

说明书

发明名称: 结合分子及抗体药物偶联物和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及特异性结合EGFR和/或cMet的免疫球蛋白单可变结构域(immunoglobulin single variable domain, ISVD)以及包含所述免疫球蛋白单可变结构域的EGFR和/或cMet结合分子及抗体药物偶联物(ADC)。本发明还涉及编码所述ISVD或结合分子的核酸和包含所述核酸的载体, 以及所述ISVD或结合分子和所述ADC的治疗应用。

背景技术

[0002] EGFR是一种存在于细胞膜上的具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体蛋白, 它可以通过结合外源性生长因子(如EGF)来发送信号, 进一步激活与细胞分裂、存活和血管生成相关的下游途径, 从而影响细胞的增殖、生存和分化等过程。在许多肿瘤类型中都发现EGFR存在高表达或突变, 因此EGFR成为了治疗该类癌症的重要靶点。目前已经开发出多种抑制EGFR功能的药物, 如酪氨酸激酶抑制剂和单克隆抗体等, 这些药物已经被广泛应用于肺癌、结直肠癌、头颈癌等多个恶性肿瘤的治疗。

[0003] cMet是一种在上皮细胞上表达的具有酪氨酸激酶(RTK)活性的受体, 在细胞增殖、生存和迁移中起关键作用。cMet的结合配体为肝细胞生长因子(HGF), cMet与HGF结合后发生二聚化并激活cMet通路, 促进细胞分裂、血管生成和免疫调节等。由于cMet在多种癌症中存在高表达或突变, 因此cMet已成为一种重要的药物靶点, 相关的抗癌药物正在研究和开发中。

[0004] 美国食品和药物管理局已经批准了一款EGFR和cMet双靶向的抗体: 埃万妥单抗(Amivantamab)(也称为“JNJ-61186372”), 治疗具有表皮生长因子受体(EGFR)外显子20插入突变的局部晚期或转移性非小细胞肺癌(NSCLC)成年患者, 用于克服非小细胞肺癌患者靶向治疗的耐药性。AZD9592是正在进行临床研究中的抗EGFR/cMet双特异性抗体ADC药物, 携带拓扑异构酶1抑制剂作为有效载荷, 用于晚期实体瘤治疗(Moore, Sheri L.等人, 2016. “A Novel Bispecific Antibody Target

ing EGFR and cMet Is Effective against EGFR Inhibitor-Resistant Lung Tumors.” *Cancer Research* 76(13):3942 – 53.<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2833>; Robert Hsu等人, “A narrative review of antibody – drug conjugates in EGFR-mutated non-small cell lung cancer” ,*Front Oncol.*2023Dec 1; 13:1252652.doi:10.3389/fonc.2023.1252652)。

- [0005] 抗EGFR/cMet双特异性抗体JNJ-61186372和ADC药物AZD9592的抗体具有常规的抗体四链结构, 分子量大(150Kda), 不利于穿透深层肿瘤组织。因此, 本领域仍存在开发靶向EGFR和/或cMet靶点的新抗体形式(antibody format)和具有有利特性的EGFR和/或cMet结合分子和ADC分子的迫切需要。
- [0006] 免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)例如纳米抗体是由单一链的抗体分子组成的小型蛋白质, 具有高度的抗原特异性和亲和力, 而且与常规四链抗体相比具有更小的体积、更高的稳定性和更深的组织穿透性。因此, 纳米抗体以及基于其构建的药物分子在肿瘤治疗领域中的应用正在受到广泛关注, 并有望成为未来肿瘤治疗的重要手段之一。

发明内容

- [0007] 本公开在筛选抗EGFR和抗cMet噬菌体展示文库的基础上, 提供了新颖的抗cMet和抗EGFR免疫球蛋白单可变结构域(ISVD), 并利用所述ISVD作为组件, 构建产生了具有优异的肿瘤靶向性、内吞活性和杀伤活性的抗EGFR结合分子、抗cMet结合分子和抗EGFR/cMet结合分子及抗体-药物偶联物。
- [0008] 因此, 在第一方面, 本公开提供了特异性结合cMet的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)和包含所述ISVD的重链抗体以及cMet结合分子。在一些实施方案中, 所述cMet结合分子为抗cMet双表位抗体。在一些实施方案中, 所述cMet结合分子还包含结合EGFR的结合结构域。
- [0009] 在第二方面, 本公开提供了特异性结合EGFR的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)和包含所述ISVD的重链抗体以及EGFR结合分子。在一些实施方案中, 所述EGFR结合分子还包含结合cMet的结合结构域。
- [0010] 在第三方面, 本公开提供了EGFR和cMet结合分子, 其包含一个或多个特异性结合EGFR和cMet的根据本发明第一方面和/或第二方面的免疫球蛋白单可变结

构域(ISVD)。在一些实施方案中,所述结合分子为单链或多链抗体。在一些实施方案中,所述抗体为双特异性抗体或多特异性抗体。

- [0011] 在第四方面,本公开提供了编码根据本公开第一方面至第三方面所述的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子、EGFR和cMet结合分子的核酸、包含所述核酸的载体(优选地,表达载体)、包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞是原核的或真核的,例如,选自大肠杆菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备ISVD或结合分子的其它细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞是HEK 293细胞或CHO细胞。本公开也提供了制备根据本公开第一方面至第三方面所述的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子、EGFR和cMet结合分子的方法。
- [0012] 在一些实施方案中,根据本发明的特异性结合EGFR和/或cMet的结合分子的分子量小于常规四链抗体,具备更好的肿瘤组织穿透能力。
- [0013] 在一些实施方案中,根据本发明的EGFR和/或cMet结合分子与细胞表面表达的EGFR抗原的特异性结合活性较低,从而减少了EGFR结合分子的“在靶/脱肿瘤(On-target/off tumor)”毒性,如显著降低包含EGFR结合分子的药物常被报道的皮肤毒性(Taieb,Julien等人,2023. “Adverse Events Associated with Encorafenib Plus Cetuximab in Patients with BRAFV600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer:An in-Depth Analysis of the BEACON CRC Study.” *Clinical Colorectal Cancer, Updates in Pancreatic Cancer*,22(1):59 - 66.<https://doi.org/10.1016/j.clcc.2022.12.003>; Robert,Caroline等人,2005. “Cutaneous Side-Effects of Kinase Inhibitors and Blocking Antibodies.” *The Lancet Oncology* 6(7):491 - 500.[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70243-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70243-6)。
- [0014] 在一些实施方案中,根据本发明的结合分子具有结合cMet双表位(即cMet上两种不同表位)的结构,所述结构使结合分子具有更好的肿瘤靶向性。在一些实施方案中,根据本发明的结合分子的cMet双表位设计,相比仅靶向cMet上单种表位,显著增加了结合分子与靶细胞的亲和力和内吞能力。
- [0015] 本发明特异性结合EGFR和/或cMet的ISVD以及包含所述ISVD的EGFR和/或cMet结合分子具有良好的肿瘤靶向性、肿瘤组织穿透能力和/或靶细胞内吞能力

等，因此所述ISVD或结合分子可作为缀合物或偶联物的靶向模块，并缀合或偶联诸如化疗剂，毒素，药物(如免疫治疗剂)，放射性元素，探针或信号分子等，以提供肿瘤杀伤、免疫调节或疾病检测等应用。

[0016] 在第五方面，本公开提供了包含本公开第一方面至第三方面所述的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子、或EGFR和cMet结合分子的缀合物、融合物、以及抗体药物偶联物(ADC)，尤其是抗EGFR/cMet多特异性抗体药物偶联物。

[0017] 在一些实施方案中，根据本发明的抗体药物偶联物具有以下优点：

[0018] (1)结合表达人EGFR或cMet的肿瘤细胞以及共表达人EGFR和cMet的肿瘤细胞；

[0019] (2)在表达人EGFR或cMet的肿瘤细胞以及共表达人EGFR和cMet的肿瘤细胞上显示内吞活性；

[0020] (3)阻断HGF与肿瘤细胞上的cMet结合；

[0021] (4)具有旁杀效应；

[0022] (5)抗肿瘤活性谱宽，对多种不同EGFR和cMet表达密度的肿瘤表现出显著的杀伤活性；

[0023] (6)体内低毒副作用，例如低的在靶/脱肿瘤毒性。

[0024] 在一些实施方案中，根据本发明的抗体药物偶联物还具有选自以下的一个或多个优点：

[0025] (7)因其所含的多特异性抗体而能够同时靶向多个抗原，并具有更好的靶向性和减少的毒副作用(例如减少的脱靶毒性或减少的潜在剂量限制性毒性)；

[0026] (8)相比靶向EGFR或cMet的单靶点ADC，在肿瘤细胞上具有更高的内吞效率；

[0027] (9)相比靶向EGFR或cMet的单靶点ADC，在肿瘤细胞上具有更高的亲和力；

[0028] (10)相比靶向EGFR或cMet的单靶点ADC，对肿瘤细胞有更强的杀伤作用，对肿瘤的生长有更强的抑制作用。

[0029] 在一些实施方案中，根据本发明的抗体药物偶联物还具有选自以下的一个或多个优点：

[0030] (11)具有良好的产品均一性；

[0031] (12)具有良好的产品稳定性；和

[0032] (13)具有良好的成药性。

[0033] 在第六方面，本公开提供了药物组合物和药物制剂，其包含根据本公开第一方面至第三方面所述的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子、或者EGFR和cMet结合分子，或本公开第五方面的ADC以及可药用载体，并且任选地还包含一种或多种另外的药学活性多肽和/或化合物，例如，还包含选自溶瘤药物、细胞毒性剂、细胞因子和免疫检查点分子的抑制剂的其他治疗剂。在此方面，本公开也提供了包含根据本公开第一方面至第三方面所述的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子、或者EGFR和cMet结合分子，或本公开第五方面的ADC的组合产品或试剂盒。

[0034] 在第七方面，本公开提供了本发明第一方面至第三方面所述的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子、或者EGFR和cMet结合分子、或本公开第五方面的ADC作为药物的用途或用于制备药物的用途，其中所述药物用于治疗癌症，例如，所述癌症选自肺癌(例如，肺鳞状细胞癌、肺腺癌、非小细胞肺癌)、乳腺癌(例如，三阴性乳腺癌)、胃癌、结肠癌或头颈癌(例如，咽鳞癌)。在此方面，本公开也提供了一种治疗癌症的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的本公开第一方面至第三方面所述的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子、或者EGFR和cMet结合分子，或本公开第四方面的核酸或载体或宿主细胞，或者本公开第五方面的ADC，其中所述受试者是哺乳动物；优选地，所述受试者是人；其中所述癌症是例如，肺癌(例如，肺鳞状细胞癌、肺腺癌、非小细胞肺癌)、乳腺癌(例如，三阴性乳腺癌)、胃癌、结肠癌或头颈癌(例如，咽鳞癌)。

附图说明

[0035] 结合以下附图一起阅读时，将更好地理解以下详细描述的本发明的优选实施方案。出于说明本发明的目的，图中显示了目前优选的实施方案。然而，应当理解本发明不限于图中所示实施方案的精确安排和手段。

[0036] 图1显示FACS检测抗EGFR抗体与靶细胞的结合活性。

[0037] 图2显示FACS检测抗cMet抗体与靶细胞的结合活性。

[0038] 图3显示抗cMet VHH-Fc对于配体HGF与靶细胞EBC-1结合的阻断作用。

[0039] 图4显示抗cMet抗体V-n7A12和V-n9A2结合抗原cMet上的不同表位。

- [0040] 图5A和5B显示FACS检测细胞对各VHH-Fc的内吞。
- [0041] 图6显示通过ELISA检测抗cMet抗体V-n7A12、V-n9A2、V-n9A10与人cMet抗原和食蟹猴cMet抗原是否具有交叉反应性的结果。
- [0042] 图7显示FACS检测双表位抗体对靶细胞的结合。
- [0043] 图8显示FACS检测双表位抗体在靶细胞上的内吞。与单表位相比，双表位介导了协同内吞活性。
- [0044] 图9显示一种单链形式的多特异性EGFR/cMet抗体分子结构示意图。
- [0045] 图10显示一种双链形式的多特异性EGFR/cMet抗体分子结构示意图。
- [0046] 图11显示靶细胞EBC-1和NCI-H1975细胞上三特异性抗体候选分子的结合。
- [0047] 图12显示靶细胞对单链三特异性抗体候选分子的内吞。
- [0048] 图13显示靶细胞对双链三特异性抗体候选分子的内吞。
- [0049] 图14显示三特异性抗EGFR/cMet抗体阻断EBC-1细胞与配体HGF的结合。
- [0050] 图15显示FACS检测三特异性抗体在靶细胞上由抗EGFR ISVD和抗cMet ISVD介导的协同内吞作用。
- [0051] 图16显示FACS检测三特异性抗体在靶细胞上由抗EGFR ISVD和抗cMet ISVD介导的协同结合作用。
- [0052] 图17显示ADC分子对靶细胞的结合。
- [0053] 图18A和18B显示ADC分子对靶细胞的杀伤。
- [0054] 图19显示具有PEG和/或EVC的连接子的ADC分子的细胞结合检测。
- [0055] 图20显示具有PEG和/或EVC的连接子的ADC分子的细胞杀伤检测。
- [0056] 图21显示V-20-Fc-PEG-EVC-MMAE，V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE和V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE在CDX模型中的体内药效。
- [0057] 图22显示V-23-Fc-VA-Exd在CDX模型中的体内药效。
- [0058] 图23显示V-23-Fc-Glu-Exd在CDX模型中的体内药效。

具体实施方式

- [0059] 除非另外限定，否则本文中所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的不同含义。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入。此外，本文中所述的材料、

方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从后附的权利要求书中显而易见。

[0060] 定义

[0061] 为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。要理解，本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案，并且不意欲是限制性的。

[0062] 术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小5%、4%、3%、2%或1%的下限和比指定数字数值大5%、4%、3%、2%或1%的上限的范围内的数字数值。

[0063] 如本文所用，术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项。

[0064] 在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

[0065] 术语“在靶/脱肿瘤毒性(on-target/off tumor toxicity)”是指除肿瘤细胞外，正常组织细胞也表达被抗体靶向的肿瘤相关抗原，从而与抗体结合而导致损伤。

[0066] 在与抗原一起使用时，术语“结合分子”与“抗原结合分子”可互换使用(例如，EGFR结合分子、cMet结合分子、EGFR和cMet结合分子)，是指可以特异性结合抗原、抗原上的表位的蛋白或多肽分子。结合分子对抗原具有“亲和力”和/或“具有特异性”。在本文中，EGFR结合分子是指能够特异性结合EGFR的蛋白或多肽，cMet结合分子是指能够特异性结合cMet的蛋白或多肽，EGFR和cMet结合分子是指能够特异性结合EGFR和cMet两者的蛋白或多肽。结合分子的一些实例包括抗体、抗体片段、融合蛋白等，只要它们展现出期望的抗原结合活性即可。

[0067] 抗原结合分子中与抗原实际结合的结构域，在本文中称作“抗原结合位点”或“抗原结合结构域”。“结构域”作为蛋白质或多肽中的折叠的结构，一般而言，负责蛋白质或多肽的单个功能。例如，通常，常规抗体和免疫球蛋白通过其重链可变区(VH)中的3个互补决定区(HCDR1-3)和轻链可变区(VL)中的3个互补决定区(LCDR1-3)，在VH-VL二聚体的表面形成抗原结合结构域，其中6个C

DR赋予了抗体与抗原的特异性结合。但在一些情况下，单个免疫球蛋白可变结构域(例如，重链可变结构域(VH)或轻链可变结构域(VL)、衍生自骆驼科重链抗体的重链可变结构域(VHH)、衍生自鱼类IgNAR的VH样单结构域(v-NAR))即可赋予抗原结合。即，该单个可变结构域不需要与另一可变结构域相互作用，可以独立地作为识别和结合靶抗原的“抗原结合结构域”。典型地，通过工程化改造，抗体的“抗原结合结构域”，包括上述的单免疫球蛋白可变结构域以及常规抗体的可变结构域对，可以被添加、移除或转移至其他蛋白或多肽中，并仍然发挥其抗原结合功能，且不损失蛋白质或多肽的其余部分和/或其余结构域的功能。

[0068] 术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。抗原结合位点与特定抗原结合的能力可以通过本领域已知的常规结合测定法测定。例如，通过实施例描述的ELISA测定法检测抗体与抗原的结合能力，或通过实施例描述的FACS测定法检测抗体与表面表达抗原的细胞的结合能力，或通过实施例描述的SPR技术检测亲和力常数 K_D 。

[0069] 术语“抗体”在本文中以最广义义使用，指包含免疫球蛋白的抗原结合位点的蛋白质，涵盖各种结构的天然抗体和人工抗体，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单表位和多表位抗体(例如双表位抗体)、单特异性和多特异性抗体(例如，双特异性抗体)、单链和多链抗体、纳米抗体、单结构域抗体、重链抗体、嵌合抗体、人源化抗体、完整抗体和抗体片段。在一些实施方案中，优选地，本发明的抗体是单结构域抗体、纳米抗体或重链抗体。在另一些实施方案中，优选地，本发明的抗体是双表位抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0070] 术语“抗体片段”或抗体的“抗原结合片段”可互换使用，是指与完整抗体不同的分子，其包含完整抗体的一部分且能够结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 单链抗体片段(例如scFv, scFab); 单免疫球蛋白结构域; 骆驼科重链抗体的可变结构域片段; 和由抗体片段形成的各种单特异性、双特异性或多特异性抗体结构，例如线性抗体片段、diabody片段等。在本公开中，除非另有说明或明确与上下文相悖，否则提及术语“抗体”等同于提及“抗体及其抗体片段”。在根据本发明的一些

实施方案中，抗体片段包含用于在重链与重链之间形成链间二硫键的半胱氨酸残基部分，例如，抗体铰链区的半胱氨酸残基，以提供可用于巯基偶联化学的氨基酸残基位点。在根据本发明的另一些实施方案中，抗体片段包含引入Fc区的半胱氨酸残基，以提供可用于巯基偶联化学的氨基酸残基位点。

[0071] 在本公开中，术语“免疫球蛋白单可变结构域”(缩写为“ISVD”)与术语“单可变结构域”可互换使用，用于指能够通过单个可变结构域，例如单个VHH结构域或单个VH结构域或单个VL结构域，而无需与额外的免疫球蛋白可变结构域配对，来特异性识别并结合目的抗原的抗体多肽片段。对于由VHH结构域或VH或VL结构域构成的ISVD，其结构可被认为由四个框架区(“FR”)和三个互补决定区(“CDR”)组成，所述框架区分别被称为“框架区1”或“FR1”、“框架区2”或“FR2”、“框架区3”或“FR3”以及“框架区4”或“FR4”；所述四个框架区被三个互补决定区或“CDR”打断，所述互补决定区被分别称为“互补决定区1”或“CDR1”、“互补决定区2”或“CDR2”和“互补决定区3”或“CDR3”。从所述ISVD多肽的N端到C端，四个框架区和三个互补决定区按如下顺序排列：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白单可变结构域可以包括全人序列、人源化序列、以其它方式序列优化的序列或嵌合免疫球蛋白序列。免疫球蛋白单可变结构域可以以分离的形式单独使用，或作为一个更大蛋白质的一部分发挥抗原结合功能。在本公开中，特异性结合EGFR的ISVD也称作抗EGFR ISVD；特异性结合cMet的ISVD也称作抗cMet ISVD；特异性结合EGFR和cMet的ISVD也称作抗EGFR/cMet ISVD。

[0072] 在本公开中，术语“单结构域抗体”和“单域抗体”在本文中可互换地使用，通常指通过ISVD来识别和结合抗原的抗体。单结构域抗体的实例包括源自骆驼科(美洲驼和骆驼)和软骨鱼(例如护士鲨)的单结构域抗体(WO 2005/035572)。

[0073] 在本公开中，术语“重链抗体(heavy-chain antibody, hcAb)”是指仅具有重链而不具有轻链的抗体。重链抗体的重链从N端到C端可以例如，包含VH-CH2-CH3，或可以包含VH-CH1-CH2-CH3，或可以包含VHH-CH2-CH3等。所述重链可以构成同型二聚体。在一些实施方案中，优选地，根据本发明的重链抗体

为包含两个单体的二聚体，其中每个单体包含通过免疫球蛋白铰链区连接到免疫球蛋白恒定区(CH2和CH3结构域)上的VHH结构域。

- [0074] 术语“纳米抗体”在本文中用于指包含单个ISVD结构域(如VHH结构域)、或基本上由其组成或由其组成的、分子量小于20kDa(典型地分子量为大约12—15kDa)的抗体。
- [0075] 术语“VHH抗体”在本文中用于指由VHH结构域组成的抗体。“VHH结构域”，也称为VHH、VHH序列、VHH抗体片段，是从C端到N端包含FR4—CDR3—FR3—CDR2—FR2—CDR1—FR1的单链抗体片段。使用VHH结构域(单独，或也可以作为较大肽的一部分)来识别和结合靶抗原，提供了许多优于使用常规VH及VL结构域、scFv或常规抗体片段(例如Fab或F(ab')₂片段)的显著优势：
- [0076] —仅需要单一结构域以高亲和力及高选择性结合抗原，从而使得既不需要存在两个单独结构域，也不需要确保该两个结构域以适当空间构象及构型存在(例如scFv一般需要使用经特别设计的接头)；
- [0077] —VHH结构域可容易地改造成多价及多特异性格式；
- [0078] —VHH结构域高度可溶且无聚集趋势；
- [0079] —VHH结构域对热、pH、蛋白或多肽酶及其他变性剂或条件高度稳定，且因此可在制备、储存或运输中不使用冷冻设备，从而达成节约成本、时间及环境；
- [0080] —VHH结构域易于制备且相对廉价，甚至在生产所需的规模上亦如此；
- [0081] —VHH结构域与常规四肽链抗体及其抗原结合片段相比相对较小，因此显示较高的组织渗透性，且可以较高剂量给药；
- [0082] —VHH结构域可显示所谓腔(cavity)结合性质(与常规VH结构域相比，VHH具有延长的CDR3环，从而可到达常规四肽链抗体及其抗原结合片段不可到达的靶标表位)。
- [0083] VHH包括人源化的VHH、骆驼源化的VH或通过亲和力成熟而获得的VHH。
- [0084] 关于VHH的进一步描述可以参考WO 94/04678、WO 95/04079和WO 96/34103。在一些实施方案中，根据本发明的抗原结合分子和抗体的抗原结合位点优选由VHH结构域提供。

- [0085] 术语“…价”指抗原结合分子(例如抗体)中存在的抗原结合位点的数目。因此,“单价”、“二价”、“三价”和“四价”抗体指抗体分子中分别存在1个抗原结合位点、2个抗原结合位点、3个抗原结合位点和4个抗原结合位点。
- [0086] 在本文中,“单特异性”是指,抗原结合分子仅具有结合单一一种表位的能力。“多特异性”是指,抗原结合分子具有能够结合两种或两种以上不同表位(例如,相同抗原和/或不同抗原上的不同表位)的能力。相应地,“双特异性”是指,抗原结合分子能够结合两种不同表位的能力。单特异性抗原结合分子(例如抗体)可以是单价或多价的。多特异性和双特异性抗原结合分子(例如抗体)可以是二价、三价、四价、或更多价的。
- [0087] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。重链和轻链的可变结构域通常具有相似的结构,包含四个保守的框架区(FR)和三个互补决定区(CDR)。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,故可以通过改造可变区,构建模拟已知抗体的性质的抗体变体。在一些情况下,来自已知抗体的CDR序列可以被移植到具有不同性质的不同抗体的构架区上,并可以根据需要进行1至几个残基突变,例如回复突变以精细化抗体的期望性质。在另一些情况下,可以对抗体的可变结构域进行工程化改造,以构建其人源化、去免疫原性和/或PTM(翻译后修饰)去除变体。经修饰后的抗体的性质,包括但不限于靶抗原结合性质或其它期望的功能性质,例如内化活性,可以采用本领域已知和本文描述的方法,进行体外或体内测定和筛选。应当理解,本文所给出的任何可变区(例如VH和/或VL区、VHH区)的此类功能性变体,均在本发明考虑之列。
- [0088] 术语“互补决定区”或“CDR区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR主要负责与抗原表位结合,从可变区的N-端开始顺序编号依次包括CDR1、CDR2和CDR3。在一个给定的可变区氨基酸序列中,各CDR的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体CDR指派系统的任一种或其组合确定,所述指派系统包括例如:基于抗体的三维结构和CDR环的拓扑学的Chothia(Chothia等人.(1989)Nature 342:877-883, Al-Lazikani等人,“Standard conf

ormations for the canonical structures of immunoglobulins” *Journal of Molecular Biology*, 273, 927–948 (1997)), 基于抗体序列可变性的Kabat(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第4版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际ImMunoGeneTics database (IMGT) (<http://imgt.cines.fr/>), 以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类 (affinity propagation clustering) 的North CDR定义。除非另有说明, 否则在本公开中, 术语“CDR”或“CDR序列”涵盖以上述任一种方式确定的CDR序列。CDR也可以基于与参考CDR序列(例如本发明示例的CDR序列)具有相同的AbM或Kabat编号位置而确定。在一个实施方案中, 本发明抗体的CDR根据Kabat或Chothia或AbM或IMGT或Contact、或其任意组合来定义。在一个实施方案中, 本发明抗体的CDR根据Kabat定义方案确定。

[0089] 具有不同特异性(即, 针对不同抗原表位)的抗体具有不同的CDR。然而, 尽管CDR在抗体与抗体之间是不同的, 但是CDR内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用Kabat、Chothia、AbM、IMGT和Contact方法中的至少两种, 可以确定最小重叠区域, 从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。最小结合单位可以是CDR的一个子部分。正如本领域技术人员明了, 通过抗体的结构和蛋白折叠, 可以确定CDR序列其余部分的残基。因此, 本公开也考虑本文所给出的任何CDR的变体。例如, 在一个CDR的变体中, 最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变, 而根据Kabat或Chothia或AbM或IMGT或Contact定义的其余CDR残基可以被保守氨基酸残基替代。

[0090] 如果氨基酸序列(例如ISVD)对两种不同的抗原或抗原决定簇(例如来自不同哺乳动物物种的EGFR, 例如人EGFR以及食蟹猴EGFR, 或者来自不同哺乳动物物种的cMet, 例如人cMet和食蟹猴cMet)具有特异性, 则称对这两种不同的抗原或抗原决定簇是“交叉反应性的”。抗体具有人猴物种交叉反应性, 尤其是具有相近似的人猴抗原结合亲和力, 将是有利的, 该性质可以有助于抗体的临床前药物开发, 例如由抗体构成的ADC分子的毒理检测。在一些实施方案中, 本发明抗体优选具有人猴物种交叉反应性。

- [0091] 如本文所用，术语“表位”是指抗体特异性结合的抗原部分。表位可由形成构象空间单元的连续和/或不连续氨基酸构成。对于不连续表位而言，抗原线性序列不同部分的氨基酸，通过蛋白质分子的折叠，在三维空间中紧密靠近。可以通过竞争结合试验，对结合相同抗原的不同抗体进行表位分组。这样的竞争结合试验可以通过本领域已知的方法，例如固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定，或采用本文实施例中描述的方法进行。
- [0092] “人源化”抗体是指包含来自非人CDR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在一些实施方案中，人源化抗体中的所有或基本上所有的CDR对应于非人抗体的那些，并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。
- [0093] 在本文中，术语“半衰期延长结构域”或表述“增加半衰期的结合部分”可互换使用，是指能够赋予与之结合的分子(例如抗体)在施用于动物后增加的循环半衰期的化学结构。这样的化学结构包括，例如，柔性亲水分子(例如，碳水化合物或PEG(聚乙二醇))、免疫球蛋白Fc区、血清白蛋白、血清白蛋白结合结构域或血清白蛋白结合性肽(例如，抗HSA ISVD)。半衰期延长结构域可以根据其具体性质，通过化学缀合或融合与本发明的结合分子或抗体连接。
- [0094] 在一些实施方案中，本公开第一方面所述的EGFR结合分子、本公开第二方面所述的cMet结合分子和本公开第三方面所述的EGFR和cMet结合分子包含与人血清白蛋白结合的ISVD作为半衰期延长结构域。在一些实施方案中，所述与人血清白蛋白结合的ISVD选自Alb-1、Alb-3、Alb-4、Alb-5、Alb-6、Alb-7、Alb-8、Alb-9、Alb-10和Alb-23的血清白蛋白结合部分。在一个实施方案中，所述血清白蛋白结合部分是Alb-8或Alb-23或其变体，如WO 2012/175400的第7-9页中所示。在一些优选实施方案中，所述与人血清白蛋白结合的ISVD包含SEQ ID NO:46所示氨基酸序列或由其组成的CDR1、包含SEQ ID NO:47所示氨基酸序列或由其组成的CDR2和包含SEQ ID NO:48所示氨基酸序列或由其组成的CDR3。在一些实施方案中，所述与人血清白蛋白结合的ISVD包含SEQ ID NO:45的

序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0095] 术语“免疫球蛋白Fc区”、“Fc结构域”、“Fc部分”或“Fc区”在本文中可互换使用，用于定义免疫球蛋白重链的C端区域，所述区域包含至少一部分的恒定区。已知，每个免疫球蛋白的重链恒定区包含四个或五个结构域，所述结构域按如下顺序命名：CH1-铰链-CH2-CH3(-CH4)。CH4存在于无铰链区的IgM中。在本公开中，Fc结构域可以包含CH2结构域和CH3结构域，以及任选地还包含全部或部分的免疫球蛋白铰链区；但不包含免疫球蛋白的重链可变区VH和轻链可变区VL以及重链恒定区CH1和轻链恒定区CL。例如，在一个实例中，Fc结构域可以从N末端到C末端包含CH2结构域和CH3结构域或由所述CH2结构域和CH3结构域组成。在另一个实例中，Fc结构域可以从N末端到C末端包含免疫球蛋白铰链区、CH2结构域和CH3结构域或由所述免疫球蛋白铰链区、CH2结构域和CH3结构域组成。Fc结构域常以二聚化形式存在，二聚化形式中的每个Fc结构域在本文中也作为Fc亚单位。

[0096] 术语“Fc区”包括天然序列Fc区和变体Fc区。在某些实施方案中，根据本发明的抗体包含人IgG重链Fc区。在一些实施方案中，人IgG重链Fc区从Glu216、Cys226或Pro230延伸至重链的羧基端。然而，Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或者可以不存在。除非另外说明，Fc区或恒定区中的氨基酸残基根据EU编号系统编号，该EU编码系统也被称为EU索引，如在Kabat等，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述。在一些实施方案中，所述Fc区是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区。在一些实施方案中，相对于天然序列Fc区，所述Fc区包含修饰。在一些具体实施方案中，所述Fc区是效应子功能增加或减少的。在一些具体实施方案中，所述Fc区是与Fc γ R结合增强或减弱的。在一些具体实施方案中，所述Fc区是含有重链防错配突变的，例如包含Knob-into-hole(KIH)突变。

[0097] 在一些情况下，包含铰链区序列的免疫球蛋白Fc区是优选的，其可以例如促进抗体多肽链的二聚化和/或提供用于偶联其他活性分子的半胱氨酸残基。这样的铰链序列可基本上或部分对应于IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的铰链区。例如，所

述的铰链区序列可包括核心铰链区的全部或部分以及下铰链区的全部或部分。核心铰链区在IgG1、IgG2和IgG3中具有氨基酸序列CPPC，在IgG4中具有CPSC序列。优选地，铰链区含有至少一个连接两条Fc链的二硫键。在一些实施方案中，所述铰链区序列包含来自IgG1的E216到T225的铰链区序列或D221到T225的铰链区序列(根据EU编号)，或来自其他免疫球蛋白同种型的对应铰链区序列。在一些实施方案中，本发明的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)与Fc区通过铰链序列连接，所述铰链序列包含例如EPKSS(SEQ ID NO:49)或EPKSC(SEQ ID NO:50)。

[0098] 术语“效应子功能”指随免疫球蛋白同种型变动的归因于免疫球蛋白Fc区的那些生物学活性。免疫球蛋白效应子功能的例子包括：C1q结合和补体依赖的细胞毒性(CDC)、Fc受体结合作用、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP)、细胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原呈递细胞摄取抗原、下调细胞表面受体(例如B细胞受体)和B细胞活化。

