

抗 TF 抗体和抗 TF 抗体-药物偶联物及其医药用途

技术领域

本披露涉及抗 TF 抗体和抗 TF 抗体-药物偶联物及其医药用途。

背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

Tissue Factor 又称为 TF/tissue thromboplastin/FIII/CD142，是跨膜糖蛋白，全长 47kDa，其中胞外区 219 个氨基酸，跨膜区 23 个氨基酸，胞内区 21 个氨基酸。人

Tissue Factor 的基因名称为 F3。

TF 主要由血管周围细胞（如外膜成纤维细胞和周细胞）和体表（如皮肤角质形成细胞）表达，单核细胞、脑星形胶质细胞、肺部上皮细胞、心脏成纤维细胞和心肌细胞等也都有表达。这种广泛的表达有利于它形成全身性的止血屏障。

TF 在正常生理条件下是外源性凝血的启动子，是血液中的 FVII（coagulation factor VII）和 FVII 的活化形式 FVIIa 的细胞受体。当血管破损时，TF 与血液中的 FVII 形成复合物并活化 FVII 为 FVIIa，生成 TF/FVIIa 复合物。TF/FVIIa 可结合血液中的 FX（coagulation factor X），使其活化为 FXa，并形成 TF/FVIIa/FXa 复合物，进一步引发凝血级联反应，活化 prothrombin(FII)为 thrombin(FIIa)，thrombin 使凝血纤维原 fibrinogen 转化为不可溶的凝血纤维 fibrin，最终完成凝血。

TF/FVIIa 复合物可激活 PAR2（proteinase-activated receptors2）信号通路，TF/FVIIa 复合物还可以与 Integrin β 1 形成 TF/FVIIa/Integrin β 1 复合体，PAR2 和 Integrin β 1 的下游信号通路可促进肿瘤的生长。TF/FVIIa 凝血级联反应的下游产物 thrombin 和 Fibrin 与肿瘤的转移及血栓形成相关。

TF 在病理条件下高表达于多种实体瘤如胰腺癌、肺癌、乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、食道癌、卵巢癌、膀胱癌等。多种生长因子和细胞因子诱导 TF 表达，多种转录因子和 microRNA 调节癌细胞中的 TF 基因表达。如肝细胞生长因子（HGF）/c-Met 和表皮生长因子受体(EGFR)信号通路可通过激活多种激酶途径，包括 JNK、Src、PI3k/Akt/ mTOR 和 KRAS/Raf/MEK/ERK 等上调 TF 的表达。转化生长因子 β （TGF- β ）和血管内皮生长因子（VEGF）也可增加 TF 的表达。在炎症期间，TF 可被多种细胞因子上调，如干扰素- γ （IFN- γ ）、肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）等。TF 也可被一些 micro RNAs 如 miR-181b，miR19 等下调表达，或被单核细胞（monocytes）上的 TFPI（tissue factor pathway inhibitor）抑制活性。

病理条件下 TF 的高表达可促进肿瘤的生长、转移以及血栓的形成，并且与不良的预后相关。因此开发针对 TF 的 ADC，既可以通过抗体的信号阻断作用抑制肿瘤的生长，也可以通过 TF 抗体的靶向性，实现毒素对肿瘤的特异性杀伤。

发明内容

本披露涉及抗 TF 抗体，抗 TF 抗体-药物偶联物（尤其是抗 TF 抗体-依喜替康类似物偶联物）以及其医药用途。

5 本披露提供了一种抗 TF 抗体，其中所述抗 TF 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

a. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 64 或 41 的氨基酸序列，和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 65 或 42 的氨基酸序列，和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 66 或 43 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO: 67 或 44 的氨基酸序列，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 68、83 或 45 的氨基酸序列；

b. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 46 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列，和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列，和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 49、111、112 或 113 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO: 50 的氨基酸序列，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 51 的氨基酸序列；

c. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 73 或 144 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 74、142、145 或 146 的氨基酸序列，和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 75 或 143 的氨基酸序列，和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 76、151、147 或 150 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO: 77 或 148 的氨基酸序列，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 78 或 149 的氨基酸序列；

优选地，

a. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 64 的氨基酸序列，和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 65 的氨基酸序列，和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO: 67 的氨基酸序列，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 68 或 83 的氨基酸序列；或

所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 41 的氨基酸序列，和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 42 的氨基酸序列，和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 43 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO: 44 的氨基酸序列，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 45 的氨基酸序列；

b. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 46 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列，和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列，和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 49 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO: 50 的氨基酸序列，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 51 的氨基酸序列；

c. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 73 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 74 的氨基酸序列，和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 75 的氨基酸序

列,和所述轻链可变区的LCDR1包含SEQ ID NO: 76或151的氨基酸序列,LCDR2包含SEQ ID NO: 77或148的氨基酸序列,和LCDR3包含SEQ ID NO: 78的氨基酸序列。

5 在一些实施方案中,如前所述的抗TF抗体,其中如上所述的HCDR1-3和LCDR1-3按Kabat编号规则确定。在一些实施方案中,如前所述的抗TF抗体,其中如上所述的HCDR1-3和LCDR1-3按IMGT编号规则确定。在一些实施方案中,如前所述的抗TF抗体,其中如上所述的HCDR1-3和LCDR1-3按Chothia编号规则确定。在一些实施方案中,如前所述的抗TF抗体,其中如上所述的HCDR1-3和LCDR1-3按AbM编号规则确定。在一些实施方案中,如前所述的抗TF抗体,其中如上所述的HCDR1-3和LCDR1-3按Contact编号规则确定。

10 本披露提供了一种抗TF抗体,其中所述抗TF抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中:

a. 所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO: 40,SEQ ID NO: 64和SEQ ID NO: 65所示的HCDR1,HCDR2和HCDR3;所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:66,SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:68所示的LCDR1, LCDR2和LCDR3;或

15 所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO: 40,SEQ ID NO: 64和SEQ ID NO: 65所示的HCDR1, HCDR2和HCDR3;所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO: 66,SEQ ID NO: 67和SEQ ID NO: 83所示的LCDR1, LCDR2和LCDR3;或

20 所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO: 40,SEQ ID NO: 41和SEQ ID NO: 42所示的HCDR1, HCDR2和HCDR3;所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO: 43,SEQ ID NO: 44和SEQ ID NO: 45所示的LCDR1, LCDR2和LCDR3;

b. 所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO: 46,SEQ ID NO: 47和SEQ ID NO: 48所示的HCDR1,HCDR2和HCDR3;所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO: 49,SEQ ID NO: 50和SEQ ID NO:51所示的LCDR1, LCDR2和LCDR3;

25 c. 所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO: 73,SEQ ID NO: 74和SEQ ID NO: 75所示的HCDR1,HCDR2和HCDR3;所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO: 76,SEQ ID NO: 77和SEQ ID NO:78所示的LCDR1, LCDR2和LCDR3;或

30 所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO: 73,SEQ ID NO: 74和SEQ ID NO: 75所示的HCDR1,HCDR2和HCDR3;所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO: 151,SEQ ID NO: 148和SEQ ID NO:78所示的LCDR1, LCDR2和LCDR3;

如上所述的HCDR1-3和LCDR1-3按Kabat编号规则确定。

本披露提供了一种抗TF抗体,其中所述抗TF抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中:

35 a. 所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO: 40,SEQ ID NO: 64和SEQ ID NO: 65所示的HCDR1,HCDR2和HCDR3;所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:66,SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:68所示的LCDR1, LCDR2和LCDR3;

b. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 和 SEQ ID NO: 48 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 和 SEQ ID NO: 51 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

5 c. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 和 SEQ ID NO: 75 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 和 SEQ ID NO: 78 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中, 如前所述的抗 TF 抗体, 其为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

在一些实施方案中, 如前所述的抗 TF 抗体, 其为嵌合抗体或人源化抗体。

10 在一些实施方案中, 如前所述的抗 TF 抗体, 其为人源化抗体。

在一些实施方案中, 如前任一项目所述的抗 TF 抗体, 其包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

a. 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 62、58、130、131 或 132 具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 63、81、59、15 133、134 或 135 具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列; 或所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 36 具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 37 具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列;

b. 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 52 或 114 具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 53、115、116、117、118、20 119、120 或 121 具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列; 或所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 38 具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 39 具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列;

c. 所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 71、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95 或 96 具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 72、97、102、98、99、100 或 101 具有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列; 25

优选地,

a. 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 62、58、130、131 或 132 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 63、81、59、133、134 或 135 的氨基酸序列; 30 或所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列;

b. 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 52 或 114 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 53、115、116、117、118、119、120 或 121 的氨基酸序列; 或所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ 35 ID NO: 39 的氨基酸序列;

c. 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 71、84、85、86、87、88、89、90、91、

92、93、94、95 或 96 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 72、97、102、98、99、100 或 101 的氨基酸序列；

更优选地，

- a. 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 63 或 81 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列；或

- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 130 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 133 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 131 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 133 的氨基酸序列；或

- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 133 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 132 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 133 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 130 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 134 的氨基酸序列；或

- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 131 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 134 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 134 的氨基酸序列；或

- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 132 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 134 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 130 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 131 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列；或

- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 132 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 130 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 135 的氨基酸序列；或

- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 131 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 135 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含

SEQ ID NO: 135 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 132 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 135 的氨基酸序列；

5 b. 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 52 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 39 的氨基酸序列；

c. 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 71 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 72、97 或 102 的氨基酸序列。

10 在一些实施方案中，如前任一项所述的抗 TF 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

a. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 36 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 37 所示；或

15 b. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 38 示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 39 示。

在一些实施方案中，如前任一项所述的抗 TF 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

a. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 62 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 63 所示；或

20 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 62 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 81 所示；或

所述重链可变区如 SEQ ID NO: 58 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 59 所示；或

25 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 36 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 37 所示；或

所述重链可变区如 SEQ ID NO: 130 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 133 所示；或

所述重链可变区如 SEQ ID NO: 131 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 133 所示；或

30 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 58 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 133 所示；或

所述重链可变区如 SEQ ID NO: 132 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 133 所示；或

35 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 130 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 134 所示；或

所述重链可变区如 SEQ ID NO: 131 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:

- 134 所示；或
所述重链可变区如 SEQ ID NO: 58 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
134 所示；或
所述重链可变区如 SEQ ID NO: 132 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
5 134 所示；或
所述重链可变区如 SEQ ID NO: 130 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
59 所示；或
所述重链可变区如 SEQ ID NO: 131 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
59 所示；或
10 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 132 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
59 所示；或
所述重链可变区如 SEQ ID NO: 130 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
135 所示；或
所述重链可变区如 SEQ ID NO: 131 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
15 135 所示；或
所述重链可变区如 SEQ ID NO: 58 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
135 所示；或
所述重链可变区如 SEQ ID NO: 132 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
135 所示；
20 b. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 52 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
53 所示；或
所述重链可变区如 SEQ ID NO: 38 所示，和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
39 所示；
c. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 71 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
25 72 所示；或
所述重链可变区如 SEQ ID NO: 71 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 97
所示；或
所述重链可变区如 SEQ ID NO: 71 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 102
所示。
30 在一些实施方案中，如前任一项所述的抗 TF 抗体，其包含重链可变区和轻链
可变区，其中：
a. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 62 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
63 所示；或
b. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 52 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:
35 53 所示；或
c. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 71 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO:

72 所示。

在一些实施方案中，如前一项所述的抗 TF 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区选自如 SEQ ID NO: 130、131 和 132；和所述轻链可变区选自如 SEQ ID NO: 133、134 和 135 所示。

在一些实施方案中，如前一项所述的抗 TF 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区选自如 SEQ ID NO: 114；和所述轻链可变区选自如 SEQ ID NO: 115、116、117、118、119、120 和 121 所示。

在一些实施方案中，如前一项所述的抗 TF 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区选自如 SEQ ID NO: 84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95 和 96；和所述轻链可变区选自如 SEQ ID NO: 97、98、99、100、101 和 102 所示。

在一些实施方案中，如前一项所述的抗 TF 抗体，其为抗体片段；优选地，其选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、dsFv 和 dAb。

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗 TF 抗体进一步包含抗体重链恒定区和轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区，所述轻链恒定区为人 κ 或 λ 链恒定区；更优选地，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列，和所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 55 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示，和所述轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 55 所示。

在一些实施方案中，如前一项所述的抗 TF 抗体，其选自以下任一项所述的包含重链和轻链的抗体：

a. 与 SEQ ID NO: 69、60、136、137 或 138 具有至少 80% 序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 70、82、61、139、140 或 141 具有至少 80% 序列同一性的轻链；或

与 SEQ ID NO: 107 具有至少 80% 序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 108 具有至少 80% 序列同一性的轻链；

b. 与 SEQ ID NO: 56 或 122 具有至少 80% 序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 57、123、124、125、126、127、128 或 129 具有至少 80% 序列同一性的轻链；或

与 SEQ ID NO: 109 具有至少 80% 序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 110 具有至少 80% 序列同一性的轻链；

c. 与 SEQ ID NO: 79、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163 或 164 具有至少 80% 序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 80、165、

- 170、166、167、168 或 169 具有至少 80%序列同一性的轻链；
优选地，
a.与 SEQ ID NO: 69 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 70
或 82 具有至少 80%序列同一性的轻链；或
5 与 SEQ ID NO: 60 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 61
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 107 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 108
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 136 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 139
10 具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 137 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 139
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 60 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 139
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
15 与 SEQ ID NO: 138 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 139
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 136 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 137 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
20 具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 60 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 138 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
25 与 SEQ ID NO: 136 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 61
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 137 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 61
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 138 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 61
30 具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 136 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 141
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 137 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 141
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
35 与 SEQ ID NO: 60 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 141
具有至少 80%序列同一性的轻链；或

与 SEQ ID NO: 138 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 141 具有至少 80% 序列同一性的轻链;

b. 与 SEQ ID NO: 56 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 57 具有至少 80% 序列同一性的轻链; 或

5 与 SEQ ID NO: 109 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 110 具有至少 80% 序列同一性的轻链;

c. 与 SEQ ID NO: 79 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 80、165 或 170 具有至少 80% 序列同一性的轻链;

更优选地,

10 a. 所述重链包含 SEQ ID NO: 69 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 70 的氨基酸序列; 或

所述重链包含 SEQ ID NO: 69 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 82 的氨基酸序列; 或

15 所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列; 或

所述重链包含 SEQ ID NO: 107 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 108 的氨基酸序列; 或

所述重链包含 SEQ ID NO: 136 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 139 的氨基酸序列; 或

20 所述重链包含 SEQ ID NO: 137 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 139 的氨基酸序列; 或

所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 139 的氨基酸序列; 或

25 所述重链包含 SEQ ID NO: 138 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 139 的氨基酸序列; 或

所述重链包含 SEQ ID NO: 136 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 140 的氨基酸序列; 或

所述重链包含 SEQ ID NO: 137 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 140 的氨基酸序列; 或

30 所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 140 的氨基酸序列; 或

所述重链包含 SEQ ID NO: 138 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 140 的氨基酸序列; 或

35 所述重链包含 SEQ ID NO: 136 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列; 或

所述重链包含 SEQ ID NO: 137 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 61

的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 138 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 136 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 141 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 137 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 141 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 141 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 138 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 141 的氨基酸序列；

b. 所述重链包含 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 57 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 109 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 110 的氨基酸序列；

c. 所述重链包含 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 80 的氨基酸序列或

所述重链包含 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 165 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 170 的氨基酸序列。

上述的“至少 80%序列同一性”, 包含至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性。

在一些实施方案中, 如前一项所述的抗 TF 抗体, 其包含重链和轻链, 其中:

a. 与 SEQ ID NO: 69 具有至少 85%序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 70 具有至少 85%序列同一性的轻链；或

与 SEQ ID NO: 69 具有至少 85%序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 82 具有至少 85%序列同一性的轻链；或

与 SEQ ID NO: 60 具有至少 85%序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 61 具有至少 85%序列同一性的轻链；或

与 SEQ ID NO: 107 具有至少 85%序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 108 具有至少 85%序列同一性的轻链；或

与 SEQ ID NO: 136 具有至少 85%序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 139 具有至少 85%序列同一性的轻链；或

与 SEQ ID NO: 137 具有至少 85%序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 139

- 具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 60 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 139
具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 138 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 139
- 5 具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 136 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 137 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
具有至少 85%序列同一性的轻链；或
- 10 与 SEQ ID NO: 60 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 138 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 136 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 61
- 15 具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 137 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 61
具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 138 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 61
具有至少 85%序列同一性的轻链；或
- 20 与 SEQ ID NO: 136 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 141
具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 137 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 141
具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 60 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 141
- 25 具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 138 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 141
具有至少 85%序列同一性的轻链；
b. 与 SEQ ID NO: 56 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 57
具有至少 85%序列同一性的轻链；或
- 30 与 SEQ ID NO: 109 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 110
具有至少 85%序列同一性的轻链；
c. 与 SEQ ID NO: 79 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 80
具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 79 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 165
- 35 具有至少 85%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 79 具有至少 85%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 170

具有至少 85%序列同一性的轻链。

上述的“至少 85%序列同一性”，包含至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性。

5 在一些实施方案中，如前任一项所述的抗 TF 抗体，其选自以下任一项所述的包含重链和轻链的抗体：

- a. 所述重链如 SEQ ID NO: 69 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 70 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 69 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 82 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 60 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 61 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 107 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 108 所示；或
10 所述重链如 SEQ ID NO: 136 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 139 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 137 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 139 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 60 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 139 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 138 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 139 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 136 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 140 所示；或
15 所述重链如 SEQ ID NO: 137 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 140 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 60 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 140 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 138 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 140 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 136 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 61 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 137 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 61 所示；或
20 所述重链如 SEQ ID NO: 138 所示，和/或与 SEQ ID NO: 61 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 136 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 141 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 137 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 141 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 60 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 141 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 138 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 141 所示；
25 b. 所述重链如 SEQ ID NO: 56 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 57 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 109 所示，和所述轻链如 SEQ ID NO: 110 所示；
c. 所述重链如 SEQ ID NO: 79 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 80 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 79 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 165 所示；或
所述重链如 SEQ ID NO: 79 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 170 所示。

30 在一些实施方案中，如前任一项所述的抗 TF 抗体，其包含重链和轻链：

- a. 所述重链如 SEQ ID NO: 69 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 70 所示；
b. 所述重链如 SEQ ID NO: 56 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 57 所示；
c. 所述重链如 SEQ ID NO: 79 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 80 所示。

35 在一些实施方案中，本披露还提供核酸分子，其编码如前任一项所述的抗 TF 抗体。

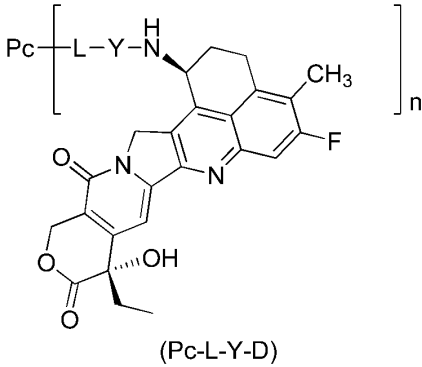
在一些实施方案中，本披露还提供一种宿主细胞，其包含如前所述的核酸分

子。

在一些实施方案中，本披露还提供一种免疫偶联物，其包含如前一项所述的抗 TF 抗体和效应分子，其中，所述效应分子偶联至如前一项所述的抗 TF 抗体；优选地，所述效应分子选自抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子，以及其任何组合。

在一些实施方案中，本披露还提供一种用于体内和/或体外免疫检测或测定 TF 的方法，所述方法包括使如前一项所述的抗 TF 抗体接触受试者或来自受试者的样品的步骤。

在一些实施方案中，本披露还提供一种通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐：



其中：

Y 为 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ；

其中， R^a 和 R^b 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素和 C_{1-6} 烷基；

R^1 为 C_{3-6} 环烷基- C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基；

R^2 选自氢原子、卤代 C_{1-6} 烷基和 C_{3-6} 环烷基；

或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基；

m 为 0 至 4 的整数；

L 为接头单元；

n 为 1 至 10；优选地，n 为 1 至 8；更优选地，n 为 2 至 8；最优选地，n 为 4 至 8；

Pc 为如前一项所述的抗 TF 抗体。

在一些实施方案中，n 为 0-10（包括小数和整数），优选 1-10，更优选 1-8，或 2-8，或 2-7，2-6，或 2-5，或 2-4，或 3-8，或 3-7，或 3-6，或 4-8，或 4-7，或 4-6，或 4-5 的平均值；在一些实施方案中，n 为平均值，如 1，2，3，4，5，6，7，8，9，10。

在一些实施方案中， R^a 和 R^b 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素和

C₁₋₆ 烷基；优选地，R^a 和 R^b 相同或不同，且各自独立地为氢原子或 C₁₋₆ 烷基。

在一些实施方案中，R¹ 为 C₃₋₆ 环烷基；优选地，R¹ 为环丙基。

在一些实施方案中，R² 为氢原子或卤代 C₁₋₆ 烷基；优选地，R² 为氢原子。

在一些实施方案中，R¹ 和 R² 与其相连接的碳原子一起形成环丙基。

- 5 在一些实施方案中，R¹ 为 C₃₋₆ 环烷基，且 R² 为氢原子或卤代 C₁₋₆ 烷基；优选地，R¹ 为环丙基，且 R² 为氢原子。

在一些实施方案中，如前所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中接头单元-L-为 -L¹-L²-L³-L⁴-，

- 10 其中，L¹ 选自 -(琥珀酰亚胺-3-基-M)-W-C(O)-、-CH₂-C(O)-NR³-W-C(O)-和 -C(O)-W-C(O)-，其中 W 选自 C₁₋₆ 亚烷基和 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基，其中所述的 C₁₋₆ 亚烷基或 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基各自独立地任选被选自卤素、羟基、氰基、氨基、C₁₋₆ 烷基、卤代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基和 C₃₋₆ 环烷基中的一个或多个取代基所取代；

- 15 L² 选自 -NR⁴(CH₂CH₂O)^pCH₂CH₂C(O)-、-NR⁴(CH₂CH₂O)^pCH₂C(O)-、-S(CH₂)^pC(O)- 和化学键，其中 p¹ 为 1 至 20 的整数；

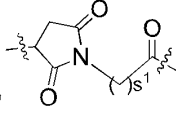
L³ 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代；

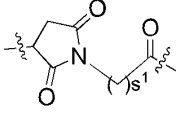
- 20 L⁴ 选自 -NR⁵(CR⁶R⁷)_t-、-C(O)NR⁵-、-C(O)NR⁵(CH₂)_t- 和化学键，其中 t 为 1 至 6 的整数；

R³、R⁴ 和 R⁵ 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、C₁₋₆ 烷基、卤代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基和 C₁₋₆ 羟烷基；

- 25 R⁶ 和 R⁷ 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、C₁₋₆ 烷基、卤代 C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基和 C₁₋₆ 羟烷基。

在一些实施方案中，L¹ 选自 -(琥珀酰亚胺-3-基-M)-W-C(O)-，其中 W 选自 C₁₋₆

亚烷基和 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基；优选地，L¹ 为 ，其中 s¹ 为 2 至 8

的整数；更优选地，L¹ 为 ，其中 s¹ 为 5。

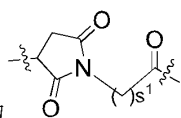
在一些实施方案中，L² 为化学键。

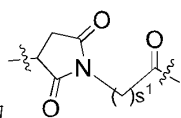
- 30 在一些实施方案中，L³ 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基；优选地，L³ 为四肽残基；更优

选地, L^3 为如 GGFG (SEQ ID NO: 105) 所示的四肽残基。

在一些实施方案中, L^4 选自 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$, 其中 t 为 1 至 6 的整数; R^5 、 R^6 和 R^7 相同或不同, 且各自独立地为氢原子或 C_{1-6} 烷基; 优选地, L^4 为 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$, 其中 R^5 、 R^6 或 R^7 相同或不同, 且各自独立地为氢原子或 C_{1-6} 烷基, t 为 1 或 2。

- 5 在一些实施方案中, 如前所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其中接头单元-L-为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$,



其中 L^1 为 , 其中 s^1 为 2 至 8 的整数;

L^2 为化学键;

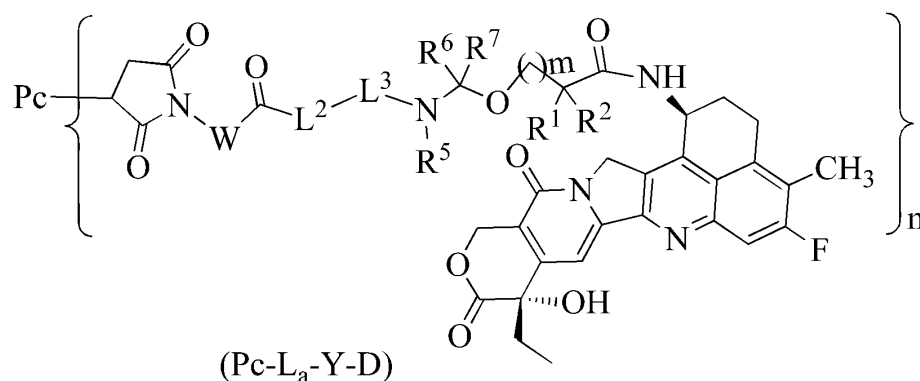
L^3 为四肽残基; 优选地, L^3 为如 GGFG (SEQ ID NO: 105) 所示的四肽残基;

- 10 L^4 为 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$, 其中 R^5 、 R^6 或 R^7 相同或不同, 且各自独立地为氢原子或 C_{1-6} 烷基, t 为 1 或 2;

其中所述-L-的 L^1 端与 Pc 相连, L^4 端与 Y 相连。

在一些实施方案中, 如前一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其为通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其

- 15 药学上可接受的盐:



其中,

Pc 为如前一项所述的抗 TF 抗体;

m 为 0 至 4 的整数;

- 20 n 为 1 至 10;

R^1 为 C_{3-6} 环烷基- C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基;

R^2 选自氢原子、卤代 C_{1-6} 烷基和 C_{3-6} 环烷基;

或者, R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基;

- 25 W 选自 C_{1-6} 亚烷基和 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-6} 环烷基, 其中所述的 C_{1-6} 亚烷基和 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-6} 环烷基各自独立地任选被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代;

L^2 选自 $-NR^4(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^4(CH_2CH_2O)_pCH_2C(O)-$ 、

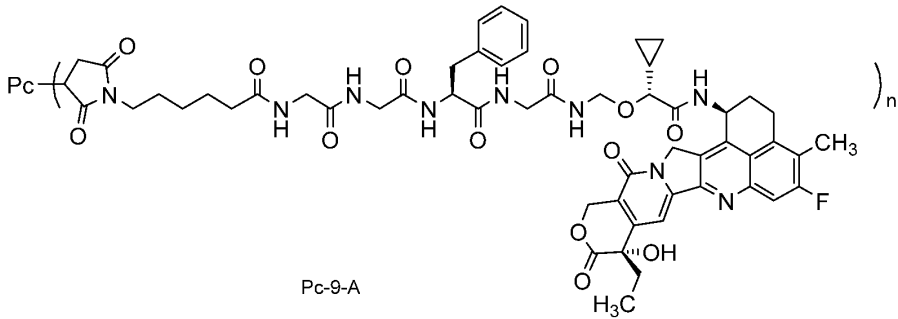
-S(CH₂)^{p¹}C(O)- 和化学键，其中 p¹ 为 1 至 20 的整数；

L³ 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代；

R⁴ 和 R⁵ 选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基；

R⁶ 和 R⁷ 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

在一些实施方案中，如前任一项目所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其为通式 (Pc-9-A) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐：



