一种自带游离载荷回收单元的配体药物偶联物

技术领域

[01] 本发明涉及生物医药领域，具体涉及一种自带游离载荷回收单元的配体药物偶联物及其应用。

背景技术

[02] 抗体药物偶联物（Antibody-Drug Conjugates，ADCs）是将单克隆抗体与细胞毒性药物（也可称为payload，有效载荷）通过连接子偶联而产生的新型生物药（Hafeez U, Parakh S, Gan HK, Scott AM. Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. Molecules. 2020 Oct 16;25(20):4764.），通过靶向特定抗原，ADC 能够有效地渗透到肿瘤组织，并被肿瘤细胞吞噬进入酶溶体，释放效应分子。其充分结合了单克隆抗体靶向选择性强和细胞毒性药物活性高的特点，不仅可以将细胞毒性药物特异性地靶向于肿瘤细胞，同时还具备缓释、提高药物抗肿瘤活性等效果，是肿瘤治疗的重点发展方向之一。

[03] ADC 技术的发展历程大致分为 4 个阶段：第一代 ADC 属于早期探索阶段，这一阶段对有效载荷活性及释放方式、连接子性质等关键问题的认识基本空白，采用鼠源抗体+高活性有效载荷+不稳定连接子+随机偶联策略，免疫原性高，为不同 DAR 值组分的混合物，代谢不稳定，安全窗窄，成药挑战较高，代表性品种是 Mylotarg。第二代 ADC 丰富了连接子的类型，采用人源化抗体+高活性有效载荷+稳定连接子+随机偶联策略，免疫原性低，代谢稳定性大幅提高，治疗指数提高，代表性品种为 Kadcyla 和 Adcetris。与第一代 ADC 相比，二代 ADC 显示出良好的临床疗效和安全性。第三代吸取了早期 ADC 的经验：不均一性、不稳定性是影响 ADC 体内药效和毒性重要因素，高 DAR 值组分在体内稳定性差，影响 ADC 治疗窗口，所以采用了定点偶联及低 DAR 值技术，但仍然存在有效载荷释放不足、高耐药性等问题。第四代 ADC 技术采用高 DAR 值（4-8）、中低活性有效载荷策略，有效载荷具有较高的旁观者效应，最重要的特点是对肿瘤表面抗原低表达和高表达抗原肿瘤都具有很好的疗效，代表性品种为 Enhertu 和 Trodelvy。自 2009 年第一款 ADC 药物-gemtuzumab ozogamicin（Mylotarg）获美国 FAD 获批上市以来，截至 2024 年 5 月，全球共有 15 款 ADC 药物获批上市（详见表 1），还有大量的 ADC 药物正处于临床研究阶段或早期研究阶段。

表 1. 全球获批上市 ADC 药物基本信息

序号	商品名	ADC 名称	研发机构	靶点	连接子	载荷
1	Mylotarg	Gemtuzumab ozogamicin (GO)	Pfizer	CD33	可裂解的腙键	Calicheamicin
2	Adcetris	Brentuximab vedotin (SGN-35)	Seagen/Takeda Pharmaceuticals	CD30	可裂解的二肽	MMAE
3	Kadcyla	Trastuzumab emtansine (T-DM1)	Roche/ ImmunoGen	HER2	不可裂解的硫醚	DM1
4	Besponsa	Inotuzumab ozogamicin	Pfizer/Celltech	CD22	可裂解的腙键	Calicheamicin
5	Lumoxiti	Moxetumomab pasudotox	AstraZeneca	CD22	可裂解的 mc-VC-PABC	PE38
6	Polivy	Polatuzumab vedotin	Roche	CD79B	可裂解的二肽	MMAE
7	Padcev	Enfortumab vedotin	Seagen/Astellas Pharma	NECTIN-4	可裂解的 mc-VC-PABC	MMAE
8	Enhertu	Fam-trastuzumab deruxtecan (DS-8201)	Daiichi Sankyo/AstraZeneca	HER2	可裂解的 GGFG 四肽	Dxd
9	Trodelvy	Sacituzumab govitecan	Immunomedics	TROP-2	可裂解的 CL2A	SN38
10	Blenrep	Belantamab mafodotin	GSK	BCMA	不可裂解的马来酰亚胺	MMAF
11	Akalux	Cetuximab saratolacan	RakutenMedical	EGFR	可裂解结构	IRDye700DX
12	Zynlonta	Loncastuximab tesirine-lpyl	ADC Therapeutics	CD19	可裂解的二肽	PBD(SG3199)
13	爱地希	Disitamab vedotin	RemeGen	HER2	可裂解的 mc-VC-PABC	MMAE
14	Tivdak	Tisotumab vedotin-tftv	Genmab/ Seagen	TF	可裂解的 mc-VC-PABC	MMAE
15	Elahere	Mirvetuximab soravtansine-gyxn	Immunogen/华东医药	FRA	可裂解的 SPDB	DM4

[04] 有效载荷的活性和理化性质会直接影响 ADC 药物的抗肿瘤功效。现有获批的 ADC 中有效载荷主要有两大类：微管蛋白抑制剂和 DNA 抑制剂，其中 DNA 抑制剂又分为 DNA 损伤剂和拓扑异构酶抑制剂。如表 1 所示，微管蛋白抑制剂是目前 ADC 药物开发中应用最广的一类有效载荷，15 款 ADC 上市药中有 8 款的有效载荷是微管蛋白抑制剂（奥瑞他汀类化合物（MMAE）、美登素类化合物（如 DM1、DM4））。另外 DNA 损伤剂包括卡奇霉素类、PBD 类及喜树碱类衍生物（SN38、DXD）也广泛作为有效载荷应用于 ADC 药

物的构建中，目前已上市的 ADC 药品中具有代表性示例有 Mylotarg、Besponsa、Enhertu、Trodelvy 以及 Zynlonta（Wang Z, Li H, Gou L, Li W, Wang Y. Antibody-drug conjugates: Recent advances in payloads. Acta Pharm Sin B. 2023 Oct;13(10):4025-4059）。

[05] 通常来说，抗体上赖氨酸和半胱氨酸的存在为偶联载荷提供了反应位点，早期的 ADC 药物基本通过赖氨酸或半胱氨酸残基进行随机偶联，但由于抗体大约 40 个氨基酸残基通常可以发生反应，不同数量的 DAR（0-8）小分子载荷可能附着在抗体上，导致 DAR 值分布较宽。由于 IgG1 抗体同时具有链间二硫键和链内二硫键。链间二硫键暴露在抗体的外部，很容易被还原暴露出游离的半胱氨酸残基，从而为连接子有效负载与抗体的偶联提供了可用的位点。另外由于结合位点的数量有限和硫醇基团的独特反应性，使用半胱氨酸作为连接位点有助于降低 ADC 的异质性，因此迄今为止最常用的偶联方式是基于半胱氨酸的反应。但无论是赖氨酸还是半胱氨酸残基的偶联方式，由于不够稳定性，都有可能导致有效载荷的提早释放，从而导致脱靶毒性（Fu Z, Li S, Han S, Shi C, Zhang Y. Antibody drug conjugate: the "biological missile" for targeted cancer therapy. Signal Transduct Target Ther. 2022 Mar 22;7(1):93）。

[06] 尽管 ADC 新药的开发已经获得前所未有的成功，但在开发 ADC 的过程中仍然存在许多挑战，包括药代动力学的复杂性、有效载荷释放不足、耐药性以及治疗时不可避免的副作用等。最常见的严重副作用（3 级或更高）是血液毒性，包括中性粒细胞减少、血小板减少、白细胞减少和贫血。血液毒性以及肝毒性和胃肠道反应可能与细胞毒性有效载荷过早释放到血液循环中有关。这与主要影响那些快速增殖的健康细胞的常规化疗药物一致。

[07] 此外，在药物上市阶段，尽管一些 ADCs 已经证明了足够的有效性和安全性，但在临床应用过程中，几乎所有 ADCs 都表现出一定的毒性。随着 ADC 药物在临床应用的深入，有些药物则因表现出一定的毒副作用导致临床应用剂量减少或停止用药。据估计，ADC 药物进入人体后，只有约 0.1%的药物量被传递到靶向病变细胞群，绝大多数药物在非靶向健康细胞内分解“离位”，由此可能导致不必要的毒性。未到达靶病变或靶组织的 ADC 毒性可分为“靶上（on-target）”或“脱靶（off-target）”，脱靶（off-target）毒性主要由 ADC 上脱落下的游离毒素所引起。完整的 ADC 进入正常细胞可能通过非特异性内吞作用，或通过与靶抗原或 Fc/C 型凝集素受体结合而内化。细胞外液中的 ADC 分子解离的有效载荷或其他靶向/非靶向凋亡细胞释放的有效载荷可通过细胞膜被动扩散或非特异性内吞的方式进入正常细胞。脱靶的有效载荷传递是 ADC 耐受性的关键驱动因素，并最终决定患者的推荐剂量（Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Mechanisms of ADC Toxicity and Strategies to Increase ADC Tolerability. Cancers (Basel). 2023 Jan 24;15(3):713.）

[08] 为提高 ADC 的耐受性，Balthasar 等人通过设计中和抗体片段（Fab 或 sdAb）来结合非共轭的循环有效载荷分子，旨在减少细胞毒素到达正常组织或细胞的量，从而减少接受 ADC 的患者脱靶毒性的程度（Bordeau BM, Nguyen TD, Polli JR, Chen P, Balthasar JP. Payload-Binding Fab Fragments Increase the Therapeutic Index of MMAE Antibody-Drug Conjugates. Mol Cancer Ther. 2023 Apr 3;22(4):459-470.、Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Use of Payload Binding Selectivity Enhancers to Improve Therapeutic Index of Maytansinoid-Antibody-Drug Conjugates. Mol Cancer Ther. 2023 Nov 1;22(11):1332-1342.）。在这种方法中，需要将 ADC 和中和抗体片段向受试者共同给药，生产及用药成本较高，另外 ADC 与中和抗体片段间的给药比例、给药方式也需要探索，增加了给药方案开发的复杂性。此外，在 WO2021113740A1 及 WO2024044709A2 也公开了上述方法，并公开了多种靶向小分子毒素的抗体，包括单域抗体以及寡肽等，如仅结合游离 MMAE，不结合 MMAE-ADC 上的 MMAE 的抗体鼠源抗体 MA24E2，人源化抗体 ABC3315、ABC3320（重链：SEQ ID NO:163；轻链：SEQ ID NO:164）；抗 MMAE 单域抗体 MC7；抗喜树碱类毒素鼠源 8C2 抗体、人源化 8C2 Fab、人源化 8C2 VHH；抗喜树碱类毒素的单域抗体 TF7 及单域抗体 TA2、抗卡奇霉素（calicheamicin）的寡肽 C2 和 C9、抗卡奇霉素(calicheamicin)的单域抗体 CG4、抗美登素(maytansinoid)单域抗体 DF3A2, DF3A4, DF4B12, DMFH1, DMOH9。但发现部分抗体的使用虽然可以降低游离的小分子毒素，但也可能原因不明的增加抗体偶联药物的细胞毒性。如 8C2 抗体、MC7 抗体等。

[09] 本发明创造性的在配体药物偶联物中直接连接一个可回收从配体药物偶联物上脱落下来的游离载荷的回收单元，可以清除血液中游离的载荷，降低脱靶毒性，同时通常过回收游离载荷又可以整体上增加配体药物偶联物所携带的载荷，弥补因载荷脱落而导致的活性损失。因此通过引入回收单元，实现对游离载荷的回收，可以显著增加配体偶联药物的安全性。进而 ADC 用药剂量可进一步提升从而相应的提高 ADC 治疗的有效性，扩大治疗窗。

[10] 此外，在上述组合疗法（WO2021113740A1）上出现的原因未知的抗体药物偶联物细胞毒性增强的风险也被有效避免。另一方面，相对使用两种大分子产品的组合疗法，可以大幅度的降低生产成本和临床开发成本，简化用药，降低药物风险，并提高受试者用药便利性。

[11] 回收单元可以利用现有技术筛选靶向游离载荷的抗体、多肽或适配体等，相关的筛选技术发展也日趋成熟，主要是通过特定方法筛选高亲和力、高特异性结合小分子靶标的抗体或抗原结合片段以及适配体等，用于治疗、诊断或研究，主要技术包括杂交瘤技术、纳米抗体筛选技术、计算机辅助设计（AI/结构生物学）、噬菌体展示技术、酵母展示技术、单 B 细胞克隆技术、微流控技术、表面等离子共振辅助筛选以及核酸适配体筛选技术（SELEX）等。其中杂交瘤技术是最传统的筛选方法，主要原理是将免疫动物（如小鼠）的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，形成杂交瘤细胞，筛选分泌目标抗体的克隆。噬菌体展示技术的优点是无需动物免疫，可针对毒性小分子或难以免疫的靶标进行筛选。本发明则利用上述多种技术针对靶向小分子药

物的抗体、多肽或适配体进行了筛选。

[12] 本文引用的所有参考文献，包括专利申请、专利出版物和 UniProtKB/Swish Prot 登录号，均以引用的方式整体并入本文，即每个单独的参考文献都被明确且单独地指示以引用的形式并入本文。

发明内容

[13] 本发明提供了一种自带游离载荷回收单元的配体药物偶联物及其在预防或治疗肿瘤中的应用。

[14] 具体的一方面，本发明提供了一种配体药物偶联物，所述配体药物偶联物包含靶向肿瘤抗原或非肿瘤抗原的配体单元，偶联的载荷单元以及能够结合从所述配体药物偶联物上脱落下来的游离载荷的回收单元。

[15] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 IgG 形式，回收单元为 VHH 形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VL-CL；(2)VH-CH1-CH2-CH3-VHH；(3) VH-CH1-CH2-CH3-VHH；以及(4)VL-CL，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 1 中。

[16] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 IgG 形式，回收单元为 scFv 形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VL-CL；(2)VH-CH1-CH2-CH3-scFv；(3) VH-CH1-CH2-CH3-scFv；以及(4)VL-CL，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 2 中。

[17] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 IgG 形式，回收单元为多肽（peptide）形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VL-CL；(2)VH-CH1-CH2-CH3-多肽；(3) VH-CH1-CH2-CH3-多肽；以及(4)VL-CL，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 3 中。

[18] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 IgG 形式，回收单元为适配体（aptamer）形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VL-CL；(2)VH-CH1-CH2-CH3-适配体；(3) VH-CH1-CH2-CH3-适配体；以及(4)VL-CL，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 4 中。

[19] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 VHH+Fc 形式，回收单元为 VHH 形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VHH $_{配体}$-CH2-CH3-VHH $_{回收}$；以及(2) VHH $_{配体}$-CH2-CH3-VHH $_{回收}$；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 5 中。

[20] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 VHH+Fc 形式，回收单元为 scFv 形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VHH-CH2-CH3-scFv；以及(2) VHH-CH2-CH3-scFv；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 6 中。

[21] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 VHH+Fc 形式，回收单元为多肽形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VHH-CH2-CH3-多肽；以及(2) VHH-CH2-CH3-多肽；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 7 中。

[22] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 VHH+Fc 形式，回收单元为适配体形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VHH-CH2-CH3-适配体；以及(2) VHH-CH2-CH3-适配体；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 8 中。

[23] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为多肽形式，回收单元为 VHH 形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：多肽-VHH；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 9 中。

[24] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为多肽形式，回收单元为 scFv 形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：多肽-scFv；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 10 中。

[25] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为多肽形式，回收单元为多肽形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：多肽$_{配体}$-多肽$_{回收}$；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 11 中。

[26] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为多肽形式，回收单元为适配体形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：多肽-适配体；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 12 中。

[27] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 VHH 形式，回收单元为适配体形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：VHH-适配体；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 13 中。

[28] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 scFv 形式，回收单元为适配体形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：scFv-适配体；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 14 中。

[29] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为适配体形式，回收单元为多肽形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：适配体-多肽；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 15 中。

[30] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为适配体形式，回收单元也为适配体形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：适配体$_{配体}$-适配体$_{回收}$；六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 16 中。

[31] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为双特异性抗体形式，回收单元为 VHH 形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VL-CL；(2)VH-CH1-CH2-CH3-VHH；(3) VH-CH1-CH2-CH3-VHH；以及(4)VL-CL，(1)和(2)的 VH 和 VL 形成特异性结合第一抗原或第一抗原表位的结合位点， (3)和(4)的 VH 和 VL 形成特异性结合第二抗原或第二抗原表位的结合位点，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 17 中。

[32] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为双特异性抗体形式，回收单元为 scFv 形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VL-CL；(2)VH-CH1-CH2-CH3-scFv；(3) VH-CH1-CH2-CH3-scFv；以及(4)VL-CL，(1)和(2)的 VH 和 VL 形成特异性结合第一抗原或第一抗原表位的结合位点， (3)和(4)的 VH 和 VL 形成特异性结合第二抗原或第二抗原表位的结合位点，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 18 中。

[33] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为双特异性抗体形式，回收单元为多肽形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VL-CL；(2)VH-CH1-CH2-CH3-多肽；(3) VH-CH1-CH2-CH3-多肽；以及(4)VL-CL，(1)和(2)的 VH 和 VL 形成特异性结合第一抗原或第一抗原表位的结合位点，(3)和(4)的 VH 和 VL 形成特异性结合第二抗原或第二抗原表位的结合位点，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 19 中。

[34] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为双特异性抗体形式，回收单元为适配体形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VL-CL；(2)VH-CH1-CH2-CH3-适配体；(3) VH-CH1-CH2-CH3-适配体；以及(4)VL-CL，(1)和(2)的 VH 和 VL 形成特异性结合第一抗原或第一抗原表位的结合位点，(3)和(4)的 VH 和 VL 形成特异性结合第二抗原或第二抗原表位的结合位点，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 20 中。

[35] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 IgG 形式，回收单元为 VHH 形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，载荷偶联在 VHH 上，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VL-CL；(2)VH-CH1-CH2-CH3-VHH；(3) VH-CH1-CH2-CH3-VHH；以及(4)VL-CL，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 21 中。

[36] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 IgG 形式，回收单元为 VHH 形式，所述回收单元通过连接单元连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，载荷偶联在 IgG 和 VHH 之间的连接单元上，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VL-CL；(2)VH-CH1-CH2-CH3-VHH；(3) VH-CH1-CH2-CH3-VHH；以及(4)VL-CL，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 22 中。

[37] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 IgG 形式，回收单元为 VHH 形式，所述回收单元直接连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，IgG 和 VHH 直接相连，即配体单元与回收单元之间无连接单元，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1)VL-CL；(2)VH-CH1-CH2-CH3-VHH；(3) VH-CH1-CH2-CH3-VHH；以及(4)VL-CL，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 23 中。

[38] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：配体单元为 scFv 形式，回收单元为 IgG 形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 C-末端；优选地，配体单元-回收单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1) VL-CL；(2) scFv-VH-CH1-CH2-CH3；(3) scFv-VH-CH1-CH2-CH3；以及(4)VL-CL，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 54 中。

[39] 在一些实施方案中，配体药物偶联物包含：回收单元为 scFv 形式，配体单元为 IgG 形式，所述回收单元直接或不直接地连接于所述配体单元的 N-末端；优选地，回收单元-配体单元从 N-末端到 C-末端的结构如下：(1) VL-CL；(2) scFv-VH-CH1-CH2-CH3；(3) scFv-VH-CH1-CH2-CH3；以及(4)VL-CL，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，示意图示于图 56 中。

[40] 在一些实施方案中，所述的配体单元和所述的回收单元之间直接相连或不直接相连。

[41] 在一些实施方案中，所述的配体单元和所述的回收单元之间含有连接单元。

[42] 在一些实施方案中，所述的配体药物偶联物进一步含有其他功能单元。

[43] 在一些实施方案中，所述的载荷通过所述的连接子偶联在所述配体单元和/或所述的回收单元和/或所述连接单元和/或所述的其他功能单元上。

[44] 在一些实施方案中，所述配体单元包括特异性结合肿瘤抗原的抗体或抗原结合片段、受体、多肽、寡肽、拟肽、融合蛋白或适配体（aptamer）。

[45] 进一步的，所述抗体包括且不限于单克隆抗体，双特异性抗体，多特异性抗体，纳米抗体（HcAb），免疫球蛋白新抗原受体（IgNAR）；所述抗原结合片段包括且不限于 scFv，Fab，Fab'，$F(ab')_2$，Fd，Fv，dAb，Fd，sdAb，VHH，Diabody；所述受体包括但不限于 T 细胞受体。

[46] 进一步的，所述抗体选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或进行人工改造的抗体。

[47] 进一步的，所述抗体进一步包括免疫球蛋白的恒定区。

[48] 更进一步的，所述免疫球蛋白选自人 IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4。

[49] 进一步的，所述肿瘤抗原或非肿瘤抗原包括但不限于 CD9、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD29、CD30、CD33、CD37、CD44、CD45、CD46、CD47、CD49b、CD51、CD52、CD56、CD73(NT5E)、CD79b、CD123、CD133、CD138、CD157、CD166、DLL-3、CDH6、Tissue factor、EpCAM、PSMA、MUC1、MUC16、FOLR1、GPC3、ROR1、ROR2、PD-L1、ENPP3、TDGF1、MSLN、TIM-1、LRRC15、LIV-1(ZIP6)、Claudin6、Claudin9、Claudin 18.2、Mesothelin、HER2(ErbB2)、HER3(ErbB3)、EGFR、c-MET、SLITRK6、KIT(CD117)、STEAP1、NaPi2B(SLC34A2)、SLC44A4、GPNMB、AXL、CD166、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、PTK7(CCK4)、EFNA4、5T4、NOTCH3、Nectin-4、TROP-2、GPR20、EphA2、LYPD3、FGFR2、FGFR3、FRα、CEACAMs、CAIX、P-cadherin(CDH3)、CDH17、GD3、Cadherin 6、LAMP1、FLT3、BCMA、SLTRK6、Lewis Y、ASCT2、CA-IX、Cripto、DPEP3、Globo H、Ly6E、RNF43、DR5、CDCP1、CEACAM6、FUT3、GD2、CD26E、CD70、CD74、CD163、PRLR、TNFα、CXCR4、LXR、IL-6、CEACAM5、GPRC5D、HLA-DR、CTLA4(CD152)、FAP α 或 IL2R。

[50] 进一步的，所述特异性结合肿瘤抗原或非肿瘤抗原的抗体包括但不限于阿仑单抗、喷替酸阿妥莫单抗、埃万妥单抗、阿替利珠单抗、伊尼妥单抗、anetumab、阿维鲁单抗、贝妥莫单抗、bermekimab、贝伐珠单抗、贝林妥欧单抗、维布妥昔单抗、卡妥索单抗、西米普利单抗、西妥昔单抗、clivatuzumab、达利珠单抗、达雷妥尤单抗、地舒单抗、达妥昔单抗 β、dostarlimab、度伐利尤单抗、依决洛单抗、维恩妥尤单抗、epcoritamab、依帕珠单抗、埃达珠单抗、genmab、格菲妥单抗、吉伦妥昔单抗、ibritumomab、inebilizumab、奥加伊妥珠单抗、伊匹木单抗、艾沙妥昔单抗、labetuzumab、loncastuximab、莫格利珠单抗、泰朗妥昔单抗、莫妥珠单抗、尼妥珠单抗、naratuximab、那西妥单抗、纳武利尤单抗、奥瑞利珠单抗、奥法妥木单抗、奥拉单抗、奥戈伏单抗、帕尼单抗、帕博利珠单抗、帕妥珠单抗、维泊妥珠单抗、racotumomab、ramucirumab、雷莫西尤单抗、利妥昔单抗、戈沙妥珠单抗、替妥木单抗、托珠单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、伏妥莫单抗、扎鲁木单抗、托西珠单抗或扎木单抗；以及上述抗体的抗原结合片段和衍生物；所述靶向结合特定抗原的多肽、寡肽、融合蛋白包括但不限于双环肽（bicycle）、血管肽-2、线性肽、pH 敏感肽、SOR-C27、A6 多肽、SOR13；以及上述多肽、寡肽或融合蛋白的变体和衍生物；所述靶向结合特定抗原的适配体包括 AS1411、sgc8、sgc4f、sgd5a、TC01、TD05、A9、A10、APT、Min.2、AIR-3A、E3、E07、Waz、P19、Zy1；以及上述适配体的变体和衍生物。特异性结合肿瘤抗原或非肿瘤抗原的抗体或抗原结合片段、受体片段或靶向结合特定抗原的多肽、寡肽、拟肽、融合蛋白或适配体（aptamer），可以根据针对的肿瘤抗原或非肿瘤抗原及结合需求，通过现有的筛选技术、或者人工设计及计算机辅助设计方式或人工智能协助开发方式获得。

[51] 进一步的，所述配体药物偶联物能够特异性结合所述的游离载荷，且所述的配体药物偶联物之间不发生分子凝集。

[52] 进一步的，所述的回收单元特异性结合所述的游离载荷。

[53] 更进一步的，所述的回收单元包括特异性结合所述的游离载荷的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体（aptamer）。

[54] 进一步的，所述特异性结合所述的游离载荷的抗体包括且不限于单克隆抗体，双特异性抗体，多特异性抗体，纳米抗体（HcAb），免疫球蛋白新抗原受体（IgNAR）；所述抗原结合片段包括且不限于 scFv，Fab，Fab'，$F(ab')_2$，Fd，Fv，dAb，Fd，sdAb，VHH，Diabody；所述受体包括且不限于 T 细胞受体。

[55] 进一步的，所述特异性结合所述的游离载荷的抗体选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或进行人工改造的抗体。

[56] 进一步的，所述的回收单元能够特异性结合所述的游离载荷是指所述的回收单元与所述的游离载荷的平衡解离常数 K_D（M）小于 10^{-4}，或更进一步的小于 10^{-5}，或更进一步的小于 10^{-6}，或更进一步的小于 10^{-7}，或更进一步的小于 10^{-8}，或更进一步的小于 10^{-9}，或更进一步的小于 10^{-10}，或更进一步的小于 10^{-11}，或更进一步的小于 10^{-12} 或更进一步的小于 10^{-13}。

[57] 进一步的，所述的回收单元不结合所述的配体药物偶联物中处于偶联状态的载荷或者与所述的配体药物偶联物中处于偶联状态的载荷具有较低的亲和力，所述较低的亲和力也可以实现所述的配体药物偶联物分子之间不发生分子凝集。

[58] 进一步的，所述的回收单元特异性地靶向所述的偶联的载荷单元上的非外露表位。

[59] 进一步的，所述的连接子或载荷上连接有能够阻止回收单元结合仍偶联在所述配体药物偶联物上的载荷的载荷表位遮蔽单元。

[60] 进一步的，所述的载荷表位遮蔽单元不影响所述的配体药物偶联物进入目标细胞后正常分离所述的载荷。

[61] 更进一步的，所述的回收单元为一个，两个或多个。

[62] 进一步的，所述回收单元包含：

（1） 选自以下氨基酸序列所限定的 CDR1-3 的 VHH 域：

如 SEQ ID NO:103、104 和 105 所示的 CDR1-3；

或者（2）选自如 SEQ ID NO:102 所示的氨基酸序列；

或者（3）选自包含如下限定的 VH 和 VL 组合的氨基酸序列：

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 4 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10 和 11 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 6、FAS 和 SEQ ID NO:13 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 4 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:16 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 20 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:22、23 和 24 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:26、WAS 和 SEQ ID NO:27 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29、30 和 31 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:33、KVS 和 SEQ ID NO:34 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29、36 和 37 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:33、KLS 和 SEQ ID NO:34 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:40、41 和 42 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:44、KVS 和 SEQ ID NO:45 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:47、48 和 42 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:50、KVS 和 SEQ ID NO:51 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:53、54 和 55 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:57、DTS 和 SEQ ID NO:58 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:62、63 和 64 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:66、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:69、70 和 71 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:73、WAS 和 SEQ ID NO:74 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:80、GAS 和 SEQ ID NO:81 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:83、84 和 85 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:87、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:89、90 和 91 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:93、HGT 和 SEQ ID NO:94 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:99、77 和 100 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:38 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:39 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:46 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:52 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:56 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:59 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:60 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:61 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:65 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:72 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:75 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:82 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:86 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:88 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:92 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:95 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:96 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:97 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:98 所示的 VL；

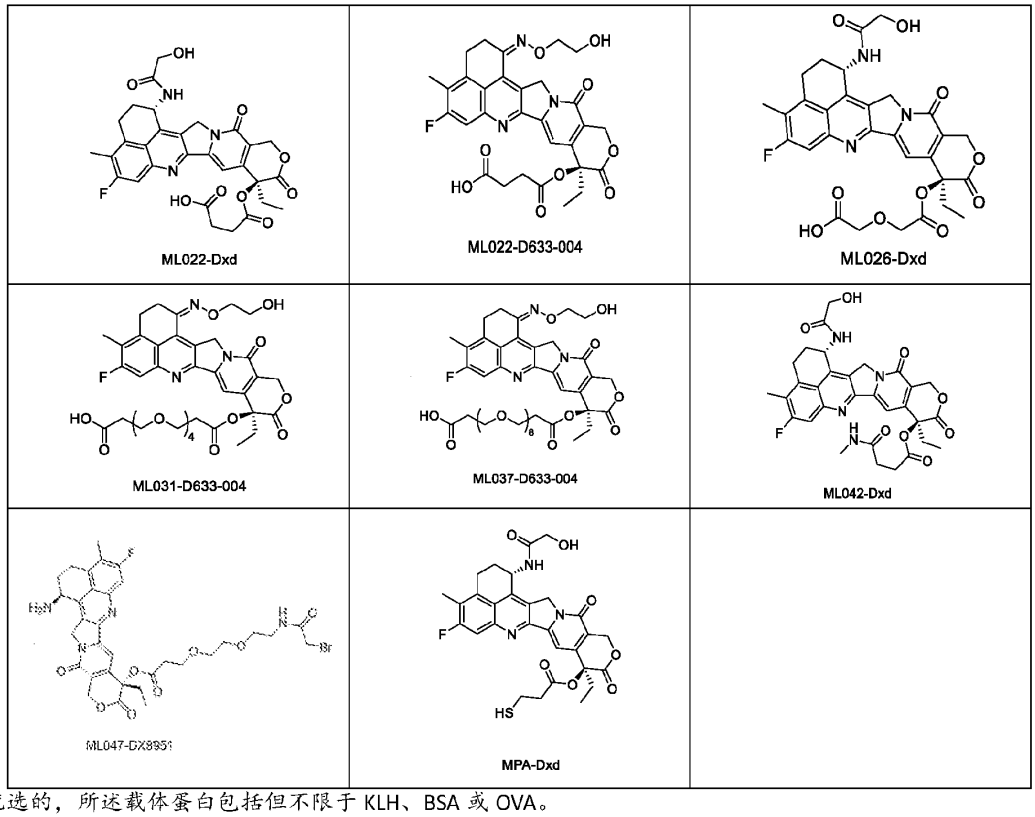
所述 CDR1、CDR2、CDR3 序列、所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 序列和所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 序列是基于 IMGT 定义方案获得的；

或者（4）包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128 或 SEQ ID NO:129 所限定的多肽；

或者（5）包含核苷酸序列如 SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:161 或 SEQ ID NO:162 所限定的适配体。

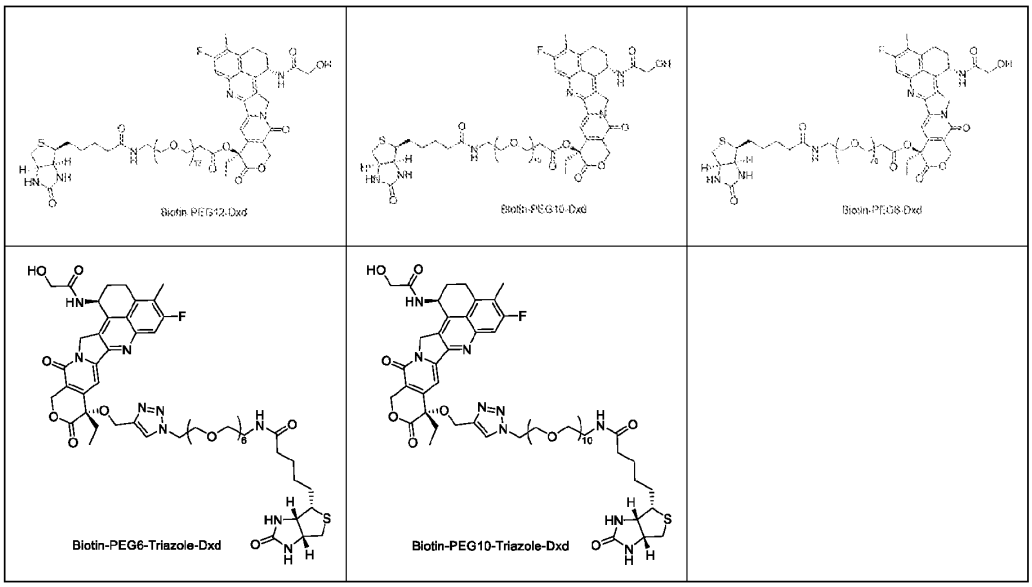
[63] 进一步的，所述回收单元为利用小分子药物和载体蛋白的偶联物或生物素-小分子药物偶联物免疫非人动物而获得；或者利用噬菌体展示技术筛选而获得；或者利用虚拟技术筛选而获得；或者利用 SELEX 技术筛选而获得；或者利用杂交瘤技术筛选而获得；或者利用纳米抗体筛选技术而获得；或者利用酵母展示技术而获得；或者利用单 B 细胞克隆技术而获得；或者利用微流控技术而获得；或者利用表面等离子共振辅助筛选技术获得。

[64] 进一步的，所述小分子药物包括但不限于 MMAE、MMAD、DM1、DM2、DM4、艾日布林、依沙替康（Exatecan）、SN38、DXD、卡奇霉素（calicheamicin）、吡咯并苯并二氮卓（PBD）、茚二啉苯并二氮卓（IBD）、倍癌霉素（duocarmycin）、鹅膏蕈碱（amanitin）、Maaa-1181a、紫杉醇（taxol）、柔红霉素（daunomycin）、长春碱（vinblastine）、阿霉素（Doxorubicin）、氨甲蝶呤、MMAF、ML022-Dxd、ML022-D633-004、ML026-Dxd、ML031-D633-004、ML037-D633-004、ML042-Dxd、ML047-DX8951、MPA-Dxd，



优选的，所述载体蛋白包括但不限于 KLH、BSA 或 OVA。

[65] 进一步的，所述生物素-小分子药物偶联物包括但不限于 Biotin-PEG12-Dxd、Biotin-PEG10-Dxd、Biotin-PEG6-Dxd、Biotin-PEG6-Triazole-Dxd 或 Biotin-PEG10-Triazole-Dxd：



。

[66] 进一步的，所述偶联的载荷包括细胞毒性分子、核酸、免疫刺激物和调节剂。

[67] 进一步的，所述载荷数量为一个，两个或多个。

[68] 进一步的，所述载荷数量为 1、2、3、4、5、6、7、8 个或者更多个。

[69] 进一步的，偶联 2 个或多个载荷时，所述载荷可以是相同的载荷或不同的载荷。

[70] 进一步的，所述载荷通过定点或随机偶联方式偶联至所述的配体单元和/或回收单元和/或连接单元和/或其他功能单元上。

[71] 更进一步的，所述细胞毒性分子包括但不限于微管蛋白抑制剂、DNA 抑制剂或其他毒素分子；所述 DNA 抑制剂进一步包括 DNA 损伤剂或拓扑异构酶 I 抑制剂。

[72] 更进一步的，所述微管蛋白抑制剂进一步包括但不限于奥瑞他汀类化合物（Auristatins）、美登素类衍生物（Maytansinoid Derivatives）、微管溶素（tubulysin）、软海绵素（halichondrin）、念珠藻素（Cryptophycins）、EG5 抑制剂。

[73] 更进一步的，所述奥瑞他汀类化合物进一步包括但不限于奥瑞他汀 F（AF）、单甲基奥瑞他汀 D（MMAD）、单甲基奥瑞他汀 E（MMAE）、单甲基奥瑞他汀 F（MMAF）；所述美登素类衍生物进一步包括但不限于 DM1、DM2、DM4；所述软海绵素进一步包括但不限于艾日布林（eribulin）。

[74] 更进一步的，所述 DNA 损伤剂进一步包括但不限于卡奇霉素（calicheamicin）类、吡咯并苯并二氮卓（PBD）类、茚二啉苯并二氮卓（IBD）类、倍癌霉素（duocarmycin）类；所述拓扑异构酶 I 抑制剂进一步包括但不限于喜树碱（camptothecin）类衍生物。

[75] 更进一步的，所述喜树碱类衍生物进一步包括但不限于依沙替康（Exatecan）、SN38、DXD。

[76] 更进一步的，所述其他毒素分子包括但不限于鹅膏蕈碱（amanitin）、Maaa-1181a、紫杉醇（taxol）、柔红霉素（daunomycin）、长春碱（vinblastine）、阿霉素（Doxorubicin）、氨甲蝶呤或其放射性同位素和/或可药用盐。

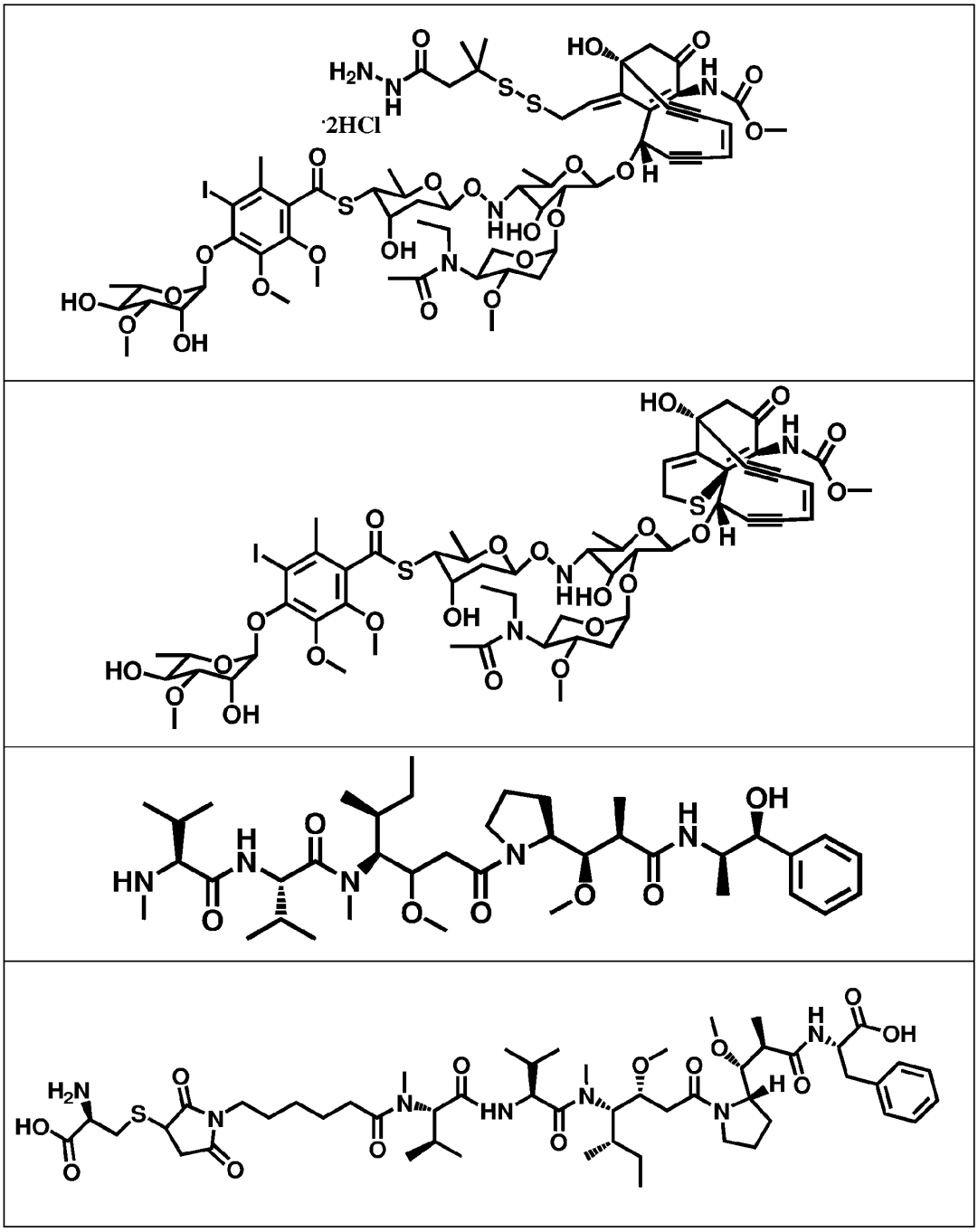
[77] 进一步的，所述偶联的载荷所使用的核酸包括但不限于反义核酸（ASO）、小干扰 RNA（siRNA）、微小 RNA（miRNA）、小激活 RNA（saRNA）、信使 RNA（mRNA） 、寡核苷酸（AOC）。

