

抗原结合蛋白及其用途

相关申请的交叉引用

本申请要求 2023 年 12 月 18 日提交的中国专利申请 202311743747.1 的优先权，
5 这些专利申请的全部内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

本发明涉及特异性结合 HER3 的纳米抗体或其抗原结合片段，含有所述纳米抗体或其抗原结合片段的多肽构建体，编码所述纳米抗体或其抗原结合片段或所述多
10 肽构建体的核酸分子。此外，本发明还涉及所述纳米抗体或其抗原结合片段在疾病的治疗和诊断中的应用。

背景技术

人表皮生长因子受体 3 (HER3, 也称 ErbB3) 是人表皮生长因子受体 (HER) 家族
15 成员，该家族还包括 HER1/EGFR/ErbB1、HER2/ErbB2 和 HER4/ErbB4。每个成员都由与配体结合的胞外结构域、跨膜结构域、胞内激酶结构域和 C 端尾部组成。HER3 基因定位于 12 号染色体长臂 (12q13.2)，编码 180 kDa 蛋白，是 HER 家族中唯一缺乏或几乎没有酪氨酸激酶活性的成员，它的激酶活性比完全激活的 HER1 弱 1000 倍，需要与其他受体 HER1、HER2 或 HER4 形成异二聚体来诱导下游 C 端磷酸化。近年来研究发
20 现，HER3 还与癌细胞中其他非 HER 家族受体酪氨酸激酶(RTK)共同表达并形成异二聚体，激活致癌信号通路，特别是 PI3K/Akt、MAPK/ERK 和 JAK/STAT 通路和 Src 激酶。

与其他 HER 家族成员相比，HER3 单独过表达时并不致癌，但可以与其他受体合作诱导肿瘤发生，转移事件和耐药性。目前，已发现在多种癌症中 HER3 是过表达和/或过
25 度激活的，如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、脑癌、造血组织肿瘤、成视网膜细胞瘤、黑色素瘤、结肠癌、胃癌、头颈癌、肺癌等。HER3 过表达会对多种治疗药物产生耐药性，如 EGFR/HER2-TKI 耐药。且其高表达也与疾病进展和/或预后不良有关。

HER3 是一种引人注目的癌症治疗靶点，但迄今为止，尚未批准用于临床使用的
30 HER3 靶向治疗。靶向 HER3 的抗肿瘤治疗研究主要聚焦在单克隆抗体。瑟瑞妥单抗和

帕曲妥单抗是迄今为止在临床试验中显示出最有希望的靶向 HER3 的单克隆抗体，多项I期研究结果均显示出较好的耐受性与安全性。

5 瑟瑞妥单抗（Seribantumab，MM-121）是与 HER3 结合的完全人源 IgG2 单克隆抗体，可以阻断神经调节蛋白(NRG)配体与 HER3 结合，从而阻止维持肿瘤活化的 HER3 信号，同时通过阻断 ErbB 的同源或异源二聚化，便可阻断导致细胞生长的下游信号，进而诱导肿瘤细胞的死亡。

10 帕曲妥单抗（Patritumab，U3-1287）是一种全人源 HER3 抗体，可抑制 HER3 与配体结合。在 HER2 阳性乳腺癌中，patritumab 联合曲妥珠单抗和紫杉醇的总缓解率（ORR）为 39%。但在评估 patritumab 联合厄洛替尼治疗非小细胞肺癌的临床研究中未能达到预期的临床试验终点(NCT02134015)。

HER3 不具有如 HER2 等其他家族成员的内在激酶活性，且没有合适的反映患者 HER3 激活与否的生物标志物，进而给药物研发带来非常大的困难。抗 HER3 靶向药物的研发还需继续，传统 IgG 抗体的分子量约 150 kDa，但来源于羊驼的单域抗体/纳米抗体，和人的 Fc 融合之后分子量只有大约 75kDa，只有常规抗体的一半，与传统单克隆抗体相比具有更小的结构，具有更强的穿透血脑屏障能力，可以渗透进入肿瘤更核心部位，最大限度增加抗体药物结合肿瘤细胞的机会，产生更好的诊断和治疗肿瘤的效果。

因此，提供一种针对 HER3 的纳米抗体将具有较好的诊断和治疗肿瘤的前景。

发明内容

20 本申请的发明人经过大量的研究，筛选获得了系列抗 HER3 的纳米抗体以及多肽构建体，所述纳米抗体或多肽构建体与 HER3 具有高结合活性。特别地，本发明的纳米抗体或多肽构建体具有内吞活性，可以通过内吞介导毒素进入细胞内部，进而起到对肿瘤细胞的杀伤作用。在此基础上，由所述纳米抗体制备的人源化纳米抗体或多肽构建体仍然具有这些突出的活性。并且，所述纳米抗体或多肽构建体还具有分子量小，易于生产等特点。

25 基于此，本申请还提供了含有所述纳米抗体或其抗原结合片段的缀合物，编码所述纳米抗体或其抗原结合片段的核酸分子及包含其的宿主细胞，以及相关用途。

纳米抗体及其抗原结合片段

30 在一个方面，本发明提供了特异性结合 HER3 的纳米抗体或其抗原结合片段。本文

中所述的纳米抗体通常由 4 个构架区(FRs)和 3 个互补决定区(CDRs)组成,称为 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 及 FR4,所述抗原结合片段包含该纳米抗体的至少一部分,该部分足以赋予该片段特异性结合 HER3 的能力。在一些实施方案中,本发明所述的纳米抗体可在 N 端或 C 端处截短以使其仅包含部分 FR1 和/或 FR4,或缺少那些骨架区中的一个或两个,只要其实质上保持抗原结合和特异性即可。

在某些实施方案中,所述纳米抗体或其抗原结合片段包含: SEQ ID NO: 8-10 任一项所示的 VHH 中含有的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3。

在某些实施方案中,所述 CDR 根据 Kabat、Chothia 或 IMGT 编号系统定义。

在某些实施方案中,所述纳米抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 1 所示的 CDR1; 如 SEQ ID NO: 2 或 7 所示的 CDR2; 以及,如 SEQ ID NO: 3 所示的 CDR3; 其中,所述 CDR 按 Kabat 编号系统定义。

在某些实施方案中,所述纳米抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 4 所示的 CDR1; 如 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR2; 以及,如 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR3; 其中,所述 CDR 按 IMGT 编号系统定义。

在某些实施方案中,所述纳米抗体或其抗原结合片段包含驼源抗体的框架区序列。

在某些实施方案中,所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 8 所示的序列,或与其相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列,或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如,1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。在某些实施方案中,所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 8 所示的序列。

在某些实施方案中,所述纳米抗体或其抗原结合片段是人源化的,即其中一或多个框架区已基本上由人类框架区替换。

在某些实施方案中,所述纳米抗体或其抗原结合片段进一步包含人免疫球蛋白的重链框架区(例如,人重链胚系抗体基因所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区),所述重链框架区任选地包含一个或多个(例如,1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个)从人源残基至驼源残基的回复突变。

在某些实施方案中,所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 9 所示的序

列，或与其相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列。在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 9 所示的序列。

在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 10 所示的序列，或与其相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列。在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 10 所示的序列。

多肽构建体

在另一个方面，本发明还提供了特异性结合 HER3 的多肽构建体，其包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段，以及免疫球蛋白 Fc 结构域。

在本文中，所述 Fc 结构域也称为 Fc 区，是指包含 CH2 和 CH3 的重链恒定区的一部分。在一些实施方案中，Fc 结构域包含铰链、CH2 和 CH3。当 Fc 结构域包含铰链时，铰链调节两个含 Fc 的多肽之间的二聚作用。Fc 结构域可为任何抗体重链恒定区同型。在一些实施方案中，Fc 结构域是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

在某些实施方案中，本发明多肽构建体所包含的 Fc 结构域是天然 Fc 区，其包含与自然界中发现的 Fc 区的氨基酸序列一致的氨基酸序列。例如，所述 Fc 结构域可以是天然序列人类 IgG1 Fc 区、天然序列人类 IgG2 Fc 区、天然序列人类 IgG3 Fc 区或天然序列人类 IgG4 Fc 区。天然 Fc 区可具有效应子功能。示例性“效应子功能”包括与 Fc 受体结合；C1q 结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；噬菌作用；对细胞表面受体（例如 B 细胞受体）的下调；和 B 细胞活化等。可以通过将天然 Fc 区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基或化学修饰，产生功能改变，例如，改变抗体对效应子配体（如 FcR 或补体 C1q）的亲合力，从而改变效应子功能（例如降低或增强）。