[0099] 在不需要效应子功能的情况下，Fc区可以包含降低或消除效应子功能的突变。在一些情况下(例如以本发明抗体作为ADC运载体的情况下)，优选地，所述Fc区包含降低或消除Fc区与Fc γ 受体的突变，例如Fc区的234和235位赖氨酸(L)变成丙氨酸(A)的LALA突变，以降低Fc γ 受体介导的脱靶细胞毒性。另外地或备选地，可以在Fc区中引入突变以增加与FcRn的结合和/或去除蛋白酶位点，和/或引入可用于偶联活性分子的氨基酸修饰。另外或备选地，可以出于抗体生产原因，对Fc区进行突变，例如去除或替换可能发生翻译后修饰(例如糖基化)的氨基酸，以提供治疗性抗体改善的成药性和可开发性。

[0100] 术语“抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)”是某些细胞毒性效应细胞(例如天然杀伤(NK)细胞)介导对靶细胞和外来宿主细胞杀伤的主要机制之一。抗体的Fc区通过与表达在例如NK细胞上的Fc受体Fc γ RIIIA(即，CD16a)结合，来激活NK细胞发挥ADCC作用。

[0101] 术语“补体依赖的细胞毒性作用(CDC)”是指在补体存在下靶细胞的裂解。经典补体途径的激活由补体系统的第一组分(C1q)与结合其对应抗原的抗体(适当的

亚类)结合而启动。为了评估补体活化,可以执行CDC测定法,通过例如Gazzano-Santoro等人, J.Immunol.Methods 202:163(1996)中所述的方法。

[0102] “亲和力”是指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明,在用于本文时,“结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗体与抗原)之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可用结合解离平衡常数(K_D)来表述。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量,包括现有技术已知以及本文中所描述的那些方法。

[0103] 在本文中,氨基酸序列的“同一性百分数(%)”是指将候选序列与本公开中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后,在不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分时,候选序列中与本公开中所示的具体氨基酸序列在比对的相应位置上具有相同氨基酸残基的位置百分数。

[0104] 在一些实施方案中,本公开考虑本发明ISVD、结合分子和抗体序列的变体,所述变体相对于在本文中具体公开的ISVD、结合分子和抗体序列包含氨基酸变化。在一些实施方案中,所述变体相对于在本文中具体公开的ISVD、结合分子和抗体序列在比较窗口中具有相当程度的同一性,例如同一性为至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%或更高。在本文中,如果没有指定比较窗口(即,待比较的感兴趣的区域),则比对在参考序列的全长上进行。

[0105] 在本发明的一些实施方案中,本文所述的氨基酸变化包括氨基酸的取代、插入或缺失。优选的,本文所述的氨基酸变化为氨基酸取代,优选地保守取代。在优选的实施方案中,本发明所述的氨基酸变化发生在CDR外的区域(例如在FR中)。更优选地,本发明所述的氨基酸变化发生在VHH外的区域。在一些实施方案中,取代为保守性取代。保守取代是指一个氨基酸经相同类别内的另一氨基酸取代,例如一个酸性氨基酸经另一酸性氨基酸取代,一个碱性氨基酸经另一碱性氨基酸取代,或一个中性氨基酸经另一中性氨基酸取代。示例性的取代如下表A所示:

[0106] 表A

原始残基	示例性取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0107] 在本文中，“分离的”抗体或抗体片段是指人工抗体或抗体片段、重组生成的抗体或抗体片段、以及已经与产生其的天然环境中的组分至少部分地分离的抗体或抗体片段。在一些实施方案中，根据本发明的抗体(例如抗EGFR/cMet抗体)或抗体片段(例如抗EGFR ISVD或抗cMet ISVD)为“分离的”。在一些实施方案中，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE，等电聚焦(IEF)，毛细管电泳)或层析(例如，离子交换或反相HPLC)确定，分离的抗体或抗体片段被纯化至超过90%、95%或99%纯度。

- [0108] 在本文中，术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞，包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生本发明抗体分子的任何类型的细胞系统，包括真核细胞，例如，哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞；和原核细胞，例如，大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞，也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。
- [0109] 在本文中，术语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体，其包含有效连接要表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件；用于表达的其它元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中。表达载体包括本领域已知的所有那些，包括被掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如，裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如，慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。
- [0110] 在本文中，术语“内吞”与“内化”可互换使用，是指由配体与细胞表面上的相应受体结合所触发的、配体/受体复合物被内化并递送到细胞溶质中或转移至合适的细胞内区室的过程。在一些实施方案中，本发明的抗体在与细胞表面表达的EGFR和/或cMet结合后引发由EGFR和/或cMet受体介导的内吞。在本文中，可以通过例如实施例所述的方法测定内吞和内吞率，表征抗体所具有的内吞活性。在一些实施方案中，具有内吞活性的本发明抗体可以用作在本发明的ADC中运载抗肿瘤药物进入癌细胞中的工具。
- [0111] 术语“缀合物”或“偶联物”在本文中指通过将一种或多种免疫球蛋白相关分子或其片段与一种或多种其他分子缀合而形成的分子。缀合物典型地包含至少一个非蛋白质性质的化学结构部分，例如用于实现所述缀合的化学连接子。在一些情况下，所述其他分子可以同为免疫球蛋白相关分子或其片段。在一些情况下，所述其他分子可以不同于免疫球蛋白相关分子或其片段。所述一种或多种另外的分子可以相同或彼此不同。例如，所述其他分子可以是靶标结合元件和/或效应子元件，诸如化疗剂，毒素，药物(如免疫治疗剂)，放射性元素，探针或信号分子等。

- [0112] “抗体-药物偶联物(ADC)”是指通过连接子(Linker)连接抗原结合分子与(小分子)药物所得的化合物。在本文中,对抗体药物偶联物或ADC的称谓包括其药化学上可接受的盐和溶剂化合物以及其它等同的形式。ADC中的药物化合物部分在本文中可称作“有效载荷”或“毒素”。
- [0113] 术语“连接子”是指将药物(例如小分子药物)与抗原结合分子部分共价连接起来的结构片段。应当理解,连接子在连接至抗原结合分子之前具有可与抗原结合分子的官能团形成键的官能团。在一些情况下,连接子还可以具有可降解部分以及任选地亲水性调节模块例如PEG区段。在根据本发明的ADC的一些实施方案中,连接子优选是“可降解的”,由此在ADC被递送至靶区域(例如靶肿瘤组织部位)后能够发生断裂并释放出有效载荷。可用的此类“可降解连接子”包括例如,酸不稳定性连接子、肽酶敏感性连接子、光不稳定性连接子、二甲基连接子或含二硫化物的连接子。
- [0114] 术语“连接子-有效载荷(linker-payload)”是指有效载荷与连接子连接形成的化合物。在一些情况下,连接子-有效载荷(linker-payload)用作ADC合成的中间体。
- [0115] 术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗疾病例如癌症中有效的任何物质,包括化疗剂、细胞毒性剂、免疫调节剂(例如免疫抑制剂)、其它抗体、小分子药物、血管生成抑制剂或细胞因子。
- [0116] 术语“药物”是指能够调节生物过程尤其改变或预防病理过程的化合物。在本文中,药物优选指抗肿瘤化合物。
- [0117] 术语“小分子药物”是指低分子量的能够调节生物过程尤其改变或预防病理过程的药物。“小分子”被定义为分子量小于10kD、通常小于2kD和优选小于1kD的分子,更优选小于500D。小分子药物包括但不限于具有如上所限定的分子量的有机分子、含无机组分的有机分子、含放射性原子的分子、合成分子、肽模拟物和抗体模拟物。作为治疗剂,小分子可以比大分子更能透过细胞、对降解更不易感和更不易于引发免疫应答。
- [0118] “抗肿瘤化合物”是对肿瘤有作用的药化学活性化合物,其包括但不限于细胞毒性剂或化疗剂,例如WO2021/173773、US5658920中公开的细胞毒性剂、喜树碱

类化合物例如依喜替康(Exatecan)和Dxd(Exatecan衍生物)、澳瑞他汀类化合物例如单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、MMAF。

[0119] 术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。

[0120] “化疗剂”包括在治疗癌症或免疫系统疾病中有用的化学化合物。

[0121] 本文所述的术语“烷基”指完全饱和的支链的或无支链的烃基团。烷基优选包含1-16个碳原子，例如1-12个碳原子、1-10个碳原子、1-6个碳原子或1-4个碳原子。烷基的代表性示例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基等。

[0122] 术语“烯基”指含有2-16个碳原子并且包含至少一个双键且不包含叁键的直链或支链烃基团。烯基基团优选含有2-12个碳原子、2-10个碳原子、2-8碳原子、2-6个碳原子或2-4个碳原子。烯基的代表性示例包括但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基等。

[0123] 术语“炔基”指含有2-16个碳原子并且包含至少一个叁键的直链或支链烃基团。炔基基团优选含有2-12个碳原子、2-10个碳原子、2-8碳原子2-6个碳原子或2-4个碳原子。炔基的代表性示例包括但不限于乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基等。

[0124] 术语“卤素”或“卤代”指氟(-F)、氯(-Cl)、溴(-Br)或碘(-I)。

[0125] 术语“卤代烷基”指被一个或多个本文所定义的卤素基团取代的如本文所定义的烷基。卤代烷基可以优选是单卤代烷基、二卤代烷基或多卤代烷基(包括全卤代烷基)。单卤代烷基基团在烷基中可以含有一个碘、溴、氯或氟。二卤代烷基和多卤代烷基基团在烷基中可以含有两个或多个相同的卤原子或含有不同卤代基团的组合。优选地，多卤代烷基最多包含12、10或8或6或4或3或2个卤素基团。卤代烷基的非限制性示例包括氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、五氟乙基、七氟丙基、二氟氯甲基、二氯氟甲基、二氟乙基、二氟丙基、二氯乙基和二氯丙基。全卤代烷基指所有氢原子被卤素原子替换的烷基。

- [0126] 术语“卤代烯基”指被一个或多个本文所定义的卤素基团取代的如本文所定义的烯基。术语“卤代炔基”指被一个或多个本文所定义的卤素基团取代的如本文所定义的炔基。对于“卤代烷基”定义的“卤代”含义可适用于“卤代烯基”和“卤代炔基”。
- [0127] 术语“烷氧基”和“烷基-O-”可互换使用，表示通过氧原子连接的如上定义的烷基。优选地，烷氧基具有1-8个碳原子(C₁₋₈烷氧基)、1-6个碳原子(C₁₋₆烷氧基)、1-4个碳原子(C₁₋₄烷氧基)或1-3个碳原子(C₁₋₃烷氧基)。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基(包括正丙氧基、异丙氧基)、丁氧基(包括正丁氧基、仲丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基等)、戊氧基(包括正戊氧基、异戊氧基、新戊氧基等)、己氧基、庚氧基、辛氧基等。
- [0128] 术语“氨基酸”是指天然存在和合成的氨基酸、氨基酸类似物及其人工修饰形式。氨基酸可以是L或D异构体。在本公开中，天然20种氨基酸用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示，例如：苯丙氨酸(Phe; F)、酪氨酸(Tyr; Y)、亮氨酸(Leu; L)、甘氨酸(Gly; G)、丙氨酸(Ala; A)、缬氨酸(Val; V)、赖氨酸(Lys; K)、丝氨酸(Ser; S)、谷氨酸(Glu; E)、天冬氨酸(Asp; D)、天冬酰胺(Asn; N)、异亮氨酸(Ile; I)、精氨酸(Arg; R)、脯氨酸(Pro; P)和谷氨酰胺(Gln; Q)。其余氨基酸用全称或本领域公知的多字母缩写来表述，例如，瓜氨酸可以用Cit表示；环丁烷-1,1-二甲酰胺-瓜氨酸用cBu-Cit表示。在没有特别指明的时候，本发明的氨基酸是指L-氨基酸。
- [0129] 术语“戊糖醛酸”是指如上所定义的戊糖的伯羟基被氧化为羧基形成的化合物。戊糖醛酸的示例包括但不限于木糖醛酸、阿拉伯糖醛酸。
- [0130] 术语“己糖醛酸”是指如上所定义的己糖的伯羟基被氧化为羧基形成的化合物。己糖醛酸的示例包括但不限于葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸和甘露糖醛酸。
- [0131] 术语“任选的”或“任选地”：意为随后描述的事件或情况发生或不发生，并且该描述包括所述事件或情况发生的实例以及所述事件或情况没有发生的实例。例如，当基团或结构是“任选被取代的”，所述基团或结构可以被取代，也可以是不被取代的。

- [0132] 本文中“药学上可接受的”是指能够用于施用至个体或受试者，其不会发生在生物学上或其它方面不是被期望的，例如不会产生严重的不能容忍的副作用。在根据上下文无矛盾的情况下，本文中“药学上可接受的”和“可药用”可互换使用。
- [0133] 术语“药学上可接受的盐”表示指保持本发明的ADC偶联物的生物学效应和性能的盐，并且该盐在生物学上或其它方面不是不被期望的。本发明的ADC偶联物可以以它们的药学上可接受的盐形式存在，包括酸加成盐和碱加成盐。在本发明中，药学上可接受的无毒的酸加成盐表示本发明中的ADC偶联物与有机或无机酸形成的盐，有机或无机酸包括但不限于盐酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硝酸、高氯酸、乙酸、草酸、马来酸、富马酸、酒石酸、苯磺酸、甲磺酸、水杨酸、琥珀酸、柠檬酸、乳酸、丙酸、苯甲酸、对甲苯磺酸、苹果酸等。药学上可接受的无毒的碱加成盐表示本发明中的ADC偶联物与有机或无机碱所形成的盐，包括但不限于碱金属盐，例如锂、钠或钾盐；碱土金属盐，例如钙或镁盐；有机碱盐，例如通过与含N基团的有机碱形成的铵盐。
- [0134] 术语“溶剂化物”表示一个或多个溶剂分子与本发明中的ADC抗体-药物偶联物所形成的缔合物。形成溶剂化物的溶剂包括但不限于水、甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜等。
- [0135] 术语“药物:抗体比率”或“DAR”是指偶联于本文所述的Ab部分的药物部分(D)与Ab部分的比例。在本文所述的一些实施方案中，DAR可由式I中的p确定，例如DAR可以为1至16，例如2-16、4-16、5-12、6-10、2-8、3-8、2-6、4-6、6-10，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15。DAR也可被计算为产品中分子群体的平均DAR，即通过检测方法(例如通过常规方法如质谱法、ELISA测定、电泳和/或HPLC)测得的产品中偶联于本文所述的Ab部分的药物部分(D)与Ab部分的总体比例，此DAR在文中称为平均DAR。在一些实施方案中，本发明偶联物的平均DAR值是1至16，例如2-16、4-16、5-12、6-10、2-8、3-8、2-6、4-6、6-10，例如1.0-8.0，2.0-6.0，例如0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.

9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8.0、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9或10.0，以这些数值中的两个作为端点的范围。应当理解，当提及平均DAR值时，本发明的ADC是指ADC分子群体或ADC分子混合物，其包含具有相同和/或不同DAR的ADC分子。

[0136] 术语“半数有效浓度(EC_{50})”是指在特定的暴露时间后诱导在基线和最大值之间的50%的应答的药物、抗体、ADC或毒剂的浓度。在本申请的上下文中， EC_{50} 的单位为“nM”。

[0137] 术语“荧光激活细胞分选”或“FACS”是指专门类型的流式细胞术。它提供了根据每个细胞的特定光散射和荧光特征，将生物细胞的异质混合物以每次一个细胞分拣到两个或更多个容器中的方法(FlowMetric. “Sorting Out Fluorescence Activated Cell Sorting”.2017-11-09)。用于进行FACS的仪器是本领域技术人员已知的并且对于公众是可商购获得的。这种仪器的实例包括Becton Dickinson(Foster City, CA)的FACS Star Plus、FACSscan和FACSsort仪器、来自Coulter Epics Division(Hialeah, FL)的Epics C和来自Cytomation(Colorado Springs, Colorado)的MoFlo。

[0138] 术语“药物组合物”指这样的组合物，其以允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

[0139] 术语“药用赋形剂”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、载体或稳定剂等。

[0140] 术语“药物组合”、“组合产品”、“药物联合”或“联合产品”是指非固定组合产品或固定组合产品，包括但不限于药盒、药物组合物。术语“非固定组合”意指活性成分(例如，(i)本发明的抗原结合分子或ADC分子包括其药学上可接受的盐、以及(ii)其他治疗剂)以分开的实体被同时、无特定时间限制或以相同或不同的时间间隔、依次地施用于患者，其中这类施用对患者体内提供预防或

治疗有效水平的两种或更多种活性剂。在一些实施方案中，药物组合中使用的本发明的抗原结合分子或ADC分子和其他治疗剂以不超过它们单独使用时的水平施用。术语“固定组合”意指两种或更多种活性剂以单个实体的形式被同时施用于患者。优选对两种或更多种活性剂的剂量和/或时间间隔进行选择，从而使各部分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。各成分可以各自呈单独的制剂形式，其制剂形式可以相同也可以不同。

- [0141] 术语“个体”或“受试者”可互换地使用，包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如，牛、羊、猫、犬和马)、灵长类(例如，人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。特别地，个体或受试者是人。
- [0142] 术语“肿瘤”和“癌症”在本文中互换地使用，是指哺乳动物中细胞生长不受调节的生理疾患，涵盖实体瘤和液体肿瘤，并且涵盖恶性的和良性的肿瘤，及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。
- [0143] 在本文中，术语“治疗”指意欲改变正在接受治疗的个体中疾病之天然过程的临床介入。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态，以及缓解或改善预后。涉及肿瘤或癌症治疗的情形下，“治疗”涵盖可以通过人为干预手段(例如，通过药物的施用)引起的抗肿瘤生物学效果，包括但不限于，例如，肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。
- [0144] 用于本文时，“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。在一些实施方式中，具有癌症家族病史的受试者是预防性方案的候选。通常，在癌症的背景中，术语“预防”是指在癌症的病征或症状发生前，特别是在具有癌症风险的受试者中发生前的药物施用。
- [0145] 术语“有效量”指本发明的抗原结合分子或ADC分子或组合物或组合的这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。根据预期效果，可以包括“治疗有效量”和“预防有效量”。

- [0146] 术语“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。抗体或ADC的治疗有效量可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量和抗体或ADC在个体中激发所需反应的能力而变动。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体或ADC的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤生长率、肿瘤体积等)至少约20%、更优选地至少约40%、甚至更优选地至少约50%、60%或70%和仍更优选地至少约80%或90%。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价化合物抑制可度量参数(例如，癌症)的能力。
- [0147] “预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在受试者中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量小于治疗有效量。
- [0148] 术语“抗肿瘤作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果，包括但不限于例如，肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。
- [0149] 以下就本发明进行详述描述。本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，在以下任何节、小节或实施方案中描述的任何技术特征，均可以与在其他的任何节、小节或实施方案中描述的任何技术特征进行组合，并且这些组合均在本发明考虑范畴之中。
- [0150] I.本公开的第一方面：特异性结合cMet的ISVD和包含该ISVD的cMet结合分子
- [0151] cMet(或c-Met)是原癌基因MET的基因产物，其在染色体7上编码，只识别一种已知的配体，为肝细胞生长因子(HGF)。cMet蛋白是一种在许多肿瘤细胞类型中过量表达或突变的受体酪氨酸激酶，其在肿瘤细胞增殖、存活、侵袭、转移和肿瘤血管生成中发挥关键作用。抑制cMet可以在过量表达cMet蛋白或表达组成型激活的cMet蛋白的肿瘤细胞中诱导细胞死亡。
- [0152] 本公开第一方面提供特异性结合cMet的ISVD(即，抗cMet ISVD)和包含该ISVD的重链抗体和cMet结合分子。在一些实施方案中，本发明的抗cMet ISVD、重链抗体和cMet结合分子以中等或高亲和力结合人cMet。在一些实施方案中，本发明的抗cMet ISVD和cMet结合分子与常规四链抗体相比具有改善的组织渗透性。

- [0153] 本发明的特异性结合cMet的ISVD从N端至C端包含三个互补决定区，分别为CDR1、CDR2和CDR3。
- [0154] 在一些实施方案中，本发明的特异性结合cMet的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)包含
- [0155] (a)SEQ ID NO:16、39-40和121-130之一所示的氨基酸序列中的3个CDR；
- [0156] (b)SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:42和134-136之一所示的氨基酸序列中的3个CDR；或
- [0157] (c)SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列中的3个CDR。在一些实施方案中，本发明的特异性结合cMet的ISVD包含，与以上(a)-(c)之一中所述3个CDR相比，具有单个或者多个CDR不超过每个CDR中1个至3个氨基酸变化的变体；其中所述氨基酸变化是氨基酸的添加、缺失或保守氨基酸取代。在一些实施方案中，根据本发明的CDR根据AbM、Chothia、Kabat、IMGT或其任意组合进行定义，优选地根据Kabat或AbM或其组合进行定义。
- [0158] 在一些实施方案中，本发明的特异性结合cMet的ISVD包含根据Kabat编号的
- [0159] (a)SEQ ID NO:18所示的CDR1或SEQ ID NO:18所示的CDR1的不超过1个氨基酸变化的变体(例如，SEQ ID NO:41和131-133之一所示的CDR1)、SEQ ID NO:19所示的CDR2或SEQ ID NO:19所示的CDR2的不超过2个氨基酸变化的变体、和SEQ ID NO:20所示的CDR3或SEQ ID NO:20所示的CDR3的不超过2个氨基酸变化的变体；
- [0160] (b)SEQ ID NO:23所示的CDR1或SEQ ID NO:23所示的CDR1的不超过1个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO:24所示的CDR2或SEQ ID NO:24所示的CDR2的不超过2个氨基酸变化的变体、和SEQ ID NO:25所示的CDR3或SEQ ID NO:25所示的CDR3的不超过2个氨基酸变化的变体；或
- [0161] (c)SEQ ID NO:28所示的CDR1或SEQ ID NO:28所示的CDR1的不超过1个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO:29所示的CDR2或SEQ ID NO:29所示的CDR2的不超过2个氨基酸变化的变体、和SEQ ID NO:30所示的CDR3或SEQ ID NO:30所示的CDR3的不超过2个氨基酸变化的变体；
- [0162] 其中所述氨基酸变化是氨基酸的添加、缺失或保守氨基酸取代。

- [0163] 在一些实施方案中，本公开提供了特异性结合cMet的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)，其中所述ISVD包含：
- [0164] (a)分别包含SEQ ID Nos:18、19和20或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；
- [0165] (b)分别包含SEQ ID Nos:41、19和20或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；
- [0166] (c)分别包含SEQ ID Nos:131、19和20或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；
- [0167] (d)分别包含SEQ ID Nos:132、19和20或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；
- [0168] (e)分别包含SEQ ID Nos:133、19和20或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；或者
- [0169] (f)分别包含SEQ ID Nos:23、24和25或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中，以上(b)或(f)项定义的ISVD是优选的。
- [0170] 在一些实施方案中，本发明的特异性结合cMet的所述ISVD包含VHH或由VHH组成。在一些实施方案中，本发明的特异性结合cMet的所述ISVD包含以下序列或由以下序列组成：
- [0171] (a)SEQ ID NO:16、39-40和121-130之一的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；
- [0172] (b)SEQ ID NO:21、42和134-136之一的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；或
- [0173] (c)SEQ ID NO:26的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；
- [0174] 优选地，所述氨基酸变化不发生在CDR区中。在一些实施方案中，包含SEQ ID NO:39、40或42的氨基酸序列的所述ISVD是优选的。
- [0175] 在一些实施方案中，本公开提供包含本发明的特异性结合cMet的ISVD的抗体，尤其是抗cMet重链抗体。
- [0176] 在一些实施方案中，本公开提供包含本发明的特异性结合cMet的ISVD的结合分子。在一些实施方案中，所述cMet结合分子包含或由选自以下的抗体组成：单结构域抗体、纳米抗体、VHH抗体或重链抗体。在另一些实施方案中，所述cMet结合分子选自单特异性抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

- [0177] 在一些实施方案中，本发明的cMet结合分子包含至少一个本发明的特异性结合cMet的ISVD，例如，其包含两个、三个、四个或更多个相同或不同的本发明特异性结合cMet的ISVD，优选地，其包含两个、三个或四个不同的本发明特异性结合cMet的ISVD。在一些实施方案中，本发明提供的cMet结合分子包含两个结合cMet不同表位的ISVD。
- [0178] 在一些实施方案中，包含在本发明的cMet结合分子中的抗cMet ISVD优选是人源化的VHH结构域。与骆驼科动物的VHH相比，人源化VHH对人体具有减小的人抗骆驼科抗体反应，提高了抗体应用的安全性。
- [0179] 在一些实施方案中，本发明的特异性结合cMet的ISVD或cMet结合分子具有以下一个或多个特性：
- [0180] (1)以中等或高亲和力结合人cMet；
- [0181] (2)特异性结合细胞表面表达的cMet；
- [0182] (3)在配体HGF存在下，阻断配体HGF与细胞表面的cMet结合；
- [0183] (4)被表达cMet的细胞内化；
- [0184] (5)与人cMet和食蟹猴cMet具有交叉反应性；
- [0185] (6)由不同的cMet双表位介导的协同结合；
- [0186] (7)由不同的cMet双表位介导的协同内吞。
- [0187] 在一些实施方案中，本发明的cMet结合分子是单特异性形式、双特异性或多特异性抗体分子形式。多特异性抗体分子例如可以是三特异性抗体分子，其包含针对cMet的第一结合特异性和针对一种或多种其他分子的第二及第三结合特异性。
- [0188] 在一些实施方案中，本发明的cMet结合分子包含特异性结合cMet上相同表位的第一和第二ISVD。在一些实施方案中，所述第一和第二ISVD分别为特异性结合cMet上相同表位的根据本发明的ISVD。在一些进一步的实施方案中，所述第一和第二ISVD包含：(i)包含选自SEQ ID NO:18或41的氨基酸序列或由其组成的CDR1、分别包含SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由其组成的CDR2和CDR3；或者(ii)分别包含SEQ ID NO:23-25的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3。在一些进一步的实施方案中，所述第一和第二ISVD包

含与SEQ ID NO:16、39、40或SEQ ID NO:21或42之一所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。在一些优选的实施方案中，所述第一和第二ISVD包含SEQ ID NO:16、39、40或SEQ ID NO:21或42的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。

[0189] 在一些实施方案中，本发明的cMet结合分子包含特异性结合cMet上不同表位的第一和第二ISVD。在一些实施方案中，所述第一和第二ISVD分别为特异性结合cMet上不同表位的根据本发明的ISVD。在一些实施方案中，所述第一ISVD包含第一抗cMet VHH结构域，所述第二ISVD包含第二抗cMet VHH结构域，或反之亦然，其中所述第一和第二cMet VHH结构域彼此不同。在一些实施方案中，所述第一抗cMet VHH结构域包含：分别包含SEQ ID NO:23-25的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；且所述第二抗cMet VHH结构域包含：包含选自SEQ ID NO:18或41的氨基酸序列或由其组成的CDR1、分别包含SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由其组成的CDR2和CDR3。在一些进一步的实施方案中，所述第一抗cMet VHH结构域包含与SEQ ID NO:21或42所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；且所述第二抗cMet VHH结构域包含与SEQ ID NO:16、39或40所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。在一些进一步的实施方案中，所述第一抗cMet VHH结构域包含SEQ ID NO:21或42的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；且所述第二抗cMet VHH结构域包含SEQ ID NO:16、39或40的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。在一些优选实施方案中，所述第一ISVD包含所述第一抗cMet VHH结构域，且所述第二ISVD包含所述第二抗cMet VHH结构域。在一些实施方案中，所述结合分子是抗cMet双表位抗体。

[0190] 在一些实施方案中，本发明的cMet结合分子可以是单链或多链形式。在一些实施方案中，所述结合分子还包含用于连接位于同一条多肽链上的不同结构域(例

如两个或两个以上ISVD)的肽接头。在另一些实施方案中,所述结合分子还包含免疫球蛋白Fc区。

- [0191] 在一些实施方案中,本公开提供了抗cMet双表位抗体,其中所述抗体包含第一多肽链和第二多肽链,其中,从N端到C端,
- [0192] 第一多肽链包含:特异性结合cMet的第一ISVD和免疫球蛋白Fc区;
- [0193] 第二多肽链包含:特异性结合cMet的第二ISVD和免疫球蛋白Fc区,
- [0194] 优选地,其中:
- [0195] -第一多肽链包含SEQ ID NO:88的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列;且
- [0196] -第二多肽链包含SEQ ID NO:89的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,
- [0197] 再优选地,其中所述第一多肽链包含SEQ ID NO:88的序列或由其组成;且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:89的序列或由其组成。
- [0198] 在一些实施方案中,本发明的cMet结合分子还包含至少一个特异性结合EGFR的ISVD,优选地至少一个(例如1个)根据本发明的抗EGFR ISVD。
- [0199] 在一些实施方案中,本发明的cMet结合分子在其N端或C端经由一个或多个肽接头与一个或多个其他基团、残基或部分连接,其中与没有所述一个或多个其他基团、残基或部分连接的相应cMet结合分子相比,所述一个或多个其他基团、残基或部分提供增加的半寿期、提供效应子功能,如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)。
- [0200] 在一些实施方案中,提供增加的半寿期的所述一个或多个其他基团、残基、部分选自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可与血清蛋白(例如,血清白蛋白(如人血清白蛋白)结合的部分、与血清免疫球蛋白(如IgG)结合的部分、或Fc结构域。
- [0201] 在一些实施方案中,本发明的cMet结合分子在其N端或C端经由一个或多个肽接头连接与人血清白蛋白结合的ISVD。在一些实施方案中,所述与人血清白蛋白结合的ISVD包含SEQ ID NO:46所示氨基酸序列或由其组成的CDR1、包含SEQ ID NO:47所示氨基酸序列或由其组成的CDR2和包含SEQ ID NO:48所示氨基

酸序列或由其组成的CDR3。在一些实施方案中，所述与人血清白蛋白结合的ISVD包含SEQ ID NO:45的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0202] 在某些实施方案中，本文中所提供的cMet结合分子经改变以增加或降低其糖基化的程度。对cMet结合分子的糖基化位点的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以便产生或移除一个或多个糖基化位点而方便地实现。当cMet结合分子包含Fc区时，可以改变与Fc区连接的糖类。在一些应用中，除去不想要的糖基化位点的修饰可以是有用的，例如除去岩藻糖模块以提高抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)功能(参见Shield等(2002)JBC277:26733)。在其它应用中，可以进行半乳糖苷化修饰以调节补体依赖性细胞毒性(CDC)。在某些实施方案中，可在本文中所提供cMet结合分子的Fc区中引入一个或多个氨基酸修饰，以此产生Fc区变体，以便增强例如本发明的cMet结合分子治疗癌症的有效性。

[0203] II.本公开的第二方面：特异性结合EGFR的ISVD和包含该ISVD的EGFR结合分子

[0204] 表皮生长因子受体(EGFR、ErbB1或HER1)是由c-erbB1原癌基因编码的一种I型跨膜糖蛋白。EGFR是受体酪氨酸激酶(RTK)的人表皮生长因子受体(HER)家族的成员，该家族包括HER2(ErbB2)、HER3(ErbB3)和HER4(ErbB4)。EGFR的表达或激酶活性的增加与多种人癌症有关，因此，EGFR是治疗癌症的有吸引力的靶标。

[0205] 在本说明书中，“EGFR”指来自任何物种的EGFR，并且包括来自任何物种的EGFR同种型、片段、变体或同源物。人EGFR是UniProt P00533所示的蛋白。由人EGFR基因编码的mRNA的备选剪接产生四种同种型：同种型1—同种型4。EGFR是一种跨膜蛋白，其包含一个大的胞外区、单个跨膜结构域、胞内近膜结构域、酪氨酸激酶结构域和C端调节区。EGFR与配体的结合诱导受体二聚化和EGFR的C端调节区中的几个酪氨酸残基(Y992、Y1045、Y1068、Y1148和Y1173)的自磷酸化。异常的EGFR表达/活性与许多疾病(例如，癌症)相关。

[0206] 本公开第二方面提供特异性结合EGFR的ISVD(抗EGFR ISVD)和包含所述ISVD的EGFR结合分子。在一些实施方案中，本发明的抗EGFR ISVD和EGFR结合