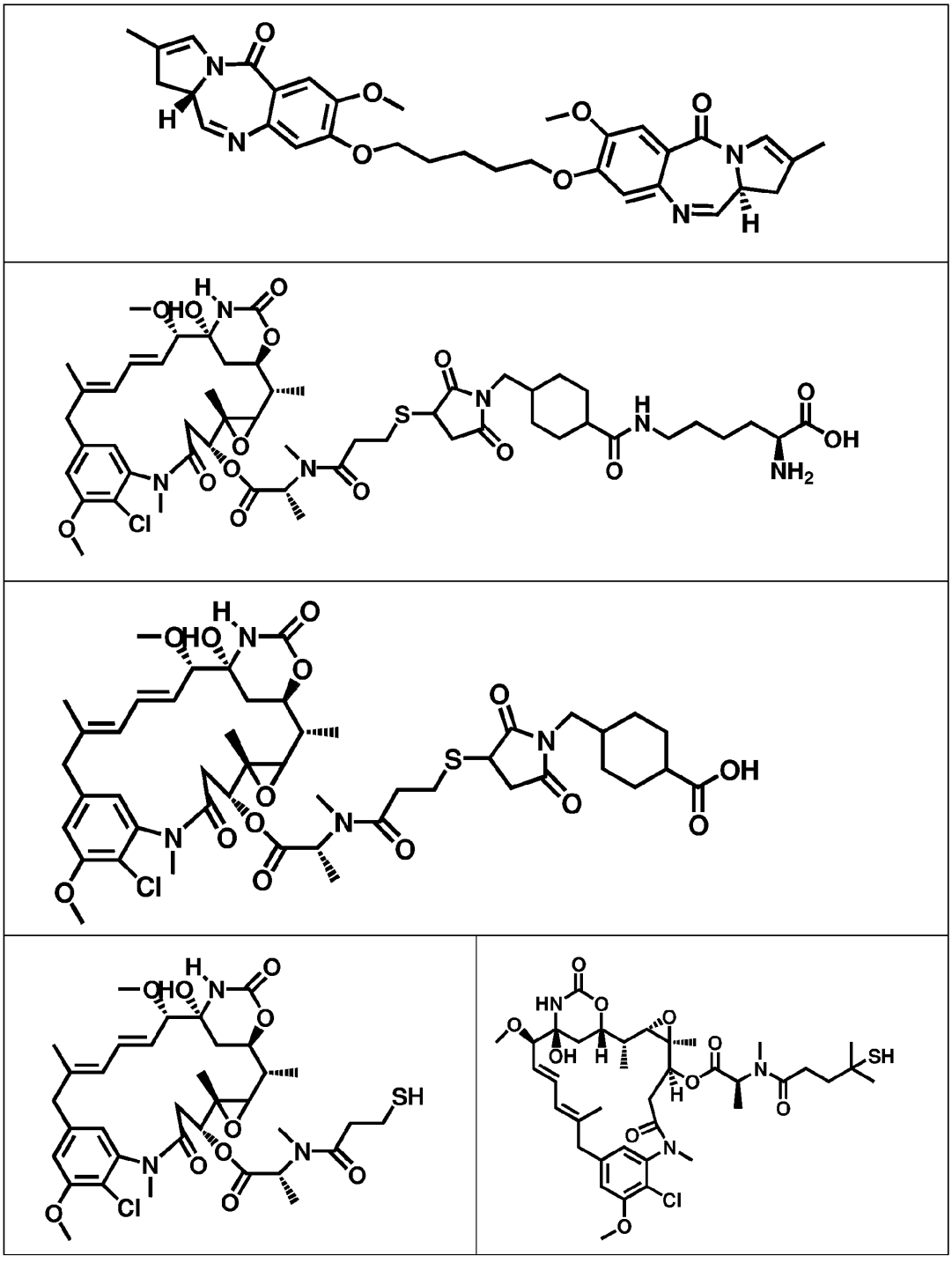
[78] 更进一步的，所述偶联的载荷所使用的核酸包括但不限于 DMPK siRNA、Exon-44-skipping PMO、DUX4 siRNA、Exon-51-skipping PMO、DMPK ASO、DUX4 ASO、CpG。

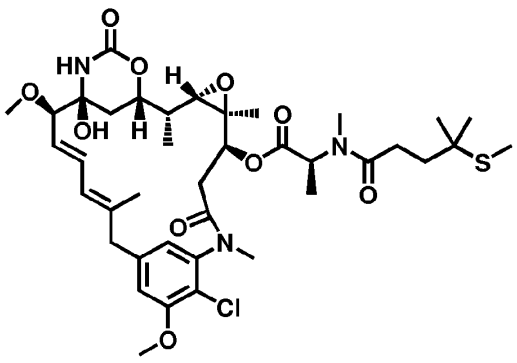
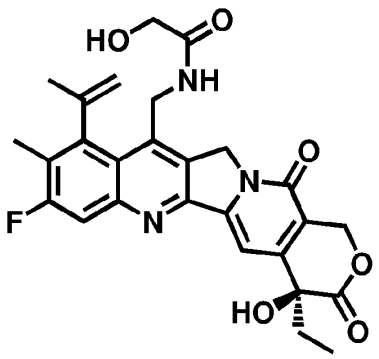
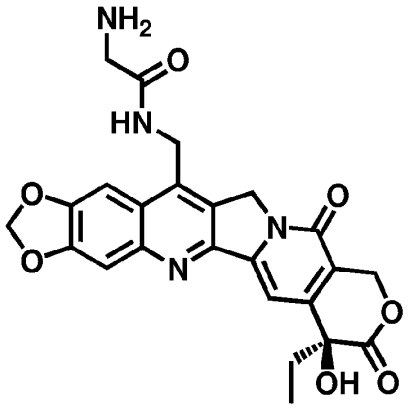
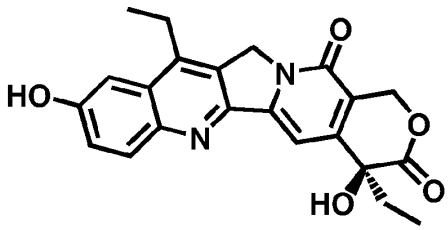
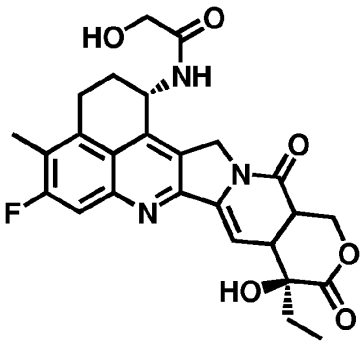
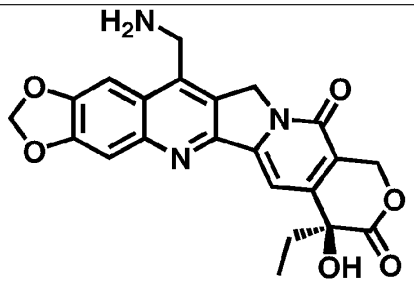
[79] 更进一步的，所述偶联的载荷所使用的免疫刺激物包括但不限于 TLR7 激动剂、TLR8 激动剂、TLR9 激动剂、TGF-β 抑制剂、TNIK 抑制剂、Sting 激动剂。

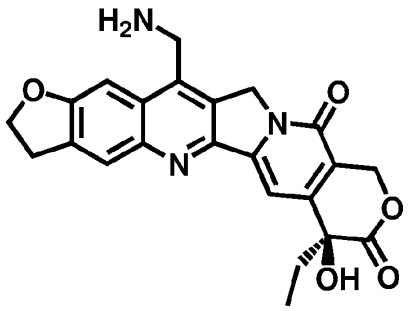
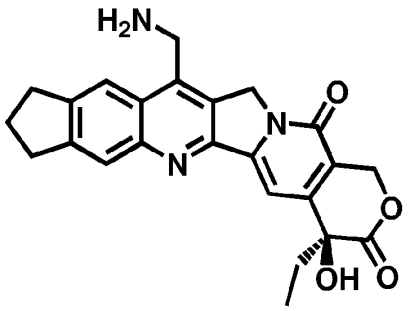
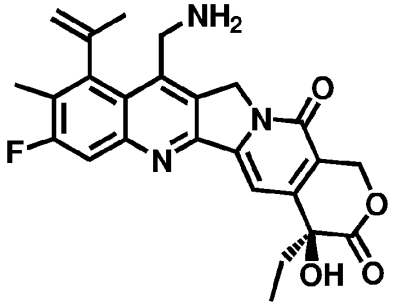
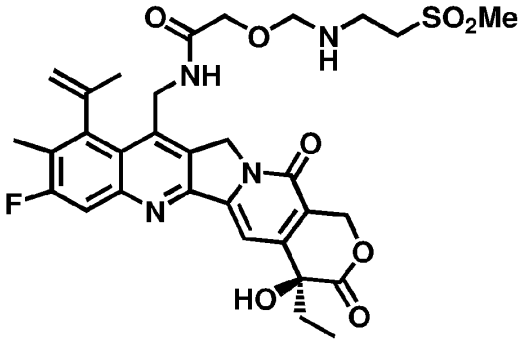
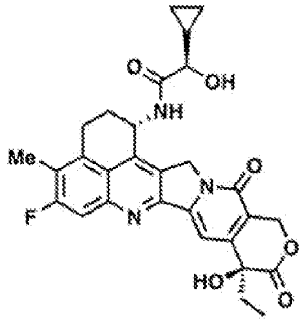
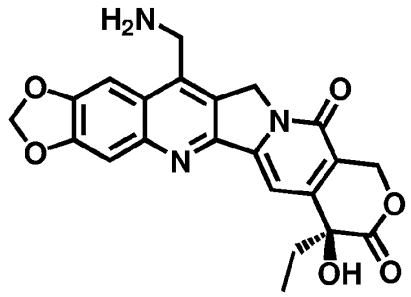
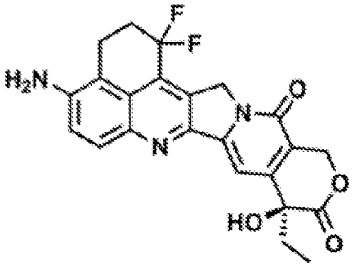
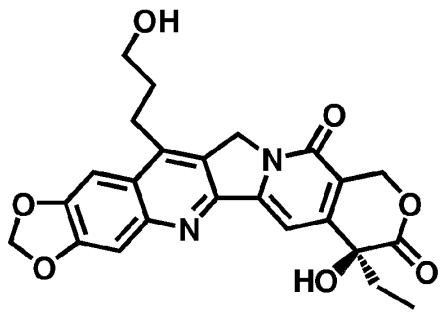
[80] 更进一步的，所述偶联的载荷所使用的调节剂包括但不限于糖皮质激素受体调节剂（如地塞米松、布地奈德、丙酸氟替卡松、糖皮质激素）、抗生素（如 rifalogue）、激酶抑制剂（如达沙替尼）、肝脏 X 受体（LXR）激动剂、磷酸二酯酶（PDE4）抑制剂、双磷酸盐（阿仑膦酸）。

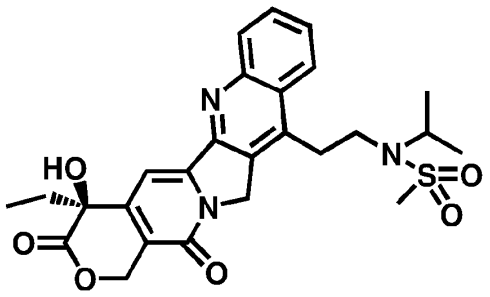
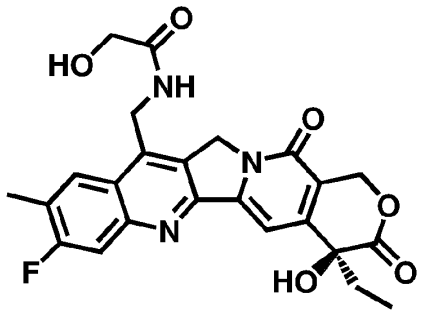
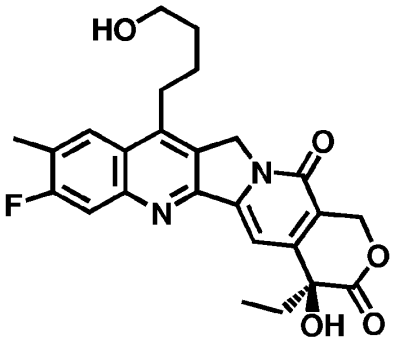
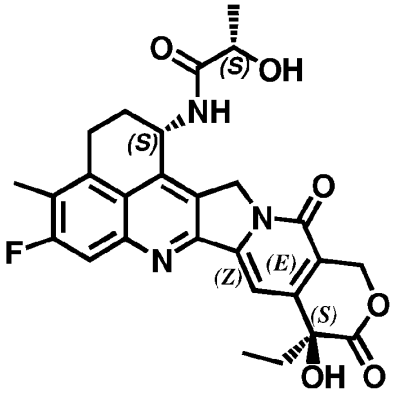
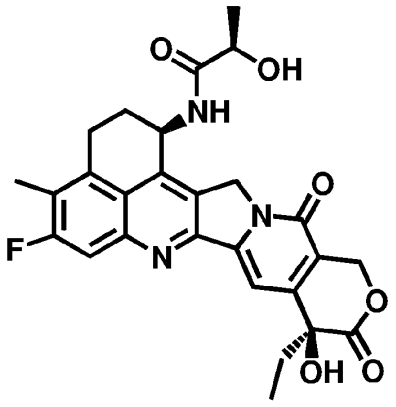
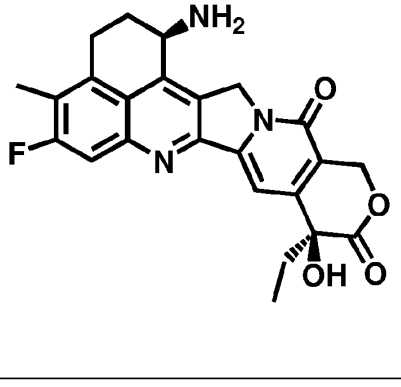
[81] 进一步的，所述游离载荷后的结构选自包含如下所示的结构或如下结构的同分异构体或氘代化物的组：

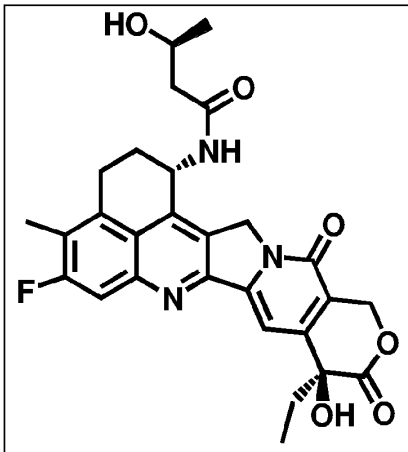
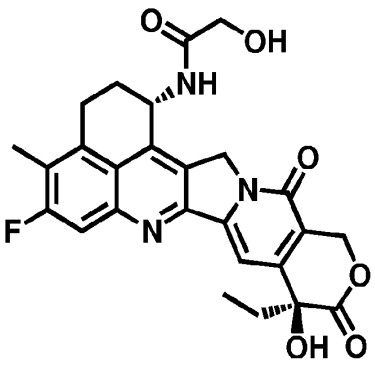
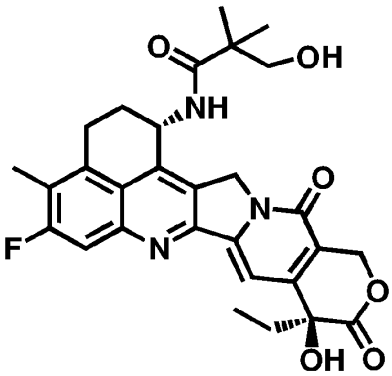
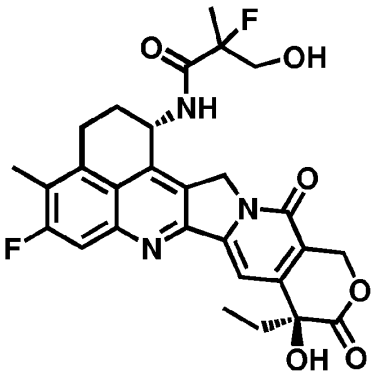
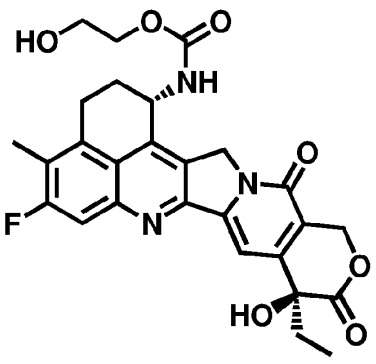
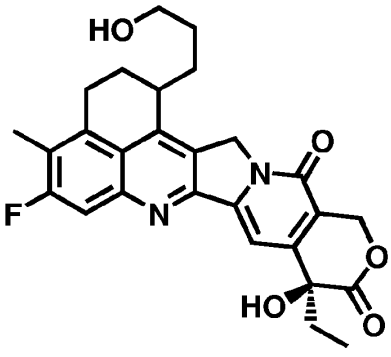


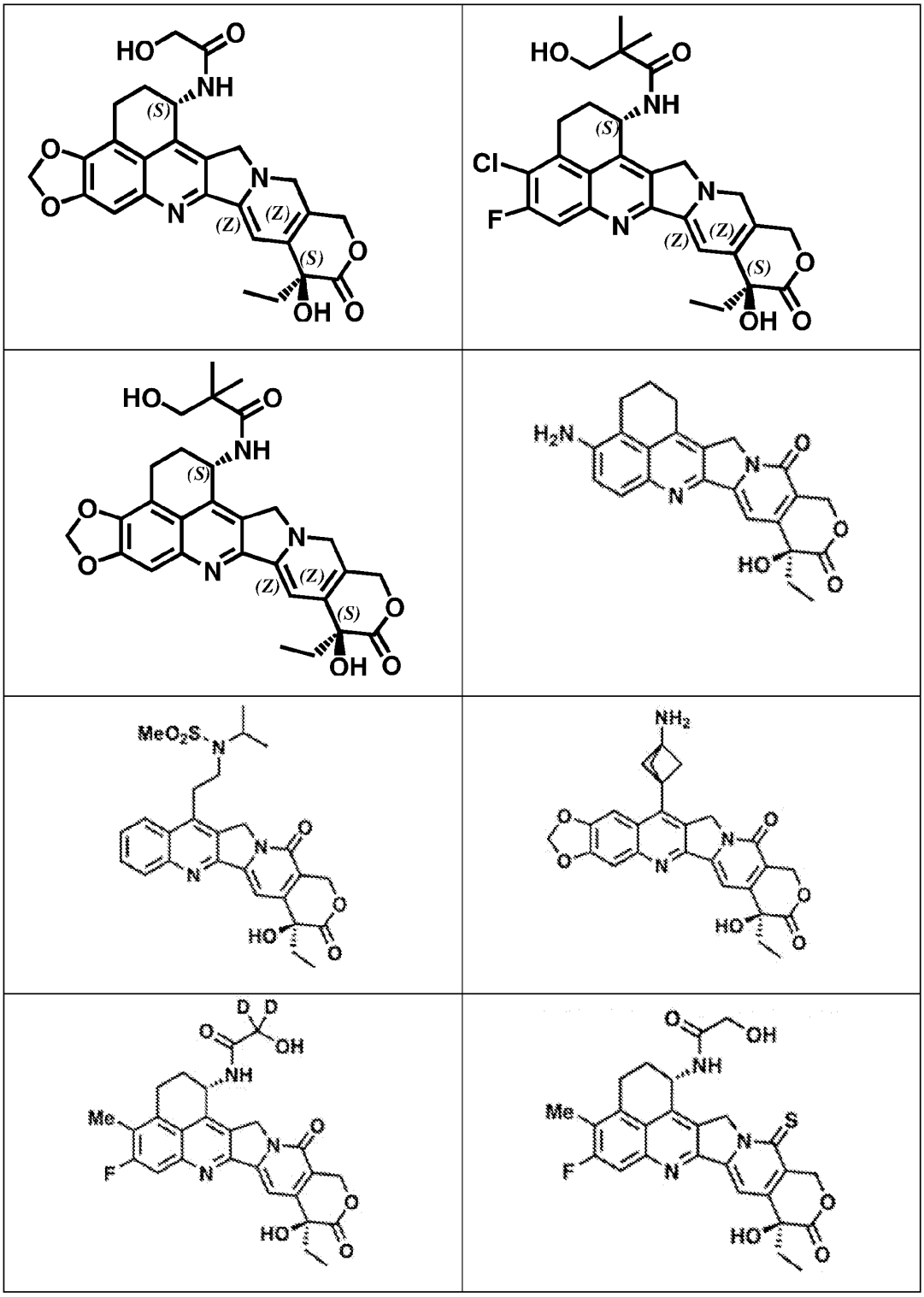




。

[82] 进一步的，所述的连接单元包括且不限于肽接头，Fc 域或其片段；优选肽接头为柔性肽接头；进一

步优选的肽接头包含一个或多个氨基酸；进一步优选的肽接头包含至少 5 个氨基酸；或者所述的肽接头的氨基酸序列包含：(GGGGS)n, (VPGXG)n, (SG)n, (EAAAK)n, (G)n, (R)n, A(EAAAK)n ALEA(EAAAK)nA, A(EAAAK)nA, (AP)n, VSQTSKLTRAETVFPDV, PLGLWA, RVLAEA, EDVVCCSMSY, GGIEGRGS, TRHRQPRGWE, AGNRVRRSVG, GFLG, LE，其中所述 n 等于 1、2、3 或 4。

[83] 另一方面，本发明提供了一种配体药物偶联物在药学上可接受的盐、氘代物、溶剂化物。

[84] 另一方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含本发明提供的配体药物偶联物或其在药学上可接受的盐、氘代物、溶剂化物以及药学上可接受的辅料。

[85] 另一方面，本发明提供了一种能够结合从配体药物偶联物上脱落下来的游离载荷的回收单元在制备自带游离载荷回收单元的配体药物偶联物上的应用。

[86] 进一步的，所述的回收单元包括特异性结合所述的游离载荷的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体（aptamer）。

[87] 进一步的，所述特异性结合所述的游离载荷的抗体包括且不限于单克隆抗体，双特异性抗体，多特异性抗体，纳米抗体（HcAb），免疫球蛋白新抗原受体（IgNAR）；所述抗原结合片段包括且不限于 scFv, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv, dAb, Fd, sdAb, VHH, Diabody；所述受体包括且不限于 T 细胞受体。

[88] 进一步的，所述特异性结合所述的游离载荷的抗体选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或进行人工改造的抗体。

[89] 进一步的，回收单元能够特异性结合所述的游离载荷是指所述的回收单元与所述的游离载荷的平衡解离常数 KD（M）小于 10^{-4}，或更进一步的小于 10^{-5}，或更进一步的小于 10^{-6}，或更进一步的小于 10^{-7}，或更进一步的小于 10^{-8}，或更进一步的小于 10^{-9}，或更进一步的小于 10^{-10}，或更进一步的小于 10^{-11}，或更进一步的小于 10^{-12}，或更进一步的小于 10^{-13}。

[90] 进一步的，所述的回收单元不结合所述的配体药物偶联物中处于偶联状态的载荷或者与所述的配体药物偶联物中处于偶联状态的载荷具有较低的亲和力，所述较低的亲和力也可以实现所述的配体药物偶联物分子之间不发生分子凝集。

[91] 进一步的，所述回收单元包含：

（1）选自以下氨基酸序列所限定的 CDR1-3 的 VHH 域：

如 SEQ ID NO:103、104 和 105 所示的 CDR1-3；

或者（2）选自如 SEQ ID NO:102 所示的氨基酸序列；

或者（3）选自包含如下限定的 VH 和 VL 组合的氨基酸序列：

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 4 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10 和 11 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 6、FAS 和 SEQ ID NO:13 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 4 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:16 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 20 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:22、23 和 24 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:26、WAS 和 SEQ ID NO:27 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29、30 和 31 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:33、KVS 和 SEQ ID NO:34 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29、36 和 37 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:33、KLS 和 SEQ ID NO:34 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:40、41 和 42 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:44、KVS 和 SEQ ID NO:45 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:47、48 和 42 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:50、KVS 和 SEQ ID NO:51 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:53、54 和 55 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:57、DTS 和 SEQ ID NO:58 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:62、63 和 64 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:66、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:69、70 和 71 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:73、WAS 和 SEQ ID NO:74 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:80、GAS 和 SEQ ID NO:81 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:83、84 和 85 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:87、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:89、90 和 91 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:93、HGT 和 SEQ ID NO:94 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:99、77 和 100 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:38 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:39 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:46 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:52 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:56 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:59 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:60 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:61 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:65 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:72 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:75 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:82 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:86 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:88 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:92 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:95 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:96 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:97 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:98 所示的 VL；

所述 CDR1、CDR2、CDR3 序列、所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 序列和所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 序列是基于 IMGT 定义方案获得的；

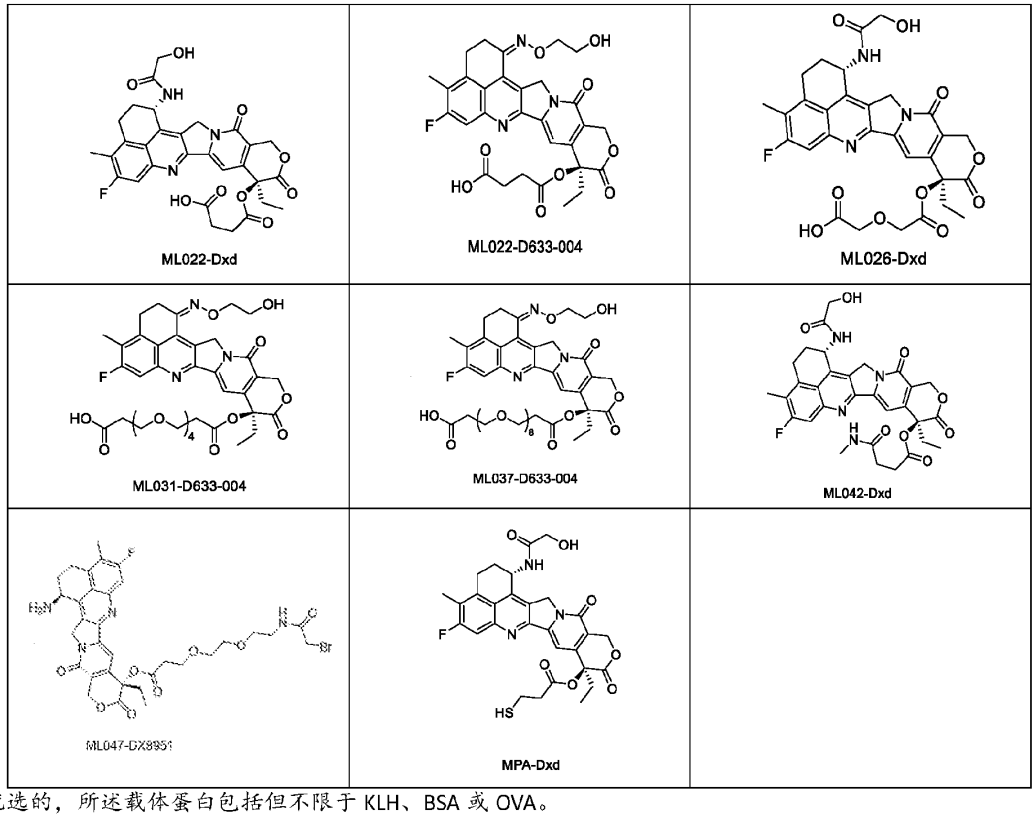
或者（4）包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128 或 SEQ ID NO:129 所限定的多肽；

或者（5）包含核苷酸序列如 SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:161 或 SEQ ID NO:162 所限定的适配体。

[92] 进一步的，所述回收单元为利用小分子药物和载体蛋白的偶联物或生物素-小分子药物偶联物免疫非人动物而获得；或者利用噬菌体展示技术筛选而获得；或者利用虚拟技术筛选而获得；或者利用 SELEX 技术筛选而获得；或者利用杂交瘤技术筛选而获得；或者利用纳米抗体筛选技术而获得；或者利用酵母展示

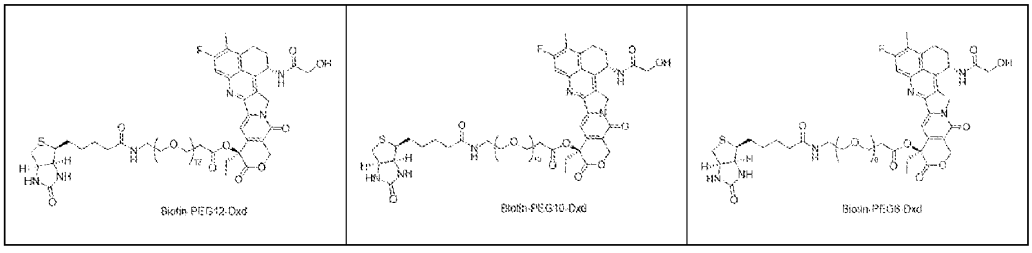
技术而获得；或者利用单 B 细胞克隆技术而获得；或者利用微流控技术而获得；或者利用表面等离子共振辅助筛选技术获得。

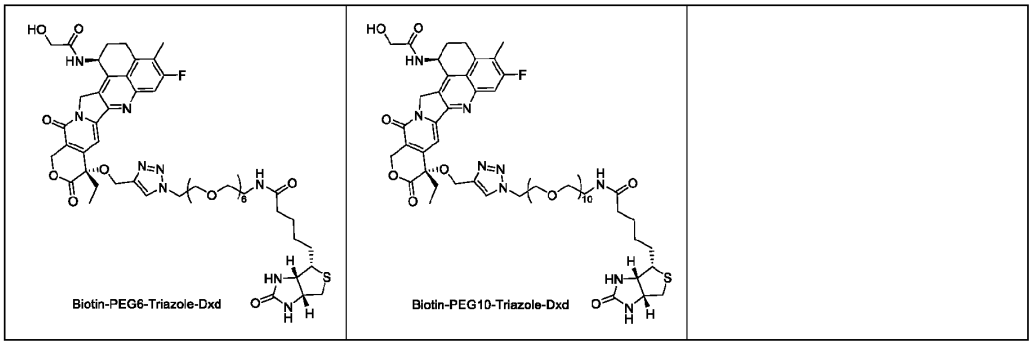
[93] 进一步的，所述小分子药物包括但不限于 MMAE、MMAD、DM1、DM2、DM4、艾日布林、依沙替康（Exatecan）、SN38、DXD、卡奇霉素（calicheamicin）、吡咯并苯并二氮卓（PBD）、茚二啉苯并二氮卓（IBD）、倍癌霉素（duocarmycin）、鹅膏蕈碱（amanitin）、Maaa-1181a、紫杉醇（taxol）、柔红霉素（daunomycin）、长春碱（vinblastine）、阿霉素（Doxorubicin）、氨甲蝶呤、MMAF、ML022-Dxd、ML022-D633-004、ML026-Dxd、ML031-D633-004、ML037-D633-004、ML042-Dxd、ML047-DX8951、MPA-Dxd，



优选的，所述载体蛋白包括但不限于 KLH、BSA 或 OVA。

[94] 进一步的，所述生物素-小分子药物偶联物包括但不限于 Biotin-PEG12-Dxd、Biotin-PEG10-Dxd、Biotin-PEG6-Dxd、Biotin-PEG6-Triazole-Dxd 或 Biotin-PEG10-Triazole-Dxd：





。

[95] 进一步的，所述的连接子或载荷上连接有能够阻止回收单元结合仍偶联在所述配体药物偶联物的载荷的载荷表位遮蔽单元。

[96] 进一步的，所述的载荷表位遮蔽单元不影响所述的配体药物偶联物进入目标细胞后正常分离所述的载荷。

[97] 本发明还提供了一种制备所述的配体药物偶联物的方法，其包含以下步骤：

1）筛选获得特异性结合所述载荷的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体；

2）将筛选得到的特异性结合所述载荷的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体作为回收单元制备配体药物偶联物；

3）检测所筛选到的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体是否结合所制备的配体药物偶联物，如果不结合，则获得目标配体药物偶联物；或者检测所筛选到的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体是否结合所制备的药物-连接子，如果不结合，则获得目标配体药物偶联物。

4）如果所筛选到的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体结合所制备的配体药物偶联物或者药物-连接子，或制备的配体药物偶联物之间发生分子凝集：

A. 进一步改构或替换回收单元中的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体，直至获得配体药物偶联物之间不发生分子凝集并不结合目标配体药偶联物；和/或

B. 筛选能连接到所述配体药物偶联物的连接子或载荷上的载荷表位遮蔽单元，所连接的载荷表位遮蔽单元将能阻止所述筛选到的抗体或其抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体结合所制备的抗体药物偶联物并且不会影响所述的配体药物偶联物进入到细胞后的载体正常释放，筛选到合适的载荷表位遮蔽单元后，制备得到目标配体药物偶联物。

[98] 本发明还提供了一种治疗或预防疾病的方法，包括向有需要的受试者施用预防或治疗有效量的所述的配体药物偶联物或其药学上可接受的盐、氘代物、溶剂化物或所述的药物组合物或其在药学上可接受的盐、氘代物、溶剂化物以及在药学上可接受的辅料。所述的疾病优选是肿瘤。

[99] 本发明还提供了一种所述的配体药物偶联物或其药学上可接受的盐、氘代物、溶剂化物或所制备的药物组合物在制备用于治疗或预防疾病的药物中的用途。

[100] 本发明还提供了一种用于筛选回收单元的免疫原。

[101] 进一步的，所述的免疫原包括但不限于 MMAF、ML022-Dxd、ML022-D633-004、ML026-Dxd、ML031-D633-004、ML037-D633-004、ML042-Dxd、ML047-DX8951、MPA-Dxd、Biotin-PEG12-Dxd、Biotin-PEG10-Dxd、Biotin-PEG6-Dxd、Biotin-PEG6-Triazole-Dxd、Biotin-PEG10-Triazole-Dxd 和与所述 MMAF、ML022-Dxd、ML022-D633-004、ML026-Dxd、ML031-D633-004、ML037-D633-004、ML042-Dxd、ML047-DX8951、MPA-Dxd 偶联载体蛋白得到的偶联物。

[102] 进一步的，所述的载体蛋白包括但不限于 KLH、BSA 或 OVA。

[103] 本发明还提供了一种可特异性结合配体药物偶联物游离载荷的载荷回收单元。进一步的，所述载荷回收单元包含：

（1）选自以下氨基酸序列所限定的 CDR1-3 的 VHH 域：

如 SEQ ID NO:103、104 和 105 所示的 CDR1-3；

或者（2）选自如 SEQ ID NO:102 所示的氨基酸序列；

或者（3）选自包含如下限定的 VH 和 VL 组合的氨基酸序列：

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 4 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10 和 11 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 6、FAS 和 SEQ ID NO:13 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 4 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:16 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 20 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:22、23 和 24 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:26、WAS 和 SEQ ID NO:27 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29、30 和 31 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:33、KVS 和 SEQ ID NO:34 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29、36 和 37 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:33、KLS 和 SEQ ID NO:34 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:40、41 和 42 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:44、KVS 和 SEQ ID NO:45 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:47、48 和 42 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:50、KVS 和 SEQ ID NO:51 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:53、54 和 55 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:57、DTS 和 SEQ ID NO:58 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:62、63 和 64 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:66、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:69、70 和 71 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:73、WAS 和 SEQ ID NO:74 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:80、GAS 和 SEQ ID NO:81 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:83、84 和 85 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:87、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:89、90 和 91 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:93、HGT 和 SEQ ID NO:94 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:99、77 和 100 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:38 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:39 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:46 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:52 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:56 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:59 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:60 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:61 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:65 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:72 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:75 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:82 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:86 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:88 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:92 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:95 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:96 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:97 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:98 所示的 VL；

所述 CDR1、CDR2、CDR3 序列、所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 序列和所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 序列是基于 IMGT 定义方案获得的；

或者（4）包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128 或 SEQ ID NO:129 所限定的多肽；

或者（5）包含核苷酸序列如 SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:161 或 SEQ ID NO:162 所限定的适配体。

[104] 本发明还提供了一种用于降低配体药物偶联物毒性的方法，进一步的，在患者接受配体药物偶联物治疗方法时，给予患者有效量的能够结合所述配体药物偶联物中游离载荷的所述的对应的载荷回收单元。

[105] 进一步的，所述的配体药物偶联物与所述的载荷回收单元可同时给药，也可序贯给药。

[106] 本发明还提供了一种包含编码所述的载荷回收单元中氨基酸序列的核酸。

[107] 本发明还提供了一种载体，进一步的，所述的载体包含所述的核酸。

[108] 本发明还提供了一种细胞，进一步的，所述的细胞包含所述的载体。更进一步的，所述的细胞选自 CHO 细胞、COS 细胞、HEK-293 细胞、NSO 细胞、PER.C6®细胞或 Sp2.0 细胞。

附图说明

[109] 图 1 配体药物偶联物示意图（配体单元为 IgG 形式，回收单元为特异性结合游离载荷的 VHH，六角星标志代表偶联的或游离的载荷，下同）

[110] 图 2 配体药物偶联物示意图（配体单元为 IgG 形式，回收单元为特异性结合游离载荷的 scFv）

[111] 图 3 配体药物偶联物示意图（配体单元为 IgG 形式，回收单元为特异性结合游离载荷多肽）

[112] 图 4 配体药物偶联物示意图（配体单元为 IgG 形式，回收单元为特异性结合游离载荷的适配体（aptamer））

[113] 图 5 配体药物偶联物示意图(配体单元为 VHH+Fc 形式,回收单元为特异性结合游离载荷的 VHH)

[114] 图 6 配体药物偶联物示意图(配体单元为 VHH+Fc 形式,回收单元为特异性结合游离载荷的 scFv)

[115] 图 7 配体药物偶联物示意图(配体单元为 VHH+Fc 形式,回收单元为特异性结合游离载荷的多肽)

[116] 图 8 配体药物偶联物示意图（配体单元为 VHH+Fc 形式，回收单元为特异性结合游离载荷的适配体）

[117] 图 9 配体药物偶联物示意图（配体单元为多肽形式，回收单元为特异性结合游离载荷的 VHH，示意图不代表载荷偶联在多肽的第一个氨基酸位点，可以偶联在多肽的任意适合位点，下同）

[118] 图 10 配体药物偶联物示意图（配体单元为多肽形式，回收单元为特异性结合游离载荷的 scFv）

[119] 图 11 配体药物偶联物示意图（配体单元为多肽形式，回收单元为特异性结合游离载荷的多肽）

[120] 图 12 配体药物偶联物示意图（配体单元为多肽形式，回收单元为特异性结合游离载荷的适配体）

[121] 图 13 配体药物偶联物示意图（配体单元为 VHH 形式，回收单元为特异性结合游离载荷的适配体）

[122] 图 14 配体药物偶联物示意图（配体单元为 scFv 形式，回收单元为特异性结合游离载荷的适配体）

[123] 图 15 配体药物偶联物示意图（配体单元为适配体形式，回收单元为特异性结合游离载荷的多肽）

[124] 图 16 配体药物偶联物示意图(配体单元为适配体形式,回收单元为特异性结合游离载荷的适配体)

[125] 图 17 配体药物偶联物示意图（配体单元为双特异性抗体形式，回收单元为特异性结合游离载荷的 VHH）

[126] 图 18 配体药物偶联物示意图（配体单元为双特异性抗体形式，回收单元为特异性结合游离载荷的 scFv）

[127] 图 19 配体药物偶联物示意图（配体单元为双特异性抗体形式，回收单元为特异性结合游离载荷的多肽）

[128] 图 20 配体药物偶联物示意图（配体单元为双特异性抗体形式，回收单元为特异性结合游离载荷的适配体）

[129] 图 21 配体药物偶联物回收单元特异性结合游离载荷示意图（配体单元为 IgG 形式，回收单元为特异性结合游离载荷的 VHH，载荷偶联在 VHH 上）

[130] 图 22 配体药物偶联物示意图（配体单元为 IgG 形式，回收单元为特异性结合游离载荷的 VHH，载荷偶联在 IgG 和 VHH 之间的连接单元上）

[131] 图 23 配体药物偶联物示意图（配体单元为 IgG 形式，回收单元为特异性结合游离载荷的 VHH，IgG 和 VHH 直接相连，即配体单元与回收单元之间无连接单元）