因此，在某些实施方案中，本发明多肽构建体所包含的 Fc 结构域也可以是变异 Fc 区，其与天然 Fc 区相比可以包含一个或多个（例如 1-10 个，例如 1-5 个）氨基酸突变或

化学修饰以改变本发明抗体的下列中的一个或多个特性：Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能等。在某些实施方案中，本发明多肽构建体所包含的 Fc 结构域具有降低或去除的效应子功能，例如是包含 LALA 突变的 Fc 结构域。

5 在某些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 结构域任选地通过肽接头连接至所述纳米抗体或其抗原结合片段的 N 端和/或 C 端（例如 C 端）。

在某些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 结构域是 IgG 的 Fc 结构域（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 结构域）。

在某些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 结构域是人免疫球蛋白 Fc 结构域，例如人
10 IgG 的 Fc 结构域（例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 结构域）。

在某些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 11 所示的序列，或与其相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2
15 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列。在某些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 11 所示的序列。

在某些实施方案中，所述多肽构建体包含 SEQ ID NOs: 12-14 任一项所示的序列，或与其相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列
20 同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列。

纳米抗体及多肽构建体的制备

本发明的纳米抗体或多肽构建体可以用本领域已知的各种方法来制备，例如通过基因工程重组技术来获得。例如，通过化学合成或 PCR 扩增获得编码本发明纳米抗体或多肽构建体的 DNA 分子。将所得 DNA 分子插入表达载体内，然后转染宿主细胞。然后，
25 在特定条件下培养转染后的宿主细胞，并表达本发明的抗体或多肽构建体。

在另一个方面，本发明还提供了分离的核酸分子，其编码本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体。

30 在另一个方面，本发明还提供了载体，其包含本发明的核酸分子。在某些实施方案

中，所述载体为克隆载体或表达载体。

在另一个方面，本发明还提供了宿主细胞，其包含本发明的核酸分子或载体。此类宿主细胞包括但不限于，原核细胞例如细菌细胞（如大肠杆菌细胞），以及真核细胞例如真菌细胞（例如酵母细胞），昆虫细胞，植物细胞和动物细胞（如哺乳动物细胞，例如小鼠细胞、人细胞等）。

在另一个方面，本发明还提供了制备本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体的方法，其包括，在允许蛋白表达的条件下，培养本发明的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述纳米抗体或其抗原结合片段或所述多肽构建体。

10 双特异性或多特异性抗体

在另一个方面，本发明还提供了双特异性或多特异性抗体，其包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体。本发明还提供了本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体、或编码它们的核酸分子、载体或宿主细胞用于制备双特异性或多特异性抗体的用途。

15 在某些实施方案中，所述双特异性或多特异性抗体特异性结合 **HER3**，并且额外地特异性结合一个或多个其他靶标。

在某些实施方案中，所述双特异性或多特异性抗体还包含至少一种具有针对第二靶标的第二结合特异性的第二抗体。

20 偶联物

在另一个方面，本发明还提供了偶联物，其包括包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体或本发明的双特异性或多特异性抗体以及与其连接的偶联部分。

25 在某些实施方案中，所述偶联部分选自治疗剂（如细胞毒剂、细胞因子、毒素或放射性核素）。

在某些实施方案中，所述偶联物是抗体-药物偶联物（ADC）。

药物组合物

30 在另一个方面，本发明还提供了药物组合物，其含有本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体或

偶联物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在某些实施方案中，所述药物组合物还包含另外的药学活性剂，例如抗肿瘤剂。

在某些实施方案中，在所述药物组合物中，本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体或偶联物与
5 所述另外的药学活性剂可以作为分开的组分或作为混合的组分提供。

本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物可以配制成医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂（包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液）、吸入剂、
10 喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式和治疗用途。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：在适当的溶剂中掺入必需剂量的本发明的抗体或其抗原结合片段，以及任选地，同时掺入其他期望的成分(包括但不限于，pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合)，随后过滤除菌。此外，可以将无菌注射溶液制备为无
15 菌冻干粉剂(例如，通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中。

在某些示例性实施方案中，所述药学上可接受的载体和/或赋形剂包含无菌可注射液体（如水性或非水性悬浮液或溶液）。在某些示例性实施方案中，此类无菌可注射液体选自注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液（例如 0.9% (w/v)NaCl）、
20 葡萄糖溶液（例如 5%葡萄糖）、含有表面活性剂的溶液（例如 0.01%聚山梨醇 20）、pH 缓冲溶液（例如磷酸盐缓冲溶液）、Ringer 氏溶液及其任意组合。

本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明所述的纳米抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、或偶联物。“预防有效量”是指，足以预防，阻止，或延迟疾病的发生的量。“治疗有效
25 量”是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。治疗有效量可根据如下因素发生变化：待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

检测应用

试剂盒

在另一个方面，本发明还提供了试剂盒，其包括本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体。

5 在某些实施方案中，所述试剂盒包含缀合物，所述缀合物包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体，以及与所述纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体连接的可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

10 在某些实施方案中，所述试剂盒包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体，以及特异性识别所述纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体的第二抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

15

嵌合抗原受体

在另一方面，本申请还提供了嵌合抗原受体，其包含如前所述的纳米抗体或其抗原结合片段的抗原结合结构域或者如前所述的多肽构建体。

在某些实施方案中，所述抗原结合结构域由免疫效应细胞（例如 T 细胞）所表达。

20 分离的核酸分子

在另一方面，本申请还提供了分离的核酸分子，其编码如前所述的嵌合抗原受体。

载体

在另一方面，本申请还提供了载体，其包含如前所述的分离的核酸分子。在某些实施方案中，其用于制备嵌合抗原受体 T 细胞。

25 宿主细胞

在另一方面，本申请还提供了宿主细胞，其包含如前所述的分离的核酸分子或如前所述的载体。在某些实施方案中，所述宿主细胞是免疫效应细胞（例如，T 细胞或 NK 细胞）。在某些实施方案中，所述宿主细胞是嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）。

制药用途

在另一个方面，本发明还提供了本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物用于制备药物的用途，所述药物用于在受试者中预防和/治疗肿瘤。

5 在某些实施方案中，所述肿瘤为 **HER3** 阳性肿瘤。

在某些实施方案中，所述药物用于抑制表达 **HER3** 的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞。

在某些实施方案中，药物还包含另外的药学活性剂。

在某些实施方案中，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物，例如烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂、放射增敏剂、抗血管生成剂、细胞因子、分子靶向药物、免疫检查点抑制剂或溶瘤病毒。

在某些实施方案中，所述肿瘤选自实体瘤，例如胃癌、肺癌、肝癌、头颈癌、皮肤癌、大肠癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、宫颈癌、间皮瘤、乳腺癌、结直肠癌或口腔鳞癌。

在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

预防和/或治疗肿瘤的方法

在另一个方面，本发明还提供了用于在受试者中预防和/或治疗肿瘤的方法，其包括：给有此需要的受试者施用有效量的本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物。

在某些实施方案中，所述肿瘤为 **HER3** 阳性肿瘤。

在某些实施方案中，所述肿瘤选自实体瘤，例如胃癌、肺癌（如非小细胞肺癌）、肝癌、头颈癌、皮肤癌、大肠癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、宫颈癌、间皮瘤、乳腺癌、结直肠癌或口腔鳞癌。

在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物可以配制成医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂（包括注射

液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液)、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式和治疗用途。本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如,可通过下述方法来制备无菌注射溶液:在适当的溶剂中掺入必需剂量的本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物,以及任选地,同时掺入其他期望的成分(包括但不限于,pH 调节剂,表面活性剂,佐剂,离子强度增强剂,等渗剂、防腐剂、稀释剂,或其任何组合),随后过滤除菌。此外,可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如,通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中,例如注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液(例如 0.9% (w/v)NaCl)、葡萄糖溶液(例如 5%葡萄糖)、含有表面活性剂的溶液(例如 0.01%聚山梨醇 20)、pH 缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲溶液)、Ringer 氏溶液及其任意组合。

本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用,包括但不限于,口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、内胞浆网槽内、腹股沟、膀胱内、局部(如,粉剂、药膏或滴剂),或鼻腔途径。但是,对于许多治疗用途而言,优选的给药途径/方式是胃肠外给药(例如静脉注射或推注,皮下注射,腹膜内注射,肌肉注射)。技术人员应理解,给药途径和/或方式将根据预期目的而发生变化。在某些实施方案中,本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物通过静脉注射或推注给予。

