xaa_5 不存在，或为选自甘氨酸和丙氨酸的氨基酸；

其中，所述氨基酸序列的 N 端与 Z 连接，且 C 端与 M 连接(如果 M 存在的话)或直接与药物 D 连接，

优选地，Xaa_3 为 ε -氨基被 C_1-C_3 烷基单取代或二取代的赖氨酸，

再优选地，Y 为选自以下的肽：Phe-Lys-Gly、Leu-lys-Gly、Gly-Val-Lys-Gly、Val-Lys-Gly-Gly、Val-Lys-Gly、Val-Lys-Ala、Val-Lys-Leu，其中 Lys 残基为未取代的或被 C_1-C_3 烷基单取代或二取代的赖氨酸。

8. 根据权利要求 6-7 任一项的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，Y 为



其中，R_3和R_4各自独立地选自甲基、乙基和丙基，

优选地，R_3和R_4相同，更优选地，R_3和R_4各自独立地为丙基，

其中，左侧波浪线表示与Z连接的位置；右侧波浪线表示与M连接的位置。

9. 根据权利要求6-8的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，Z具有以下结构：

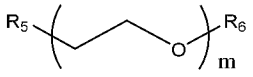
$-Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-$，

其中Z_1为Ab中的硫原子，

Z_2为5-10元杂环基，优选地含1或2个选自N, S和O的杂原子；

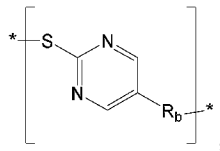
Z_3选自键、-C(=O)-、$-C_1-C_{10}$亚烷基-C(=O)-、$-C_3-C_{10}$亚炔基-C(=O)-、$-C_3-C_{10}$亚烯基-C(=O)-、$-C_1-C_{10}$亚杂烷基-C(=O)-、$-C_3-C_8$亚环烷基-C(=O)-、 -O-C_1-C_8亚烷基-C(=O)-、 -亚芳基-C(=O)-、$-C_1-C_{10}$亚烷基-亚芳基-C(=O)-、-亚芳基-C_1-C_{10}亚烷基-C(=O)-、 $-C_1-C_{10}$亚烷基-C_3-C_8亚环烷基-C(=O)-、 $-C_3-C_8$亚环烷基-C_1-C_{10}亚烷基-C(=O)-、 $-C_3-C_8$亚杂环基-C(=O)-、 $-C_1-C_{10}$亚烷基-C_3-C_8亚杂环基-C(=O)-、$-C_3-C_8$亚杂环基-C_1-C_{10}亚烷基-C(=O)-，

Z_4是键或是下式表示的PEG单元，



，其中，R_5选自C_{1-4}亚烷基、-NH-、-NH-C_{1-4}亚烷基-杂芳基-，其中杂芳基为5元或6元的含氮杂芳基，优选三唑基；R_6为-C(=O)-、C_{1-4}亚烷基、C_{1-4}亚烷基-C(=O)-、-NH-C(=O)-(CH_2OCH_2)-C(=O)-、C_{1-4}亚烷基-NH-C(=O)-(CH_2OCH_2)-C(=O)-，其中m为2-12的整数，例如m=2, 4, 6, 或8，

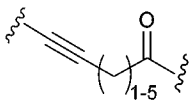
优选地，Z具有以下结构：



，

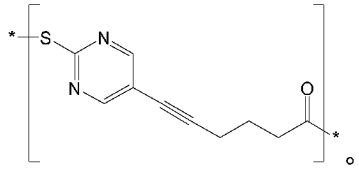
其中，R_b是亚炔基-C(=O)-或亚烯基-C-(=O)-、

优选地，R_b是



其中，左侧波浪线表示与抗体(Ab)连接的位置；右侧波浪线表示与Y连接的位置；

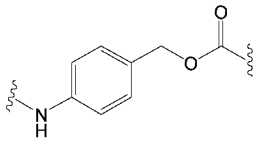
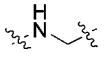
更优选地，Z具有结构：



。

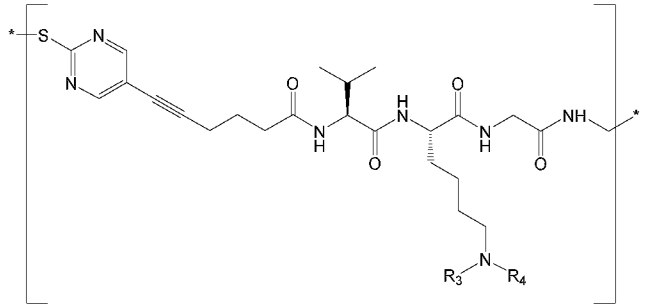
10. 根据权利要求6-9的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，M不存在、或是氨基-C_1-

C_3亚烷基，例如，-NH-CH_2-，或氨基-苯基-C_1-C_3亚烷基-O-C(=O)-，优选地M为：


或

，

其中左侧波浪线表示与Y连接，右侧波浪线表示与药物D单元连接。

11. 根据权利要求6-10的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，L为包含如下结构的连接体：