[132] 图 24 62、64 号嵌合抗体细胞保护实验结果

[133] 图 25 PP-1M-#60 和 PP-1M-#66 分子细胞保护活性

[134] 图 26 J4 号嵌合抗体细胞保护实验结果

[135] 图 27 DXD1-1、DXD1-2、DXD2-1、DXD2-2、DXD5、DXD8、DXD10 号抗体细胞保护实验结果

[136] 图 28 JLD1-JLD27 号抗体细胞保护实验结果

[137] 图 29 D2 等抗体细胞保护实验结果

[138] 图 30 PP-1X-#9 和 PP-1X-#17 分子细胞保护活性

[139] 图 31 86 号抗体特异性结合 DXD 实验结果

[140] 图 32 86 号抗体细胞保护实验结果

[141] 图 33 抗 MMAE 多肽+Fc 融合分子结构示意图

[142] 图 34 各分子与 OVA-MMAF、OVA 特异性结合实验结果

[143] 图 35 游离的 MMAE 竞争性结合多肽分子鉴定结果

[144] 图 36 抗 MMAE 多肽+VHH+Fc 融合分子结构示意图

[145] 图 37 PP-1A-#600 融合分子与 MMAE 的特异性结合验证

[146] 图 38 PP-1A-#600 融合分子细胞保护实验

[147] 图 39 抗 DXD 多肽+Fc 融合分子结构示意图

[148] 图 40 斑点印记实验结果

[149] 图 41 PP-1A 多肽细胞保护实验

[150] 图 42 融合分子与 OVA-MMAF 和 BSA-MMAF 特异性结合实验结果

[151] 图 43 PP-1B-#74 分子与 OVA-MMAF 和 BSA-MMAF 竞争 ELISA 实验结果

[152] 图 44 PP-1D 各分子与 BSA-MMAF 和 OVA-MMAF 特异性结合实验结果

[153] 图 45 抗体-适配体偶联物（靶向 MMAE）结构示意图

[154] 图 46 各分子与 OVA-DXD、OVA 或 BSA-DXD、BSA 特异性结合实验结果

[155] 图 47 各分子竞争 ELISA 结合实验结果

[156] 图 48 抗体-适配体偶联物（靶向 DXD）结构示意图

[157] 图 49 ELISA 结合实验结果

[158] 图 50 各分子对细胞保护效果实验（抑制 DXD 毒性）

[159] 图 51 PR-ADC 细胞毒性测试结果

[160] 图 52 PR-ADC 在人膀胱癌细胞 HT-1376 皮下移植瘤模型中的药效研究结果

[161] 图 53 PR-ADC 在人结肠癌细胞 RKO 皮下移植瘤模型中的药效研究

[162] 图 54 配体药物偶联物示意图（配体单元为 scFv 形式，回收单元为特异性结合游离载荷的 IgG，载荷偶联在 scFv 上）

[163] 图 55 双特异性抗体-连接子-药物（MMAE）结构示意图

[164] 图 56 配体药物偶联物示意图（配体单元为 IgG 形式，回收单元为特异性结合游离载荷的 scFv）

[165] 图 57 常规抗体药物偶联物示意图

[166] 图 58 双特异性抗体-连接子-药物（DXD）结构示意图

具体实施方式

[167] 在本申请中，术语“配体药物偶联物”是指可用于抑制肿瘤细胞或癌细胞的增殖并用于在患者中治疗癌症或用于治疗自身免疫性或炎症等疾病的一类药物。配体药物偶联物相应地用于多种环境中以治疗癌症、自身免疫性疾病或炎症等多种疾病。配体药物偶联物用来向肿瘤细胞、癌细胞或其他细胞递送药物。不受理论的束缚，在一些实施方案中，配体药物偶联物的配体单元将与肿瘤或非肿瘤靶点的相关抗原结合

或缀合，并且配体药物偶联物在肿瘤细胞、癌细胞或其他细胞内通过受体介导的内吞作用或其他内在化机制被吸收。在一些实施方案中，抗原连接到肿瘤细胞、癌细胞或其他细胞，或者可以是与肿瘤细胞、癌细胞或其他细胞相关的细胞外基质蛋白。一旦进入细胞中，经由活化单元的活化，载荷在细胞内释放。

[168] 在本申请中，术语“肿瘤”通常是指所有赘生性（neoplastic）细胞生长和增殖，无论是恶性的还是良性的，及所有癌前（pre-cancerous）和癌性细胞和组织。在本发明实施例中，所述肿瘤可以包括实体瘤和/或血液瘤。术语“癌症”，“癌性”，“细胞增殖性病症”，“增殖性病症”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。在一些实施方案中，肿瘤可以指含有多数癌细胞，例如显示本文中描述的任何癌症的特征细胞的肉体块。肿瘤的例子可包括任何上述类型的癌症的原发性肿瘤或自任何上述类型的癌症衍生的第二位点处的转移性肿瘤。

[169] 在本申请中，术语“肿瘤抗原”通常包括本领域已知的含义，其包括在肿瘤细胞上表达（或与肿瘤细胞发育相关）、已知或被认为对肿瘤细胞的致瘤特性有作用的任何分子。许多肿瘤抗原为本领域已知。一种分子是否为肿瘤抗原还可以根据本领域技术人员熟知的技术和测定法确定，例如克隆发生测定法（clonogenic assay）、转化试验、体外或体内肿瘤形成测定法、凝胶迁移测定法（gel migration assay）、基因敲除分析等。术语“肿瘤抗原”可以指人跨膜蛋白，即锚定在细胞脂双层中的细胞膜蛋白。

[170] 在本申请中，术语“配体单元”是指一类能够与生物分子（如蛋白质、核酸、受体等）特异性结合的小分子或大分子化合物。在本申请中，配体单元可以但不限于是特异性结合肿瘤抗原的抗体或抗原结合片段、受体、多肽、寡肽、拟肽、融合蛋白或适配体（aptamer）。

[171] 在本申请中，术语“载荷”是指可能引起细胞毒性的药物分子，例如，任何用于治疗肿瘤或癌症的分子都可以被使用，包括化合物、DNA、RNA、多肽、免疫刺激物等，也可以是天然药物（例如 天然地含有一个或多个允许共价连接至缀合物的官能团的药物），或者可以是化学修饰以掺入一个允许共价连接至相邻基团或部分的官能团（例如，选自羟基、羧基、氨基和硫醇基的基团）的药物），条件是修饰的药物具有药理学活性。

[172] 在本申请中，术语“游离载荷”是指配体药物偶联物进入人体后，从配体药物偶联物中脱落下来的含有载荷的分子部分，尤其是会对人体正常细胞带来损害的分子结构。

[173] 在本申请中，术语“偶联”是指将两个或多个分子通过化学键连接起来形成一个新的复合分子的过程，如共价键等。

[174] 在本申请中，术语“抗体”（也同义地称为“免疫球蛋白（Ig）”）。涵盖天然形式的抗体及人工筛选及构型改造或氨基酸突变的抗体，包括且不限于单克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、纳米抗体（重链抗体，HcAb）、免疫球蛋白新抗原受体（Immunoglobulin new antigen receptor，IgNAR）。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG（例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型），IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。

[175] 在本申请中，术语“抗原结合片段”是指抗体与抗原功能性结合的片段或片段组合，通常不含有 Fc 区域，例如 scFv，Fab，Fab'，$F(ab')_2$，Fd，Fv，dAb，Fd，sdAb，VHH，Diabody，鲨源免疫球蛋白新抗原受体可变区（Variable domain of immunoglobulin new antigen receptor，VNAR），其包含足以赋予该片段特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。可使用本领域技术人员已知的常规技术（例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法）从给定的抗体获得抗体的抗原结合片段（例如，上述抗体片段），并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

[176] 优选地，抗体是 IgG 蛋白，更优选地是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 蛋白。最优选地，所述抗体是 IgG1 蛋白。 抗体可以是人的或衍生自其他物种。 优选地，抗体是人抗体。抗体可以是单价抗体或双价抗体或多价抗体。天然形式的人 IgG，IgD 是由两条重链和两条轻链组成的 Y 形四聚体分子（二价），每个重链都有一个可变结构域 （VH） 和三个恒定结构域（CH1、CH2、CH3）。每个轻链都有一个可变区 （VL） 和恒定区（CL）。

[177] 在本申请中，术语“特异性结合”是指抗体或抗原结合片段等以高度选择性的方式与其靶抗原的相应表位结合而不与多种其他抗原结合。通常，抗体或抗原结合片段等以至少约 $1x10^{-4}$M 、10^{-5}M 、10^{-6}M 、10^{-7} M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M、10^{-12}M 或 10^{-13}M 的亲和力结合。

[178] 在本申请中，术语“多肽（peptide）”可以指完整的氨基酸序列编码的完整的蛋白或与其一部分。术语“寡肽”又称为“小肽”或“低聚肽”，是由少数几个氨基酸通过肽键连接而成的短链多肽。

[179] 在本申请中，术语“融合蛋白”是指一种通过基因工程技术将两个或多个蛋白质的编码基因连接起来，使得这些蛋白质在细胞内表达时能够形成一个单一的蛋白质分子。通常用于增强蛋白质的稳定性、改善其溶解性、提高表达效率或赋予蛋白质新的功能。本申请中的融合蛋白包括但不限于标签融合蛋白、结构域融合蛋白及多功能融合蛋白。

[180] 在本申请中，术语拟肽（peptidomimetics）是指一类模拟肽结构的化合物，它们具有与肽相似的化学或生物学特性，但不是天然的肽。它们可以模拟肽的二级结构（如 α-螺旋或 β-折叠），或者具有与特定生物靶标相互作用的能力。拟肽的分子结构可以包含非天然氨基酸、非肽键的连接方式，以及各种侧链修

饰。

[181] 在本申请中，术语“适配体（aptamer）”又称为“适体”，通常是指能够与多种目标物质高特异性、高选择性地结合的一种特殊的寡核苷酸片段，可以是 DNA、RNA 或 XNA（核酸类似物）序列，通常通过体外筛选技术——指数富集的配体系统进化技术（Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX）从核酸分子文库中获得，广泛应用于生物传感器、药物传送、疾病治疗及微生物检测。与传统的蛋白质探针相比，适配体具有合成容易、稳定性好、分子量及体积更小等优势，另外还有更好的热稳定性、易于修饰等特点。

[182] 在本申请中，术语“双特异性抗体”按其最广义使用，涵盖具有两个表位特异性的抗体，指抗体能够特异性结合至少两种不同的抗原性决定簇。通常，双特异性抗体包含两种抗原结合位点，其中每种特异于不同的抗原性决定簇。在某些实施方案中，所述双特异性抗体能够同时结合两种抗原性决定簇，特别是在两种不同的细胞上表达的两种抗原性决定簇。Kontermann RE, Brinkmann U. Bispecific antibodies. Drug Discov Today. 2015 Jul;20(7):838-47.及 Thakur A, Huang M, Lum LG. Bispecific antibody based therapeutics: Strengths and challenges. Blood Rev. 2018 Jul;32(4):339-347.的全部内容通过引用并于本文。

[183] 在本申请中，术语“多特异性抗体”按其最广义使用，涵盖具有两个或多个表位特异性的抗体，这些多特异性抗体包括但不限于：包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）的抗体，其中该 VH-VL 单元具有两个或多个表位特异性；具有两个或多个 VH 和 VL 区的抗体，每个 VH-VL 单元与不同的靶点或同一个靶点的不同表位结合；具有两个或更多个单可变区的抗体（例如 VHH），每个单可变区与不同的靶点或同一个靶点的不同的表位结合。

[184] 在本申请中，术语“较低的亲和力”是指回收单元与所述的配体药物偶联物中处于偶联状态的载荷的平衡解离常数 K_D（M）大于 10^{-7}。

[185] 在本申请中，术语“药学上可接受的”成分通常是指适用于人和/或动物而无过度不良副反应（如毒性、刺激和变态反应），即有合理的效益/风险比的物质。

[186] 在本申请中，术语“溶剂化物”通常是指一个或多个溶剂分子与本发明实施例的化合物的缔合物或配合物。形成溶剂化物的溶剂的非限制性实例包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

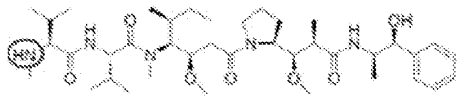
[187] 在本申请中，术语“同位素”通常包括具有相同原子数而不同质量数的原子。可掺入本发明实施例所述的化合物及其药学上可接受的盐中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素，例如，^{2}H、^{3}H、^{11}C、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{17}O、^{18}O、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{18}F、^{36}Cl、^{123}I 和 ^{125}I。

[188] 在本申请中，术语“非外露表位”有时也被称为“隐蔽表位”或“隐藏表位”。非外露表位是指来源于不一定经过抗原加工/呈递并且对免疫识别“隐藏”的癌症特异性抗原的表位。非外露表位通常以非常低的浓度出现在 APC 上，并且不缺失自反应性 T 细胞。非外露表位不被呈递用于被 T 细胞识别，除非其以异常高的浓度产生，或者除非其脱离了其天然抗原的构型。来源于癌症特异性抗原的隐性抗原表位可用于破坏 T 细胞对肿瘤的耐受性并诱导针对该肿瘤的有效免疫应答。这样的原理已经在 Pardoll, et al., PNAS, Vol.96, pp.5340-5342(1999)中进行了描述，其全部内容通过引用并于本文。

[189] 在本申请中，术语“治疗”指被设计用于改变临床病理学过程中治疗的个体或细胞的自然进程的临床干预。期望的治疗效果包括减小疾病进展速度、改善或缓解疾病状态、以及缓解或改善预后。例如，如果减轻或消除与治疗的疾病或病症（诸如癌症、炎症或自身免疫疾病等）相关联的一种或多种症状。

[190] 在本申请中，术语“有效量”是指足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

[191] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下面实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。



MMAE



MMAF

[192]

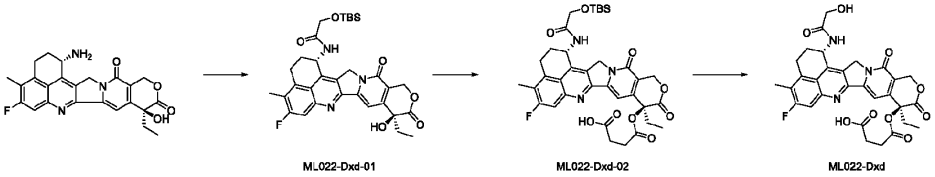
[193] MMAE 与 MMAF 结构如上所示，根据文献（Bordeau BM, Nguyen TD, Polli JR, Chen P, Balthasar JP. Payload-Binding Fab Fragments Increase the Therapeutic Index of MMAE Antibody-Drug Conjugates. Mol Cancer Ther. 2023 Apr 3;22(4):459-470.、Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Use of Payload Binding Selectivity Enhancers to Improve Therapeutic Index of Maytansinoid-Antibody-Drug Conjugates. Mol Cancer Ther. 2023 Nov 1;22(11):1332-1342.）的报道，因期望所筛选得到的抗 MMAE/MMAF 抗体的目标表位是结合左侧 N 端的

仲胺，且由于 MMAF 结构上的羧基基团更易于衍生及偶联，用于生成免疫原，偶联后并不影响 N 端的仲胺，因此本专利申请文本中部分实施例采用 MMAF 来代替 MMAE 构建免疫原，实验结果表明筛选得到的相关分子与 MMAF 有较强结合活性亦可理解为相关分子同样能够特异性结合游离的 MMAE。

具体实施例

实施例 1 免疫原的制备

实施例 1-1 ML022-Dxd 的合成

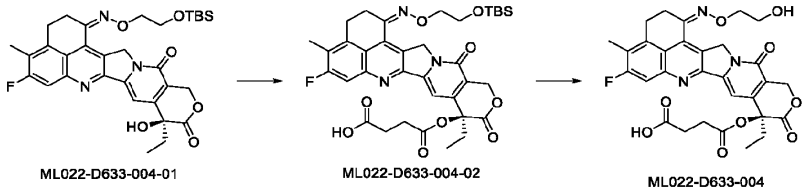


[194] 称取 2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙酸(393.84 mg，2.07 mmol)置于 25 mL 规格的单口瓶中，加入 10 mL 的 N,N-二甲基甲酰胺完全溶解，室温搅拌，依次称取 HATU（CAS#148893-10-1，786.86 mg，2.07 mmol）、N,N-二异丙基乙胺（364.72 mg，2.82 mmol）、伊喜替康甲磺酸盐（500 mg，0.94 mmol）加入反应体系中，室温反应。LC-MS 监测反应完成后，反相 Flash 制备纯化。得到目标产物 ML022-Dxd-01 430 mg，纯度 91.41%，产率 68.76%。ESI-MS(m/z)：608.75$[M+H]^+$。

[195] 称取 ML022-Dxd-01(300 mg，0.49 mmol)置于 25 mL 规格的单口瓶中，加入 10 mL 的二氯甲烷完全溶解，5℃搅拌，依次称取丁二酸酐（74.1 mg，0.74 mmol）、DBU（CAS #6674-22-2，150.3 mg，0.98 mmol）加入反应体系中，室温反应。LC-MS 监测反应完成后，正相柱层析纯化。得到目标产物 ML022-Dxd-02 196 mg，纯度 88.1%，产率 49.36%。ESI-MS(m/z)：708.81$[M+H]^+$。

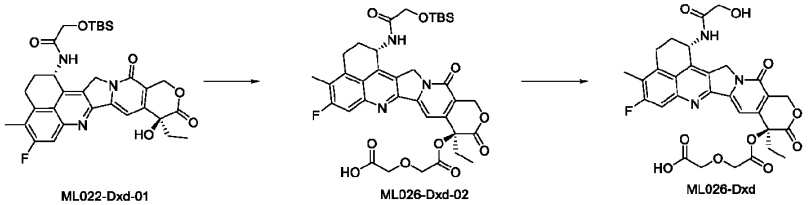
[196] 称取 ML022-Dxd-02（500 mg，0.7 mmol）置于 25 mL 规格的单口瓶中，加入 5 mL 的四氢呋喃和 5 mL 的水超声溶解，室温搅拌，向体系中滴加 3 mL 的甲酸室温反应。LC-MS 监测反应完成后，反相高压制备纯化。得到目标产物 ML022-Dxd 256 mg，纯度 97.64%，产率 59.62%。ESI-MS(m/z)：594.51$[M+H]^+$。

实施例 1-2 ML022-D633-004 的合成



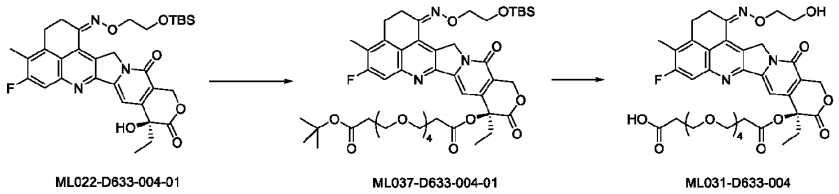
[197] 根据 ML022-Dxd 的合成步骤，第二步原料更换为 ML022-D633-004-01，得到目标产物 ML022-D633-004 19.94 mg。纯度 94.25%，产率 44.82%。ESI-MS(m/z)：594.65$[M+H]^+$。

实施例 1-3 ML026-Dxd 的合成



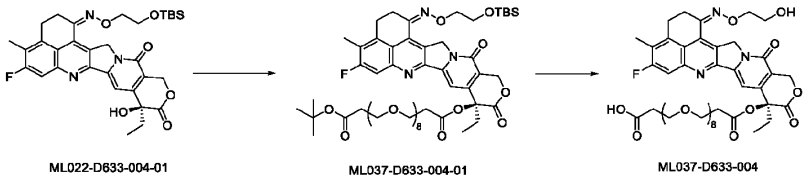
[198] 根据 ML022-Dxd 的合成步骤，第二步更换原料为二甘醇酐。得到目标产物 ML026-Dxd 60 mg，纯度 95.89%，产率 32.01%。ESI-MS(m/z)：610.22$[M+H]^+$。

实施例 1-4 ML031-D633-004 的合成



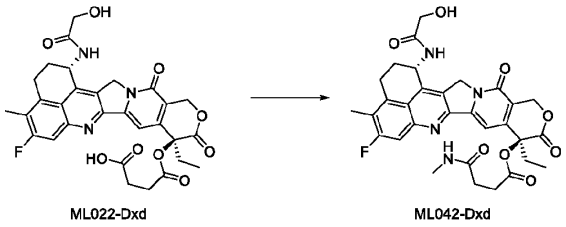
[199] 根据 ML022-D633-004 的合成步骤，第二步原料更换为羧酸-四聚乙二醇-丙酸叔丁酯，得到目标产物 ML031-D633-004 16.06 mg，纯度 95.72%，产率 24.38%。ESI-MS(m/z)：769.97[M+H]$^+$。

实施例 1-5 ML037-D633-004 的合成



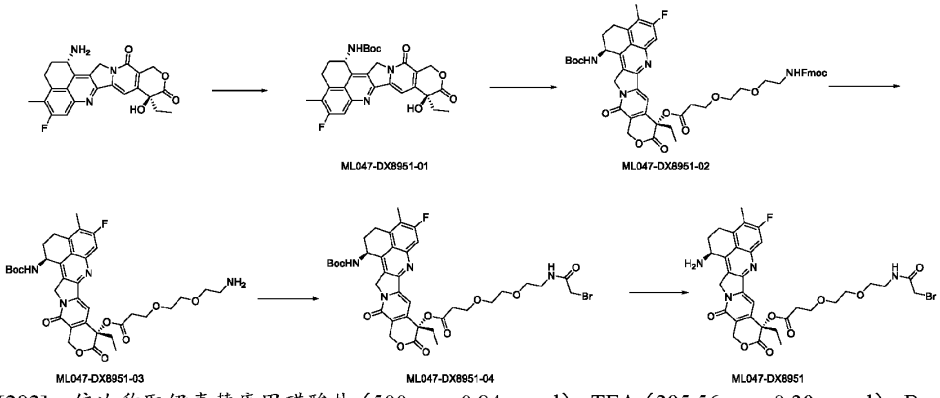
[200] 根据 ML022-D633-004 的合成步骤，第二步原料更换为羧基-八聚乙二醇-丙酸叔丁酯，得到目标产物 ML037-D633-004 14.41 mg，纯度 94.52%，产率 10.72%。ESI-MS(m/z)：947.37[M+H]$^+$。

实施例 1-6 ML042-Dxd 的合成



[201] 称取 ML022-Dxd(30 mg，0.54 mmol)置于 25 mL 规格的单口瓶中，加入 10 mL 的二氯甲烷完全溶解，室温搅拌，依次称取 HATU（21.14 mg，0.55 mmol）、N,N-二异丙基乙胺（9.8 mg，0.75 mmol）、甲胺盐酸盐(2.35 mg，0.75 mmol)加入反应体系中，室温反应。旋蒸除去溶剂，反相高压制备纯化。得到目标产物 ML042-Dxd 14.19 mg，纯度 93.75%，产率 43.39%。ESI-MS(m/z)：607.67[M+H]$^+$。

实施例 1-7 ML047-DX8951 的合成



[202] 依次称取伊喜替康甲磺酸盐（500 mg，0.94 mmol）、TEA（285.56 mg，0.28 mmol）、Boc 酸酐（410.59 mg，1.88 mmol）置于 100 mL 规格的单口瓶中，加入 50 mL 的二氯甲烷完全溶解，室温搅拌过夜。LC-MS 监测反应完成后，水洗，饱和食盐水洗，合并有机相，无水硫酸钠干燥，旋干。得到目标产物 ML047-DX8951-01 粗品 630 mg，直接投入下一步。ESI-MS(m/z)：535.95[M+H]$^+$。

[203] 称取 1-(9H-芴-9-基)-3-氧代-2,7,10-三氧杂-4-氮杂十三碳-13-酸（820.41mg，2.05 mmol）置于 100 mL

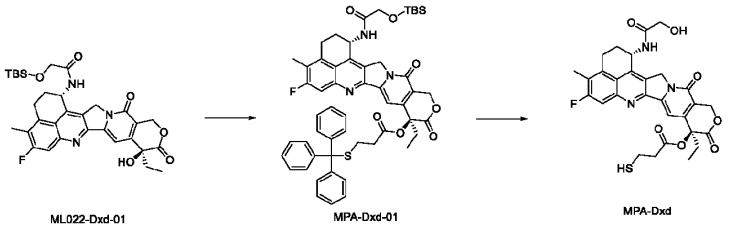
规格的单口瓶中，加入 50 mL 的二氯甲烷完全溶解，室温搅拌，依次称取 EDCI（CAS#25952-53-81.07 g，5.6 mmol）、DMAP（CAS#1122-58-3，684.3mg，5.8 mmol）、ML047-DX8951-01（1.0 g，1.87 mmol）加入反应体系中，室温反应。LC-MS 监测反应完成后，旋蒸除去溶剂,正向硅胶柱纯化。得到目标产物 ML047-DX8951-02 1.51 g，纯度 95.75%，产率 84.44%。ESI-MS(m/z)：918.47[M+H]$^+$。

[204] 称取 ML047-DX8951-02（200 mg，0.21 mmol）置于 25 mL 规格的单口瓶中，加入 10 mL 的二氯甲烷超声溶解，室温搅拌，向体系中滴加 3 mL 的二乙胺室温反应。LC-MS 监测反应完成后，旋蒸除去溶剂，二氯溶解,旋干,重复三次。得到目标产物 ML047-DX8951-03 粗品 150 mg,直接投入下一步。ESI-MS(m/z)：695.56[M+H]$^+$。

[205] 称取 ML047-DX8951-03 粗品（30 mg，0.043 mmol）置于 25 mL 规格的单口瓶中，加入 10 mL 的二氯甲烷超声溶解，室温搅拌，称取 2,5-Pyrrolidinedione, 1-(bromoacetyl)- (9CI) (28.5mg，0.12 mmol)加入上述体系。 LC-MS 监测反应完成后，水洗，饱和食盐水洗，合并有机相，旋干得到 ML047-DX8951-04 粗品 35 mg，直接投入下一步。ESI-MS(m/z)：815.96[M+H]$^+$。

[206] 称取 ML047-DX8951-04 粗品（30 mg，0.036 mmol）置于 25 mL 规格的单口瓶中，加入 5 mL 的二氯甲烷超声溶解，室温搅拌，向体系中滴加 2 mL 的 TFA（CAS#76-05-1）室温反应。LC-MS 监测反应完成后,反相高压制备纯化。得到目标产物 ML047-DX8951 3.13 mg,纯度 96.40%,产率 11.46%。ESI-MS(m/z)：715.75[M+H]$^+$。

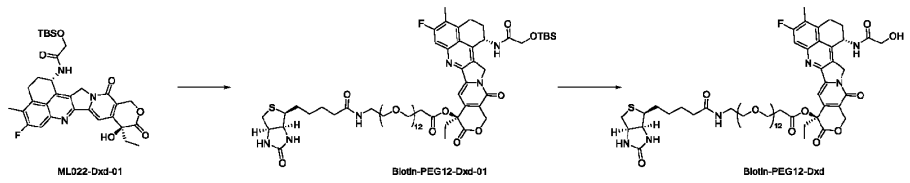
实施例 1-8 MPA-Dxd 的合成



[207] 称化合物 ML022-Dxd-01（270.12 mg，0.34 mmol）、3-(三苯甲硫基)丙酸（324.54 mg，0.68mmol）、DIC（162 μL，0.68mmol）、DMPA （27.41 mg，0.068 mmol）用 6 mL 二氯甲烷溶解。室温反应 4 h。向反应体系中加入 10 mL 纯化水，进行萃取，旋干有机相，得目标产物 MPA-Dxd-01 240.14 mg 粗品，收率 57.54%。ESI-MS(m/z)：938.36 [M+H]$^+$。

[208] MPA-Dxd-01 粗品用 7 mL 二氯甲烷复溶，加入 2 mL TFA 和 1 mL 三乙基硅烷。室温反应 18 h。经制备液相纯化后，得目标产物 MPA-Dxd 62.14 mg，收率 41.61%。ESI-MS(m/z): 582.16 [M+H]$^+$。

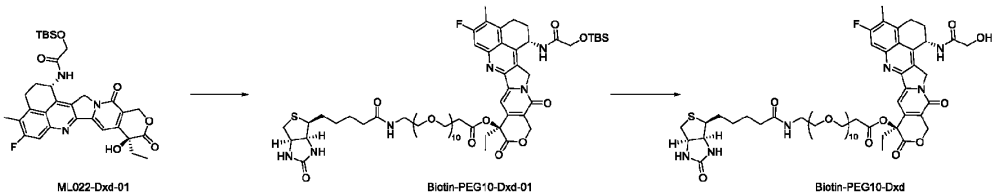
实施例 1-9 Biotin-PEG12-Dxd 的合成



[209] 依次称取生物素-聚乙二醇 12-羧基（27.78 mg，32.91μmol）、DCC（CAS#538-75-0, 13.58 mg，65.82μmol）、DMAP（2.01 mg，16.45μmol）置于 10 mL 规格的单口瓶中，加入 3 mL 的二氯甲烷和 3 mL 的四氢呋喃溶解，0℃搅拌。称取 ML022-Dxd-01（20 mg，32.91μmol）溶于 2 mL 的二氯甲烷中，滴加至上述体系中，室温反应。LC-MS 监测反应完成后，将反应液旋干，得到的 Biotin-PEG12-Dxd-01 粗品 50 mg 直接投入下一步。ESI-MS(m/z)：1434.34[M+H]$^+$。

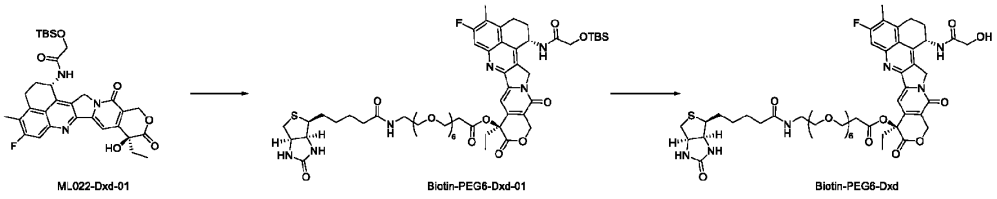
[210] 称取 Biotin-PEG12-Dxd-01 粗品（50 mg，0.28 mmol）置于 25 mL 规格的单口瓶中，加入 2 mL 的四氢呋喃和 2 mL 的水超声溶解，室温搅拌，向体系中滴加 1 mL 的甲酸室温反应。LC-MS 监测反应完成后，反相高压制备纯化。得到目标产物 Biotin-PEG12-Dxd 7.89 mg，纯度 95.88%，产率 35.74%。ESI-MS(m/z)：1319.94[M+H]$^+$。

实施例 1-10 Biotin-PEG10-Dxd 的合成



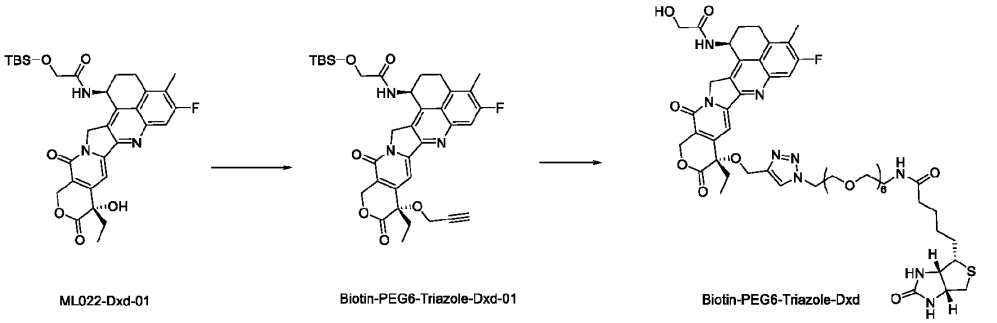
[211] 根据 Biotin-PEG12-Dxd 的合成路线，原料更换为生物素-聚乙二醇 10-羧基。得到目标产物 Biotin-PEG10-Dxd 16.6 mg，纯度 95.88%，产率 13.18%。ESI-MS(m/z)：1232.41$[M+H]^+$。

实施例 1-11 Biotin-PEG6-Dxd 的合成



[212] 根据 Biotin-PEG12-Dxd 的合成路线，原料更换为生物素-聚乙二醇 6-羧基。得到目标产物 Biotin-PEG6-Dxd 22.14 mg，纯度 95.91%，产率 24.51%。ESI-MS(m/z)：1056.98$[M+H]^+$。

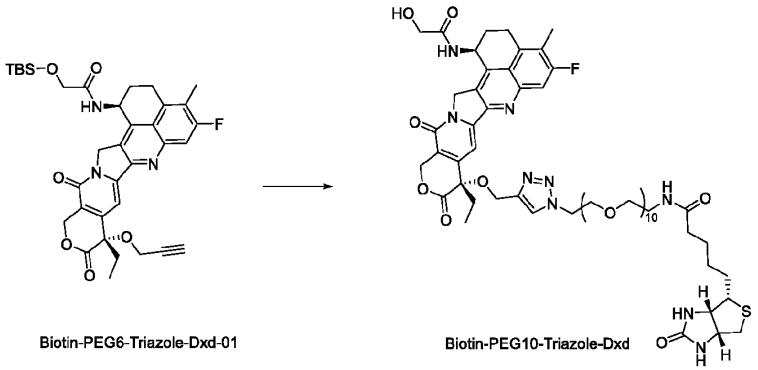
实施例 1-12 Biotin-PEG6-Triazole-Dxd 的合成



[213] 称取 NaH（31 mg）置于三口瓶中，用氩气置换并保护，降温至 0℃搅拌，缓慢滴加 ML022-Dxd-01（300 mg，0.5 mmol）的 N,N-二甲基甲酰胺（20 mL）的溶液,低温搅拌 30 分钟，缓慢滴加溴丙炔（91 mg）的 N,N-二甲基甲酰胺（10 mL）的溶液，低温搅拌并逐渐回室温。搅拌过夜。 体系经反相高压制备纯化。得到目标产物 Biotin-PEG6-Triazole-Dxd-01 23 mg 为粗品。ESI-MS(m/z)：646.21$[M+H]^+$。

[214] Biotin-PEG6- Triazole -Dxd-01（8 mg，12 μmol）用 2 mL 丙酮和 1 mL 水溶解，室温加入化合物 N3-PEG6-Biotin（7.5 mg，12 μmol）和五水硫酸铜（5 mg）。体系放置 10 ℃低温浴中搅拌。将含有维生素 C 钠（4 mg）的水溶液（1 mL）缓慢滴加至反应中。10 ℃搅拌 1 h。体系用乙腈（1 mL）淬灭。体系经制备液相纯化，得目标产物 Biotin-PEG6-Triazole-Dxd 3.85 mg。纯度 94.48%，收率 25%。ESI-MS(m/z)：1108.25$[M+H]^+$。

实施例 1-13 Biotin-PEG10-Triazole-Dxd 的合成



Biotin-PEG6-Triazole-Dxd-01 Biotin-PEG10-Triazole-Dxd

[215] 根据 Biotin-PEG6-Triazole-Dxd 的合成路线，第二步原料更换为 N3-PEG10-Biotin。得目标产物 Biotin-PEG10-Triazole-Dxd 2.77 mg，收率 15%。ESI-MS(m/z)：1329.09 $[M+H]^+$。

实施例 1-14 免疫偶联物（载体蛋白（BSA/OVA/KLH）-MMAF、载体蛋白（BSA/OVA/KLH）-ML022-Dxd、载体蛋白（BSA/OVA/KLH）-ML022-D633-004、载体蛋白（BSA/OVA/KLH）-ML031-D633-004）的合成

[216] 药物的活化过程：用 DMF 溶解分别溶解药物、EDC、NHS，用 EDC 和 NHS 对药物进行活化，室温下，600r/min，震荡反应活化 15min。

[217] 药物与载体蛋白（BSA/OVA/KLH）的偶联过程：用 PBS 溶解蛋白，向载体蛋白（BSA/OVA/KLH）体系中分别加入 10-30eq 的活化后的药物，调整浓度至 5mg/ml，室温下过夜反应。

[218] 换液与检测：反应结束后，用 PBS 缓冲液对反应体系进行充分换液，除去多余的小分子，样品进行 ELISA 检测偶联情况。

实施例 1-15 免疫偶联物（载体蛋白（BSA/OVA/KLH）-ML047-DX8951、载体蛋白（BSA/OVA/KLH）-MPA-Dxd）的合成

[219] 载体蛋白（BSA/OVA/KLH）的还原过程：将蛋白溶解至 20mM 硼酸，5mM 硼砂，pH 8.5 的体系中，向反应体系中加入 10%的 DTPA，5-20eq TCEP，室温下反应 2h。

[220] 药物与载体蛋白（BSA/OVA/KLH）的偶联过程：向上述反应体系中加入 5-20eq 的药物，室温下 600r/min，反应 3h。

[221] 换液与检测：反应结束后，将体系换液至 PBS 中，取适量样品进行 ELISA 检测偶联情况。

实施例 2 特异性结合 MMAE 的抗体筛选

[222] 表 1. 小鼠免疫方案-免疫原为 BSA-MMAF（由实施例 1-14 制备）

佐剂类别	弗氏佐剂	水溶性佐剂
具体方案	采用弗氏完全（首次免疫）或不完全佐剂乳化免疫原 40 μg 进行单次免疫。雌性小鼠每 2 周皮下注射一次。 两次免疫后进行第一次效价检测，第三次免疫后进行第二次效价检测，第四次免疫后进行第三次效价检测。	用 40 μg 的免疫原与佐剂按 1:1 比例混合进行单次免疫。雌性小鼠每 1 周皮下注射一次，第一次和第二次免疫间隔 10 天。 两次免疫后进行第一次效价检测，第三、四次免疫后进行第二次效价检测，第五次免疫后进行第三次效价检测。

[223] 表 2. 小鼠免疫方案-免疫原为 KLH-MMAF（由实施例 1-14 制备）

佐剂类别	弗氏佐剂	水溶性佐剂
具体方案	采用弗氏完全（首次免疫）或不完全佐剂乳化免疫原 40 μg 进行单次免疫。雌性小鼠每 2 周皮下注射一次。 三次免疫后进行第一次效价检测，随后进行第四次免	用 40 μg 的免疫原与佐剂按 1:1 比例混合进行单次免疫。雌性小鼠每 1 周皮下注射一次，第一次和第二次免疫间隔 10 天。 三次免疫后进行第一次效价检测，第四、五次免疫后

	疫。	进行第二次效价检测，随后进行第六次免疫。

实施例 2-1 结合 MMAE 的抗体筛选（第一轮）

[224] 杂交瘤的产生

[225] 使用 BSA-MMAF 进行小鼠免疫，每只小鼠（小鼠品系均为 CD1）每次注射 40 μg 免疫原，选择效价检测结果优异小鼠的脾细胞分别与 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 1:1 的比例在电融合的条件下进行融合，使用含有 20%FBS 的 HAT 培养基铺 96 孔细胞培养板，每只鼠铺板 30 块，培养 7 天后全部换 10% FBS 的 HT 培养基，培养 3 天后进行上清的 ELISA 检测。

[226] 杂交瘤初筛

[227] 包被 OVA-MMAF 浓度为 200ng/mL 到 ELISA 板上，37℃孵育 1h，5%脱脂奶粉封闭，37℃孵育 2h，取 100μL 杂交瘤上清到板中，37℃孵育 1h，加入 1:5000 稀释的 HRP-Goat Anti-mouse IgG△IgM，37℃孵育 1h 后 TMB 显色，于 450 nm 处检测 OD 值。并对阳性杂交瘤上清进行了负向筛选，筛选特异性结合 MMAE 而不结合 MMAE-Linker（结构为 MC-Val-Cit-PAB-MMAE）的杂交瘤：包被 OVA-MMAF 浓度为 200ng/mL 到 ELISA 板上，37℃孵育 1h，5%脱脂奶粉封闭，37℃孵育 2h，取 50μL 杂交瘤上清，分别加入 PBS、游离的 MMAE 以及维迪西妥单抗，37℃共孵育 1h，加入 1:5000 稀释的 HRP-Goat Anti-mouse IgG△IgM，37℃孵育 1h 后 TMB 显色，于 450 nm 处检测 OD 值。根据结果选择加入 PBS 组与加入维迪西妥单抗组读数相同且加入游离 MMAE 组数值较低的杂交瘤，认为其可以特异性结合游离的 MMAE 而不结合 MMAE-Linker，对其通过有限稀释法进行亚克隆，共亚克隆 500 余个板。共进行 24 只小鼠的融合筛选，初筛共检测杂交瘤 46000 余株，进行亚克隆 800 余板。