检测方法

在另一个方面,本发明还提供了用于检测 HER3 在样品中的存在或其水平的方法,其包括使用本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体。在某些实施方案中,所述方法用于治疗目的,诊断目的,或者非治疗非诊断目的。

在某些实施方案中,所述方法是免疫学检测,例如免疫印迹法、酶免疫测定法(例如 ELISA)、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法。

在某些实施方案中,所述方法包括使用缀合物,所述缀合物包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体,以及与所述纳米抗体或其抗原结合片段或多

肽构建体连接的可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

在某些实施方案中，所述方法包括使用本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体，并且所述方法还包括使用携带可检测的标记（例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素）的第二抗体来检测所述纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体。

在某些实施方案中，所述方法包括：(1) 将所述样品与本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、本发明的多肽构建体、或缀合物接触，所述缀合物包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体，以及与所述纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体连接的可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素；(2) 检测抗原-抗体免疫复合物的形成或检测所述免疫复合物的量。所述免疫复合物的形成表明存在 **HER3** 或表达 **HER3** 的细胞。

在某些实施方案中，所述方法用于检测肿瘤是否能够通过靶向 **HER3** 的抗肿瘤疗法来治疗。在此类实施方案中，所述样品来自受试者，所述受试者患有肿瘤、怀疑患有肿瘤或具有患有肿瘤风险。在某些实施方案中，所述样品为来自受试者（例如哺乳动物，例如人）的细胞样品（例如包含肿瘤细胞的样品）或体液样品（例如血液）。在某些实施方案中，当存在 **HER3** 或表达 **HER3** 的细胞，和/或与参照水平相比（例如与无肿瘤疾病的患者相比），**HER3** 或表达 **HER3** 的细胞的量增加时，表明所述受试者适于靶向 **HER3** 的抗肿瘤疗法。

检测试剂制备用途

在另一个方面，本发明还提供了本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体在制备用于检测 **HER3** 在样品中的存在或其水平或者用于检测肿瘤是否能够通过靶向 **HER3** 的抗肿瘤疗法来治疗的检测试剂中的用途。

在某些实施方案中，所述检测试剂通过如上所述的本发明的方法来检测 **HER3** 在样品中的存在或其水平以及任选地检测肿瘤是否能够通过靶向 **HER3** 的抗肿瘤疗法来治疗。

在某些实施方案中，所述样品为来自受试者（例如哺乳动物，例如人）的细胞样品

(例如包含肿瘤细胞的样品)或体液样品(例如血液)。

术语定义

在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员
5 人所通常理解的含义。并且,本文中所用的病毒学、生物化学、免疫学实验室操作步骤
均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术
语的定义和解释。

当本文使用术语“例如”、“如”、“诸如”、“包括”、“包含”或其变体时,这些术语将
不被认为是限制性术语,而将被解释为表示“但不限于”或“不限于”。

10 除非本文另外指明或根据上下文明显矛盾,否则术语“一个”和“一种”以及“该”和类
似指称物在描述本发明的上下文中(尤其在以下权利要求的上下文中)应被解释成覆盖
单数和复数。

如本文中所使用的,术语“驼源抗体”是指,经免疫接种或抗原入侵的骆驼科
(**Camelidae**)动物(包括骆驼(**Camel**)、羊驼(**Alpaca**)和大羊驼(**L.glama**))所产生的
15 针对该抗原的抗体。本领域技术人员已知,在骆驼科动物所产生的抗体中存在缺失轻链
的“重链抗体”(Camelid heavy-chain antibody, **HCAb**),这种抗体只包含一个重链可变区
(**variable domain of heavy chain of HCAb, VHH**)和两个常规的 **CH2** 与 **CH3** 区,并且单
独克隆并表达出来的 **VHH** 区具有很好的结构稳定性与抗原结合活性,**VHH** 是目前已知
的可结合目标抗原的最小单位。

20 如本文中所使用的,术语“纳米抗体(**nanobody**)”或“单域抗体”具有本领域技术人
员通常理解的含义,可以互换使用。其是指由单个单体可变抗体结构域(例如单个重链
可变区)所组成的抗体片段,通常来源于重链抗体(例如骆驼科动物抗体或鲨鱼抗体)
的可变区。典型地,纳米抗体由 4 个构架区和 3 个互补性决定区组成,具有 **FR1-CDR1-**
FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的结构。纳米抗体可在 **N** 端或 **C** 端处截短以使其仅包含部分
25 **FR1** 和/或 **FR4**,或缺少那些骨架区中的一个或两个,只要其实质上保持抗原结合和特异
性即可。

如本文中所使用的,术语纳米抗体的“抗原结合片段”是指包含纳米抗体的片段的多
肽,其保持特异性结合纳米抗体所结合的共同抗原的能力,和/或与纳米抗体竞争对抗原
的特异性结合,其也被称为“抗原结合部分”。通常参见, **Fundamental Immunology, Ch.**
30 **7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989))**, 其以其全文通过引用合并入本文,用

于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过本发明纳米抗体的酶促或化学断裂产生本发明抗体的抗原结合片段。在一些实施方案中，所述纳米抗体的“抗原结合片段”与全长纳米抗体相比可在 N 端或 C 端处截短以使其仅包含部分 FR1 和/或 FR4，或缺少那些骨架区中的一个或两个，只要其实质上保持抗原结合和特异性即可。

- 5 可使用本领域技术人员已知的常规技术（例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法）从给定的纳米抗体（例如本发明提供的纳米抗体）获得纳米抗体的抗原结合片段，并且以与用于完整纳米抗体的方式相同的方式就特异性筛选纳米抗体的抗原结合片段。

在本文中，除非上下文明确指出，否则当提及术语“单域抗体”或“纳米抗体”时，其不仅包括完整纳米抗体，而且包括纳米抗体的抗原结合片段。

- 10 如本文中所使用的，术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区中负责抗原结合的氨基酸残基。在纳米抗体中含有三个 CDR，命名为 CDR1、CDR2 和 CDR3。这些 CDR 的精确边界可根据本领域已知的各种编号系统进行定义，例如可按照 Kabat 编号系统（Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991）、Chothia 编号系统（Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia 等人 (1989) *Nature* 342:878-883）或 IMGT 编号系统（Lefranc et al., *Dev. Comparat. Immunol.* 27:55-77, 2003）中的定义。对于给定的纳米抗体，本领域技术人员将容易地鉴别各编号系统所定义的 CDR。并且，不同编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的（例如，可参见 Lefranc et al., *Dev. Comparat. Immunol.* 27:55-77, 2003）。在本文中，纳米抗体的 CDR 优选地通过
15 Kabat、Chothia 和/或 IMGT 编号系统确定。

如本文中所使用的，术语“构架区”或“FR”残基是指，抗体可变区中除了如上定义的 CDR 残基以外的那些氨基酸残基。

- 25 如本文中所使用的，术语“Fc 结构域”或“Fc 区”意指，包含 CH2 和 CH3 的重链恒定区的一部分。抗体的 Fc 片段具有多种不同的功能，但不参与抗原的结合。由 Fc 区介导的“效应子功能”包括 Fc 受体结合；C1q 结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；噬菌作用；对细胞表面受体(例如 B 细胞受体)的下调；和 B 细胞活化等。在一些实施方案中，Fc 区包含铰链、CH2 和 CH3。当 Fc 区包含铰链时，铰链调节两个含 Fc 的多肽之间的二聚作用。Fc 区可为任何抗体重链恒定区同型，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

- 30 Fc 结构域既可以包括天然 Fc 区，也可以包括变异 Fc 区。天然 Fc 区包含与自然界

中发现的 Fc 区的氨基酸序列一致的氨基酸序列，例如天然序列人类 Fc 区包括天然序列人类 IgG1 Fc 区(非 A 和 A 同种异型)；天然序列人类 IgG2 Fc 区；天然序列人类 IgG3 Fc 区；及天然序列人类 IgG4 Fc 区，以及其天然存在的变异体。变异 Fc 区包含因至少一个氨基酸修饰而与天然序列 Fc 区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。在一些实施方案中，变异 Fc 区可具备相比于天然 Fc 区改变的效应子功能（例如 Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能）。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，经基因工程改造的非人源抗体，其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言，人源化抗体的全部或部分 CDR 区来自于非人源抗体（供体抗体），全部或部分的非 CDR 区（例如，可变区 FR 和/或恒定区）来自于人源免疫球蛋白（受体抗体）。在某些实施方案中，人源化抗体的 CDR 区来自于非人源抗体（供体抗体），全部或部分的非 CDR 区（例如，可变区 FR 和/或恒定区）来自于人源免疫球蛋白（受体抗体）。人源化抗体通常保留了供体抗体的预期性质，包括但不限于，抗原特异性、亲和性、反应性等。在本申请中，供体抗体可以是有预期性质（例如，抗原特异性、亲和性、反应性等）的驼源抗体。为制备人源化抗体，可以使用本领域已知的方法将免疫动物的 CDR 区插入人源框架序列。在纳米抗体的语境下，人源化抗体可指人源化 VHH，即其中一或多个骨架区已基本上由人类骨架区替换的 VHH。在一些情形中，人类免疫球蛋白的某些骨架区(FR)由相应非人类残基替换。此外，人源化 VHH 可包含在初始 VHH 或人类骨架序列中均未发现、但被包括在内以进一步改进和优化 VHH 或含 VHH 的多肽的性能的残基。