分子与常规四链抗体相比具有改善的组织渗透性。在一些实施方案中，本发明的抗EGFR ISVD和EGFR结合分子以中等或低亲和力结合人EGFR。在本文中，“中等亲和力”是指，通过例如表面等离子体共振技术(SPR)测定，抗体对于靶表位的结合亲和力 K_D 值等于或高于1nM，但小于50nM；“低亲和力”是指，抗体对于靶表位的结合亲和力 K_D 值大于50nM。在一些实施方案中，与以 K_D 值低于1nM，尤其是低于0.1nM的“高亲和力”抗EGFR ISVD或包含所述ISVD的EGFR结合分子相比，本发明的中等或低亲和力抗EGFR ISVD或包含所述ISVD的EGFR结合分子具有以下至少一种优势：(i)增加的肿瘤组织特异性；(ii)在正常组织中显示出降低的靶向毒性，例如皮肤毒性；(iii)具有改善的安全性；和(iv)在治疗癌症方面更有效。

[0207] 本发明的特异性结合EGFR的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)从N端至C端包含三个互补决定区，分别为CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中，本发明的特异性结合EGFR的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)包含

[0208] (a)SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:31和94-99之一所示的氨基酸序列中的3个CDR；

[0209] (b)SEQ ID NO:6、32和100-102之一所示的氨基酸序列中的3个CDR；或

[0210] (c)SEQ ID NO:11、36、84和105-114之一所示的氨基酸序列中的3个CDR。

[0211] 在一些实施方案中，本发明的特异性结合EGFR的ISVD包含，与以上(a)-(c)之一中所述3个CDR相比，具有单个或者多个CDR不超过每个CDR中1个至3个氨基酸变化的变体，其中所述氨基酸变化是氨基酸的添加、缺失或保守氨基酸取代。在一些实施方案中，根据本发明的CDR根据AbM、Chothia、Kabat、IMGT或其任意组合进行定义，优选地根据Kabat或AbM或其组合进行定义。

[0212] 在一些实施方案中，本发明的特异性结合EGFR的ISVD包含根据Kabat编号的

[0213] (a)SEQ ID NO:3所示的CDR1或SEQ ID NO:3所示的CDR1的不超过1个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO:4所示的CDR2或SEQ ID NO:4所示的CDR2的不超过2个氨基酸变化的变体、和SEQ ID NO:5所示的CDR3或SEQ ID NO:5所示的CDR3的不超过2个氨基酸变化的变体；

- [0214] (b)SEQ ID NO:8所示的CDR1或SEQ ID NO:8所示的CDR1的不超过1个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO:9所示的CDR2或SEQ ID NO:9所示的CDR2的不超过2个氨基酸变化的变体(例如, SEQ ID NO:34或103所示的CDR2)、和SEQ ID NO:10所示的CDR3或SEQ ID NO:10所示的CDR3的不超过2个氨基酸变化的变体(例如, SEQ ID NO:35或104所示的CDR3); 或
- [0215] (c)SEQ ID NO:13所示的CDR1或SEQ ID NO:13所示的CDR1的不超过1个氨基酸变化的变体、SEQ ID NO:14所示的CDR2或SEQ ID NO:14所示的CDR2的不超过2个氨基酸变化的变体(例如, SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:85、115-120之一所示的CDR2)、和SEQ ID NO:15所示的CDR3或SEQ ID NO:15所示的CDR3的不超过2个氨基酸变化的变体;
- [0216] 其中所述氨基酸变化是氨基酸的添加、缺失或保守氨基酸取代。
- [0217] 在一些实施方案中, 本发明提供了特异性结合EGFR的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD), 其中所述ISVD包含:
- [0218] (a)分别包含SEQ ID Nos:3、4和5或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3;
- [0219] (b)分别包含SEQ ID Nos:8、9和10或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3;
- [0220] (c)分别包含SEQ ID Nos:8、34和35或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3;
- [0221] (d)分别包含SEQ ID Nos:8、103和104或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3;
- [0222] (e)分别包含SEQ ID Nos:13、14和15或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3;
- [0223] (f)包含SEQ ID No:13或由其组成的CDR1、包含SEQ ID Nos:115-120之一或由其组成的CDR2和包含SEQ ID No:15或由其组成的CDR3;
- [0224] (g)分别包含SEQ ID Nos:13、38和15或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3; 或者
- [0225] (h)分别包含SEQ ID Nos:13、85和15或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3。
- 在一些实施方案中, 以上(a)、(c)或(h)项定义的ISVD是优选的。在一些实施方案中, (c)项定义的ISVD是更优选的。
- [0226] 在一些实施方案中, 本发明的特异性结合EGFR的所述ISVD包含VHH或由VHH组成。在一些实施方案中, 本发明的特异性结合EGFR的所述ISVD包含以下序列或由以下序列组成:

- [0227] (a)SEQ ID NO:1、31和94–99之一的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；
- [0228] (b)SEQ ID NO:6、32和100–102之一的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；或
- [0229] (c)SEQ ID NO:11、36、84和105–114之一的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；优选地，所述氨基酸变化不发生在CDR区中。在一些实施方案中，包含SEQ ID NO:31、32、84或36的氨基酸序列的所述ISVD是优选的。在另一些实施方案中，包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的所述ISVD是更优选的。
- [0230] 在一些实施方案中，本公开提供了包含本发明的特异性结合EGFR的ISVD的抗体，尤其是抗EGFR重链抗体。
- [0231] 在一些实施方案中，本公开提供了特异性结合EGFR的结合分子。在一些实施方案中，所述EGFR结合分子包含本发明的特异性结合EGFR的ISVD。在一些实施方案中，所述EGFR结合分子包含或由选自以下的抗体组成：单结构域抗体、纳米抗体、VHH抗体或重链抗体。在另一些实施方案中，所述EGFR结合分子为单特异性抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。
- [0232] 在一些实施方案中，本发明的EGFR结合分子包含至少一个本发明的特异性结合EGFR的ISVD，例如，其包含两个、三个、四个或更多个相同或不同的本发明特异性结合EGFR的所述ISVD。
- [0233] 在一些实施方案中，包含在本发明的EGFR结合分子中的ISVD优选是人源化的VHH。与骆驼科动物的VHH相比，人源化VHH对人体具有减小的人抗骆驼科抗体反应，提高了抗体应用的安全性。
- [0234] 在一些实施方案中，本发明的特异性结合EGFR的ISVD或EGFR结合分子具有以下一个或多个特性：
- [0235] (1)以中等或低亲和力结合人EGFR；
- [0236] (2)与人EGFR和食蟹猴EGFR具有交叉反应性；
- [0237] (3)特异性结合肿瘤细胞表面表达的EGFR；
- [0238] (4)被表达EGFR的肿瘤细胞内化。

- [0239] 在一些实施方案中，本发明的EGFR结合分子是双特异性或多特异性抗体分子形式。多特异性抗体分子例如可以是三特异性抗体分子，其包含针对EGFR的第一结合特异性和针对一种或多种其他分子的第二及第三结合特异性。在一些实施方案中，本发明的EGFR结合分子还包含至少一个特异性结合cMet的ISVD，优选地至少一个或两个根据本发明的抗cMet ISVD。
- [0240] 在一些实施方案中，本发明的EGFR结合分子在其N端或C端经由一个或多个肽接头与一个或多个其他基团、残基或部分连接，其中与没有所述一个或多个其他基团、残基或部分连接的相应EGFR结合分子相比，所述一个或多个其他基团、残基或部分提供增加的半寿期、提供效应子功能，如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)。
- [0241] 在一些实施方案中，提供增加的半寿期的所述一个或多个其他基团、残基、部分选自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可与血清蛋白(例如，血清白蛋白(如人血清白蛋白)结合的部分、与血清免疫球蛋白(如IgG))结合的部分、或Fc结构域。
- [0242] 在一些实施方案中，本发明的EGFR结合分子在其N端或C端经由一个或多个肽接头连接与人血清白蛋白结合的ISVD。在一些实施方案中，所述与人血清白蛋白结合的ISVD例如包含SEQ ID NO:46所示氨基酸序列或由其组成的CDR1、包含SEQ ID NO:47所示氨基酸序列或由其组成的CDR2和包含SEQ ID NO:48所示氨基酸序列或由其组成的CDR3。在一些实施方案中，所述与人血清白蛋白结合的ISVD包含SEQ ID NO:45的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。
- [0243] 在某些实施方案中，本文中所提供的EGFR结合分子经改变以增加或降低其糖基化的程度。对EGFR结合分子的糖基化位点的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以便产生或移除一个或多个糖基化位点而方便地实现。当EGFR结合分子包含Fc区时，可以改变与Fc区连接的糖类。在一些应用中，除去不想要的糖基化位点的修饰可以是有用的，例如除去岩藻糖模块以提高抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)功能(参见Shield等(2002)JBC277:26733)。在其它应用中，可以进行半乳糖苷化修饰以调节补体依赖性细胞毒性(CDC)。在某些实施方案中，可在本文中所

提供EGFR结合分子的Fc区中引入一个或多个氨基酸修饰，以此产生Fc区变体，以便增强例如本发明的EGFR结合分子治疗癌症的有效性。

[0244] III.本公开的第三方面：EGFR和cMet结合分子

[0245] 在第三方面，本公开提供了EGFR和cMet结合分子。优选地，所述结合分子为能够同时结合EGFR和cMet的多特异性抗体。在一些实施方案中，根据本发明的多特异性抗体具有一个或多个以下特性：

[0246] (1)以中等或低亲和力结合EGFR，例如人EGFR；

[0247] (2)被表达EGFR的肿瘤细胞内化；

[0248] (2)特异性结合cMet，例如人cMet；

[0249] (3)在配体HGF存在下，阻断配体HGF与细胞表面的cMet结合；

[0250] (4)被表达cMet的肿瘤细胞内化；特别是在结合cMet不同表位时产生协同的内化增强作用；

[0251] (5)与表达EGFR和cMet两者的肿瘤细胞结合，并优选表现出协同结合活性；

[0252] (6)被表达EGFR和cMet两者的肿瘤细胞内吞，并优选表现出协同内吞活性；

[0253] (7)与人EGFR和食蟹猴EGFR具有交叉反应性；

[0254] (8)与人cMet和食蟹猴cMet具有交叉反应性；和

[0255] (9)降低肿瘤细胞增殖和转移。

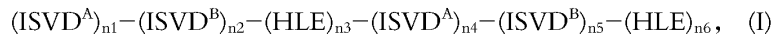
[0256] 在过去的二十年中已经确立了单克隆抗体为抗肿瘤治疗剂，有多种针对EGFR和cMet的单克隆抗体已被批准或正在临床开发，但肿瘤产生的获得性耐药限制了它们的长期疗效。由于多特异性抗体(例如，双特异性抗体、三特异性抗体)能够特异性结合不同的抗原表位，当设计为同时作用于两种或多种不同介质的信号转导通路时，有利于避免肿瘤产生获得性耐药。

[0257] 在一些实施方案中，本发明的多特异性抗体是EGFR和cMet结合分子，包含至少一个根据本公开第二方面(例如本文第II部分)定义的特异性结合EGFR的ISVD，例如，一个或两个本发明的结合EGFR的ISVD；并且还包含至少一个根据本公开第一方面(例如本文第I部分)定义的结合cMet的ISVD，例如，一个或两个本发明的结合cMet的ISVD，任选地，其中位于同一条多肽链上的ISVD之间经由一个或多个肽接头连接。

- [0258] 通常，包含两个或更多个ISVD的EGFR和cMet结合分子在本文中也称为“多价”EGFR和cMet结合分子。例如“二价”EGFR和cMet结合分子可以包含一个结合EGFR的ISVD和一个结合cMet的ISVD，任选地通过一个肽接头连接。“三价”EGFR和cMet结合分子可以包含一个结合EGFR的ISVD和两个结合cMet的ISVD，任选地通过两个肽接头连接；或者可以包含两个结合EGFR的ISVD和一个结合cMet的ISVD，任选地通过两个肽接头连接。“四价”EGFR和cMet结合分子可以包含两个结合EGFR的ISVD和两个结合cMet的ISVD，任选地通过三个肽接头连接；或者可以包含一个结合EGFR的ISVD和三个结合cMet的ISVD，任选地通过三个肽接头连接；或者可以包含三个结合EGFR的ISVD和一个结合cMet的ISVD，任选地通过三个肽接头连接等。
- [0259] 在多价EGFR和cMet结合分子中，两个或更多个ISVD可以相同或不同，并且可以针对EGFR的相同抗原表位、cMet的相同抗原表位、或者可以针对EGFR的不同抗原表位、cMet的不同抗原表位；或者其任何合适的组合。
- [0260] 在一些优选实施方案中，本发明的多特异性EGFR和cMet结合分子包含至少一个(优选一个)针对EGFR的ISVD和两个针对cMet上不同表位的ISVD。在另一些优选实施方案中，本发明的多特异性EGFR和cMet结合分子包含至少一个(优选一个)针对EGFR的ISVD和两个针对cMet的相同表位的ISVD。
- [0261] 本发明多特异性抗体的结构形式
- [0262] 多特异性抗体(例如，双特异性抗体、三特异性抗体)根据不同的组成部分以及构建方式，可以分为许多种类。例如，根据多特异性抗体结构的左右基本上对称性，可分为对称结构和不对称结构；根据多特异性抗体有无IgG的Fc区，可分为有Fc区的抗体样式和无Fc区的抗体样式；根据多特异性抗体中抗原结合位点的数量可分为二价、三价、四价或更多价的抗体等；根据构成多特异性抗体的多肽链数量可分为单链或多链形式。参见，例如Brinkmann U.和Kontermann R.E., The making of bispecific antibodies, Mabs, 2017, 9(2):182–212。本领域已知的这些多特异性抗体结构形式均在本发明的考虑之列。
- [0263] 单链形式的多特异性抗体

[0264] 在一些实施方案中，本公开提供单链形式的EGFR和cMet结合分子(例如，参见图9)，其中至少一个特异性结合EGFR的ISVD和至少一个特异性结合cMet的ISVD位于一条多肽链上，其中所述ISVD之间经由肽接头连接或直接连接。

[0265] 在一些实施方案中，本公开提供了单链形式的多特异性抗体，其包含单条多肽链，其中所述多肽链从N端到C端包含：



[0266] 其中n1,n2,n3,n4,n5和n6彼此独立地选自0,1或2的整数；其中ISVD^A和ISVD^B分别表示结合抗原A和B的ISVD结构域，其中A和B彼此不同且独立地选自EGFR和cMet；其中HLE表示作为半衰期延长结构域的血清白蛋白结合性肽；其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接，优选表示长度5-15个氨基酸的肽接头。式(I)中的各ISVD^A可以彼此独立地靶向A抗原上的相同表位或不同表位。式(I)中的各ISVD^B可以彼此独立地靶向B抗原上的相同表位或不同表位。在一些情况下，优选所述多特异性抗体具有2价至6价(即，n1+n2+n4+n5=2至6)，更优选地，不超过4价(即，n1+n2+n4+n5=2至4)，例如为2价、3价或四价。

[0267] 所述多特异性抗体中抗EGFR ISVD结构域和抗cMet ISVD结构域的个数可以相等或不等。所述多特异性抗体可以根据需要包含或不包含HLE结构域。在一些实施方案中，抗EGFR ISVD结构域的个数不超过4个，优选地不超过3个，例如为1个。在一些实施方案中，抗cMet ISVD结构域的个数为不超过4个，优选地不超过3个，例如为2个。在一些实施方案中，抗EGFR ISVD结构域与抗cMet ISVD结构域的个数比为1:1或1:2。在一些实施方案中，抗体包含0或1个HLE。

[0268] 在一些实施方案中，本公开提供了包含单条多肽链的多特异性抗体，其中所述多肽链从N端到C端包含：

[0269] (i)ISVD^A-ISVD^B；

[0270] (ii)ISVD^A-ISVD^B-ISVD^B，其中每个ISVD^B各自靶向B抗原的相同表位或优选地不同表位；

[0271] (iii)ISVD^B-ISVD^A-ISVD^B，其中每个ISVD^B各自靶向B抗原的相同表位或优选地不同表位；

- [0272] 其中优选地A表示EGFR且B表示cMet。在一些实施方案中，所述(i)-(iii)的多肽链包含位于N末端或优选地C末端的一个HLE。
- [0273] 在一些实施方案中，所述HLE为与人血清白蛋白结合的抗HSA ISVD。在一些实施方案中，所述抗HSA ISVD包含SEQ ID NO:46所示氨基酸序列或由其组成的CDR1、包含SEQ ID NO:47所示氨基酸序列或由其组成的CDR2和包含SEQ ID NO:48所示氨基酸序列或由其组成的CDR3。在一些实施方案中，所述与人血清白蛋白结合的ISVD包含SEQ ID NO:45的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。
- [0274] 在一些具体实施方案中，本发明提供了包含单条多肽链的多特异性抗体，其中所述多肽链包含：
- [0275] (a)特异性结合EGFR的ISVD，优选地其选自根据本公开第二方面的特异性结合EGFR的ISVD；以及(b)特异性结合cMet的第一ISVD和特异性结合cMet的第二ISVD，优选地分别选自根据本公开第一方面的特异性结合cMet的ISVD，其中所述第一ISVD和第二ISVD相同或不同；优选地，所述第一ISVD和第二ISVD特异性结合cMet的不同表位。在一些实施方案中，所述多肽链还包含特异性结合HSA的ISVD，优选地位于所述多肽链的N末端或C末端。在一些实施方案中，优选地，从N端到C端，所述多肽链包含：特异性结合EGFR的ISVD、第一肽接头、特异性结合cMet的第一ISVD、第二肽接头、特异性结合cMet的第二ISVD、以及任选地第三肽接头和特异性结合HSA的ISVD。
- [0276] 双链形式的多特异性抗体
- [0277] 在一些实施方案中，本公开提供双链形式的EGFR和cMet结合分子(例如，参见图10)，其包含至少一个特异性结合EGFR的ISVD和至少一个特异性结合cMet的ISVD以及至少一个半衰期延长结构域，其中所述半衰期延长结构域为免疫球蛋白Fc区，任选地其中位于同一条多肽链上的ISVD之间经由肽接头连接或直接连接。
- [0278] 在一些实施方案中，本公开提供了包含第一多肽链和第二多肽链的多特异性抗体，其中

- [0279] 第一多肽链从N端到C端包含：(ISVD^A)_{n1}-(ISVD^B)_{n2}-HLE-(ISVD^A)_{n3}-(ISVD^B)_{n4},
(II)
- [0280] 第二多肽链从N端到C端包含：(ISVD^B)_{m1}-(ISVD^A)_{m2}-HLE-(ISVD^B)_{m3}-(ISVD^A)_{m4}, (III)
- [0281] 其中n₁,n₂,n₃和n₄以及m₁,m₂,m₃和m₄彼此独立地选自0,1或2的整数；
- [0282] 其中ISVD^A和ISVD^B分别表示结合抗原A和B的ISVD结构域，其中A和B彼此不同且独立地选自EGFR和cMet；其中HLE表示作为半衰期延长结构域的免疫球蛋白Fc区，尤其是人IgG1或IgG4 Fc区；其中符号“-”表示通过肽接头连接或直接连接，优选表示长度5-15个氨基酸的肽接头。式(II)和式(III)中的各ISVD^A可以彼此独立地靶向A抗原上的相同表位或不同表位。(II)和式(III)中的各ISVD^B可以彼此独立地靶向B抗原上的相同表位或不同表位。在一些情况下，优选所述多特异性抗体具有2价至6价(即，n₁,n₂,n₃和n₄以及m₁,m₂,m₃和m₄的和为2-6)，更优选地，不超过4价，例如为2价、3价或四价。
- [0283] 所述多特异性抗体中抗EGFR ISVD结构域和抗cMet ISVD结构域的个数可以相等或不等。在一些实施方案中，抗EGFR ISVD结构域的个数不超过4个，优选地不超过3个，例如为1个。在一些实施方案中，抗cMet ISVD结构域的个数为不超过4个，优选地不超过3个，例如为2个。在一些实施方案中，抗EGFR ISVD结构域与抗cMet ISVD结构域的个数比为1:1或1:2。
- [0284] 在一些优选的实施方案中，所述多特异性抗体包含第一和第二多肽链，其中：
- [0285] 第一多肽链从N端到C端包含：(ISVD^A)-HLE，
- [0286] 第二多肽链从N端到C端包含：(ISVD^B)-HLE；
- [0287] 或者，
- [0288] 第一多肽链从N端到C端包含：(ISVD^B)-(ISVD^A)-HLE，
- [0289] 第二多肽链从N端到C端包含：(ISVD^B)-HLE；
- [0290] 其中每个ISVD^B各自靶向B抗原的相同表位或优选地不同表位；
- [0291] 或者，
- [0292] 第一多肽链从N端到C端包含：(ISVD^A)-HLE；
- [0293] 第二多肽链从N端到C端包含：(ISVD^B)-(ISVD^B)-HLE，

- [0294] 其中每个ISVD^B各自靶向B抗原的相同表位或优选地不同表位；
- [0295] 其中优选地A表示EGFR，且B表示cMet。
- [0296] 由于免疫球蛋白Fc区的二聚化作用，上述多特异性抗体的第一和第二多肽链可以缔合形成异源二聚体，由此产生双链形式的多特异性结合分子。优选地，为了促进第一和第二多肽链的异二聚化，可以在第一和第二多肽链的Fc区中引入Knob-into-hole突变，例如(T366W/T366S,L368A,Y407V)突变或(T366Y/Y407T)突变。优选地，所述Fc区包含来自人IgG1或IgG4的氨基酸序列，更优选地，所述Fc区还包含降低或消除Fc γ 受体结合的突变，例如LALA突变。
- [0297] 在一些具体实施方案中，本发明的EGFR和cMet结合分子为双链形式，其包含：
- [0298] (a)特异性结合EGFR的ISVD位于一多肽链上，优选所述ISVD选自根据本公开第二方面的特异性结合EGFR的ISVD，其中在所述ISVD的C端连接Fc区(Fc亚单位)；以及
- [0299] (b)特异性结合cMet的第一ISVD和特异性结合cMet的第二ISVD从N末端至C末端位于另一条链上，优选分别选自根据本公开第一方面的特异性结合cMet的ISVD，其中所述第一ISVD和第二ISVD相同或不同；优选地，所述第一ISVD和第二ISVD特异性结合cMet的不同表位；任选地，所述第一ISVD和第二ISVD之间经由一个或多个肽接头连接，
- [0300] 其中在所述第二ISVD的C端连接Fc区(Fc亚单位)。
- [0301] 在一些具体实施方案中，本发明的EGFR和cMet结合分子为双链多特异性抗体，其包含第一多肽链和第二多肽链，其中，从N端到C端，第一多肽链包含：特异性结合EGFR的ISVD和免疫球蛋白Fc区，且第二多肽链包含：特异性结合cMet的第一ISVD、肽接头、特异性结合cMet的第二ISVD和免疫球蛋白Fc区。
- [0302] 示例抗原结构域组合
- [0303] 在上述根据本发明的多特异性抗体的一些实施方案中，优选地，根据本发明的多特异性抗体包含至少一个根据本公开第一方面(例如第I部分所定义)的抗cMet ISVD和/或至少一个根据本公开第二方面(例如第II部分所定义)的抗EGFR ISVD。

- [0304] 在一些进一步优选的实施方案中，根据本发明的多特异性抗体包含特异性结合cMet上相同表位的第一和第二ISVD。在一些实施方案中，所述第一和第二ISVD分别为特异性结合cMet上相同表位的根据公开第一方面的抗cMet ISVD。在一些进一步的实施方案中，所述第一和第二ISVD包含：(i)包含选自SEQ ID NO:18或41的氨基酸序列或由其组成的CDR1、分别包含SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由其组成的CDR2和CDR3；或者(ii)分别包含SEQ ID NO:23-25的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3。在一些进一步的实施方案中，所述第一和第二ISVD包含与SEQ ID NO:16、39、40或SEQ ID NO:21或42之一所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。在一些优选的实施方案中，所述第一和第二ISVD包含SEQ ID NO:16、39、40或SEQ ID NO:21或42的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。
- [0305] 在另一些进一步优选的实施方案中，根据本发明的多特异性抗体包含特异性结合cMet上不同表位的第一和第二ISVD。在一些实施方案中，所述第一和第二ISVD分别为特异性结合cMet上不同表位的根据本公开第一方面的抗cMet ISVD。在一些实施方案中，所述第一ISVD包含第一抗cMet VHH结构域，所述第二ISVD包含第二抗cMet VHH结构域，或反之亦然，其中所述第一和第二cMet VHH结构域彼此不同。在一些实施方案中，所述第一抗cMet VHH结构域包含：分别包含SEQ ID NO:23-25的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；且所述第二抗cMet VHH结构域包含：包含选自SEQ ID NO:18或41的氨基酸序列或由其组成的CDR1、分别包含SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由其组成的CDR2和CDR3。在一些进一步的实施方案中，所述第一抗cMet VHH结构域包含与SEQ ID NO:21或42所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；且所述第二抗cMet VHH结构域包含与SEQ ID NO:16、39或40所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。在一些进一步的实施方案中，所述第一抗cMet VHH结构域包含SEQ ID NO:21或42

2的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；且所述第二抗cMet VHH结构域包含SEQ ID NO:16、39或40的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。在一些优选实施方案中，所述第一ISVD包含所述第一抗cMet VHH结构域，且所述第二ISVD包含所述第二抗cMet VHH结构域。

[0306] 在上述包含结合相同cMet表位或不同cMet表位的第一和第二ISVD的本发明多特异性抗体的一些优选实施方案中，所述抗体还包含至少一个(优选1个)根据本公开第二方面的抗EGFR ISVD。在一些实施方案中，所述抗EGFR ISVD包含：

[0307] (i)分别包含SEQ ID NOs:3、4和5的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；

[0308] (ii)分别包含SEQ ID NOs:8、9和10的氨基酸序列、或SEQ ID NOs:8、34和35的氨基酸序列、或SEQ ID NOs:8、103和104的氨基酸序列、或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；或者

[0309] (iii)分别包含SEQ ID NOs:13、14和15的氨基酸序列、或SEQ ID NOs:13、85和15的氨基酸序列，或SEQ ID NOs:13、38和15的氨基酸序列、或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；

[0310] 再优选地，所述抗EGFR ISVD：

[0311] (a)包含SEQ ID NO:1、31和94-99之一所示氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；

[0312] (b)包含SEQ ID NO:6、32、100-102之一所示氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；或

[0313] (c)包含SEQ ID NO:11、36、84和105-114之一所示氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；

[0314] 再优选地所述抗EGFR ISVD：

[0315] (a)包含SEQ ID NO:31所示氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；

[0316] (b)包含SEQ ID NO:32所示氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；或

- [0317] (c)包含SEQ ID NO:84所示氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。
- [0318] 在一些实施方案中，本公开提供单链多特异性抗体，其包含选自以下的抗EGFR ISVD与第一和第二抗cMet ISVD的组合：
- [0319] (a)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:1、6或13的氨基酸序列中的3个CDR且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列中的3个CDR以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列中的3个CDR；或
- [0320] (b)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:1、6或13的氨基酸序列中的3个CDR且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列中的3个CDR以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列中的3个CDR；其中CDR优选根据Kabat定义，
- [0321] 优选地，所述抗体包含选自以下的抗EGFR ISVD与第一和第二抗cMet ISVD的组合：
- [0322] (a)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:1、6或13的氨基酸序列且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列；或
- [0323] (b)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:1、6或13的氨基酸序列且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在此单链多特异性抗体的一些进一步实施方案中，所述抗体从N端到C端包含所述抗EGFR ISVD、肽接头、所述第一抗cMet ISVD、肽接头和第二抗cMet ISVD。
- [0324] 在一些实施方案中，本公开提供双链多特异性抗体，其包含选自以下的抗EGFR ISVD与第一和第二抗cMet ISVD的组合：
- [0325] (a)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:31、32或84的氨基酸序列中的3个CDR且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列中的3个CDR以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列中的3个CDR；
- [0326] (b)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:31、32或84的氨基酸序列中的3个CDR且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列中的3个CDR以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列中的3个CDR；

- [0327] (c)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:31、32或84的氨基酸序列中的3个CDR且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列中的3个CDR以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列中的3个CDR；或
- [0328] (d)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:31、32或84的氨基酸序列中的3个CDR且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列中的3个CDR以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列中的3个CDR；其中CDR优选根据Kabat定义，
- [0329] 优选地，所述抗体包含选自以下的抗EGFR ISVD与第一和第二抗cMet ISVD的组合：
- [0330] (a)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:31、32或84的氨基酸序列且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列；或
- [0331] (b)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:31、32或84的氨基酸序列且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列；
- [0332] (c)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:31、32或84的氨基酸序列且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列；或
- [0333] (d)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:31、32或84的氨基酸序列且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列；
- [0334] 再优选地，所述抗体包含选自以下的抗EGFR ISVD与第一和第二抗cMet ISVD的组合：
- [0335] (a)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列；

- [0336] (b)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列；
- [0337] (c)抗EGFR ISVD包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列且第一抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列以及第二抗cMet ISVD包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列；
- [0338] 再优选地，所述抗体包含：包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的抗EGFR ISVD、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的第一抗cMet ISVD以及包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的第二抗cMet ISVD。
- [0339] 在此双链多特异性抗体的一些进一步实施方案中，所述抗体包含第一多肽链和第二多肽链，其中，从N端到C端，第一多肽链包含：特异性结合EGFR的ISVD和免疫球蛋白Fc区，且第二多肽链包含：特异性结合cMet的第一ISVD、肽接头、特异性结合cMet的第二ISVD和免疫球蛋白Fc区。
- [0340] 示例性肽接头
- [0341] 在本发明多特异性抗体的一些实施方案中，所述抗体包含肽接头。在本文中，用于本发明结合分子和本发明抗体中的“肽接头”是指由天然氨基酸组成的短氨基酸序列。对在本发明的结合分子和本发明抗体中使用的肽接头的长度或柔性没有特别限制。用于本发明结合分子和抗体的肽接头可以是任何合适的氨基酸序列，特别是1至50，优选地1至30，例如1至10个氨基酸残基的氨基酸序列。在一些实施方案中，肽接头基本上由甘氨酸(G)和丝氨酸(S)残基组成，优选地，包含肽基序如GGGGS(SEQ ID NO:43)基序的一个或多个重复(例如，包含式(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n，其中n可以是1、2、3、4、5、6、7或更大)，例如，GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中，用于本发明结合分子和抗体中连接两个ISVD的肽接头优选包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。基于本文的公开内容，本领域技术人员将能够在有限的常规实验之后，确定用于本发明的结合分子或本发明抗体中的最佳肽接头。
- [0342] 示例性免疫球蛋白Fc区

- [0343] 在本发明多特异性抗体的一些实施方案中，所述抗体包含Fc区(Fc亚单位)。可用于本发明结合分子和抗体中的Fc区可以是源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区。
- [0344] 在一些实施方案中，本发明的EGFR和cMet结合分子的Fc区使用了“结入扣”技术(参见例如John B.B.Ridgway等人，‘Knobs-into-holes’ engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization.Protein Engineering,1996.9(7):p.617-21；Shane Atwell等人，Stable heterodimers form remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library.J.Mol.Biol,1997.270:p.26-35)，该技术可在本发明的EGFR和cMet结合分子的两条链之间改造界面，以促进本发明EGFR和cMet结合分子的两条链正确缔合。通常，该技术涉及在一条链的界面引入“凸起”，在欲与之配对的另一条链的界面引入相应的“空穴”，使得凸起可置于空穴中。优选的界面包含一条链的重链恒定结构域的CH3结构域和欲与之配对的另一条链的重链恒定结构域的CH3结构域。可通过将来自一条链的重链恒定结构域的CH3结构域的界面的小氨基酸侧链替换为较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)来构建凸起。通过将大氨基酸侧链替换为较小的侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)，在欲配对的另一条链的重链恒定结构域的CH3结构域的界面构建与凸起相同或相似大小的补偿性空穴。
- [0345] 在一个实施方案中，本发明EGFR和cMet结合分子的两条链上的Fc区包含对Fc受体的结合亲和力的修饰。在一个实施方案中，所述Fc受体是Fc γ 受体，特别地是人Fc γ 受体。在一个实施方案中，所述Fc受体是活化性Fc受体。在一个实施方案中，所述修饰减少本发明EGFR和cMet结合分子的效应子功能。在一个具体实施方案中，所述效应子功能是抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一个实施方案中，所述修饰在本发明EGFR和cMet结合分子的Fc区内，特别地在其CH2区内。在一个实施方案中，本发明的EGFR和cMet结合分子包含在重链第329位置(EU编号)处的氨基酸置换。在一个具体实施方案中，所述氨基酸置换是P329G。在一个实施方案中，本发明的EGFR和cMet结合分子包含在重链第234和235位置(EU编号)处的氨基酸置换。在一个具体实施方案中，所述氨基酸置换是L234A和L235A(LALA突变)(Armour KL等人，Recombinant human IgG molecules lacking

g Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur J Immunol, 1999.29(8):2613–24)。在一个实施方案中，本发明的EGFR和cMet结合分子包含在重链第234、235和329位置处(EU编号)的氨基酸置换。在一个具体实施方案中，本发明的EGFR和cMet结合分子包含重链中的氨基酸置换L234A、L235A和P329G(EU编号)。