[228] 单克隆筛选

[229] 根据筛选阳性克隆的方法进行单克隆的筛选，将鼠源抗体的可变区搭载到人源恒定区上，最终得到了 160 余个嵌合抗体进行后续的分析。

[230] 嵌合抗体分析-亲和力分析

[231] ELASA 检测：包被 OVA-MMAF 浓度为 200ng/mL 到 ELISA 板上，37℃孵育 1h，5%脱脂奶粉闭，37℃孵育 2h，将抗体嵌合抗体进行梯度稀释，浓度为 10000、5000、2500、1250、625、125、25、5、1、0.1、0.01、0 ng/mL，取 100μL 加入到板中，37℃孵育 1h，加入 1：5000 稀释的 Goat Anti-Human IgG H&L (HRP) (abcam，ab6858)，37℃孵育 1h 后 TMB 显色，于 450 nm 处检测 OD 值。

[232] 实验结果表明（表 3），62、64 号嵌合抗体与 OVA-MMAF 的亲和力较高，优于 AB3320。

[233] 表 3.部分候选分子亲和力检测 EC50(ng/mL)值

抗体编号	2	3	4	8	9	14	62	64	68	ABC3320
EC50	178.8	407.4	314.5	282.1	365	6007	126.5	62.11	211.3	199.8

[234] Biacore 检测（与游离 MMAE 的结合亲和力）

[235] 抗体固定：用 ProA 的探针将 20μg/mL 的抗体固定到芯片表面；结合：抗原 MMAE 浓度为：50、16.7、5.5、1.85、0 nM 流速设定 30μL/min，接触时间为 600 s；解离：缓冲液 HEPES 冲洗 300 s。再生：10mM Glycine-HCl 进行再生。

[236] 实验结果表明（表 4），62 号嵌合抗体与游离的 MMAE 的亲和力较高，与 ABC3320 相当。

[237] 表 4. 部分候选分子亲和力检测

抗体编号	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)
ABC3320	1.00E+05	3.18E-05	3.18E-10
62	1.05E+05	7.78E-05	7.41E-10
1	5.35E+04	9.52E-05	1.78E-09
44	3.26E+05	5.80E-04	1.78E-09
89	6.16E+04	1.30E-04	2.11E-09
74	8.44E+04	1.80E-04	2.14E-09
69	7.02E+04	1.50E-04	2.14E-09
92	6.73E+04	1.79E-04	2.66E-09
93	8.57E+04	2.41E-04	2.81E-09

[238] 嵌合抗体分析-特异性分析：为了验证嵌合抗体是否特异性结合游离的 MMAE 而不结合 MMAE-Linker（即筛选出同时也不与 ADC 中偶联载荷结合的抗体），进行了嵌合抗体的竞争和阻断实验。

[239] 竞争实验：

1）包被 OVA-MMAF 浓度为 200ng/mL 到 ELISA 板上，37℃孵育 1h，5%脂奶粉封闭，37℃孵育 2h；2）将抗体按照 10000、5000、2500、1250、625、125、25、5、1、0.1、0.01、0 ng/mL 的终浓度进行稀释，同时将 MMAE 和 MMAE-Linker 稀释为终浓度为 5μM；

3）在 ELISA 板中分别加入 50μL PBS+50μL 嵌合抗体、50μL MMAE+50μL 嵌合抗体、50μL MMAE-Linker+50μL 嵌合抗体，每孔总体积为 100μL，37℃孵育 1h，孵育后倒掉反应液，用 PBST 洗板 3 次；

4）加入 1:5000 稀释的 Goat Anti-Human IgG H&L (HRP) (abcam，ab6858)，37℃孵育 1h 后 TMB 显色，于 450 nm 处检测 OD 值。

[240] 实验结果（表 5）表明，62、64 号嵌合抗体的竞争 EC50 值分别是 80.9 ng/mL、84.52 ng/mL，62、64 号嵌合抗体能够特异性结合游离的 MMAE 并且不结合 MMAE-Linker。

[241] 表 5. 62、64 号嵌合抗体及 ABC3320 的竞争 EC50(ng/mL)值

抗体编号 / ELISA 板加入成分	62	64	ABC3320
PBS+抗体	80.9	84.52	239.9
MMAE-Linker+抗体	231.3	147.8	331.4
MMAE+抗体	NA	NA	NA

[242] 注："NA"代表测得的 OD 值过低，因而计算的 EC50 值没有意义。

[243] 阻断实验：包被 OVA-MMAF 浓度为 200ng/mL 到 ELISA 板上，37℃孵育 1h，5%脱脂奶粉封闭，37℃孵育 2h，将抗体稀释终浓度为 100ng/mL，MMAE 和 MMAE-Linker 按 600、200、66.67、22.22、7.41、2.47、0.82、0.27、0.09、0.03、0.01nM 的浓度进行稀释，在 ELISA 板中分别加入 50 μL MMAE+50μL 嵌合抗体、50 μL MMAE-Linker+50μL 嵌合抗体，每孔总体积为 100μL，37℃孵育 1h，加入 1:5000 稀释的 Goat Anti-Human IgG H&L (HRP) (abcam，ab6858)，37℃孵育 1h 后 TMB 显色，于 450 nm 处检测 OD 值。根据实验结果（表 6），62、64 号嵌合抗体的阻断 IC50 值分别是 1.427 nM、4.762 nM。

[244] 表 6. 62、64 号嵌合抗体及 ABC3320 的阻断 IC50(nM)值

抗体编号 / ELISA 板加入成分	62	64	ABC3320
MMAE+抗体	1.427	4.762	1.367
MMAE-Linker+抗体	NA	NA	NA

[245] 嵌合抗体分析-细胞保护效果分析：OVCAR3 细胞铺板，5000 个/孔，24h 后弃上清加入抗体和游离的 MMAE，MMAE 终浓度为 69.5nM，抗体终浓度为 60、30、15、10、7.5、5、3.75、2.5μg/mL，50 μL MMAE+50 μL 嵌合抗体混合均匀加入 OVCAR3 细胞中培养 72h，加入 CellTiter-Meiluncell 发光法细胞活力检测试剂盒（美仑生物，PWL111），进行化学发光读数。

[246] 如图 24，实验结果表明，62 和 64 号嵌合抗体对 MMAE 的杀伤有较好的保护效果，与 ABC3320 相当。

[247] 综上，在上述候选分子中，62 号和 64 号嵌合抗体具有较佳的性能。

[248] 对 62 号和 64 号嵌合抗体分别进行测序，重链可变区（62H、64H）及轻链可变区（62L、64L）氨基酸序列如下所示：

[249] >62H（SEQ ID NO:1；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

EVQLQESGPGLVKSFQTVSLTCTVT**<u>GYSITNANHW</u>**WNWFRQVSGSKLEWIGY**<u>ISSSGTT</u>**DINPSLKSRFSI TRDTSKNQLFLQLNAVTTEDIATYFC**<u>VRTYYDGTYEEN</u>**WGPGTTLTVSS

[250] >62H 的 HCDR1（SEQ ID NO:2）

[251] GYSITNANHW

[252] >62H 的 HCDR2（SEQ ID NO:3）

[253] ISSSGTT

[254] >62H 的 HCDR3（SEQ ID NO:4）

[255] VRTYYDGTYEEN

[256] >62L（SEQ ID NO:5；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

DIVMTQTPKFLPVSAGDRVTMTCKAS**<u>QSVGNN</u>**VAWYQQKPGQSPKLLIY**<u>YAS</u>**NRYTGVPDRFTGSGSGT

DFTFTISSVQVEDLAVYFC**QQHYNSPWTFAGG**TKLEIK

[257] >62L 的 LCDR1（SEQ ID NO:6）

[258] QSVGNN

[259] >62L 的 LCDR2

[260] YAS

[261] >62L 的 LCDR3（SEQ ID NO:7）

[262] QQHYNSPWTFAGG

[263] >64H（SEQ ID NO:8；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
EVQLQESGPGLVKPSQTVSLTCTVT**GNSITNTNNW**WNWIRQVSGSKLEWIGY**ISSSGST**DSNPSLKSRISI
TRDTSRNQLFLQLKSVTPEDVATYYC**VRTYYDGSYEEN**WGQGTTLTVSS

[264] >64H 的 HCDR1（SEQ ID NO:9）

[265] GNSITNTNNW

[266] >64H 的 HCDR2（SEQ ID NO:10）

[267] ISSSGST

[268] >64H 的 HCDR3（SEQ ID NO:11）

[269] VRTYYDGSYEEN

[270] >64L（SEQ ID NO:12；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
DIVMTQTPKFLPVSARDRATMTCKAS**QSVGNN**VAWYQQKPGQSPKLLIY**FAS**KRYTGVPDRFTGRGSGT
DFTFTISSVQVEDLAVYFC**QQHYISPWT**FGGGTKLELK

[271] >64L 的 LCDR1（SEQ ID NO:6）

[272] QSVGNN

[273] >64L 的 LCDR2

[274] FAS

[275] >64L 的 LCDR3（SEQ ID NO:13）

[276] QQHYISPWT

[277] 62 号抗体的人源化序列设计

[278] 通过序列相似性的比对，选取与鼠源 62 号抗体相似度最高的抗体种系作为人源化模板，将重链和轻链的 CDR 分别替换掉模板的 CDR 区，随后根据人工智能预测的三维结构对影响抗体活性的关键氨基酸进行回复突变。具体人源化过程如下：

[279] （1）选取 IGHV4-30-4*01 和 IGHJ6*01 作为鼠源 62 号抗体的重链人源化模板，选取 Kappa 的 IGKV1-33*01 和 IGKJ4*01 作为鼠源 62 号抗体的轻链人源化模板，将鼠源 62 号抗体的重链或轻链 CDR 区替换掉人源化模板的 CDR 区，分别得到重链可变区序列 5759（SEQ ID NO:14）及轻链可变区序列 5764（SEQ ID NO:15）；

[280] （2）使用 WeMol 软件中的 ESMFold 模块对鼠源 62 号抗体的可变区进行结构预测，获得三维结构模型；

[281] （3）根据鼠源 62 号抗体的可变区结构，判断框架区中影响重链和轻链相互作用以及与 CDR 有相互作用的关键氨基酸，确定回复突变的氨基酸位点，分别得到重链可变区序列 5954（SEQ ID NO:17）及轻链可变区序列 6052（SEQ ID NO:18），二者组成 PP-1M-#60 分子；同时将重链 CDR3 中的潜在异构化位点 DG 进行翻译后修饰移除，得到重链可变区序列 6265（SEQ ID NO:19），与轻链可变区序列 6052（SEQ ID NO:18）组成 PP-1M-#66 分子。

[282] >5759（SEQ ID NO:14；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GYSITNANHW**WSWIRQPPGKGLEWIGY**ISSSGTT**YYNPSLKSRVT
ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC**VRTYYDGTYEEN**WGQGTTVTVSS

[283] >5759 的 HCDR1（SEQ ID NO:2）

[284] GYSITNANHW

[285] >5759 的 HCDR2（SEQ ID NO:3）

[286] ISSSGTT

[287] >5759 的 HCDR3（SEQ ID NO:4）

[288] VRTYYDGTYEEN

[289] >5764（SEQ ID NO:15；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQAS**QSVGNN**LNWYQQKPGKAPKLLIY**YAS**NLETGVPSRFSGSGSGTD
FTFTISSLQPEDIATYYC**QQHYNSPWT**FGGGTKVEIK

[290] >5764 的 LCDR1（SEQ ID NO:6）

[291] QSVGNN

[292] >5764 的 LCDR2

[293] YAS

[294] >5764 的 LCDR3（SEQ ID NO:16）

[295] QQHYNSPWT

[296] >5954（SEQ ID NO:17；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GYSITNANHW**WNWFRQPPGKGLEWIGY**ISSSGTT**DINPSLKSRVT

ISRDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYC**VRTYYDGTYEEN**WGQGTTVTVSS

[297] >5954 的 HCDR1（SEQ ID NO:2）

[298] GYSITNANHW

[299] >5954 的 HCDR2（SEQ ID NO:3）

[300] ISSSGTT

[301] >5954 的 HCDR3（SEQ ID NO:4）

[302] VRTYYDGTYEEN

[303] >6052（SEQ ID NO:18；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQAS**QSVGNN**VAWYQQKPGKAPKLLIY**YAS**NLYTGVPSRFSGSGSGTD
FTFTISSLQPEDIATYFC**QQHYNSPWTFAGG**TKVEIK

[304] >6052 的 LCDR1（SEQ ID NO:6）

[305] QSVGNN

[306] >6052 的 LCDR2

[307] YAS

[308] >6052 的 LCDR3（SEQ ID NO:7）

[309] QQHYNSPWTFAGG

[310] >6265（SEQ ID NO:19；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GYSITNANHW**WNWFRQPPGKGLEWIGY**ISSSGTT**DINPSLKSRVT
ISRDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYC**VRTYYDSTYEEN**WGQGTTVTVSS

[311] >6265 的 HCDR1（SEQ ID NO:2）

[312] GYSITNANHW

[313] >6265 的 HCDR2（SEQ ID NO:3）

[314] ISSSGTT

[315] >6265 的 HCDR3（SEQ ID NO:20）

[316] VRTYYDSTYEEN

[317] 人源化抗体构建及表达纯化

[318] 通过引物设计，将抗体的重链序列和轻链序列分别构建到表达载体上，利用 Expi293 细胞进行瞬时转染和表达。

[319] 人源化抗 MMAE 抗体的细胞保护实验

[320] 消化 NCI-H292 细胞，离心 1200rpm 5 分钟，弃去上清，用 1640+10%FBS 培养基重悬计数，调整至相应浓度，并按照 60μL 每孔加入 Corning 3610 板内，每孔 5000 细胞，37℃培养箱备用；

[321] 稀释抗体浓度(40μg/mL 或 20μg/mL, 2 倍稀释)，游离 MMAE 固定浓度在 10ng/mL，将 30μL MMAE 与 30μL 抗体 1: 1 加入铺有细胞的 3610 板内，总培养体系为 120μL，37℃培养箱培养 3 天；

[322] 将板子取出，室温平衡，每孔加入 100μL CellTiter-Glo® Luminescent Cell，混匀，室温避光静置 10min；

[323] 酶标仪上机检测 Luminescence values，计算公式为：%Cytoxicity=(Blank-Sample)/Blank*100%。

[324] 实验结果如图 25，结果表明 PP-1M-#60 和 PP-1M-#66 分子具有良好的细胞保护活性。

实施例 2-2 结合 MMAE 的抗体筛选（第二轮）

[325] 杂交瘤的产生

[326] 使用 KLH-MMAF 进行小鼠免疫，每只小鼠（小鼠品系为 CD1 与 Balb/c）每次注射 40μg 免疫原，选择效价检测结果优异小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 1:1 的比例在电融合的条件下进行融合，使用含有 20%FBS 的 HAT 培养基铺 96 孔细胞培养板，每只鼠铺板 30 块，培养 7 天后全部换 10% FBS 的 HT 培养基，培养 3 天后进行上清的 ELISA 检测。

[327] 杂交瘤初筛

[328] 包被 OVA-MMAF 浓度为 200ng/mL 到 ELISA 板上，37℃孵育 1h，3%BSA 封闭，37℃孵育 2h，取 100μL 杂交瘤上清到板中，37℃孵育 1h，加入 1:5000 稀释的 HRP-Goat Anti-mouse IgG△IgM，37℃孵育 1h 后 TMB 显色，于 450 nm 处检测 OD 值。并对阳性杂交瘤上清进行了负向筛选，筛选特异性结合 MMAE 而不结合 MMAE-Linker 的杂交瘤：包被 OVA-MMAF 浓度为 200ng/mL 到 ELISA 板上，37℃孵育 1h，3%BSA 封闭，37℃孵育 2h，取 50μL 杂交瘤上清，分别加入 300nM 游离的 MMAE 以及 300nM MMAE-Linker，37℃共孵育 1h，加入 1:5000 稀释的 HRP-Goat Anti-mouse IgG△IgM，37℃孵育 1h 后 TMB 显色，于 450 nm 处检测 OD 值。据结果选择 PBS 组与 MMAE-Linker 组读数均高且游离 MMAE 组数值较低的杂交瘤，认为其可以特异性结合游离的 MMAE 而不结合 MMAE-Linker，对其通过有限稀释法进行亚克隆，共亚克隆 38 板，检测杂交瘤 700 余株。

[329] 单克隆筛选

[330] 重复上述筛选方法进行单克隆的筛选，将鼠源抗体的可变区搭载到人源恒定区上，最终得到了 6 个嵌合抗体进行后续的分析。

[331] 嵌合抗体分析-特异性分析

[332] 竞争实验：实验步骤同上竞争实验，实验结果（表 7）表明，J4 号嵌合抗体的的竞争 EC50 值为 27.27 ng/mL，明显优于 ABC3320。

[333] 表 7. J4 号嵌合抗体及 ABC3320 的竞争 EC50(ng/mL)值

抗体编号 / ELISA 板加入成分	J4	ABC3320
PBS+抗体	27.27	239.9
MMAE-Linker+抗体	26.09	331.4
MMAE+抗体	NA	NA

[334] 阻断实验：实验步骤同上阻断实验，根据实验结果（表 8），J4 号嵌合抗体的阻断 IC50 值是 1.89 nM。

[335] 表 8. J4 号嵌合抗体及 ABC3320 的阻断 IC50(nM)值

抗体编号 / ELISA 板加入成分	J4	ABC3320
MMAE+抗体	1.89	1.367
MMAE-Linker+抗体	NA	NA

[336] 嵌合抗体分析-细胞保护效果分析：实验步骤同上细胞保护效果分析实验，实验结果如图 26，结果表明，J4 号嵌合抗体的细胞保护效果与 ABC3320 相当。

[337] 综上，在上述候选分子中，J4 号嵌合抗体具有较佳的性能。

[338] 对 J4 号嵌合抗体分别进行测序，重链可变区（J4H）及轻链可变区（J4L）氨基酸序列如下所示：

[339] ＞J4H（SEQ ID NO:21；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
EVQMQQSGAELVKPGASVKLSCKTS**GFTFSSSY**ISWLKQKPGQSLEWIAW**IYAGTGNT**NYNQKFAGRA
QLTVDTSSSTAYMQFSGLTTEDSAIYYC**SRDGYDGRSYDLDY**WGQGTSVTVSS

[340] >J4H 的 HCDR1（SEQ ID NO:22）

[341] GFTFSSSY

[342] >J4H 的 HCDR2（SEQ ID NO:23）

[343] IYAGTGNT

[344] >J4H 的 HCDR3（SEQ ID NO:24）

[345] SRDGYDGRSYDLDY

[346] ＞J4L（SEQ ID NO:25；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
DVVLTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS**QDVGTS**VAWYQQKPGQSPKLLIY**WAS**TRHTGVPDRFTGSGSGT
DFTLTIGNVQSEDLADYFC**QQFSTYPLT**FGGGTKLEIK

[347] >J4L 的 LCDR1（SEQ ID NO:26）

[348] QDVGTS

[349] >J4L 的 LCDR2

[350] WAS

[351] >J4L 的 LCDR3（SEQ ID NO:27）

[352] QQFSTYPLT

实施例 2-3 结合 MMAE 的抗体筛选（第三轮）

[353] 杂交瘤的产生

[354] 使用 KLH-MMAF 进行小鼠免疫，每只小鼠（小鼠品系均为 Balb/c）每次注射 40μg 免疫原，选择效价检测结果优异的小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 1:1 的比例在电融合的条件下进行融合，使用含有 20%FBS 的 HAT 培养基铺 96 孔细胞培养板，每只鼠铺板 30 块，培养 7 天后全部换 10% FBS 的 HT 培养基，培养 3 天后进行上清的 ELISA 检测。

[355] 杂交瘤初筛

[356] 包被 OVA-MMAF 浓度为 200ng/mL 到 ELISA 板上，37℃孵育 1h，3%BSA 封闭，37℃孵育 2h，取 100μL 杂交瘤上清到板中，37℃孵育 1h，加入 1：5000 稀释的 HRP-Goat Anti-mouse IgG△IgM，37℃孵育 1h 后 TMB 显色，于 450 nm 处检测 OD 值。并对阳性杂交瘤上清进行了负向筛选，筛选特异性结合 MMAE 而不结合 MMAE-Linker 的杂交瘤：包被 OVA-MMAF 浓度为 200ng/mL 到 ELISA 板上，37℃孵育 1h，3%BSA 封闭，37℃孵育 2h，取 50μL 杂交瘤上清，分别加入 300nM 游离的 MMAE 以及 300nM MMAE-linker，37℃共孵育 1h，加入 1：5000 稀释的 HRP-Goat Anti-mouse IgG△IgM，37℃孵育 1h 后 TMB 显色，于 450 nm 处检测 OD 值。根据结果选择加入 PBS 组与加入维迪西妥单抗读数相同且加入游离 MMAE 组数值较低的杂交瘤，认为其可以特异性结合游离的 MMAE 而不结合 MMAE-Linker，对其通过有限稀释法

进行亚克隆，共亚克隆 20 余个板，检测杂交瘤 400 余株。

[357] 单克隆筛选

[358] 重复上述筛选方法进行单克隆的筛选，将鼠源抗体的可变区搭载到人源恒定区上，最终得到了 10 个嵌合抗体进行后续的分析。

[359] 嵌合抗体分析-特异性分析

[360] 竞争实验：实验步骤同上竞争实验，实验结果（表 9）表明，92、93 号嵌合抗体的竞争 EC50 值分别为 30.63ng/mL 和 37.22ng/mL，明显优于 ABC3320。

[361] 表 9. 92、93 号嵌合抗体及 ABC3320 的竞争 EC50(ng/mL)值

抗体编号 / ELISA 板加入成分	92	93	ABC3320
PBS+抗体	30.63	37.22	161.4
MMAE-Linker+抗体	35.03	43.67	207
MMAE+抗体	NA	NA	NA

[362] 阻断实验：实验步骤同上阻断实验，根据实验结果（表 10），92、93 号嵌合抗体的阻断 IC50 值分别是 83.75nM、54.69nM。

[363] 表 10. 92、93 号嵌合抗体及 ABC3320 的阻断 IC50(nM)值

抗体编号 / ELISA 板加入成分	92	93	ABC3320
MMAE+抗体	83.75	54.69	1.9659
MMAE-Linker+抗体	NA	NA	NA

[364] 综上，在上述候选分子中，92 号和 93 号嵌合抗体具有较佳的性能。

[365] 对 92 号和 93 号嵌合抗体分别进行测序，重链可变区（92H、93H）及轻链可变区（92L、93L）氨基酸序列如下所示：

[366] >92H（SEQ ID NO:28；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS**GYTFTSYV**MHWVKQKPGQGLEWIGY**IIHYNDVT**KYNENFRGK
ATLTSDKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYC**TRSPYYYDGSFDY**WGQGTTLTVSS

[367] >92H 的 HCDR1（SEQ ID NO:29）

[368] GYTFTSYV

[369] >92H 的 HCDR2（SEQ ID NO:30）

[370] IIHYNDVT

[371] >92H 的 HCDR3（SEQ ID NO:31）

[372] TRSPYYYDGSFDY

[373] >92L（SEQ ID NO:32；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**QSIVHSNGNTY**LEWFLQKPGQSPKLLIY**KVS**NRFSGVPDRFSGS
GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC**FQGSHAPYT**FGGGTKLEIK

[374] >92L 的 LCDR1（SEQ ID NO:33）

[375] QSIVHSNGNTY

[376] >92L 的 LCDR2

[377] KVS

[378] >92L 的 LCDR3（SEQ ID NO:34）

[379] FQGSHAPYT

[380] >93H（SEQ ID NO:35；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS**GYTFTSYV**MHWVKQKPGQGLEWIGY**IIHYNDGT**KYNEKFRGK
ATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC**ARSPYYSDGSFDY**WGQGTTLTVSS

[381] >93H 的 HCDR1（SEQ ID NO:29）

[382] GYTFTSYV

[383] >93H 的 HCDR2（SEQ ID NO:36）

[384] IIHYNDGT

[385] >93H 的 HCDR3（SEQ ID NO:37）

[386] ARSPYYSDGSFDY

[387] >93L（SEQ ID NO:38；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**QSIVHSNGNTY**LEWFLQKPGQSPKLLIY**KLS**NRFSGVPDRFSGSG
SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC**FQGSHAPYT**FGGGTKLEIK

[388] >93L 的 LCDR1（SEQ ID NO:33）

[389] QSIVHSNGNTY

[390] >93L 的 LCDR2

[391] KLS

[392] >93L 的 LCDR3（SEQ ID NO:34）

[393] FQGSHAPYT

实施例 2-4 结合 MMAE 的抗体筛选（第四轮）

[394] 杂交瘤的产生

[395] 使用 BSA-MMAF 进行小鼠免疫，每只小鼠（小鼠品系为 CD1 和 Balb/c）每次注射 40μg 免疫原，选择效价检测结果优异的小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 1:1 的比例在电融合的条件下进行融合，使用含有 20%FBS 的 HAT 培养基铺 96 孔细胞培养板，每只鼠铺板 30 块，培养 7 天后全部换 10% FBS 的 HT 培养基，培养 3 天后进行上清的 ELISA 检测。

[396] 杂交瘤初筛

[397] 包被 OVA-MMAF 浓度为 200ng/mL 到 ELISA 板上，37℃孵育 1h，3%BSA 封闭，37℃孵育 2h，取 100μL 杂交瘤上清到板中，37℃孵育 1h，加入 1：5000 稀释的 HRP-Goat Anti-mouse IgG△IgM，37℃孵育 1h 后 TMB 显色，于 450 nm 处检测 OD 值。并对阳性杂交瘤上清进行了负向筛选，筛选特异性结合 MMAE 而不结合 MMAE-Linker 的杂交瘤。包被 OVA-MMAF 浓度为 200ng/mL 到 ELISA 板上，37℃孵育 1h，3%BSA 封闭，37℃孵育 2h，取 50μL 杂交瘤上清，分别加入 300nM 游离的 MMAE 以及 300nM MMAE-linker，37℃共孵育 1h，加入 1：5000 稀释的 HRP-Goat Anti-mouse IgG△IgM，37℃孵育 1h 后 TMB 显色，于 450 nm 处检测 OD 值。根据结果选择 PBS 组与维迪西妥单抗组读数均高且游离 MMAE 组数值较低的杂交瘤，认为其可以特异性结合游离的 MMAE 而不结合 MMAE-Linker，对其通过有限稀释法进行亚克隆。共亚克隆 50 余个板，检测杂交瘤 1000 余株。

[398] 单克隆筛选

[399] 重复上述筛选方法进行单克隆的筛选，将鼠源抗体的可变区搭载到人源恒定区上，最终得到了 23 个嵌合抗体进行后续的分析。

[400] 嵌合抗体分析-特异性分析

[401] 竞争实验：实验步骤同上竞争实验，实验结果（表 11）表明，132、133 号嵌合抗体的的竞争 EC50 值分别为 70.61ng/mL 和 34.84ng/mL，明显优于 ABC3320。

[402] 表 11. 132、133 号嵌合抗体及 ABC3320 的竞争 EC50(ng/mL)值

抗体编号 / ELISA 板加入成分	132	133	ABC3320
PBS+抗体	70.61	34.84	234.2
MMAE-Linker+抗体	163	140.6	395.5
MMAE+抗体	NA	NA	NA

[403] 阻断实验：实验步骤同上阻断实验，根据实验结果（表 12），132、133 号嵌合抗体的阻断 IC50 值分别是 1.318nM、1.593nM。

[404] 表 12. 132、133 号嵌合抗体及 ABC3320 的阻断 IC50(nM)值

抗体编号 / ELISA 板加入成分	132	133	ABC3320
MMAE+抗体	1.318	1.593	0.5729
MMAE-Linker+抗体	NA	NA	NA

[405] 综上，在上述候选分子中，132 号和 133 号嵌合抗体具有较佳的性能。

[406] 对 132 号和 133 号嵌合抗体分别进行测序，重链可变区（132H、133H）及轻链可变区（132L、133L）氨基酸序列如下所示：

[407] >132H（SEQ ID NO:39；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GFTFSAYY**MHWIRQTPEERLEWVAT**ISDGGSNT**YYPDSVKGRFII

SRDNAKNILYLQMSSLKSEDTAMYYC**ARDGGWLLYYFDY**WGQGTTLTVSS

[408] >132H 的 HCDR1（SEQ ID NO:40）

[409] GFTFSAYY

[410] >132H 的 HCDR2（SEQ ID NO:41）

[411] ISDGGSNT

[412] >132H 的 HCDR3（SEQ ID NO:42）

[413] ARDGGWLLYYFDY

[414] >132L（SEQ ID NO:43；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**QAIVQSNGETY**LEWYLQKSGQSPKLLIY**KVS**NRFTGVPDRFSGS
GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC**FQGSHVPWT**FGGGTKLEIK

[415] >132L 的 LCDR1（SEQ ID NO:44）

[416] QAIVQSNGETY

[417] >132L 的 LCDR2

[418] KVS

[419] >132L 的 LCDR3（SEQ ID NO:45）

[420] FQGSHVPWT

[421] >133H（SEQ ID NO:46；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GFIFSDHY**MYWVRQTPEKRLEWVAV**ISDGGTYT**NYPDSVKGRF
TISRDNAKNTLYLHIHSLKSEDTAMYYC**ARDGGWLLYYFDY**WGQGTTLTVSS

[422] >133H 的 HCDR1（SEQ ID NO:47）

[423] GFIFSDHY

[424] >133H 的 HCDR2（SEQ ID NO:48）

[425] ISDGGTYT

[426] >133H 的 HCDR3（SEQ ID NO:42）

[427] ARDGGWLLYYFDY

[428] >133L（SEQ ID NO:49；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
DVVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**QNIVQSDGNTY**LEWYLQKPGQSPKLLIY**KVS**NRFSGVPDRFSGSG
SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC**FQGSHLPWT**FGGGTKLEIK

[429] >133L 的 LCDR1（SEQ ID NO:50）

[430] QNIVQSDGNTY

[431] >133L 的 LCDR2

[432] KVS

[433] >133L 的 LCDR3（SEQ ID NO:51）

[434] FQGSHLPWT

实施例 3 特异性结合 DXD 的抗体筛选

实施例 3-1 结合 DXD 的抗体筛选（第一轮）

[435] 杂交瘤的产生与初筛

[436] 1）使用 KLH-DXD 进行小鼠免疫，每次注射 40 μg 免疫原，选择效价检测结果优异的 2 只小鼠（小鼠品系分别为 Balb/c 和 CD1）脾细胞分别与 SP2/0 骨髓瘤细胞通过电化学的方法进行融合，杂交瘤细胞铺 70 块 96 孔板在 HAT 培养基中进行培养，一周之后将培养基替换为 HT 培养基，待融合细胞生长至一定程度有抗体分泌之后进行阳性杂交瘤细胞的筛选。

[437] 2）选择 OD450 值大于 0.2 的细胞孔进行 ADC（结构如图 58，Ab-MC-GGFG-DXD）和游离 DXD 的负筛（取发酵液上清和定量的游离 DXD 或 ADC 进行共孵育，挑选 ADC 的孵育不会影响 OD450 读值而 DXD 的孵育使 OD450 读值变小的细胞孔。），获得 20 株阳性杂交瘤进行亚克隆，通过 ELISA 的方法进行单克隆筛选最终获得来自 7 个 pool 的杂交瘤进行序列钓取工作，得到的嵌合抗体分别编号为 DXD1-1、DXD1-2、DXD2-1、DXD2-2、DXD5、DXD8、DXD10。

[438] 嵌合抗体的表征

[439] 嵌合抗体初筛：利用 293F 细胞表达上述嵌合抗体，7 天后收取发酵液上清用 OCTET 进行定量。

[440] 每孔铺 5000 个 A549 细胞，24h 后加入发酵液上清（分别稀释至 10μg/mL 和 50μg/mL）和 DXD（100 nM）进行共孵育，72h 后检测细胞活率，初步筛选具有 DXD 保护作用的发酵液进行纯化和亲和验证。

[441] 实验结果如图 27，结果表明初步筛选具有细胞保护作用的抗体是 DXD5、DXD8。

[442] 将前期初筛具备保护作用的嵌合抗体纯化后用 ELISA 进行抗体与 OVA-DXD 的结合活性检测：将 500ng/mL 的 OVA-DXD 在 37℃包被 2h 至 96 孔板中，利用 PBST 洗两次后加入 5%的奶粉在 37℃封闭 2h，用 PBST 洗板两次后将抗体浓度按 20000，10000，5000，2500，1250，625，125，25，5，0.5，0.05ng/mL 进行稀释，将稀释过的抗体加入 96 孔板中放置在 37℃孵育 1h，用 PBST 洗板两次后加入 Anti-mouse IgG

HRP 于 37℃孵育 1h，用 PBST 洗板三次后加入 TMB 显色液，待显色至一定程度后加入 2M H_2SO_4 通过酶标仪进行读数。EC50 值详见表 13，与 OVA-DXD 结合活性较佳的嵌合抗体有 DXD1-1、DXD5 及 DXD8。

[443] 表 13. 嵌合抗体与 OVA-DXD 结合 EC50(μg/mL)值

抗体编号	1-1	1-2	2-1	2-2	5	8	10
EC50	0.05194	10.25	5.797	28.75	0.05238	0.06915	9.379

实施例 3-2 结合 DXD 的抗体筛选（第二轮）

[444] 杂交瘤的产生与初筛

[445] 1）使用 KLH-DXD 进行小鼠免疫，每次注射 40 μg 免疫原，选择效价检测结果优异的小鼠（品系为 Balb/c）脾细胞分别与 SP2/0 骨髓瘤细胞通过电化学的方法进行融合，杂交瘤细胞铺 30 块 96 孔板在 HAT 培养基中进行培养，一周之后将培养基替换为 HT 培养基，待融合细胞生长至一定程度有抗体分泌之后进行阳性杂交瘤细胞的筛选。

[446] 2）选择 OD450 值大于 1.8 的细胞孔进行 ADC 和游离 DXD 的负筛（取发酵液上清和定量的游离 DXD 或 ADC 进行共孵育，挑选 ADC 的孵育不会影响 OD450 读值而 DXD 的孵育使 OD450 读值变小的细胞孔。），获得 52 株阳性杂交瘤进行亚克隆，通过 ELISA 的方法进行单克隆筛选最终获得来自 27 个 pool 的杂交瘤进行序列钓取工作，得到的嵌合抗体分别编号为 JLD1-JLD27。

[447] 嵌合抗体的表征

[448] 嵌合抗体初筛：利用 293F 细胞表达上述嵌合抗体，7 天后收取发酵液上清用 OCTET 进行定量。

[449] 每孔铺 5000 个 A549 细胞，24h 后加入发酵液上清（分别稀释至 10μg/mL 和 50μg/mL）和 DXD（100 nM）进行共孵育，72h 后检测细胞活率，初步筛选具有 DXD 保护作用的发酵液进行纯化和亲和验证。

[450] 实验结果如图 28，结果表明初步筛选具有细胞保护作用的抗体是 JLD6，JLD7，JLD8，JLD9，JLD10，JLD12，JLD13，JLD14，JLD16，JLD17，JLD18，JLD19，JLD20，JLD21，JLD23，JLD24，JLD25，JLD27。

[451] 将前期初筛具备保护作用的嵌合抗体纯化后用 ELISA 进行抗体与 OVA-DXD 的结合活性检测：将 500ng/mL 的 OVA-DXD 在 37℃包被 2h 至 96 孔板中，利用 PBST 洗两次后加入 5%的奶粉在 37℃封闭 2h，用 PBST 洗板两次后将抗体浓度按 20000，10000，5000，2500，1250，625，125，25，5，0.5，0.05ng/mL 进行稀释，将稀释过的抗体加入 96 孔板中放置在 37℃孵育 1h，用 PBST 洗板两次后加入 Anti-mouse IgG HRP 于 37℃孵育 1h，用 PBST 洗板三次后加入 TMB 显色液，待显色至一定程度后加入 2M H_2SO_4 通过酶标仪进行读数。EC50 值详见表 14，与 OVA-DXD 结合活性较佳的嵌合抗体有 JLD6、JLD7、JLD17 及 JLD20。

[452] 表 14. 嵌合抗体与 OVA-DXD 结合 EC50(ng/mL)值

抗体编号	JLD6	JLD7	JLD17	JLD18	JLD20	JLD24	IgG1
EC50	36.06	32.19	86.89	188.6	42.59	38270	NA

实施例 3-3 结合 DXD 的抗体筛选（第三轮）

[453] 杂交瘤的产生与初筛

[454] 1）使用 KLH-DXD 进行小鼠免疫，每次注射 40 μg 免疫原，选择效价检测结果优异的 2 只小鼠（小鼠品系分别为 Balb/c 和 CD1）脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞通过电化学的方法进行融合，Balb/c 小鼠的杂交瘤细胞铺 30 块 96 孔板，CD1 小鼠的杂交瘤细胞铺 30 块 96 孔板在 HAT 培养基中进行培养，一周之后将培养基替换为 HT 培养基，待融合细胞生长至一定程度有抗体分泌之后进行阳性杂交瘤细胞的筛选。

[455] 2）选择 OD450 值大于 2 的细胞孔进行 ADC 和游离 DXD 的负筛（取发酵液上清和定量的游离 DXD 或 ADC 进行共孵育，挑选 ADC 的孵育不会影响 OD450 读值而 DXD 的孵育使 OD450 读值变小的细胞孔。），获得 212 株阳性杂交瘤进行亚克隆，通过 ELISA 的方法进行单克隆筛选最终获得来自 65 个 pool 的杂交瘤进行序列钓取工作，得到的嵌合抗体分别编号为 D1-D65。

[456] 嵌合抗体的表征

[457] 嵌合抗体初筛：利用 293F 细胞表达上述嵌合抗体，7 天后收取发酵液上清用 OCTET 进行定量。

[458] 每孔铺 5000 个 A549 细胞，24h 后加入发酵液上清（稀释至 20μg/mL）和 DXD（1 μM）进行共孵育，72h 后检测细胞活率，初步筛选具有 DXD 保护作用的发酵液进行纯化和亲和验证。

[459] 实验结果如图 29，结果表明初步筛选具有细胞保护作用的抗体是 D2、D4、D6、D12、D15-1、D15-2、D23-1、D23-2、D24、D28-2、D31、D34、D41、D42、D47、D43-1、D43-3、D49、D50、D52、D56-2、D61、D62、D63、D64、D65。

[460] 将前期初筛具备保护作用的嵌合抗体纯化后用 ELISA 进行抗体与 OVA-DXD 的结合活性检测：将 500ng/mL 的 OVA-DXD 在 37℃包被 2h 至 96 孔板中，利用 PBST 洗两次后加入 5%的奶粉在 37℃封闭 2h，用 PBST 洗板两次后将抗体浓度按 20000，10000，5000，2500，1250，625，125，25，5，0.5，0.05ng/mL 进行稀释，将稀释过的抗体加入 96 孔板中放置在 37℃孵育 1h，用 PBST 洗板两次后加入 Anti-mouse IgG HRP 于 37℃孵育 1h，用 PBST 洗板三次后加入 TMB 显色液，待显色至一定程度后加入 2M H_2SO_4 通过酶标仪进行读数。EC50 值详见表 15，与 OVA-DXD 结合活性较佳的嵌合抗体有 D2、D4、D6、D52、D61、D62、D63 及 D64。

[461] 表 15. 嵌合抗体与 OVA-DXD 结合 EC50(ng/mL)值

抗体编号	D64	D4	D2	D6	D63	D62	D61	D52	D15-2
EC50	29.83	49.17	52.23	54.74	58.31	67.83	68.17	68.85	94.19
抗体编号	D12	D47	D24	D49	D15-1	D43-1	D28-2	D41	D28-1
EC50	94.52	97.92	98.93	104	125.3	144.1	169.4	204.2	361.1
抗体编号	D65	D31	D43-3	D50	D23-1	D34	D23-2	D42	D56-2
EC50	546.6	10700	12314	18281	18446	32099	38302	NA	NA