如本文中所使用的，术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。为了测定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性，为了最佳比较目的将序列进行比对（例如，可在第一氨基酸序列或核酸序列中引入缺口以与第二氨基酸或核酸序列最佳比对）。然后比较对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，则分子在该位置上是同一的。两个序列之间的百分比同一性是由序列所共享的同一性位置的数目的函数（即，百分比同一性=同一重叠位置的数目/位置的总数×100%）。在某些实施方案中，两个序列长度相同。

两个序列之间的百分比同一性的测定还可使用数学算法来实现。用于两个序列的比較的数学算法的一个非限制性实例是 Karlin 和 Altschul 的算法，1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268，如同 Karlin 和 Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

90:5873-5877 中改进的。将这样的算法整合至 Altschul 等人, 1990, J. Mol. Biol. 215:403 的 NBLAST 和 XBLAST 程序中。

如本文中所使用的, 术语“特异性结合”是指, 两分子间的非随机的结合反应, 如抗体和其所针对的抗原之间的反应。特异性结合相互作用的强度或亲和力可以该相互作用的平衡解离常数 (K_D) 表示。在本发明中, 术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数, 其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小, 抗体-抗原结合越紧密, 抗体与抗原之间的亲和力越高。

两分子间的特异性结合性质可使用本领域公知的方法进行测定。一种方法涉及测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速度。“结合速率常数” (k_a 或 k_{on}) 和“解离速率常数” (k_{dis} 或 k_{off}) 两者都可通过浓度及缔合和解离的实际速率而计算得出 (参见 Malmqvist M, Nature, 1993, 361:186-187)。 k_{dis}/k_{on} 的比率等于解离常数 K_D (参见 Davies 等人, Annual Rev Biochem, 1990; 59:439-473)。可用任何有效的方法测量 K_D 、 k_{on} 和 k_{dis} 值。在某些实施方案中, 可以使用表面等离子体共振术 (SPR) 在 Biacore 中来测量解离常数。除此以外还可用生物发光干涉测量法或 Kinexa 来测量解离常数。

如本文中所使用的, 本发明所述的可检测的标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。这类标记是本领域熟知的, 其实例包括但不限于, 酶 (例如, 辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶, 等)、放射性核素 (例如, 3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、荧光染料 (例如, 异硫氰酸荧光素 (FITC)、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明 (TRITC)、藻红蛋白 (PE)、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物 (例如 Cy7、Alexa 750))、发光物质 (例如化学发光物质, 如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、钌衍生物如三联吡啶钌)、磁珠 (例如, Dynabeads[®])、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料 (例如, 聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶, 等) 珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素 (例如, 链霉亲和素) 的生物素。

如本文中所使用的, 术语“载体 (vector)”是指, 可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时, 载体称为表达载体。载体可以通过转化, 转导或者转染导入宿主细胞, 使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的, 包括但不限于: 质粒; 噬菌粒; 柯斯质粒; 人工染色体, 例如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 来源的人工染色体 (PAC); 噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动

物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如SV40）。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

5 如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

10 如本文中所使用的，术语“预防”是指，为了阻止或延迟疾病或病症或症状（例如，肿瘤）在受试者体内的发生而实施的方法。如本文中所使用的，术语“治疗”是指，为了获得有益或所需临床结果而实施的方法。为了本发明的目的，有益或所需的临床结果包括但不限于，减轻症状、缩小疾病的范围、稳定（即，不再恶化）疾病的状态，延迟或减缓疾病的发展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状（无论部分或全部），无论是可检测或是不可检测的。此外，“治疗”还可以指，与期望的存活期相比（如果未接受治疗），15 延长存活期。

20 如本文中所使用的，术语“癌症”或“肿瘤”可互换使用，其是指以体内异常细胞的不受控生长为特征的一大类疾病。不受管制的细胞分裂可能导致恶性肿瘤或侵入邻近组织的细胞的形成，并可能通过淋巴系统或血流转移到身体的远端部位。癌症包括良性和恶性癌症以及休眠肿瘤或微转移。癌症也包括血液学恶性肿瘤。

发明的有益效果

25 本申请提供的抗 HER3 的纳米抗体或多肽构建体，其与 HER3 具有高结合活性。特别地，本发明的纳米抗体或多肽构建体具有内吞活性，可以通过内吞介导毒素进入细胞内部，进而起到对肿瘤细胞的杀伤作用。在此基础上，由所述纳米抗体或多肽构建体制备的人源化纳米抗体或多肽构建体仍然具有这些突出的活性。并且，所述纳米抗体或多肽构建体由于分子量小还具有易于生产等特点。

30 下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将理解，下列附图和实施例仅用于说明本发明，而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述，本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员

来说将变得显然。

附图说明

- 图 1 显示了通过 ELISA 法检测的待选抗体对人 HER3 抗原的结合能力。
- 5 图 2A 显示了 FACS 实验中 14 种待选抗体对 SK-BR-3 细胞的结合活性。
- 图 2B 显示了 FACS 实验中 4 种待选抗体对 SK-BR-3 细胞的结合活性。
- 图 3 显示了待选抗体在 SK-BR-3 细胞的内吞百分数。
- 图 4 显示了 MHAB15-6 人源化抗体和人重组 HER3 的 ELISA 结合曲线。
- 图 5 显示了 MHAB15-6 人源化抗体和 SK-BR-3 细胞的流式结合曲线。
- 10 图 6 显示了人源化抗体在 SK-BR-3 细胞的内吞百分数。
- 图 7 为抗体 MHAB15-6 是否与 Patritumab 竞争性结合人重组 HER3 抗原的测试结果。
- 图 8A 显示了抗体 MHAB15-6-5 对不同种属 HER3 的 ELISA 结合曲线。
- 图 8B 显示了 Isotype 对不同种属 HER3 的 ELISA 结合曲线。
- 15 图 9A 显示了抗体 MHAB15-6-5 对 EGFR 家族蛋白的 ELISA 结合曲线。
- 图 9B 显示了 Isotype 对 EGFR 家族蛋白的 ELISA 结合曲线。

序列信息

本发明涉及的部分序列的信息提供于下面的表 1 中。

20 表 1：序列信息

SEQ ID NO:	序列名称	序列
1	MHAB15-6-Kabat-CDR1 MHAB15-6-5-Kabat-CDR1 MHAB15-6-7-Kabat-CDR1	AYITN
2	MHAB15-6-Kabat-CDR2 MHAB15-6-5-Kabat-CDR2	TVTPGGSTIAADSVKG
3	MHAB15-6-Kabat-CDR3 MHAB15-6-5-Kabat-CDR3 MHAB15-6-7-Kabat-CDR3	IPPKR
4	MHAB15-6-IMGT-CDR1 MHAB15-6-5-IMGT-CDR1 MHAB15-6-7-IMGT-CDR1	GITLSAYI
5	MHAB15-6-IMGT-CDR2 MHAB15-6-5-IMGT-CDR2 MHAB15-6-7-IMGT-CDR2	VTPGGST
6	MHAB15-6-IMGT-CDR3 MHAB15-6-5-IMGT-CDR3 MHAB15-6-7-IMGT-CDR3	NTIPPKR

