

(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 9 月 14 日 (14.09.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/169328 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/079562

(22) 国际申请日: 2023 年 3 月 3 日 (03.03.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210226048.9 2022 年 3 月 9 日 (09.03.2022) CN
202310099967.9 2023 年 2 月 9 日 (09.02.2023) CN

(71) 申请人: 三优生物医药(上海)有限公司(SANYOU BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区新骏环路 188 号 6 号楼 B-C 座 3 楼, Shanghai 201114 (CN)。杭州中美华东制药有限公司(HANGZHOU ZHONGMEIHUADONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市拱墅区莫干山路 866 号, Zhejiang 310011 (CN)。

(72) 发明人: 徐培芳(XU, Peifang); 中国上海市闵行区新骏环路 188 号 6 号楼 B-C 座 3 楼, Shanghai 201114 (CN)。刘婵娟(LIU, Chanjuan); 中国上海市闵行区新骏环路 188 号 6 号楼 B-C 座 3 楼, Shanghai 201114 (CN)。郎国竣(LANG, Guojun); 中国上海市闵行区新骏环路 188 号 6 号楼 B-C 座 3 楼, Shanghai 201114 (CN)。林晨(LIN, Chen); 中国浙江省杭州市拱墅区莫干山路 866 号, Zhejiang 310011 (CN)。束庆玉(SHU, Qingyu); 中国浙江省杭州市拱墅区莫干山路 866 号, Zhejiang 310011 (CN)。刘东舟(LIU, Dongzhou); 中国浙江省杭州市拱墅区莫干山路 866 号, Zhejiang 310011 (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))。

(54) Title: ROR1-TARGETED BINDING MOLECULE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种靶向 ROR1 的结合分子及其应用

(57) Abstract: The present application relates to an antibody specifically recognizing ROR1, and a preparation method therefor and the use thereof. The present application also relates to an antibody-drug conjugate (ADC) targeting ROR1 and a composition containing the molecule. In addition, the present invention further relates to the therapeutic and diagnostic uses of the antibodies, antibody fragments and antibody-drug conjugates.

(57) 摘要: 本申请涉及特异性识别 ROR1 的抗体, 其制备方法和用途。本申请还涉及靶向 ROR1 的抗体偶联药物(ADC)以及含有该分子的组合物。此外, 本发明还涉及这些抗体、抗体片段以及抗体偶联药物的治疗和诊断用途。



WO 2023/169328 A1

一种靶向 ROR1 的结合分子及其应用

技术领域

本申请涉及特异性识别 ROR1 的抗体，其制备方法和用途。此外，本申请还涉及靶向 ROR1 的抗体偶联药物 (ADC) 以及含有该分子的组合物。此外，本发明还涉及这些抗体、抗体片段以及抗体偶联药物的治疗和诊断用途。

背景技术

抗体偶联药物 (Antibody-Drug Conjugates, ADC) 是传统抗体药物的衍生药物，由靶向特异性抗原的单克隆抗体药物和小分子细胞毒药物通过连接子偶联而成，兼具抗体药物的特异靶向性和传统小分子药物的杀伤效应，其主要的适应症为恶性肿瘤。ADC 凭借其优异的肿瘤杀伤效应，迅速成为抗肿瘤药物研发的热点。但 ADC 的毒性通常较高，因此对于靶点抗原的特异性要求较高，适合开发 ADC 的靶点一般是在肿瘤中高表达，在健康组织中低表达或者几乎不表达；抗原为肿瘤细胞表达上调的表面受体，能够促进肿瘤生长或生存，并且该靶点抗原应具有内化特性。

受体酪氨酸激酶样孤儿受体 1 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, ROR1, 也被称为受体相关的神经营养性酪氨酸激酶 1, NTRKR1) 和受体酪氨酸激酶样孤儿受体 2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2, ROR2) 是隶属于受体酪氨酸激酶 (RTK) 家族的单次跨膜蛋白，其胞外由一个免疫球蛋白样结构域 (Ig) 和两个富含半胱氨酸的结构域 (FZD 结构域和 KRD 结构域) 组成，胞内由一个酪氨酸激酶结构域、两个富含丝氨酸或苏氨酸的结构域和一个富含脯氨酸的结构域组成。ROR1 和 ROR2 通过 FZD 结构域结合配体 Wnt5a 参与非经典 Wnt 信号通路 (Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC et al (2003). *Genes Cells* 8:645–654; Fukuda T, Chen L, Endo T, Tang L, Lu D, Castro JE, Widhopf GF II, Rässenti LZ, Cantwell MJ, Prussak CE et al (2008). *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3047–3052; Paganoni S, Bernstein J, Ferreira A (2010). *Neuroscience* 165:1261–1274)。ROR1 能抑制细胞凋亡，增强 EGFR 信号传导，诱导上皮间质转化 (EMT) (Fukuda T, Chen L, Endo T, Tang L, Lu D, Castro JE, Widhopf GF II, Rässenti LZ, Cantwell MJ, Prussak CE et al (2008). *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3047–3052; Yamaguchi T, Yanagisawa K, Sugiyama R, Hosono Y, Shimada Y, Arima C, Kato S, Tomida S, Suzuki M, Osada H et al (2012). *Cancer Cell* 21:348–361; Cui B, Zhang S, Chen L, Yu J, Widhopf GF, Fecteau J-F, Rässenti LZ, Kipps TJ (2013). *Cancer Res* 73:3649–3660)。

ROR1 是保守的胚胎蛋白，随着胚胎发育其表达逐渐下降，在成人大多数组织中几乎不存在或低表达，而越来越多的文献发现 ROR1 在多种癌细胞中表达，比如 B 细胞慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 和其他血液恶性肿瘤、肾细胞癌、结肠癌和乳癌的某些其他癌细胞系。

此外，ROR1 在许多血液和实体恶性肿瘤的进展中起着重要作用。因此，作为癌症标志物，ROR1 成为癌症治疗的理想药物靶点。

虽然现有技术公开了几款针对 ROR1 的抗体药物，但是作为泛癌种的肿瘤标志物，仍然迫切需要开发高质量的抗 ROR1 抗体，其可以用作开表达 ROR1 的癌症的基于抗体的靶向疗法的基础，还可以用作诊断工具以检测 ROR1 相关病症中的 ROR1 表达。此外，基于 ADC 在肿瘤治疗领域展现出的良好前景，目前依然迫切需要具有有效治疗作用的包含 ROR1 的 ADC，本发明满足了这些需求。

发明内容

第一方面，本发明提供了靶向 ROR1 的抗体、其具有以下优点：

- (1) 高亲和力结合 ROR1、结合表达 ROR1 的靶细胞；
- (2) 能够通过内吞作用进入细胞；
- (3) 适合构建有效治疗的抗体偶联药物。

在一个实施方案中，本发明提供了特异性结合 ROR1 的抗 ROR1 抗体及其抗原结合片段，其包含：

1) 如 SEQ ID NO: 57 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 56 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)；

2) 如 SEQ ID NO: 55 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 54 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)；

3) 如 SEQ ID NO: 59 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 58 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)；

4) 如 SEQ ID NO: 61 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 60 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)；

5) 如 SEQ ID NO: 63 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 62 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)；

6) 如 SEQ ID NO: 65 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 64 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)；

7) 如 SEQ ID NO: 67 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 66 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

8) 如 SEQ ID NO: 68 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 66 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

9) 如 SEQ ID NO: 70 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 69 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

10) 如 SEQ ID NO: 72 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 71 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

11) 如 SEQ ID NO: 74 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 73 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

12) 如 SEQ ID NO: 75 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 79 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

13) 如 SEQ ID NO: 76 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 81 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

14) 如 SEQ ID NO: 77 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 82 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

15) 如 SEQ ID NO: 78 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 80 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

16) 如 SEQ ID NO: 78 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 81 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

17) 如 SEQ ID NO: 78 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 82 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3); 或

18) 如 SEQ ID NO: 84 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、

HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 89 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)。

一个实施方案中, 本发明提供了特异性结合 ROR1 的抗 ROR1 抗体及其抗原结合片段, 其包含:

1) 包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 28、29 和 30 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

2) 包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 31、32 和 33 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

3) 包含如 SEQ ID NO: 7、8 和 9 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 34、32 和 33 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

4) 包含如 SEQ ID NO: 10、11 和 12 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 35、32 和 36 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

5) 包含如 SEQ ID NO: 4、13 和 14 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 35、32 和 37 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

6) 包含如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 38、32 和 33 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

7) 包含如 SEQ ID NO: 18、8 和 19 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 31、32 和 33 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

8) 包含如 SEQ ID NO: 20、21 和 12 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 31、32 和 33 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

9) 包含如 SEQ ID NO: 22、23 和 24 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 39、40 和 41 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

10) 包含如 SEQ ID NO: 4、25 和 26 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 35、32 和 33 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

11) 包含如 SEQ ID NO: 18、25 和 27 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 35、32 和 33 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

12) 包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 31、45 和 48 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

13) 包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 43、46 和 48 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、

LCDR3;

14) 包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 44、47 和 48 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

15) 包含如 SEQ ID NO: 4、42 和 6 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 31、45 和 48 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

16) 包含如 SEQ ID NO: 4、42 和 6 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 43、46 和 48 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

17) 包含如 SEQ ID NO: 4、42 和 6 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 44、47 和 48 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3; 或

18) 包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 49、50 和 30 所示序列, 或相对于所述序列含有一个或多个且不超过 3 个氨基酸的氨基酸取代 (例如保守性取代)、缺失或插入的序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

在一个实施方案中, 本发明提供了特异性结合 ROR1 的抗 ROR1 抗体及其抗原结合片段, 其包含重链可变区, 其中:

1) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 57 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 57 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 57 组成;

2) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 55 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 55 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性

的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 55 组成；

3) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 59 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 59 组成；

4) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 61 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 61 组成；

5) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 63 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 63 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 63 组成；

6) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 65 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 65 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 65 组成；

7) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 67 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 67 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 67 组成；

8) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 68 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 68 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 68 组成；

9) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 70 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 70 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 70 组成；

10) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 72 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 72 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 72 组成；

11) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 74 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 74 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 74 组成；

12) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 83 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 83 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 83 组成；

13) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 84 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 84 组成；

14) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 85 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 85 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 85 组成;

15) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 75 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 75 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 75 组成;

16) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 76 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 76 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 76 组成;

17) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 77 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 77 组成; 或

18) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 78 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 78 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 78 组成。

在一个实施方案中, 本发明提供了特异性结合 ROR1 的抗 ROR1 抗体及其抗原结合片段, 其包含轻链可变区, 其中:

1) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 56 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 56 组成;

2) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 54 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 54 组成;

3) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 58 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 58 组成;

4) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 60 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 60 组成;

5) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 62 组成;

6) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 64 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 64 的

氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 64 组成；

7) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 66 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 66 组成；

8) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 69 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 69 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 69 组成；

9) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 71 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 71 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 71 组成；

10) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 73 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 73 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 73 组成；

11) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 79 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 79 组成；

12) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 80 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 80 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 80 组成；

13) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 81 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 81 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 81 组成；

14) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 82 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 82 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 82 组成；

15) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 86 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 86 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 86 组成；

16) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 87 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 87 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 87 组成；

17) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 88 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 88 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性

的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 88 组成；或

18) 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 89 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 89 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 89 组成。

在另一个实施方案中，本发明提供了特异性结合 ROR1 的抗 ROR1 抗体及其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

1) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 57 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 57 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 57 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 56 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 56 组成；

2) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 55 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 55 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 55 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 54 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 54 组成；

3) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 59 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 59 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 58 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 58 组成；

4) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 61 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 61 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 60 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 60 组成；

5) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 63 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 63 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 63 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 62 组成；

6) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 65 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 65 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性

的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 65 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 64 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 64 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 64 组成；

7) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 67 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 67 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 67 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 66 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 66 组成；

8) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 68 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 68 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 68 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 66 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 66 组成；

9) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 70 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 70 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 70 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 69 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 69 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 69 组成；

10) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 72 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 72 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 72 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 71 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 71 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 71 组成；

11) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 74 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 74 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 74 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 73 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 73 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 73 组成；

12) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 75 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 75 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 75 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 79 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 79 组成；

13) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 76 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 76 的

氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 76 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 80 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 80 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 80 组成；

14) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 76 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 76 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 76 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 81 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 81 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 81 组成;

15) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 77 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 77 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 80 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 80 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 80 组成;

16) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 77 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 77 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 81 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 81 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 81 组成;

17) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 77 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 77 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 82 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 82 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 82 组成;

18) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 78 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 78 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 78 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 80 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 80 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 80 组成;

19) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 78 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 78 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 78 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 81 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 81 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 81 组成;

20) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 78 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 78 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 78 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 82 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 82 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 82 组成;

21) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 83 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 83 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 83 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 86 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 86 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 86 组成;

22) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 83 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 83 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 83 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 87 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 87 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 87 组成;

23) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 84 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 84 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 87 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 87 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 87 组成;

24) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 84 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 84 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 88 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 88 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 88 组成;

25) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 84 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 84 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 89 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 89 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 89 组成;

26) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 85 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 85 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 85 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 87 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 87 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 87 组成；

27) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 85 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 85 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 85 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 88 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 88 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 88 组成；或

28) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 85 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 85 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 85 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 89 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 89 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 89 组成。

在一些实施方案中，上述抗体或其抗原结合片段还包含来自人抗体胚系共有序列的重链和/或轻链恒定区序列。所述的轻链恒定区优选是人源的 κ 或 λ 链恒定区。重链恒定区可以是 γ 、 μ 、 α 、 δ 、或 ϵ 链，在一些实施方案中，所述的重链恒定区优选来自人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 的恒定区序列。在一个实施方案中，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 53 所示的序列，或者由所述序列组成。在另一个实施方案中，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 52 所示的序列。

应当理解，也可以使用这些恒定区结构域的序列变体，例如包含一个或多个氨基酸修饰，其中氨基酸位点是应 Kabat 等人的 (1991) EU 索引系统标识。

在一个具体实施方案中，本发明提供了特异性结合 ROR1 的抗 ROR1 抗体及其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中：

1) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 93 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 93 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 93 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 92 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 92 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 92 组成；

2) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 91 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 91 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 91 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 90 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 90 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 90 组成；

3) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 95 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 95 的氨基酸

序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 95 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 94 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 94 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 94 组成；

4) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 97 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 97 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 97 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 96 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 96 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 96 组成；

5) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 99 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 99 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 99 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 98 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 98 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 98 组成；

6) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 101 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 101 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 101 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 100 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 100 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 100 组成；

7) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 103 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 103 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 103 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 102 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 102 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 102 组成；

8) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 104 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 104 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 104 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 102 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 102 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 102 组成；

9) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 106 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 106 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 106 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 105 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 105 组成；

10) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 108 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 108 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 108 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 107 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 107 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 107 组成;

11) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 110 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 110 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 110 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 109 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 109 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 109 组成;

12) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 111 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 111 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 111 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 115 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 115 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 115 组成;

13) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 112 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 112 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 112 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 116 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 116 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 116 组成;

14) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 112 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 112 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 112 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 117 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 117 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 117 组成;

15) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 113 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 113 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 113 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 116 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 116 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 116 组成;

16) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 113 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 113 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 113 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 117 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 117 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 117 组成；

17) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 113 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 113 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 113 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 118 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 118 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 118 组成；

18) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 114 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 114 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 114 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 116 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 116 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 116 组成；

19) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 114 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 114 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 114 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 117 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 117 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 117 组成；

20) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 114 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 114 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 114 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 118 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 118 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 118 组成；

21) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 119 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 119 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 119 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 122 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 122 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 122 组成；

22) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 119 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 119 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 119 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 123 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 123 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 123 组成；

23) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 120 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 120 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 120 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 123 所示氨基酸序列，

或与 SEQ ID NO: 123 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 123 组成；

24) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 120 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 120 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 120 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 124 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 124 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 124 组成；

25) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 120 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 120 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 120 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 125 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 125 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 125 组成；

26) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 121 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 121 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 121 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 123 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 123 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 123 组成；

27) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 121 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 121 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 121 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 124 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 124 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 124 组成；或

28) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 121 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 121 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 121 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 125 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 125 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 125 组成。

在前述任一项的抗体的某些实施方案中，该抗体是单克隆的。

在前述任一项的抗体的某些实施方案中，该抗体是全长抗体。

在一个实施方案中，本发明的抗 ROR1 抗体是完整抗体，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 抗体。在另一个实施方案中，本发明的抗 ROR1 抗体仅涵盖其抗原结合部分，例如：Fab、Fab'-SH、Fv、scFv 或 (Fab')₂ 片段。

第二方面，本发明提供了靶向人 ROR1 的抗体偶联药物，所述抗体偶联药物具有以下

优点:

- (1) 结合表达人 ROR1 的靶细胞, 与其具有高亲和力;
- (2) 能够通过内吞作用进入细胞, 杀伤靶细胞; 在一些实施方案中, 本发明的 ADC 具有高内吞效率;
- (3) 治疗、预防、改善受试者与 ROR1 异常功能或表达相关的病症 (例如癌症, 诸如血液癌症、实体瘤), 或治疗、预防、改善所述疾病的一或多种症状;
- (4) 减少或抑制受试者 (其具有表达 ROR1 的肿瘤) 中肿瘤生长或进展;
- (5) 诱导表达 ROR1 的肿瘤消退 (例如长期消退);
- (6) 在表达 ROR1 的细胞中发挥细胞毒性活性;

在一个实施方案中, 本申请提供了包含第一方面所述抗 ROR1 抗体的缀合物。在一个具体的实施方案中, 可以与抗 ROR1 抗体缀合的分子例如是细胞毒性剂、免疫调节剂、显像剂、荧光蛋白、分子标志物、治疗性蛋白质、生物聚合物及寡核苷酸等。

在一个实施方案中, 本发明提供了一种抗体偶联药物 (ADC), 其包含第一方面所述的抗 ROR1 抗体或其抗原结合片段和至少一种治疗活性物质或药物活性成分, 具有 Ab-(L-D)_n 的结构, 其中: Ab 为如本发明第一方面所述的结合 ROR1 的抗体或其抗原结合片段; L 为接头; D 为治疗活性物质或药物活性成分, n 表示 1-20 的整数, 例如 1, 2, 3, 4, 5.....。

在一个实施方案中, 所述抗体偶联药物包含多个 D 成分, 所述多个 D 成分可以是不同治疗活性物质或药物活性成分的组合, 或者是相同治疗活性物质或药物活性成分的组合。在一个实施方案中, 所述抗体偶联药物具有 1-20 的药物/抗体比 (DAR), 例如数值为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 的 DAR。在一个实施方案中, 所述 DAR 为平均 DAR。在一个实施方案中, 平均 DAR 是 1-15, 例如 1-10、2-8、2-6 或 3-5。在一个具体实施方案中, 平均 DAR 为 3.7。

在一个具体的实施方案中, 所述治疗活性物质或药物活性成分是细胞毒素、植物毒素、小分子毒素、放射性同位素、美登木素生物碱等。在一个具体实施方案中, 所述细胞毒素是海兔毒素 (dolastatin) 及其 auristatin 类衍生物, 例如 0101(2-甲基丙胺酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧-3-[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]氨基}丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺)、8261(2-甲基丙胺酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-羧基-2-苯乙基]氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺)Dolastatin 10、Dolastatin 15、auristatin E、auristatin PE、monomethyl auristatin D (MMAD)、monomethyl auristatin E (MMAE)、monomethyl auristatin F (MMAF)、auristatin F 苯二胺 (AFP)、auristatin EB (AEB)、auristatin EFP (AEFP)、auristatin F 羟丙基酰胺 (AFHPA)。在另一个实施方案中, 所述海兔毒素及其 auristatin 类衍生物是 auristatin、多拉司他汀、

MMAE、MMAF、auristatin F 羟丙基酰胺或 auristatin F 苯二胺。

在一个实施方案中，细胞毒素以非位点特异性方式或者位点特异性方式借助接头与抗 ROR1 抗体或其抗原结合片段共价连接。

在一个实施方案中，所述接头选自马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苄氧基 (mc-vc-PAB)、乙酰基-赖氨酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基 (AcLys-VC-PABC)、氨基 PEG6-丙酰基、及马来酰亚胺己酸基 (mc)、马来酰亚胺基丙酰基 (MP)、缬氨酸-瓜氨酸 (val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸 (ala-phe)、对氨基苄氧羰基 (PAB)、N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶硫基)戊酸酯 (SPP)、N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯 (SMCC)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯 (SIAB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯 (SPDB)、N-琥珀酰亚胺基3-(吡啶-2-基二硫代)-丙酸酯 (SPDP)。

在一个实施方案中，所述抗体偶联药物包含第一方面所述的抗 ROR1 抗体或其抗原结合片段和微管蛋白抑制剂 (MMAE)。在进一步的实施方案中，MMAE 通过 MC-VC-PAB 接头与抗 ROR1 抗体上半胱氨酸的巯基缀合，具有抗 ROR1 抗体-MC-VC-PAB-MMAE 的结构。IgG1 型抗体具有 16 对半胱氨酸残基，其中以 12 个链内和 4 个链间二硫键的形式存在。链间二硫键具有溶剂可及性，可以被还原剂还原形成八个巯基，进而成为偶联目标 (McCombs J, Owen S. Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry. AAPS J. 2015;17:339-51)。

在一个具体实施方案中，所述抗体偶联药物包含抗 ROR1 单克隆抗体 B62-H3L3 和 MC-VC-PAB-MMAE，或由其组成。在进一步的实施方案中，MMAE 通过 MC-VC-PAB 接头与 B62-H3L3 上半胱氨酸的巯基缀合。

在另一个具体实施方案中，所述抗体偶联药物包含抗 ROR1 单克隆抗体 B31-H3L3 和 MC-VC-PAB-MMAE，或由其组成。在进一步的实施方案中，MMAE 通过 MC-VC-PAB 接头与 B31-H3L3 上半胱氨酸的巯基缀合。

第三方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含 (1) 第一方面的抗体或其抗原结合片段或第二方面的抗体偶联药物，以及 (2) 可药用载体。

第四方面，本发明提供了分离的多核苷酸分子，其编码第一方面所述的任一抗体或其抗原结合片段。

第五方面，本发明提供了载体，其包含第四方面的核酸分子。在一个实施方案中，所述载体是表达载体。

第六方面，本发明提供了宿主细胞，其包含第五方面的载体或第四发明的核酸分子。在一些实施方案中，该宿主细胞是原核的，例如大肠杆菌。在其它实施方案中，该宿主细胞是真核的，例如 HEK293 细胞，CHO 细胞，酵母细胞，或植物细胞。

第七方面，本发明提供了一种在有需要的受试者中预防或治疗与 ROR1 异常表达相关

的疾病的方法,包括向所述受试者施用预防有效量或治疗有效量的本发明抗体或其抗原结合片段、或预防有效量或治疗有效量的本发明的抗体偶联药物、或预防有效量或治疗有效量的本发明药物组合物。

在一个实施方案中,所述与 ROR1 异常表达相关的疾病是高表达 ROR1 的癌症,例如慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、套细胞淋巴瘤、肾细胞癌、结肠癌、胃癌、乳腺癌、神经母细胞瘤、肺癌、头颈癌和黑色素瘤。在一个具体实施方案中,其中所述肺癌是非小细胞肺癌。在一个具体实施方案中,所述乳腺癌是三阴性乳腺癌。

在一些实施方案中,本发明的 ADC 分子或药物组合物还能与一种或多种其它疗法例如治疗方式和/或其它治疗剂组合施用,用于本文所述的用途,例如用于预防和/或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一个具体实施方案中,本发明提供了一种杀死表达 ROR1 的细胞或者抑制表达 ROR1 的细胞生长的方法,包括使所述细胞接触有效量的本发明抗体或其抗原结合片段、或有效量的本发明的抗体偶联药物、或有效量的本发明药物组合物。

第八方面,本发明提供了抗 ROR1 抗体或其抗原结合片段在制备用于预防或治疗癌症的抗体偶联药物中的用途。

本发明还提供了包含抗 ROR1 抗体或其抗原结合片段的抗体偶联药物在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。

附图说明

图 1 显示了基于 FACS 法测定的本申请获得的各个鼠源抗体克隆 Fab 结合 huROR1-HEK293 细胞的结合活性;图 1A 显示了克隆 B31 Fab、B32 Fab、B34 Fab、B39 Fab、B62 Fab、B74 Fab、C38 Fab、M71 Fab 和 M78 Fab 裂解液结合 huROR1-HEK293 细胞的结合活性;图 1B 显示了 C42 Fab 和 C77 Fab 裂解液结合 huROR1-HEK293 细胞的结合活性;NC 表示阴性对照,MFI 表示中位数荧光强度。

图 2A-2L 显示了本申请抗体的 SEC-HPLC 结果;图 2A 显示了 B31 的 SEC-HPLC 结果;图 2B 显示了 B32 的 SEC-HPLC 结果;图 2C 显示了 B34 的 SEC-HPLC 结果;图 2D 显示了 B39 的 SEC-HPLC 结果;图 2E 显示了 B62 的 SEC-HPLC 结果;图 2F 显示了 B74 的 SEC-HPLC 结果;图 2G 显示了 C38 的 SEC-HPLC 结果;图 2H 显示了 M71 的 SEC-HPLC 结果;图 2I 显示了 M78 的 SEC-HPLC 结果;图 2J 显示了 C42 的 SEC-HPLC 结果;图 2K 显示了 C77 的 SEC-HPLC 结果;图 2L 显示了 99961.1 的 SEC-HPLC 结果。

图 3A-3B 显示了基于 ELISA 法测定的本申请抗体与抗原蛋白 huROR1-His 的结合活性;图 3A 显示了 B31、B32、B34、B39、B62 和 B74 与抗原蛋白 huROR1-His 的结合活性;图 3B 显示了 C38、C42、C77、M71 和 M78 与抗原蛋白 huROR1-His 的结合活性。

图 4A-4B 显示了基于 FACS 法测定的本申请抗体与 A549 肿瘤细胞的结合活性;图 4A 显示了 B31、B32、B34、B39、B62 和 B74 与 A549 肿瘤细胞的结合活性;图 4B 显示了 C38、

C42、C77、M71 和 M78 与 A549 肿瘤细胞的结合活性。

图 5A-5B 显示了基于 FACS 法测定的本申请抗体与 huROR1-HEK293 细胞的结合活性；图 5A 显示了 B31、B32、B34、B39、B62 和 B74 与 huROR1-HEK293 细胞的结合活性；图 5B 显示了 C38、C42、C77、M71 和 M78 与 huROR1-HEK293 细胞的结合活性。

图 6A-6B 显示了基于 ELISA 法测定的本申请抗体与抗原蛋白 MusROR1-His 的结合活性；图 6A 显示了 B31、B32、B34、B39 和 B62 与抗原蛋白 MusROR1-His 的结合活性；图 6B 显示了 B74、C38、C42、C77、M71 和 M78 与抗原蛋白 MusROR1-His 的结合活性。

图 7A-7B 显示了基于 ELISA 法测定的本申请抗体与抗原蛋白 huROR2-His 的结合活性；图 7A 显示了 B31、B32、B34、B39 和 B62 与抗原蛋白 huROR2-His 的结合活性；图 7B 显示了 B74、C38、C42、C77、M71 和 M78 与抗原蛋白 huROR2-His 的结合活性。

图 8A-8B 显示了基于 FACS 法测定的本申请抗体在 huROR1-HEK293 细胞上的内吞效率；图 8A 显示了 B62 和 C42 在 huROR1-HEK293 细胞上的内吞效率；图 8B 显示了 B31、B32、B34、B39、B74、C38、C77、M71 和 M78 在 huROR1-HEK293 细胞上的内吞效率。

图 9A-9F 显示了基于 Fab-Zap 法测定的本申请抗体在 huROR1-HEK293 细胞上的内吞效率；图 9A 显示了 B31 和 B32 在 huROR1-HEK293 细胞上的内吞效率；图 9B 显示了 B34 和 B39 在 huROR1-HEK293 细胞上的内吞效率；图 9C 显示了 B74 和 C38 在 huROR1-HEK293 细胞上的内吞效率；图 9D 显示了 C77 和 M71 在 huROR1-HEK293 细胞上的内吞效率；图 9E 显示了 M78 在 huROR1-HEK293 细胞上的内吞效率；图 9F 显示了 B62 和 C42 在 huROR1-HEK293 细胞上的内吞效率。

图 10A-10E 显示了基于 ELISA 法测定的人源化抗体与抗原蛋白 huROR1-His 的结合活性；图 10A 显示了 B31-H2L2、B31-H1L1 和 B31-H2L3 与抗原蛋白 huROR1-His 的结合活性；图 10B 显示了 B31-H3L2、B31-H3L3 和 B31-H3L4 与抗原蛋白 huROR1-His 的结合活性；图 10C 显示了 B31-H4L2、B31-H4L3 和 B31-H4L4 与抗原蛋白 huROR1-His 的结合活性；图 10D 显示了 B62-H1L1、B62-H1L2、B62-H2L2 和 B62-H2L3 与抗原蛋白 huROR1-His 的结合活性；图 10E 显示了 B62-H2L4、B62-H3L2、B62-H3L3 和 B62-H3L4 与抗原蛋白 huROR1-His 的结合活性。

图 11A-11B 显示了基于 FACS 法测定的人源化抗体与 A549 肿瘤细胞的结合活性；图 11A 显示了 B31-H1L1、B31-H2L2、B31-H2L3、B31-H3L2、B31-H3L3、B31-H3L4、B31-H4L2、B31-H4L3 和 B31-H4L4 与 A549 肿瘤细胞的结合活性；图 11B 显示了 B62-H1L1、B62-H1L2、B62-H2L2、B62-H2L3、B62-H2L4、B62-H3L2、B62-H3L3 和 B62-H3L4 与 A549 肿瘤细胞的结合活性。

图 12 显示了基于 Fab-Zap 法测定的 B31-H3L3 和 B62-H3L3 在 huROR1-HEK293 细胞上的内吞效率。

图 13A-13B 显示了基于 FACS 法测定的本申请 ADC 与 A549 和 HT29 肿瘤细胞的结合

活性；图 13A 显示了 B31-H3L3-MMAE 和 B62-H3L3-MMAE 与 A549 肿瘤细胞的结合活性；图 13B 显示了 B31-H3L3-MMAE 和 B62-H3L3-MMAE 与 HT29 肿瘤细胞的结合活性。

图 14A-14D 显示了基于 MTS 法检测的本申请 ADC 的肿瘤细胞杀伤效果；图 14A 显示了 B31-H3L3-MMAE 在 A549 肿瘤细胞上的杀伤效果；图 14B 显示了 B62-H3L3-MMAE 在 A549 肿瘤细胞上的杀伤效果；图 14C 显示了 B31-H3L3-MMAE 在 HT29 肿瘤细胞上的杀伤效果；图 14D 显示了 B62-H3L3-MMAE 在 HT29 肿瘤细胞上的杀伤效果。

图 15A-15C 显示了基于 CCK8 法测定的本申请 ADC 在三个肿瘤细胞 Jeko-1、MDA-MB-468 和 NCI-H1944 上的杀伤效果；图 15A 显示了 B31-H3L3-MMAE 和 B62-H3L3-MMAE 在 Jeko-1 细胞上的杀伤效果；图 15B 显示了 B31-H3L3-MMAE 和 B62-H3L3-MMAE 在 Jeko-1 细胞上的杀伤效果；图 15C 显示了 B31-H3L3-MMAE 和 B62-H3L3-MMAE 在 NCI-H1944 细胞上的杀伤效果。

图 16 显示了基于 CCK8 法测定的本申请 ADC 在 huROR1-HEK293 细胞上的抗原依赖杀伤效果。

图 17A-17B 显示了基于 FACS 法测定的本申请 ADC 在 A549 和 HT-29 肿瘤细胞上的内吞效率；图 17A 显示了 B31-H3L3-MMAE 和 B62-H3L3-MMAE 在 A549 肿瘤细胞上的内吞效率；图 17B 显示了 B31-H3L3-MMAE 和 B62-H3L3-MMAE 在 HT-29 肿瘤细胞上的内吞效率。

图 18A-18C 显示了本申请 ADC 在 HT-29 肿瘤模型的小鼠体内的抑瘤效果；图 18A 显示了实验周期内不同实验组小鼠体内的肿瘤体积变化，箭头标注为给药的时间点；图 18B 显示了实验周期内不同实验组小鼠的体重变化；图 18C 显示了实验结束后不同实验组小鼠体内的肿瘤重量。

图 19A-19C 显示了本申请 ADC 在 A549 肿瘤模型的小鼠体内的抑瘤效果；图 19A 显示了实验周期内不同实验组小鼠体内的肿瘤体积变化；图 19B 显示了实验周期内不同实验组小鼠的体重变化；图 19C 显示了实验结束后不同实验组小鼠体内的肿瘤重量。

图 20A-20B 显示了本申请 ADC 在 NCI-N87 肿瘤模型的小鼠体内的抑瘤效果；图 20A 显示了实验周期内不同实验组小鼠体内的肿瘤体积变化，箭头标注为给药的时间点；图 20B 显示了实验周期内不同实验组小鼠的体重变化。

图 21A-21B 显示了本申请 ADC 在 MDA-MB-231 肿瘤模型的小鼠体内的抑瘤效果；图 21A 显示了实验周期内不同实验组小鼠体内的肿瘤体积变化，箭头标注为给药的时间点；图 21B 显示了实验周期内不同实验组小鼠的体重变化。

图 22A-22B 显示了本申请 ADC 在 MDA-MB-468 肿瘤模型的小鼠体内的抑瘤效果；图 22A 显示了实验周期内不同实验组小鼠体内的肿瘤体积变化，箭头标注为给药的时间点；图 22B 显示了实验周期内不同实验组小鼠的体重变化。

图 23A-23B 显示了本申请 ADC 在 Jeko-1 肿瘤模型的小鼠体内的抑瘤效果；图 23A 显

示了实验周期内不同实验组小鼠体内的肿瘤体积变化，箭头标注为给药的时间点；图 23B 显示了实验周期内不同实验组小鼠的体重变化。

发明详述

在详细描述本发明之前，应了解，本发明不受限于本说明书中的特定方法及实验条件，因为所述方法以及条件是可以改变的。另外，本文所用术语仅是供说明特定实施方案之用，而不意欲为限制性的。

I. 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。

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 10%的下限和比指定数字数值大 10%的上限的范围内的数字数值。

术语“和/或”当用于连接两个或多个可选项时，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更多项。

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。

术语“ROR1”指任何重组体或天然存在形式的受体酪氨酸激酶样孤儿受体 1 (ROR1)、其变体或同系物，所述变体或同系物维持 ROR1 活性的例如至少 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的活性。所述变体或同系物相比于天然存在的 ROR1 蛋白在完整序列或部分序列（例如，50、100、150 或 200 个连续氨基酸部分）具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 氨基酸序列同一性。在一个实施方案中，ROR1 蛋白包括 Uniprot ID: Q01973 的氨基酸序列。

ROR1 在胚胎中高度表达，之后其表达水平在成人阶段显著下降。但是发现在多种血液癌症和实体瘤中 ROR1 的表达显著提高。高度表达 ROR1 的血液癌症包括 B 细胞慢性淋巴细胞白血病 (CLL)，急性淋巴细胞白血病 (ALL)，非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 和髓系血液癌症。在实体瘤中，表达 ROR1 的癌症类型包括结直肠癌、肠癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌等多种癌症。

术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且涵盖多种抗体结构物，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体（例如，双特异性抗体）和抗体片段，只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。完整抗体通常将包含至少两条全长重链和两条全长轻链，但在某些情况下可包括较少的链，例如骆驼中天然存在的抗体可仅包含重链。

术语“抗 ROR1 抗体”是指特异性与 ROR1 结合的抗体分子，其能够抑制 ROR1 活性。

相对于不存在 ROR1 抗体，抗 ROR1 抗体能够抑制 ROR1 活性，例如，通过至少部分地或完全地阻断 ROR1 的刺激，减少、预防或延迟 ROR1 的活化，或失活、脱敏或下调 ROR1 的信号转导、活性或量。在一些实施方案中，相比于对照，抗体可以抑制 ROR1 活性的 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多。

术语“抗体片段”指与完整抗体不同的分子，其包含完整抗体的一部分且能够结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体 (例如 scFv); 单结构域抗体; 双价或双特异性抗体或其片段; 骆驼科抗体 (重链抗体); 和由抗体片段形成的多特异性抗体 (例如双特异性抗体)。

术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域通常具有相似的结构，其中每个结构域包含四个保守的构架区 (FR) 和三个互补决定区 (CDR) (参见，例如，Kindt 等 Kuby Immunology, 6th ed., W.H.Freeman and Co. 91 页 (2007))。单个 VH 或 VL 结构域足以给予抗原结合特异性。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高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。可变结构域中的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。在一个给定的可变区氨基酸序列中，各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派系统的任一种或其组合确定，所述指派系统包括例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人, (1989) Nature 342: 877-883, Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948(1997)), 基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (<http://imgt.cines.fr/>), 以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类 (affinity propagation clustering) 的 North CDR 定义。

除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。

CDR 也可以基于与参考 CDR 序列 (例如本发明示例的 CDR 之任一) 具有相同的 AbM 编号位置而确定。在一个实施方案中，本发明的抗体的 CDR 根据 AbM 编号方案确定位置。

除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区和 CDR 中的残基位置 (包括重链可变区残基) 时，是指根据 AbM 编号系统的编号位置。

“人源化抗体”是指包含来自非人 CDR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的嵌合抗体。在一些实施方案中，人源化抗体中的所有或基本上所有的 CDR (例如，CDR) 对应于非人抗体的那些，并且所有或基本上所有的 FR 对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体 (例如非人抗体) 的“人源化形式”是

