

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2024年11月7日 (07.11.2024)



(10) 国际公布号  
**WO 2024/227426 A1**

(51) 国际专利分类号:  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/090585

(22) 国际申请日: 2024年4月29日 (29.04.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202310491237.3 2023年4月30日 (30.04.2023) CN  
202311138664.X 2023年9月5日 (05.09.2023) CN  
202410173852.4 2024年2月7日 (07.02.2024) CN

(71) 申请人: 泰诚思(上海)生物医药有限公司 (TAICHENGSI (SHANGHAI) BIOMEDICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区巴圣路160号10幢3单元2层, Shanghai 200131 (CN)。

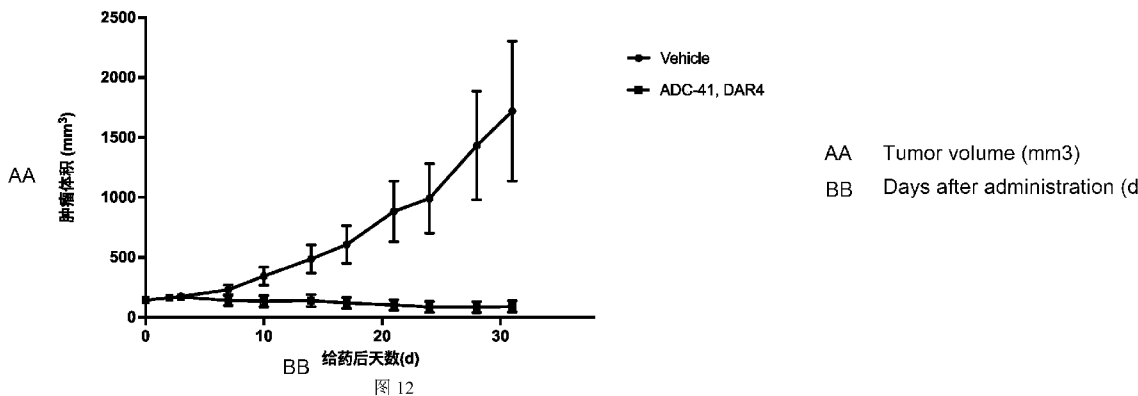
(72) 发明人: 邹斌(ZOU, Bin); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区巴圣路160号10幢3单元2层, Shanghai 200131 (CN)。钟琛(ZHONG, Chen); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区巴圣路160号10幢3单元2层, Shanghai 200131 (CN)。刘绍军(LIU, Shaojun); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区巴圣路160号10幢3单元2层, Shanghai 200131 (CN)。杜平(DU, Ping); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区巴圣路160号10幢3单元2层, Shanghai 200131 (CN)。

(74) 代理人: 北京金诚同达律师事务所 (BEIJING JINCHENG TONGDA & NEAL LAW FIRM); 中国北京市朝阳区建国门外大街1号国贸大厦A座10层, Beijing 100004 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

(54) Title: ANTIGEN-BINDING PROTEIN FOR HROR1 AND USE THEREOF

(54) 发明名称: hROR1的抗原结合蛋白及其用途



(57) Abstract: The present invention relates to an antigen-binding protein for hROR1 and the use thereof, and particularly relates to an antigen-binding protein for hROR1, a bispecific antigen structured protein, a nucleic acid molecule encoding the antigen-binding protein, a vehicle, a cell, a drug molecule and the use thereof. Provided are different antibodies targeting the Ig-like domain or Kringle domain of hROR1 and bispecific antibodies based on these antibodies, and on this basis, compositions, such as ADCs combining different linkers and toxins, are produced. These antibodies and compositions provide new means for diagnosis and treatment of tumors. In particular, an anti-hROR1 ADC has a good anti-tumor activity and thus has a potential for use in tumor treatment.

(57) 摘要: 涉及hROR1的抗原结合蛋白及其用途, 具体涉及hROR1的抗原结合蛋白、双特异性抗原结构蛋白、编码该抗原结合蛋白的核酸分子、载体、细胞、药物分子, 以及它们的用途。提供新的靶向hROR1的Ig-like结构域或Kringle结构域的不同抗体和基于这些抗体的双抗, 并在此基础上产生组合物, 例如不同连接子和毒素组合ADC。这些抗体及组合物为肿瘤的诊疗提供了新的手段。特别是, 抗hROR1ADC具有良好的抗肿瘤活性, 具有用于肿瘤治疗的潜力。

CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

## hROR1 的抗原结合蛋白及其用途

## 技术领域

本发明涉及 hROR1 的抗原结合蛋白、双特异性抗原结合蛋白、编码该抗原结合蛋白的核酸分子、载体、细胞、药物分子，以及它们的用途。

## 背景技术

受体酪氨酸激酶孤儿受体-1 (ROR1) 与同家族成员受体酪氨酸激酶孤儿受体-2(ROR2) 隶属于受体酪氨酸激酶 (RTKs) 家族，都是近期受关注的肿瘤靶点。ROR1 和 ROR2 结构相似，均为 I 型跨膜蛋白，成熟的全长蛋白包含由 3 个不同结构域 (Ig-like、Frizzled 和 Kringle 结构域) 的胞外区、跨膜区和胞内区组成，胞内区包含一个酪氨酸激酶结构域、两个富含丝氨酸/苏氨酸的结构域和一个富含脯氨酸的结构域。ROR1 和 ROR2 都在多种肿瘤组织中高表达，但 ROR2 在一些正常组织中也有低中程度的表达，而 ROR1 尽管在胚胎组织中可检测，在成年人正常组织中几乎不表达，除了睾丸、子宫、肺、膀胱和结肠里有很低水平的表达 (Clin Cancer Res 2008;14(2), doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1823)，因而被认为是一个很好的肿瘤靶点。

ROR1 在血液瘤和实体瘤中都有较为广泛的表达。例如，ROR1 在慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、一些急性淋巴细胞白血病 (ALL)、和慢性套细胞淋巴瘤 (CML) 等血液瘤中高表达，且 ROR1 在多种实体瘤中如肉瘤、卵巢癌、肾细胞癌、头颈癌、乳腺癌、肺癌、恶性间皮瘤、结肠癌、神经母细胞瘤、黑色素瘤和其它肿瘤组织中高表达。ROR1 高表达与癌症如 CLL 和卵巢癌病程加快及预后不良相关 (Sci Rep. 2014 Jul 24;4:5811. doi: 10.1038/srep05811; Blood. 2016 Dec 22; 128(25): 2931-2940. 10.1182/blood-2016-04-712562)。ROR1 可能通过参与多种信号转导通路促进肿瘤的发生发展。有报道显示 ROR1 可能介导 Wnt5a, Wnt5b 和 Wnt16 信号，增强细胞增殖、抑制细胞凋亡，诱导上皮-间充质转换 (EMT) 和癌细胞迁移和转移，并且有助于小窝形成促进内吞 (Cells 2021, 10, 142, doi:10.3390/cells10010142; Nat Commun 2016 Jan 4;7:10060. doi: 10.1038/ncomms10060)。

如前所述，ROR1 在肿瘤中有特异性表达且有可能促进肿瘤生长，因而 ROR1 可视为较好的癌症疗法药物靶标，已有工作开发 ROR1 特异性抗体的靶标。因 ROR1 在不同哺乳动物物种之间具有高同源性，其胞外区氨基酸序列人和食蟹猴完全相同，在人和小鼠之间 96.8% 相同，人和大鼠之间 96.6% 相同。因而，通过标准技术如动物免疫产生针对这个靶标的高亲和力抗体具有一定的困难。

靶向 ROR1 的策略主要包括单抗、双抗、抗体偶联药物和 CAR-T，目前尚无靶向 ROR1 的产品得到临床确证。此外，ROR1 的胞外区具有三个不同的结构域，进入临床研究阶段的三个靶向 ROR1 抗体偶联药物中 VLS-101 和 NBE002 靶向 Ig-like 结构域，LCB71 靶向 Frizzled 结构域。而特异性识别不同结构域或同一结构域的不同表位有可能带来不一样的亲和力、内吞效率或生物性功能，特别是识别不同表位的不同抗体组成的双抗也许会增加抗体的功能特性。另外，现有 ADC 产品都有安全性和耐药性问题。

## 发明内容

本发明主要目的在于提供能够与 hROR1 中特异性结合的抗原结合蛋白，并且具有很好的抗原结合活性。

本发明的第一方面涉及分离的抗原结合蛋白，能够结合 hROR1，含有 a~o 任一项：

a. 具有第一重链可变区，含有氨基酸序列为 TYAMS 的 HCDR1，氨基酸序列为 SISSGGSTYYPDSVKG 的 HCDR2，氨基酸序列为 YSLMVEAHWYFDV 的 HCDR3，

b. 具有第二重链可变区，含有氨基酸序列为 SYAMS 的 HCDR1，氨基酸序列为 SISSGGSTYYPDSVKG 的 HCDR2，氨基酸序列为 GYSNYVDWYFDV 的 HCDR3，

c. 具有第三重链可变区，含有氨基酸序列为 DYTMH 的 HCDR1，氨基酸序列为 GIDPNYGGTNYNEKFKD 的 HCDR2，氨基酸序列为 DDGYEYDFDY 的 HCDR3，

d. 具有第四重链可变区，含有氨基酸序列为 SYWIE 的 HCDR1，氨基酸序列为 EILPGSGNTQNNEKFKG 的 HCDR2，氨基酸序列为 EGRRSHFFDY 的 HCDR3，

e. 具有第五重链可变区，含有氨基酸序列为 RYAMS 的 HCDR1，氨基酸序列为 SISSGGSTYYPDSVKG 的 HCDR2，氨基酸序列为 GYYGNNDWYFDV 的 HCDR3，

f. 具有第一轻链可变区，含有氨基酸序列为 KASQDINSYLS 的 LCDR1，氨基酸序列为 RANRLVD 的

LCDR2, 氨基酸序列为LQYDEFPYT的LCDR3,

g.具有第二轻链可变区, 含有氨基酸序列为KATQDINSYLS的LCDR1, 氨基酸序列为RPNRLVD的LCDR2, 氨基酸序列为LQYDEFPYT的LCDR3,

h.具有第三轻链可变区, 含有氨基酸序列为HASQGISSNIG的LCDR1, 氨基酸序列为HGTNLED的LCDR2, 氨基酸序列为VQYAQFPYT的LCDR3,

i.具有第四轻链可变区, 含有氨基酸序列为KSSQSLNNSNQNKYLA的LCDR1, 氨基酸序列为FASTRES的LCDR2, 氨基酸序列为QQHYSSPWT的LCDR3,

j.具有第五轻链可变区, 含有氨基酸序列为KASQDINSYLS的LCDR1, 氨基酸序列为RANSLVD的LCDR2, 氨基酸序列为LQFDEFPYT的LCDR3,

k.具有a项所述的第一重链可变区和具有f项所述的第一轻链可变区,

l.具有b项所述的第二重链可变区和具有g项所述的第二轻链可变区,

m.具有c项所述的第三重链可变区和具有h项所述的第三轻链可变区,

n.具有d项所述的第四重链可变区和具有i项所述的第四轻链可变区,

o.具有e项所述的第五重链可变区和具有j项所述的第五轻链可变区。

本发明第一方面的一些实施例中, 具有鼠源的框架区或人源的框架区。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的框架区为IgG框架区。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的人源的框架区具有相对于鼠源的框架区的一个或多个位点的回复突变。

本发明第一方面的一些实施例中, 还具有恒定区。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的恒定区具有LALA突变。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的a~e、k~o中的任一项的重链恒定区含有C220S、A121C、V205C、K149C、D265C、S239C、A330C、S442C中的一个或多个突变。

本发明第一方面的一些实施例中, CDR序列根据Kabat定义方案确定。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的抗原结合蛋白包括抗体或其抗原结合片段。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的抗体选自单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的抗原结合片段选自Fab抗体、单链抗体或单域抗体。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的重链可变区具有S62Q、S62A、S62N、S62E、S62V、S62Y、S62F或S62K突变。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的轻链可变区具有G57A、G57S、G57N或G57L突变。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的轻链可变区具有D56E、D56Q、D56T或D56Y突变。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的轻链可变区具有S31A、S31Q、S31L、S31V、S31E、S31Y、S31F或S31K突变。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的轻链可变区具有T57A、T57Q、T57L、T57V、T57E、T57Y、T57F或T57K突变。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的轻链可变区具有S27A、S27Q、S27L、S27V、S27E、S27Y、S27F、S27K突变。

本发明第一方面的一些实施例中, 具有氨基酸序列如SEQ ID No.53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、65、73、75、78、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、90、91、92、93、134或135任一所示的重链, 和氨基酸序列如SEQ ID No.64、66、67、68、70、71、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、105、106、108、109、110、112、113、114、115、116、117、119、120、121、122或123任一所示的轻链。

本发明第一方面的一些实施例中, 所述的抗原结合蛋白, 选自抗体Ab-1~5中的任一项, 其中,

Ab-1具有氨基酸序列如SEQ ID NO.124所示的重链, 和如SEQ ID No.129所示的轻链;

Ab-2具有氨基酸序列如SEQ ID NO.125所示的重链, 和如SEQ ID No.130所示的轻链;

Ab-3具有氨基酸序列如SEQ ID NO.126所示的重链, 和如SEQ ID No.131所示的轻链;

Ab-4具有氨基酸序列如SEQ ID NO.127所示的重链，和如SEQ ID NO.132所示的轻链；

Ab-5具有氨基酸序列如SEQ ID NO.128所示的重链，和如SEQ ID No.133所示的轻链。

本发明的第二方面涉及分离的双特异性抗原结合蛋白，能够结合hROR1，具有：

结合hROR1中Ig-like结构域的第一抗原结合片段，所述的第一抗原结合片段具有第一重链可变区和第一轻链可变区，其中，

所述的第一重链可变区含有氨基酸序列为TYAMS的HCDR1，氨基酸序列为SISSGGSTYYPDSVKG的HCDR2，和氨基酸序列为YSLMVEAHWYFDV的HCDR3，

所述的第一轻链可变区含有氨基酸序列为KASQDINSYLS的LCDR1，氨基酸序列为RANRLVD的LCDR2，和氨基酸序列为LQYDEFPYT的LCDR3，

结合hROR1中Kringle结构域的第二抗原结合片段，所述的第二抗原结合片段具有第四重链可变区和第四轻链可变区，其中，

所述的第四重链可变区含有氨基酸序列为SYWIE的HCDR1，氨基酸序列为EILPGSGNTQNNEKFKG的HCDR2，氨基酸序列为EGRRSHFFDY的HCDR3，

所述的四轻链可变区含有氨基酸序列为KSSQSLLNSSNQKNYLA的LCDR1，氨基酸序列为FASTRES的LCDR2，氨基酸序列为QQHYSSPWT的LCDR3。

本发明的第二方面的一些实施例中，具有鼠源的框架区或人源的框架区。

本发明的第二方面的一些实施例中，所述的框架区为IgG框架区。

本发明的第二方面的一些实施例中，所述的人源的框架区具有相对于鼠源的框架区的一个或多个位点的回复突变。

本发明的第二方面的一些实施例中，还具有恒定区。

本发明的第二方面的一些实施例中，所述的恒定区具有LALA突变。

本发明的第二方面的一些实施例中，所述的第一抗原结合片段的重链恒定区含有C220S、A121C、V205C、K149C、D265C、S239C、A330C、S442C中的一个或多个突变。

本发明的第二方面的一些实施例中，所述的第二抗原结合片段的重链恒定区含有C220S、A121C、V205C、K149C、D265C、S239C、A330C、S442C中的一个或多个突变。

本发明的第二方面的一些实施例中，所述的双特异性抗原结合蛋白为IgG样或非IgG样。

本发明的第二方面的一些实施例中，所述的IgG样抗原结合蛋白选自DVD-Ig双特异性抗原结合蛋白、IgG-scFv双特异性抗原结合蛋白或CrossMAb双特异性抗原结合蛋白。

本发明的第二方面的一些实施例中，具有p、q、r、s中的任一项：

p. 氨基酸序列如61所示的第一重链，和氨基酸序列如140所示的第二重链，氨基酸序列如69所示的第一轻链，氨基酸序列如141所示的第二轻链；

q. 氨基酸序列如72所示的第一重链，和氨基酸序列如137所示的第二重链，氨基酸序列如69所示的第一轻链，氨基酸序列如141所示的第二轻链；

r. 氨基酸序列如89所示的第一重链，和氨基酸序列如138所示的第二重链，氨基酸序列如69所示的第一轻链，氨基酸序列如139所示的第二轻链；

s. 氨基酸序列如136所示的第一重链，和氨基酸序列如142所示的第二重链，氨基酸序列如69所示的第一轻链，氨基酸序列如139所示的第二轻链。

本发明的第二方面的一些实施例中，所述的双特异性抗原结合蛋白选自抗体Ab-6~9中的任一项，其中，Ab-6形式为DVD-Ig，具有氨基酸序列如SEQ ID NO.45所示的重链，和如SEQ ID No.49所示的轻链；Ab-7形式为IgG-scFv，具有氨基酸序列如SEQ ID NO.46所示的重链，和如SEQ ID No.50所示的轻链；Ab-8形式为crossmab，具有氨基酸序列如SEQ ID NO.47所示的第一重链，和如SEQ ID No.67所示的第一轻链；氨基酸序列如SEQ ID NO.51所示的第二重链，和如SEQ ID No.69所示的第二轻链；

Ab-9形式为DVD-Ig，具有氨基酸序列如SEQ ID NO.48所示的重链，和如SEQ ID No.52所示的轻链。

本发明的第三方面涉及核酸分子，用于编码以上任一所述的抗原结合蛋白或用于编码以上任一所述的双特异性抗原结合蛋白。

本发明的第四方面涉及载体，其特征在于包含以上所述的核酸分子。

本发明的第五方面涉及细胞，包含以上所述的核酸分子，和/或以上所述的载体。

本发明的第六方面涉及药物分子，其特征在于包含以上任一所述的抗原结合蛋白或以上任一所述的双特异性抗原结合蛋白。

本发明第六方面的一些实施例中，还包括治疗剂或可检测标记物，所述的治疗剂选自细胞毒性剂、细胞抑制剂、放射性同位素、抗血管生成剂或脂质体。

本发明第六方面的一些实施例中，所述的细胞毒性剂来自植物、真菌或细菌的分子或其衍生物。

本发明第六方面的一些实施例中，所述的细胞毒性剂选自肽毒素、蛋白毒素或烷化剂类毒素。

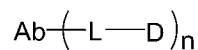
本发明第六方面的一些实施例中，所述的细胞毒性剂选自美登素生物碱类、澳瑞他汀类、艾瑞布林、紫杉烷、卡奇霉素、西马多丁、吡咯苯并二氮杂卓、葱环类药物、喜树碱衍生物、 $\alpha$ -鹅膏蕈碱及其衍生物、曲贝替定及其衍生物、鲁贝替定及其衍生物中的一种或多种。

本发明第六方面的一些实施例中，所述的治疗剂或可检测标记物通过可切割或不可切割的连接子与所述的抗原结合蛋白偶联。

本发明第六方面的一些实施例中，所述的连接子具有一个或多个接头。

本发明第六方面的一些实施例中，所述的接头选自寡肽接头、胍接头、硫脲接头、触发自降解接头、琥珀酰亚胺基反式-4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯接头、马来酰亚胺接头、二硫化物接头、硫醚接头、连烯接头中的一种或多种。

本发明第六方面的一些实施例中，结构如式I所示：



式I

Ab为所述的抗原结合蛋白，L是含一个或多个接头的连接子，D为所述的治疗剂或可检测标记物，n选自1-20的整数。

本发明第六方面的一些实施例中，n选自2~8的整数。

本发明第七方面涉及药物组合物，包含以上任一所述的抗原结合蛋白、以上任一所述的双特异性抗原结合蛋白，以上所述的核酸分子、以上所述的载体、以上所述的细胞、和/或以上任一所述的药物分子，以及药学上可接受的载体和/或添加物。

本发明的第八方面涉及以上任一所述的抗原结合蛋白、以上任一所述的双特异性抗原结合蛋白，以上所述的载体、以上所述的细胞、和/或以上任一所述的药物分子，在制备药物中的应用，所述的药物用于诊断、预防和/或治疗hROR1相关的疾病和/或病症。

本发明的第八方面的一些实施例中，所述的疾病和/或病症包括肿瘤。

本发明的第八方面的一些实施例中，所述的肿瘤为慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性套细胞淋巴瘤、肉瘤、卵巢癌、肾细胞癌、头颈癌、乳腺癌、肺癌、恶性间皮瘤、结肠癌、神经母细胞瘤或黑色素瘤。

本发明提供新的靶向 hROR1 的 Ig-like 结构域和 Kringle 结构域的不同抗体和基于这些抗体的双抗，并在此基础上产生组合物，例如不同连接子和毒素组合 ADC。这些抗体及组合物为肿瘤的诊疗提供了新的手段。特别是，抗 hROR1 ADC 具有良好的抗肿瘤活性，具有用于肿瘤治疗的潜力。

#### 附图说明

图 1 示出人 ROR1 (hROR1) 和人 ROR2 (hROR2) 的胞外区，包含信号肽、Ig-like 结构域、Frizzled 结构域和 Kringle 结构域。

图 2 示出新的鼠抗 hROR1 mAb 的可变免疫球蛋白重链和轻链的氨基酸序列。

图 3 示出如实施例 4 所述测出的嵌合鼠/人抗 hROR1 抗体对商业化的成熟 hROR1 全长胞外区、hROR1 胞外区三个不同结构域、以及成熟 hROR2 全长胞外区的结合活性。其中，Ab1 对 hROR1 Ig-like 结构域具有较高的亲和力，而 Ab4 与其它抗体不同，不结合 Ig-like 结构域而结合 Kringle 结构域，说明能识别独特的抗原表位。

图 4 示出如实施例 4 所述用抗人 ROR1 抗体 Ab-1、Ab-2、Ab-3、Ab-4、Ab-5 在人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 上的 FACS 细胞染色。

图 5 示出荧光激活细胞分选术 (FACS) 测量的所选嵌合鼠/人 IgG 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 上表达的内源 hROR1 的结合活性。

图 6 示出所选嵌合鼠/人 IgG 在表达内源 hROR1 的人卵巢癌细胞 PA-1 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的内吞。(A) 所选抗体在 PA-1 细胞上的内吞活性。(B) 所选抗体在 MDA-MB-231 细胞上的内吞活性。所选抗体在这两株细胞上都表现出明显的内吞活性。

图 7 (A) 示出基于所选嵌合鼠/人 IgG 的不同形式的双特异性抗体的结构示意图。(B) 列出这些抗体的全长序列。

图 8 示出所选双特异性抗体所选对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 上表达的内源 hROR1 的结合活性。

图 9 示出嵌合抗体突变体或人源化抗 hROR1 抗体与成熟 hROR1 全长胞外区的结合活性。部分人源化抗体展示出比嵌合体更高的结合活性。

图 10 (A) 示意性地示出怎样产生本发明公开的基于抗体链间二硫键对应的半胱氨酸与不同 linker-payload 偶联的 ADC。图 10 (B) 示意性地示出利用连烯偶联技术产生 ADC 的主要流程图。10 (C) 示意性地示出基于引入的半胱氨酸突变怎样产生本发明公开的位点特异性偶联的 ADC。通过点突变和重组抗体表达的方法在所选位点引入半胱氨酸突变, 之后产生位点特异性偶联的 ADC。

图 11 (A-C) 示出浓度范围为 0.01~1000 nM 的所选抗 ROR1 ADC 在人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 上的细胞毒性。(D) 示出浓度范围为 0.01~1000 nM 的所选抗 ROR1 ADC 在人肉瘤细胞 Saos2 上的细胞毒性。(E) 示出浓度范围为 0.01~1000 nM 的所选抗 ROR1 ADC 在人软组织肉瘤细胞 SK-UT-1 上的细胞毒性。

图 12 示出在用 hROR1 阳性 MDA-MB-231 细胞注射的雌性 NCG 小鼠中的异种移植模型中 ADC41, DAR4 的效力。所选 ADC 展示了很强的抑瘤活性。

### 具体实施方式

除非另有定义, 本文使用的所有技术和科学术语的含义与本领域普通技术人员通常理解的含义相同。如果发生冲突, 则以本文的描述、定义为准。

有鉴于现有技术中存在的问题, 本发明提供能够与 hROR1 中特异性结合的抗原结合蛋白, 并且具有很好的抗原结合活性, 本发明的抗原结合蛋白中, 含有 a~o 任一项:

a. 具有第一重链可变区, 含有氨基酸序列为 TYAMS 的 HCDR1, 氨基酸序列为 SISSGGSTYYPDSVKG 的 HCDR2, 氨基酸序列为 YSLMVEAHWYFDV 的 HCDR3,

b. 具有第二重链可变区, 含有氨基酸序列为 SYAMS 的 HCDR1, 氨基酸序列为 SISSGGSTYYPDSVKG 的 HCDR2, 氨基酸序列为 GYSNYVDWYFDV 的 HCDR3,

c. 具有第三重链可变区, 含有氨基酸序列为 DYTMH 的 HCDR1, 氨基酸序列为 GIDPNYGGTNYNEKFKD 的 HCDR2, 氨基酸序列为 DDGYEYDFDY 的 HCDR3,

d. 具有第四重链可变区, 含有氨基酸序列为 SYWIE 的 HCDR1, 氨基酸序列为 EILPGSGNTQNNEKFKG 的 HCDR2, 氨基酸序列为 EGRRSHFFDY 的 HCDR3,

e. 具有第五重链可变区, 含有氨基酸序列为 RYAMS 的 HCDR1, 氨基酸序列为 SISSGGSTYYPDSVKG 的 HCDR2, 氨基酸序列为 GYYGNNDWYFDV 的 HCDR3,

f. 具有第一轻链可变区, 含有氨基酸序列为 KASQDINSYLS 的 LCDR1, 氨基酸序列为 RANRLVD 的 LCDR2, 氨基酸序列为 LQYDEFPYT 的 LCDR3,

g. 具有第二轻链可变区, 含有氨基酸序列为 KATQDINSYLS 的 LCDR1, 氨基酸序列为 RPNRLVD 的 LCDR2, 氨基酸序列为 LQYDEFPYT 的 LCDR3,

h. 具有第三轻链可变区, 含有氨基酸序列为 HASQGISSNIG 的 LCDR1, 氨基酸序列为 HGTNLED 的 LCDR2, 氨基酸序列为 VQYAQFPYT 的 LCDR3,

i. 具有第四轻链可变区, 含有氨基酸序列为 KSSQSLLNSSNQKNYLA 的 LCDR1, 氨基酸序列为 FASTRES 的 LCDR2, 氨基酸序列为 QQHYSSPWT 的 LCDR3,

j. 具有第五轻链可变区, 含有氨基酸序列为 KASQDINSYLS 的 LCDR1, 氨基酸序列为 RANSLVD 的 LCDR2, 氨基酸序列为 LQFDEFPYT 的 LCDR3,

k. 具有 a 项所述的第一重链可变区和具有 f 项所述的第一轻链可变区,

l.具有b项所述的第二重链可变区和具有g项所述的第二轻链可变区，  
m.具有c项所述的第三重链可变区和具有h项所述的第三轻链可变区，  
n.具有d项所述的第四重链可变区和具有i项所述的第四轻链可变区，  
o.具有e项所述的第五重链可变区和具有j项所述的第五轻链可变区。本发明的hROR1的抗原结合蛋白种类包括但不限于全长抗体、抗体片段、免疫缀合物、抗体类似物、抗体衍生物、融合蛋白等。抗体包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab)2、Fv、scFv、dsFv、VHH等等。

嵌合抗体通常是指具有小鼠单克隆抗体的V区（可变区）和人免疫球蛋白的C区（恒定区）的抗体。

人源化抗体通常是指小鼠抗体的CDR序列分别引入人VH和VL结构域的框架序列所形成的抗体。

产生本发明的hROR1的单克隆抗体的杂交瘤可以使用公知技术制作。如，首先，使用hROR1蛋白质、表达hROR1的细胞或编码hROR1的基因作为敏化抗原，按照通常的免疫方法将其免疫。采用通常的细胞融合法使从免疫动物中得到的免疫细胞与公知的亲细胞融合，得到杂交瘤。进而，利用通常的筛选法，从此杂交瘤中筛选产生目标抗体的细胞，由此可以选择出产生抗hROR1抗体的杂交瘤。

具体而言，单克隆抗体的制作例如可以如下所示进行。首先，通过表达hROR1基因，可以得到hROR1蛋白质，用作获得抗体的敏化抗原。即，将编码hROR1的基因序列括入公知的表达载体中，转化适当的宿主细胞后，可以采用公知的方法从此宿主细胞中或培养上清液中纯化目标人hROR1蛋白质。另外，纯化的天然的hROR1蛋白质也可以同样地使用。可以通过组合或者单独使用1次或者多次通常的离子层析或亲和层析等多种层析法进行生成。另外，也可以将融合蛋白质用作免疫原，所述融合蛋白质是将hROR1蛋白质的所期望的部分多肽与不同的多肽融合得到的。为了制备为免疫原的融合蛋白质，例如可以使用抗体的Fc片段或肽标记等。表达融合蛋白质的载体，可以通过使编码所期望的二种或者二种以上的多肽片段的基因框内融合，并如上所述地将该融合基因括入表达载体中，进行制作。

如上所示纯化的hROR1蛋白质可以用作对哺乳动物进行免疫时使用的敏化抗原。另外，hROR1的部分肽也可以用作敏化抗原。

用该敏化抗原免疫的哺乳动物没有特殊的限定。为了通过细胞融合法得到单克隆抗体，考虑到与细胞融合中使用的亲细胞的相容性，优选选择免疫动物。一般情况下，作为免疫动物优选啮齿动物。具体而言，可以将小鼠、大鼠、仓鼠、或者家兔用作免疫动物。此外，也可以将猴等用作免疫动物。

上述动物可以按照公知的方法通过敏化抗原免疫。例如，作为一般的方法，可以通过腹腔内或皮下注射敏化抗原对哺乳动物进行免疫。具体而言，每隔4至21日向哺乳动物多次给与该敏化抗原。敏化抗原可以用PBS（Phosphate-Buffered Saline）或生理盐水等以适当的倍率稀释，用于免疫。并且，可以与佐剂一起给与敏化抗原。例如可以与弗式完全佐剂（Freund's complete adjuvant）混合、乳化，形成敏化抗原。另外，用敏化抗原免疫时可以使用适当的载体。特别是分子量小的部分肽用作敏化抗原的情况下，优选使该敏化抗原肽与白蛋白、匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)等载体蛋白质结合进行免疫。

如上所述将哺乳动物免疫，确认血清中的所期望的抗体量升高后，从哺乳动物中采取免疫细胞，进行细胞融合。作为免疫细胞，特别优选使用脾细胞。

目标抗体的筛选及单克隆优选采用基于公知的抗原抗体反应的筛选方法实施。例如，使抗原与用聚苯乙烯等制成的小球或市售96孔微量滴定板等载体结合，与杂交瘤的培养上清液反应。接着，清洗载体后，使酶标记的二次抗体等反应。如果培养上清液中含有与敏化抗原反应的目标抗体，则二次抗体通过此抗体与载体结合。最终通过检测与载体结合的二次抗体，能够确定在培养上清液中是否存在目标抗体。可以通过有限稀释法等克隆产生具有抗原结合能力的所期望的抗体的杂交瘤。此时，作为抗原，可以优选使用用于免疫的蛋白质以及实质相同的hROR1蛋白质。例如包含hROR1的胞外域、或者构成该区域的部分氨基酸序列的寡肽可以作为抗原使用。

嵌合抗体和人源化抗体可以采用已知的方法制造。如将3个CDR和4个FR连结的V区基因，通过在5'末端和3'末端返火且附着适当的限制酶识别序列的引物，将其全长扩增。将如上所述得到的DNA和编码人抗体C区的DNA组装入表达载体中使其框内融合，将该重组载体导入宿主建立重组细胞后，培养该重组细胞，通过使编码该抗体的DNA表达以产生抗体。具体的，可参考实施例2。

所述的抗体形式包括但不限于IgG、IgM、IgA、IgE、IgD等，优选使用IgG。进一步的，所述IgG包



括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等。嵌合抗体和人源化抗体所使用的恒定区中，重链可以使用包括 C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 4, C $\mu$ 、C $\delta$ 、C $\alpha$ 1、C $\alpha$ 2、C $\epsilon$  等，轻链可以使用包括 C $\kappa$ 、C $\lambda$  等。

在抗体的 Fc 区中可以引入 LALA 突变以降低抗体与 Fc $\gamma$  受体和补体的结合。重链恒定区的突变包括但不限于 C220S、A121C、V205C、K149C、D265C、S239C、A330C、S442C 中的一个或多个突变。

本发明中，CDR 用于表示抗体的互补决定区（或称高变环），CDR 中的氨基酸序列决定了抗体抗原结合位点的化学结构和特性。重链可变区（VH）中的 CDR 以 HCDR 表示，对于三个重链 CDR 区分别命名为 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3；轻链可变区（VL）的 CDR 以 LCDR 表示，对于三个轻链 CDR 区分别命名为 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。需要说明的是，在抗体中 CDR 区域一般通过实验进行预测识别，如无特别说明，本发明中的各 CDR 序列由 Kabat 定义方案界定，相关的氨基酸编号由 Kabat 编号方案确定。应当理解，当采用不同的定义方案界定 CDR 时，所预测的 CDR 区序列可能仅存在部分的重叠，或发生缩短或加长。

在抗体制备中，可根据不同的定义方案，将各自定义的 CDR 和 FR 基因序列通过已知的方法连结扩增至全长，从而进一步制备各种抗体或抗体片段。

抗体片段 Fab 是指，由重链可变区的 VH 区和重链第一恒定区 CH1 功能区以及通过二硫键连接的整个轻链组成，主要发挥抗体的抗原结合功能。

scFv 为单链抗体，具体是指将抗体的轻链可变区基因和重链可变区基因在 DNA 水平上与合适的寡核苷酸链（linker）连接起来，使其在合适的生物体中以单肽链的形式表达，并折叠成仅由重链和轻链可变区组成的新抗体。连结的 linker 没有特殊的限制。例如可以使用包含 3 至 25 个残基左右的任意的单链肽作为连接体。

dsFv 为二硫键稳定抗体，具体是将抗体的重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）中的一个氨基酸残基突变为半胱氨酸，然后通过链间二硫键连接 VH 和 VL 而形成的抗体。

VHH 为重链单域抗体，具体是指只含有 VH 功能域而不含有 VL 功能域的小分子抗体。

融合蛋白是指，利用基因工程技术将抗体分子片段与其他蛋白质（如抗体酶、免疫毒素、免疫细胞因子、免疫粘附素等）融合的产物。

制备上述各种抗体片段的方法是已知的。其中一种方法为通过酶处理抗体以产生抗体片段，用于产生抗体片段的酶包括但不限于木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、或者纤溶酶等。另一种方法为构筑编码上述抗体片段的基因，将其导入表达载体后，使其在适当的宿主细胞中表达以产生抗体片段。

本发明中的抗体衍生物是指在保留内源功能的前提下，对本发明的抗体中一个或多个氨基酸残基进行的取代、变异、修饰、替换、缺失和/或添加所得到的产物。

本发明中，CH 用于表示抗体的重链恒定区，CL 用于表示抗体的轻链恒定区，重链恒定区通常进一步包括了 CH1、CH2 和 CH3 结构域。FR 用于表示抗体可变区的框架，其中，重链可变区的框架区以 HFR 表示，对于四个重链框架区分别命名为 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4；轻链可变区的框架区以 LFR 表示，对于四个轻链框架区分别命名为 LFR1、LFR2、LFR3 和 LFR4。

重链可变区具有 S62Q、S62A、S62N、S62E、S62V、S62Y、S62F 或 S62K 突变。

轻链可变区具有 G57A、G57S、G57N 或 G57L 突变。

轻链可变区具有 D56E、D56Q、D56T 或 D56Y 突变。

轻链可变区具有 S31A、S31Q、S31L、S31V、S31E、S31Y、S31F 或 S31K 突变。

轻链可变区具有 T57A、T57Q、T57L、T57V、T57E、T57Y、T57F 或 T57K 突变。

轻链可变区具有 S27A、S27Q、S27L、S27V、S27E、S27Y、S27F、S27K 突变。

本发明还涉及了能够结合 HROR1 的双特异性抗原结合蛋白，其具有结合 hROR1 中 Ig-like 结构域的第一抗原结合片段以及 Kringle 结构域的第二抗原结合片段，

所述的第一抗原结合片段具有第一重链可变区和第一轻链可变区，其中，

所述的第一重链可变区含有氨基酸序列为 TYAMS 的 HCDR1，氨基酸序列为 SISSGGSTYYPDVSKG 的 HCDR2，和氨基酸序列为 YSLMVEAHWYFDV 的 HCDR3，

所述的第一轻链可变区含有氨基酸序列为 KASQDINSYLS 的 LCDR1，氨基酸序列为 RANRLVD 的

LCDR2, 和氨基酸序列为LQYDEFPYT的LCDR3,

所述的第二抗原结合片段具有第四重链可变区和第四轻链可变区, 其中,

所述的第四重链可变区含有氨基酸序列为SYWIE的HCDR1, 氨基酸序列为EILPGSGNTQNNEKFKG的HCDR2, 氨基酸序列为EGRRSHFFDY的HCDR3,

所述的第四轻链可变区含有氨基酸序列为KSSQSLLNSSNQKNYLA的LCDR1, 氨基酸序列为FASTRES的LCDR2, 氨基酸序列为QQHYSSPWT的LCDR3。