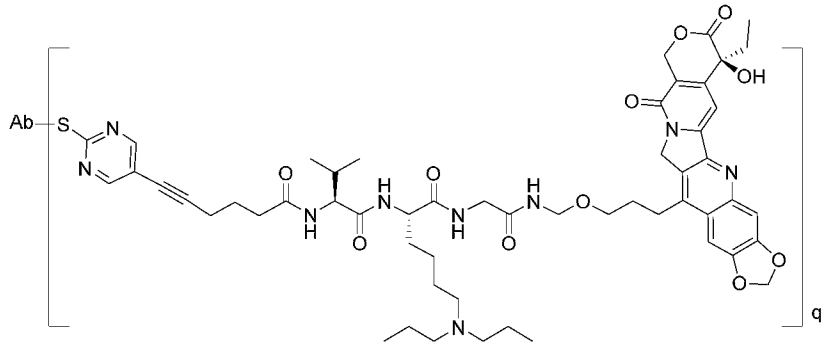


其中，R_3和R_4各自独立地选自甲基、乙基、丙基。

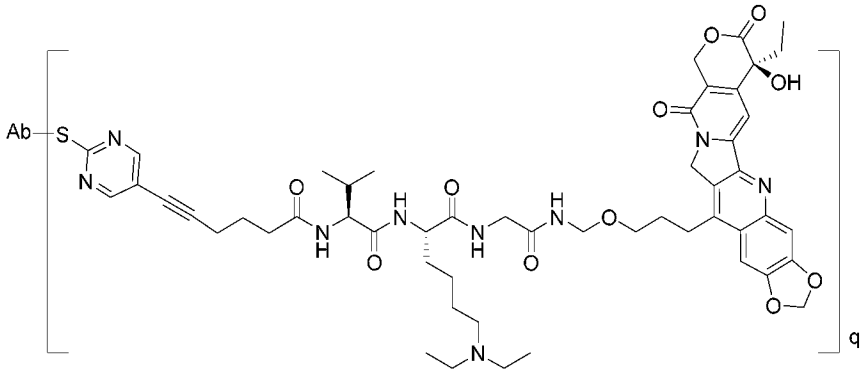
12. 根据权利要求11的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，R_3和R_4均为甲基；或R_3和R_4均为乙基；或R_3和R_4均为丙基。

13. 权利要求1的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，所述式I的L-D单元通过与Ab的轻链和/或重链的半胱氨酸的巯基形成硫醚键，从而与抗体连接。

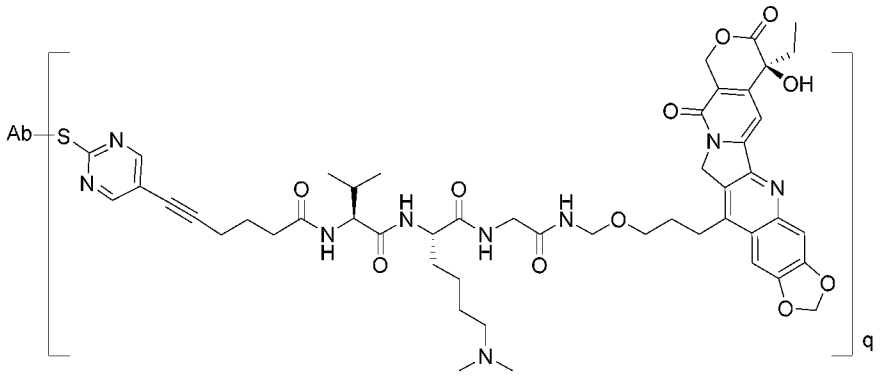
14. 根据权利要求1的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物，其中，所述ADC选自：



或



或



，

其中，q 为 1-8 的平均 DAR 值，优选地，q 为大约 2、大约 3、大约 4、大约 5、大约 6，大约 7 或大约 8，

优选地，所述 Ab 为 IgG1 全长抗体，且包含 SEQ ID NO: 7 的重链可变区(VH)序列的三个 CDR 和 SEQ ID NO: 8 的轻链可变区(VL)序列的三个 CDR；或更优选地包含 SEQ ID NO: 7 的重链可变区和包含 SEQ ID NO: 8 的轻链可变区。

15．药物组合物，其包含前述权利要求 1-14 任一项的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物以及任选地药用辅料。

16．结合组织因子(TF)的抗体或其抗原结合片段，其包含

（i）如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列，或者

（ii）如 SEQ ID NO:3 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:4 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列，或者

（iii）如 SEQ ID NO:5 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:6 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列，或者

（iv）如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，以及如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列，

优选地，其中所述 CDR 根据 Chothia、Abm、Kabat 或 IMGT 或其组合进行定义。

17. 权利要求 16 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中：

（i）重链可变区包含如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，以及轻链可变区包含如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或者

（ii）重链可变区包含如 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，以及轻链可变区包含如 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或者

（iii）重链可变区包含如 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，以及轻链可变区包含如 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或者

（iv）重链可变区包含如 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，以及轻链可变区包含如 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或与其具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列;

优选地，

其中所述抗体或其抗原结合片段包含选自以下的重链可变区和轻链可变区：

（i）包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的轻链可变区，或者

（ii）包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列的轻链可变区，或者

（iii）包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO：6 所示的氨基酸序列的轻链可变区，或者，

（iv）包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO：8 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

18．权利要求 16-17 任一项的抗体或其抗原结合片段，其中

所述抗体包含 Fc 区，优选地人 Fc 区；或者

所述抗体是 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 抗体，且优选地具有人 IgG1 重链恒定区；或者

所述抗原结合片段是选自以下的抗体片段：Fab、Fab’、Fab’-SH、Fv、单链抗体、scFv、scFab、二硫键连接的 scFv, 二硫键连接的 scFab、(Fab’)2 片段或线性抗体。

19．权利要求 16-18 任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是鼠源抗体、或嵌合抗体、或人源化抗体，优选地为人源化抗体。

20．一种分离的核酸，其编码权利要求 16-19 任一项的抗 TF 抗体或其抗原结合片段。

21．一种载体，其包含权利要求 20 的核酸，优选地所述载体是表达载体。

22．一种宿主细胞，其包含权利要求 20 的核酸或权利要求 21 的载体，优选地，所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

23．包含权利要求 16-19 中任一项的抗体或其抗原结合片段的免疫缀合物或免疫融合物或多特异性抗体。

24．药物组合物，其包含前述权利要求 16-19 任一项的抗体或其抗原结合片段或权利要求 23 的免疫缀合物或免疫融合物或多特异性抗体，以及任选地药用辅料。

25．权利要求 16-19 任一项的抗体或其抗原结合片段或权利要求 23 的免疫缀合物或免疫融合物或多特异性抗体的用途，用于：在体内或在体外，

(1) 靶向性结合 TF 阳性肿瘤细胞;

(2) 阻断 TF 阳性肿瘤细胞中由 TF/VIIa 介导的下游信号通路；或

(3) 抑制和/或杀伤 TF 阳性肿瘤细胞，

或用于制备在前述任一项中使用的药物。

26. 在受试者中预防或治疗 TF 阳性肿瘤的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的前述权利要求 1-14 任一项的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物、或权利要求 16-19 任一项的抗 TF 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 23 的免疫缀合物或免疫融合物或多特异性抗体、或权利要求 15 或 24 的药物组合物，优选地，所述肿瘤是宫颈癌、胰腺癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、头颈癌、胃癌，包括原发性或晚期或转移性癌症。