指已经进行了人源化的抗体。

如本文所用，术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。抗原结合位点与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法如通过放射性免疫测定 (RIA) 或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法 (SPR) 测定。

术语“半数有效浓度 (EC₅₀) ”是指在特定的暴露时间后诱导在基线和最大值之间的 50% 的应答的药物、抗体或毒剂的浓度。

本文所述的术语“治疗剂”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“抗体偶联药物”或“ADC”是指以共价键偶联治疗活性物质或活性药物成分的抗体或抗体片段，从而使得治疗活性物质或活性药物成分靶向至抗体的结合靶标以表现出其药理学功能。治疗活性物质或活性药物成分可以是能够杀死 ADC 靶向的细胞 (优选癌细胞) 的细胞毒素。治疗活性物质、活性药物成分或细胞毒素的共价连接可以以非位点特异性方式利用接头进行，或者以位点特异性方式进行。

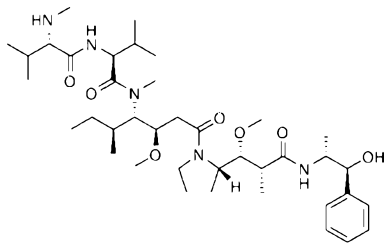
术语“位点特异性偶联”是指将治疗活性物质或活性药物成分特异性连接到抗体的特定位点的连接方式。在一个实施方式中，所述偶联借助连接子完成。

术语“细胞毒性剂”可以和“细胞毒素”互换使用，在本发明中指抑制或破坏细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。在一个实施方案中，细胞毒性剂可以包括但不限于细菌毒素 (例如白喉毒素)、植物毒素 (例如蓖麻毒蛋白)、小分子毒素、放射性同位素、美登木素生物碱等，具体地，例如蒽环霉素 (anthracycline)、喜树碱 (camptothecin)、考布他汀 (combrextastatin)、海兔毒素 (dolastatin) 及其 auristatin 类衍生物、多卡米星 (duocarmycin)、烯二炔 (enediynes)、格尔德霉素 (geldanamycin)、引哚琳并-苯二氮杂卓二聚体 (indolino-benzodiazepine dimer)、美登素 (maytansine)、嘌呤霉素 (puromycin)、吡咯并苯二氮杂卓二聚体 (pyrrolobenzodiazepine dimer)、紫杉烷 (taxane)、长春花生物碱 (vinca alkaloid)、特吡莱辛 (tubulysin)、哈米特林 (hemiasterlin)、斯考他汀 (spliceostatin)、普拉地内酯 (pladienolide) 及卡奇霉素 (calicheamicin)。

本发明的任何抗体偶联药物均可用海兔毒素 (dolastatin) 及其 auristatin 类衍生物与抗体偶联制备。海兔毒素 (dolastatin) 及其 auristatin 类衍生物是抗体偶联药物 (ADC) 中使用的重要细胞毒素，其干扰微管动力学、细胞分裂等，具有抗肿瘤、抗真菌活性。其骨架的修饰已在文献中广泛报道，主要是对末端亚基：P1 (N 端) 和 P5 (C 端) 的修饰，中央肽亚基的修饰也导致 该类物质在体外具有有效的细胞毒活性。在一个方面中，海兔毒素 (dolastatin) 及其 auristatin 类衍生物例如可为 0101(2-甲基丙胺酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧-3-[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]氨基}丙

基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺)、8261(2-甲基丙胺酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-羧基-2-苯乙基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧丙基]吡咯烷-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-氧庚烷-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺)、Dolastatin 10、Dolastatin 15、auristatin E、auristatin PE、monomethyl auristatin D (MMAD)、monomethyl auristatin E (MMAE)、monomethyl auristatin F (MMAF)、auristatin F 苯二胺 (AFP)、auristatin EB (AEB)、auristatin EFP (AEFP)、auristatin F 羟丙基酰胺 (AF HPA)、及其他 auristatin (例如美国公开案第 20130129753 号中所述的 auristatin) 等。

Monomethyl auristatin (MMAE) 即去甲基-auristatin E, 是auristatin化合物家族成员中著名的一员, 其结构式如下:



MMAE通过抑制微管蛋白聚合而起到有效的有丝分裂抑制作用, 因其细胞毒性而不能用作药物, 但是却被广泛用以制备抗体偶联物。MMAE通过接头与单克隆抗体 (MAB) 偶联形成MMAE-MAB。一般而言, MMAE-MAB经抗体靶向肿瘤细胞, 接头在MMAE-MAB进入肿瘤细胞后被裂解, 从而释放MMAE, 使其发挥细胞毒作用, 杀伤肿瘤细胞。

术语“接头”和“连接子”在本申请中可以互换使用, 指使抗体与ADC中的治疗活性物质或活性药物成分共价连接的化学模块。在一个实施方案中, 接头可以包含将抗原与有效载荷连接的氨基酸残基。氨基酸残基可以形成二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元。氨基酸残基包括天然存在的那些以及非天然存在的氨基酸类似物, 例如瓜氨酸或 β -氨基酸, 例如 β -丙氨酸, 或 ω -氨基酸如4-氨基-丁酸。

根据性质分类, 适用于本发明的接头可以是组织蛋白酶可降解的接头, 例如缬氨酸-瓜氨酸 (val-cit) 接头、cBu-Cit接头和CX接头; 不可断裂接头例如SMCC接头或MD接头; 酸敏接头、硅脂结构的接头、disulfide-carbamate接头、MC-GGFG接头、TRX接头、含半乳糖苷的接头、焦磷酸酯接头、近红外敏感的接头、紫外敏感的接头例如PC4AP。

本发明的接头还可以是一种或多种接头的组合, 例如组织蛋白酶降解的接头可以与其它类型的接头组合, 构成新的接头。因此, 本发明所述的“接头”涵盖单个类型的接头, 或不同类型接头的组合, 只要其能够将本发明的抗体与药物偶联起来即可。

在具体实施方案中, 接头包括但不限于马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苄氧基 (mc-vc-PAB)、乙酰基-赖氨酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基 (AcLys-VC-PABC)、氨基PEG6-丙酰基、及马来酰亚胺己酸基 (mc)、马来酰亚胺基丙酰基 (MP)、缬氨酸-瓜氨酸 (val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸 (ala-phe)、对氨基苄氧羰基 (PAB)、N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶硫

基)戊酸酯 (SPP)、N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯 (SMCC)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯 (SIAB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯 (SPDB)、N-琥珀酰亚胺基3-(吡啶-2-基二硫代)-丙酸酯 (SPDP)。

术语“负载”或“药物负载”或“有效负载”是指在ADC分子内每个抗体的平均有效负载数(在本文中“有效负载”可与“治疗活性物质或活性药物成分”互换使用)。药物负载的范围可以为每个抗体1-20个治疗活性物质或活性药物成分。术语“药物/抗体比”或“DAR”是指偶联于抗体的治疗活性物质或活性药物成分(D)与抗体的比例。本文中所述ADC通常具有1-20的DAR,在某些具体实施方案中具有1-8、2-8、2-6、2-5、2-18、4-16、5-12、6-10、3-8、4-6、6-10,和2-4的DAR。代表性DAR值是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15,通常表示为字母D和数字的组合,其中数字表示DAR的数值,例如D2表示DAR值为2的药物/抗体比。在一些实施方案中,DAR是平均DAR,即通过检测方法(例如通过常规方法如UV/可见光光谱法、质谱法、ELISA测定、与HPLC进行表征。也可测得定量DAR值。DAR可能受限于抗体上的连结位点数目。例如,在连结位点是半胱氨酸硫醇的情形下,抗体可能只有一或几个半胱氨酸硫醇基或可能只有一或几个具有充分反应性的硫醇基(通过此硫醇基可连结连接单元)。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0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、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,以这些数值中的两个作为端点的范围。

术语“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、病情或疾病的进展或严重性。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态,以及缓解或改善预后。在一些实施方案中,本发明的抗体用来延缓疾病发展或用来减慢疾病的进展。

术语“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。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。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发生前的药物施用。

术语“有效量”指本发明的抗体或缀合物或组合物的量或剂量,其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。有效量可以由作为本领域技术人员的主治医师通过考虑以下多种因素来容易地确定:诸如哺乳动物的物种;体重、年龄和一般健康

状况；涉及的具体疾病；疾病的程度或严重性；个体患者的应答；施用的具体抗体；施用模式；施用制剂的生物利用率特征；选择的给药方案；和任何伴随疗法的使用。

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。抗体或抗体片段或其缀合物或组合物的治疗有效量可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量和抗体或抗体部分在个体中激发所需反应的能力而变动。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体或抗体片段或其缀合物或组合物的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数（例如肿瘤生长率、肿瘤体积等）至少约 20%、更优选地至少约 40%、甚至更优选地至少约 50%、60%或 70%和仍更优选地至少约 80%或 90%。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价化合物抑制可度量参数（例如，癌症）的能力。

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，由于预防性剂量在对象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。

术语“药物组合物”指这样的组合物，其以允许包含在其中的活性成分的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。

II. 本发明组合物

在一些实施方案中，本发明提供包含本文所述的任何抗 ROR1 抗体、或其 ADC 分子的组合物，优选地组合物为药物组合物。在一个实施方案中，所述组合物还包含药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。在一个实施方案中，组合物（例如，药物组合物）包含本发明的抗 ROR1 抗体、或其 ADC 分子，以及一种或多种其它治疗剂的组合。

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。

本发明组合物的施用途径是根据已知方法，例如，经口、通过静脉内注射、腹膜内、脑内（实质内）、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门脉内或病灶内途径；通过持续释放系统或通过植入装置。在某些实施方案中，组合物可通过弹丸注射或通过连续输注或通过植入装置施用。

受试者可以是哺乳动物，例如，灵长类，优选地，高级灵长类，例如，人类（例如，患

有本文所述疾病或具有患有本文所述疾病的风险的个体)。在一个实施方案中,受试者患有本文所述疾病(例如,癌症)或具有患有本文所述疾病的风险。在某些实施方案中,受试者接受或已经接受过其它治疗,例如化疗治疗和/或放射疗法。在一些实施方案中,受试者之前已经接受过或正在接受免疫疗法。

可以通过将具有所需纯度的本发明的抗 ROR1 抗体、或其 ADC 分子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抗体的药物,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。

III. 制备本发明的抗体和抗体偶联药物

在一个实施方案中,本发明提供了制备抗 ROR1 抗体的方法,其中所述方法包括在适于表达编码所述抗 ROR1 抗体的核酸的条件下培养包含编码抗 ROR1 抗体的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞,以及任选地分离所述抗 ROR1 抗体。在某个实施方案中,所述方法还包括从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗 ROR1 抗体。

为了重组产生本发明的抗 ROR1 抗体,首先分离编码本发明抗 ROR1 抗体的核酸,并将所述核酸插入载体,用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序,例如通过使用能够与编码本发明抗 ROR1 抗体的核酸特异性结合的寡核苷酸探针进行。

如本文所述制备的本发明的抗 ROR1 抗体可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于净电荷、疏水性、亲水性等因素,并且这些对本领域技术人员是显而易见的。可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的抗 ROR1 抗体的纯度,所述熟知分析方法包括大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。

现有技术描述了用于将细胞毒性剂或其他治疗剂与抗体偶联的多种方法。例如,可以通过赖氨酸侧链的氨基和抗体 N 末端的氨基,天门冬氨酸、谷氨酸和 C 末端的羧基或活化的半胱氨酸巯基在抗体中进行,以使缀合反应发生。

实施例

以下实施例进一步说明本发明,然而,应理解实施例以说明而非限定的方式来描述,

并且本领域技术人员可以进行多种修改。

除非明确指明相反，否则本发明的实施将采用本领域技术内的常规化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA 技术、遗传学、免疫学和细胞生物学的方法。

实施例 1 原材料制备及鉴定

1.1 ROR1 对照抗体制备及鉴定

ROR1 对照抗体制备：本申请使用抗 ROR1 抗体 Cirmtuzumab (西妥珠单抗) 作为阳性对照抗体，根据 WO/2019/173843 公开的序列由通用生物科技股份有限公司进行目的片段的基因合成。然后通过同源重组的方法构建至真核表达载体 pcDNA3.4 (Invitrogen)，将构建好的重组蛋白表达载体分别转化到大肠杆菌 DH5 α 中，37°C 过夜培养，然后利用无内毒素质粒提取试剂盒 (OMEGA, D6950-01) 进行质粒提取，获得期望的表达西妥珠单抗的表达载体，克隆号为 99961.1，下文将表达的西妥珠单抗简称为 99961.1。通过 ExpiFectamine™ CHO 转染试剂盒 (Thermo Fisher, A29129) 将表达载体转染 293 细胞以表达西妥珠单抗，转染 7 天后，收集细胞培养物上清液，15000 g 离心 10 min，将所得上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤后，采用 Protein A/G 亲和层析柱对上清液中的抗体进行亲和纯化。用 100 mM 甘氨酸盐 (pH 3.0) 洗脱目的抗体，并将洗脱的抗体通过超滤浓缩管 (Millipore, UFC901096) 换液至 PBS 缓冲液中。

ROR1 对照抗体鉴定：用购买的 huROR1-His 抗原蛋白 (恺佻生物, ROR-HM401) 检测制备的阳性对照抗体 99961.1 (IgG1) 的活性，具体方法如下：在 96 孔 ELISA 板上包被 huROR1-His (2 μ g/mL、30 μ L/孔)，4°C 包被过夜；洗板 3 次后，用 PBS 配置的 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 小时；洗板 3 次后，加入用 PBS 梯度稀释的对照抗体 99961.1 室温孵育 1 小时；洗板后，加入 PBS 稀释 (1: 6000) 的二抗 Anti-human-IgG-Kappa+Lambda-HRP (Millipore, AP502P+AP506P) 室温孵育 1 小时后，洗板 6 次加入 TMB 显色 5-20 min，终止显色后酶标仪 OD450 读取数据，处理数据 Graphpad prism 作图。结果显示，表达的对照抗体 99961.1 可以结合 ROR1 蛋白，具有正常的抗 ROR1 活性。

1.2 抗原蛋白制备及鉴定

抗原蛋白制备：通过在编码基因水平的遗传操作，分别在人 ROR1 蛋白 huROR1 ECD AA30-406 (Uniprot ID: Q01973)、小鼠 ROR1 蛋白 MusROR1 ECD AA30-406 (Uniprot ID: Q9Z139)、人 ROR2 蛋白 huROR2 ECD AA34-403 (Uniprot ID: Q01974) 的序列 C 端加上 His 标签或者人 Fc (SEQ ID NO: 51) 标签。分别将获得的核酸序列构建至 pcDNA3.4 载体中，然后转化到大肠杆菌 DH5 α 中，37°C 过夜培养，之后利用无内毒素质粒提取试剂盒 (OMEGA, D6950-01) 提取质粒。将所得到的质粒用 ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒 (Gibco™, A14524) 瞬转至 HEK293 细胞 (ATCC® CRL-1573™) 中，表达 7 天后，收取细胞培养物上清液，对含有 Fc 标签的蛋白通过 COLUMN XK16/20 (Cytiva) 进行亲和纯化。

纯化后用 100 mM 甘氨酸盐 (pH=3.0) 洗脱目的蛋白, 浓缩、置换缓冲液, 最后获得抗原蛋白 (huROR1-huFc)。对含有 His 标签的蛋白用 Ni Smart Beads 6FF (常州天地人和生物科技有限公司, SA036050) 进行亲和纯化, 然后用咪唑梯度洗脱目的蛋白。洗脱的各蛋白分别通过超滤浓缩管 (Millipore, UFC901096) 换液至 PBS 缓冲液中, 最后获得抗原蛋白 (huROR1-His, MusROR1-His, huROR2-His)。

抗原鉴定: 用实施例 1.1 获得的质检合格的抗体 99961.1 (IgG1) 检测制得的抗原 (huROR1-His, huROR1-huFc)。具体方法如下: 分别用 2 μ g/mL huROR1-His, huROR1-huFc 包被 Elisa 板 4°C 过夜, 以购买的抗原蛋白 huROR1-His, huROR1-huFc (恺伟生物 ROR-HM201) 作为阳性对照; 洗板 3 次后, 用 PBS 配置的 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 小时; 洗板 3 次后, 加入用 PBS 梯度稀释的抗体 99961.1 室温孵育 1 小时; 洗板后, 加入 PBS 稀释 (1: 6000) 的二抗 Anti-human-IgG-Kappa+Lambda-HRP (Millipore, AP502P+AP506P) 室温孵育 1 小时, 洗板 6 次然后加入 TMB 显色 5-20 min, 终止显色反应, 采用酶标仪 OD450 读取数据, 处理数据 Graphpad prism 作图。结果显示, 抗体 99961.1 可以以与购买的 ROR1 抗原蛋白相当的亲和力结合本申请发明人自行构建表达的抗原 huROR1-His, huROR1-huFc。

实施例 2 构建及鉴定过表达人 ROR1 的细胞株

过表达人 ROR1 的 HEK293 细胞株 (以下简称 huROR1-HEK293) 的构建: 将全长人 ROR1 (Uniprot ID: Q01973) 的编码核酸序列构建至 pLVX-puro 质粒 (Clontech, Cat#632164) 上。然后, 将所得到的质粒通过电转仪 (Invitrogen, NeonTM Transfection System, MP922947) 电转化至 HEK293 细胞 (ATCC® CRL-1573TM) 中。电转化后, 将所得到的细胞分别转移至含有体积百分比为 10% 的 FBS (Gibco, 15140-141) 且不含抗生素的 DMEM 培养基 (Gibco, 11995065) 中, 然后将细胞转入 10 $\times$ 10 cm 细胞培养皿中培养 48 小时, 接着以平均 10⁴ 个细胞/孔的密度将细胞分装至 96 孔细胞培养板中, 加入终浓度为 2 μ g/mL 的嘌呤霉素作为筛选压力, 2 周左右挑取形成克隆的细胞株进行鉴定。

huROR1-HEK293 细胞的流式鉴定: 将对数生长期的上述细胞株细胞消化并铺板到 96 孔板中, 用 FACS 缓冲液 (含体积百分比为 2% 的 FBS 的 1 $\times$ PBS 缓冲液) 清洗后, 加入用 PBS 梯度稀释的一抗 (99961.1) 4°C 孵育 30 min; 清洗后, 加入配制好的荧光二抗 anti human IgG Fc (abcam, 98596), 4°C 孵育 30 min; 最后通过流式细胞仪 (Beckman, CytoFLEXAOO-1-1102) 进行检测。检测结果显示获得了表面高表达人 ROR1 的 huROR1-HEK293 细胞株。

实施例 3 动物免疫及免疫库构建

3.1 免疫方案

采用 huROR1-huFc 和 huROR1-His 抗原通过皮下注射和腹腔注射交叉免疫 3 只 Balb/C 小鼠 (上海灵畅生物科技有限公司), 每两周免疫一次, 总计免疫 4 次。第 4 次免疫后一周

取小鼠血用于免疫效价检测，最后，再用 huROR1-huFc 加强免疫一次。

3.2 免疫后小鼠血清抗体效价检测

分别用 2 μ g/mL huROR1-His, huROR1-huFc 包被 Elisa 板 4°C 过夜 (30 μ L/孔)，洗板 3 次后，用 PBS 配置的 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 小时；洗板 3 次后，加入用 PBS 梯度稀释的小鼠血清，同时加入抗体 99961.1 作为阳性对照，室温孵育 1 小时；洗板后，加入 PBS 稀释的二抗 Goat-anti-mouse-IgG(1+2a+2b+3)-HRP (Jackson, 115-035-164) 或者 Goat-anti-human-Kappa+Lambda-HRP (Millipore, AP502P+AP506P) 室温孵育 1 小时后，洗板 6 次加入 TMB 显色 5-20 min，终止显色反应后采用酶标仪 OD450 读取数据，处理数据 Graphpad prism 作图。结果显示，3 只小鼠血清效价均达标。

3.3 噬菌体展示抗体基因文库构建

在免疫结束后，取小鼠脾脏，经研磨和过滤后收集脾细胞，加入 1 mL 的 TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher, 15596026) 裂解脾细胞，通过酚氯仿法提取总 RNA，通过反转录试剂盒 (TaKaRa, 6210A) 将提取的 RNA 反转录成 cDNA。之后以 cDNA 为 PCR 模板，采用鼠源抗体序列的特异性引物分别扩增抗体的轻链和重链可变区基因。PCR 产物通过 NcoI、NotI 双酶切得到抗体基因片段，将其插入至噬菌体展示用载体上，通过 T4 连接酶连接，连接产物通过 DNA 回收试剂盒 (Omega, D6492-02) 回收，最后通过电转仪 (Bio-Rad, MicroPulser) 转化至感受态大肠杆菌 SS320 中 (Lucigen, MC1061F)，将电转后的细菌涂布于含有氨苄青霉素和四环素的 2-YT (C^+/K^+ 2-YT) 固体平板，扩增正确转化抗体质粒的 SS320 菌，采用 VSCM13 辅助噬菌体 (购自 Stratagene) 对其进行包装，获得了含 Fab 序列的噬菌体展示文库。

实施例 4 噬菌体展示抗体基因文库筛选

4.1 细胞法筛选噬菌体展示抗体基因文库

在 T25 培养方瓶中培养 hROR1-HEK293T 细胞。当细胞生长密度接近 90% 时，去除培养上清，并用 PBS (源培, B310KJ) 清洗一次，然后加入 2 mL 的 4% 多聚甲醛 (生工, E672002-0500) 固定 0.5 小时，最后用 PBS 清洗两次后作为筛选原材料。筛选时，将噬菌体展示文库与固定的 hROR1-HEK293T 细胞在室温下孵育 1 小时，用 1 $\times$ PBS 清洗三次后，加入 2 mL 甘氨酸-HCl (pH=2.0) 轻轻混匀 10 分钟，以洗脱特异性结合人 ROR1 的噬菌体，接着将洗脱上清侵染对数期的 SS320 菌体 (Lucigen, 60512-1)，静置 30 分钟，然后在 37°C，220 rpm 条件下培养 1 小时，再加入 VSCM13 辅助噬菌体，静置 30 分钟，继续在 37°C，220 rpm 条件下培养 1 小时，离心并置换至 C^+/K^+ 2-YT 培养基中，最终得到的噬菌体继续用于第二轮的筛选。多次重复筛选，同时每轮随机挑选 10 个克隆进行序列分析以对库进行评估，

经过 3 轮筛选后，库内的序列富集明显。

4.2 免疫管法和磁珠法筛选噬菌体展示抗体基因文库

采用免疫管法和磁珠法富集针对抗原的特异性抗体，两种方法互为补充和验证。

免疫管法筛选是将抗原蛋白 huROR1-His 或者 huROR1-huFc 包被在具有高吸附力的免疫管表面,通过将噬菌体展示抗体文库加入免疫管中并和吸附于免疫管表面的抗原蛋白进行孵育、洗涤和洗脱的淘选过程，经历 2-4 轮淘选，最终富集针对抗原的特异性单克隆抗体 Fab。本实施例中，经过 3 轮淘选后富集了针对人 ROR1 的单克隆抗体 Fab，具体方法参考专利 CN112250763B 中的实施例 2.4.2。

磁珠法筛选是将抗原蛋白 huROR1-His 进行生物素标记后，再与偶联有链霉亲和素的磁珠结合，通过将结合抗原的磁珠和抗体基因噬菌体展示文库进行孵育、洗涤和洗脱的淘选过程。通常经历 3-4 轮的淘选，由此针对抗原的特异性单克隆抗体可以大量富集。本实施例中，将生物素标记的 huROR1-His 用于噬菌体展示文库筛选，经过 3 轮淘选后进行针对人 ROR1 的单克隆抗体 Fab 初筛，具体方法参考专利 CN112250763B 中的实施例 2.4.1。

4.3 单克隆的挑选

对每轮洗脱下来的噬菌体池进行 ELISA 检测来评价富集的效果，并从每轮筛选的噬菌体池中随机挑选 10 个克隆进行序列分析，结合富集效果和所测序列重复性比例综合分析，选择合适的轮次进行单克隆挑选。

ELISA 单克隆初筛使用抗原蛋白 huROR1-His，将初筛获得的结合 huROR1-His 的抗体 Fab 制备成 Fab 裂解液，然后用实施例 2.1 制备的过表达细胞 huROR1-HEK293 通过流式细胞分析法 (FACS) 进行检测复核，共筛选到了 11 个特异结合人 ROR1 的抗体 Fab 分子，分别以相应的克隆号对获得的 11 株鼠源抗体 Fab 进行命名 (B62、B31、B32、B74、B34、B39、C38、C77、C42、M71 和 M78)，具体的 FACS 结果见图 1A-1B。所得鼠源抗体 Fab 的 CDR 氨基酸序列见表 1，采用 AbM 定义 CDR 的方式，确定 CDR 序列。

表 1 鼠源抗体 CDR 区域的氨基酸序列

克隆号	SEQ ID NO	序列	
B62	1	HCDR1	GFTFSSYVMS
	2	HCDR2	TINSNGGNTY
	3	HCDR3	DSLGLRRRDYAMDY
	28	LCDR1	VTSIDIDDDVN
	29	LCDR2	AGNTLRP
	30	LCDR3	LQSDNLPYT
B31	4	HCDR1	GFTFSRYAMS
	5	HCDR2	SISRGGSTY

克隆号	SEQ ID NO	序列	
	6	HCDR3	YFGNYDAMDY
	31	LCDR1	KASQDINNYVS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT
B32	7	HCDR1	GFAFSSYAMS
	8	HCDR2	SINRDVTTY
	9	HCDR3	GYYYGGGPYWHFDV
	34	LCDR1	KASQDINSYLT
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT
B74	10	HCDR1	GFTFSIYAMS
	11	HCDR2	SISGGGTAY
	12	HCDR3	GYYYGGSPYWHFDV
	35	LCDR1	KASQDINSYLS
	32	LCDR2	RANRLVD
	36	LCDR3	LQIDEFPYT
B34	4	HCDR1	GFTFSRYAMS
	13	HCDR2	SISTGGSPY
	14	HCDR3	GYYYNSSPHWYFAV
	35	LCDR1	KASQDINSYLS
	32	LCDR2	RANRLVD
	37	LCDR3	LQYDEFPYT
B39	15	HCDR1	GFTFSTYAMS
	16	HCDR2	SISTGASTY
	17	HCDR3	EETTTAALYYAMDY
	38	LCDR1	KASQDINNYLS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT
C38	18	HCDR1	GFTFSSYAMS
	8	HCDR2	SINRDVTTY
	19	HCDR3	DYYYGSSLYYGMDY
	31	LCDR1	KASQDINNYVS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT
C77	20	HCDR1	GFSFSNYAMS
	21	HCDR2	SINSGVTTY
	12	HCDR3	GYYYGGSPYWHFDV
	31	LCDR1	KASQDINNYVS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT
	22	HCDR1	GFTFSNYIMS

克隆号	SEQ ID NO	序列	
	23	HCDR2	TINSGGTNTY
	24	HCDR3	YNGNYVWFAY
	39	LCDR1	SASSSVSFIY
	40	LCDR2	DTSNLAS
	41	LCDR3	QQWSNYHFT
M71	4	HCDR1	GFTFSRYAMS
	25	HCDR2	SINRGGTTY
	26	HCDR3	DYYYGSSLYNGMDF
	35	LCDR1	KASQDINSYLS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT
M78	18	HCDR1	GFTFSSYAMS
	25	HCDR2	SINRGGTTY
	27	HCDR3	DYYYGSNLYNGMDY
	35	LCDR1	KASQDINSYLS
	32	LCDR2	RANRLVD
	33	LCDR3	LQFDEFPYT

实施例 5 抗体构建、表达与纯化

5.1 质粒构建

将筛选获得的单克隆 B62、B31、B32、B74、B34、B39、C38、C77、C42、M71 和 M78 的 Fab 序列中的 VH 编码序列与人 IgG1 的重链恒定区 (SEQ ID NO:52) 的编码序列连接获得嵌合抗体的重链编码序列, 将 Fab 序列中的 VL 编码序列与人轻链恒定区 (CL) 的 Kappa 型 (SEQ ID NO:53) 的编码序列连接获得嵌合抗体的轻链编码序列。将抗体重链和轻链的编码序列分别插入真核表达载体质粒 pcDNA3.4 (Invitrogen) 上, 转化到大肠杆菌 DH5α 中, 37°C 过夜培养。利用无内毒素质粒提取试剂盒 (OMEGA, D6950-01) 进行质粒提取, 得到无内毒素的抗体质粒以供真核表达使用。

5.2 抗体的表达和纯化

通过 Expi CHO 瞬转表达系统 (Thermo Fisher, A29133) 表达上述获得的抗体全长序列, 具体方法如下: 转染当天, 确认 CHO 细胞密度为 7×10^6 至 1×10^7 个活细胞/mL 左右, 细胞存活率 > 98%, 此时用 37°C 预温的新鲜 ExpiCHO 表达培养基将细胞调整到终浓度为 6×10^6 个细胞/mL。用 4°C 预冷的 OptiPRO™ SFM 稀释目的质粒 (向 1 mL 所述培养基中加入 1 μg 质粒), 同时用 OptiPRO™ SFM 稀释 ExpiFectamine™ CHO 试剂, 再将两者等体积混合并轻轻吹打混匀制备成 ExpiFectamine™ CHO/质粒 DNA 混合液, 室温孵育 1-5 min, 缓慢加入到准备好的细胞悬液中并同时轻轻摇晃, 最后置于细胞培养摇床中, 在 37°C、8% CO₂ 条件下培养。

转染 18-22 h 后, 向培养液中添加 ExpiCHO™Enhancer 试剂和 ExpiCHO™Feed 试剂, 摇瓶放置于 32°C 摇床和 5% CO₂ 条件下继续培养。在转染后的第 5 天, 添加相同体积的 ExpiCHO™Feed 试剂, 缓慢加入的同时轻轻混匀细胞混悬液。转染 7 天后, 收集表达有目的蛋白的细胞培养上清液, 15000 g 离心 10 min, 所得上清液用 MabSelect SuRe LX (GE, 17547403) 进行亲和纯化, 然后用 100 mM 乙酸钠 (pH3.0) 洗脱目的蛋白, 接着用 1 M Tris-HCl 中和, 最后通过超滤浓缩管 (Millipore, UFC901096) 将所得蛋白换液至 PBS 缓冲液中。

实施例 6 抗体的理化性质检测

本实施例中, 采用 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 检测了上述获得的抗体的相对分子量和纯度。

6.1 抗体 SDS-PAGE 鉴定

非还原溶液制备: 分别将 1 µg 各个获得的抗体以及质控品 IPI (伊匹木单抗, Ipilimumab) 加入 5×SDS 上样缓冲液和 40 mM 碘代乙酰胺中, 75°C 干浴加热 10 min, 冷却到室温后, 12000 rpm 离心 5 min 取上清。

还原溶液制备: 分别将 2 µg 各个获得的抗体以及质控品 IPI 加入 5×SDS 上样缓冲液和 5 mM DTT 中, 100°C 干浴加热 10 min, 冷却到室温后, 12000 rpm 离心 5 min 取上清。将上清加入 Bis-tris 4-15% 梯度胶 (金斯瑞) 进行凝胶电泳并通过考马斯亮蓝染色使蛋白条带显色。

使用 EPSON V550 彩色扫描仪扫描带有显色蛋白条带的蛋白凝胶 (脱色液脱色至凝胶背景透明), 通过 ImageJ 按照峰面积归一法计算还原和非还原条带纯度。

试验结果表明, 各个抗体非还原胶的条带在 150kD 左右, 还原胶的条带在 55kD 左右和 25kD 左右, 符合预期大小。通过还原胶检测的所有本申请获得的抗体纯度均大于 95% (表 2)。

6.2 SEC-HPLC 鉴定抗体的单体纯度

材料准备: 1、流动相: 150 mmol/L 磷酸缓冲液, pH7.4; 2、样品制备: 分别用流动相溶液稀释各个抗体以及质控品 IPI 到 0.5 mg/mL。Agilent HPLC 1100 或岛津 LC2030C PLUS 液相色谱仪, 色谱柱为 XBridge BEH (SEC 3.5 µm, 7.8 mm I.D.×30 cm), Waters 流速设为 0.8 mL/min, 进样体积 20 µL, VWD 检测器波长为 280 nm 和 214 nm。依次进样空白溶液、IPI 质控品溶液和抗体样品溶液。按照面积归一法计算样品中高分子聚合物、抗体单体和低分子物质百分比。

结果如图 2A-2K 和表 2 所示, 除抗体 B74 外, 其余抗体的 SEC 单体纯度均大于 96%。

表 2 本申请获得的抗体表达量和理化性质

克隆号	SDS-PAGE (%)	SEC-HPLC (%)
99961.1	>95.0	98.68
B31	>95.0	96.45
B62	>95.0	99.1
B32	>95.0	98.79
B34	>95.0	99.29
B39	>95.0	98.6
B74	>95.0	峰形异常
C38	>95.0	98.9
C42	>95.0	99.39
C77	>95.0	100
M71	>95.0	100
M78	>95.0	98.93

实施例 7 抗体的抗原结合活性检测

在本实施例中，基于 ELISA 方法检测了表达的 11 个抗体 (B62、B31、B32、B34、B39、B74、C38、C42、C77、M71 和 M78) 与人 ROR1 抗原蛋白 huROR1-His 的结合情况，还基于 FACS 方法检测了所述抗体 (B62、B31、B32、B34、B39、B74、C38、C42、C77、M71 和 M78) 与人 ROR1 过表达细胞 huROR1-HEK293 和 A549 肿瘤细胞的结合能力。A549 肿瘤细胞是人类非小细胞肺癌细胞系，其过表达人 ROR1。

7.1 基于 ELISA 检测抗体对抗原蛋白 huROR1-His 的结合能力

以 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 huROR1-His 包被 96 孔 ELISA 板 (30 $\mu\text{L/孔}$)，4°C 过夜。次日，将孔板用 PBST 洗 3 次后用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h，用 PBST 洗板 3 次后，加入梯度稀释 (3.00000、0.33333、0.11111、0.03704、0.01235、0.00412、0.00046、0.00005 $\mu\text{g/mL}$) 的各个抗体及阳性对照抗体 99961.1 并孵育 1 h。之后用 PBST 清洗 3 次后加入二抗 Goat-anti-human Fc-HRP (abcam, ab97225) 并孵育 1 h。孵育完成后，PBST 洗板 6 次，加 TMB (SurModics, TMBS-1000-01) 显色。根据显色结果，加入 2 M HCl 终止反应，通过酶标仪 (Molecular Devices, SpecterMax 190) 在 OD450 下读取数据。

结果如图 3A-3B 所示，本申请获得的全部抗体和抗原蛋白 huROR1-His 都具有较好的亲和活性，各抗体的亲和力均与 99961.1 相当。

7.2 基于 FACS 检测抗体对 huROR1-HEK293 和 A549 肿瘤细胞的结合能力

本实施例中分别用人 ROR1 过表达细胞 huROR1-HEK293 和 A549 肿瘤细胞两种细胞对抗体的结合活性进行评价。

具体方法如下：将对数生长期的 huROR1-HEK293 细胞或者 A549 细胞制备成单细胞悬液，密度调整为 1×10^6 个细胞/mL，以每孔 100 μL 加至 96 孔圆底板中，4°C、300 g 离心

并去除上清。向对应孔中加入梯度稀释的本申请获得的抗体和阳性对照抗体 99961.1, 混匀并于 4°C 孵育 30 min。将孵育后的细胞混合液洗涤 3 次后加入 100 μ L 1:300 稀释的二抗 Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG-Fc (abcam, ab98596), 4°C 避光孵育 30 min, 洗涤 3 次后通过流式细胞仪 (Beckman, CytoFLEX AOO-1-1102) 检测。

结果如图所示, 在 A549 细胞上 (图 4A-4B), 除 C42 外, 其他抗体的亲和力均优于对照抗体 99961.1; 在 huROR1-HEK293 细胞上 (图 5A-5B), 所有抗体的亲和力与对照抗体 99961.1 相当。

实施例 8 抗体种属及同族交叉活性检测

本实施例中检测了本申请获得的各个抗体在种属及同族上的交叉反应性。采用实施例 1.2 制备的鼠 ROR1 抗原蛋白 MusROR1-His 和人 ROR2 抗原蛋白 huROR2-His 对本申请获得的抗体的种属及同族交叉活性进行鉴定。

8.1 抗体的种属交叉反应性鉴定

用 2 μ g/mL 的 MusROR1-His 包被 96 孔 ELISA 板 (30 μ L/孔), 4°C 过夜。次日, 将孔板用 PBST 洗 3 次后用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 用 PBST 洗板 3 次后, 加入梯度稀释 (1.00000、0.11111、0.03704、0.01235、0.00412、0.00137、0.00015、0.00002 μ g/mL) 的各个抗体及阳性对照抗体 99961.1 并孵育 1 h。之后用 PBST 清洗 3 次后加入二抗 Goat-anti-human Fc-HRP (abcam, ab97225) 并孵育 1 h。孵育完成后, PBST 洗板 6 次, 加 TMB (SurModics, TMBS-1000-01) 显色。根据显色结果, 加入 2 M HCl 终止反应, 通过酶标仪 (Molecular Devices, SpecterMax 190) 在 OD450 下读取数据。

结果如图 6A-6B 和表 3 所示, B62、B32、C38 和 C42 与抗原蛋白 MusROR1-His 结合, 显示出了良好的鼠交叉活性。而其他抗体和阳性对照抗体 99961.1 均不结合鼠源抗原蛋白。因此本申请获得的抗体 B62、B32、C38 和 C42 在基于小鼠模型的实验及测试中具有广泛用途。