实施例 3-4 嵌合抗体的细胞保护实验

[462] 嵌合抗体的结合特异性检测

[463] 用 ELISA 的方法检测 ADC（结构如图 58，Ab-MC-GGFG-DXD）和游离的 DXD 对抗体与 DXD 结合活性的检测，按照 200ng/mL 包被 DXD-OVA，37℃孵育 2h，用 5%的奶粉在 37℃封闭 2h，将梯度稀释的抗体分别与 PBS、ADC（500nM）以及游离的 DXD（40 μM）于 37℃进行共孵育 1h 后，加入 Anti-human HRP 于 37℃进行孵育 1h，用 PBST 洗板三次后加入 TMB 显色液，待显色至一定程度后加入 2M H_2SO_4 通过酶标仪进行读数，IC50(μg/mL)值见表 16，除 D28-2 外，其他嵌合抗体的结合特异性较好。

[464] 表 16. 嵌合抗体与 DXD 结合的特异性

抗体编号 / ELISA 板加入成分	D2	D4	D6	D52	D62	D64	JLD6	JLD18
PBS	0.017	0.018	0.021	0.028	0.046	0.023	0.033	0.118
ADC	0.141	0.255	0.423	0.056	0.478	0.164	0.042	0.077
游离的 DXD	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
抗体编号 / ELISA 板加入成分	DXD1	DXD5	DXD8	JD3	JD17	JD18-7	D28-2	IgG
PBS	0.053	0.039	0.086	0.613	0.056	0.020	0.116	NA
ADC	0.142	0.066	1.675	2.208	0.310	0.027	NA	NA
游离的 DXD	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

[465] 嵌合抗体对 DXD 杀伤细胞保护实验

[466] NCI-H292 为 DXD 的敏感细胞系，按 5000 细胞/孔将细胞铺至白色 96 孔板中，在培养箱中培养 24h 后加入梯度稀释的抗体与小分子 DXD 的混合液进行细胞杀伤和抗体保护实验，72h 后利用化学发光检测试剂盒通过检测每孔中活细胞 ATP 的量对抗体的细胞保护效率进行检测，IC50 值见表 17，对 DXD 杀伤细胞保护效果较好的嵌合抗体有 DXD8、JLD6、JLD18、D2、D4、D28-2、D52、D6。

[467] 表 17. 嵌合抗体对 DXD 杀伤细胞的抑制 IC50(μg/mL)值

抗体编号	DXD8	JLD6	JLD18	D2	D4	D28-2	D52
IC50	1.669	1.739	2.59	2.702	3.404	3.529	3.733
抗体编号	D6	DXD5	D64	D62	DXD-3	IgG	
IC50	3.822	5.741	5.793	6.609	~25.61	NA	

[468] 综合上述实验结果，在上述候选分子中，D4、D6、D28-2、D52、JLD6、JLD18 以及 DXD8 嵌合抗体具有较佳的性能，能够有效起到结合游离 DXD 毒素降低细胞杀伤的效果。

[469] 对上述嵌合抗体分别进行测序，重链及轻链可变区氨基酸序列如下所示：
[470] >D4H（SEQ ID NO:52；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GFTFSDNY**MYWVRQTPEKRLEWVAT**ISAGGSYT**YYPDSVKGRF
TISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDTAMYYC**AGTAMDY**WGQGTSVTVSS

[471] >D4H 的 HCDR1（SEQ ID NO:53）

[472] GFTFSDNY

[473] >D4H 的 HCDR2（SEQ ID NO:54）

[474] ISAGGSYT

[475] >D4H 的 HCDR3（SEQ ID NO:55）

[476] AGTAMDY

[477] >D4L（SEQ ID NO:56；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

DIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAS**SSVSY**MHWYQQKSGTSPKRWIY**DTS**KLASGVPARFSGSGSGTSY
SLTISSLEAEDAATYYC**LQWKSYPPT**FGAGTKLEIK

[478] >D4L 的 LCDR1（SEQ ID NO:57）
[479] SSVSY
[480] >D4L 的 LCDR2
[481] DTS
[482] >D4L 的 LCDR3（SEQ ID NO:58）
[483] LQWKSYPPT
[484] >D6H（SEQ ID NO:59；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GFTFSDNY**MYWVRQTPEKRLEWVAT**ISAGGSYT**YYPDSVKGRF
TISRDNAMNNLYLQMSSLKSEDTAMYYC**AGTAMDY**WGQGTSVTVSS

[485] >D6H 的 HCDR1（SEQ ID NO:53）

[486] GFTFSDNY

[487] >D6H 的 HCDR2（SEQ ID NO:54）

[488] ISAGGSYT

[489] >D6H 的 HCDR3（SEQ ID NO:55）

[490] AGTAMDY

[491] >D6L（SEQ ID NO:60；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

DIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAS**SSVSY**MHWYQQKSGTSPKRWIY**DTS**KLASGVPARFSGSGSGTSY
SLTISSLEAEDAATYYC**LQWKSYPPT**FGAGTKLEIK

[492] >D6L 的 LCDR1（SEQ ID NO:57）
[493] SSVSY
[494] >D6L 的 LCDR2
[495] DTS
[496] >D6L 的 LCDR3（SEQ ID NO:58）
[497] LQWKSYPPT
[498] >D28H（SEQ ID NO:61；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

EVQLQESGGGLVQPGGSMKLSCVAS**GFTFINYW**MNWVRQSPERGLEWVAQ**ISLISDDYAT**HYAESVKG
RFTISRDDSKSSLYLQMNNLRAEDTGIYYC**TEAGYFFDY**WGQGTTLTVSS

[499] >D28H 的 HCDR1（SEQ ID NO:62）
[500] GFTFINYW
[501] >D28H 的 HCDR2（SEQ ID NO:63）
[502] ISLISDDYAT
[503] >D28H 的 HCDR3（SEQ ID NO:64）
[504] TEAGYFFDY
[505] >D28L（SEQ ID NO:65；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

DVVMTQSQQFMSTSVGDRVSVTCKAS**QNVGTN**VAWYQQRPGQSPKALIY**SAS**YRYSGVPDRFTGSGSG
TDFTLTISNVQSEDLAEYFC**QQYNSYPLT**FGAGTKLELK

[506] >D28L 的 LCDR1（SEQ ID NO:66）
[507] QNVGTN
[508] >D28L 的 LCDR2
[509] SAS
[510] >D28L 的 LCDR3（SEQ ID NO:67）
[511] QQYNSYPLT
[512] >D52H（SEQ ID NO:68；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

EVQLQESGGGLVQPGGSMKLSCVAS**GFTLSNYW**MNWVRQSPEKGLEWVAQ**IRPKSYNYAT**HYAESVK GRFTISRDGSKSSVYLEMSNLRAEDTGIYYC**TGFPFDY**WGQGTTLTVSS

[513] >D52H 的 HCDR1（SEQ ID NO:69）
[514] GFTLSNYW
[515] >D52H 的 HCDR2（SEQ ID NO:70）
[516] IRPKSYNYAT
[517] >D52H 的 HCDR3（SEQ ID NO:71）
[518] TGFPFDY
[519] >D52L（SEQ ID NO:72；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS**QDVGTA**VAWYQQKPGQSPKLLIY**WAS**TRHTGVPDRFTGSGSWT DFTLTINNVQSEDLADYFC**QQYSSYPLT**FGAGTKLEIK

[520] >D52L 的 LCDR1（SEQ ID NO:73）
[521] QDVGTA
[522] >D52L 的 LCDR2
[523] WAS
[524] >D52L 的 LCDR3（SEQ ID NO:74）
[525] QQYSSYPLT
[526] >JLD6H（SEQ ID NO:75；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

DVQLQESGPGLVKPSQTVSLTCTVT**GISITNGNHW**WNWIRQLSGNKLEWIGY**IRPSGST**DSNPSLKSRISI TRDTSKNQVFLQLNSVTPEDVATYYC**ARGGLEDGKYYYAMDY**WGQGTSL

[527] >JLD6H 的 HCDR1（SEQ ID NO:76）
[528] GISITNGNHW
[529] >JLD6H 的 HCDR2（SEQ ID NO:77）
[530] IRPSGST
[531] >JLD6H 的 HCDR3（SEQ ID NO:78）
[532] ARGGLEDGKYYYAMDY
[533] >JLD6L（SEQ ID NO:79；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

DIVLTQSPPSLAVSLGQSVTISCRAS**ENVEYFGTSL**MQWYQQKPGQPPKLLIY**GAS**SVESGVPARFSGSGS GTDFSLKIHPVEEDDIAMYFC**QQSRKVPST**FGSGTKLEIK

[534] >JLD6L 的 LCDR1（SEQ ID NO:80）
[535] ENVEYFGTSL
[536] >JLD6L 的 LCDR2
[537] GAS
[538] >JLD6L 的 LCDR3（SEQ ID NO:81）
[539] QQSRKVPST
[540] >JLD18H（SEQ ID NO:82；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

DVQLQESGGGLVQPGGSMKLSCIAS**GFTFTNYW**MNWVRQSPEKGLEWVAQ**IRLMSNNCAT**HYAESVK GRFTISRDASKSFFYLQMNNLRAEDTGIYYC**TYYDYDYYYSMDY**WGQGTSVTVSS

[541] >JLD18H 的 HCDR1（SEQ ID NO:83）
[542] GFTFTNYW
[543] >JLD18H 的 HCDR2（SEQ ID NO:84）
[544] IRLMSNNCAT
[545] >JLD18H 的 HCDR3（SEQ ID NO:85）
[546] TYYDYDYYYSMDY
[547] >JLD18L（SEQ ID NO:86；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

DVVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKAS**QNVATN**VAWYQQKPGQSPKALFY**SAS**YRYSGVPDRFTGSGSG TDFTLTISNVQSEDLAEYFC**QQYNSYPLT**FGAGTKLEIK

[548] >JLD18L 的 LCDR1（SEQ ID NO:87）

[549] QNVATN
[550] >JLD18L 的 LCDR2
[551] SAS
[552] >JLD18L 的 LCDR3（SEQ ID NO:67）
[553] QQYNSYPLT
[554] >DXD8H（SEQ ID NO:88；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS**GHTFTSYV**MNWVKQKPGLGLDWIGY**INPYNGGI**KYNEKFKGK ATLTSDKSSRTAYMELSSLTSEDSAVYYC**YYYGNSYGY**WGQGTTLTVSS

[555] >DXD8H 的 HCDR1（SEQ ID NO:89）
[556] GHTFTSYV
[557] >DXD8H 的 HCDR2（SEQ ID NO:90）
[558] INPYNGGI
[559] >DXD8H 的 HCDR3（SEQ ID NO:91）
[560] YYYGNSYGY
[561] >DXD8L（SEQ ID NO:92；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHAS**QGINSN**IGWLQQKPGKSFKGLIY**HGT**NLEDGVPSRFSGGGSGAD YSLTISSLESEDFADYYC**IQYAQFPFT**FGSGTKLEIK

[562] >DXD8L 的 LCDR1（SEQ ID NO:93）
[563] QGINSN
[564] >DXD8L 的 LCDR2
[565] HGT
[566] >DXD8L 的 LCDR3（SEQ ID NO:94）
[567] IQYAQFPFT
[568] JLD6 抗体的人源化序列设计
[569] 通过序列相似性的比对，选取与鼠源 JLD6 抗体相似度最高的抗体种系作为人源化模板，将重链和轻链的 CDR 分别替换掉模板的 CDR 区，然后根据人工智能预测的三维结构对影响抗体活性的关键氨基酸进行回复突变。具体人源化过程如下：
[570] （1）选取 IGHV4-30-4*01 和 IGHJ6*01 作为鼠源 JLD6 抗体的重链人源化模板，选取 Kappa 的 IGKV4-1*01 和 IGKJ2*01 作为鼠源 JLD6 抗体的轻链人源化模板，将鼠源 JLD6 抗体的重链或轻链 CDR 区替换掉人源化模板的 CDR 区，分别得到重链可变区序列 6231（SEQ ID NO:95）及轻链可变区序列 6235（SEQ ID NO:96）；
[571] （2）使用 WeMol 软件中的 ESMFold 模块对鼠源 JLD6 抗体的可变区进行结构预测，获得三维结构模型；
[572] （3）根据鼠源 JLD6 抗体的可变区结构，判断框架区中影响重链和轻链相互作用以及与 CDR 有相互作用的关键氨基酸，确定回复突变的氨基酸位点，分别得到重链可变区序列 6233（SEQ ID NO:97），与轻链可变区序列 6235 组成 PP-1X-#9 分子；同时将重链 CDR3 中的潜在异构化位点 DG 进行翻译后修饰移除，得到重链可变区序列 6496（SEQ ID NO:98），与轻链可变区序列 6235 组成 PP-1X-#17 分子。
[573] >6231（SEQ ID NO:95；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GISITNGNHW**WSWIRQPPGKGLEWIGY**IRPSGST**YYNPSLKSRVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC**ARGGLEDGKYYYAMDY**WGQGTTVTVSS

[574] >6231 的 HCDR1（SEQ ID NO:76）
[575] GISITNGNHW
[576] >6231 的 HCDR2（SEQ ID NO:77）
[577] IRPSGST
[578] >6231 的 HCDR3（SEQ ID NO:78）
[579] ARGGLEDGKYYYAMDY
[580] >6235（SEQ ID NO:96；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS**ENVEYFGTSL**LAWYQQKPGQPPKLLIY**GAS**TRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQSRKVPST**FGQGTKLEIK

[581] >6235 的 LCDR1（SEQ ID NO:80）
[582] ENVEYFGTSL
[583] >6235 的 LCDR2
[584] GAS
[585] >6235 的 LCDR3（SEQ ID NO:81）
[586] QQSRKVPST
[587] >6233（SEQ ID NO:97；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GISITNGNHW**WNWIRQPPGKGLEWIGY**IRPSGST**YSNPSLKSRVTI SRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC**ARGGLEDGKYYYAMDY**WGQGTTVTVSS

[588] >6233 的 HCDR1（SEQ ID NO:76）
[589] GISITNGNHW
[590] >6233 的 HCDR2（SEQ ID NO:77）
[591] IRPSGST
[592] >6233 的 HCDR3（SEQ ID NO:78）
[593] ARGGLEDGKYYYAMDY
[594] >6496（SEQ ID NO:98；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GISITNANHW**WNWIRQPPGKGLEWIGY**IRPSGST**YSNPSLKSRVTI
SRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC**ARGGLEEGKYYYAMDY**WGQGTTVTVSS
[595] >6496 的 HCDR1（SEQ ID NO:99）
[596] GISITNANHW
[597] >6496 的 HCDR2（SEQ ID NO:77）
[598] IRPSGST
[599] >6496 的 HCDR3（SEQ ID NO:100）
[600] ARGGLEEGKYYYAMDY
[601] 人源化抗体构建及表达纯化
[602] 通过引物设计，将抗体的重链序列和轻链序列分别构建到表达载体 pcDNA3.4 上，获得相应的各个质粒，利用 Expi293 细胞进行瞬时转染，具体转染和纯化过程如下：
[603] HEK293SQ 细胞于 Expi293 表达培养基中培养。使用 ExpiFectamine 293 转染试剂盒，并按照制造商的说明进行瞬时转染，转染 20 h 后添加转染增强剂，120 h 后收集上清液进行后续蛋白纯化；
[604] 分别用 0.1 M NaOH 和 PBST 活化磁珠，加入上清液室温孵育 1.5 h 后，分别用 PBST 和水清洗杂质，用 1000 μL 洗脱 buffer 洗脱目的蛋白，用 4-12% SDS-PAGE 测定样品的纯度。
[605] 人源化抗 Dxd 抗体的细胞保护实验
[606] 消化 NCI-H292 细胞，离心 1200rpm 5 分钟，弃去上清，用 1640+10%FBS 培养基重悬计数，调整至相应浓度，并按照 60μL 每孔加入 Corning 3610 板内，每孔 5000 细胞，37 ℃培养箱备用；
[607] 稀释抗体浓度（40μg/mL 或 20μg/mL, 2 倍稀释），游离 Dxd 固定浓度在 10ng/mL，将 30μL Dxd 与 30μL 抗体 1: 1 加入铺有细胞的 3610 板内，总培养体系为 120 μL，37 ℃培养箱培养 3 天；
[608] 将板子取出，室温平衡，每孔加入 100μL CellTiter-Glo® Luminescent Cell，混匀，室温避光静置 10min；
[609] 酶标仪上机检测 Luminescence values，计算公式为：%Cytoxicity=(Blank-Sample)/Blank*100%
[610] 实验结果如图 30，结果表明 PP-1X-#9 和 PP-1X-#17 分子具有较好的细胞保护活性。

实施例 4 特异性结合 DXD 的纳米抗体筛选

实施例 4-1 羊驼免疫方案及筛选方法

[611] 表 18. 羊驼免疫方案

编号	羊驼 2-1	羊驼 2-2	羊驼 2-3
佐剂	弗氏佐剂	水佐剂	弗氏佐剂
免疫原	KLH-DXD	KLH-DXD	OVA-DXD
免疫次数	4	4	3
间隔	2 周	2 周	2 周

[612] 羊驼 2-1/2-3 组

[613] 初次免疫：采用弗氏完全佐剂（FCA）与抗原按 1:1 体积比制备的乳浊液，免疫剂量为 500μg 抗原/头份。

[614] 加强免疫：每间隔 14 日用弗氏不完全佐剂（FIA）制备乳浊液，剂量调整为 250μg/头份。

[615] 羊驼 2-2 组

[616] 初次免疫：剂量 500μg 抗原/头份。

[617] 加强免疫：剂量 250μg 抗原/头份，免疫间隔周期同 2-1 组。

[618] 免疫后筛选方法

[619] 羊驼 2-3：三次免疫后 14 日采集静脉血，羊驼 2-1/2-2：四次免疫后第 7 日采集静脉血，分离外周血单个核细胞（PBMC）并进行 RNA 提取。将 RNA 逆转录为 cDNA 后，通过 PCR、限制性酶切及连接反应构建纳米抗体噬菌体文库。

[620] 经两轮淘选后进行 ELISA 检测挑选不重复序列，本批共筛选 1000 株抗体，随后构建 VHH+Fc 形式的抗体进行抗体 ELISA 检测以及细胞保护实验。

实施例 4-2 抗体 ELISA 检测

[621] 1）将不重复序列构建成表达载体，以 HEK293F 悬浮细胞瞬时转染。

2）蛋白纯化：Protein A 磁珠亲和层析。将纯化蛋白进行 ELISA 检测，分别以 OVA-DXD/ADC（结构如图 58，Ab-MC-GGFG-DXD）/OVA 100ng/孔进行包被，4℃孵育过夜。

3）次日，将板中液体弃掉，放入洗板机中，洗板 3 次。封闭：封闭液为 2%-3%BSA，每孔加入封闭液 200μL，37℃孵育 1h。

4）洗板：将板中液体弃掉，放入洗板机中，洗板 3 次。

5）抗体梯度稀释。每个抗体对应五个实验组，第一组为 OVA-DXD 板+抗体+PBS；第二组为 OVA-DXD 板+抗体+DXD（40μM）；第三组为 OVA-DXD 板+抗体+ADC（500nM）；第四组为 OVA 板+抗体+PBS；第五组为 ADC 板+抗体+PBS。

6）抗体、PBS、DXD、ADC 各加入 30μL，37℃孵 1h。

7）将板中液体弃掉，放入洗板机中，洗板 3 次。

8）二抗：Anti ALFA tag Mab HRP，1：5000 稀释，37℃孵育 1h。洗板：将板中液体弃掉，放入洗板机中，洗板 3 次。

9）加入显色液（TMB 100μL），避光显色。加入终止液 50μL，用酶标仪测定 OD450nm 读值。

[622] 实验结果如图 31，结果表明，86 号抗体在特异性方面表现较佳。

实施例 4-3 细胞保护实验

[623] 复苏 NCI-H292 细胞，用含 10% FBS 的 1640 培养基培养至 80%融合度。胰酶消化细胞，离心重悬，调整细胞密度至 3×10^4 cells/mL。将细胞悬液接种至 96 孔板，每孔 100 μL（约 3000-5000 cells/孔），边缘孔用 PBS 填充以减少蒸发干扰。37℃、5% CO_2培养箱中孵育 24 h，使细胞贴壁。设置以下组别：抗体保护组：细胞+抗体预处理+DXD 毒素+培养基；对照抗体保护组：细胞+对照抗体 IgG1 预处理+DXD 毒素+培养基。吸弃原培养基，加入用新鲜培养基配置的浓度为 200μg/mL 的抗体，每孔 100 μL。加入含 DXD（10nM）毒素的培养基，37℃、5% CO_2培养 48 h。每孔加入 50 μL 细胞增殖/杀伤检测试剂，轻摇混匀，37℃避光孵育 5-30 min。用酶标仪测定化学发光值。

[624] 实验结果如图 32，结果表明，相比于对照组，86 号抗体能够产生细胞保护效果。

[625] 对 86 号抗体进行测序，氨基酸序列如下所示：

[626] >86（SEQ ID NO:101；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**<u>GFTFSIYY</u>**MGWVRQAPGKGPEWVSA**<u>INTGGGST</u>**WYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYC**<u>ARVLDPSTWEYDT</u>**WGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[627] >86 VHH（SEQ ID NO:102；加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（IMGT 系统））：

[628] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**<u>GFTFSIYY</u>**MGWVRQAPGKGPEWVSA**<u>INTGGGST</u>**WYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYC**<u>ARVLDPSTWEYDT</u>**WGQGTQVTVSS

[629] >86 CDR1（SEQ ID NO:103）

[630] GFTFSIYY

[631] >86 CDR2（SEQ ID NO:104）

[632] INTGGGST

[633] >86 CDR3（SEQ ID NO:105）

[634] ARVLDPSTWEYDT

实施例 5 特异性结合 MMAE 的多肽筛选

实施例 5-1 噬菌体展示八/十二环肽库的构建

[635] 随机八/十二环肽寡核苷酸引物的合成

[636] 编码随机八/十二环肽寡核苷酸片段的设计策略是采用 NNK 密码子编码方式。其中 N 为任意核苷酸（A/T/C/G），K 为 G/T。合成的随机核苷酸序列见表 19。

[637] 表 19. 用于多肽库构建的核苷酸序列

名称	序列
八环肽核苷酸序	CTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCCAGG^CGGCCGCTTGT(N

列	NK)$_8$TGCGGTGGAGGTGGCCAGGC^CGGCCAGCACCATCAC CATCACCAT
十二环肽核苷酸序列	CTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCCAGG^CGGCCGCTTGT(N NK)$_{12}$TGCGGTGGAGGTGGCCAGGC^CGGCCAGCACCATCAC CATCACCAT
Exten-R 延伸引物	ATGGTGATGGTGATGGTGCT
Exten-R 对应肽链	Ala Cys (X)$_{8\ or12}$ Cys Gly Gly Gly

[638] PCR 扩增双链 DNA 片段

[639] 在长链 DNA 引物的 3'端设计了回文序列可为 DNA 聚合酶提供引物，引导 3'至 5'端的 DNA 合成，获得完整的双链 DNA 序列。将合成的编码八环肽库的寡核苷酸模板加入 ddH_2O 溶解为 100 μM 的溶液，取 5 μg 与等摩尔的通用延伸引物在 50 μL ddH_2O 中混合，95 ℃水浴中热变性 5 min，水浴中自然降温至 37 ℃以下形成退火混合物。向退火反应物中加入等体积的 PrimeSTAR Max Premix（TAKARA, CAT#: R045B）配制 PCR 溶液混匀后瞬时离心，37℃ 10min，65 ℃ 15 min 延伸退火产物合成编码八/十二环肽库的双链 DNA 片段。

[640] pComb3XSS 噬菌体载体和 DNA 片段的酶切、连接与转化

[641] 使用限制性内切酶 sfi I（NEB, CAT#: R0123L）I 酶切制备的 DNA 片段和 pComb3XSS，50℃孵育 18 h。1%琼脂糖凝胶电泳分别分离酶切过夜的 pComb3XSS，按照胶回收试剂盒（MN, CAT#740609.250）说明书的操作纯化回收，然后使用 T4 连接酶将线性化的 pComb3XSS 质粒和酶切后的 DNA 片段连接，载体与 DNA 片段的摩尔比例为 1:10，置于 16℃，恒温孵育 19 h。用纯化试剂盒对连接产物进行纯化回收，超纯水（30 μL/管）洗脱，Nanodrop 测浓度。每支的电转杯（2 mm，冰水浴中预冷）加入新鲜制备的 350 μL TG1 感受态细胞，随即加入 500 ng 的连接产物，轻弹电击杯底部混匀，冰浴中孵育 10 min。彻底擦干电转杯壁上和底部的水，设置电压为 2.5 KV，进行电击转化。

[642] 肽库的鉴定

[643] 随机挑选 12 个克隆测序，序列比对分析多肽库的质量。

实施例 5-2 噬菌体展示环肽库的富集筛选 MMAE 结合肽

[644] 多肽噬菌体展示文库淘选

[645] 淘选前进行免疫管包被，免疫管用 PBS 清洗 3 次，吸干残液。根据免疫策略，免疫管分别包被负筛抗原和正筛抗原，使用 500 μL 包被缓冲液稀释至包被终浓度。室温 150rpm 混匀 2h 后，放置 4℃过夜约 16h。取 P12P 噬菌体展示文库 1.35E+13cfu，作为第一轮淘选的 input；第二轮至第四轮淘选取上一轮富集的噬菌体展示文库作为 input 约 1.00E+13cfu。Input 使用 Casein 溶液（Thermo scientific, Cat.37528）封闭，浓度为 50%，用 1xPBS 补齐体积至 500 μL。接种过夜活化的 TG1 大肠杆菌至 120mL 2YT 液体培养基，37℃，250rpm/2-3 h，至 OD0.6-0.8 待用。包被正筛抗原的免疫管使用 1xPBS 清洗后，加入 1mL Casein 溶液封闭 1 h。包被负筛蛋白的免疫管加入封闭后的 phage input，室温 150rpm 结合 1h，用于去除 phage 与毒素偶联蛋白的结合。包被正筛抗原的免疫管封闭后，清洗免疫管，将经过负筛的 phage 转入免疫管中，室温 150rpm 结合 1-2 h。使用 1xPBST 清洗免疫管 3 次，清洗时放置于 150rpm 摇床上 1-2 min，加入 5nmol Truncated MMAE 溶液，室温 150rpm 竞争洗脱 1h。将洗脱液转移至包被第二次负筛蛋白的免疫管中，室温 150rpm 结合 1h，进一步负筛去除 phage 和毒素偶联蛋白的结合。再将洗脱的 phage 加入 40mL OD0.6-0.8 TG1 菌液里，并加入终浓度为 2%的葡萄糖溶液。37℃侵染 45-60 min，每 15min 温和摇晃菌液。侵染过后，取 100ul 菌液稀释 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 四个梯度，各取 100μL 涂小平板（10cm*10cm 2YT-Amp-Glu），第二天统计单克隆数量，监测 phage 的富集情况。并取 1ml 菌液加入甘油，保存于-80℃。剩余的菌液中加入 1/1000 Amp (100mg/mL)和辅助噬菌体 M13KO7(Mol 20:1)(NEB, Cat. N0315S)，37℃静止侵染 1h。离心收集菌液，弃上清，加入 40mL 1/1000 Kan (50mg/mL)和 IPTG(50mg/mL) 的 2YT-Amp 液体培养基，30℃ 220rpm 过夜培养。过夜培养的菌液，10000 rpm 离心 10 min；收集上清，0.45 μM 过滤，加入 1/5 体积的 PEG-NaCl 沉淀。冰上放置 1h，4℃，10000rpm 离心 30 min，弃去上清，PBS 重悬沉淀，用于淘选。Nanodrop 测定噬菌体的 OD260 值，根据 OD260 值确定用于淘选的噬菌体投入量，1OD 约为 3.0E+12。

[646] 多肽噬菌体展示文库单克隆筛选

[647] 96 孔板（sterile, round bottom），每孔中加入 600 μL 的 Amp+ 2YT 培养液。从 P12P P1 Round2-4 的平板挑单克隆进行培养。37℃，220rpm，3-6h 至 OD 0.6。制备的噬菌体用于 phage ELISA。取 150 μL 菌液转移至新的 96 孔板，加入甘油保存菌种于-80℃。96 孔板中加入辅助噬菌体 M13KO7（Mol 20:1），37℃静止感染 1h。加入 1/1000 Kan(50 mg/mL) and IPTG(50 mg/mL)，30℃220rpm 过夜培养。96 孔板过夜培养的噬菌体，4000 rpm 离心 30min；将上清(400 μL)转移到新的 96 孔板中，用于 Phage ELISA。

[648] Phage ELSIA 实验方法

[649] Phage ELSIA 封闭：包被抗原的 96 孔板，洗板机 PBST 清洗 1 遍，加入 Casein 溶液封闭，200 μL/孔，37℃封闭 1h。Phage ELSIA 一抗孵育：PBST 清洗 3 边，每孔加入 100 μL 过夜培养的噬菌体上清。设置两个阴性对照孔：Blank 和 M13KO7(1:100)。37℃孵育 1-2h。Phage ELSIA 二抗孵育：用 PBST 洗 6 遍，加入用 3% Milk-PBS 稀释的二抗 anti-M13KO7-HRP(1:10000)(Sino.Biological, Cat. 11973-MM05T-H), 37℃，孵育 1h。显色：用 PBST 洗 6 遍，每孔加入 100μL TMB 显色液，避光显色 2-10min。终止：每孔加入 100 μL 2M H_2SO_4 终止，用酶标仪读取 OD450 值，记录并保存。分析数据，挑选特异性阳性克隆送测序，通过 CLC 软件分析获得序列，进行下一步构建和表达纯化。构建分子的形式如图 33 所示。

实施例 5-3 多肽分子与 MMAE 特异性结合验证

[650] ELISA 检测 Fc 融合多肽和 MMAE 的结合特异性

[651] 构建的 Fc 融合多肽 PP-1A-#84 至#95 号分子用于 OVA-MMAF 和 OVA 的结合特异性鉴定，确定和 MMAE 特异性结合活性较好的分子。经第一轮初筛后，进一步验证#85/#86/#89/#93 与 OVA-MMAF 特异性结合，而与阴性蛋白 OVA 不结合；对#84/#87/#88/#90/#91/#92/#94 重复验证是否与 MMAE 特异性结合。

[652] 表 20. PP-1A-#85（多肽）- PP-1A-#94（多肽）及 PP-1A-#85（Fc 融合多肽）氨基酸序列表

序列编号	代号	序列
SEQ ID NO:106	PP-1A-#85（多肽）	ACDESHGVPHTSGMC
SEQ ID NO:107	PP-1A-#86（多肽）	ACLPNSLGPSAMSSC
SEQ ID NO:108	PP-1A-#87（多肽）	ACLVLKLSTGIKSEC
SEQ ID NO:109	PP-1A-#88（多肽）	ACRLTGPDWLHTQRC
SEQ ID NO:110	PP-1A-#89（多肽）	ACTPALRSLAC
SEQ ID NO:111	PP-1A-#90（多肽）	ACLRNSPRKQC
SEQ ID NO:112	PP-1A-#91（多肽）	ACHWNAKADYGSFVC
SEQ ID NO:113	PP-1A-#92（多肽）	ACTGCSRTHSPRSRC
SEQ ID NO:114	PP-1A-#93（多肽）	ACVLSPHPQAC
SEQ ID NO:115	PP-1A-#94（多肽）	ACDSLGGSPVC
SEQ ID NO:116	PP-1A-#85（Fc 融合多肽）	ACDESHGVPHTSGMCGGGSDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG

[653] 多肽 ELISA binding 实验方法

[654] ①抗原包被：使用包被缓冲液包被 MMAF 偶联蛋白及阴性蛋白于酶标板，浓度为 1μg/mL，放置 4 度过夜约 16 h。②封闭：包被抗原的酶标板，洗板机 PBST 清洗 1 遍，加入 Casein 溶液封闭，200 μL/孔，室温封闭 1 h。③一抗孵育：PBST 清洗 3 遍，加入首孔浓度为 2000nM，用 Casein 溶液 5 倍梯度稀释的多肽样品。阴性对照为 Fc.uIgG1 分子。室温孵育 2 h。④二抗孵育：PBST 清洗 3 遍，加入用 Casein 溶液稀释的二抗 Goat pAb to Hu IgG(HRP) (1:10000) (Abcam, Cat. Ab97225) ，室温孵育 1 h。⑤显色：PBST 清洗 6 遍，每孔加入 100ul TMB 显色液，避光显色 2-10 min。⑥终止：每孔加入 100 μL 2M H_2SO_4 终止反应，用酶标仪读取 OD450 值，记录并保存。最后使用 GraphPad 软件分析数据。

[655] ELISA binding 结果如图 34 显示，#85/#86/#89/#93 与 OVA-MMAF 有较好的结合活性，与 OVA 没有结合；#88/#90/#91/#92 分子与 OVA-MMAF 有特异性结合，但结合活性较弱。

实施例 5-4 竞争 ELISA 鉴定多肽分子与游离 MMAE 的结合活性

[656] 游离 MMAE 竞争性结合多肽分子鉴定

[657] 采用竞争实验进一步分析 PP-1A-#85/#93 是否与游离 MMAE 结合，而不与 MMAE 偶联抗体结合。

[658] 多肽竞争 ELISA 实验方法

[659] ①抗原包被：使用包被缓冲液包被 BSA-MMAF 于酶标板，浓度为 1 μL/mL，放置 4 度过夜约 16 h。

②封闭：包被抗原的酶标板，洗板机 PBST 清洗 1 遍，加入 Casein 溶液封闭，200 μL/孔，室温封闭 1 h。③一抗孵育：PBST 清洗 3 遍，加入 Casein 溶液稀释的多肽样品与截短的游离 MMAE/null-ADC 的预混液，多肽样品终浓度为 2000 nM，截短的游离 MMAE 和 null-ADC（一种不结合任何靶点的 IgG1 抗体偶联 MMAE）首孔浓度为 1000nM，以 10 倍梯度稀释。阳性对照为 ABC3320 分子，终浓度为 1.28 nM。室温孵育 2 h。④二抗孵育：PBST 清洗 3 遍，加入用 Casein 溶液稀释二抗的 Goat pAb to Hu IgG(HRP) (1:10000)，室温孵育 1 h。⑤显色：PBST 清洗 6 遍，每孔加入 100ul TMB 显色液，避光显色 2-10min。⑥终止：每孔加入 100ul 2M H2SO4 终止反应，用酶标仪读取 OD450 值，记录并保存。最后使用 GraphPad 软件分析数据。

[660] 竞争 ELISA 结果如图 35 显示，PP-1A-#85/#93 与 BSA-MMAF 的结合会被截短的游离 MMAE 阻断，而不会被 null-ADC 阻断，说明#85/#93 两个多肽分子与 MMAE 特异性结合，而不结合 null-ADC。

实施例 5-5 多肽分子的原核表达

[661] 抗体融合肽和 MMAE 的特异性结合鉴定

[662] 根据结合活性和竞争鉴定，选择 PP-1A-#85 分子构建 Anti-MSLN-MMAE 抗体融合肽，构建分子的形式如图 36 所示。载体构建后进行 BL21 菌株感受态化学转化，挑单克隆活化培养。活化的菌液经过测序确认序列无误后，以 1:100 的比例接种于 2 x YT 培养基(1/1000 Kan (50mg/mL))，37℃，220rpm，培养 1-2 h 至菌液 OD 值为 0.6-0.8。摇床温度调整为 16℃，待温度达到之后，在培养好的菌液中加入 IPTG 溶液(0.3mM)(Solarbio, Cat. 12.02.11020)， 16℃，220rpm 进行诱导培养 24 h。离心收集菌体，使用提前冷却的 PBS 溶液充分重悬菌体。重悬后的菌液进行超声破碎，功率为 120W，破碎时间约为 1.25h。超声破碎过程需维持菌液的低温状态。超声破碎后的菌液经多次离心收集上清，得到较为澄清的溶液，进行下一步蛋白纯化。

[663] 表 21. PP-1A-#600 氨基酸序列表

序列编号	代号	序列
SEQ ID NO:117	PP-1A-#600（PP-1A-#85 多肽 + MSLN VHH+ Fc）	ACDESHGVPHTSGMCGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAVSGFPLSSYGMSW ARQAPGEERELVAHIGTTGGSTNYADSV KGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDTA VYYCRARRQMPSNEYWGQGTTVTVSS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG

实施例 5-6 抗体融合肽与 MMAE 特异性结合验证

[664] 利用 ELISA 检测抗体融合肽分子 PP-1A-#600 分子（氨基酸序列如表 21）与 OVA-MMAF 和 OVA 的结合活性，验证其与 MMAE 的特异性结合。

[665] 多肽 ELISA binding 实验方法

[666] ①抗原包被：使用包被缓冲液包被 OVA-MMAF 和 OVA 蛋白于酶标板，浓度为 1μg/mL，放置 4℃过夜约 16 h。②封闭：包被抗原的酶标板，洗板机 PBST 清洗 1 遍，加入 Casein 溶液封闭，200 μL/孔，室温封闭 1 h。③一抗孵育：PBST 清洗 3 遍，加入首孔浓度为 2000nM，用 Casein 溶液 5 倍梯度稀释的多肽样品。阳性对照为 ABC3320 分子，阴性对照为 Fc.uIgG1 分子，浓度为 100nM。室温孵育 2 h。④二抗孵育：PBST 清洗 3 遍，用 Casein 溶液稀释二抗 Goat pAb to Hu IgG(HRP) (1:10000)，室温孵育 1 h。⑤显色：PBST 清洗 6 遍，每孔加入 100 μL TMB 显色液，避光显色 2-10min。⑥终止：每孔加入 100 μL 2M H_2SO_4 终止反应，用酶标仪读取 OD450 值，记录并保存。最后使用 GraphPad 软件分析数据。

[667] ELISA binding 结果如图 37 显示，PP-1A-#600 和 OVA-MMAF 有较强结合活性，而与 OVA 没有结合，显示良好的结合特异性。

实施例 5-7 细胞实验检测 MMAE 结合肽对毒素细胞毒性的抑制作用

[668] 采用 NCI-H292 肿瘤细胞系检测 PP-1A-#600 对 MMAE 毒性的抑制作用。

[669] ①NCI-H292 细胞消化处理，计数并按 5E3/孔铺板，每孔 60 μL，37 ℃培养箱贴壁。②多肽 PP-1A#600、

对照抗体 BMK219(ABC3320-Fc)及无义对照抗体 Null IgG 按 100 μg/ml 浓度起始，2-fold 稀释，10 个梯度。固定 MMAE 浓度分别为 1ng/mL、3ng/mL、5ng/mL 、10ng/mL。受试物与 MMAE 进行孵育，室温 2h。③将孵育样品加入 96 孔板内，60 μL/孔；37 ℃培养箱培养 3 天。④每孔加入 100 μL Cell Counting-Lite2.0 Reagent，摇床震荡 10min。⑤酶标仪读取荧光信号。

[670] 实验结果如图 38，结果表明，当 MMAE 浓度为 1，3，5，10 ng/mL 时，PP-1A-#600 融合分子均能够展现出良好的细胞保护作用。

实施例 6 特异性结合 DXD 的多肽筛选

实施例 6-1 噬菌体展示八/十五线性肽库的构建

[671] 随机八/十五线性肽寡核苷酸引物的合成

[672] 编码随机线性八肽及十五肽寡核苷酸片段的设计策略是采用 NNK 或 NHC 编码方式。其中 N 为任意核苷酸 (A/T/C/G)，K 为 G/T，H 为 A/C/T。合成的随机核苷酸序列见表 22。

[673] 表 22. 用于多肽库构建的核苷酸序列

名称	序列
八肽核苷酸序列	CTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCCAGG^CGGCCNHC(NNK)$_8$NHCGGTGGAGGTAGCGGCCAGGC^CGGCCAGCACCATCACCATCACCAT
十五肽核苷酸序列	CTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCCAGG^CGGCC(NHC)$_{15}$GGTGGAGGTAGCGGCCAGGC^CGGCCAGCACCATCACCATCACCAT
Exten-R 延伸引物	ATGGTGATGGTGATGGTGCT
Exten-R 对应肽链	(X)$_{8\ or15}$ Cys Gly Gly Gly Ser-gIII