27. 检测样品中 TF 的方法，所述方法包括

(a)将样品与前述权利要求 16-19 中任一项的抗体或其抗原结合片段接触；和

(b)检测所述抗体或其抗原结合片段和 TF 间的复合物的形成；任选地，抗体是被可检测地标记的。

通过ELISA检测人源化抗体与人TF-His亲和力

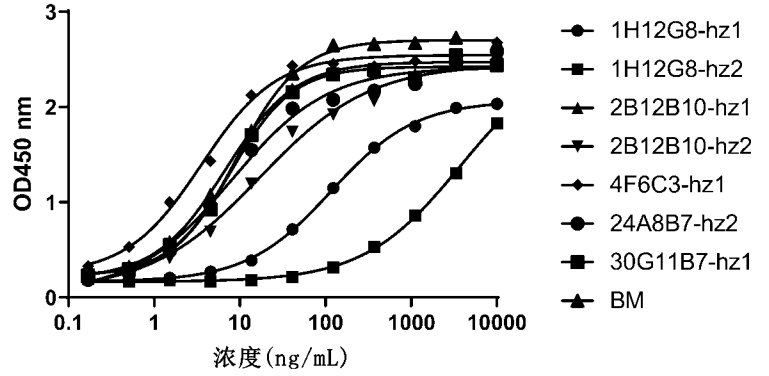


图 1A

通过ELISA检测人源化抗体与食蟹猴TF-His亲和力

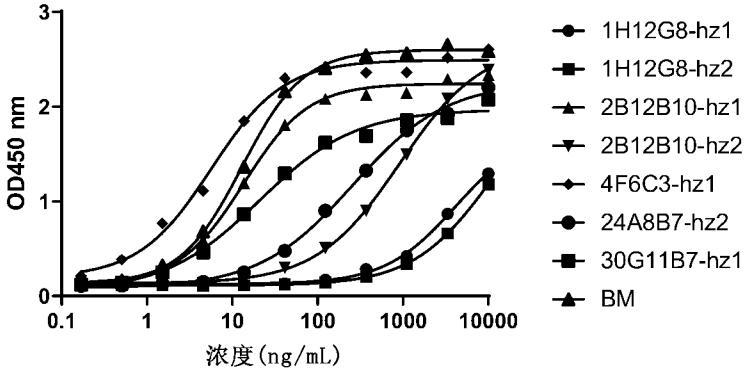


图 1B

通过ELISA检测人源化抗体与人TF-His亲和力

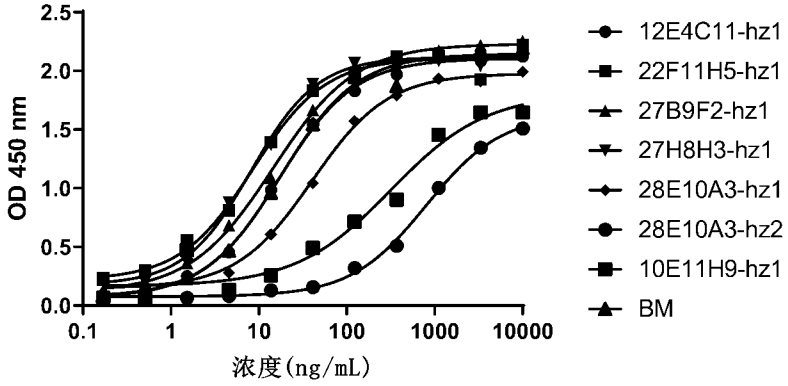


图 1C

通过ELISA检测人源化抗体与食蟹猴TF-His亲和力

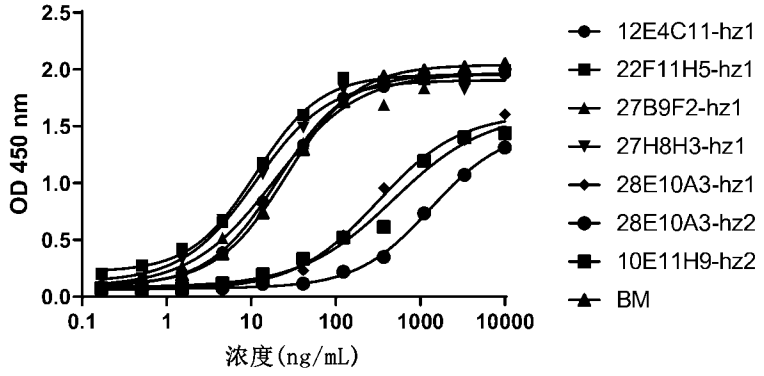


图 **1D**