8.2 本申请抗体同族交叉反应性检测

用 2 μ g/mL 的 huROR2-His 包被 96 孔 ELISA 板 (30 μ L/孔), 4°C 过夜。次日, 将孔板用 PBST 洗 3 次后用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 用 PBST 洗板 3 次后, 加入梯度稀释的抗体及阳性对照抗体 99961.1 并孵育 1 h。之后用 PBST 清洗 3 次后加入二抗 Goat-anti-human Fc-HRP (abcam, ab97225) 并孵育 1 h。孵育完成后, PBST 洗板 6 次, 加 TMB (SurModics, TMBS-1000-01) 显色。根据显色结果, 加入 2 M HCl 终止反应, 通过酶标仪 (Molecular Devices, SpecterMax 190) 在 OD450 下读取数据。

结果如图 7A-7B 和表 3 所示, 所有抗体均不与抗原蛋白 huROR2-His 结合, 说明本申请制得的抗体能够特异性结合人 ROR1。

表 3 本申请获得的抗体种属交叉和同族交叉活性

克隆编号	种属	MusROR1-His	huROR2-His
B31	鼠	不结合	不结合
B62	鼠	结合	不结合
B32	鼠	结合	不结合
B34	鼠	不结合	不结合
B39	鼠	不结合	不结合
B74	鼠	不结合	不结合
C38	鼠	结合	不结合
C42	鼠	结合	不结合
C77	鼠	不结合	不结合
M71	鼠	不结合	不结合
M78	鼠	不结合	不结合

实施例 9 抗体内吞效率检测

在本实施例中，分别运用 FACS 和 Fab-Zap 两种检测方法对本申请获得的抗体的内吞效率进行检测。FACS 法内吞检测是用过饱和的抗体结合细胞，检测短时间内的抗体内吞效率；Fab-Zap 法是以不同浓度的结合了 Fab-Zap 毒素的抗体去结合细胞，通过内吞将毒素带进去杀伤靶细胞，此种方法反映的是内吞效率长期累加的效果。

9.1 FACS 法检测本申请抗体的内吞效率

抗体稀释：将测试抗体用 DMEM 完全培养基稀释成 10.0000 µg/mL 的终浓度。

处理细胞：将 huROR1-HEK293 细胞消化后加入 DMEM 完全培养基。充分混匀细胞后，细胞计数并测定其活率。分别取 10⁶ 的细胞加到 1.5 mL 离心管，300 g 离心 5 分钟，弃去上清，用 1 mL 预冷的 DMEM 培养基重悬，300 g 离心 5 分钟，弃去上清。

一抗孵育：取 1000 µL 预冷的上述稀释的抗体，加到已有细胞的离心管中制备抗体细胞混悬液，将抗体细胞混悬液加入 96 孔板中，4℃孵育。

胞外二抗孵育：快速转移 96 孔板中的混悬液到第二个 96 孔板中。向第二块 96 孔板中每孔加入 180 µL 预冷 FACS buffer 清洗 2 遍。之后每孔各加入 100 µL 的稀释二抗 FITC-labeled anit-huFc 或 RPE-labeled anit-huFc (二抗采用 FACS buffer 以 1:150 倍稀释)；4℃孵育 30 min。

细胞固定：孵育结束后，离心弃上清液，每孔加入 180 µL 预冷 FACS buffer，清洗细胞 2 遍。离心去上清，每孔用 100 µL 4%多聚甲醛室温固定细胞 30 min。

破碎细胞膜：固定完后，加入 180 µL FACS buffer 清洗 2 遍。每孔加入 100 µL 预热的 0.5% Triton X-100，室温穿孔 5 min。

胞内二抗孵育：清洗 96 孔板之后，每孔加入 180 µL 预热的 Permeabilization Buffer (Invitrogen™ eBioscience™, 00-8333-56) 清洗 2 遍。每孔各加入 100 µL 的稀释二抗

RPE-labeled anti-huFc (采用 Perm buffer 以 1: 150 倍稀释)。室温孵育 60 min。

检测荧光: 清洗 96 孔板之后, 用 100 μ L FACS buffer 重悬, 通过流式细胞仪检测。

本实验采用两组不同荧光设置对每个样品染色, 第一组设置为 FITC+PE, 即先用 FITC 二抗染胞外一抗, 破膜后用 PE 二抗染胞内一抗, 在这一组中 PE 为胞内信号, FITC 为胞外信号; 第二组设置为 PE+PE, 即先用 PE 二抗染胞外一抗, 破膜后用 PE 二抗染胞内一抗, 这一组 PE 为胞内和胞外信号的总和。同时这两组样品均用 FITC 和 PE 通道去检测, 内吞率计算值都是计算 PE 通道检测值, 具体公式为:

内吞率 = 一组 (FITC+PE) PE 通道 / 二组 (PE+PE) PE 通道 $\times 100\%$ 。

结果如图 8A-8B 所示, 本实施例的结果显示本申请制得的所有抗体在较短的时间内 (3h 内) 的内吞效率均优于对照抗体 99961.1。

9.2 Fab-Zap 法检测抗体内吞效率

本实验通过抗体介导 Fab-ZAP 内吞的细胞毒性来检测抗体的内吞活性。Fab-ZAP 是连接了 saporin (皂素) 的 Fab 片段, saporin 是一种核糖体抑制剂, 能够抑制蛋白质的合成而使细胞死亡。本实验用的 Fab-ZAP 是一种能够和嵌合抗体的人源 Fc 结合的 Fab 片段, Fab-ZAP 和嵌合抗体孵育后使嵌合抗体带上毒素, 当嵌合抗体被内吞时, 毒素随着嵌合抗体进入到细胞内, 使细胞死亡, 然后通过 MTS (Promega, G3580) 检测细胞的活性来检测抗体是否内吞。

具体实验方法如下: 首先将 Fab-Zap 用 DMEM 完全培养基稀释成 0.4 nM, 然后用 0.4 nM Fab-Zap 梯度稀释 (0.020000、0.006667、0.002222、0.000741、0.000247、0.000082、0.000027、0.000009 μ g/mL) 本申请获得的各个抗体及阳性对照抗体制成抗体稀释液。将对数生长期 huROR1-HEK293 细胞制成单细胞悬液, 调整密度为 6×10^6 个细胞/mL, 以每孔 50 μ L 接种到 96 孔板中, 然后取前述抗体稀释液, 以每孔 50 μ L 加入细胞培养板中, 充分吹打混匀。将细胞培养板放入 37°C 细胞培养箱孵育 48 小时。孵育结束后, 向每孔中加入 7.5 μ L TritonX-100 溶液, 轻轻拍打混匀, 将细胞培养板放入 37°C 细胞培养箱孵育 0.5 小时。接着向每孔中继续加入 20 μ L MTS, 37°C 孵育 1-4 小时。最后以 1000 rpm 离心细胞培养板 5 分钟, 酶标仪读取数据, 检测波长 A492。

结果如图 9A-9F 所示, 表明在本实施例限定的抗体浓度条件下, 本申请制得的抗体的内吞效果与对照抗体相当。考虑到细胞对于毒素敏感是在某一个阈值以上才会出现反应, 当累加的毒素差异不大时较难拉开差距。

实施例 10 抗体亲和动力学 (Gator) 检测

本实施例中, 基于 Gator 设备检测本申请获得抗体和阳性对照抗体 99961.1 与抗原蛋白 huROR1-His 的亲合力。

首先将 PBS (10 mM pH7.4) (IgG-free, 购自 Jackson ImmunoResearch Lab) +0.02% Tween

20 (购自 thermo) +0.2%BSA (购白源培) 配置成 Q 缓冲液, 用配置好的 Q 缓冲液将待测抗体的存储液稀释到终浓度为 30 nM 的工作液; 将抗原蛋白 huROR1-His 存储液用 Q 缓冲液配置成倍数稀释 (480、240、120、60、30、15、7.5 nM) 的工作液, 然后利用 Gator 仪器及其配套软件, 选择 Advanced Kinetics 实验模式进行检测和分析。试验结果如表 4 所示。

结果显示: 除 C42 抗体与对照抗体 99961.1 具有相当的亲和力之外, 其余抗体的亲和力均优于对照抗体 99961.1 的亲和力 1 个数量级或以上, 其中 B62 抗体的亲和力优于对照抗体 99961.1 的亲和力约 2 个数量级, 亲和力达到 9.84E-10。

表 4 本申请获得的抗体的亲和动力学检测结果

克隆号	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	R ²	Rmax (nm)
99961.1	1.35E-08	5.29E+05	7.12E-03	0.995	0.669
B31	5.67E-09	3.83E+05	2.17E-03	0.997	0.723
B32	1.25E-09	3.01E+05	3.77E-04	0.994	0.874
B34	2.52E-09	2.41E+05	6.09E-04	0.995	0.782
B39	4.43E-09	3.04E+05	1.35E-03	0.995	1.060
B62	9.84E-10	3.79E+05	3.73E-04	0.995	1.400
B74	1.44E-09	3.23E+05	4.64E-04	0.995	1.080
C38	1.34E-09	3.14E+05	4.22E-04	0.995	0.935
C42	2.96E-08	1.10E+05	3.25E-03	0.998	0.652
C77	2.47E-09	3.14E+05	7.74E-04	0.996	0.959
M71	1.54E-09	3.51E+05	5.40E-04	0.995	0.916
M78	1.86E-09	3.30E+05	6.14E-04	0.995	0.920

实施例 11 抗体亲和动力学 (Biacore) 分析

本实施例中, 基于 Biacore 设备检测本申请获得的抗体和阳性对照抗体 99961.1 与抗原蛋白 huROR1-His 的亲和力。

蛋白的偶联: 将实施例 1.2 生产的 huROR1-His 蛋白用 pH5.0 的 NaAc 缓冲液稀释至 5.6 μg/mL, 流速设置为 10 μL/min, 1-乙基- (3-二甲氨基丙基) 碳酰二亚胺 (EDC) 和 N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 混合液活化芯片时间为默认值 420 s, 采用预设偶联量的偶联模式固定抗原蛋白 huROR1-His 至约 75 RU 水平, 以乙醇胺封闭未结合供试品的活化基团。

样品测试条件: 以含有 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液 (pH7.4) 作为运行缓冲液, 将运行缓冲液作为对照测试样品, 设置系列抗体浓度 (4 nM, 20 nM), 样品分析时设置流速为 30 μL/min, 结合时间为 120 s, 解离时间为 360 s。解离结束之后, 采用 10 mM Gly-HCl (pH 2.0) 再生 20 s 以完全去除与配体结合的抗体。

参数拟合: 实验采用多循环运行, 其响应信号以分析时间为横坐标, 响应值为纵坐标。所得数据进行双参比扣减后, 通过 Biacore T200 分析软件进行拟合, 所采用的拟合模型为

1:1 Langmuir 结合模型，确定其结合解离常数等亲和力指标。

结果如表 5 所示，B62 抗体亲和力优于对照抗体 99961.1 约 2 个数量级，其 KD 达到 6.39E-11，而对照抗体 99961.1 的 KD 只有 1.98E-9；此外 B31 抗体的亲和力与对照抗体 99961.1 相当。

表 5 本申请获得的抗体的亲和动力学检测结果

克隆号	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t 1/2 (s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
99961.1	6.94E+05	1.37E-03	504.4	1.98E-09	Local Fit	3.13
B31	6.53E+05	8.17E-04	848.8	1.25E-09	Local Fit	1.61
B62	1.21E+06	7.74E-05	8954.3	6.39E-11	Local Fit	0.92

实施例 12 亲和动力学表位分组

本实施例采用亲和动力学的方法，对本申请获得的抗体和阳性对照抗体 99961.1 的表位进行分组。

具体试验方法如下：首先将 PBS (10mM PH7.4) (IgG-free，购自 Jackson ImmunoResearch Lab) +0.02% Tween 20 (购自 thermo) +0.2%BSA (购自源培) 配置成 Q 缓冲液，用配置好的 Q 缓冲液将待测抗体的存储液稀释到终浓度为 100 nM 的工作液；将抗原 huROR1-His 存储液用 Q 缓冲液配置成 50 nM 的工作液，然后利用 Gator 仪器及其配套软件，基于 Epitope Binning 实验模式的 Tandem 设置进行检测和分析。

具体检测和分析步骤如下：

平衡 1 阶段：探针以 1000 rpm 的转速在 Q 缓冲液内平衡反应 60 s；

固化抗原阶段：平衡 1 阶段完成后的探针以 400 rpm 的转速在含有 50 nM 抗原的 Q 缓冲液内固化反应 90 s；

平衡 2 阶段：固化抗原阶段完成后探针以 1000 rpm 的转速在 Q 缓冲液内平衡反应 60 s；

抗体 1 结合阶段：平衡 2 阶段完成后的探针以 1000 rpm 的转速在含有 100 nM 抗体 1 的 Q 缓冲液内结合反应 180 s；

平衡 3 阶段：抗体 1 结合阶段完成后的探针以 1000 rpm 的转速在 Q 缓冲液内平衡反应 30 s；

抗体 2 结合阶段：平衡 3 阶段完成后的探针以 1000 rpm 的转速在含有 100 nM 抗体 2 的 Q 缓冲液内结合反应 180 s；

再生阶段：从平衡 1 阶段到抗体 2 结合阶段为 1 个 Assay，完成 1 个 Assay 的探针在进行下一次 Assay 前需要以 1000 rpm 的转速在 Q 缓冲液内再生反应 50 s。

由此获得的各个抗体表位分组结果如表 6 所示。结果显示，本申请抗体和对照抗体 99961.1 共分成 2 个表位分组，仅 C42 和对照抗体具有相同的结合表位，其余抗体与对照抗体的结合表位不同。

表 6 表位分组结果汇总

表位分组	克隆号
1	99961.1、C42
2	B62、B32、C38、B74、M71、B34、M78、C77、B39、B31

实施例 13 鼠源抗体的人源化

将实施例 4 筛选得到的鼠源抗体 B31 和 B62 的 VH 和 VL 序列分别和已知的人源抗体数据库进行比对，找到分别与鼠源 VH 和 VL 序列同源性最高的人种系 (germline) 基因 VH 和 VL 序列。选择相应人种系基因 VH 和 VL 序列的框架区 (采用 AbM 定义 CDR 和框架区)，将该种系基因的互补决定区 (CDR) 序列替换为本申请鼠源抗体 B31 和 B62 中对应的 CDR 序列，然后借助计算机预测模拟，通过回复突变的方式保留鼠源抗体 B31 和 B62 框架区中对抗原结合具有重要影响的鼠源氨基酸。鼠源抗体 B31 和 B62 经人源化后获得人源化抗体 CDR 区氨基酸序列见表 7。通过实施例 5 的方法进行构建、表达、纯化获得对 B31 和 B62 进行人源化后的多个抗体，并通过 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 鉴定对 B31 和 B62 进行人源化后获得的多个抗体蛋白，结果见表 8。结果表明各个抗体非还原胶的条带在 150 kD 左右，还原胶的条带在 55 kD 左右和 25 kD 左右，符合预期大小，通过还原胶检测的所有本申请获得的抗体纯度均大于 95%；所有抗体的 SEC 单体纯度均大于 96%。

表 7 人源化抗体的 CDR 区氨基酸序列

克隆号	SEQ ID NO	序列	
B31-H1L1、B31-H2L2、B31-H2L3、B31-H3L2、 B31-H3L3、B31-H3L4、B31-H4L2、B31-H4L3、 B31-H4L4	4	HCDR1	GFTFSRYAMS
B31-H1L1、B31-H2L2、B31-H2L3、B31-H3L2、 B31-H3L3、B31-H3L4、 B31-H4L2、B31-H4L3、B31-H4L4	5	HCDR2	SISRGGSTY
	42	HCDR2	AISRGGSTY
B31-H1L1、B31-H2L2、B31-H2L3、B31-H3L2、 B31-H3L3、B31-H3L4、B31-H4L2、B31-H4L3、 B31-H4L4	6	HCDR3	YFGNYDAMDY
B31-H1L1、B31-H2L2、B31-H3L2、B31-H4L2	31	LCDR1	KASQDINNYVS
B31-H2L3、B31-H3L3、B31-H4L3	43	LCDR1	RASQDINNYVS
B31-H3L4、B31-H4L4	44	LCDR1	RASQDINNYLS
B31-H1L1、B31-H2L2、B31-H3L2、B31-H4L2	45	LCDR2	RANRLVD
B31-H2L3、B31-H3L3、B31-H4L3	46	LCDR2	RANRLVS
B31-H3L4、B31-H4L4	47	LCDR2	RANRLQS
B31-H1L1、B31-H2L2、B31-H2L3、B31-H3L2、 B31-H3L3、B31-H3L4、B31-H4L2、B31-H4L3、 B31-H4L4	48	LCDR3	LQFDEFPYT
B62-H1L1、B62-H1L2、B62-H2L2、B62-H2L3、 B62-H2L4、B62-H3L2、B62-H3L3、B62-H3L4	1	HCDR1	GFTFSSYVMS

B62-H1L1、B62-H1L2、B62-H2L2、B62-H2L3、 B62-H2L4、B62-H3L2、B62-H3L3、B62-H3L4	2	HCDR2	TINSNGGNTY
B62-H1L1、B62-H1L2、B62-H2L2、B62-H2L3、 B62-H2L4、B62-H3L2、B62-H3L3、B62-H3L4	3	HCDR3	DSLGLRRRDYA MDY
B62-H1L1、B62-H1L2、B62-H2L2、B62-H2L3、 B62-H3L2、B62-H3L3	28	LCDR1	VTSIDIDDDVN
B62-H2L4、B62-H3L4	49	LCDR1	QTSIDIDDDVN
B62-H1L1、B62-H1L2、B62-H2L2、B62-H2L3、 B62-H3L2、B62-H3L3	29	LCDR2	AGNTLRP
B62-H2L4、B62-H3L4	50	LCDR2	AGNTLET
B62-H1L1、B62-H1L2、B62-H2L2、B62-H2L3、 B62-H2L4、B62-H3L2、B62-H3L3、B62-H3L4	30	LCDR3	LQSDNLPYT

表 8 人源化抗体的理化性质

克隆号	SDS-PAGE(%)	SEC(%)
B31	>95.0	100
B31-H1L1	>95.0	98.34
B31-H2L2	>95.0	100
B31-H2L3	>95.0	100
B31-H3L2	>95.0	100
B31-H3L3	>95.0	100
B31-H3L4	>95.0	100
B31-H4L2	>95.0	100
B31-H4L3	>95.0	99.1
B31-H4L4	>95.0	100
B62	>95.0	98.72
B62-H1L1	>95.0	100
B62-H1L2	>95.0	100
B62-H2L2	>95.0	100
B62-H2L3	>95.0	100
B62-H2L4	>95.0	96.73
B62-H3L2	>95.0	100
B62-H3L3	>95.0	100
B62-H3L4	>95.0	97.07

实施例 14 人源化抗体的抗原亲和力检测

在本实施例中，基于 ELISA 方法检测了人源化抗体与人 ROR1 抗原蛋白 huROR1-His 的亲合效果，还基于 FACS 方法检测了人源化抗体与 A549 肿瘤细胞的亲和能力。具体测试方法参照实施例 7。

ELISA 检测结果如图 10A-10E 所示，人源化抗体与抗原蛋白的亲和力与对应母本分子

和对照抗体 99961.1 相当。

FACS 测试结果如图 11A-11B 所示，除 B31-H3L4、B31-H4L3、B31-H4L2 和 B31-H4L4 外，人源化抗体对 A549 肿瘤细胞上的抗原蛋白的亲和力与对应母本分子和对照抗体 9996.1 相当。

实施例 15 人源化抗体内吞效率检测

本实施例中，对实施例 13 中人源化抗体 B31-H3L3 和 B62-H3L3 进行 Fab-Zap 法内容检测，具体方法参照实施例 9，结果如图 12 所示，B31-H3L3 和 B62-H3L3 的内吞效果与对照抗体 99961.1 相当。

实施例 16 ADC 制备

本实施例中将抗体 B62-H3L3、B31-H3L3 和对照抗体 99961.1 与毒素 MMAE (一种 tubulin 抑制剂，具有抗癌活性) 偶联构建了抗体偶联药物，MMAE 与接头 MC-VC-PAB 连接构成 MC-VC-PAB-MMAE，并借助接头与抗体的半胱氨酸上的巯基共价连接，从而使得抗体与 MMAE 缀合制得抗体偶联药物。IgG1 型抗体具有 16 对半胱氨酸残基，其中以 12 个链内和 4 个链间二硫键的形式存在。链间二硫键具有溶剂可及性，可以被还原剂还原形成八个巯基，进而成为偶联目标 (McCombs J, Owen S. Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry. AAPS J. 2015;17:339-51)。

具体制备方法如下：

将抗体 B62-H3L3、B31-H3L3 和对照抗体 99961.1 从 -80℃ 冰箱取出，融化后分别转移到 15 mL 30KD 超滤离心管中，补加偶联缓冲液 (每 1 L 含量：Na₂HPO₄ 2H₂O 6.86 g，NaH₂PO₄ H₂O 1.58 g，纯化水定容至 1000 g，pH7.4) 至 15 mL，4500 rpm 离心约 30 min，浓缩至 2-3 mL，重新补加透析液 (每 1L 含量：组氨酸 0.73 g，一水盐酸组氨酸 1.12 g，纯化水定容至 1000 g，pH6.0) 至 15 mL，反复透析 8-10 次，获得抗体原液，检测透析后抗体浓度。

依次加入抗体原液、10 mM 二硫键还原剂 TCEP 母液 (三(2-羧乙基)膦酸盐母液，每 1 L 含量：Na₂HPO₄ 2H₂O 6.86 g，NaH₂PO₄ H₂O 1.58 g，纯化水定容至 1000 g)、10 mM DTPA 母液 (二乙烯三胺五乙酸母液，每 1 L 含量：DTPA 3.90 g，NaOH 1.20 g，纯化水定容至 1000 g) 和偶联缓冲液构成还原反应体系，以还原抗体的半胱氨酸上的巯基。还原反应体系中各组分的加入量参见表 9，使得还原反应体系中抗体浓度为 5 mg/mL，DTPA 终浓度为 1 mM，TCEP 与 B62-H3L3 或 B31-H3L3 的摩尔比为 2，TCEP 与 9996.1 的摩尔比为 2.2。充分混匀之后，将还原反应体系置于 25℃ 恒温混匀仪中，转速为 400 rpm，还原反应 2 h。

称量 MC-VC-PAB-MMAE，使用 DMSO 溶解，配置成 5 mM MC-VC-PAB-MMAE 母液。还原反应结束后，在冰水浴中依次向还原反应体系中添加 MC-VC-PAB-MMAE 母液，添加

量如表 10 所示，制成偶联反应体系。充分混匀后，将偶联反应体系置于 25℃恒温混匀仪中，400 rpm，偶联反应 1 h 获得包含 ADC 的溶液。

偶联结束后，离心包含 ADC 的溶液并过滤，获得 ADC 样品，并将其转移到 15 mL 30KD 超滤离心管中。补加透析液至 15 mL，4500 rpm 离心 20 min，浓缩至 2-3 mL，重新补加透析液至 15 mL，反复透析 8-10 次。对透析后的 ADC 样品进行 SEC-HPLC 检测、HIC-HPLC 检测、浓度检测、游离药物检测等。测试结果参见表 11。测试结果显示获得了纯度 99%以上的 ADC。

表 9 还原反应体系组成

克隆号	抗体母液浓度 (mg/mL)	抗体母液加入体积 (mL)	抗体量(mg)	10mM TCEP 母液加入体积 (μL)	10mM DTPA 母液加入体积 (μL)	偶联缓冲液加入体积 (μL)
B62-H3L3	7.14	10.5	74.97	103.4	1499	2892
B31-H3L3	9.28	5.0	46.4	64	928	3288
99961.1	8.62	9.0	77.58	117.7	1552	4846

表 10 MC-VC-PAB-MMAE 母液添加量

克隆号	B62-H3L3	B31-H3L3	99961.1
MC-VC-PAB-MMAE 与抗体摩尔比	6.0	6.0	6.0
5mM MC-VC-PAB-MMAE 母液添加体积 (μL)	620	384	642

表 11 ADC 样品测试结果

克隆号	SEC-HPLC	浓度 (mg/mL)	游离药物 残留量	HIC-HPLC					
				平均 DAR	D0%	D2%	D4%	D6%	D8%
B62-H3L3-MMAE	99.9%	9.9	未检出	3.5	6.40	34.11	41.47	13.76	4.26
B31-H3L3-MMAE	99.6%	6.5	未检出	3.5	6.50	34.45	41.49	13.88	3.67
99961.1-MMAE	99.8%	7.1	0.03%	3.8	4.61	30.76	42.30	16.36	5.97

实施例 17 ADC 的抗原结合活性检测

本实施例中，基于 FACS 方法检测了所述制得的 ADC (B62-H3L3-MMAE、B31-H3L3-MMAE) 与肿瘤细胞 A549 和 HT-29 (人结肠癌细胞) 上的人 ROR1 的结合能力。

具体方法如下：将对数生长期的 A549 细胞或者 HT-29 细胞制备成单细胞悬液，密度调整为 1×10^6 个细胞/mL，以每孔 100 μL 加至 96 孔圆底板中，4℃、300 g 离心并去除上清。向对应孔中加入梯度稀释 (1.0000、0.3333、0.1111、0.0370、0.0123、0.0041、0.0014、0.0001 μg/mL) 的本申请抗体(B62-H3L3 和 B31-H3L3)、本申请 ADC (B62-H3L3-MMAE、B31-H3L3-MMAE)、99961.1、99961.1-MMAE 和阴性对照，混匀并于 4℃孵育 30 min。将孵育后的细胞混合液洗涤 3 次后加入 100 μL 1：300 稀释的二抗 Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG-Fc (abcam , ab98596) ， 4℃避光孵育 30 min，洗涤 3 次后通过流式细胞仪 (Beckman，

CytoFLEX AOO-1-1102) 检测。

结果如图 13A-13B 所示：与 A549 细胞结合的结果显示于图 13A，在偶联后，B62-H3L3-MMAE 和 99961.1-MMAE 与 A549 细胞的结合活性略差于对应裸抗，B62-H3L3 和 B62-H3L3-MMAE 与 A549 细胞结合活性都要优于相应阳性对照；与 HT-29 细胞结合的结果显示于图 13B：裸抗和相应的 ADC 与 HT-29 细胞的结合活性相当，且 B62-H3L3 和 B62-H3L3-MMAE 与 HT-29 细胞的结合活性都要略优于相应阳性对照。

实施例 18 基于 MTS 法检测 ADC 肿瘤细胞杀伤效果

本实施例中分别用 A549 和 HT-29 细胞检测本申请 ADC 和对照 ADC 对肿瘤细胞的杀伤情况。

具体方法如下：将对数生长期的 A549 细胞或者 HT-29 细胞制备成单细胞悬液，A549 密度调整为 1×10^4 个细胞/mL，HT-29 密度调整为 1.5×10^4 个细胞/mL，以每孔 100 μ L 加至 96 孔细胞培养板中，37°C，5% CO₂，培养 12h 后。之后加入梯度稀释 (2000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.813、1.953 nM) 的 ADC 样品，37°C，5% CO₂，培养 72 h (A549 细胞) 或者 96 h (HT-29 细胞)。然后每孔加入 40 μ L MTS (Promega, G3580)，37°C 孵育 1 h 后，通过酶标仪在 OD492 下读取数据。

结果如图 14A-14D 所示：B31-H3L3-MMAE 在两个肿瘤细胞 A549 (图 14A) 和 HT-29 (图 14C) 上的杀伤效果要略优于对照 ADC 99961.1-MMAE，而 B62-H3L3-MMAE 在 A549 (图 14B) 和 HT-29 (图 14D) 上的杀伤效果要略差于对照 ADC 99961.1-MMAE。

实施例 19 基于 CCK8 法检测 ADC 肿瘤细胞杀伤效果

实施例中分别用 Jeko-1 细胞 (人套细胞淋巴瘤细胞)、MDA-MB-468 细胞 (人乳腺癌细胞) 和 NCI-H1944 细胞 (人肺癌细胞) 检测 B31-H3L3-MMAE、B62-H3L3-MMAE 和对照 ADC 对肿瘤细胞的杀伤情况。

具体方法如下：将对数生长期的 Jeko-1 细胞、MDA-MB-468 细胞或 NCI-H1944 细胞制备成单细胞悬液，Jeko-1 密度调整为 1×10^5 个细胞/mL，MDA-MB-468 密度调整为 2×10^5 个细胞/mL，NCI-H1944 密度调整为 1.2×10^5 个细胞/mL，以每孔 90 μ L 加至 96 孔细胞培养板中，37°C，5% CO₂，培养 12 h。之后加入 ADC 样品，将药物浓度梯度稀释至 500、158、50、15.8、5、1.58、0.5、0.158、0.05 nM，37°C，5% CO₂，培养 72 h。然后每孔加入 10 μ L CCK8 (Bimake, B34304)，37°C 孵育 1h 后，通过酶标仪在 OD450 下读取数据。

试验结果如图 15A-15C 所示，B31-H3L3-MMAE 和 B62-H3L3-MMAE 在三个肿瘤细胞 Jeko-1 (图 15A) 和 MDA-MB-468 (图 15B) 和 NCI-H1944 (图 15C) 上的杀伤效果与对照 ADC 99961.1-MMAE 相当，其中 B31-H3L3-MMAE 在 Jeko-1、MDA-MB-468 和 NCI-H1944 上的 EC₅₀ 分别是 38.24 nM、15.24 nM 和 117.3 nM，B62-H3L3-MMAE 在 Jeko-1、MDA-MB-468

和 NCI-H1944 上的 EC_{50} 分别是 50.14 nM、28.64 nM 和 128.6 nM。

实施例 20 基于 CCK8 法检测 ADC 抗原依赖的杀伤效果

本实施例中用 huROR1-HEK293 细胞检测 B31-H3L3-MMAE 和对照 ADC 抗原依赖的杀伤效果。

具体方法如下：将对数生长期的 huROR1-HEK293 细胞制备成单细胞悬液，细胞密度调整成 6×10^4 个细胞/mL，以每孔 50 μ L 加至 96 孔细胞培养板中，37°C，5% CO_2 ，培养 24 h 后，每孔加入 50 μ L 浓度为 100 μ g/mL 的抗体 B31-H3L3 和阳性对照抗体 99961.1，37°C 孵育 2 h 后，加入浓度梯度稀释 (42.6667、21.3333、10.6667、5.3333) 的对应的 ADC B31-H3L3-MMAE 和对照 ADC 99961.1-MMAE，37°C，5% CO_2 ，培养 96h 后，每孔 30 μ L CCK8 (absin/爱必信，abs50003)，37°C 孵育 1-4 h 后，通过酶标仪在 OD450 下读板。采用未加抗体仅加入 ADC 的体系作为对照组。

结果如图 16 所示，抗体 B31-H3L3 和 99961.1 的竞争能够显著抑制其对应 ADC 对 huROR1-HEK293 细胞的杀伤效果，证明本申请制得的 ADC 对于细胞的杀伤依赖于连接在 ADC 上的抗体与细胞表面的抗原的结合，因而是抗原依赖性杀伤而非连接毒素的非特异性杀伤。

实施例 21 ADC 内吞效率检测

本实施例中用 A549 和 HT-29 肿瘤细胞基于 FACS 法检测了本申请获得的 ADC 的内吞效率，具体实验方法参见实施例 9。

实验结果表明，在 A549 细胞上 (图 17A)，B31-H3L3-MMAE 和对照 ADC 99961.1-MMAE 内吞效率相当，B62-H3L3-MMAE 的内吞效率略低于阳性对照 ADC，且 ADC 的内吞效率均高于其对应抗体；在 HT-29 细胞上 (图 17B)，B31-H3L3-MMAE 的内吞效率略高于阳性对照 ADC，B62-H3L3-MMAE 的内吞效率略低于阳性对照 ADC，且抗体内吞效率普遍低于其对应 ADC。

实施例 22 ADC 抑制 HT-29 小鼠荷瘤模型药效检测

本实施例中，验证了 2 个候选 ADC (B31-H3L3-MMAE 和 B62-H3L3-MMAE) 在动物体内的抑瘤效果，以 99961.1-MMAE 为阳性对照，所使用肿瘤细胞为结肠癌细胞 HT-29 (BNCC337732)。

具体方法如下：使用 6-8 周龄、体重在 20 g 左右的雌性 Balb/C 裸鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司)，每只裸鼠皮下单侧注射 1×10^6 个 HT-29 细胞，待荷瘤体积达 100 mm^3 左右时，进行随机分组分笼。每组 6 只荷瘤裸鼠，共 9 组，包括一个 PBS 阴性对照组、5 个候选 ADC 组 (B31-H3L3-MMAE 0.4 kg/mg (mpk)、B31-H3L3-MMAE 2 mg/kg、B31-H3L3-MMAE 10 mg/kg、B62-H3L3-MMAE 2 mg/kg 和 B62-H3L3-MMAE 10 mg/kg) 和

3 个阳性对照 ADC 组 (99961.1-MMAE 0.4 kg/mg、99961.1-MMAE 2 mg/kg 和 99961.1-MMAE 10 mg/kg)，给药方式为尾静脉注射给药，每周给药 2 次并测量 2 次瘤体积，共给药 8 次/4 周 (BIW*4)。瘤体积 (V) 计算方式： $V=L\times W^2/2$ (其中 L 是肿瘤直径中最长的，W 是肿瘤直径中最短的)。给药结束后 1 周将小鼠安乐死，取肿瘤并测量瘤重。分析瘤体积、瘤重和小鼠体重变化数据，计算抑瘤率。结果示于图 18A-18C 和表 12。

试验结果表明，各组小鼠体重之间无明显差异，并且治疗期间各组小鼠体重均无明显变化，表明小鼠对 ADC 的耐受性良好 (图 18B)；B31-H3L3-MMAE、B62-H3L3-MMAE 和对照 ADC 99961.1-MMAE 均在高剂量 (10 mpk) 的条件下显示出了显著的抑瘤效果，在高剂量的条件下，B31-H3L3-MMAE 和 99961.1-MMAE 抑瘤效果相当，B62-H3L3-MMAE 的抑瘤率略弱于对照 ADC 99961.1-MMAE，而在较低剂量 (2 mpk) 的条件下，B62-H3L3-MMAE 的抑瘤效果明显优于对照 ADC 99961.1-MMAE 和 B62-H3L3-MMAE (图 18A、图 18C 和表 12)。

表 12 ADC 在小鼠体内的抑瘤率

	抑瘤率 TGI (%)=(1-实验组肿瘤平均体积/PBS 对照组肿瘤平均体积)×100%								
	测量天								
	23	27	30	34	37	41	44	48	51
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99961.1-MMAE 10 mpk	-15.19	37.35	44.00	69.99	82.23	85.78	90.30	88.83	89.35
99961.1-MMAE 2 mpk	-5.80	-10.51	-9.85	1.17	14.41	5.62	13.72	17.82	15.90
99961.1-MMAE 0.4 mpk	7.60	0.08	4.71	-2.64	9.28	2.61	7.32	8.34	11.08
B31-H3L3-MMAE1 0 mpk	-5.56	17.16	36.56	59.72	73.42	83.01	85.35	85.16	85.53
B31-H3L3-MMAE2 mpk	-7.50	8.48	6.86	0.99	4.88	6.70	9.97	14.09	15.37
B31-H3L3-MMAE0 .4 mpk	-2.50	8.22	-0.94	-5.59	4.75	9.43	12.34	17.92	16.05
B62-H3L3-MMAE1 0 mpk	20.27	29.04	23.90	48.45	63.35	67.65	68.50	73.86	73.87
B62-H3L3-MMAE2 mpk	-1.05	1.92	-2.38	4.20	17.04	16.26	23.06	27.19	33.54

实施例 23 ADC 抑制 A549 小鼠荷瘤模型药效检测

本实施例检测了 2 个候选 ADC (B31-H3L3-MMAE 和 B62-H3L3-MMAE) 在动物体内的抑瘤效果, 所使用肿瘤细胞为非小细胞肺癌细胞 A549 (中科院上海细胞库, C2107019), 以 99961.1-MMAE 作为阳性对照。

具体方法如下: 使用 6-8 周龄、体重在 18-20 g 的雌性裸鼠 (Balb/C 北京维通利华实验动物技术有限公司), 每只裸鼠右侧背部皮下单侧注射 1×10^6 个 A549 细胞, 待荷瘤体积达 100 mm^3 左右时, 进行随机分组分笼。每组 6 只荷瘤裸鼠, 共 4 组, 包括一个 PBS 阴性对照组、2 个 ADC 组 (B31-H3L3-MMAE 10 mpk (mg/kg) 和 B62-H3L3-MMAE 10 mpk) 和 1 个阳性对照 ADC 组 (99961.1-MMAE 10 mpk), 给药方式为尾静脉注射给药, 每周给药 2 次并测量 2 次瘤体积, 共给药 6 次/3 周 (BIW*3)。瘤体积 (V) 计算方式: $V=L\times W^2/2$ (其中 L 是肿瘤直径中最长的, W 是肿瘤直径中最短的)。给药结束后观察一定时间后将小鼠安乐死, 取肿瘤并测量瘤重。分析瘤体积、瘤重和小鼠体重变化数据, 计算抑瘤率。结果示于图 19A-19C 和表 13。

试验结果表明, 治疗期间各组小鼠体重均无明显变化, 表明小鼠对 ADC 的耐受性良好 (图 19B); B62-H3L3-MMAE 在同等剂量下显示出了与阳性对照 ADC 相当的抑瘤效果, B31-H3L3-MMAE 显示出了优于阳性对照 ADC 的抑瘤效果 (图 19A, 19C 和表 13)。

表 13 ADC 在小鼠体内的抑瘤率

	抑瘤率 TGI (%)=(1-实验组肿瘤平均体积/PBS 对照组肿瘤平均体积) $\times$ 100%			
测量天	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk	B31-H3L3-MMAE 10 mpk	B62-H3L3-MMAE 10 mpk
27	0	13.93	8.75	18.82
31	0	24.23	32.35	33.29
34	0	25.74	40.25	30.91
38	0	32.76	49.82	40.03
41	0	43.24	51.16	37.77
45	0	40.56	47.39	35.15
48	0	37.81	43.98	36.38