[0346] 在一个实施方案中，用于本发明结合分子和抗体的Fc区具有突变YTE，即具有根据Kabat的EU index编号的突变M252Y(Met252Tyr)、S254T(Ser254Thr)和T256E(Thr256Glu)的组合，以提供增加的半寿期。

[0347] 在一些实施方案中，用于本发明双链多特异性抗体的免疫球蛋白Fc区包含：

[0348] 具有Hole突变的Fc链(也称作扣链)，其包含SEQ ID NO:137的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；以及

[0349] 具有Knob突变的Fc链(也称作结链)，其包含SEQ ID NO:138的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0350] 示例性多特异性抗体

[0351] 在一些实施方案中，本发明提供了多特异性抗体，所述抗体包含第一多肽链和第二多肽链，其中：

[0352] –第一多肽链包含选自SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:86的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；且

[0353] –第二多肽链包含选自SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:87的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。优选地，在一些实施方案中，

[0354] (i)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73、75或74的氨基酸序列或与其具

有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；

[0355] (ii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73、75或74的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；

[0356] (iii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73、75或74的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；

[0357] (iv)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成。

[0358] 再优选地，在一些实施方案中，

[0359] (i)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列、或由其组成；

[0360] (ii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列、或由其组成；

[0361] (iii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列、或由其组成。

[0362] 在另一些实施方案中，本公开提供了多特异性抗体，所述抗体包含单条多肽链，其中所述多肽链包含选自SEQ ID NO:51-66的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；或者其中所述多肽链包含选自SEQ ID NO:67-68和76-83的序列或与其具有至少

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。优选地，在一些实施方案中，所述多肽链包含选自SEQ ID NO:51-56的序列或由其组成。

[0363] 本发明EGFR和cMet结合分子的性质

[0364] EGFR亲和力

[0365] 本发明的EGFR和cMet结合分子包含以中等或低亲和力结合EGFR的ISVD。EGFR在正常组织(例如，皮肤)中以低水平表达。以中等或低亲和力结合EGFR的本发明EGFR和cMet结合分子在正常组织中显示降低的在靶毒性(on-target toxicity)，同时仍然能够靶向表达高水平EGFR的肿瘤，从而导致改善的安全性特征。

[0366] 在一些实施方案中，包含在本发明结合分子中与人EGFR结合的ISVD也可与食蟹猴EGFR结合。例如，与人EGFR结合的ISVD可以以具有相近似的 K_D 与食蟹猴EGFR结合。在本文中，相近似 K_D 是指进行比较的两个 K_D 值之间的差异不超过10倍，优选地不超过大约5倍，或更优选地不超过2倍。本发明的EGFR和cMet结合分子能够结合人EGFR和食蟹猴EGFR，这种交叉反应性是有利的，因为它允许在临床前开发期间在食蟹猴中进行本发明的EGFR和cMet结合分子的给药和安全性测试。

[0367] cMet亲和力

[0368] 本发明的EGFR和cMet结合分子包含特异性结合cMet的ISVD。在一些实施方案中，本发明的EGFR和cMet结合分子包含特异性结合cMet上不同表位的至少两个ISVD，这使本发明的EGFR和cMet结合分子具有更好的肿瘤靶向性和内化作用。

[0369] 在一些实施方案中，包含在本发明结合分子中与人cMet结合的ISVD，可以以 K_D 低于80nM、50nM、20nM、15nM、12nM、11nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM或2.5nM的亲和力，与人cMet结合。或者，与人cMet结合的ISVD可以以 K_D 为1至20nM、1至15nM、1至10nM、1至9nM、1至8nM、1至7nM、1至6nM、1至5nM、1至4nM、1至3nM、1至2.5nM或2至2.5nM的亲和力与人cMet结合。

- [0370] 在一些实施方案中，包含在本发明结合分子中与人cMet结合的ISVD，也可与食蟹猴cMet结合例如，与人cMet结合的ISVD可以以具有相近似的 K_D 与食蟹猴cMet结合。本发明的EGFR和cMet结合分子能够结合人cMet和食蟹猴cMet，这种交叉反应性是有利的，因为它允许在临床前开发期间在食蟹猴中进行本发明的EGFR和cMet结合分子的给药和安全性测试。
- [0371] 同时特异性结合EGFR和cMet
- [0372] 本发明的EGFR和cMet结合分子可以同时结合EGFR靶和cMet靶。已知许多肿瘤共表达EGFR和cMet两者，因此，预期具有同时结合EGFR和cMet的能力的本发明EGFR和cMet结合分子是有利的。
- [0373] 内化
- [0374] 本发明的EGFR和cMet结合分子可以介导有效内化。这对于缀合物或偶联物是特别有用的，因为它确保缀合物或偶联物被内化到细胞中并递送到溶酶体，在溶酶体中抗体分子随后被降解并且药物被释放到细胞中，发挥药物的细胞效应，例如细胞毒性。
- [0375] 细胞对本发明EGFR和cMet结合分子的内化可通过使活细胞与本发明的EGFR和cMet结合分子接触并在足够的内化时间后检测本发明的EGFR和cMet结合分子来分析。当抗体分子保留在细胞表面上(例如在细胞表面上检测到，和/或在细胞内未检测到)时，确定抗体分子未被细胞内化。在细胞内检测到抗体分子(例如，位于细胞质或细胞器)，确定抗体分子已经内化。
- [0376] 当与EGFR单特异性结合分子或cMet单特异性结合分子相比较，本发明的EGFR和cMet结合分子介导的内化对共表达这两种靶标的肿瘤细胞显示出更大的选择性，由此，可以最小化其在不显示显著水平的EGFR和cMet共表达的正常组织中的不利影响。
- [0377] 体外活性
- [0378] 本发明的EGFR和cMet结合分子在体外具有细胞毒性活性。细胞毒性活性可以使用体外细胞活力测定来测量，例如CellTiter-Glo®(Promega)测定。在一些实施方案中，所述细胞是表达EGFR和cMet两者的细胞。

- [0379] 在一些实施方案中，与表达低水平的EGFR和/或cMet的细胞相比，本发明的EGFR和cMet结合分子能够增加对表达显著量的EGFR和cMet两者的细胞例如肿瘤细胞的杀伤。可通过测量细胞表面的相对EGFR和cMet受体密度来确定表达显著量的EGFR和cMet两者的细胞。
- [0380] 体内活性
- [0381] 本发明的EGFR和cMet结合分子体内能够抑制癌症的发展或进展。在一些实施方案中，癌症可以是表达EGFR和cMet两者或一者的癌症。癌细胞可以在细胞表面表达EGFR和cMet之一或两者。所述癌症可以是例如选自肺癌(例如，肺鳞状细胞癌、肺腺癌、非小细胞肺癌)、乳腺癌(例如，三阴性乳腺癌)、结肠癌和咽鳞癌。
- [0382] IV.本公开的第四方面：核酸、载体、宿主和生产方法
- [0383] 在第四方面，本公开提供了根据本公开第一至第三方面的ISVD、结合分子和多肽的编码核酸、载体、宿主细胞和生产方法。
- [0384] 在一个实施方案中，本公开提供了制备本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体的方法，其中所述方法包括在适于表达编码所述ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体的核酸的条件下培养包含编码所述ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞，以及任选地分离所述ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体。在某个实施方案中，所述方法还包括从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体。
- [0385] 为了重组产生本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体，首先分离编码本发明ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体的核酸，并将所述核酸插入载体，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序，例如通过使用能够与编码本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体的核酸特异性结合的寡核苷酸探针进行。

- [0386] 如本文所述制备的本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于净电荷、疏水性、亲水性等因素，并且这些对本领域技术人员是显而易见的。可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体的纯度，所述熟知分析方法包括大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。
- [0387] V.本公开的第五方面：免疫融合物、免疫缀合物和抗体药物偶联物(ADC)
- [0388] 在第五方面，本公开提供了包含根据本公开第一至第三方面的ISVD、抗体和抗原结合分子的免疫融合物、免疫缀合物和抗体药物偶联物。
- [0389] 免疫融合物和免疫缀合物
- [0390] 在一个实施方案中，本公开提供通过将根据本公开第一至第三方面的ISVD、抗体和抗原结合分子融合或缀合于异源分子而产生的免疫融合物或免疫缀合物。
- [0391] 在一个实施方案中，在免疫融合物中，本发明的抗原结合分子(如抗体)与异源肽或多肽分子直接或通过氨基酸接头连接。可以提及的异源肽或多肽包括但不限于，赋予该融合另一功能活性的蛋白或多肽、或利于免疫融合物纯化或检测的标签肽。
- [0392] 在一个实施方案中，在免疫缀合物中，本发明的抗原结合分子(如抗体)与治疗剂或诊断剂或可检测剂缀合。在缀合物中，可以使用化学接头来共价连接缀合物的不同实体。在一些情况下，有利地的是，化学接头是利于抗原结合分子多肽在递送至靶位点后释放的“可裂解接头”。例如，可以使用酸不稳定性接头、肽酶敏感性接头、光不稳定性接头、二甲基接头或含二硫化物的接头。
- [0393] 在与治疗剂缀合的实施方案中，适用于缀合物的治疗剂包括但不限于细胞毒素(例如细胞生长抑制剂或细胞杀伤剂)，药物或放射性同位素。
- [0394] 在与诊断剂或可检测剂缀合的实施方案中，这类缀合物可以作为临床检验方法的部分(如确定特定疗法的效力)，用于监测或预测疾病或病症的发作、形成、进展和/或严重性。可以通过将抗体与可检测剂偶联实现这类诊断和检测，所述可

检测剂包括但不限于多种酶，例如辣根过氧化物酶；辅基，例如链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素；荧光物质；发光物质；放射性物质；和用于各种正电子发射成像术中的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

[0395] 在一些实施方案中，适用于缀合物的治疗剂包括但不限于药物(例如抗肿瘤药物)；在另一些实施方案中，适用于缀合物的诊断剂包括但不限于放射性诊断剂、荧光物质或发光物质。

[0396] 抗体药物偶联物(ADC)

[0397] 在一些优选的实施方案中，本公开提供了抗体-药物偶联物(ADC)。

[0398] 在一些实施方案中，本公开提供具有式(I₀)的抗体药物偶联物(ADC)或其药学上可接受的盐或溶剂化物：



[0399] 其中：

[0400] Ab是本发明的结合分子，例如抗体，例如上述特异性结合EGFR和/或cMet的抗体或其片段(例如抗原结合片段)；

[0401] L是连接子；

[0402] D是药物，例如抗肿瘤化合物；和

[0403] p是选自1至16的整数，例如选自1-10、1-9、2-8、4-10、6-8、3-7、4-6、2-6的整数，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。在一些实施方案中，Ab为根据本公开第三方面的EGFR和cMet结合分子，尤其是根据本公开第三方面的多特异性抗体。在一些特别优选的实施方案中，所述多特异性抗体包含第一和第二多肽链的，其中：

[0404] (i)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列、或由其组成；

[0405] (ii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列、或由其组成；

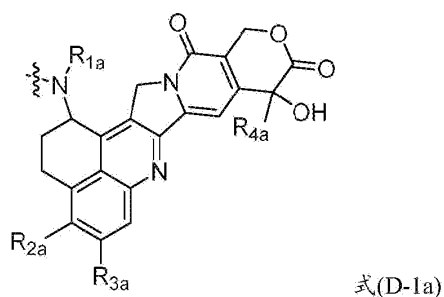
[0406] (iii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列、或由其组成。

- [0407] 可以理解, -L-D部分可以通过本领域已知的任意方式与Ab共价连接。在一些实施方案中, -L-D部分通过来自Ab的硫(S)原子与Ab共价连接, 即-L-D部分和Ab通过-S-连接。在一些实施方案中, 所述硫原子来源于Ab的链间二硫键的打开。在一些实施方案中, 所述硫原子来自Ab中的(工程化或天然)半胱氨酸。
- [0408] 在一些实施方案中, 本发明提供一种具有式(I)的抗体-药物偶联物(ADC)或其药学上可接受的盐或溶剂化物:
- $$\text{Ab}-(\text{S}-\text{L}-\text{D})_p \text{ (I)}$$
- [0409] 其中:
- [0410] Ab是本发明的结合分子, 例如抗体, 例如上述特异性结合EGFR和/或cMet的抗体或其片段(例如抗原结合片段);
- [0411] L是连接子;
- [0412] D是药物, 例如抗肿瘤化合物; 并且
- [0413] p是选自1至16的整数, 例如选自1-10、1-9、2-8、4-10、6-8、3-7、4-6、2-6的整数, 例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或12。应当理解, 式(I)中的S是来自抗体Ab的硫。在一些实施方案中, Ab为根据本公开第三方面的EGFR和cMet结合分子, 尤其是根据本公开第三方面的多特异性抗体。在一些特别优选的实施方案中, 所述多特异性抗体包含第一和第二多肽链的, 其中:
- [0414] (i)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列、或由其组成; 且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列、或由其组成;
- [0415] (ii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列、或由其组成; 且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列、或由其组成;
- [0416] (iii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列、或由其组成; 且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列、或由其组成。
- [0417] 可以理解, p是指式(I₀)或(I)的抗体-药物偶联物分子中Ab所连接的-L-D的数目, 也可称为DAR。
- [0418] 在一些实施方案中, 本发明式(I₀)或(I)中的D可以是任何抗肿瘤化合物, 只要是具有抗肿瘤效果、且具有能连接于连接子的结构部分的化合物即可, 没有特别限制。抗肿瘤化合物可以是对肿瘤有作用的药学活性化合物。对于抗肿瘤性化

合物而言，连接子的一部分或全部优选可在肿瘤细胞内被切断，游离出抗肿瘤性化合物部分，从而显示抗肿瘤效果。

[0419] 在一些实施方案中，抗肿瘤化合物可以是例如细胞毒性剂，例如喜树碱类化合物或溴瑞他汀类化合物。

[0420] 在一些实施方案中，D具有式(D-1a)或式(D-1b)所示结构：



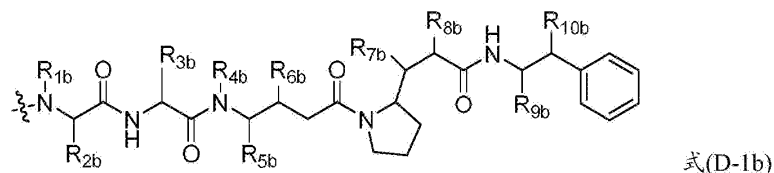
[0421] 其中R_{1a}选自H和C₁-C₆烷基；

[0422] R_{2a}选自H、卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆卤代烷基、-OR_{5a}和-SR_{5a}；

[0423] R_{3a}选自H、卤素、CN、C₁-C₆烷基、C₁-C₆卤代烷基和-OR_{5a}；且

[0424] R_{4a}和R_{5a}独立地选自H和C₁-C₄烷基；

[0425] 在一些实施方案中，R_{1a}为H；R_{2a}为C₁-C₆烷基；R_{3a}为卤素，优选为-F；R_{4a}为C₁-C₄烷基，优选为乙基；



[0426] 其中R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b}和R_{8b}各自独立地选自C₁₋₈烷基；优选C₁₋₄烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；

[0427] R_{6b}和R_{7b}各自独立地选自C₁₋₈烷氧基，例如甲氧基、乙氧基或丙氧基；

[0428] R_{9b}选自C₁₋₈烷基和COOH；优选C₁₋₄烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；且

[0429] R_{10b}选自OH和H。

[0430] 在一些实施方案中，R_{1b}、R_{4b}和R_{8b}各自独立地选自C₁₋₂烷基；优选甲基；

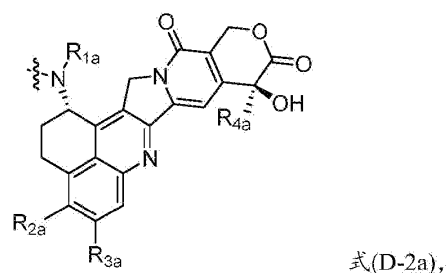
[0431] R_{2b} 、 R_{3b} 和 R_{5b} 各自独立地选自 C_{3-4} 烷基；

[0432] R_{6b} 和 R_{7b} 各自独立地选自 C_{1-2} 烷氧基；且

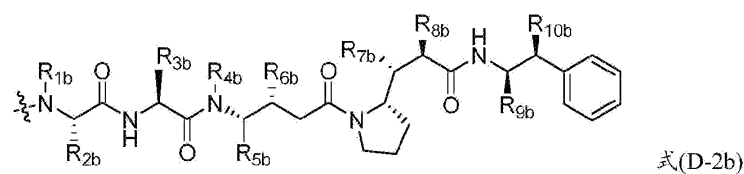
[0433] R_{9b} 选自 C_{1-4} 烷基且 R_{10b} 为OH；或 R_{9b} 为COOH且 R_{10b} 为H。

[0434] 可以理解，结构式中的波浪线表示该价键与分子的其余部分连接。例如，D结构式中的波浪线表示该价键与L连接。

[0435] 在一些实施方案中，D具有式(D-2a)或式(D-2b)所示的结构：

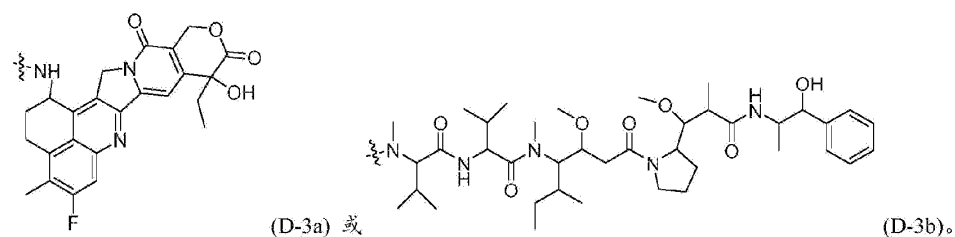


[0436] 其中 R_{1a} 、 R_{2a} 、 R_{3a} 和 R_{4a} 如上所定义；或

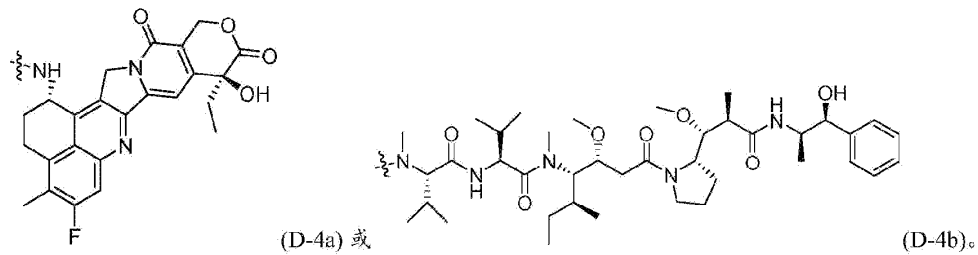


[0437] 其中 R_{1b} 、 R_{2b} 、 R_{3b} 、 R_{4b} 、 R_{5b} 、 R_{6b} 、 R_{7b} 、 R_{8b} 、 R_{9b} 和 R_{10b} 如上所定义。

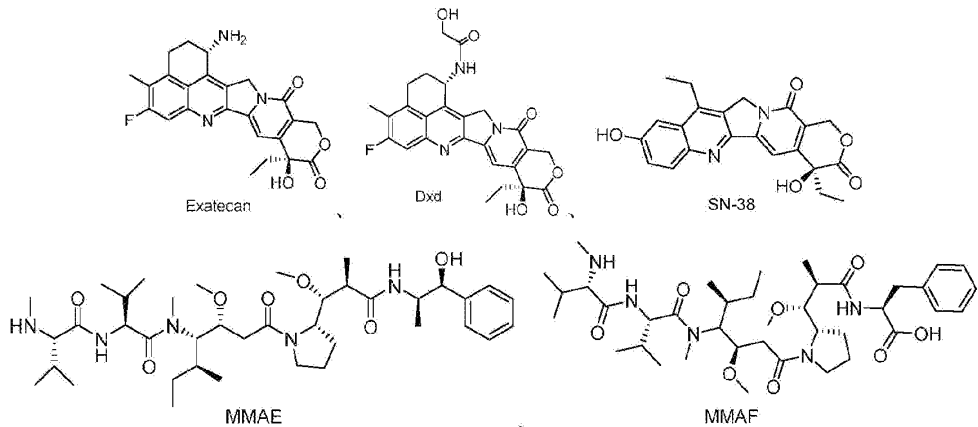
[0438] 在一些实施方案中，D具有式(D-3a)或式(D-3b)所示的结构：



[0439] 在一些实施方案中，D具有式(D-4a)或式(D-4b)所示的结构：



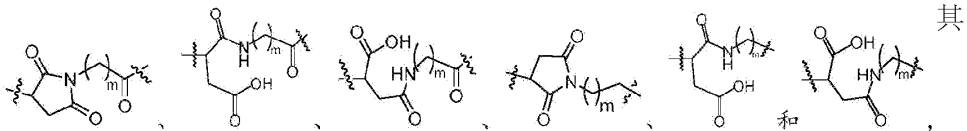
[0440] 在一些实施方案中，在本公开的ADC中，所述药物是依喜替康(Exatecan)、Dxd、SN-38、单甲基溴瑞他汀E(MMAE)或MMAF。结构式如下所示：



[0441] 在一些实施方案中，-L-具有如下结构：-Z-L₁-L₂-L₃-

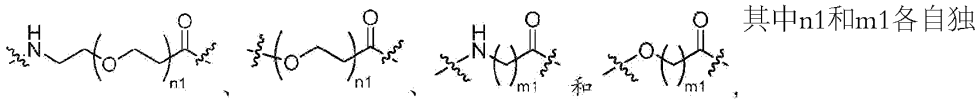
[0442] 其中

[0443] Z选自



中m为选自1-10的整数，例如为1、2、3、4、5、6、7或8；

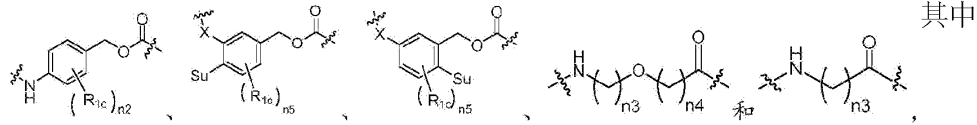
[0444] L₁选自不存在、



地为选自0-20的整数，例如选自0-12的整数，例如1、2、3、4、5、6、7或8；

[0445] L₂是氨基酸残基或由2-8个氨基酸构成的肽残基；且

[0446] L₃选自：



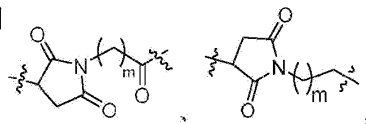
X选自-NH-、-O-和-S-；R_{1c}各自独立地选自C₁₋₈烷基、C₁₋₈卤代烷基-、C₁₋₈烷氧基、卤素、硝基和氰基；Su各自独立地选自戊糖、戊糖醛酸、己糖和己糖醛酸；n₂为0、1、2、3或4；n₅为0、1、2或3；n₃和n₄独立地为1、2、3、4、5或6；和

[0447] 其中，Z与Ab上的S连接，L₃与D连接。

[0448] 在一些实施方案中，-L-具有如下结构：-Z-L₁-L₂-L₃-

[0449] 其中

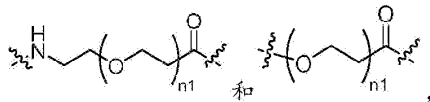
[0450] Z选自



其中m为选自1-10的整数，例如为1、2、

3、4、5、6、7或8；

[0451] L₁选自不存在、

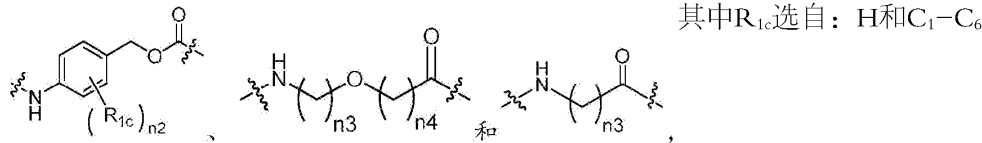


其中n₁独立地为选自0-12

的整数，例如1、2、3、4、5、6、7或8；

[0452] L₂是由2-8个氨基酸构成的肽残基；且

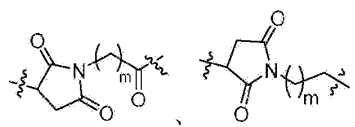
[0453] L₃选自：



烷基；n₂为1、2、3或4；且n₃和n₄独立地为1、2、3、4、5或6。

[0454] 应当理解，上述-Z-L₁-L₂-L₃-中，Z与Ab连接，例如与Ab上的S连接，L₃与D连接。

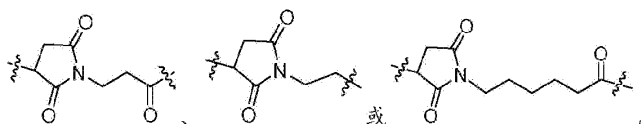
[0455] 在一些实施方案中，Z选自



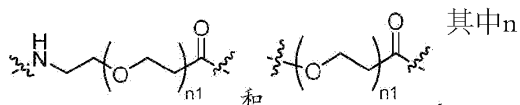
其中m为1、2、3、4、

5、6、7或8。

[0456] 在一些实施方案中，Z选自



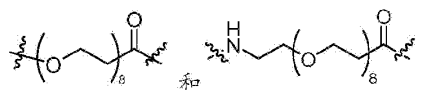
[0457] 在一些实施方案中，L₁选自不存在、



其中n

1独立地为选自0-12的整数，例如1、2、3、4、5、6、7或8。

[0458] 在一些实施方案中，L₁选自不存在、



[0459] 在一些实施方案中，L₂是氨基酸残基或由2、3、4、5、6或7个氨基酸构成的肽残基。在一些实施方案中，L₂是氨基酸残基。在一些实施方案中，L₂是由2、3、4、5、6或7个氨基酸构成的肽残基。

[0460] 在一些实施方案中，所述氨基酸残基或氨基酸优选为L-氨基酸。而且，除了 α -氨基酸之外，所述氨基酸残基或氨基酸可以是 β -丙氨酸、 ϵ -氨基己酸、 γ -氨基丁酸等结构的氨基酸残基或氨基酸，还可以是非天然型的氨基酸，例如N-甲基化的氨基酸。

[0461] 在一些实施方案中，所述氨基酸残基或氨基酸各自独立地选自缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、赖氨酸(Lys)、瓜氨酸(Cit)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、异亮氨酸(Ile)、精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、甲硫氨酸(Met)、色氨酸(Trp)、半胱氨酸(Cys)、组氨酸(His)和苏氨酸(Thr)。在一些实施方案中，所述氨基酸残基或氨基酸各自独立地选自甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、瓜氨酸(Cit)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)、谷氨酸(Glu)和谷氨酰胺(Gln)。在一

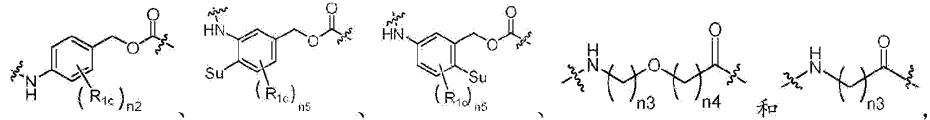
些实施方案中，所述氨基酸残基或氨基酸各自独立地选自甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、瓜氨酸(Cit)和谷氨酸(Glu)。

[0462] 在一些实施方案中，L₂选自-Ala-、-Val-、-Gly-、-Val-Ala-、-Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-、-Gly-Gly-Phe-Gly-。

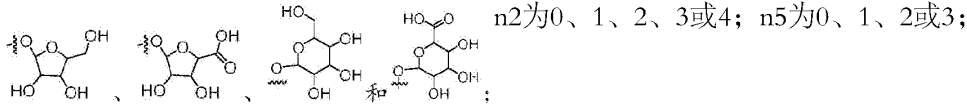
[0463] 在一些实施方案中，L₂选自-Gly-、-Val-Ala-、-Val-Cit-、-Glu-Val-Cit-和-Gly-Gly-Phe-Gly-。在一些实施方案中，L₂是-Gly-。在一些实施方案中，L₂选自-Val-Ala-、-Gly-Gly-Phe-Gly-、-Val-Cit-和-Glu-Val-Cit-。

[0464] 应当理解，L₂通过左侧氨基酸的氨基与L₁或Z连接，通过右侧氨基酸的羧基与L₃连接，这与下面的解释相一致。

[0465] 在一些实施方案中，L₃选自：

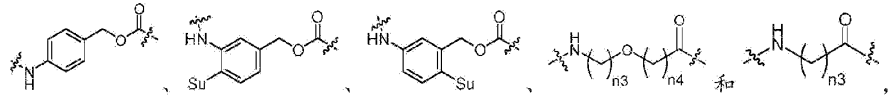


[0466] 其中R_{1c}各自独立地选自C₁₋₈烷基、C₁₋₈卤代烷基、C₁₋₈烷氧基、卤素、硝基和氰基；Su各自独立地选自



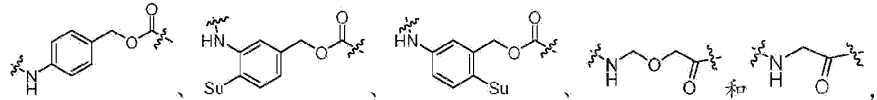
和n₃和n₄独立地为1、2、3、4、5或6。

[0467] 在一些实施方案中，L₃选自：



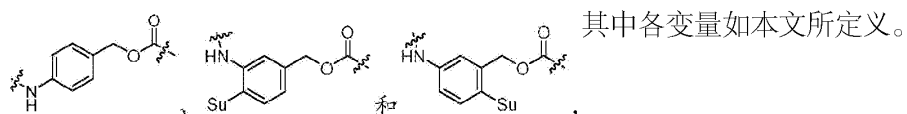
[0468] 其中各变量如本文所定义。

[0469] 在一些实施方案中，L₃选自：



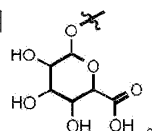
[0470] 其中各变量如本文所定义。

[0471] 在一些实施方案中，L₃选自：

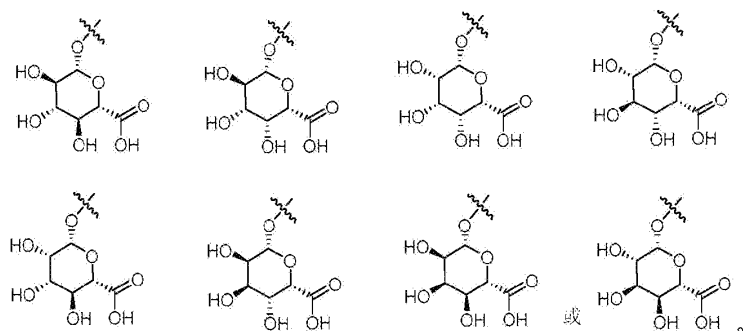


[0472] 在一些实施方案中，Su选自木糖、阿拉伯糖、木糖醛酸、阿拉伯糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸和甘露糖醛酸。