通过流式检测人源化抗体与NCI-H358细胞亲和力

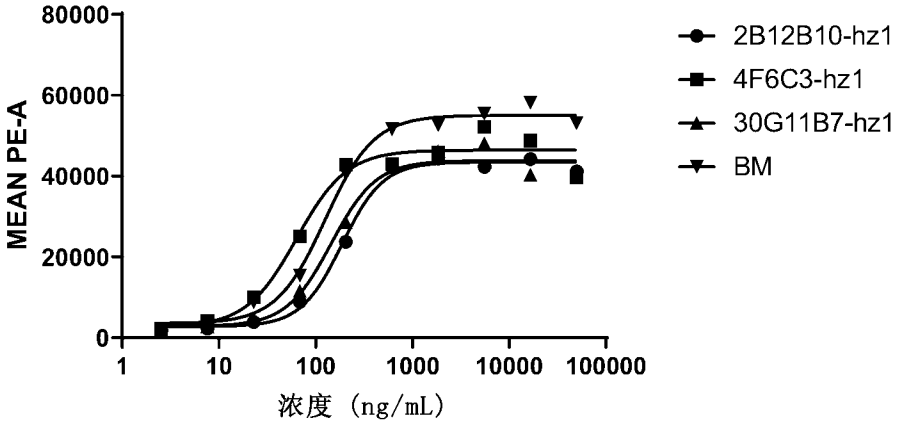


图 **2A**

通过流式检测人源化抗体与NCI-H358细胞亲和力

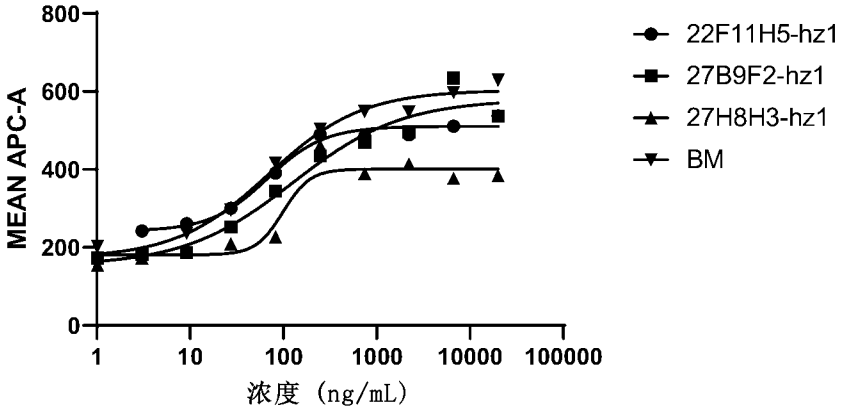


图 **2B**

通过流式检测人源化抗体与**KYSE520**细胞亲和力

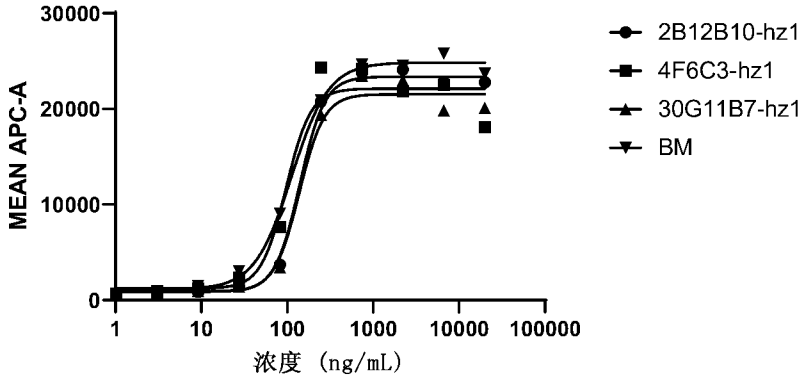


图 **2C**

通过流式检测人源化抗体与**KYSE520**细胞亲和力

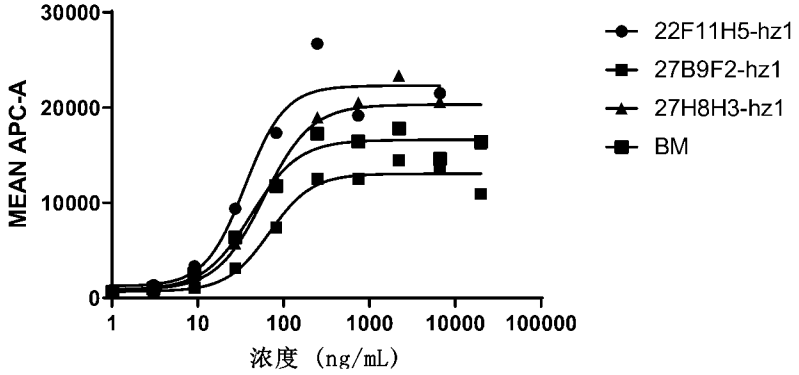


图 **2D**

IL-8 释放抑制实验

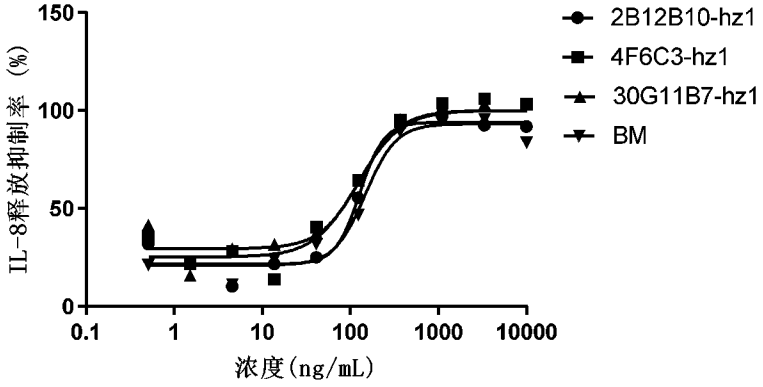


图 **3A**

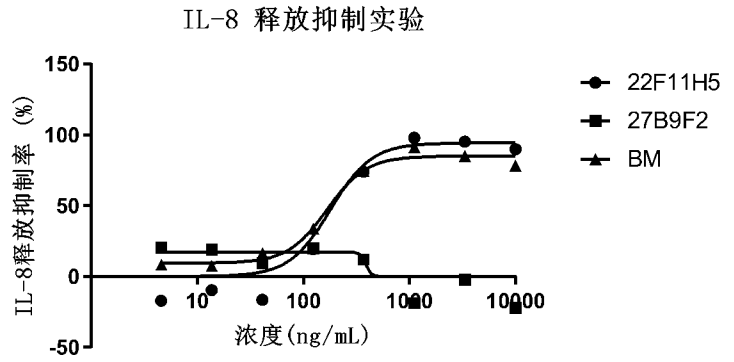


图 3B