[674] PCR 扩增双链 DNA 片段、pComb3XSS 噬菌体载体和 DNA 片段的酶切、连接与转化参照实施例 5-1 相关步骤进行。

[675] 肽库的鉴定

[676] 随机挑选 20-30 个克隆测序，序列比对分析多肽库的质量。

实施例 6-2 噬菌体展示肽库的富集筛选 DXD 结合肽

[677] 多肽噬菌体展示文库淘选

[678] 进行液相和固相淘选交叉策略，液相淘选实验方法：使用链霉亲和素磁珠（Magnosphere, Cat. MS300/Streptavidin ），使用前混匀磁珠和保护液，取所需浓度的磁珠用 PBS 充分清洗 3 次。负筛磁珠用于去除 phage 和磁珠的非特异性结合，使用 3% BSA (Bovogen, Cat. BSAS 0.1)溶液室温孵育封闭 30min。正筛磁珠中加入 1mL PBS 稀释的正筛抗原 biotin-DXD, 室温孵育结合 1h。分别取噬菌体展示文库 1.00E+13cfu，作为第一轮淘选的 input；第二轮淘选取上一轮富集的噬菌体展示文库作为 input 约 1.00E+13cfu。封闭后的负筛磁珠中加入 phage input，封闭液为 3% BSA 溶液，用 1xPBS 补齐体积。同时正筛的磁珠结合抗原后用 1xPBS 清洗后加入 3% BSA 溶液室温孵育封闭 1h。封闭后的正筛磁珠 PBS 清洗三次，加入去除非特异性结合后的 phage，室温结合 1h。PBST/PBS 清洗磁珠，随淘选轮数适当增加清洗强度，清洗后加入 1mL 0.1 M pH2.2 Gly-HCl 室温旋转洗脱 10min。收集洗脱液，酸洗的洗脱液中加入 100 μL 1M pH8.0 Tris-HCl 中和。

[679] 固相淘选实验方法：淘选前进行免疫管包被，免疫管用 PBS 清洗 3 次，吸干残液。根据免疫策略，免疫管分别包被负筛抗原和正筛抗原，使用 500 μL 包被缓冲液稀释至包被终浓度。室温 150rpm 混匀 2h 后，放置 4℃过夜约 16h。第三轮淘选取上一轮富集的噬菌体展示文库作为 input 约 1.00E+13cfu。Input 使用 Casein 溶液（Thermo scientific, Cat.37528）封闭，浓度为 50%，用 1xPBS 补齐体积至 500μL。包被正筛抗原的免疫管使用 1xPBS 清洗后，加入 1ml Casein 溶液封闭 1h。包被负筛蛋白的免疫管加入封闭后的 phage input，室温 150rpm 结合 1h，用于去除 phage 与毒素偶联蛋白的结合。包被正筛抗原的免疫管封闭后，清洗免疫管，将经过负筛的 phage 转入免疫管中，室温 150rpm 结合 1-2h。使用 1xPBST 清洗免疫管 3 次，清洗时放置于 150rpm 摇床上 1-2 min，加入 5nmol DXD 溶液，室温 150rpm 竞争洗脱 1h。将洗脱的 phage 加入 40ml OD0.6-0.8 TG1 菌液里，并加入终浓度为 2%的葡萄糖溶液。37℃侵染 45-60 分钟，每 15 min 温和摇晃菌液。侵染过后，取 100 μL 菌液稀释 10^1, 10^2, 10^3 三个梯度，取 100 μL 涂小平板（10cm*10cm 2YT-Amp-Glu），第二天统计单克隆数，监测 phage 的富集情况。取 1mL 菌液加入甘油，保存于-80℃。剩余的菌液中加入 1/1000 Amp (100mg/mL)和辅助噬菌体 M13KO7(Mol 20:1)(NEB, Cat. N0315S)，37℃静止侵染 1h。离心收集菌液，弃上清，加入 40mL 1/1000 Kan (50mg/mL)和 IPTG(50mg/mL) 的 2YT-Amp 液体培养基，30℃ 220rpm 过夜培养。过夜培养的菌液，10000 rpm 离心 10 min；收集上清，0.45 μM 过滤，加入 1/5 体积的 PEG-NaCl 沉淀。冰上放置 1h，4℃，10000rpm 离心 30 min，弃去上清，PBS 重悬沉淀，用

于淘选。Nanodrop 测定噬菌体的 OD260 值，根据 OD260 值确定用于淘选的噬菌体投入量，1OD 约为 3.0E+12。

[680] 多肽噬菌体展示文库单克隆筛选

[681] 96 孔板（sterile, round bottom），每孔中加入 600 μL 的 Amp+2YT 培养液。从 P8P/P12P P5 Round2/3 的平板挑单克隆进行培养。37℃，220rpm，3-6h 至 OD 0.6。制备的噬菌体用于 phage ELISA。取 150 μL 菌液转移至新的 96 孔板，加入甘油保存菌种于-80℃。96 孔板中加入辅助噬菌体 M13KO7（Mol 20:1），37℃静止感染 1h。加入 1/1000 Kan(50 mg/mL) and IPTG(50 mg/mL)，30℃ 220rpm 过夜培养。96 孔板过夜培养的噬菌体，4000 rpm 离心 30min；将上清(400 μL)转移到新的 96 孔板中，用于 phage ELISA。

[682] Phage ELSIA 实验方法

[683] 参照实施例 5-1 相关步骤进行。构建分子的形式如图 39 所示。

实施例 6-3 斑点印记筛选 DXD 特异性结合肽

[684] 待测样品准备：5000 rpm 离心 5 min 收集 IPTG 诱导过夜（16℃，16 h）的 50 mL 菌液，弃上清。加入 7 mL PBS 重悬细菌沉淀，200 W，破碎 5 min。12000 rpm 离心 20 min，收集上清待用。点样：将尼龙膜（碧云天，CAT#FFN10）裁剪成合适的大小，画线。使用移液器将 3 μL 的抗原样品（OVA 或 OVA-DXD，20μg/ml）点在膜上。点样时要注意点样量的一致性，以及点与点之间的间距，避免样品之间相互干扰。点样后，让膜在室温下自然干燥。封闭：将干燥后的膜放入封闭液（5%脱脂奶粉）中，在摇床上室温封闭 1-2 h，封闭的目的是防止非特异性结合，减少背景信号。洗涤：孵育一抗后，用洗涤缓冲液（PBST）充分洗涤膜，洗涤 3 次，每次 5 min，以去除未结合的一抗。二抗孵育：将膜放入含有适当稀释的二抗的溶液中，室温孵育 1-2 h。二抗是针对一抗的抗体，通常带有可检测的标记，如辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酶（AP）等。洗涤：用洗涤缓冲液再次洗涤膜，以去除未结合的二抗，洗涤 3 次，每次 5 min。显色：取适量 ECL 显色底物溶液到膜上，在室温下避光反应，凝胶成像仪观察显色情况，对膜进行拍照记录。通过观察斑点的有无、颜色深浅等，可以对样品中的目标蛋白质进行定性或半定量分析。

[685] 斑点印记结果如图 40 所示，实验结果表明，6553、6677、6678、6683、6685、6686、6689、6560、6551、6561、6562 号分子可特异性结合 DXD 的多肽。

[686] 表 23. 上述分子氨基酸序列表

序列编号	分子编号	代号	序列
SEQ ID NO:118	6551	PP-1A-#330（多肽）	VALTWYYPIYLFATR
SEQ ID NO:119	6553	PP-1A-#340（多肽）	ILTTVNVVPNTIHVR
SEQ ID NO:120	6677	PP-1A-#414（多肽）	ACLACWTSRSC
SEQ ID NO:121	6678	PP-1A-#415（多肽）	ACLSPWLFFWC
SEQ ID NO:122	6683	PP-1A-#426（多肽）	ACYPFGNPRGVRPSC
SEQ ID NO:123	6685	PP-1A-#428（多肽）	ACWTLWLPLLPLGSC
SEQ ID NO:124	6686	PP-1A-#417（多肽）	ACGSLSWRNCGSYRC
SEQ ID NO:125	6689	PP-1A-#431（多肽）	ACSQCVLLPPPQSVC
SEQ ID NO:126	6560	PP-1A-#358（多肽）	AHNVEILPPFDYTLS
SEQ ID NO:127	6561	PP-1A-#362（多肽）	LTVAMITTSRITTSN
SEQ ID NO:128	6562	PP-1A-#367（多肽）	APPTFPVSTSVVISR

实施例 6-4 细胞实验检测 DXD 结合肽对毒素细胞毒性的抑制作用

[687] 采用 NCI-H292 肿瘤细胞检测 DXD 结合多肽对 DXD 细胞毒性的抑制作用。

[688] NCI-H292 细胞消化处理，计数并按 5E3/孔铺板，每孔 60 μL，37℃培养箱贴壁。多肽分子及无义对照抗体 Null IgG 按 100μg/ml 浓度起始，2-fold 稀释，7 个梯度。固定 DXD 浓度为 1ng/mL。受试物与 DXD 进行孵育，室温 2h。将孵育样品加入 96 孔板内，60 μL/孔；37 ℃培养箱培养 3 天。每孔加入 100 μL Cell Counting-Lite2.0 Reagent，摇床震荡 10min。用酶标仪读取荧光信号。

[689] 实验结果如图 41 所示，结果表明多肽 PP-1A#414、PP-1A#340、PP-1A#415、PP-1A#417 展现出细胞保护作用，其中 PP-1A#414 的活性最佳。

实施例 7 基于虚拟技术筛选特异性结合 MMAE 的多肽

实施例 7-1 虚拟多肽库的生成和筛选

[690] 虚拟多肽库的生成

[691] 在初步建立中，使用 20 个天然氨基酸通过排列组合生成天然三肽库，含有共计 8000 个三肽；使用结构预测软件对三肽库进行批量结构预测后，分别与小分子化合物 MMAE 进行批量分子对接；通过亲和

力结果筛选出前 50 的三肽，并在每个可能的位置插入 20 种不同的天然氨基酸，排除重复序列后以此生成新的四肽；以此类推，同样的方法被后续应用于生成五肽、六肽、七肽、八肽库等。

[692] 虚拟多肽库的筛选

[693] 分子对接：使用 AutoDock Vina 对接软件对预测的多肽和小分子进行分子对接，将 MMAE 用于 ADC 偶联的 N 端设置为 binding pocket，num_modes 参数设置为 10，energy_range 参数分别设置为 5，以及 exhaustiveness 参数设置为 16；采用柔性对接模式，以 MMAE 的 N 端为结合中心，多肽进行灵活结合；对接完成后对所有对接构象进行排序，结合自由能越低，越有可能是潜在的最佳结合模式，以此虚拟筛选高亲和力多肽。

[694] 表 24. 亲和力数据

七肽		
编号	代号	亲和力
ligand1765	PP-1B-#56	-5.3
ligand6244	PP-1B-#57	-5.1
ligand124	PP-1B-#58	-4.9
ligand4139	PP-1B-#59	-4.9
ligand1514	PP-1B-#60	-4.8
ligand5681	PP-1B-#61	-4.8
ligand2675	PP-1B-#62	-4.7
ligand27	PP-1B-#63	-4.7
ligand574	PP-1B-#64	-4.7
ligand6481	PP-1B-#65	-4.7
ligand11	PP-1B-#66	-4.6
ligand4685	PP-1B-#67	-4.6
ligand4766	PP-1B-#68	-4.6
ligand488	PP-1B-#69	-4.6
ligand283	PP-1B-#70	-4.5
ligand3337	PP-1B-#71	-4.5
ligand3948	PP-1B-#72	-4.5
ligand6128	PP-1B-#73	-4.5
ligand2770	PP-1B-#74	-4.4

[695] 因此，在上述候选分子中，多肽 PP-1B-#74 表现出较高亲和力，其序列为：YYVAWRW（SEQ ID NO:129）。

实施例 7-2 多肽分子构建及表达纯化

[696] 多肽分子构建

[697] 通过引物设计，将多肽片段 PP-1B-#74 连接至 Fc 的 C 端，构建生产 Fc 融合多肽的质粒，氨基酸序列信息见 SEQ ID NO:130。

[698] SEQ ID NO:130：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGGSGGGSYYVAWRW

[699] 多肽分子表达及纯化

[700] HEK293SQ 细胞于 Expi293 表达培养基中培养。使用 ExpiFectamine 293 转染试剂盒，并按照制造商的说明进行瞬时转染，转染 20h 后添加转染增强剂，120h 后收集上清液进行后续蛋白纯化；分别用 0.1 M NaOH 和 PBST 活化磁珠，加入上清液室温孵育 1.5 h 后，分别用 PBST 和水清洗杂质，用 1000 μL 洗脱 buffer 洗脱目的蛋白，用 4-12% SDS-PAGE 测定样品的纯度。

实施例 7-3 Fc 融合多肽和 MMAE 的特异性结合鉴定

[701] 对构建的 Fc 融合多肽 PP-1B-#70-#74 分子分别与 OVA-MMAF 和 OVA 的结合进行鉴定，筛选与 MMAE 结合特异性较好的分子；经第一轮初筛后，进一步验证#74 与 OVA-MMAF 以及 BSA-MMAF 的结合特异性；

[702] 多肽 ELISA binding 实验方法

[703] ①抗原包被：使用包被缓冲液包被 MMAF 偶联蛋白及阴性蛋白于酶标板，浓度为 1 μg/mL，放置 4℃

过夜约 16 h；②封闭：包被抗原的酶标板，洗板机 PBST 清洗 1 遍，加入 Casein 溶液封闭，200 μL/孔，室温封闭 1 h；③一抗孵育：PBST 清洗 3 遍，加入首孔浓度为 2000 nM，用 Casein 溶液 5 倍梯度稀释的多肽样品，室温孵育 2 h；④二抗孵育：PBST 清洗 3 遍，加入用 Casein 溶液稀释的二抗 Goat pAb to Hu IgG(HRP) (1:10000) (Abcam, Cat. Ab97225)，室温孵育 1 h；⑤显色：PBST 清洗 6 遍，每孔加入 100 μL TMB 显色液，避光显色 2-10min；⑥终止：每孔加入 100 μL 2M H_2SO_4 终止反应，用酶标仪读取 OD450 值，记录并保存。最后使用 GraphPad 软件分析数据。

[704] 实验结果如图 42 所示，结果表明，PP-1B-#74 分子能够与 OVA-MMAF 和 BSA-MMAF 发生特异性结合。

实施例 7-4 游离的 MMAE 竞争性结合多肽分子鉴定

[705] 根据多肽分子结合活性结果，对 PP-1B-#74 分子进一步验证与 MMAE 的特异性结合，通过竞争实验进行验证。

[706] 多肽竞争 ELISA 实验方法

[707] ①抗原包被：使用包被缓冲液包被 BSA-MMAF 于酶标板，浓度为 1 μg/mL，放置 4℃过夜约 16 h；②封闭：包被抗原的酶标板，洗板机 PBST 清洗 1 遍，加入 Casein 溶液封闭，200 μL/孔，室温封闭 1 h；③一抗孵育：PBST 清洗 3 遍，加入 Casein 溶液稀释的多肽样品与截短的游离 MMAE/null-ADC 的预混液，多肽样品终浓度为 2000 nM，截短的游离 MMAE 和 null-ADC 首孔浓度为 1000 nM，以 10 倍梯度稀释，室温孵育 2 h；④二抗孵育：PBST 清洗 3 遍，加入用 Casein 溶液稀释二抗的 Goat pAb to Hu IgG(HRP) (1:10000)，室温孵育 1 h；⑤显色：PBST 清洗 6 遍，每孔加入 100 μL TMB 显色液，避光显色 2-10 min；终止：每孔加入 100 μl 2M H_2SO_4 终止反应，用酶标仪读取 OD450 值，记录并保存。⑥最后使用 GraphPad 软件分析数据。

[708] 实验结果如图 43 显示，结果表明，PP-1B-#74 分子能够与 MMAE 发生特异性结合。

实施例 8 特异性结合 MMAE 的适配体筛选

实施例 8-1 第一轮适配体的合成与筛选

[709] 合成以下序列所示的单链 DNA 文库和引物

[710] 表 25. 适配体文库和引物

名称	序列
Pool-A-30N-N	CAGCACCGTCAACTGAATNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNGTGATGCGATGGAGATGT
1214-F	CAGCACCGTCAACTGAAT
1214-R、1214-R-5B	ACATCTCCATCGCATCAC

[711] 其中：文库由 66 个碱基长度的单链 DNA 构成，中间为 30 个碱基的随机序列（N），两端为固定引物序列，5B 指 5'端带 Biotin 修饰。1214-F 及 1214-R-5B 用于每轮对称 PCR，1214-F 和 1214-R 用于对待测序文库进行扩增，单链 DNA 文库和引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

[712] 适配体筛选

[713] 初始 ssDNA 文库 12000 rpm 离心 1 min 后，用 100 μL Binding buffer 溶解（D-PBS 中加 5 mM 终浓度的 $MgCl_2$，即 DPBS 含 5 mM Mg^{2+}），DNA 总量为 1-5 nmol。95℃金属浴 5 min，立即放冰上冷却 5 min。该过程用于文库的变复性，使适配体的构象重新折叠，复性结束后加入 100 μL Binding buffer，加入孔板中备用。使用包被 3%BSA 的空酶标作为负筛，包被了 BSA-MMAF 的免疫管作为正筛，在正筛的孔板中加入复性后的适配体文库，室温孵育 120 min，使构象折叠后的适配体与靶标 MMAF 充分结合。孵育结束后弃去上清，用含 DPBS 或 DPBST 溶液洗涤后加入 200 μL 洗脱液洗脱（20 mmol/L Tris-HCl，4 mol/L 异硫氰酸胍，1 mmol/L 二硫苏糖醇（pH 8.3）），80 ℃孵育 15 min，洗下结合在单抗上的 ssDNA，收集洗脱液。以洗脱液为模板进行第一轮 PCR 扩增，体系为：200 μL 模板，400 μL PrimeStar Max，32 μL 1214-F，32 μL 1214-R，332 μL ddH_2O，总体系为 800 μL，每个 PCR 管分装 80 μL。反应条件 95 ℃预变性 2 min；95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 5 s，72 ℃延伸 5 s，扩增 6 个循环；最后 72 ℃延伸 2 min。

[714] 为确定 PCR 的最佳循环数，取 100 μL 第一轮 PCR 产物作为模板，按照上右表反应体系配制，从中取 80 μL 分别加入 4 个 PCR 管，分别扩增 2，4，6，8 个循环，随即进行 3%琼脂糖凝胶电泳，选择条带清晰，无非特异性扩增的轮数进行第三次 PCR，第三次 PCR 反应体系和循环数优化体系一致，剩余混合物按照优化后的循环数进行扩增。

[715] 生物素化的 PCR 产物中加入一定量的链霉亲和素磁珠，室温下摇床孵育 15min。1xPBS 清洗两遍后加入 200 mM NaOH 孵育 5 min，使 DNA 双链在碱性环境中解开变为单链。上磁力架，使含生物素的一条 ssDNA 留在链霉亲和素磁珠上并吸附在管壁，而另一条不带生物素的 ssDNA 存在于上清中，收集得到的 ssDNA 次级文库，乙醇沉淀法纯化（1/10 3 M NaAC 和 2.5 倍体积的无水乙醇，上下颠倒混匀后置于-80 ℃

冰箱沉降过夜。次日直接取出于 4 ℃ 13000 rpm 离心 10 min，倒掉上清后，加入 1 mL 75%乙醇洗涤，4 ℃ 13000 rpm 离心 10 min。弃去上清，吹干后用 50 μL Binding buffer 溶解沉淀并利用 Nanodrop 检测浓度。取 1 μg DNA 作为次级文库进行下一轮筛选，多余部分保存在-20 ℃冰箱）。

[716] 每一轮通过调整靶标用量、孵育时间及清洗条件来改变筛选压力。正筛抗原从 100 μg 到 30 μg 逐轮降低，正筛时间从 120 min 到 30 min 逐轮降低。负筛抗原为 10 μg 以去除非特异结合的序列，孵育时间从 20 min 逐轮增加至 60 min。

[717] 第一轮共筛选得到 P-#1-P-#6 共计 6 条适配体。

[718] 表 26. 适配体序列

序列编号	代号	序列
SEQ ID NO:131	P-#1	CAGCACCGTCAACTGAATGAAATGCGTGAAAGTTCGAAAATAGTTCTCGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:132	P-#2	CAGCACCGTCAACTGAATCGGGGCACGCAATTCGTAGTGTTAAGTTGTGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:133	P-#3	CAGCACCGTCAACTGAATCTACGCGTGATGCATATTGGTCGAGCGGGGGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:134	P-#4	CAGCACCGTCAACTGAATGAAAAGCGCAAATCTGGCTAACATAGGCTCGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:135	P-#5	CAGCACCGTCAACTGAATGATCCAGAAAACGGCGACCGTCTCAGCGTAGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:136	P-#6	CAGCACCGTCAACTGAATAGATTCAAGGTCTTGCCGGGATATCGCCATGTGATGCGATGGAGATGT

实施例 8-2 第二轮适配体的合成与筛选

[719] 合成以下序列所示的单链 DNA 文库和引物

[720] 表 27. 适配体文库和引物

名称	序列
N10+N40-Cap-libr	CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTNNNNNNNNNNCTGCAGCGATTCTTGATCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTAAGCTTGCACCCGCATCGT
Capture oligo(10+40)	biotin-TACCGCAAAAAAAAACAAGAATCGCTGCAG
P1(10+40)	CCTGCCACGCTCCGCAAG
P2(10+40), P2-B(10+40)	ACGATGCGGGTGCCAAGCTTA

[721] 其中：文库由 110 个碱基长度的单链 DNA 构成。

[722] 适配体筛选

[723] 初始 ssDNA 文库 12000 rpm 离心 1 min 后，用 1 mL ddH_2O 溶解，DNA 总量为 1-5 nmol，再加入 Capture oligo(10+40) 室温旋转混合孵育 60 min， Capture oligo(10+40)与 ssDNA 按照 1.2：1 的摩尔质量比例投入。孵育结束后的样品中加入链霉亲和素磁珠（根据磁珠承载生物素的量，磁珠的承载量与 Biotin 的比例为 1.5:1），孵育 30 min 后，将 EP 管置于磁力架上，静置 30s，弃去上清，用 1xPBS 清洗三遍。加入 15 nmol truncated MMAE，室温旋转孵育 120min，靶向 MMAE 的适配体会发生构象转换，从 Capture oligo 上脱落，转换成结合 MMAE 的构象。孵育结束后，收集上清，以收集到的上清为模板进行第一轮 PCR 扩增，体系为：全部模板，400 μL PrimeStar Max，32 μL P1(10+40)，32 μL P2(10+40)，332 μL ddH_2O，总体系为 800 μL，每个 PCR 管分装 80 μL。反应条件 95 ℃预变性 2 min；95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 5 s，72 ℃延伸 5 s，扩增 6 个循环；最后 72 ℃延伸 2 min。

[724] 为确定 PCR 的最佳循环数，取 100 μL 第一轮 PCR 产物作为模板，按照下表反应体系配制，从中取 80 μL 分别加入 4 个 PCR 管，分别扩增 2，4，6，8 个循环，随即进行 3%琼脂糖凝胶电泳，选择条带清晰，无非特异性扩增的轮数进行第三次 PCR，第三次 PCR 反应体系和循环数优化体系一致，剩余混合物按照优化后的循环数进行扩增。

[725] 生物素化的 PCR 产物中加入一定量的链霉亲和素磁珠，室温下摇床孵育 15min。1xPBS 清洗两遍后加入 200 mM NaOH 孵育 5 min，使 DNA 双链在碱性环境中解开变为单链。上磁力架，使含生物素的一条 ssDNA 留在链霉亲和素磁珠上并吸附在管壁，而另一条不带生物素的 ssDNA 存在于上清中，收集得到的 ssDNA 次级文库，乙醇沉淀法纯化（1/10 3 M NaAC 和 2.5 倍体积的无水乙醇，上下颠倒混匀后置于-80 ℃冰箱沉降过夜。次日直接取出于 4 ℃ 13000 rpm 离心 10 min，倒掉上清后，加入 1 mL 75%乙醇洗涤，4 ℃ 13000 rpm 离心 10 min。弃去上清，吹干后用 50 μL Binding buffer 溶解沉淀并利用 Nanodrop 检测浓度。取

1 μg DNA 作为次级文库进行下一轮筛选，多余部分保存在-20 ℃冰箱）。

[726] 使用偶联了 vc 的 MMAE 作为负筛抗原， 偶联了生物素的 MMAF 作为正筛抗原。每一轮通过调整靶标用量、孵育时间及清洗条件来改变筛选压力。正筛抗原从 15nmol 到 0.12 nmol 逐轮降低，正筛时间从 120 min 到 60 min 逐轮降低。从第三轮开始加入负筛步骤以去除与链霉亲和素磁珠非特异结合的序列，孵育时间从 30 min 逐轮增加至 60 min。每一轮孵育结束后收集上清，以上清中结合 MMAE 的 ssDNA 作为模板用于后续的 PCR 和单链化步骤。

[727] 第二轮筛选得到 PP-1-#148- PP-1-#153 共计 6 条适配体。

[728] 表 28. 适配体序列

序列编号	代号	序列
SEQ ID NO:137	PP-1-#148	CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTAGTCATAGTAC TGCAGCGATTCTTGATCGTAATACTAGCTAACT CTTGGCACTAGAAGAGATTGAGTCCTAAGCTT GCACCCGCATCGT
SEQ ID NO:138	PP-1-#149	CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTTGAACGGATTC TGCAGCGATTCTTGATCGTTACTTGGGCATTAT CGTCATCAGCTTTCATGAGTAAGGGTAAGCTT GCACCCGCATCGT
SEQ ID NO:139	PP-1-#150	CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTCTATTGACTTCT GCAGGATTCTTGATCGCAAACATTGTCAGATG CGAGGTTGACAGCTGTAGTTACACTAAGCTTG CACCCGCATCGT
SEQ ID NO:140	PP-1-#151	CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTCCTATCATGCCT GCAGCGATTCTTGATCGGATTAGTGTTTGCTAC CTGTTTCTAGCAGTCCGTAGCTCATAAGCTTGC ACCCGCATCGT
SEQ ID NO:141	PP-1-#152	CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTGTTATACGCCCT GCAGCGATTCTTGATCGTTCGTCTCCGATCCCA GCCTTACTACCGCTTTTTAGATGCTAAGCTTGC ACCCGCATCGT
SEQ ID NO:142	PP-1-#153	CCTGCCACGCTCCGCAAGCTTCCTTCTGGTCC TGCAGCGATTCTTGATCGGCTATCTCGCCTATA GTCTCGACGTAGTATGCAGGCATGCTAAGCTT GCACCCGCATCGT

实施例 8-3 抗原结合实验

[729] 实验步骤

[730] 包被：在 96 孔酶标板上分别包被 1 μg/mL 的 BSA-MMAF 及 BSA、OVA-MMAF 及 OVA，4℃过夜。封闭：包被抗原的 96 孔板，洗板机 PBST 清洗 1 遍，加入 2% casein 封闭，200 μL/孔，37℃封闭 1h。一抗：PBST 清洗 3 边，每孔加入用 binding buffer 稀释后的适配体，首孔浓度为 3 μM，3 倍稀释 8 个梯度，小心充分吹打混匀， 37℃孵育 1-2h。二抗：用 PBST 洗 3 遍，用 binding buffer 稀释二抗 Streptavidin-HRP（1：10000），37℃，孵育 1h。显色：用 DPBST（含 5mM Mg^{2+}）洗 6 遍，每孔加入 100 μL TMB 显色液，避光显色 2-10 min。终止：每孔加入 100 μL ELISA 终止液，用酶标仪读取 OD450 值，记录并保存。

[731] 实验结果如图 44 所示，结果表明 P-#3、 P-#4、PP-1-#148、PP-1-#151 可特异性结合 MMAF。

实施例 8-4 抗体-适配体偶联物的制备

[732] 利用 DBCO-PEG8-NHS 连接子中的 NHS 活性酯基团与抗体上伯胺基团发生反应从而引入 DBCO 基团，DBCO 基团与适配体中的叠氮基基团发生炔-叠氮环加成反应（SPAAC）共价结合获得抗体-适配体偶联物。

[733] 实验步骤

[734] 取 1mg 抗体，按摩尔比加入 12 倍摩尔当量的 DBCO-PEG8-NHS (MCE, 2553412-88-5)，在 25℃条件下反应 3h，反应完成后使用离心脱盐柱（Zeba™,7K 0.5mL）置换到 PBS 中；在脱盐后的上述样品中加入 4 倍摩尔当量的被叠氮基修饰的适配体，置于 4℃条件下过夜反应。反应完成后使用超滤浓缩管（ThermoFisher, 100K MW, 88503）将上述样品置换至 PBS 中即得抗体-适配体偶联物，构建的抗体-适配体偶联物示意图如图 45 所示。

实施例 9 特异性结合 DXD 的适配体筛选

实施例 9-1 适配体的合成与筛选

[735] 合成以下序列所示的单链 DNA 文库和引物

[736] 表 29. 适配体文库和引物

名称	序列
Pool-A-30N-N	CAGCACCGTCAACTGAATNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNGTGATGCGATGGAGATGT
1214-F	CAGCACCGTCAACTGAAT
1214-R、1214-R-5B	ACATCTCCATCGCATCAC

[737] 其中：文库由 66 个碱基长度的单链 DNA 构成，中间为 30 个碱基的随机序列（N），两端为固定引物序列，5B 指 5'端带 Biotin 修饰。1214-F 及 1214-R-5B 用于每轮对称 PCR，1214-F 和 1214-R 用于对待测序文库进行扩增，单链 DNA 文库和引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

[738] 适配体筛选

[739] 初始单链 DNA 文库 12000 rpm 离心 1 min 后，用 100 μL Binding buffer 溶解（D-PBS 中加 5 mM 终浓度的 $MgCl_2$，即 DPBS 含 5 mM Mg^{2+}），DNA 总量为 1-5 nmol。95℃金属浴 5 min，立即放冰上冷却 5 min。该过程用于文库的变复性，使适配体的构象重新折叠，复性结束后加入 900 μL Binding buffer。加入 0.5 μg DXD-Biotin，室温旋转孵育 120min，使构象折叠后的适配体与靶标 DXD 充分结合。孵育结束后的样品中加入链霉亲和素磁珠（根据磁珠承载生物素的量，磁珠的承载量与 Biotin 的比例为 1.5:1），孵育 15min 后，将 EP 管置于磁力架上，静置 30s，弃去上清，用 1xPBS 清洗三遍。以清洗后的磁珠为模板进行第一轮 PCR 扩增，体系为：全部模板，400 μL PrimeStar Max，32 μL 1214-F，32 μL 1214-R，332 μL ddH_2O，总体系为 800 μL，每个 PCR 管分装 80 μL。反应条件 95 ℃预变性 2 min；95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 5 s，72 ℃延伸 5 s，扩增 6 个循环；最后 72 ℃延伸 2 min。

[740] 为确定 PCR 的最佳循环数，取 100 μL 第一轮 PCR 产物作为模板，250 μL PrimeStar Max，20 μL 1214-F，20 μL 1214-R-5B，110 μL ddH_2O，从中取 80 μL 分别加入 4 个 PCR 管，分别扩增 2，4，6，8 个循环，随即进行 3%琼脂糖凝胶电泳，选择条带清晰，无非特异性扩增的轮数进行第三次 PCR，第三次 PCR 反应体系和循环数优化体系一致，剩余混合物按照优化后的循环数进行扩增。

[741] 生物素化的 PCR 产物中加入一定量的链霉亲和素磁珠，室温下摇床孵育 15min。1xPBS 清洗两遍后加入 200 mM NaOH 孵育 5 min，使 DNA 双链在碱性环境中解开变为单链。上磁力架，使含生物素的一条 ssDNA 留在链霉亲和素磁珠上并吸附在管壁，而另一条不带生物素的 ssDNA 存在于上清中，收集得到的 ssDNA 次级文库，乙醇沉淀法纯化(1/10 3 M NaAC 和 2.5 倍体积的无水乙醇，上下颠倒混匀后置于-80 ℃冰箱沉降过夜。次日直接取出于 4 ℃ 13000 rpm 离心 10 min，倒掉上清后，加入 1 mL 75%乙醇洗涤，4 ℃ 13000 rpm 离心 10 min。弃去上清，吹干后用 50 μL Binding buffer 溶解沉淀并利用 Nanodrop 检测浓度。取 1 μg DNA 作为次级文库进行下一轮筛选，多余部分保存在-20 ℃冰箱。

[742] 使用链霉亲和素磁珠作为负筛抗原， 偶联了生物素的 DXD 作为正筛抗原。每一轮通过调整靶标用量、孵育时间及清洗条件来改变筛选压力。共进行六轮筛选，正筛抗原从 0.5 μg 到 0.2 μg 逐轮降低，正筛时间从 120 min 到 60 min 逐轮降低。从第三轮开始加入负筛步骤以去除与链霉亲和素磁珠非特异结合的序列，孵育时间从 30 min 逐轮增加至 60 min。每一轮孵育结束后弃去上清，用含 0.01% - 0.05% Tween20 的 PBST 溶液洗涤后再用 1xPBS 洗涤，弃去上清，与磁珠结合的 ssDNA 作为模板用于后续的 PCR 和单链化步骤。

[743] 筛选得到 D-#3-D-#18 共计 14 条适配体。

[744] 表 30. 适配体序列

序列编号	代号	序列
SEQ ID NO:143	D-#3	CAGCACCGTCAACTGAATTCCGTGGAGCCGTGGGT TATCCGTGCGACCGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:144	D-#4	CAGCACCGTCAACTGAATCCGTGTGGATCCGTGCC TGCCGTGTCCACCGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:145	D-#5	CAGCACCGTCAACTGAATCCGCCGCGACCGTGTGT TAGCCGTGGAGCCGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:146	D-#6	CAGCACCGTCAACTGAATCCGCGGGAACCGTGTCT GACCGTGTGACCCGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:147	D-#7	CAGCACCGTCAACTGAATCGTGCAAAGCCGTATGA TGTGCGTAGCCGTGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:148	D-#8	CAGCACCGTCAACTGAATCCGTGGGCGCGCGCCTT TGCTGCTGCAACCCGTGATGCGATGGAGATGT

SEQ ID NO:149	D-#9	CAGCACCGTCAACTGAATCCGTGTAGAGCCGTGTA TCCGTGCGGCACCGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:150	D-#10	CAGCACCGTCAACTGAATCGTGGGGGAGGGTGGG GTGCGAAATGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:151	D-#13	CAGCACCGTCAACTGAATCGTGCAAAGCCGTGTCT CCGTGCGTGCCGTGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:152	D-#14	CAGCACCGTCAACTGAATCGTGTGACCCGTGTATA CCGTGGGAGCCGTGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:153	D-#15	CAGCACCGTCAACTGAATCCGTGGGAGCCGCGAA CCACCGTGCGACCCGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:154	D-#16	CAGCACCGTCAACTGAATCCGGGCGGCGGCGGGC CCCTGCCGTGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:155	D-#17	CAGCACCGTCAACTGAATTCTGGGAACCGTGTGAA ACCGTGTGACCGTGTGATGCGATGGAGATGT
SEQ ID NO:156	D-#18	CAGCACCGTCAACTGAATGAGGCTCTGAATCCGTG TGAAACCGTGTGAGTGATGCGATGGAGATGT

[745] 为提高适配体亲和力，在适配体的两端分别加上一段互补序列进行改造：

[746] 表 31. 改造后的适配体序列

序列编号	代号	序列
SEQ ID NO:157	Capture D-#3	GGAGGCTCTCGGGACGACCAGCACCGTCAACT GAATTCCGTGGAGCCGTGGGTTATCCGTGCGAC CGTGATGCGATGGAGATGTGTCGTCCCGATCAC TTGAATGGTCT
SEQ ID NO:158	Capture D-#5	GGAGGCTCTCGGGACGACCAGCACCGTCAACT GAATCCGCCGCGACCGTGTGTTAGCCGTGGAGC CGTGATGCGATGGAGATGTGTCGTCCCGATCAC TTGAATGGTCT
SEQ ID NO:159	Capture D-#6	GGAGGCTCTCGGGACGACCAGCACCGTCAACT GAATCCGCGGGAACCGTGTCTGACCGTGTGACC CGTGATGCGATGGAGATGTGTCGTCCCGATCAC TTGAATGGTCT
SEQ ID NO:160	Capture D-#7	GGAGGCTCTCGGGACGACCAGCACCGTCAACT GAATCGTGCAAAGCCGTATGATGTGCGTAGCCG TGTGATGCGATGGAGATGTGTCGTCCCGATCAC TTGAATGGTCT
SEQ ID NO:161	Capture D-#14	GGAGGCTCTCGGGACGACCAGCACCGTCAACT GAATCGTGTGACCCGTGTATACCGTGGGAGCCG TGTGATGCGATGGAGATGTGTCGTCCCGATCAC TTGAATGGTCT
SEQ ID NO:162	Capture D-#17	GGAGGCTCTCGGGACGACCAGCACCGTCAACT GAATTCTGGGAACCGTGTGAAACCGTGTGACCG TGTGATGCGATGGAGATGTGTCGTCCCGATCAC TTGAATGGTCT

实施例 9-2 抗原结合实验

[747] 实验步骤

[748] 包被：在 96 孔酶标板上分别包被 1 μg/mL 的 OVA-DXD 及 OVA，4℃过夜。封闭：包被抗原的 96 孔板，洗板机 PBST 清洗 1 遍，加入 2% casein 封闭，200 μL/孔，37℃封闭 1h。一抗：PBST 清洗 3 遍，每孔加入用 binding buffer 稀释后的适配体，首孔浓度为 3 μM，3 倍稀释 8 个梯度，小心充分吹打混匀，37 ℃孵育 1-2h。二抗：用 PBST 洗 3 遍，用 binding buffer 稀释二抗 Streptavidin-HRP(1：10000)，37℃，孵育 1h。显色：用 DPBST（含 5mM Mg^{2+}）洗 6 遍，每孔加入 100 μL TMB 显色液，避光显色 2-10 min。终止：每孔加入 100 μL ELISA 终止液，用酶标仪读取 OD450 值，记录并保存。

[749] 实验结果如图 46，结果表明 D-#5/D-#14/D-#17 可以特异性结合 DXD，且经过改造后，Capture D-#5/Capture D-#14/ Capture D-#17 与 DXD 的结合亲和力显著提高。

实施例 9-3 游离 DXD 竞争结合实验

[750] 实验步骤

[751] 包被：在 96 孔酶标板上分别包被 1 μg/mL 的 OVA-DXD，4℃过夜。封闭：包被抗原的 96 孔板，洗

板机 PBST 清洗 1 遍，加入 2% casein 封闭，200 μL/孔，37℃封闭 1h。一抗：PBST 清洗 3 边，每孔加入用 binding buffer 稀释后的适配体，抗体浓度为 2000nM，DXD 及 GGFG-DXD 首孔浓度为 20 μM，3 倍稀释 8 个梯度，稀释后的 DXD 与适配体体积按照 1：1 混合，小心充分吹打混匀， 37℃孵育 1-2h。二抗：用 PBST 洗 3 遍，用 binding buffer 稀释二抗 Streptavidin-HRP(1：10000)，37℃，孵育 1h。显色：用 DPBST 洗 6 遍，每孔加入 100 μL TMB 显色液，避光显色 2-10 min。终止：每孔加入 100 μL ELISA 终止液，用酶标仪读取 OD450 值，记录并保存。

[752] 实验结果如图 47，结果表明 D-#5/D-#14/D-#17 亲本和改造后的分子 Capture D-#5/Capture D-#14/Capture D-#17 均能竞争结合游离的 DXD。

实施例 9-4 抗体-适配体偶联物的制备

[753] 利用 DBCO-NHS 或 DBCO-PEG8-NHS 连接子中的 NHS 活性酯基团与抗体上伯胺基团发生反应从而引入 DBCO 基团，DBCO 基团与适配体中的叠氮基基团发生炔-叠氮环加成反应（SPAAC）共价结合获得抗体-适配体偶联物。具体实验步骤为：

[754] 实验步骤

[755] 取 1mg 抗体，按摩尔比加入 12 倍摩尔当量的 DBCO-NHS (MCE,1384870-47-6)或 DBCO-PEG8-NHS (MCE, 2553412-88-5)，在 25℃条件下反应 3h，反应完成后使用离心脱盐柱（Zeba™,7K 0.5mL ）置换到 PBS 中；在脱盐后的上述样品中加入 4 倍摩尔当量的被叠氮基修饰的适配体，置于 4℃条件下过夜反应。反应完成后使用超滤浓缩管（ThermoFisher, 100K MW, 88503）将上述样品置换至 PBS 中即得抗体-适配体偶联物，构建的抗体-适配体偶联物示意图如图 48 所示。

实施例 9-5 抗体-适配体偶联物的抗原结合实验

[756] 实验结果如图 49，结果表明构建的抗体-适配体偶联物 PP-1D#501、PP-1D#502、PP-1D#503、PP-1D#504 均可特异性结合 DXD。

实施例 9-6 细胞保护实验

[757] 实验结果如图 50，结果表明 capture D-#5-RS920-#101、D-#14-RS920-#101、capture D-#17-RS920-#101 均能够有效抑制 DXD 毒性，并对细胞均有不同程度的保护作用。