双特异性的抗体根据是否存在Fc片段, 分为含Fc片段的IgG样双特异性抗体, 不含Fc片段的非IgG样抗体。非IgG样抗体包括了BiTE双特异性抗体、DART双特异性抗体、TandAb双特异性抗体、Bi-Nanobody双特异性抗体。Ig样双特异性抗体包括了Triomab quadroma双特异性抗体、KIH IgG双特异性抗体, CrossMAb双特异性抗体、Orthodox-Fab IgG双特异性抗体, YBODY双特异性抗体, Two-in-One双特异性抗体, DVD-Ig双特异性抗体、IgG-ScFv及ScFv2-Fc双特异性抗体、FIT-Ig双特异性抗体, Mebs-Ig双特异性抗体。本申请中对于所制备的抗原结合蛋白结合活性的检测采用的是现有的方法, 如流式细胞术。如可参考实施例4的方法进行检测。

本申请中对于所制备的抗原结合蛋白内吞活性的检测可以采用本领域技术人员公知的方法进行。如使用含有可检测标记物的待测抗原结合蛋白, 使其与表达有hROR1的细胞共孵育, 并通过流式细胞术检测其进入细胞内激发的荧光强度, 分析内吞活性。可参考实施例5。

本发明中的载体用于DNA或RNA的复制、转录和/或翻译的表达。通过培养包含所述载体的细胞, 可以产生期望的表达产物。所选用的载体是已知, 如可以为质粒。

此外, 本发明还涉及了含有上述抗原结合蛋白或双特异性抗原结合蛋白的药物分子。

所述的药物分子中还可以包含治疗剂或可检测标记物。

药物分子可以包含任何已知的药物形式。其形式包括但不限于蛋白、多肽、小分子药物、抗体偶联药物或各种形态药物的结合物等。

本发明中的抗体偶联药物是指抗原结合蛋白(通常为抗体或抗体片段)通过连接子与治疗剂偶联。制备抗体偶联药物的方法是已知的。其中, 连接子与药物之间的连接通常通过已知的化学合成方法产生, 形成能够与抗体结合的连接子-治疗剂结构, 在抗体偶联药物的制备过程中, 抗体偶联一个或多个连接子-治疗剂结构, 抗体与连接子-治疗剂结构的偶联通常针对抗体中的赖氨酸或半胱氨酸残基的侧链进行建立。其中, 对于赖氨酸的缀合, 连接子中通常具有N-羟基琥珀酰亚胺, 可以与所述的赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基反应形成稳定的酰胺键, 形成抗体与治疗剂的偶联。对于半胱氨酸的缀合, 连接子中通常具有可介导偶联反应的官能团如马来酰亚胺官能团、连烯酰胺(allenamide)等, 所述的半胱氨酸通过已知的方法将二硫键还原, 以产生反应性巯醇, 从而与马来酰亚胺缀合, 形成抗体与治疗剂的偶联。如可参考本发明的实施例8中所示例的方法。

可采用的连接子包括不可切割的和可切割的。连接子中可以具有一个或多个接头, 包括但不限于寡肽接头(包括可切割和/或不可切割的寡肽接头)、胍接头、硫脲接头、触发自降解(self-immolative)接头、琥珀酰亚胺基反式-4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)接头、马来酰亚胺接头、二硫化物接头、硫醚接头和/或连烯接头。

可采用的治疗剂可以是免疫调节剂, 例如Sting激动剂, TLR7、TLR8和/或TLR9激动剂, PD-1抑制剂等。

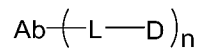
可采用的治疗剂可以是细胞毒性剂、细胞抑制剂等。细胞毒性剂可以是来自植物、真菌或细菌的分子或其衍生物, 包括但不限于肽毒素, 蛋白毒素, 烷化剂类毒素或其他类型毒素。药物毒性剂可以选自美登素生物碱类(例如, 美登醇(maytansinol)或DM1美登素)、澳瑞他汀类(例如, 一甲基澳瑞他汀E或一甲基澳瑞他汀F)、艾瑞布林、紫杉烷、卡奇霉素、西马多丁、吡咯苯并二氮杂卓、葱环类药物、喜树碱衍生物、 $\alpha$ -鹅膏蕈碱及其衍生物、曲贝替定及其衍生物、鲁贝替定及其衍生物中的一种或多种。本发明中使用的细胞毒性物质可以为一种, 也可以组合两种以上细胞毒性物质进行使用。

可采用的治疗剂还可以是代谢药(例如, 抗叶酸剂如甲氨蝶呤, 氟嘧啶如5-氟尿嘧啶, 阿糖胞苷, 或者嘌呤或腺苷的类似物); 插入剂(例如, 葱环类如多柔比星, 奈莫柔比星, 或者优选PNU-159682的衍生物), 道诺霉素, 表柔比星(epirubicin), 伊达比星, 丝裂霉素-C, 放线菌素D, 或光神霉素, 或者其他插入

剂如吡咯苯并二氮杂卓；DNA-反应剂如卡奇霉素、天赐米星类(tiancimycins)和其他烯二炔；铂衍生物(例如，顺铂或卡铂)；烷化剂(例如，氮芥、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、环磷酰胺、异环磷酰胺亚硝基脲或塞替派)；RNA聚合酶抑制剂如 $\alpha$ -鹅膏蕈碱；抗有丝分裂剂(例如，长春花生物碱如长春新碱，或者紫杉烷类如紫杉醇或多西他赛)；拓扑异构酶抑制剂(例如，依托泊苷、替尼泊苷、安吡啶、托泊替康、依喜替康)；细胞周期抑制剂(例如，flavopyridol)；或者抗微管剂(例如，埃坡霉素、tubulysine、pre-tubulysine、浙皮海绵内酯类似物或艾榴素类似物)。治疗剂可以是蛋白酶体抑制剂或拓扑异构酶抑制剂如硼替佐米、安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷、替尼泊苷或多柔比星等。治疗性放射性同位素包括碘(131I)、钇(90Y)、镱(177Lu)、镭(225Ac)、镓、砷(At)、铯(Re)、铋(Bi或Bi)和铑(Rh)等。抗血管生成剂包括利诺胺、贝伐单抗、血管抑素和雷佐生。

含有可检测标记物的药物分子可以用于诊断。如可以包括造影剂。造影剂可以是放射性同位素标记如碘(131I或125I)、铟(111In)、锝(99Tc)、磷(32P)、碳(14C)、氚(3H)、其他放射性同位素(例如放射性离子)，或者治疗性放射性同位素如上文列出的治疗性放射性同位素之一。此外，造影剂可以包括不透射线材料、磁共振成像(MRI)剂、超声显影剂以及适合通过成像动物体的装置检测的任何其他造影剂。所述的可检测标记物还可以是荧光标记、生物活性酶标记、发光标记或发色团标记。

药物分子的结构如式I所示：



式I

Ab为所述的抗原结合蛋白，L是含一个或多个接头的连接子，D为所述的治疗剂或可检测标记物，n选自1-20的整数。进一步，可以是自2-8的整数。

本发明的药物组合物的给药方式可以通过口服或非口服。非口服的给药方式包括如注射给药、经鼻给药、经肺给药、经皮给药等等。注射给药又可以包括静脉注射、肌肉注射、腹腔内注射、皮下注射等。除此以外，给药量可以考虑患者的年龄、症状进行具体的调整。作为给药量，如，给药量可以是每1kg体重每次给药0.0001mg~1000mg。又如，在每位患者的每次给药0.001mg~100000mg。需要说明的是，上述给药量仅用于举例说明，而不适用于限定给药量的范围。

本发明的药物组合物可以按照常用方法进行制剂化，也可以同时含有药学上可接受的药物载体和/或添加物。例如可以举出表面活性剂、赋形剂、着色剂、香料、防腐剂、稳定剂、缓冲剂、悬浮剂、等渗剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、流动性促进剂、矫味剂等。并且，并不限于此，可以适当地使用其它常用的药物载体。具体而言，作为药物载体包括但不限于轻质无水硅酸、乳糖、结晶纤维素、甘露醇、淀粉、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯醇缩乙醛二乙氨基乙酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、中链脂肪酸三甘油酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油60、白糖、竣甲基纤维素、玉米淀粉、无机盐类等。

本发明治疗和诊断的癌症的种类没有特殊的限制，通常为hROR1蛋白质表达的癌症，优选为慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性套细胞淋巴瘤、肉瘤、卵巢癌、肾细胞癌、头颈癌、乳腺癌、肺癌、恶性间皮瘤、结肠癌、神经母细胞瘤或黑色素瘤。

并且，本发明的药物组合物中，根据需要可以配合多种抗体。例如，通过制成多种抗hROR1抗体的混合物，可能能够增强对hROR1表达细胞的细胞毒性。或者，除抗hROR1抗体之外，通过配合识别其它肿瘤相关抗原的抗体，也可以提高治疗效果。

如无特别说明，本发明中的各CDR序列由Kabat定义方案界定，相关的氨基酸编号由Kabat编号方案确定。应当理解，当采用不同的定义方案界定CDR时，所预测的CDR区序列可能仅存在部分的重叠，或发生缩短或加长。

以下，通过实施例对于本发明作进一步说明。

#### 实施例1. 细胞系

人卵巢癌细胞PA-1，人三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231和MCF-7，人肉瘤细胞系Saos-2，均购自ATCC。

MDA-MB-231细胞系在补充了10% (v/v) 热灭活的FBS (Thermo Scientific; Logan, UT) 的DMEM

(Thermo Scientific; Logan, UT) 中生长。

Saos-2 细胞系在补充了 10% (v/v) 热灭活的 FBS (Thermo Scientific; Logan, UT) 的 RPMI1640 (Thermo Scientific; Logan, UT) 中生长。

PA-1 和 MCF-7 细胞系在补充了 10% (v/v) 热灭活的 FBS (Thermo Scientific; Logan, UT) 1% (v/v) 非必须氨基酸, 以及 1 mM 丙酮酸钠中的 MEM (Thermo Scientific; Logan, UT) 生长, 以支持贴壁培养。

每种培养基中均添加 100U/mL 青霉素和 100mg/mL 链霉素(Sigma Aldrich)。

#### 实施例 2. 小鼠免疫和抗体筛选

免疫原的制备与小鼠免疫: 采用 human ROR1(30-403)-His 作为免疫原制备抗 hROR1 的单克隆抗体。准备 15 只小鼠(5 只 BALB/c 小鼠、5 只 C57bl/6 小鼠, 5 只 A/J 小鼠), 使用弗氏完全佐剂乳化的 50  $\mu$ g human ROR1(30-403)-His 蛋白进行皮下注射初次免疫, 两周后进行第二次免疫, 初次免疫后使用不完全弗氏佐剂乳化的 25  $\mu$ g human ROR1(30-403)-His 蛋白进行 3 次免疫, 采用腹腔-皮下交替的注射方式, 以两周为间隔免疫小鼠。小鼠第四次免疫后 7 天, 采用尾部取血的方式进行采血并进行抗原结合能力的检测。

抗体筛选: 从 15 只小鼠中选择血清效价高的 BALB/c 小鼠进行细胞融合。取小鼠的脾细胞和 SP2/0 细胞采用电融合的方式进行细胞融合, SP2/0 细胞与脾细胞的比例为 20:1。融合后 7~10 天后, 采用间接 ELISA 和 FACS 的方法进行杂交瘤上清特异性抗体的检测。挑选阳性克隆进行亚克隆, 经过两次亚克隆后得到单克隆细胞株, 即杂交瘤细胞株, 筛选所得到的阳性杂交瘤细胞株分别为 7F6D10、33B10G8、21A9A4、84E3F11 和 94F8B4。采用 SBA Clonotyping system-HRP kit 进行亚型检测, 所选抗体的亚型均为 IgG1 Kappa。

鼠抗 hROR1 mAb 的可变免疫球蛋白重链和轻链的氨基酸序列, 如图 2 所示。

利用 Kabat 定义的框架区(FR)和互补决定区(CDR), 图中示出命名为 7F6D10、33B10G8、21A9A4、84E3F11 和 94F8B4 的 5 个抗体的重链可变结构域序列(分别为 SEQ ID NO:1、5、9、13、17)和轻链可变结构域序列(分别为 SEQ ID NO:21、25、29、33、37)。

抗体	可变区	结构域	氨基酸序列	SEQ ID No.
7F6D10	VH1	HCDR1	TYAMS	2
		HCDR2	SISSGGSTYYPDVSKG	3
		HCDR3	YSLMVEAHWYFDV	4
	VL1	LCDR1	KASQDINSYLS	22
		LCDR2	RANRLVD	23
		LCDR3	LQYDEFPYT	24
33B10G8	VH2	HCDR1	SYAMS	6
		HCDR2	SISSGGSTYYPDVSKG	7
		HCDR3	GYSNYVDWYFDV	8
	VL2	LCDR1	KATQDINSYLS	26
		LCDR2	RPNRLVD	27
		LCDR3	LQYDEFPYT	28
21A9A4	VH3	HCDR1	DYTMH	10
		HCDR2	GIDPNYGGTNYNEKFKD	11
		HCDR3	DDGYEYDFDY	12
	VL3	LCDR1	HASQGISSNIG	30
		LCDR2	HGTNLED	31
		LCDR3	VQYAQFPYT	32
84E3F11	VH4	HCDR1	SYWIE	14
		HCDR2	EILPGSGNTQNNEKFKG	15
		HCDR3	EGRRSHFFDY	16
	VL4	LCDR1	KSSQSLLNSSNQKNYLA	34
		LCDR2	FASTRES	35
		LCDR3	QQHYSSPWT	36
94F8B4	VH5	HCDR1	RYAMS	18
		HCDR2	SISSGGSTYYPDVSKG	19
		HCDR3	GYYGNNNDWYFDV	20
	VL5	LCDR1	KASQDINSYLS	38
		LCDR2	RANSLVD	39
		LCDR3	LQFDEFPYT	40

### 实施例 3.嵌合鼠/人 IgG 抗体的表达和纯化

利用 MHSSALLCCLVLLTGVR 作为前导信号肽通过全基因合成制备抗体的可变区编码区，并与人 IgH- $\gamma$ 1 以及 IgL- $\kappa$  编码区通过 NotI/XbaI 酶切位点组装在表达载体 pcDNA3.4，该载体具有 CMV 启动子可增强多种基因在哺乳细胞中的高水平表达，并含有氨苄抗性基因用于选择性标记。选择 CHO-K1 细胞作为抗体表达的宿主，细胞在合适的条件下（120rpm，8%CO<sub>2</sub>，37℃）下传代三次，收集细胞加入电转液混合均匀，随后添加质粒并混合均匀后至于电转管中，经电转仪将 pcDNA3.4 表达载体转染至 CHO-K1 细胞中。于 37℃，270 rpm，8% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24h 后，添加补料/丁酸钠/双抗生素后培养 3-7 天，将收获的上清过滤（0.22  $\mu$ m）除去细胞后用于后续纯化。将处理好的上清用 Protein A 亲和层析柱纯化，随后用柠檬酸缓冲液（pH 3.4）洗脱，将洗脱液置于透析袋中进行缓冲液换液，最终得到 7F6D10、33B10G8、21A9A4、84E3F11 和 94F8B4 嵌合鼠/人 IgG1 抗体。通过 NanoDrop 仪器读取 A280nm 吸光度确定其浓度和数量，并通过 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 进行纯度检测，所表达抗体的纯度为>95%。

下表中列出了后续实施例中使用的鼠/人 IgG1 嵌合抗体，包括它们的浓度和稀释液

抗体	可变域	形式	抗体 SEQ ID HC/LC	缓冲液	终浓度 (mg/ml)
Ab-1	7F6D10	IgG1	HC: SEQ ID NO.124 LC: SEQ ID NO.129	PBS	8.77
Ab-2	33B10G8	IgG1	HC: SEQ ID NO.125 LC: SEQ ID NO.130	PBS	2.24
Ab-3	21A9A4	IgG1	HC: SEQ ID NO.126 LC: SEQ ID NO.131	PBS	8.68
Ab-4	84E3F11	IgG1	HC: SEQ ID NO.127 LC: SEQ ID NO.132	PBS	9.8
Ab-5	94F8B4	IgG1	HC: SEQ ID NO.128 LC: SEQ ID NO.133	PBS	1.43

### 实施例 4.抗体结合活性的检测

ELISA: 对于 ELISA，将 96 孔 3590 板(Corning, NY)的每个孔分别用 100  $\mu$ L 含 50 ng 抗原蛋白的包被缓冲液(0.015 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，0.035 M NaHCO<sub>3</sub>，pH 9.5)在 4℃条件下包被过夜。用 150  $\mu$ L 每孔含 4%(w/v)脱脂奶粉的 PBS 缓冲液在 37℃下封闭 1h 之后，弃去上清并在干净的纸巾上排干孔内溶液。然后在 37℃下于每孔中加入 4 倍梯度稀释后的待测抗体（7F6D10、33B10G8、21A9A4、84E3F11 或 94F8B4）作为一抗，孵育 1 小时后，用 1% PBST 清洗三遍后弃去上清。再加入 100  $\mu$ L 每孔 PBS 缓冲液，其中含 1.25 ng/mL 辣根过氧化物酶(HRP)偶联的山羊抗人 IgG Fc (Invitrogen, California, CA) 以及 4%(w/v)脱脂奶粉在 37℃条件下孵育 45 分钟。用 1% PBST 清洗三遍后，并且利用 TMB 显色液 (Beyotime, Shanghai, CN) 根据制造商的指导进行显色反应，室温避光孵育 15 分钟，直至显色至预期深浅，后利用 TMB 显色终止液。利用 SpectraMax i3X 酶标仪 (Molecular Devices; Sunnyvale, CA) 在 450nm 下测量吸光度。为了确定表位范围，直接包被 hROR1\_Ig-like、hROR1\_Frizzled 或 hROR1\_Kringle 蛋白，然后用待测抗体温育，之后用同样方式检测。

流式细胞术: 将待测细胞按照 40000 细胞每孔种在 96 孔圆底板中，加入用梯度稀释（100 nM 起，4 倍稀释到 0.006 nM）后的抗体作为一抗，在 4℃的条件下孵育 1 小时。将不用一抗孵育，只用二抗孵育的细胞孔作为空白对照。孵育后离心弃去上清，用 200  $\mu$ L 每孔冰冷的 1% (v/v) FBS 的 PBS 洗涤两次。之后用 FITC 标记的山羊抗人 IgG 特异性多克隆抗体作为二抗在 4℃条件下孵育 1 小时后重复以上洗涤步骤，弃去上清后重新加入 100  $\mu$ L 每孔 1% FBS 的 PBS 重悬。利用 Flow cytometer 仪器 (Agilent) 分析细胞结合后的染色情况，并且利用 GraphPad 9.5.1 分析数据。

图 3 示出测出的嵌合鼠/人抗 hROR1 抗体对商业化的成熟 hROR1 全长胞外区、hROR1 胞外区三个不同结构域、以及成熟 hROR2 全长胞外区的结合活性。通过 ELISA 分析每种嵌合鼠/人 Fab 结合至与成熟 hROR1 全长胞外区 (hROR1\_ECD)、人 hROR1 Ig 相似结构域(hROR1\_Ig-like)、hROR1 Frizzled 结构域 (hROR1\_Frizzled)、hROR1 Kringle 结构域(hROR1\_Kringle)、以及成熟 hROR2 全长胞外区 (hROR2\_ECD)。这些商业化的抗原已被验证可用于抗人 ROR1 或/ROR2 抗体的 ELISA 实验以检测抗体的结合活性。通过固定在板上的嵌合鼠/人抗 hROR1 抗体捕获带 His 标签的 hROR1\_ECD、hROR1\_Ig-like、hROR1\_Frizzled、hROR1\_Frizzled 或 hROR2\_ECD，然后用 HRP 的山羊抗人抗体作为二抗进行检测。

图 4 示出 Ab-1~5 在在人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 上的 FACS 细胞染色。

图 5 示出荧光激活细胞分选术 (FACS) 测定的所选嵌合鼠/人 IgG 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 上表达的内源 hROR1 的结合活性。

#### 实施例 5. 利用 pHrodo iFL green 对抗体内吞活性的检测

将 PA-1 和 MDA-MB-231 细胞在恒温培养箱 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 中培养过夜。采用 pHrodo iFL Green human IgG 试剂分别标记所选抗体 Ab-1~5, 将抗体-pHrodo iFL Green human IgG 缀合物分别与人卵巢癌细胞 PA-1 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 共孵育 24 小时。抗体最高浓度设置为 10 μg/ml, 并进行 4 倍梯度稀释。孵育完成后, 用 PBS 清洗并用培养基重悬细胞, 在 NovoCyte 流式细胞仪上测定 pHrodo iFL Green 进入细胞内激发的荧光强度, 分析抗体的内吞活性。

图 6 示出所选嵌合鼠/人 IgG 在表达内源 hROR1 的人卵巢癌细胞 PA-1 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的内吞。Ab-1~5 为 hROR1 特异性 mAb, 以及对照抗体 UC961 和 C2E3。(A) 所选抗体在 PA-1 细胞上的内吞活性。(B) 所选抗体在 MDA-MB-231 细胞上的内吞活性。

#### 实施例 6. 纯化的、重组抗 hROR1 双抗的表达和表征

使用 7F6D10 和 84E3F11 嵌合人 IgG 构建四个双抗, 双抗的表达纯化参照实施例 3。克隆双抗的可变区编码区, 组装于 pcDNA 表达载体上, 并转染至 CHO-K1 细胞中, 进行真核表达并纯化。所得的纯化抗体分别为 Ab-6~9。

图 7 示出基于所选嵌合鼠/人 IgG 的不同形式的双特异性抗体的结构示意图。

所选双特异性抗体 84E3F11-7F6D10 和 7F6D10-84E3F11 为 DVD-Ig 形式; 所选双特异性抗体 84E3F11-7F6D10-VH-VL 为 IgG-scFv 形式; 所选双特异性抗体 84E3F11-7F6D10(cross) 为 CrossMab 形式, 如图 7 所示。(A) 为所选双特异性抗体的结构示意图, (B) 为所选双特异性抗体的序列。

表 3 列出了所选鼠/人嵌合双特异性抗体的终浓度和缓冲液。

抗体	抗体	形式	抗体 SEQ ID HC/LC	缓冲液	终浓度
84E3F11-7F6D10	Ab-6	DVD-IgG	HC: SEQ ID NO.45 LC: SEQ ID NO.49	PBS	6.53
84E3F11-7F6D10-VH-VL	Ab-7	IgG-scFv	HC: SEQ ID NO.46 LC: SEQ ID NO.50	PBS	1.5
84E3F11-7F6D10(cross)	Ab-8	Crossmab	HC-1: SEQ ID NO.47 HC-2: SEQ ID NO.67 LC-1: SEQ ID NO.51 LC-2: SEQ ID NO.69	PBS	1.42
7F6D10-84E3F11	Ab-9	DVD-Ig	HC: SEQ ID NO.48 LC: SEQ ID NO.52	PBS	5.14

图 8 示出所选双特异性抗体所选对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 上表达的内源 hROR1 的结合活性。

#### 实施例 7. 纯化的、重组嵌合抗体突变体或人源化抗 hROR1 抗体的表达和表征

嵌合抗体突变体或人源化抗体的表达纯化参照实施例 3。

表 4 嵌合抗体突变体或人源化抗体, 包括它们的浓度和稀释液。

抗体	形式	抗体 SEQ ID HC/LC	缓冲液	终浓度 (mg/mL)
Ab-10	IgG1	HC: SEQ ID NO.53 LC: SEQ ID NO.64	PBS (pH 7.4)	1.07
Ab-11	IgG1	HC: SEQ ID NO.53 LC: SEQ ID NO.66	PBS (pH 7.4)	0.95
Ab-12	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.64	PBS (pH 7.4)	0.59
Ab-13	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.66	PBS (pH 7.4)	0.75
Ab-14	IgG1	HC: SEQ ID NO.58 LC: SEQ ID NO.68	PBS (pH 7.4)	1.05
Ab-15	IgG1	HC: SEQ ID NO.134 LC: SEQ ID NO.117	PBS (pH 7.4)	
Ab-16	IgG1	HC: SEQ ID NO.58	PBS (pH 7.4)	0.93

		LC: SEQ ID NO.70		
Ab-17	IgG1	HC: SEQ ID NO.60 LC: SEQ ID NO.68	PBS (pH 7.4)	1.05
Ab-18	IgG1	HC: SEQ ID NO.135 LC: SEQ ID NO.109	PBS (pH 7.4)	5.42
Ab-19	IgG1	HC: SEQ ID NO.60 LC: SEQ ID NO.70	PBS (pH 7.4)	1.04
Ab-20	IgG1	HC: SEQ ID NO.62 LC: SEQ ID NO.68	PBS (pH 7.4)	0.86
Ab-21	IgG1	HC: SEQ ID NO.62 LC: SEQ ID NO.70	PBS (pH 7.4)	0.93
Ab-22	IgG1	HC: SEQ ID NO.63 LC: SEQ ID NO.71	PBS (pH 7.4)	8.68
Ab-23	IgG1	HC: SEQ ID NO.73 LC: SEQ ID NO.64	PBS (pH 7.4)	1.15
Ab-24	IgG1	HC: SEQ ID NO.75 LC: SEQ ID NO.64	PBS (pH 7.4)	1.03
Ab-25	IgG1	HC: SEQ ID NO.76 LC: SEQ ID NO.64	PBS (pH 7.4)	0.87
Ab-26	IgG1	HC: SEQ ID NO.77 LC: SEQ ID NO.64	PBS (pH 7.4)	0.87
Ab-27	IgG1	HC: SEQ ID NO.78 LC: SEQ ID NO.64	PBS (pH 7.4)	0.94
Ab-28	IgG1	HC: SEQ ID NO.79 LC: SEQ ID NO.64	PBS (pH 7.4)	0.97
Ab-29	IgG1	HC: SEQ ID NO.80 LC: SEQ ID NO.64	PBS (pH 7.4)	0.91
Ab-30	IgG1	HC: SEQ ID NO.81 LC: SEQ ID NO.64	PBS (pH 7.4)	0.97
Ab-31	IgG1	HC: SEQ ID NO.82 LC: SEQ ID NO.94	PBS (pH 7.4)	4.6
Ab-32	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.95	PBS (pH 7.4)	1.17
Ab-33	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.96	PBS (pH 7.4)	1.29
Ab-34	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.97	PBS (pH 7.4)	1.12
Ab-35	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.99	PBS (pH 7.4)	1.29
Ab-36	IgG1	HC: SEQ ID NO.55 LC: SEQ ID NO.98	PBS (pH 7.4)	5.58
Ab-37	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.100	PBS (pH 7.4)	1.35
Ab-38	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.101	PBS (pH 7.4)	1.28
Ab-39	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.102	PBS (pH 7.4)	1.25
Ab-40	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.103	PBS (pH 7.4)	1.31
Ab-41	IgG1	HC: SEQ ID NO.56 LC: SEQ ID NO.109	PBS (pH 7.4)	1.41
Ab-42	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.105	PBS (pH 7.4)	1.30
Ab-43	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.106	PBS (pH 7.4)	1.35
Ab-44	IgG1	HC: SEQ ID NO.57 LC: SEQ ID NO.109	PBS (pH 7.4)	3.78
Ab-45	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.108	PBS (pH 7.4)	1.31

Ab-46	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.109	PBS (pH 7.4)	1.37
Ab-47	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.110	PBS (pH 7.4)	1.21
Ab-48	IgG1	HC: SEQ ID NO.65 LC: SEQ ID NO.109	PBS (pH 7.4)	3.19
Ab-49	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.112	PBS (pH 7.4)	1.33
Ab-50	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.113	PBS (pH 7.4)	1.37
Ab-51	IgG1	HC: SEQ ID NO.54 LC: SEQ ID NO.114	PBS (pH 7.4)	1.37
Ab-52	IgG1	HC: SEQ ID NO.83 LC: SEQ ID NO.70	PBS (pH 7.4)	1.39
Ab-53	IgG1	HC: SEQ ID NO.85 LC: SEQ ID NO.117	PBS (pH 7.4)	9.12
Ab-54	IgG1	HC: SEQ ID NO.84 LC: SEQ ID NO.70	PBS (pH 7.4)	1.22
Ab-55	IgG1	HC: SEQ ID NO.59 LC: SEQ ID NO.117	PBS (pH 7.4)	11.33
Ab-56	IgG1	HC: SEQ ID NO.86 LC: SEQ ID NO.70	PBS (pH 7.4)	1.40
Ab-57	IgG1	HC: SEQ ID NO.87 LC: SEQ ID NO.70	PBS (pH 7.4)	1.48
Ab-58	IgG1	HC-1: SEQ ID NO.89 HC-2: SEQ ID NO.140 LC-1: SEQ ID NO.69 LC-2: SEQ ID NO.141	PBS (pH 7.4)	0.75
Ab-59	IgG1	HC: SEQ ID NO.88 LC: SEQ ID NO.70	PBS (pH 7.4)	1.27
Ab-60	IgG1	HC: SEQ ID NO.91 LC: SEQ ID NO.117	PBS (pH 7.4)	11.94
Ab-61	IgG1	HC: SEQ ID NO.90 LC: SEQ ID NO.70	PBS (pH 7.4)	1.53
Ab-62	IgG1	HC: SEQ ID NO.92 LC: SEQ ID NO.70	PBS (pH 7.4)	1.19
Ab-63	IgG1	HC: SEQ ID NO.93 LC: SEQ ID NO.70	PBS (pH 7.4)	1.20
Ab-64	IgG1	HC: SEQ ID NO.60 LC: SEQ ID NO.115	PBS (pH 7.4)	1.24
Ab-65	IgG1	HC-1: SEQ ID NO.61 HC-2: SEQ ID NO.142 LC-1: SEQ ID NO.69 LC-2: SEQ ID NO.141	PBS (pH 7.4)	9.12
Ab-66	IgG1	HC: SEQ ID NO.60 LC: SEQ ID NO.116	PBS (pH 7.4)	1.37
Ab-67	IgG1	HC: SEQ ID NO.60 LC: SEQ ID NO.117	PBS (pH 7.4)	0.67
Ab-68	IgG1	HC-1: SEQ ID NO.72 HC-2: SEQ ID NO.138 LC-1: SEQ ID NO.69 LC-2: SEQ ID NO.139	PBS (pH 7.4)	0.96
Ab-69	IgG1	HC: SEQ ID NO.60 LC: SEQ ID NO.119	PBS (pH 7.4)	1.06
Ab-70	IgG1	HC: SEQ ID NO.60 LC: SEQ ID NO.120	PBS (pH 7.4)	1.13
Ab-71	IgG1	HC: SEQ ID NO.60 LC: SEQ ID NO.121	PBS (pH 7.4)	0.91
Ab-72	IgG1	HC: SEQ ID NO.60	PBS (pH 7.4)	1.33

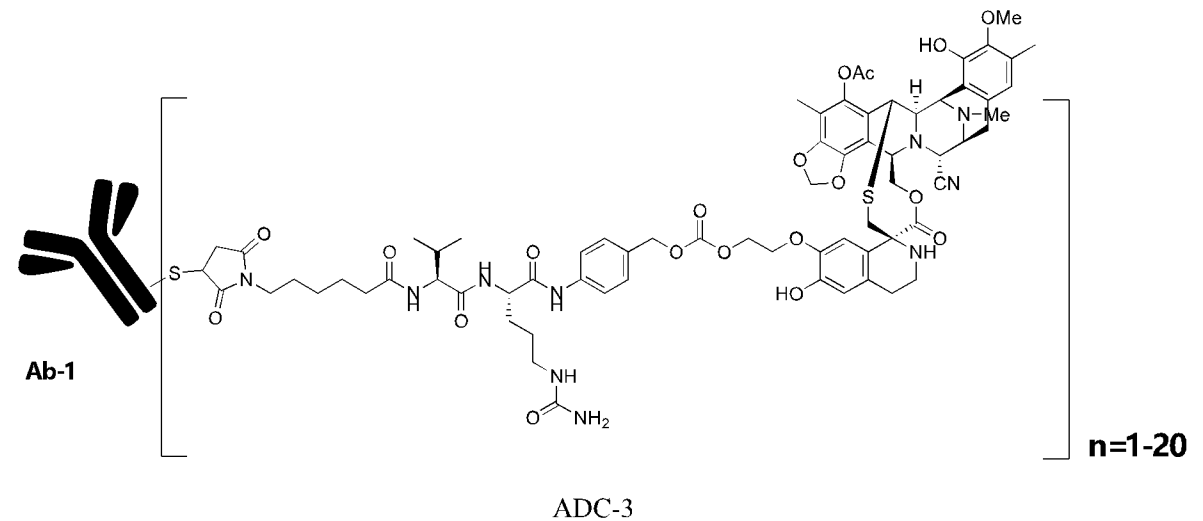
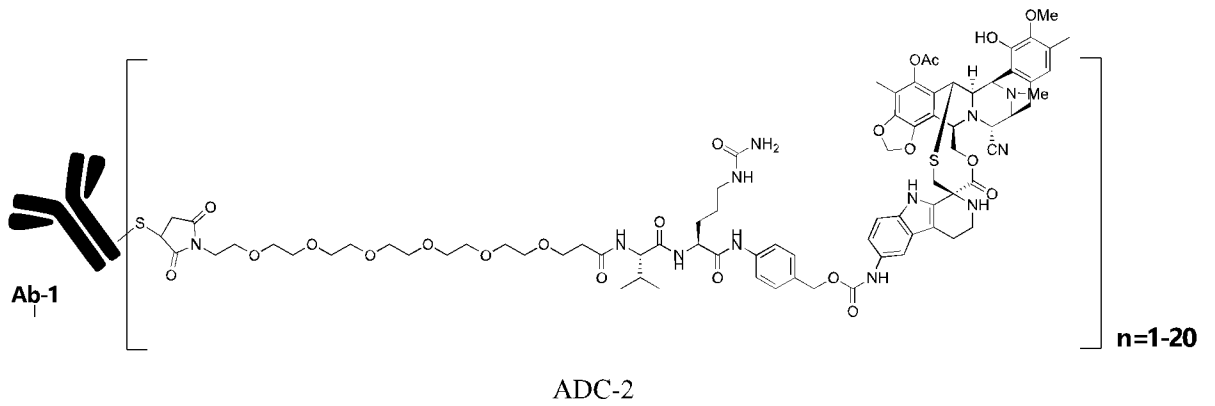
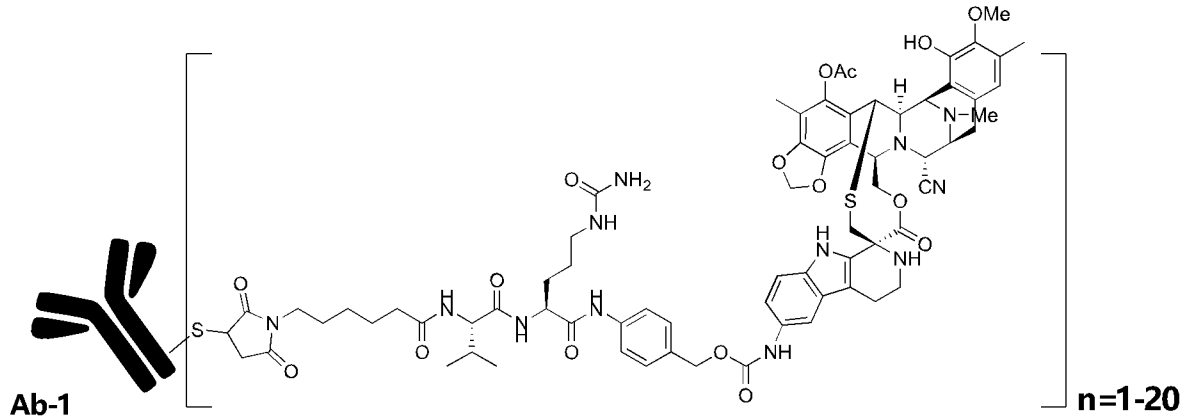