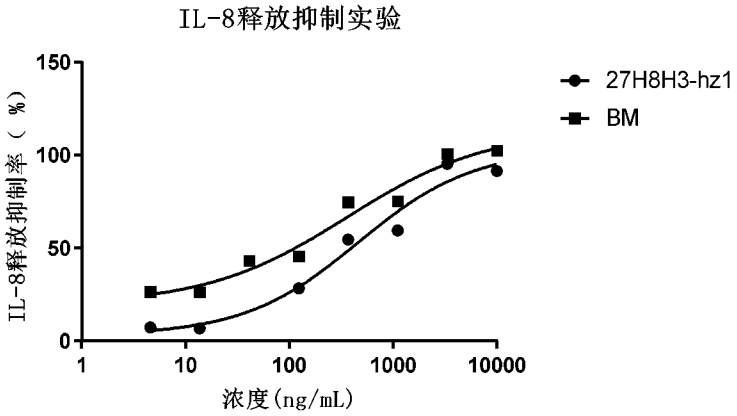


图 3C

人源化抗体对凝血的影响（2 mM Ca^{2+}，50 ug/mL 抗体浓度）

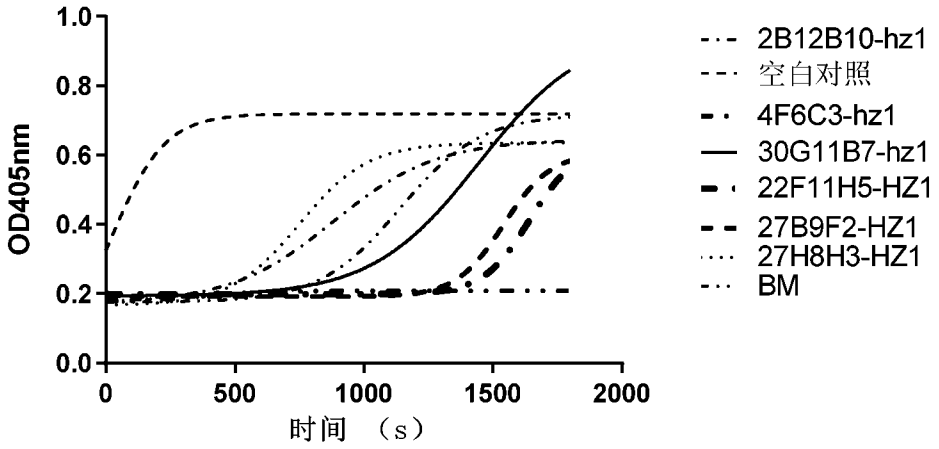


图 4A

人源化抗体对凝血的影响（5 mM Ca^{2+}，20 ug/mL 抗体浓度）

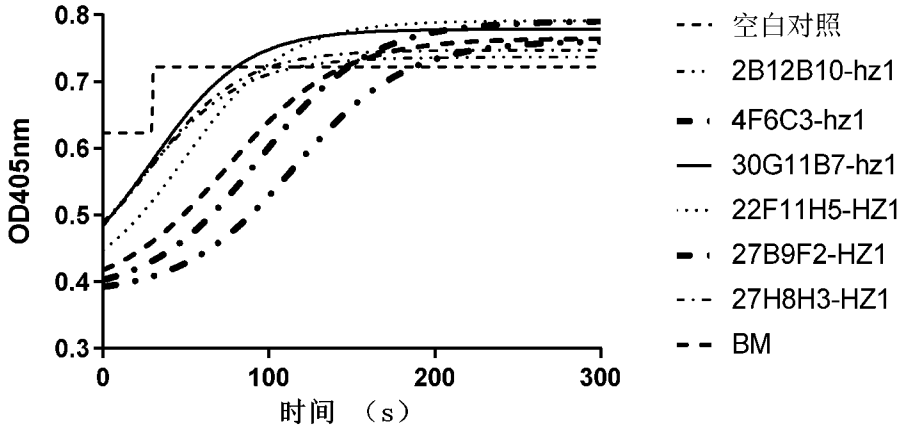


图 4B

人源化抗体血清稳定性检测

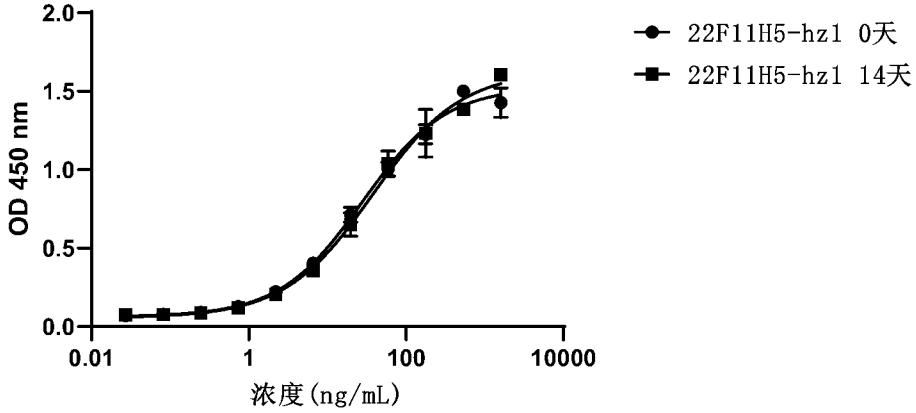


图 5A

人源化抗体血清稳定性检测

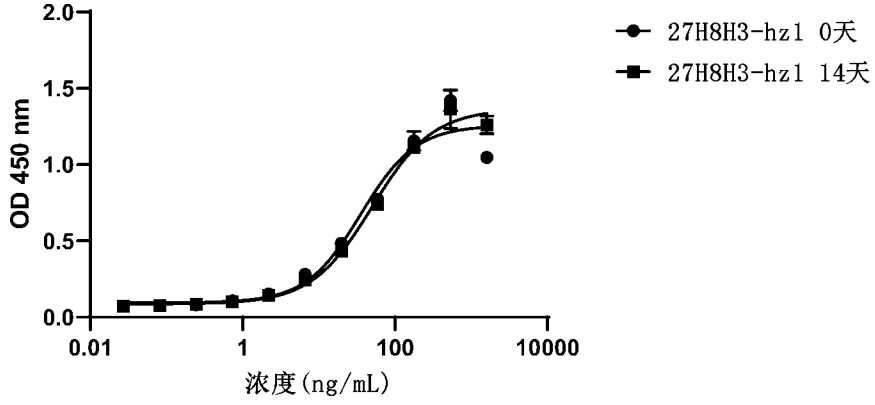
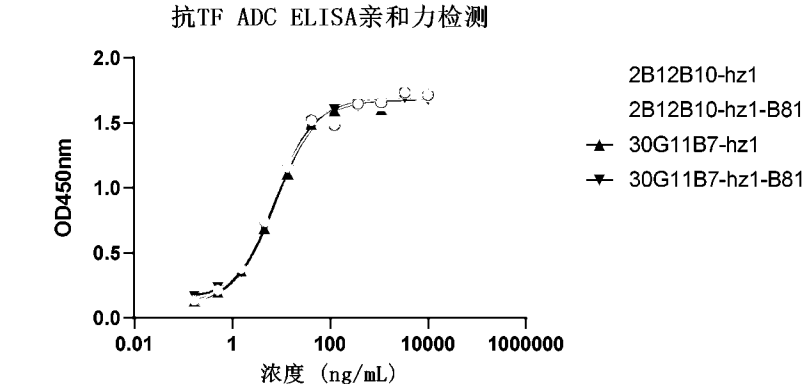
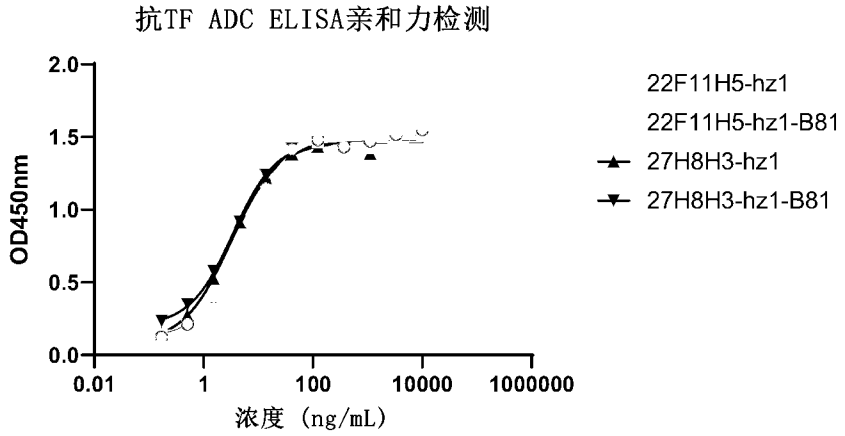