实施例 24 ADC 抑制 NCI-N87 小鼠荷瘤模型药效检测

本实施例检测了 1 个候选 ADC (B31-H3L3-MMAE) 在动物体内的抑瘤效果, 所使用肿瘤细胞为胃癌细胞 NCI-N87 (中科院上海细胞库, C2009021, P3), 以 99961.1-MMAE 作为阳性对照。

具体方法如下: 使用 6-8 周龄、体重在 18-20 g 的雌性裸鼠 (Balb/C 北京维通利华实验动物技术有限公司), 每只裸鼠进行背部皮下注射 1×10^6 个 NCI-N87 细胞, 待荷瘤体积达

100 mm³左右时，进行随机分组分笼。每组 10 只荷瘤裸鼠，共 5 组，包括一个 PBS 阴性对照组、2 个 ADC 组 (B31-H3L3-MMAE 5 mpk (mg/kg) 和 B31-H3L3-MMAE 10 mpk) 和 2 个阳性对照 ADC 组 (99961.1-MMAE 5 mpk 和 99961.1-MMAE 10 mpk)，给药方式为尾静脉注射给药，每周给药 1 次并测量 2 次瘤体积，共给药 3 次/3 周 (QW*3)。瘤体积 (V) 计算方式： $V=L\times W^2/2$ (其中 L 是肿瘤直径中最长的，W 是肿瘤直径中最短的)。分析瘤体积和小鼠体重变化数据，计算抑瘤率。结果示于图 20A-20B 和表 14。

试验结果表明，治疗期间各组小鼠体重均无明显变化，表明小鼠对 ADC 的耐受性良好 (图 20B)；和 PBS 组比较，各剂量组都具有显著的抑瘤效果，B31-H3L3-MMAE 分子与 99961.1-MMAE 分子在 10 mpk 下抑瘤效果均相当(图 20A 和表 14)。

表 14 ADC 在小鼠体内的抑瘤率

	抑瘤率 TGI (%)=(1-实验组肿瘤平均体积/PBS 对照组肿瘤平均体积)×100%				
测量天	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk	99961.1-MMAE 5 mpk	B31-H3L3-MMAE 10 mpk	B31-H3L3-MMAE 5 mpk
9	0	8.56	11.62	9.34	-1.37
13	0	70.46	60.38	70.29	50.63
16	0	85.05	76.07	85.24	66.26
20	0	93.11	86.75	93.39	78.22
23	0	96.15	91.1	96.64	83.03
27	0	97.36	94.75	98.1	90.91
30	0	98.27	95.93	98.59	91.62
34	0	98.61	97.67	98.9	94.93
37	0	98.87	97.75	99.04	93.89
41	0	99.28	98.28	99.11	95.15
44	0	99.40	98.2	99.31	94.2
48	0	99.40	98.09	99.48	94.68
51	0	99.20	97.86	99.31	91.52

实施例 25 ADC 抑制 MDA-MB-231 小鼠荷瘤模型药效检测

本实施例检测了 1 个候选 ADC (B31-H3L3-MMAE) 在动物体内的抑瘤效果，所使用肿瘤细胞为三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 (中科院上海细胞库，C2006040)，以 99961.1-MMAE 作为阳性对照。

具体方法如下：使用 6-8 周龄、体重在 20-22 g 的雌性裸鼠 (NSG 北京维通利华实验动物技术有限公司)，每只裸鼠背部皮下注射 1×10^6 个 MDA-MB-231 细胞，待荷瘤体积达 100 mm³左右时，进行随机分组分笼。每组 10 只荷瘤裸鼠，共 5 组，包括一个 PBS 阴性对照组、

2 个 ADC 组 (B31-H3L3-MMAE 5 mpk (mg/kg) 和 B31-H3L3-MMAE 10 mpk) 和 2 个阳性对照 ADC 组 (99961.1-MMAE 5 mpk 和 99961.1-MMAE 10 mpk), 给药方式为尾静脉注射给药, 每周给药 1 次并测量 2 次瘤体积, 共给药 3 次/3 周 (QW*3)。瘤体积 (V) 计算方式: $V = L \times W^2 / 2$ (其中 L 是肿瘤直径中最长的, W 是肿瘤直径中最短的)。分析瘤体积和小鼠体重变化数据, 计算抑瘤率。结果示于图 21A-21B 和表 15。

试验结果表明, 各组小鼠给药前期未见明显差异, PBS 组于第 35 天开始出现体重下降, 预计为肿瘤负荷过大导致, ADC 组和阳性对照组小鼠体重无明显变化, 表明小鼠对 ADC 的耐受性良好 (图 21B); 和 PBS 组比较, 阳性对照和测试 ADC 的高剂量组有相当的抑瘤作用, 效果显著; 低剂量条件下测试 ADC (B31-H3L3-MMAE) 显现出了优于阳性对照 ADC 的肿瘤抑制效果。低剂量组在停药后有一定的肿瘤组织反弹 (图 21A 和表 15)。

表 15 ADC 在小鼠体内的抑瘤率

	抑瘤率 TGI (%)=(1-实验组肿瘤平均体积/PBS 对照组肿瘤平均体积)×100%				
测量天	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk	99961.1-MMAE 5 mpk	B31-H3L3-MMAE 10 mpk	B31-H3L3-MMAE 5 mpk
21	0	27.12	25.14	29.51	24.01
25	0	59.78	41.55	59.33	50.35
28	0	76.74	61.45	74.57	67.87
32	0	87.51	73.37	87.43	79.37
35	0	91.65	79.35	91.32	85.76
39	0	94.82	84.93	94.55	89.98
42	0	95.56	85.01	95.56	90.53
46	0	96.13	79.9	95.87	88.81
49	0	96.25	76.4	96.03	86.62
53	0	91.58	31.55	91.85	58.88
56	0	96.60	67.66	96.60	79.79

实施例 26 ADC 抑制 MDA-MB-468 小鼠荷瘤模型药效检测

本实施例检测了 1 个候选 ADC (B31-H3L3-MMAE) 在动物体内的抑瘤效果, 所使用肿瘤细胞为三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-468 (中科院上海细胞库, TCHu136), 以 99961.1-MMAE 作为阳性对照。

具体方法如下: 使用 6-8 周龄、体重在 21-25 g 的雌性裸鼠 (NOD SCID 浙江维通利华实验动物技术有限公司), 每只裸鼠背部皮下注射 1×10^7 个 MDA-MB-468 细胞, 待荷瘤体积达 200 mm³ 左右时, 进行随机分组分笼。每组 6 只荷瘤裸鼠, 共 5 组, 包括一个 PBS 阴性对照组、2 个 ADC 组 (B31-H3L3-MMAE 5 mpk (mg/kg) (QW*3)、B31-H3L3-MMAE 10 mpk

(QW*3)和 2 个阳性对照 ADC 组 (99961.1-MMAE 5 mpk (QW*3)、99961.1-MMAE 10 mpk (QW*3); 每组 3 只荷瘤裸鼠, 共 2 组, 包括 B31-H3L3-MMAE 10 mpk (单次给药) 和 99961.1-MMAE 10 mpk (单次给药), 给药方式为尾静脉注射给药, 共给药 3 次/3 周 (QW*3) 或单次给药 (single dose)。瘤体积 (V) 计算方式: $V=L \times W^2/2$ (其中 L 是肿瘤直径中最长的, W 是肿瘤直径中最短的)。分析瘤体积和小鼠体重变化数据, 计算抑瘤率。结果示于图 22A-22B 和表 16-17。

试验结果表明, 治疗期间各组小鼠体重均无明显变化, 表明小鼠对 ADC 的耐受性良好 (图 22B); QW*3 给药 10 mpk B31-H3L3-MMAE 的组的抑瘤速度略高于 QW*3 给药 10 mpk 99961.1-MMAE 的组 (表 17), 但都在给药后大约 18 天达到全部小鼠的完全缓解 (CR); QW*3 给药 5 mg/kg B31-H3L3-MMAE 组优于 QW*3 给药 5 mg/kg 99961.1-MMAE 组的抑瘤效果, 且在给药后 25 天达到 4/6 小鼠的 CR。单次给药 10 mg/kg 剂量 B31-H3L3-MMAE 的组表现出优于单次给药 10 mg/kg 99961.1-MMAE 组的抑瘤效果, 其中 B31-H3L3-MMAE 组在给药后 18 天全部 CR, 而 99961.1-MMAE 组却在给药后 20 天出现瘤体复发。本实验中, 所有 B31-H3L3-MMAE 组未见瘤体复发 (图 22A 和表 16-17)。

表 16 ADC 在小鼠体内的抑瘤率

测量天	抑瘤率 TGI (%)=(1-实验组肿瘤平均体积/PBS 对照组肿瘤平均体积)×100%						
	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk, QW*3	99961.1-MMAE 5 mpk, QW*3	B31-MMAE 10 mpk, QW*3	B31-MMAE 5 mpk, QW*3	99961.1-MMAE 10 mpk, 单次给药	B31-MMAE 10 mpk, 单次给药
35	0	38.24	38.52	46.53	38.37	21.17	29.08
38	0	60.49	56.66	70.18	52.31	45.57	50.62
42	0	84.96	68.58	91.94	74.83	74.09	84.41
45	0	94.6	84.17	99.44	84.77	78.07	94.13
49	0	100	92.84	100	93.52	77.26	100
51	0	100	96.69	100	96.83	74.59	100
56	0	100	98.21	100	98.02	64.31	100

表 17 ADC 在小鼠体内的完全缓解率

测量天	完全缓解率 CR (%)						
	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk, QW*3	99961.1-MMAE 5 mpk, QW*3	B31-MMAE 10 mpk, QW*3	B31-MMAE 5 mpk, QW*3	99961.1-MMAE 10 mpk, 单次给药	B31-MMAE 10 mpk, 单次给药
38	0	-	-	-	-	-	-
42	0	-	-	1/6	-	-	-

45	0	1/6	-	5/6	-	-	1/3
49	0	6/6	1/6	6/6	2/6	-	3/3
51	0	6/6	4/6	6/6	4/6	-	3/3
56	0	6/6	6/6	6/6	4/6	-	3/3

实施例 27 ADC 抑制 Jeko-1 小鼠荷瘤模型药效检测

本实施例检测了 1 个候选 ADC (B31-H3L3-MMAE) 在动物体内的抑瘤效果, 所使用肿瘤细胞为套细胞淋巴瘤细胞 Jeko-1 (ATCC, CRL-3006), 以 99961.1-MMAE 作为阳性对照。

具体方法如下: 使用 6-8 周龄、体重在 21-25 g 的雌性裸鼠 (BALB/c 浙江维通利华实验动物技术有限公司), 每只裸鼠背部皮下注射 1×10^7 个 Jeko-1 细胞, 待荷瘤体积达 100 mm^3 左右时, 进行随机分组分笼。每组 7 只荷瘤裸鼠, 共 9 组, 包括一个 PBS 阴性对照组、4 个 ADC 组 (B31-H3L3-MMAE 2.5 mpk (mg/kg) (QW*3)、B31-H3L3-MMAE 10 mpk (QW*3)、B31-H3L3-MMAE 10 mpk (单次给药) 和 B31-H3L3-MMAE 2.5+3.5 mpk (Q2W*2, 即第 15 天给药 2.5 mpk 和第 29 天给药 3.5 mpk, 简写为 D15 2.5 mpk+D29 3.5 mpk)) 和 4 个阳性对照 ADC 组 (99961.1-MMAE 2.5 mpk (QW*3)、99961.1-MMAE 10 mpk (QW*3)、99961.1-MMAE 10 mpk (单次给药) 和 99961.1-MMAE 2.5+3.5 mpk (Q2W*2, 即第 15 天给药 2.5 mpk 和第 29 天给药 3.5 mpk, 简写为 D15 2.5 mpk+D29 3.5 mpk)), 给药方式为尾静脉注射给药, 共给药 3 次/3 周 (QW*3) 或单次给药 (single dose) 或给药 2 次/3 周 (Q2W*2)。瘤体积 (V) 计算方式: $V=L\times W^2/2$ (其中 L 是肿瘤直径中最长的, W 是肿瘤直径中最短的)。分析瘤体积和小鼠体重变化数据, 计算抑瘤率。结果示于图 23A-23B 和表 18-19。

试验结果表明, 治疗期间各组小鼠体重均无明显变化, 表明小鼠对 ADC 的耐受性良好 (图 23B); QW*3 给药组, B31-H3L3-MMAE-10mpk 和 99961.1-MMAE-10mpk 剂量组的小鼠肿瘤生长抑制率 TGI 约为 96%, 抑瘤率相当, 给药后 23 天肿瘤未复发; B31-H3L3-MMAE-2.5mpk 和 99961.1-MMAE-2.5mpk 剂量组的抑瘤效果相当, TGI 分别为 60.47 %和 59.22%。单次给药组, B31-H3L3-MMAE (10 mpk) 和 99961.1-MMAE (10 mpk) 剂量组的 TGI 分别为 79.24%和 91.74%, 给药后 23 天肿瘤均未复发。Q2W*2 给药组, B31-H3L3-MMAE (2.5+3.5 mpk) 剂量组的抑瘤效果与 99961.1-MMAE (2.5+3.5 mpk)组相当, TGI 分别为 34.96% 和 34.60% (图 23A 和表 18-19)。

表 18 ADC 在小鼠体内的抑瘤率

抑瘤率 TGI (%)=(1-实验组肿瘤平均体积/PBS 对照组肿瘤平均体积) $\times$ 100%					
测量天	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk, QW*3	99961.1-MMAE 2.5 mpk, QW*3	B31-H3L3-MMAE 10 mpk, QW*3	B31-H3L3-MMAE 2.5 mpk, QW*3
17	0	2.81	2.04	3.63	6.14
20	0	40.69	15.40	26.96	13.78

22	0	62.44	10.31	52.36	10.83
24	0	69.94	4.20	61.53	20.13
27	0	86.34	29.20	83.08	40.94
29	0	90.97	44.98	89.03	47.48
31	0	94.42	53.01	94.30	53.56
34	0	95.57	55.18	96.02	58.44
36	0	96.24	58.47	95.68	61.76
38	0	95.38	60.82	96.28	64.21
41	0	95.77	59.22	95.44	60.47

表 19 ADC 在小鼠体内的抑瘤率

抑瘤率 TGI (%)=(1-实验组肿瘤平均体积/PBS 对照组肿瘤平均体积)×100%					
测量天	PBS	99961.1-MMAE 10 mpk, 单次给药	99961.1-MMAE 2.5(D15)/3.5(D29) mpk, Q2W*2	B31-H3L3-MMAE 10 mpk, 单次给药	B31-H3L3-MMAE 2.5(D15)/3.5(D29) mpk, Q2W*2
17	0	5.32	2.85	6.54	4.77
20	0	44.15	16.28	28.99	18.97
22	0	61.50	9.92	45.06	7.83
24	0	70.14	5.65	59.45	4.25
27	0	82.01	6.58	74.96	13.01
29	0	90.01	7.92	86.03	9.77
31	0	91.95	13.64	90.48	11.05
34	0	93.67	18.47	89.15	24.86
36	0	92.85	18.18	86.44	36.94
38	0	92.51	32.36	84.62	42.42
41	0	91.74	34.60	79.24	34.96

序列表

SEQ ID NO:	序列描述	序列信息
51	人 IgG1 Fc	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

52	hIgG1 重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
53	CL (KAPPA)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
54	B31 VL	DIQMNQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYVSWFQQKP GKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSFTISSLEYED MGIYYCLQFDEFPTYFGGGTKLEIK
55	B31 VH	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQT PEKRLEWVASISRGGSTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDAMYYCASYFGNYDAMDYWGQGTSTVTVSS
56	B62 VL	DIVLTQSPASLSMAIGEKVTIRCVTSIDIDDDVNWYQQKPG KPPKLLISAGNTLRPGVPSRFSGSGGYGTDFVFTIENMLSEDV ADYYCLQSDNLPYTFGGGTKEIK
57	B62 VH	DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQT PDKRLELVATINSNGGNTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ QMSSLKSEDAMYYCARDLGLRRRDYAMDYWGQGTSTV TVSS
58	B32 VL	DIQITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGK SPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMG IYYCLQFDEFPTYFGGGTKLEIK
59	B32 VH	EVKLMESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYAMSWVRQT PDKRLEWVASINRDVTTYYPDSMKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDAMYYCARGYYYGGGPYWHFDVWGAGTTVT VSS
60	B74 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDI GIYYCLQIDEFPYTFGGGTKEIK
61	B74 VH	EVMLVESGGNLVKPGGSLKLSCAASGFTFSIYAMSWVRQT PEKRLEWVASISGGGTAYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDAMYYCARGYYYGGSPYWHFDVWGAGTTVT VSS
62	B34 VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGK SPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMG IYYCLQYDEFPTYFGGGTKLEIK

63	B34 VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQT PEKRLEWVASISTGGSPYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLKSEDTAMYYCARGYYNSSPHWYFAVWGAGTSVT VSS
64	B39 VL	DIKITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLSWFQQKPGK SPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMG IYYCLQFDEFPTYFGGGTKLEIK
65	B39 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQT PEKRLEWVASISTGASTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDTAMYYCAREETTTAALYYAMDYWGQGTSTV SS
66	C38、C77 VL	DIQMTQSPSSMHASLGERVTITCKASQDINNYVSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSFTISSEYEDM GIYYCLQFDEFPTYFGGGTKLEIK
67	C38 VH	EVMLVESGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQT PDKRLEWVASINRDVTITYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDTAMYYCARDYYYGSSLYYGMDYWGQGTSTV VSS
68	C77 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFSNYAMSWVRQT PEKRLEWVASINSGVTITYYPDSVKGRFTVSRDNARNILYLH MTGLRSEDTAIYYCSRGYYYGGSPYWHFDVWGAGTTVT SS
69	C42 VL	DIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSFIYWYQQKPGSS PRLLIYDTSNLASGVVPRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAAT YYCQQWSNYHFTFGSGTKLEIK
70	C42 VH	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYIMSWVRQT PEKRLEWVATINSGGTNTITYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRSEDTALYYCTRYNGNYVWFAYWGQGTSLTVSA
71	M71 VL	DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSESEDM GIYYCLQFDEFPTYFGGGTKLEIK
72	M71 VH	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQT PEKRLEWVASINRGGTITYYPDSVKGRFTISRDNARDILYLQ MSSLRSEDTAIYYCARDYYYGSSLYNGMDFWGQGTSVIVS S
73	M78 VL	DIKITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGK SPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMG IYYCLQFDEFPTYFGGGTKLEIK
74	M78 VH	EVMLVESGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQS PEKRLEWVASINRGGTITYYPDSVKGRFTISRDNARDILYLQ MSSLRSEDTAIYYCARDYYYGSNLYNGMDYWGQGTSVIV SS

75	B31-H1L1 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQT PGKRLEWVASISRGGSTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQ MSSLRAEDTAMYYCASYFGNYDAMDYWGQGTTVTVSS
76	B31-H2L2、 B31-H2L3 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQA PGKGLEWVASISRGGSTYYADSVKGRFTISRDNANTLYL QMSSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGTTVTVSS
77	B31-H3L2、 B31-H3L3、 B31-H3L4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQA PGKGLEWVASISRGGSTYYADSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGTTVTVSS
78	B31-H4L2、 B31-H4L3、 B31-H4L4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQA PGKGLEWVASISRGGSTYYADSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGTTVTVSS
79	B31-H1L1 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINNYVSWFQQKPG KAPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYFTFTISLQPEDF ATYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIK
80	B31-H2L2、 B31-H3L2、 B31-H4L2 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINNYVSWFQQKPG KAPKSLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDF ATYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIK
81	B31-H2L3、 B31-H3L3、 B31-H4L3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYVSWFQQKPG KAPKSLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFA TYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIK
82	B31-H3L4、 B31-H4L4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLSWFQQKPG KAPKSLIYRANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIK
83	B62-H1L1、 B62-H1L2 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQT PGKRLELVATINSNGGNTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMSSLRAEDTAMYYCARDSLGLRRRDYAMDYWGQGTTV TVSS
84	B62-H2L2、 B62-H2L3、 B62-H2L4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQA PGKGLELVATINSNGGNTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYL QMGSRAEDTAMYYCARDSLGLRRRDYAMDYWGQGTTV TVSS
85	B62-H3L2、 B62-H3L3、 B62-H3L4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQA PGKGLEVATINSNGGNTYYADSVKGRFTISRDNANTLYL QMGSRAEDTAMYYCARDSLGLRRRDYAMDYWGQGTTV TVSS
86	B62-H1L1 VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTIRCVTSIDDDVDNWWYQQKPG KAPKLLISAGNTRLRPGVPSRFSSSGYGTDFFTISSMQPEDIA TYYCLQSDNLPYTFGGGTKLEIK

87	B62-H1L2、 B62-H2L2、 B62-H3L2 VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITRCVTSIDIDDDVNWYQQKPG KAPKLLISAGNTRLPGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIA TYYCLQSDNLPYTFGGGKLEIK
88	B62-H2L3、 B62-H3L3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCVTSIDIDDDVNWYQQKPG KAPKLLISAGNTRLPGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIA TYYCLQSDNLPYTFGGGKLEIK
89	B62-H2L4、 B62-H3L4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQTSIDIDDDVNWYQQKPG KAPKLLISAGNLTETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIA TYYCLQSDNLPYTFGGGKLEIK
90	B31 轻链	DIQMNQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYVSWFQQKP GKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSFTISSLEYED MGIYYCLQFDEFPTYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
91	B31 重链	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSRYAMSWVRQ TPEKRLEWVASISRGGSTYYPD SVKGRFTISRDNARNILYL QMSSLRSEDAMYYCASYFGNYDAMDYWGQGTSTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
92	B62 轻链	DIVLTQSPASLSMAIGEKVTIRCVTSIDIDDDVNWYQQKPG KPPKLLISAGNTRLPGVPSRFSSSGYGTDFVFTIENMLSEDV ADYYCLQSDNLPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

93	B62 重链	DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYVMSWVRQT PDKRLELVATINSNGGNTYYPD SVKGRFTISRDNANTLYL QMSSLKSEDAMYYCARD SLGLRRRDYAMDYWGQGTSTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
94	B32 轻链	DIQITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGK SPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMG IYYCLQFDEFPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
95	B32 重链	EVKLMESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYAMSWVRQ TPDKRLEWVASINRDVTYYPD SMKGRFTISRDNARNILYL QMSSLRSEDAMYYCARGYYYGGGPYWHFDVWGAGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
96	B74 轻链	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDI GIYYCLQIDEPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

97	B74 重链	EVMLVESGGNLVKPGGSLKLSCAASGFTFSIYAMSWVRQT PEKRLEWVASISGGGTAYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDTAIYYCARGYYYGGSPYWHFDVWGAGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
98	B34 轻链	DIQMTQSPSSLSASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGK SPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMG IYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TSFNRGEC
99	B34 重链	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQT PEKRLEWVASISTGGSPYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLKSEDTAMYYCARGYYNSSPHWYFAVWGAGTSVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
100	B39 轻链	DIKITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDM GIYYCLQFDEFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

101	B39 重链	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQT PEKRLEWVASISTGASTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDAMYYCAREETTTAALYYAMDYWGQGTSTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY ICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
102	C38、C77 轻链	DIQMTQSPSSMHASLGERVTITCKASQDINNYVSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYFTISSLEYEDM GIYYCLQFDEFPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
103	C38 重链	EVMLVESGGGLVLRPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQT PDKRLEWVASINRDVTITYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQ MSSLRSEDAMYYCARDYYYGSSLYYGMDYWGQGTSTVTV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
104	C77 重链	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFSNYAMSWVRQT PEKRLEWVASINSGVTITYYPDSVKGRFTVSRDNARNILYLH MTGLRSEDATIIYYCSRGYYYGGSPYWHFDVWGAGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY ICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

105	C42 轻链	DIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSFIYWYQQKPGSS PRLLIYDTSNLASGVVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAAT YYCQQWSNYHFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
106	C42 重链	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYIMSWVRQT PEKRLEWVATINSGGTNTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRSEDALYYCTRYNGNYVWFAYWGQGLTVTVSA ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
107	M71 轻链	DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPG KSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLESDM GIYYCLQFDEFPTYFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT TKSFNRGEC
108	M71 重链	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQ TPEKRLEWVASINRGGTTYYPDSVKGRFTISRDNARDILYL QMSSLRSEDALYYCARDYYYGSSLYNGMDFWGQGTSVIV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
109	M78 轻链	DIKITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGK SPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMG IYYCLQFDEFPTYFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

110	M78 重链	EVMLVESGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQS PEKRLEWVASINRGGTTYYPDSVKGRFTISRDNARDILYLQ MSSLRSEDTAIYYCARDYYYGSNLYNGMDYWGQGTSVIV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
111	B31-H1L1 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQT PGKRLEWVASISRGGSTYYPDVKGRFTISRDNANTLYLQ MSSLRAEDTAMYYCASYFGNYDAMDYWGQGTITVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
112	B31-H2L2、 B31-H2L3 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQA PGKGLEWVASISRGGSTYYADSVKGRFTISRDNANTLYL QMSSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

113	B31-H3L2、 B31-H3L3、 B31-H3L4 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQA PGKGLEWVASISRGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
114	B31-H4L2、 B31-H4L3、 B31-H4L4 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISRGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCASYFGNYDAMDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
115	B31-H1L1 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINNYVSWFQQKPG KAPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYFTFTISLQPEDF ATYYCLQFDEFPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
116	B31-H2L2、 B31-H3L2、 B31-H4L2 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINNYVSWFQQKPG KAPKSLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDF ATYYCLQFDEFPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
117	B31-H2L3、 B31-H3L3、 B31-H4L3 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYVSWFQQKPG KAPKSLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFA TYYCLQFDEFPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

118	B31-H3L4、 B31-H4L4 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLSWFQKKPG KAPKSLIYRANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCLQFDEFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
119	B62-H1L1、 B62-H1L2 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQT PGKRLELVATINSNGGNTYYPD SVKGRFTISRDN AKNTLYL QMSSLRAEDTAMYYCARDSLGLRRRDYAMDYWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
120	B62-H2L2、 B62-H2L3、 B62-H2L4 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQA PGKGLELVATINSNGGNTYYPD SVKGRFTISRDN AKNTLYL QMGSRAEDTAMYYCARDSLGLRRRDYAMDYWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
121	B62-H3L2、 B62-H3L3、 B62-H3L4 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQA PGKGLEVYVATINSNGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMGSRAEDTAMYYCARDSLGLRRRDYAMDYWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

122	B62-H1L1 轻链	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIRCVTSIDIDDDVNWYQQKPG KAPKLLISAGNTRLPGVPSRFSSSGYGTDFTFTISSMQPEDIA TYYCLQSDNLPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
123	B62-H1L2、 B62-H2L2、 B62-H3L2 轻链	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIRCVTSIDIDDDVNWYQQKPG KAPKLLISAGNTRLPGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIA TYYCLQSDNLPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
124	B62-H2L3、 B62-H3L3 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCVTSIDIDDDVNWYQQKPG KAPKLLISAGNTRLPGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIA TYYCLQSDNLPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
125	B62-H2L4、 B62-H3L4 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQTSIDIDDDVNWYQQKPG KAPKLLISAGNTLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIA TYYCLQSDNLPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

权利要求

1. 一种特异性结合 ROR1 的抗 ROR1 抗体及其抗原结合片段, 其包含:

1) 如 SEQ ID NO: 57 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 56 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

2) 如 SEQ ID NO: 55 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 54 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

3) 如 SEQ ID NO: 59 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 58 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

4) 如 SEQ ID NO: 61 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 60 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

5) 如 SEQ ID NO: 63 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 62 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

6) 如 SEQ ID NO: 65 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 64 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

7) 如 SEQ ID NO: 67 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 66 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

8) 如 SEQ ID NO: 68 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 66 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

9) 如 SEQ ID NO: 70 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 69 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

10) 如 SEQ ID NO: 72 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 71 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

11) 如 SEQ ID NO: 74 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、

HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 73 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

12) 如 SEQ ID NO: 75 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 79 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

13) 如 SEQ ID NO: 76 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 81 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

14) 如 SEQ ID NO: 77 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 82 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

15) 如 SEQ ID NO: 78 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 80 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

16) 如 SEQ ID NO: 78 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 81 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3);

17) 如 SEQ ID NO: 78 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 82 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3); 或

18) 如 SEQ ID NO:84 所示的重链可变区所包含的 3 个重链 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 和如 SEQ ID NO: 89 所示的轻链可变区所包含的 3 个轻链 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)。

2. 一种特异性结合 ROR1 的抗 ROR1 抗体及其抗原结合片段, 其包含:

1) 包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 28、29 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

2) 包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 31、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

3) 包含如 SEQ ID NO: 7、8 和 9 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 34、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

4) 包含如 SEQ ID NO: 10、11 和 12 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID NO: 35、32 和 36 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;

5) 包含如 SEQ ID NO: 4、13 和 14 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3; 和如 SEQ ID

NO: 35、32 和 37 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

6) 包含如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 38、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

7) 包含如 SEQ ID NO: 18、8 和 19 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 31、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

8) 包含如 SEQ ID NO: 20、21 和 12 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 31、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

9) 包含如 SEQ ID NO: 22、23 和 24 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 39、40 和 41 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

10) 包含如 SEQ ID NO: 4、25 和 26 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 35、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

11) 包含如 SEQ ID NO: 18、25 和 27 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 35、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

12) 包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 31、45 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

13) 包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 43、46 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

14) 包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 44、47 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

15) 包含如 SEQ ID NO: 4、42 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 31、45 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

16) 包含如 SEQ ID NO: 4、42 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 43、46 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

17) 包含如 SEQ ID NO: 4、42 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 44、47 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；或

18) 包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3；和如 SEQ ID NO: 49、50 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

3. 权利要求 1 或 2 所述的抗 ROR1 抗体及其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

1) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 57 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 57 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 57 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 56 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列

且包含如 SEQ ID NO: 28、29 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 56 组成；

2) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 55 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 55 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 55 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 54 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 31、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 54 组成；

3) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 59 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 7、8 和 9 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 59 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 58 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 34、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 58 组成；

4) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 61 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 10、11 和 12 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 61 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 60 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 35、32 和 36 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 60 组成；

5) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 63 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 63 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、13 和 14 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 63 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 62 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 35、32 和 37 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 62 组成；

6) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 65 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 65 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 15、16 和 17 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 65 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 64 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 64 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 38、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 64 组成；

7) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 67 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 67 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 18、8 和 19 所示序列的

HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 67 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 66 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 31、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 66 组成；

8) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 68 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 68 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 20、21 和 12 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 68 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 66 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 31、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 66 组成；

9) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 70 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 70 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 22、23 和 24 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 70 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 69 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 69 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 39、40 和 41 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 69 组成；

10) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 72 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 72 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、25 和 26 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 72 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 71 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 71 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 35、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 71 组成；

11) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 74 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 74 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 18、25 和 27 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 74 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 73 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 73 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 35、32 和 33 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 73 组成；

12) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 75 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 75 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 75 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 79 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 31、45 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 79 组成；

13) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 76 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 76 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 或由 SEQ ID NO: 76 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 80 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 80 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 31、45 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 或由 SEQ ID NO: 80 组成;

14) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 76 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 76 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 或由 SEQ ID NO: 76 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 81 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 81 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 43、46 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 或由 SEQ ID NO: 81 组成;

15) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 77 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 或由 SEQ ID NO: 77 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 80 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 80 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 31、45 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 或由 SEQ ID NO: 80 组成;

16) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 77 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 或由 SEQ ID NO: 77 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 81 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 81 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 43、46 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 或由 SEQ ID NO: 81 组成;

17) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 77 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 或由 SEQ ID NO: 77 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 82 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 82 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 44、47 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 或由 SEQ ID NO: 82 组成;

18) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 78 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 78 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、42 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 或由 SEQ ID NO: 78 组成, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 80 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 80 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列

且包含如 SEQ ID NO: 31、45 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 80 组成；

19) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 78 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 78 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、42 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 78 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 81 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 81 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 43、46 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 81 组成；

20) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 78 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 78 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 4、42 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 78 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 82 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 82 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 44、47 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 82 组成；

21) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 83 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 83 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 83 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 86 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 86 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 28、29 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 86 组成；

22) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 83 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 83 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 83 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 87 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 87 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 28、29 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 87 组成；

23) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 84 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 84 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 87 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 87 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 28、29 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 87 组成；

24) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 84 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的

HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 84 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 88 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 88 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 28、29 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 88 组成；

25) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 84 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 84 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 89 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 89 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 49、50 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 89 组成；

26) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 85 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 85 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 85 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 87 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 87 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 28、29 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 87 组成；

27) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 85 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 85 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 85 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 88 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 88 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 28、29 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 88 组成；或

28) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 85 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 85 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，或由 SEQ ID NO: 85 组成，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 89 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 89 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列且包含如 SEQ ID NO: 49、50 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或由 SEQ ID NO: 89 组成。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项的分离的抗 ROR1 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'-SH、Fv (例如 scFv) 或 (Fab')₂ 片段。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项的分离的抗 ROR1 单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含恒定区序列，其中所述恒定区序列的至少一部分是人共有恒定区序列。

6. 如权利要求 1-5 中任何一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体的重链恒定区包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列, 轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。

7. 如权利要求 1-6 中任何一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链和轻链, 其中:

1) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 93 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 93 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 93 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 92 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 92 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 92 组成;

2) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 91 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 91 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 91 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 90 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 90 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 90 组成;

3) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 95 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 95 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 95 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 94 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 94 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 94 组成;

4) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 97 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 97 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 97 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 96 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 96 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 96 组成;

5) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 99 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 99 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 99 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 98 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 98 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 98 组成;

6) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 101 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 101 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 101 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 100 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 100 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 100 组成;

7) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 103 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 103 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 103 组成, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 102 所示氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 102 的氨基酸序列具有至少 90%同一

性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 102 组成；

8) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 104 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 104 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 104 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 102 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 102 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 102 组成；

9) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 106 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 106 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 106 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 105 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 105 组成；

10) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 108 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 108 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 108 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 107 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 107 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 107 组成；

11) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 110 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 110 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 110 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 109 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 109 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 109 组成；

12) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 111 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 111 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 111 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 115 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 115 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 115 组成；

13) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 112 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 112 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 112 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 116 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 116 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 116 组成；

14) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 112 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 112 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 112 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 117 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 117 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 117 组成；

15) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 113 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 113 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 113 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 116 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 116 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 116 组成；

16) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 113 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 113 的氨基

酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 113 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 117 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 117 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 117 组成；

17) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 113 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 113 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 113 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 118 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 118 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 118 组成；

18) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 114 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 114 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 114 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 116 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 116 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 116 组成；

19) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 114 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 114 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 114 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 117 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 117 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 117 组成；

20) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 114 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 114 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 114 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 118 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 118 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 118 组成；

21) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 119 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 119 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 119 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 122 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 122 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 122 组成；

22) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 119 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 119 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 119 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 123 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 123 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 123 组成；

23) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 120 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 120 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 120 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 123 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 123 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 123 组成；

24) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 120 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 120 的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 120 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 124 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 124 的氨基酸序列具有至少 90%同一

性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 124 组成；

25) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 120 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 120 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 120 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 125 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 125 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 125 组成；

26) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 121 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 121 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 121 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 123 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 123 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 123 组成；

27) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 121 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 121 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 121 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 124 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 124 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 124 组成；或

28) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 121 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 121 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 121 组成，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 125 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 125 的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 125 组成。

8. 一种具有 Ab-(L-D)_n 结构的抗体偶联药物，其中 Ab 为如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 ROR1 的抗体或其抗原结合片段，L 为接头，D 为治疗活性物质或药物活性成分，n 表示 1-20 的整数。

9. 权利要求 8 所述的抗体偶联药物，其中所述治疗活性物质或药物活性成分是细胞毒素、植物毒素、小分子毒素、放射性同位素。

10. 权利要求 8 或 9 所述的抗体偶联药物，其中所述治疗活性物质或药物活性成分是海兔毒素 (Dolastatin) 及其 auristatin 类衍生物，例如 Dolastatin 10、Dolastatin 15、auristatin E、auristatin PE、monomethyl auristatin D (MMAD)、monomethyl auristatin E (MMAE)、monomethyl auristatin F (MMAF)、auristatin F 苯二胺 (AFP)、auristatin EB (AEB)、auristatin EFP (AEFP)、auristatin F 羟丙基酰胺 (AF HPA)。

11. 权利要求 8-10 中任一项所述的抗体偶联药物，其中所述海兔毒素 (Dolastatin) 及其 auristatin 类衍生物是 MMAE、MMAF、auristatin F 羟丙基酰胺或 auristatin F 苯二胺。

12. 权利要求 8-11 中任一项所述的抗体偶联药物，其中所述接头是组织蛋白酶可降解的接头 (例如缬氨酸-瓜氨酸 (val-cit) 接头、cBu-Cit 接头和 CX 接头)、不可断裂接头 (例如 SMCC 接头或 MD 接头)、酸敏接头、硅脂结构的接头、disulfide-carbamate 接头、MC-GGFG