7	MHAB15-6-7-Kabat-CDR2	TVTPGGSTYYADSVKG
8	MHAB15-6 VHH	QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGITLSAYITN WYRQVPGKQRELVATVTPGGSTIAADSVKGRFTIS RDNTKNTVYVYLMNLSLRPEDTAVYYCNTIPPKRWG QGTRVTVSS
9	MHAB15-6-5 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLSAYITN WVRQAPGKQRELVATVTPGGSTIAADSVKGRFTIS RDNSKNTVYVYLMNLSLRPEDTAVYYCNTIPPKRWG QGTRVTVSS
10	MHAB15-6-7 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLSAYITN WVRQAPGKQRELVATVTPGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYVYLMNLSLRPEDTAVYYCNTIPPKRW QGTRVTVSS
11	Fc	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	MHAB15-6	QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGITLSAYITN WYRQVPGKQRELVATVTPGGSTIAADSVKGRFTIS RDNTKNTVYVYLMNLSLRPEDTAVYYCNTIPPKRWG QGTRVTVSSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	MHAB15-6-5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLSAYITN WVRQAPGKQRELVATVTPGGSTIAADSVKGRFTIS RDNSKNTVYVYLMNLSLRPEDTAVYYCNTIPPKRWG QGTRVTVSSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	MHAB15-6-7	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLSAYITN WVRQAPGKQRELVATVTPGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYVYLMNLSLRPEDTAVYYCNTIPPKRW QGTRVTVSSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWXVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

具体实施方式

现参照下列意在举例说明本发明（而非限定本发明）的实施例来描述本发明。

除非特别指明，本发明中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法，基本上

5 参照 J. Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，

1989, 以及 F. M. Ausubel 等人, 精编分子生物学实验指南, 第 3 版, John Wiley & Sons, Inc., 1995 中所述的方法进行; 限制性内切酶的使用依照产品制造商推荐的条件。本领域技术人员知晓, 实施例以举例方式描述本发明, 且不意欲限制本发明所要求保护的范围。

5

实施例 1. 抗人 HER3 纳米抗体序列的获得

1-1 羊驼免疫及血清效价检测

采用 Her3/ERBB3 Protein, Human(His Tag)抗原 (恺佶, Cat. No. HER-HM403) 和 Her3/ERBB3 Protein, Human(His Tag)抗原 (ACRO, Cat. No. ER3-H5223), 免疫一只空白羊驼。

初次免疫前采血 10mL, 作为阴性血清; 初次免疫使用完全弗氏佐剂与 1mg HER3 抗原 1:1 混合后皮下多点注射。后分别于第二、四、六周利用不完全弗氏佐剂与 0.5mg HER3 抗原 1:1 混合后皮下多点注射进行二次、三次、四次免疫, 再于第八、十周利用不完全弗氏佐剂与 1mg HER3 抗原 1:1 混合后皮下多点注射进行五次、六次免疫, 再于第十二、十四、十六周利用不完全弗氏佐剂与 0.5mg HER3 抗原 1:1 混合后皮下多点注射进行七次、八次和九次免疫, 并于第三次、四次、五次、六次、七次、八次和九次免疫前采集 10mL 外周血, 分离血清, 用 ELISA 方法监测免疫反应。九免 7 天后, 采集 50mL 外周血用于后续纳米抗体库构建。

1-2 特异性纳米抗体筛选与鉴定

采集免疫羊驼的外周血, 提取 RNA, 制备 cDNA 样品后, PCR 克隆 VHH 抗体编码基因, 构建单域抗体噬菌体展示库。随机挑取克隆, 对库容量及多样性进行鉴定。

利用 Her3/ERBB2 Protein, Human, Recombinant, His Tag)抗原 (恺佶, Cat. No. HER-HM403; ACRO, Cat. No. ER3-H5223), 对单域抗体噬菌体展示库进行淘选富集实验后, 筛选后挑选单克隆进行 Phage-ELISA 检测, 挑选 CDR 区域氨基酸序列不同的候选克隆, 最终挑选出 25 条独特序列。

1-3 独特序列可溶性验证及抗体表达

提取上述 25 个阳性克隆质粒, 分别转入 E.coli Rosetta, 0.4mM IPTG 20°C 200rpm 诱导表达过夜。次日, 离心, 将沉淀用 PBS 重悬, 超声破碎, 离心获取 25 个克隆的破碎

后上清。采用 ELISA 检测 25 个克隆的破碎上清与人 HER3 抗原的结合活性（OD₄₅₀ 如下表 2 所示）。

选取与人 HER3 结合活性强的 14 条独特序列，将 VHH 序列整合到 Human IgG1 的 Fc（LALA）序列（SEQ ID NO: 11），进行 CHO 瞬转表达，生产 MHAB15 待选抗体

5 （本申请编号和筛选的独特序列对应如表 3 所示，后续 MHAB15 待选抗体的描述均使用本申请编号即 MHAB15-1~14），表达后抗体经 Protein A 纯化，溶解于 PBS 中，抗体溶液纯度（SEC，280nm）均>95%，内毒素（EU/mg）<1。分装后于-80℃保存。

表 2. 25 个克隆的 OD₄₅₀ 结果

独特序列	OD ₄₅₀	独特序列	OD ₄₅₀
M26H3-2011	3.246	M29H3-2-112	3.041
M26H3-2049	0.116	M29H3-2-139	3.198
M26H3-3014	0.09	M29H3-2-140	0.106
M26H3-3039	0.217	M29H3-2-145	0.091
M26H3-3155	1.568	M29H3-3-12	0.078
M29H3-1-72	0.18	M29H3-3-21-1	0.53
M29H3-2-12	0.86	M29H3-3-32	0.117
M29H3-2-41	1.164	M29H3-3-33-1	0.1
M29H3-2-79	2.367	M29H3-3-37	0.082
M29H3-2-84	1.053	M29H3-3-52	0.103
M29H3-2-100	0.157	M29H3-3-149	0.157
M29H3-2-105	2.294	M29H3-3-177	0.105
M29H3-2-111	0.33		
无关对照	0.073	1%M-PBS	0.079

10

表 3. 编号对应

本申请编号	独特序列	本申请编号	独特序列
MHAB15-1	M26H3-3155	MHAB15-8	M29H3-2-112
MHAB15-2	M29H3-2-41	MHAB15-9	M29H3-2-139
MHAB15-3	M29H3-2-79	MHAB15-10	M29H3-2-140
MHAB15-4	M29H3-2-84	MHAB15-11	M29H3-3-21-1
MHAB15-5	M29H3-2-100	MHAB15-12	M29H3-3-33-1
MHAB15-6	M29H3-2-105	MHAB15-13	M26H3-2049
MHAB15-7	M29H3-2-111	MHAB15-14	M29H3-3-52

实施例 2. 抗人 HER3 纳米抗体活性检测

2-1 ELISA 结合实验

使用 ELISA 法检测 MHAB15 待选抗体（抗人 HER3 VHH 的 Fc 融合蛋白）对人

15 HER3 抗原的结合能力。使用 PBS 将 Human ErbB3 / Her3 Protein, His Tag (MALS verified)抗原（ACRO, Cat.No. ER3-H5223）稀释至 0.5 μg/mL，以 100 μL/孔加入至

ELISA 板 (Corning, Cat.No. 9018) 中, 2°C-8°C 包被过夜。使用 PBST 冲洗 3 次, 加入 1% BSA/PBST 室温封闭 1hr, 然后 PBST 冲洗 5 次, 加入待测抗体 (待测抗体编号为 MHAB15, 阳性对照抗体为 Patritumab, 初始浓度为 10 µg/mL, 进行 4 倍梯度稀释), 孵育 1hr 后使用 PBST 冲洗 7 次, 洗去未结合抗体, 加入 1:50,000 倍稀释的 Goat Anti-Human IgG Fc(HRP) (Abcam, Cat.No. ab97225), 室温孵育 30min。洗去多余二抗后, 加入 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution, (Absin, Cat.No. 9178), 100 µL/孔, 室温避光显色 15min, 然后加入 100 µL TMB 终止液 (Absin, Cat.No. abs9472) 终止反应。使用酶标仪读取波长 450nm 处吸收值, 使用 Graphpad 绘制四参数曲线。

所有实验结果以平均值 $\pm$ SEM (平均标准误差) 表示。采用 Prism 6 (GraphPad) 软件作图并进行数据分析。

结果如图 1 所示, MHAB15 待选抗体与人 HER3 抗原的结合活性: MHAB15-1~14 所有抗体 EC50 均小于阳性对照抗体 Patritumab, 显示出了优越的结合活性。