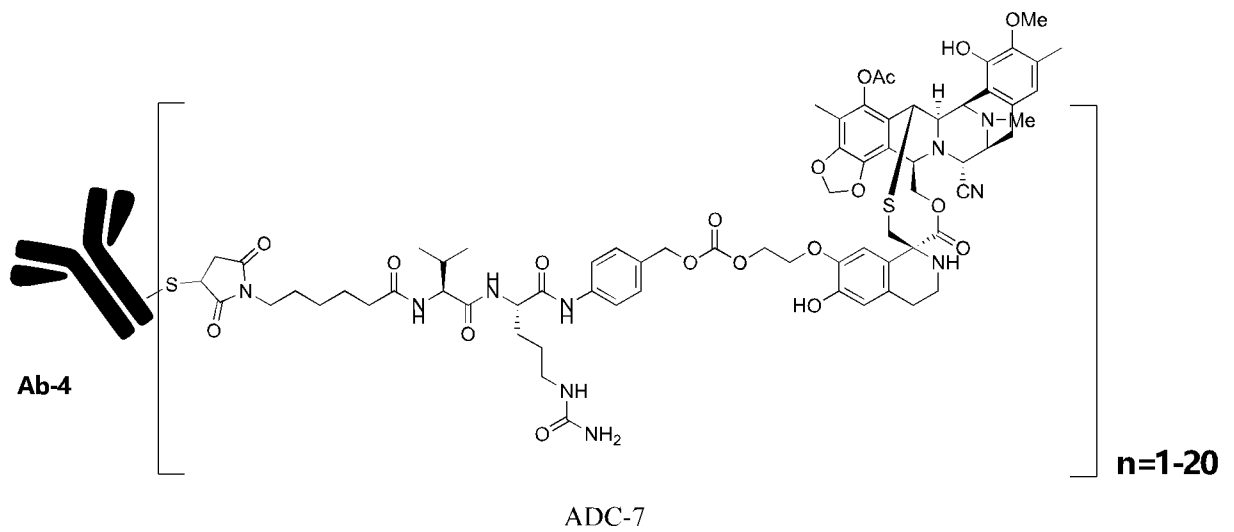
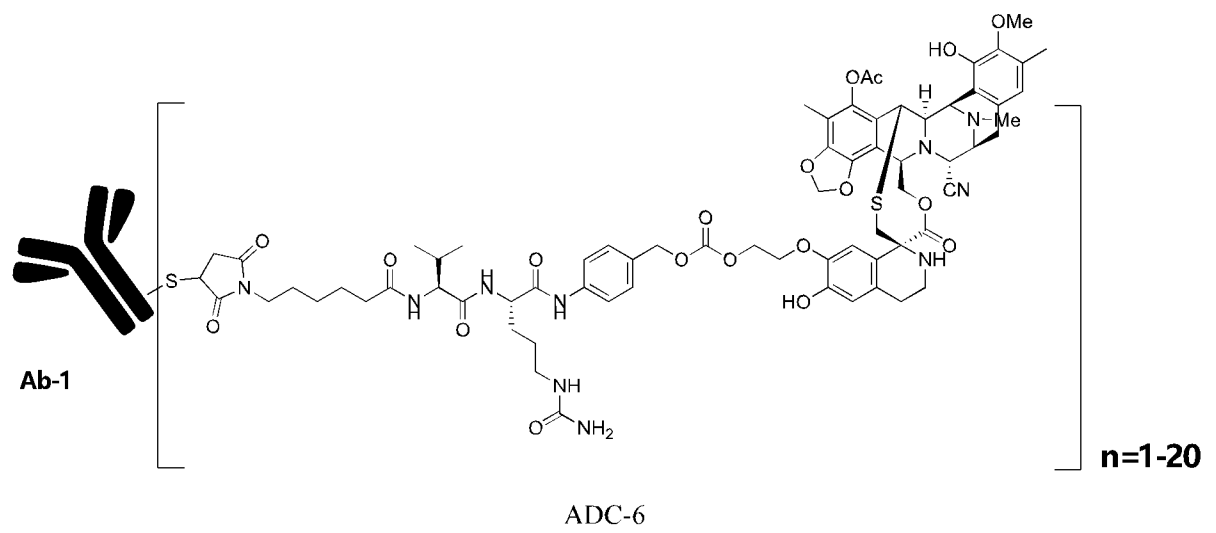
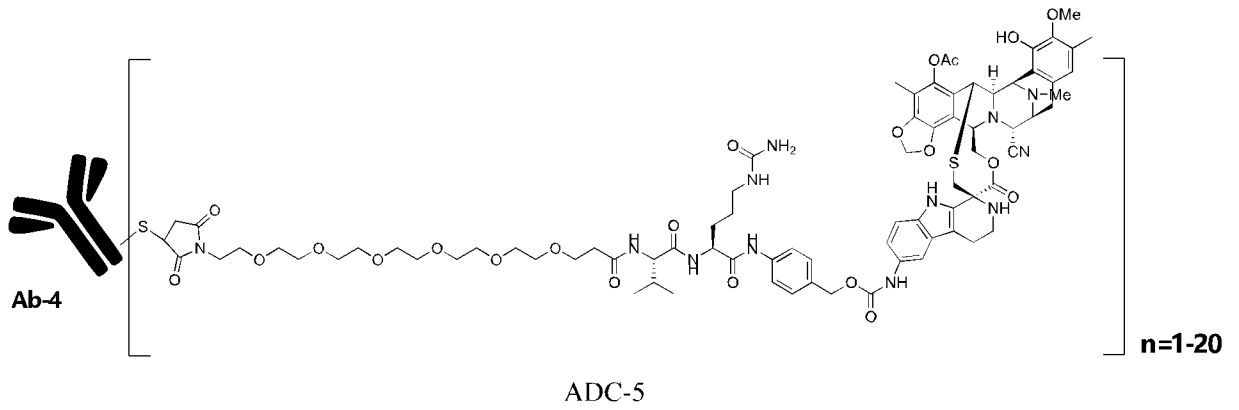
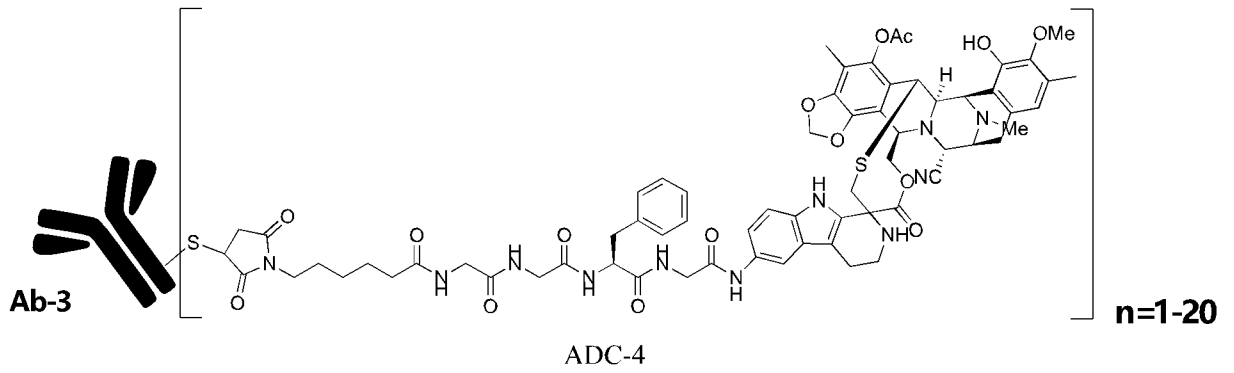
		LC: SEQ ID NO.122		
Ab-73	IgG1	HC: SEQ ID NO.60 LC: SEQ ID NO.123	PBS (pH 7.4)	1.21
Ab-74	IgG1	HC-1: SEQ ID NO.136 HC-2: SEQ ID NO.137 LC-1: SEQ ID NO.69 LC-2: SEQ ID NO.139	PBS (pH 7.4)	

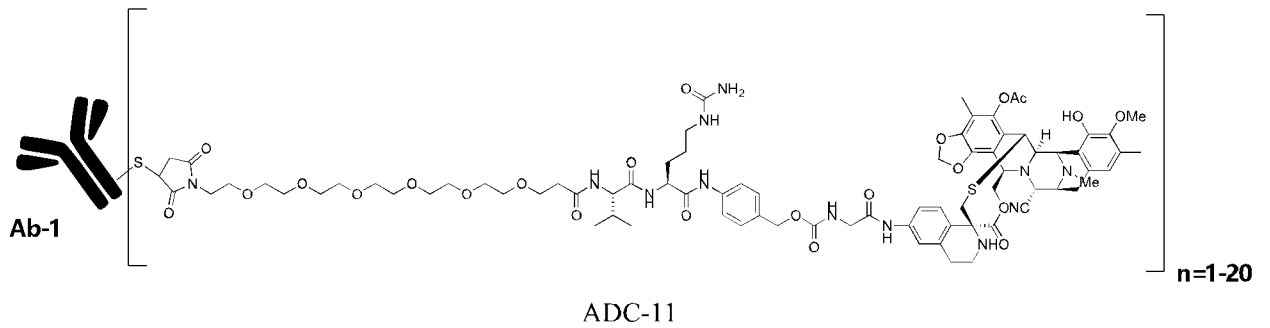
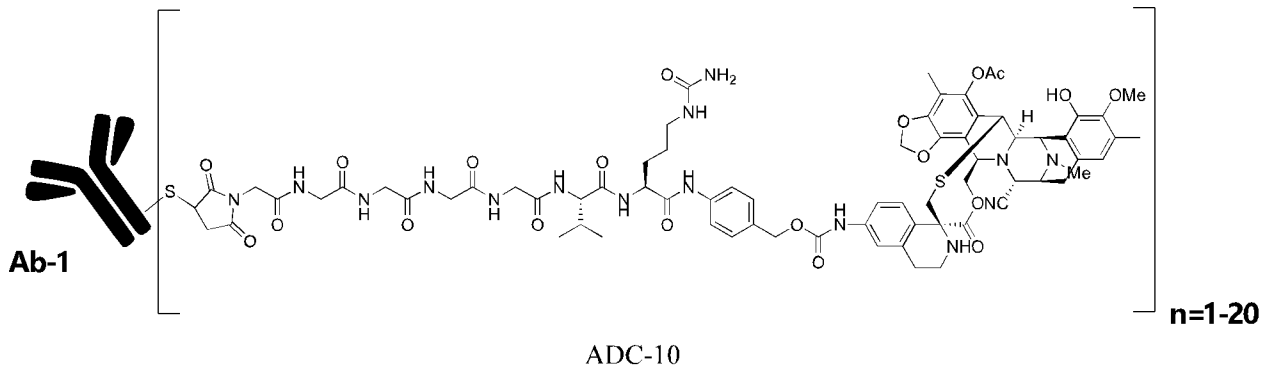
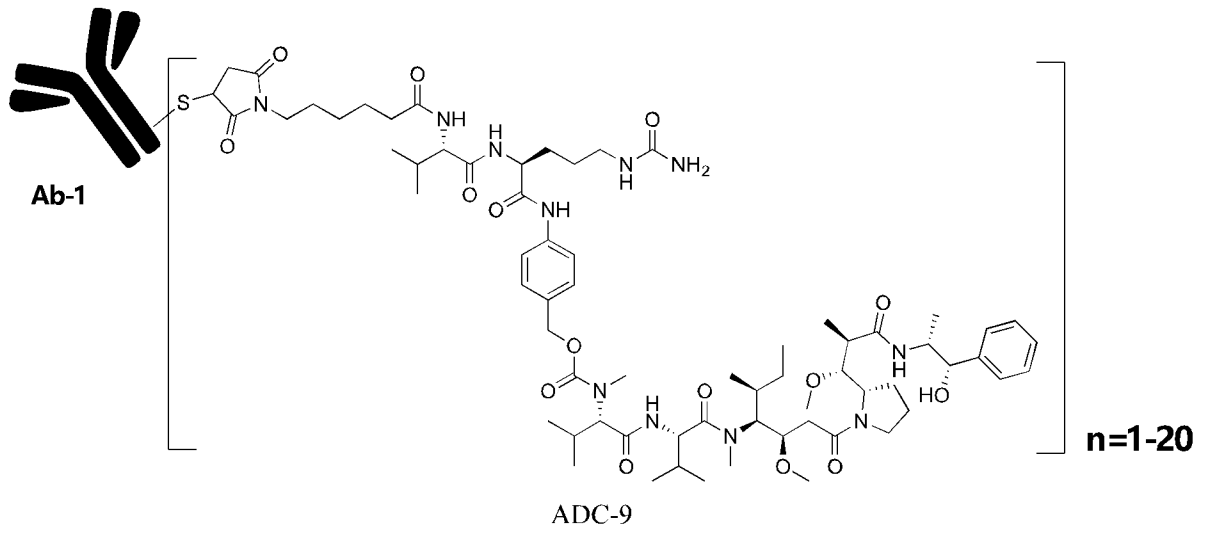
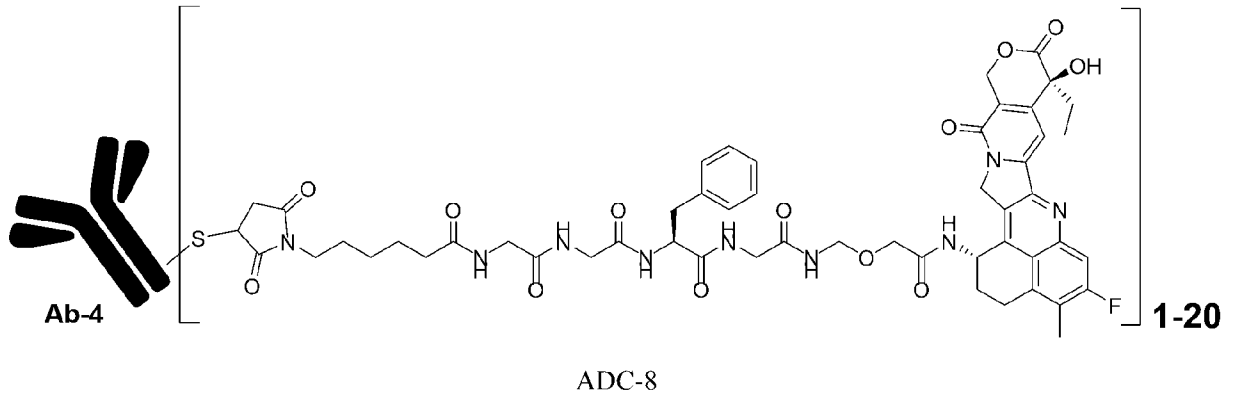
图 9 示出嵌合抗体突变体或人源化抗 hROR1 抗体与成熟 hROR1 全长胞外区的 ELISA 结合活性。

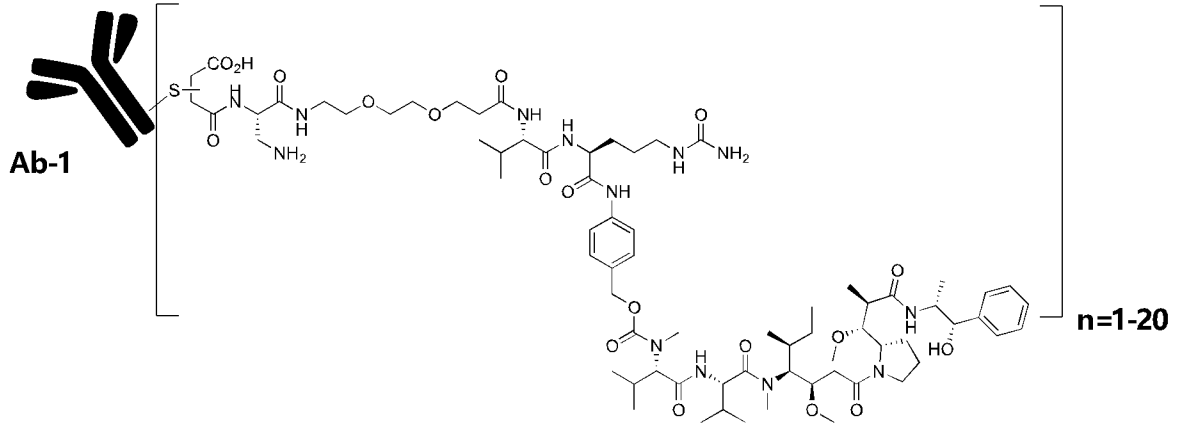
实施例 8. 利用抗体链间二硫键和/或半胱氨酸突变位点偶联产生 ADC-1~56

通过抗体链间二硫键位点偶联 1-20 个抗肿瘤毒素分子制备如下的 ADC-1~23:

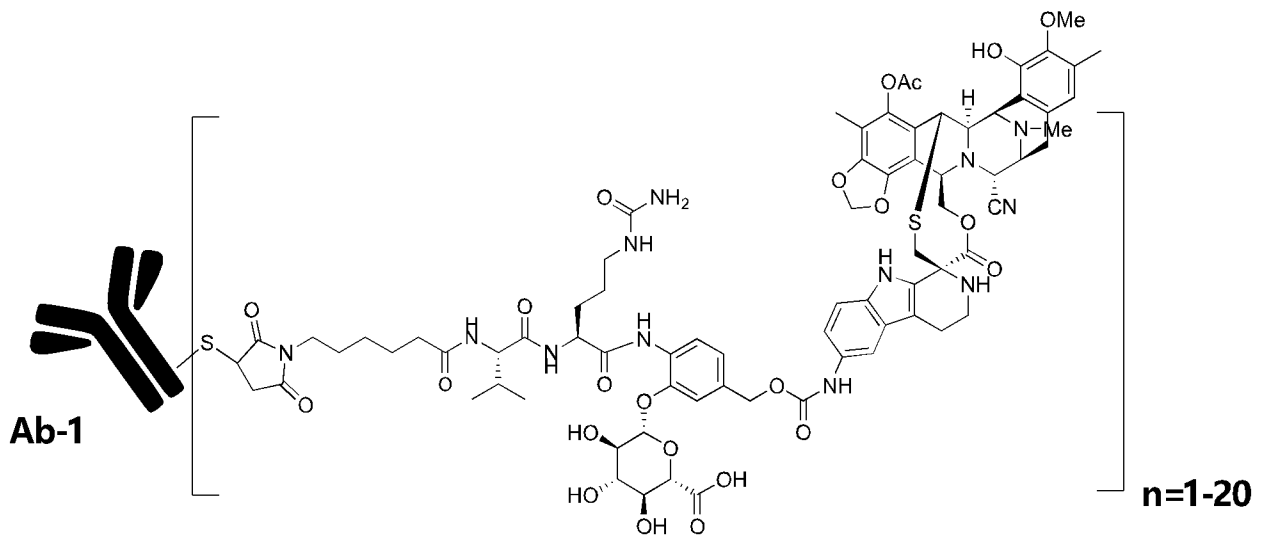




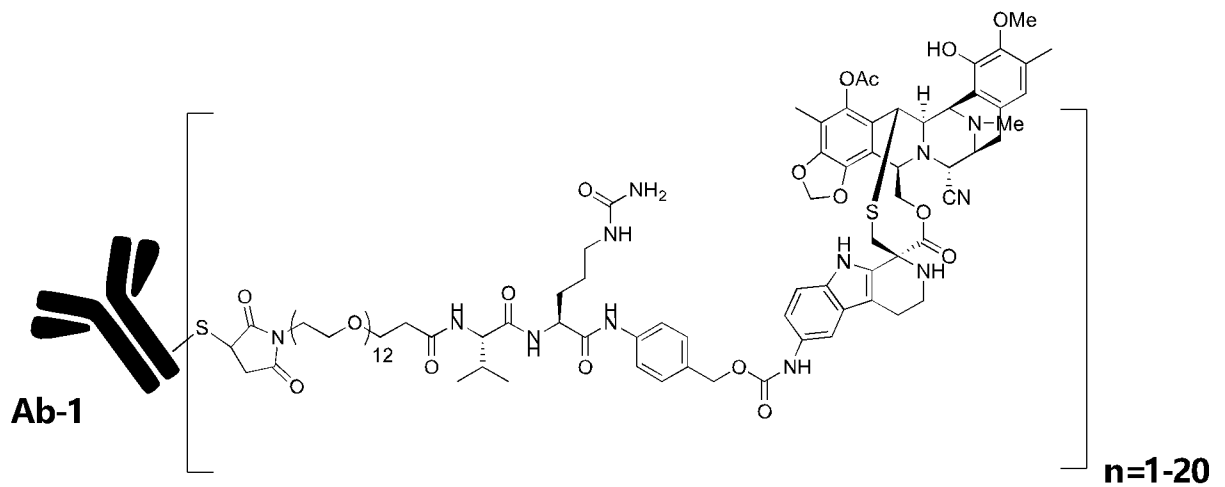




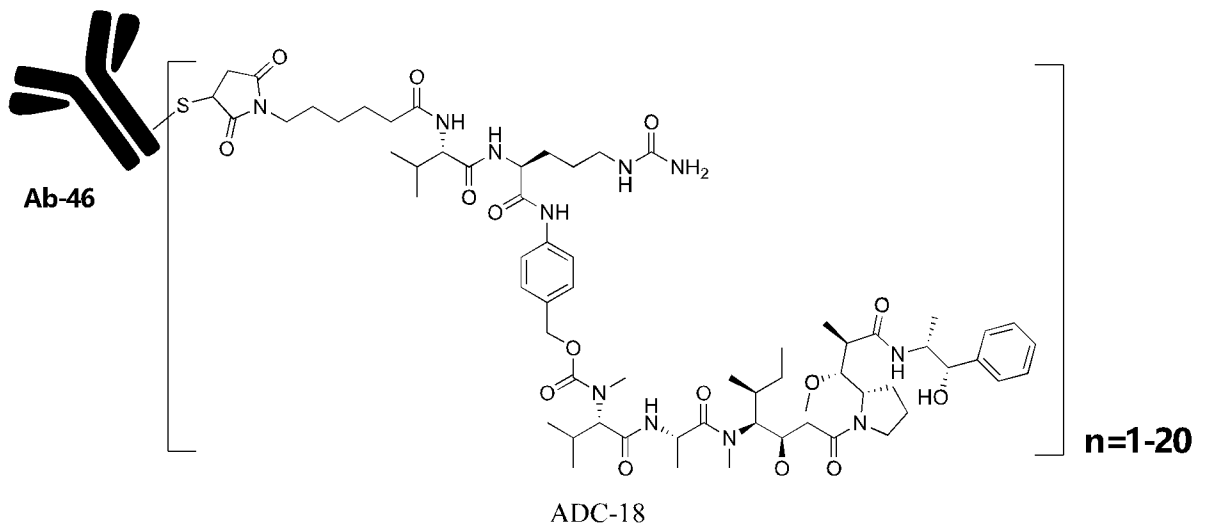
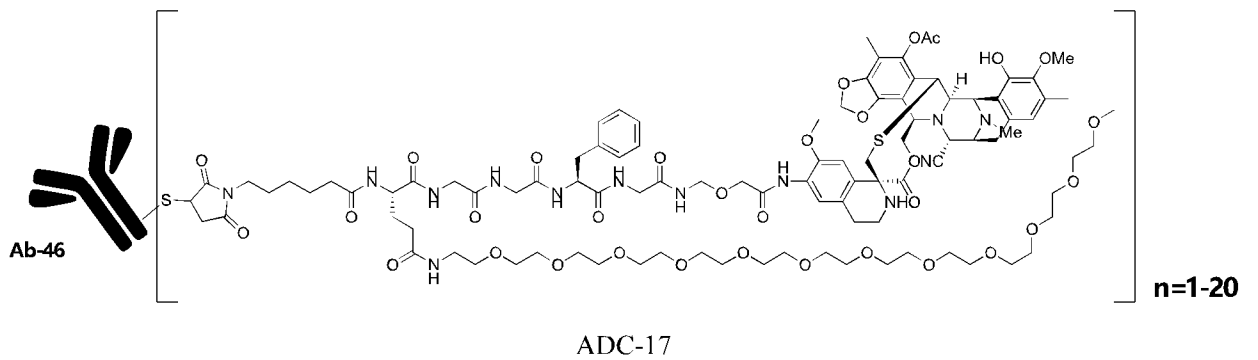
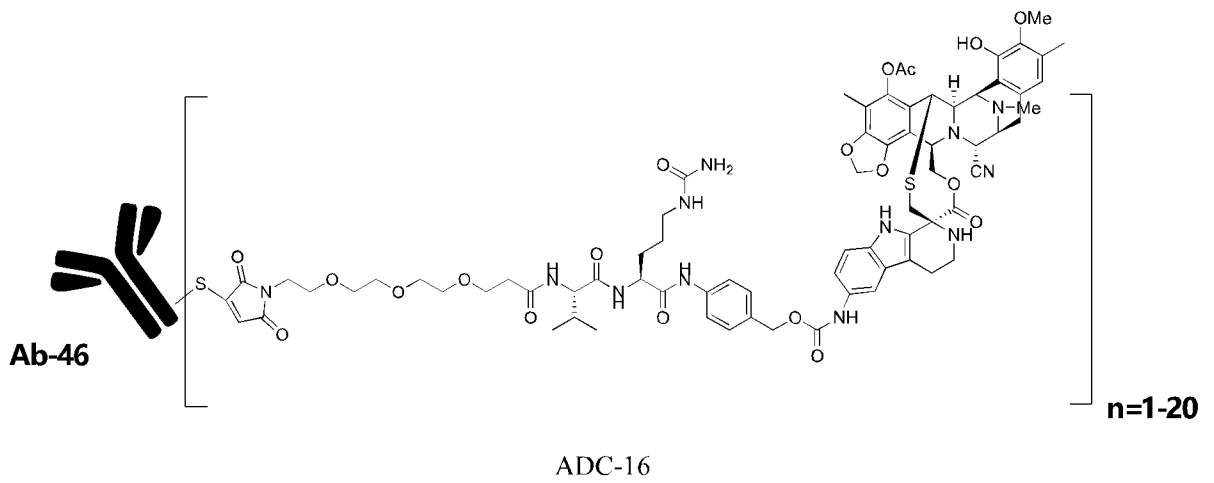
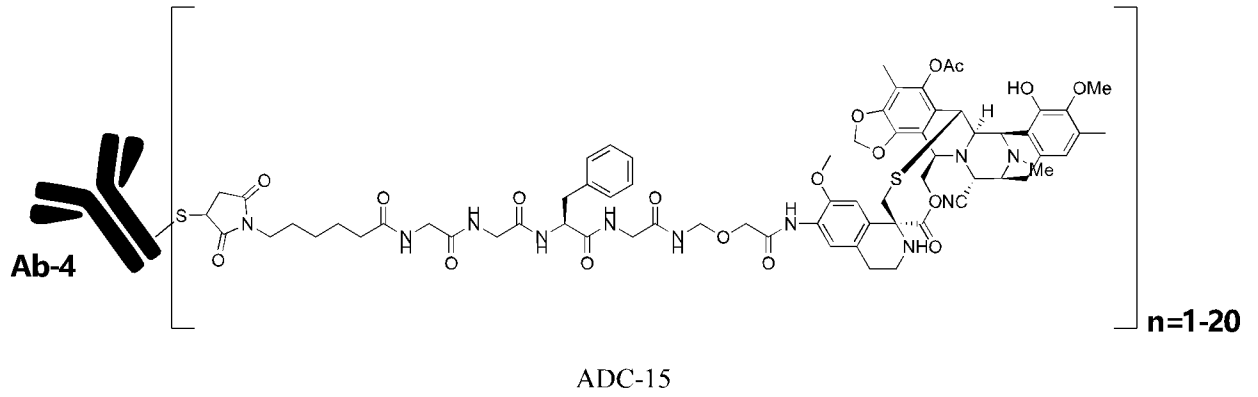
ADC-12

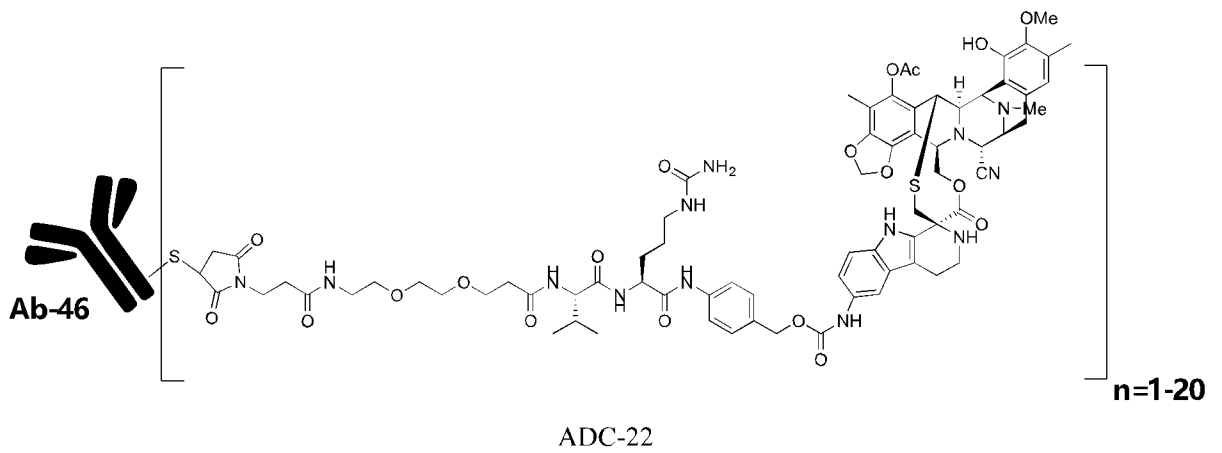
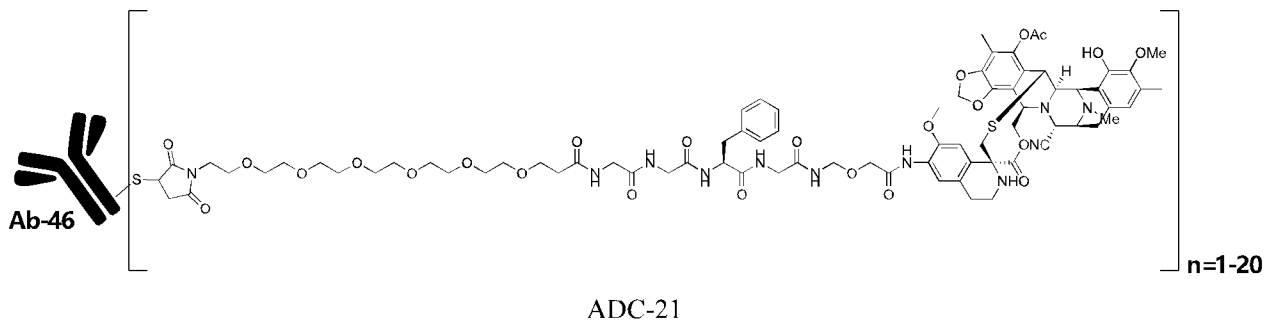
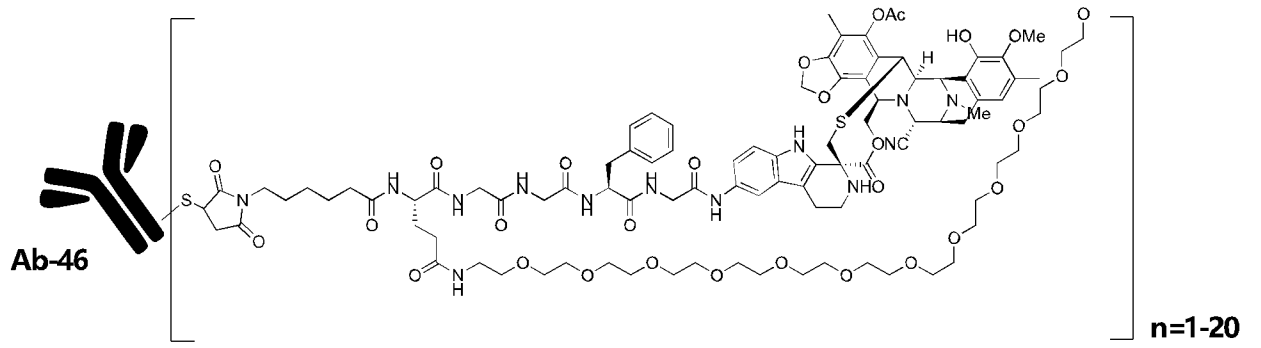
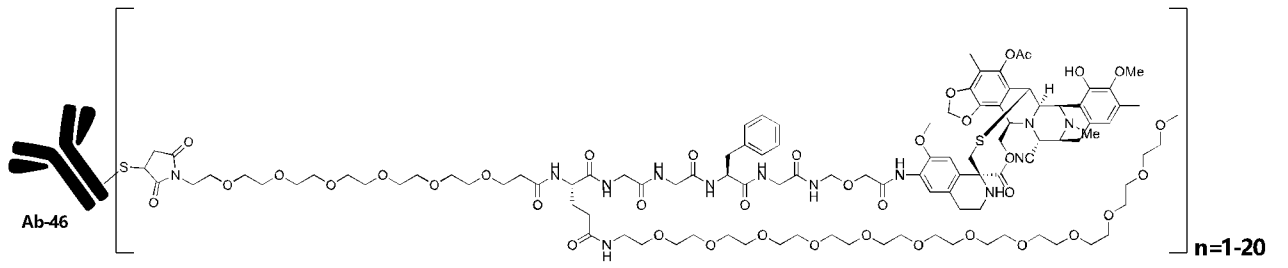


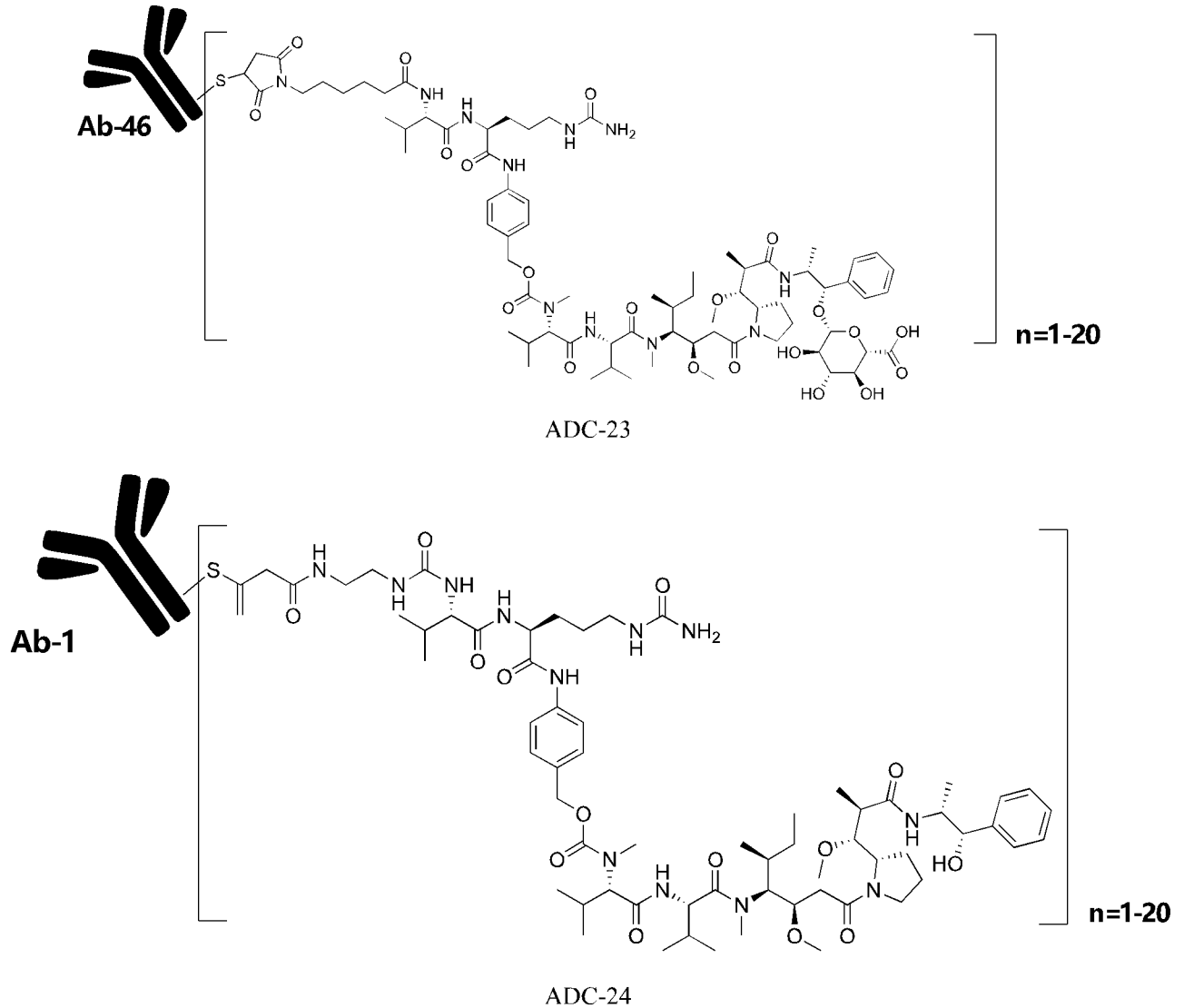
ADC-13



ADC-14







结合图 10 (A) 所示出利用抗体链间二硫键位点对应的半胱氨酸和马来酰亚胺接头制备抗体偶联药物的总体方法, 具体合成 ADC-1~23 时的偶联过程如下: 取一个 0.5ml 离心管, 加入 2 mg 抗体, 加入 30 mM His-HAC, (pH5.5) 缓冲液将抗体稀释至 5 mg/ml, 加入 100 mM EDTA 水溶液至终浓度 5 mM, 震荡混匀。按 TCEP 与抗体摩尔比 3:1 加入浓度为 2 mg/ml TCEP 水溶液, 震荡混匀后于恒温混匀仪内 20°C 孵育 1.5 小时。按化合物与抗体摩尔比 12:1 加入浓度为 10mg/ml 的连接子-毒素 DMSO 溶液, 并补充 DMSO 至最终反应体积的 20%。震荡混匀后于恒温混匀仪内 20°C 孵育 1.5 小时。完成偶联之后, 使用 300mg/mL 的葡聚糖包被活性炭 (厂家: Sigma) 去除游离小分子。最后用超滤管将 ADC 储存缓冲液置换为 50 mM PBS (pH7.2), -80°C 冷冻保存备用。