实施例 10 PR-ADC（Payload Recycling-Antibody Drug Conjugates）、常规 ADC 的制备方法

实施例 10-1 PR-ADC（CDCP1A9-DL01-MMAE、CDCP1A12-DL01-MMAE、Nectin4A14-DL01-MMAE、CDCP1A10-DL01-MMAE）的制备

[758] CDCP1A9-DL01-MMAE 的构型示意图如图 2 所示，其中配体单元是一种靶向 CDCP1 的 IgG 抗体（CDCP1A9），回收单元是抗 MMAE 的 scFv，二者构成抗 CDCP1-IgG+抗 MMAE-scFv 双特异性抗体，双特异性抗体-连接子-药物结构示意图如图 55 所示。

[759] CDCP1A12-DL01-MMAE 的构型示意图如图 54 所示，其中配体单元是一种靶向 CDCP1 的 scFv（CDCP1A12），回收单元是抗 MMAE 的 IgG 抗体，二者构成抗 CDCP1-scFv+抗 MMAE-IgG 双特异性抗体，双特异性抗体-连接子-药物结构示意图如图 55 所示。

[760] Nectin4A14-DL01-MMAE 的构型示意图如图 56 所示，其中回收单元是抗 MMAE 的 scFv，配体单元是一种靶向 Nectin-4 的 IgG 抗体（Nectin4A14），二者构成抗 MMAE-scFv+抗 Nectin-4-IgG 双特异性抗体，双特异性抗体-连接子-药物结构示意图如图 55 所示。

[761] CDCP1A10-DL01-MMAE 的构型示意图如图 56 所示，其中回收单元是抗 MMAE 的 scFv，配体单元是一种靶向 CDCP1 的 IgG 抗体（CDCP1A10），二者构成抗 MMAE-scFv+抗 Nectin-4-IgG 双特异性抗体，双特异性抗体-连接子-药物结构示意图如图 55 所示。

[762] 制备方法

[763] 用纯化水分别配制还原剂和金属螯合剂如下：5mM TCEP (Tris-2-carboxyethyl-phosphine)、10 mM DTPA (Diethylene triamine pentacetate acid)母液，10mg/mL 上述对应的双特异性抗体，加入体积比 10%的 DTPA，TCEP 与抗体的终浓度摩尔比 2~3:1，TCEP 比例根据抗体不同，略有调整，于 25℃搅拌反应 1h。

[764] TCEP 还原后的抗体可直接进行偶联。配制一定浓度(5mM)连接子-毒素(DL01-MMAE)溶于 DMSO（dimethyl sulfoxide，二甲亚砜）中，按照药物与巯基的摩尔比 1.5~2:1 缓慢加药，于 25℃搅拌反应 2h。反应结束后，用 ADC 缓冲液离心超滤，纯化去除残余未反应药物以及 DMSO 等游离小分子，并且利用疏水高效液相（HIC-HPLC）法及液质联用（LC-MS）法检测偶联情况，用体积排阻色谱法（SEC）检测偶联后样品纯度。

[765] 制备获得的 CDCP1A9-DL01-MMAE（PR-ADC）中，每个抗体偶联的药物平均结合数（DAR）为：3.86，SEC 检测纯度为 94.38%；制备获得的 CDCP1A12-DL01-MMAE（PR-ADC）中，每个抗体偶联的药物平均结合数（DAR）为：3.92，SEC 检测纯度为 94.38%；制备获得的 Nectin4A14-DL01-MMAE（PR-ADC）中，每个抗体偶联的药物平均结合数（DAR）为：3.89，SEC 检测纯度为 94.94%；制备获得的 CDCP1A10-DL01-MMAE（PR-ADC）中，每个抗体偶联的药物平均结合数（DAR）为：4.10，SEC 检测纯度为 92.7%。

实施例 10-2 常规 ADC（CDCP1A6-DL01-MMAE、Enfortumab vedotin（in-house）-简称 EV）的制备

[766] CDCP1A6-DL01-MMAE、EV 的构型示意图如图 57 所示，其中抗体部分分别为靶向 CDCP1 和 Nectin-

4 的抗体，抗体-连接子-药物结构示意图如图 55 所示。

[767] 参照实施例 10-1 的制备方法，获得 CDCP1A6-DL01-MMAE（常规 ADC）、EV（常规 ADC）。

[768] 制备获得的 CDCP1A6-DL01-MMAE（常规 ADC）中，每个抗体偶联的药物平均结合数（DAR）为：4.08，SEC 检测纯度为 99.37%；制备获得的 EV（常规 ADC）中，每个抗体偶联的药物平均结合数（DAR）为：3.85，SEC 检测纯度为 98.81%。

实施例 11 细胞实验

实施例 11-1 PR-ADC 细胞毒性测试

[769] 实验结果（图 51）表明，PR-ADC（Nectin4A8-DL01-MMAE、Nectin4A9-DL01-MMAE）保持与维恩妥尤单抗（内部制备，Enfortumab vedotin，一种靶向 Nectin-4 的抗体药物偶联物，简称 EV）相似的细胞杀伤活性。

实施例 11-2 裸抗分子、常规 ADC、PR-ADC 与 Nectin-4 的结合活性比较

[770] 表 32. 各分子与 Nectin-4 的结合活性比较

编号	代号	Top OD450	EC50
1	Enfortumab	1.24	0.31
2	Nectin4A8	1.12	0.66
3	Nectin4A9	1.30	0.53
4	EV	1.23	0.35
5	Nectin4A8-DL01-MMAE	1.04	0.65
6	Nectin4A9-DL01-MMAE	1.30	0.81
7	hIgG1	0.00	NA

[771] 实验结果（表 32）表明，Nectin4A7、Nectin4A8 裸抗分子和其对应的常规 ADC（EV）或 PR-ADC（Nectin4A8-DL01-MMAE）与 Nectin-4 结合能力相当。并且与 Enfortumab 及 EV 与 Nectin-4 的结合能力是处于同一水平。

实施例 11-3 细胞杀伤活性

[772] 表 33. 细胞杀伤活性实验结果

编号	代号	HCC1954		OVCAR3		CHOK1	
		IC50 (nM)	MIR(%)	IC50 (nM)	MIR(%)	IC50 (nM)	MIR(%)
1	EV	147.70	70.90	33.29	60.27	NA	17.40
2	Nectin4A8-DL01-MMAE	153.30	72.32	35.60	61.79	NA	19.87
3	MMAE	0.31	60.95	0.31	3.69	34.88	83.94

[773] 实验结果（表 33）表明，PR-ADC（Nectin4A8-DL01-MMAE）和常规 ADC（EV）具有相似的细胞杀伤活性。

实施例 12 PR-ADC（MMAE 载荷）在动物模型中的安全性研究

实施例 12-1 BALB/c 小鼠毒性比较研究

1. 配体单元靶向 CDCP1 的 PR-ADC 与常规 ADC 的比较（MMAE 载荷）

[774] 试验一：18 只 BALB/c 小鼠，雌性，分组时体重在 16~19g，分为 PR-ADC 组（CDCP1A9-DL01-MMAE，140mg/kg），常规 ADC 组（CDCP1A6-DL01-MMAE，100mg/kg），均为等摩尔剂量，每组 9 只（5 只毒理+4 只 TK），共 2 组。单次给药，给药容量 10mL/kg。通过死亡、临床观察、体重、毒代动力学检测等方面考察并比较 BALB/c 小鼠对各组药物相关的毒性表现，试验持续 14 天。

[775] 游离的 MMAE 采用 Hybrid LBA LC-MS/MS 法测定。Protein A/G-Beads 将血清中的 ADC/PR-ADC、结合有 MMAE 的 PR-ADC 以及结合有 MMAE 的抗 MMAE 抗体分离后，剩余样品经蛋白沉淀后采用 LC-MS/MS 方法检测游离的 MMAE。

[776] 表 34. 各组动物毒性试验结果

组别	剂量（mg/kg）	死亡	最大体重变化率	临床观察
PR-ADC 组	140	0/9	-16.4%（D7）	炸毛(5/5)、弓背(5/5)
常规 ADC 组	100	1/9	-24.1%（D7）	炸毛(5/5)、弓背(5/5)、眯眼(2/5)

[777] 根据实验结果，BALB/c 小鼠对 PR-ADC 组（CDCP1A9-DL01-MMAE）的耐受量大于 140 mg/kg，对常规 ADC 组（CDCP1A6-DL01-MMAE）的耐受量小于 100mg/kg，等摩尔剂量下毒性比较结果为常规 ADC 组（CDCP1A6-DL01-MMAE，100mg/kg）> PR-ADC 组（CDCP1A9-DL01-MMAE，140mg/kg）。

[778] 本实验结果显示，PR-ADC 结构相比于常规 ADC 结构，其回收单元的增加，有效的降低了对动物的毒性。

[779] 表 35. 各组动物体内血清中游离 MMAE 的毒代动力学参数

组别	剂量（mg/kg）	游离 MMAE		
		C_{max}(nM)	AUC(h*nM)	T_{max}(h)
PR-ADC 组	140	6.2±0.6	726.68±101.74	24
常规 ADC 组	100	75.8±16.03	8003.69±1615.32	24

[780] 毒代动力学结果显示在 BALB/c 小鼠血清中，PR-ADC 组（CDCP1A9-DL01-MMAE）中游离的 MMAE 暴露量（C_{max} 和 AUC）明显小于常规 ADC 组（CDCP1A6-DL01-MMAE）的暴露量，游离的 MMAE 的暴露水平与毒性呈正相关，说明 PR-ADC 可明显改善常规 ADC 的体内毒性。

[781] 试验二：16 只 BALB/c 小鼠，雌性，分组时体重在 16~20g，分为 PR-ADC 组（CDCP1A12-DL01-MMAE，134mg/kg），常规 ADC 组（CDCP1A6-DL01-MMAE，100mg/kg）剂量组，均为等摩尔剂量，每组 8 只（4 只毒理+4 只 TK），共 2 组。单次给药，给药容量 10mL/kg。通过死亡、临床观察、体重、毒代动力学检测等方面考察并比较 BALB/c 小鼠对各组药物相关的毒性表现，试验持续 14 天。

[782] 游离的 MMAE 同样采用 Hybrid LBA LC-MS/MS 法测定。

[783] 表 36. 各组动物毒性试验结果

组别	剂量（mg/kg）	死亡	最大体重变化率	临床观察
PR-ADC 组	134	0/8	-16.43%（D4）	炸毛(4/4)、稀便(4/4)
常规 ADC 组	100	7/8	-23.44%（D7）	炸毛(4/4)、稀便(1/4)、消瘦(2/4)、软便(1/4)、眼睁不开(3/4)

[784] 根据实验结果，BALB/c 小鼠对 PR-ADC 组（CDCP1A12-DL01-MMAE）的耐受量大于 134mg/kg，对常规 ADC 组（CDCP1A6-DL01-MMAE）的耐受量小于 100mg/kg，等摩尔剂量下毒性比较结果为常规 ADC 组（CDCP1A6-DL01-MMAE，100mg/kg）> PR-ADC 组（CDCP1A12-DL01-MMAE，134mg/kg）。

[785] 本实验结果同样显示，PR-ADC 结构相比于常规 ADC 结构，其回收单元的增加，有效的降低了对动物的体内毒性。

[786] 表 37. 各组动物体内血清中游离 MMAE 的毒代动力学参数

组别	剂量（mg/kg）	游离 MMAE		
		C_{max}(nM)	AUC(h*nM)	T_{max}(h)
PR-ADC 组	134	6.06±4.27	619.43±363.31	[24,72]
常规 ADC 组	100	22.95±4.44	2165.03±1003.12	24

[787] 毒代动力学结果显示在 BALB/c 小鼠血清中， PR-ADC 组（CDCP1A12-DL01-MMAE）小鼠血清中游离的 MMAE 暴露（C_{max} 和 AUC）明显小于常规 ADC 组（CDCP1A6-DL01-MMAE）的暴露量，游离的 MMAE 的暴露水平与毒性基本呈正相关，说明 PR-ADC 可明显改善常规 ADC 的体内毒性。

2. 配体单元靶向 Nectin-4 的 PR-ADC 与常规 ADC 的比较（MMAE 载荷）

[788] 18 只 BALB/c 小鼠，雌性，分组时体重在 16~19g，分为 PR-ADC 组（Nectin4A14-DL01-MMAE，136mg/kg）、常规 ADC 组（EV，100mg/kg），均为等摩尔剂量，每组 9 只（5 只毒理+4 只 TK），共 2 组。

[789] 游离的 MMAE 同样采用 Hybrid LBA LC-MS/MS 法测定。

[790] 表 38. 各组动物毒性试验结果

组别	剂量（mg/kg）	死亡	最高体重变化率	临床观察
PR-ADC 组	136	0/9	-8.7%（D4）	炸毛(4/4)
常规 ADC 组	100	2/9	-24.4%（D7）	炸毛(4/4)、弓背(5/5)、眯眼(5/5)、精神不振(1/5)

[791] 根据实验结果，BALB/c 小鼠对 PR-ADC 组（Nectin4A14-DL01-MMAE）的耐受量大于 136 mg/kg，

对常规 ADC 组(EV)的耐受量小于 100mg/kg,等摩尔剂量下毒性比较结果为常规 ADC 组(EV,100mg/kg)> PR-ADC 组（Nectin4A14-DL01-MMAE，136mg/kg)。

[792] 本实验结果同样显示，PR-ADC 结构相比于常规 ADC 结构，其回收单元的增加，有效的降低了对动物的体内毒性。

[793] 表 39. 各组动物体内血清中游离 MMAE 的毒代动力学参数

组别	剂量（mg/kg）	游离 MMAE		
		C_{max}(nM)	AUC(h*nM)	T_{max}(h)
PR-ADC 组	136	10.05±1	1410.51±71.39	24
常规 ADC 组	100	76.08±4.88	9090.97±655.17	24

[794] 毒代动力学结果显示在 BALB/c 小鼠血清中， PR-ADC 组（Nectin4A14-DL01-MMAE）中小鼠血清中游离的 MMAE 暴露（C_{max} 和 AUC）明显小于常规 ADC 组（EV）的暴露量，游离的 MMAE 的暴露水平与毒性基本呈正相关，说明 PR-ADC 可明显改善常规 ADC 的体内毒性。

实施例 12-2 SD 大鼠毒性比较研究

1. 配体单元靶向 CDCP1 的 PR-ADC 与常规 ADC 的比较（MMAE 载荷）

[795] 16 只 SD 大鼠,雌性,分组时体重在 220~270g,分为 PR-ADC 组(CDCP1A9-DL01-MMAE,42mg/kg)、常规 ADC 组（CDCP1A6-DL01-MMAE，30mg/kg)，均为等摩尔剂量，每组 8 只（4 只毒理+4 只 TK)，共 2 组。试验均为单次静脉给药，给药剂量 10mL/kg。通过死亡、临床观察、体重、毒代动力学检测等方面考察并比较 SD 大鼠对各组药物相关的毒性表现，试验持续 14 天。

[796] 游离的 MMAE 同样采用 Hybrid LBA LC-MS/MS 法测定。

[797] 表 40. 各组动物毒性试验结果

组别	剂量（mg/kg）	死亡	最大体重变化率	临床观察
PR-ADC 组	42	1/8	-5.2%（D4）	/
常规 ADC 组	30	3/8	-5.4%（D4）	弓背(2/4)、结痂(3/4)、尿液发黄

[798] 根据实验结果，SD 大鼠对 PR-ADC 组（CDCP1A9-DL01-MMAE）的耐受量小于 42mg/kg，对常规 ADC 组(CDCP1A6-DL01-MMAE)的耐受量小于 30mg/kg,毒性比较结果为常规 ADC 组(CDCP1A6-DL01-MMAE，30mg/kg）>PR-ADC 组（CDCP1A9-DL01-MMAE，42mg/kg)。

[799] SD 大鼠毒性试验也显示，PR-ADC 结构相比于常规 ADC 结构，其回收单元的增加，有效的降低了对动物的体内毒性。

[800] 表 41. 各组动物体内血清中游离 MMAE 的毒代动力学参数

组别	剂量（mg/kg）	游离 MMAE		
		C_{max}(nM)	AUC(h*nM)	T_{max}(h)
PR-ADC 组	42	9.03±1.85	780.36±117.77	[48,72]
常规 ADC 组	30	9.58±2.51	994.81±335.93	[72,120]

[801] 毒代动力学结果显示，在等摩尔剂量条件下，在 SD 大鼠血清中， PR-ADC 组（CDCP1A9-DL01-MMAE)中游离的 MMAE 暴露(C_{max} 和 AUC)小于常规 ADC 组(CDCP1A6-DL01-MMAE)。游离的 MMAE 的暴露水平与毒性呈正相关。同样说明 PR-ADC 可明显改善常规 ADC 组的毒性。

实施例 13 PR-ADC 在动物模型中的药效研究

实施例 13-1 配体单元靶向 Nectin-4 的 PR-ADC 与常规 ADC 在人膀胱癌细胞 HT-1376 皮下移植瘤模型中的药效研究比较

[802] 研究方法

[803] 人膀胱癌细胞 HT-1376 经扩增培养后，于 BALB/c-nu 小鼠（集萃药康，雌性）右前肢腋下靠背部皮下接种。观察肿瘤的生长情况，当肿瘤体积达到约 90~200 mm^3 时，按照肿瘤体积随机分组并给药。

[804] 给药当天记为 D0。试验期间，每周测两次肿瘤长径、短径及体重，伴随临床症状观察。试验终点，实验鼠作安乐死处理。

[805] 实验结果（图 52 及表 42）表明：在 HT-1376 皮下移植瘤模型中，PR-ADC 和常规 ADC 分子均表现出显著的抗肿瘤作用（P≤0.05），在等摩尔剂量下，PR-ADC 组（Nectin4A14-DL01-MMAE）与常规 ADC 组（EV）的抗肿瘤作用相当。

[806] 表 42. 各组 TGI 结果

分类	组别	TGI
PR-ADC 组	Nectin4A14-DL01-MMAE	63%
常规 ADC 组	EV	71%
对照组	空白	0

实施例 13-2 配体单元靶向 CDCP1 的 PR-ADC 与常规 ADC 在人结肠癌细胞 RKO 皮下移植瘤模型中的药效研究比较

[807] 研究方法

[808] 人结肠癌细胞 RKO 经扩增培养后，于 BALB/c-nu 小鼠（集萃药康，雌性）右前肢腋下靠背部皮下接种。观察肿瘤的生长情况，当肿瘤体积达到约 100~200 mm^3 时，按照肿瘤体积随机分组并给药。

[809] 给药当天记为 D0。试验期间，每周测两次肿瘤长径、短径及体重，伴随临床症状观察。试验终点，实验鼠作安乐死处理。

[810] 实验结果（图 53 及表 43）表明：在 RKO 皮下移植瘤模型中，所有分子均表现出显著的抗肿瘤作用（P≤0.01）。等摩尔剂量下， PR-ADC 组（CDCP1A10-DL01-MMAE、CDCP1A12-DL01-MMAE）与常规 ADC 组（CDCP1A6-DL01-MMAE）的抗肿瘤作用相当。

[811] 表 43. 各组 TGI 结果

分类	组别	TGI
PR-ADC 组	CDCP1A10-DL01-MMAE	96%
PR-ADC 组	CDCP1A12-DL01-MMAE	95%
常规 ADC 组	CDCP1A6-DL01-MMAE	99%
对照组	空白	0

[812] 以上所揭示的仅是本发明的部分实施例而已，并非是对本发明作其他形式的限制，本领域普通技术人员能够理解，本发明并不限于各个具体实施方式。对本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，可以对本发明进行若干改进和修饰，这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

权 利 要 求 书

1. 一种配体药物偶联物，其特征在于，所述配体药物偶联物包含靶向肿瘤抗原或非肿瘤抗原的配体单元，偶联的载荷单元以及能够结合从所述配体药物偶联物上脱落下来的游离载荷的回收单元，所述的载荷单元包含载荷以及连接子。

2. 根据权利要求 1 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的配体单元和所述的回收单元之间直接相连或不直接相连。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的配体单元和所述的回收单元之间含有连接单元。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的配体药物偶联物进一步含有其他功能单元。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的载荷通过所述的连接子偶联在所述配体单元和/或所述的回收单元和/或所述连接单元和/或所述的其他功能单元上。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述配体单元包含特异性结合肿瘤抗原或非肿瘤抗原的抗体或抗原结合片段、受体、多肽、寡肽、拟肽、融合蛋白或适配体（aptamer）。

7. 根据权利要求 6 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述抗体包括且不限于单克隆抗体，双特异性抗体，多特异性抗体，纳米抗体（HcAb），免疫球蛋白新抗原受体（IgNAR）；所述抗原结合片段包括且不限于 scFv，Fab，Fab'，$F(ab')_2$，Fd，Fv，dAb，Fd，sdAb，VHH，Diabody；所述受体包括但不限于 T 细胞受体。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述抗体选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或进行人工改造的抗体。

9. 根据权利要求 8 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述抗体进一步包括免疫球蛋白的恒定区。

10. 根据权利要求 9 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述免疫球蛋白选自人 IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4。

11. 根据权利要求 1-10 任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述肿瘤抗原或非肿瘤抗原包括但不限于 CD9、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD29、CD30、CD33、CD37、CD44、CD45、CD46、CD47、CD49b、CD51、CD52、CD56、CD73(NT5E)、CD79b、CD123、CD133、CD138、CD157、CD166、DLL-3、CDH6、Tissue factor、EpCAM、PSMA、MUC1、MUC16、FOLR1、GPC3、ROR1、ROR2、PD-L1、ENPP3、TDGF1、MSLN、TIM-1、LRRC15、LIV-1(ZIP6)、Claudin6、Claudin9、Claudin 18.2、Mesothelin、HER2(ErbB2)、HER3(ErbB3)、EGFR、c-MET、SLITRK6、KIT(CD117)、STEAP1、NaPi2B(SLC34A2)、SLC44A4、GPNMB、AXL、CD166、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、PTK7(CCK4)、EFNA4、5T4、NOTCH3、Nectin-4、TROP-2、GPR20、EphA2、LYPD3、FGFR2、FGFR3、FRα、CEACAMs、CAIX、P-cadherin(CDH3)、CDH17、GD3、Cadherin 6、LAMP1、FLT3、BCMA、SLTRK6、Lewis Y、ASCT2、CA-IX、Cripto、DPEP3、Globo H、Ly6E、RNF43、DR5、CDCP1、CEACAM6、FUT3、GD2、CD26E、CD70、CD74、CD163、PRLR、TNFα、CXCR4、LXR、IL-6、CEACAM5、GPRC5D、HLA-DR、CTLA4(CD152)、FAP α 或 IL2R。

12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述特异性结合肿瘤抗原或非肿瘤抗原的抗体包括且不限于阿仑单抗、喷替酸阿妥莫单抗、埃万妥单抗、阿替利珠单抗、伊尼妥单抗、anetumab、阿维鲁单抗、贝妥莫单抗、bermekimab、贝伐珠单抗、贝林妥欧单抗、维布妥昔单抗、卡妥索单抗、西米普利单抗、西妥昔单抗、clivatuzumab、达利珠单抗、达雷妥尤单抗、地舒单抗、达妥昔单抗 β、dostarlimab、度伐利尤单抗、依决洛单抗、维恩妥尤单抗、epcoritamab、依帕珠单抗、埃达珠单抗、genmab、格菲妥单抗、吉伦妥昔单抗、ibritumomab、inebilizumab、奥加伊妥珠单抗、伊匹木单抗、艾沙妥昔单抗、labetuzumab、loncastuximab、莫格利珠单抗、泰朗妥昔单抗、莫妥珠单抗、尼妥珠单抗、naratuximab、那西妥单抗、纳武利尤单抗、奥瑞利珠单抗、奥法妥木单抗、奥拉单抗、奥戈伏单抗、帕尼单抗、帕博利珠单抗、帕妥珠单抗、维泊妥珠单抗、racotumomab、ramucirumab、雷莫西尤单抗、利妥昔单抗、戈沙妥珠单抗、替妥木单抗、托珠单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、伏妥莫单抗、扎鲁木单抗、托西珠单抗或扎木单抗；以及上述抗体的抗原结合片段和衍生物；所述靶向结合特定抗原的多肽、寡肽、融合蛋白包括但不限于双环肽（bicycle）、血管肽-2、线性肽、pH 敏感肽、SOR-C27、A6 多肽、SOR13；以及上述多肽、寡肽或融合蛋白的变体和衍生物；所述靶向结合特定抗原的适配体包括 AS1411、sgc8、sgc4f、sgd5a、TC01、TD05、A9、A10、APT、Min.2、AIR-3A、E3、E07、Waz、P19、Zy1；以及上述适配体的变体和衍生物。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述配体药物偶联物能够特异性结合所述的游离载荷，且所述的配体药物偶联物之间不发生分子凝集。

14. 根据权利要求 13 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的回收单元特异性结合所述的游离载荷。

15. 根据权利要求 14 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的回收单元包括特异性结合所述的游离载荷的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体（aptamer）。

16. 根据权利要求 15 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述特异性结合所述的游离载荷的抗体包括且不限于单克隆抗体，双特异性抗体，多特异性抗体，纳米抗体（HcAb），免疫球蛋白新抗原受体（IgNAR）；所述抗原结合片段包括且不限于 scFv，Fab，Fab'，$F(ab')_2$，Fd，Fv，dAb，Fd，sdAb，VHH，Diabody；所述

受体包括且不限于T细胞受体。

17. 根据权利要求16所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述特异性结合所述的游离载荷的抗体选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或进行人工改造的抗体。

18. 根据权利要求13-17中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的回收单元能够特异性结合所述的游离载荷是指所述的回收单元与所述的游离载荷的平衡解离常数 K_D（M）小于 10^{-4}，或更进一步的小于 10^{-5}，或更进一步的小于 10^{-6}，或更进一步的小于 10^{-7}，或更进一步的小于 10^{-8}，或更进一步的小于 10^{-9}。

19. 根据权利要求18所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的回收单元能够特异性结合所述的游离载荷是指所述的回收单元与所述的游离载荷的平衡解离常数 K_D（M）小于 10^{-7}，或更进一步的小于 10^{-8}，或更进一步的小于 10^{-9}。

20. 根据权利要求19所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的回收单元能够特异性结合所述的游离载荷是指所述的回收单元与所述的游离载荷的平衡解离常数 K_D（M）小于 10^{-9}。

21. 根据权利要求18所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的回收单元不结合所述的配体药物偶联物中处于偶联状态的载荷或者与所述的配体药物偶联物中处于偶联状态的载荷具有较低的亲和力，所述较低的亲和力也可以实现所述的配体药物偶联物分子之间不发生分子凝集。

22. 根据权利要求21所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的回收单元特异性地靶向所述的偶联的载荷单元上的非外露表位。

23. 根据权利要求13-22中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的连接子或载荷上连接有能够阻止回收单元结合仍偶联在所述配体药物偶联物上的载荷的载荷表位遮蔽单元。

24. 根据权利要求23所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的载荷表位遮蔽单元不影响所述的配体药物偶联物进入目标细胞后正常分离所述的载荷。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述回收单元为一个，两个或多个。

26. 根据权利要求15所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述回收单元包含：

（1）选自以下氨基酸序列所限定的CDR1-3的VHH域：

如SEQ ID NO:103、104和105所示的CDR1-3；

或者（2）选自如SEQ ID NO:102所示的氨基酸序列；

或者（3）选自包含如下限定的VH和VL组合的氨基酸序列：

包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:2、3和4所示的HCDR1-3的VH，和包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:6、YAS和SEQ ID NO:7所示的LCDR1-3的VL；

包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:9、10和11所示的HCDR1-3的VH，和包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 6、FAS和SEQ ID NO:13所示的LCDR1-3的VL；

包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:2、3和4所示的HCDR1-3的VH，和包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:6、YAS和SEQ ID NO:16所示的LCDR1-3的VL；

包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:2、3和20所示的HCDR1-3的VH，和包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:6、YAS和SEQ ID NO:7所示的LCDR1-3的VL；

包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:22、23和24所示的HCDR1-3的VH，和包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:26、WAS和SEQ ID NO:27所示的LCDR1-3的VL；

包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:29、30和31所示的HCDR1-3的VH，和包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:33、KVS和SEQ ID NO:34所示的LCDR1-3的VL；

包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:29、36和37所示的HCDR1-3的VH，和包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:33、KLS和SEQ ID NO:34所示的LCDR1-3的VL；

包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:40、41和42所示的HCDR1-3的VH，和包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:44、KVS和SEQ ID NO:45所示的LCDR1-3的VL；

包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:47、48和42所示的HCDR1-3的VH，和包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:50、KVS和SEQ ID NO:51所示的LCDR1-3的VL；

包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:53、54和55所示的HCDR1-3的VH，和包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:57、DTS和SEQ ID NO:58所示的LCDR1-3的VL；

包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:62、63和64所示的HCDR1-3的VH，和包含氨基酸序列分别如SEQ

ID NO:66、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:69、70 和 71 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:73、WAS 和 SEQ ID NO:74 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:80、GAS 和 SEQ ID NO:81 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:83、84 和 85 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:87、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:89、90 和 91 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:93、HGT 和 SEQ ID NO:94 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:99、77 和 100 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:38 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:39 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:46 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:52 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:56 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:59 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:60 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:61 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:65 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:72 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:75 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:82 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:86 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:88 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:92 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:95 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:96 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:97 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:98 所示的 VL；

所述 CDR1、CDR2、CDR3 序列、所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 序列和所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 序列是基于 IMGT 定义方案获得的；

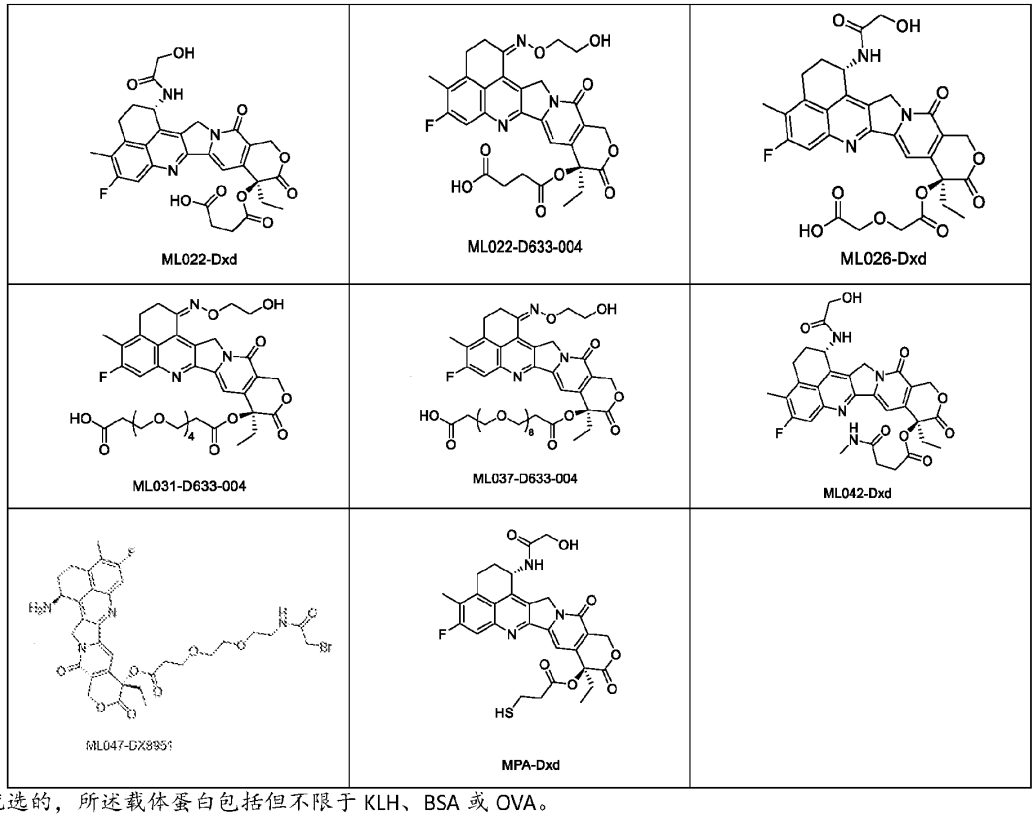
或者（4）包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128 或 SEQ ID NO:129 所限定的多肽；

或者（5）包含核苷酸序列如 SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:161 或 SEQ ID NO:162 所限定的适配体。

27. 根据权利要求 1-26 中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述回收单元为利用小分子药物和载体蛋白的偶联物或生物素-小分子药物偶联物免疫非人动物而获得；或者利用噬菌体展示技术筛选而获得；或者利用虚拟技术筛选而获得；或者利用 SELEX 技术筛选而获得；或者利用杂交瘤技术筛选而获得；或者利用纳米抗体筛选技术而获得；或者利用酵母展示技术而获得；或者利用单 B 细胞克隆技术而获得；

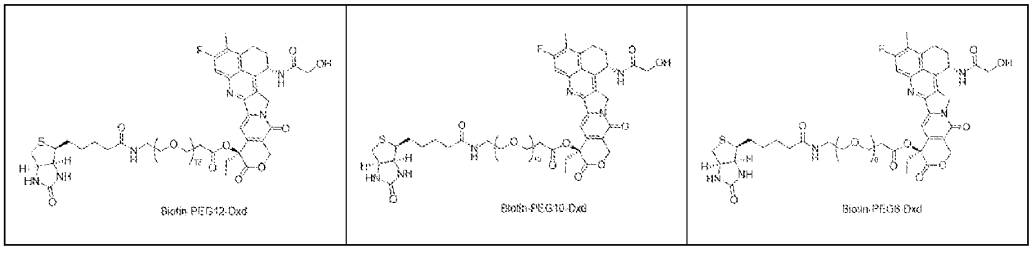
或者利用微流控技术而获得；或者利用表面等离子共振辅助筛选技术获得。

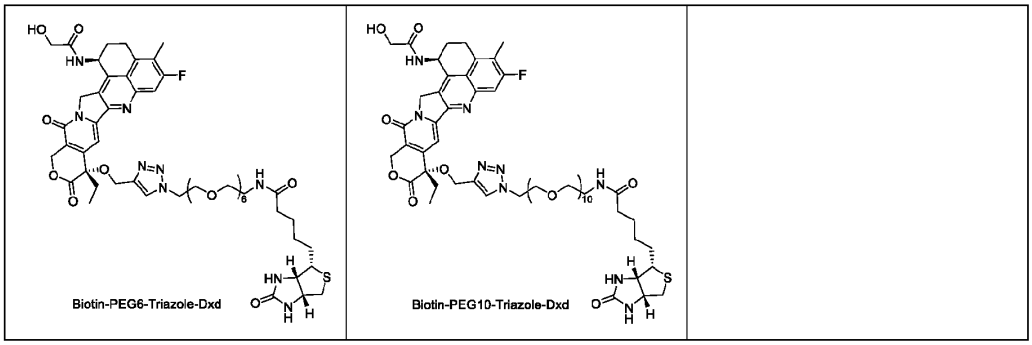
28. 根据权利要求 27 中所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述小分子药物包括但不限于 MMAE、MMAD、DM1、DM2、DM4、艾日布林、依沙替康（Exatecan）、SN38、DXD、卡奇霉素（calicheamicin）、吡咯并苯并二氮卓（PBD）、茚二啉苯并二氮卓（IBD）、倍癌霉素（duocarmycin）、鹅膏蕈碱（amanitin）、Maaa-1181a、紫杉醇（taxol）、柔红霉素（daunomycin）、长春碱（vinblastine）、阿霉素（Doxorubicin）、氨甲蝶呤、MMAF、ML022-Dxd、ML022-D633-004、ML026-Dxd、ML031-D633-004、ML037-D633-004、ML042-Dxd、ML047-DX8951、MPA-Dxd，



优选的，所述载体蛋白包括但不限于 KLH、BSA 或 OVA。

29. 根据权利要求 28 中所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述生物素-小分子药物偶联物包括但不限于 Biotin-PEG12-Dxd、Biotin-PEG10-Dxd、Biotin-PEG6-Dxd、Biotin-PEG6-Triazole-Dxd 或 Biotin-PEG10-Triazole-Dxd：





。

30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述偶联的载荷包括细胞毒性分子、核酸、免疫刺激物和调节剂。

31. 根据权利要求 30 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述载荷数量为一个，两个或多个。

32. 根据权利要求 31 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述载荷数量为 1、2、3、4、5、6、7、8 个或者更多个。

33. 根据权利要求 30-32 中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，偶联 2 个或多个载荷时，所述载荷可以是相同的载荷或不同的载荷。

34. 根据权利要求 30-33 中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述载荷通过定点或随机偶联方式偶联至所述的配体单元和/或回收单元和/或连接单元和/或其他功能单元上。

35. 根据权利要求 30-34 中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述细胞毒性分子包括但不限于微管蛋白抑制剂、DNA 抑制剂或其他毒素分子；所述 DNA 抑制剂进一步包括 DNA 损伤剂或拓扑异构酶 I 抑制剂。

36. 根据权利要求 35 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述微管蛋白抑制剂进一步包括但不限于奥瑞他汀类化合物（Auristatins）、美登素类衍生物（Maytansinoid Derivatives）、微管溶素（tubulysin）、软海绵素（halichondrin）、念珠藻素（Cryptophycins）、EG5 抑制剂。

37. 根据权利要求 35 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述奥瑞他汀类化合物进一步包括但不限于奥瑞他汀 F（AF）、单甲基奥瑞他汀 D（MMAD）、单甲基奥瑞他汀 E（MMAE）、单甲基奥瑞他汀 F（MMAF）；所述美登素类衍生物进一步包括但不限于 DM1、DM2、DM4；所述软海绵素进一步包括但不限于艾日布林（eribulin）。

38. 根据权利要求 35 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述 DNA 损伤剂进一步包括但不限于卡奇霉素（calicheamicin）类、吡咯并苯并二氮卓（PBD）类、茚二啉苯并二氮卓（IBD）类、倍癌霉素（duocarmycin）类；所述拓扑异构酶 I 抑制剂进一步包括但不限于喜树碱（camptothecin）类衍生物。

39. 根据权利要求 35 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述喜树碱类衍生物进一步包括但不限于依沙替康（Exatecan）、SN38、DXD。

40. 根据权利要求 35 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述其他毒素分子包括但不限于鹅膏蕈碱（amanitin）、Maaa-1181a、紫杉醇（taxol）、柔红霉素（daunomycin）、长春碱（vinblastine）、阿霉素（Doxorubicin）、氨甲蝶呤或其放射性同位素和/或可药用盐。