2-2 FACS 结合实验

第一次实验, 利用内源表达人 HER3 的人乳腺癌 SK-BR-3 细胞检测待选抗体的结合, 待测抗体梯度稀释 (30000 ng/mL, 7500 ng/mL, 1875 ng/mL, 468.8 ng/mL, 117.2 ng/mL, 29.3 ng/mL, 7.3 ng/mL and 1.8 ng/mL), 使用 100 µL AF488 Anti-Human IgG (H+L) 二抗 (Yesen, Cat:33126ES60) 稀释液检测待测抗体的结合情况, 流式细胞仪检测 FITC 荧光强度 (Mean Fluorescence Intensity, MFI)。第二次实验, 选取 Top4 利用 SK-BR-3 细胞检测待选抗体的结合, 待测抗体梯度稀释 (同第一次实验), 使用 100 µL PE Goat anti-Human IgG Fc Secondary Antibody (Invitrogen, 货号 12-4998-82) 稀释液检测待测抗体的结合情况, 流式细胞仪检测结合二抗的荧光强度所有实验结果以平均值 $\pm$ SEM (平均标准误差) 表示。采用 Prism 6 (GraphPad) 软件作图并进行数据分析。

FACS 结合结果如图 2A 和图 2B 所示, MHAB15-6、1、2、10 的结合活性都较好, 而 MHAB15-6 则最优。

2-3 内吞实验

利用 SK-BR-3 细胞进行内吞活性检测。使用 FACS buffer (含有 2% FBS 的 PBS) 制备 1×10^6 /mL 细胞悬液和 10 µg/mL 抗 HER3 的待测抗体溶液, 将细胞悬液加入 1.5 mL

EP 管中，1200 rpm，4℃离心 3 分钟，弃上清。分别吸 1.5 mL 的待测抗体溶液加到细胞中，置于冰上孵育 30 min，利用预冷的 200 μL/孔 FACS buffer 清洗四次。用 1.5 mL 完全培养基重悬细胞，混匀后将细胞加到 96 孔板中，100 μL/孔。分别置于 4℃和 37℃孵育 0h、1h、2h 和 4h（双复孔）。孵育结束后，1200 rpm，4℃离心 3 分钟，加入 100 μL AF488 Anti-Human IgG (H+L)稀释液（Yesen,Cat:33126ES60），4℃孵育 30 min，洗净未结合的二抗后，使用流式细胞仪检测结合二抗的荧光强度（Mean Fluorescence Intensity, MFI），计算内吞比率，计算公式如下：

$$\text{Internalization (\%)} = 100\% - \text{MFI}_T / \text{MFI}_{T0} * 100\%$$

所有实验结果以平均值 ± SEM（平均标准误差）表示。采用 Prism 6（GraphPad）软件作图并进行数据分析。

各时间段内吞百分数曲线如图 3 所示，37℃下，MHAB15 待选抗体在 SK-BR-3 细胞具有良好的内吞活性，且内吞活性与 Patritumab 相当或略优于 Patritumab。

2-4 Fab-ZAP 法检测抗体内吞介导的细胞杀伤实验

15 将人乳腺癌 SK-BR-3 细胞消化后用完全培养基（ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007+10%FBS, Sigma-Aldrich, Cat.no. F8687+1% P/S, Gibco, Cat.no. 15140-122）重悬，细胞密度调整为 4E4 cells/mL，加入 96 孔细胞培养板，每孔 50 μL，将细胞培养板放入 37℃ 细胞培养箱培养 16 小时。第二天用培养基配制含有 9nM ZAP-Fab 的 ZAP 稀释液，然后用 ZAP 稀释液将抗体梯度稀释成 20 4000pM 至 0.256pM（7 个浓度梯度，1: 5 稀释）的工作液，37℃孵育 15min 后，将工作液加到细胞培养板中，每孔加入 50 μL，抗体终浓度 2000pM 至 0.128pM，混匀后将细胞培养板放入 37℃细胞培养箱继续孵育 120 小时。提前将 7.5 μL Triton-X 100 加到未加抗体-Fab-ZAP 处理的细胞孔中，孵育 30min，此孔作为阳性对照。未加抗体-Fab-ZAP 或 Triton-X100 处理的细胞孔（NT）为阴性对照。然后在细胞培养板中每孔加入 25 μL MTS（Promega, Cat: G3598B），37℃细胞培养箱中孵育 2 小时，于酶标仪中震荡 10s 后读取数据，检测波长 A490。利用公式 $\text{killing rate\%} = 100\% - (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{Triton-X100}}) / (\text{OD}_{\text{NT}} - \text{OD}_{\text{Triton-X100}}) * 100\%$ 计算细胞杀伤效率。采用 Prism 6（GraphPad）软件作图并进行数据分析。

内吞介导的细胞杀伤结果显示，MHAB15-6-Fab-ZAP 对 SK-BR-3 细胞有良好的杀伤活性，与 Patritumab 相当。综合 FACS 结合和内吞结果，将对 MHAB15-6 进行人源

化并做后续筛选工作。

表 4. EC50 结果

	MHAB15-1	MHAB15-2	MHAB15-6	MHAB15-10	Patritumab	Isotype
EC50 (pM)	~ 140.6	~ 18.84	~ 17.69	89.70	~ 16.07	N/A

实施例 3. 抗人 HER3 纳米抗体人源化及活性检测

5 MHAB15-6 的 VHH 序列如 SEQ ID NO: 8 所示, Kabat 定义的 CDR1-CDR3 序列分别如 SEQ ID NO: 1-3 所示, IMGT 定义的 CDR1-CDR3 序列分别如 SEQ ID NO: 4-6 所示。对 MHAB15-6 的 VHH 进行人源化改造, 获得两株人源化纳米抗体 MHAB15-6-5 (VHH 如 SEQ ID NO: 9 所示) 和 MHAB15-6-7 (VHH 如 SEQ ID NO: 10 所示)。将上述 VHH 序列整合到人 IgG1 的 Fc 序列 (SEQ ID NO: 11), 并纯化表达用于后续活性
10 实验。

3-1 ELISA 结合实验

使用 ELISA 法检测 MHAB15-6 人源化序列对人 HER3 抗原的结合能力。使用 PBS 将 Human ErbB3 / Her3 Protein, His Tag (MALS verified)抗原 (ACRO, Cat.No. ER3-H5223) 稀释至 0.5 µg/mL, 以 100 µL/孔加入至 ELISA 板 (Corning, Cat.No. 9018)
15 中, 2°C-8°C包被过夜。使用 PBST 冲洗 3 次, 加入 1% BSA/PBST 室温封闭 1hr, 然后 PBST 冲洗 5 次, 加入 MHAB15-6 人源化抗体 (抗体编号分别为 MHAB15-6-1~8, 阳性对照抗体为 Patritumab), 初始浓度为 10 µg/mL , 进行 10 倍梯度稀释), 孵育 1hr 后使用 PBST 冲洗 7 次, 洗去未结合抗体, 加入 1:50,000 倍稀释的 Goat Anti-Human IgG Fc(HRP) (Abcam, Cat.No. ab97225), 室温孵育 30min。洗去多余二抗后, 加入 1-Step™
20 Ultra TMB-ELISA Substrate Solution, (Absin, Cat.No. 9178), 100 µL/孔, 室温避光显色 15min, 然后加入 100 µL TMB 终止液 (Absin, Cat.No. abs9472)终止反应。使用酶标仪读取波长 450nm 处吸收值, 使用 Graphpad 绘制四参数曲线。

所有实验结果以平均值 ± SEM (平均标准误差) 表示。采用 Prism 6 (GraphPad) 软件作图并进行数据分析。

25 由 ELISA 结合结果可知 (图 4), MHAB15-6 各人源化抗体与抗原的结合活性与 parental MHAB15-6 相当。

3-2 FACS 结合实验

利用 SK-BR-3 细胞检测 MHAB15-6 人源化抗体的结合，待测抗体梯度稀释 (30000 ng/mL, 7500 ng/mL, 1875 ng/mL, 469 ng/mL, 117 ng/mL, 29 ng/mL, 7ng/mL and 1.8 ng/mL)，使用 PE Goat anti-Human IgG Fc Secondary Antibody (Invitrogen, 货号 12-4998-82) 检测待测抗体的结合情况，流式细胞仪检测结合二抗的荧光强度 (Mean Fluorescence Intensity, MFI)。