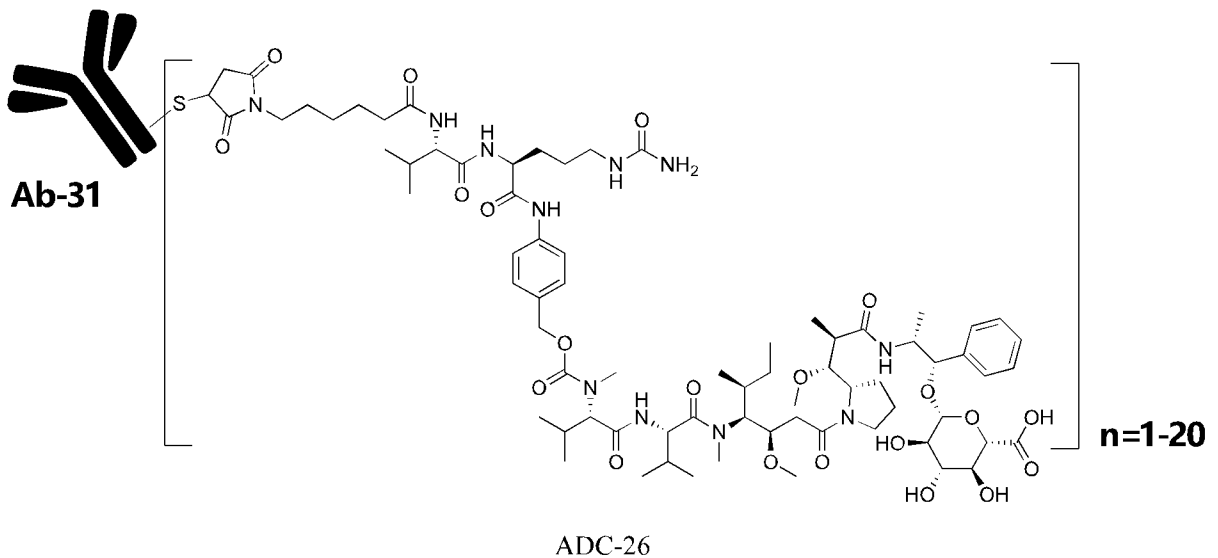
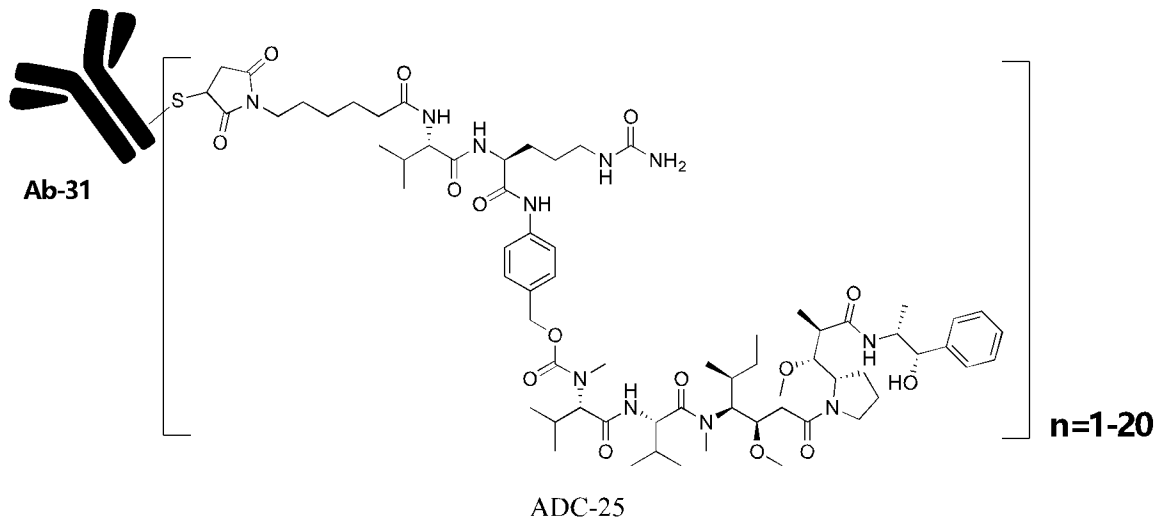
结合图 10 (B) 所示出利用抗体链间二硫键位点对应的半胱氨酸和连烯接头制备抗体偶联药物的总体方法, 具体合成 ADC-24 时的偶联过程如下: 取一个 0.5ml 离心管, 加入 2 mg 抗体, 加入 25mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 25mM NaCl, 1mM DTPA (pH7.4) 缓冲液将抗体稀释至 10 mg/ml, 按抗体摩尔数的 2~15 倍加入一定体积的 TCEP 或 DTT 水溶液, 震荡混匀后于恒温混匀仪内 20°C 孵育 2-24 小时。按抗体摩尔数的 4~24 倍加入一定体积的毒素-连接子溶液。震荡混匀后于恒温混匀仪内 20°C 孵育 0.5-24 小时。完成偶联之后, 停止反应并纯化 ADC。

结合图 10 (A) 和图 10 (C) 示出抗体偶联药物的总体制备方法, 通过抗体链间二硫键和/或半胱氨酸突变位点偶联 1-20 个抗肿瘤毒素分子制备如下的 ADC-25~56。

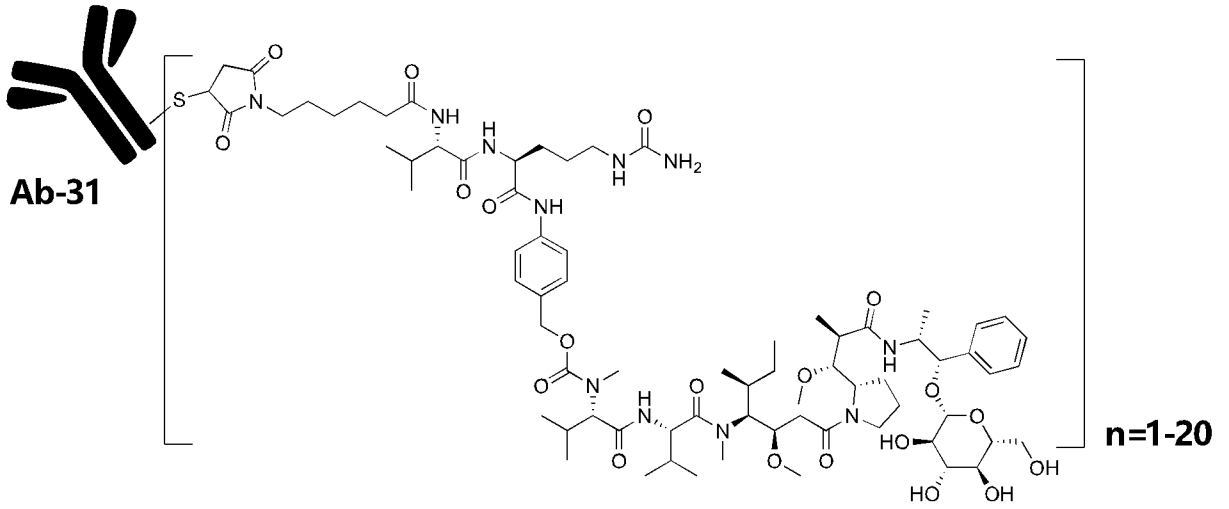
取一个 0.5ml 离心管, 加入 2 mg 抗体, 加入 30 mM His-HAC, (pH5.5) 缓冲液将抗体稀释至 5 mg/ml, 加入 100 mM EDTA 水溶液至终浓度 5 mM, 震荡混匀。按 TCEP 与抗体摩尔比 3 :1 加入浓度为 2 mg/ml TCEP 水溶液, 震荡混匀后于恒温混匀仪内 20°C 孵育 1.5 小时。或用脱盐柱将抗体缓冲液置换为 2 mM EDTA,

100mM Tris-HCl (pH 8.0)。取一个 1.5 ml 离心管，加入 1 mg 抗体，按照 DTT 与抗体摩尔比 20:1-100:1 加入浓度为 100 mM DTT 水溶液，移液器吹打混匀后于恒温混匀仪内 22°C 孵育过夜。按化合物与抗体摩尔比 12:1 加入浓度为 10mg/ml 的连接子-毒素 DMSO 溶液，并补充 DMSO 至最终反应体积的 20%。震荡混匀后于恒温混匀仪内 20°C 孵育 1.5 小时。完成偶联之后，使用 300 mg/mL 的葡聚糖包被活性炭（厂家：Sigma）去除游离小分子。最后用超滤管将 ADC 储存缓冲液置换为 50 mM PBS (pH7.2)，-80°C 冷冻保存备用。

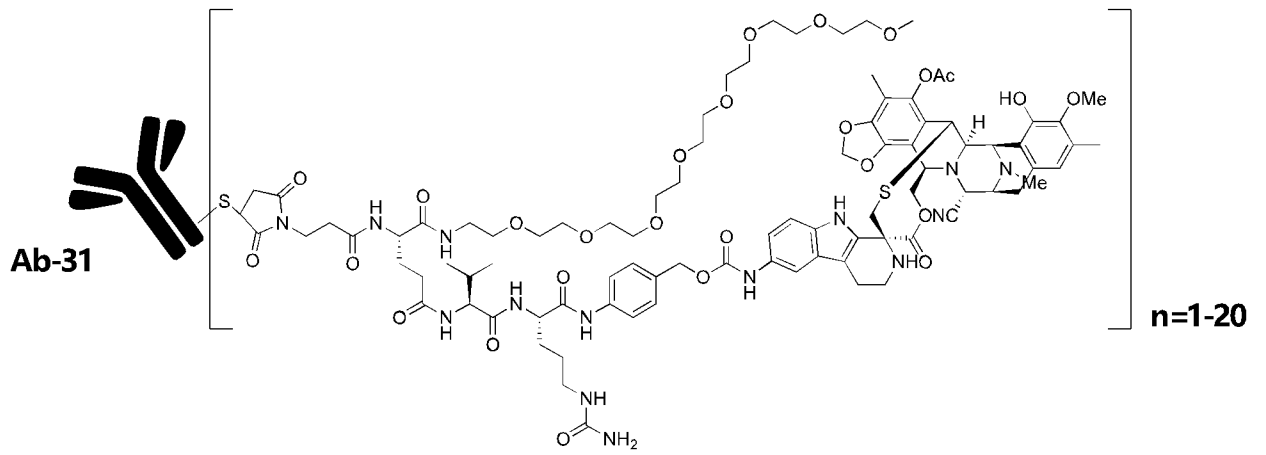
或用脱盐柱将抗体缓冲液置换为 2 mM EDTA，100mM Tris-HCl (pH 8.0)。取一个 1.5 ml 离心管，加入 1 mg 抗体，按照 DTT 与抗体摩尔比 100:1 加入浓度为 100 mM DTT 水溶液，移液器吹打混匀后于恒温混匀仪内 22°C 孵育过夜。用脱盐柱将抗体缓冲液置换为 2 mM EDTA，150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)。按 DHAA 与抗体摩尔比 20:1 加入浓度为 100 mM DHAA DMA 溶液，移液器吹打混匀后于恒温混匀仪内 22°C 孵育 2 小时后用脱盐柱除去 DHAA, 将抗体缓冲液置换为 150 mM NaCl，50 mM Tris-HCl (pH 7.5)。按化合物与抗体摩尔比 6 : 1 加入浓度为 10 mg/ml 的连接子-毒素 DMA 溶液，并补充 DMA 至最终反应体积的 10%。震荡混匀后于恒温混匀仪内 20°C 孵育 4 小时。完成偶联之后，用脱盐柱除去游离小分子，将 ADC 储存缓冲液调整为 50mM His-HAC (pH5.5)，-80°C 冷冻保存备用。



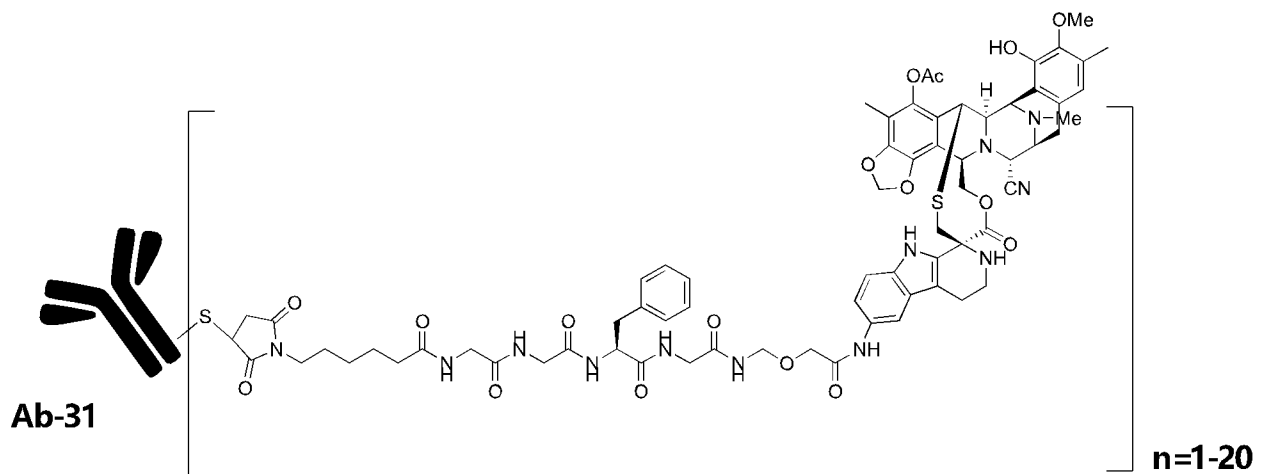




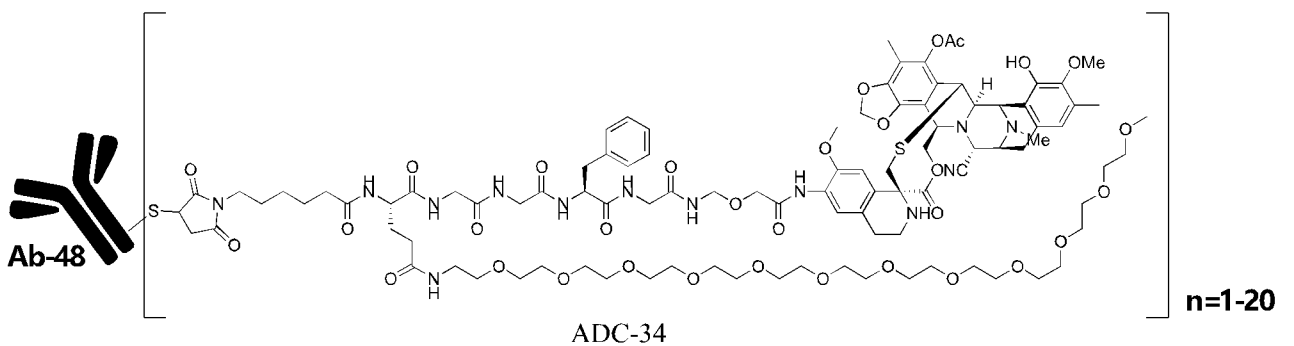
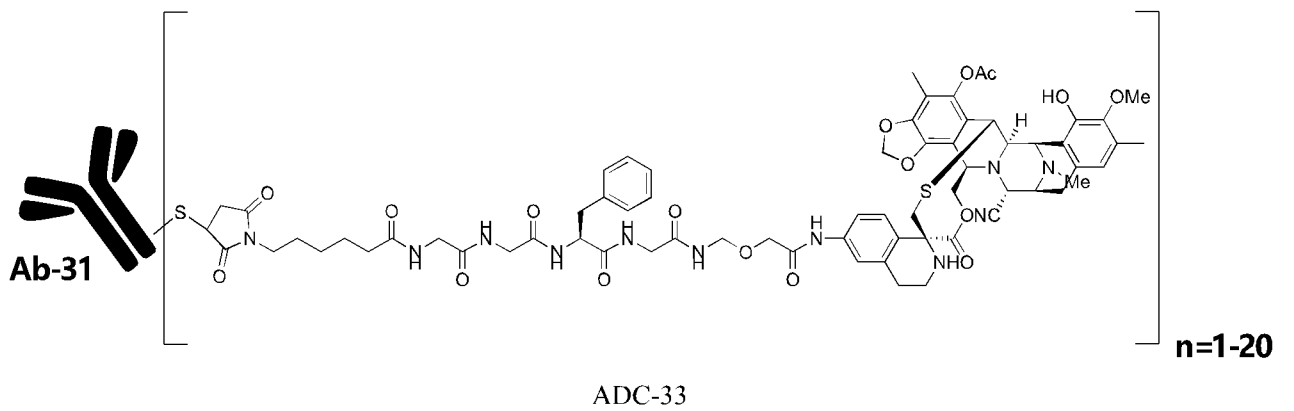
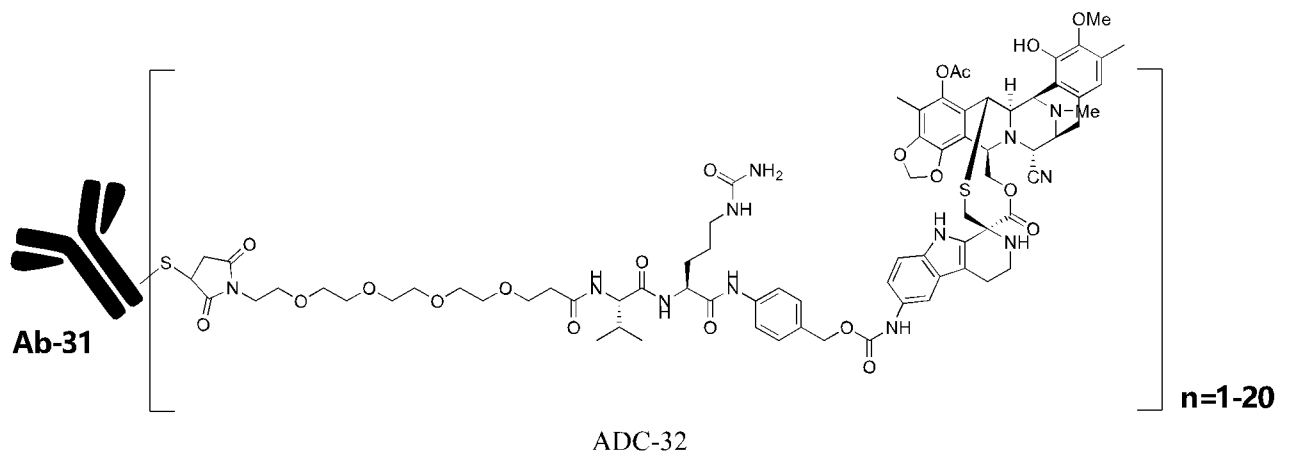
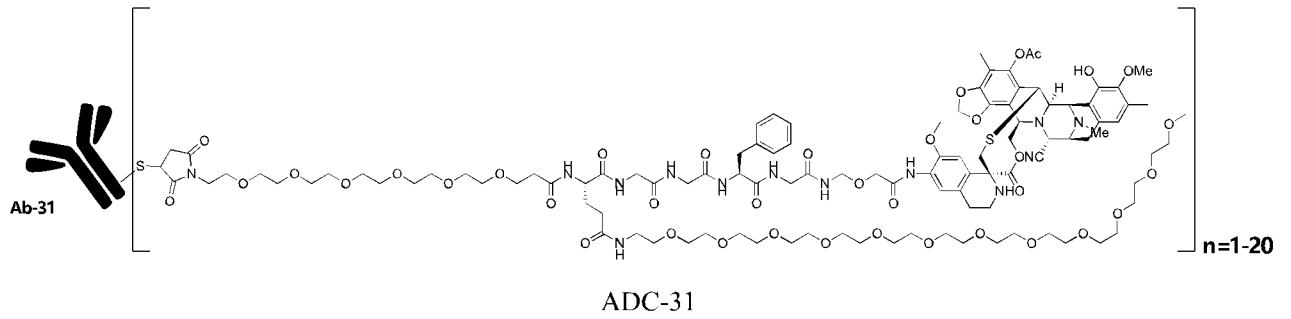
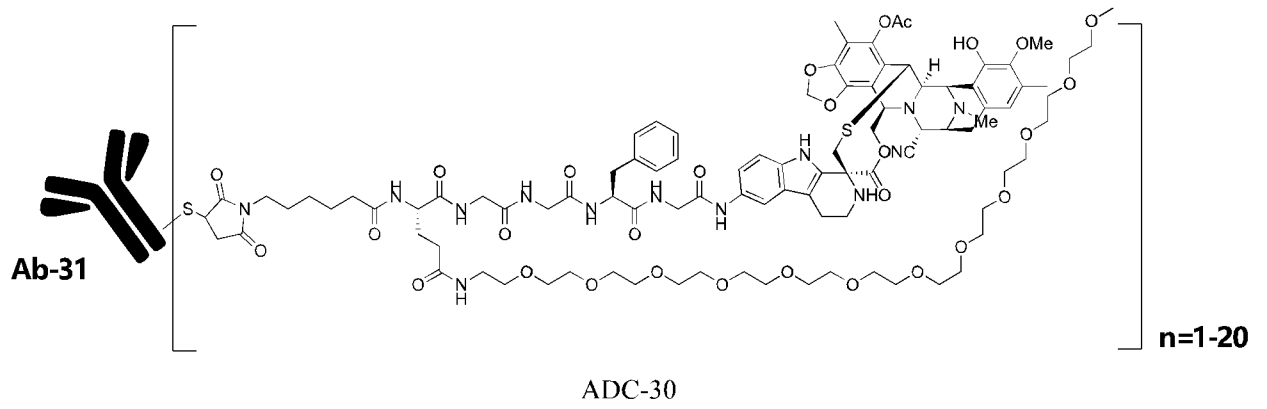
ADC-27

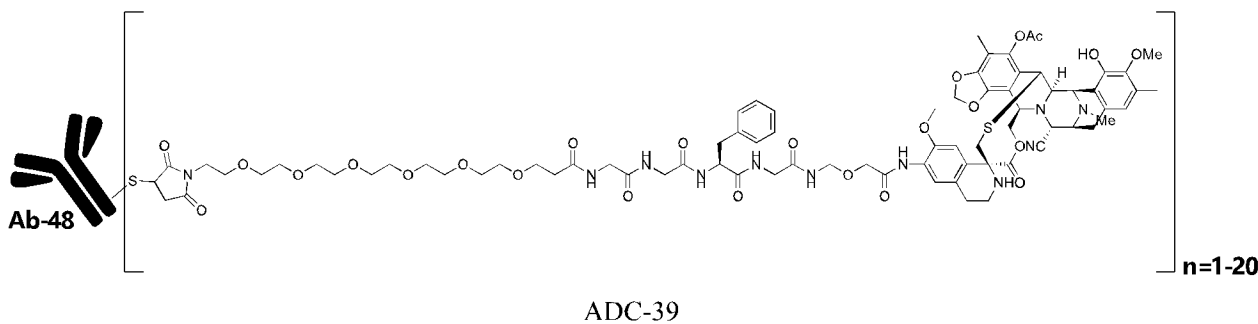
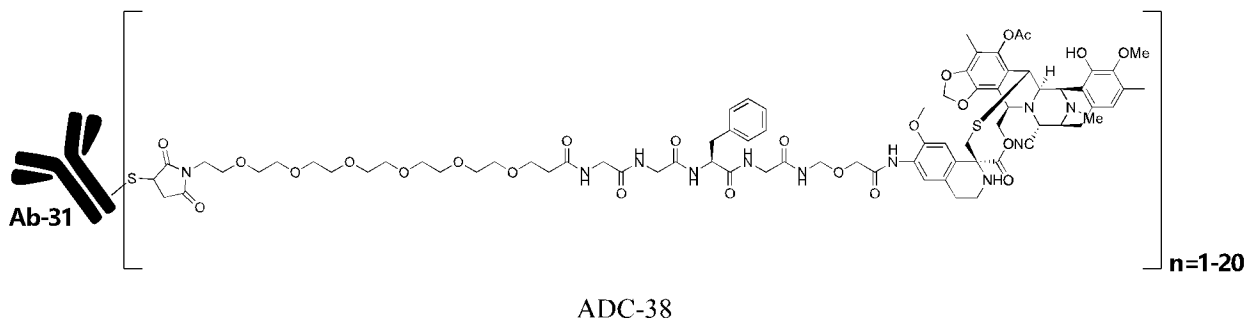
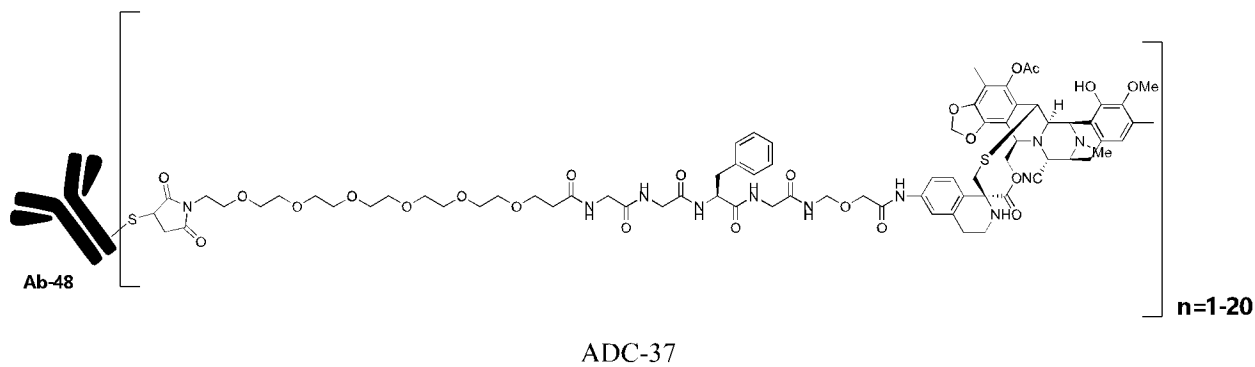
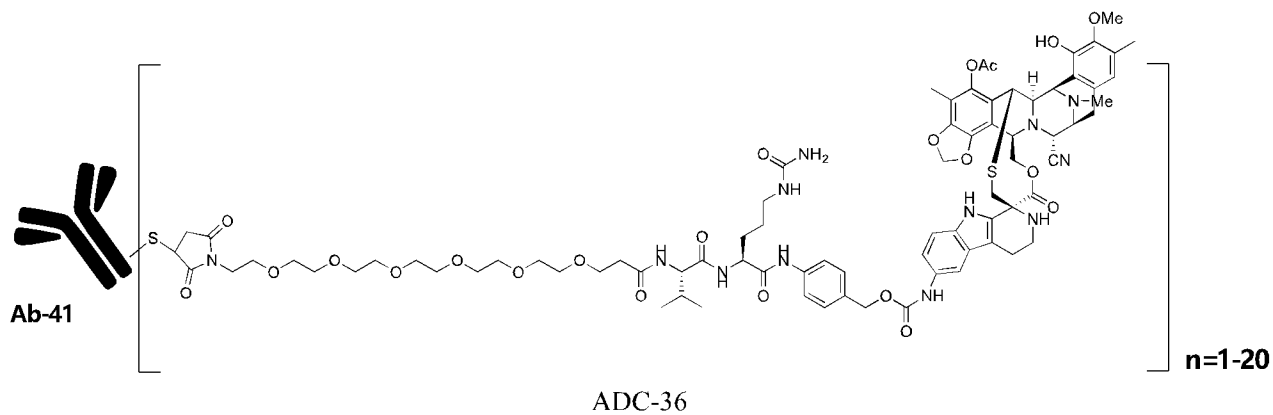
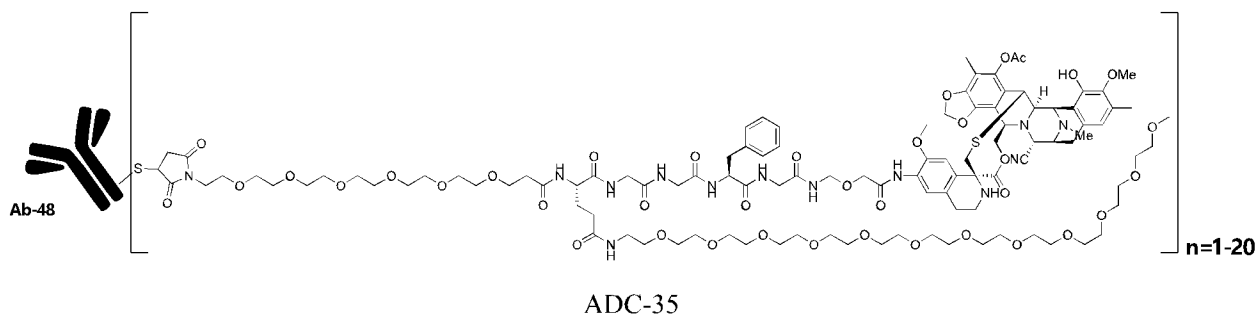


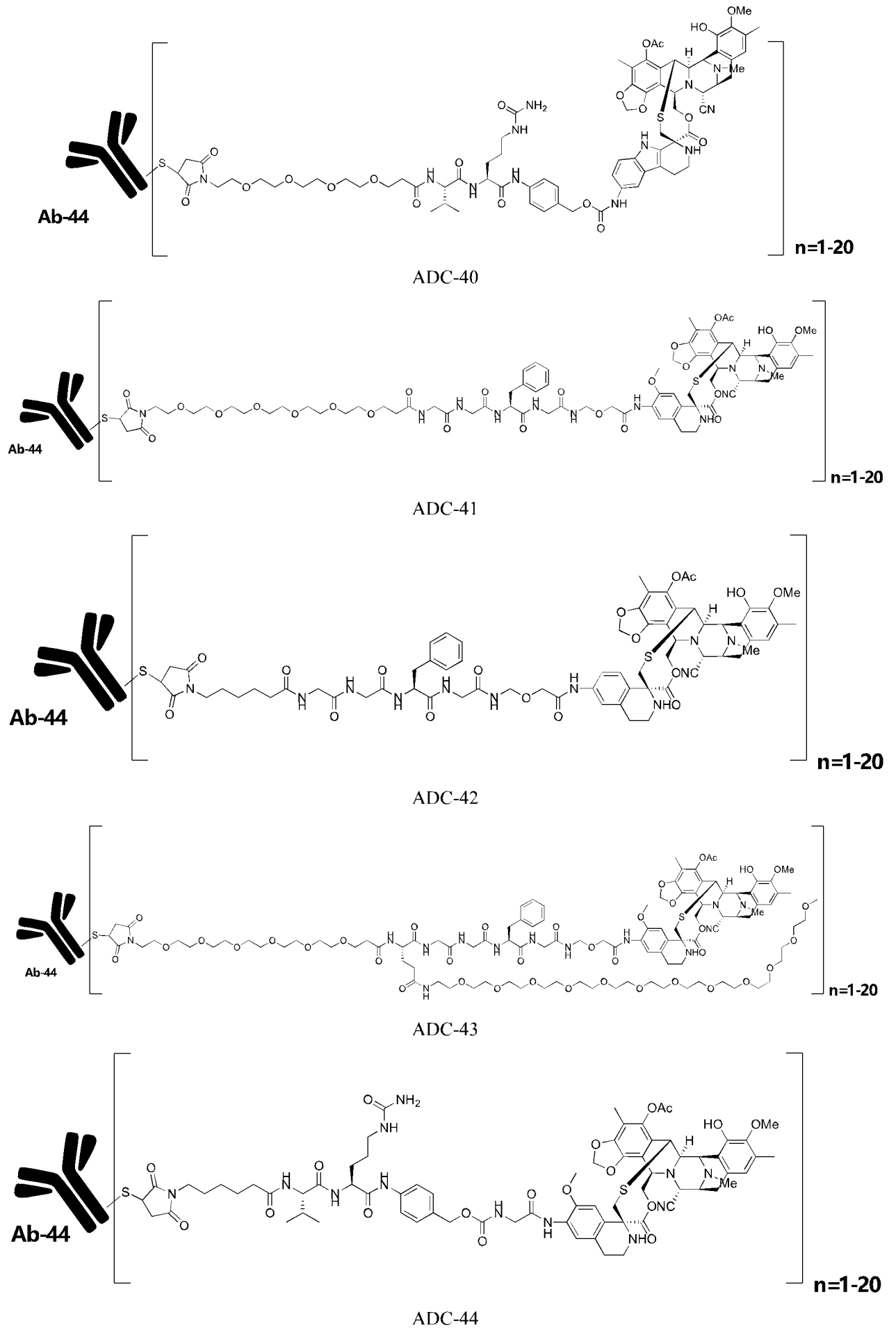
ADC-28

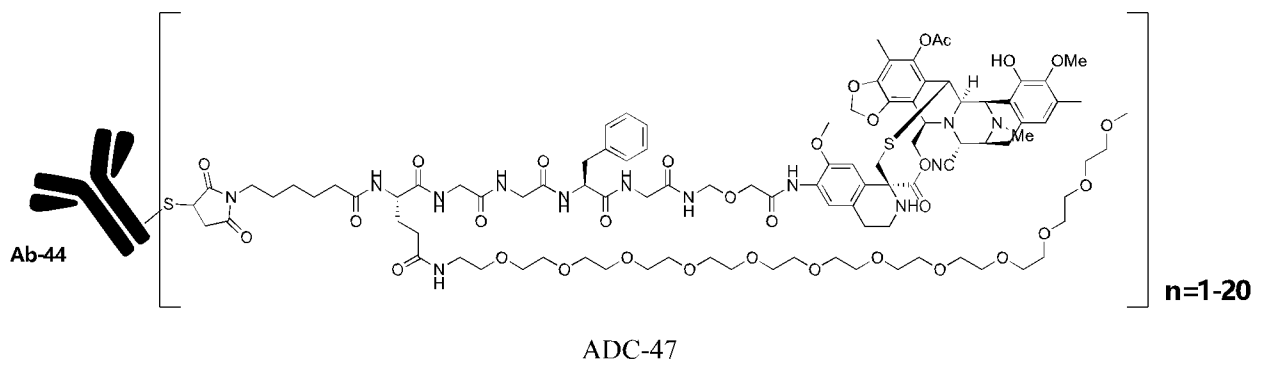
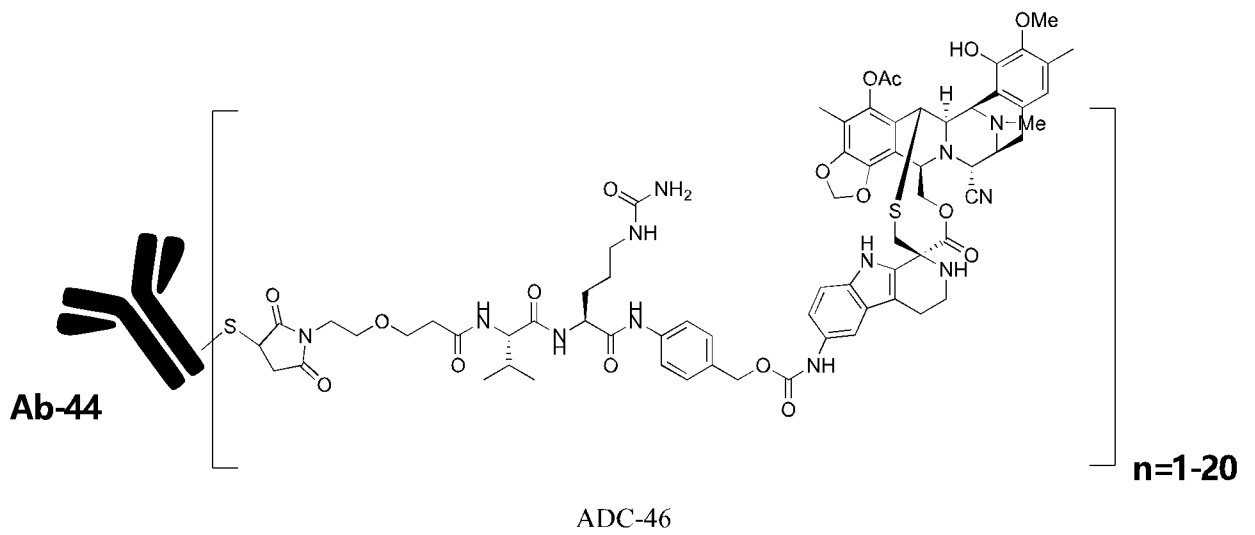
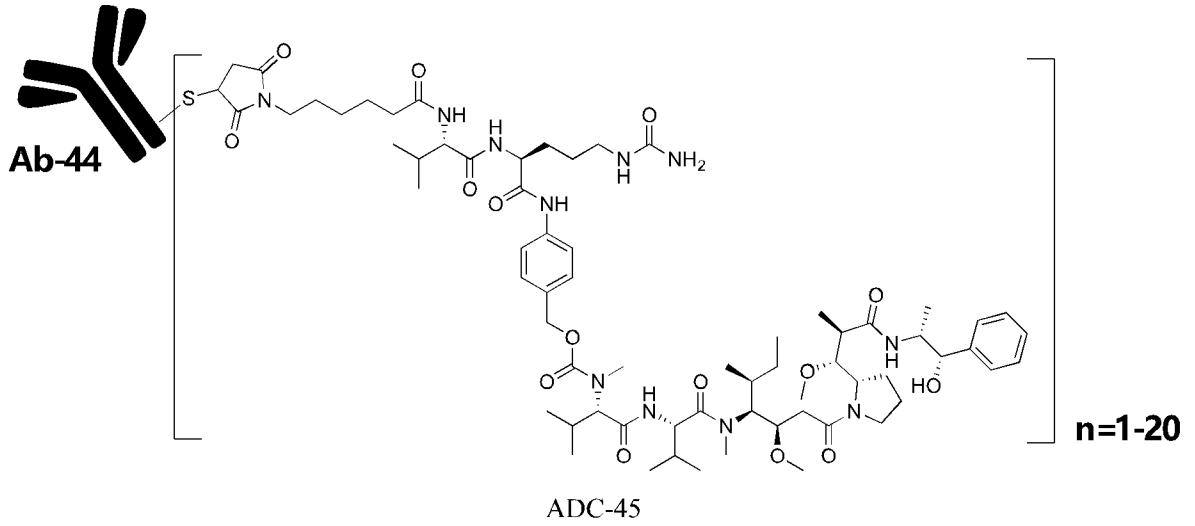