其中：

n 为 1 至 8；

Pc 为如前任一项目所述的抗 TF 抗体；

优选地，所述的 Pc 选自以下任一项目所述的包含重链可变区和轻链可变区的抗 TF 抗体：

a. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 64 和 SEQ ID NO: 65 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 和 SEQ ID NO: 68 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3; 或

所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 64 和 SEQ ID NO: 65 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 和 SEQ ID NO: 83 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3; 或

所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 42 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 和 SEQ ID NO: 45 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

b. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 和 SEQ ID NO: 48 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 和 SEQ ID NO: 51 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

c. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 和 SEQ ID NO:

75 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 和 SEQ ID NO: 78 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

更优选地, 所述的 Pc 选自以下任一项所述的包含重链可变区和轻链可变区的抗 TF 抗体:

5 a. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 62 所示; 和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 63 所示; 或

所述重链可变区如 SEQ ID NO: 62 所示; 和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 81 所示; 或

10 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 58 所示; 和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 59 所示; 或

所述重链可变区如 SEQ ID NO: 36 所示; 和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 37 所示;

b. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 52 所示; 和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 53 所示; 或

15 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 38 示; 和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 39 示;

c. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 71 所示; 和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 72 所示;

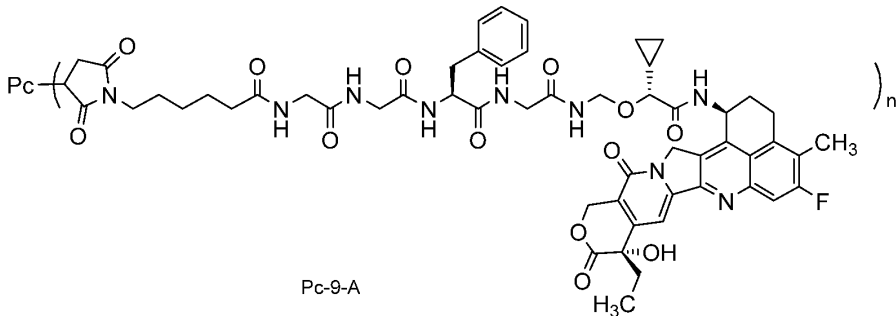
最优选地, 所述的 Pc 选自以下任一项所述的包含重链和轻链的抗体:

20 a. 所述重链如 SEQ ID NO: 69 所示; 和所述轻链如 SEQ ID NO: 70 所示; 或
所述重链如 SEQ ID NO: 69 所示; 和所述轻链如 SEQ ID NO: 82 所示; 或
所述重链如 SEQ ID NO: 60 所示; 和所述轻链如 SEQ ID NO: 61 所示;

b. 所述重链如 SEQ ID NO: 56 所示; 和所述轻链如 SEQ ID NO: 57 所示;

c. 所述重链如 SEQ ID NO: 79 所示; 和所述轻链如 SEQ ID NO: 80 所示。

25 在一些实施方案中, 如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其为通式 (Pc-9-A) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:



其中:

30 n 为 1 至 8; 优选的, n 为 2 至 8; 更优选的, n 为 4 至 8;

Pc 为如前任一所述抗 TF 抗体；

优选地，所述的 Pc 选自以下任一所述的包含重链可变区和轻链可变区的抗 TF 抗体：

- a. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 64 和 SEQ ID NO: 65 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67 和 SEQ ID NO: 68 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3; 或
- b. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 和 SEQ ID NO: 48 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 和 SEQ ID NO: 51 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3; 或
- c. 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 和 SEQ ID NO: 75 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 和 SEQ ID NO: 78 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3; 或

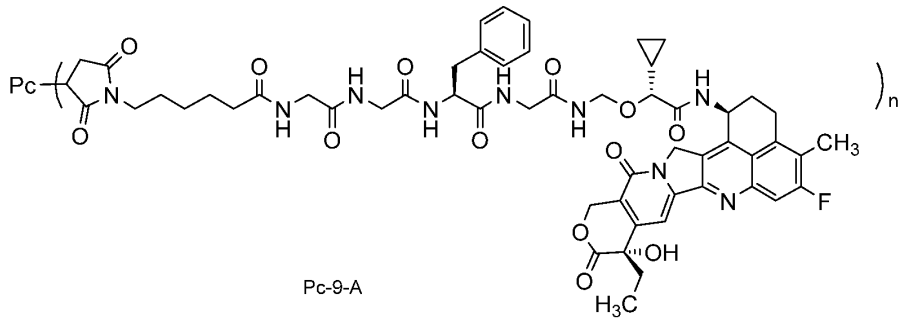
更优选地，所述的 Pc 选自以下任一所述的包含重链可变区和轻链可变区的抗 TF 抗体：

- a. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 62 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 63 所示；
- b. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 52 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 53 所示；和
- c. 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 71 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 72 所示；

最优选地，所述的 Pc 选自以下任一所述的包含重链和轻链的抗体：

- a. 所述重链如 SEQ ID NO: 69 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 70 所示；或
- b. 所述重链如 SEQ ID NO: 56 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 57 所示；或
- c. 所述重链如 SEQ ID NO: 79 所示；和所述轻链如 SEQ ID NO: 80 所示。

在一些实施方案中，如前任一所述通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其为通式 (Pc-9-A) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐：

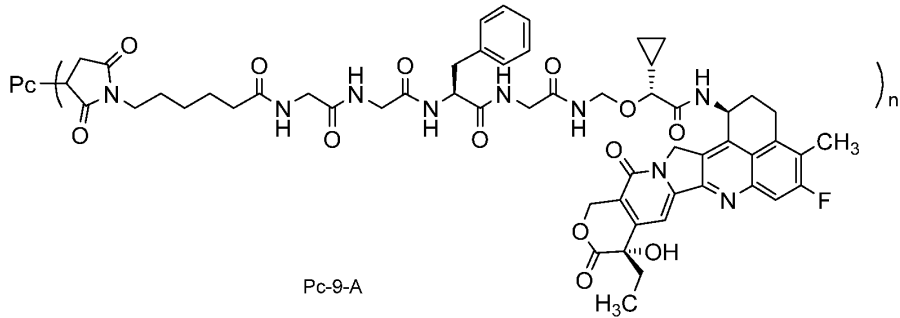


其中：

- n 为 1 至 8；优选的，n 为 2 至 8；更优选的，n 为 4 至 8；

Pc 为包含重链可变区和轻链可变区的抗 TF 抗体:所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 64 和 SEQ ID NO: 65 所示的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67 和 SEQ ID NO:68 所示的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3。

5 在一些实施方案中, 如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其为通式 (Pc-9-A) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:

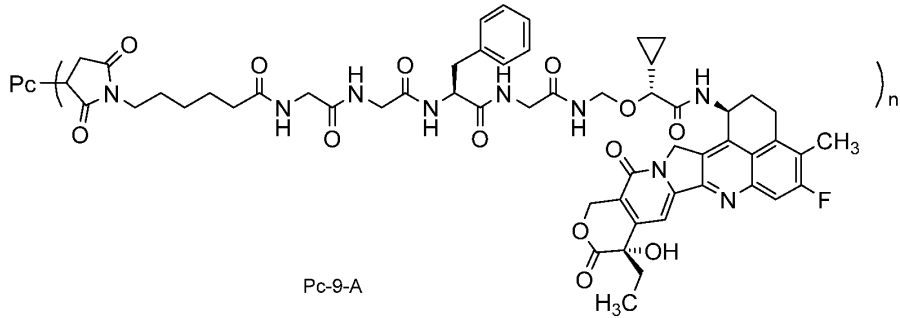


其中:

10 n 为 1 至 8; 优选的, n 为 2 至 8; 更优选的, n 为 4 至 8;

Pc 为包含重链可变区和轻链可变区的抗 TF 抗体: 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 62 所示; 和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 63 所示。

15 在一些实施方案中, 如前任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其为通式 (Pc-9-A) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:

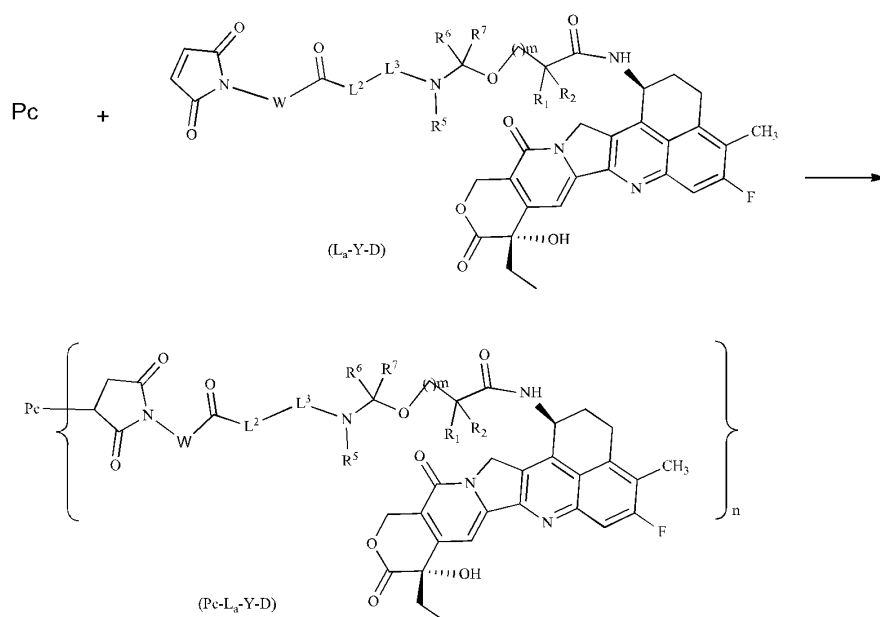


其中:

n 为 1 至 8; 优选的, n 为 2 至 8; 更优选的, n 为 4 至 8;

20 Pc 为包含重链和轻链的抗 TF 抗体: 所述重链如 SEQ ID NO: 69 所示; 和所述轻链如 SEQ ID NO: 70 所示。

在一些实施方案中, 本披露还提供一种制备如通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐的方法, 其包括以下步骤:



Pc 还原后, 与通式 (L_a-Y-D) 所示的化合物发生偶联反应, 得到通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐;

其中:

5 Pc 为如前一项所述的抗 TF 抗体;

m 为 0 至 4 的整数;

n 为 1 至 10;

R¹ 为 C₃₋₆ 环烷基-C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基;

R² 选自氢原子、卤代 C₁₋₆ 烷基和 C₃₋₆ 环烷基;

10 或者, R¹ 和 R² 与其相连接的碳原子一起形成 C₃₋₆ 环烷基;

W 选自 C₁₋₆ 亚烷基和 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基, 其中所述的 C₁₋₆ 亚烷基和 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基各自独立地任选被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代;

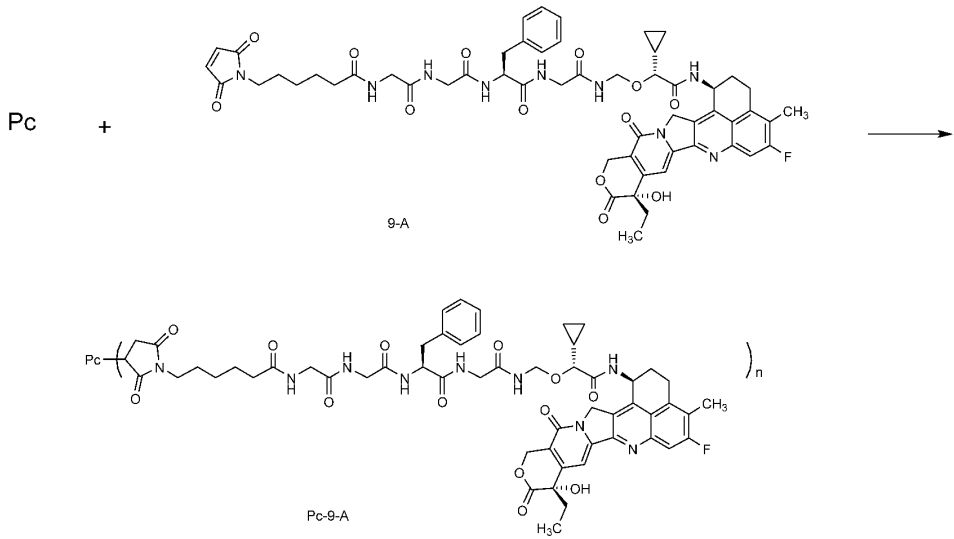
15 L² 选自 -NR⁴(CH₂CH₂O)^pCH₂CH₂C(O)-、-NR⁴(CH₂CH₂O)^pCH₂C(O)-、-S(CH₂)^pC(O)- 和化学键, 其中 p¹ 为 1 至 20 的整数;

L³ 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基, 其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基, 并任选被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代;

20 R⁴ 和 R⁵ 选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

R⁶ 和 R⁷ 相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

在一些实施方案中, 本披露还提供一种制备如通式 (Pc-9-A) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的方法, 其包括以下步骤:



Pc 还原后，与化合物 9-A 发生偶联反应，得到通式（Pc-9-A）所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐；

5 其中：

n 为 1 至 8；优选的，n 为 2 至 8；更优选的，n 为 4 至 8；

Pc 为如前任一项目所述的抗 TF 抗体。

10 在一些实施方案中，本披露还提供一种药物组合物，其包含如前任一项目所述的抗 TF 抗体，或如前所述的核酸分子，或如前任一项目所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐；以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

在一些实施方案中，本披露还提供如前任一项目所述的抗 TF 抗体，或如前所述的核酸分子，或如前任一项目所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐；或如前所述的药物组合物在制备用于治疗 TF 介导的疾病或病症的药物中的用途。

15 在一些实施方案中，本披露还提供如前任一项目所述的抗 TF 抗体，或如前所述的核酸分子，或如前任一项目所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐；或如前所述的药物组合物在制备用于治疗肿瘤或癌症的药物中的用途。

20 在一些实施方案中，本披露还提供如前任一项目所述的抗 TF 抗体，或如前所述的核酸分子，或如前任一项目所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐；或如前所述的药物组合物在制备用于治疗肿瘤或癌症的药物中的用途；优选地，所述肿瘤或癌症选自乳腺癌、胰腺癌、肺癌(包括非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、食道癌、卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、前列腺癌、膀胱癌、输卵管癌、腹膜癌、结直肠癌（包括结肠癌和直肠癌）、头颈癌和鳞状细胞癌。

25 在一些实施方案中，本披露还提供一种试剂盒，其包含如前任一项目所述的抗 TF 抗体，或如前所述的核酸分子，或如前任一项目所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐；或如前所述的药物组合物。

在一些实施方案中，如前任一项目所述的通式（Pc-L-Y-D）所示的抗体-药物偶

联物或其药学上可接受的盐，m 非限制性地选自 0、1、2、3 和 4。

在一些实施方案中，本披露还提供一种预防或治疗疾病或病症的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如前一项所述的抗 TF 抗体，或如前一项所述的核酸分子，或如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，
5 或如前一项所述的药物组合物。在一些实施方案中，所述疾病或病症为肿瘤或癌症；优选地，所述疾病或病症为与 TF 有关的疾病或病症。在一些实施方案中，所述肿瘤或癌症选自乳腺癌、胰腺癌、肺癌（包括非小细胞肺癌和小细胞肺癌）、食道癌、卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、前列腺癌、膀胱癌、输卵管癌、腹膜癌、结肠直肠癌（包括结肠癌和直肠癌）、头颈癌和鳞状细胞癌。

10 另一方面，本披露提供了一种药物组合物，其包含如前一项所述的抗 TF 抗体、抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。在一些实施方案中，所述单位剂量的药物组合物中含有 0.1mg-3000mg 或 1mg-1000mg 如前所述的抗 TF 抗体或如前所述的抗体-药物偶联物。

15 另一方面，本披露提供了如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物作为药物。

另一方面，本披露提供了如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物用于治疗 TF 介导的疾病或病症的药物；在一些实施方案中，所述 TF 介导的疾病或病症为 TF 高表达癌症，TF 中表达癌症或 TF 低表达癌症。在一些实施方案中，如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受
20 的盐或包含其的药物组合物用于治疗肿瘤或癌症。

另一方面，本披露进一步涉及一种用于治疗 and/或预防肿瘤或癌症的方法，该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效剂量的如前一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或包含其的药物组合物；在一些实施方案中，其中所述
25 的肿瘤或癌症为与 TF 高表达相关的癌症，与 TF 中表达相关的癌症或与 TF 低表达相关的癌症。

可将活性化合物制成适合于通过任何适当途径给药的形式，活性化合物可以以单位剂量的方式，或者是受试者可以以单剂自我给药的方式。本披露化合物或组合物的单位剂量的表达方式可以是片剂、胶囊、扁囊剂、瓶装药水、药粉、颗粒剂、锭剂、栓剂、再生药粉或液体制剂。
30

本披露治疗方法中所用化合物或组合物的剂量通常将随疾病的严重性、受试者的体重和化合物的相对功效而改变。不过，作为一般性指导，合适的单位剂量可以是 0.1 mg ~1000mg。

本披露的药物组合物除活性化合物外，可含有一种或多种辅料，所述辅料选自以下成分：填充剂、稀释剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂或赋形剂等。根据给药
35 方法的不同，组合物可含有 0.1 至 99 重量%的活性化合物。

本披露提供的抗 TF 抗体具有与细胞表面抗原良好的亲和力和良好的细胞内吞效率，对凝血基本没有影响；本披露提供的抗 TF 抗体-药物偶联物有很强的肿瘤抑制效率，并且在动物体内具有更好的药效和更低的毒副作用。

通过 FACS binding 实验进行表位分析，本披露的抗体结合 TF 特定的表位。尤其是抗体 hu67Y116，与现有技术中的抗体结合 TF 不同的表位。

发明详述

术语

除非另有限定，本文所用的所有技术和科学术语均与本披露所属领域普通技术人员的通常理解一致。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料实施或测试本披露，但本文描述了优选的方法和材料。描述和要求保护本披露时，依据以下定义使用下列术语。

当本披露中使用商品名时，旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的药物和活性药物部分。

除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968) 中所述。

术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸，以及以与天然存在的氨基酸类似的方式发挥作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸，以及后来修饰的那些氨基酸，例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构（即与氢、羧基、氨基和 R 基团结合的 α 碳）的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有修饰的 R 基团（例如，正亮氨酸）或修饰的肽骨架，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构，但是以与天然存在的氨基酸类似的方式发挥作用的化学化合物。

本文中的术语“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体），全长抗体和抗体片段（或抗原结合片段，或抗原结合部分），只要它们展现出期望的抗原结合活性。

“天然抗体”指天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白，由二硫键结合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从 N 至 C 端，每条重链具有一个可变区（VH），又称作可变重域，或重链可变域，接着是三个恒定域（CH1、CH2 和 CH3）。类似地，从 N 至 C 端，每条轻链具有一个可变区（VL），又称作可变轻域，或轻链可变域，接着是一个恒定轻域（也称轻链恒定区，CL）。

术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文可互换使用，指包含与天然抗体结构基本类似的结构，或重链含有如本文中定义的Fc区的抗体。

“分离的”抗体是已经与其天然环境的组分分开的抗体。本披露中，在一些实施方案中，抗体可纯化至大于90%或99%的纯度。在一些实施方案中，抗体通过例如电泳（例如，SDS-PAGE、等电聚焦（IEF）、毛细管电泳）或层析（例如，离子交换或反相HPLC）方法进行纯化和测定。

术语“可变区”或“可变域”或“可变结构域”指抗体重链和/或轻链中涉及抗体结合抗原的域。天然IgG抗体VH和VL各包含四个保守的框架区（FR）和三个互补决定区（CDR）。其中，术语“互补决定区”或“CDR”指可变结构域内主要促成与抗原结合的区域；“框架”或“FR”是指可变结构域中除CDR残基之外的可变结构域残基。VH包含3个CDR区：HCDR1、HCDR2和HCDR3；VL包含3个CDR区：LCDR1、LCDR2和LCDR3。每个VH和VL由从氨基末端排到羧基末端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。单个VH或VL可能足以赋予抗原结合特异性。

可以通过各种公知方案来确定CDR的氨基酸序列的边界，例如：“Kabat”编号规则（参见Kabat等（1991），“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）、“Chothia”编号规则、“ABM”编号规则、“contact”编号规则（参见Martin，ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001）和ImMunoGenTics（IMGT）编号规则（Lefranc，M.P.等，Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77（2003）；Front Immunol. 2018 Oct 16;9:2278）等；各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的，示例性的，如下表1中所示。

表 1. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

术语“轻链”包括可变区结构域VL及恒定区结构域CL。VL处于轻链的氨基末端。轻链包括κ链及λ链。

术语“重链”包括可变区结构域VH及三个恒定区结构域CH1、CH2及CH3。VH处于重链的氨基末端，且CH结构域处于羧基末端，其中CH3最接近多肽的羧基末端。重链可属于任何同种型，包括IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3及IgG4亚型)、IgA(包括IgA1及IgA2亚型)、IgM及IgE。

术语“抗体片段”指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述

部分与完整抗体所结合的抗原相结合。抗体片段的包括但不限于 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、单域抗体、单链 Fab (scFab)、双抗体、线性抗体、单链抗体分子 (例如 scFv)；以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

术语“Fc 区”或“片段可结晶区”用于定义抗体重链的 C 末端区域，包括天然序列 Fc 区和经改造的 Fc 区。在一些实施方式中，人 IgG 重链的 Fc 区定义为从 Cys226 位置处的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。抗体重链的 Fc 区的边界还可以变化，例如缺失 Fc 区的 C 末端赖氨酸 (根据 EU 编号系统的残基 447) 或缺失 Fc 区的 C 末端甘氨酸和赖氨酸 (根据 EU 编号系统的残基 446 和 447)。因此，在一些实施方式中，完整抗体的组合物可以包括去除了所有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方式中，完整抗体的组合物可以包括没有去除 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方式中，完整抗体的组合物具有带有和不带有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体混合物的抗体群体。用于本文所述抗体的合适天然序列 Fc 区包括人 IgG1、IgG2 (IgG2A、IgG2B)、IgG3 和 IgG4。除非本文中另有规定，Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号方式依照 EU 编号系统，又称作 EU 索引，如记载于 Kabat 等，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991。

术语“嵌合抗体”指抗体中的重链和/或轻的一部分自特定的来源或物种衍生，而重链和/或轻链的剩余部分自不同来源或物种衍生的抗体。

术语“人源化抗体”是保留非人抗体的反应性同时在中具有较低免疫原性的抗体。例如，可以通过保留非人 CDR 区并用其人对对应物 (即，恒定区以及可变区的框架区部分) 替换抗体的其余部分来实现。

术语“人抗体”意指可变区及恒定区是人序列的抗体。该术语涵盖源自人基因但具有，例如，降低可能的免疫原性、增加亲和力、消除可能会引起不期望的折叠的半胱氨酸或糖基化位点等序列已发生改变的抗体。该术语涵盖这些在非人细胞 (其可能会赋予不具人细胞特征的糖基化) 中重组产生的抗体。该术语亦涵盖已在含有一些或所有人免疫球蛋白重链及轻链基因座的转基因小鼠中饲养的抗体。人抗体的含义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

术语“亲和力成熟的”抗体指在抗体的一个或多个 CDR 中具有一处或多处改变、导致该抗体对抗原的亲和力与亲本抗体相比有所改进的抗体。在一些实施方式中，亲和力成熟的抗体将具有纳摩尔或甚至皮摩尔量级的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知方法生成。Marks 等，*Bio/Technology* 10:779-783 (1992) 记载了通过 VH 和 VL 结构域改组进行的亲和力成熟。以下文献记载了 CDR 和/或框架残基的随机诱变：Barbas 等，*PNAS*，91:3809-3813 (1994)；Schier 等，*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton 等，*J.Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson 等，*J.Immunol.* 154 (7) :3310-9(1995) 及 Hawkins 等，*J. Mol. Biol.*

226:889-896 (1992)。

术语“单克隆抗体”指基本上均质的抗体的群，即在该群中包含的抗体分子的氨基酸序列是相同的，除了可能少量存在的天然突变以外。相比之下，多克隆抗体制剂通常包含在其可变结构域具有不同氨基酸序列的多种不同抗体，其通常
5 特异性针对不同表位。“单克隆”表示从基本上均质的抗体群体获得的抗体的特征，并且不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。例如，单克隆抗体可以由 Kohler 等，(1975) *Nature* 256:495 描述的杂交瘤方法制备，或者由重组 DNA 方法制备（参见例如美国专利号 4, 816, 567）。或者使用 Clackson 等，(1991) *Nature* 352:624-628 和 Marks 等，(1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597 中描述的技术，从噬菌
10 体抗体文库中分离“单克隆抗体”。亦可参见 Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731，或利用含有所有或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法制备“单克隆抗体”。

术语“抗原”是指能够由抗体选择性结合，且另外能够用于动物中以产生能够结合该抗原的抗体的分子或分子部分。抗原可具有一个或多个能够与不同的抗
15 体相互作用的表位。

术语“表位”指能够与抗体特异性结合的抗原上的区域（area 或 region）。表位可以由连续氨基酸串（线性表位）形成或包含非连续氨基酸（构象表位），例如因抗原的折叠（即通过蛋白质性质的抗原的三级折叠）而变成空间接近。构象表位和线性表位的差别在于：在变性溶剂的存在下，抗体对构象表位的结合丧失。
20 表位包含处于独特空间构象的至少 3，至少 4，至少 5，至少 6，至少 7，或 8-10 个氨基酸。

筛选结合特定表位的抗体（即那些结合相同表位的抗体）可以使用本领域公知方法来进行，包括但不限于：丙氨酸扫描、肽印迹（见 *Meth. Mol. Biol.* 248 (2004) 443-463）、肽切割分析、表位切除、表位提取、抗原的化学修饰（见 *Prot. Sci.* 9
25 (2000) 487-496）和交叉阻断（见“Antibodies”，Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)）。

与参照抗体“结合相同表位的抗体”或与参照抗体“竞争结合的抗体”指在竞争测定法中，将参照抗体对抗原的结合阻断 50% 或更多的抗体，或其对抗原的结合被参照抗体阻断 50% 或更多的抗体。还例如，为了测定待测抗体是否与参照
30 抗体结合相同表位，在饱和条件下容许参照抗体结合抗原。在去除过量的参照抗体后，评估待测抗体结合抗原的能力。为了确认待测抗体是否结合相同表位或仅仅受到空间原因阻碍结合，可以使用常规实验（例如，肽突变和使用 ELISA、RIA、表面等离子共振、流式细胞术或本领域可获得的任何其它定量或定性抗体结合测定的结合分析）。这种测定法应当以两种设置中进行，即两种抗体均作为饱和抗
35 体。如果在两种设置中，均只有第一（饱和）抗体能够结合抗原，那么可以得出结论，该待测抗体和参照抗体竞争结合该抗原。

在一些实施方案中，如在竞争性结合测定中所测量的（参见例如，Junghans等，*Cancer Res.* 50 (1990) 1495-1502），如果一个抗体的1倍、5倍、10倍、20倍或100倍过量抑制另一个抗体的结合至少50%、至少75%、至少90%或甚至99%或更多，则认为两个抗体结合相同或重叠的表位。

5 在一些实施方案中，对于抗原中那些能减少或消除一种抗体结合的氨基酸突变，如果其基本上全部能减少或消除另一种抗体的结合，则认为两种抗体结合“相同表位”；如果其仅有一部分能减少或消除另一种抗体的结合，则认为两种抗体具有“重叠表位”。

术语“亲和力”是指分子（例如，抗体）的单个结合部位与其结合配体（例如，抗原）之间非共价相互作用的总体的强度。除非另外指明，如本文所用，结合“亲和力”是指内部结合亲和力，其反映出结合对（例如，抗体与抗原）的成员之间1:1相互作用。分子X对其配体Y的亲和力通常可以由平衡解离常数(KD)表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法（包括本文所述的那些方法）测量。