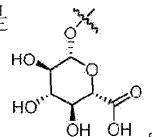
[0473] 在一些实施方案中，Su选自



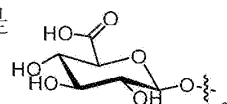
[0474] 在一些实施方案中，Su各自独立地是：



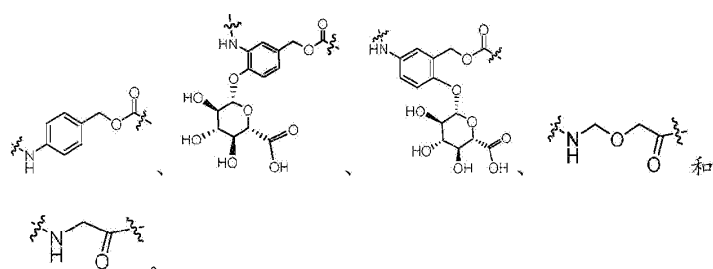
[0475] 在一些实施方案中，Su各自独立地是



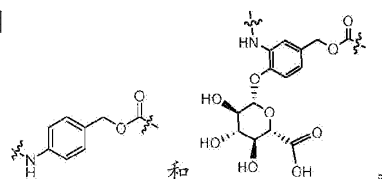
[0476] 在一些实施方案中，Su各自独立地是 在一些实施方案中，L₃



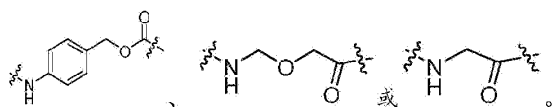
选自：



[0477] 在一些实施方案中， L_3 选自

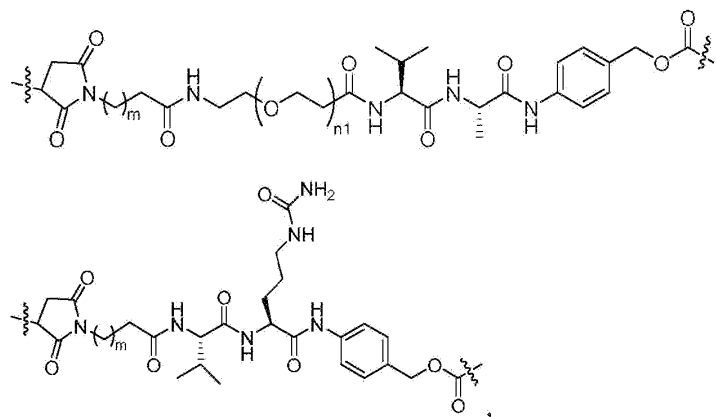


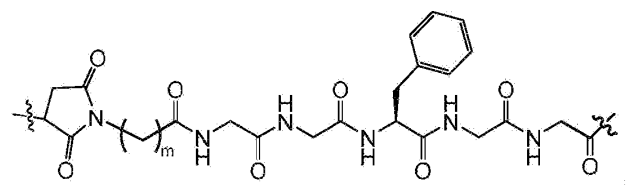
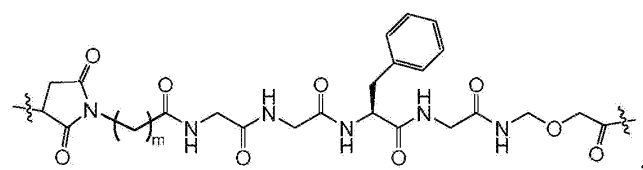
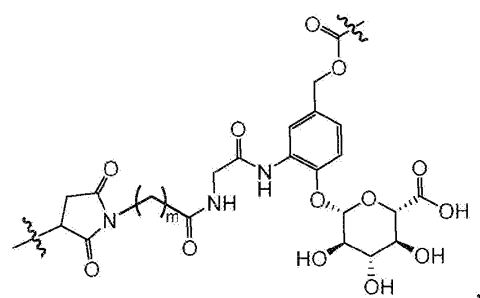
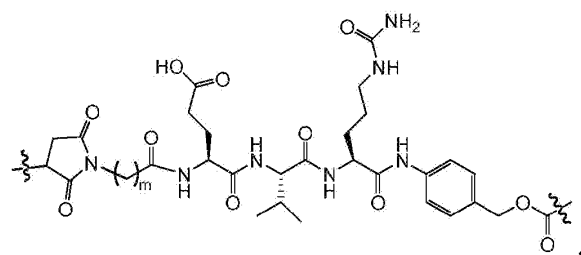
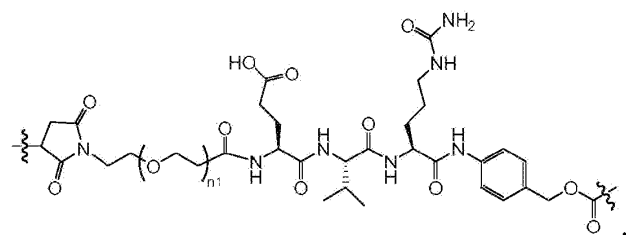
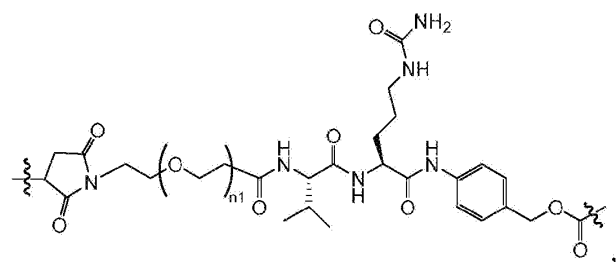
[0478] 在一些实施方案中， L_3 选自：

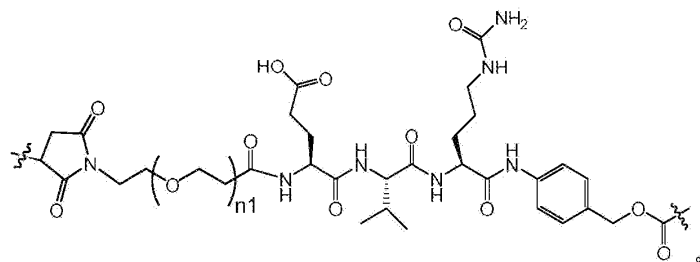
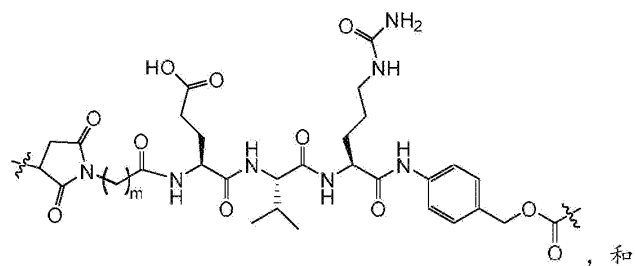


[0479] 应当理解， L_3 通过左侧的氨基与 L_2 连接，通过右侧的羰基与D连接，这与下面的解释相一致。

[0480] 在一些实施方案中， $-Z-L_1-L_2-L_3-$ 各自独立地选自如下结构：





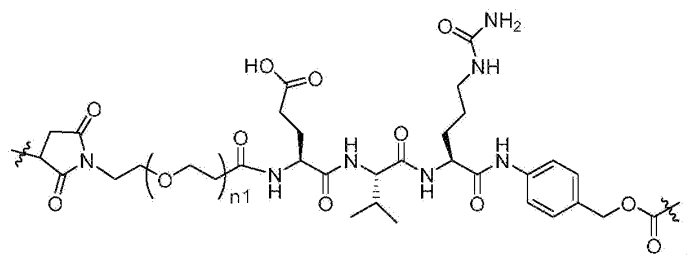
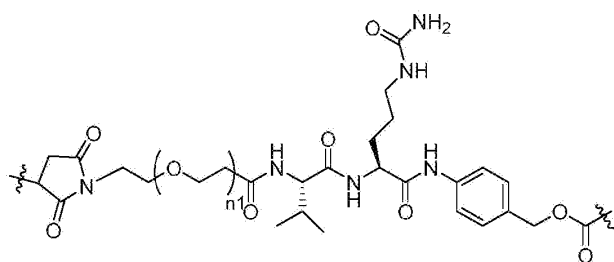
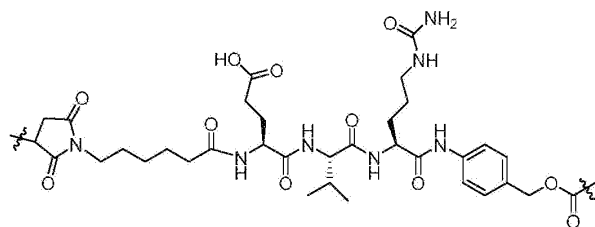
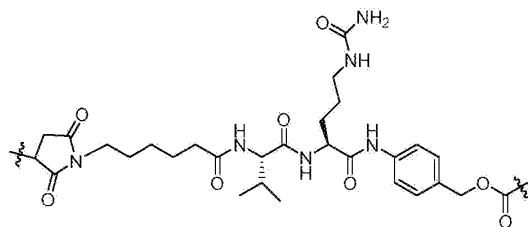
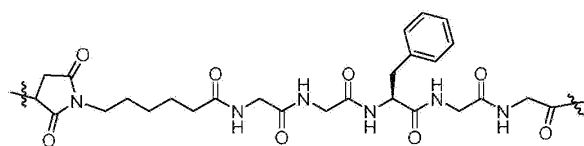
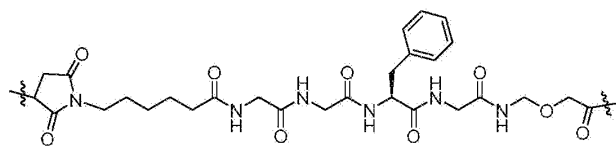
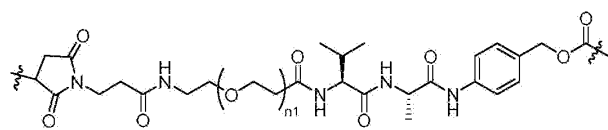


[0481] 其中，m各自独立地为选自1-10的整数，例如为1、2、3、4、5、6、7或8；

[0482] n1独立地为选自0-12的整数，例如1、2、3、4、5、6、7或8，优选为6或8；和

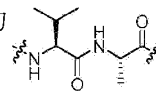
[0483] 其中，所述基团左侧与Ab上的S连接，右侧与D连接。

[0484] 在一些实施方案中，-Z-L₁-L₂-L₃-各自独立地选自如下结构



[0485] 其中 n_1 独立地为选自0-8的整数，例如1、2、3、4、5、6、7或8，优选为8。

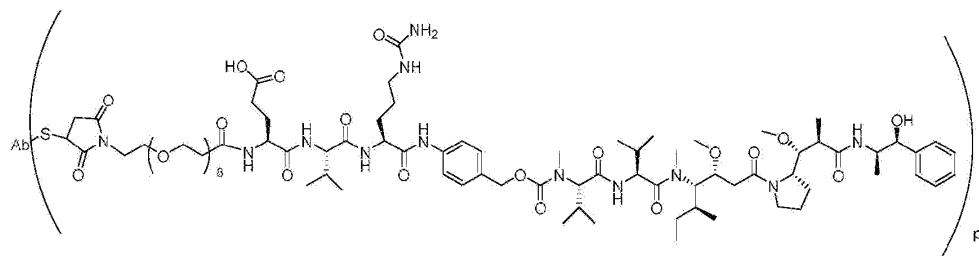
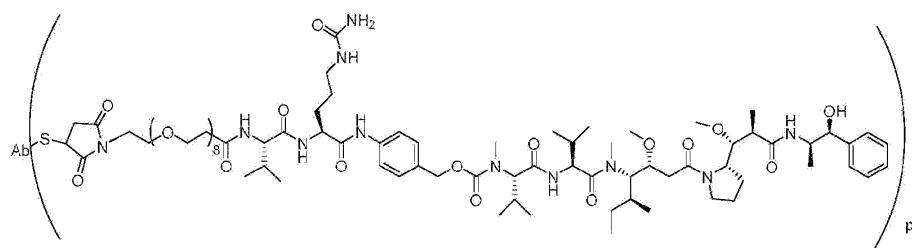
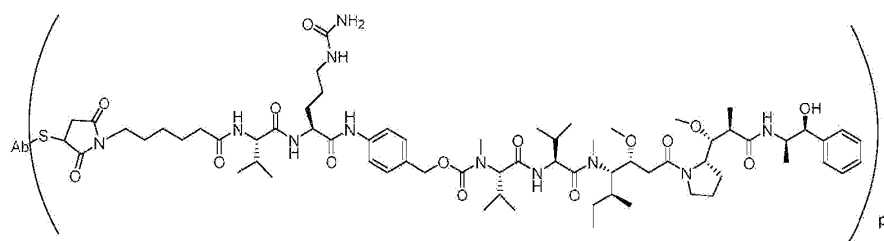
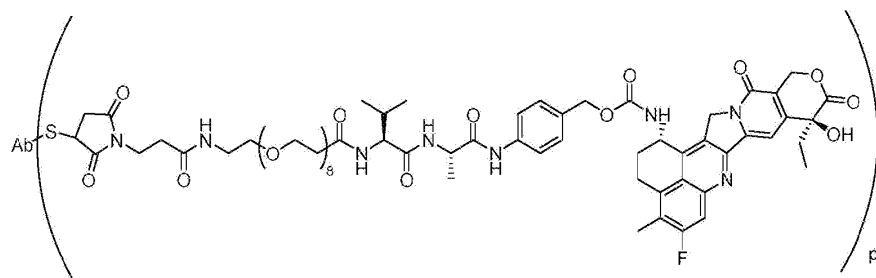
[0486] 应当理解，在没有特别说明且根据上下文不矛盾的情况下，对于本发明的ADCs，本文所示的二价基团的左侧的键与Ab或靠近Ab端的基团连接，所述二价基团的右侧的键与D或靠近D端的基团连接。例如，当 L_2 为

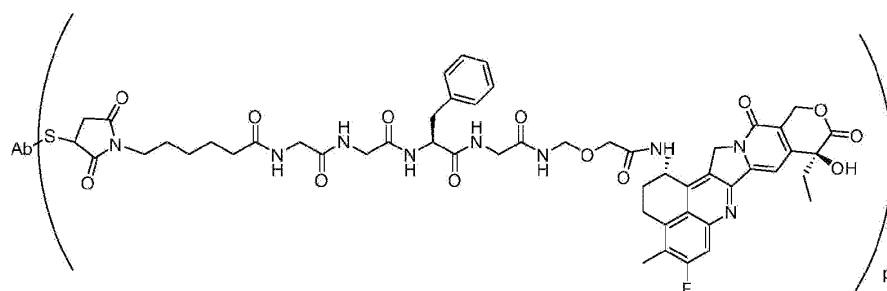
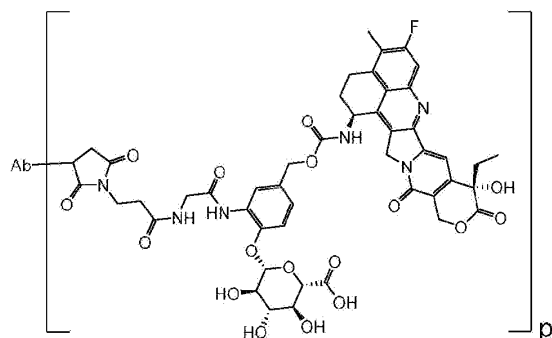
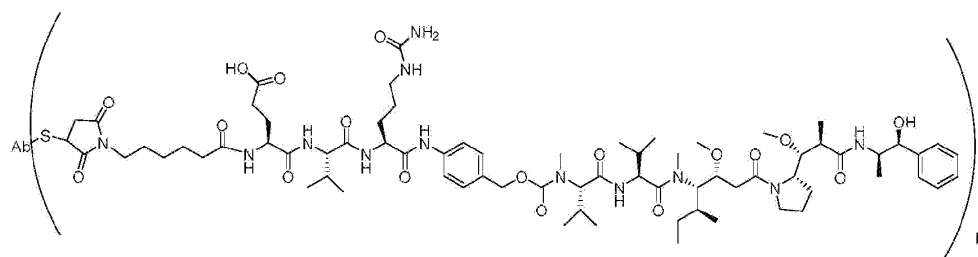


侧的氨基与 L_1 连接，右侧的羧基与 L_3 连接；

[0487] 在一些实施方案中，所述抗体-药物偶联物具有2-10、6-10、4-8、7-9或2-4或2-6的平均DAR。

[0488] 在一些实施方案中，所述抗体-药物偶联物选自





[0489] 其中Ab是本发明的结合分子，如多特异性抗体，优选V-17-Fc、V-20-Fc、V-23-Fc和V-26-Fc；p如上所定义，例如p是选自1至16的整数，例如选自1-10、1-9、2-8、4-10、6-8、3-7、4-6、2-6的整数，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。优选地，所述抗体-药物偶联物具有例如2-10、6-10、4-8、7-9或2-4或2-6的平均DAR。在一些实施方案中，所述多特异性抗体是根据本公开第三方面的多特异性抗体。在一些特别优选的实施方案中，所述多特异性抗体包含第一和第二多肽链的，其中：

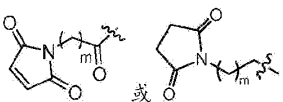
[0490] (i)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列、或由其组成；

- [0491] (ii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列、或由其组成；
- [0492] (iii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列、或由其组成。
- [0493] 应当理解，以上ADC中与Ab相连接的S原子来自于抗体Ab。Ab在还原剂例如TCEP作用下打开二硫键(例如链间二硫键)，生成巯基-SH，然后与连接子的末端官能团例如马来酰亚胺部分连接。在一些实施方案中，与Ab相连接的S原子来自于Ab的半胱氨酸。
- [0494] 需要说明，本公开的上述和其它技术方案及其中的一个或多个特征可以任意地进行组合，构成在本文中未直接描述的技术方案，这些未直接描述的技术方案也涵盖在本申请的公开范围内。
- [0495] 本发明的ADC分子的制备
- [0496] 本发明的另一个方面提供了一种应用本发明的抗体制备ADC的方法。本发明中的“ADC”被定义为通过连接子(L)偶联至具有生物学和/药学活性的活性物质(D，也可称为有效载荷)的抗体。所述方法包括将本发明的抗体(Ab)通过一个或多个连接子(L)(例如如本发明所定义)偶联至一个或多个的活性物质D上。优选地，连接子-活性物质位点特异性偶联至抗体。
- [0497] 在一些实施方案中，所述方法包括制备用于ADC的Ab，其包含在适合Ab或其链表达的条件下，培养包含编码所述Ab(例如任意一条多肽链和/或多条多肽链)的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述Ab。
- [0498] 在一些实施方案中，所述方法包括如下步骤：
- [0499] (a)将抗体Ab加入缓冲溶液中，加入还原剂，然后进行孵育；
- [0500] (b)向步骤(a)中的反应溶液中加入连接子-有效载荷进行偶联，获得粗产物；和
- [0501] (c)任选地将粗产物进行纯化得到本发明的抗体药物偶联物；
- [0502] 其中Ab如上所定义。
- [0503] 应当理解，所述连接子-有效载荷与Ab反应提供式I化合物中的-L-D部分，在-L-D清楚定义的情况下，根据现有技术，可以确定连接子-有效载荷的结构。

[0504] 在一些实施方案中，步骤a)的缓冲溶液为PBS缓冲液，优选地，其pH为5.0-9.0，例如6.0-8.0。

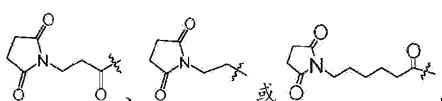
[0505] 在一些实施方案中，步骤a)的还原剂为TCEP。

[0506] 在一些实施方案中，连接子-有效载荷具有如下结构： $Z'-L_1-L_2-L_3-D$ ，其中 L_1 、 L_2 、 L_3 、 D 如上所定义， Z' 为

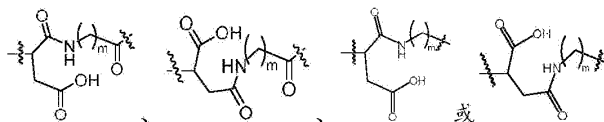


如为1、2、3、4、5、6、7或8。

[0507] 在一些实施方案中， Z' 选自



[0508] 在一些实施方案中，对于合成其中 Z 为



的ADC的方法，其还包含另外

的使马来酰亚胺开环的水解步骤。

[0509] 在一些实施方案中，所述步骤在实施例公开的特定反应条件下进行。

[0510] 应当指出的是，实施例公开的特定反应条件的范围或具体值浮动100%、80%、60%、40%、20%或10%得到的实施方案也在本发明的考虑中。

[0511] VI.本公开的第六方面：药物组合物和药物制剂以及组合产品和试剂盒

[0512] 在一些实施方案中，本公开提供了包含本文所述的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体或ADC的组合物，优选地组合物为药物组合物或药物制剂。在一个实施方案中，所述组合物还包含药用辅料。在一个实施方案中，所述组合物包含本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体或ADC，以及一种或多种其它治疗剂(例如，化学治疗药物、肿瘤疫苗、与肿瘤细胞上的其他特异性抗原结合的抗体、其他消耗肿瘤细胞的抗体)的组合。

[0513] 在一些实施方案中，本发明的组合物为药物组合物或药物制剂，其包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。如本文所用，“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸

收延迟剂等。适用于本发明的药用载体可以是无菌液体，如水和油，包括那些石油、动物、植物或合成来源的，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。

- [0514] 本发明的药物组合物或制剂还可以包含超过一种活性成分，所述活性成分是被治疗的特定适应症所需的，优选具有不会不利地彼此影响的互补活性的那些活性成分。在用于癌症的治疗时，此类活性成分包括但不限于抗癌剂和化疗剂；在用于感染性疾病的治疗时，此类活性成分包括但不限于抗病毒剂和抗生素。所述活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在。
- [0515] 在一些实施方案中，本公开还提供了组合产品，其包含至少一种本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体或ADC，或者还包含一种或多种其它抗肿瘤剂。
- [0516] 在一些实施方案中，所述组合产品中的两种或多种成分可以依次、分开或同时联合施用给受试者。
- [0517] 在一些实施方案中，本公开还提供了包含本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子、多特异性抗体、ADC、药物组合物或组合产品的试剂盒，以及任选的指导施用的包装插页。
- [0518] 在一些实施方案中，本公开还提供了包含本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子、多特异性抗体、ADC、药物组合物、组合产品的药物制品，任选地，所述药物制品还包括指导施用的包装插页。
- [0519] VII.本公开的第七方面：用途和方法
- [0520] 本文公开的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子、或包含它们的多特异性抗体具有体外和体内诊断用途以及治疗性用途。例如，可以将这些分子施用至体外或离体的培养细胞或施用至受试者，例如，人类受试者，以治疗和/或诊断EGFR抗原和/或cMet相关的疾病，例如癌症。
- [0521] 在一些实施方案中，本公开提供了体外或体内检测生物样品，例如血清、精液或尿或组织活检样品(例如，来自过度增生性或癌性病灶)中存在相关EGFR和/或cMet抗原的诊断方法。该诊断方法包括:(i)在允许相互作用发生的条件下使样品(和任选地，对照样品)与如本文所述的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体接触或向受试者施用所述ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子

或多特异性抗体和(ii)检测所述ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体和样品(和任选地,对照样品)之间复合物的形成。复合物的形成表示存在相关抗原,并且可以显示本文所述治疗的适用性或需求。

- [0522] 在一些实施方案中,在治疗之前,例如,在起始治疗之前或在治疗间隔后的某次治疗之前检测相关抗原。可以使用的检测方法包括免疫组织化学、免疫细胞化学、FACS、ELISA测定、PCR技术(例如,RT-PCR)或体内成像技术。一般地,体内和体外检测方法中所用ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体直接或间接地用可检测物质标记以促进检测结合的或未结合的复合物。合适的可检测物质包括多种生物学活性酶、辅基、荧光物质、发光物质、顺磁(例如,核磁共振活性)物质和放射性物质。
- [0523] 在一些实施方案中,体内确定相关抗原的水平和/或分布,例如,以非侵入方式确定(例如,通过使用合适的成像技术(例如,正电子发射断层摄影术(PET)扫描)检测可检测物标记的本发明ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体。在一个实施方案中,例如,通过检测用PET试剂(例如,¹⁸F-氟脱氧葡萄糖(FDG))以可检测方式标记的本发明ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体,体内测定相关抗原的水平和/或分布。
- [0524] 在一个实施方案中,本发明提供了包含本文所述ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体和使用说明书的诊断试剂盒。
- [0525] 在一些实施方案中,本公开涉及使用本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体或ADC体内用来治疗癌症,并在受试者中抑制表达EGFR和/或cMet的肿瘤的生长或转移,从而抑制或减少癌症的生长或转移。可以单独使用本发明的EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体或ADC。备选地,本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体或ADC可以与其他癌症治疗剂/预防剂组合施用。当本发明的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体或ADC与一种或多种其他药物组合施用时,这种组合可以按任何顺序施用或者同时施用。
- [0526] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或

多特异性抗体或ADC。在另一个实施方案中，本发明提供一种防止受试者中癌症耐药性出现的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体或ADC。

[0527] 在一些实施方案中，用ISVD、EGFR结合分子、cMet结合分子或多特异性抗体治疗的癌包括但不限于表达EGFR和/或cMet的癌，例如，肺癌(例如，肺鳞状细胞癌、肺腺癌、非小细胞肺癌)、乳腺癌(例如，三阴性乳腺癌)、结肠癌或咽鳞癌。

[0528] 描述以下实施例以辅助对本发明的理解。不意在且不当以任何方式将实施例解释成限制本发明的保护范围。

[0529] 实施例

[0530] 实施例1参考基准抗体以及参考基准抗体偶联药物的制备与纯化

[0531] 参考基准抗体JNJ-61186372是一种靶向EGFR和cMet的双特异性抗体，由抗EGFR半抗体与抗cMET半抗体组成。JNJ-61186372是基于专利WO2014081954A1中的SEQ ID NO:199-202序列和制备方法生成。

[0532] 参考基准抗体ABT-700是一种靶向cMet的单特异性IgG抗体，基于专利CN109562189B中的SEQ ID NO:86-87序列和所记载的方法制备生成。

[0533] 参考基准抗体RAA22/B09-57(本文中也称为BMK-AZD，或AZD Ab)是一种靶向EGFR和cMet的双特异性抗体，由抗EGFR半抗体与抗cMET半抗体组成，基于专利申请号US2023/0183358A1中的SEQ ID NO:59-62序列和所记载的方法制备生成。

[0534] 参考基准抗体偶联药物ABBV399是一种靶向cMet的单特异性抗体(ABT-700)偶联MMAE分子构成，可基于专利CN109562189B中的SEQ ID NO:86-87序列和偶联方法制备生成。

[0535] 参考基准抗体偶联药物AZD9592(本文中也称为AZD ADC)是一种靶向EGFR和cMet的双特异性抗体(RAA22/B09-57)偶联喜树碱类分子构成，可基于专利申请号US2023/0183358A1中的SEQ ID NO:59-62序列和偶联方法制备生成。

[0536] 实施例2分别与EGFR和cMet特异性地结合的ISVD的生成

[0537] 2.1羊驼免疫

- [0538] 使用重组his标签的人EGFR ECD蛋白(爱康得生物科技公司)和重组his标签的人cMet ECD蛋白(爱康得生物科技公司),作为目标抗原,用于羊驼免疫。免疫过程按如下进行。
- [0539] 选取健康成年羊驼(爱康得生物科技公司)2只,将0.5mg目标抗原(重组his标签的人EGFR ECD蛋白或重组his标签的人cMet ECD蛋白)与Gerbu佐剂(GERBU biochemicals GmbH)按1:1比例混匀,以颈部淋巴结皮下多点注射的方式免疫羊驼。首次免疫500 μ g,后续免疫250 μ g,共3-4剂,免疫间隔为18-21天。第二次免疫和第三次免疫后7天取羊驼的5ml颈静脉血用于ELISA血清效价检测。结果表明在三轮免疫后成功达到了采血建库的标准,安排采血建库。
- [0540] 2.2噬菌体展示库的构建和选择
- [0541] 如实施例2.1所述,将羊驼分别用EGFR或cMet第三次免疫后,各采集100ml羊驼颈静脉血,离心提取外周血单个核细胞(PBMC)。从PBMC中抽提总RNA,以RNA为模板,使用PrimeScript逆转录试剂盒(Takara公司)反转录方式生成cDNA。以cDNA为模板,第一轮PCR扩增产生常规IgG(VH)和缺乏CH1结构域的纯重链IgG(包含VHH作为ISVD)的核酸片段。在琼脂糖凝胶上分离这两类核酸,将包含VHH的编码核酸提取纯化后进行第二轮PCR扩增,获得只有VHH基因片段的核酸片段。将提取纯化后的VHH基因片段插入噬菌体载体(Phage Display vector)中,并电转化到大肠杆菌感受态细胞,将菌液在-80℃冻存。
- [0542] 复苏大肠杆菌ER2738菌液,并将复苏的菌液接种至100ml 2YT-A培养基(上海生工公司)中,加入辅助噬菌体(New England Biolabs)进行感染,用2×YT-AK培养基(上海生工公司)重悬菌体,37℃200rpm培养过夜。收集培养上清,采用PEG/NaCl沉淀方法制备重组噬菌体,分别制备了抗EGFR噬菌体展示库和抗cMet噬菌体展示库。使用生物素-人EGFR蛋白和生物素-人cMet蛋白对抗EGFR噬菌体展示库和抗cMet噬菌体展示库进行富集淘选,用于后续的ELISA法的阳性克隆挑选。
- [0543] 2.3 ELISA法挑选阳性克隆和测序
- [0544] 采用ELISA结合试验,检测实施例2.2中经富集淘选获得的大肠杆菌ER2738菌克隆的表达上清。检测过程按照如下进行。

- [0545] 取抗原(人EGFR-his抗原或人cMet-his抗原)用PBS缓冲液稀释至 $2\mu\text{g/mL}$ ，包被96孔ELISA板， 4°C 过夜。抗原包被板用PBST洗5遍，加入含5%脱脂牛奶的PBST封闭液，室温封闭1小时。PBST洗6遍，加入实施例2.2获得的大肠杆菌ER2738菌的表达上清， 37°C 振荡孵育1小时。PBST洗6遍，加入PBS稀释的抗M13-HRP第二抗体(爱康得生物科技(苏州)有限公司)， 37°C 震荡45分钟。PBST洗5遍，加入TMB显色液，避光显色5-15分钟。再加入终止液。酶标仪读数，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}-\text{OD}_{650\text{nm}}$ 吸光值。选取读值大于1的细菌克隆送Sanger测序。选取含有对应阳性VHH序列的ER2738菌单克隆加入甘油，冻于 -80°C 冰箱。
- [0546] 2.4 VHH-HIS和VHH-FC的生产
- [0547] 分别从抗EGFR阳性克隆和抗cMET阳性克隆，通过PCR，获得阳性抗EGFR VHH序列和阳性抗cMET VHH序列，并在其C端添加标签(C端添加6xHis标签或添加Fc标签：hIgG1同种型)，之后分别插入到表达载体pcDNA3.4中，瞬时转染HEK-293F细胞(下文也简称为“293F细胞”)，收集上清液。6xHis标签的蛋白使用Ni柱初步纯化后，使用离子交换柱对蛋白进一步精纯；hFc融合蛋白使用Protein A柱纯化。用SDS-PAGE和SEC-HPLC法测定VHH抗体的纯度。由此获得抗EGFR的两种标签VHH：抗EGFR VHH-his和抗EGFR VHH-Fc；以及抗cMet的两种标签VHH：抗cMet VHH-his和抗cMet VHH-Fc。
- [0548] 2.5 FACS法检测抗体与靶细胞的结合
- [0549] 通过FACS检测在瞬时转染的HEK-293F的上清液中表达的抗体与靶细胞的结合。
- [0550] 具体地，分别收集实施例2.4的通过瞬时转染HEK-293F获得的抗EGFR上清液 $100\mu\text{L}$ ；以及抗cMet上清液 $100\mu\text{L}$ ，作为待测样品。通过FACS检测抗EGFR上清液分别与靶细胞CHO-S-EGFR细胞或CHO-S细胞的结合；以及通过FACS检测抗cMet上清液分别与靶细胞CHO-S-cMet细胞或CHO-S细胞的结合。CHO-S-EGFR细胞是表达人EGFR的CHO-S工程细胞系的简称。CHO-S-cMet细胞是表达人cMet的CHO-S工程细胞系的简称。
- [0551] FACS检测按如下进行。以 3×10^5 个细胞/孔的密度铺96孔板，并在 4°C 以 300g 离心5分钟。将待测上清液($100\mu\text{L}$ /孔)加入并孵育一小时。加入第二抗体PE-抗人Ig

G(invitrogen,Cat#:12-4998-82)在4℃孵育半小时后,用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的平均荧光强度(MFI),并用FlowJo进行分析。结果表明,初筛的23个抗EGFR VHH与靶细胞CHO-S-EGFR均有不同程度的结合。初筛的18个抗cMet VHH与靶细胞CHO-S-cMet均有不同程度的结合。抗EGFR上清液和抗cMet上清液与CHO-S细胞几乎没有结合。