图 5B



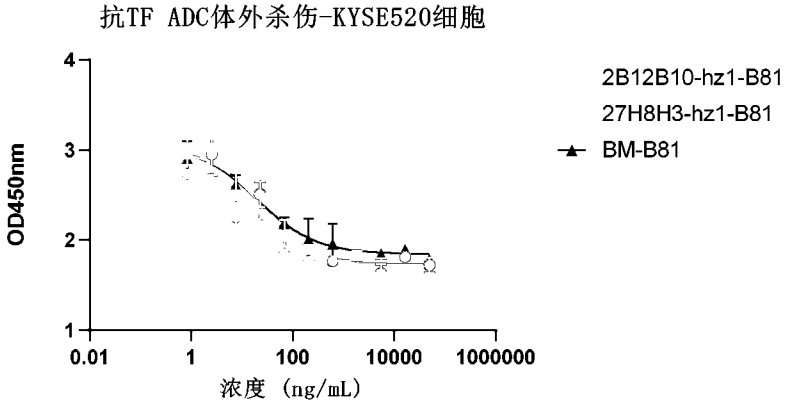
	2B12B10-hz1	2B12B10-hz1-B81	30G11B7-hz1	30G11B7-hz1-B81
EC50	6.649	3.763	7.682	7.752

图 6A



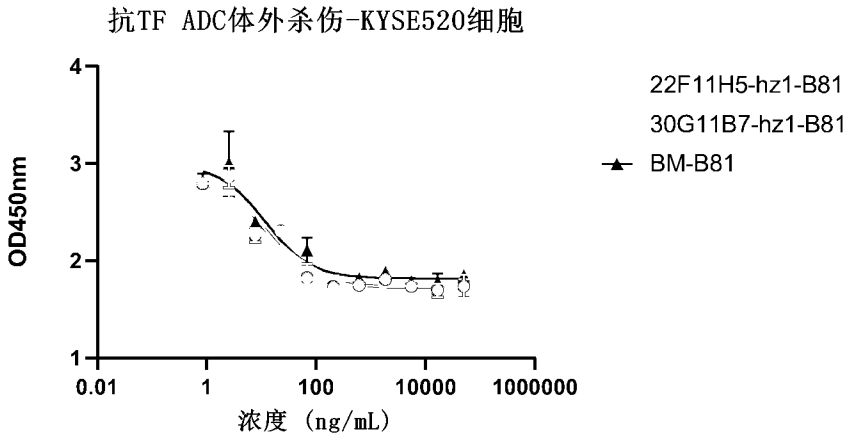
	22F11H5-hz1	22F11H5-hz1-B81	27H8H3-hz1	27H8H3-hz1-B81
EC50	5.148	8.825	3.130	3.432

图 6B



	2B12B10-hz1-B81	27H8H3-hz1-B81	BM-B81
HillSlope	-1.098	-0.8976	-0.7533
IC50	19.41	26.27	20.04

图 7A



	22F11H5-hz1-B81	30G11B7-hz1-B81	BM-B81
HillSlope	-1.016	-0.7233	-1.038
IC50	11.53	12.01	11.72

图 **7B**

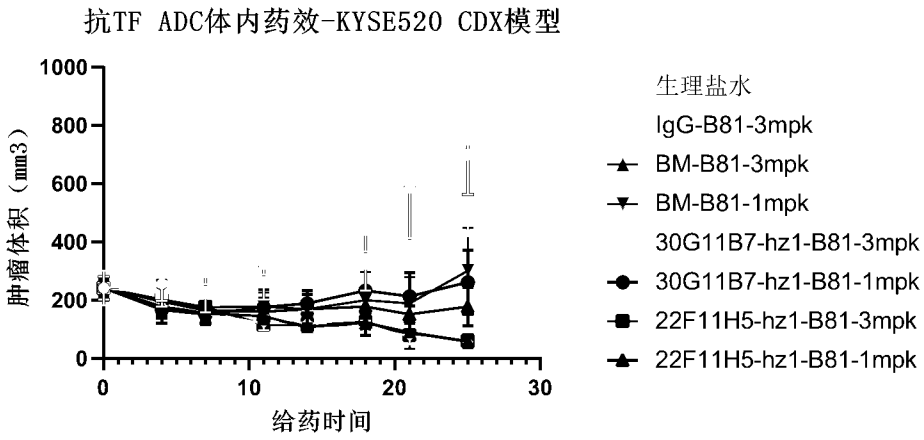


图 8.