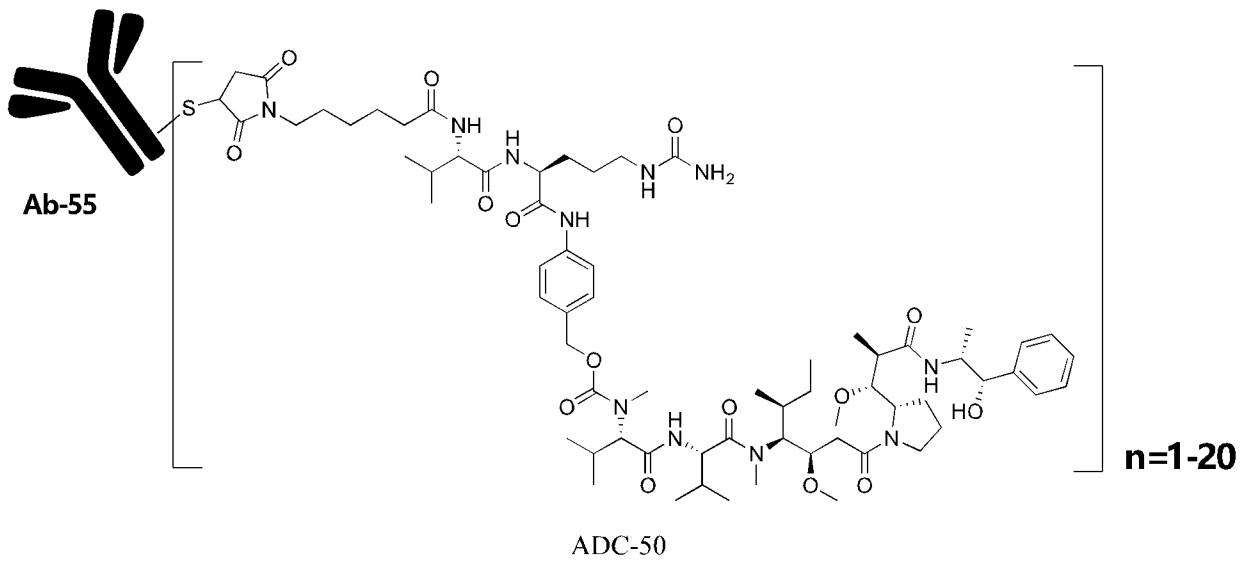
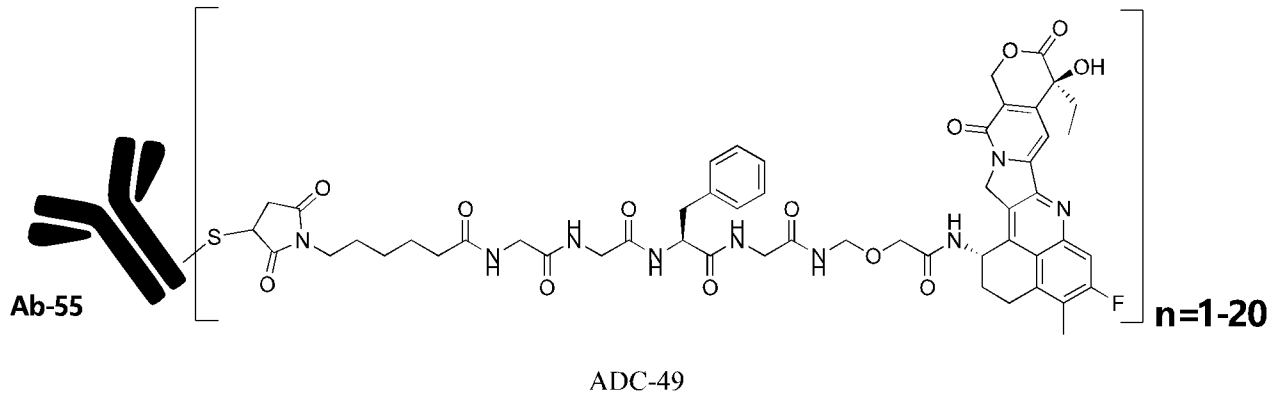
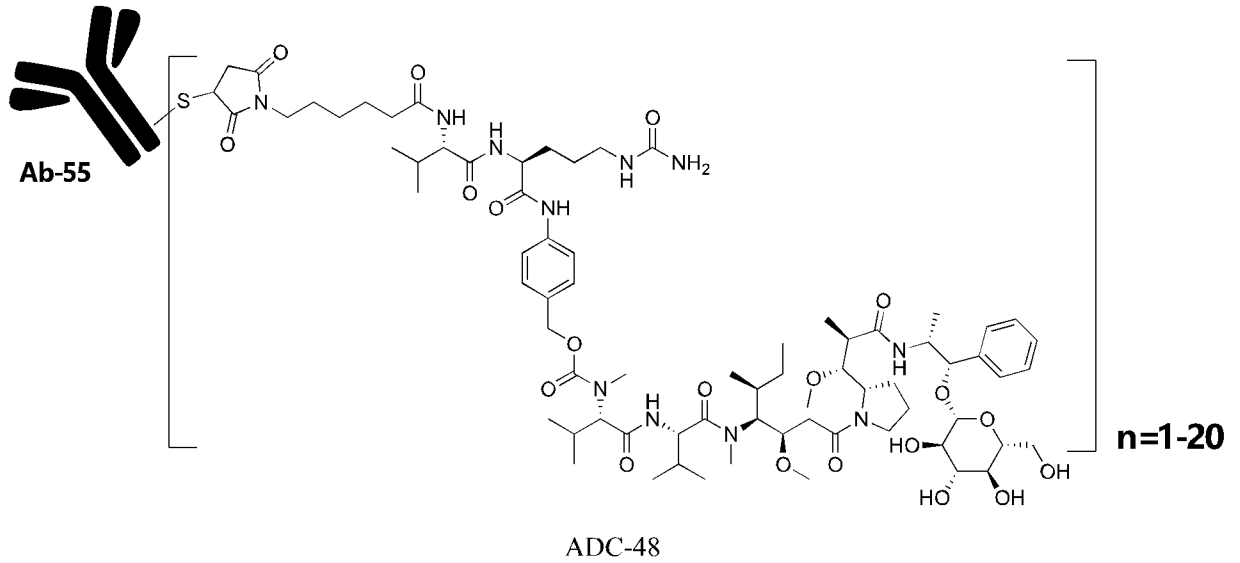
ADC-29

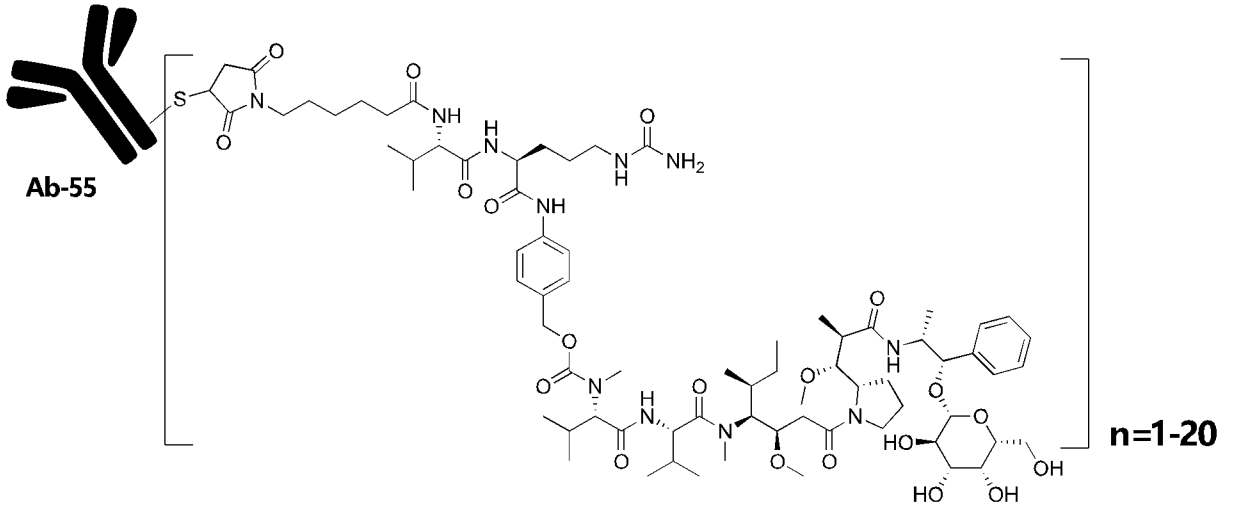




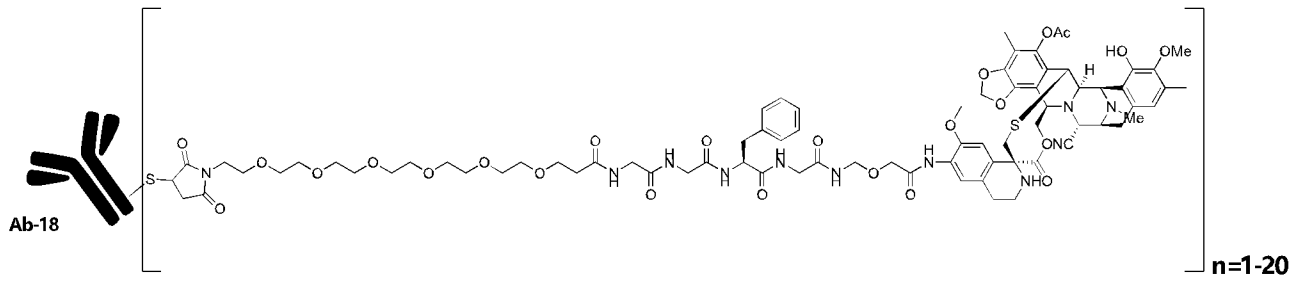




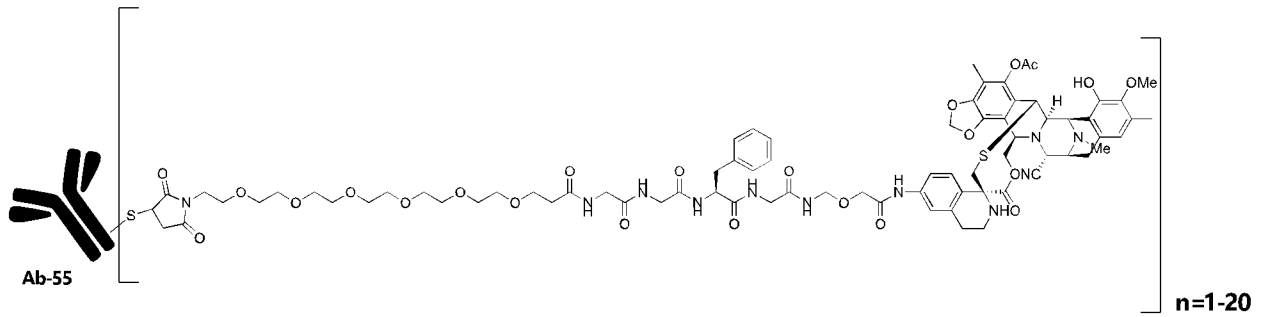




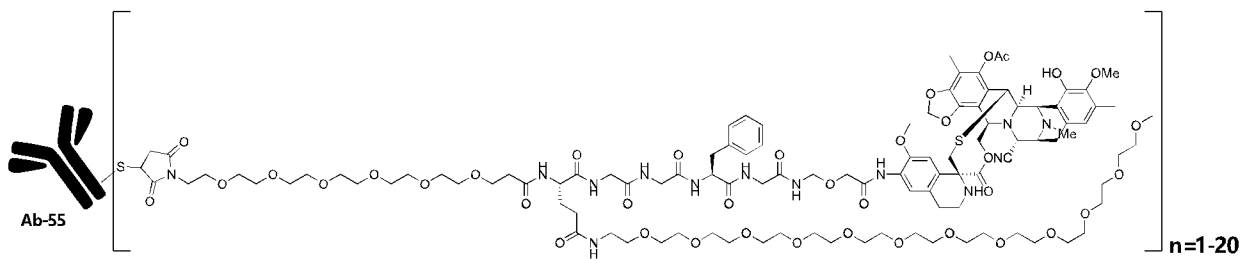
ADC-51



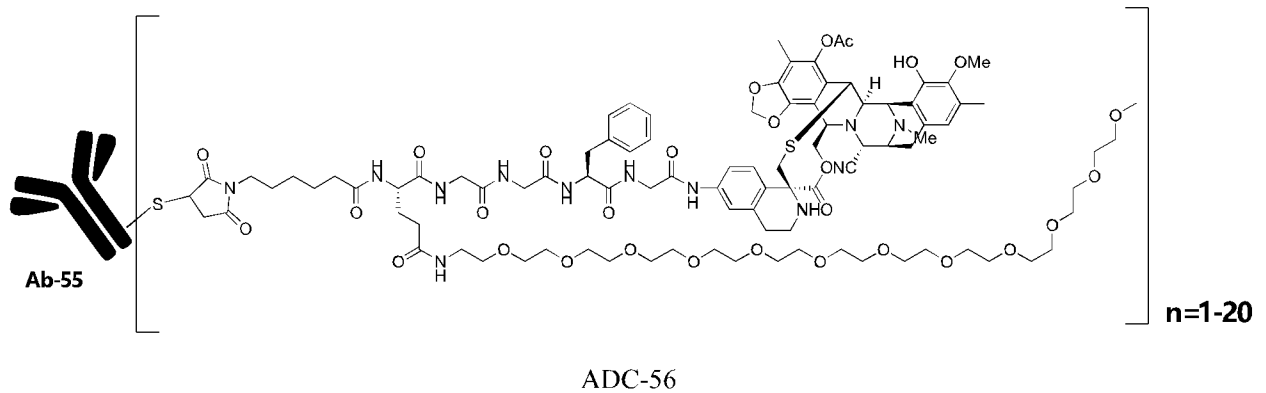
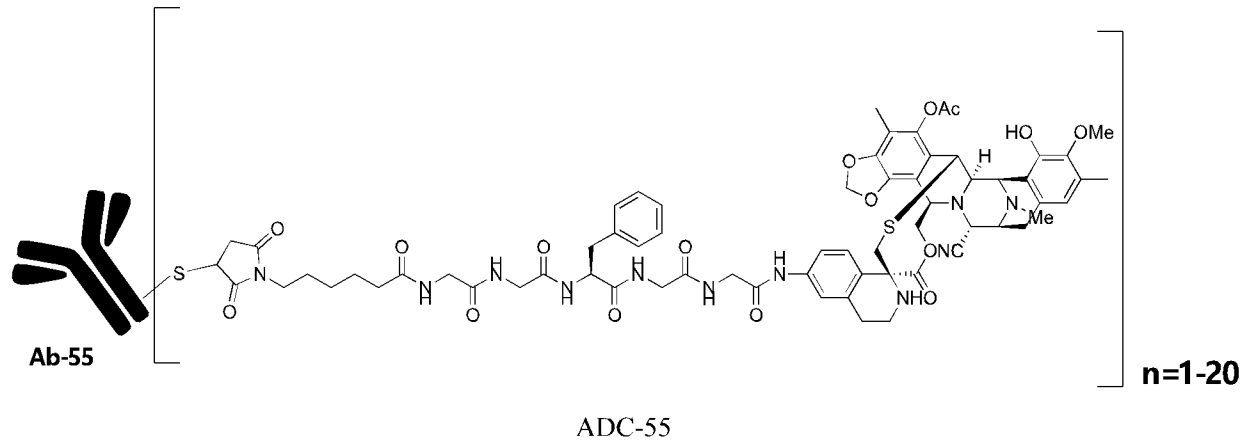
ADC-52



ADC-53



ADC-54



#### 实施例 9. 基于抗 ROR1 抗体的 ADC 的体外细胞毒性检测

将  $1.5 \times 10^3$  个细胞接种在 96 孔板里(排除 PBS 填充的边缘孔)。细胞培养在  $80 \mu\text{L}$  补充了 10%FBS(v/v)、100U/mL 青霉素和 100mg/mL 链霉素的 DMEM 中, 并且在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的加湿培养箱中过夜培养。在恒温培养箱中孵育一天后, 取稀释好的溶液(每孔  $20 \mu\text{L}$ )添加至各孔, 使最终 ADC 浓度范围为 0.01 nM~1000 nM。与细胞共孵育( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ )五天后, 将 96 孔板从培养箱中取出并平衡至室温。大约 30min 之后, 在每个孔加入  $40 \mu\text{L}$  的 CellTiter-Glo®(Promega, G7572)。将板在 450rpm 振荡 5min, 不振荡平衡 10min 之后, 使用 SpectraMax i3X 酶标仪测定荧光值。用 Graphpad Prism 软件拟合发光对 ADC 浓度(nM)的曲线。利用 Prism 软件的内置“log(抑制剂)对反应-可变斜率(4 个参数)”功能确定 IC<sub>50</sub> 值。

图 11 (A-C)示出浓度范围为 0.01~1000 nM 的所选抗 ROR1 ADC 在人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 上的细胞毒性。(D) 示出浓度范围为 0.01~1000 nM 的所选抗 ROR1 ADC 在人肉瘤细胞 Saos2 上的细胞毒性。(E) 示出浓度范围为 0.01~1000 nM 的所选抗 ROR1 ADC 在肉瘤细胞 SK-UT-1 上的细胞毒性。

#### 实施例 10. 在 hROR1 阳性人卵巢癌 PA-1 细胞建立的卵巢癌模型中评价抗 hROR1 ADC 的体内效力。

在研究第 0 天将每只称重至少 20g 的 8-12 周龄小鼠, 用 PA-1 卵巢癌肿瘤细胞接种 ( $5 \times 10^6$  个细胞/动物, 1:1 添加基质胶, 在  $100 \mu\text{L}$  PBS 中)。在转接后的第 21 天将配制于 PBS 中的 ADC 以 3mg/kg 施用(i.v.)至 6 只小鼠的组。PBS 做为阴性载体对照(vehicle control)。所有处理组均为尾静脉注射, 注射体积为 5L/kg, 每周一次, 共三周。通过测量肿瘤体积大小, 考察肿瘤生长是否被抑制、延缓或治愈。每周用卡尺测量 2 次肿瘤大小, 将各组中小鼠的平均肿瘤体积随时间作图。体积单位用  $\text{mm}^3$  表示, 公式如下:  $V = 0.5 a \times b^2$ , 其中 a 和 b 分别为肿瘤的长径和短径。实验动物的使用及福利将遵照国际实验动物评估和认可委员会(AAALAC)的规则执行。

图 12 示出在用 hROR1 阳性 PA-1 细胞注射的雌性 balb/c nude 小鼠中的卵巢癌异种移植模型中 ADC-41, DAR4 的抗肿瘤效力。

本发明中的实施例仅用于对本发明进行说明, 并不构成对权利要求范围的限制, 本领域内技术人员可以想到的其他实质上等同的替代, 均在本发明保护范围内。



## 权利要求书

- 1.分离的抗原结合蛋白，能够结合hROR1，其特征在于含有a~o任一项：
  - a.具有第一重链可变区，含有氨基酸序列为TYAMS的HCDR1，氨基酸序列为SISSGGSTYYPDSVKG的HCDR2，氨基酸序列为YSLMVEAHWYFDV的HCDR3，
  - b.具有第二重链可变区，含有氨基酸序列为SYAMS的HCDR1，氨基酸序列为SISSGGSTYYPDSVKG的HCDR2，氨基酸序列为GYSNYVDWYFDV的HCDR3，
  - c.具有第三重链可变区，含有氨基酸序列为DYTMH的HCDR1，氨基酸序列为GIDPNYGGTNYNEKFKD的HCDR2，氨基酸序列为DDGYEDYFDY的HCDR3，
  - d.具有第四重链可变区，含有氨基酸序列为SYWIE的HCDR1，氨基酸序列为EILPGSGNTQNNEKFKG的HCDR2，氨基酸序列为EGRSSHFFDY的HCDR3，
  - e.具有第五重链可变区，含有氨基酸序列为RYAMS的HCDR1，氨基酸序列为SISSGGSTYYPDSVKG的HCDR2，氨基酸序列为GYYGNNDWYFDV的HCDR3，
  - f.具有第一轻链可变区，含有氨基酸序列为KASQDINSYLS的LCDR1，氨基酸序列为RANRLVD的LCDR2，氨基酸序列为LQYDEFPYT的LCDR3，
  - g.具有第二轻链可变区，含有氨基酸序列为KATQDINSYLS的LCDR1，氨基酸序列为RPNRLVD的LCDR2，氨基酸序列为LQYDEFPYT的LCDR3，
  - h.具有第三轻链可变区，含有氨基酸序列为HASQGISSNIG的LCDR1，氨基酸序列为HGTLNED的LCDR2，氨基酸序列为VQYAQFPYT的LCDR3，
  - i.具有第四轻链可变区，含有氨基酸序列为KSSQSLLNSSNQKNYLA的LCDR1，氨基酸序列为FASTRES的LCDR2，氨基酸序列为QQHYSSPWT的LCDR3，
  - j.具有第五轻链可变区，含有氨基酸序列为KASQDINSYLS的LCDR1，氨基酸序列为RANSLVD的LCDR2，氨基酸序列为LQFDEFPYT的LCDR3，
  - k.具有a项所述的第一重链可变区和具有f项所述的第一轻链可变区，
  - l.具有b项所述的第二重链可变区和具有g项所述的第二轻链可变区，
  - m.具有c项所述的第三重链可变区和具有h项所述的第三轻链可变区，
  - n.具有d项所述的第四重链可变区和具有i项所述的第四轻链可变区，
  - o.具有e项所述的第五重链可变区和具有j项所述的第五轻链可变区。
- 2.如权利要求1所述的抗原结合蛋白，其特征在于具有鼠源的框架区或人源的框架区。
- 3.如权利要求2所述的抗原结合蛋白，其特征在于所述的框架区为IgG框架区。
- 4.如权利要求2所述的抗原结合蛋白，其特征在于所述的人源的框架区具有相对于鼠源的框架区的一个或多个位点的回复突变。
- 5.如权利要求1所述的抗原结合蛋白，其特征在于还具有恒定区。
- 6.如权利要求5所述的抗原结合蛋白，其特征在于所述的a~e、k~o中的任一项的重链恒定区含有C220S、A121C、V205C、K149C、D265C、S239C、A330C、S442C中的一个或多个突变。
- 7.如权利要求1所述的抗原结合蛋白，其特征在于所述的抗原结合蛋白包括抗体或其抗原结合片段。
- 8.如权利要求1所述的抗原结合蛋白，其特征在于所述的重链可变区具有S62Q、S62A、S62N、S62E、S62V、S62Y、S62F或S62K突变。
- 9.如权利要求1所述的抗原结合蛋白，其特征在于所述的轻链可变区具有G57A、G57S、G57N或G57L突变。
- 10.如权利要求1所述的抗原结合蛋白，其特征在于所述的轻链可变区具有D56E、D56Q、D56T或D56Y突变。
- 11.如权利要求1所述的抗原结合蛋白，其特征在于所述的轻链可变区具有S31A、S31Q、S31L、S31V、S31E、S31Y、S31F或S31K突变。
- 12.如权利要求1所述的抗原结合蛋白，其特征在于所述的轻链可变区具有T57A、T57Q、T57L、T57V、T57E、T57Y、T57F或T57K突变。
- 13.如权利要求1所述的抗原结合蛋白，其特征在于所述的轻链可变区具有S27A、S27Q、S27L、S27V、S27E、S27Y、S27F、S27K突变。

14.如权利要求1所述的抗原结合蛋白，其特征在于具有氨基酸序列如SEQ ID No.53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、65、73、75、78、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、90、91、92、93、134或135任一所示的重链，和氨基酸序列如SEQ ID No.64、66、67、68、70、71、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、105、106、108、109、110、112、113、114、115、116、117、119、120、121、122或123任一所示的轻链。

15.如权利要求1所述的抗原结合蛋白，其特征在于选自抗体Ab-1~5中的任一项，其中，Ab-1具有氨基酸序列如SEQ ID NO.124所示的重链，和如SEQ ID No.129所示的轻链；Ab-2具有氨基酸序列如SEQ ID NO.125所示的重链，和如SEQ ID No.130所示的轻链；Ab-3具有氨基酸序列如SEQ ID NO.126所示的重链，和如SEQ ID No.131所示的轻链；Ab-4具有氨基酸序列如SEQ ID NO.127所示的重链，和如SEQ ID NO.132所示的轻链；Ab-5具有氨基酸序列如SEQ ID NO.128所示的重链，和如SEQ ID No.133所示的轻链。

16.分离的双特异性抗原结合蛋白，能够结合hROR1，其特征在于具有：  
结合hROR1中Ig-like结构域的第一抗原结合片段，所述的第一抗原结合片段具有第一重链可变区和第一轻链可变区，其中，

所述的第一重链可变区含有氨基酸序列为TYAMS的HCDR1，氨基酸序列为SISSGGSTYYPDSVKG的HCDR2，和氨基酸序列为YSLMVEAHWYFDV的HCDR3，

所述的第一轻链可变区含有氨基酸序列为KASQDINSYLS的LCDR1，氨基酸序列为RANRLVD的LCDR2，和氨基酸序列为LQYDEFPYT的LCDR3，

结合hROR1中Kringle结构域的第二抗原结合片段，所述的第二抗原结合片段具有第四重链可变区和第四轻链可变区，其中，

所述的第四重链可变区含有氨基酸序列为SYWIE的HCDR1，氨基酸序列为EILPGSGNTQNNEKFKG的HCDR2，氨基酸序列为EGRRSHFFDY的HCDR3，

所述的第四轻链可变区含有氨基酸序列为KSSQSLNSSNQKNYLA的LCDR1，氨基酸序列为FASTRES的LCDR2，氨基酸序列为QQHYSSPWT的LCDR3。

17.如权利要求16所述的双特异性抗原结合蛋白，其特征在于具有鼠源的框架区或人源的框架区。

18.如权利要求17所述的双特异性抗原结合蛋白，其特征在于所述的框架区为IgG框架区。

19.如权利要求17所述的双特异性抗原结合蛋白，其特征在于所述的人源的框架区具有相对于鼠源的框架区的一个或多个位点的回复突变。

20.如权利要求16所述的双特异性抗原结合蛋白，其特征在于还具有恒定区。

21.如权利要求20所述的双特异性抗原结合蛋白，其特征在于所述的第一抗原结合片段的重链恒定区含有C220S、A121C、V205C、K149C、D265C、S239C、A330C、S442C中的一个或多个突变。

22.如权利要求20所述的双特异性抗原结合蛋白，其特征在于所述的第二抗原结合片段的重链恒定区含有C220S、A121C、V205C、K149C、D265C、S239C、A330C、S442C中的一个或多个突变。

23.如权利要求16所述的双特异性抗原结合蛋白，其特征在于所述的双特异性抗原结合蛋白为IgG样或非IgG样。

24.如权利要求23所述的双特异性抗原结合蛋白，其特征在于所述的IgG样抗原结合蛋白选自DVD-Ig双特异性抗原结合蛋白、IgG-scFv双特异性抗原结合蛋白或CrossMAb双特异性抗原结合蛋白。

25.如权利要求16所述的双特异性抗原结合蛋白，其特征在于具有p、q、r、s中的任一项：

p. 氨基酸序列如61所示的第一重链，和氨基酸序列如140所示的第二重链，氨基酸序列如69所示的第一轻链，氨基酸序列如141所示的第二轻链；

q. 氨基酸序列如72所示的第一重链，和氨基酸序列如137所示的第二重链，氨基酸序列如69所示的第一轻链，氨基酸序列如141所示的第二轻链；

r. 氨基酸序列如89所示的第一重链，和氨基酸序列如138所示的第二重链，氨基酸序列如69所示的第一轻链，氨基酸序列如139所示的第二轻链；

s. 氨基酸序列如136所示的第一重链，和氨基酸序列如142所示的第二重链，氨基酸序列如69所示的第一轻链，氨基酸序列如139所示的第二轻链。

26.如权利要求16所述的双特异性抗原结合蛋白，其特征在于选自抗体Ab-6~9中的任一项，其中，Ab-6形式为DVD-Ig，具有氨基酸序列如SEQ ID NO.45所示的重链，和如SEQ ID No.49所示的轻链；Ab-7形式为IgG-scFv，具有氨基酸序列如SEQ ID NO.46所示的重链，和如SEQ ID No.50所示的轻链；Ab-8形式为crossmab，具有氨基酸序列如SEQ ID NO.47所示的第一重链，和如SEQ ID No.67所示的第一轻链；氨基酸序列如SEQ ID NO.51所示的第二重链，和如SEQ ID No.69所示的第二轻链；

Ab-9形式为DVD-Ig，具有氨基酸序列如SEQ ID NO.48所示的重链，和如SEQ ID No.52所示的轻链。

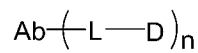
27.核酸分子，其特征在于用于编码权利要求1~15任一所述的抗原结合蛋白或用于编码权利要求16~26任一所述的双特异性抗原结合蛋白。

28.载体，其特征在于包含权利要求27所述的核酸分子。

29.细胞，包含权利要求27所述的核酸分子，和/或权利要求28所述的载体。

30.药物分子，其特征在于包含权利要求1~16任一所述的抗原结合蛋白或权利要求17~26任一所述的双特异性抗原结合蛋白。

31.如权利要求30所述的药物分子，其特征在于结构如式I所示：



式I

Ab为所述的抗原结合蛋白，L是含一个或多个接头的连接子，D为所述的治疗剂或可检测标记物，n选自1-20的整数。

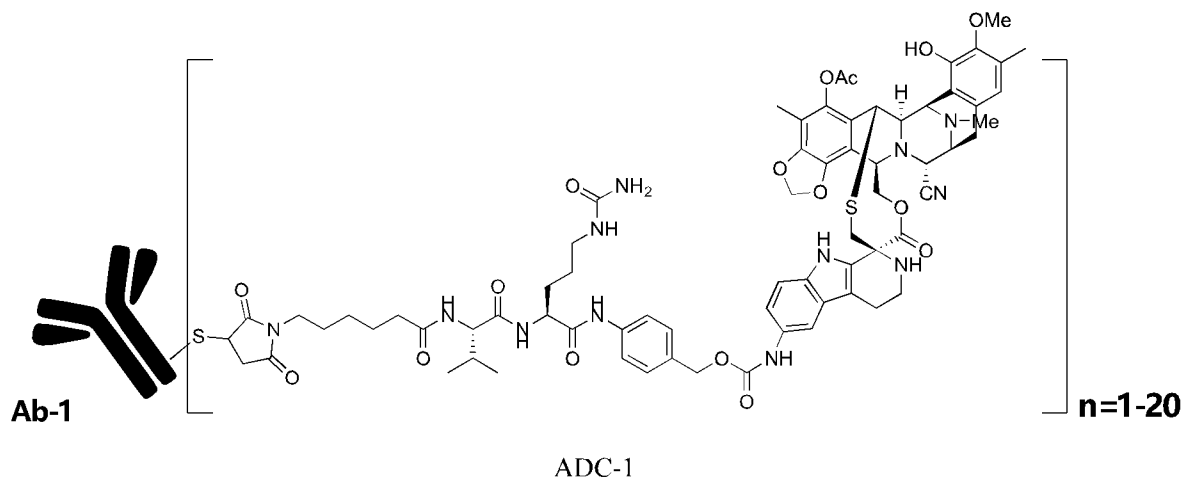
32.如权利要求31任一所述的药物分子，其特征在于n选自2~8的整数。

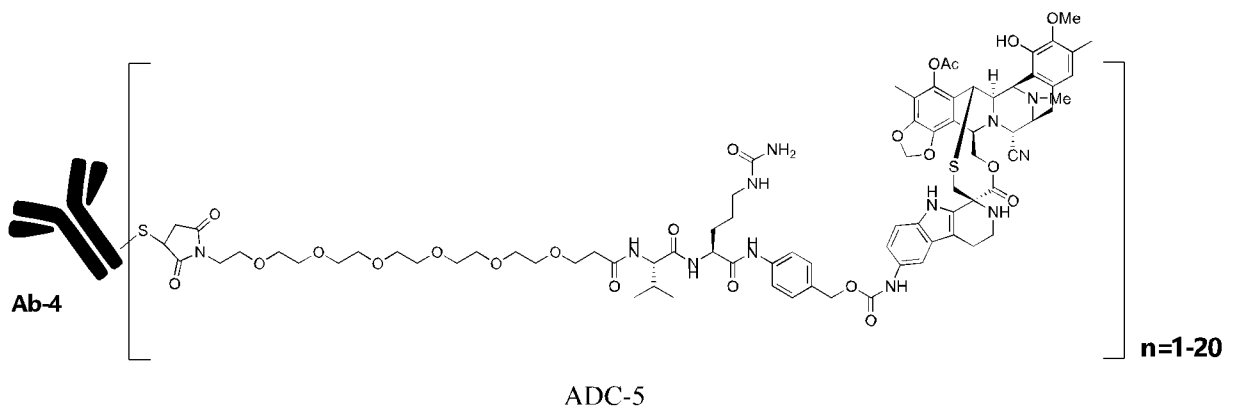
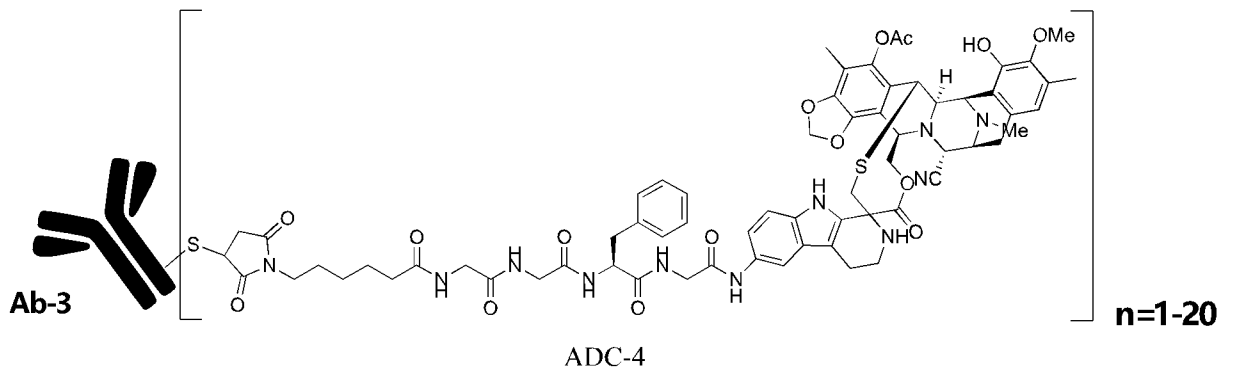
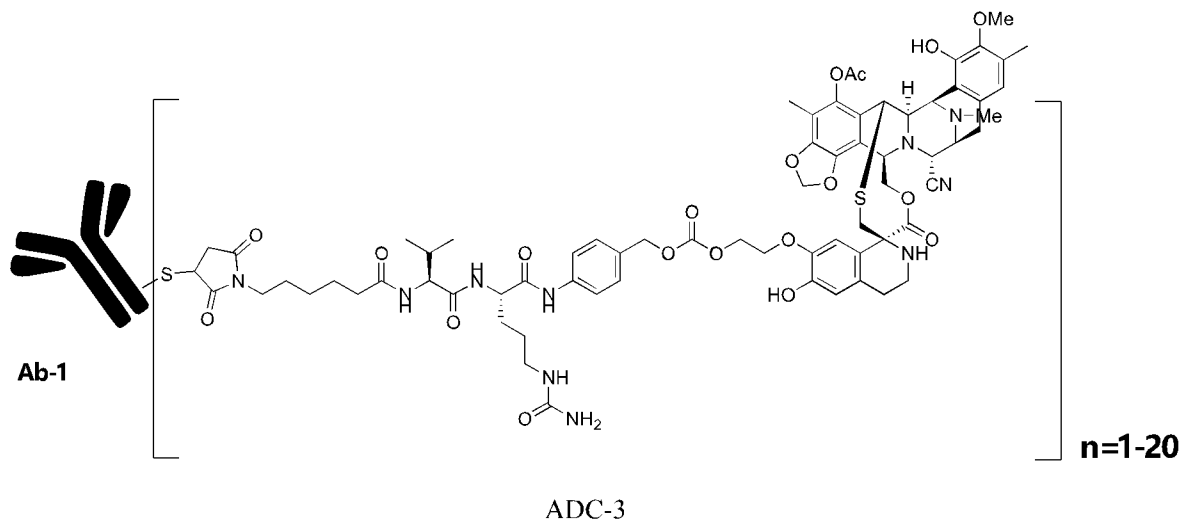
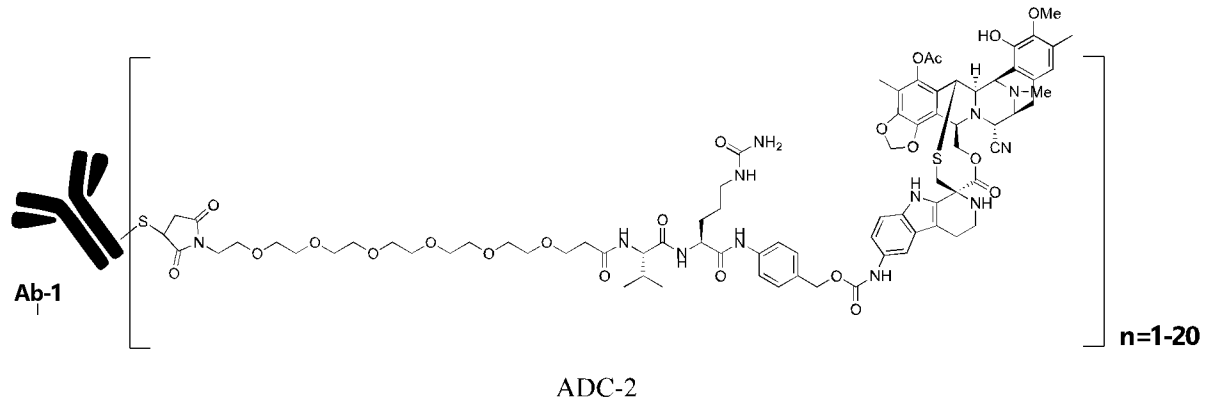
33.如权利要求31所述的药物分子，其特征在于还包括治疗剂或可检测标记物，所述的治疗剂选自细胞毒性剂、细胞抑制剂、放射性同位素、抗血管生成剂、免疫调节剂或脂质体。