- [0552] 实施例3作为ISVD的各VHH的体外生物学活性检测
- [0553] 3.1 FACS检测VHH与细胞的结合
- [0554] 通过FACS检测实施例2制备的Fc标签的抗EGFR VHH和Fc标签的抗cMet VHH与靶细胞的结合。在抗EGFR VHH测定中,使用的靶细胞为表达EGFR的肿瘤细胞NCI-H1975(人肺腺癌细胞系);在抗cMet VHH的测定中,使用的靶细胞为表达cMet的肿瘤细胞EBC-1(人肺鳞癌细胞系)。按如下进行FACS检测。
- [0555] 靶细胞以 1.5×10^5 个细胞/孔的密度铺96孔板,并在4℃以300g离心5分钟。加入抗EGFR VHH-Fc(375nM,3倍梯度稀释)或抗cMet VHH-Fc(50nM,4倍梯度稀释)重悬,并在4℃孵育1小时。加入第二抗体PE-抗人IgG(cBioscience, cat#:12-4998-82)在4℃孵育半小时,用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。
- [0556] 抗EGFR VHH-Fc的检测结果如图1显示。作为抗EGFR VHH候选物的V-n5B10、V-n9B8、V-n10A1以剂量依赖方式与靶细胞结合,其结合活性低于对照抗体。在后续以及本文的其他部分,有时为了方便描述,V-n5B10、V-n9B8和V-n10A1的抗EGFR VHH也分别简称为5B10、9B8和10A1。
- [0557] 抗cMet VHH-Fc的检测结果如图2所示。作为抗cMet VHH候选物的V-n7A12、V-n9A2、V-n9A10以剂量依赖方式与靶细胞结合。在后续以及本文的其他部分,有时为了方便描述,V-n7A12、V-n9A2和V-n9A10的抗cMET VHH也分别简称为7A12、9A2和9A10。
- [0558] 3.2测定抗cMet VHH-Fc对于配体HGF与靶细胞EBC-1结合的阻断作用
- [0559] 将靶细胞EBC-1细胞以 1.5×10^5 个细胞/孔的密度铺96孔板,并在4℃以300g离心5分钟。加入配体50 μL HGF-His(1 μg/mL)(北京百普塞斯科技股份有限公司)孵育1小时,然后加入50 μL抗cMet VHH-Fc V-n7A12、V-n9A2或V-n9A10(10

0nM,5倍梯度稀释),混合后孵育1小时。加入第二抗体iF647-抗his(金斯瑞)在4℃孵育半小时,用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。

[0560] 结果如图3所示,V-n7A12、V-n9A2和V-n9A10阻断EBC-1细胞与配体HGF结合,其最高浓度下的MFI值分别为:40640、82172以及77193。最高浓度与最低浓度下的MFI比值分别为:2.22,1.12和1.14。如上结果表明:候选分子V-n7A12以剂量依赖方式阻断EBC-1细胞与配体HGF的结合。V-n9A2、V-n9A10弱阻断EBC-1细胞与配体HGF的结合。

[0561] 3.3表位鉴定

[0562] 通过表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance,简称SPR)技术检测抗cMet VHH-Fc形式的V-n7A12、V-n9A2抗体与抗原cMet结合的表位是否相同。

[0563] 用CM5传感器芯片(Cytiva)将V-n9A2抗体固定。将人cMet抗原(300nM)以50 μL/分钟的流速注射到感应芯片上,结合阶段200秒。然后,将抗cMet抗体V-n7A12以50 μL/分钟的流速注射到感应芯片上,结合阶段120秒。

[0564] 结果如图4所示,V-n9A2与人cMet抗原结合,且不影响V-n7A12与人cMet抗原的结合。这说明,抗cMet抗体V-n7A12、V-n9A2结合抗原cMet上的不同表位。

[0565] 3.4 FACS检测细胞对各VHH-Fc的内吞

[0566] 用FACS方法检测肿瘤靶细胞对实施例2制备的抗EGFR VHH-Fc和抗cMet VHH-Fc的内化能力。

[0567] 准备肿瘤靶细胞NCI-H1975和EBC-1,每孔细胞数为 $1 \sim 1.5 \times 10^5$ 个细胞,铺在96孔板上。分别加入实施例2制备的抗EGFR VHH-Fc(125nM,3倍稀释)或抗cMet VHH-Fc(50nM,4倍稀释),4℃孵育30min,离心去掉含有各VHH-Fc的上清。将细胞平均分为2组,分别于4℃和37℃孵育4小时,孵育结束后,立刻加入冰浴的PBS终止内吞实验。加入第二抗体PE-抗人IgG(eBioscience,货号:12-4998-82)在4℃孵育30min后,用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。

[0568] 使用下式计算细胞表面结合抗体的内化水平:

[0569] 内吞=4℃孵育样本的MFI-37℃孵育样本的MFI。

[0570] 内吞率%= $100\% - (37^\circ\text{C} \text{ 孵育样本的MFI} / 4^\circ\text{C} \text{ 孵育样本的MFI}) \times 100\%$ 。

[0571] 肿瘤靶细胞NCI-H1975对于作为抗EGFR抗体的候选分子的内吞结果如图5A所示，其中显示了测试抗体浓度下4℃孵育样本的MFI和37℃孵育样本的MFI。肿瘤靶细胞EBC-1对于作为抗cMet抗体的候选分子的内吞如图5B所示，其中显示了测试抗体浓度下根据上述公式确定的内吞MFI。

[0572] 3.5 ELISA检测各VHH-Fc与不同种属抗原的交叉反应性

[0573] 取人cMet-His抗原或食蟹猴cMet-His抗原用PBS缓冲液稀释至1 μg/mL，包被96孔ELISA板，4℃过夜。抗原包被板用PBST(300 μL/孔)洗3遍，加入含5%脱脂牛奶的PBS至200 μL/孔，37℃振荡封闭2小时。PBST洗3遍，加入按5倍比例梯度稀释的各抗cMet VHH-Fc，37℃振荡孵育1小时。PBST洗3遍，加入PBS稀释的抗人Fc-HRP第二抗体(Abcam,CAT#: ab97225)，以100uL/孔的体积加入各孔，后于37℃震荡孵育45分钟。然后PBST(300 μL/孔)洗3遍，以100uL/孔加入TMB显色液至孔中，避光显色5-10分钟。再加入终止液，终止液体积为50uL/孔。酶标仪读数，测定OD_{450nm}-OD_{650nm}吸光值。ELISA检测结果如图6和表1所示。

[0574] 表1.ELISA检测抗cMet抗体与人cMet抗原或猴cMet抗原的结合

抗原	抗 cMet 抗体的 EC ₅₀ (nM)		
	V-n7A12	V-n9A2	V-n9A10
人 cMet	0.066	0.108	-
食蟹猴 cMet	0.063	0.105	-

备注：“-”表示无法拟合出EC₅₀值。

[0575] 结果表明，抗cMet候选分子V-n7A12和V-n9A2与人cMet抗原和食蟹猴cMet抗原显示出交叉反应，且对人和猴cMet表现出类似的结合亲和力。但是V-n9A10与人cMet抗原的亲和力相比与猴cMet抗原的亲和力差异较大。

[0576] 实施例4.VHH序列优化和表征

[0577] 4.1 VHH序列优化

[0578] 使用“最佳匹配法”将实施例2制备的原始VHH序列进行人源化。利用人种系V基因数据库对VHH框架区的氨基酸序列进行比对分析，选出最佳种系序列。利用Kabat CDR定义，用VHH CDR序列代替最佳匹配的人类CDR序列，生成人源化VHH序列。回复突变框架区的多个残基，并根据情况，进行翻译后修饰(Post-translational modification,PTM)去除。反向翻译优化序列，送由金唯智(中国上海)

基因合成。然后构建至pcDNA 3.4表达载体中，以表达C端融合人His标签的单价人源化VHHs。由此获得人源化VHH克隆蛋白。

[0579] 对人源化以及PTM去除后的VHH序列进行免疫原性分析。若序列具有高风险，对序列的TCE(T细胞表位)表位进行氨基酸突变，以消除或者降低免疫原性风险。将突变的序列送由金唯智(中国上海)基因合成，然后构建至pcDNA 3.4表达载体中，以表达C端融合His标签的VHHs。由此获得低免疫原性风险的VHH克隆蛋白。

[0580] 抗EGFR VHH的序列优化

[0581] 下表2A至2C中显示了各母本抗EGFR抗体及其优化序列。

[0582] 表2A.抗EGFR VHH-10A1抗体及其优化序列

抗体名	母本序列
V-n10A1	SEQ ID NO: 11
抗体名	人源化
zn10A1.m5	SEQ ID NO: 105
zn10A1.m6	SEQ ID NO: 106
抗体名	PTM 去除
pn10A1.m1	SEQ ID NO: 107
pn10A1.m2	SEQ ID NO: 108
pn10A1.m3	SEQ ID NO: 109
pn10A1.m4	SEQ ID NO: 110
pn10A1.m5	SEQ ID NO: 111
pn10A1.m6	SEQ ID NO: 112
抗体名	人源化+PTM 去除
pzn10A1_m6m5	SEQ ID NO: 113
ppzn10A1_m6m5.m1	SEQ ID NO: 114
ppzn10A1_m6m5.m3 (也称为 hu10A1 ^b)	SEQ ID NO: 84
dppzn10A1_m6m5.m3_1.m2 (也称为 hu10A1)	SEQ ID NO: 36

[0583] 表2B.抗EGFR VHH 9B8抗体及其优化序列

抗体名	母本序列
V-n9B8	SEQ ID NO: 6
抗体名	人源化
zn9B8.m2	SEQ ID NO: 100
zn9B8.m4	SEQ ID NO: 101
抗体名	人源化+PTM 去除
pzn9B8.m2.m11 (也称为 hu9B8)	SEQ ID NO: 32
pzn9B8.m2.m12	SEQ ID NO: 102

[0584] 表2C.抗EGFR VHH 5B10抗体及其优化序列

抗体名	母本序列
V-n5B10	SEQ ID NO: 1
抗体名	人源化
zn5B10.m16	SEQ ID NO: 94
zn5B10.m17	SEQ ID NO: 95
zn5B10.m18	SEQ ID NO: 96
zn5B10.m20	SEQ ID NO: 31

(也称为 hu5B10)	
zn5B10.m21	SEQ ID NO: 97
zn5B10.m22	SEQ ID NO: 98
zn5B10.m23	SEQ ID NO: 99

[0585] 抗cMET VHH的序列优化

[0586] 下表2D至2E中显示了各母本抗cMet抗体及其优化序列。

[0587] 表2D抗cMet VHH 9A2抗体及其优化序列

抗体名	母本序列
V-n9A2	SEQ ID NO: 21
抗体名	人源化
VHH8	SEQ ID NO: 134
VHH9	SEQ ID NO: 135
VHH10 (也称为 hu9A2)	SEQ ID NO: 42
VHH11	SEQ ID NO: 136

[0588] 表2E.抗cMet VHH 7A12抗体及其优化序列

抗体名	母本序列
V-n7A12	SEQ ID NO: 16
抗体名	人源化
7A12-M1	SEQ ID NO: 121
7A12-M2	SEQ ID NO: 122
7A12-M3	SEQ ID NO: 123
7A12-M4	SEQ ID NO: 124
抗体名	PTM 去除
pn7A12.N32X.m1	SEQ ID NO: 125
pn7A12.N32X.m3	SEQ ID NO: 126
pn7A12.N32X.m4	SEQ ID NO: 127
pn7A12.N32X.m6	SEQ ID NO: 128
抗体名	人源化+PTM 去除
pzn7A12m4.m1 (也称为 hu7A12 ^b)	SEQ ID NO: 40
抗体名	人源化+PTM 去除+一次免疫原性去除
dpzn7A12m4.m1_1	SEQ ID NO: 129
dpzn7A12m4.m1_3	SEQ ID NO: 130
抗体名	人源化+PTM 去除+二次免疫原性去除+
dpzn7A12m4.m1_1.m1 (也称为 hu7A12)	SEQ ID NO: 39

- [0589] 4.2优化抗体的功能表征
- [0590] 使用FACS结合试验，检测了各抗EGFR VHH-His候选抗体分子V-n10A1、V-n9B8和V-n5B10以及抗cMet VHH-His候选分子V-n9A2和V-n7A12以及其相对应的各序列优化改造后的分子，与靶细胞MDA-MB-468(三阴性乳腺癌细胞系)、EBC-1细胞(人非小细胞肺癌细胞系)、MKN45细胞系(人胃癌细胞系)或者过表达EGFR或cMet的CHOK1细胞的结合。试验按如下进行。
- [0591] 以 1.5×10^5 个细胞/孔的密度将靶细胞铺96孔板，并在4℃以300g离心5分钟。加入待测抗体VHH-His或参照抗体重悬，并在4℃孵育1小时。加入第二抗体iF647-anti-his(Genscript, 1:1000稀释, 货号: A01802-100)或者APC-anti-his(BioLegend, 1: 200, 货号: 362605), 在4℃孵育半小时或者45分钟，用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。

- [0592] 1)抗EGFR抗体的序列优化改造
- [0593] 母本抗体V-n10A1、V-n9B8、V-n5B10进行序列优化改造后，通过FACS结合试验，检测各优化后的抗EGFR抗体与靶细胞的结合活性，其结果如表3A和3B所示。
- [0594] 表3A.各人源化抗EGFR抗体与靶细胞的结合活性

抗体名称	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值	靶细胞
V-n10A1	-	5829	MDA-MB-468
zn10A1.m5	-	3485	
zn10A1.m6	-	9675	
V-n9B8	2.04	94621	
zn9B8.m2	2.49	95829	
zn9B8.m4	1.43	57113	
V-n5B10	15.03	110773.6	
zn5B10.m16	3.132	76781.3	
zn5B10.m17	23.16	93566.7	
zn5B10.m18	1.303	71122.4	
zn5B10.m20	0.2192	59191.5	
zn5B10.m21	0.429	58747	
zn5B10.m22	1.149	86869.5	
zn5B10.m23	1.936	74208.6	

备注：“-”表示无法拟合出EC₅₀值。

- [0595] 表3B.PTM去除序列优化后的各抗EGFR抗体与靶细胞的结合活性

抗体名称	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值	靶细胞
V-n10A1 第一轮 PTM 去除序列优化			
V-n10A1	-	5157	MDA-MB-468
pn10A1.m1	-	10255.7	
pn10A1.m2	-	3773.5	
pn10A1.m3	-	5477.6	
pn10A1.m4	-	5265	
pn10A1.m5	-	27433.9	
pn10A1.m6	-	5787	
V-n10A1 第二轮 PTM 去除序列优化			
V-n10A1		2759	CHOK1-huEGFR 细胞
pzn10A1_m6m5	-	3573	
ppzn10A1_m6m5.m1	-	2470	
ppzn10A1_m6m5.m3	-	4767	
zn9B8.m2 PTM 去除序列优化			
zn9B8.m2	3.940	84343	CHOK1-huEGFR 细胞
pzn9B8.m2.m11	3.39	80145	
pzn9B8.m2.m12	4.963	85741	

备注：“-”表示无法拟合出EC₅₀值。

- [0596] 2)抗cMet抗体的序列优化改造：

[0597] 母本抗体V-n7A12和V-n9A2进行序列优化改造后，通过FACS结合试验，检测各优化后的抗cMet抗体与靶细胞的结合活性，其结果如下表3C至3F所示。

[0598] 表3C.各人源化抗cMet抗体与靶细胞的结合活性

抗体名称	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值	靶细胞
V-n9A2	1.564	290877.6	EBC-1 细胞
VHH8	2.505	143281	
VHH9	1.626	193984.2	
VHH10	1.632	233386.4	
VHH11	2.107	150778.6	
V-n7A12	3.759	35568.6	MKN45 细胞
7A12-M1	88.1	56591.3	
7A12-M2	-	36691.1	
7A12-M3	-	57350.4	
7A12-M4	4.112	44671.9	

备注：“-”表示无法拟合出EC₅₀值。

[0599] 表3D.PTM去除序列优化后的各抗cMet抗体与靶细胞的结合活性

抗体名称	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值	靶细胞
V-n7A12	3.759	35568.6	MKN45 细胞
pn7A12.N32X.m1	5.098	40412.3	
pn7A12.N32X.m3	4.157	49561.8	
pn7A12.N32X.m4	4.965	38029.9	
pn7A12.N32X.m6	4.454	44729.5	

[0600] 表3E.第一次免疫原性去除的抗cMet抗体与靶细胞的结合活性

抗体名称	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值	靶细胞
V-n7A12	1.008	74188	CHOK1-hucMet 细胞
dpzn7A12m4.m1_1	0.7158	73854	
dpzn7A12m4.m1_3	0.8094	63423	

[0601] 表3F.第二次免疫原性去除的抗cMet抗体与靶细胞的结合活性

抗体名称	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值	靶细胞
V-n7A12	1.937	145845	CHOK1-hucMet 细胞
dpzn7A12m4.m1_1.m1	2.098	135258	

[0602] 4.4抗cMet VHH和抗EGFR VHH的SPR检测

[0603] 使用SPR方法，表征抗cMet VHH和抗EGFR VHH对靶抗原的结合亲和力。

[0604] 对于VHH_His标签的单价抗体，按如下方法一进行检测。将10ug/ml的抗原(不同种属的EGFR抗原或者cMet抗原)固定在CM5的芯片上，然后以30 μ L/分钟的流速注入各待测抗体(抗体进行浓度梯度稀释)，设置结合时间为120s，解离时间

为200s。解离结束以后，用10mM甘氨酸(pH 2.0)进行再生。试验数据将用1：1结合的模型进行分析。结果见下表4A。

[0605] 对于VHH_Fc标签的二价抗体，按如下方法二进行检测。用Protein A芯片捕获各待测抗体(浓度为10ug/ml)，然后以30 μ L/分钟的流速注入抗原(不同种属的EGFR抗原或者cMet抗原)，设置结合时间为120s，解离时间为200s。解离结束以后，用10mM甘氨酸(pH 2.0)进行再生。试验数据将用1：1结合的模型进行分析。结果见下表4B。

[0606] 表4A.VHH_His标签的单价抗cMet抗体和抗EGFR抗体的SPR数据

抗体名称	抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
V-n5B10	Human EGFR	2.32E+05	5.36E-03	2.32E-08
V-n5B10	Cyno EGFR	5.22E+05	3.84E-03	7.36E-09
V-n10A1	Human EGFR	6.91E+05	2.58E-02	3.74E-08
V-n10A1	Cyno EGFR	5.81E+05	1.00E-02	1.72E-08
V-n7A12	Human cMet	5.09E+05	1.53E-04	3.01E-10
V-n7A12	Cyno cMet	4.58E+04	4.39E-03	9.60E-08
V-n9A2	Human cMet	1.81E+05	2.90E-03	1.60E-08
V-n9A2	Cyno cMet	1.02E+05	7.20E-03	7.03E-08
ABT700	Human cMet	1.08E+05	7.38E-05	6.81E-10
ABT700	Cyno cMet	1.22E+05	7.14E-05	5.84E-10
BMK-AZD	Human EGFR	1.90E+05	3.10E-03	1.63E-08
BMK-AZD	Cyno EGFR	5.91E+05	2.63E-02	4.45E-08
BMK-AZD	Human cMet	2.88E+05	6.23E-04	2.16E-09
BMK-AZD	Cyno cMet	3.58E+05	1.15E-03	3.22E-09

注：表中所有测试的V-n系列抗体均为C端带His标签的VHH的单价形式，采用方法一检测；表中的对照抗体采用方法二检测。

[0607] 表4B：VHH_Fc标签的二价抗EGFR抗体的SPR数据:

抗体名称	抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
V-F42 (hu9B8_Fc) ₂	Human EGFR	3.30E+04	3.92E-04	1.19E-08
V-F42	Cyno EGFR	3.92E+04	8.04E-05	2.05E-09

注：表中所有抗体均为C端带Fc标签的VHH的二聚体形式，采用方法二检测。

- [0608] 实施例5.抗cMet双表位抗体构建和表征
- [0609] 5.1构建和制备抗cMet双表位抗体
- [0610] 本发明抗cMet的双表位的M-1分子为不对称的双链形式，分别具有SEQ ID NO:88所示的第一多肽链(9A2-Fc链)和SEQ ID NO:89所示的第二多肽链(hu7A12^b-Fc链)。
- [0611] 本发明抗cMet单表位的M-2分子为对称的双链形式，其具有SEQ ID NO:90所示的第一多肽链和第二多肽链(9A2-Fc链)。
- [0612] 本发明抗cMet单表位的M-3分子为对称的双链形式，其具有SEQ ID NO:91所示的第一多肽链和第二多肽链(hu7A12^b-Fc链)。
- [0613] 将上述M-1、M-2、M-3的第一/第二多肽链构建至pcDNA 3.4表达载体中(如果抗体为对称结构则生成一种载体；如果抗体为不对称结构，则生成分别包含第一和第二多肽链编码基因的两种载体)，转染至HEK293F细胞中。培养细胞3天，并收集转染细胞的培养上清液，装入Protein A柱(MabSelect Prisma, Cytiva)用于纯化。抗体用醋酸-醋酸钠溶液(pH3.5)洗脱，然后立即用2M Tris中和。用Nano Drop测量抗体浓度。用SDS-PAGE和分析HPLC-SEC测定蛋白纯度。
- [0614] 5.2 FACS检测双表位抗体对靶细胞的结合
- [0615] 通过FACS检测肿瘤靶细胞EBC-1对抗cMet分子的结合。
- [0616] 准备肿瘤靶细胞EBC-1，每孔细胞数为1.5 × 10⁵个细胞，铺在96孔板上。分别加入抗cMet M-1，M-2，M-3分子(50nM,4倍稀释)，4℃孵育1小时，离心去掉含有各VHH-Fc的上清。加入第二抗体PE-抗人IgG(eBioscience，目录号12-4998-82)在4℃孵育30min后，用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。

- [0617] 结果如图7显示,结果表明:对比抗cMet单表位的M-2和M-3分子,肿瘤靶细胞EBC-1对于抗cMet双表位M-1分子具有更强的结合,且双表位分子对细胞的结合活性也优于对照组ABT700。
- [0618] 5.3 FACS检测双表位抗体的协同内吞作用
- [0619] 用FACS方法检测抗cMet双表位分子M-1的协同内吞作用。
- [0620] 准备肿瘤靶细胞EBC-1,每孔细胞数为 1.5×10^5 个细胞,铺在96孔板上。分别加入抗cMet M-1, M-2, M-3分子(50nM,4倍稀释),4℃孵育30min,离心去掉含有各VHH-Fc的上清。将细胞平均分为2组,分别于4℃和37℃孵育4小时,孵育结束后,立刻加入冰浴的PBS终止内吞实验。随后加入第二抗体PE-抗人IgG(e Bioscience, 目录号12-4998-82)在4℃孵育30min后,用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。
- [0621] 使用下式计算细胞表面结合抗体的内化水平:
- [0622] 内吞=4℃孵育样本的MFI-37℃孵育样本的MFI。
- [0623] 如图8实验结果所示,上述试验结果表明:肿瘤靶细胞EBC-1对于作为抗cMet双表位M-1分子具有较高的内吞(对比抗cMet单表位的M-2, M-3分子),且抗cMet双表位M-1分子较ABT700具有更好的内吞效果。
- [0624] 实施例6多特异性抗EGFR/CMet抗体分子的生成和检测
- [0625] 6.1多特异性抗EGFR/CMet抗体分子的生成
- [0626] 根据上述实施例1-实施例5的分析检测结果,将抗EGFR的VHH和抗cMet的VHH组合到一起,形成单链或多链多特异性抗体。
- [0627] 单链多特异性抗体
- [0628] 将抗EGFR的VHH序列和抗cMet的VHH序列组合为单链的抗体形式。具体而言,将一个抗EGFR的VHH序列(V-n5B10、V-n9B8、V-n10A1)或其人源化VHH序列和两个抗cMet的相同或不同表位的VHH序列(V-n7A12、V-n9A2)或其人源化VHH序列组合,形成特异性抗EGFR/cMet抗体分子。其中,在抗EGFR VHH的C端加入一段GGGGS肽接头(SEQ ID NO:43),然后是一段抗cMet VHH(第一抗cMet ISVD),再加入一段GGGSGGGGS肽接头(SEQ ID NO:44),再加入另一

段抗cMet VHH(第二抗cMet ISVD)。由此方法组合形成的示例性多特异性抗体分子及其氨基酸序列如表5所示。

[0629] 表5：示例性单链多特异性抗体分子

抗体名称	抗体的拼接方式	序列号
V-1	5B10-9A2-7A12	SEQ ID NO: 51
V-3	5B10-7A12-9A2	SEQ ID NO: 52
V-7	9B8-9A2-7A12	SEQ ID NO: 53
V-9	9B8-7A12-9A2	SEQ ID NO: 54
V-13	10A1-9A2-7A12	SEQ ID NO: 55
V-15	10A1-7A12-9A2	SEQ ID NO: 56
V-16	hu10A1-hu7A12-9A2	SEQ ID NO: 57
V-17	hu10A1-hu7A12-hu9A2	SEQ ID NO: 58
V-18	hu10A1- hu7A12-hu7A12	SEQ ID NO: 59
V-19	hu10A1- hu9A2-hu9A2	SEQ ID NO: 60
V-20	hu5B10-hu7A12-hu9A2	SEQ ID NO: 61
V-21	hu5B10-hu7A12-hu7A12	SEQ ID NO: 62
V-22	hu5B10-hu9A2-hu9A2	SEQ ID NO: 63
V-23	hu9B8-hu7A12-hu9A2	SEQ ID NO: 64
V-24	hu9B8-hu7A12-hu7A12	SEQ ID NO: 65
V-25	hu9B8-hu9A2-hu9A2	SEQ ID NO: 66

注：表5将作为抗EGFR VHH的V-n5B10、V-n9B8、V-n10A1分别简称为5B10、9B8、10A1；将作为抗cMet VHH的V-n7A12、V-n9A2、V-n9A10分别简称为7A12、9A2、9A10。

[0630] 任选地，将所述特异性抗体分子连接结合人血清白蛋白的ISVD，如Alb8，以延长特异性抗EGFR/cMet抗体分子的半衰期。例如，将所述特异性抗体分子的C端，通过肽接头(如SEQ ID NO:43所示的GGGGS)连接结合人血清白蛋白的ISVD，如Alb8(SEQ ID NO:45)。

[0631] 具体地，以V-17为例，如图9所示例的那样，在V-17的C端连接一段GGGGS肽接头(SEQ ID NO:43)，然后是一段抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:45)，由此组合成hu10A1-hu7A12-hu9A2-抗HSA-Alb8(也称为“V-17-抗HSA-Alb8”)。类似地，针对表5所述的其他特异性抗体分子，分别在C端连接一段GGGGS肽接头(SEQ ID NO:43)，然后是一段抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:45)，分别形成V-1-抗HS

A-Alb8, V-3-抗HSA-Alb8, V-7-抗HSA-Alb8, V-9-抗HSA-Alb8, V-13-抗HSA-Alb8, V-15-抗HSA-Alb8, V-16-抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:67), V-17-抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:68), V-18-抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:76), V-19-抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:77), V-20-抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:78), V-21-抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:79), V-22-抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:80), V-23-抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:81), V-24-抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:82), V-25-抗HSA-Alb8(SEQ ID NO:83)。

[0632] 将本公开所述单链的多特异性抗EGFR/cMet抗体构建至pcDNA 3.4表达载体中。转染至HEK293F细胞中，培养细胞3天，并收集转染细胞的培养上清液，装入Cytiva PrismA填料(Cytiva)用于纯化。抗体用醋酸-醋酸钠溶液(pH3.5)洗脱，然后立即用2M Tris中和。用Nano Drop测量抗体浓度。用SDS-PAGE和分析HPLC-SEC测定蛋白纯度，然后将其储存在-80℃。

[0633] 多链多特异性抗体

[0634] 将抗EGFR的VHH序列和抗cMet相同或不同表位的VHH序列分别组合为含有Fc亚单位的多肽链，所述多肽链可进一步缔合形成同源或异源的二聚体，以产生双链形式的多特异性的EGFR和cMet结合分子。

[0635] 图10显示了一种示例性的多链多特异性抗体结构。具体地，将所述抗EGFR的VHH序列与Fc亚单位组成多肽链(抗EGFR-Fc)，并任选地所述Fc亚单位含有LALA突变和/或Knob-into-hole结构，所制备的多肽链包括如表6A所示的序列：

[0636] 表6A：抗EGFR-Fc的示例性序列

结构域的拼接方式	序列号
hu10A1-Fc	SEQ ID NO: 70
hu5B10-Fc	SEQ ID NO: 71
hu9B8-Fc	SEQ ID NO: 72
hu10A1 ^b -Fc	SEQ ID NO: 86

[0637] 将所述抗cMet的VHH序列与Fc亚单位组成多肽链(抗cMet1-抗cMet2-Fc)，具体地，将第一抗cMet的VHH序列的C端与相同或不同的第二抗cMet的VHH序列的N端通过一段肽接头(如SEQ ID NO:42所示的GGGGSGGGGS)连接，第二抗cMet的VHH的C端再通过铰链区与Fc亚单位组成多肽链，并任选地所述Fc亚单位

含有LALA突变和/或Knob-into-hole结构，所制备的多肽链包括如表6B所示的序列：

[0638] 表6B：抗cMet1-抗cMet2-Fc的示例性序列

结构域的拼接方式	序列号
hu9A2-hu7A12-Fc	SEQ ID NO: 73
hu9A2-hu9A2-Fc	SEQ ID NO: 74
hu7A12-hu7A12-Fc	SEQ ID NO: 75
9A2-hu7A12-Fc	SEQ ID NO: 69
9A2-hu7A12 ^b -Fc	SEQ ID NO: 87

[0639] 上述任一抗EGFR-Fc多肽链可以和任一抗cMet1-抗cMet2-Fc多肽链缔合形成二聚体，例如合成表7所示的双链形式的多特异性抗EGFR/cMet抗体：

[0640] 表7：双链形式的多特异性抗EGFR/cMet抗体的示例

双链形式的抗EGFR/cMet 抗体名称	构成双链的多肽链 1	构成双链的多肽链 2
V-17-Fc	hu10A1-Fc (SEQ ID NO: 70)	hu9A2-hu7A12-Fc (SEQ ID NO: 73)
V-18-Fc	hu10A1-Fc (SEQ ID NO: 70)	hu7A12-hu7A12-Fc (SEQ ID NO: 75)
V-19-Fc	hu10A1-Fc (SEQ ID NO: 70)	hu9A2-hu9A2-Fc (SEQ ID NO: 74)
V-20-Fc	hu5B10-Fc (SEQ ID NO: 71)	hu9A2-hu7A12-Fc (SEQ ID NO: 73)
V-21-Fc	hu5B10-Fc (SEQ ID NO: 71)	hu7A12-hu7A12-Fc (SEQ ID NO: 75)
V-22-Fc	hu5B10-Fc (SEQ ID NO: 71)	hu9A2-hu9A2-Fc (SEQ ID NO: 74)
V-23-Fc	hu9B8-Fc (SEQ ID NO: 72)	hu9A2-hu7A12-Fc (SEQ ID NO: 73)
V-24-Fc	hu9B8-Fc (SEQ ID NO: 72)	hu7A12-hu7A12-Fc (SEQ ID NO: 75)
V-25-Fc	hu9B8-Fc (SEQ ID NO: 72)	hu9A2-hu9A2-Fc (SEQ ID NO: 74)
V-26-Fc	hu10A1 ^b -Fc (SEQ ID NO: 86)	9A2-hu7A12 ^b -Fc (SEQ ID NO: 87)

[0641] 将本公开所述双链形式的多特异性抗EGFR/cMet抗体的多肽链1和多肽链2分别构建至pcDNA 3.4表达载体中，转染至HEK293F细胞中，培养细胞3天，并收集

转染细胞的培养上清液，装入Protein A柱(MabSelect PrismA, Cytiva)用于纯化。抗体用醋酸-醋酸钠溶液(pH3.5)洗脱，然后立即用2M Tris中和。用Nano Drop测量抗体浓度。用SDS-PAGE和分析HPLC-SEC测定蛋白纯度，然后将其储存在-80℃。