接头、TRX 接头、含半乳糖苷的接头、焦磷酸酯接头、近红外敏感的接头、紫外敏感的接头 (例如 PC4AP)。

13. 权利要求 8-12 中任一项所述的抗体偶联药物, 其中所述接头选自马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苄氧基 (mc-vc-PAB)、乙酰基-赖氨酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基 (AcLys-VC-PABC)、氨基 PEG6-丙酰基、及马来酰亚胺己酸基 (mc)、马来酰亚胺基丙酰基 (MP)、缬氨酸-瓜氨酸 (val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸 (ala-phe)、对氨基苄氧羰基 (PAB)、N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶硫基)戊酸酯 (SPP)、N-琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯 (SMCC)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯 (SIAB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯 (SPDB)、N-琥珀酰亚胺基 3-(吡啶-2-基二硫代)-丙酸酯 (SPDP)。

14. 权利要求 8-13 中任一项所述的抗体偶联药物, 其中所述接头是 MC-VC-PAB、SMCC 或 MC-GGFG。

15. 权利要求 8-14 中任一项所述的抗体偶联药物, 其中所述 Ab 包含:

(1) 如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和如 SEQ ID NO: 28、29 和 30 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 或

(2) 如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和如 SEQ ID NO: 43、46 和 48 所示序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

16. 权利要求 8-15 中任一项所述的抗体偶联药物, 其中所述 Ab 包含重链可变区和轻链可变区, 其中

(1) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 85 所示氨基酸序列, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 88 所示氨基酸序列, 或

(2) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 77 所示氨基酸序列, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 81 所示氨基酸序列。

17. 权利要求 8-16 中任一项所述的抗体偶联药物, 其中所述 Ab 包含:

(1) 如 SEQ ID NO: 121 所示氨基酸序列的重链和如 SEQ ID NO: 124 所示氨基酸序列的轻链; 或

(2) 如 SEQ ID NO: 113 所示氨基酸序列的重链和如 SEQ ID NO: 117 所示氨基酸序列的轻链。

18. 权利要求 15-17 中任一项所述的抗体偶联药物, 其所述接头是 MC-VC-PAB, 所述细胞毒素是 MMAE。

19. 一种药物组合物, 其包含:

(1) 如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 ROR1 抗体或其抗原结合片段, 或如权利要求 8-18 中任一项所述的抗体偶联药物, 以及;

(2) 可药用载体。

20. 一种分离的多核苷酸分子，其编码如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 ROR1 抗体或其抗原结合片段。

21. 一种载体，其包含权利要求 20 所述的核酸分子，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 21 所述的载体或权利要求 20 所述的核酸分子。

23. 如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 ROR1 抗体或其抗原结合片段在制备用于预防或治疗癌症的抗体偶联药物中的用途，或在制备用于预防或治疗与 ROR1 异常表达相关的疾病的药物中的用途。

24. 如权利要求 8-18 中任一项所述的的抗体偶联药物在制备用于预防或治疗与 ROR1 异常表达相关的疾病的药物中的用途。

25. 一种杀死表达 ROR1 的细胞或者抑制表达 ROR1 的细胞生长的方法，包括使所述细胞接触有效量的如权利要求 1-7 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或有效量的如权利要求 8-18 任一项所述的的抗体偶联药物、或有效量的如权利要求 19 所述的药物组合物。

26. 一种在有需要的受试者中预防或治疗与 ROR1 异常表达相关的疾病的方法，包括向所述受试者施用预防有效量或治疗有效量的如权利要求 1-7 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或预防有效量或治疗有效量的如权利要求 8-18 任一项所述的的抗体偶联药物、或预防有效量或治疗有效量的如权利要求 19 所述的药物组合物。

27. 权利要求 24 所述的用途或权利要求 26 所述的方法，其中与 ROR1 异常表达相关的疾病是高表达 ROR1 的癌症。

28. 如权利要求 27 所述的用途或方法，其中所述高表达 ROR1 的癌症是慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、套细胞淋巴瘤、肾细胞癌、结肠癌、乳腺癌、神经母细胞瘤、肺癌、胃癌、头颈癌和黑色素瘤。