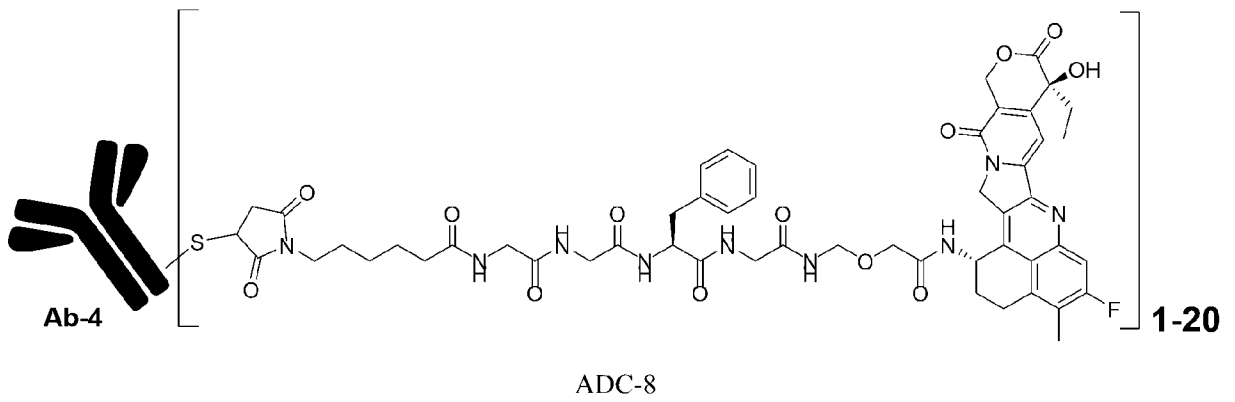
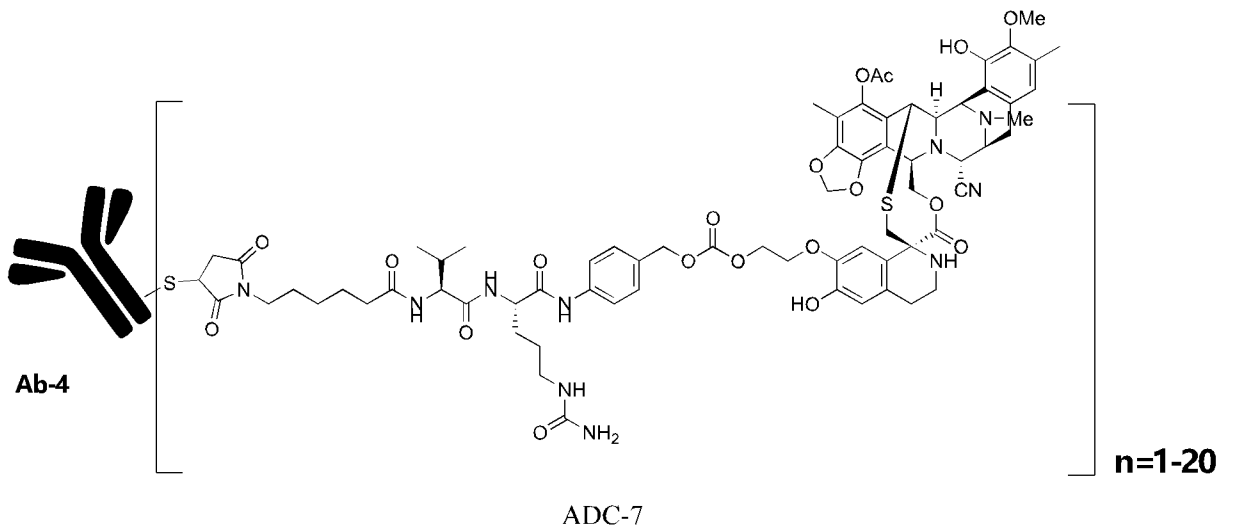
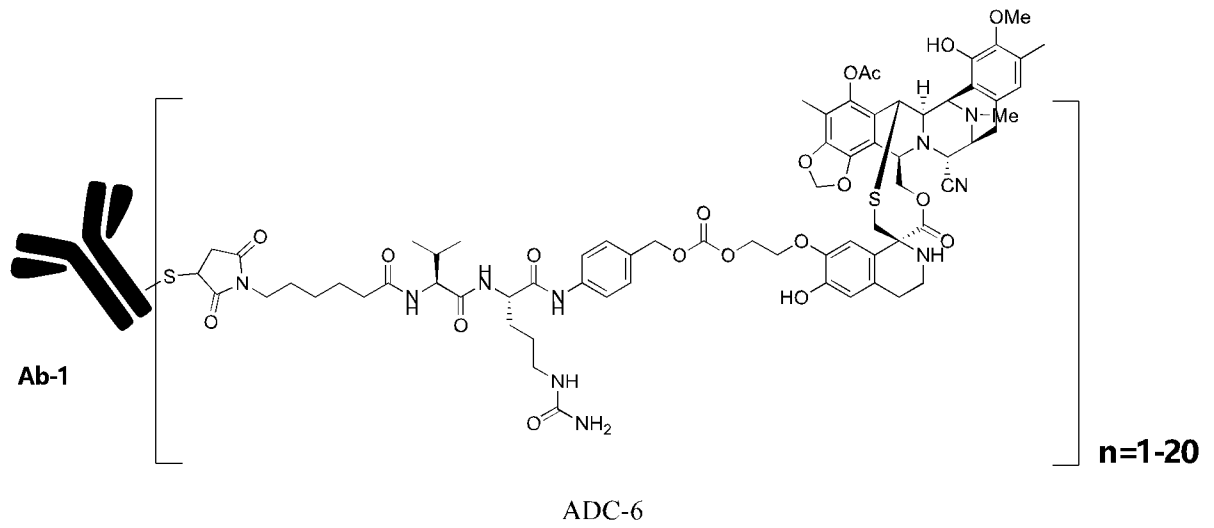
34.如权利要求33所述的药物分子，其特征在于所述的细胞毒性剂选自美登素生物碱类、澳瑞他汀类、艾瑞布林、紫杉烷、卡奇霉素、西马多丁、吡咯苯并二氮杂卓、葱环类药物、喜树碱衍生物、 $\alpha$ -鹅膏蕈碱及其衍生物、曲贝替定及其衍生物、鲁贝替定及其衍生物中的一种或多种。

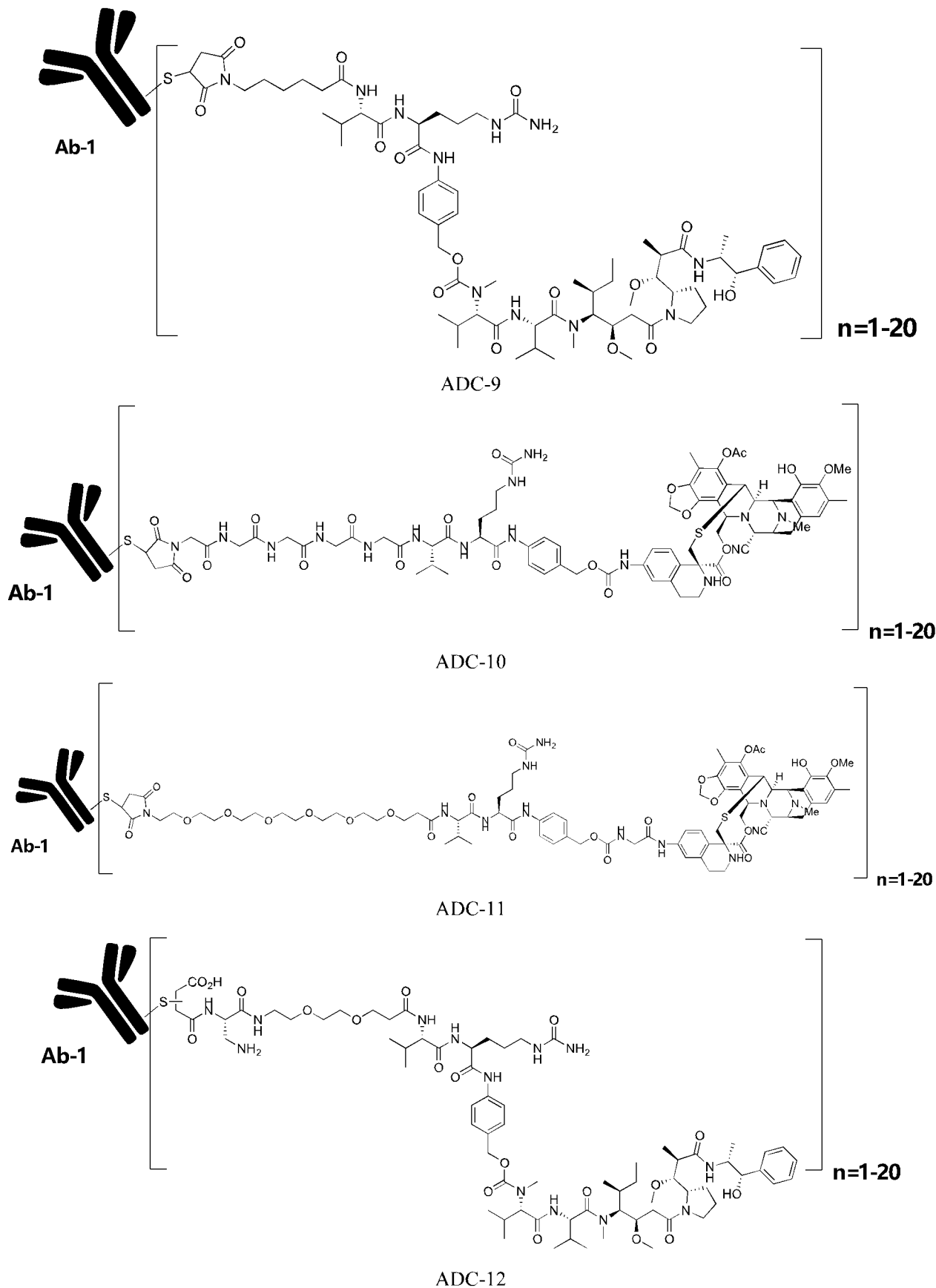
35.如权利要求31所述的药物分子，其特征在于所述的接头选自寡肽接头、胍接头、硫脲接头、触发自降解接头、琥珀酰亚胺基反式-4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯接头、马来酰亚胺接头、二硫化物接头、硫醚接头、连烯接头中的一种或多种。

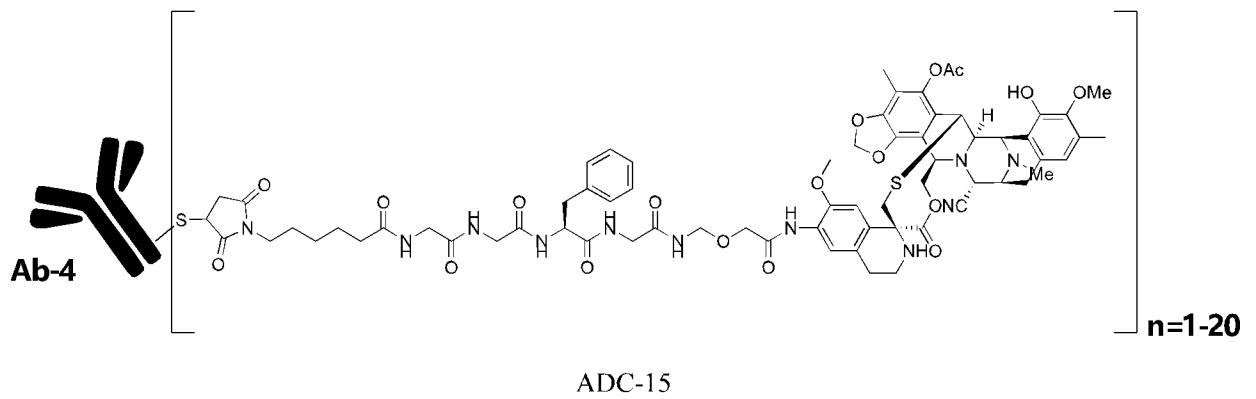
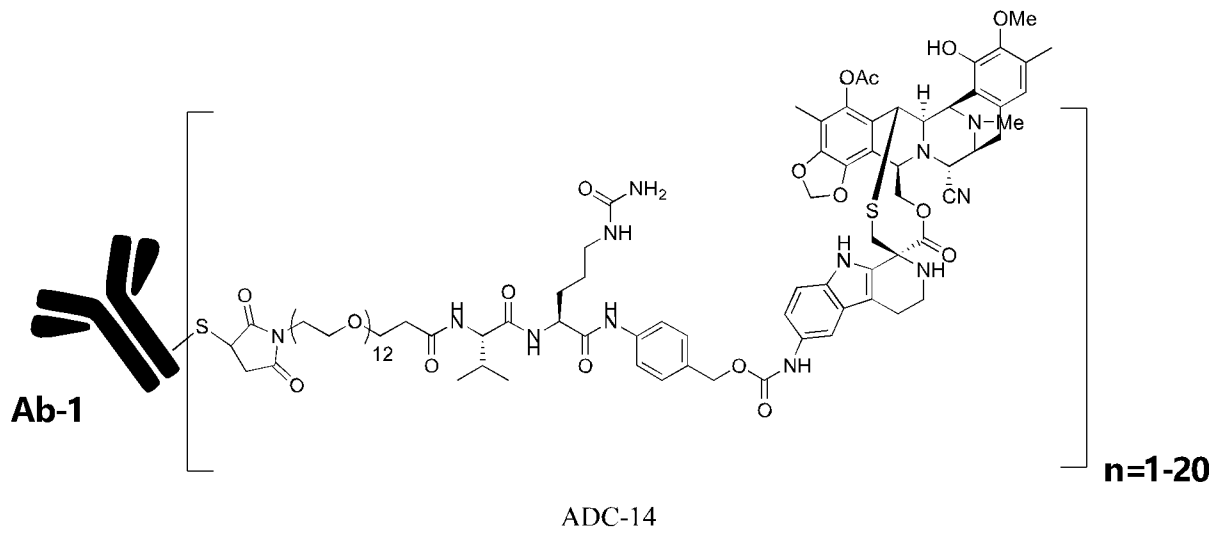
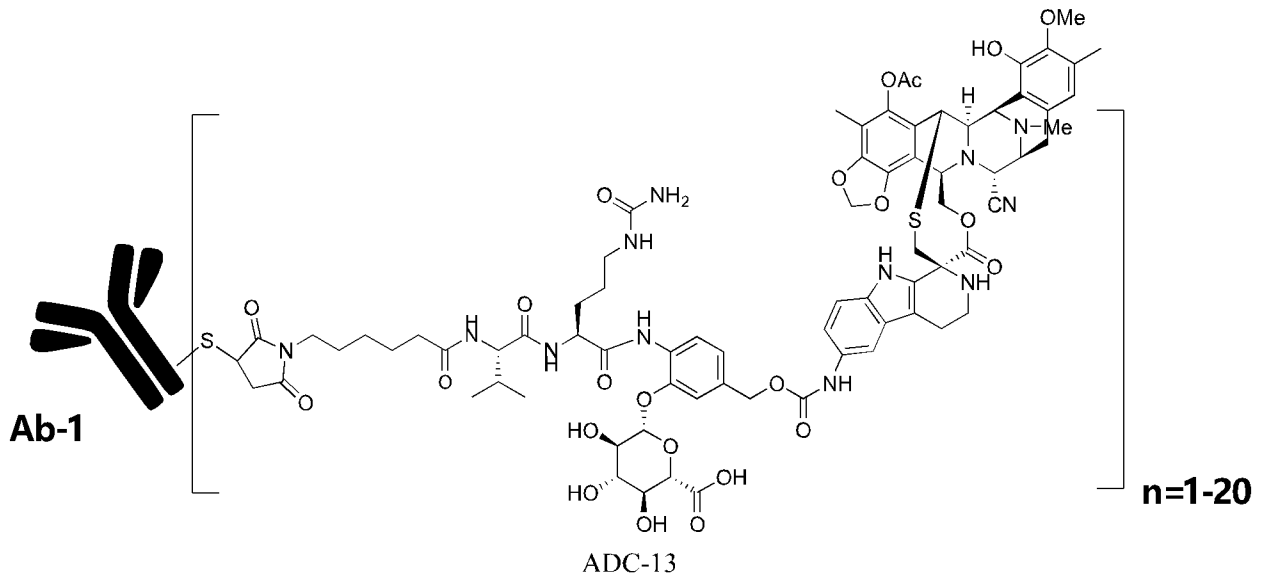
36.如权利要求31所述的药物分子，其特征在于选自ADC1~56的任一项：

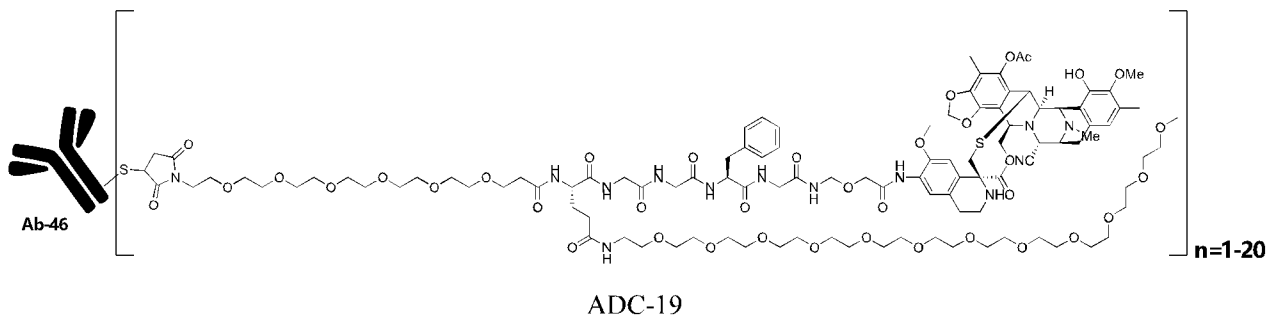
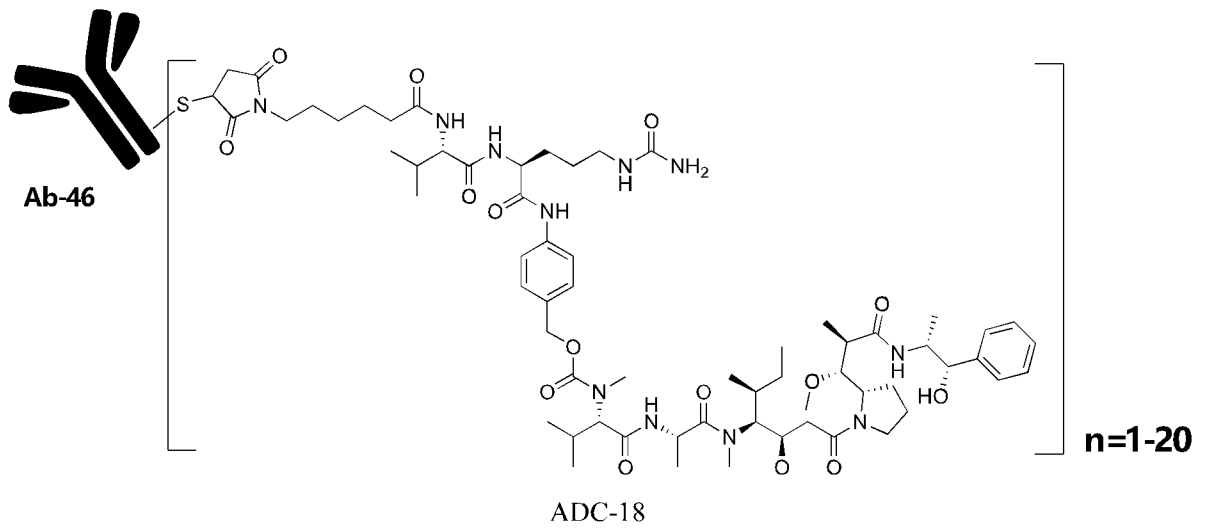
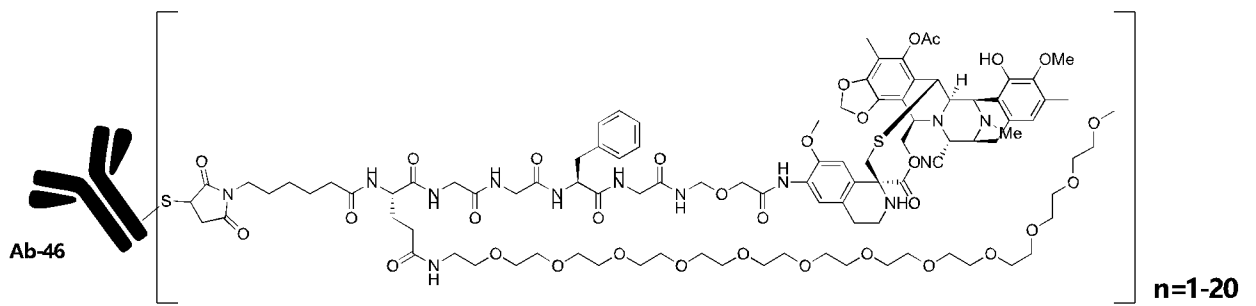
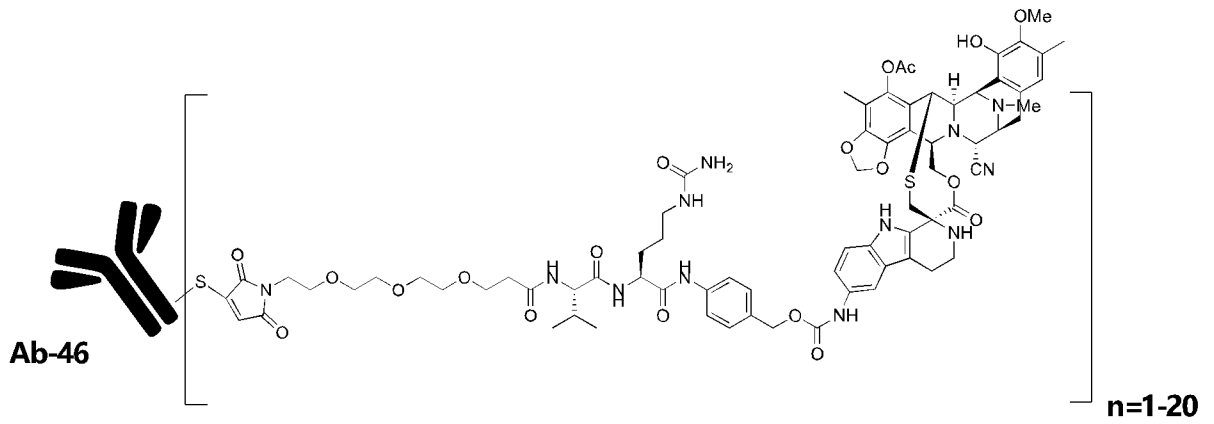




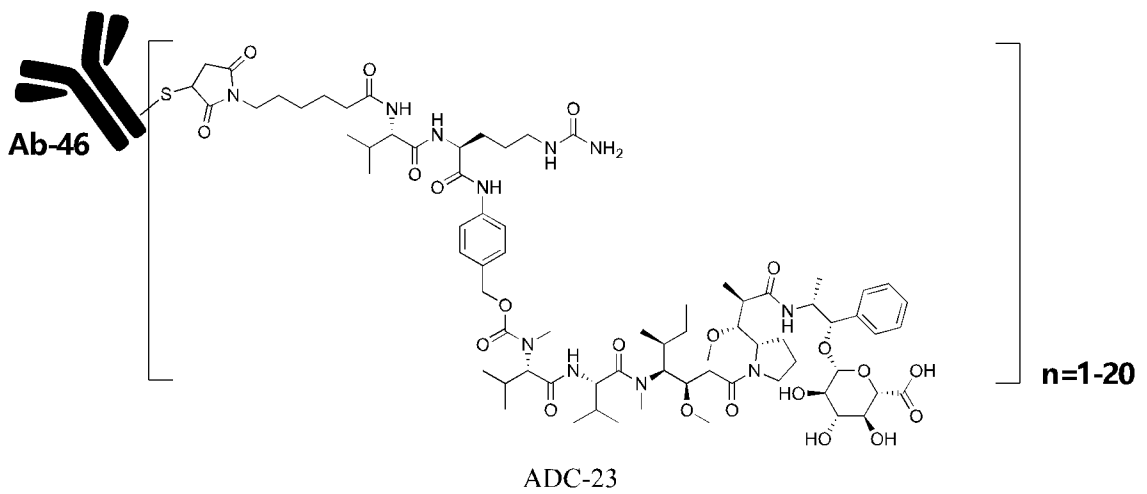
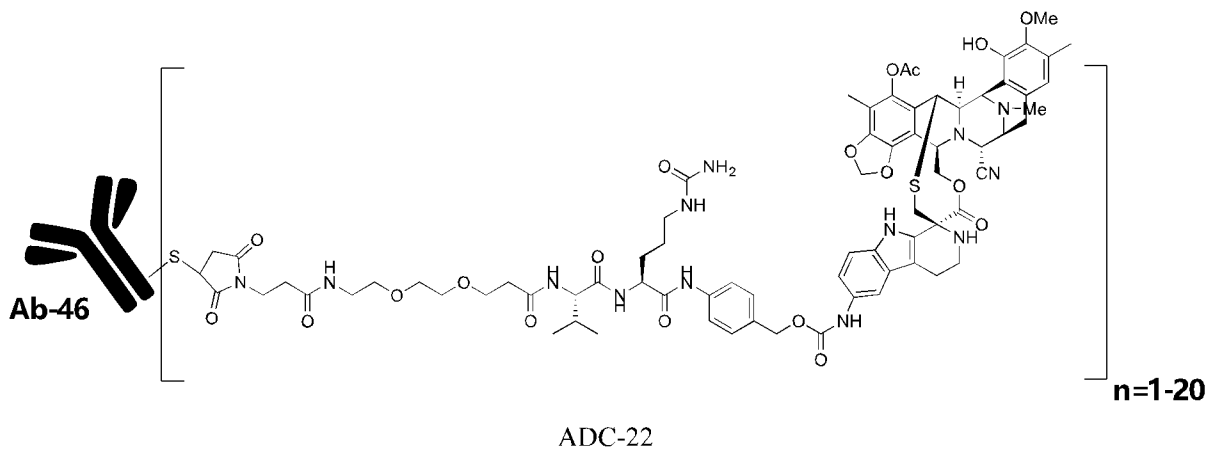
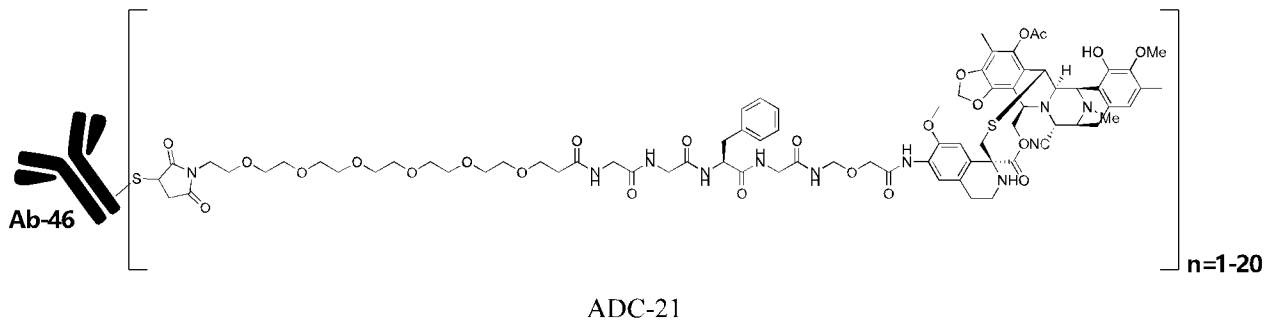
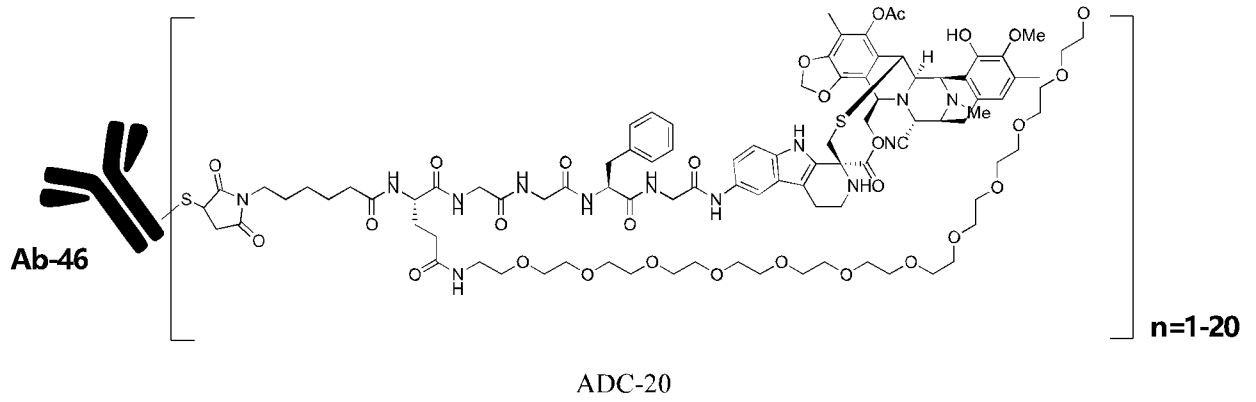


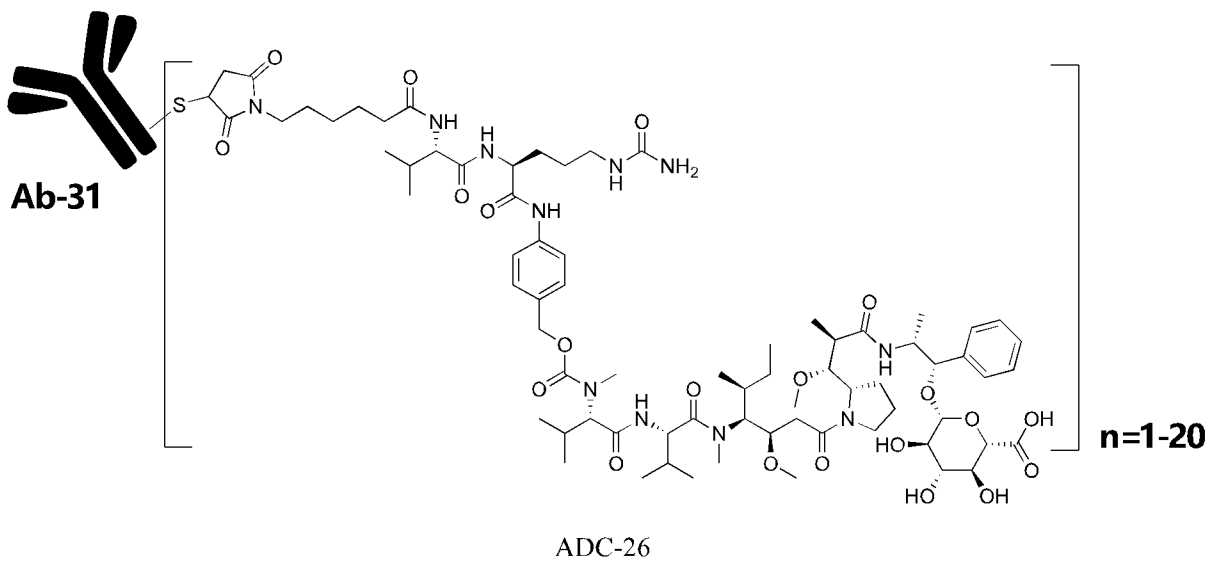
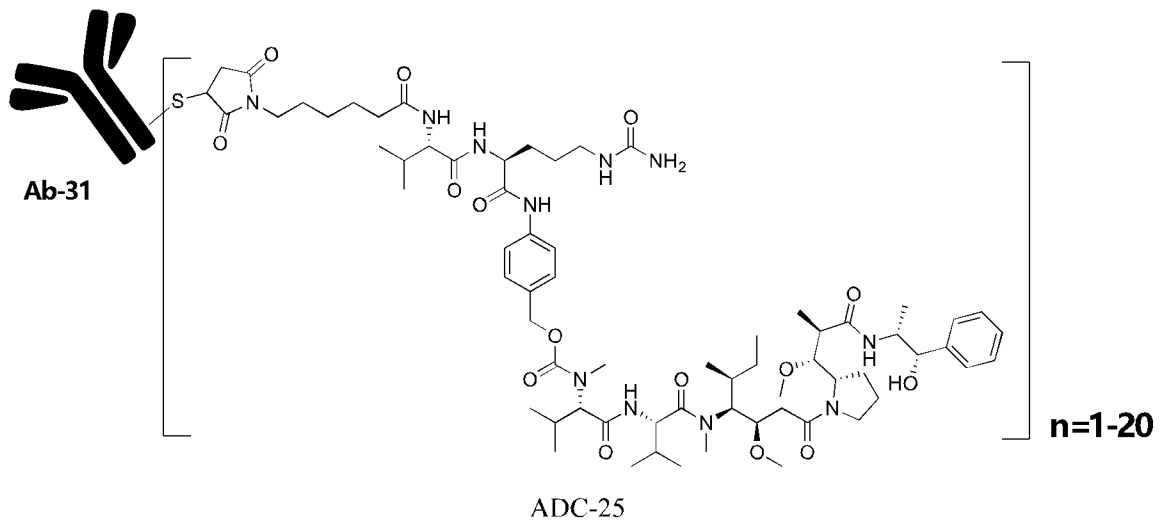
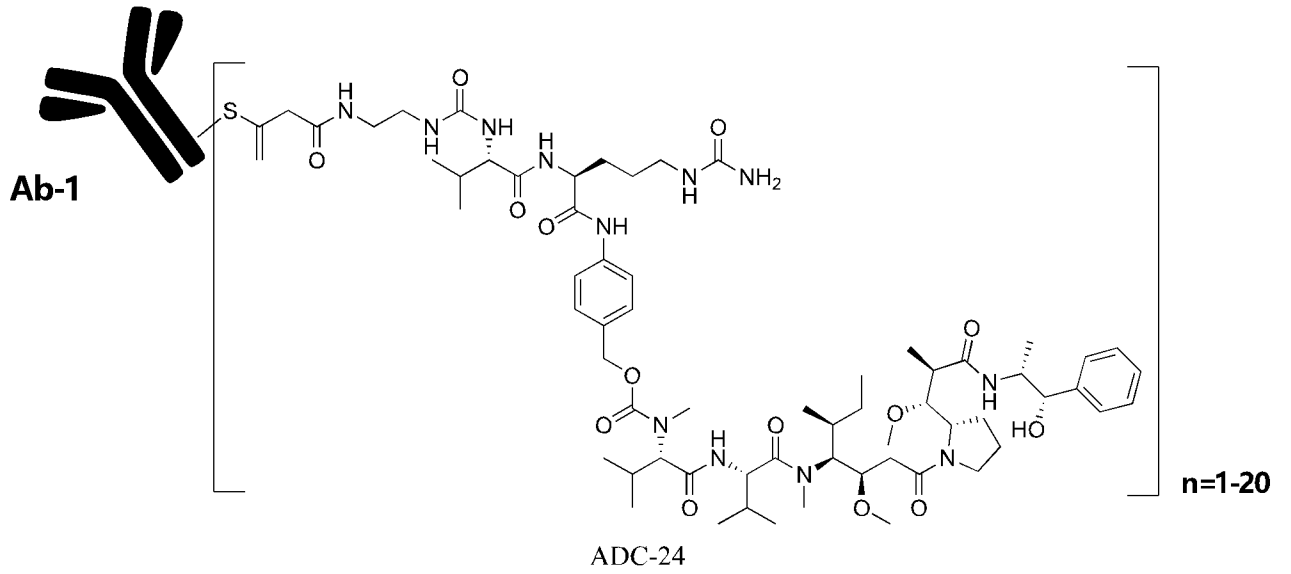