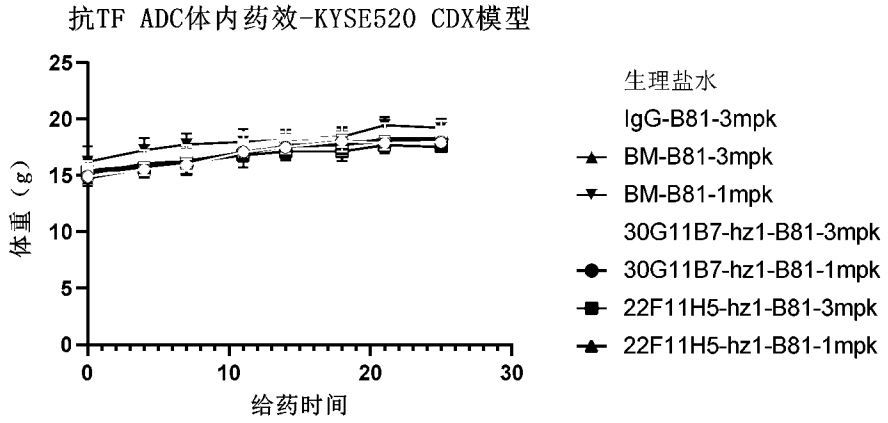


图 9.

抗TF ADC体内药效-KYSE520 CDX模型

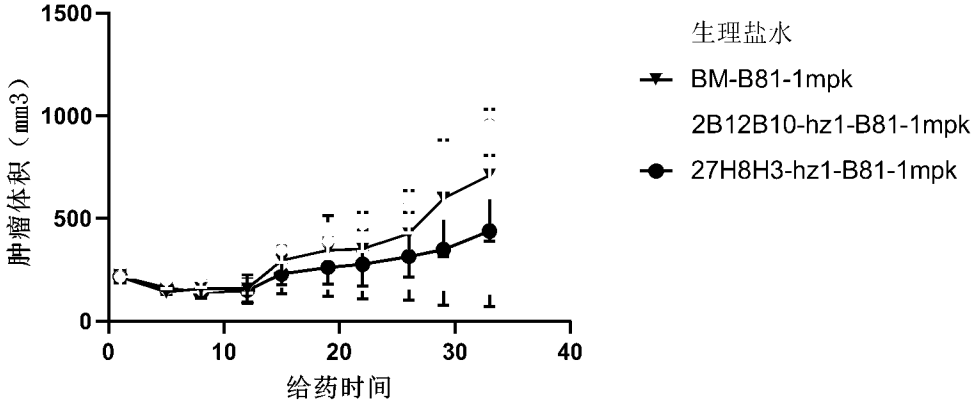


图 10

抗TF ADC体内药效-KYSE520 CDX模型小鼠体重变化

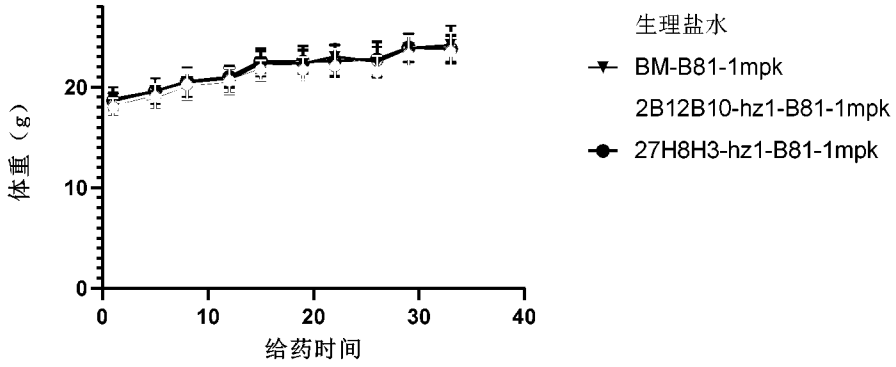


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/078127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/36(2006.01)i; A61K47/68(2017.01)i; A61P35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Database: CNTXT, WPABS, WPABSC, ENTXT, ENTXTC, DWPI, VEN, CJFD, CNKI, PUBMED, ELSVIER, 万方, WANFANG, 百度学术搜索, BAIDU SCHOLAR SEARCH: 细胞毒性药物, 抗体偶联药物, 抗体, 喜树碱, TF抗体, 组织因子, cytotoxic drugs, Camptothecin, antibody, TF, ADC, tissue factor Genbank, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NOs: 1-104的序列检索, China Patent Biological Sequence Search System: search for SEQ ID NOs: 1-104

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CA 3141428 A1 (ICONIC THERAPEUTICS, INC. et al.) 07 January 2021 (2021-01-07) see claim 1, description paragraph 471	1-27
A	CN 110575547 A (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 17 December 2019 (2019-12-17) see claims 1 and 11, description paragraphs 155-156	1-27
A	WO 2022011324 A1 (ICONIC THERAPEUTICS INC.) 13 January 2022 (2022-01-13) see abstract	1-27
A	WO 2022022508 A1 (TUOJIE BIOTECH (SHANGHAI) CO., LTD.) 03 February 2022 (2022-02-03) see abstract	1-27
A	CN 111727075 A (EURO CELTIQUE SA) 29 September 2020 (2020-09-29) see claim 19, description paragraph 30	1-27

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 May 2023	**04 June 2023**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/078127

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	陈倩倩等 (CHEN, Qianqian et al.). "组织因子在肺癌中的研究进展 (Research Progress on Tissue Factor in Lung Cancer)" *肿瘤学杂志 (Journal of Chinese Oncology),* Vol. 26, No. (1), 31 January 2020 (2020-01-31), pages 62-66, see page 64 left-hand column last paragraph	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/078127

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/078127

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **Part of 25, and 26**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The use (1), (2) and (3) in vivo of claim 25 and claim 26 belong to a method for treatment of diseases, which is subject matter for which no search is required according to PCT Rule 39.1(4). The search for claim 26 is carried out on the basis of the subject matter of claim 26 being reasonably expected to be a pharmaceutical use claim, i.e., "the use of an antibody-drug conjugate of any one of claims 1-14 or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, or an anti-TF antibody of any one of claims 16-19 or an antigen-binding fragment thereof, or an immunoconjugate or immune fusion or multispecific antibody of claim 23, or a pharmaceutical composition of claim 15 or 24 in the preparation of a drug for preventing or treating TF-positive tumors."