[0642] 6.2 FACS BINDING检测

[0643] 用FACS方法检测上述三特异性抗EGFR/cMet抗体分子对靶细胞EBC-1和NCI-H1975细胞(中科院细胞库)的结合。

[0644] 分别准备各靶细胞，每孔细胞为 1.5×10^5 个细胞，铺在96孔板上。加入实施例6.1制备的各三特异性抗体(250nM,3倍稀释)，4℃孵育1h，然后300g的离心速度离心4分钟去掉上清。用FACS buffer(1% BSA)重复离心洗板2遍。加入第二抗体PE-抗人IgG(eBioscience，目录号12-4998-82)在4℃孵育1h后，再离心洗板2次，最后用FACS buffer(1% BSA)重悬细胞，用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。

[0645] 由图11所示，V-17-Fc, V-20-Fc, V-23-Fc和V-26-Fc三特异性抗体能够结合EBC-1和NCI-H1975细胞。

[0646] 6.3 FACS内吞检测

[0647] 用FACS方法检测靶细胞EBC-1和NCI-H1975细胞(中科院细胞库)对上述三特异性抗EGFR/cMet抗体分子的内化能力。

[0648] 分别准备各靶细胞，每孔细胞为 3×10^5 个细胞，铺在96孔板上。加入实施例6.1制备的各三特异性抗体(250nM,3倍稀释)，4℃孵育30min，离心去掉含有三特异性抗体的上清。将细胞平均分为2组，分别于4℃和37℃孵育4小时，孵育结束后，立刻加入冰浴的PBS终止内吞实验。加入第二抗体在4℃孵育30min后，用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。对于VHH-Fc模式的分子，第二抗体采用PE-抗人IgG(eBioscience，货号：12-4998-82)；对于VHH带his标签的分子，第二抗体采用APC-抗his(BioLegend，货号：362605)。

[0649] 使用下式计算细胞表面结合抗体的内化水平：

[0650] 内吞 = 4°C 孵育样本的MFI - 37°C 孵育样本的MFI；

- [0651] 靶细胞MDA-MB-468、EBC-1和NCI-H1975细胞对三特异性抗体的候选分子V-1, V-3, V-7, V-9, V-13, V-15, V-17-Fc, V-20-Fc, V-23-Fc和V-26-Fc的内吞结果如图12-图13所示。
- [0652] 如图12和图13所示, 靶细胞能够内吞三特异性抗EGFR/cMet抗体分子V-1, V-3, V-7, V-9, V-13, V-15, V-17-Fc, V-20-Fc, V-23-Fc和V-26-Fc。
- [0653] 6.4 SPR检测三特异性抗体对人、食蟹猴抗原的亲和力
- [0654] 6.4.1 SPR检测三特异性抗体对人、食蟹猴EGFR抗原的亲和力
- [0655] 用Cytiva通过SPR法检测三特异性抗EGFR/cMet抗体分子对人、食蟹猴EGFR(北京义翘神州科技股份有限公司)的亲和力。
- [0656] 用固定在GLM传感器芯片(伯乐)上的氨基偶联抗原人EGFR-his(ECD, Met1-Ser645)、食蟹猴EGFR-his(ECD, Met1-Ser645)(北京义翘神州科技股份有限公司)(20 μ g/mL)。将按比例稀释的实施例6.1的三特异性抗EGFR/cMet抗体分子以100 μ L/分钟的流速注射到感应芯片上, 结合阶段100秒, 然后解离180秒。在每个解离阶段后, 10mM甘氨酸(pH 1.5)再生缓冲液。从测试的传感图中减去空白表面和缓冲液通道的传感图。实验数据采用1:1结合模型进行朗格缪尔分析。候选分子与人、食蟹猴EGFR的亲和力结果如表8所示。
- [0657] 结果表明, 候选分子与人EGFR抗原和食蟹猴EGFR抗原显示出相近的结合和解离速率, 这些三特异性抗EGFR/cMet抗体分子与食蟹猴EGFR有交叉反应。
- [0658] 表8.SPR检测三特异性抗体对人、食蟹猴EGFR抗原的亲和力

抗体名称	抗原	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	K _D (M)
V-1	人 EGFR	1.12E+05	3.54E-03	3.17E-08
	食蟹猴 EGFR	7.41E+04	2.06E-03	2.78E-08
V-3	人 EGFR	1.19E+05	3.00E-03	2.51E-08
	食蟹猴 EGFR	1.12E+05	2.46E-03	2.18E-08
V-7	人 EGFR	9.16E+04	1.17E-06	1.28E-11
	食蟹猴 EGFR	9.32E+04	1.25E-07	1.35E-12
V-9	人 EGFR	8.69E+04	2.35E-07	2.70E-12
	食蟹猴 EGFR	7.64E+04	1.95E-06	2.55E-11
V-13	人 EGFR	2.76E+05	1.35E-02	4.89E-08
	食蟹猴 EGFR	4.33E+05	1.62E-02	3.74E-08
V-15	人 EGFR	3.34E+05	9.43E-03	2.83E-08
	食蟹猴 EGFR	3.35E+05	7.64E-03	2.28E-08
V-23-Fc	人 EGFR	2.10E+04	2.02E-04	9.63E-09
	食蟹猴 EGFR	2.82E+04	3.14E-04	1.11E-08
V-26-Fc	人 EGFR	4.09E+02	9.88E-02	2.42E-04
	食蟹猴 EGFR	5.87E+04	2.19E-01	3.74E-06

- [0659] 6.4.2 SPR检测三特异性抗体对人、食蟹猴cMet抗原的亲和力
- [0660] 用固定在GLM传感器芯片(伯乐)上的氨基偶联抗原人cMet-his(ECD, Met1-Thr932)、食蟹猴cMet-his(ECD, Met1-Thr932(北京义翘神州科技股份有限公司)(20 μg/mL)。将按比例稀释的实施例6.1的三特异性抗EGFR/cMet抗体分子(500nM)以30 μL/分钟的流速注射到感应芯片上, 结合阶段100秒, 然后解离180秒。在每个解离阶段后, 10mM甘氨酸(pH 1.5)再生缓冲液。从测试的传感图中减去空白表面和缓冲液通道的传感图。实验数据采用1:1结合模型进行分析。候选分子与人cMet、食蟹猴cMet的亲和力结果如表9所示。
- [0661] 结果表明, 候选分子与人cMet抗原和食蟹猴cMet抗原显示出相似的结合和解离速率, 这些三特异性抗EGFR/cMet抗体分子与食蟹猴cMet有交叉反应。
- [0662] 表9.SPR检测三特异性抗体对人、食蟹猴cMet抗原的亲和力

		Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
V-1	人 cMet	1.35E+05	1.32E-03	9.81E-09
	食蟹猴 cMet	1.33E+05	8.55E-04	6.43E-09
V-3	人 cMet	1.83E+05	1.58E-03	8.61E-09
	食蟹猴 cMet	1.76E+05	1.06E-03	5.99E-09

V-7	人 cMet	1.30E+05	1.33E-03	1.02E-08
	食蟹猴 cMet	1.20E+05	7.89E-04	6.59E-09
V-9	人 cMet	1.16E+05	1.67E-03	1.44E-08
	食蟹猴 cMet	1.08E+05	1.10E-03	1.02E-08
V-13	人 cMet	3.04E+05	8.25E-04	2.72E-09
	食蟹猴 cMet	2.00E+05	3.81E-04	1.91E-09
V-15	人 cMet	1.89E+05	1.25E-03	6.61E-09
	食蟹猴 cMet	1.85E+05	8.31E-04	4.49E-09
V-17-Fc	人 cMet	9.78E+04	1.37E-04	1.40E-09
	食蟹猴 cMet	7.93E+04	1.54E-04	1.95E-09
V-20-Fc	人 cMet	1.54E+05	3.65E-04	2.37E-09
	食蟹猴 cMet	4.30E+04	1.99E-04	4.62E-09
V-23-Fc	人 cMet	2.86E+04	2.15E-03	7.52E-08
	食蟹猴 cMet	9.68E+04	2.25E-04	2.33E-09
V-26-Fc	人 cMet	7.26E+04	9.70E-05	1.34E-09
	食蟹猴 cMet	1.68E+05	1.23E-04	7.30E-10

[0663] 6.5测定三特异性抗EGFR/cMet抗体分子对于配体HGF与靶细胞EBC-1结合的阻断作用

[0664] 将靶细胞EBC-1细胞以 1.5×10^5 个细胞/孔的密度铺在96孔板，并在4℃以300g离心5分钟。先加入三特异性抗EGFR/cMet抗体(200nM,4倍梯度稀释)和细胞一起孵育30min，再加入配体HGF-His(2 μ g/mL)(北京义翘神州科技股份有限公司)共同在4℃孵育1小时。加入第二抗体iF647-抗his(金斯瑞)在4℃孵育半小时，用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。

[0665] 结果表明，如图14所示，本发明的三特异性抗EGFR/cMet抗体能阻断EBC-1细胞与配体HGF的结合，且阻断活性优于ABT700和BMK-AZD。

[0666] 6.6 FACS检测三特异性抗体对靶细胞的协同内吞作用

[0667] M-4分子作为对照分子，其为不对称双链Fc形式，分别具有SEQ ID NO:73所示的第一多肽链(hu9A2-hu7A12-Fc)和SEQ ID NO:92所示的第二多肽链(anti-Covid-19链)，其中anti-Covid-19链不与靶细胞EGFR或cMET结合。

[0668] M-5分子作为对照分子，其为不对称双链Fc形式，分别具有SEQ ID NO:93所示的第一多肽链(anti-Covid-19链)和SEQ ID NO:71所示的第二多肽链(hu5B10-Fc)，其中anti-Covid-19链不与靶细胞EGFR或cMET结合。

- [0669] M-6分子作为对照分子，其为不对称双链Fc形式，分别具有SEQ ID NO:93所示的第一多肽链(anti-Covid-19链)和SEQ ID NO:72所示的第二多肽链(hu9B8-Fc)，其中anti-Covid-19链不与靶细胞EGFR或cMET结合。
- [0670] M-7分子作为对照分子，其为不对称双链Fc形式，分别具有SEQ ID NO:93所示的第一多肽链(anti-Covid-19链)和SEQ ID NO:70所示的第二多肽链(hu10A1-Fc)，其中anti-Covid-19链不与靶细胞EGFR或cMET结合。
- [0671] 将上述M-4、M-5、M-6、M-7分子的第一/第二多肽链构建至pcDNA 3.4表达载体中(如果抗体为对称结构则生成一种载体；如果抗体为不对称结构，则生成分别包含第一和第二多肽链编码基因的两种载体)，转染至HEK293F细胞中。培养细胞3天，并收集转染细胞的培养上清液，装入Protein A柱(MabSelect Prism A, Cytiva)用于纯化。抗体用醋酸-醋酸钠溶液(pH3.5)洗脱，然后立即用2M Tris中和。用Nano Drop测量抗体浓度。用SDS-PAGE和分析HPLC-SEC测定蛋白纯度。
- [0672] 用FACS方法检测肿瘤靶细胞EBC-1对三特异性抗EGFR/cMet抗体的增强的内化能力。
- [0673] 准备肿瘤靶细胞EBC-1，每孔细胞数为 3×10^5 个细胞，铺在96孔板上。分别加入三特异性抗EGFR/cMet抗体V-20-Fc，V-23-Fc分子，抗cMet的M-4，和抗EGFR的M-5，M-6，M-7分子(40nM,5倍稀释)，4℃孵育30min，离心去掉含有各VHH-Fc的上清。将细胞平均分为2组，分别于4℃和37℃孵育4小时，孵育结束后，立刻加入冰浴的PBS终止内吞实验。加入第二抗体PE-抗人IgG(cBioscience，目录号12-4998-82)在4℃孵育30min后，用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。
- [0674] 使用下式计算细胞表面结合抗体的内化水平：
- [0675] 内吞=4℃孵育样本的MFI-37℃孵育样本的MFI。
- [0676] 如图15显示，肿瘤靶细胞EBC-1对于三特异性抗体分子V-20-Fc，V-23-Fc具有较高的内吞(对比抗cMet的M-4，和抗EGFR的M-5、M-6、M-7分子)。
- [0677] 6.7 FACS检测三特异性抗体对靶细胞的协同结合作用

- [0678] NCI-H1975细胞，以每孔细胞为 1.5×10^5 个细胞，铺在96孔板上。加入本发明三特异性抗体(200nM,5倍稀释)，4℃孵育1h，然后300g的离心速度离心4分钟去掉上清。用FACS buffer(1%BSA)重复离心洗板2遍。加入第二抗体PE-抗人IgG(e Bioscience，目录号12-4998-82)在4℃孵育1h后，再离心洗板2次，最后用FACS buffer(1%BSA)重悬细胞，用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。
- [0679] 由图16所示，V-23-Fc对比于其相应的对照抗体(M4和M6)结合能力更强，预示这两个靶点有协同结合作用。
- [0680] 实施例7.抗体-药物偶联物(ADC)的制备、表征和实验
- [0681] 本发明实施例部分使用的连接子-有效载荷是现有技术已知和/或可商购的，或者可以按照本文所述进行制备。当所绘制结构与实际情况不一致时，应当允许根据实际情况对结构进行修改或改正。
- [0682] 通用合成方法A
- [0683] 将在20mM His-hacn,150mM NaCl,pH5.5中的5.45mg/ml本发明的抗体置于Eppendorf管中。将6摩尔当量的TCEP(Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride,5 mM浓度)加入到抗体缓冲液中(TCEP: 抗体=6:1)。将含有反应混合物的Eppendorf管置于振荡器(x500 rpm)上，在37℃反应2小时。向混合物中加入另外6摩尔当量的TCEP(5mM)。将反应混合物置于振荡器(500rpm)上在37℃下再振荡2小时。然后，超滤(MWCO 30kd)以除去TCEP，并用20mM His-hac缓冲液补充缓冲液。将6摩尔当量的连接子-有效载荷(5mg/ml，在DMA中)逐滴加入完全还原的抗体中，同时DMA浓度保持低于20%(v/v)。将反应在振荡器上室温保持2小时(连接子-有效载荷: 抗体=6:1)。用HIC-HLPC检测转化率，当转化完全即进行纯化。将反应混合物转移到超滤管(MWCO 30kd)中，在10,000rpm转速下离心样品5分钟至一半溶液体积，用His-hac缓冲液(含10%DMA)补充至原体积。丢弃流穿物。重复洗涤步骤10次。然后再用10mM His-hac pH=5.0重复洗涤10次进行溶液置换，最后转移剩余的溶液并调节至适当的浓度。
- [0684] 当使用另一方法Pro A进行纯化时(ProA产品标注40g/L容量)，使用前用10CV 10 mM His-hac洗涤，然后将样品装载到填充有Pro A树脂的重力柱上。用至少10CV的含有10% DMSO的10mM His-hac缓冲液洗涤,以及50CV不含DMSO的10mM

His-hac缓冲液洗涤以完全除去游离的有效载荷。然后用pH 3的醋酸溶液(浓度50 mM)洗脱并立即用2M Tris缓冲液(pH 12.0)中和至pH 5.5 ~ pH 6.0。将缀合物溶液在Eppendorf管中合并。测量浓度(Nanodrop,A280)。用10mM His-Hac(pH 6)作为空白。如果终浓度小于预期,用离心超滤方法(MWCO 30kd超滤膜)浓缩至所要求浓度。

- [0685] 通过HIC和SEC-HPLC方法测定纯度。通过RP-HPLC方法测定游离连接子-有效载荷。
- [0686] 用于测定或检测ADC的一般方法和/或参数
- [0687] ◆尺寸排阻色谱(SEC)方法(用于总ADC检测)
- [0688] SEC-HPLC方法参数

色谱条件	
柱温箱	25±1℃
流速	0.8 mL/mL
运行时间	20 min
进样量	至少 40µg
洗脱类型	等度洗脱
柱	Zenix-C SEC-150, 7.8*300mm 150*
流动相	50mM PB +300 mM NaCl, pH 6.8 ±0.1

- [0689] ◆反相HPLC(RP HPLC)方法(用于游离药物检测)
- [0690] RP HPLC法参数

柱	Agilent 安捷伦 ZORBAX StableBond 300 C3 柱, 4.6x150mm, 5µm
检测波长	280 nm; 214nm (任选)
柱温箱温度	60 °C
取样器温度	15 °C
流速	1.0 mL/min
进样量	2µg
流动相	流动相 A: 0.1% TFA 的 H ₂ O 溶液
	流动相 B: 0.1% TFA 的 ACN 溶液

- [0691] 按照下表进行洗脱

时间(Min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.0	75.0	25.0
2.0	75.0	25.0
10.0	5.0	95.0
12.0	5.0	95.0
14.0	5.0	95.0
16.0	80.0	20.0
18.0	80.0	20.0

[0692] ◆HIC-HPLC法(用于游离抗体和DAR分布检测)

[0693] HIC-HPLC条件。

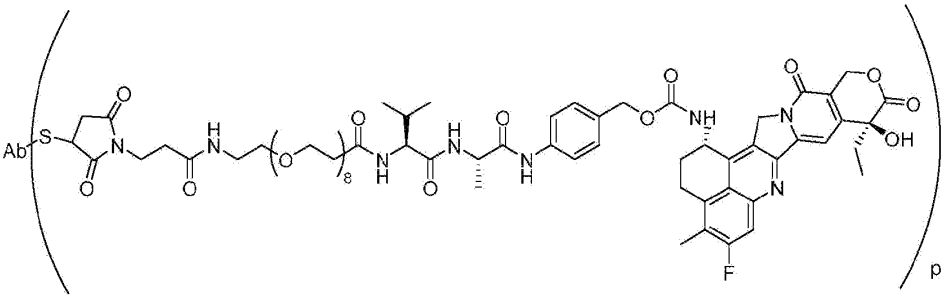
柱	MABPac™ HIC-Butyl HPLC 色谱柱, 5um, 4.6 X 100mm,Thermo SCIENTIFIC
检测波长	280 nm; 214nm (任选的)
柱温箱温度	25℃
取样器温度	15℃
流速	0.6 mL/min
进样量	30-50μg
流动相	流动相 A: 1.5M (NH ₄) ₂ SO ₄ 和 50mM PB, pH7.4
	流动相 B: 50 mM PB, 25% IPA, pH 7.4

[0694] 按照下表进行洗脱

时间(Min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.0	100.0	0.0
7.0	100.0	0.0
23.0	0.0	100.0
26.0	0.0	100.0
26.5	100.0	0.0
35.0	100.0	0.0

[0695] 7.1ADC分子的制备和表征

[0696] a)偶联Mal-PEG8-VA-PAB-Exatecan的ADC分子的制备

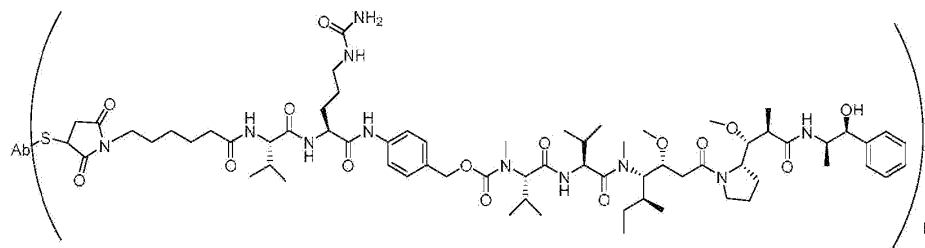


[0697] Ab为本申请所制备抗体V-26-Fc, p主要为4。可以理解, p也可以为其他正整数, 例如1、2、3、5、6、7、8、9或10等。

[0698] 按照上述合成方法A, 采用抗体V-26-Fc和连接子-有效载荷Mal-PEG8-VA-PAB-Exatecan(CAS No.:2679821-39-5; MedChemExpress, HY-147271)制备得到V-26-Fc-VA-Exd, MW 96.37, 平均 Dar 4.0, 产率63%, 纯度91.73%。

[0699] 按照V-26-Fc-VA-Exd制备方法, 将抗体V-26-Fc分别替换为V-17-Fc、V-20-Fc、V-23-Fc, 制备得到V-17-Fc-VA-Exd、V-20-Fc-VA-Exd、V-23-Fc-VA-Exd。

[0700] b) 偶联MC-VC-PAB-MMAE的ADC分子的制备

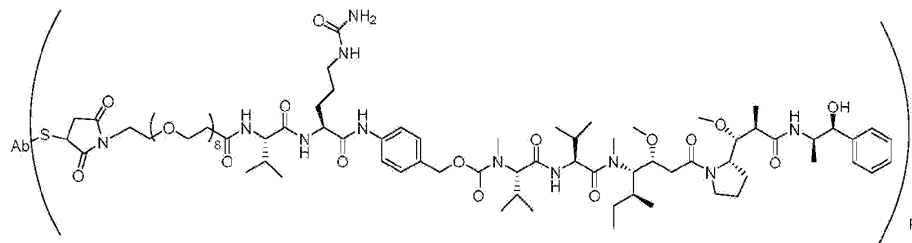


[0701] Ab为本申请所制备抗体V-26-Fc, p主要为4。可以理解, p也可以为其他正整数, 例如1、2、3、5、6、7、8、9或10等。

[0702] 按照上述合成方法A, 采用抗体V-26-Fc和连接子-有效载荷MC-VC-PAB-MMAE(CAS No.:646502-53-6; MedChemExpress, HY-15575)制备得到V-26-Fc-VC-MMAE。

[0703] 按照V-26-Fc-VC-MMAE制备方法, 将抗体V-26-Fc分别替换为V-17-Fc、V-20-Fc、V-23-Fc, 制备得到V-17-Fc-VC-MMAE、V-20-Fc-VC-MMAE、V-23-Fc-VC-MMAE。

[0704] c) 偶联Mal-PEG8-VC-PAB-MMAE的ADC分子的制备

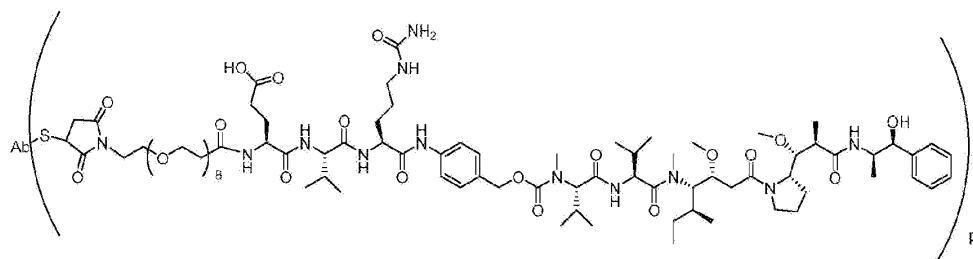


[0705] Ab为本申请所制备抗体V-26-Fc, p主要为4。可以理解, p也可以为其他正整数, 例如1、2、3、5、6、7、8、9或10等。

[0706] 按照上述合成方法A, 采用抗体V-26-Fc和连接子-有效载荷Mal-PEG8-VC-PAB-MMAE(CAS No.:2353409-69-3; MedChemExpress, HY-141156)制备得到V-26-Fc-PEG-VC-MMAE。

[0707] 按照V-26-Fc-PEG-VC-MMAE制备方法, 将抗体V-26-Fc分别替换为V-17-Fc、V-20-Fc、V-23-Fc, 制备得到V-17-Fc-PEG-VC-MMAE、V-20-Fc-PEG-VC-MMAE、V-23-Fc-PEG-VC-MMAE。

[0708] d)偶联Mal-PEG8-EVC-PAB-MMAE的ADC分子的制备

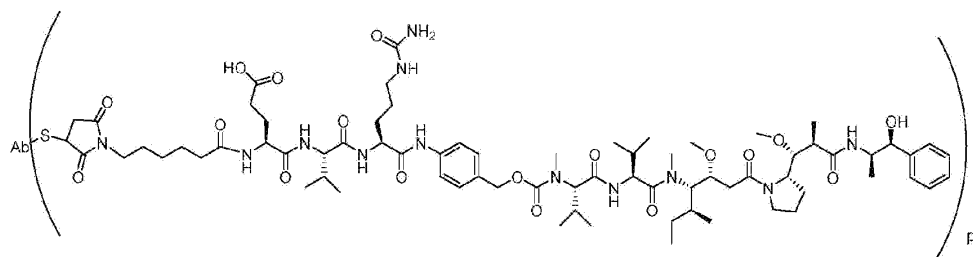


[0709] Ab为本申请所制备抗体V-26-Fc, p主要为4。可以理解, p也可以为其他正整数, 例如1、2、3、5、6、7、8、9或10等。

[0710] 按照上述合成方法A, 采用抗体V-26-Fc和连接子-有效载荷Mal-PEG8-EVC-PAB-MMAE(按照本申请制备方法制备)制备得到V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE。

[0711] 按照V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE制备方法, 将抗体V-26-Fc分别替换为V-17-Fc、V-20-Fc、V-23-Fc, 制备得到V-17-Fc-PEG-EVC-MMAE、V-20-Fc-PEG-EVC-MMAE、V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE。

[0712] e)偶联MC-EVC-PAB-MMAE的ADC分子的制备

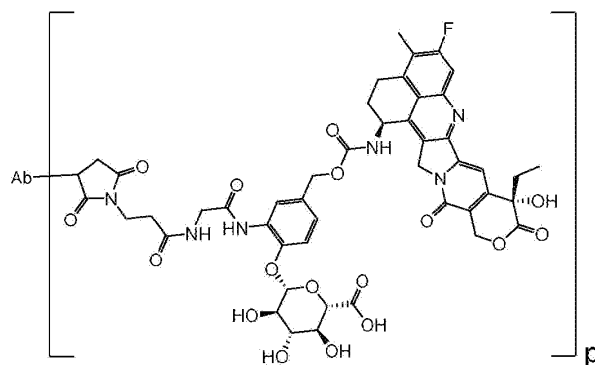


[0713] Ab为本申请所制备抗体V-26-Fc, p主要为4。可以理解, p也可以为其他正整数, 例如1、2、3、5、6、7、8、9或10等。

[0714] 按照上述合成方法A, 采用抗体V-26-Fc和连接子-有效载荷MC-EVC-PAB-MMAE(CAS No.:2873452-49-2; MedChemExpress, HY-154915)制备得到V-26-Fc-EVC-MMAE。

[0715] 按照V-26-Fc-EVC-MMAE制备方法, 将抗体V-26-Fc分别替换为V-17-Fc、V-20-Fc、V-23-Fc, 制备得到V-17-Fc-EVC-MMAE、V-20-Fc-EVC-MMAE、V-23-Fc-EVC-MMAE。

[0716] f)偶联Mal-Gly-Exatecan-D-葡萄糖醛酸的ADC分子的制备:



[0717] Ab为本申请所制备抗体V-23-Fc, p主要为4。可以理解, p也可以为其他正整数, 例如1、2、3、5、6、7、8、9或10等。

[0718] 按照上述合成方法A, 采用抗体V-23-Fc和连接子-有效载荷Mal-Gly-Exatecan-D-葡萄糖醛酸(CA No.:2763252-25-9; MedChemExpress, HY-153179)制备得到V-23-Fc-Gluc-Exd(或称V-23-Fc-Glu-Exd), MW 96, 平均Dar 4.0, 产率50%, 纯度84.31%。

[0719] 按照V-23-Fc-Gluc-Exd制备方法, 将抗体V-23-Fc分别替换为V-26-Fc、V-17-Fc、V-20-Fc, 制备得到V-26-Fc-Gluc-Exd、V-17-Fc-Gluc-Exd、V-23-Fc-Gluc-Exd。

[0720] 将本申请制备得到的示例性ADCs的表征数据如下:

分子 ID	偶联策略	MW	游离有效 载荷	平均 Dar 值	产率(%)	纯度(%)
V-26-Fc-VA-Exd	半胱氨酸	96.37	<1%	平均 Dar 4.0	63%	91.73%
V-20-Fc-VA-Exd	半胱氨酸	96.36	<1%	平均 Dar 4.0	69%	87.2%
V-23-Fc-VA-Exd	半胱氨酸	97.51	<1%	平均 Dar 4.0	62%	92.7%
V-26-Fc-VC-MMAE	半胱氨酸	96.31	<1%	平均 Dar 4.0	66.6%	99.67%
V-20-Fc-VC-MMAE	半胱氨酸	96.07	<1%	平均 Dar 4.0	68.2%	98.3%
V-23-Fc-VC-MMAE	半胱氨酸	97.51	<1%	平均 Dar 4.0	64.7%	93.5%
V-26-Fc-PEG-VC-MMAE	半胱氨酸	97.56	<1%	平均 Dar 3.7	66%	89.3%
V-20-Fc-PEG-EVC-MMAE	半胱氨酸	97.84	<1%	平均 Dar 4.0	62.8%	86.94%
V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE	半胱氨酸	99.21	<1%	平均 Dar 3.7	50%	89.54%
V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE	半胱氨酸	98.07	<1%	平均 Dar 4.0	65%	94.92%
V-23-Fc-Gluc-Exd	半胱氨酸	96	<1%	平均 Dar 4.0	50%	84.31%

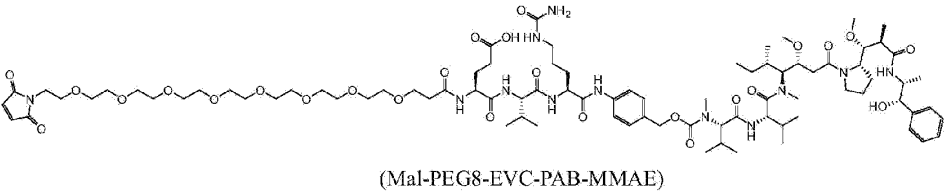
[0721] 参考基准抗体药物偶联物AZD9592的制备

[0722] 向抗体(RAA22/B09-57，本文中也称为BMK-AZD，或AZD Ab)溶液中加入15当量TCEP溶液，混合均匀后于37℃反应2小时。向反应液中加入DMA以及16当量由DMA溶解成10mM母液的连接子-有效载荷(Mal-PEG8-amide-Val-Ala-(4-NH2)-Exatecan)，最终反应体系中有有机溶剂占比为10%。将反应液混匀并置于22℃恒温摇床中继续反应1小时，然后加入N-乙酰半胱氨酸淬灭反应。偶联后的样品使用超滤浓缩管进行纯化，换液至最终ADC的储存缓冲液中(30mM组氨酸,30mM精氨酸-HCl,含0.02% PS 80,pH6.8)。用0.22 μ m针头滤器过滤样品除菌。

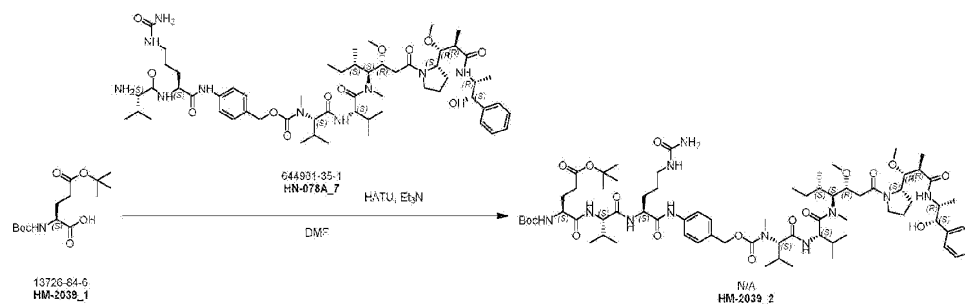
[0723] 本申请所涉及的参考基准抗体药物偶联物的表征数据如下：

分子 ID	MW	游离有效载荷	平均 Dar 值	产率(%)	纯度(%)
AZD9592	96.37	1.2%	平均 Dar 5.9	95.82%	98.57%
ABBV399	96.36	<1%	平均 Dar 3.0	27.6%	100%

[0724] 本申请Mal-PEG8-EVC-PAB-MMAE的制备



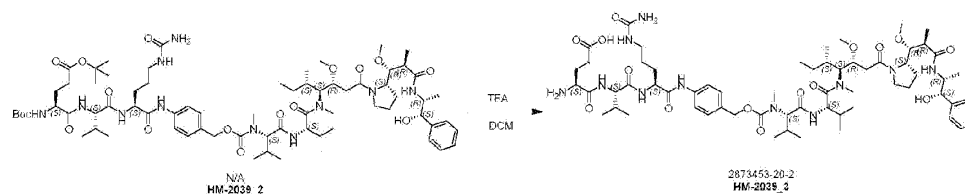
[0725] 步骤一：



[0726] (1)将化合物HM-2039_1(CAS:13726-84-6)(100mg,0.33mmol,1eq)、HN-078A_7 (Catalog:HY-100374,CAS:644981-35-1)(388.86mg,0.346,1.05eq)加入DMF(6mL)中, 加入HATU(188mg)和三乙胺(66.7mg), 在N₂保护下反应4h。