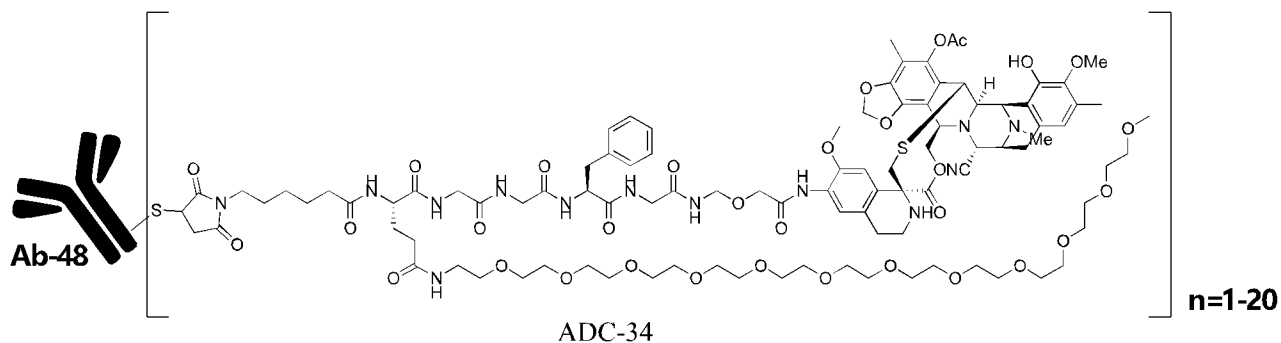
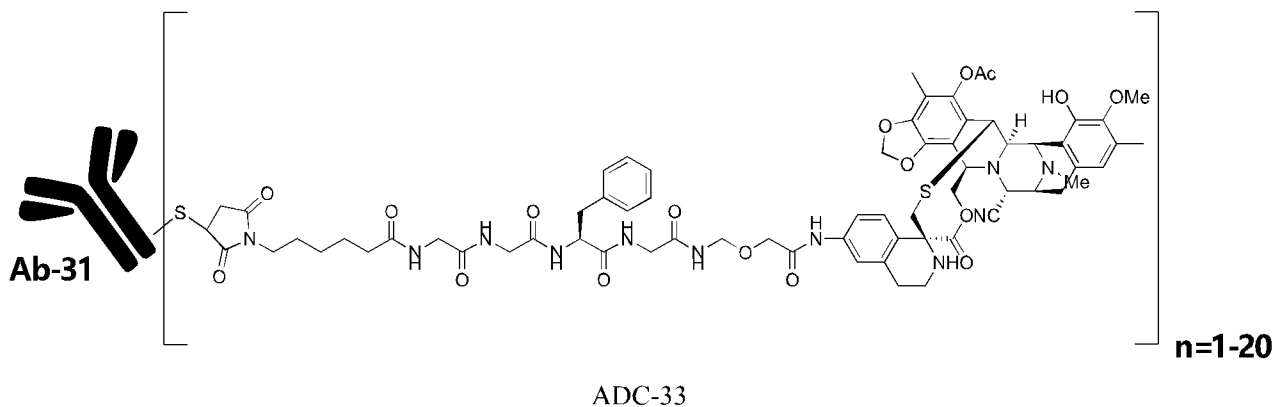
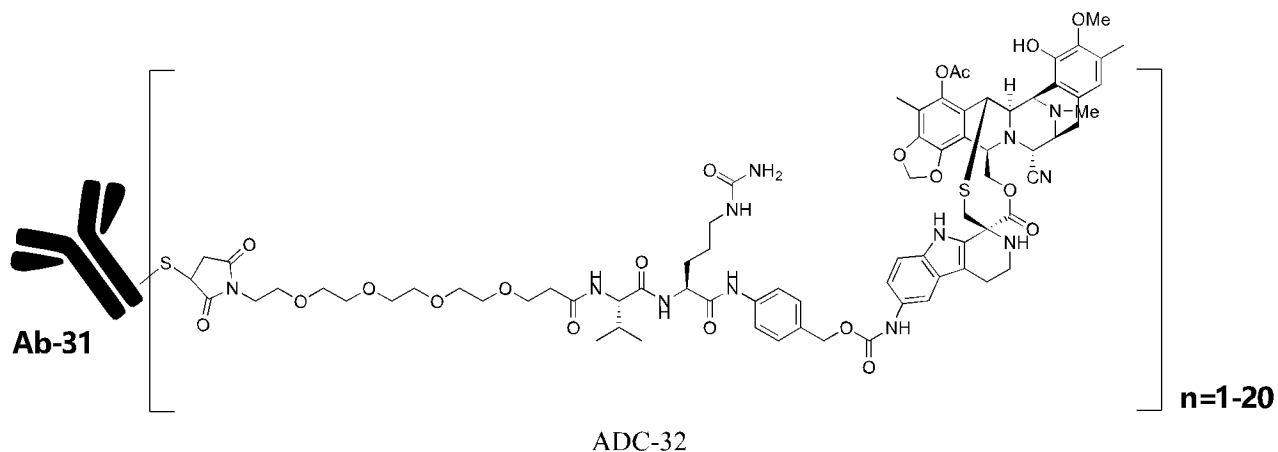
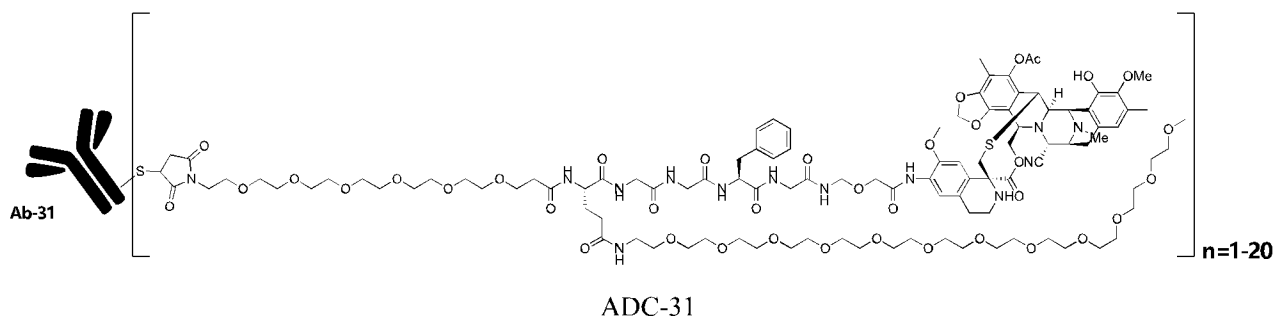
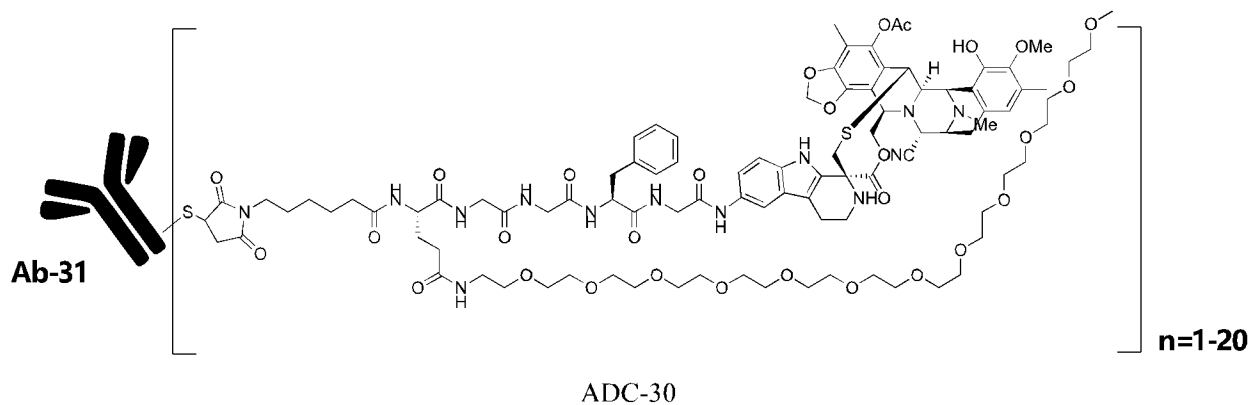


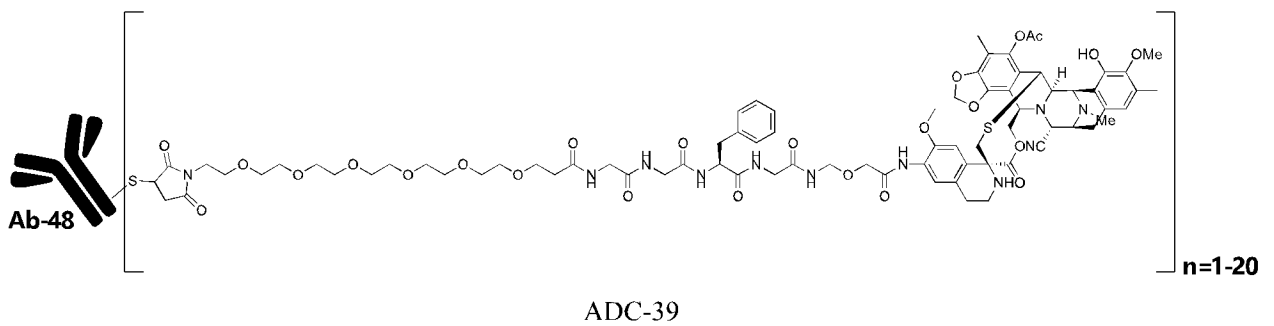
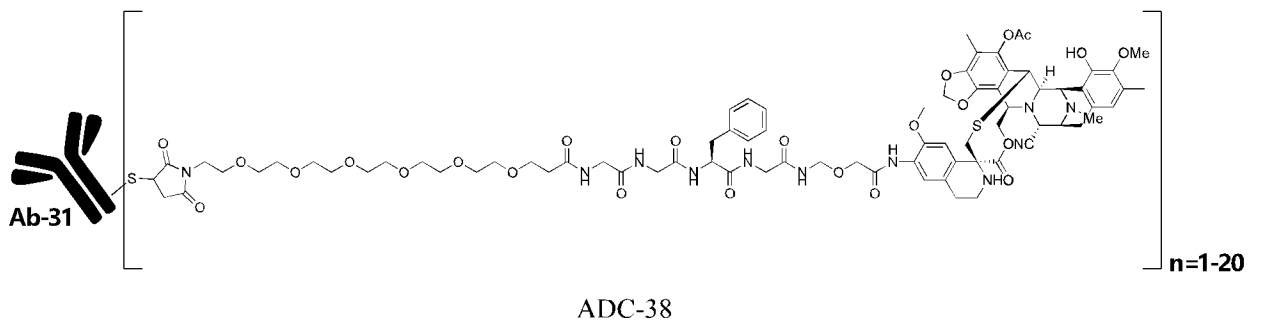
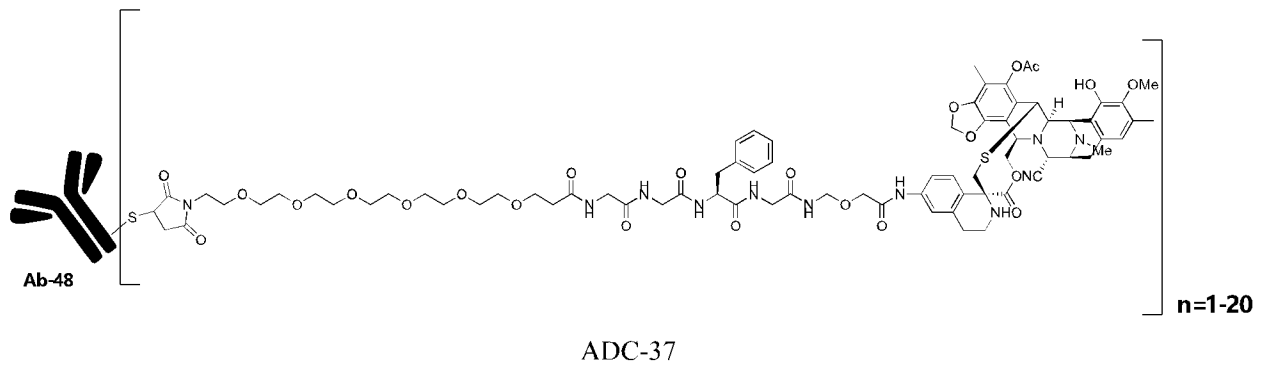
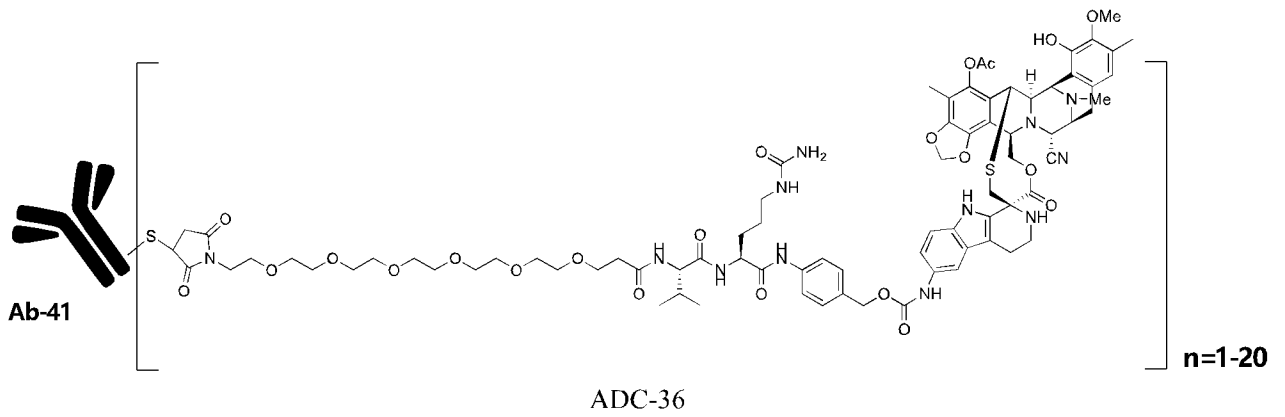
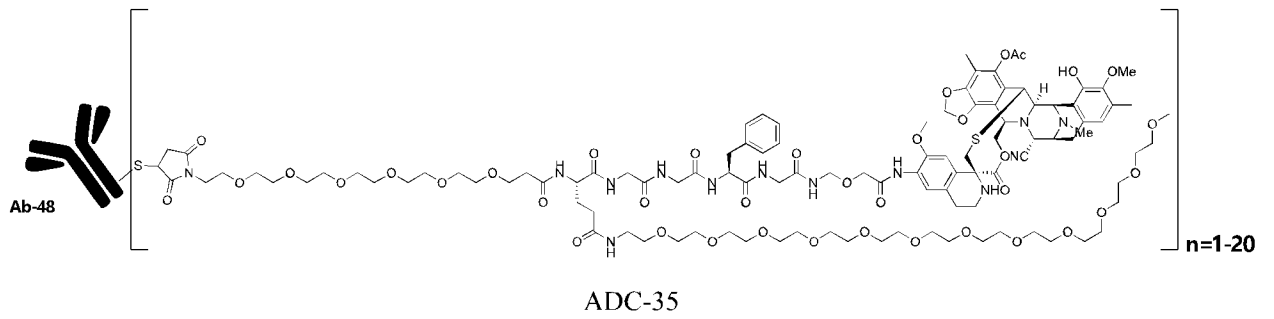


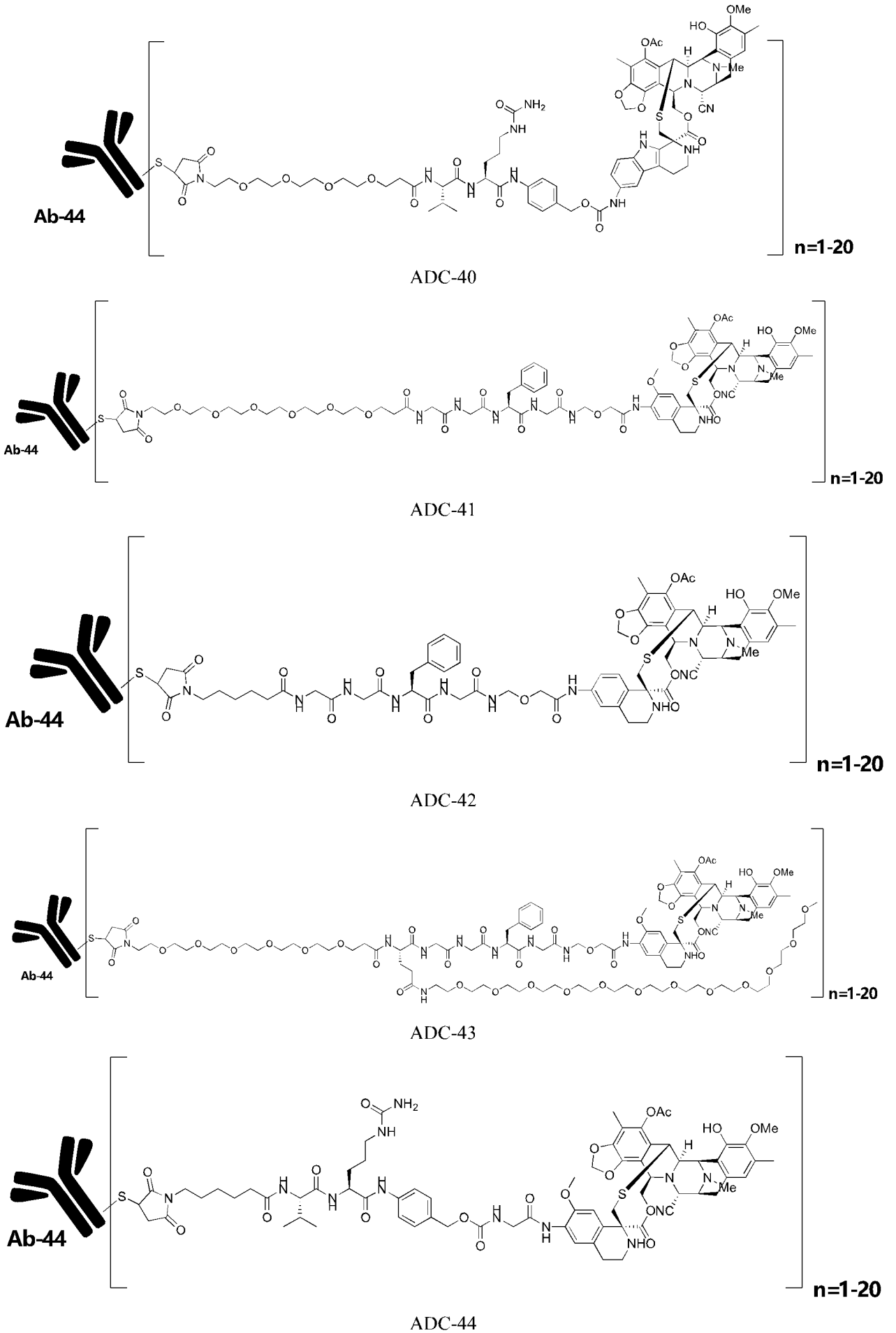


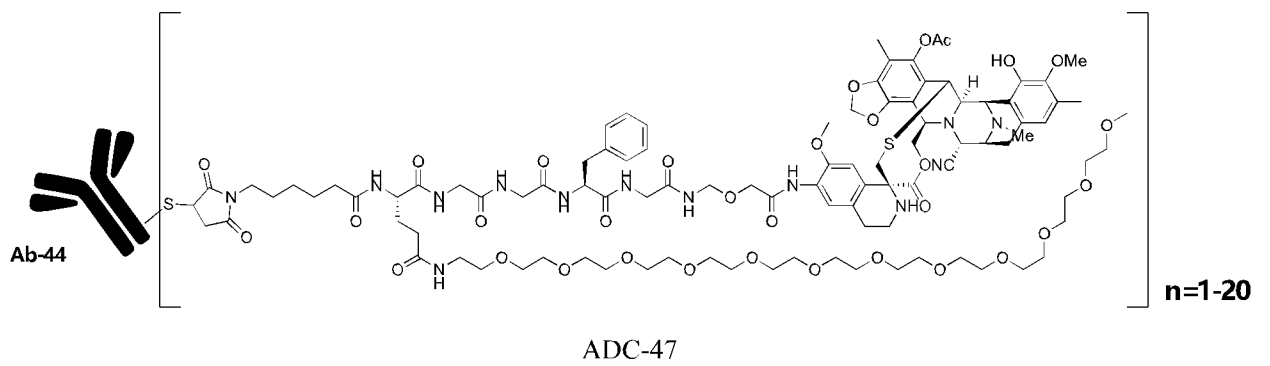
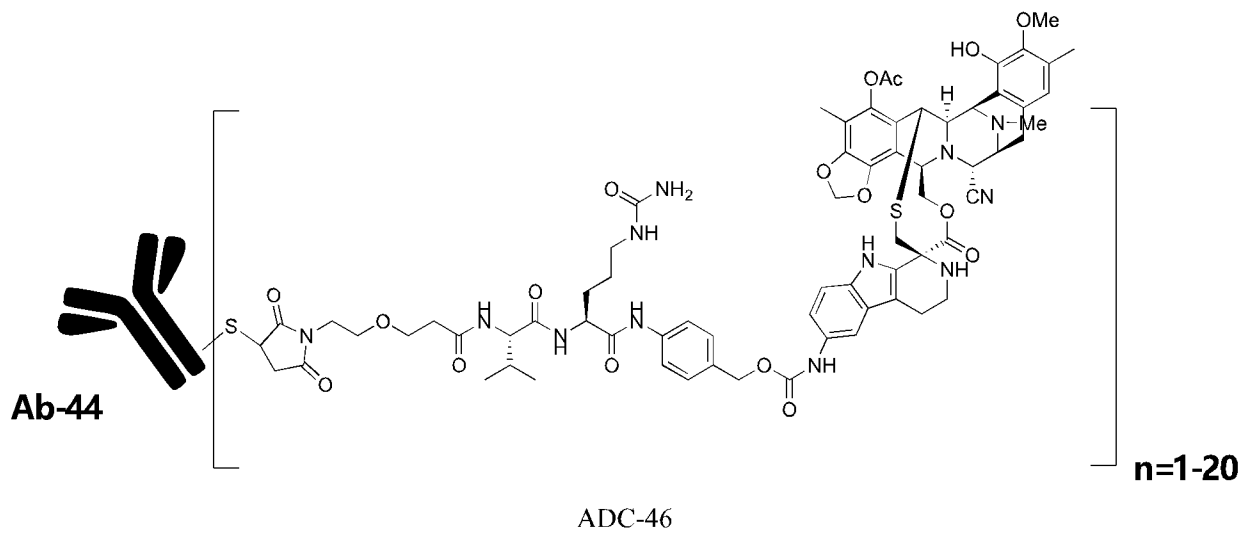
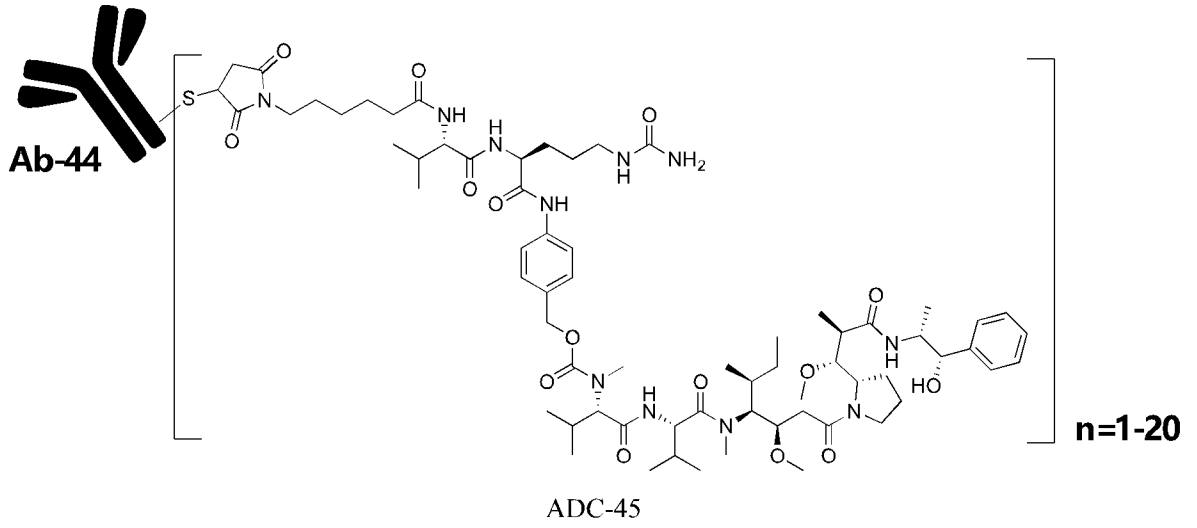


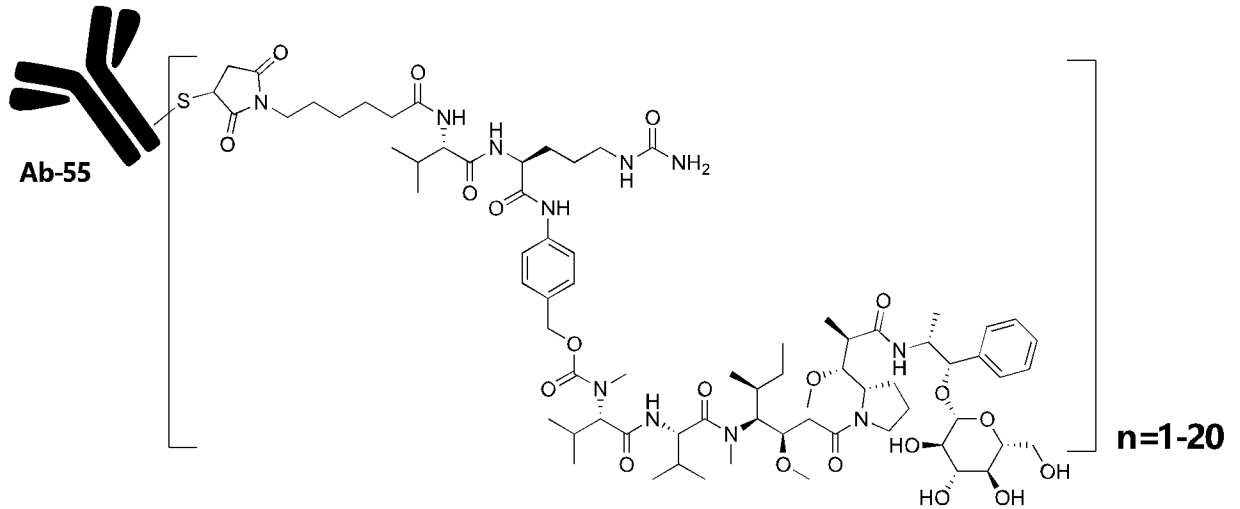




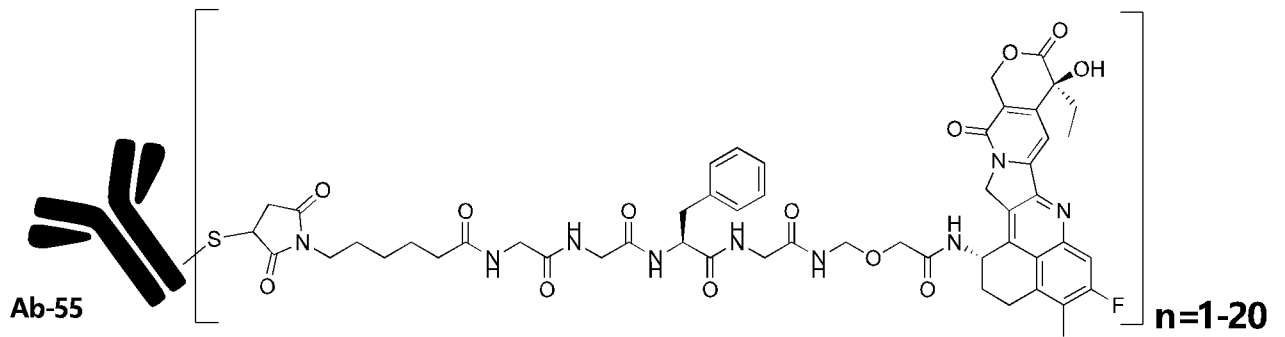




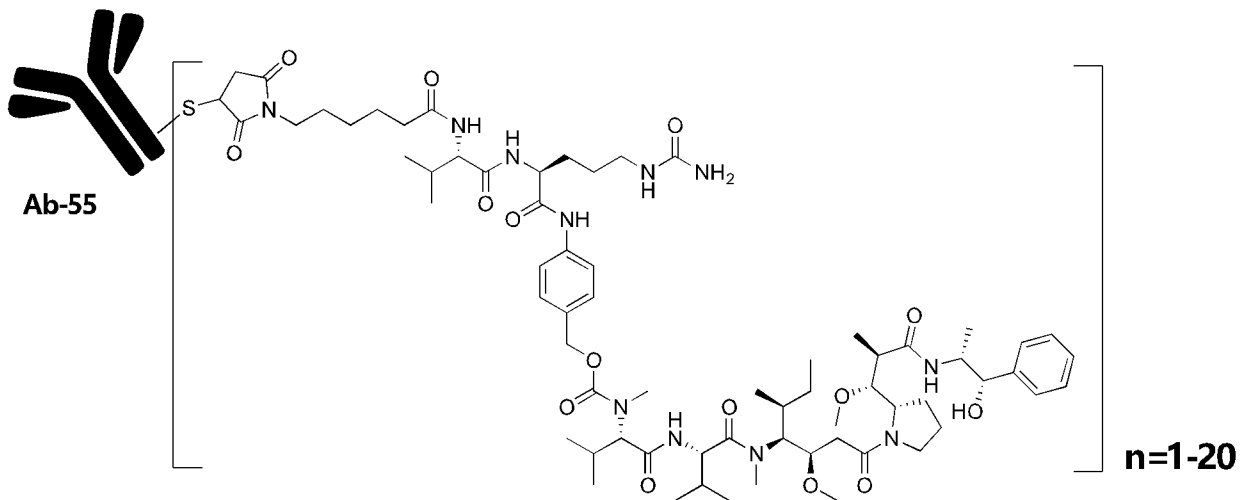




ADC-48

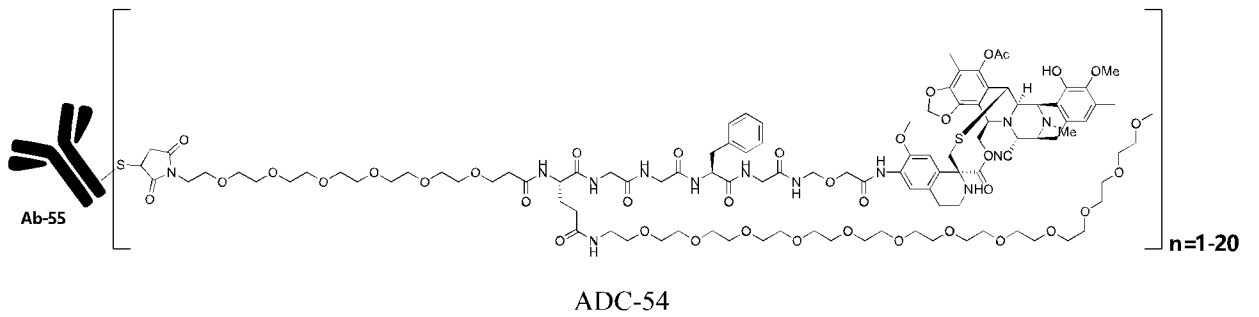
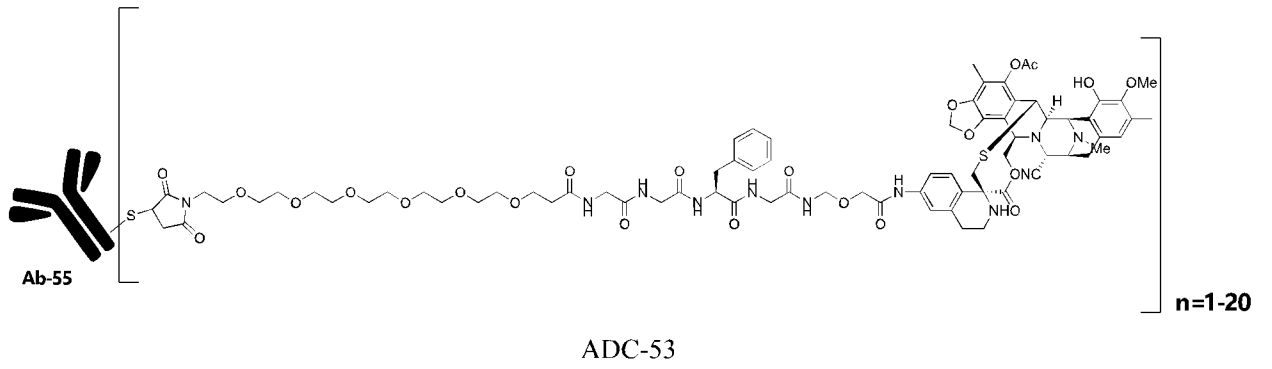
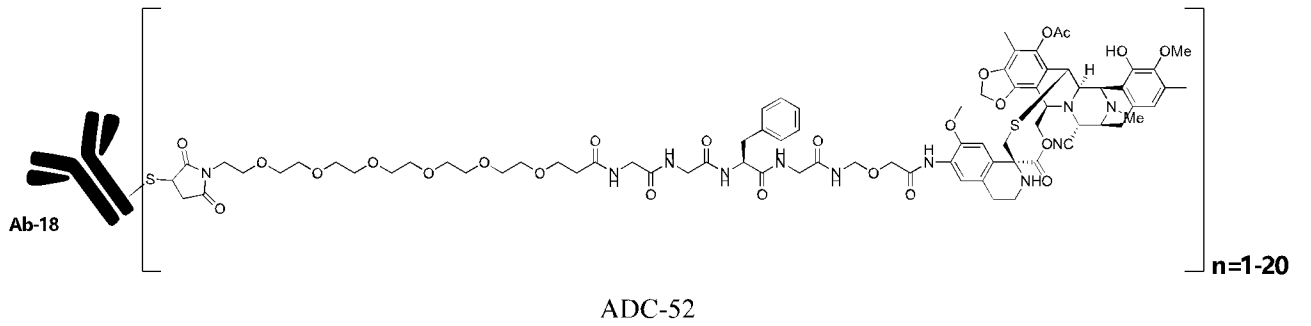
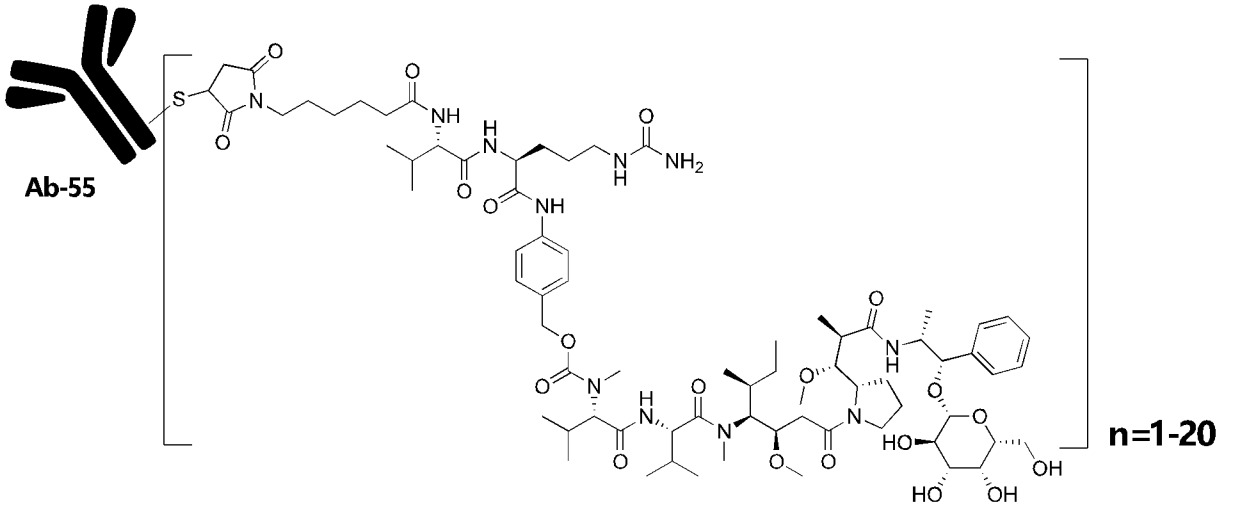


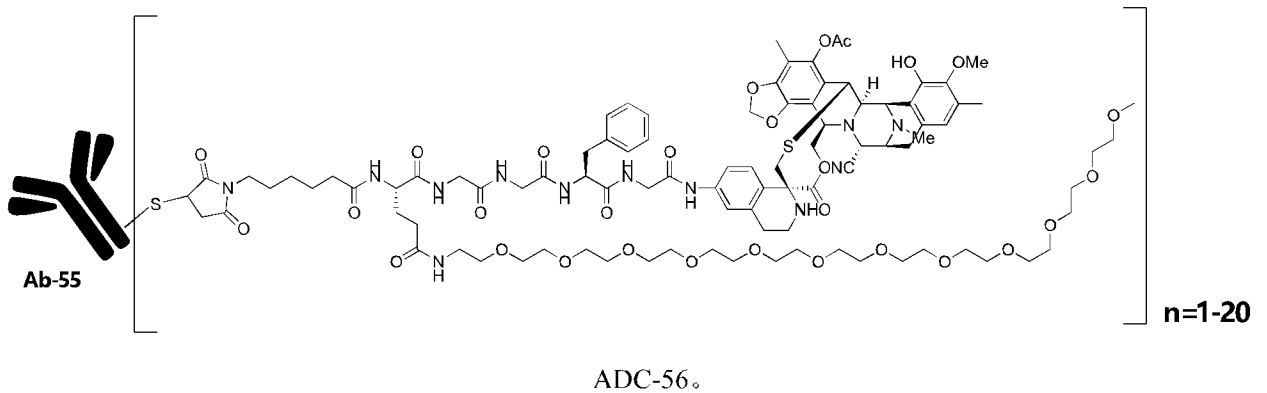
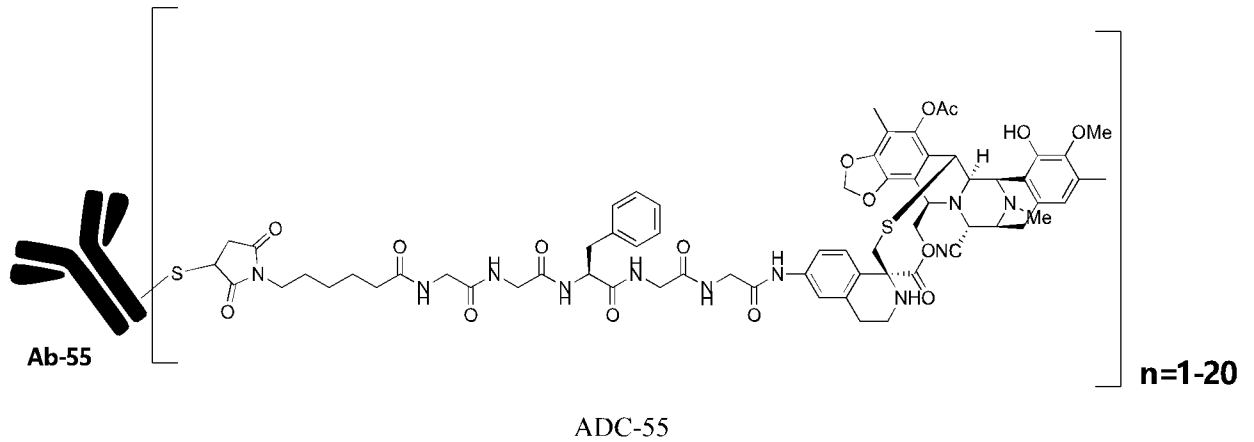
ADC-49



ADC-50







37.权利要求1~15任一所述的抗原结合蛋白、权利要求16~26任一所述的双特异性抗原结合蛋白，权利要求27所述的核酸分子、权利要求28所述的载体、权利要求29所述的细胞、和/或权利要求30~35任一所述的药物分子，在制备药物中的应用，所述的药物用于诊断、预防和/或治疗hROR1相关的疾病和/或病症。

38.如权利要求37所述的应用，其特征在于所述的疾病和/或病症包括肿瘤。

39.如权利要求38所述的应用，其特征在于所述的肿瘤为慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性套细胞淋巴瘤、肉瘤、卵巢癌、肾细胞癌、头颈癌、乳腺癌、肺癌、恶性间皮瘤、结肠癌、神经母细胞瘤或黑色素瘤。

成熟 hROR1 胞外区	Ig-like 结构域 42 - 147	Frizzled 结构域 165 - 299	Kringle 结构域 312 - 381
成熟 hROR2 胞外区	Ig-like 结构域 55 - 145	Frizzled 结构域 169 - 303	Kringle 结构域 316 - 384

图 1

SEQ ID NO.	FR1	FR2	FR3	FR4	CDR1	CDR2	CDR3	FR4
1	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WRLKQTFVPSL EAWVA	SISGSGSTFVSSGSGMS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVSSGSGMS	YSLRNVLAASVPGQV	WGSTGFTVTVSS
5	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
9	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
13	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
17	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
SEQ ID NO. 19-24 可变区氨基酸序列								
21	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
25	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
29	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
33	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
37	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
SEQ ID NO. 25-32 可变区氨基酸序列								
21	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
25	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
29	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
33	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS
37	EVKLVSGGSLVPPVGGSLKISC AASGFTFS	WVLDQTFE KRLDVA	SISGSGSTFVPSVAGS	RFPSRSTFAAPSLVLCWASL KSGDTAAMSC'78	YVMAIS	SISGSGSTFVPSVAGS	GRVAVVQVW'77QV	WVCTGFTVTVSS