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/078127

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CA	3141428	A1	07 January 2021	KR	20220029724	A	08 March 2022
				ECSP	22007981	A	31 May 2022
				CR	20220047	A	23 June 2022
				CO	2022001083	A2	20 May 2022
				WO	2021003399	A1	07 January 2021
				US	2022257789	A1	18 August 2022
				IL	289138	A	01 February 2022
				CL	2021003414	A1	09 September 2022
				TW	202116357	A	01 May 2021
				EA	202193309	A1	28 March 2022
				PE	20221004	A1	15 June 2022
				AU	2020299398	A1	24 February 2022
				EP	3994150	A1	11 May 2022
				BR	112021025720	A2	21 June 2022
				JP	2022538908	A	06 September 2022
				AR	119346	A1	09 December 2021
				DOP	2021000268	A	15 August 2022
CN	110575547	A	17 December 2019	None			
WO	2022011324	A1	13 January 2022	CA	3184987	A1	13 January 2022
				TW	202216198	A	01 May 2022
				KR	20230037042	A	15 March 2023
				AU	2021304359	A1	02 March 2023
				BR	112023000455	A2	28 March 2023
WO	2022022508	A1	03 February 2022	KR	20230044275	A	03 April 2023
				AU	2021317378	A1	09 March 2023
				BR	112023001359	A2	14 February 2023
				CA	3184724	A1	03 February 2022
				TW	202214306	A	16 April 2022
CN	111727075	A	29 September 2020	AU	2018371271	A1	11 June 2020
				CA	3083345	A1	31 May 2019
				MX	2020005473	A	27 August 2020
				IL	274951	A	30 July 2020
				JP	2021503915	A	15 February 2021
				JP	7165193	B2	02 November 2022
				EP	3717069	A1	07 October 2020
				WO	2019102435	A1	31 May 2019
				US	2020385487	A1	10 December 2020
				US	11401345	B2	02 August 2022

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/078127

A. 主题的分类

C07K16/36(2006.01)i；A61K47/68(2017.01)i；A61P35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

数据库： CNTXT,WPABS,WPABSC,ENTXT,ENTXTC,DWPI,VEN,CJFD,CNKI,PUBMED,ELSVIER,万方,百度学术搜索： 细胞毒性药物，抗体偶联药物，抗体，喜树碱，TF抗体，组织因子，cytotoxic drugs, Camptothecin, antibody, TF,ADC, tissue factor Genbank,EMBL,STN,中国专利生物序列检索系统:对SEQ ID NOs:1-104的序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CA 3141428 A1 (ICONIC THERAPEUTICS, INC.等) 2021年1月7日 (2021-01-07) 参见权利要求1、说明书第471段	1-27
A	CN 110575547 A (中国科学院上海药物研究所等) 2019年12月17日 (2019-12-17) 参见权利要求1和11，说明书第155-156段	1-27
A	WO 2022011324 A1 (ICONIC THERAPEUTICS INC) 2022年1月13日 (2022-01-13) 参见摘要	1-27
A	WO 2022022508 A1 (TUOJIE BIOTECH SHANGHAI CO LTD) 2022年2月3日 (2022-02-03) 参见摘要	1-27
A	CN 111727075 A (普渡制药公司) 2020年9月29日 (2020-09-29) 参见权利要求19、说明书第30段	1-27
A	陈倩倩等. "组织因子在肺癌中的研究进展" 肿瘤学杂志, 第26卷，第1期，2020年1月31日 (2020-01-31)， 第62-66页，参见第64页左栏最后一段	1-27

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年5月26日	2023年6月4日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	袁实 电话号码 (+86) 010-62411598

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/078127

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/078127

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 25的一部分和26
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求25中的在体内的用途（1）（2）（3）和权利要求26属于疾病治疗方法，根据PCT细则39.1(4)为不要求检索的主题。对权利要求26的检索是基于将对权利要求26合理预期为制药用途权利要求的主题进行的，即“权利要求1-14任一项的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化物、或权利要求16-19任一项的抗TF抗体或其抗原结合片段、或权利要求23的免疫缀合物或免疫融合物或多特异性抗体、或权利要求15或24的药物组合物在制备预防或治疗TF阳性肿瘤的药物中的应用。”

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/078127

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CA	3141428	A1	2021年1月7日	KR	20220029724	A	2022年3月8日
				ECSP	22007981	A	2022年5月31日
				CR	20220047	A	2022年6月23日
				CO	2022001083	A2	2022年5月20日
				WO	2021003399	A1	2021年1月7日
				US	2022257789	A1	2022年8月18日
				IL	289138	A	2022年2月1日
				CL	2021003414	A1	2022年9月9日
				TW	202116357	A	2021年5月1日
				EA	202193309	A1	2022年3月28日
				PE	20221004	A1	2022年6月15日
				AU	2020299398	A1	2022年2月24日
				EP	3994150	A1	2022年5月11日
				BR	112021025720	A2	2022年6月21日
				JP	2022538908	A	2022年9月6日
				AR	119346	A1	2021年12月9日
				DOP	2021000268	A	2022年8月15日
CN	110575547	A	2019年12月17日		无		
WO	2022011324	A1	2022年1月13日	CA	3184987	A1	2022年1月13日
				TW	202216198	A	2022年5月1日
				KR	20230037042	A	2023年3月15日
				AU	2021304359	A1	2023年3月2日
				BR	112023000455	A2	2023年3月28日
WO	2022022508	A1	2022年2月3日	KR	20230044275	A	2023年4月3日
				AU	2021317378	A1	2023年3月9日
				BR	112023001359	A2	2023年2月14日
				CA	3184724	A1	2022年2月3日
				TW	202214306	A	2022年4月16日
CN	111727075	A	2020年9月29日	AU	2018371271	A1	2020年6月11日
				CA	3083345	A1	2019年5月31日
				MX	2020005473	A	2020年8月27日
				IL	274951	A	2020年7月30日
				JP	2021503915	A	2021年2月15日
				JP	7165193	B2	2022年11月2日
				EP	3717069	A1	2020年10月7日
				WO	2019102435	A1	2019年5月31日
				US	2020385487	A1	2020年12月10日
				US	11401345	B2	2022年8月2日