如本文所使用的，术语“kassoc”或“ka”指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率，
15 术语“kdis”或“kd”指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。术语“KD”指平衡解离常数，其获得自kd与ka的比率（即kd/ka）并且表示为摩尔浓度（M）。可以使用本领域公知的方法测定抗体的KD值。例如，使用生物传感系统例如系统测量表面等离子体共振，或通过溶液平衡滴定法（SET）测量溶液中的亲和力。

术语“特异性地结合”、“特异性结合”或“结合”是指抗体以比针对其他
20 抗原或表位更高的亲和力结合至某个抗原或该抗原内的表位。通常，抗体以约 1×10^{-7} M或更小（例如约 1×10^{-8} M或更小、约 1×10^{-9} M或更小）的平衡解离常数(KD)结合抗原或抗原内的表位。在一些实施方式中，抗体与抗原结合的KD为该抗体结合至非特异性抗原（例如BSA、酪蛋白）的KD的10%，或更少（例如1%）。可使用本领域已知的方法来测量KD，例如通过BIAcore®表面等离子体共振测定法测量。然而，特异性结合至抗原或抗原内的表位的抗体可能对其它相关的抗原具有交叉反应性，例如，对来自其它物种（同源）（诸如人或猴，例如食蟹猕猴（*Macaca fascicularis*）（*cynomolgus*, cyno）、黑猩猩（*Pan troglodytes*）（*chimpanzee*, *chimp*））或狨猴（*Callithrix jacchus*）（*commonmarmoset*, *marmoset*）的相应抗原具有交叉反应性。

30 术语“抗TF抗体”和“结合TF的抗体”是指能够以足够的亲和力结合TF的抗体。在某些实施例中，与抗TF抗体结合的抗体具有以下平衡解离常数(KD) <约1 μ M、<约100 nM、<约10 nM、<约1 nM、<约0.1 nM、<约0.01 nM或<约0.001 nM（例如 10^{-8} M或更小、例如 10^{-8} M至 10^{-9} M、例如 10^{-9} M或更小）。在某些实施例中，抗TF抗体结合来自不同物种的TF中保守的TF表位。

35 术语“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指一种细胞毒性形式，其中分泌的Ig结合到某些细胞毒性细胞（例如，自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞

和巨噬细胞)上的 Fc 受体(FcR)，使这些细胞毒性效应细胞与带有抗原的靶细胞特异性结合，随后用细胞毒素杀死靶细胞。抗体“武装”细胞毒性细胞，并且是此类杀伤作用所必需的。介导 ADCC 的主要细胞 NK 细胞仅表达 Fc γ RIII，而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。造血细胞上的 FcR 表达总结在 Ravetch 和 Kinet，
5 《免疫学年评》(Annu.Rev.Immunol.)9:457-92(1991)的第 464 页的表 3 中。为评估目标分子的 ADCC 活性，可进行体外 ADCC 分析，分析方法例如美国专利 No.5, 500, 362 或 5, 821, 337 中所述。用于此类测定的有效效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可选地，目的抗体的 ADCC 活性也可以在体内评估，例如，在动物模型(诸如在 Clynes 等人，(USA)95:652-656(1998)中所公开的)
10 中评估。

术语“抗体依赖性细胞吞噬作用”(“ADCP”)是指通过吞噬细胞(诸如巨噬细胞或树突状细胞)的内化作用消除抗体包被的靶细胞的机制。

术语“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指诱导细胞死亡的机制，其中靶标结合抗体的 Fc 效应子结构域结合并活化补体成分 C1q，继而激活补体级联，导致靶细胞死亡。补体的活化也可导致补体成分沉积在靶细胞表面上，这些补体成分通过结合白细胞上的补体受体(例如，CR3)来促进 CDC。
15

术语“核酸”与术语“多核苷酸”在本文中可互换使用，并且是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。所述术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸，所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的，具有与参考核酸相似的结合特性，并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。此类类似物的示例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性-甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。“分离的”核酸指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括在下述细胞中含有的核酸分子，所述细胞通常含有该核酸分子，但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。“编码抗 TF 抗体的核酸”指编码抗体重链和轻链(或其片段)的一个或更多个核酸分子。
20
25

除非另有说明，否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如，简并密码子取代)和互补序列以及明确指明的序列。具体地，如下详述，简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得，在这些序列中，一个或多个所选的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer 等，*Nucleic Acid Res.*19:5081, 1991; Ohtsuka 等，*J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; 和 Rossolini 等，*Mol. Cell. Probes*8:91-98, 1994)。
30

术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物，其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物，以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。
35

术语“裸抗体”指未与异源模块（例如细胞毒性模块）或放射性标记物缀合的抗体。裸抗体可以存在于药学配制剂中。

术语“同一性”、“序列同一性”或“氨基酸序列同一性”是指，当对两条序列进行最佳比对时（必要时引入间隙，以获取最大序列同一性百分比，且将任何保守性取代视为序列同一性的一部分），两条序列的氨基酸/核酸在等价位置相同的程度（百分比）。为测定序列同一性百分比，比对可以通过属于本领域公知的多种方法来实现，诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign (DNASTAR) 等。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数，包括在所比较的序列全长上达成最大比对所需的任何算法。

术语“保守修饰的变体”或“保守性取代”指使用具有相似特征（例如，电荷、侧链尺寸、亲水性/疏水性、骨架构型和刚性等）的其他氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得通常可以做出这样的变化而不改变蛋白的生物活性。本领域技术人员知晓，在通常情况下，在多肽的非必需区域中的单氨基酸置换基本上不改变生物活性（参见例如，Watson 等，(1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub.Co., p.224 (4th Ed.)）。术语“保守修饰的变体”当适用核酸序列时，保守修饰的变体是指那些编码相同或基本上相同的氨基酸序列的核酸，或在该核酸不编码氨基酸序列的情况下，是指基本相同的序列。由于遗传密码的简并性，任何给定的蛋白质均可以由多个功能相同的核酸编码。例如，密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此，在密码子指定丙氨酸的每个位置，该密码子可以改变为任何所述相应密码子而不改变编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”，它们是保守修饰变异中的一种。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每种可能的沉默变异。技术人员将认识到，核酸中的每个密码子（除了 AUG--通常是甲硫氨酸的唯一密码子；和 TGG--通常是色氨酸的唯一密码子）均可以被修饰以产生功能相同的分子。因此，在每个所述序列中均隐含了编码多肽的核酸的每一种沉默变异。

术语“表达载体”或“表达构建体”是指适用于对宿主细胞进行转化，且含有指导及/或控制（连同宿主细胞一起）与其可操作地连接的一个或多个异源编码区的表达的核酸序列的载体。表达构建体可以包括但不限于影响或控制转录、翻译且在存在内含子时影响与其可操作地连接的编码区的 RNA 剪接的序列。

如本文中所使用，“可操作地连接”意指该术语所适用的组分允许其在适合条件下执行其固有功能的关系。举例而言，表达载体中与蛋白质编码序列“可操作地连接”的控制序列是与其连结，从而在与该控制序列的转录活性兼容的条件下，达成该蛋白质编码序列的表达。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用，并且指已经导入外源核酸的细胞，包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”，其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代，而不考虑传代的次

数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同，可以含有突变。本文中包括具有与在初始转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞包括原核和真核宿主细胞，其中真核宿主细胞包括但不限于哺乳动物细胞、昆虫细胞系植物细胞和真菌细胞。示例性的宿主细胞如下：中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、NSO、SP2 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾（BHK）细胞、猴肾细胞（COS）、人肝细胞癌细胞（例如，Hep G2）、A549 细胞、3T3 细胞和 HEK-293 细胞、巴氏毕赤酵母（*Pichiapastoris*）、芬兰毕赤酵母（*Pichia finlandica*）、白色念珠菌（*Candida albicans*）、黑曲霉（*Aspergillus niger*）、米曲霉（*Aspergillus oryzae*）、里氏木霉（*Trichoderma reesei*）。

10 如在本披露中所使用的，表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换使用，包括此类细胞的后代。因而，词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试者细胞和来源于其的培养物，而与传代的次数无关。还应理解的是，由于有义或无义的突变，使得并非所有子代均具有完全相同的 DNA 内容物。包括与筛选出其的原始转化细胞具有相同功能或生物活性的突变子代。

15 现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8 章和 15 章。公开所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或更多个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件，从 ImMunoGeneTics (IMGT) 的网站 <http://imgt.cines.fr> 得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001 ISBN 012441351 上获得。

20 本披露工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染宿主细胞。作为一种更推荐的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的 N 端位点。通过表达与人 TF 特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如，用 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 pH 梯度法洗脱结合的抗体，用 SDS-PAGE 检测抗体片段，收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如 -70°C，或者冻干。

30 “分离的”指纯化状态，并且在这种情况下意味着在指定的分子基本上不含其他生物分子，例如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物或其他材料，例如细胞碎片和生长培养基。通常，术语“分离的”并不意图指完全不存在这些材料或不存在在水、缓冲液或盐，除非它们以显著干扰如本文所述的化合物的实验或治疗用途的量存在。

35 术语“药物”是指可以改变或查明机体的生理功能及病理状态，可用以预防，诊断和治疗疾病的化学物质。药物包括细胞毒性药物。药物和毒物之间并无严格

界限，毒物是指在较小剂量即对机体产生毒害作用，损害人体健康的化学物质，任何药物剂量过大都可产生毒性反应。

术语“细胞毒性药物”，即抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞，但是由于缺乏特异性，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会导致正常细胞的凋亡，导致严重的副作用。细胞毒性药物包括毒素，如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素，放射性同位素（例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 和 Lu 的放射性同位素），化疗药物，抗生素和核溶酶。

术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 个）碳原子的烷基，更优选为含有 1 至 6 个碳原子的烷基。非限制性示例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基，及其各种支链异构体等。更优选的是含有 1 至 6 个碳原子的低级烷基，非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自 D 原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

术语“烷氧基”指-O-(烷基)，其中烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性示例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自 D 原子、卤素、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基。

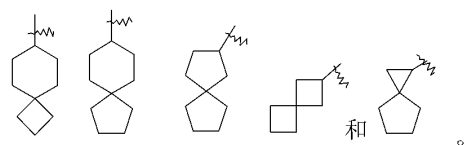
术语“亚烷基”指饱和的直链或支链脂肪族烃基，其为从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团，优选含有 1 至 12 个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 个)碳原子，更优选含有 1 至 6 个碳原子的亚烷基。亚烷基的非限制性示例包括但不限于亚甲基(-CH₂-)、1,1-亚乙基(-CH(CH₃)-)、1,2-亚乙基(-CH₂CH₂-)、1,1-亚丙基(-CH(CH₂CH₃)-)、1,2-亚丙基(-CH₂CH(CH₃)-)、1,3-亚丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)等。亚烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自烯基、炔基、烷氧基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基和氧代基中的一个或多个取代基。

术语“烯基”指分子中含有至少一个碳碳双键的烷基化合物，其中烷基的定义如上所述。优选含有 2 至 12 个(例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 个)碳原子的烯基，更优选含有 2 至 6 个碳原子的烯基。烯基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷氧基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

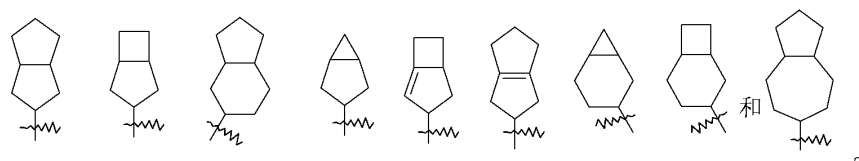
术语“炔基”指分子中含有至少一个碳碳三键的烷基化合物，其中烷基的定义如上所述。优选含有 2 至 12 个(例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 个)碳原子的炔基，更优选含有 2 至 6 个碳原子的炔基。炔基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，环烷基环包含 3 至 20 个碳原子，优选包含 3 至 12 个(例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 个)碳原子，优选包含 3 至 8 个碳原子，更优选包含 3 至 6 个碳原子(如 C₃₋₆ 环烷基)。单环环烷基的非限制性示例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基和环辛基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。

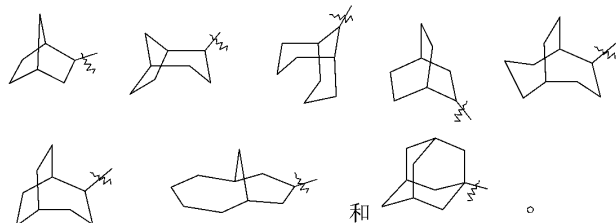
术语“螺环烷基”指 5 至 20 元，单环之间共用一个碳原子(称螺原子)的多环基团，其可以含有一个或多个双键。优选为 6 至 14 元(例如 6、7、8、9、10、11、12、13 和 14)，更优选为 7 至 10 元(例如 7、8、9 或 10 元)。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺环烷基分为单螺环烷基、双螺环烷基或多螺环烷基，优选为单螺环烷基和双螺环烷基。更优选为 3 元/4 元、3 元/5 元、3 元/6 元、4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/4 元、5 元/5 元、5 元/6 元、6 元/3 元、6 元/4 元、6 元/5 元和 6 元/6 元单螺环烷基。螺环烷基的非限制性示例包括：



术语“稠环烷基”指 5 至 20 元，系统中的每个环与体系中的其他环共享毗邻的一对碳原子的全碳多环基团，其中一个或多个环可以含有一个或多个双键。优选为 6 至 14 元（例如 6、7、8、9、10、11、12、13 和 14），更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环稠环烷基，优选为双环或三环，更优选为 3 元/4 元、3 元/5 元、3 元/6 元、4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/4 元、5 元/5 元、5 元/6 元、6 元/3 元、6 元/4 元、6 元/5 元和 6 元/6 元双环烷基。稠环烷基的非限制性示例包括：



10 术语“桥环烷基”指 5 至 20 元，任意两个环共用两个不直接连接的碳原子的全碳多环基团，其可以含有一个或多个双键。优选为 6 至 14 元（例如 6、7、8、9、10、11、12、13 和 14），更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环桥环烷基，优选为双环、三环或四环，更优选为双环或三环。桥环烷基的非限制性示例包括：



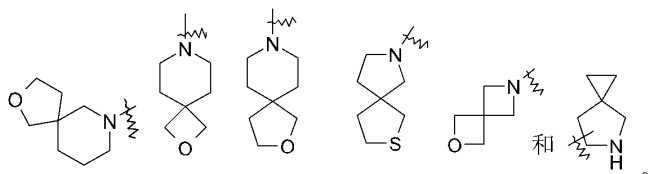
所述环烷基环包括如上所述的环烷基(包括单环、螺环、稠环和桥环)稠合于芳基、杂芳基或杂环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为环烷基，非限制性示例包括茛满基、四氢萘基和苯并环庚烷基等；优选茛满基和四氢萘基。

环烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的
20 连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自卤素、烷基、烷氧基、卤代烷
基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、
环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

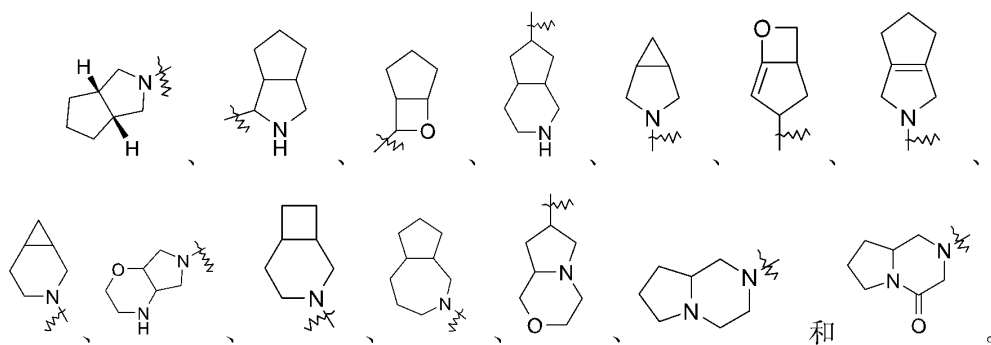
术语“杂环基”指饱和或部分饱和单环或多环环状取代基，其包含 3 至 20 个环原子，其中一个或多个环原子为选自氮、氧、硫、S(O)或 S(O)₂ 的杂原子，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个（例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 个）环原子，其中 1~4 个（例如 1、2、3

和 4 个) 是杂原子; 更优选包含 3 至 8 个环原子 (例如 3、4、5、6、7 和 8 个), 其中 1-3 是杂原子 (例如 1、2 和 3 个); 更优选包含 3 至 6 个环原子, 其中 1-3 个是杂原子; 最优选包含 5 或 6 个环原子, 其中 1-3 个是杂原子。单环杂环基的非限制性示例包括吡咯烷基、四氢吡喃基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基和高哌嗪基等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。

术语“螺杂环基”指 5 至 20 元，单环之间共用一个原子(称螺原子)的多环杂环基团，其中一个或多个环原子为选自氮、氧、硫、S(O)或 S(O)₂ 的杂原子，其余环原子为碳。其可以含有一个或多个双键。优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺杂环基分为单螺杂环基、双螺杂环基或多螺杂环基，优选为单螺杂环基和双螺杂环基。更优选为 4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/5 元、5 元/6 元或 6 元/6 元单螺杂环基。螺杂环基的非限制性示例包括：

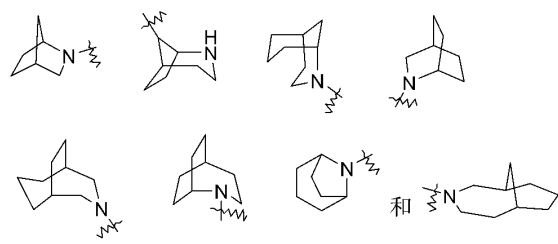


术语“稠杂环基”指 5 至 20 元，系统中的每个环与体系中的其他环共享毗邻的一对原子的多环杂环基团，一个或多个环可以含有一个或多个双键，其中一个或多个环原子为选自氮、氧、硫、S(O)或 S(O)₂ 的杂原子，其余环原子为碳。优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环稠杂环基，优选为双环或三环，更优选为 3 元/4 元、3 元/5 元、3 元/6 元、4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/4 元、5 元/5 元、5 元/6 元、6 元/3 元、6 元/4 元、6 元/5 元和 6 元/6 元双环稠杂环基。稠杂环基的非限制性示例包括：



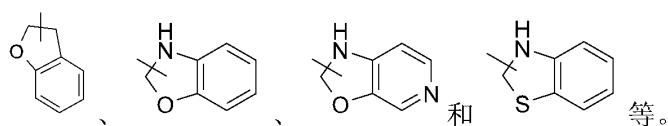
术语“桥杂环基”指 5 至 14 元，任意两个环共用两个不直接连接的原子
25 环杂环基团，其可以含有一个或多个双键，其中一个或多个环原子为选自氮、氧、硫、S(O)或 S(O)₂ 的杂原子，其余环原子为碳。优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元（例如 7、8、9 或 10 元）。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或

多环桥杂环基，优选为双环、三环或四环，更优选为双环或三环。桥杂环基的非限制性示例包括：



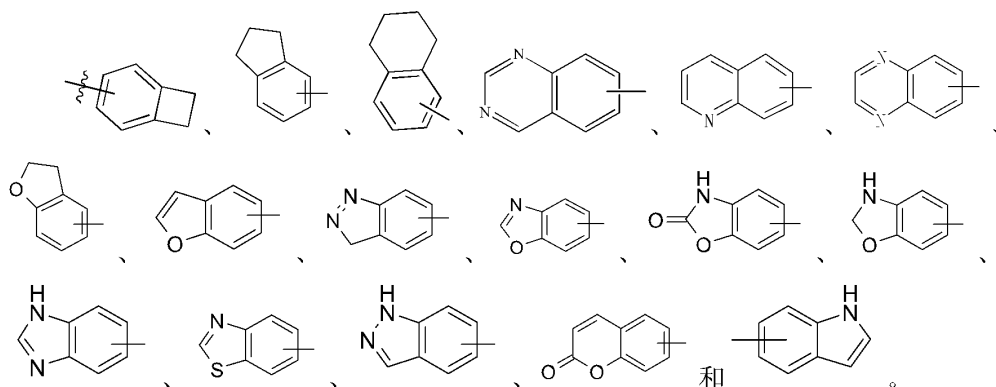
所述杂环基环包括如上所述的杂环基(包括单环、螺杂环、稠杂环和桥杂环)

- 5 稠合于芳基、杂芳基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂环基，其非限制性示例包括：



- 10 杂环基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

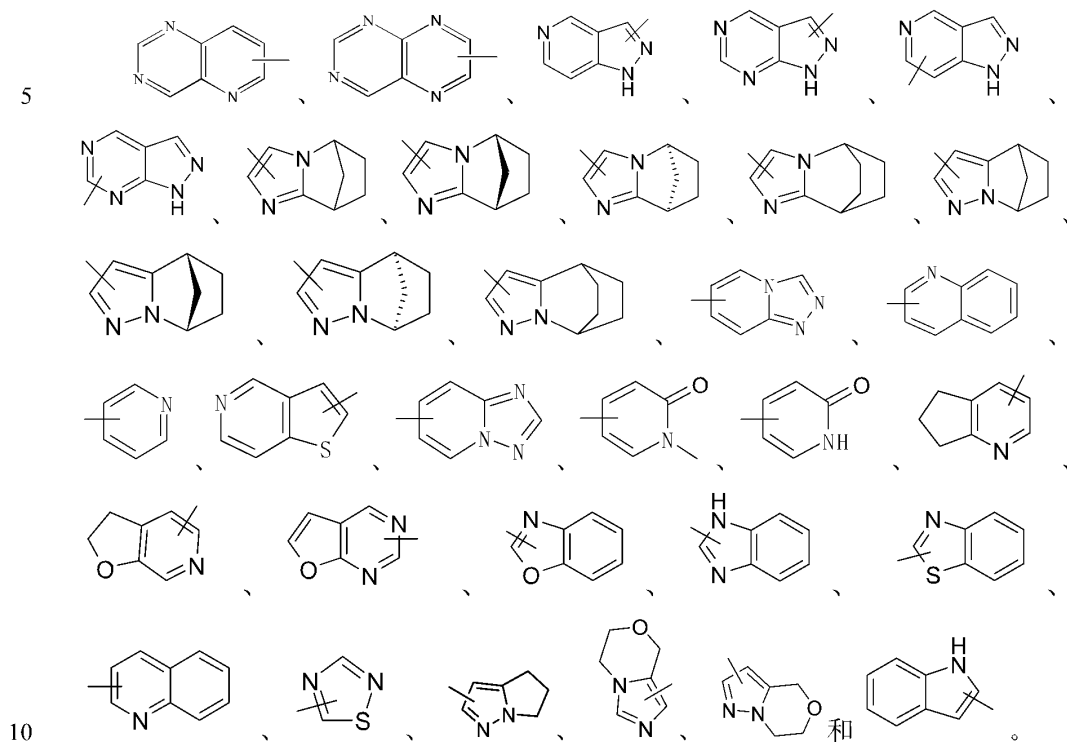
- 15 术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的6至14元全碳单环或稠合多环(稠合多环是共享毗邻碳原子对的环)基团，优选为6至10元，例如苯基和萘基。所述芳基环包括如上所述的芳基环稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，其非限制性示例包括：



- 20 芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选自卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

术语“杂芳基”指包含1至4个杂原子(例如1、2、3和4个)、5至14个环原子的杂芳族体系，其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为5至10元(例如

5、6、7、8、9 或 10 元), 更优选为 5 元或 6 元, 例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、*N*-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、咪唑基、吡唑基、三唑基和四唑基等。所述杂芳基环包括如上述的杂芳基稠合于芳基、杂环基或环烷基环上, 其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环, 其非限制性示例包括:



杂芳基可以是取代的或非取代的, 当被取代时, 取代基可以在任何可使用的连接点上被取代, 所述取代基优选独立地任选自卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基氧基、杂环基氧基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基。

15 上述环烷基、杂环基、芳基和杂芳基包括从母体环原子上除去一个氢原子所衍生的残基, 或从母体的相同环原子或两个不同的环原子上除去两个氢原子所衍生的残基即“二价环烷基”、“二价杂环基”、“亚芳基”或“亚杂芳基”。

术语“氨基保护基”是为了使分子其它部位进行反应时氨基保持不变, 用易于脱去的基团对氨基进行保护。非限制性实施例包含(三甲基硅)乙氧基甲基、四氢吡喃基、叔丁氧羰基 (Boc)、乙酰基、苄基、烯丙基、对甲氧苄基和叔丁基二甲基硅基 (TBS) 等。这些基团可任选地被选自卤素、烷氧基或硝基中的 1-3 个取代基所取代。

术语“羟基保护基”是指通常用于阻断或保护羟基而反应在化合物的其它官能团上进行的羟基衍生物。作为示例, 优选地, 所述的羟基保护基可以是(C₁₋₁₀ 烷基或芳基)₃ 硅烷基, 例如: 三乙基硅基, 三异丙基硅基, 叔丁基二甲基硅基 (TBS) 和叔丁基二苯基硅基等; 可以是 C₁₋₁₀ 烷基或取代烷基, 优选烷氧基或芳基取代的

烷基,更优选 C₁₋₆ 烷氧基取代的 C₁₋₆ 烷基或苯基取代的 C₁₋₆ 烷基,最优选 C₁₋₄ 烷氧基取代的 C₁₋₄ 烷基,例如:甲基,叔丁基,烯丙基,苄基,甲氧基甲基(MOM),乙氧基乙基和 2-四氢吡喃基(THP)等;可以是(C₁₋₁₀ 烷基或芳香基)酰基,例如:甲酰基,乙酰基,苯甲酰基和对硝基苯甲酰基等;可以是(C₁₋₆ 烷基或 6 至 10 元芳基)磺酰基;也可以是(C₁₋₆ 烷氧基或 6 至 10 元芳基氧基)羰基。

术语“环烷基氧基”指环烷基-O-,其中环烷基如上所定义。

术语“杂环基氧基”指杂环基-O-,其中杂环基如上所定义。

术语“烷基硫基”指烷基-S-,其中烷基如上所定义。

术语“卤代烷基”指烷基被一个或多个卤素取代,其中烷基如上所定义。

10 术语“卤代烷氧基”指烷氧基被一个或多个卤素取代,其中烷氧基如上所定义。

术语“氘代烷基”指烷基被一个或多个氘原子取代,其中烷基如上所定义。

术语“羟烷基”指被一个或多个羟基取代的烷基,其中烷基如上所定义。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

15 术语“羟基”指-OH。

术语“巯基”指-SH。

术语“氨基”指-NH₂。

术语“氰基”指-CN。

术语“硝基”指-NO₂。

20 术语“氧代基”指“=O”。

术语“羰基”指 C=O。

术语“羧基”指-C(O)OH。

术语“羧酸酯基”指-C(O)O(烷基)、-C(O)O(环烷基)、(烷基)C(O)O-或(环烷基)C(O)O-,其中烷基和环烷基如上所定义。

25 术语“抗体-药物偶联物(antibody drug conjugate, ADC)”是把抗体通过连接单元与具有生物活性的细胞毒素或具有细胞杀伤活性的小分子药物相连。

本披露所描述的抗体或抗体片段可以通过任何方式偶联至效应分子。举例来说,抗体或抗体片段可以通过化学或重组方式附接至细胞毒性药物。制备融合物或偶联物的化学方式在本领域中是已知的并且可以用于制备免疫偶联物。用于偶联抗体或抗体片段和药物的方法必须能够连接抗体与细胞毒性药物而不会干扰抗体或抗体片段结合至靶分子的能力。