图 2

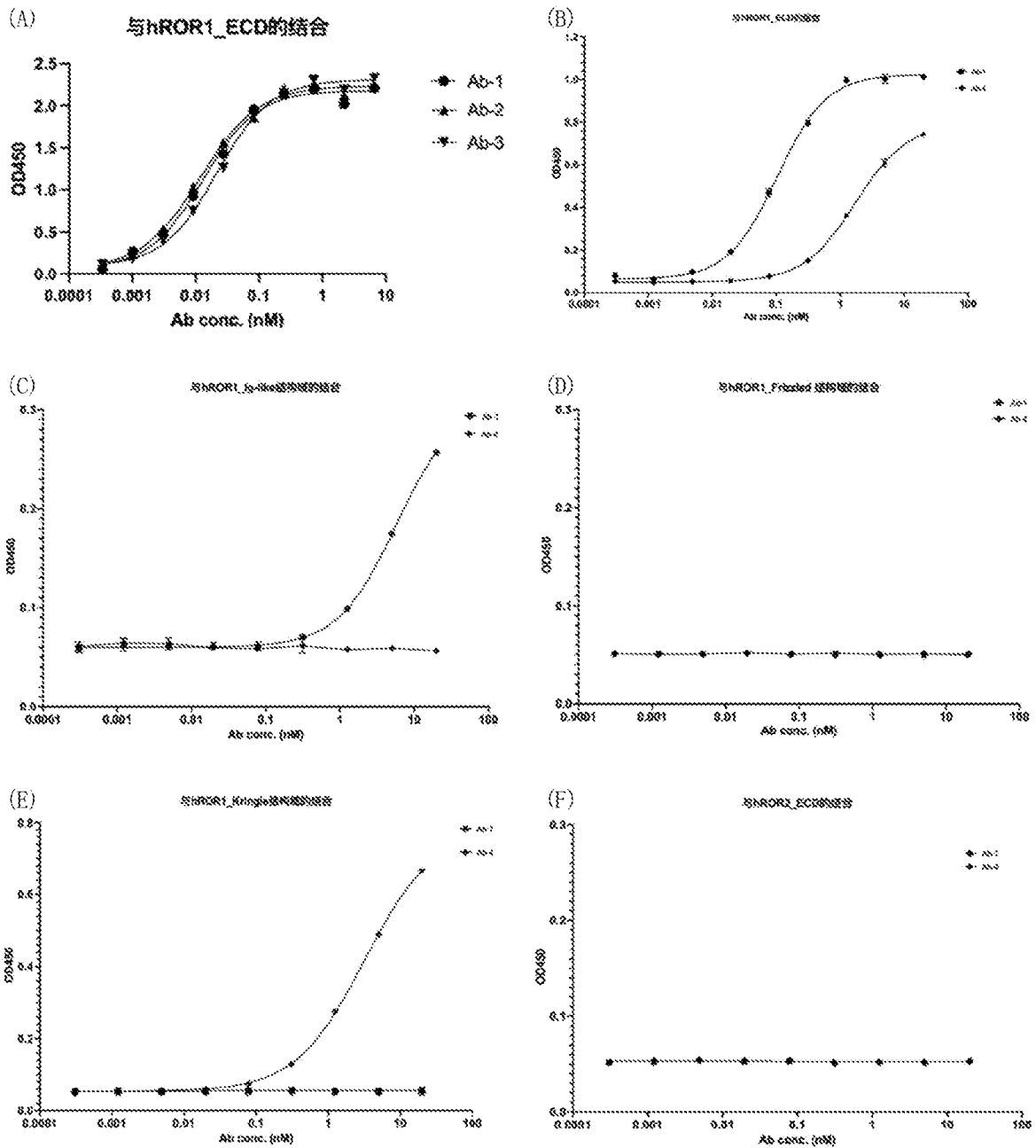


图 3

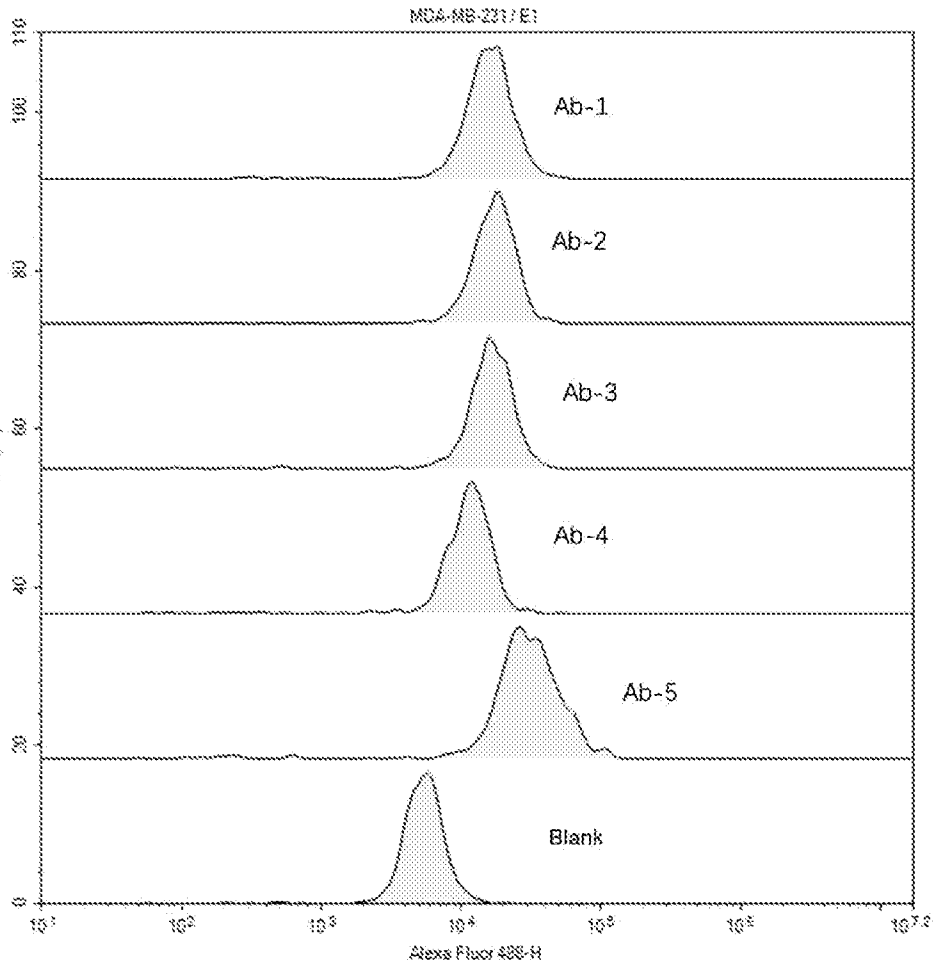


图 4

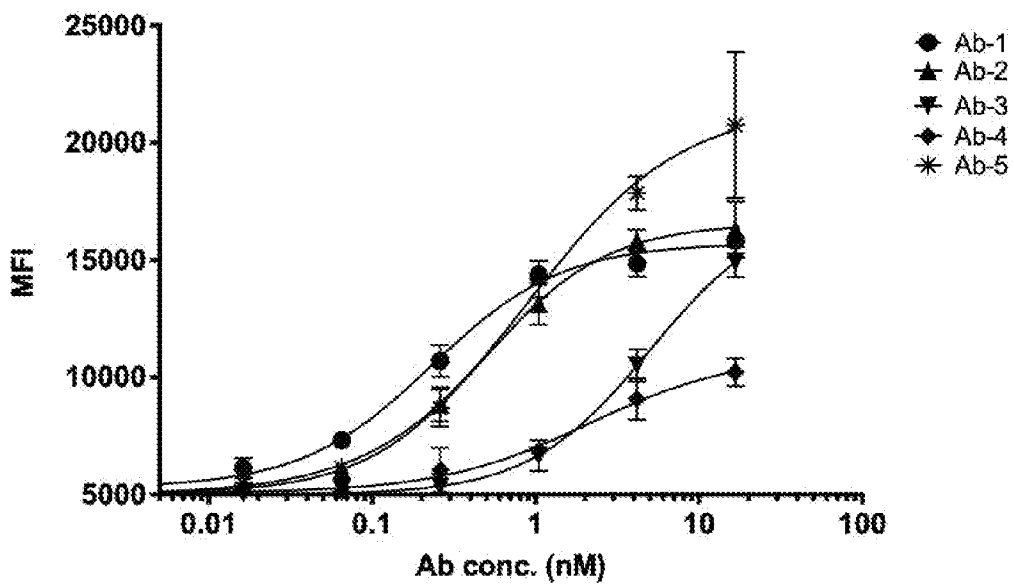


图 5

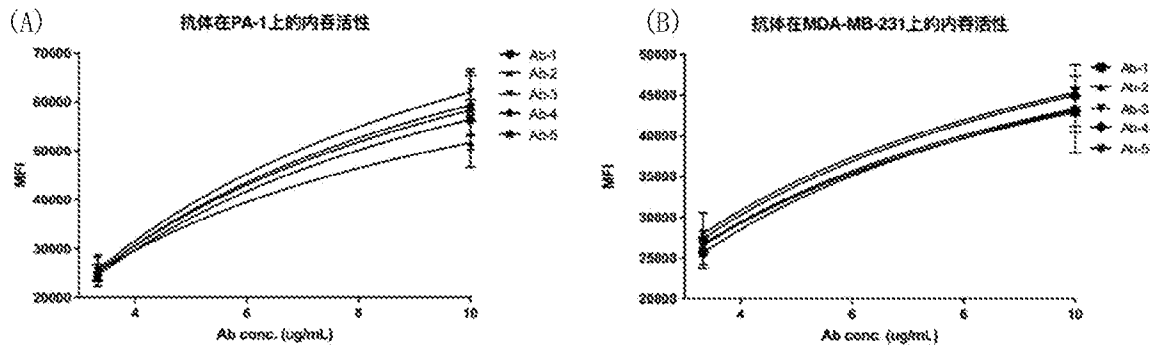
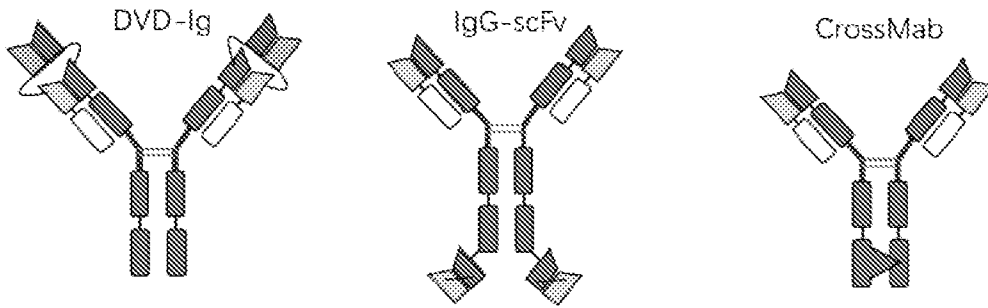


图 6

(A)



(B)

网络地址块	类别	全长位二进制地址
84E3F11-7F6D10	VH	<p>QVCLQBGAEIMKPKGASVKSCHATGYTESYMWYWKRCPCGHEWIGELPQSGNTQWNEKFKGKATIAUTSSN JAVMQLRELTSEDSAVYCA REGRRHFFDYMGGQTTLYSSANTPP EVALKMSGGGLUNTPGGS-KLSCAASGFTT SYWMSWLRQTRPKRSLEWWSASBS</p> <p>GGTTTYDSSYKGRPTFSROJANMUYLQMSLSUSEDTMAYCTRSYLVNLSAHPYFDVWETGTTVYSSASIKGSPFPLVWSSSAGTSSVHFHFPAVLDSSGLSVLYVYSSSLSGTQCYCNVHKNSHFKVDRKVFKSCXKTHCPC</p> <p>PAPPELLGGPSVLPFPKPKDLMISRTPYTCVWDVNSHEDPEVFWWYVGVCEVHNRAKTRPREEDNSTYRVYSALVUHQDWLNGKWKCVKZKALAPKPKTSKAAKQOPREPQVYUPLPSSREGMTNCOVSLCULVWGPYPSYDIAVWESVNGOPENRYKTTIPRULDSDGSHFLV</p> <p>SKLTVDSRWQCGMIFSCVMHEUNRHHTQKLSLSFGK</p>
88E3F11-7F6D10(0055)	VH	<p>QVCLQBGAEIMKPKGASVKSCHATGYTESYMWYWKRCPCGHEWIGELPQSGNTQWNEKFKGKATIAUTSSN JAVMQLRELTSEDSAVYCA REGRRHFFDYMGGQTTLYSSANTPP EVALKMSGGGLUNTPGGS-KLSCAASGFTT SYWMSWLRQTRPKRSLEWWSASBS</p> <p>GGTTTYDSSYKGRPTFSROJANMUYLQMSLSUSEDTMAYCTRSYLVNLSAHPYFDVWETGTTVYSSASIKGSPFPLVWSSSAGTSSVHFHFPAVLDSSGLSVLYVYSSSLSGTQCYCNVHKNSHFKVDRKVFKSCXKTHCPC</p> <p>PAPPELLGGPSVLPFPKPKDLMISRTPYTCVWDVNSHEDPEVFWWYVGVCEVHNRAKTRPREEDNSTYRVYSALVUHQDWLNGKWKCVKZKALAPKPKTSKAAKQOPREPQVYUPLPSSREGMTNCOVSLCULVWGPYPSYDIAVWESVNGOPENRYKTTIPRULDSDGSHFLV</p> <p>SKLTVDSRWQCGMIFSCVMHEUNRHHTQKLSLSFGK</p>
84E3F11-7F6D10-VH-VI	VH	<p>QVCLQBGAEIMKPKGASVKSCHATGYTESYMWYWKRCPCGHEWIGELPQSGNTQWNEKFKGKATIAUTSSN JAVMQLRELTSEDSAVYCA REGRRHFFDYMGGQTTLYSSANTPP EVALKMSGGGLUNTPGGS-KLSCAASGFTT SYWMSWLRQTRPKRSLEWWSASBS</p> <p>GGTTTYDSSYKGRPTFSROJANMUYLQMSLSUSEDTMAYCTRSYLVNLSAHPYFDVWETGTTVYSSASIKGSPFPLVWSSSAGTSSVHFHFPAVLDSSGLSVLYVYSSSLSGTQCYCNVHKNSHFKVDRKVFKSCXKTHCPC</p> <p>PAPPELLGGPSVLPFPKPKDLMISRTPYTCVWDVNSHEDPEVFWWYVGVCEVHNRAKTRPREEDNSTYRVYSALVUHQDWLNGKWKCVKZKALAPKPKTSKAAKQOPREPQVYUPLPSSREGMTNCOVSLCULVWGPYPSYDIAVWESVNGOPENRYKTTIPRULDSDGSHFLV</p> <p>SKLTVDSRWQCGMIFSCVMHEUNRHHTQKLSLSFGK</p>
7F6D10-84E3F11	VH	<p>QVCLQBGAEIMKPKGASVKSCHATGYTESYMWYWKRCPCGHEWIGELPQSGNTQWNEKFKGKATIAUTSSN JAVMQLRELTSEDSAVYCA REGRRHFFDYMGGQTTLYSSANTPP EVALKMSGGGLUNTPGGS-KLSCAASGFTT SYWMSWLRQTRPKRSLEWWSASBS</p> <p>GGTTTYDSSYKGRPTFSROJANMUYLQMSLSUSEDTMAYCTRSYLVNLSAHPYFDVWETGTTVYSSASIKGSPFPLVWSSSAGTSSVHFHFPAVLDSSGLSVLYVYSSSLSGTQCYCNVHKNSHFKVDRKVFKSCXKTHCPC</p> <p>PAPPELLGGPSVLPFPKPKDLMISRTPYTCVWDVNSHEDPEVFWWYVGVCEVHNRAKTRPREEDNSTYRVYSALVUHQDWLNGKWKCVKZKALAPKPKTSKAAKQOPREPQVYUPLPSSREGMTNCOVSLCULVWGPYPSYDIAVWESVNGOPENRYKTTIPRULDSDGSHFLV</p> <p>SKLTVDSRWQCGMIFSCVMHEUNRHHTQKLSLSFGK</p>

图 7



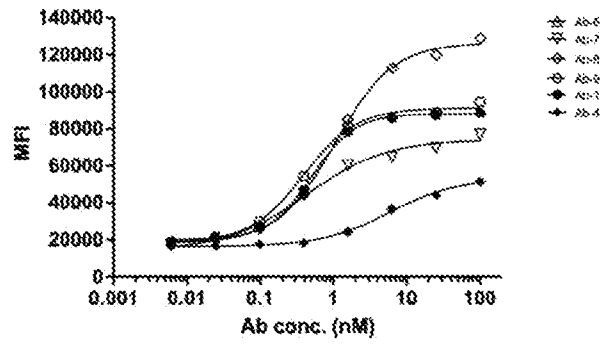


图 8

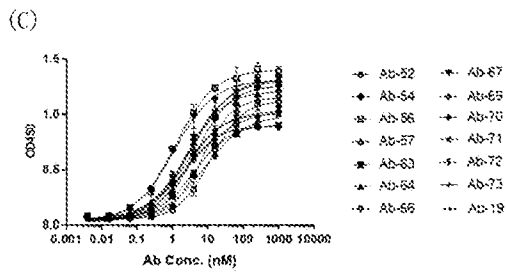
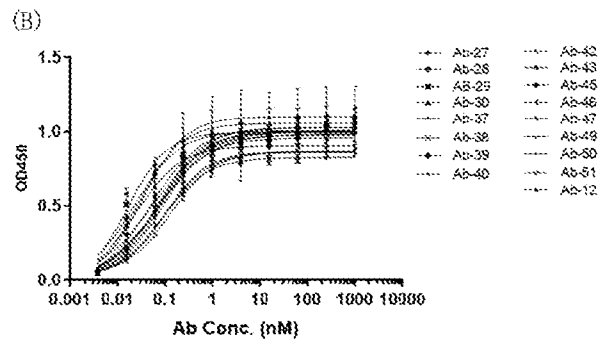
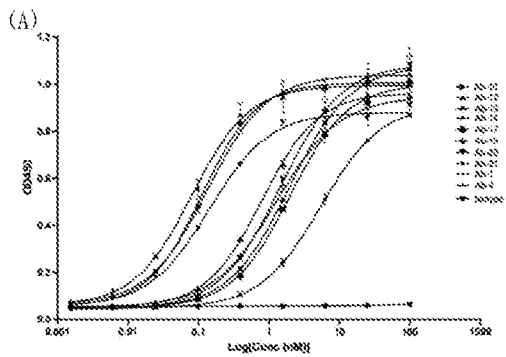


图 9

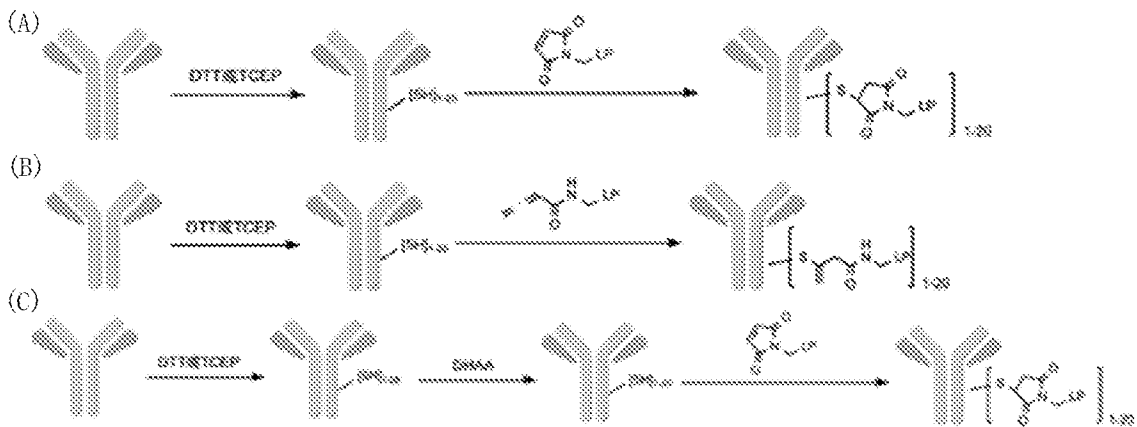


图 10

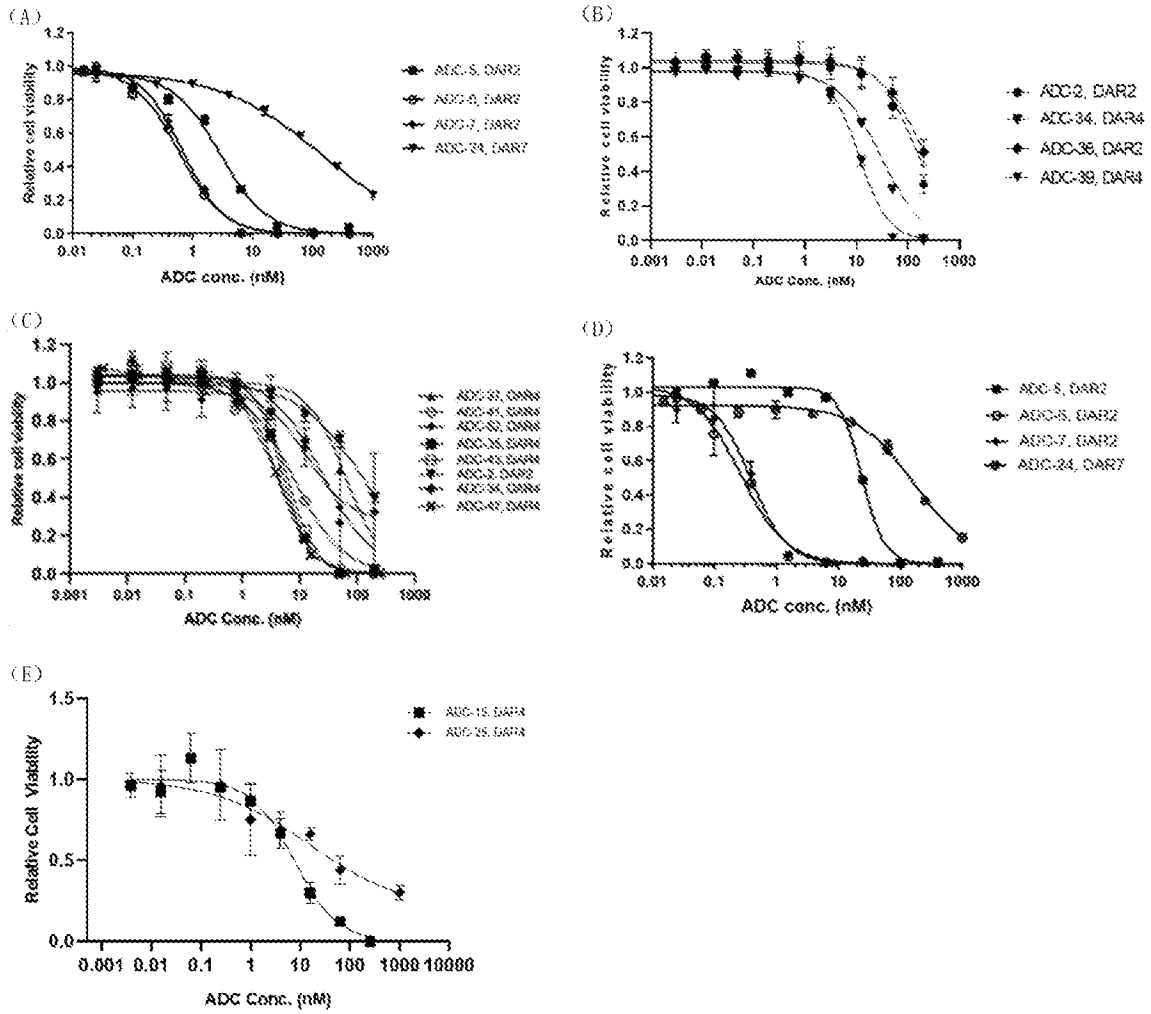


图 11

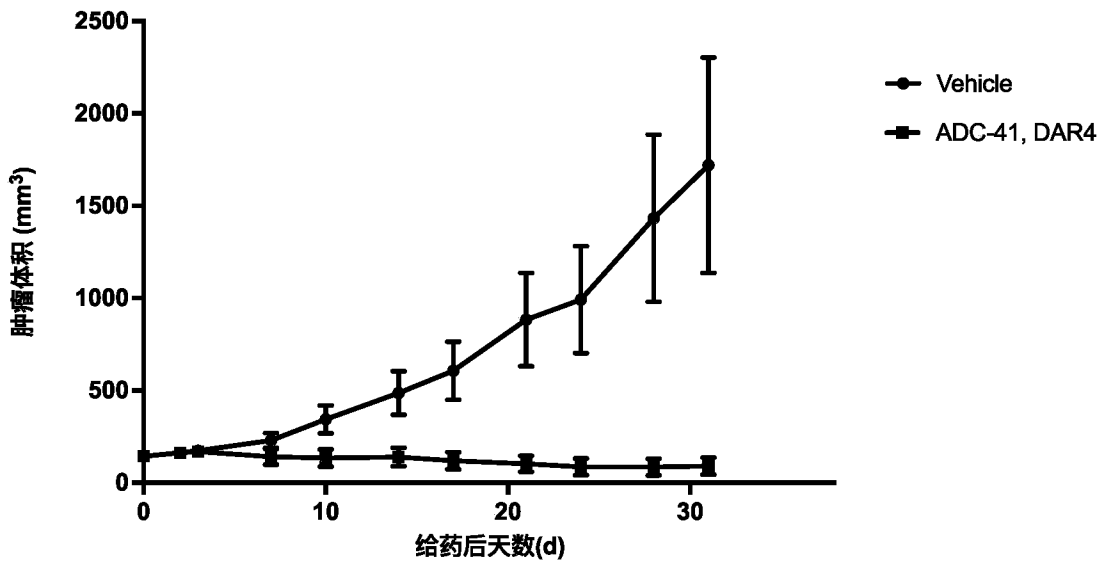


图 12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/090585

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K16/28(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C07K C12N A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNTXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, 万方数据, Wanfang Data, Web of Science, BING, 百度学术, Baidu Scholar, HimmPat, incoPat, 读秀, DUXIU, 中国生物序列检索系统, China Biological Sequence Search System, NCBI, EBI, STNext: 申请人, applicant, 发明人, inventor, ROR1, 酪氨酸激酶样孤儿受体1, 抗体, antibody, 序列1-137, sequences 1-137		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 114539411 A (SHANDONG BOAN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 27 May 2022 (2022-05-27) claims 1-13	1-39
A	CN 115043942 A (SICHUAN KELUN BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 13 September 2022 (2022-09-13) claims 1-31	1-39
A	WO 2022217054 A1 (SORRENTO THERAPEUTICS, INC.) 13 October 2022 (2022-10-13) claims 1-50	1-39
A	CN 108848669 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE et al.) 20 November 2018 (2018-11-20) claims 1-45	1-39
A	CN 110590951 A (ANMENGDE MEDICAL TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 20 December 2019 (2019-12-20) claims 1-10	1-39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
07 August 2024		14 August 2024
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	周琪 (ZHOU, Qi). "靶向ROR1肿瘤免疫治疗的研究进展 (Advances in Targeted ROR1 Tumor Immunotherapy)" <i>中国免疫学杂志 (Chinese Journal of Immunology)</i> , Vol. 36, No. (9), 31 December 2020 (2020-12-31), pp. 1145-1149 abstract	1-39
A	LIU, D.L. et al. "The Anti-ROR1 Monoclonal Antibody Zilovetamab Inhibits the Proliferation of Ovarian and Endometrial Cancer Cells" <i>Pharmaceutics</i> , Vol. vol. 14, 11 April 2022 (2022-04-11), no. 837 abstract	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/090585

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

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

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

Invention 1: the technical solutions of claims 1-39 (in part) involving a first heavy-chain variable region, a first light-chain variable region, an Ab-1 antigen-binding protein, a bispecific antigen-binding protein, a nucleic acid molecule, a drug molecule, a vector, a cell, and the use in the preparation of a drug.

Invention 2: the technical solutions of claims 1-15 and 27-39 (in part) involving a second heavy-chain variable region, a second light-chain variable region, an Ab-2 antigen-binding protein, a nucleic acid molecule, a drug molecule, a vector, a cell, and the use in the preparation of a drug.

Invention 3: the technical solutions of claims 1-15 and 27-39 (in part) involving a third heavy-chain variable region, a third light-chain variable region, an Ab-3 antigen-binding protein, a nucleic acid molecule, a drug molecule, a vector, a cell, and the use in the preparation of a drug.

Invention 4: the technical solutions of claims 1-39 (in part) involving a fourth heavy-chain variable region, a fourth light-chain variable region, an Ab-4 antigen-binding protein, a bispecific antigen-binding protein, a nucleic acid molecule, a drug molecule, a vector, a cell, and the use in the preparation of a drug.

Invention 5: the technical solutions of claims 1-15 and 27-39 (in part) involving a fifth heavy-chain variable region, a fifth light-chain variable region, an Ab-5 antigen-binding protein, a nucleic acid molecule, a drug molecule, a vector, a cell, and the use in the preparation of a drug.

The same or corresponding technical feature among inventions 1-5 is an antigen-binding protein that binds to hROR1. However, the prior art discloses an anti-ROR1 antibody or an antigen-binding fragment thereof (see CN 114539411 A, publication date: 27 May 2022, claims 1-13). Therefore, the same or corresponding technical feature among the above-mentioned inventions does not define any contribution which the inventions make over the prior art, and is not a special technical feature as defined in PCT Rule 13.2. Therefore, the present application lacks unity of invention and does not comply with PCT Rule 13.1.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2024/090585**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	114539411	A	27 May 2022	None	
-----					
CN	115043942	A	13 September 2022	None	
-----					
WO	2022217054	A1	13 October 2022	EP 4320165 A1	14 February 2024
				JP 2024513239 A	22 March 2024
				CA 3214653 A1	13 October 2022
				TW 202305001 A	01 February 2023
-----					
CN	108848669	A	20 November 2018	CA 3011815 A1	27 July 2017
				BR 112018014615 A2	11 December 2018
				PH 12018501554 A1	20 May 2019
				RU 2018129962 A	20 February 2020
				RU 2018129962 A3	22 June 2020
				RU 2766190 C2	09 February 2022
				EP 3405496 A1	28 November 2018
				EP 3405496 B1	25 October 2023
				WO 2017127664 A1	27 July 2017
				US 2020299381 A1	24 September 2020
				US 11242388 B2	08 February 2022
				SG 11201806120 WA	30 August 2018
				IL 260689 A	01 December 2022
				IL 260689 B2	01 April 2023
				US 2018340026 A1	29 November 2018
				US 10618959 B2	14 April 2020
				MX 2018008926 A	10 January 2019
				CL 2018001971 A1	21 December 2018
				KR 20180101554 A	12 September 2018
				US 2022153839 A1	19 May 2022
				UA 125718 C2	25 May 2022
				AU 2017210327 A1	09 August 2018
				JP 2019509021 A	04 April 2019
				JP 7000660 B2	04 February 2022
-----					
CN	110590951	A	20 December 2019	None	
-----					

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K16/28(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: C07K C12N A61K A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNTEXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, 万方数据, Web of Science, BING, 百度学术, HimmPat, incoPat, 读秀, 中国生物序列检索系统, NCBI, EBI, STNext: 申请人, 发明人, ROR1, 酪氨酸激酶样孤儿受体1, 抗体, antibody, 序列1-137</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 114539411 A (山东博安生物技术股份有限公司) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 权利要求1-13</td> <td>1-39</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 115043942 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司 等) 2022年9月13日 (2022 - 09 - 13) 权利要求1-31</td> <td>1-39</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2022217054 A1 (SORRENTO THERAPEUTICS, INC.) 2022年10月13日 (2022 - 10 - 13) 权利要求1-50</td> <td>1-39</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108848669 A (斯克利普斯研究所 等) 2018年11月20日 (2018 - 11 - 20) 权利要求1-45</td> <td>1-39</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110590951 A (安萌得医药科技(上海)有限公司) 2019年12月20日 (2019 - 12 - 20) 权利要求1-10</td> <td>1-39</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>周琪. "靶向ROR1肿瘤免疫治疗的研究进展" 中国免疫学杂志, 第36卷, 第9期, 2020年12月31日 (2020 - 12 - 31), 第1145-1149页 摘要</td> <td>1-39</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 114539411 A (山东博安生物技术股份有限公司) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 权利要求1-13	1-39	A	CN 115043942 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司 等) 2022年9月13日 (2022 - 09 - 13) 权利要求1-31	1-39	A	WO 2022217054 A1 (SORRENTO THERAPEUTICS, INC.) 2022年10月13日 (2022 - 10 - 13) 权利要求1-50	1-39	A	CN 108848669 A (斯克利普斯研究所 等) 2018年11月20日 (2018 - 11 - 20) 权利要求1-45	1-39	A	CN 110590951 A (安萌得医药科技(上海)有限公司) 2019年12月20日 (2019 - 12 - 20) 权利要求1-10	1-39	A	周琪. "靶向ROR1肿瘤免疫治疗的研究进展" 中国免疫学杂志, 第36卷, 第9期, 2020年12月31日 (2020 - 12 - 31), 第1145-1149页 摘要	1-39
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
A	CN 114539411 A (山东博安生物技术股份有限公司) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 权利要求1-13	1-39																					
A	CN 115043942 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司 等) 2022年9月13日 (2022 - 09 - 13) 权利要求1-31	1-39																					
A	WO 2022217054 A1 (SORRENTO THERAPEUTICS, INC.) 2022年10月13日 (2022 - 10 - 13) 权利要求1-50	1-39																					
A	CN 108848669 A (斯克利普斯研究所 等) 2018年11月20日 (2018 - 11 - 20) 权利要求1-45	1-39																					
A	CN 110590951 A (安萌得医药科技(上海)有限公司) 2019年12月20日 (2019 - 12 - 20) 权利要求1-10	1-39																					
A	周琪. "靶向ROR1肿瘤免疫治疗的研究进展" 中国免疫学杂志, 第36卷, 第9期, 2020年12月31日 (2020 - 12 - 31), 第1145-1149页 摘要	1-39																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2024年8月7日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2024年8月14日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>		<p>授权官员</p> <p>冯晓亮</p> <p>电话号码 (+86) 010-53961927</p>																					



C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	LIU, D.L.等. "The Anti-ROR1 Monoclonal Antibody Zilovertamab Inhibits the Proliferation of Ovarian and Endometrial Cancer Cells" PHARMACEUTICS, 第14卷, 2022年4月11日 (2022 - 04 - 11), 编号837 摘要	1-39

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
  - a.  作为国际申请的一部分提交的:
  - b.  为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),  
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2.  本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

## 第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

发明1：权利要求1-39（部分）中涉及第一重链可变区、第一轻链可变区及Ab-1的抗原结合蛋白、双特异性抗原结合蛋白、核酸分子、药物分子、载体、细胞、制备药物的应用的技术方案；

发明2：权利要求1-15、27-39（以上部分）中涉及第二重链可变区、第二轻链可变区及Ab-2的抗原结合蛋白、核酸分子、药物分子、载体、细胞、制备药物的应用的技术方案；

发明3：权利要求1-15、27-39（以上部分）中涉及第三重链可变区、第三轻链可变区及Ab-3的抗原结合蛋白、核酸分子、药物分子、载体、细胞、制备药物的应用的技术方案；

发明4：权利要求1-39（部分）中涉及第四重链可变区、第四轻链可变区及Ab-4的抗原结合蛋白、双特异性抗原结合蛋白、核酸分子、药物分子、载体、细胞、制备药物的应用的技术方案；

发明5：权利要求1-15、27-39（以上部分）中涉及第五重链可变区、第五轻链可变区及Ab-5的抗原结合蛋白、核酸分子、药物分子、载体、细胞、制备药物的应用的技术方案。

发明1-5之间的相同或相应的技术特征为结合hROR1的抗原结合蛋白。然而，现有技术中已公开了抗ROR1抗体或其抗原结合片段（参见CN114539411A，公开日2022年5月27日，权利要求1-13）。因此，上述发明之间的相同或相应的技术特征没有对现有技术做出任何贡献，不属于PCT实施细则13.2规定的特定技术特征。因此，本申请不具备单一性，不符合PCT实施细则13.1的规定。

- 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
- 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
- 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
- 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

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

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/090585

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114539411	A	2022年5月27日	无			
CN	115043942	A	2022年9月13日	无			
WO	2022217054	A1	2022年10月13日	EP	4320165	A1	2024年2月14日
				JP	2024513239	A	2024年3月22日
				CA	3214653	A1	2022年10月13日
				TW	202305001	A	2023年2月1日
CN	108848669	A	2018年11月20日	CA	3011815	A1	2017年7月27日
				BR	112018014615	A2	2018年12月11日
				PH	12018501554	A1	2019年5月20日
				RU	2018129962	A	2020年2月20日
				RU	2018129962	A3	2020年6月22日
				RU	2766190	C2	2022年2月9日
				EP	3405496	A1	2018年11月28日
				EP	3405496	B1	2023年10月25日
				WO	2017127664	A1	2017年7月27日
				US	2020299381	A1	2020年9月24日
				US	11242388	B2	2022年2月8日
				SG	11201806120	WA	2018年8月30日
				IL	260689	A	2022年12月1日
				IL	260689	B2	2023年4月1日
				US	2018340026	A1	2018年11月29日
				US	10618959	B2	2020年4月14日
				MX	2018008926	A	2019年1月10日
				CL	2018001971	A1	2018年12月21日
				KR	20180101554	A	2018年9月12日
				US	2022153839	A1	2022年5月19日
				UA	125718	C2	2022年5月25日
				AU	2017210327	A1	2018年8月9日
				JP	2019509021	A	2019年4月4日
				JP	7000660	B2	2022年2月4日
CN	110590951	A	2019年12月20日	无			