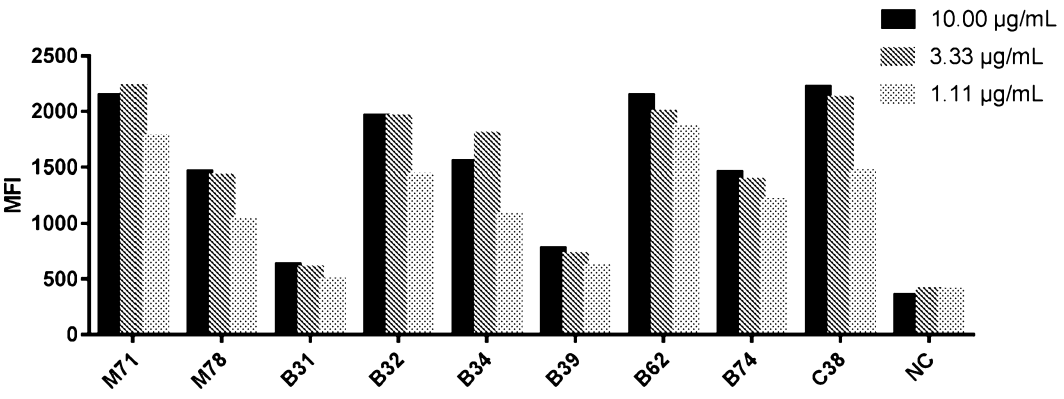


图 1A

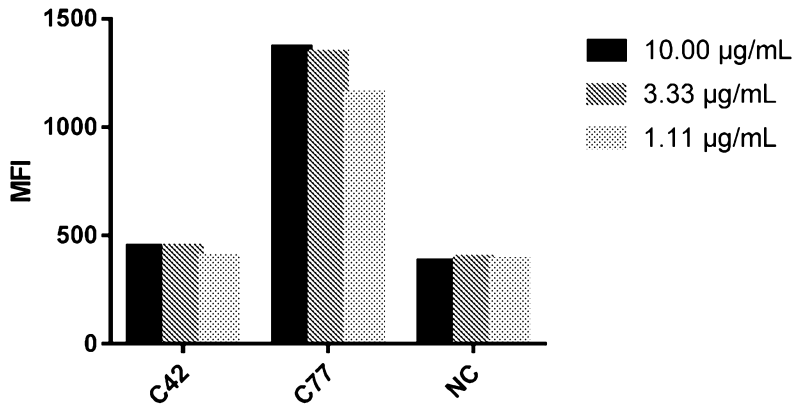


图 1B

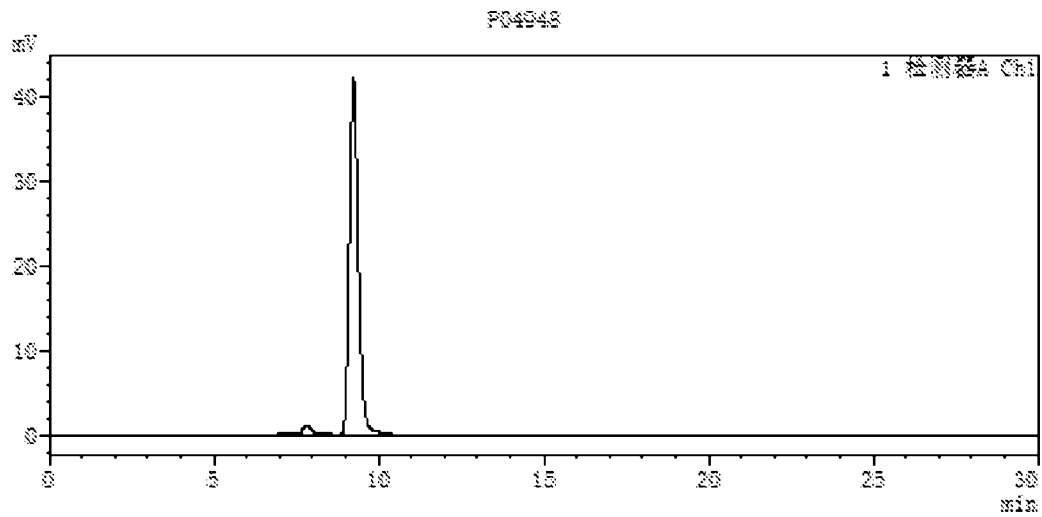


图 2A

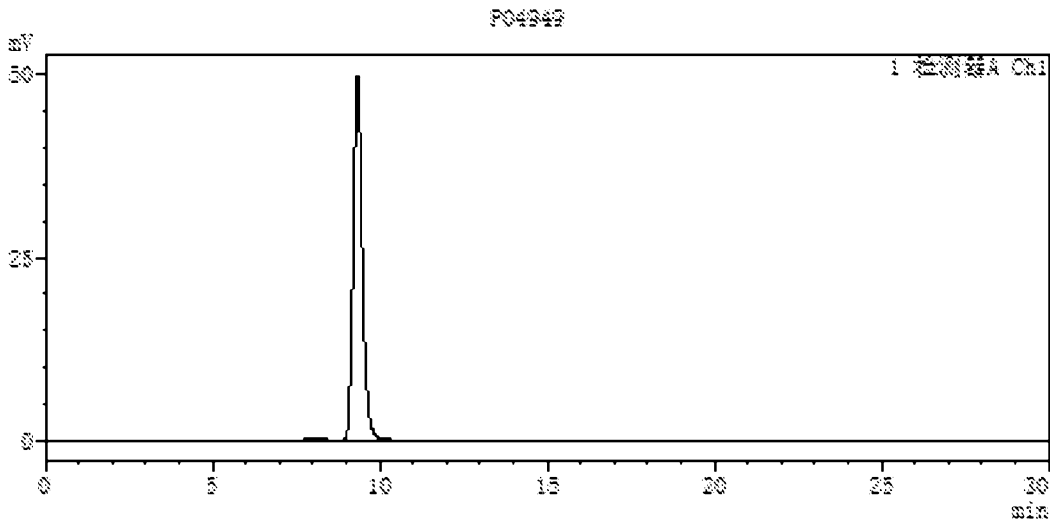


图 2B

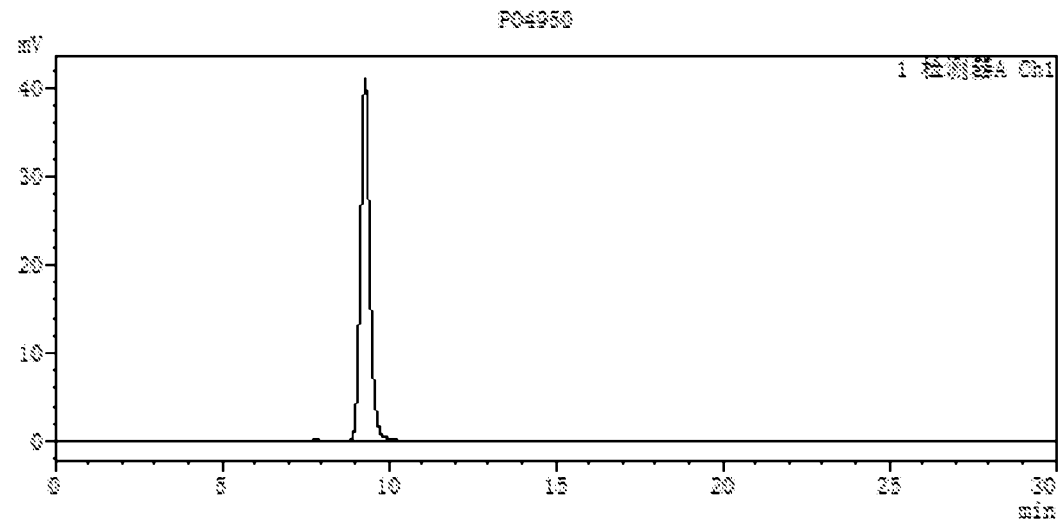


图 2C

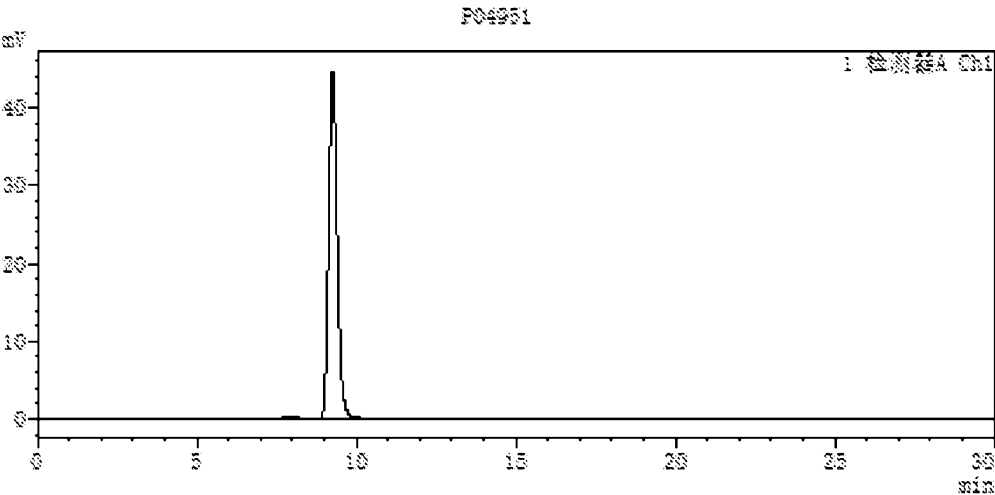


图 2D

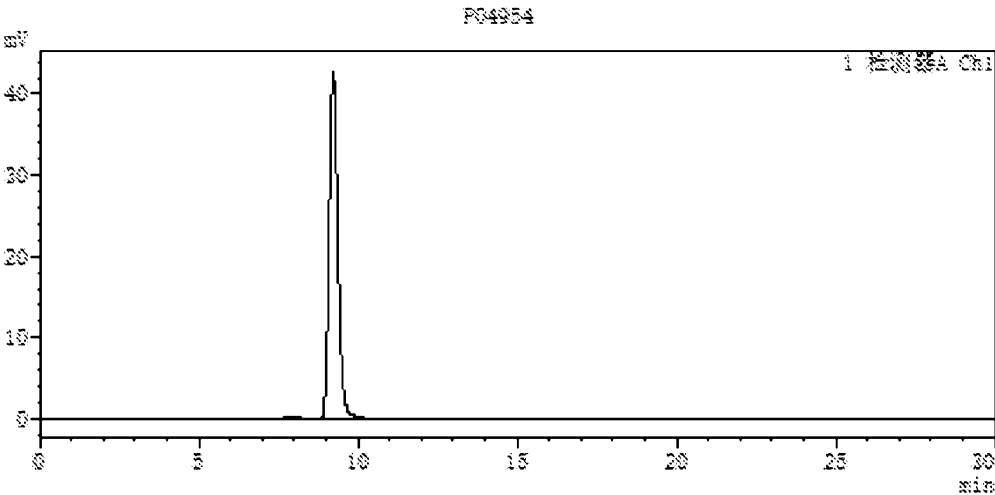


图 2E

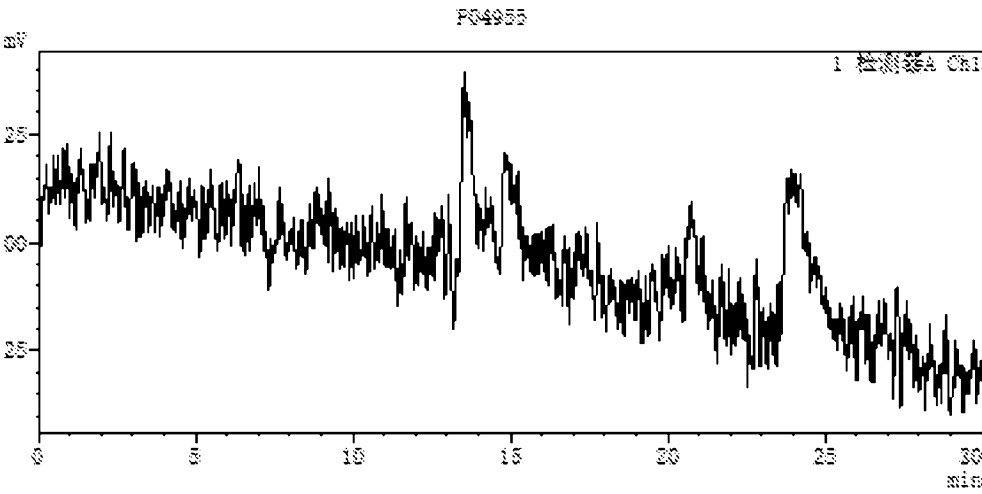


图 2F

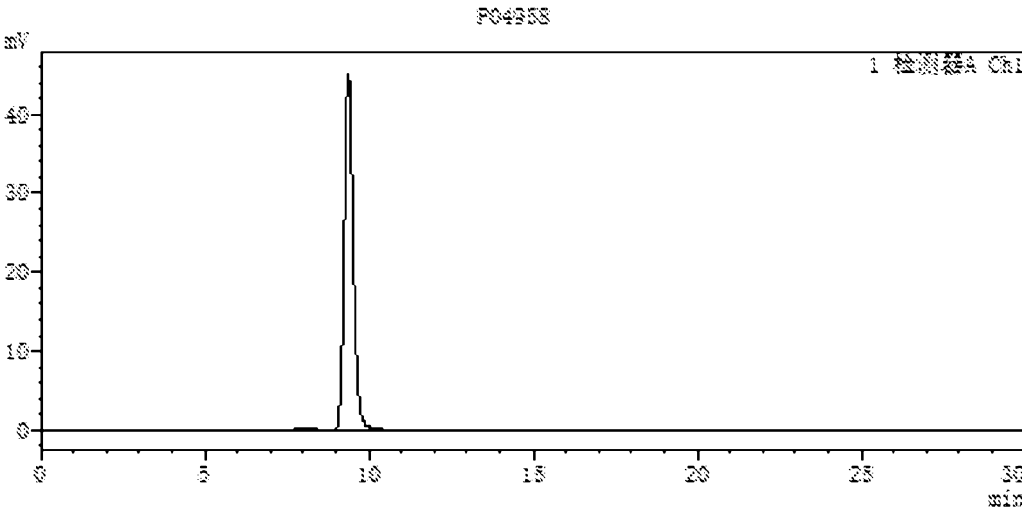


图 2G

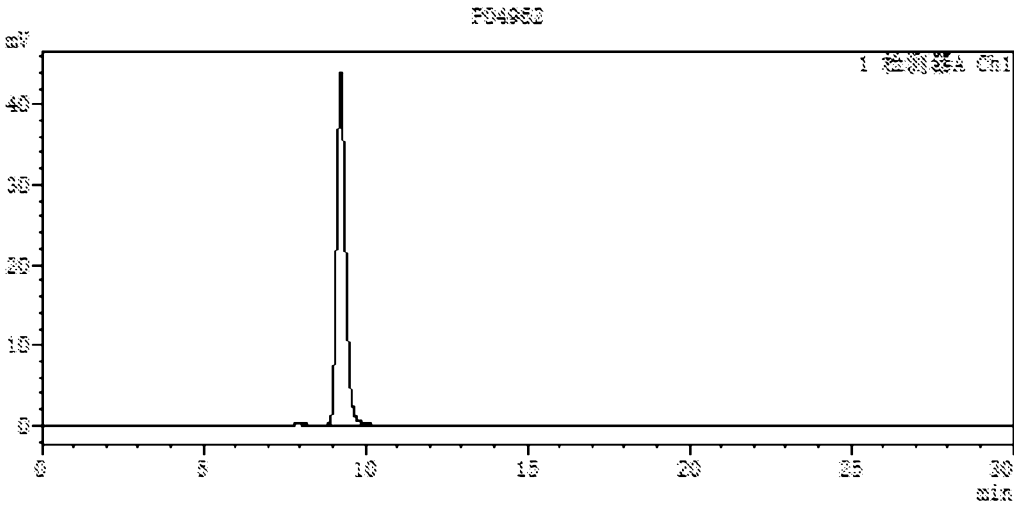


图 2H

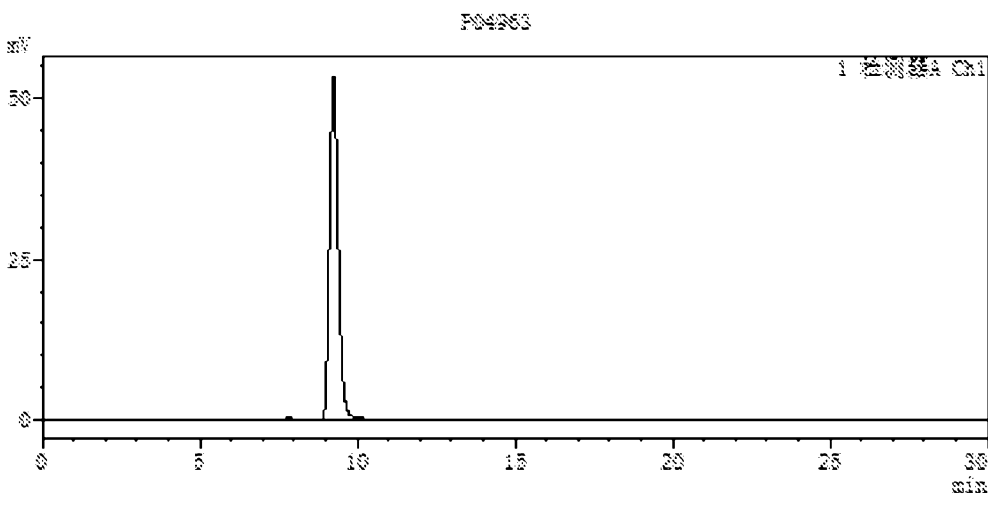


图 2I

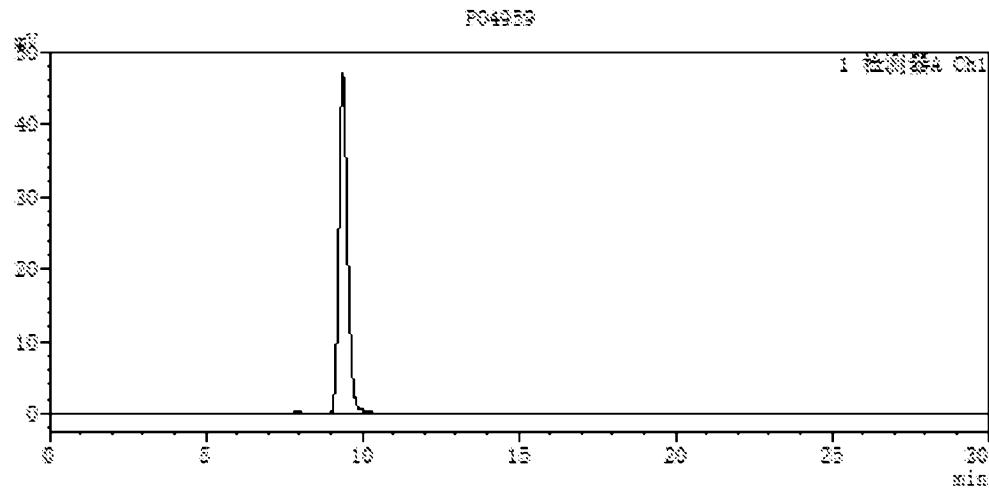


图 2J

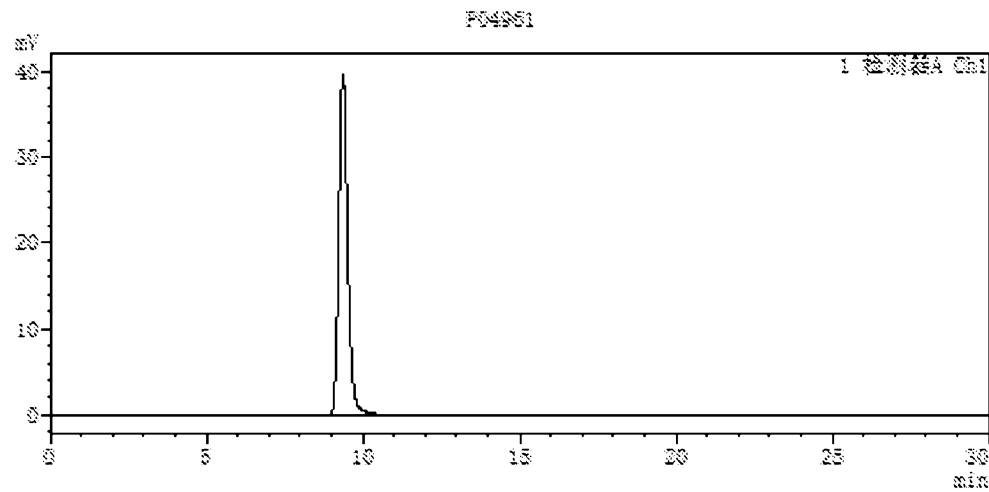


图 2K

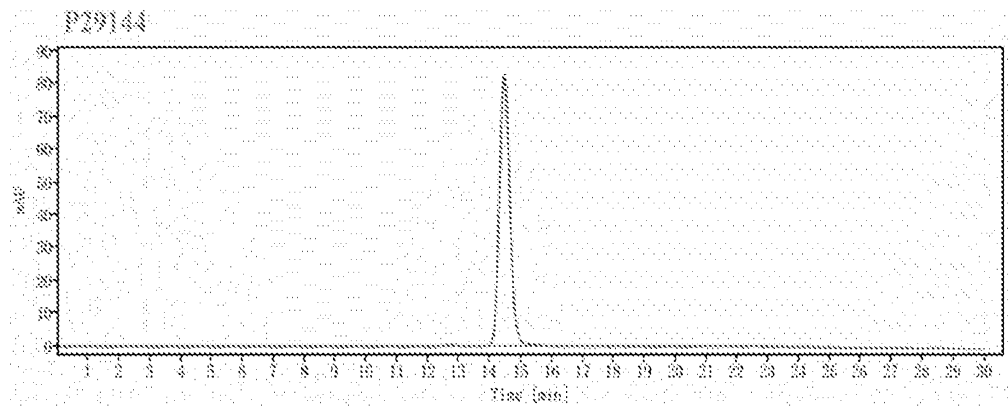


图 2L

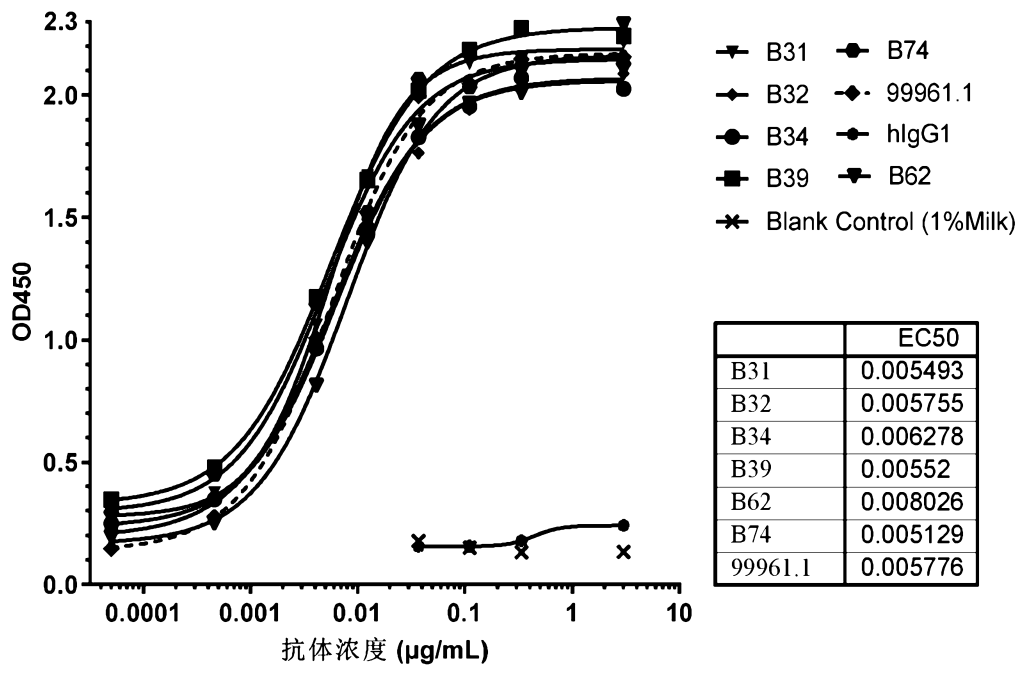


图 3A

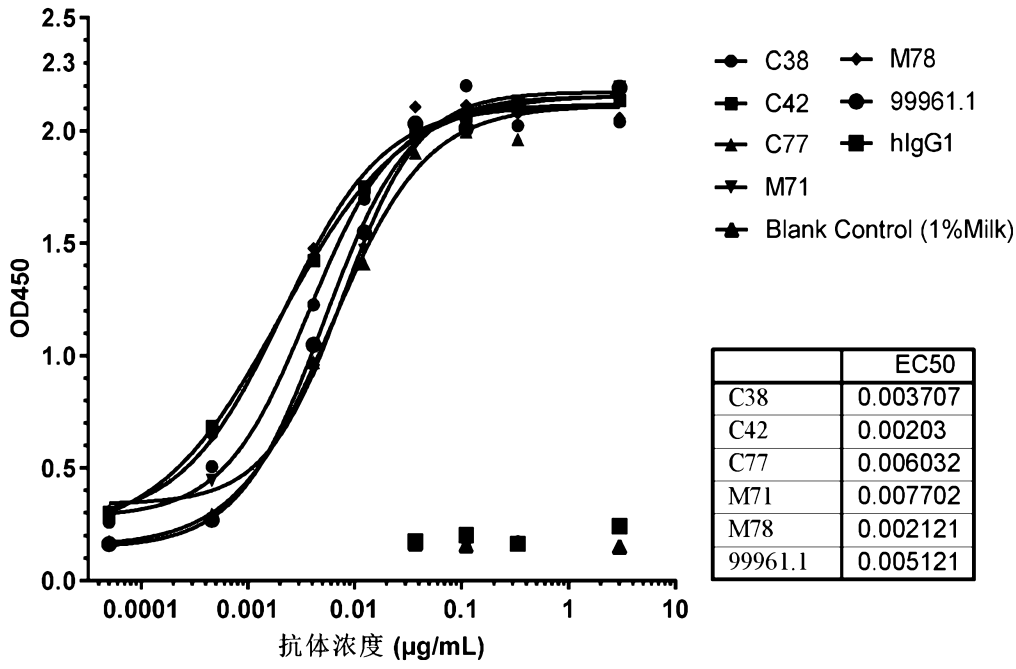


图 3B

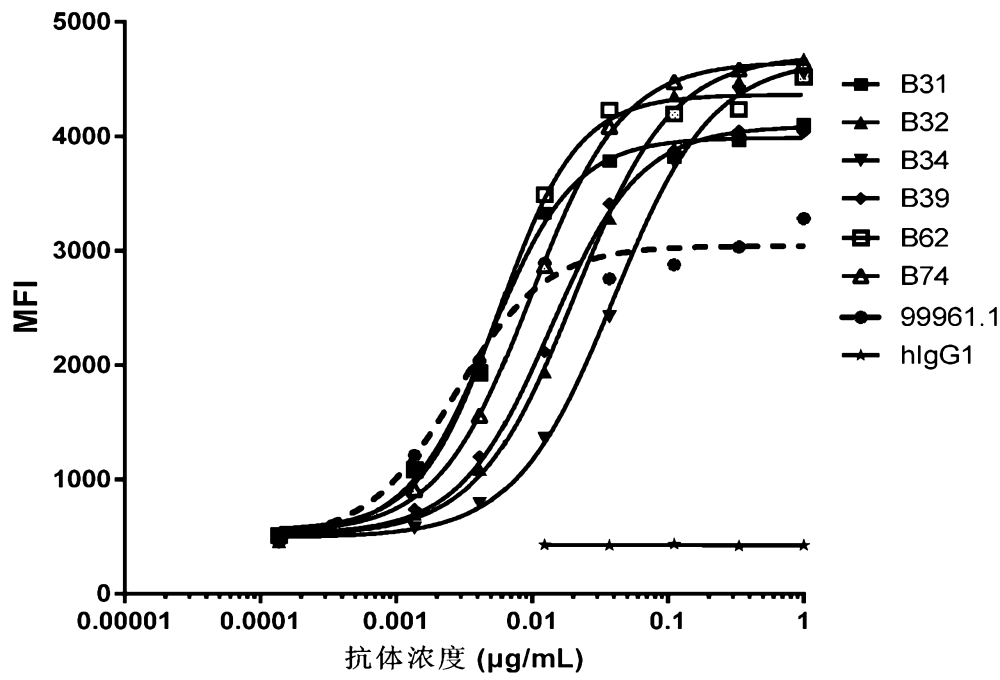


图 4A

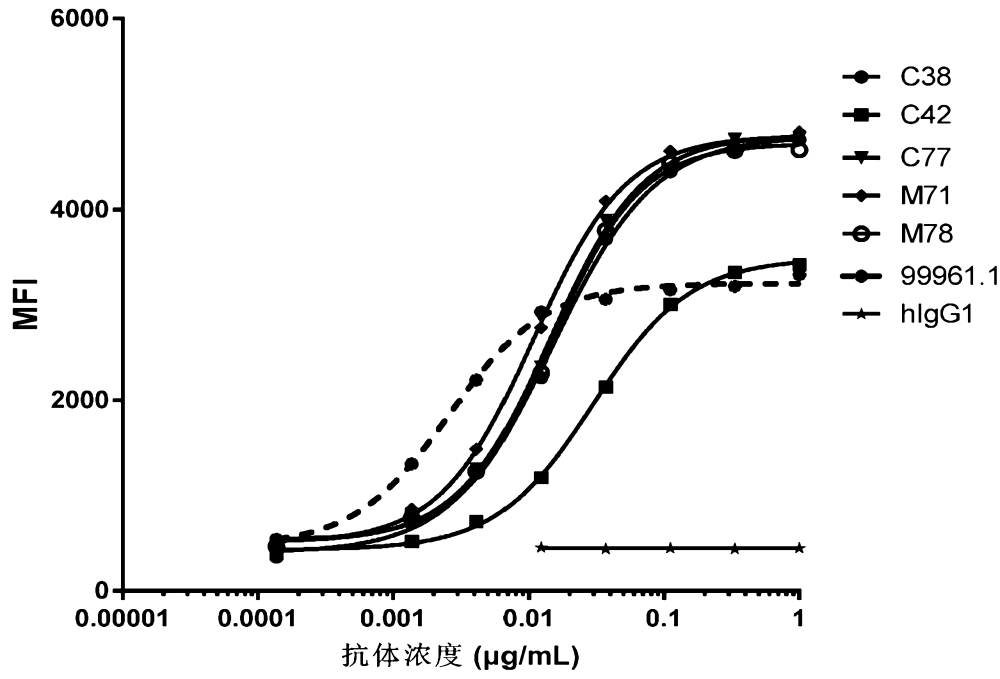


图 4B

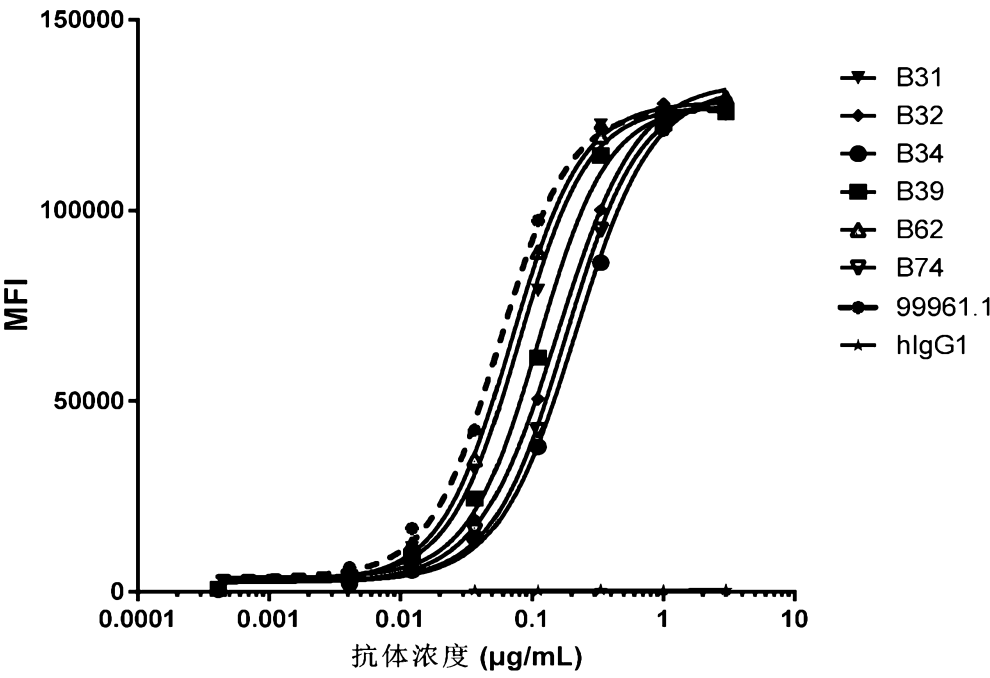


图 5A

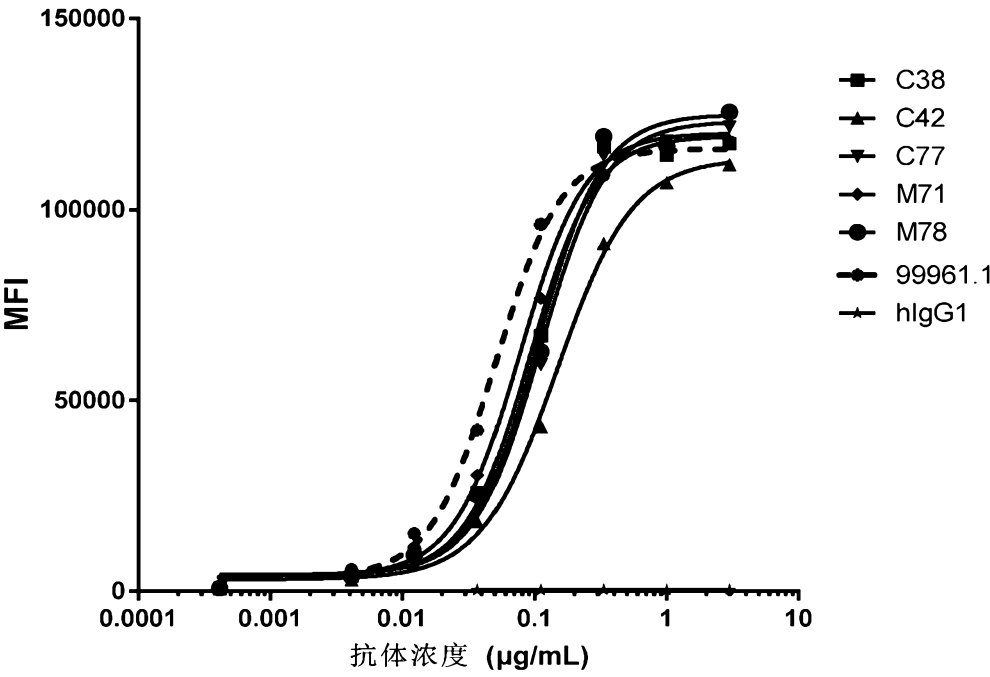


图 5B

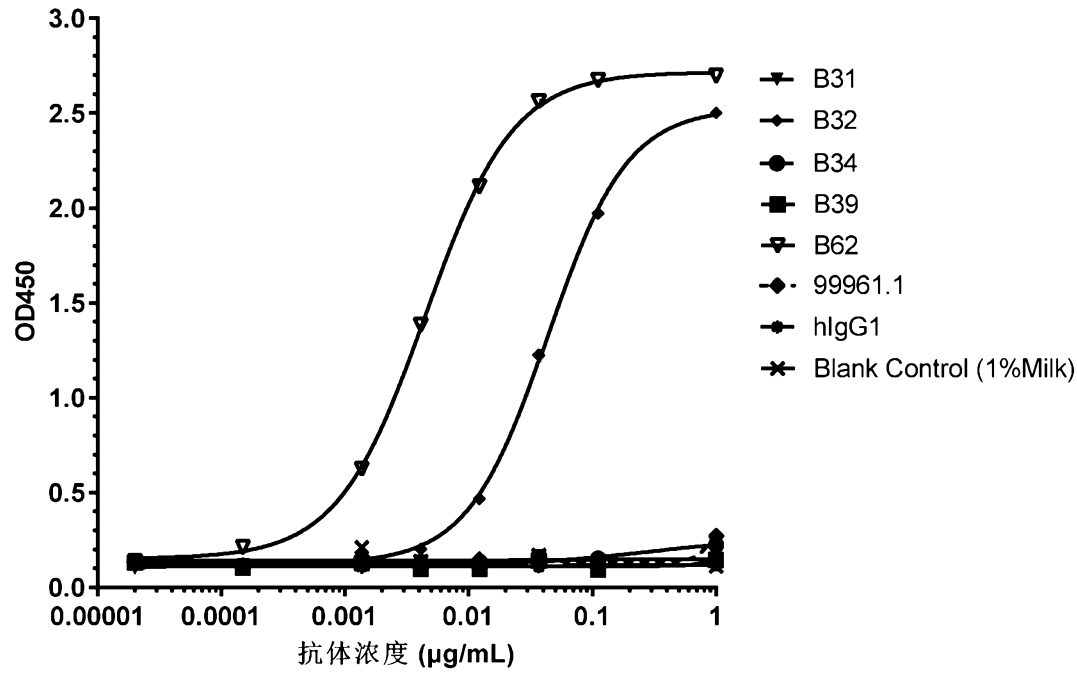


图 6A

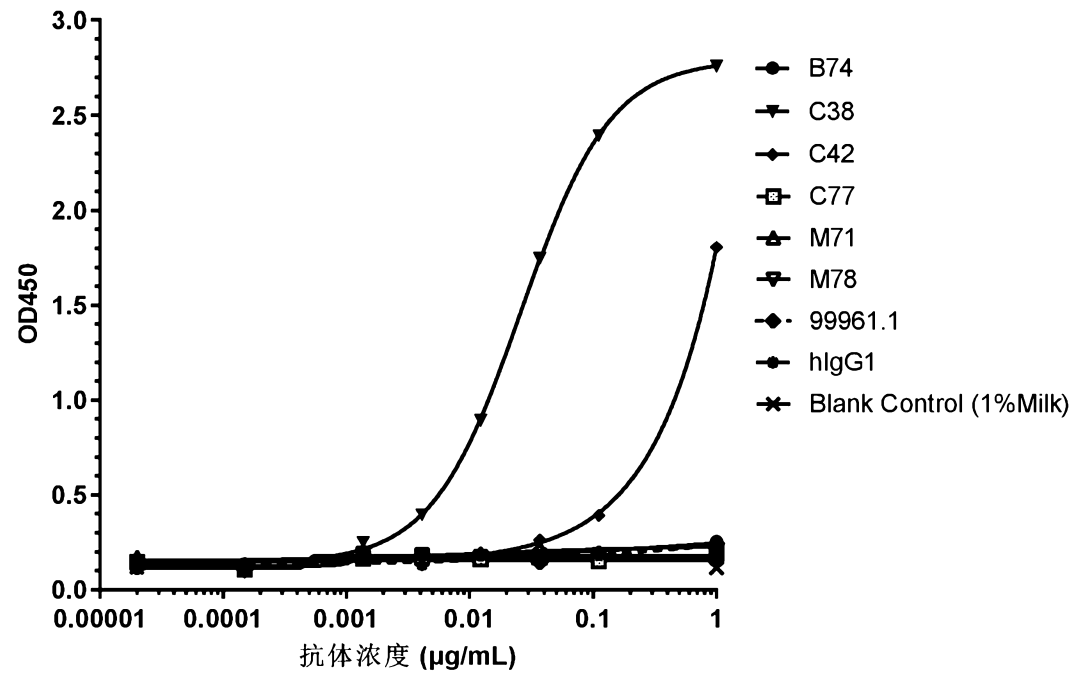


图 6B

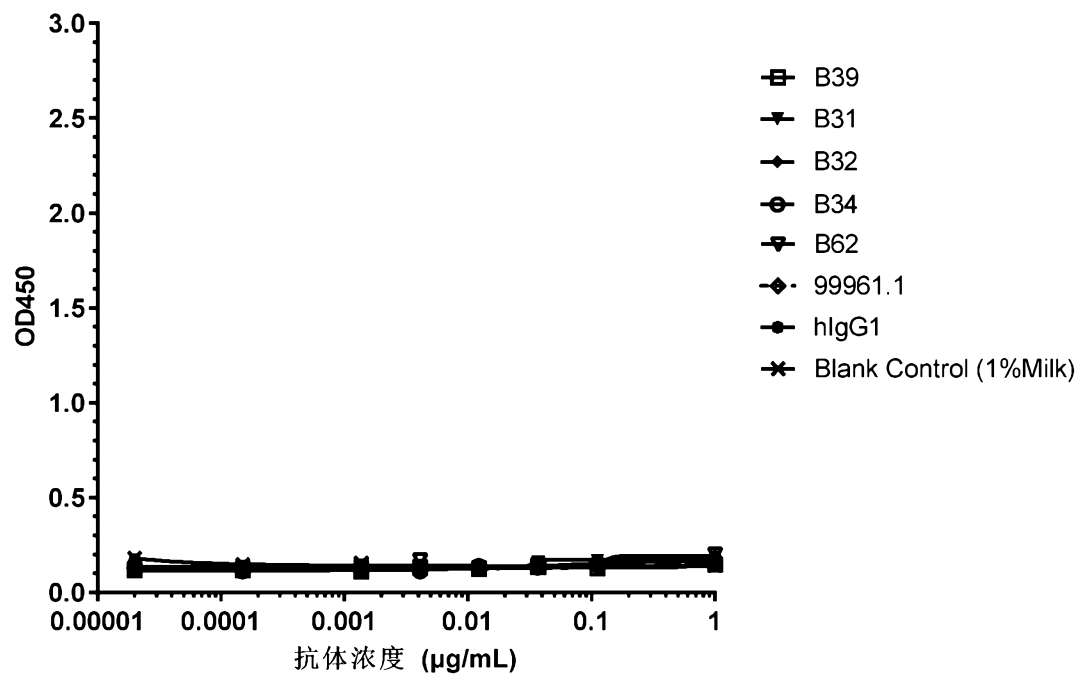


图 7A

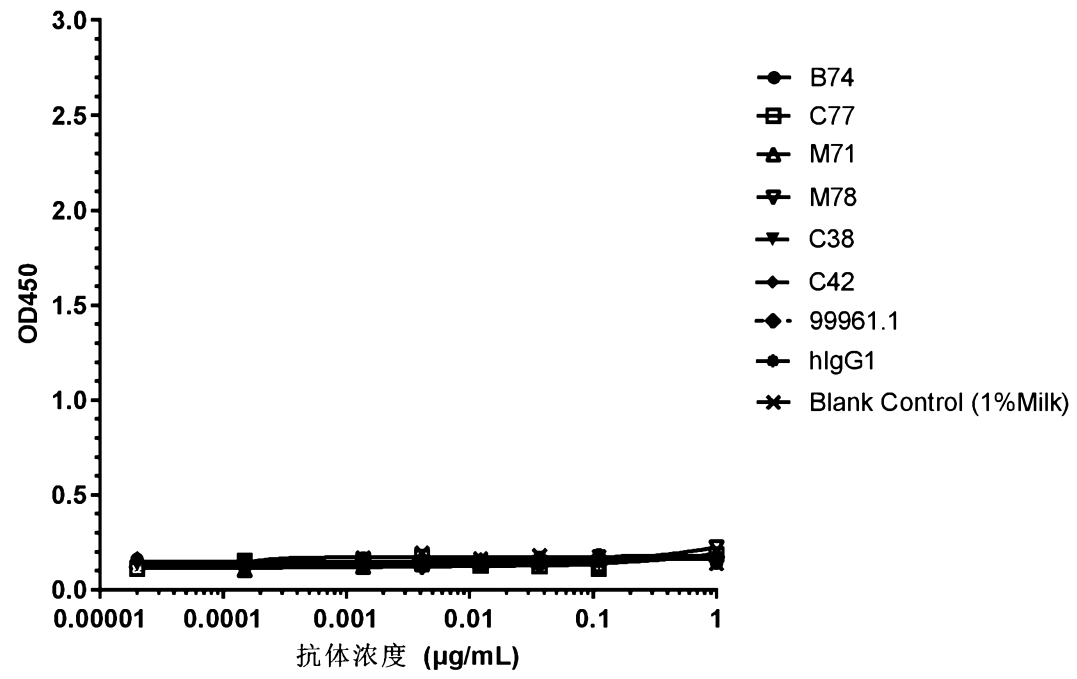


图 7B

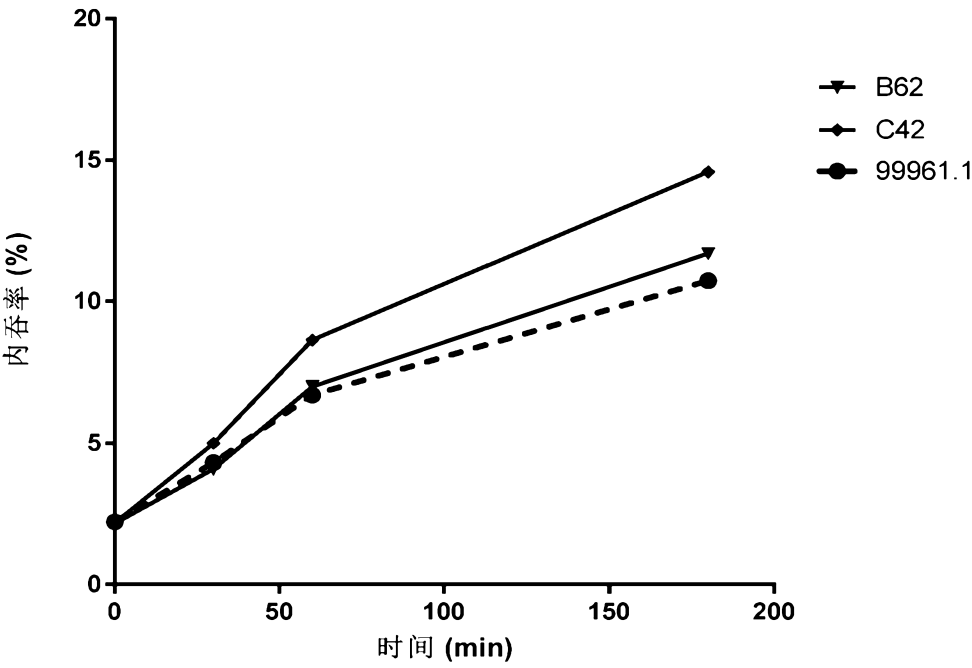


图 8A

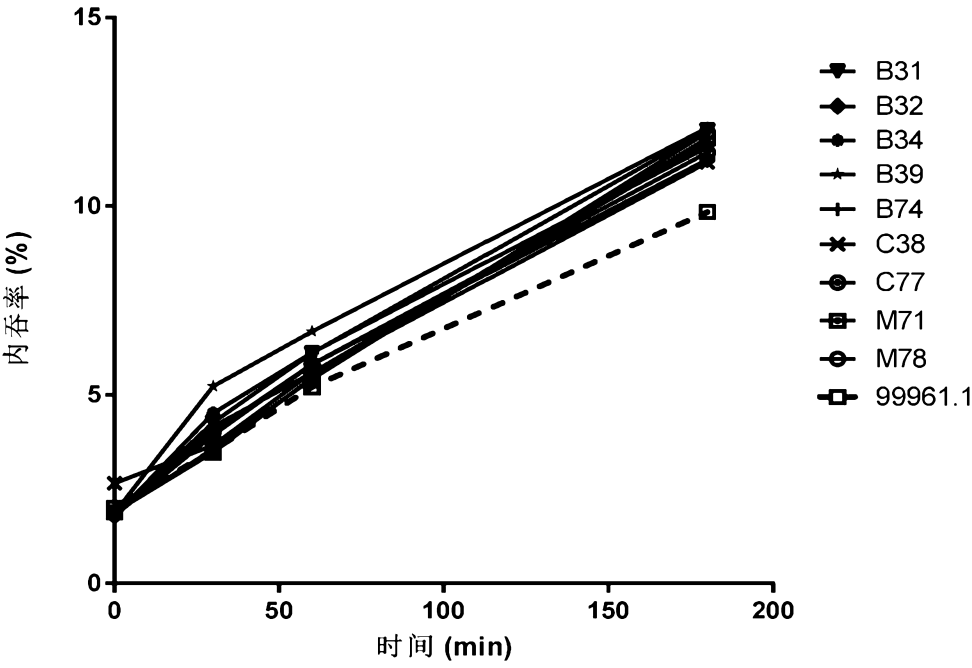


图 8B

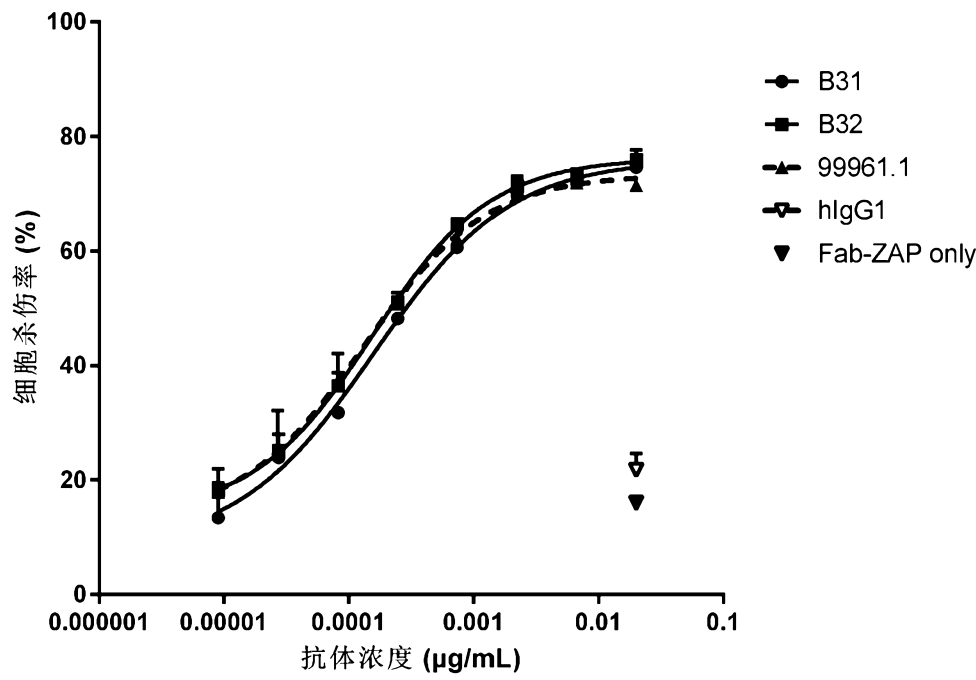


图 9A

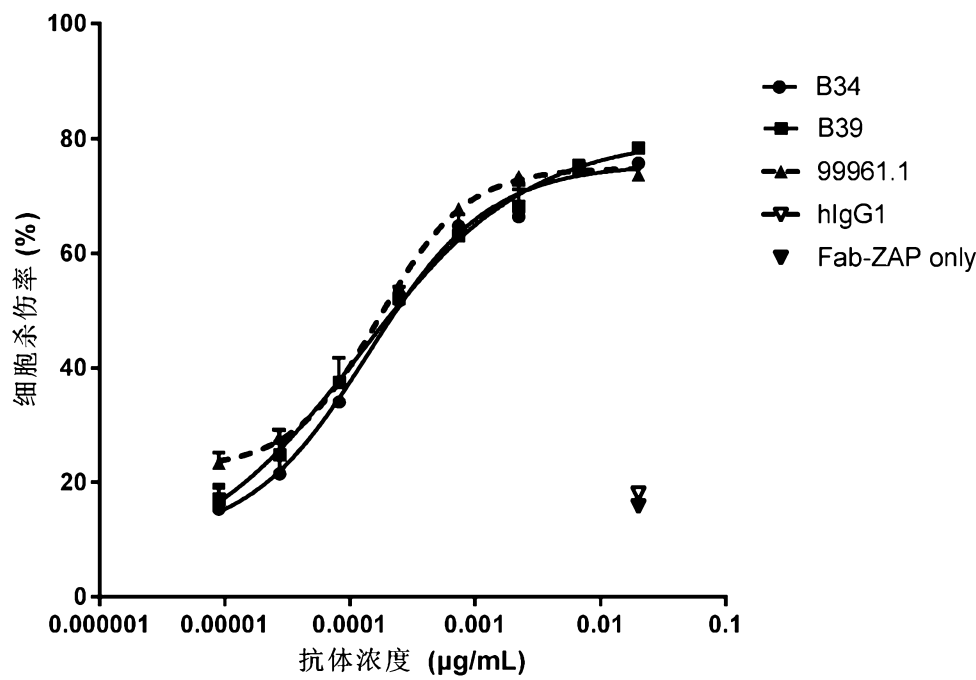


图 9B

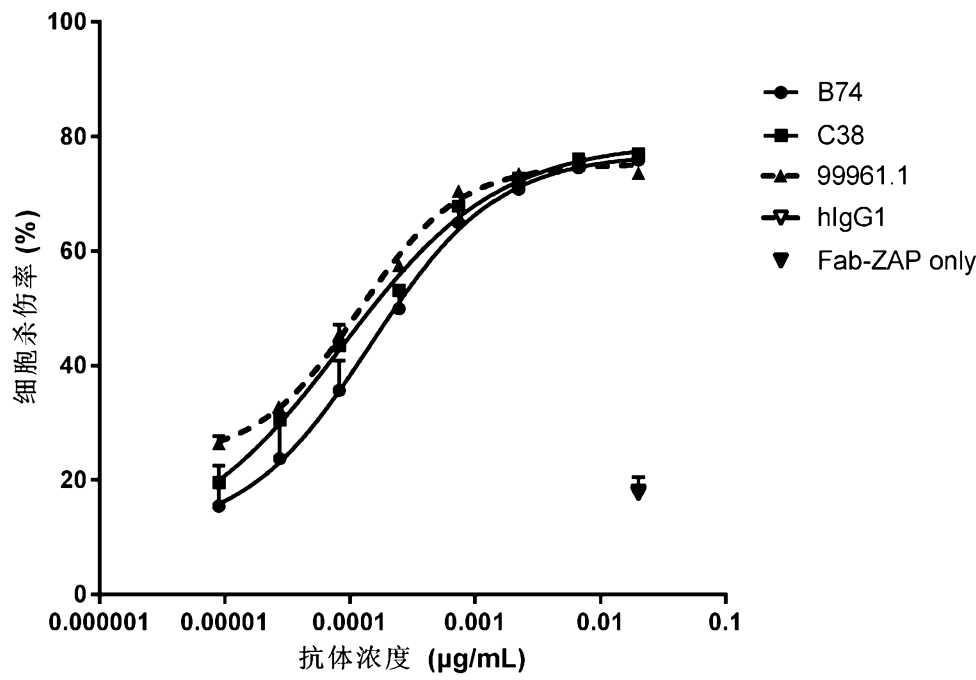


图 9C

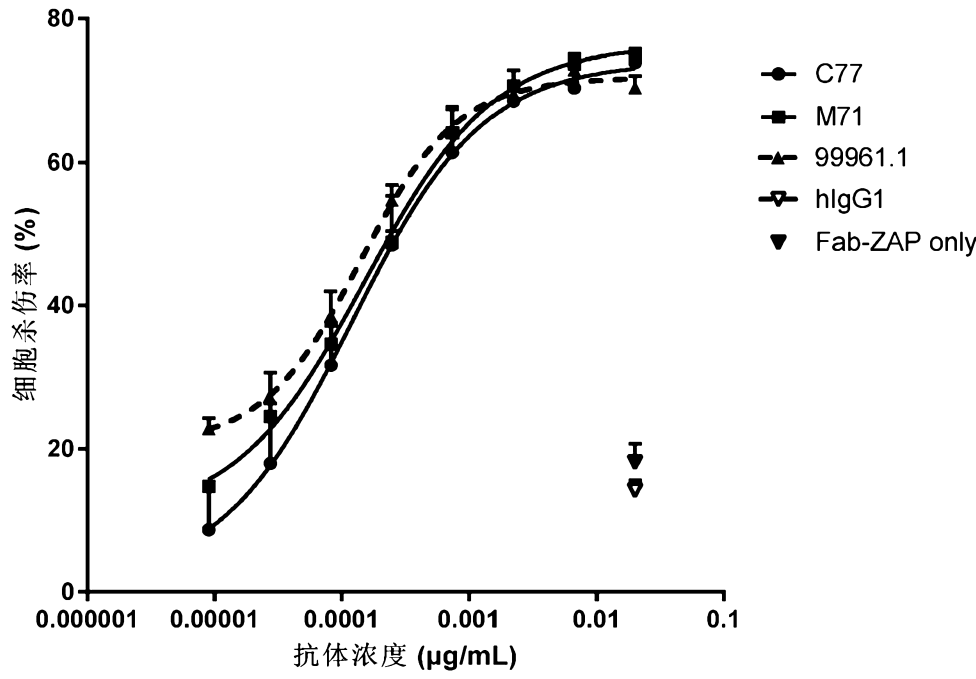


图 9D

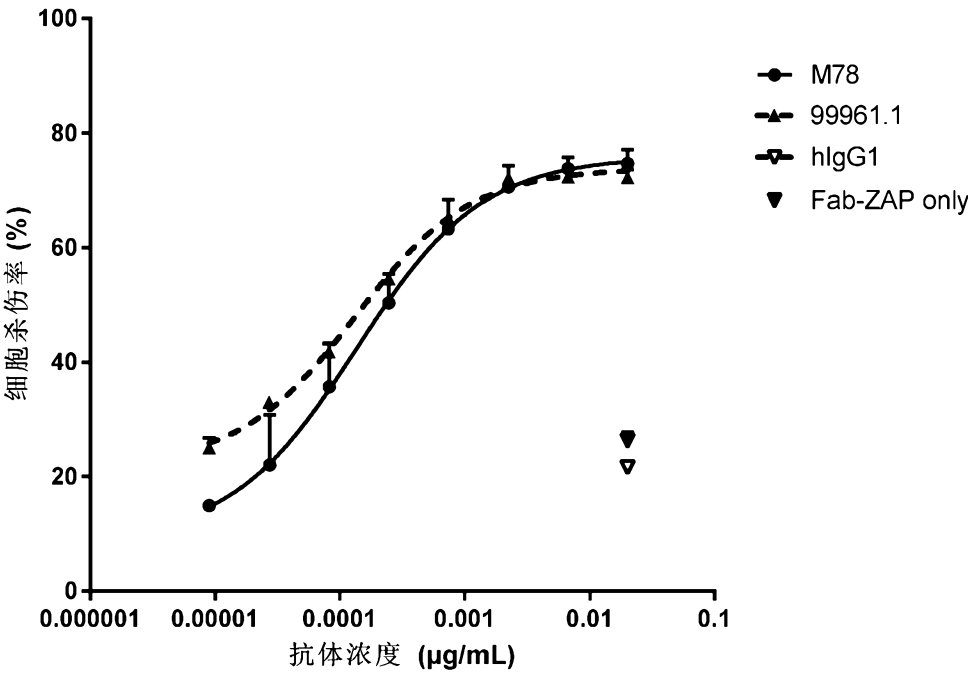


图 9E

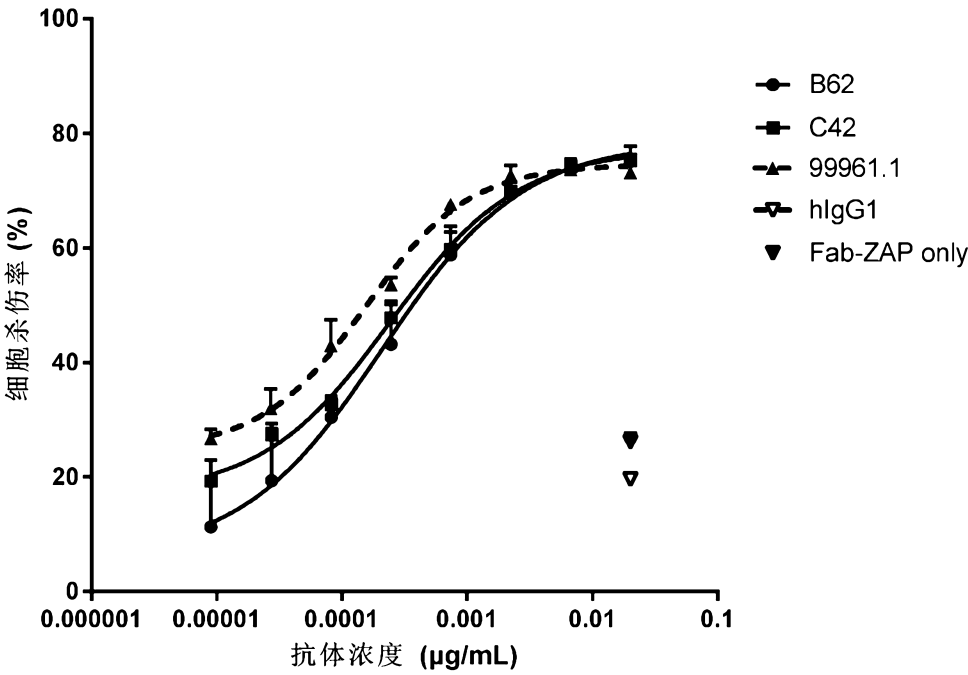


图 9F

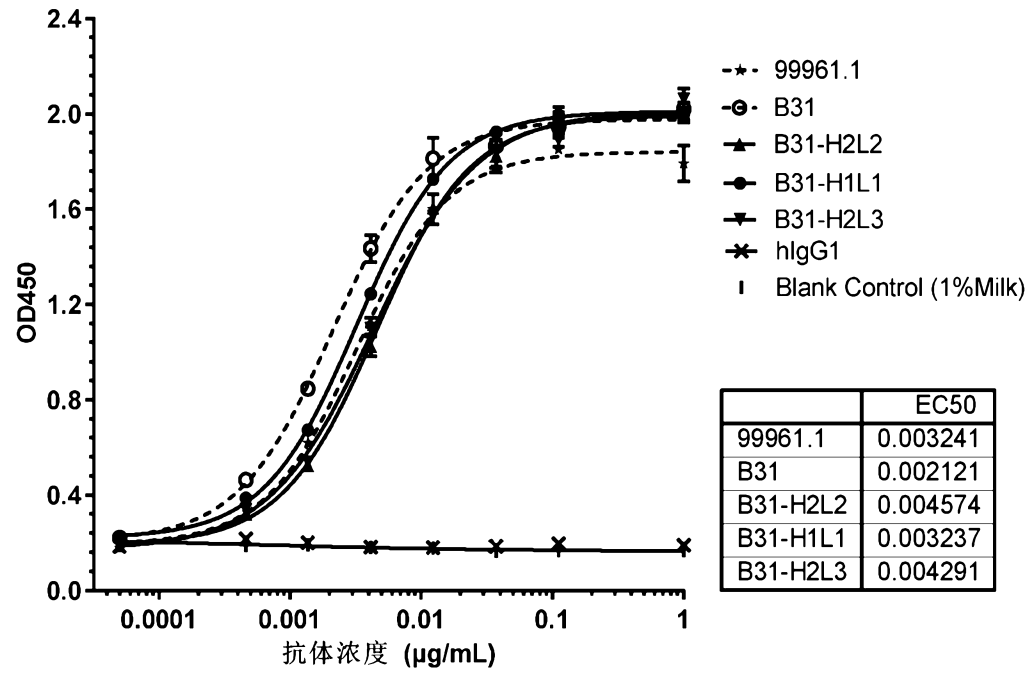


图 10A

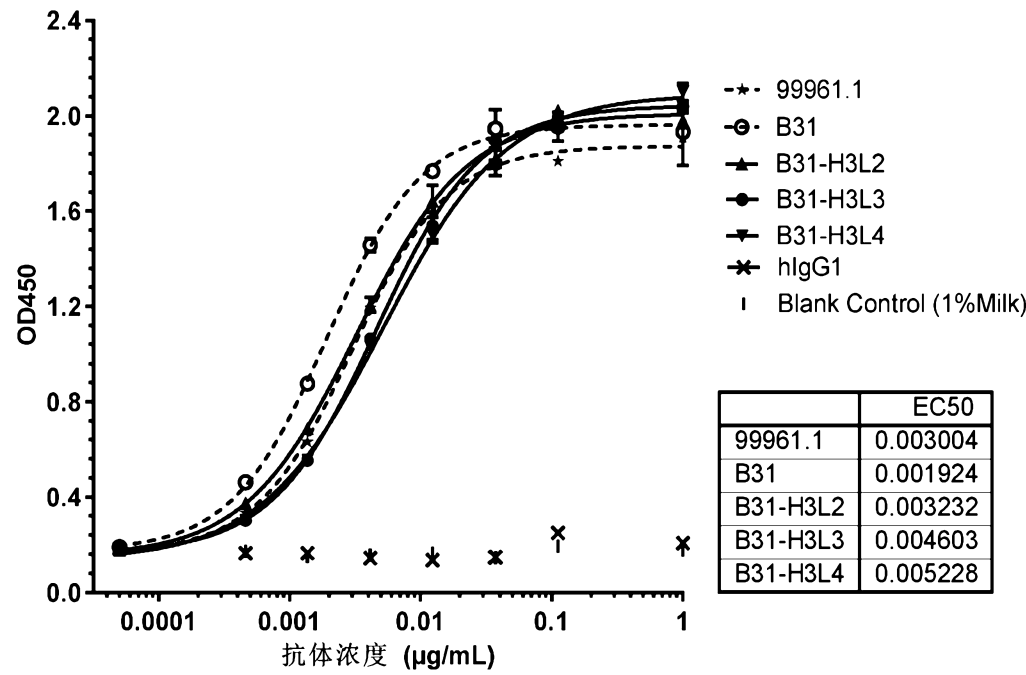


图 10B

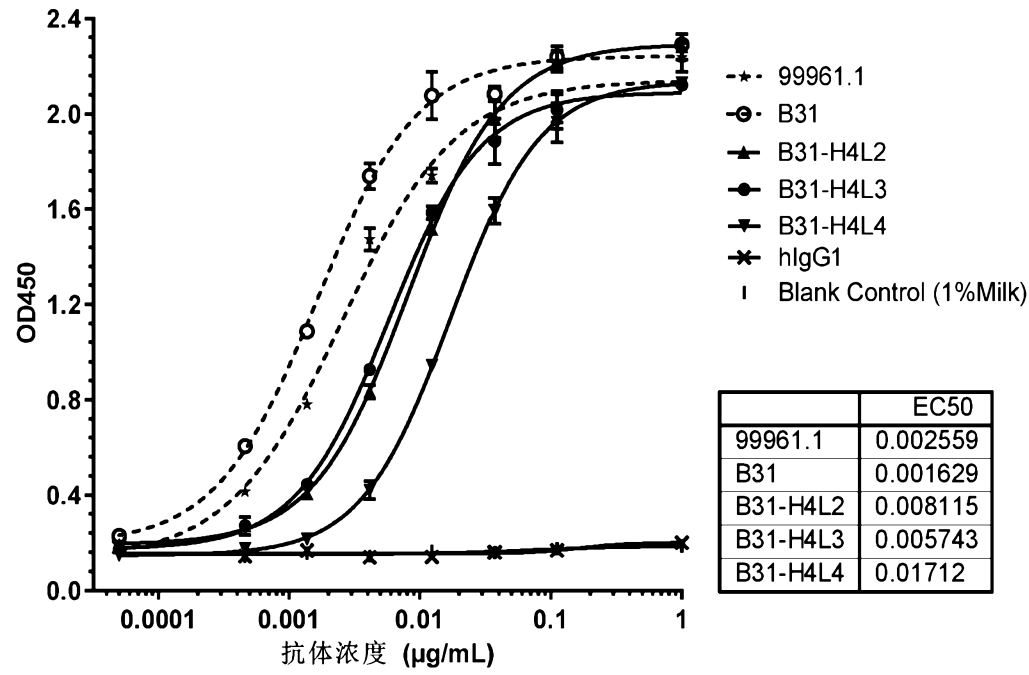


图 10C

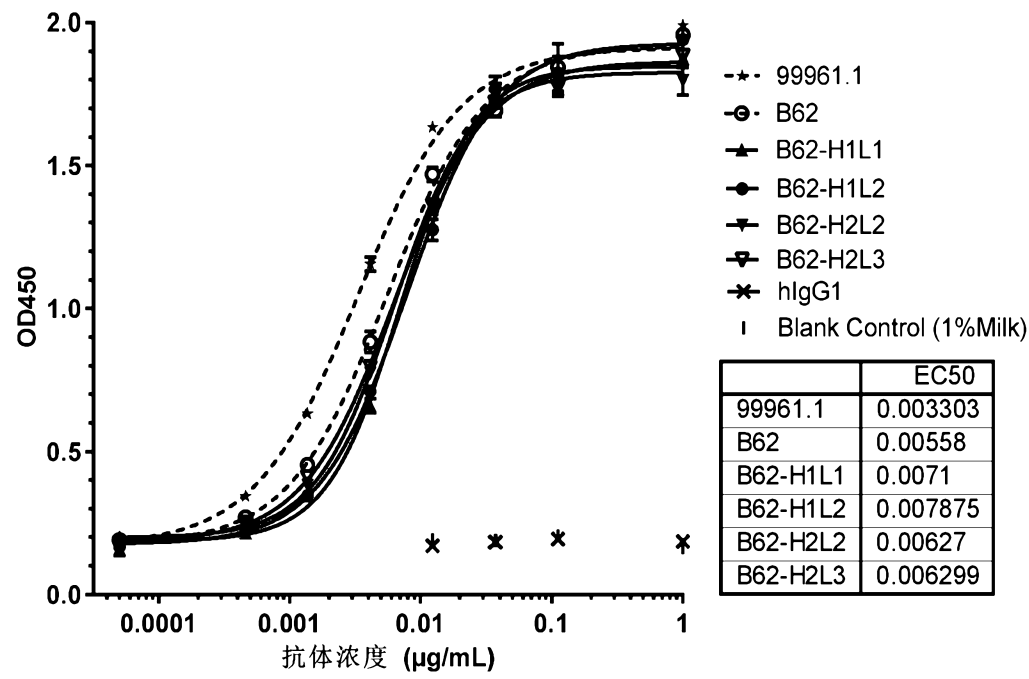


图 10D

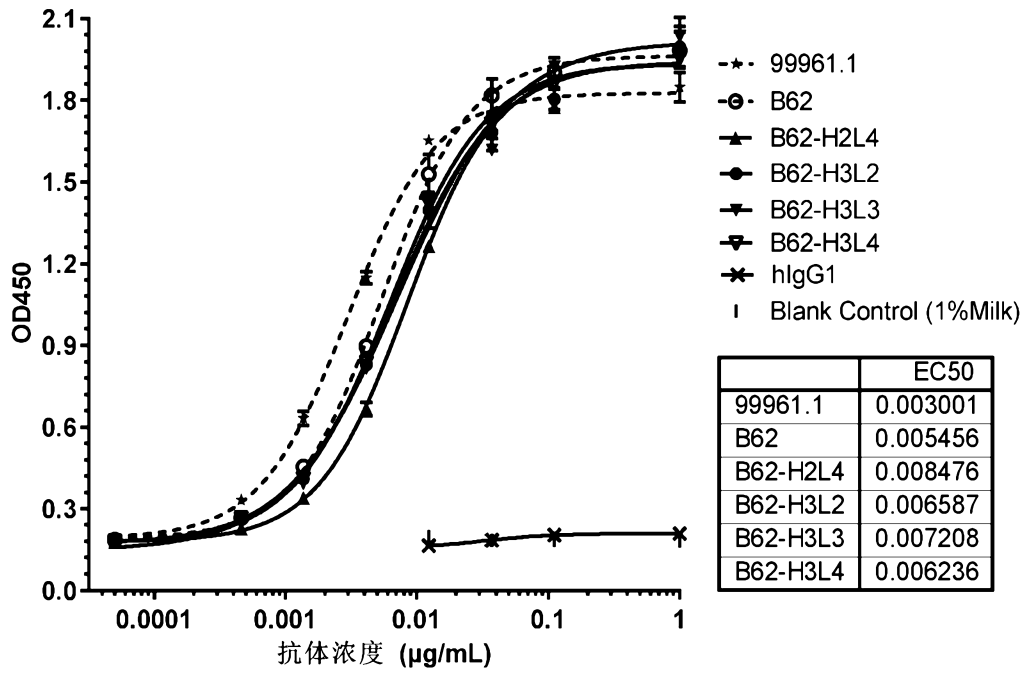


图 10E

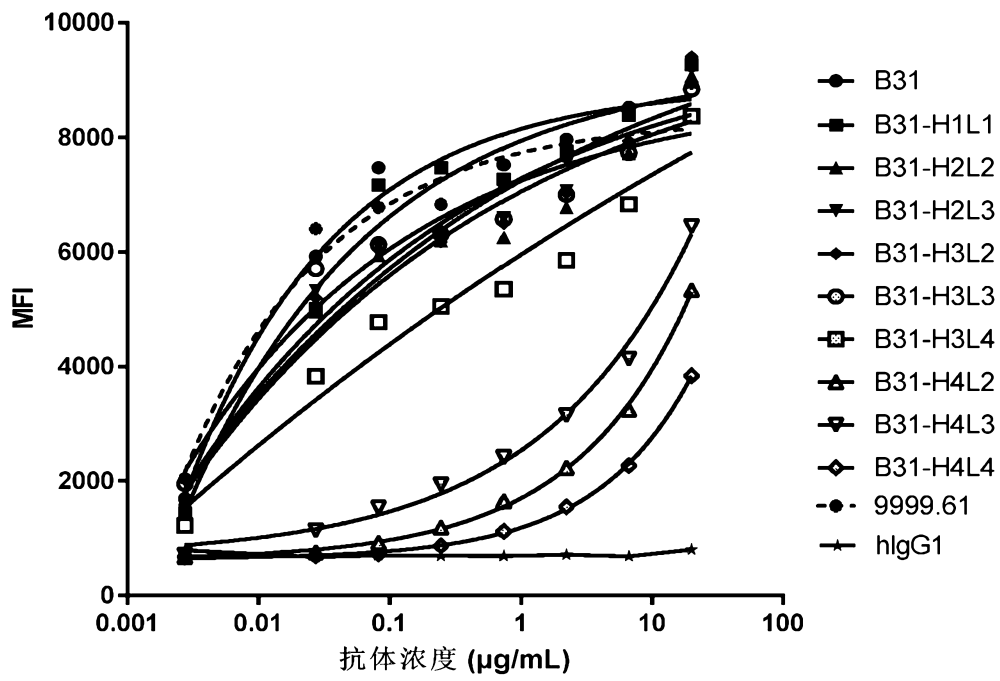


图 11A

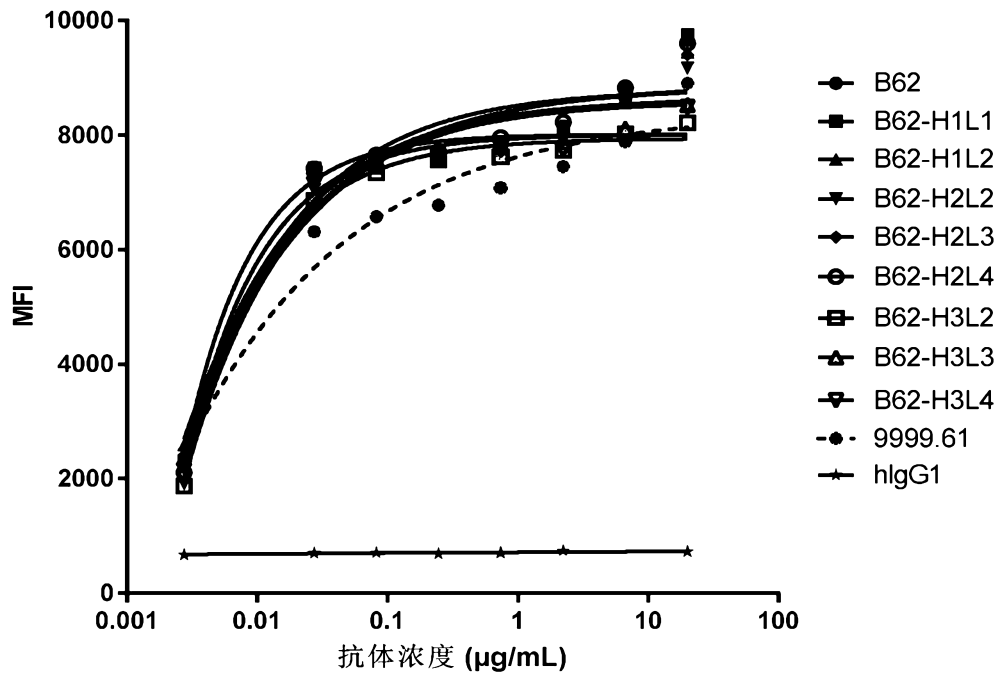


图 11B

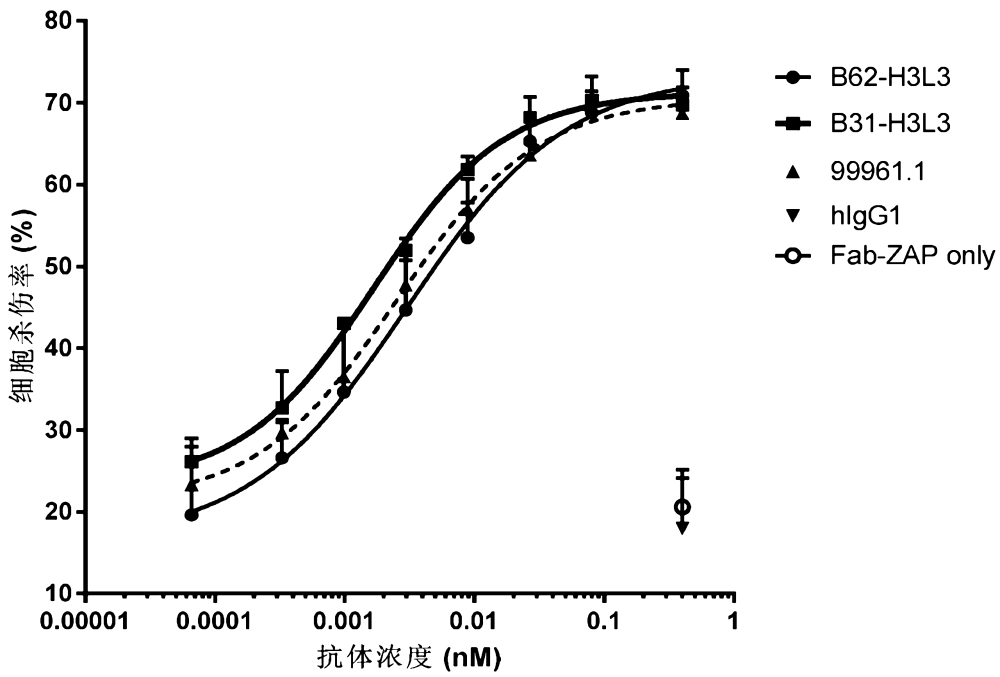


图 12

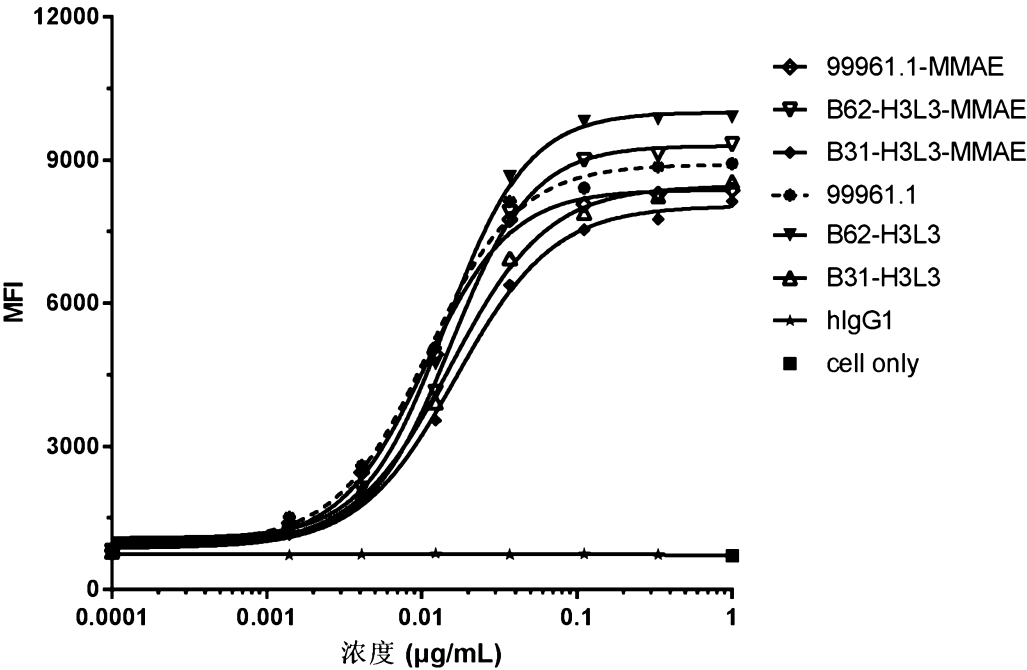


图 13A

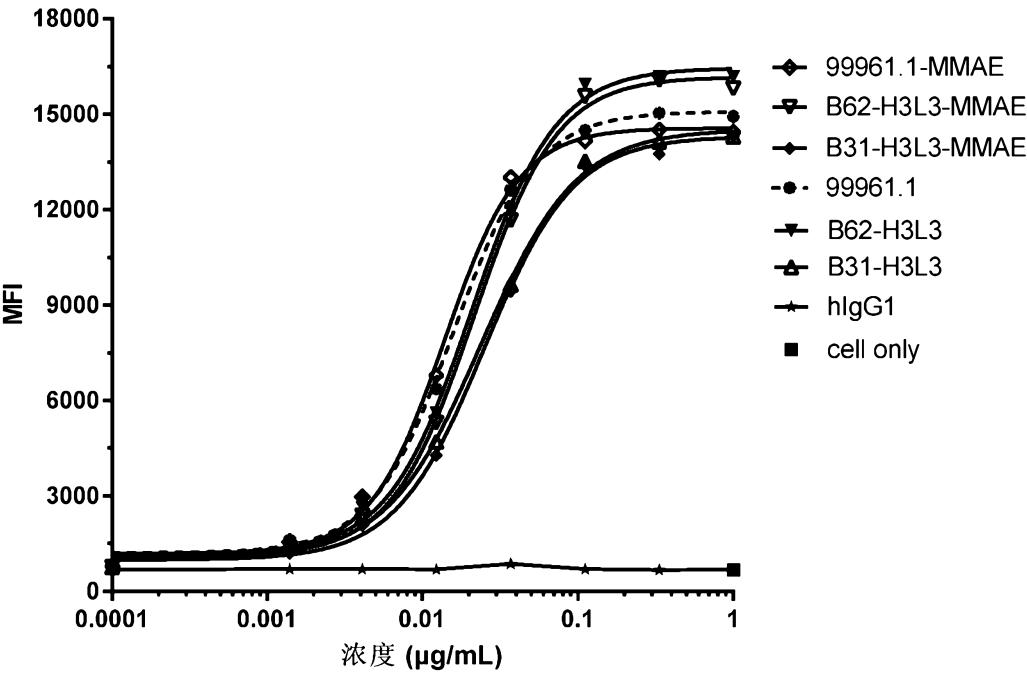


图 13B

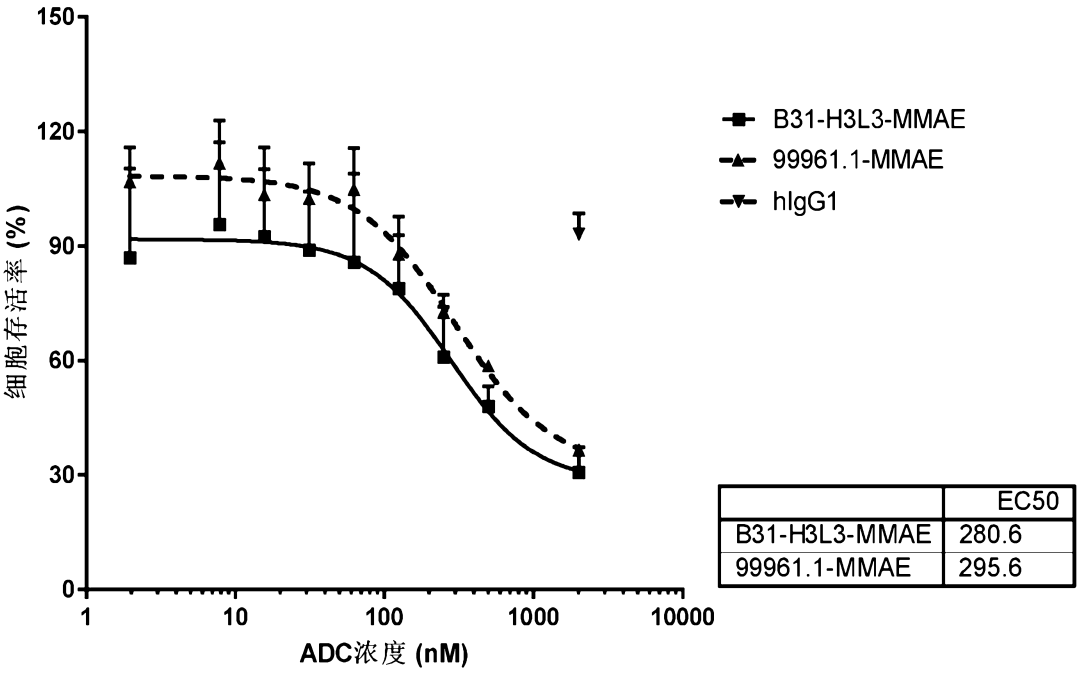


图 14A

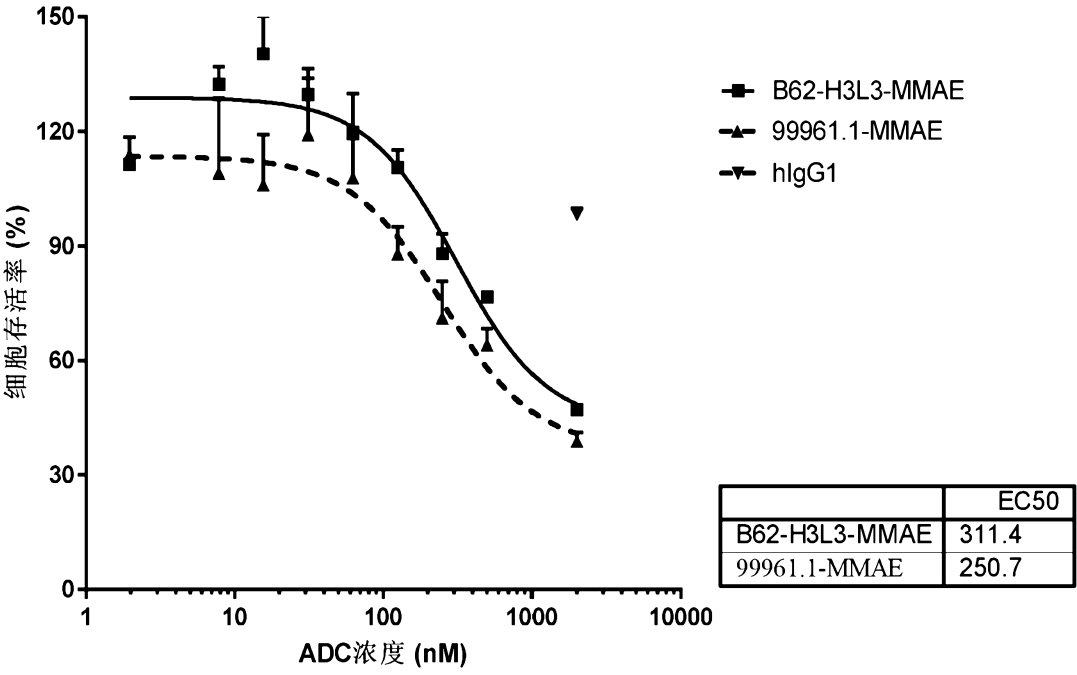


图 14B

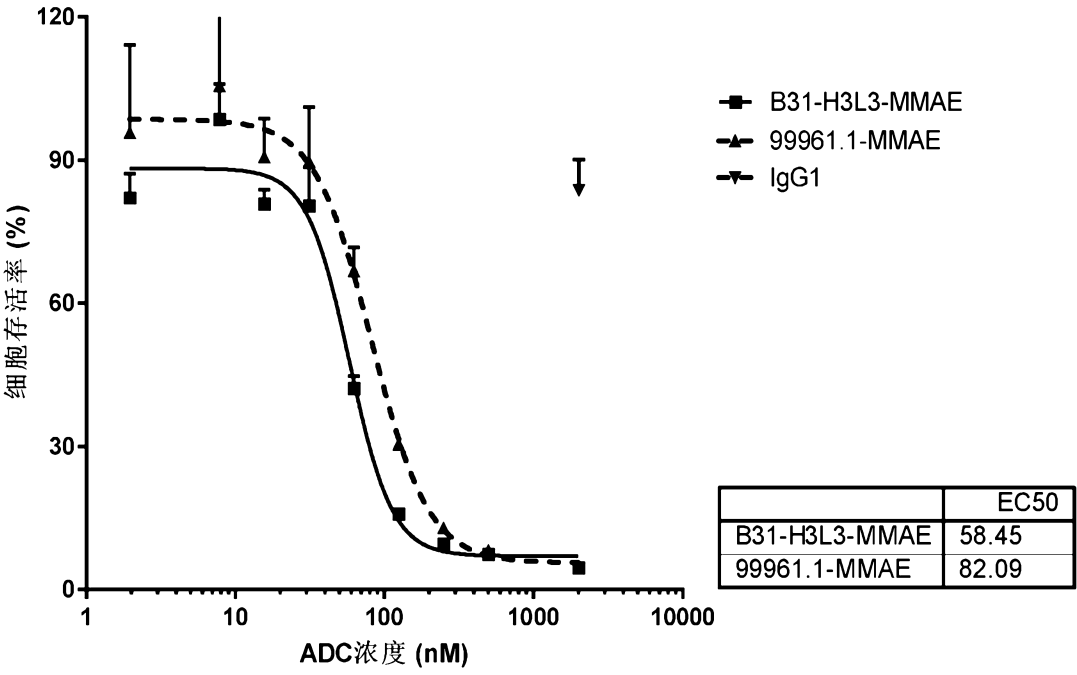


图 14C

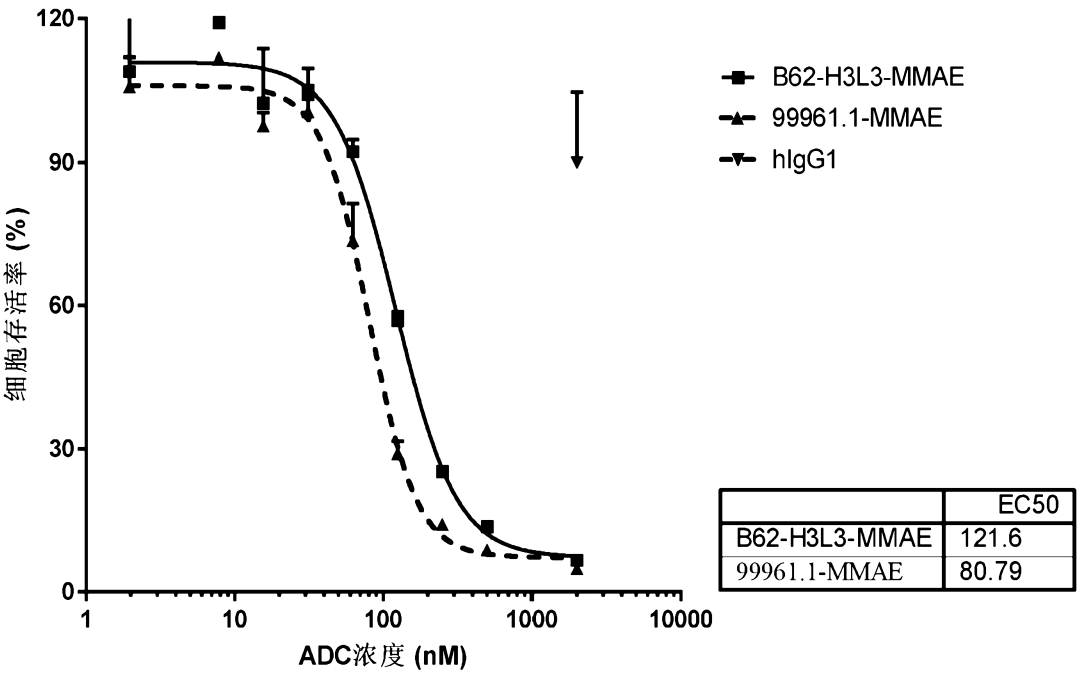


图 14D

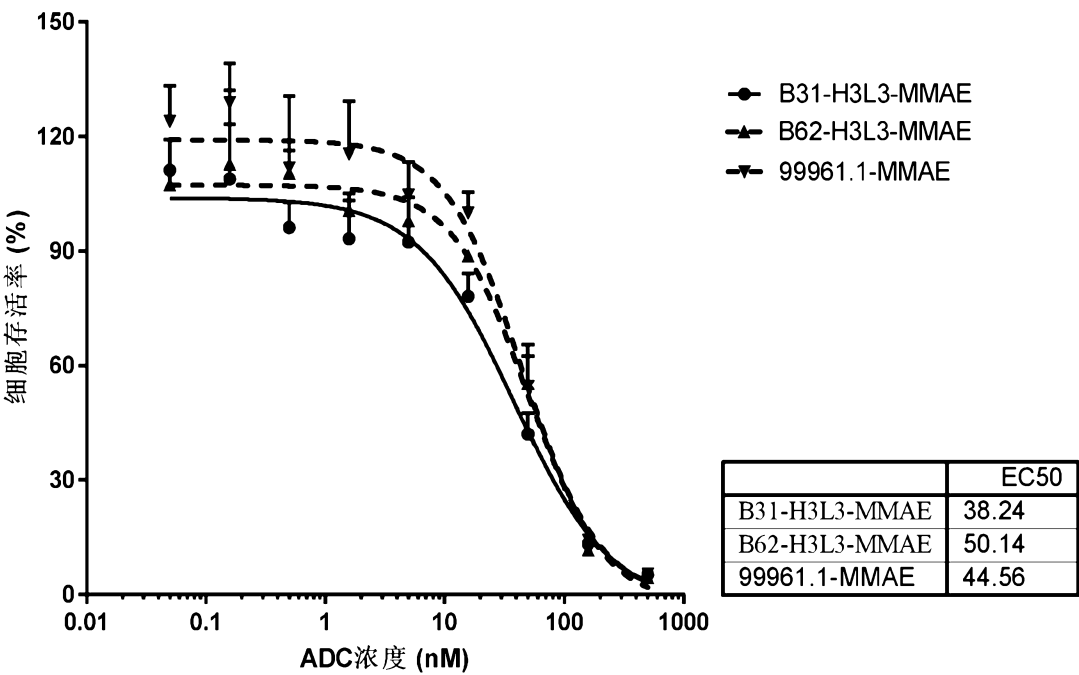


图 15A

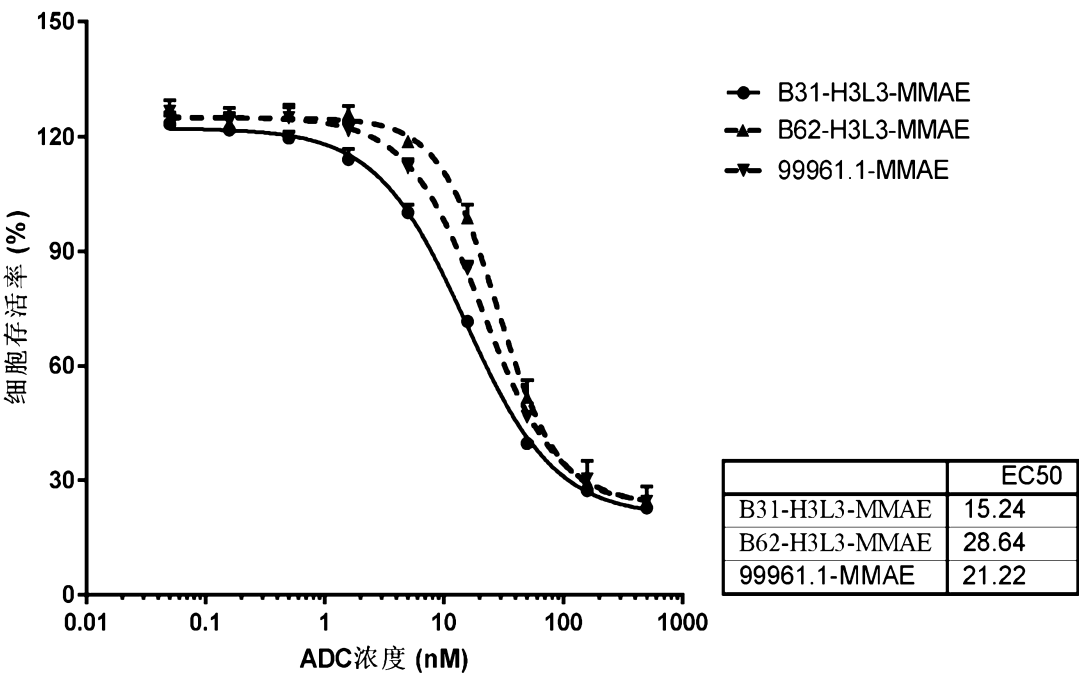


图 15B

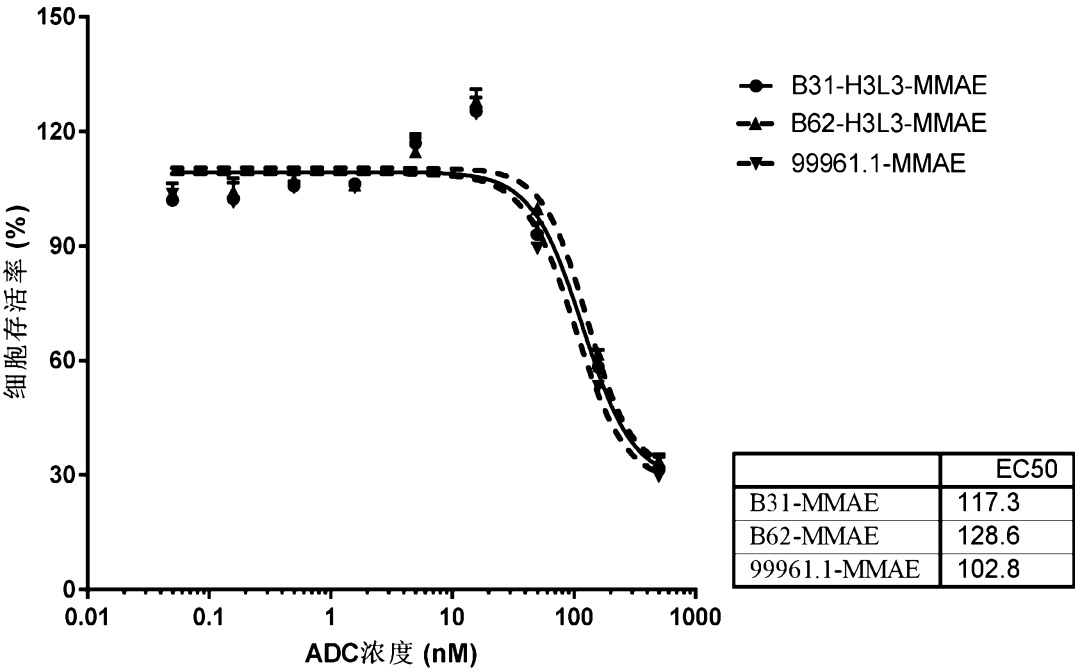


图 15C

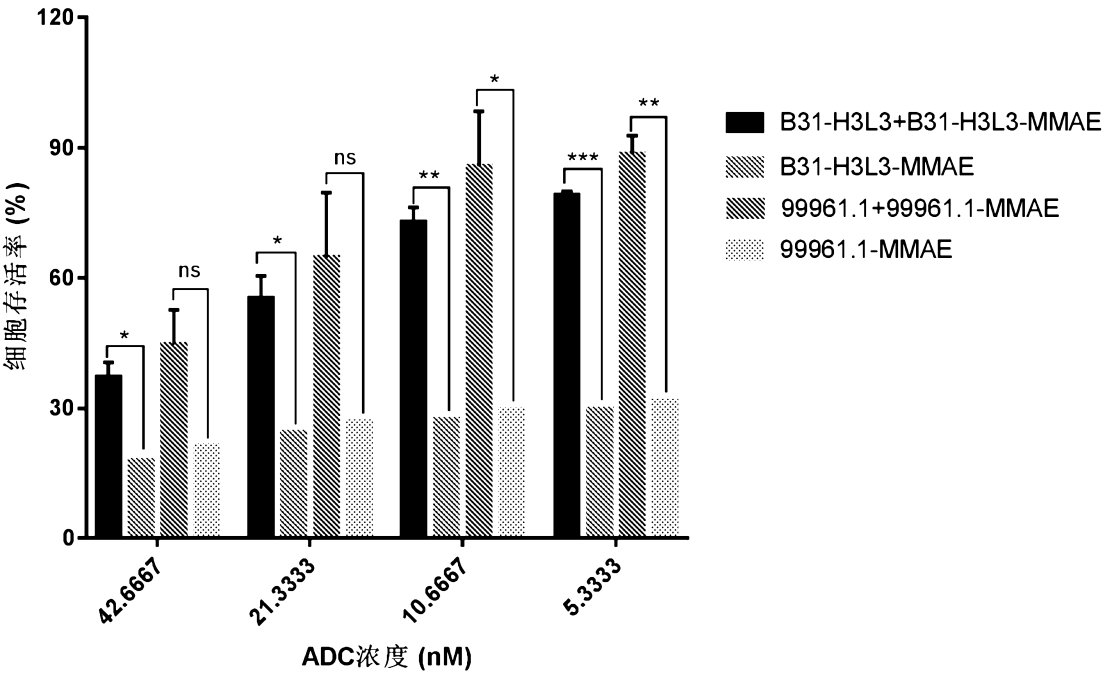


图 16

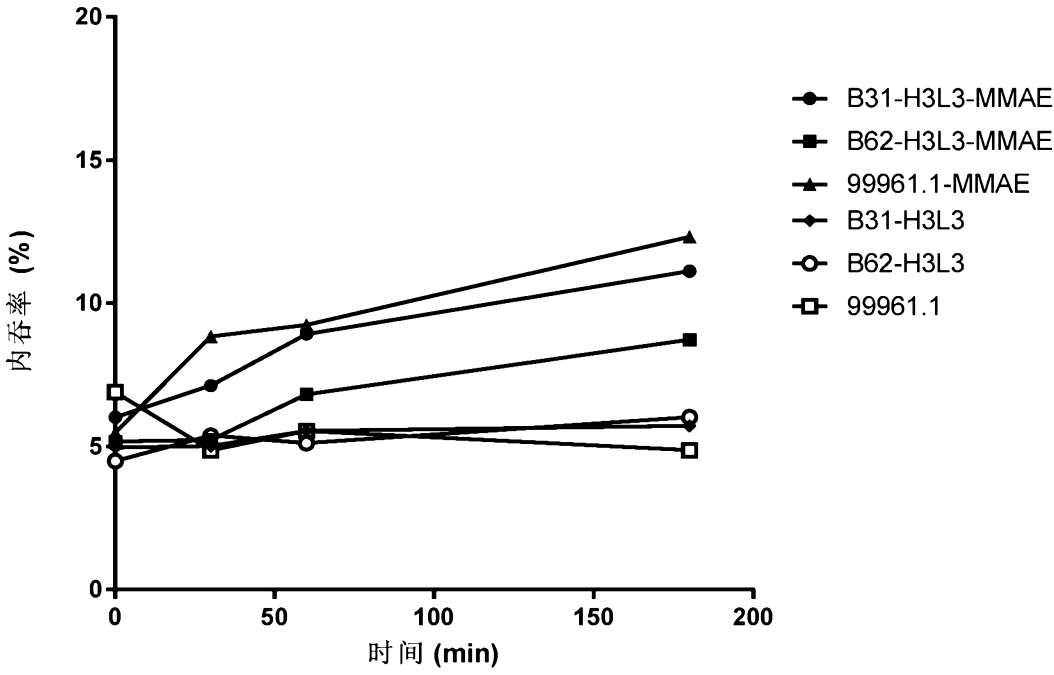


图 17A

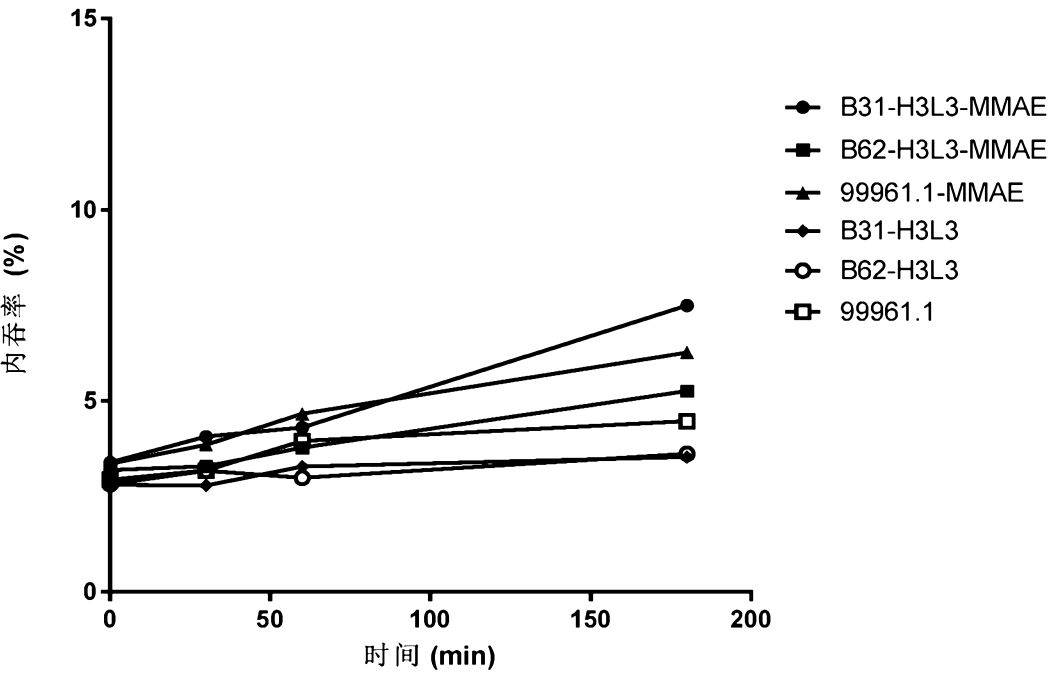


图 17B

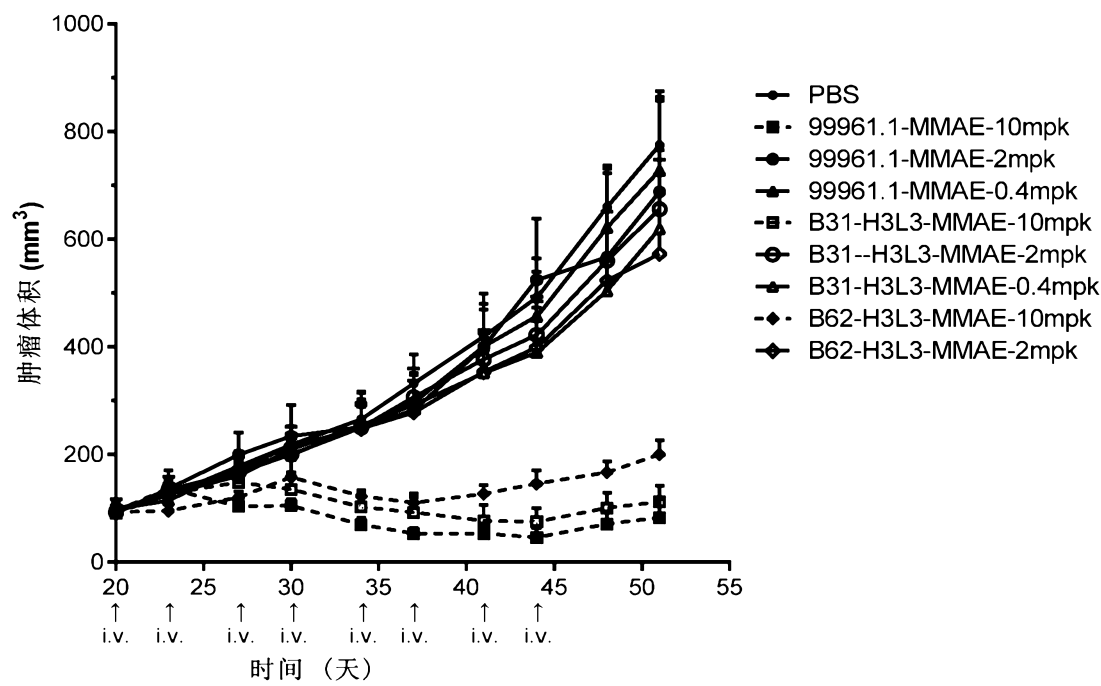


图 18A

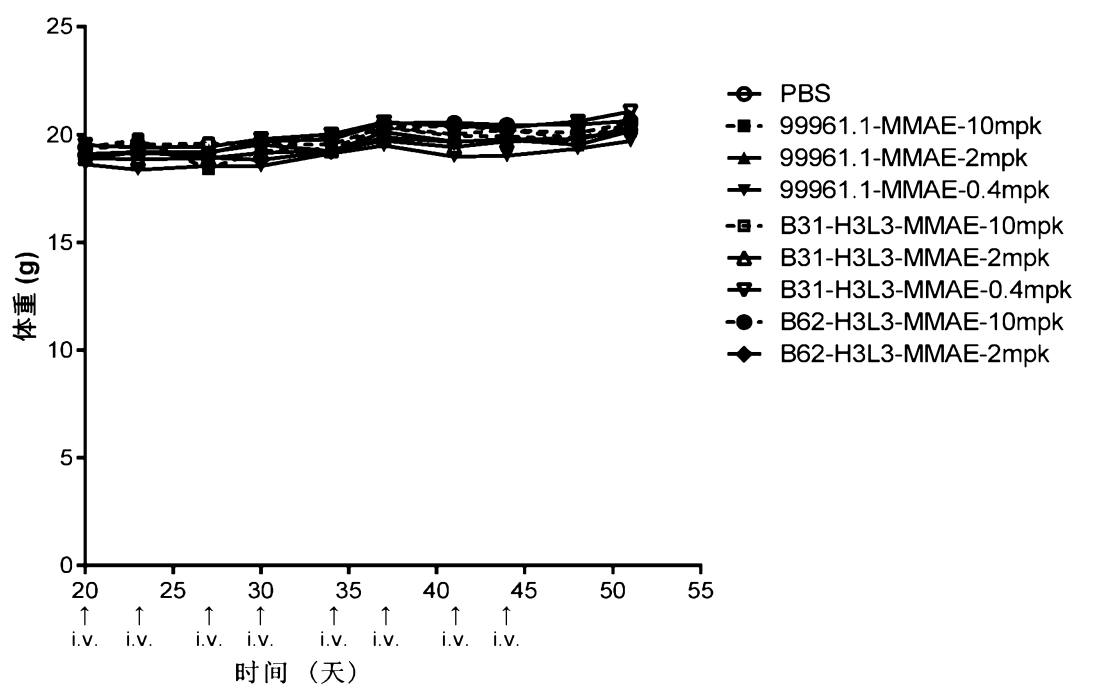


图 18B

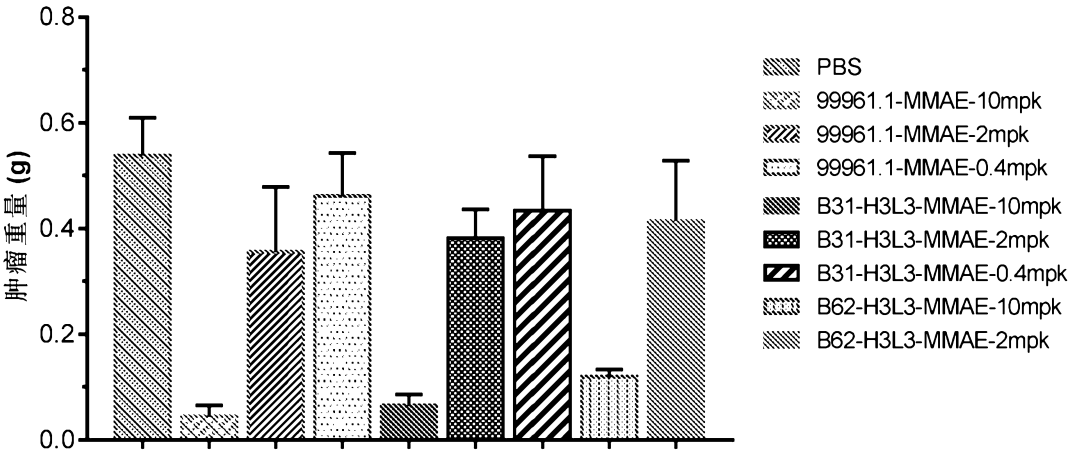


图 18C

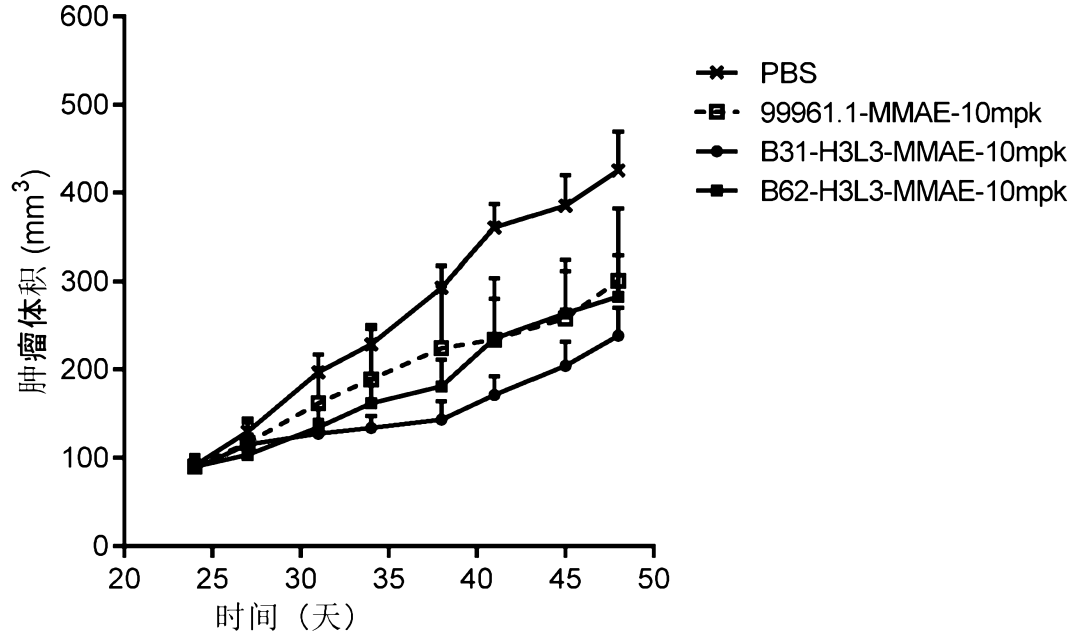


图 19A

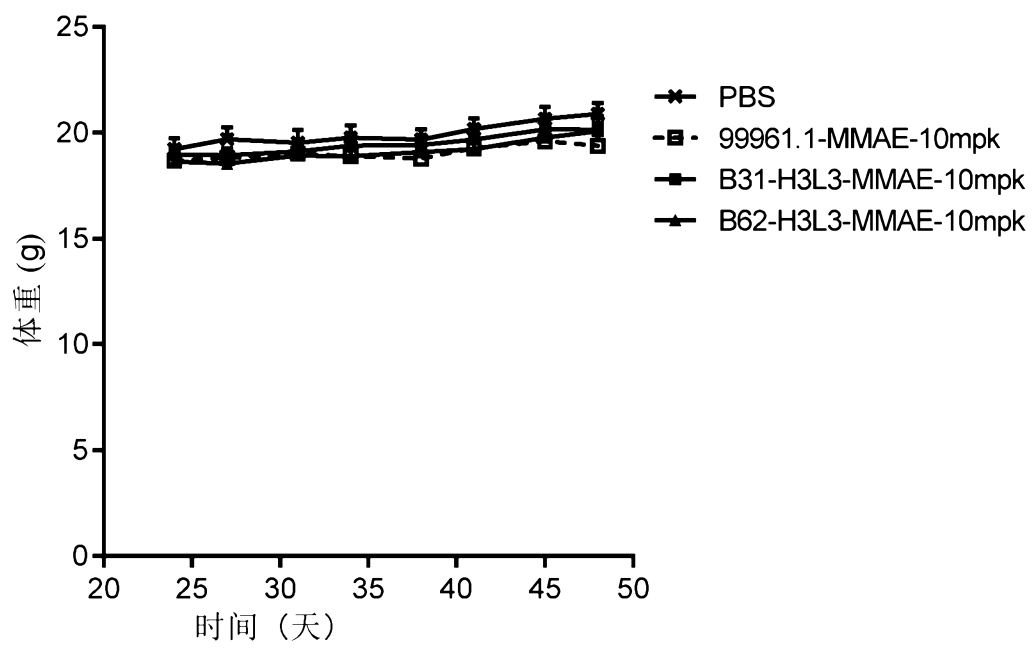


图 19B

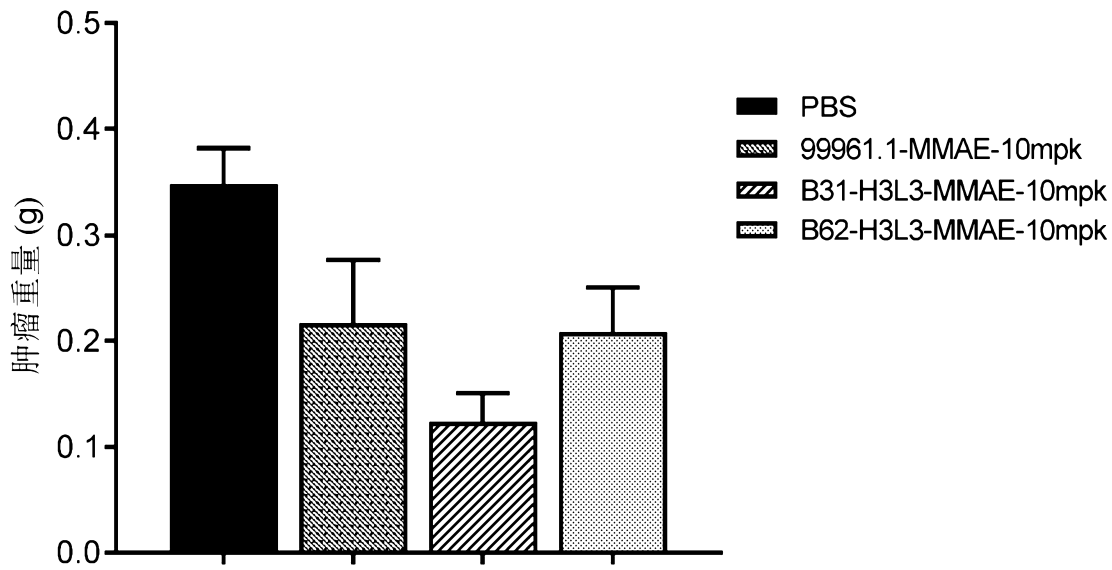


图 19C

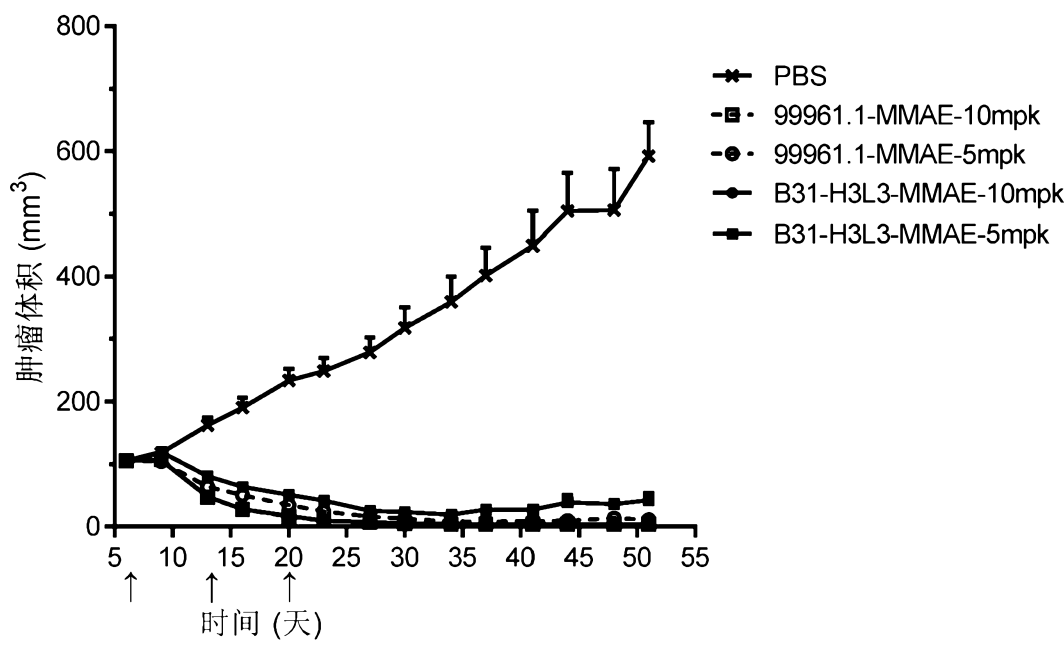


图 20A

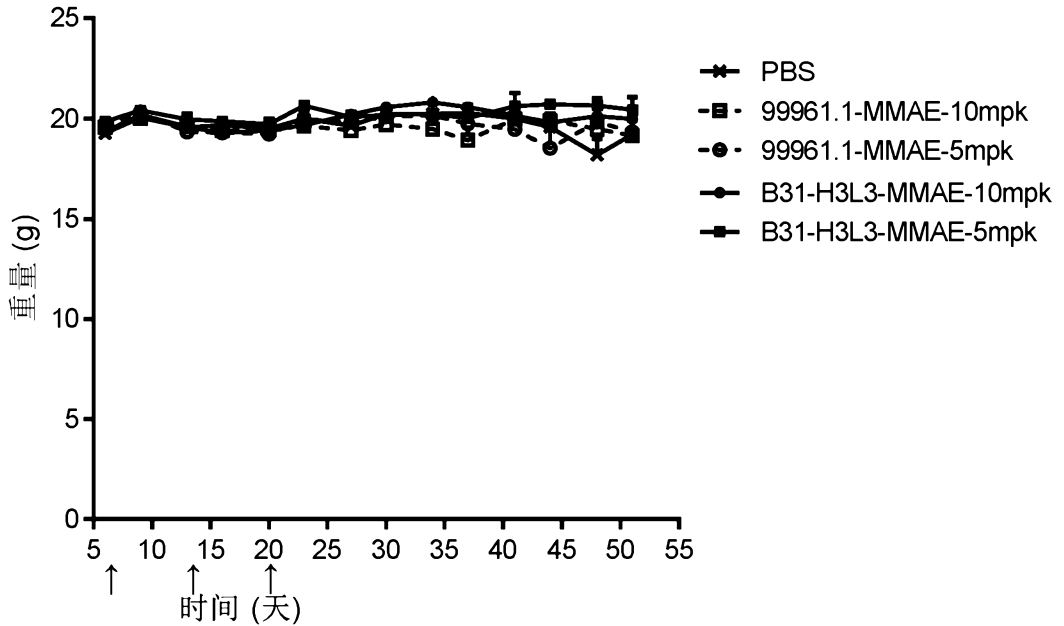


图 20B

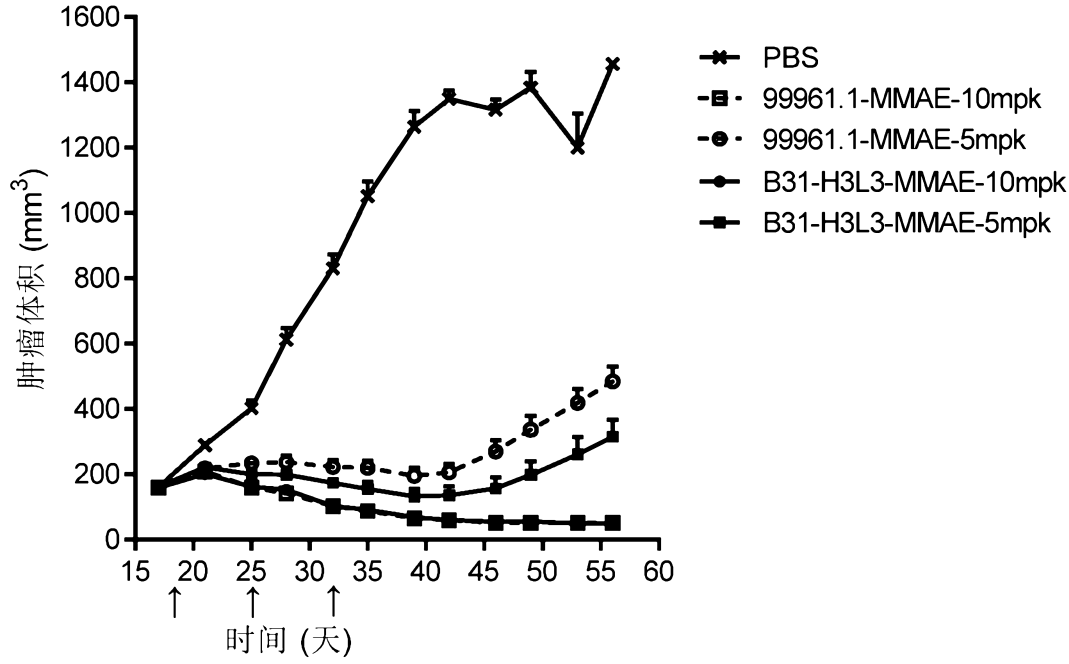


图 21A

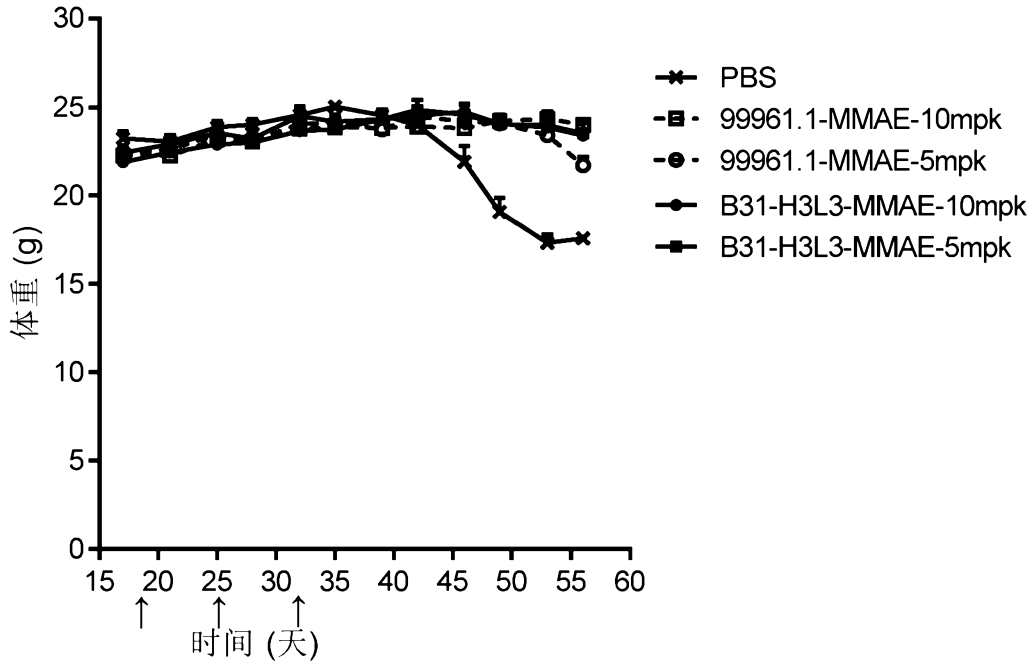


图 21B

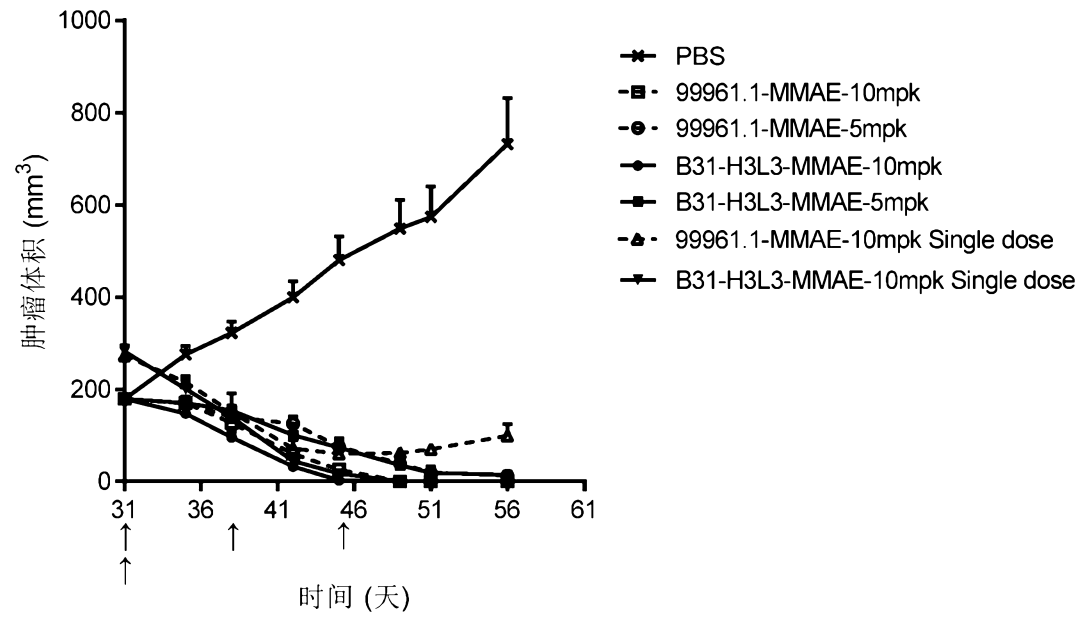


图 22A

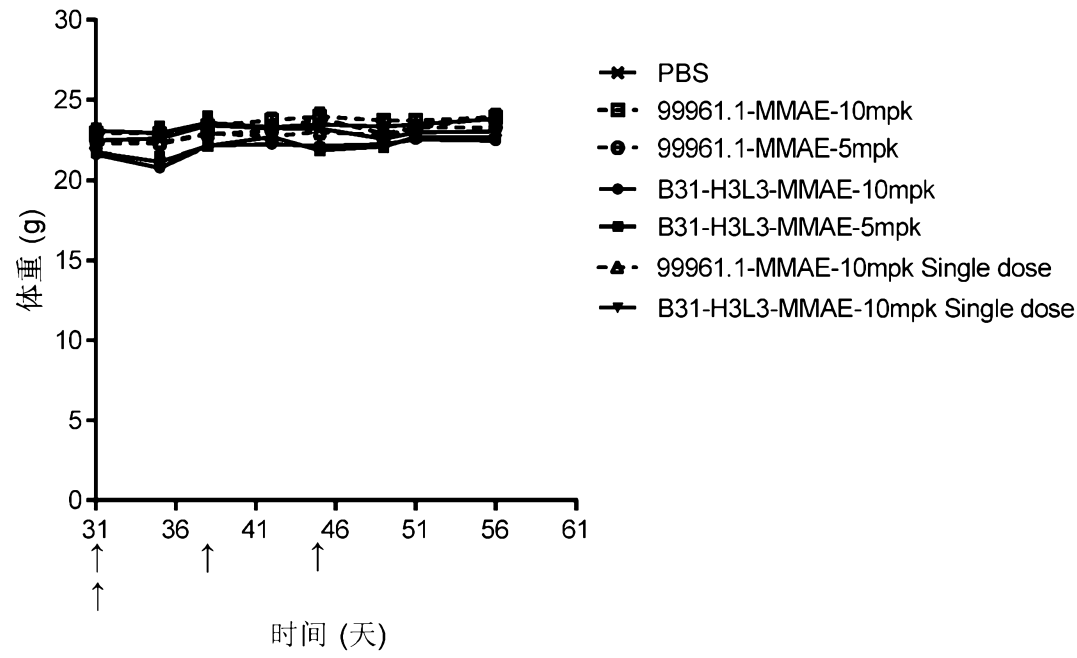


图 22B

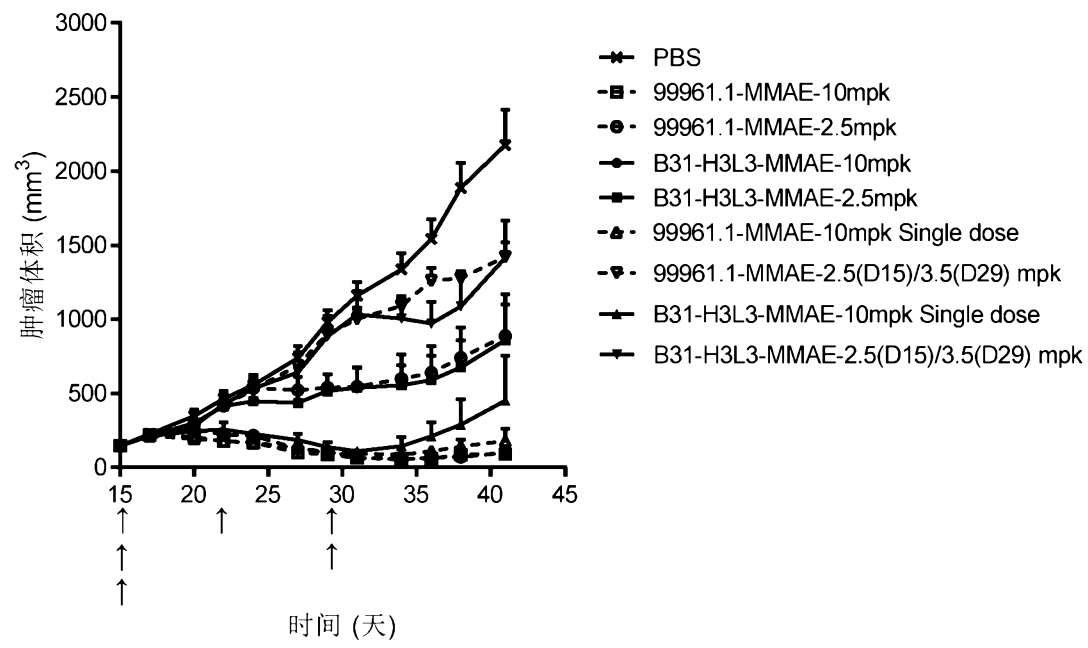


图 23A

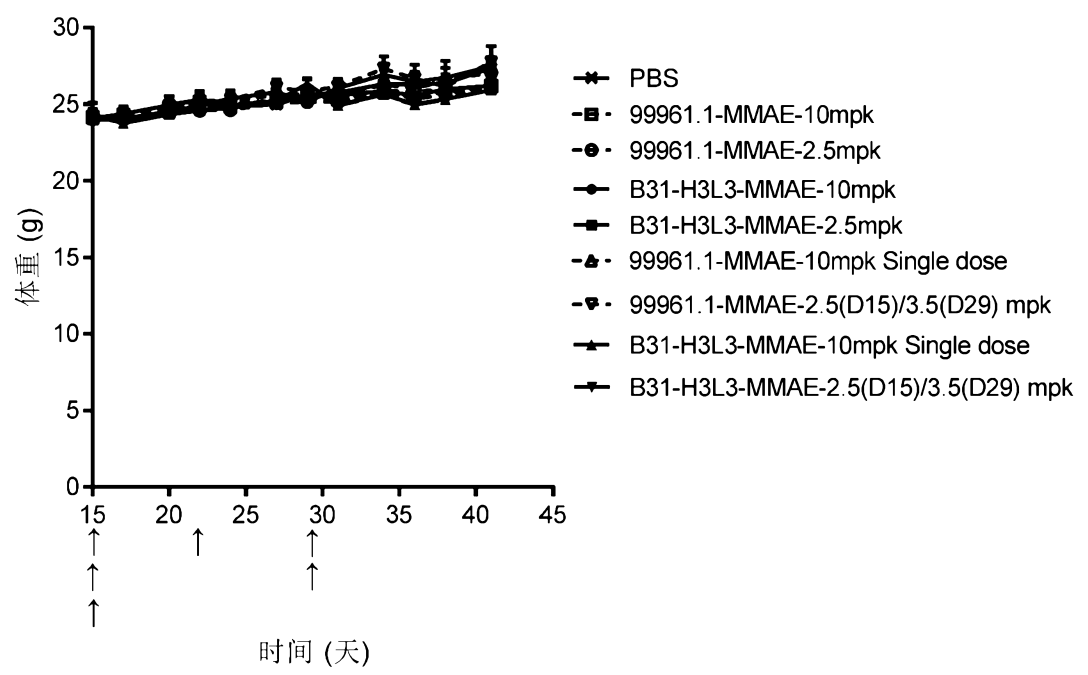


图 23B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/079562

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(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

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)

CNMED, CNABS, DWPI, WPABS, WPABSC, CJFD, AUABS, TWMED, ILABS, HKABS, MOABS, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, WOTXT, USTXT, VCN, VEN, GBTXT, EPTXT, CATXT, CNKI, PubMed, EMBL, Web of Science, GoogleScholar: ROR1, 抗体, antibod+, ADC, receptor tyrosine kinase-like orphan receptor1 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System, NCBI, EMBL, STN: 基于SEQ ID NO: 1-3, 28-30, 56, 57的序列检索, search based on SEQ ID NO: 1-3, 28-30, 56, 57