30 在一个实施方案中,抗体和细胞毒性药物都是蛋白质并且可以使用本领域中熟知的技术偶联。存在本领域中所公开的数百种交联剂,其可以偶联两种蛋白质。交联剂一般基于在抗体或细胞毒性药物上可用或插入的反应官能团来选择。另外,如果不存在反应基团,那么可以使用光可活化交联剂。在某些情况下,可能需要在抗体与细胞毒性药物之间包括间隔子。本领域中已知的交联剂包括同型双功能

剂：戊二醛、二甲基己二亚酰胺化物和双(重氨基联苯胺)，以及异型双功能剂：间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺和磺基-间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺。

可以用于使效应分子偶合至抗体片段的交联剂包括例如 TPCH(S-(2-硫代吡啶基)-L-半胱氨酸酰肼)和 TPMPH(S-(2-硫代吡啶基)巯基-丙酰肼)。TPCH 和 TPMPH 在先前已经通过温和高碘酸盐处理而氧化的糖蛋白的碳水化合物部分反应，由此在交联剂的酰肼部分与高碘酸盐产生的醛之间形成腙键。异型双功能交联剂 GMBS(N-(γ-马来酰亚胺基丁酰氧基)-琥珀酰亚胺)和 SMCC(琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷)与伯胺反应，由此将马来酰亚胺基引入组分上。这个马来酰亚胺基随后可以与另一种组分上的可以由交联剂引入的巯基反应，由此在组分之间形成稳定的硫醚键。如果组分之间的位阻干扰任一种组分的活性，那么可以使用交联剂，将长的间隔臂引入组分之间，诸如 3-(2-吡啶基二巯基)丙酸 n-琥珀酰亚胺酯(SPDP)。因此，存在许多适合的交联剂，其可以被使用并且各自取决于其对最佳免疫偶联物产量的影响来选择。

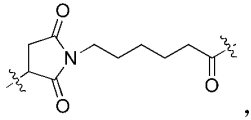
术语“载药量”，也称药物抗体比例(Drug-to-Antibody Ratio, DAR)，即 ADC 中每个抗体所偶联的药物的平均数量。其可在例如每个抗体偶联约 1 至约 10 个药物的范围内，并且在某些实施例中，在每个抗体偶联约 1 至约 8 个药物的范围内，优选自 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 3-4, 3-5, 4-8, 5-6, 5-7, 5-8 和 6-8 的范围。示例性的，载药量可以为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 的均值。本披露的 ADC 通式包括与前述一定范围内的抗体-药物偶联物的集合。在本披露的实施方式中，载药量可表示为 n, 是小数或整数。可用常规方法如 UV/可见光光谱法, 质谱, ELISA 试验和 HPLC 测定载药量。

术语“接头单元”或“连接片段”或“连接单元”是指一端与抗体或其抗原结合片段连接而另一端与药物相连的化学结构片段或键，也可以连接其他接头后再与药物相连。

术语“接头”可以包含一种或多种接头构件。示例性的接头构件包括 6-马来酰亚胺基己酰基(“MC”)、马来酰亚胺基丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”或“vc”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苄氧羰基(“PAB”)、及那样源自与接头试剂的偶联的：N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(“SPP”)、N-琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1 羧酸酯(“SMCC”，在本文中也称作“MCC”)和 N-琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)。接头可以包括延伸物、间隔物和氨基酸单元，可以通过本领域已知方法合成，诸如 US2005-0238649A1 中所记载的。接头可以是便于在细胞中释放药物的“可切割接头”。例如，可使用酸不稳定接头(例如腙)、蛋白酶敏感(例如肽酶敏感)接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari 等, Cancer Research 52: 127-131(1992); 美国专利 No.5, 208, 020)。

接头组件包括但不限于：

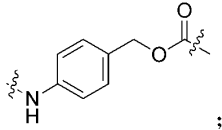
MC=6-马来酰亚氨基己酰基，结构如下：



Val-Cit 或“vc”=缬氨酸-瓜氨酸(蛋白酶可切割接头中的示例二肽)，

5 瓜氨酸=2-氨基-5-脲基戊酸，

PAB 基团为对氨基苄氧羰基(“自我牺牲”接头组件的示例)，其结构如下：



Mc-Val-Cit=N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(其中接头肽键已经修饰以防止其受到组织蛋白酶 B 的切割)，

10 MC(PEG)6-OH=马来酰亚氨基己酰基-聚乙二醇(可附着于抗体半胱氨酸)，

SPP=N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯，

SPDP=N-琥珀酰亚氨基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯，

SMCC=琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯，

IT=亚氨基硫烷，

15 本披露的一个实施方式中，细胞毒性药物通过连接单元偶联在抗体的巯基上。可以用以下非限制性方法控制配体药物偶联物的载量，包括：

- (1) 控制化合物连接部分和单抗的摩尔比，
- (2) 控制反应时间和温度，
- (3) 选择不同的反应试剂。

20 术语“任选地”或“任选”是指意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如“任选的被卤素或者氰基取代的 C₁₋₆ 烷基”是指卤素或者氰基可以但不必须存在，该说明包括烷基被卤素或者氰基取代的情形和烷基不被卤素和氰基取代的情形。

术语“取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为 1~6 个，更优选为 1~3 个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下（通过实验或理论）确定可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和（如烯属）键的碳原子结合时可能是不稳定的。

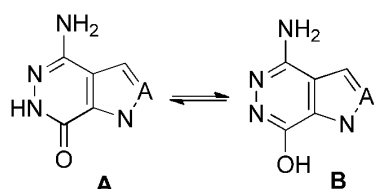
本披露中的抗体-药物偶联物浓度以蛋白的浓度计，即以抗体-药物偶联物中抗体部分的浓度计。

30 针对药物或药理学活性剂而言，术语“治疗有效量”是指无毒的但能达到预期效果的药物或药剂的足够用量。有效量的确定因人而异，取决于受体的年龄和一般情况，也取决于具体的活性物质，个案中合适的有效量可以由本领域技术人员根

据常规试验确定。

本披露的化合物和中间体还可以以不同的互变异构体形式存在，并且所有这样的形式包含于本披露的范围内。术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指可经由低能垒互变的不同能量的结构异构体。例如，质子互变异构体（也称为

5 质子转移互变异构体）包括经由质子迁移的互变，如酮-烯醇及亚胺-烯胺、内酰胺-内酰亚胺异构化。内酰胺-内酰亚胺平衡示例是在如下所示的 A 和 B 之间。



本披露中的所有化合物可以被画成 A 型或 B 型。所有的互变异构形式在本披露的范围内。化合物的命名不排除任何互变异构体。

10 本文所用的术语“药学上可接受的”是指这些化合物、材料、组合物和/或剂型，在合理的医学判断范围内，适用于与受试者组织接触而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症，具有合理的获益/风险比，并且对预期的用途是有效。

常规的药物组合物的制备见中国药典。

15 本文所使用的，单数形式的“一个”、“一种”和“该”包括复数引用，反之亦然，除非上下文另外明确指出。

“约”是指处于如本领域的普通技术人员所确定的特定值的可接受误差范围之内，其将部分取决于所述值是如何测量或测定的，即所述测量系统的限制。在特定测定、结果或实施方案的上下文中，除非实施例或说明书其它地方内另有明确说明，否则“约”意指在根据本领域惯例的一个标准偏差之内。

20

术语“药学上可接受的载体”或“可药用的载体”指药学配制剂中与活性成分不同的，且对受试者无毒的成分。药学可接受载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

术语“受试者”或“个体”包括人类和非人类动物。非人动物包括所有脊椎动物（例如哺乳动物和非哺乳动物）例如非人灵长类（例如，食蟹猴）、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非指出时，否则所述术语“患者”或“受试者”在本文中可互换地使用。如本文所使用的，术语“食蟹猴（cyno）”或“食蟹猴（cynomolgus）”是指食蟹猴（*Macaca fascicularis*）。在某些实施方案中，个体或受试者是人。

25

30 术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物，也可称为辅料。如片剂中的粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂；半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分；液体制剂中的防腐剂、抗氧化剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、

渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持
5 “干燥”状态，以利于制成片剂。如淀粉、乳糖、钙的无机盐、微晶纤维素等。

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

10 药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可在使用的可接受的溶媒和溶剂中有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。例如将活性成分溶于大豆油和卵磷脂的混合物中。然后将油溶液加入水和甘油的混合物中处理形成微乳。可通过局部大量注射，将注射液或微乳注入受试者的血流中。或者，最好按可保持本披露化合物恒定循环浓度的方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度，可使用连续静脉内递药装置。这种
15 装置的示例是 Deltec CADD-PLUS. TM. 5400 型静脉注射泵。

药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术，用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混
20 悬液，例如 1, 3-丁二醇中制备的溶液。此外，可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。为此目的，可使用包括合成甘油单或二酯在内的任何调和固定油。此外，脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

“施用”或“给予”，当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试
25 者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。

术语“样本”是指从受试者分离的类似流体、细胞、或组织的采集物，以及存在于受试者体内的流体、细胞或组织。示例性样本为生物流体，诸如血液、血清和浆膜液、血浆、淋巴液、尿液、唾液、囊液、泪液、排泄物、痰、分泌组织和器官的粘膜分泌物、阴道分泌物、腹水、胸膜、心包、腹膜、腹腔和其它体腔
30 的流体、由支气管灌洗液收集的流体、滑液、与受试者或生物来源接触的液体溶液，例如细胞和器官培养基（包括细胞或器官条件培养基）、灌洗液等，组织活检样本、细针穿刺、手术切除的组织、器官培养物或细胞培养物。

术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”是指本披露抗体-药物偶联物的盐，或本披露中所述的化合物的盐，这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性，
35 且具有应有的生物活性，本披露抗体-药物偶联物至少含有一个氨基，因此可以与酸形成盐。

“治疗（treatment 或 treat）/处理”（及其语法变型）指试图改变所治疗个体的天然过程的临床干预，并且可以为了预防或者在临床病理学的过程期间实施。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或再发生，减轻症状，减轻/减少疾病的任何直接或间接病理后果，预防转移，降低疾病进展速率，改善或减轻疾病状态，和消退或改善的预后。在一些实施方案中，使用本披露的抗体来延迟疾病的形成或减缓疾病的进展。

“有效量”一般是足以降低症状的严重程度及/或频率、消除这些症状及/或潜在病因、预防症状及/或其潜在病因出现及/或改良或改善由疾病状态引起或与其相关的损伤（例如肺病）的量。在一些实施例中，有效量是治疗有效量或预防有效量。“治疗有效量”是足以治疗疾病状态或症状、尤其与该疾病状态相关的状态或症状，或者以其他方式预防、阻碍、延迟或逆转该疾病状态或以任何方式与该疾病相关的任何其他不理想症状的进展的量。“预防有效量”是当给予受试者时将具有预定预防效应，例如预防或延迟该疾病状态的发作（或复发），或者降低该疾病状态或相关症状的发作（或复发）可能性的量。完全治疗或预防未必在给予一个剂量之后便发生，可能在给予一系列剂量之后发生。因而，治疗或预防有效量可以一次或多次给予的方式给予。“治疗有效量”和“预防有效量”可取决于以下因素变化：诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重，以及治疗剂或治疗剂组合在个体中引发期望的应答的能力。有效治疗剂或治疗剂组合的示例性指标包括例如受试者改善的健康状况。

在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方案的细节。通过说明书和权利要求书，本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中，除非上下文中有清楚的另外指明，单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的优选实施方案。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围，本披露的范围由权利要求书限定。

附图说明

- 图 1 显示本披露的抗体与小鼠 TF 抗原蛋白结合的结果。
- 图 2 显示本披露的抗体与大鼠 TF 抗原蛋白结合的结果。
- 图 3 显示本披露的 ADC-1 在食蟹猴药代实验中 PT 检测的结果。
- 图 4 显示本披露的 ADC-1 在食蟹猴药代实验中 APTT 检测的结果。

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本披露，但这些实施例并非限制本披露的范围。

本披露实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience, NY。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。本披露
5 将申请 WO2020063676 A1 中的全部内容引入。

实施例

实施例 1：抗原和抗体的克隆构建

抗体（包含轻、重链）和抗原的分子克隆用本领域公知的重叠延伸 PCR 方法
10 或基因合成的方法进行构建。抗体和蛋白抗原序列分别构建到 pTT5 载体中，用 Expi293F™细胞（A14528，Gibco）转染获得相应抗体和抗原蛋白。

抗原蛋白序列

人 TF（human TF，hTF）蛋白序列来源于 NCBI（AAA61151.1），其细胞外区域（ECD）包含 219 个氨基酸（Ser33-Glu251）。猴 TF（cyno TF，cTF）蛋白序列
15 来源于 NCBI（XP_005542723.1），其细胞外区域（ECD）包含 220 个氨基酸（Ser33-Glu252）。大鼠 TF（rat TF，rTF）蛋白序列来源于 NCBI（AAA16966.1），其细胞外区域（ECD）包含 224 个氨基酸（Ala29-Glu252）。小鼠 TF（mouse TF，mTF）蛋白序列来源于 UniProtKB（P20352），其细胞外区域（ECD）包含 223 个氨基酸（Ala29-Glu251）。TF 细胞外区域序列可能添加 His 或人 Fc 区域（hFc）或
20 小鼠 Fc 区域（mFc）标签。

TF 免疫、检测所用蛋白涉及到的质粒采用 pTT5 载体进行制备，或使用 ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒（A14525，Gibco）将质粒转染至 Expi293F™细胞以获得目标蛋白。

抗原蛋白序列如下：

25 Human TF 全序列：

METPAWPRVPRPETAVARTLLLGVVFAQVAGASGTTNTVAAYNLTWKSTN
FKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTDDTECDLTDEIVKDVVKQTYL
ARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTV
EDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDK
30 GENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREIFYIIGAVAFVVIIILVIL
AISLHKCRKAGVGQSWKENSPLNVS

SEQ ID NO: 1

Cyno TF 全序列：

METPAWPRVPRPETAVARTLLLGVVFAQVAGASGTTNTVAAYNLTWKSTN
35 FKTILEWEPKPINQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTADTECDLTDEIVKDVVKQTYL
ARVFSYPAGHVESTGSTEEPYPYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTV
QDEWTLVRRNDTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDK
GENYCFSVQAVIPSRRTANRKSTDSPVECMGHEKGESREIFYIIGAVVFVVIIILVII

LAISLHKCKKARVGRSWKENSPLNVA

SEQ ID NO: 2

Rat TF 全序列:

MAIPMRPRLAALAPTFLGFLLLQVAVGAGTPPGKAFNLTWISTDFKTILEW
5 QPKPTNYTYTVQISDRSRNWKYKCTGTTDTECDLTDEIVKDVNWTYEARVLSV
PWRNSTHGKETLFGTHGEEPPFTNARKFLPYRDTKIGQPVIQKYEQGGTKLKVT
VKDSFTLVRKNGTFLTLRQVFGNDLG YILTYRKDSSTGRKTNTTHTNEFLIDVEK
GVS YCFFAQAVIFSRKTNHKSPESITKCTEQWKS VLG ETLIIVGAVVFLVTVFILL
TISLCKRRKNRAGQKRKNTPSRLA

10

SEQ ID NO: 3

Mouse TF 全序列:

MAILVRPRLAALAPTFLGCLLLQVIAGAGIPEKAFNLTWISTDFKTILEWQ
PKPTNYTYTVQISDRSRNWKNKCFSTTDTECDLTDEIVKDV TWAYEAKVLSVPR
RNSVHGDGDQLVIHGEEPPFTNAPKFLPYRDTNLGQPVIQQFEQDGRKLN VV
15 KDSLTLVRKNGTFLTLRQVFGKDLGYIITYRKGSSTGKKTNITNTNEFSIDVEEG
VS YCFFVQAMIFSRKTNQNSPGSSTVCTEQWKS FLGETLIIVGAVVLLATIFIILLS
ISLCKRRKNRAGQKGKNTPSRLA

SEQ ID NO: 4

Human TF ECD-His 序列 (hTF-his):

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCF
20 YTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLE
TNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKD LIYTLYYWK
SSSSGKK TAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQE
KGEFRETGHHHHHH

25

SEQ ID NO: 5

Human TF ECD-hFc 序列 (hTF-hFc):

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCF
YTTDTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLE
TNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKD LIYTLYYWK
30 SSSSGKK TAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQE
KGEFREPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC
35 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 6

cyno TF ECD-hFc 序列 (cTF-hFc):

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPINQVYTVQISTKSGDWKSKCFY
TADTECDLTDEIVKDV KQTYLARVFSYPAGHVESTGSTEEPPYENSPEFTPYLET
40 NLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVQDEWTLVRRNDTFLSLRDVFGKD LIYTLYYWK

SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRRTANRKSTDSPVECMGHE
KGESREEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
5 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 7

Cyno TF ECD-His 序列 (cTF-his):

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPINQVYTVQISTKSGDWKSKCFY
10 TADTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGHVESTGSTEEPPYENSPEFTPYLET
NLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVQDEWTLVRRNDTFLSLRDVFGKDLIYTYLWYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRRTANRKSTDSPVECMGHE
KGESRETGHHHHHH

SEQ ID NO: 8

15 cyno TF ECD-mFc 序列 (cTF-mFc):

SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPINQVYTVQISTKSGDWKSKCFY
TADTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGHVESTGSTEEPPYENSPEFTPYLET
NLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVQDEWTLVRRNDTFLSLRDVFGKDLIYTYLWYWK
SSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRRTANRKSTDSPVECMGHE
20 KGESREEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVD
VSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKE
FKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD
MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYS
CSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

25 SEQ ID NO: 106

Rat TF ECD-His 序列:

AGTPPGKAFNLTWISTDFKTILEWQPKPTNYTYTVQISDRSRNWKYKCTGT
TDTECDLTDEIVKDVNWYTYEARVLSVPWRNSTHGKETLFGTHGEEPPFTNARK
FLPYRDTKIGQPVIQKYEQGGTKLKVTVKDSFTLVRKNGTFLTLRQVFGNDLGY
30 ILTYRKDSSTGRKTNTTHTNEFLIDVEKGVSYCFFAQAVIFSRKTNHKSPEITKC
TEQWKSVLGETGHHHHHH

SEQ ID NO:9

Mouse TF ECD-His 序列:

AGIPEKAFNLTWISTDFKTILEWQPKPTNYTYTVQISDRSRNWKNKCFSTTD
35 TECDLTDEIVKDVTVWAYEAKVLSVPRRNSVHGDGDQLVIHGEEPPFTNAPKFLP
YRDTNLGQPVIQQFEQDGRKLNVVVKDSLTLVRKNGTFLTLRQVFGKDLGYIIT
YRKGSSSTGKKTNITNTNEFSIDVEEGVSYCFFVQAMIFSRKTNQNSPGSSTVCTE
QWKSFLGETGHHHHHH

SEQ ID NO: 10

40 将大鼠 TF 的 1-130 氨基酸 (Met1-Ala130) 与人 TF 的 130-245 氨基酸

(Pro130-Glu245) 组合, 并添加 His 标签, 构建人与大鼠杂交抗原 HuRatTF。其中个别影响凝血的氨基酸被替换为氨基酸 Ala, 大鼠 TF 序列中个别点位突变为人 TF 的相应序列, 其蛋白序列 (含信号肽) 如下:

MAIPMRPRLAALAPTFLGFLLLQVAVGAGTPPGKAFNLTWISADFKTILA
5 WQPKPTNYTYTVQISTKSGDWKYKCTGTTDTECALTDEIVKDVKQTYLARVLS
VPWRNSTHGKETLFGTHGEEPPFTNAPEFTPYLETNLGAPTQSFEQVGTKVNVTV
EDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLAYWKSSSSGAKTAATNTNEFLIDVDKGENY
CFSVQAVIPSRVTNRASTDSPVECMGQEHHHHHH

SEQ ID NO: 11

10 注: 斜体为人 TF 序列, 虚线为信号肽, 双下划线为大鼠 TF 氨基酸突变为相应人 TF 氨基酸, 下划线为影响凝血的位点突变为丙氨酸 Ala, 波浪线为 His 标签。

构建抗原细胞株所用序列

TF 免疫、检测所用抗原细胞株涉及到的质粒参考 Cell, 01 Aug 2005, 122(3):473-48 载体进行制备。使用 Lipofectamine 3000 转染试剂 (Invitrogen,
15 L3000015) 及转座酶 hyPBBase 质粒将含抗原序列的 piggyBac 转座子质粒转染至 NIH/3T3 (ATCC, CRL-1658) 或/和 CHO-K1 (ATCC, CCL-61) 细胞中, 并通过流式细胞分选 (BD FACS Aria™ Fusion Cell Sorter) 获得目的细胞株。上述构建细胞株所用的抗原序列由 TF 抗原全长、自切蛋白 (2A) 以及绿色荧光蛋白 (EGFP) 序列共同组成。具体如下:

20 piggyBac 转座子质粒构成元件(PB 3' LTR 和 PB 5' LTR, NCBI-KF658273.1):

PB 3' LTR-CMV promoter-antigen sequence-beta-globin poly(A)-PB 5' LTR

-Ampicillin resistance gene-bla promoter

转座酶 hyPBBase 质粒构成元件 (hyPBBase, NCBI-OL519599.1):

EF1a promoter-hyPBBase-BGH polyA-fl origin-SV40 early promoter and origin

25 -Neomycin resistance gene-SV40 polyA- pUC origin -Ampicillin resistance gene- bla promoter

Human TF-2A-EGFP 序列 (hTF):

METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTIL
EWEKPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPA
30 GNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNN
TFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSR
VNRKSTDSPVECMGQEKGEFREIFYIIGAVFVVIILVIIAISLHKCRKAGVGQSWKE
NSPLNVSTSKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPGSTMVSKGEELFTGVVPIL
VELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTTLTYGVQ
35 CFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNR
IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV
QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGI
TLGMDELYK

SEQ ID NO: 12

Cyno TF-2A-EGFP 序列 (cTF):

METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTIL
EWEKPKINQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTADTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAG
HVESTGSTEPPYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFQVGTGVNVTVQDEWTLVRRND
5 TFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSR
TANRKSTDSPVECMGHEKGESREIFYIIGAVVFVVIILVILAIHLKCKKARVGRSWE
NSPLNVATSKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPGSTMVSKGEELFTGVVPIL
VELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPPTLVTTLTYGVO
CFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNR
10 IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV
QLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGI
TLGMDELYK

SEQ ID NO:13

注: 斜体为 TF 序列, 双下划线为 2A 序列, 波浪线为 EGFP 序列。

15 参考专利 WO2010066803A2 分别将人 TF 其中一段序列替换为小鼠 TF 的相应
序列, 共制备 7 个人与小鼠嵌合抗原: hTF1 (1-41mm)、hTF2 (42-84 mm)、hTF3
(85-122mm)、hTF4 (123-137 mm)、hTF7 (138-184 mm)、hTF5 (185-225 mm)、
hTF6 (226-250 mm), 这 7 个抗原简称为 hTF1、hTF2、hTF3、hTF4、hTF7、hTF5、
hTF6。其中, 专利 WO2010066803A2 未提及 hTF7, 为本披露新增。这 7 个抗原
20 在测试例中所对应的人 TF 抗原表位见表 2。

表 2

人鼠嵌合 TF 抗原	被替换为小鼠序列的相应人 TF 序列
hTF1(1-41mm)	METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGTTN TVAA (SEQ ID NO:14)
hTF2(42-84mm)	YNLTWKSTNFKTILEWEKPKVNQVYTVQISTKSGDWK SKCFYT (SEQ ID NO:15)
hTF3(85-122mm)	TDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAG (SEQ ID NO:16)
hTF4(123-137mm)	EPLYENSPEFTPYLE (SEQ ID NO:17)
hTF7(138-184mm)	TNLGQPTIQSFQVGTGVNVTVEDERTLVRRNNTFLSL RDVFGKDLI (SEQ ID NO:18)
hTF5(185-225mm)	YTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSV QAVI (SEQ ID NO:19)

hTF6(226-250mm)	PSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFR (SEQ ID NO:20)
-----------------	---

7 个嵌合抗原序列如下:

hTF1 (1-41mm) 序列:

MAILVRPRLLAALAPTFLGCLLLQVIAGAGIPEKAYNLTWKSTNFKTILEWEP
5 KPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVES
TGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSL
RDVFGKDLYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVNRKS
TDSPECMGQEKGEFREIFYIIGAVAFVVILVILAILSHKCRKAGVGQSWKENSPLNV
STSKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPGSTMVSKGEELFTGVVPILVELDGD
10 VNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPPTLVTTLTYGVCFSRYP
DHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI
DFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADH
YQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMD
ELYK

15 SEQ ID NO:21

hTF2 (42-84mm) 序列:

METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGTTNTVAAFNLTWISTDEKTL
EWQPKPTNYTYTVQISDRSRNWKNCFCSTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSY
PAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRR
20 NNTFLSLRDVFGKDLYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPS
RTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREIFYIIGAVAFVVILVILAILSHKCRKAGVGQSWK
ENSPLNVSTSKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPGSTMVSKGEELFTGVVPI
LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPPTLVTTLTYG
VCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVN
25 RIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGS
VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAG
ITLGMDELYK

SEQ ID NO: 22

hTF3 (85-122mm):

30 METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTIL
EWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVTVWAYEAKVLSV
PRRNSVHGDGDQLVIHGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTV
DERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYC
FSVQAVIPSRVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREIFYIIGAVAFVVILVILAILSHKCRK
35 AGVGQSWKENSPLNVSTSKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPGSTMVSKGE
ELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPPTL
VTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVK
FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKI

RHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHML
LEFVTAAGITLGMDELYK

SEQ ID NO: 23

hTF4 (123-137 mm):

5 METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGTTNTVAAYNLTKSTNFKTIL
EWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPA
GNVESTGSAGEPPFTNAPKFLPYRDTNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRN
NTFLSLRDVFGKDLIYTYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSR
TVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREIFYIIGAVAFVVIILVILAILSHKCRKAGVGQSWKE
10 NSPLNVSTSKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPGSTMVSKGEELFTGVVPIL
VELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQ
CFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNR
IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV
QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGI
15 TLGMDELYK

SEQ ID NO: 24

hTF7 (138-184 mm):

METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGTTNTVAAYNLTKSTNFKTIL
EWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPA
20 GNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPVIOQFEQDGRKLNVVVKDSLTLVR
KNGTFLTLRQVFGKDLGYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQA
VIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREIFYIIGAVAFVVIILVILAILSHKCRKAGVG
QSWKENSPLNVSTSKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPGSTMVSKGEELFTG
VVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLFICTTGKLPVPWPTLVTTLT
25 YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD
TLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI
EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFV
TAAGITLGMDELYK

SEQ ID NO: 25

hTF5 (185-225 mm):

30 METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGTTNTVAAYNLTKSTNFKTIL
EWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPA
GNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRN
TFLSLRDVFGKDLIYIITYRKGSSTGKKTNITNTNEFSIDVEEGVSYCFFVQAMIPS
35 RTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREIFYIIGAVAFVVIILVILAILSHKCRKAGVGQSWK
ENSPLNVSTSKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPGSTMVSKGEELFTGVVPI
LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGV
QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVN
RIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGS
40 VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAG

ITLGMDELYK

SEQ ID NO:26

hTF6 (226-250 mm):

5 *METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTIL*
EWEKPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPA
GNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNN
TFLSLRDVFGKDLIYTYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIFSRK
TNQNSPGSSSTVCTEQWKSFLGEIFYIIGAVAFVVIILVILAILSHKCRKAGVGQSWKE
NSPLNVSTSKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPGSTMVSKGEELFTGVVPIL
10 *VELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPPTLVTTLTYGVO*
CFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNR
IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV
QLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGI
TLGMDELYK