所有实验结果以平均值 $\pm$ SEM (平均标准误差) 表示。采用 Prism 6 (GraphPad) 软件作图并进行数据分析。

结合曲线如图 5 所示。MHAB15-6 人源化抗体与 SK-BR-3 细胞的结合活性与 parental MHAB15-6 相当。

10

3-3 内吞实验

利用 SK-BR-3 细胞进行内吞活性检测。使用 FACS buffer(含有 2% FBS 的 PBS)制备 1×10^6 /mL 细胞悬液和 10 μ g/mL 抗 HER3 的待测人源化抗体溶液，将细胞悬液加入 1.5 mL EP 管中，1200 rpm，4°C 离心 3 分钟，弃上清。分别吸 1.5 mL 的待测抗体溶液加到细胞中，置于冰上孵育 30 min，利用预冷的 200 μ L/孔 FACS buffer 清洗四次。用 1.5 mL 完全培养基重悬细胞，混匀后将细胞加到 96 孔板中，100 μ L/孔。分别置于 4°C 和 37°C 孵育 0h、1h、2h 和 4h (双复孔)。孵育结束后，1200 rpm，4°C 离心 3 分钟，加入 100 μ L PE Goat anti-Human IgG Fc Secondary Antibody (Invitrogen, Cat.no. 12-4998-82) 二抗稀释液，4°C 孵育 30 min，洗净未结合的二抗后，使用流式细胞仪检测结合二抗的荧光强度 (Mean Fluorescence Intensity, MFI)，计算内吞比率，计算公式如下：

20

$$\text{Internalization (\%)} = 100\% - \text{MFI}_{\text{T}} / \text{MFI}_{\text{T0}} * 100\%$$

所有实验结果以平均值 $\pm$ SEM (平均标准误差) 表示。采用 Prism 6 (GraphPad) 软件作图并进行数据分析。

内吞百分数曲线如图 6 所示，由内吞结果可知，37°C 下，MHAB15-6 人源化抗体在 SK-BR-3 细胞具有良好的内吞活性，且内吞活性与 parental MHAB15-6 相当。

25

3-4 Fab-ZAP 法检测抗体内吞介导的细胞杀伤实验

将人乳腺癌 SK-BR-3 细胞消化后用完全培养基 (ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007+10%FBS, Sigma-Aldrich, Cat.no. F8687+1% P/S, Gibco, Cat.no. 15140-122) 重悬，细胞密度调整为 4×10^4 cells/mL。加入 96 孔细

30

胞培养板，每孔 50 μL，将细胞培养板放入 37℃ 细胞培养箱培养 16 小时。第二天用培养基配制含有 9nM ZAP-Fab 的 ZAP 稀释液，然后用 ZAP 稀释液将抗体梯度稀释成 4000pM 至 0.256pM（7 个浓度梯度，1: 5 稀释）的工作液，37℃孵育 15min 后，将工作液加到细胞培养板中，每孔加入 50 μL，抗体终浓度 2000pM 至 0.128pM，混匀后将细胞培养板放入 37℃细胞培养箱继续孵育 120 小时。提前将 7.5 μL Triton-X 100 加到未加抗体-Fab-ZAP 处理的细胞孔中，孵育 30min，此孔作为阳性对照。未加抗体-Fab-ZAP 或 Triton-X100 处理的细胞孔（NT）为阴性对照。然后在细胞培养板中每孔加入 20 μL MTS（Promega, Cat: G3598B），37℃细胞培养箱中孵育 2 小时，于酶标仪中震荡 10s 后读取数据，检测波长 A490。利用公式 $\text{killing rate\%} = 100\% - (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{Triton-X100}}) / (\text{OD}_{\text{NT}} - \text{OD}_{\text{Triton-X100}}) * 100\%$ 计算细胞杀伤效率。

所有实验结果以平均值 ± SEM（平均标准误差）表示。采用 Prism 6（GraphPad）软件作图并进行数据分析。

内吞介导的细胞杀伤结果显示，MHAB15-6 人源化抗体 MHAB15-6-5-Fab-ZAP 对 SK-BR-3 细胞有良好的杀伤活性，且优于 Patritumab。

表 5. EC50 结果

	MHAB15-6-5	MHAB15-6	Patritumab	Isotype
EC50 (pM)	~ 15.88	~ 16.24	19.78	N/A

实施例 4. 竞争性 ELISA 结合实验

使用 ELISA 法检测 MHAB15 待选抗体 MHAB15-6 与 Patritumab 竞争性结合人 HER3 抗原的能力。使用 PBS 将 Patritumab 稀释至 1 ug/mL，以 100 μL/孔加入至酶标板（Corning, Cat.No. 9018）中，2℃~8℃包被过夜。使用 PBST 冲洗 3 次，加入 1% BSA/PBST 室温封闭 60 min，然后 PBST 冲洗 5 次。利用 1%BSA/PBST 稀释 Human HER3 Protein, His Tag (ACRO, Cat.No. ER3-H5223) 至 0.4 μg/mL，MHAB15-6、阳性对照抗体 Patritumab 和阴性对照 Isotype 稀释至 60ug/mL，进行 3 倍梯度稀释。先加入 50 uL MHAB15-6、Patritumab 或 Isotype 浓度梯度稀释液，后加入 50 uL HER3（His Tag）抗原稀释液，总计 100μL/孔，室温孵育 60 min。使用 PBST 冲洗 7 次，洗去未结合抗体，加入 1:12000 倍稀释的 Anti-His tag Antibody (HRP),Mouse Monoclonal (Sino Biological,Cat.No. 105327-MM02T-H)，室温孵育 60 min。洗去多余二抗后，加入 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Absin, Cat.No. 9178)，100 μL/孔，室温避光显色 15 min，然后加入 100 μL TMB 终止液 (Absin, Cat.No. abs9472)终止反应。使用

酶标仪读取波长 450nm 处吸收值，使用 Graphpad 绘制四参数曲线。

所有实验结果以平均值±SEM（平均标准误差）表示。采用 Prism 6（GraphPad）软件作图并进行数据分析。

由 ELISA 结合结果（图 7）可知，MHAB15-6 和 Patritumab 竞争性结合人 HER3 抗原。

实施例 5. ELISA 种属交叉实验

使用 ELISA 法检测 MHAB15-6-5（抗人 HER3 纳米抗体）对不同种属（人、猴、小鼠和大鼠）HER3 抗原的结合能力。用 PBS 将 Human HER3, His Tag (ACRO, Cat.No. ER3-H5223); Rhesus/Cynomolgus HER3 Protein, His Tag (Sino Biological,Cat.No. 90043-K08H); Mouse HER3 Protein, His Tag (Sino Biological,Cat.No. 51003-M08H) 和 Rat HER3 Protein, His Tag(Sino Biological,Cat.No. 80111-R08H) 分别稀释至 0.5 μg/mL，以 100 μL/孔加入至酶标板(Corning, Cat.No. 9018) 中，4℃包被过夜。使用 PBST 冲洗 3 次，每孔加入 200 μL 3% BSA/PBST，室温封闭 1 hr，然后 PBST 冲洗 5 次，加入待测抗体，初始浓度为 10 μg/mL，进行 10 倍梯度稀释），室温孵育 1 hr 后使用 PBST 冲洗 7 次，洗去未结合抗体，每孔加入 100 μL 1:50,000 倍稀释的山羊抗人 IgG Fc(HRP) (Abcam, Cat.No. ab97225)，室温孵育 30 min。使用 PBST 冲洗 7 次，洗去多余二抗后，每孔加入 100 μL 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Absin, Cat.No. 9178)，室温避光显色 15 min，然后每孔加入 100 μL TMB 终止液(Absin, Cat.No. abs9472)终止反应。使用酶标仪读取波长 450 nm 处吸收值，使用 Graphpad 绘制四参数曲线。

所有实验结果以平均值±SEM（平均标准误差）表示。采用 Prism（GraphPad）软件作图并进行数据分析。

结果如图 8A、图 8B、表 6 和表 7 所示，MHAB15-6-5 对人 HER3、猴 HER3、小鼠 HER3 和大鼠 HER3 都具有结合活性，Isotype 对人 HER3、猴 HER3、小鼠 HER3 和大鼠 HER3 无结合活性。

表 6. MHAB15-6-5 对不同种属 HER3 结合的 EC₅₀ 结果

	人(Human)	猴(Rhesus/ Cynomolgus)	小鼠(Mouse)	大鼠(Rat)
EC ₅₀ (ng/ml)	4.235	4.642	5.447	5.127