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AU 2015252014 A1 (US HEALTH) 19 November 2015 (2015-11-19) description, paragraphs 6-11	1-24, 27, 28 (all in part)
A	CN 107827984 A (ZHANG, Huilin; ZHU, Jin) 23 March 2018 (2018-03-23) abstract	1-24, 27, 28 (all in part)
A	CN 108707619 A (SHANGHAI HRAIN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 26 October 2018 (2018-10-26) abstract	1-24, 27, 28 (all in part)
A	CN 110590951 A (ANMENGDE MEDICAL TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 20 December 2019 (2019-12-20) abstract	1-24, 27, 28 (all in part)
A	EP 2649098 A1 (BIOINVENT INTERNATIONAL AB) 16 October 2013 (2013-10-16) abstract	1-24, 27, 28 (all in part)



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

09 May 2023

Date of mailing of the international search report

18 May 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/079562

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 13ter.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:

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.: **25-28 (in part)**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 25-28 (in part) relate to the subject matter of the antibody or an antigen-binding fragment thereof of any one of claims 1-7, or an effective amount of the antibody-drug conjugate of any one of claims 8-18, or an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 19 being used for prevention or treatment, which falls within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv) for which no international search is required, and therefore no international search is performed. An international search is still carried out on the technical solutions of claims 27 and 28 that refer to the pharmaceutical use of claim 24.
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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group 1: claims 1-28 (in part) set forth the technical solution relating to an anti-ROR1 antibody including three heavy chain CDRs included in a heavy chain variable region as shown in SEQ ID NO: 57 and three light chain CDRs included in a light chain variable region as shown in SEQ ID NO: 56.

Group 2: claims 1-28 (in part) set forth the technical solution relating to an anti-ROR1 antibody including three heavy chain CDRs included in a heavy chain variable region as shown in SEQ ID NO: 55 and three light chain CDRs included in a light chain variable region as shown in SEQ ID NO: 54.

...

Group 18: claims 1-28 (in part) set forth the technical solution relating to an anti-ROR1 antibody including three heavy chain CDRs included in a heavy chain variable region as shown in SEQ ID NO: 84 and three light chain CDRs included in a light chain variable region as shown in SEQ ID NO: 89.

The common technical feature between groups 1-18 is that the antibody binds to ROR1. However, the prior art document CN 110590951 A (15 June 2019, see the claims) discloses an anti-ROR1 antibody. Therefore, the above-mentioned technical feature cannot constitute the specific technical feature distinguishing the inventions from the prior art, and the 18 groups of inventions do not have the specific technical features that contribute to the prior art, are not linked with each other, and thus do not comply with PCT Rules 13.1 and 13.2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/079562

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Claims 1-28 (in part) set forth the technical solution relating to an anti-ROR1 antibody including three heavy chain CDRs included in a heavy chain variable region as shown in SEQ ID NO: 57 and three light chain CDRs included in a light chain variable region as shown in SEQ ID NO: 56.**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/079562

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
AU	2015252014	A1	19 November 2015	AU 2015252014 B2	02 March 2017
CN	107827984	A	23 March 2018	None	
CN	108707619	A	26 October 2018	None	
CN	110590951	A	20 December 2019	None	