15

SEQ ID NO: 27

注：斜体为人 TF 序列，下划线为小鼠 TF 序列，双下划线为 2A 序列，波浪线为 EGFP 序列。

通过 FACS binding 实验进行表位分析，本披露的抗体结合 TF 特定的表位。

20 阳性对照抗体序列

阳性对照 TF011 抗体序列来源于 tisotumab vedotin 的单抗序列，H39 抗体可变区序列来源于 WO2018036117A1，10H10 抗体可变区序列来源 WO2012125559A1。

TF011 抗体重链序列 (tisotumab vedotin 的单抗序列):

25 *EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSS*
ISGSGDYTYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPWGY
YLDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
30 *YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF*
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 28

TF011 抗体轻链序列 (tisotumab vedotin 的单抗序列):

35 *DIQMTQSPPSLSASAGDRVITICRASQGISSLRLAWYQQKPEKAPKSLIYAAS*
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSTPYTFGQGTKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 29

40

H39 抗体重链序列（可变区+人 IgG1 恒定区）：

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWM
GMIYPADSETRLNQKFKDQATLSVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYWCAREDY
GSSDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
5 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
10 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 30

H39 抗体轻链序列（可变区+人 κ 恒定区）：

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKSPKIWIYGISN
LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQKSSFPWTFGGGTKVEIKRT
15 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 31

10H10 抗体重链序列（可变区+人 IgG1 恒定区）：

QVHLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFITYWIEWVKQRPGHGLEWIGD
20 ILPGSGSTNYNENFKGKATFTADSSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGSGYYGNS
GFAYWGQGTTLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
25 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 32

10H10 抗体轻链序列（可变区+人 κ 恒定区）：

30 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLSSGNQKNYLTWYQQIPGQPPK
LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGA
GTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

35

SEQ ID NO: 33

TF011-mIgG2a 重链序列（可变区+小鼠 mIgG2a 恒定区）：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSS
ISGSGDYTTYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPWGY
YLDSWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL
40 TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVD

KKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSE
DDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK
CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMP
EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
5 VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO: 34

TF011-mκ 轻链序列（可变区+小鼠 κ 恒定区）：

DIQMTQSPPSLSASAGDRVITICRASQGISSRLAWYQQKPEKAPKSLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIKR
10 ADAAPTVISIFPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNS
WTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

SEQ ID NO: 35

阴性对照抗体 **hIgG1**（其中 VH/VL 来源于专利 US6114143A 的 C25
15 抗体）：

hIgG1 抗体重链的氨基酸序列（C25 重链可变区+人 IgG1 恒定区）：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNSWIGWFRQAPGQGLEWIG
DIYPGGGYTNYNEIFKGKATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCSRGPYGA
MDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
20 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
25 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 103

hIgG1 抗体轻链的氨基酸序列（C25 轻链可变区+人 κ 恒定区）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTMSCKSSQSLNSGDQKNYLTWYQQKPGKAP
KLLIYWASTGESGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDVATYYCQNDYSYPWTFG
30 QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

SEQ ID NO: 104

注：下划线部分为可变区序列。

35

实施例 2：抗原蛋白和抗体蛋白的纯化

有 His 标签的抗原经镍柱 Ni Sepharose excel 25mL (GE Healthcare, 17-3712-01) 亲和纯化，有 Fc 标签的抗原或抗体经 ProteinA -MabSelect SuRe 25 mL (GE Healthcare, 17-5438-01) 亲和纯化。亲和纯化后的蛋白再经分子排阻色谱去除聚

体或裂解片段。具体方法如下：

镍柱纯化：用 PBS 溶液冲洗平衡镍柱，将细胞转染后的上清高速离心去除杂质后上样。当 PBS 溶液冲洗镍柱至 A₂₈₀ 读数降到基线，用含 10mM 咪唑的 PBS 溶液冲洗镍柱，去除非特异结合的杂蛋白，再用含有 300mM 咪唑的 PBS 溶液洗脱目的蛋白，收集洗脱峰液体，并换液到 PBS 内保存。

色谱排阻纯化：用 PBS 溶液冲洗平衡 SEC 柱（GE，superdex75），将经过镍柱纯化或 Protein A 纯化得到的蛋白上样上样（上样体积≤3%柱体积），用 PBS 溶液作为流动相洗脱，收集各洗脱峰，经 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白所在组分。

抗体或 Fc 融合蛋白的亲和层析：将细胞转染后的上清高速离心去除杂质后上样至 Protein A 柱。当 PBS 溶液冲洗 Protein A 柱至 A₂₈₀ 读数降到基线，用 pH3.5，100mM 乙酸洗脱目的蛋白，洗脱液用 pH8.0，1M Tris-HCl 进行中和，并换液到 PBS 内。如有需要，后续可使用凝胶层析（Superdex200，GE）进一步去除聚体。

实施例 3：抗人 TF 单克隆抗体的制备

3.1 免疫

抗人 TF 单克隆抗体通过杂交瘤技术获得。实验用 SJL 白小鼠，雌性，6-8 周龄（上海斯莱克实验动物有限公司，动物生产许可证号：SCXK（沪）2017-0005）。饲养环境：SPF 级。小鼠购进后，实验室环境饲养 1 周，12/12 小时光/暗周期调节，温度 20-25℃；湿度 40-60%。将已适应环境的小鼠按以下方案免疫。

3.2 免疫方案

抗人 TF 抗体 67 的免疫抗原为 hTF-NIH/3T3 细胞（SEQ ID NO:12）、cTF-NIH/3T3 细胞（SEQ ID NO:13）、hTF-his 蛋白（SEQ ID NO:5）和 cTF-mFc 蛋白（SEQ ID NO:106），免疫方式为细胞和蛋白免疫。首次免疫使用 hTF-NIH/3T3 细胞，免疫细胞前，预先用 TiterMax® Gold Adjuvant（Sigma，T2684）0.1mL/只注射小鼠腹膜内，半小时后每只小鼠腹膜内注射 0.1mL 生理盐水稀释至 10⁸ 个细胞/mL 的细胞悬液。第 14 天进行第二次免疫，使用 cTF-NIH/3T3 细胞，每只小鼠腹膜内注射 0.1mL 生理盐水稀释至 10⁸ 个细胞/mL 的细胞悬液。第 35 天进行第三次免疫，使用 hTF-his 蛋白，50μg/只/次，抗原与佐剂（TiterMax® Gold Adjuvant）比例为 1:1，抗原与佐剂充分乳化后进行接种。第 49 天进行第四次免疫，使用 hTF-his 蛋白，50μg/只/次，抗原与佐剂（TiterMax® Gold Adjuvant）比例为 1:1，抗原与佐剂充分乳化后进行接种。于第 29，47，61 天取血，用 ELISA 和 FACS 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在第 4 次免疫以后，选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前 3 天加强免疫，腹膜内（i.p.）注射 50μg/只的生理盐水配制的 hTF-his 和 cTF-mFc 按质量比 1：1 混合的抗原蛋白溶液。

抗人 TF 抗体 310 免疫抗原为 hTF-NIH/3T3 细胞、cTF-NIH/3T3 细胞、

hTF-CHO-K1 细胞和 cTF-CHO-K1 细胞，免疫方式为细胞免疫。首次免疫使用 hTF-NIH/3T3 细胞，免疫细胞前，提前用 TiterMax® Gold Adjuvant 0.1mL/只注射小鼠腹膜内，半小时后每只小鼠腹膜内注射 0.1mL 生理盐水稀释至 10^8 个细胞/mL 的细胞悬液。第 59 天进行第二次免疫，使用 cTF-NIH/3T3 细胞，每只小鼠腹膜内注射 0.1mL 生理盐水稀释至 10^8 个细胞/mL 的细胞悬液。第 74 天进行第三次免疫，使用 hTF-CHO-K1 细胞，每只小鼠腹膜内注射 0.1mL 生理盐水稀释至 10^8 个细胞/mL 的细胞悬液。第 90 天进行第四次免疫，使用 cTF-CHO-K1 细胞，每只小鼠腹膜内注射 0.1mL 生理盐水稀释至 10^8 细胞/mL 的细胞悬液。第 104 天进行第五次免疫，使用 hTF-CHO-K1 细胞，每只小鼠腹膜内注射 0.1mL 生理盐水稀释至 10^8 个细胞/mL 的细胞悬液。于第 68, 85, 118 天取血，用 ELISA 和 FACS 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在第 5 次免疫以后，选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前 3 天加强免疫，腹膜内 (i.p.) 注射 50 μ g/只的生理盐水配制的 hTF-his (SEQ ID NO:5) 和 cTF-his (SEQ ID NO:8) 按质量比 1: 1 混合的抗原蛋白溶液。

3.3 脾细胞融合

采用电融合方法将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0-Ag14 细胞 (ATCC, CRL-8287™) 进行融合得到杂交瘤细胞。将杂交瘤细胞以 $3-4 \times 10^5$ /mL 的密度用完全培养基 (含 20% FBS、1 $\times$ HAT、1 $\times$ OPI 的 IMDM 培养基) 重悬，150 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板中。37°C, 5%CO₂ 孵育 3-4 天后，去除上清，加入 200 μ L/孔的 HT 完全培养基 (含 20%FBS、1 $\times$ HT 和 1 $\times$ OPI 的 IMDM 培养基)，37°C, 5%CO₂ 培养 3-5 天后进行检测。

3.4 杂交瘤细胞筛选

待杂交瘤细胞密度达到 90%，吸取细胞上清，使用基于细胞的 ELISA 方法进行 96 孔板的初筛。之后将筛选出来的阳性孔转至 24 孔板，2-3 天待细胞密度达到 90%，吸取细胞上清，使用 FACS 和/或竞争和/或凝血等实验进行 24 孔板复筛。选取单孔细胞进行亚克隆以获得单细胞克隆。收集亚克隆细胞上清进行复测。通过上述实验筛选得到杂交瘤克隆，用于后续试验。

实施例 4: 小鼠单克隆抗体可变区氨基酸序列测定

将实施例 3 中得到的杂交瘤单克隆细胞株进行可变区氨基酸序列测定，将小鼠杂交瘤可变区序列与人恒定区序列组合为人鼠嵌合抗体 (CHAb) 序列，对嵌合抗体进行表达和鉴定。具体方法如下：

首先采用常规公知方法获得杂交瘤单克隆细胞株的总 RNA，然后用反转录试剂盒 PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix (TAKARA, 6215A) 制备 cDNA，以 cDNA 为模板进行 PCR，扩增得到含轻重链可变区的 PCR 片段，通过 PCR 片段测序获得相应可变区序列。采用常规公知方法，将得到的轻重链序列分别克隆

到 pTT5 载体中，表达重组单克隆抗体，并验证其活性。

抗人 TF 抗体的 VH/VL CDR 的氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定并注释。

小鼠杂交瘤细胞单克隆抗体 67#的序列：

67#重链可变区：

5

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCIVSGFSLTNYGVNWVRQSPRKGLEWLGVI
WSRGNTDYNAAFISRLIISKDNSKSQVFLKMNRLQADDTAIYYCARKDAVVATD
ALDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 36

67#轻链可变区：

10

DIVMTQSHKFMSTSLGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYST
SYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPYTFGGGTKLEI
K

SEQ ID NO: 37

小鼠杂交瘤细胞单克隆抗体 310#的序列：

15

310#重链可变区：
EVQLQQSGPELVKPGASLKISCKASGYSTGYMNVWKQSPEKSLEWIGEI
NPSTGGSTYNQKFKAATLTVDQSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARRELGGPF
GYWGQGTPVTVSA

SEQ ID NO: 38

310#轻链可变区：

20

SIVMTQTPKFLLVSSGDRVTITCKASQSVSNGIAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
NRYTGVPDRFTGSGYGTDFTTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPWTFGGGTKLEI
K

SEQ ID NO: 39

25

表 3. 67#鼠源抗体的 CDR

CDR	序列	序列号
HCDR1	NYGVN	SEQ ID NO: 40
HCDR2	VIWSRGNTDYNAAFIS	SEQ ID NO: 41
HCDR3	KDAVVATDALDY	SEQ ID NO: 42
LCDR1	KASQDVSTAVA	SEQ ID NO: 43
LCDR2	STSYRYT	SEQ ID NO: 44
LCDR3	QQHYSTPYT	SEQ ID NO: 45

表 4. 310#鼠源抗体的 CDR

CDR	序列	序列号
HCDR1	GYMN	SEQ ID NO: 46
HCDR2	EINPSTGGSTYNQKFA	SEQ ID NO: 47
HCDR3	RELGGPFGY	SEQ ID NO: 48
LCDR1	KASQSVSNGIA	SEQ ID NO: 49

LCDR2	FASNRYT	SEQ ID NO: 50
LCDR3	QQDYSSPWT	SEQ ID NO: 51

人 IgG1 重链恒定区:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
5 HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK
10 SEQ ID NO: 54

人源 κ 轻链恒定区:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC
15 SEQ ID NO: 55

嵌合抗体 CH67 的重链序列和轻链序列如下:

CH67 重链:

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCIVSGFSLTNYGVNWVRQSPRKGLEWLGVI
20 WSRGNTDYNAAFISRLIISKDNSKSQVFLKMNRLQADDTAIYYCARKDAVVATD
ALDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
25 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 107

CH67 轻链:

DIVMTQSHKFMSTSLGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYST
30 SYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPYTFGGGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 108

嵌合抗体 CH310 的重链序列和轻链序列如下:

CH310 重链:

EVQLQQSGPELVKPGASLKISCKASGYSTGYMNVWKQSPEKSLEWIGEI
NPSTGGSTYNQKFKAKATLTVDQSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARRELGGPF

GYWGQGTPVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
5 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 109

CH310 轻链:

10 SIVMTQTPKFLLVSSGDRVTITCKASQSVSNGIAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
NRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPWTFGGGKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 110

15

实施例 5：抗人 TF 抗体 310#人源化

通过 MOE 软件与 IMGT 人类抗体重轻链可变区种系基因数据库进行比对，挑
选与 310#同源性高的重轻链可变区种系基因作为模板，将这个鼠源抗体的 CDR 分
别移植到相应的人源模板中，形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4
20 的可变区序列。示例性地，以下具体实施例中 CDR 氨基酸残基由 Kabat 编号系统
确定并注释。

310#抗体的人源化抗体选择 IGKV4-1*01 或 IGKV1-33*01 的 FR1、FR2、FR3，
和 IGKJ4*01 的 FR4 作为轻链框架区模板；选择 IGHV1-46*01 的 FR1、FR2、FR3
和 IGHJ6*01 的 FR4 作为重链框架区模板。任选地，对人源化抗体的轻链可变区上
25 第 1、9、10、31、43、67 和/或 73 位的氨基酸残基进行取代；和/对人源化抗体
的重链可变区上第 1、28、69、71、73、76 和/或 78 位的氨基酸残基进行取代。

表 5. 310#的人源化设计

VL		VH	
VL1	Graft(IGKV4-1*01)	VH1	Graft(IGHV1-46*01) + Q1E,T28S,R71V,T73Q
VL2	Graft(IGKV4-1*01) + D1S,P43S,S67Y	VH2	Graft(IGHV1-46*01) + Q1E,T28S,M69L,R71V,T73Q,S76N,V78A
VL3	Graft(IGKV4-1*01) + D1S,D9K,S10F,P43S,S67Y,L73F		
VL4	Graft(IGKV1-33*01)		
VL5	Graft(IGKV1-33*01) + D1S,A43S,S67Y		
VL6	Graft(IGKV1-33*01) + D1S,A43S,S67Y + N31Q		
VL7	Graft(IGKV1-33*01) +		

	D1S,A43S,S67Y + N31S		
VL8	Graft(IGKV1-33*01) D1S,A43S,S67Y + N31T	+	
FR4	IGKJ4*01	FR4	IGHJ6*01

注：示例性地，D1S 表示依照 Kabat 编号系统，将 1 位 D 突变为 S，其他以此类推。

表 6. 310#人源化抗体的 CDR

可变区	CDR	序列	序列号
所有	HCDR1	GYVMN	SEQ ID NO: 46
所有	HCDR2	EINPSTGGSTYNQKFKA	SEQ ID NO: 47
所有	HCDR3	RELGGPFGY	SEQ ID NO: 48
VL1/VL2/VL3/VL4/ VL5	LCDR1	KASQSVSNGIA	SEQ ID NO: 49
VL6	LCDR1	KASQSVSQGIA	SEQ ID NO:111
VL7	LCDR1	KASQSVSSGIA	SEQ ID NO:112
VL8	LCDR1	KASQSVSTGIA	SEQ ID NO:113
所有	LCDR2	FASNRYT	SEQ ID NO: 50
所有	LCDR3	QQDYSSPWT	SEQ ID NO: 51

310#人源化抗体的重链可变区序列和轻链可变区序列如下：

- 5

>hu310-VH1:
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYVMNWVRQAPGQGLEWM
GEINPSTGGSTYNQKFKARVMTVDQSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARRELG
GPFGYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 52
- 10

>hu310-VH2:
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYVMNWVRQAPGQGLEWM
GEINPSTGGSTYNQKFKARVTLTYDQSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRELG
GPFGYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:114
- 15

>hu310-VL1:
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNGIAWYQQKPGQPPKLLIYFAS
NRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEI
K

SEQ ID NO:115
- 20

>hu310-VL2:
SIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNGIAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
NRYTGVPDRFSGSGYGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEI
K

SEQ ID NO: 53
- 25

>hu310-VL3:

SIVMTQSPKFLAVSLGERATINCKASQSVSNGIAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
NRYTGVPDRFSGSGYGTDFFTISSLQAEDVAVYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIK
K

SEQ ID NO:116

5 >hu310-VL4:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNGIAWYQQKPGKAPKLLIYFAS
NRYTGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:117

>hu310-VL5:
10 SIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNGIAWYQQKPGKSPKLLIYFAS
NRYTGVPSRFSGSGYGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:118

>hu310-VL6:
SIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSQGIAWYQQKPGKSPKLLIYFAS
15 NRYTGVPSRFSGSGYGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:119

>hu310-VL7:
SIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSSGIAWYQQKPGKSPKLLIYFAS
20 NRYTGVPSRFSGSGYGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:120

>hu310-VL8:
SIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSTGIAWYQQKPGKSPKLLIYFAS
NRYTGVPSRFSGSGYGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:121

25 注：上述序列中，顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4；下划线
为依照 Kabat 编号系统确定的 CDR 序列；非下划线部分为 FR 序列；双下划线加
粗部分为氨基酸点突变。

30 310#人源化抗体的重链可变区和轻链可变区分别与人重链 IgG1 恒定区（SEQ
ID NO： 54）和人轻链 Kappa 恒定区（SEQ ID NO： 55）重组，获得如下表 7 所示
的人源化抗体。

表 7. 310#的人源化抗体

可变区	VH1	VH2
VL1	hu310-1	hu310-9
VL2	hu310-2	hu310-10
VL3	hu310-3	hu310-11
VL4	hu310-4	hu310-12
VL5	hu310-5	hu310-13
VL6	hu310-6	hu310-14
VL7	hu310-7	hu310-15

VL8	hu310-8	hu310-16
-----	---------	----------

310#人源化抗体的重链序列和轻链序列如下：

hu310-1/hu310-2/hu310-3/hu310-4/hu310-5/hu310-6/hu310-7/hu310-8 重链：

5 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYIMNWVRQAPGQGLEWM
GEINPSTGGSTYNQKFKARVTMTVDQSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARRELG
GPFQYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
10 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPQDIQWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 56

hu310-9/hu310-10/hu310-11/hu310-12/hu310-13/hu310-14/hu310-15/hu310-16 重

15 链：
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYIMNWVRQAPGQGLEWM
GEINPSTGGSTYNQKFKARVTLTVDQSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRELG
GPFQYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
20 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPQDIQWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:122

hu310-1/hu310-9 轻链：

25 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNGIAWYQQKPGQPPKLLIYFAS
NRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
30 ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:123

hu310-2/hu310-10 轻链：

35 SIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNGIAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
NRYTGVPDRFSGSGYGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 57

hu310-3/hu310-11 轻链：

SIVMTQSPKFLAVSLGERATINCKASQSVSNGIAWYQQKPGQSPKLLIYFAS

NRYTGVPDRFSGSGYGTDFTETISSLQAEDVAVYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:124

5 hu310-4/hu310-12 轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNGIAWYQQKPGKAPKLLIYFAS
NRYTGVPSRFSGSGSGTDFTEISSLQPEDATYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 SEQ ID NO:125

hu310-5/hu310-13 轻链:

SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNGIAWYQQKPGKSPKLLIYFAS
NRYTGVPSRFSGSGYGTDFTEISSLQPEDATYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15 SEQ ID NO:126

hu310-6/hu310-14 轻链:

SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSQGIWYQQKPGKSPKLLIYFAS
NRYTGVPSRFSGSGYGTDFTEISSLQPEDATYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20 SEQ ID NO:127

hu310-7/hu310-15 轻链:

SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSSGIWYQQKPGKSPKLLIYFAS
NRYTGVPSRFSGSGYGTDFTEISSLQPEDATYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25 SEQ ID NO:128

hu310-8/hu310-16 轻链:

SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSTGIWYQQKPGKSPKLLIYFAS
NRYTGVPSRFSGSGYGTDFTEISSLQPEDATYYCQQDYSSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30 SEQ ID NO:129

35

实施例 6: 抗人 TF 抗体 67#人源化

将实施例 4 得到的鼠源抗 TF 单克隆抗体 67#的轻重链序列, 通过 MOE 软件与 IMGT 人类抗体重轻链可变区种系基因数据库里进行同源性比较后, 挑选与 67#同源性高的重轻链可变区种系基因作为模板, 将这个鼠源抗体的 CDR 分别移植到

40 相应的人源模板中, 形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区

序列。示例性地，以下具体实施例中 CDR 氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定并注释。

67#抗体的人种系轻链模版选择 IGKV4-1*01 或 IGKV1-33*01 的 FR1、FR2、FR3，和 IGKJ4*01 的 FR4；人种系重链模版选择 IGHV2-26*01 或 IGHV4-30-4*01 的 FR1、FR2、FR3，和 IGHJ6*01 的 FR4。任选地，对人源化抗体的轻链可变区上第 8、9、10、43 和/或 73 位的氨基酸残基进行取代；和/或对人源化抗体的重链可变区上第 1、6、16、27、29、30、42、44、49、71、73、76、78 和/或 81 位的氨基酸残基进行取代。

表 8.67#的人源化设计

VL		VH	
VL1	Graft(IGKV4-1*01) + D9K	VH1	Graft(IGHV2-26*01) + Q1E,E6Q,E16Q,S30T,G42R,T81K
VL2	Graft(IGKV4-1*01) + D9K, P43S,L73F	VH2	Graft(IGHV2-26*01) + Q1E,E6Q,E16Q,S30T,G42R,A44G ,A49G,T73N,T81K
VL3	Graft(IGKV1-33*01)	VH3	Graft(IGHV4-30-4*01) + Q1E,G27F,I29L,S30T,V71K,F78V
VL4	Graft(IGKV1-33*01) + P8H,S9K,S10F,A43S	VH4	Graft(IGHV4-30-4*01) + Q1E,G27F,I29L,S30T,G42R,V71K ,T73N,N76S,F78V
FR4	IGKJ4*01	FR4	IGHJ6*01

注：如 G42R 表示依照 Kabat 编号系统，将 42 位 G 突变回 R。

67#人源化抗体的重链可变区和轻链可变区序列如下：

>hu67-VH1:

EVTLKQSGPVLVKPTQTLTLCTVSGFSLTNYGVNWIRQPPRKALEWLAVI
WSRGNTDYNAAFISRLTISKDTSKSQVVLKMTNMDPVDATYYCARKDAVVAT
DALDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:130

>hu67-VH2:

EVTLKQSGPVLVKPTQTLTLCTVSGFSLTNYGVNWIRQPPRKGLEWLGVI
WSRGNTDYNAAFISRLTISKDNSKSQVVLKMTNMDPVDATYYCARKDAVVAT
DALDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:131

>hu67-VH3:

EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLTNYGVNWIRQPPGKGLEWIGVI
WSRGNTDYNAAFISRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAVVATD
ALDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:58

>hu67-VH4:
EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLTNYGVNWIRQPPRKGLEWIGVI
WSRGNTDYNAAFISRVTISKDNSKSQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAVVATD
5 ALDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:132

>67VL-VL1:
DIVMTQSPKSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSTS
10 YRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPYTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO:133

>67VL-VL2:
DIVMTQSPKSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPPKLLIYSTS
15 YRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPYTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO:134

>67VL-VL3:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSTS
20 YRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQHYSTPYTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO:59

>67VL-VL4:
DIQMTQSHKFLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKSPKLLIYST
SYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQHYSTPYTFGGGGTKVEIK
30

SEQ ID NO:135

注：上述序列中，顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4；下划线
25 为依照 Kabat 编号系统确定的 CDR 序列；非下划线部分为 FR 序列；双下划线加
粗部分为氨基酸点突变。

67#人源化抗体的重链可变区和轻链可变区分别与人重链 IgG1 恒定区（SEQ
ID NO： 54）和人轻链 Kappa 恒定区（SEQ ID NO： 55）重组，获得如下表 9 所示
的人源化抗体。

30 表 9. 67#的人源化抗体

可变区	VH1	VH2	VH3	VH4
VL1	hu67-1	hu67-2	hu67-3	hu67-4
VL2	hu67-5	hu67-6	hu67-7	hu67-8
VL3	hu67-9	hu67-10	hu67-11	hu67-12
VL4	hu67-13	hu67-14	hu67-15	hu67-16

人源化抗体的重链序列和轻链序列如下：

hu67-1/hu67-5/hu67-9/hu67-13 重链序列：

EVTLKQSGPVLVKPTQTLTLCTVSGFSLTNYGVNWIRQPPRKALEWLAVI
35 WSRGNTDYNAAFISRLTISKDTSKSQVVLKMTNMDPVDTATYYCARKDAVVAT
DALDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD

VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 SEQ ID NO:136

hu67-2/hu67-6/hu67-10/hu67-14 重链序列:

EVTLKQSGPVLVKPTQTLTLCTVSGFSLTNYGVNWIRQPPRKGLEWLGI
WSRGNTDYNAAFISRLTISKDNSKSQVVLKMTNMDPVDATATYYCARKDAVVAT
DALDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
10 VSWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
15 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:137

hu67-3/hu67-7/hu67-11/hu67-15 重链序列:

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYGVNWIRQPPGKLEWIGVI
WSRGNTDYNAAFISRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAVVATD
20 ALDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
25 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:60

hu67-4/hu67-8/hu67-12/hu67-16 重链序列:

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTNYGVNWIRQPPRKGLEWIGVI
30 WSRGNTDYNAAFISRVTISKDNSKSQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAVVATD
ALDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
35 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:138

hu67-1/hu67-2/hu67-3/hu67-4 轻链序列:

40 DIVMTQSPKSLAVSLGERATINCKASQDVSTAWYQQKPGQPPKLLIYSTS

YRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSTPYTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:139

5 hu67-5/hu67-6/hu67-7/hu67-8 轻链序列:

DIVMTQSPKSLAVSLGERATINCKASQDVSTAWYQQKPGQSPKLLIYST
YRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSTPYTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 SEQ ID NO:140

hu67-9/hu67-10/hu67-11/hu67-12 轻链序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYST
YRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQHYSTPYTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15 SEQ ID NO: 61

hu67-13/hu67-14/hu67-15/hu67-16 轻链序列:

DIQMTQSHKFLSASVGDRVTITCKASQDVSTAWYQQKPGKSPKLLIYST
SYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQHYSTPYTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20 SEQ ID NO:141

实施例 7: hu67-11 亲和力成熟

25 将实施例 6 得到的人源抗 TF 单克隆抗体 hu67-11, 采用 hTF-hFc (SEQ ID NO: 6) 和 cTF-hFc (SEQ ID NO:7) 作为抗原构建抗体酵母库进行亲和力成熟, 以提高目标抗体的细胞结合力。通过克隆、表达、纯化上述抗体, 并对其进行检测, 选出最优的人源化抗体。