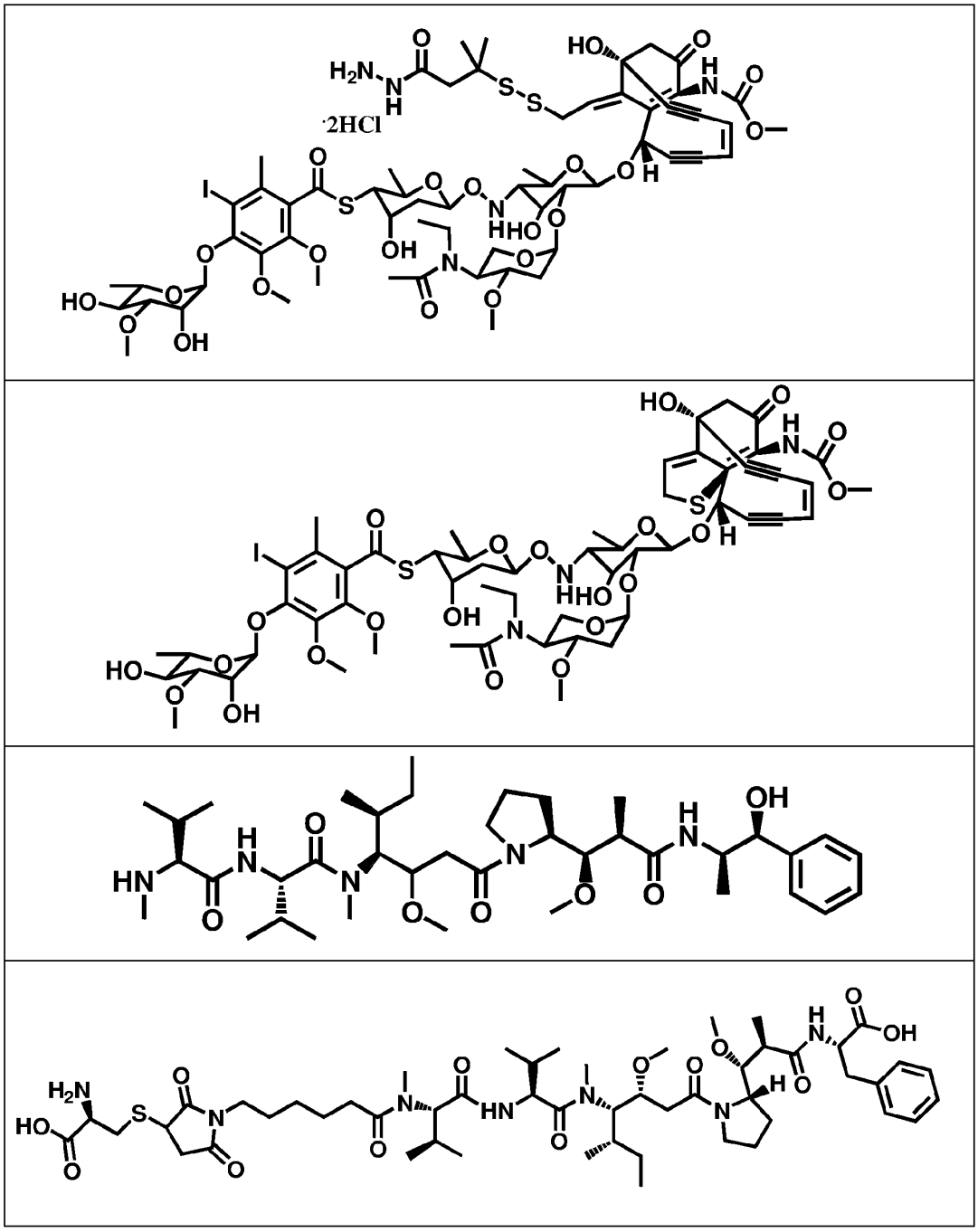
41. 根据权利要求 30 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述偶联的载荷所使用的核酸包括但不限于反义核酸（ASO）、小干扰 RNA（siRNA）、微小 RNA（miRNA）、小激活 RNA（saRNA）、信使 RNA（mRNA）、寡核苷酸（AOC）。

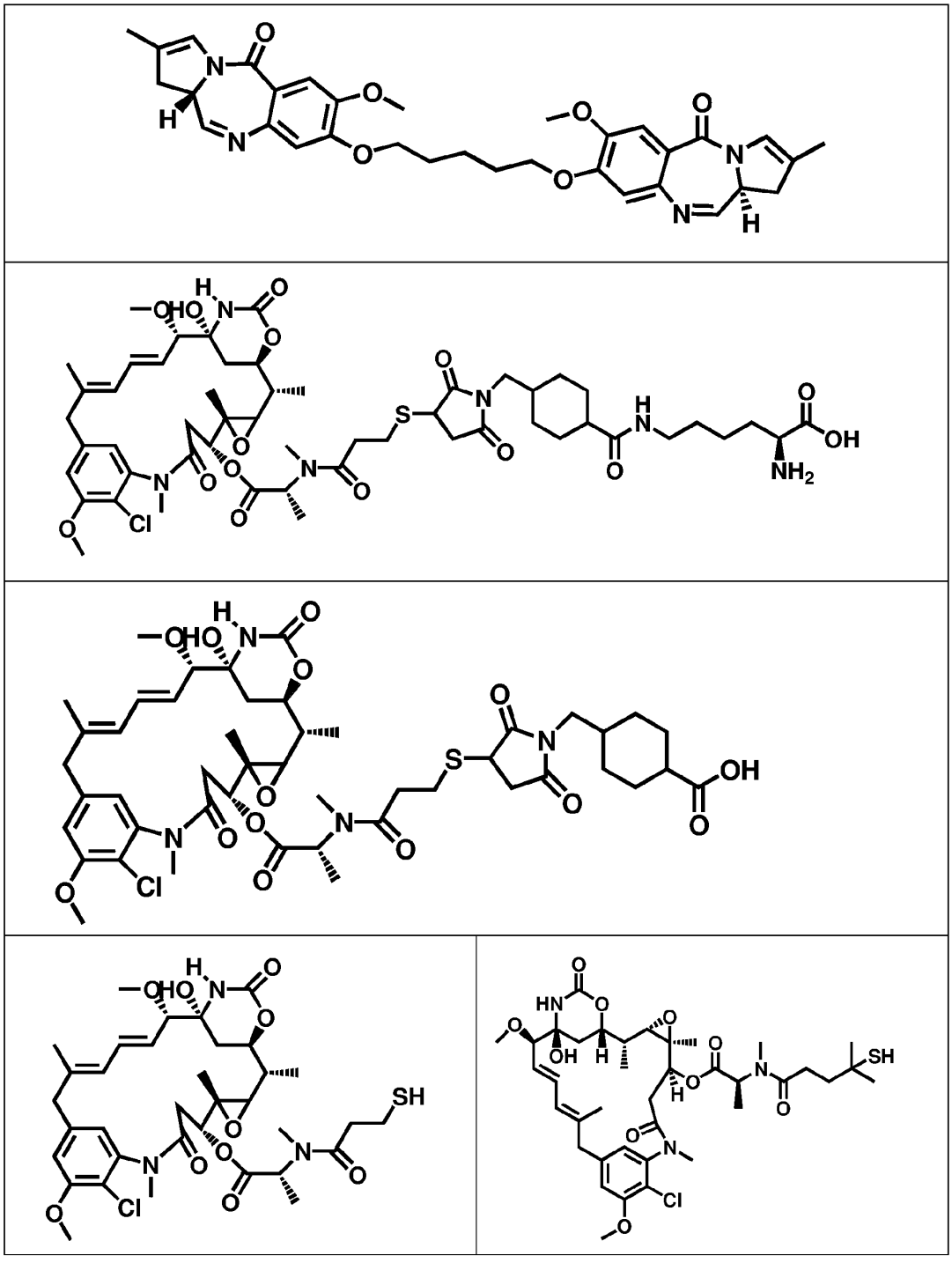
42. 根据权利要求 30 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述偶联的载荷所使用的核酸包括但不限于 DMPK siRNA、Exon-44-skipping PMO、DUX4 siRNA、Exon-51-skipping PMO、DMPK ASO、DUX4 ASO、CpG。

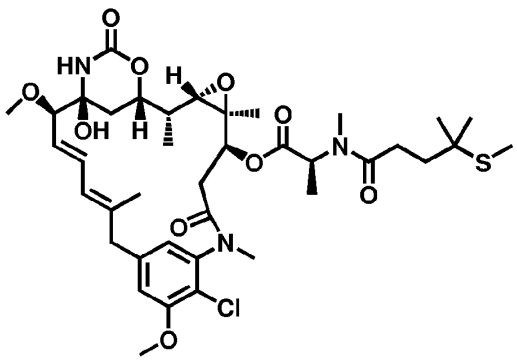
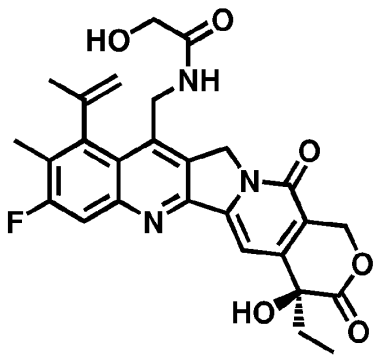
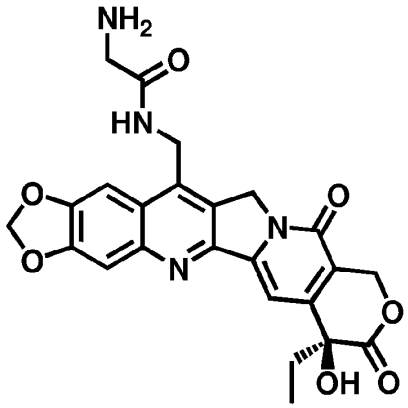
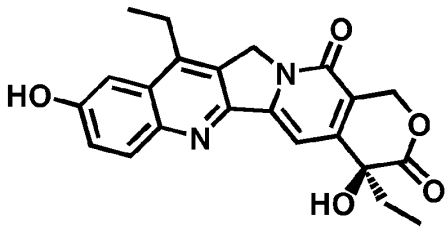
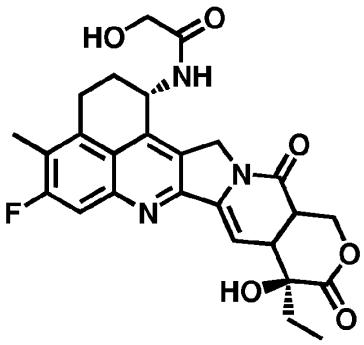
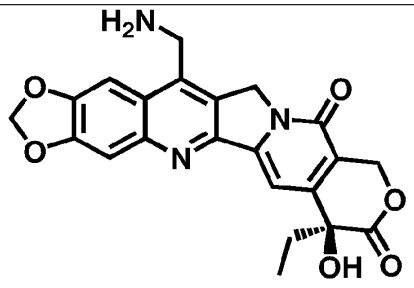
43. 根据权利要求 30 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述偶联的载荷所使用的免疫刺激物包括但不限于 TLR7 激动剂、TLR8 激动剂、TLR9 激动剂、TGF-β 抑制剂、TNIK 抑制剂、Sting 激动剂。

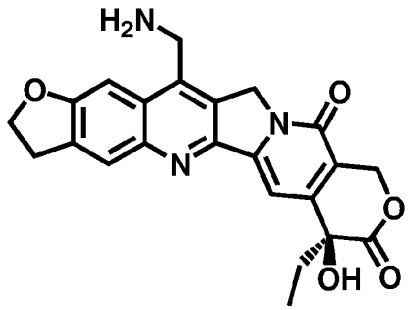
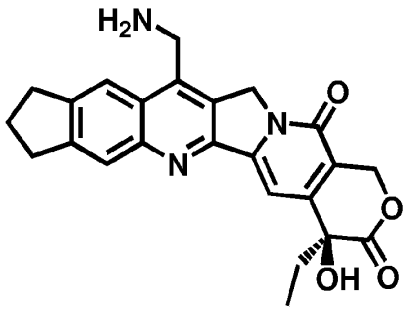
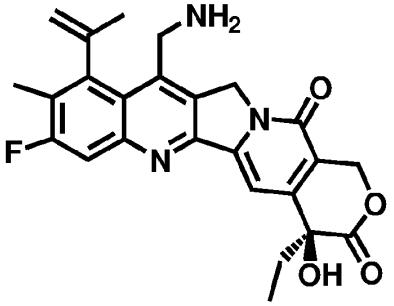
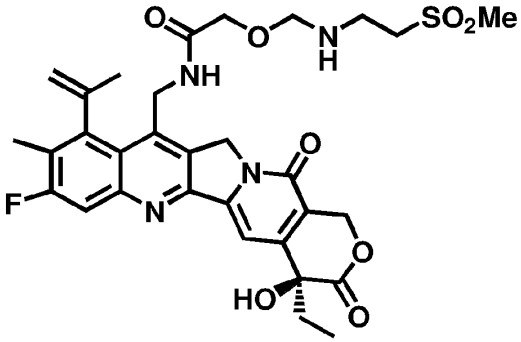
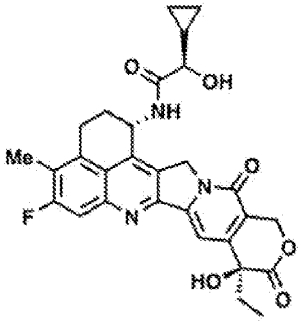
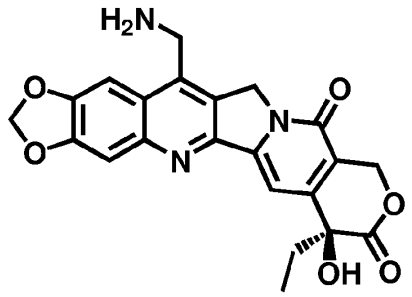
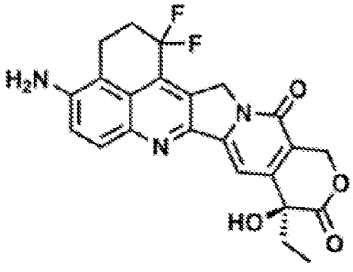
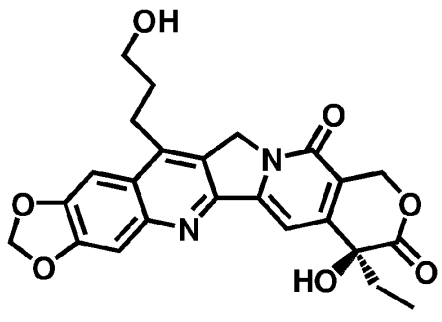
44. 根据权利要求 30 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述偶联的载荷所使用的调节剂包括但不限于糖皮质激素受体调节剂、抗生素、激酶抑制剂、肝脏 X 受体（LXR）激动剂、磷酸二酯酶（PDE4）抑制剂、双磷酸盐。

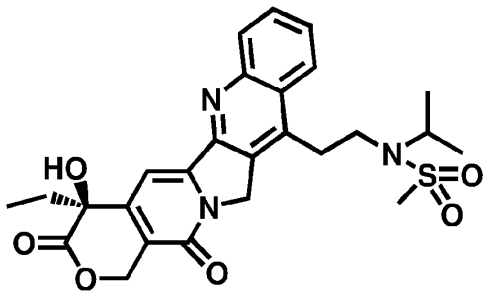
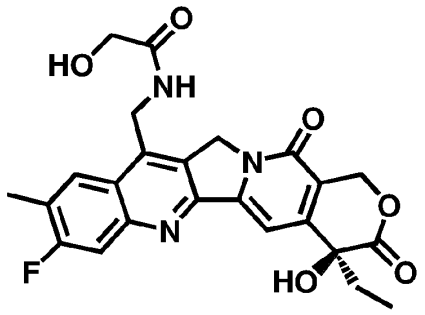
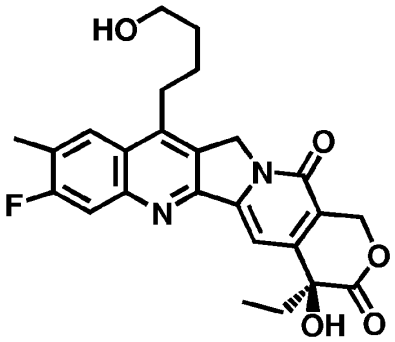
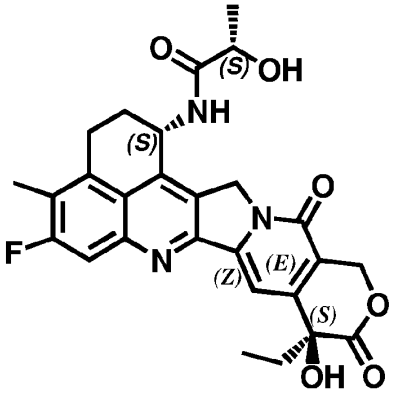
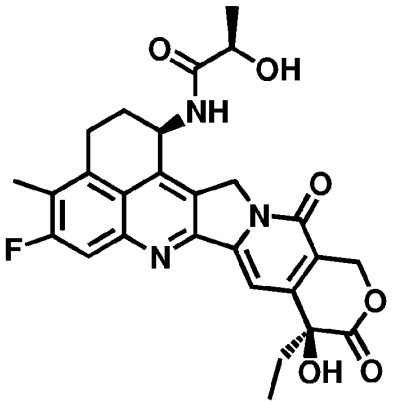
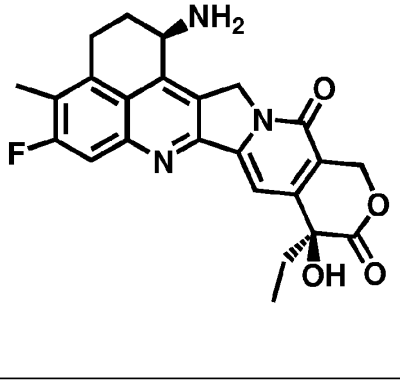
45. 根据权利要求 30 所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述游离载荷的结构选自包含如下结构或如下结构的同分异构体或氘代化物的组：

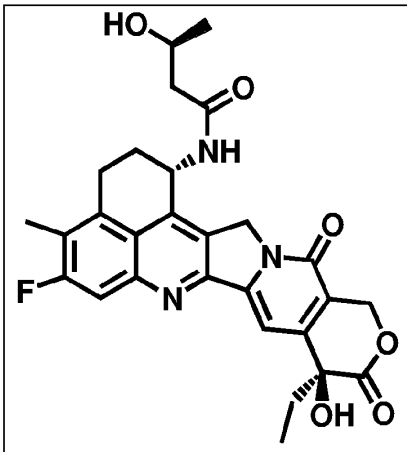
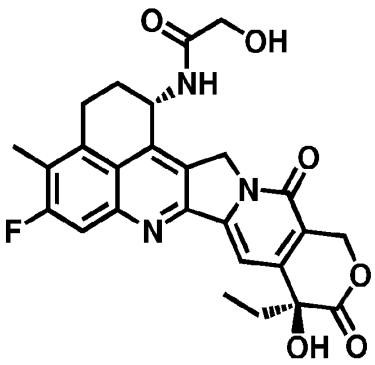
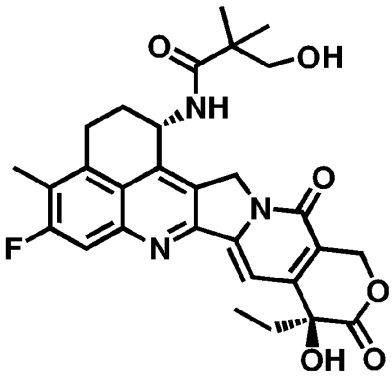
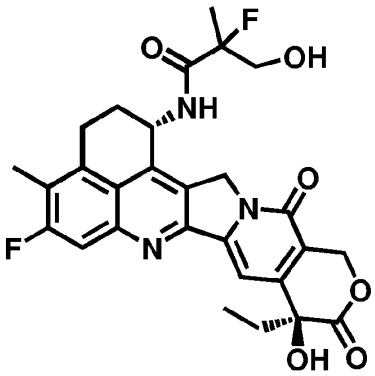
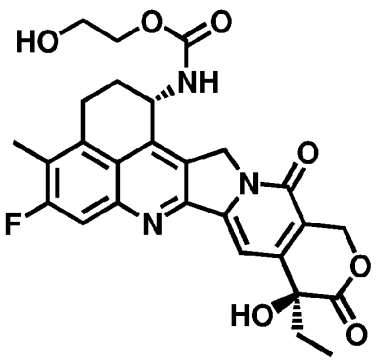
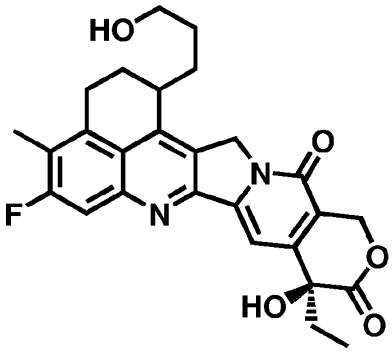


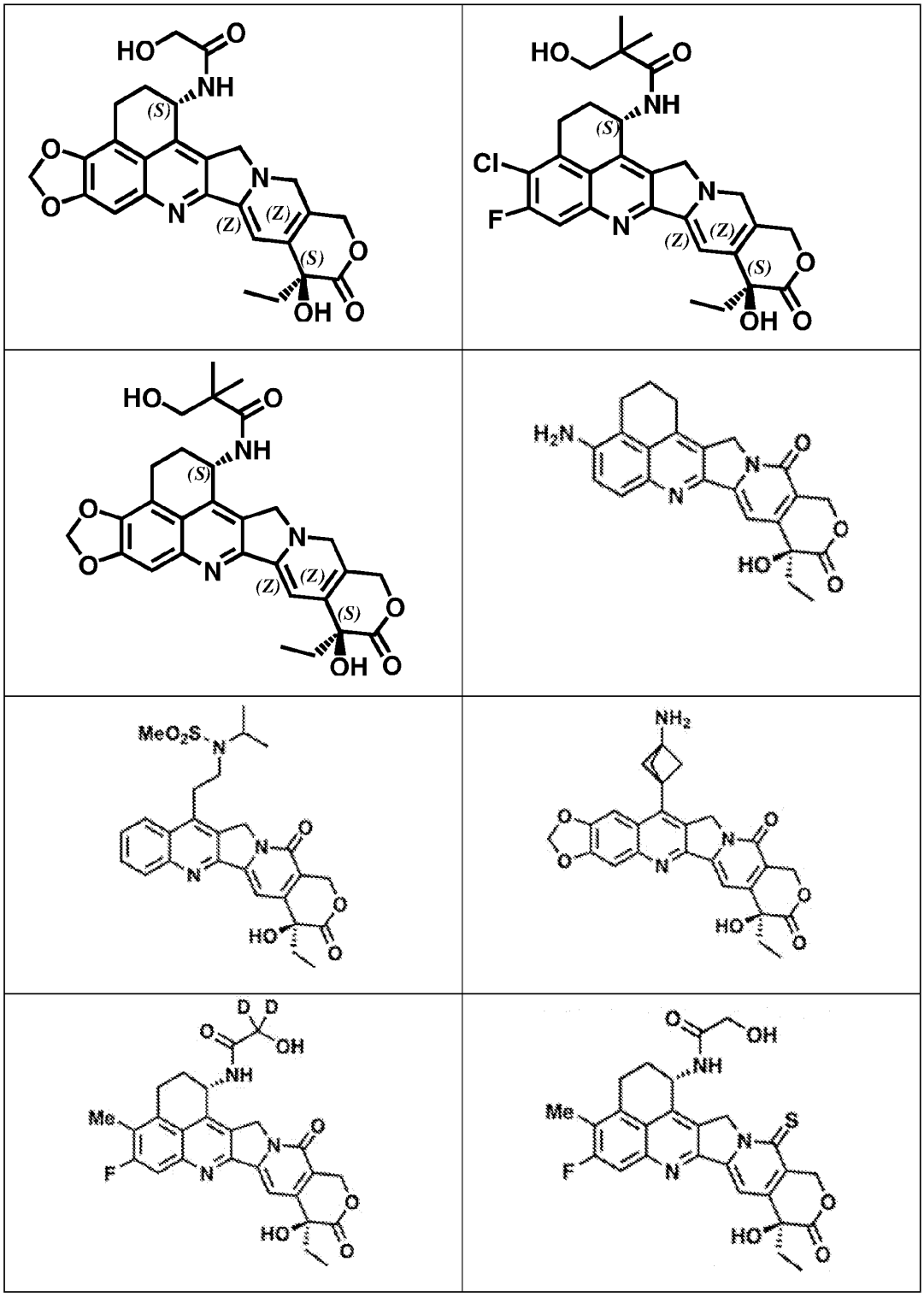




46. 根据权利要求 1-45 中任一项所述的配体药物偶联物，其特征在于，所述的连接单元包括且不限于肽接头，Fc 域或其片段；优选肽接头为柔性肽接头；进一步优选的肽接头包含一个或多个氨基酸；进一步优选

的肽接头包含至少 5 个氨基酸；或者所述的肽接头的氨基酸序列包含：(GGGGS)n，(VPGXG)n，(SG)n，(EAAAK)n，(G)n，(R)n，A(EAAAK)n ALEA(EAAAK)nA，A(EAAAK)nA，(AP)n，VSQTSKLTRAETVFPDV，PLGLWA，RVLAEA，EDVVCCSMSY，GGIEGRGS，TRHRQPRGWE，AGNRVRRSVG，GFLG，LE，其中所述 n 等于 1、2、3 或 4。

47. 权利要求 1-46 所述的配体药物偶联物在药学上可接受的盐、氘代物、溶剂化物。

48. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-46 中任一项的配体药物偶联物或权利要求 47 所述的盐、氘代物、溶剂化物以及药学上可接受的辅料。

49. 能够结合从配体药物偶联物上脱落下来的游离载荷的回收单元在制备自带游离载荷回收单元的配体药物偶联物上的应用。

50. 根据权利要求 49 所述的应用，其特征在于，所述的回收单元包含特异性结合所述的游离载荷的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体（aptamer）。

51. 根据权利要求 50 所述的应用，其特征在于，所述特异性结合所述的游离载荷的抗体包括且不限于单克隆抗体，双特异性抗体，多特异性抗体，纳米抗体（HcAb），免疫球蛋白新抗原受体（IgNAR）；所述抗原结合片段包括且不限于 scFv，Fab，Fab'，$F(ab')_2$，Fd，Fv，dAb，Fd，sdAb，VHH，Diabody；所述受体包括且不限于 T 细胞受体。

52. 根据权利要求 51 所述的应用，其特征在于，所述特异性结合所述的游离载荷的抗体选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或进行人工改造的抗体。

53. 根据权利要求 49-52 中任一项所述的应用，其特征在于，所述的回收单元能够特异性结合所述的游离载荷是指所述的回收单元与所述的游离载荷的平衡解离常数 K_D（M）小于 10^{-4}，或更进一步的小于 10^{-5}，或更进一步的小于 10^{-6}，或更进一步的小于 10^{-7}，或更进一步的小于 10^{-8}，或更进一步的小于 10^{-9}。

54. 根据权利要求 49-53 中任一项所述的应用，其特征在于，所述的回收单元能够特异性结合所述的游离载荷是指所述的回收单元与所述的游离载荷的平衡解离常数 K_D（M）小于 10^{-7}，或更进一步的小于 10^{-8}，或更进一步的小于 10^{-9}。

55. 根据权利要求 49-54 中任一项所述的应用，其特征在于，所述的回收单元能够特异性结合所述的游离载荷是指所述的回收单元与所述的游离载荷的平衡解离常数 K_D（M）小于 10^{-9}。

56. 根据权利要求 49-55 中任一项所述的应用，其特征在于，所述的回收单元不结合所述的配体药物偶联物中处于偶联状态的载荷或者与所述的配体药物偶联物中处于偶联状态的载荷具有较低的亲和力，所述较低的亲和力也可以实现所述的配体药物偶联物分子之间不发生分子凝集。

57. 根据权利要求 49 所述的应用，其特征在于，所述回收单元包含：

（1）选自以下氨基酸序列所限定的 CDR1-3 的 VHH 域：

如 SEQ ID NO:103、104 和 105 所示的 CDR1-3；

或者（2）选自如 SEQ ID NO:102 所示的氨基酸序列；

或者（3）选自包含如下限定的 VH 和 VL 组合的氨基酸序列：

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 4 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10 和 11 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 6、FAS 和 SEQ ID NO:13 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 4 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:16 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 20 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:22、23 和 24 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:26、WAS 和 SEQ ID NO:27 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29、30 和 31 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:33、KVS 和 SEQ ID NO:34 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29、36 和 37 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:33、KLS 和 SEQ ID NO:34 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:40、41 和 42 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:44、KVS 和 SEQ ID NO:45 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:47、48 和 42 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:50、KVS 和 SEQ ID NO:51 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:53、54 和 55 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:57、DTS 和 SEQ ID NO:58 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:62、63 和 64 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:66、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:69、70 和 71 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:73、WAS 和 SEQ ID NO:74 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:80、GAS 和 SEQ ID NO:81 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:83、84 和 85 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:87、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:89、90 和 91 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:93、HGT 和 SEQ ID NO:94 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:99、77 和 100 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:38 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:39 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:46 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:52 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:56 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:59 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:60 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:61 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:65 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:72 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:75 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:82 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:86 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:88 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:92 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:95 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:96 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:97 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:98 所示的 VL；

所述 CDR1、CDR2、CDR3 序列、所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 序列和所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 序列是基于 IMGT 定义方案获得的；

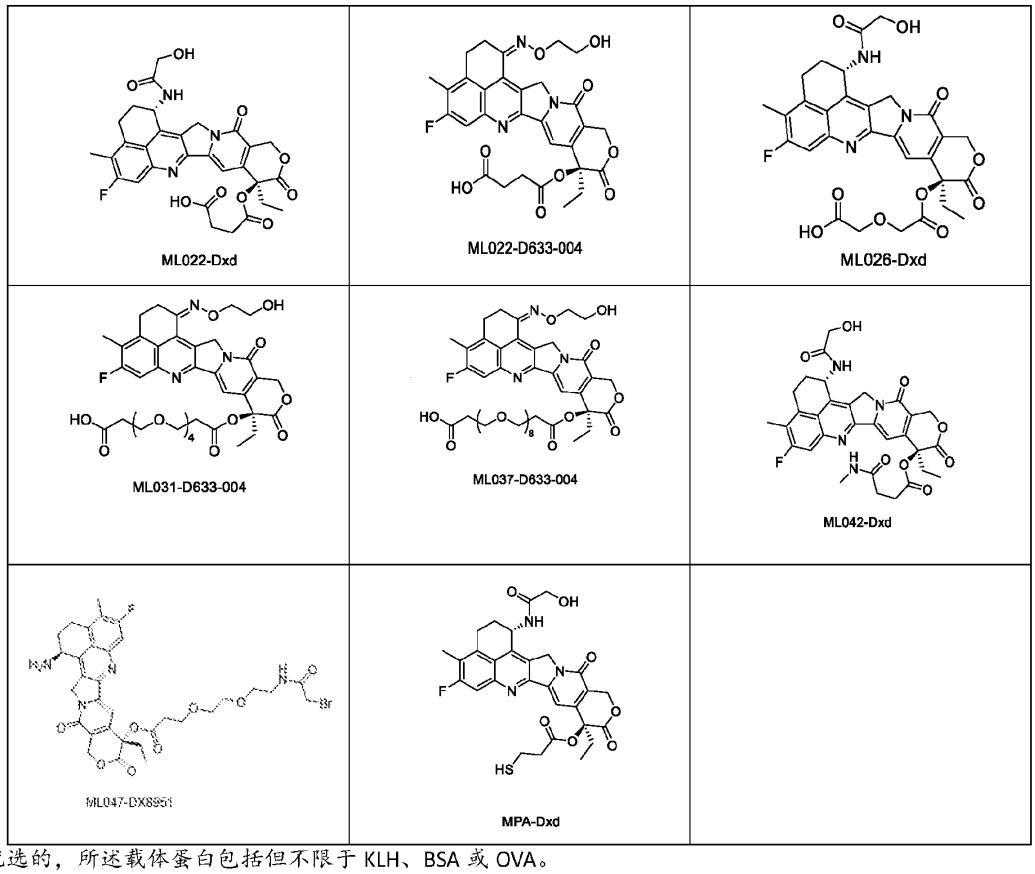
或者（4）包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128 或 SEQ ID NO:129 所限定的多肽；

或者（5）包含核苷酸序列如 SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:161 或

SEQ ID NO:162 所限定的适配体。

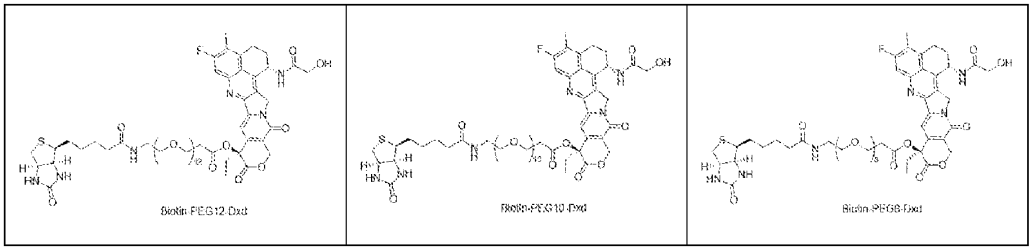
58. 根据权利要求 49-57 中任一项所述的应用，其特征在于，所述回收单元为利用小分子药物和载体蛋白的偶联物或生物素-小分子药物偶联物免疫非人动物而获得；或者利用噬菌体展示技术筛选而获得；或者利用虚拟技术筛选而获得；或者利用 SELEX 技术筛选而获得；或者利用杂交瘤技术筛选而获得；或者利用纳米抗体筛选技术而获得；或者利用酵母展示技术而获得；或者利用单 B 细胞克隆技术而获得；或者利用微流控技术而获得；或者利用表面等离子共振辅助筛选技术获得。

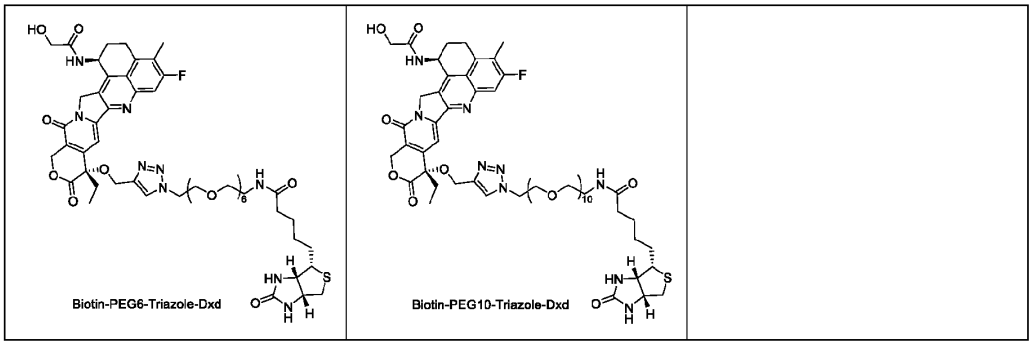
59. 根据权利要求 58 所述的应用，其特征在于，所述小分子药物包括但不限于 MMAE、MMAD、DM1、DM2、DM4、艾日布林、依沙替康（Exatecan）、SN38、DXD、卡奇霉素（calicheamicin）、吡咯并苯并二氮卓（PBD）、茚二啉苯并二氮卓（IBD）、倍癌霉素（duocarmycin）、鹅膏蕈碱（amanitin）、Maaa-1181a、紫杉醇（taxol）、柔红霉素（daunomycin）、长春碱（vinblastine）、阿霉素（Doxorubicin）、氨甲蝶呤、MMAF、ML022-Dxd、ML022-D633-004、ML026-Dxd、ML031-D633-004、ML037-D633-004、ML042-Dxd、ML047-DX8951、MPA-Dxd，PEG12-Dxd，



优选的，所述载体蛋白包括但不限于 KLH、BSA 或 OVA。

60. 根据权利要求 59 所述的应用，其特征在于，所述生物素-小分子药物偶联物包括但不限于 Biotin-PEG12-Dxd、Biotin-PEG10-Dxd、Biotin-PEG6-Dxd、Biotin-PEG6-Triazole-Dxd 或 Biotin-PEG10-Triazole-Dxd：





。

61. 根据权利要求 49 或 50 所述的应用，其特征在于，所述的连接子或载荷上连接有能够阻止回收单元结合仍偶联在所述配体药物偶联物的载荷的载荷表位遮蔽单元。

62. 根据权利要求 61 所述的应用，其特征在于，所述的载荷表位遮蔽单元不影响所述的配体药物偶联物进入目标细胞后正常分离所述的载荷。

63. 一种制备权利要求 1-46 中任一项所述的配体药物偶联物的方法，其包含以下步骤：

1）筛选获得特异性结合所述载荷的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体；

2）将筛选得到的特异性结合所述载荷的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体作为回收单元制备配体药物偶联物；

3）检测所筛选到的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体是否结合所制备的配体药物偶联物，如果不结合，则获得目标配体药物偶联物；或者检测所筛选到的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体是否结合所制备的药物-连接子，如果不结合，则获得目标配体药物偶联物。

4）如果所筛选到的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体结合所制备的配体药物偶联物或者药物-连接子，或制备的配体药物偶联物之间或者药物-连接子之间发生分子凝集：

A. 进一步改构或替换回收单元中的抗体或抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体，直至获得配体药物偶联物之间或者药物-连接子之间不发生分子凝集并且不结合目标配体药偶联物或者药物-连接子；和/或

B. 筛选能连接到所述配体药物偶联物的连接子或载荷上的载荷表位遮蔽单元，所连接的载荷表位遮蔽单元将能阻止所述筛选到的抗体或其抗原结合片段，受体，融合蛋白，多肽，寡肽，拟肽或适配体结合所制备的抗体药物偶联物并且不会影响所述的配体药物偶联物进入到细胞后的载体正常释放，筛选到合适的载荷表位遮蔽单元后，制备得到目标配体药物偶联物。

64. 一种治疗或预防疾病的方法，包括向有需要的受试者施用预防或治疗有效量的权利要求 1-46 中任一项所述的配体药物偶联物或其在药学上可接受的盐、氘代物、溶剂化物或权利要求 48 所述的药物组合物或其在药学上可接受的盐、氘代物、溶剂化物以及其在药学上可接受的辅料。

65. 根据权利要求 64 所述的方法，其特征在于，所述的疾病为肿瘤。

66. 权利要求 1-46 中任一项所述的配体药物偶联物或其药学上可接受的盐、氘代物、溶剂化物或权利要求 43 所述的药物组合物在制备用于治疗或预防疾病的药物中的用途。

67. 一种用于筛选权利要求 1 中的回收单元的免疫原。

68. 根据权利要求 67 所述的免疫原，其特征在于，所述的免疫原包括但不限于 MMAF、ML022-Dxd、ML022-D633-004、ML026-Dxd、ML031-D633-004、ML037-D633-004、ML042-Dxd、ML047-DX8951、MPA-Dxd、Biotin-PEG12-Dxd、Biotin-PEG10-Dxd、Biotin-PEG6-Dxd、Biotin-PEG6-Triazole-Dxd、Biotin-PEG10-Triazole-Dxd 和与所述 MMAF、ML022-Dxd、ML022-D633-004、ML026-Dxd、ML031-D633-004、ML037-D633-004、ML042-Dxd、ML047-DX8951、MPA-Dxd 偶联载体蛋白得到的偶联物。

69. 根据权利要求 67 或 68 所述的免疫原，其特征在于，所述的载体蛋白包括但不限于 KLH、BSA 或 OVA。

70. 一种可特异性结合配体药物偶联物游离载荷的载荷回收单元，其特征在于，所述载荷回收单元包含：

（1）选自以下氨基酸序列所限定的 CDR1-3 的 VHH 域：

如 SEQ ID NO:103、104 和 105 所示的 CDR1-3；

或者（2）选自如 SEQ ID NO:102 所示的氨基酸序列；

或者（3）选自包含如下限定的 VH 和 VL 组合的氨基酸序列：

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 4 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10 和 11 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 6、FAS 和 SEQ ID NO:13 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 4 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:16 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2、3 和 20 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:6、YAS 和 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:22、23 和 24 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:26、WAS 和 SEQ ID NO:27 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29、30 和 31 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:33、KVS 和 SEQ ID NO:34 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29、36 和 37 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:33、KLS 和 SEQ ID NO:34 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:40、41 和 42 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:44、KVS 和 SEQ ID NO:45 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:47、48 和 42 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:50、KVS 和 SEQ ID NO:51 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:53、54 和 55 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:57、DTS 和 SEQ ID NO:58 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:62、63 和 64 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:66、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:69、70 和 71 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:73、WAS 和 SEQ ID NO:74 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:80、GAS 和 SEQ ID NO:81 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:83、84 和 85 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:87、SAS 和 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:89、90 和 91 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:93、HGT 和 SEQ ID NO:94 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:76、77 和 78 所示的 HCDR1-3 的 VH，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:99、77 和 100 所示的 LCDR1-3 的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:38 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:39 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:46 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:52 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:56 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:59 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:60 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:61 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:65 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:72 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:75 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:82 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:86 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:88 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:92 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:95 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:96 所示的 VL；

包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:97 所示的 VH，和包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:98 所示的 VL；

所述 CDR1、CDR2、CDR3 序列、所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 序列和所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 序列是基于 IMGT 定义方案获得的；

或者（4）包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128 或 SEQ ID NO:129 所限定的多肽；

或者（5）包含核苷酸序列如 SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:146、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:161 或 SEQ ID NO:162 所限定的适配体。

71. 一种用于降低配体药物偶联物毒性的方法，其特征在于，在患者接受配体药物偶联物治疗方法时，给予患者有效量的能够结合所述配体药物偶联物中游离载荷的权利要求 70 中所限定的对应的载荷回收单元。

72. 权利要求 71 所述的方法，其特征在于，所述的配体药物偶联物与所述的载荷回收单元可同时给药，也可序贯给药。

73. 一种包含编码权利要求 70 所述的载荷回收单元中氨基酸序列的核酸。

74. 一种载体，其特征在于，所述载体包含权利要求 73 所述的核酸。

75. 权利要求 74 所述的载体，其特征在于，所述载体为表达载体。

76. 一种细胞，其特征在于，所述细胞中包含有权利要求 74 或权利要求 75 所述的载体。

77. 权利要求 76 所述的细胞，其特征在于，所述细胞选自 CHO 细胞、COS 细胞、HEK-293 细胞、NSO 细胞、PER.C6®细胞或 Sp2.0 细胞。