EP	2649098	A1	16 October 2013	EP 2649098 B1	22 November 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/079562

A. 主题的分类

C07K 16/28 (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

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))

CNMED, CNABS, DWPI, WPABS, WPABSC, CJFD, AUABS, TWMED, ILABS, HKABS, MOABS, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, WOTXT, USTXT, VCN, VEN, GBTXT, EPTXT, CATXT, CNKI, PubMed, EMBL, Web of Science, GoogleScholar:ROR1, 抗体, antibod+, ADC, receptor tyrosine kinase-like orphan receptor1 中国专利生物序列检索系统, NCBI, EMBL, STN: 基于SEQ ID NO: 1-3、28-30、56、57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	AU 2015252014 A1 (US HEALTH) 2015年11月19日 (2015 - 11 - 19) 说明书第6-11段	1-24, 27, 28 (均为部分)
A	CN 107827984 A (张慧林 朱进) 2018年3月23日 (2018 - 03 - 23) 摘要	1-24, 27, 28 (均为部分)
A	CN 108707619 A (上海恒润达生物科技有限公司) 2018年10月26日 (2018 - 10 - 26) 摘要	1-24, 27, 28 (均为部分)
A	CN 110590951 A (安萌得医药科技 (上海) 有限公司) 2019年12月20日 (2019 - 12 - 20) 摘要	1-24, 27, 28 (均为部分)
A	EP 2649098 A1 (BIOINVENT INT AB) 2013年10月16日 (2013 - 10 - 16) 摘要	1-24, 27, 28 (均为部分)

☐ 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

2023年5月9日

国际检索报告邮寄日期

2023年5月18日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

授权官员

张艳霞

电话号码 (+86) 010-62089438

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:

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： 25-28（部分）
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求25-28（部分）涉及权利要求1-7任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或有效量的如权利要求8-18任一项所述的抗体偶联药物、或有效量的如权利要求19所述的药物组合物用于预防或治疗的主体，属于PCT细则39.1(iv)中所列的无需进行国际检索的情形，因此未进行国际检索。对权利要求27、28中引用权利要求24所述的制药用途的技术方案仍进行了国际检索。
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。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

组1：权利要求1-28（部分），请求保护涉及包含如SEQ ID NO：57所示的重链可变区所包含的3个重链CDR和如SEQ ID NO：56所示的轻链可变区所包含的3个轻链CDR的抗ROR1抗体的技术方案；

组2：权利要求1-28（部分），请求保护涉及包含如SEQ ID NO：55所示的重链可变区所包含的3个重链CDR和如SEQ ID NO：54所示的轻链可变区所包含的3个轻链CDR的抗ROR1抗体的技术方案；

.....

组18：权利要求1-28（部分），请求保护涉及包含如SEQ ID NO：84所示的重链可变区所包含的3个重链CDR和如SEQ ID NO：89所示的轻链可变区所包含的3个轻链CDR的抗ROR1抗体的技术方案。

组1-18之间共同的技术特征是所述抗体都与ROR1结合，但现有技术文献CN110590951A（公开日2019年6月15日，参见权利要求书）中公开了一种抗ROR1抗体，因此上述技术特征不能构成与现有技术进行区别的特定技术特征，上述18组发明相互之间不具备对现有技术做出贡献的特定技术特征，不能相互关联，不符合PCT实施细则13.1和13.2的规定。

第III栏

缺乏发明单一性的意见(续第I页第3项)

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 权利要求1-28（部分），请求保护涉及包含如SEQ ID NO：57所示的重链可变区所包含的3个重链CDR和如SEQ ID NO：56所示的轻链可变区所包含的3个轻链CDR的抗ROR1抗体的技术方案

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/079562

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)
AU	2015252014	A1	2015年11月19日	AU 2015252014 B2	2017年3月2日
CN	107827984	A	2018年3月23日	无	
CN	108707619	A	2018年10月26日	无	
CN	110590951	A	2019年12月20日	无	
EP	2649098	A1	2013年10月16日	EP 2649098 B1	2017年11月22日



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118871469 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 29

(21) 申请号 202380025939.0

(22) 申请日 2023.03.03

(66) 本国优先权数据

202210226048.9 2022.03.09 CN

202310099967.9 2023.02.09 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/079562 2023.03.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/169328 ZH 2023.09.14

(71) 申请人 三优生物医药(上海)有限公司

地址 201114 上海市闵行区新骏环路188号
6号楼B-C座3楼

申请人 杭州中美华东制药有限公司

(72) 发明人 徐培芳 刘婵娟 郎国竣 林晨
束庆玉 刘东舟

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理师 陈迎春 黄革生

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

(54) 发明名称

一种靶向ROR1的结合分子及其应用

(57) 摘要

本申请涉及特异性识别ROR1的抗体,其制备方法 and 用途。本申请还涉及靶向ROR1的抗体偶联药物(ADC)以及含有该分子的组合物。此外,本发明还涉及这些抗体、抗体片段以及抗体偶联药物的治疗和诊断用途。

Abstract

The present application relates to an antibody specifically recognizing ROR1, and a preparation method therefor and the use thereof. The present application also relates to an antibody-drug conjugate (ADC) targeting ROR1 and a composition containing the molecule. In addition, the present invention further relates to the therapeutic and diagnostic uses of the antibodies, antibody fragments and antibody-drug conjugates.