7.1 亲和力成熟酵母文库的构建以及文库的筛选

30 为获得更好的抗 TF hu67-11 相关抗体, 通过酵母展示平台技术对 hu67-11 进行亲和力成熟, 在 hu67-11-scFv (SEQ ID NO:171) 的基础上设计并制备针对人 TF 和猴 TF 结合 CDR 的亲和力成熟酵母文库, 并从中筛选新的突变体。

酵母文库的构建: 设计简并引物, 通过 PCR 的方法将设计的突变氨基酸引入到 hu67-11-scFv 突变体文库中, 每个文库的大小在 10^9 左右, 构建好的酵母菌文库
35 通过二代测序的方法验证文库的多样性。

在第一轮筛选中, 将来自 hu67-11-scFv 突变体文库的酵母与生物素化的 hTF-hFc 蛋白在 50mL 含 0.1 % 牛血清白蛋白(BSA)-磷酸盐缓冲液 (称为 PBSA) 中于室温下孵育 1 小时。然后, 混合物用 PBSA 洗涤三次, 以去除未结合的抗体片

段。然后向结合生物素化 hTF-hFc 蛋白的突变体文库中加入链菌素微珠(Milenvi Biotec , Auburn ,CA), 并使其负载于 AutoMACS 系统上用于分选。收集具有对人 TF 高亲和力的抗体文库扩增培养。然后将培养物诱导表达。将所得到的富集文库进行针对与生物素化的 cTF-hFc (SEQ ID NO:7) 结合的第二轮筛选。

- 5 对于第三轮和第四轮的筛选, 将来自前一轮的文库细胞与生物素化的 hTF-hFc 和 Mouse Anti-cMyc (9E10, sigma)抗体在 PBSA 中于室温下孵育 1 小时, 混合物用 BSA 洗涤三次, 以去除未结合的抗体片段。加入 Goat anti-mouse-Alexa488(Life technologies, A-11001)和 Streptavidin-PE(Life technologies, S-866)于 4 °C下孵育 1 小时, 混合物用 PBSA 洗涤三次, 以去除未结合的抗体片段。最后, 通过 FACS (BD FACS Aria™ FUSION) 筛选出亲和力高的抗体。

- 10 突变体文库利用生物素化的 TF-hFc 抗原, 经过 2-3 轮 MACS 筛选(链霉素磁珠, Invitrogen)和 2-3 轮 FACS 筛选 (BD FACS Aria™ FUSION)。再挑选 600 个左右的酵母单克隆培养和诱导表达, 使用 FACS (BD FACSCanto II) 检测酵母单克隆对上述 hTF-hFc (SEQ ID NO: 6) 和 cTF-hFc (SEQ ID NO:7) 的结合, 挑选出
- 15 比野生型(hu67-11-scfv)亲和力更好的酵母单克隆进行测序验证, 对测序克隆进行比对分析, 去除冗余序列之后, 将非冗余序列转换成全长人 IgG 后进行哺乳动物细胞表达。

hu67-11-scfv 序列:

- 20 EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLTNYGVNWIRQPPGKGLEWIGVIWSR
GNTDYNAAFISRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAVVATDALD
YWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS
QDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSTSYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISSLQPE
DIATYYCQQHYSTPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 171

25

实施例 8: hu67-11 亲和力成熟分子的改造

- 将实施例 7 得到的人源化抗体 hu67-11 采用 CDR 点突变(单点和/或组合)的方式, 并在 FR 区进一步引入 P40S 点突变, 以进一步提高细胞结合力。通过克隆、表达、纯化、检测上述抗体。筛选得到细胞结合力进一步提高的抗体 hu67Y116、
- 30 hu67Y118 可变区序列。

抗体 hu67Y116/ hu67Y118 重链可变区序列:

- EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLTNYGVNWIRQSPGKGLEWIGVI
WSRGNTDYNAAF~~K~~SRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAIVATD
ALDYWGQGTITVTVSS

35

SEQ ID NO: 62

抗体 hu67Y116 轻链可变区序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVQTAVAWYQQKPGKAPKLLIYST
HYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLQSYTLPSFSGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 63

抗体 hu67Y118 轻链可变区序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVQTAVAWYQQKPGKAPKLLIYST
HYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLQLIGVPHTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 81

5 表 10、抗体 hu67Y116 的 CDR

hu67Y116	CDR 序列		序列号
HCDR	HCDR1	NYGVN	SEQ ID NO: 40
	HCDR2	VIWSRGNTDYNAAFKS	SEQ ID NO: 64
	HCDR3	KDAIVATDALDY	SEQ ID NO: 65
LCDR	LCDR1	KASQDVQTAVA	SEQ ID NO: 66
	LCDR2	STHYRYT	SEQ ID NO: 67
	LCDR3	LQSYTLDFS	SEQ ID NO: 68

表 11、抗体 hu67Y118 的 CDR

hu67Y118	CDR 序列		序列号
HCDR	HCDR1	NYGVN	SEQ ID NO: 40
	HCDR2	VIWSRGNTDYNAAFKS	SEQ ID NO: 64
	HCDR3	KDAIVATDALDY	SEQ ID NO: 65
LCDR	LCDR1	KASQDVQTAVA	SEQ ID NO: 66
	LCDR2	STHYRYT	SEQ ID NO: 67
	LCDR3	LQLIGVPHT	SEQ ID NO: 83

hu67Y116/ hu67Y118 重链序列:

10 EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLTNYGVNWIRQSPGKGLEWIGVI
WSRGNTDYNAAFKSSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAIVATD
ALDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
15 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 69

20 hu67Y116 轻链序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVQTAVAWYQQKPGKAPKLLIYST
HYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLQSYTLDFSFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
25 SEQ ID NO: 70

hu67Y118 轻链序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVQTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSTH
YRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCLQLIGVPHTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
5 VTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:82

实施例 9：10H10 分子序列改造

抗体 10H10 不影响凝血，已通过晶体结构分析证实（Cellular Signalling 36
10 （2017）139-144）。在抗体数据库里进行同源性比较后，建立人源化抗体模型。根据模型选择回复突变，并对 CDR 区域优化。通过克隆、表达、纯化上述抗体，并对其进行检测。

抗体 10H10 的人种系轻链模版选择 IGKV1-39*01 的 FR1、FR2、FR3，和
IGKJ2*01 的 FR4，人种系重链模版为 IGHV1-46*01 或 IGHV7-4-1*02 的 FR1、FR2、
15 FR3，和 IGHJ1*01 的 FR4。任选地，对人源化抗体的轻链可变区上第 24、25、27b、27d、27f、56 和/或 97 位的氨基酸残基进行取代；和/或对人源化抗体的重链可变区上第 1、26、27、30、31、38、40、53、54、56、57、67、68、69、71、81 和/或 101 位的氨基酸残基进行取代。

表 12. 抗体 10H10 的人源化设计

VL		VH	
VL1	Graft(IGKV1-39*01)	VH1	Graft(IGHV1-46*01)+Q1E,T30I,A40R,M69F,R71A,E81Q
VL2	Graft(IGKV1-39*01) + K24R,S25A,L27b I	VH2	Graft(IGHV7-4-1*02)+Q1E,T30I,A40R,F67A,L71A
VL3	Graft(IGKV1-39*01) + S56E	VH3	Graft(IGHV1-46*01)+Q1E,G26I,T30I,A40R,M69F,R71A,E81Q
VL4	Graft(IGKV1-39*01) + T97S	VH4	Graft(IGHV7-4-1*02)+Q1E,Y27F,T30I,A40R,F67A,L71A
VL5	Graft(IGKV1-39*01) + S27d D,S56E	VH5	Graft(IGHV1-46*01)+Q1E,T30I,A40R,M69F,R71A,E81Q+T57S
VL6	Graft(IGKV1-39*01) + G27f S,S56E	VH6	Graft(IGHV7-4-1*02)+Q1E,T30I,A40R,F67A,L71A+A101V
VL9	Graft(IGKV1-39*01) + K24Q	VH7	Graft(IGHV7-4-1*02)+Q1E,T30I,R38K,A40R,F67A,V68T,L71A
		VH8	Graft(IGHV7-4-1*02)+Q1E,Y27R,T30I,A40R,F67A,V68T,L71A

		VH9	Graft(IGHV7-4-1*02)+Q1E,T30R,R38K,A40R,F67A,V68T,L71A
		VH10	Graft(IGHV7-4-1*02)+Q1E,T30I,R38K,A40R,F67A,V68T,L71A+ T31E
		VH11	Graft(IGHV7-4-1*02)+Q1E,T30I,R38K,A40R,F67A,V68T,L71A+ G53Y
		VH12	Graft(IGHV7-4-1*02)+Q1E,T30I,R38K,A40R,F67A,V68T,L71A+ S54H
		VH13	Graft(IGHV7-4-1*02)+Q1E,T30I,R38K,A40R,F67A,V68T,L71A+ S56W
		VH14	Graft(IGHV7-4-1*02)+Q1E,T30I,A40R,F67A,L71A+S56W
FR4	IGKJ2*01	FR4	IGHJ1*01

注：表中的氨基酸位置按照 kabat 编号，L27bI 表示依照 Kabat 编号系统，将 27b 位 L 突变为 I，下同。

获得的 hu10H10 人源化抗体可变区的序列如下：

hu10H10 VH1(SEQ ID NO: 84)

5 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVRQRPGQGLEWMGDIL
PGSGSTNYNENFKGRVTFTADTSTSTVYMQQLSSLRSEDTAVYYCARSGYYGNS
GFAYWGQGTTLTVSS

hu10H10 VH2(SEQ ID NO: 85)

10 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVRQRPGQGLEWMGDILP
GSGSTNYNENFKGRAVFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGNSGF
AYWGQGTTLTVSS

hu10H10 VH3(SEQ ID NO: 86)

15 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASITYTFITYWIEWVRQRPGQGLEWMGDILP
GSGSTNYNENFKGRVTFTADTSTSTVYMQQLSSLRSEDTAVYYCARSGYYGNSG
FAYWGQGTTLTVSS

hu10H10 VH4(SEQ ID NO: 87)

20 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGFTFITYWIEWVRQRPGQGLEWMGDILP
GSGSTNYNENFKGRAVFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGNSGF
AYWGQGTTLTVSS

hu10H10 VH5(SEQ ID NO: 88)

25 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVRQRPGQGLEWMGDIL
PGSGSSNYNENFKGRVTFTADTSTSTVYMQQLSSLRSEDTAVYYCARSGYYGNS
GFAYWGQGTTLTVSS

hu10H10 VH6(SEQ ID NO: 89)

25 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVRQRPGQGLEWMGDILP
GSGSTNYNENFKGRAVFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGNSGF
VYWGQGTTLTVSS

- hu10H10 VH7(SEQ ID NO: 90)
EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVKQRPGQGLEWMGDILP
GSGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGNSGF
AYWGQGTLVTVSS
- 5 hu10H10 VH8(SEQ ID NO: 91)
EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGRFTITYWIEWVRQRPGQGLEWMGDILP
GSGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGNSGF
AYWGQGTLVTVSS
- hu10H10 VH9(SEQ ID NO: 92)
10 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFRTYWIEWVKQRPGQGLEWMGDIL
PGSGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGNSG
FAYWGQGTLVTVSS
- hu10H10 VH10(SEQ ID NO: 93)
15 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFIEYWIEWVKQRPGQGLEWMGDILP
GSGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGNSGF
AYWGQGTLVTVSS
- hu10H10 VH11(SEQ ID NO: 71)
20 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVKQRPGQGLEWMGDILP
YSGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGNSGF
AYWGQGTLVTVSS
- hu10H10 VH12(SEQ ID NO: 94)
EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVKQRPGQGLEWMGDILP
GHGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGNSGF
AYWGQGTLVTVSS
- 25 hu10H10 VH13(SEQ ID NO: 95)
EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVKQRPGQGLEWMGDILP
GSGWTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGNSGF
AYWGQGTLVTVSS
- hu10H10 VH14(SEQ ID NO: 96)
30 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVRQRPGQGLEWMGDILP
GSGWTNYNENFKGRAVFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGNSG
FAYWGQGTLVTVSS
- hu10H10 VL1(SEQ ID NO: 97)
35 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLSSGNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIY
WASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQGTKL
EIK
- hu10H10 VL2(SEQ ID NO: 98)
40 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILSSGNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIY
WASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQGTKL
EIK
- hu10H10 VL3(SEQ ID NO: 99)

- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLSSGNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIY
WASTREEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQGTKL
EIK
hu10H10 VL4(SEQ ID NO: 100)
- 5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLSSGNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIY
WASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLSFQGQTKL
EIK
hu10H10 VL5(SEQ ID NO: 101)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLSDSGNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLI
10 YWASTREEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQGTK
LEIK
hu10H10 VL6(SEQ ID NO: 102)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLSSSNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIY
WASTREEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQGQTKL
15 EIK
hu10H10 VL9(SEQ ID NO: 72)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSLSSGNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLI
YWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQGTK
LEIK
20 注：单下划线部分为 CDR，单下划线并加粗为 CDR 氨基酸取代位点，双下划
线并加粗为 FR 氨基酸取代位点，其余部分为 FR 区，下同。

表 13. hu10H10 人源化抗体的 CDR

可变区	CDR	序列	SEQ ID NO
hu10H10VH5	HCDR2	DILPGSGSSNYNENFKG	142
hu10H10VH6	HCDR3	SGYYGNSGFVY	143
hu10H10VH10	HCDR1	EYWIE	144
hu10H10VH11	HCDR2	DILPYSGSTNYNENFKG	74
hu10H10VH12	HCDR2	DILPGHGSTNYNENFKG	145
hu10H10VH13/VH14	HCDR2	DILPGSGWTNYNENFKG	146
hu10H10VL2	LCDR1	RASQSILSSGNQKNYLT	147
hu10H10VL3/VL5/VL6	LCDR2	WASTREE	148
hu10H10VL4	LCDR3	QNDYTYPLS	149
hu10H10VL5	LCDR1	KSSQSLLDSGNQKNYLT	150
hu10H10VL6	LCDR1	KSSQSLLSSSNQKNYLT	151
hu10H10VL9	LCDR1	QSSQSLLSSGNQKNYLT	76

表 14. 10H10 改造的人源化抗体

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L9
H1	hu10H10-1	hu10H10-7	hu10H10-13	hu10H10-19			
H2	hu10H10-2	hu10H10-8	hu10H10-14	hu10H10-20	hu10H10-57	hu10H10-58	
H3	hu10H10-3	hu10H10-9	hu10H10-15	hu10H10-21			
H4	hu10H10-4	hu10H10-10	hu10H10-16	hu10H10-22			
H5	hu10H10-5	hu10H10-11	hu10H10-17	hu10H10-23			
H6	hu10H10-6	hu10H10-12	hu10H10-18	hu10H10-24			
H7	hu10H10-25		hu10H10-33		hu10H10-41	hu10H10-49	

H8	hu10H10-26		hu10H10-34		hu10H10-42	hu10H10-50	
H9	hu10H10-27		hu10H10-35		hu10H10-43	hu10H10-51	
H10	hu10H10-28		hu10H10-36		hu10H10-44	hu10H10-52	
H11	hu10H10-29		hu10H10-37		hu10H10-45	hu10H10-53	hu10H10-77
H12	hu10H10-30		hu10H10-38		hu10H10-46	hu10H10-54	
H13	hu10H10-31		hu10H10-39		hu10H10-47	hu10H10-55	
H14	hu10H10-32		hu10H10-40		hu10H10-48	hu10H10-56	

表 15、人源化抗体 hu10H10-77 的 CDR 序列

CDR	序列	序列号
HCDR1	TYWIE	SEQ ID NO: 73
HCDR2	DILPYSGSTNYNENFKG	SEQ ID NO: 74
HCDR3	SGYYGNSGFAY	SEQ ID NO: 75
LCDR1	QSSQSLLSSGNQKNYLT	SEQ ID NO: 76
LCDR2	WASTRES	SEQ ID NO: 77
LCDR3	QNDYTYPLT	SEQ ID NO: 78

注：CDR 按照 Kabat 编号规则确定。

- 510H10 人源化抗体的重链序列和轻链序列如下：
hu10H10-1/hu10H10-7/hu10H10-13/hu10H10-19 重链：
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVRQRPGQGLEWMG
DILPGSGSTNYNENFKGRVTFTADTSTSTVYMQLSLRSED~~T~~AVYYCARSGYYG
NSGFAYWGQGT~~L~~TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
10VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS~~D~~GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
15SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 152
hu10H10-2/hu10H10-8/hu10H10-14/hu10H10-20/hu10H10-57/hu10H10-58 重链：
EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVRQRPGQGLEWMG
DILPGSGSTNYNENFKGRAVFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYG
20NSGFAYWGQGT~~L~~TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
25FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS~~D~~GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 153
hu10H10-3/hu10H10-9/hu10H10-15/hu10H10-21 重链：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASITYFIITYWIEWVRQRPGQGLEWMG
DILPGSGSTNYNENFKGRVTETADTSTSTVYMQLSLRSED TAVYYCARSGYYG
NSGFAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
5 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO: 154

hu10H10-4/hu10H10-10/hu10H10-16/hu10H10-22 重链:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGFTFIITYWIEWVRQRPGQGLEWMG
DILPGSGSTNYNENFKGRAVFSADTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCARSGYYG
NSGFAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
15 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
20 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 155

hu10H10-5/hu10H10-11/hu10H10-17/hu10H10-23 重链:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIITYWIEWVRQRPGQGLEWMG
DILPGSGSSNYNENFKGRVTETADTSTSTVYMQLSLRSED TAVYYCARSGYYG
25 NSGFAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
30 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:156

hu10H10-6/hu10H10-12/hu10H10-18/hu10H10-24 重链:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFIITYWIEWVRQRPGQGLEWMG
35 DILPGSGSTNYNENFKGRAVFSADTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCARSGYYG
NSGFVYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
40 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK

GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:157

hu10H10-25/hu10H10-33/hu10H10-41/hu10H10-49 重链:

5 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVKQRPGQGLEWMG
DILPGSGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGGYYG
NSGFAYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
10 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 158

15 hu10H10-26/hu10H10-34/hu10H10-42/hu10H10-50 重链:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGRTFITYWIEWVRQRPGQGLEWMG
DILPGSGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGGYYG
NSGFAYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
20 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25 SEQ ID NO: 159

hu10H10-27/hu10H10-35/hu10H10-43/hu10H10-51 重链:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFRTYWIEWVKQRPGQGLEWM
GDILPGSGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGGYY
GNSGFAYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
30 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
35 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 160

hu10H10-28/hu10H10-36/hu10H10-44/hu10H10-52 重链:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFIEYWIEWVKQRPGQGLEWMG
DILPGSGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGGYYG
40 NSGFAYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT

VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
5 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 161

hu10H10-29/hu10H10-37/hu10H10-45//hu10H10-53/hu10H10-77 重链:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVKQRPGQGLEWMG
10 DILPYSGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYGN
SGFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
15 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 79

hu10H10-30/hu10H10-38/hu10H10-46/hu10H10-54 重链:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVKQRPGQGLEWMG
20 DILPGHGSTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYG
NSGFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
25 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:162

30 hu10H10-31/hu10H10-39/hu10H10-47/hu10H10-55 重链:

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVKQRPGQGLEWMG
DILPGSGWTNYNENFKGRATFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGYYG
NSGFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
35 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

SEQ ID NO:163

hu10H10-32/hu10H10-40/hu10H10-48/hu10H10-56 重链:

5 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFITYWIEWVRQRPGQGLEWMG
DILPGSGWTNYNENFKGRAVFSADTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARS SGYYG
NSGFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
10 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:164

hu10H10-1/hu10H10-2/hu10H10-3/hu10H10-4/hu10H10-5/hu10H10-6/hu10H10-
25/hu10H10-26/hu10H10-27/hu10H10-28/hu10H10-29/hu10H10-30/hu10H10-31/hu10
H10-32 轻链:

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLSSGNQKNYLTWYQQKPGKAPK
LLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

SEQ ID NO:165

hu10H10-7/hu10H10-8/hu10H10-9/hu10H10-10/hu10H10-11/hu10H10-12 轻链:

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSLSSGNQKNYLTWYQQKPGKAPK
LLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
25 SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

SEQ ID NO:166

30 hu10H10-13/hu10H10-14/hu10H10-15/hu10H10-16/hu10H10-17/hu10H10-18/hu
10H10-33/hu10H10-34/hu10H10-35/hu10H10-36/hu10H10-37/hu10H10-38/hu10H10-
39/hu10H10-40 轻链:

35 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLSSGNQKNYLTWYQQKPGKAPK
LLIYWASTREEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

SEQ ID NO:167

hu10H10-19/hu10H10-20/hu10H10-21/hu10H10-22/hu10H10-23/hu10H10-24 轻
链:

40 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLSSGNQKNYLTWYQQKPGKAPK
LLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLSFGQG

TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

SEQ ID NO:168

5 hu10H10-41/hu10H10-42/hu10H10-43/hu10H10-44/hu10H10-45/hu10H10-46/hu
10H10-47/hu10H10-48/hu10H10-57 轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLDSGNQKNYLTWYQQKPGKAPK
LLIYWASTREEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
10 SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

SEQ ID NO:169

hu10H10-49/hu10H10-50/hu10H10-51/hu10H10-52/hu10H10-53/hu10H10-54/hu
10H10-55/hu10H10-56/hu10H10-58 轻链:

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLSSNQNKNYLTWYQQKPGKAPK
LLIYWASTREEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

SEQ ID NO:170

20 hu10H10-77 轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSLLSSGNQKNYLTWYQQKPGKAPK
LLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYTYPLTFGQG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
25 SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

SEQ ID NO: 80

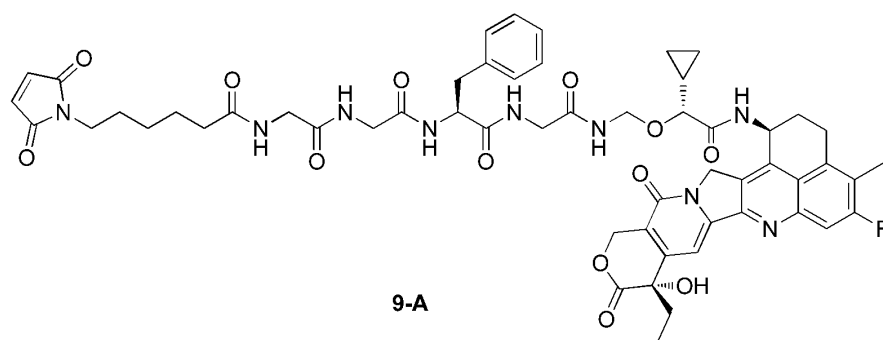
实施例 10: ADC 的制备

30

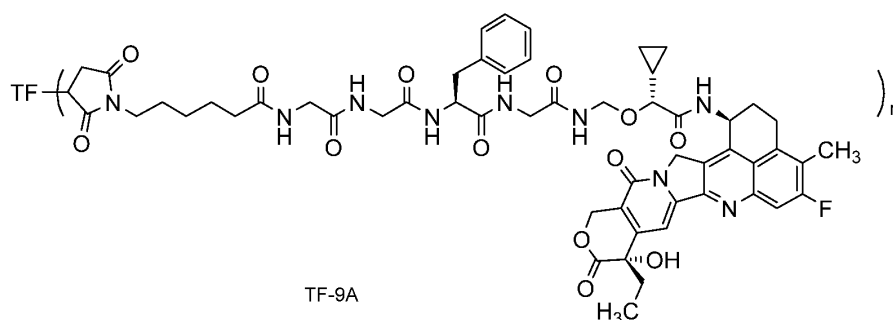
ADC 的 DAR 值测定

本披露的 ADC 的 DAR 值计算方法采用了 RP-HPLC (反相高效液相色谱)。

本披露偶联物的药物部分可以是任意适宜的药物。特别适宜的药物描述于例
如 WO2020063676A1 (通过援引完整收入本文)。本披露的化合物 9A (即
WO2020063676A1 实施例 9 的化合物 9-A), 其具有如下结构:



本披露用以下方法，通过调节反应参数，制备如 ADC 通式 (TF-9A) 所示的抗体-药物偶联物。



5

实施例 10-1 ADC-1

在 37 °C 条件下，向抗体 hu67Y116 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5, 0.05 M) (10.0 mg/mL, 7.4 mL, 511 nmol) 加入配置好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP.HCl)的水溶液 (10 mM, 131.8 μ L, 1.318 μ mol)，置于恒温振荡器，于 37 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 **9A** (5.49mg, 5.11 μ mol) 溶解于 370 mL DMSO 中，逐滴加入到上述反应液中，置于恒温振荡器，于 25 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化 (洗脱相: pH 为 5.0 的 His 缓冲水溶液)，得到偶联物 TF-9A 的示例性产物 **ADC-1**(hu67Y116-9A) 的 His 缓冲液 (3.8 mg/mL, 17.6 mL)，于 4 °C 储存。RP-HPLC 计算平均值: DAR=4.14。

15

实施例 10-2 ADC-2

在 37 °C 条件下，向抗体 hu67Y116 的 PBS 缓冲水溶液 (pH=6.5, 0.05 M) (10.0 mg/mL, 7.4 mL, 511 nmol) 加入配置好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP.HCl)的水溶液 (10 mM, 178.9 μ L, 1.789 μ mol)，置于水浴振荡器，于 37 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

20

将化合物 **9A** (6.586mg, 6.132 μ mol) 溶解于 370 μ L DMSO 中，加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用

Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化（洗脱相：pH 为 5.0 的 His 缓冲水溶液），得到偶联物 TF-9A 的示例性产物 ADC-2(hu67Y116-9A)的 PBS 缓冲液（3.52 mg/mL，17.9 mL），于 4 °C 储存。RP-HPLC 计算平均值：DAR=5.91。

5

实施例 10-3 ADC-3

在 37 °C 条件下，向抗体 hu67Y116 的 PBS 缓冲水溶液（pH=6.5, 0.05 M）（10.0 mg/mL，1 mL，69 nmol）加入配置好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP.HCl)的水溶液（10 mM，48.3 μL，483 nmol），置于水浴振荡器，于 37 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

10

将化合物 9A（1.1mg，1.035 μmol）溶解于 50 μL DMSO 中，加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化（洗脱相：pH 为 5.0 的 His 缓冲水溶液），得到偶联物 TF-9A 的示例性产物 ADC-3(hu67Y116-9A)的 PBS 缓冲液（0.8 mg/mL，11.5 mL），于 4 °C 储存。RP-HPLC 计算平均值：DAR=7.23。

15

实施例 10-4 ADC-4

在 37 °C 条件下，向抗体 hu10H10-77 的 PBS 缓冲水溶液（pH=6.5，0.05 M）（10.0 mg/mL，8 mL，549 nmol）加入配置好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP.HCl)的水溶液（10 mM，145.5 μL，1.455 μmol），置于水浴振荡器，于 37 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

20

将化合物 9A（5.9mg，5.49 μmol）溶解于 400 μL DMSO 中，加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化（洗脱相：pH 为 5.0 的 His 缓冲水溶液），得到偶联物 TF-9A 的示例性产物 ADC-4(hu10H10-77-9A)的 PBS 缓冲液（3.85 mg/mL，19 mL），于 4 °C 储存。RP-HPLC 计算平均值：DAR=4.2。

25

实施例 10-5 ADC-5

在 37 °C 条件下，向抗体 hu10H10-77 的 PBS 缓冲水溶液（pH=6.5，0.05 M）（10.0 mg/mL，8 mL，549 nmol）加入配置好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP.HCl)的水溶液（10 mM，175.7 μL，1.757 μmol），置于水浴振荡器，于 37 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