表 7. Isotype 对不同种属 HER3 结合的 EC₅₀ 结果

	人(Human)	猴(Rhesus/ Cynomolgus)	小鼠(Mouse)	大鼠(Rat)
EC ₅₀ (ng/ml)	N/A	N/A	N/A	N/A

实施例 6. EGFR 家族特异性结合 ELISA

使用 ELISA 法检测 MHAB15-6-5（抗人 HER3 纳米抗体）对 EGFR 家族蛋白（HER1、HER2、HER3 和 HER4）的结合能力。用 PBS 将 Human HER1,His Tag(Sino Biological,Cat.No. 10001-H08H); Human HER2,His Tag(ACRO,Cat.No. HE2-H5225); Human HER3 Protein, His Tag (ACRO, Cat.No. ER3-H5223)和 Human HER4 Protein, His Tag (Sino Biological,Cat.No. 10363-H08H)分别稀释至 0.5 μg/mL，以 100 μL/孔加入至酶标板(Corning, Cat.No. 9018)中，4℃包被过夜。使用 PBST 冲洗 3 次，每孔加入 200 μL 3% BSA/PBST，室温封闭 1 hr，然后 PBST 冲洗 5 次，加入待测抗体，初始浓度为 10 μg/mL，进行 10 倍梯度稀释），室温孵育 1 hr 后使用 PBST 冲洗 7 次，洗去未结合抗体，每孔加入 100 μL 1:50,000 倍稀释的山羊抗人 IgG Fc(HRP) (Abcam, Cat.No. ab97225)，室温孵育 30 min。使用 PBST 冲洗 7 次，洗去多余二抗后，每孔加入 100 μL 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Absin, Cat.No. 9178)，室温避光显色 15 min，然后每孔加入 100 μL TMB 终止液(Absin, Cat.No. abs9472)终止反应。使用酶标仪读取波长 450 nm 处吸收值，使用 Graphpad 绘制四参数曲线。

所有实验结果以平均值±SEM（平均标准误差）表示。采用 Prism（GraphPad）软件作图并进行数据分析。

结果如图 9A、图 9B 和表 8 所示，MHAB15-6-5 只结合 HER3，对 EGFR 家族其他成员 HER1、HER2 和 HER4 没有结合活性，Isotype 对 EGFR 家族蛋白无结合活性。因此，本申请的抗体对 EGFR 家族蛋白具有突出的选择结合活性，对 HER3 具有特异的结合活性。

表 8. MHAB15-6-5 对人 HER1-4 结合的 EC₅₀ 结果

	Human HER1	Human HER2	Human HER3	Human HER4
EC ₅₀ (ng/ml)	N/A	N/A	4.657	N/A

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公布的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部分为由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 特异性结合人表皮生长因子受体-3 (HER3) 的纳米抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述纳米抗体或其抗原结合片段包含: SEQ ID NO: 8-10 任一项所示的 VHH 中含有的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3;

优选地, 所述 CDR 根据 Kabat、Chothia 或 IMGT 编号系统定义。

2. 权利要求 1 所述的纳米抗体或其抗原结合片段, 其包含:

(1) 如 SEQ ID NO: 1 所示的 CDR1; 如 SEQ ID NO: 2 或 7 所示的 CDR2; 以及, 如 SEQ ID NO: 3 所示的 CDR3; 其中, 所述 CDR 按 Kabat 编号系统定义; 或者,

(2) 如 SEQ ID NO: 4 所示的 CDR1; 如 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR2; 以及, 如 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR3; 其中, 所述 CDR 按 IMGT 编号系统定义。

3. 权利要求 1 或 2 所述的纳米抗体或其抗原结合片段, 其中所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 8 所示的序列, 或与其相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列, 或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如, 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个或 8 个氨基酸置换、缺失或添加) 的序列。

4. 权利要求 1 或 2 所述的纳米抗体或其抗原结合片段, 所述纳米抗体或其抗原结合片段是人源化的;

优选地, 所述纳米抗体或其抗原结合片段进一步包含人免疫球蛋白的重链框架区 (例如, 人重链胚系抗体基因所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区), 所述重链框架区任选地包含一个或多个 (例如, 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个) 从人源残基至驼源残基的回复突变。

5. 权利要求 4 所述的纳米抗体或其抗原结合片段, 其中所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 9 或 10 所示的序列, 或与其相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少

97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列。

6. 特异性结合 HER3 的多肽构建体，其包含权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段，以及免疫球蛋白 Fc 结构域；

优选地，所述免疫球蛋白 Fc 结构域任选地通过肽接头连接至所述纳米抗体或其抗原结合片段的 N 端和/或 C 端（例如，C 端）；

优选地，所述免疫球蛋白 Fc 结构域是 IgG 的 Fc 结构域，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区；

优选地，所述免疫球蛋白 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 11 所示的序列，或与其相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的序列（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的序列）；

优选地，所述多肽构建体具有如 SEQ ID NO: 12-14 任一项所示的序列。

7. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段或权利要求 6 所述的多肽构建体。

8. 载体，其包含权利要求 7 所述的核酸分子；优选地，所述载体为克隆载体或表达载体。

9. 宿主细胞，其包含权利要求 7 所述的分离的核酸分子或权利要求 8 所述的载体。

10. 制备权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段或权利要求 6 所述的多肽构建体的方法，其包括，在允许蛋白表达的条件下，培养权利要求 9 所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述纳米抗体或其抗原结合片段或所述多肽构建体。

11. 双特异性或多特异性抗体，其包含权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段或权利要求 6 所述的多肽构建体；

优选地，所述双特异性或多特异性抗体特异性结合 HER3，并且额外地特异性结合一个或多个其他靶标；

优选地，所述双特异性或多特异性抗体还包含至少一种具有针对第二靶标的第二结合特异性的第二抗体。

12. 偶联物，其包括包含权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段、权利要求 6 所述的多肽构建体或权利要求 11 所述的双特异性或多特异性抗体以及与其连接的偶联部分；

优选地，所述偶联部分选自治疗剂（如细胞毒剂、细胞因子、毒素或放射性核素）；

优选地，所述偶联物是抗体-药物偶联物（ADC）。

13. 药物组合物，其含有权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段、权利要求 6 所述的多肽构建体、权利要求 7 所述的分离的核酸分子、权利要求 8 所述的载体、权利要求 9 所述的宿主细胞、权利要求 11 所述的双特异性或多特异性抗体或权利要求 12 所述的偶联物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂；

优选地，所述药物组合物还包含另外的药学活性剂，例如抗肿瘤剂。

14. 试剂盒，其包括权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段或权利要求 6 所述的多肽构建体；

优选地，所述试剂盒包含缀合物，所述缀合物包含权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段或权利要求 6 所述的多肽构建体，以及与所述纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体连接的可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素；

优选地，所述试剂盒包含权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段或权利要求 6 所述的多肽构建体，以及特异性识别所述纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体的第二抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

15. 嵌合抗原受体，其包含权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段或权利要求 6 所述的多肽构建体；

优选地，所述抗原结合结构域由免疫效应细胞（例如 T 细胞）所表达。

16. 分离的核酸分子，其编码权利要求 15 所述的嵌合抗原受体。

17. 载体，其包含权利要求 16 所述的分离的核酸分子；优选地，其用于制备嵌合抗原受体 T 细胞。

18. 宿主细胞，其包含权利要求 16 所述的分离的核酸分子或权利要求 17 所述的载体；

优选地，所述宿主细胞是免疫效应细胞（例如，T 细胞或 NK 细胞）；

优选地，所述宿主细胞是嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）。

19. 权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段、权利要求 6 所述的多肽构建体、权利要求 7 所述的分离的核酸分子、权利要求 8 所述的载体、权利要求 9 所述的宿主细胞、权利要求 11 所述的双特异性或多特异性抗体、权利要求 12 所述的偶联物、或权利要求 13 所述的药物组合物，或权利要求 14 所述的试剂盒，或权利要求 15 所述的嵌合抗原受体，在制备药物中的用途，所述药物用于在受试者中预防和/治疗肿瘤；

优选地，所述肿瘤表达 HER3；

优选地，所述药物用于抑制表达 HER3 的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞；

优选地，药物还包含另外的药学活性剂；

优选地，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物，例如烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂、放射增敏剂、抗血管生成剂、细胞因子、分子靶向药物、免疫检查点抑制剂或溶瘤病毒；

优选地，所述肿瘤选自实体瘤，例如胃癌、肺癌、肝癌、头颈癌、皮肤癌、大肠癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、宫颈癌、间皮瘤、乳腺癌、结直肠癌或口腔鳞癌；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人。

20. 权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段或权利要求 6 所述的多肽构建体在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测肿瘤是否能够通过靶向 **HER3** 的抗肿瘤疗法来治疗，或者用于检测 **HER3** 在样品中的存在或其水平；

优选地，所述样品为来自受试者（例如哺乳动物，例如人）的细胞样品（例如包含肿瘤细胞的样品）或体液样品（例如血液）。

21. 用于检测 **HER3** 在样品中的存在或其水平的方法，其包括使用权利要求 1-5 任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段或权利要求 6 所述的多肽构建体；

优选地，所述方法是免疫学检测，例如免疫印迹法、酶免疫测定法（例如 **ELISA**）、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法。