30

将化合物 9A（7.08mg，6.59 μmol）溶解于 400 μL DMSO 中，加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化（洗脱相：pH 为 5.0 的 His 缓冲水溶液），得到偶联物 TF-9A 的示例性产物 ADC-5(hu10H10-77-9A)的 PBS 缓冲液（3.57 mg/mL，19.5 mL），于 4 °C 储存。RP-HPLC 计算平均值：DAR=5.87。

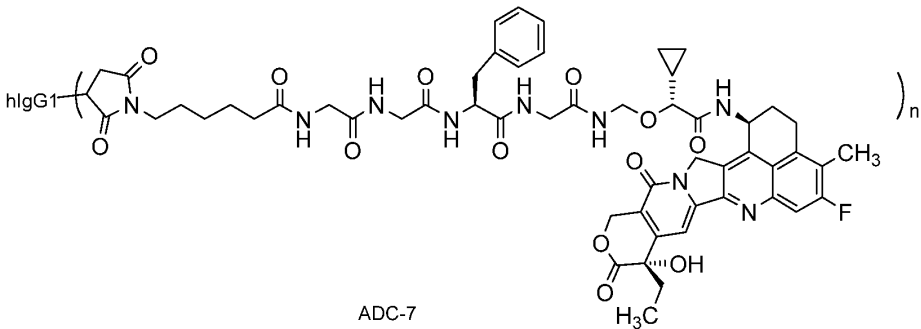
35

实施例 10-6 ADC-6

在 37 °C 条件下，向抗体 hu310-2 的 PBS 缓冲水溶液（pH=6.5，0.05 M）（10.0 mg/mL，8 mL，553 nmol）加入配置好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP.HCl)的水溶液（10 mM，124.4 μL，1.244 μmol），置于水浴振荡器，于 37 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 9A（5.94mg，5.53 μmol）溶解于 400 μL DMSO 中，加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化（洗脱相：pH 为 5.0 的 His 缓冲水溶液），得到偶联物 TF-9A 的示例性产物 ADC-6(hu310-2-9A)的 PBS 缓冲液(3.77 mg/mL，19.2 mL)，于 4 °C 储存。RP-HPLC 计算平均值：DAR=4.05。

实施例 10-7 ADC-7



在 37 °C 条件下，向抗体 hlgG1 的 PBS 缓冲水溶液（pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 缓冲水溶液：10.0 mg/mL，1 mL，67.6 nmol）加入配制好的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP.HCl)的水溶液(10 mM，16.6 uL，166 nmol)，置于水浴振荡器，于 37 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用水浴降温至 25 °C。

将化合物 9A (0.73mg，676 nmol)溶解于 60 μL 二甲亚砜中，逐滴加入到上述反应液中，置于水浴振荡器，于 25 °C 下振荡反应 3 小时，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到标题产物 ADC-7 的 PBS 缓冲液(0.91 mg/mL，9.8 mL)，于 4 °C 储存。

RP-HPLC 计算平均值：n=4.73。

测试例：

测试例 1、抗体与游离人和猴 TF 蛋白的结合实验

用 pH 7.4 的 PBS（上海源培生物科技股份有限公司，B320KJ）缓冲液将 AffiniPure Goat Anti-Human IgG (Jackson, 109-005-008)蛋白稀释至 2 μg/mL，以 100 μL/孔的体积加入 96 孔酶标板中，4°C 孵育过夜。弃去液体后，每孔加入 300 μL 用 PBS 稀释的 5%脱脂牛奶（BD，232100）进行封闭，37°C 孵育 2 小时。封闭结束

后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液（pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20）洗板 3 次后，每孔加入 50 μ L 2 μ g/mL 稀释的待测抗体溶液，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 50 μ L 梯度稀释（10 μ g/mL，5 倍梯度稀释）的生物素化的人或猴 TF-his 蛋白（SEQ ID No.5/8）（生物素标记试剂盒：DO JINDO, LK03-10），

5 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，加入 Streptavidin–Peroxidase Polymer（sigma，S2438-250UG）1:8000 稀释，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后，每孔加入 50 μ L TMB 显色底物（KPL，5120-0077），室温孵育 5 分钟，每孔加入 50 μ L 的 1 M H₂SO₄ 终止反应，用酶标仪读取在 450 nm 处的吸收值，通过 GraphPad Prism 拟合出抗体与抗原的结合曲线，计算出 EC₅₀ 值。

10 表 16：抗体与游离 TF 的结合

抗体	bio-hTF-his		bio-cTF-his	
	E _{max}	EC ₅₀ (μ g/mL)	E _{max}	EC ₅₀ (μ g/mL)
hu10H10-77	1.00	0.0035	1.13	0.0027
hu310-2	0.92	0.0529	0.92	0.0410
hu67Y116	0.89	0.1035	1.17	0.0691
hIgG1	0.10	无结合	0.05	无结合

本披露的抗体与 TF 抗原有较好的结合活性。

测试例 2、抗体与细胞的结合实验

将 MDA-MB-231 细胞，NCI-H358（简称 H358 细胞），HCT116 细胞，用 FACS 缓冲液（1%BSA，pH7.4 PBS）制备成 1 $\times$ 10⁶ 个细胞/mL 的细胞悬液，100 μ L/孔加入 96 孔圆底板。离心去除上清后加入 100 μ L/孔用 FACS 缓冲液稀释的不同浓度（60 μ g/mL，3 倍梯度稀释）待测抗体， 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 小时。以 FACS 缓冲液 300g 离心洗涤 3 次后，加入工作浓度的 APC Rat Anti-human IgG Fc（BioLegend，410712）， 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 40 分钟。以 FACS 缓冲液 300g 离心洗涤 3 次后，用 Thermo

15

20 Attune Nxt 流式细胞仪检测几何平均数荧光强度计算 EC₅₀ 值。

表 17. 抗体与细胞的结合

抗体	MDA-MB-231	H358	HCT116
	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)
实验一			
hu10H10-1	2.05	未检测	未检测
实验二			
hu10H10-19	2.35	未检测	未检测
实验三			
hu10H10-33	1.09	0.96	未检测
hu10H10-34	1.12	0.99	未检测
hu10H10-35	1.09	0.79	未检测
hu10H10-36	2.14	0.96	未检测

hu10H10-37	1.07	0.35	未检测
hu10H10-38	1.14	0.81	未检测
hu10H10-39	1.10	0.42	未检测
hu10H10-40	1.07	0.55	未检测
hu10H10-57	1.12	1.02	未检测
hu10H10-58	1.43	1.09	未检测
实验四			
hu10H10-29	1.09	0.45	未检测
hu10H10-53	1.09	0.41	未检测
实验五			
hu10H10-77	1.64	0.68	0.47
实验六			
hu310-2	1.32	0.67	0.34
实验七			
hu310-3	1.83	未检测	未检测
hu310-4	2.11	未检测	未检测
hu310-5	1.55	未检测	未检测
hu310-6	2.56	未检测	未检测
hu310-7	2.08	未检测	未检测
hu310-8	1.73	未检测	未检测
实验八			
hu310-9	1.97	未检测	未检测
hu310-10	1.33	未检测	未检测
hu310-11	1.76	未检测	未检测
hu310-12	1.95	未检测	未检测
hu310-13	1.39	未检测	未检测
hu310-14	1.76	未检测	未检测
hu310-15	1.98	未检测	未检测
hu310-16	2.26	未检测	未检测
CH310	1.84	未检测	未检测
实验九			
hu67Y116	4.91	5.42	1.66
hu67Y118	7.049	未检测	未检测
hu67-11	26.27	未检测	未检测
实验十			
CH67	16.48	55.88	未检测
hu67-4	18.02	90.53	未检测
hu67-14	18.89	106.7	未检测

本披露的抗体与表达 TF 抗原的细胞有较好有结合活性。

测试例 3、亲和力结合实验

抗体样品用 1×HBS-EP 缓冲溶液（PH7.4）（Cytiva，BR-1006-69）配制为 4 μg/mL 溶液，通过 Protein A 生物传感芯片(Cytiva，29127556)亲和捕获抗体，然后于芯片表面流经一定浓度的抗原分子人 TF-His 蛋白（SEQ ID NO:5）或猴 TF-His 蛋白（SEQ ID NO:8），用 Biacore T200（Cytiva）仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后，用 10 mM glycine-HCl（pH1.5）（Cytiva，BR-1003-54）将生物传感芯片洗净再生。数据拟合模型采用 1:1 结合模型。检测结果见表 18。

表 18. 抗体亲和力

抗体	人 TF			猴 TF		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
hu10H10-29	1.37E+05	7.45E-05	5.45E-10	1.53E+05	9.83E-05	6.42E-10
hu10H10-53	1.56E+05	7.34E-05	4.70E-10	1.81E+05	6.77E-05	3.75E-10
hu10H10-77	1.46E+05	1.10E-04	7.49E-10	1.69E+05	1.14E-04	6.77E-10
CH67	2.64E+04	9.69E-04	3.67E-08	2.95E+04	4.73E-04	1.60E-08
hu67-1	4.29E+04	5.85E-04	1.36E-08	2.41E+04	3.58E-04	1.48E-08
hu67-2	4.26E+04	6.73E-04	1.58E-08	3.37E+04	4.29E-04	1.27E-08
hu67-3	4.66E+04	6.63E-04	1.42E-08	3.19E+04	4.31E-04	1.35E-08
hu67-4	4.05E+04	7.66E-04	1.89E-08	3.37E+04	5.23E-04	1.55E-08
hu67-5	3.28E+04	5.82E-04	1.77E-08	2.58E+04	3.90E-04	1.51E-08
hu67-6	3.00E+04	6.52E-04	2.17E-08	2.99E+04	4.28E-04	1.43E-08
hu67-7	4.08E+04	5.84E-04	1.43E-08	3.42E+04	3.60E-04	1.05E-08
hu67-8	3.90E+04	6.68E-04	1.71E-08	3.25E+04	4.46E-04	1.37E-08
hu67-9	3.45E+04	5.64E-04	1.64E-08	3.24E+04	3.51E-04	1.08E-08
hu67-10	3.92E+04	5.94E-04	1.52E-08	4.00E+04	3.56E-04	8.90E-09
hu67-11	4.09E+04	6.75E-04	1.65E-08	2.71E+04	2.43E-04	8.95E-09
hu67-12	3.92E+04	7.31E-04	1.87E-08	3.34E+04	4.68E-04	1.40E-08
hu67-13	3.04E+04	5.77E-04	1.90E-08	3.15E+04	3.44E-04	1.09E-08
hu67-14	3.10E+04	6.24E-04	2.01E-08	3.10E+04	3.99E-04	1.29E-08
hu67-15	3.34E+04	6.38E-04	1.91E-08	3.12E+04	4.19E-04	1.34E-08
hu67-16	3.65E+04	7.02E-04	1.92E-08	3.22E+04	4.78E-04	1.48E-08
hu67Y116	6.67E+04	2.63E-03	3.94E-08	3.50E+04	9.47E-04	2.71E-08
CH310	4.09E+05	9.49E-03	2.32E-08	3.27E+05	7.67E-03	2.35E-08
hu310-2	3.78E+05	6.99E-03	1.85E-08	3.32E+05	6.37E-03	1.92E-08

本披露抗体与 TF 抗原有较高的亲和力。

测试例 4：抗体与小鼠和大鼠 TF 蛋白的结合实验

用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液将小鼠 TF-His 蛋白（SEQ ID NO:10）或大鼠 TF-His 蛋白（SEQ ID NO:9）稀释至 4μg/mL，以 100 μL/孔的体积加入 96 孔酶标板中，4℃ 孵育过夜。弃去上清后，每孔加入 300 μL 用 PBS 稀释的 5%脱脂牛奶(BD，232100)

进行封闭, 37℃孵育 2 小时。封闭结束后, 弃去封闭液, 并用 PBST 缓冲液 (pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20) 洗板 3 次后, 每孔加入 100 μL 梯度稀释的抗体溶液, 于 37℃孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100μL 1:4000 稀释的 Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L) (Jackson, 109-035-003), 37℃孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后, 每孔加入 50μL TMB 显色底物 (KPL, 5120-0077), 室温孵育 5 分钟, 每孔加入 50 μL 1 M H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪读取在 450 nm 处的吸收值, 通过 GraphPad Prism 拟合出抗体与抗原的结合曲线 (图 1, 图 2)。

结果显示 hu10H10-77, hu310-2, hu67Y116 均不与小鼠 TF-His 蛋白 (图 1) 或大鼠 TF-His 蛋白 (图 2) 结合。

10

测试例 5、Factor-VII- Human Chromogenic-Activity 凝血通路实验

在 TF-FVII-FX 通路中, TF 通过影响 FX 底物的生成, 最终影响凝血。本测试用于检测不同抗体对凝血通路的影响。

按照试剂盒 Factor-VII- Human Chromogenic-Activity kit (Abcam, ab 108830)试剂盒里面的 96 孔板室温放置 10 分钟左右, 然后加入 100μL/孔的 0.5 μg/mL FVIIa(注射用重组人凝血因子 VIIa , 即 NovoSeven, 37℃孵育 2 小时。孵育结束后用洗液 (试剂盒自带, wash buffer) 清洗 5 遍, 加入 40μL/孔稀释好的抗体, 再加入 40μL/孔的 MDA-MB-231 细胞和 FX(试剂盒自带)混合物, 37℃孵育半小时。加入 20μL/孔的底物 (试剂盒自带) 起始反应。用酶标仪间隔 3 分钟且持续 30 分钟读取 405nm 处的吸收值, 将未加抗体的孔的数值作为最大值 (MAX), 未加 FVIIa 的孔的数值作为最小值 (Min), 选取线性范围内的数据进行凝血通路影响的比值计算。凝血比值见表 19。

20

表 19.凝血实验

抗体 (20μg/mL)	抑制率(%)
TF011	92.8%
H39	65.5%
hu10H10-77	-1.8%
hu310-2	-2.8%
hu67Y116	4.0%
阴性对照 hIgG1	-5.0%
Max	0.0%
Min	100.0%

结果显示本披露 3 个抗体都不影响凝血通路, 阳性对照 TF011 和 H39 影响凝血通路。

25

测试例 6、DT3C 内吞实验

DT3C 蛋白进入细胞后，活化的白喉毒素（DT）对细胞进行杀伤，间接反映了抗体的内吞情况。根据 IC₅₀ 和 I_{max} 评价抗体的体外内吞活性。

DT3C 是重组表达的融合蛋白，由白喉毒素的 Fragment A（仅毒素部分）和 G 群链球菌的 3C 片段（IgG 结合部分）融合而成。该蛋白能够与抗体的 Fc 结构高度亲和，在抗体发生内吞时一同进入细胞。在胞内弗林蛋白酶的作用下，释放出具有毒性的 DT。DT 能够抑制 EF2-ADP 核糖基化的活性，阻断蛋白翻译过程，最终导致细胞死亡。而未进入细胞的 DT3C 则不具有杀伤细胞的活性。根据细胞杀伤情况来评价抗体的内吞活性。

用含 20% low IgG FBS(Gibco, 1921005PJ)的新鲜细胞培养基，制取 MDA-MB-231 细胞悬液，细胞密度为 4×10⁴ 个细胞/mL，以 50μL/孔加入细胞培养板中，即每孔细胞数为 2000 个，5%二氧化碳 37℃培养 16 小时。

用无血清 RPMI 1640 培养基配制成 4×浓度的 DT3C（120μg/mL），0.22μm 滤器过滤除菌。用无血清 RPMI 1640 培养基配制 4×浓度的抗体（40μg/mL），将 80μL DT3C（约 70KD）和 80μL 抗体（约 145KD）按照 1:1 的体积混匀，室温下静置孵育 30 分钟，然后取 40μL 混合液加入到 120μL 无血清 RPMI 1640 培养基中，并留细胞孔只加 160μL 无血清 RPMI 1640 培养基，抗体终浓度为 10μg/mL，只加培养基的孔作为内吞率计算的零点。取 50μL 稀释好的抗体加入 50μL 的细胞中，37℃，5%CO₂ 孵育三天。每孔加入 50μL CellTiter-Glo™（CTG）（Promega, G7573），室温下避光孵育 10 分钟，ENVISION 上读取化学发光，结果见表 20。

表 20. 抗体的内吞活性

抗体	抗体终浓度（μg/mL）	内吞率（%）
hu67Y116	10	69
hu10H10-77	10	39
hu310-2	10	70

结果显示，本披露的抗体具有内吞活性。

测试例 7、凝血酶原时间（PT）实验

通过测定加有抗 TF 抗体的人血浆 PT 值，评价抗体对人血浆的体外 PT 的影响。从志愿者上肢静脉抽取静脉血，倒入 15 ml 离心管中，管中预先加入 3.8 %柠檬酸三钠抗凝剂（国药集团化学试剂有限公司，6132-04-3）（抗凝剂：全血=1：9），室温 2500 rpm 离心 10 分钟，收集血浆。用 PBS（美仑生物，PWL050）将待测抗体配制成浓度为 16000 nM、8000 nM、4000 nM、2000 nM、1000 nM、500 nM（终浓度为 1600 nM、800 nM、400 nM、200 nM、100 nM、50 nM）的工作液。PT 试剂（上海达承医疗设备有限公司，OUHP29）加入 4mL 纯化水，37℃孵育 30 分钟。按照 CA600 凝血仪（sysmex）操作手册将人血浆、PT 试剂、待测抗体、空白对照 PBS、清洗剂 Clean I（上海达承医疗设备有限公司，GSA-500A）分别放入仪器

指定位置，启动程序，测定 PT 值。获取结果通过 GraphPad Prism 进行曲线拟合，并分析计算数值（表 21），主要根据抗体最大浓度的读值判定抗体对 PT 的影响。

表 21. PT 试验结果

抗体浓度(nM)	TF011		H39		hIgG		hu10H10-77		hu67Y116		hu310-2	
	Delta PT (s)	Emax	Delta PT (s)	Emax	Delta PT (s)	Emax	Delta PT (s)	Emax	Delta PT (s)	Emax	Delta PT (s)	Emax
1600	5.4	1.000	2.0	0.370	0.10	0.019	0.9	0.167	-0.1	-0.019	0.2	0.037
800	3.1	0.574	1.0	0.185	0.00	0.000	0.7	0.130	0.0	0.000	0.2	0.037
400	1.7	0.315	0.6	0.111	0.00	0.000	0.4	0.074	-0.1	-0.019	0.2	0.037
200	1.0	0.185	0.3	0.056	0.00	0.000	0.1	0.019	-0.1	-0.019	0.1	0.019
100	0.6	0.111	0.3	0.056	0.00	0.000	0.0	0.000	-0.1	-0.019	0.2	0.037
50	0.3	0.056	0.1	0.019	0.00	0.000	-0.1	-0.019	0.0	0.000	0.0	0.000

结果显示本披露的 3 个抗体都不影响凝血，且对于 PT 的影响小于 TF011 和 H39。TF011 在 PT 实验中，对于凝血有比较明显的抑制。

测试例 8、抗体和人大鼠杂交 TF 蛋白 HuRatTF 结合实验

为了筛选与人 TF 结合后不影响人相关凝血功能的特定表位的抗体，构建了实施例 1 中的人与大鼠杂交抗原 HuRatTF 蛋白（SEQ ID No.11），并用其进行抗体结合实验。HuRatTF 蛋白已将一些影响凝血的位点突变为丙氨酸 Ala，并含人和大鼠部分序列。

用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液将 HuRatTF 蛋白稀释至 4 μg/mL，以 100 μL/孔的体积加入 96 孔酶标板中，4℃过夜孵育。弃去上清后，每孔加入 300 μL 用 PBS 稀释的 5%脱脂牛奶（BD，232100）进行封闭，37℃孵育 2 小时。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液（pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20）洗板 3 次后，每孔加入 100 μL 梯度稀释（20μg/ml 起始，5 倍梯度稀释）的抗体溶液，于 37℃孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 μL 1:4000 稀释的 Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)（Jackson, 109-035-003），37℃孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后，每孔加入 50 μL TMB 显色底物（KPL，5120-0077），室温孵育 5 分钟，每孔加入 50 μL 1M H₂SO₄ 终止反应，用酶标仪读取在 450 nm 处的吸收值，通过 GraphPad Prism 拟合出抗体与抗原的结合曲线，数据请见表 22。

表 22. 抗体与 HuRatTF 蛋白的结合实验结果

抗体	EC ₅₀ (nM)	最大值(OD450nm)
hu310-2	2.134	0.4282
hu10H10-77	2.004	1.3875
hu67Y116	53.39	0.2916
TF011	不结合	0.0585

结果显示，对凝血功能有影响的抗体 TF011 不与 HuRatTF 蛋白结合，对凝血

功能没有影响的本披露抗体可与 HuRatTF 蛋白结合。

测试例 9、IL-8 细胞因子测试实验

将 MDA-MB-231 细胞用无血清的培养基制备成 3×10^5 个细胞/mL 的细胞悬液，
5 100 μ L/孔加入 96 孔板，37℃ 饥饿孵育 2 小时。弃掉上清，加入 100 μ L/孔用无血清培养基配制好的梯度稀释（10 μ g/mL 起始，6 倍梯度稀释）抗体，37℃ 孵育 0.5 小时。弃掉上清，加入 120 μ L/孔用无血清培养基配制好的 FVIIa（注射用重组人凝血因子 VIIa，NovoSeven），37℃ 孵育 5 小时。孵育完成后，300g 离心 5 分钟，转移 100 μ L 的上清至 IL-8 试剂盒（欣博盛生物，EHC008）中 96 孔板，根据说明书
10 进行 IL-8 测试。用酶标仪读取在 450 nm 处的吸收值，用 GraphPad Prism 拟合出抗体与抗原的结合曲线。计算出 EC₅₀ 值，结果见表 23。

表 23. IL8 实验

抗体	EC ₅₀ (nM)
hu10H10-77	0.412
hu310-2	0.407
hu67Y116	1.569
hIgG1	无结合

结果显示本披露的抗体对于 IL8 产生较强的抑制作用。

15 测试例 10、ADC 分子细胞活性实验

本实验的目的是检测 ADC 样品对细胞杀伤作用，根据 IC₅₀ 和 I_{max} 来评价 ADC 的体外活性。

HPAF II 细胞（人胰腺癌细胞），MDA-MB-231 细胞（人乳腺癌细胞），H358 细胞（人非小细胞肺癌细胞）和 CHO-K1 细胞（仓鼠卵巢细胞）用胰酶消化，新鲜培养基中和，1000rpm 离心后用培养液重悬，计数后将细胞悬液密度分别调整为：
20 HPAF II 细胞 3700 个/mL、MDA-MB-231 细胞 7400 个/mL、H358 细胞 7400 个/mL 和 CHO-K1 细胞 3700 个/mL，取 135 μ L 细胞悬液加入到 96 孔细胞培养板中，即 HPAF II 细胞每孔 500 个、MDA-MB-231 细胞每孔 1000 个、H358 细胞每孔 1000 个和 CHO-K1 细胞每孔 500 个，第 11 列不铺细胞只加入 135 μ L 的培养基，5%二氧化碳 37℃ 16 小时培养。
25

ADC 样品用 PBS 稀释成 3.333 μ M（10 $\times$ 浓度），以此为首浓度，用 PBS 进行连续五倍梯度稀释，共 9 个浓度；每孔加入 15 μ L 的 10 $\times$ 梯度稀释溶液，其中第 10 和 11 孔为培养基，每个浓度点做复孔，5%二氧化碳 37℃ 培养 6 天。

当培养完成后，每孔加入 50 μ L CTG，室温下避光孵育 10 分钟，将白色底膜
30 贴在细胞培养板底部，置于 ENVISION 上读取化学发光。体外细胞杀伤活性结果见表 24。

表 24 . ADC 的体外细胞杀伤活性

ADC	HPAF II		MDA-MB-231		H358		CHO-K1	
	IC ₅₀ (nM)	Imax(%)	IC ₅₀ (nM)	Imax(%)	IC ₅₀ (nM)	Imax(%)	IC ₅₀ (nM)	Imax(%)
ADC-1	1.06	61.78	19.31	79.43	11.07	73.32	>333	7.01
ADC-6	0.44	65.52	11.98	79.97	1.13	69.9	>333	4.37
ADC-4	0.15	65.75	3.31	79.26	0.53	73.39	>333	4.34
ADC-2	0.30	77.79	3.38	86.48	3.40	85.72	>333	1.80

结果显示上述 ADC 在细胞株 HPAFII、MDA-MB-231、H358 上有较强的杀伤效果。

测试例 11、HPAFII 的 CDX 模型体内药效实验

- 5
- 本测试例评价并比较各 ADC 药物对 NUNU 小鼠皮下移植瘤的疗效。
- 每只 NUNU 小鼠（4-6 周，♀，SPF 级，北京维通利华实验动物有限责任公司）皮下接种 4×10⁶/200 μL（含 50% matrigel）HPAF-II 细胞（人胰腺癌），待肿瘤生长至 250~300mm³左右后，根据肿瘤体积将动物分组（D0）。小鼠腹腔注射（IP）给药，每周给药一次，共给药 3 次。每周一次给药体积为 10 mL/kg；具体给药剂
- 10
- 量和给药方案见表 25。每周测 2 次肿瘤体积，称量小鼠体重，记录数据。
- 实验指标为考察药物对肿瘤生长的影响，具体指标为 T/C%或抑瘤率 TGI%。每周二次用游标卡尺测量肿瘤直径，肿瘤体积（V）计算公式为： $V=1/2\times a\times b^2$ ，其中 a、b 分别表示长、宽。 $T/C\%=(T-T_0)/(C-C_0)\times 100$ ，其中 T、C 为实验结束时的肿瘤体积；T₀、C₀ 为实验开始时的肿瘤体积。其中，T 为给药 ADC 的肿瘤
- 15
- 体积，C 为对照组的肿瘤体积。肿瘤生长抑制率%（TGI%）=100-T/C%；当肿瘤出现消退时，肿瘤生长抑制率%（TGI%）=100-(T-T₀)/T₀×100；如果肿瘤比起始体积缩小，即 T<T₀ 或 C<C₀ 时，即定义为肿瘤部分消退（PR）；如果肿瘤完全消失，即定义为肿瘤完全消退（CR）。除非特别说明，二组肿瘤体积之间采用双因素 ANOVA 检验，P<0.05 定义为有统计学显著性差异。结果请参见表 25。

20

表 25.ADC 对 HPAF- II 裸小鼠皮下移植瘤的疗效

分组	平均肿瘤体积(mm ³ ±SEM)		T/C (%) D25	抑瘤率 (%) D25	P 值 D25	部分消退
	D0	D25				
空白对照 (PBS)	278.2±16.0	2127.1±96.0	——	——	——	0/8
ADC-1 (1 mg/kg)	277.7±14.7	1869.2±244.6	86	13.93	0.343	0/8
ADC-1 (2 mg/kg)	277.5±15.5	815.2±105.6	29	70.92	<0.001	0/8
ADC-4 (1 mg/kg)	280.3±14.1	1926.5±218.2	89	10.96	0.414	0/8
ADC-4 (2 mg/kg)	279.9±12.3	690.4±112.9	22	77.79	<0.001	0/8

hIgG-9A (2 mg/kg)	277.5±13.6	2012.5±207.5	94	6.17	0.624	0/8
----------------------	------------	--------------	----	------	-------	-----

P 值指与空白对照组相比；IP：腹腔注射；部分消退：D25 肿瘤体积小于 D0。

给药三次后，ADC-4（2mg/kg）、ADC-1（2mg/kg）组抗体均对 HPAF-II 裸小鼠皮下移植瘤有明显疗效，和空白对照组相比有显著性差异；药物有明显的剂量依赖性。荷瘤小鼠对以上药物均能较好耐受。

5

测试例 12、H358 的 CDX 模型体内药效实验

本测试例评价并比较各 ADC 药物对裸小鼠皮下移植瘤的疗效。

每只裸小鼠（4-6 周，♀，SPF 级，上海斯莱克实验动物有限责任公司）皮下接种 5×10⁶/200 μL（含 50% matrigel）H358 细胞（人非小细胞肺癌），待肿瘤生长至 300mm³左右后，根据肿瘤体积将动物分组（D0）。小鼠腹腔注射（IP）给药，每周给药一次，共给药 3 次。每周一次给药体积为 10 mL/kg；具体给药剂量和给药方案见表 26。每周测 2 次肿瘤体积，称量小鼠体重，记录数据。

实验指标为考察药物对肿瘤生长的影响，具体指标为 T/C%或抑瘤率 TGI%。每周二次用游标卡尺测量肿瘤直径，肿瘤体积（V）计算公式为：V=1/2×a×b²，其中 a、b 分别表示长、宽。T/C%=(T-T0)/(C-C0) ×100，其中 T、C 为实验结束时的肿瘤体积；T0、C0 为实验开始时的肿瘤体积。其中，T 为给药 ADC 的肿瘤体积，C 为对照组的肿瘤体积。肿瘤生长抑制率%（TGI%）=100-T/C%；当肿瘤出现消退时，肿瘤生长抑制率%（TGI%）=100-(T-T0)/T0×100；如果肿瘤比起始体积缩小，即 T<T0 或 C<C0 时，即定义为肿瘤部分消退（PR）；如果肿瘤完全消失，即定义为肿瘤完全消退（CR）。除非特别说明，二组肿瘤体积之间采用双因素 ANOVA 检验，P<0.05 定义为有统计学显著性差异。结果请参见表 26。

表 26.ADC 对 H358 裸小鼠皮下移植瘤的疗效

分组	平均肿瘤体积 (mm ³ ±SEM)		T/C (%) D32	抑瘤率 (%) D32	P 值 D32	部分 消退	实验开始/ 结束动物 数
	D0	D32					
hIgG-9A (3mg/kg)	310.4±17.6	813.9±61.8	——	——	——	——	8/7
ADC-1 (3 mg/kg)	309.7±20.3	182.2±24.5	-25	141.2	<0.001	8/8	8/8
ADC-1 (1 mg/kg)	308.5±18.4	323.8±43.0	3	96.97	<0.001	3/8	8/8
ADC-4 (3 mg/kg)	307.8±18.0	201.8±15.7	-21	134.4	<0.001	7/8	8/8
ADC-4 (1 mg/kg)	309.6±19.5	252.2±21.5	-11	118.5	<0.001	8/8	8/7
ADC-6	310.6±19.1	178.9±11.6	-26	142.4	<0.001	8/8	8/6

(3 mg/kg)							
ADC-6 (1 mg/kg)	309.9±19.8	179.8±24.7	-26	142.0	<0.001	8/8	8/8

P 值指与阴性抗体组相比；IP：腹腔注射；部分消退：D32 肿瘤体积小于 D0。

ADC-1（3mg/kg、1mg/kg）、ADC-4（3mg/kg、1mg/kg）、ADC-6（3mg/kg、1mg/kg）给药三次后，均有很好的抑瘤效果，引起肿瘤部分消退；药物有一定的剂量依赖性。荷瘤小鼠对以上药物均能较好耐受。

5

测试例 13、MDA-MB-231 的 CDX 模型体内药效实验

本测试例评价并比较各 ADC 药物对 NOD scid 小鼠皮下移植瘤的疗效。

每只 NOD scid 小鼠（4-6 周，♀，SPF 级，上海斯莱克实验动物有限责任公司）皮下接种 3×10⁶/100 μL（含 50% 基质胶）MDA-MB-231 细胞（人乳腺癌），待肿瘤生长至 250~300mm³ 左右后，根据肿瘤体积将动物分组（D0）。小鼠腹腔注射（IP）给药，每周给药一次，共给药 3 次。每周一次给药体积为 10 mL/kg。每周测 2 次肿瘤体积，称量小鼠体重，记录数据。

实验指标为考察药物对肿瘤生长的影响，具体指标为 T/C%或抑瘤率 TGI%。每周二次用游标卡尺测量肿瘤直径，肿瘤体积（V）计算公式为：V=1/2×a×b²，其中 a、b 分别表示长、宽。T/C%=(T-T0)/(C-C0)×100，其中 T、C 为实验结束时的肿瘤体积；T0、C0 为实验开始时的肿瘤体积。其中，T 为给药 ADC 的肿瘤体积，C 为对照组的肿瘤体积。肿瘤生长抑制率%（TGI%）=100-T/C%；当肿瘤出现消退时，肿瘤生长抑制率%（TGI%）=100-(T-T0)/T0×100；如果肿瘤比起始体积缩小，即 T<T0 或 C<C0 时，即定义为肿瘤部分消退（PR）；如果肿瘤完全消失，即定义为肿瘤完全消退（CR）。除非特别说明，二组肿瘤体积之间采用双因素 ANOVA 检验，P<0.05 定义为有统计学显著性差异。荷瘤小鼠对以上药物均能较好耐受，没有明显体重减轻等症状发生。使用 PBS 作为空白对照。结果请参见表 27。

表 27. ADC 对 MDA-MB-231 小鼠皮下移植瘤的疗效

分组	平均肿瘤体积 (mm ³ ±SEM)		T/C (%) D21	%抑瘤 率 D21	P 值 D21	部分消 退
	D0	D21				
空白对照 (PBS)	273.4±15.5	1168.1±66.0	——	——	——	0/8
hIgG-9A (3mg/kg)	270.2±17.2	586.5±96.5	35	64.64	<0.001	1/8
ADC-1 (1mg/kg)	271.8±15.9	975.0±88.5	79	21.40	0.102	0/8
ADC-1 (3 mg/kg)	271.3±16.6	235.0±57.4	-4	113.39	<0.001	6/8
ADC-2	274.2±17.3	747.8±67.2	53	47.07	<0.001	0/8

(1 mg/kg)						
ADC-3 (1 mg/kg)	271.1±19.5	730.7±78.5	51	48.62	<0.001	0/8
ADC-6 (1 mg/kg)	272.6±19.7	860.4±76.7	66	34.30	0.009	0/8
ADC-6 (3 mg/kg)	271.9±17.1	244.1±47.6	-3	110.23	<0.001	7/8

P 值指与空白对照组相比；IP：腹腔注射；部分消退：D21 肿瘤体积小于 D0。

给药三次后，ADC-1(3mg/kg、1mg/kg)、ADC-2（1mg/kg）、ADC-3（1mg/kg）、ADC-6(3mg/kg、1mg/kg)、hIgG-9A (3mg/kg)组抗体均对 MDA-MB-231 小鼠皮下移植瘤有明显疗效，和空白对照组相比有显著性差异；药物有明显的剂量依赖性。

5 荷瘤小鼠对以上药物均能较好耐受。

测试例 14、食蟹猴体内 PK 与毒性观察实验

本测试例评价 ADC-1 与 ADC-2 在食蟹猴体内的 PK 并同时进行毒性观察。

每只食蟹猴（苏州西山中科实验动物有限公司；SCXK（苏）2018-0001）通过静脉输注方式给药，给药剂量均为 12 mg/kg。于给药后 0.083 h（5 min±1 min）、1 h（±5 min）、6 h（±15 min）、12 h（±15 min）、24 h（±30 min）、48 h（±30 min）、96 h（±30 min）、168 h（±30 min）、240 h（±60 min）、336 h（±60 min）、504 h（±60 min）采血进行血药浓度检测与其他毒理观察。

10

PK 检测采用 LBA 方法(Delfia)定量检测 ADC-1 在食蟹猴血清中的总抗体和完整 ADC 的浓度。

15

表 28. ADC-1 食蟹猴药代总抗体和完整 ADC 血药浓度

12mpk	代谢数据
总抗体半衰期 (天)	4.0 ± 0.2
完整 ADC 半衰期 (天)	3.7 ± 0.1
AUC 0-t -总抗体 (µg/mL*h)	22609
AUC 0-t-完整 ADC (µg/mL*h)	18923
AUC 0-t-游离毒素(ng/mL*h)	18.4
AUC 比值（完整 ADC/总抗体）	84%
CL-总抗体 (mL/天/kg)	12.4
CL-完整 ADC (mL/天/kg)	15.0

表 29. ADC-2 食蟹猴药代总抗体和完整 ADC 血药浓度

12mpk	代谢数据
总抗体半衰期 (天)	2.8 ± 0.2

完整 ADC 半衰期 (天)	2.6 ± 0.1
AUC 0-t -总抗体 (µg/mL*h)	17693
AUC 0-t-完整 ADC (µg/mL*h)	15786
AUC 比值 (完整 ADC/总抗体)	89%
CL-总抗体 (mL/天/kg)	16.1
CL-完整 ADC (mL/天/kg)	18.2

5 ADC-1 与 ADC-2 分子的总抗体和完整 ADC 在食蟹猴体内的半衰期和 AUC 基本一致， ADC-1 与 ADC-2 分子在食蟹猴体内稳定性较好；二次给药由于免疫原性的存在其半衰期和 AUC 均低于第一次给药。

 ADC-1 药代检测时所有动物于首次给药前，第二天，第八天采血进行凝血功能检测。取血前需进食过夜，收集血样，试用 Sysmex CS-2000i 全自动凝血分析仪
10 或 Sysmex CA-1500 自动凝血分析仪进行 PT 与 APTT 检测。PT 与 APTT 检测结果如图 3、4。结果显示相比给药前，无明显凝血时间延长与出血风险增加。

测试例 15、TGA 实验

 本测试例测试抗体 hu67Y116 是否影响 TF 凝血活性。

15 人血浆中含外源性凝血途径除 TF 以外的凝血因子，如 FVII、FX、FV、FII、FI 等，如果抗体不影响 TF 的凝血活性，则不会影响人血浆的凝血时间和峰值。根据试剂盒 Technothrombin TGA Kit 说明书，制备人血浆。然后准备 20X 的抗体，按照比例 1：19 混合抗体和血浆，加入 40µL/孔至黑色 96 孔板中，然后加入 10µL/孔的 RCH（TGA reagent C high，Kit 自带），最后加入 50µL/孔的底物起始反应。
20 用酶标仪读取荧光（~360nm/~460nm,激发/发射）。结果如表 30 所示，TF011 相比阴性对照抗体，有显著凝血抑制，而 hu67Y116 则对凝血基本没有影响。

表 30. TGA 实验结果

抗体	调整期	峰值	
	时间 [min]	凝血酶 [nM]	时间 [min]
TF011	37	93.9	82
hu67Y116	27	111.9	47
hIgG1	24	128.6	47

权利要求书:

1. 一种抗 TF 抗体, 其中所述抗 TF 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:
 - a. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列, HCDR2
5 包含 SEQ ID NO: 64 或 41 的氨基酸序列, 和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 65 或 42 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 66 或 43 的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO: 67 或 44 的氨基酸序列, 和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 68、83 或 45 的氨基酸序列;
 - b. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 46 的氨基酸序列, HCDR2
10 包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列, 和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 49、111、112 或 113 的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO: 50 的氨基酸序列, 和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 51 的氨基酸序列;
 - c. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 73 或 144 的氨基酸序列,
15 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 74、142、145 或 146 的氨基酸序列, 和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 75 或 143 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 76、151、147 或 150 的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO: 77 或 148 的氨基酸序列, 和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 78 或 149 的氨基酸序列;
- 优选地,
 - 20 a. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO: 64 的氨基酸序列, 和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 65 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO: 67 的氨基酸序列, 和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 68 或 83 的氨基酸序列; 或
 - 25 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO: 41 的氨基酸序列, 和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 42 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 43 的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO: 44 的氨基酸序列, 和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 45 的氨基酸序列;
 - b. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 46 的氨基酸序列, HCDR2
30 包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列, 和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 49 的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO: 50 的氨基酸序列, 和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 51 的氨基酸序列;
 - c. 所述重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 73 的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO: 74 的氨基酸序列, 和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 75 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 76 或 151 的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO: 77 或 148 的氨基酸序列, 和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 78 的氨
35

基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗TF抗体,其为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体;优选地,其为嵌合抗体或人源化抗体;更优选地,其为人源化抗体。

5

3. 根据权利要求1或2所述的抗TF抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

a. 所述重链可变区包含与SEQ ID NO: 62、58、130、131或132具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO: 63、81、59、
10 133、134或135具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;或所述重链可变区包含与SEQ ID NO: 36具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO: 37具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

b. 所述重链可变区包含与SEQ ID NO: 52或114具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO: 53、115、116、117、118、
15 119、120或121具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;或所述重链可变区包含与SEQ ID NO: 38具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO: 39具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

c. 所述重链可变区包含与SEQ ID NO: 71、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO: 72、97、102、98、99、100或101具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

优选地,

a. 所述重链可变区包含SEQ ID NO: 62、58、130、131或132的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 63、81、59、133、134或135的氨基酸序列;
25 或所述重链可变区包含SEQ ID NO: 36的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 37的氨基酸序列;

b. 所述重链可变区包含SEQ ID NO: 52或114的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 53、115、116、117、118、119、120或121的氨基酸序列;或所述重链可变区包含SEQ ID NO: 38的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ
30 ID NO: 39的氨基酸序列;

c. 所述重链可变区包含SEQ ID NO: 71、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 72、97、102、98、99、100或101的氨基酸序列;

更优选地,

a. 所述重链可变区包含SEQ ID NO: 62的氨基酸序列,和所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 63或81的氨基酸序列;或

- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列; 或
- 5 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 130 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 133 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 131 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 133 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含
- 10 SEQ ID NO: 133 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 132 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 133 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 130 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 134 的氨基酸序列; 或
- 15 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 131 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 134 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 134 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 132 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含
- 20 SEQ ID NO: 134 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 130 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 131 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列; 或
- 25 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 132 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 130 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 135 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 131 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含
- 30 SEQ ID NO: 135 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 135 的氨基酸序列; 或
- 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 132 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 135 的氨基酸序列;
- 35 b. 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 52 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 53 的氨基酸序列; 或

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 39 的氨基酸序列;

c. 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 71 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 72、97 或 102 的氨基酸序列。

5

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗 TF 抗体, 其为抗体片段; 优选地, 其选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、dsFv 和 dAb。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 TF 抗体, 其包含重链恒定区和轻链恒定区; 优选地, 所述重链恒定区为人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 重链恒定区, 和所述轻链恒定区为人 κ 或 λ 链恒定区; 更优选的, 所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列, 和所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 55 的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗 TF 抗体, 其选自以下任一项所述的包含重链和轻链的抗体:

a. 与 SEQ ID NO: 69、60、136、137 或 138 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 70、82、61、139、140 或 141 具有至少 80% 序列同一性的轻链; 或

与 SEQ ID NO: 107 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 108 具有至少 80% 序列同一性的轻链;

b. 与 SEQ ID NO: 56 或 122 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 57、123、124、125、126、127、128 或 129 具有至少 80% 序列同一性的轻链; 或

与 SEQ ID NO: 109 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 110 具有至少 80% 序列同一性的轻链;

c. 与 SEQ ID NO: 79、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163 或 164 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 80、165、170、166、167、168 或 169 具有至少 80% 序列同一性的轻链;

优选地,

a. 与 SEQ ID NO: 69 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 70 或 82 具有至少 80% 序列同一性的轻链; 或

与 SEQ ID NO: 60 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 61 具有至少 80% 序列同一性的轻链; 或

与 SEQ ID NO: 107 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 108 具有至少 80% 序列同一性的轻链; 或

与 SEQ ID NO: 136 具有至少 80% 序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 139

- 具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 137 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 139
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 60 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 139
- 5 具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 138 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 139
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 136 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
- 10 与 SEQ ID NO: 137 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 60 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 138 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 140
- 15 具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 136 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 61
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 137 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 61
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
- 20 与 SEQ ID NO: 138 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 61
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 136 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 141
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 137 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 141
- 25 具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 60 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 141
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 138 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 141
具有至少 80%序列同一性的轻链；
- 30 b. 与 SEQ ID NO: 56 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 57
具有至少 80%序列同一性的轻链；或
与 SEQ ID NO: 109 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 110
具有至少 80%序列同一性的轻链；
- c. 与 SEQ ID NO: 79 具有至少 80%序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO:
- 35 80、165 或 170 具有至少 80%序列同一性的轻链；
更优选地，

- a. 所述重链包含 SEQ ID NO: 69 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 70 的氨基酸序列; 或
- 所述重链包含 SEQ ID NO: 69 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 82 的氨基酸序列; 或
- 5 所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列; 或
- 所述重链包含 SEQ ID NO: 107 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 108 的氨基酸序列; 或
- 10 所述重链包含 SEQ ID NO: 136 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 139 的氨基酸序列; 或
- 所述重链包含 SEQ ID NO: 137 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 139 的氨基酸序列; 或
- 所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 139 的氨基酸序列; 或
- 15 所述重链包含 SEQ ID NO: 138 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 139 的氨基酸序列; 或
- 所述重链包含 SEQ ID NO: 136 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 140 的氨基酸序列; 或
- 所述重链包含 SEQ ID NO: 137 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 140 的氨基酸序列; 或
- 20 所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 140 的氨基酸序列; 或
- 所述重链包含 SEQ ID NO: 138 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 140 的氨基酸序列; 或
- 25 所述重链包含 SEQ ID NO: 136 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列; 或
- 所述重链包含 SEQ ID NO: 137 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列; 或
- 所述重链包含 SEQ ID NO: 138 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列; 或
- 30 所述重链包含 SEQ ID NO: 136 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 141 的氨基酸序列; 或
- 所述重链包含 SEQ ID NO: 137 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 141 的氨基酸序列; 或
- 35 所述重链包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 141 的氨基酸序列; 或

所述重链包含 SEQ ID NO: 138 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 141 的氨基酸序列;

b. 所述重链包含 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 57 的氨基酸序列; 或

5 所述重链包含 SEQ ID NO: 109 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 110 的氨基酸序列;

c. 所述重链包含 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 80 的氨基酸序列或

10 所述重链包含 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 165 的氨基酸序列; 或

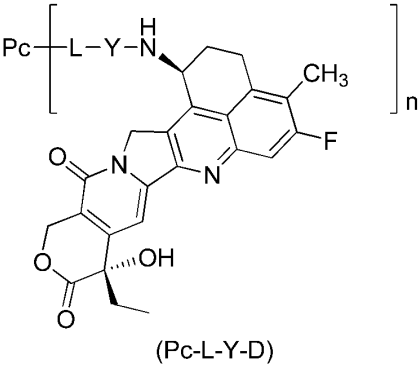
所述重链包含 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列, 和所述轻链包含 SEQ ID NO: 170 的氨基酸序列。

15 7. 核酸分子, 其编码权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗 TF 抗体。

8. 一种宿主细胞, 其包含如权利要求 7 所述的核酸分子。

9. 一种免疫偶联物, 其包含: 权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗 TF 抗体和效应分子, 其中, 所述效应分子偶联至所述抗 TF 抗体; 优选地, 所述效应分子选自
20 抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子, 以及其任何组合。

10. 一种通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:



25 其中:

Y 为 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$;

其中, R^a 和 R^b 相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、氘原子、卤素和 C_{1-6} 烷基;

R^1 为 C_{3-6} 环烷基- C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基;

R^2 选自氢原子、卤代 C_{1-6} 烷基和 C_{3-6} 环烷基；
或者， R^1 和 R^2 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基；
 m 为 0 至 4 的整数；
 L 为接头单元；

- 5 n 为 1 至 10；优选地， n 为 1 至 8；更优选地， n 为 2 至 8；
 Pc 为如权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗 TF 抗体。

11. 根据权利要求 10 所述的通式 ($Pc-L-Y-D$) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中接头单元- L -为 $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ ，

- 10 其中， L^1 选自 $-(琥珀酰亚胺-3-基-M)-W-C(O)-$ 、 $-CH_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-$ 和 $-C(O)-W-C(O)-$ ，其中 W 选自 C_{1-6} 亚烷基和 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-6} 环烷基，其中所述的 C_{1-6} 亚烷基或 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-6} 环烷基各自独立地任选被选自卤素、羟基、氰基、氨基、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{3-6} 环烷基中的一个或多个取代基所取代；

- 15 L^2 选自 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)p^1C(O)-$ 和化学键，其中 p^1 为 1 至 20 的整数；

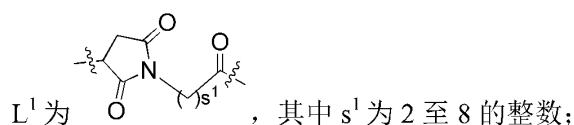
- L^3 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基，其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基，并任选被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、
20 氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代；

L^4 选自 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ 、 $-C(O)NR^5-$ 、 $-C(O)NR^5(CH_2)_t-$ 和化学键，其中 t 为 1 至 6 的整数；

R^3 、 R^4 和 R^5 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 羟烷基；

- 25 R^6 和 R^7 相同或不同，且各自独立地选自氢原子、卤素、 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷基、氘代 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 羟烷基；

优选地，其中所述接头单元- $L^1-L^2-L^3-L^4$ -如下：



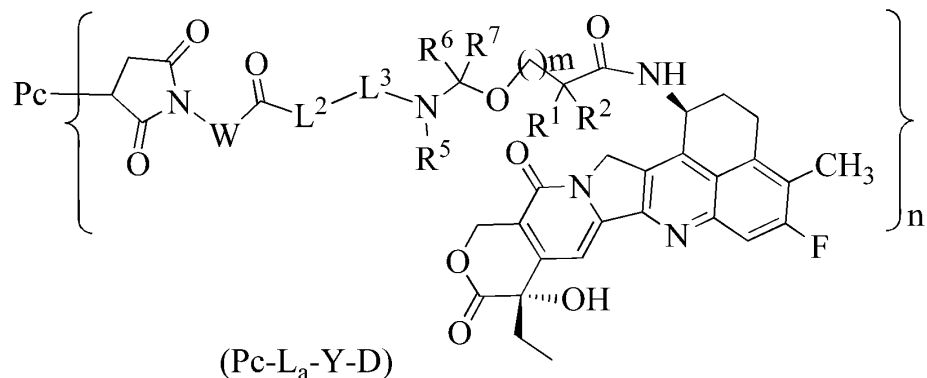
L^2 为化学键；

- 30 L^3 为四肽残基；优选地， L^3 为如 GGFG (SEQ ID NO: 105) 所示的四肽残基；

L^4 为 $-NR^5(CR^6R^7)_t-$ ，其中 R^5 、 R^6 或 R^7 相同或不同，且各自独立地为氢原子或 C_{1-6} 烷基， t 为 1 或 2；

其中所述- L -的 L^1 端与 Pc 相连， L^4 端与 Y 相连。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其为通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:



5 其中,

Pc 为如权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗 TF 抗体;

m 为 0 至 4 的整数;

n 为 1 至 10;

R¹ 为 C₃₋₆ 环烷基-C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基;

10 R² 选自氢原子、卤代 C₁₋₆ 烷基和 C₃₋₆ 环烷基;

或者, R¹ 和 R² 与其相连接的碳原子一起形成 C₃₋₆ 环烷基;

W 选自 C₁₋₆ 亚烷基和 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基, 其中所述的 C₁₋₆ 亚烷基和 C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基各自独立地任选被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代;

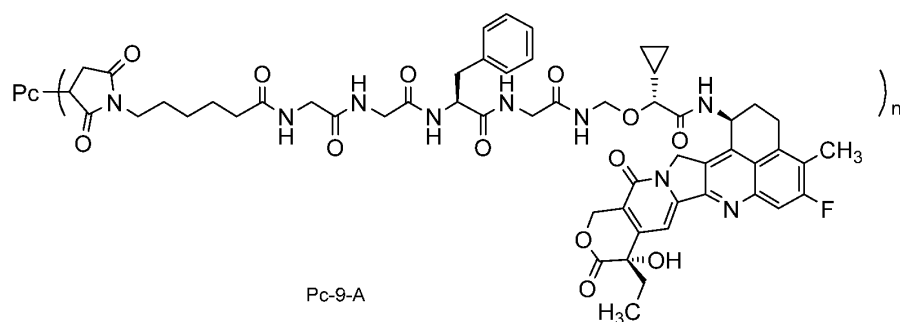
15 L² 选自 -NR⁴(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂CH₂C(O)-、-NR⁴(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂C(O)-、-S(CH₂)^{p¹}C(O)- 和化学键, 其中 p¹ 为 1 至 20 的整数;

L³ 为由 2 至 7 个氨基酸残基构成的肽残基, 其中所述的氨基酸残基选自苯丙氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸和天冬氨酸中的氨基酸形成的氨基酸残基, 并任选被选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基中的一个或多个取代基所取代;

R⁴ 和 R⁵ 选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

20 R⁶ 和 R⁷ 相同或不同, 且各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基。

25 13. 根据权利要求 10 至 12 中任一项所述的通式 (Pc-L-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐, 其为通式 (Pc-9-A) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐:



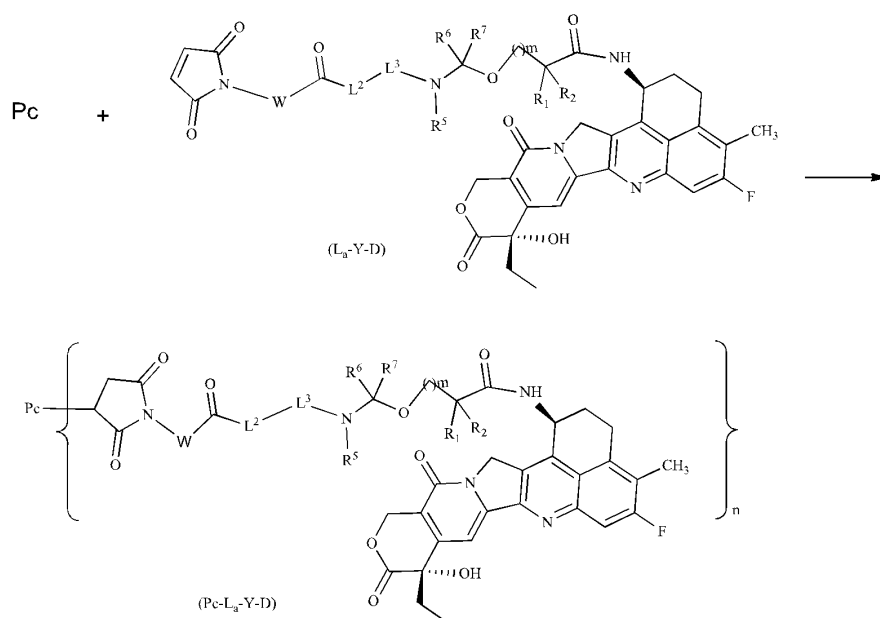
其中:

n 为 1 至 8;

Pc 为如权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗 TF 抗体。

5

14. 一种制备如通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐的方法, 其包括以下步骤:



10 Pc 还原后, 与通式 (L_a-Y-D) 所示的化合物发生偶联反应, 得到通式 (Pc-L_a-Y-D) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐;

其中:

Pc 为如权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗 TF 抗体;

W、L²、L³、R¹、R²、R⁵~R⁷、m 和 n 如权利要求 12 中所定义。

15 15. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗 TF 抗体, 或权利要求 7 所述的核酸分子, 或权利要求 10 至 13 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐; 以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

16. 权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗 TF 抗体，或权利要求 7 所述的核酸分子，或权利要求 10 至 13 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，或权利要求 15 所述的药物组合物在制备用于治疗肿瘤或癌症的药物中的用途；

- 5 优选地，所述肿瘤或癌症选自乳腺癌、胰腺癌、肺癌、食道癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、前列腺癌、膀胱癌、输卵管癌、腹膜癌、结直肠癌、头颈癌和鳞状细胞癌。