[0727] (2)LCMS监测反应结束, 将反应液滴到水中, 用EA(30mL*2)萃取两次, 合并有机相后用饱和食盐水(30mL*3)洗三次, 无水硫酸钠干燥后浓缩得410mg(88.29% yield)白色固体。

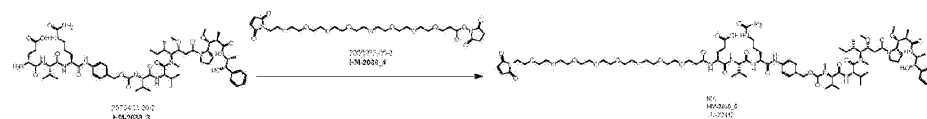
[0728] 步骤二:



[0729] (1)将化合物HM-2039_2(410mg,0.291mmol,1eq)加入DCM(4mL)中, 加入TFA(1 mL), 氮气保护后(0-10℃)下反应1h。

[0730] (2)LCMS监测反应结束, 低温浓缩除去DCM得到粗品, 粗品过反相柱得产物: 200mg, 54.86% yield白色固体。

[0731] 步骤三:



[0732] (1)将HM-2039_3(0.1g, 79.84umol,1eq)、HM-2039_4(CAS:1818294-46-0)(51.8 mg, 83.83umol,1.05eq)溶于DMF, 反应液搅拌2h。

- [0733] (2)LCMS监测反应结束,将反应液直接制备(TFA in water,ACN)得目标产物30mg(23.54% yield)白色固体, MW 1756.08, 纯度99.18%。
- [0734] ^1H NMR(400MHz,DMSO) δ 10.04(s,1H),8.35–8.25(m,0.28H),8.25–8.15(m,1H),8.13–8.03(m,1.5H),7.94–7.87(m,0.4H),7.76–7.70(m,1H),7.67–7.63(m,0.4H),7.62–7.57(m,1.7H),7.38–7.25(m,7H),7.22–7.14(m,1H),7.04(s,2H),5.99(s,1H),5.66–5.20(m,2H),5.15–4.95(s,2H),4.80–4.15(m,8H),4.10–3.90(m,2H),3.63–3.56(m,5H),3.52–3.48(m,28H),3.28–3.24(m,4H),3.22–3.18(m,5H),3.16–3.10(m,2H),3.10–2.84(m,9H),2.50–2.40(m,2H),2.30–2.20(m,3H),2.20–1.69(m,10H),1.67–1.30(m,7H),1.08–0.98(m,7H),0.89–0.76(m,26H).
- [0735] 7.2本发明ADCs的FACS结合检测
- [0736] 用FACS方法检测上述三特异性抗EGFR/cMet抗体分子偶联毒素分子(即有效载荷)形成ADC分子后对靶细胞MDA-MB-468、EBC-1和NCI-H1975细胞(中科院细胞库)的结合。
- [0737] 试验方法如实施例6.2所述。分别准备各靶细胞,每孔细胞为 1.5×10^5 个细胞,铺在96孔板上。加入测试ADCs(200nM或者40nM,5倍稀释),4℃孵育1h,然后300g的离心速度离心4分钟去掉上清。用FACS buffer(1%BSA)重复离心洗板2遍。加入第二抗体(PE-抗人IgG(eBioscience, 货号: 12-4998-82))在4℃孵育1h后,再离心洗板2次,最后用FACS buffer(1%BSA)重悬细胞,用流式细胞仪(Life Technologies)测定细胞的MFI。
- [0738] 由图17所示,V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE、V-20-Fc-PEG-EVC-MMAE、V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE能够结合EBC-1和NCI-H1975细胞。同样的,V-23-Fc-VA-Exd和V-23-Fc-Gluc-Exd能够结合MDA-MB-468细胞和NCI-H1975细胞,结合活性优于对照组AZD9592以及ABBV399。
- [0739] 7.3本发明ADCs的细胞杀伤检测
- [0740] 用FACS方法检测上述三特异性抗EGFR/cMet抗体分子偶联毒素形成ADC分子后对靶细胞MDA-MB-468、EBC-1和NCI-H1975细胞(中科院细胞库)的杀伤。
- [0741] 将100ul用细胞培养基重悬的细胞(1×10^4)接种到96孔板的每个孔中,在37℃、5% CO_2 培养箱中培养过夜。第二天,在相应的孔中加入100ul经系列稀释的V-

20-Fc-PEG-EVC-MMAE、V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE和V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE以及阳性对照ADC ABBV399和AZD9592。细胞继续培养3-5天。然后，在每个孔中加入20 μL CCK8(Shanghai Life iLab Biotech，货号：AC11L054)，在37℃、5% CO₂培养箱中培养至显色。使用酶标仪(Molecular Device,Spectra Max M5)记录450nm处的吸光度。

[0742] 细胞活力的计算公式如下：细胞活力百分比=[(As-Ab)/(Ac-Ab)]×100。As=实验孔吸光度(细胞、培养基、CCK8和ADC)；Ab=空白孔吸光度(培养基和CCK8)；Ac=对照孔吸光度(细胞、培养基和CCK8)。

[0743] V-20-Fc-PEG-EVC-MMAE、V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE和V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE对EBC-1、NCI-H1975、MDA-MB-468的杀伤结果见如下表10A和图18A所示，V-23-Fc-VA-Exd、V-23-Fc-Gluc-Exd对EBC-1、NCI-H1975的杀伤结果见如下表10B和图18B所示。结果表明各ADC分子对靶细胞的杀伤效果基本等于或者好于阳性对照药(ABBV399和AZD9592)。

[0744] 表10A.V-20-Fc-PEG-EVC-MMAE、V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE和V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE对靶细胞的杀伤

ADC 名称	IC ₅₀ 值
靶细胞：EBC-1 细胞	
V-20-Fc-PEG-EVC-MMAE	0.1546 nM
V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE	0.1414 nM
V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE	0.1315 nM
AZD9592	0.1893 nM
ABBV399	0.1937 nM
靶细胞：NCI-H1975 细胞	
V-20-Fc-PEG-EVC-MMAE	0.09336 nM
V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE	0.04603 nM
V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE	0.04696 nM
AZD9592	11.3 nM
ABBV399	-
靶细胞：MDA-MB-468	
V-20-Fc-PEG-EVC-MMAE	0.1282 nM
V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE	0.04861 nM
V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE	0.4841 nM
AZD9592	3.231 nM
ABBV399	-

备注：“-”表示无法拟合出IC₅₀值。

[0745] 表10B.V-23-Fc-VA-Exd和V-23-Fc-Gluc-Exd对靶细胞的杀伤

ADC 名称	IC ₅₀ 值
靶细胞: EBC-1 细胞	
V-23-Fc-VA-Exd	0.1381 nM
V-23-Fc-Gluc-Exd	0.1290 nM
AZD9592	0.1641 nM
靶细胞: NCI-H1975 细胞	
V-23-Fc-VA-Exd	25.29 nM
V-23-Fc-Gluc-Exd	33.99 nM
AZD9592	-

备注: “-” 表示无法拟合出IC₅₀值。

[0746] 7.4 PEG修饰和/或EVC修饰ADCs的细胞结合和细胞杀伤检测

[0747] 以V-26-Fc为抗体部分的代表, 分别偶联了Mal-PEG8-EVC-PAB-MMAE(V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE)、Mal-PEG8-VC-PAB-MMAE(V-26-Fc-PEG-V-VC-MMAE)和MC-VC-PAB-MMAE(V-26-Fc-VC-MMAE)以及Mal-PEG8-VA-PAB-Exatecan(V-26-Fc-VA-Exd)。FACS结合试验方法如前所述(如实施例6.2或7.2), 试验结果如图19。细胞杀伤试验步骤如7.3部分所述, 试验结果如图20所示。

[0748] 实施例8.多特异性抗EGFR/cMet抗体药物偶联物(ADC)的体内药效评估

[0749] 应用EBC-1、NCI-H1975、NCI-H441(肺腺癌细胞)、MDA-MB-468、FADU(头颈癌细胞)和SW48(结肠腺癌细胞)CDX小鼠模型来评估三特异性抗EGFR/cMet抗体分子偶联毒素分子形成ADC分子的体内药效。使用新鲜培养基复苏各肿瘤细胞。收集处于对数生长期的细胞。在收集细胞的过程中, 除去培养基并洗涤两次, 然后用DPBS重悬。然后将细胞皮下注射到BALB/c nu/nu小鼠体内。EBC-1、NCI-H1975、NCI-H441、MDA-MB-468、FADU和SW48 CDX模型的接种量分别为 $3 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ 、 $3 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ 、 $1 \times 10^7/100 \mu\text{L}$ 、 $1 \times 10^7/100 \mu\text{L}$ 、 $5 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ 和 $5 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ 。当小鼠平均肿瘤体积达到110-250mm³时, 根据肿瘤体积随机分组。分组当天被定义为第0天。各CDX小鼠模型均采用单次静脉推注的方式进行给药, 于D0静脉给予受试品。开始给药后, 每周称量小鼠体重1-2次, 测量肿瘤体积1-2次, 每天观察动物2次, 直至研究终点。肿瘤体积的计算公式为: 肿瘤体积(立方毫米)=0.5*肿瘤长度*肿瘤宽度²。采用肿瘤体积变化(c

change in tumor size,基于基线)来反应肿瘤的抑制情况,以此评估供试品的抗肿瘤药效。肿瘤体积变化(change in tumor size,基于基线)的计算公式如下:

$$\text{肿瘤体积变化} = (V_t - V_0) / V_0 \times 100\%$$

- [0750] V_t : 受试品给药组小鼠在第t天的组平均肿瘤体积;
- [0751] V_0 : 受试品给药组小鼠在第0天的组平均肿瘤体积;
- [0752] 8.1 V-20-Fc-PEG-EVC-MMAE、V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE和V-26-PEG-EVC-MMAE在CDX模型中的体内药效
- [0753] 试验结果如图21所示, V-20-Fc-PEG-EVC-MMAE、V-23-Fc-PEG-EVC-MMAE和V-26-Fc-PEG-EVC-MMAE均具有很强的肿瘤抑制作用, 静脉注射药物后, 肿瘤体积明显缩小, 且药效好于阳性对照药ABBV399和AZD9592。
- [0754] 8.2 V-23-Fc-VA-Exd在CDX模型中的体内药效
- [0755] 应用EBC-1、NCI-H1975、NCI-H441以及MDA-MB-468CDX小鼠模型评估了V-23-Fc-VA-Exd的体内药效。试验结果如图22所示, V-23-Fc-VA-Exd展现出优于阳性对照药AZD9592的体内抑制肿瘤效果。
- [0756] 在EBC-1模型中, 在给药后第54天, V-23-Fc-VA-Exd和AZD9592在高剂量下肿瘤被完全消除; 在低剂量下, V-23-Fc-VA-Exd药效优于AZD9592。
- [0757] 在NCI-H1975模型中, 在给药后第29天, V-23-Fc-VA-Exd在2mg/kg的肿瘤抑制效果与AZD9592在4mg/kg的肿瘤抑制效果相当; 在同等剂量下, V-23-Fc-VA-Exd药效优于AZD9592。
- [0758] 在NCI-H441模型中, 在给药后第45天, 在同等剂量下, V-23-Fc-VA-Exd药效优于AZD9592; V-23-Fc-VA-Exd在2mg/kg的肿瘤抑制效果与AZD9592在8mg/kg的肿瘤抑制效果相当。
- [0759] 在MDA-MB-468模型中, 在给药后第42天, V-23-Fc-VA-Exd和AZD9592在4mg/kg和8mg/kg下肿瘤被完全消除; V-23-Fc-VA-Exd在2mg/kg的肿瘤体积变化率为-72%。
- [0760] 8.3 V-23-Fc-Gluc-Exd在CDX模型中的体内药效
- [0761] 应用SW48 CDX(结直肠癌模型, EGFR^{++&cMet⁺})、FADU CDX(头颈癌模型, EGFR^{+++&cMet^{+/-}})、EBC-1 CDX(非小细胞肺癌模型, EGFR^{++&cMet⁺⁺⁺})和NCI

-H1975 CDX(非小细胞肺癌模型, EGFR⁺&cMet⁺)小鼠模型评估了V-23-Fc-Glu
c-Exd的体内药效。试验结果如图23所示, V-23-Fc-Glu c-Exd展现出优于阳性
对照药的体内抑制肿瘤效果。

[0762] 在SW48模型、FADU模型、NCI-H1975模型中, V-23-Fc-Glu c-Exd在同等
剂量下药效优于阳性对照药, 包括AZD9592和ABBV399。

[0763] 在EBC-1 CDX模型中, 在给药后第36天, 低剂量(1mg/kg)下V-23-Fc-Glu c-
Exd药效优于AZD9592, 在3mg/kg的剂量下两组动物的肿瘤都完全消除。

[0764] 以上描述了本发明的示例性实施方案, 本领域技术人员应当理解的是, 这些
公开内容仅是示例性的, 在本发明的范围内可以进行各种其它替换、适应和修
改。因此, 本发明不限于文中列举的具体实施方案。

[0765] 序列表概述:

序列号	描述	序列
抗 EGFR 抗体， CDR 根据 Kabat 编号定义，下划线表示		
		V-n5B10
1	VHH 的氨基酸序列	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLDCSASGTIIIG <u>TYTMA</u> WYRQAPG KQREMVAIITPGGGSHHADS V KGRFTISRDN G KSTVYLQMSSL KFEDTAVYYCNA KAR WG TTEY WGQGTQVTVSS
2	VHH 的核苷酸序列	GCCGTGCAGCTGGTGGATTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCC TGGGGGGTCTCTGAGACTCGACTGTTACAGCCTCTGGAACCA TCATCGGCACCTATAACCATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGATGGTCGCAATTATTACGCTGGTGGT GGCTCACACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCAT CTCCAGAGACAACGGCAAGTCTACGGTGTATCTCCAAATGA GCAGCCTGAAATTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAAT GCCAAGGCCCGTTGGGGCACTACTGAGTACTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
3	CDR1	TYTMA
4	CDR2	IITPGGGSHHADS V K
5	CDR3	KAR WG TTEY
		V-n5B10 序列优化
		人源化，具有与 V-n5B10 相同的 CDR1-3
31	zn5B10.m20 (也称为 hu5B10)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGTIIIG <u>TYTMA</u> WYRQAPG KQREMVAIITPGGGSHHADS V KGRFTISRDN S KNTLYLQMSSL RAEDTAVYYCNA KAR WG TTEY WGQGT L TVSS
94	zn5B10.m16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTIIIG <u>TYTMA</u> WYRQAPG KQREMVAIITPGGGSHHADS V KGRFTISRDN S KNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCNA KAR WG TTEY WGQGT M TVSS
95	zn5B10.m17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTIIIG <u>TYTMA</u> WYRQAPG KQREMVAIITPGGGSHHADS V KGRFTISRDN S KNTVYLQMNS LRAEDTAVYYCNA KAR WG TTEY WGQGT M TVSS
96	zn5B10.m18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGTIIIG <u>TYTMA</u> WYRQAPG KQREMVAIITPGGGSHHADS V KGRFTISRDN S KSTVYLQMSSL RAEDTAVYYCNA KAR WG TTEY WGQGT L TVSS
97	zn5B10.m21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGTIIIG <u>TYTMA</u> WYRQAPG KQREMVAIITPGGGSHHADS V KGRFTISRDN G KNTLYLQMSSL RAEDTAVYYCNA KAR WG TTEY WGQGT L TVSS
98	zn5B10.m22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGTIIIG <u>TYTMA</u> WYRQAPG KQREMVAIITPGGGSHHADS V KGRFTISRDN S KNTLYLQMSSL RFEDTAVYYCNA KAR WG TTEY WGQGT L TVSS
99	zn5B10.m23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLDCSASGTIIIG <u>TYTMA</u> WYRQAPG KQREMVAIITPGGGSHHADS V KGRFTISRDN S KSTVYLQMSSL RFEDTAVYYCNA KAR WG TTEY WGQGT L TVSS

		V-n9B8
6	VHH 氨基酸序列	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPG KEREFVA <u>AINWNGGNTYNTDSVKGR</u> FTISRDNKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAVRYNSASYLVARSSDYNWYGQGLVTVS S
7	VHH 核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAAC CTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTC ACCTTCAGTTACTATGCCATGGCCTGGTTCGCCAGGCTCCA GGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAAGTGAATGG TGGAACACATACAATACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTG TGCAGTTAGATACAATAGTGCTAGTTACTTAGTCGCGAGATC GTCAGATTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCG TCTCCTCA
8	CDR1	YYAMA
9	CDR2	AINWNGGNTYNTDSVKG
10	CDR3	RYNSASYLVARSSDYN
		V-n9B8 序列优化
		人源化，具有与 V-n9B8 相同的 CDR1-3
100	zn9B8.m2	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPG KEREFVA <u>AINWNGGNTYNTDSVKGR</u> FTISRDNKNTVYLQM NSLTPEDTAVYYCAVRYNSASYLVARSSDYNWYGQGLVTVS S
101	zn9B8.m4	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPG KEREFVA <u>AINWNGGNTYNTDSVKGR</u> FTISRDNKNTVYLQM NSLRSED TAVYYCAVRYNSASYLVARSSDYNWYGQGLVTVS S
		人源化+PTM 去除，具有与 V-n9B8 相同的 CDR1
		pzn9B8.m2.m11 (也称为 hu9B8)
32	hu9B8_VHH	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPG KEREFVA <u>AINWNGGNTYNTDSVKGR</u> FTISRDNKNTVYLQM NSLTPEDTAVYYCAVRYNQASYLVARSSDYNWYGQGLVTVS S
33	hu9B8 VHH 的核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGCTCGAGTCCGGGGGCGGGCTGGTGCAGC CCGGCGGCAGCCTCAGACTGAGCTGCGCCGCTAGCGGCCT GACCTTCAGCTACTACGCCATGGCCTGGTTCAGACAAGCCC CCGGCAAGGAGAGAGAGATTCTGTGGCCGCCATCAACTGGAA CCAAGGCAACACCTACAACACCGACAGCGTGAAGGGCAGA TTCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCGTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGACCCCGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGCGCCGTGAGATAACAACCAAGCTAGCTACCTGGTGG CTAGAAGCAGCGACTACAAC TACTGGGGCCAAGGCACCCCT GGTGACCGTGAGCAGC
8	hu9B8_CDR1	YYAMA
34	hu9B8_CDR2	AINWNGGNTYNTDSVKG
35	hu9B8_CDR3	RYNQASYLVARSSDYN
		pzn9B8.m2.m12
102	pzn9B8.m2.m12_VHH	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPG KEREFVA <u>AINWNGGNTYNTDSVKGR</u> FTISRDNKNTVYLQM

		NSLTPEDTAVYYCAVRYNAASYLVARSSDYNWGGQGLTVTVSS
8	pzn9B8.m2.m12_CDR1	YYAMA
103	pzn9B8.m2.m12_CDR2	AINWNAGNTYNTDSVKG
104	pzn9B8.m2.m12_CDR3	RYNAASYLVARSSDYN
		V-n10A1
11	VHH 氨基酸序列	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLNLSDGSAVTADSVKGRFTISTDNTKNSVYLQMNSLKPEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTQVTVSS
12	VHH 核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGGTAGAATCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCGGCAGTCTACATGCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAAAGAGTAGCAACGCTTAACCTAAGTGATGGTAGCGCAGTTACTGCAGATTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCACGGACAACACCAAGAACTCGGTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTATTACTGTACAGCGTCTCGTTCCCTCCGGGTATTAGATACTATAAGCCTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTTTCCTCG
13	CDR1	LHAMG
14	CDR2	TLNLSDGSAVTADSVKG
15	CDR3	SRSPSGIRYYKPDY
		V-n10A1 序列优化
		人源化，具有与 V-n10A1 相同的 CDR1-3
105	zn10A1.m5	QVQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCASGRTGSLHAMGWFRQAPGQERERVATLNLSDGSAVTADSVKGRFTITDNTSKNSVYMELESLRSEDVAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTMTVTVSS
106	zn10A1.m6	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLNLSDGSAVTADSVKGRFTISTDNTSKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGLTVTVSS
		PTM 去除
107	pn10A1.m1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLOLSDGSVAVTADSVKGRFTISTDNTKNSVYLQMNSLKPEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTQVTVSS
108	pn10A1.m2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLNLDGSVAVTADSVKGRFTISTDNTKNSVYLQMNSLKPEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTQVTVSS
109	pn10A1.m3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLOLTDGSVAVTADSVKGRFTISTDNTKNSVYLQMNSLKPEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTQVTVSS
110	pn10A1.m4	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLNLDSEGSVAVTADSVKGRFTISTDNTKNSVYLQMNSLKPEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTQVTVSS
111	pn10A1.m5	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLNLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNTKNSVYLQMNSLKPEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTQVTVSS
112	pn10A1.m6	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLNLSDAVAVTADSVKGRFTISTDNTKNSVYLQMN

		NSLKPEDTAVYYCTAS <u>SRSPSGIRYYKPDY</u> WGQGTQVTVSS
		人源化+PTM 去除
113	pzn10A1_m6m5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSL <u>HAMG</u> WFRQAP GKERERVATLNLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNSKNSVYLQMN SLRAEDTAVYYCTAS <u>SRSPSGIRYYKPDY</u> WGQGTQVTVSS
114	ppzn10A1_m6m5.m1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSL <u>HAMG</u> WFRQAP GKERERVATLRLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNSKNSVYLQMN SLRAEDTAVYYCTAS <u>SRSPSGIRYYKPDY</u> WGQGTQVTVSS
84	ppzn10A1_m6m5.m3 (也称为 hu10A1 ^b)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSL <u>HAMG</u> WFRQAP GKERERVATLQLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNSKNSVYLQMN SLRAEDTAVYYCTAS <u>SRSPSGIRYYKPDY</u> WGQGTQVTVSS
36	dppzn10A1m6m5. m3_1.m2 (也称为 hu10A1)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSL <u>HAMG</u> WFRQAP GKERERVATLRLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTAS <u>SRSPSGIRYYKPDY</u> WGQGTQVTVSS
37	hu10A1 的核苷酸序列	CAGGTGCAGCTCGTGGAATCAGGAGGTGGACTGGTGCAGC CAGGTGGATCTCTGAGGCTGTCTTGTGCAGCTAGCGGAAGA ACAGGCTCTCTGCACGCCATGGGTTGGTTCAGACAGGCTCC AGGCAAGGAGAGAGAAAAGAGTGGCCACACTGCgGCTGAGC GACGTGTCAGCAGTGACAGCAGACAGCGTGAAGGGTAGAT TCACCATCAGTACCGACAACAGCAAGAACACCCCTGTACCTG CAGATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGATACCGCAGTGTACTA TTGCACCGCTTCTCGAAGCCCTAGCGGCATTCCGTACTACA AGCCTGACTATTGGGGTCAAGGCACACTGGTCACAGTGTCA TCT
		PTM 去除抗体的 CDR2, 其余 CDR 与 V-n10A1 相同
115	pn10A1.m1	TLQLSDGSAVTADSVKG
116	pn10A1.m2	TLNLADGSAVTADSVKG
117	pn10A1.m3	TLQLTDGSAVTADSVKG
118	pn10A1.m4	TLNLSEGSAVTADSVKG
119	pn10A1.m5	TLNLSDVSAVTADSVKG
120	pn10A1.m6	TLNLSDASAVTADSVKG
38	hu10A1 的 CDR2 m6m5.m1	TLRLSDVSAVTADSVKG
85	hu10A1 ^b 的 CDR2 m6m5.m3	TLQLSDVSAVTADSVKG
抗 c-Met 抗体, CDR 根据 Kabat 编号定义, 粗体下划线表示		
		V-n7A12
16	VHH 氨基酸序列	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFSSNHMGWFRQAPG KQREFIA <u>YITTREITNYADSVKGR</u> FTISRDNKNTVYLQMNVL KPEDTAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGTQVTVSS
17	VHH 核苷酸序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGG CTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCTGTGTAGCCTCTGGAAAC ATCTTCAGTAGCAATCACATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCC AGGGAAGCAGCGCGAGTTCATCGCATATATTACTACTCGTGA AATCACAACACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCA TCTCCAGAGACAACACCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATG AACGTACTGAAACCTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTAT AGCAGATCAATCTAGAGAAATCCGCCGTCTCTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCG
18	CDR1	SNHMG
19	CDR2	YITTREITNYADSVKG

20	CDR3	DQSREIRRS
		V-n7A12 序列优化
		人源化, 具有与 V-n7A12 相同的 CDR1-3
121	7A12-M1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNIFSSNHMGWVRQAPGKGLEWVAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGLTVTVSS
122	7A12-M2	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCKASGNIFSSNHMGWFRQAPGKQLEWVAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNNLRSED TAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGLTVTVSS
123	7A12-M3	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCTASGNIFSSNHMGWFRQAPGKQLEWIA YITTREITNYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNNLRSED TAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGTQVTVSS
124	7A12-M4	EVQLVESGGGLIQAGGSLRLSCTASGNIFSSNHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNNLRSED TAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGLTVTVSS
		PTM 去除
125	pn7A12.N32X.m1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN TKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGTQVTVSS
126	pn7A12.N32X.m3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFSSHHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN TKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGTQVTVSS
127	pn7A12.N32X.m4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFSSFHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN TKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGTQVTVSS
128	pn7A12.N32X.m6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFSSDHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN TKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGTQVTVSS
		人源化+PTM 去除
40	pzn7A12m4.m1 (也称为 hu7A12 ^b)	EVQLVESGGGLIQAGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNNLRSED TAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGLTVTVSS
		人源化+PTM 去除+一次免疫原性去除
129	dpzn7A12m4.m1_1	EVQLVESGGGLIQAGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGLTVTVSS
130	dpzn7A12m4.m1_3	EVQLVESGGGLIQAGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGLTVTVSS
		人源化+PTM 去除+二次免疫原性去除
39	dpzn7A12m4.m1_1.m1 (也称为 hu7A12)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIA <u>DQSREIRRS</u> WGQGLTVTVSS
		PTM 去除抗体的 CDR1, 其余 CDR 同 V-n7A12
41	pn7A12.N32X.m1 (hu7A12 和 hu7A12 ^b 的 CDR1)	SYHMG
131	pn7A12.N32X.m3	SHHMG
132	pn7A12.N32X.m4	SFHMG

133	pn7A12.N32X.m6	SDHMG
		V-n9A2
21	VHH 氨基酸序列	QSQLAESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISR SIMS WYRQPPGK ERDWWA SIGSAGNTNYVDSVK GRFTISRDNVAKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCKT TLAVSFSEY WGQGTQVTVSS
22	VHH 核苷酸序列	CAAAGCCAGCTGGCCGAAAGCGGCGGCGGACTGGTGCAGAG GCGGAGGATCTCTGGGCTGTCTTGTGTGGCTTCTGGCTTTA CAATCAGCCGGTCCATCATGAGCTGGTATAGACAGCCTCCT GGCAAGGAACGGGACTGGGTCGCCAGCATCGGCAGCGCCG GCAATACAACTACGTGGACAGCGTGAAAGGCAGATTAC CATCTCCAGAGATGTGGCCAAGAACACCGTGTACCTGCAGAG TGAACAGCCTGAAGCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG CAAGACCACCCTGGCTGTGTCTTCAGCGAGTACTGGGGCC AGGGCACACAGGTGACCGTTTCTAGC
23	CDR1	RSIMS
24	CDR2	SIGSAGNTNYVDSVKG
25	CDR3	TLAVSFSEY
		V-n9A2 序列优化
		人源化, 具有与 V-n9A2 相同的 CDR1-3
42	VHH10 (也称为 hu9A2)	QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISR SIMS WYRQAPGK ERDWWA SIGSAGNTNYVDSVK GRFTISRDNVAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCKT TLAVSFSEY WGQGTQVTVSS
134	VHH8	ESQLLES GGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISR SIMS WYRQAPGK ERDWWA SIGSAGNTNYVDSVK GRFTISRDNVAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCKT TLAVSFSEY WGQGTQVTVSS
135	VHH9	ESQLLES GGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISR SIMS WYRQAPGK ERDWWA SIGSAGNTNYVDSVK GRFTISRDNVAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCKT TLAVSFSEY WGQGTQVTVSS
136	VHH11	QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISR SIMS WYRQPPGK ERDWWA SIGSAGNTNYVDSVK GRFTISRDNVAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCKT TLAVSFSEY WGQGTQVTVSS
		V-n9A10
26	VHH 氨基酸序列	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTF SSYVMS WYRQAPG KERELVALIS TTGSSTKYGDSVK GRFTISRDNVAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCNA MIGWNNH WGQGTQVTVSS
27	VHH 核苷酸序列	CAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGACTGGTTCAGC CTGGAGGATCTCTCAGACTGAGCTGCGAGGCCAGCGCTTT ACCTTCAGCTCCTACGTGATGAGCTGGTATAGACAGGCCCC TGGCAAAGAGCGGGAAGTGGTCGCCCTGATCTCTAGCACCA CCGGCAGCTCTACAAAGTACGGCGATAGCGTGAAGGGCAG ATTACAATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACACCGTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCCGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGTAATGCTATGATCGGCTGGAACAACCACTGGGGCC AGGGCACCCACGTGACAGTGTCTCTCC
28	CDR1	SYVMS
29	CDR2	LISSTGSSTKYGDSVKG
30	CDR3	MIGWNNH
抗体组件		
		连接肽
43	肽接头 1	GGGGS
44	肽接头 2	GGGSGGGGS

		抗 HSA
45	抗 HSA-AIb8	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMN LRPETAIVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
46	抗 HSA-AIb8 CDR1 (Kabat 编号)	SFGMS
47	抗 HSA-AIb8 CDR2 (Kabat 编号)	SISGSGSDTLYADSVKG
48	抗 HSA-AIb8 CDR3 (Kabat 编号)	GGSLSR
		铰链序列
49	铰链序列 1	EPKSS
50	铰链序列 2	EPKSC
		免疫球蛋白 Fc 区序列
137	扣 (Hole) 链	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
138	结 (Knob) 链	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
三特异性抗 EGFR/cMet 抗体		
单链多特异性		
51	抗体 V-1 中各 ISVD 的 拼接方式: 5B10-9A2- 7A12	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLDCSASGTIIGTYTMAWYRQAPG KQREMAIITPGGGSHHADSVDKGRFTISRDNKSTVYLQMSL KFEDTAVYYCNAKARWGTEYWGQGTQVTVSSGGGGSQSQL AESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISRIMSWSYRQPPGKERDW VASIGSAGNTNYVDSVDKGRFTISRDAKNTVYLQMNLSKPED TAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSSGGGGSQSQL VESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFSSNHMGWFRQAPGKQRE FIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNVLKPEDT AVYYCIADQSREIRRSWGQGTQVTVSS
52	抗体 V-3 中各 ISVD 的 拼接方式: 5B10- 7A12-9A2	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLDCSASGTIIGTYTMAWYRQAPG KQREMAIITPGGGSHHADSVDKGRFTISRDNKSTVYLQMSL KFEDTAVYYCNAKARWGTEYWGQGTQVTVSSGGGGSQSQL LVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFSSNHMGWFRQAPGKQRE FIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNVLKPED TAVYYCIADQSREIRRSWGQGTQVTVSSGGGGSQSQL AESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISRIMSWSYRQPPGKERDW VASIGSAGNTNYVDSVDKGRFTISRDAKNTVYLQMNLSKPED TAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSS
53	抗体 V-7 中各 ISVD 的 拼接方式: 9B8-9A2- 7A12	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPG KREFVAAINWNGGNTYNTDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMN NSLKPEDTAVYYCAVRYNSASYLVARSSDYNYWGQGLTVTVS SGGGGSQSQLAESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISRIMSWSY RQPPGKERDWASIGSAGNTNYVDSVDKGRFTISRDAKNTVY LQMNLSKPEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSSGGG

		GSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFSSNHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGTQVTVSS
54	抗体 V-9 中各 ISVD 的拼接方式: 9B8-7A12-9A2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPGKEREFVAANWNGGNTYNTDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCAVRYNSASYLVARSSDYNWGGQTLTVSSSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFSSNHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGTQVTVSSGGGGSQSQLAESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISRSMISWYRQPPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDAKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSS
55	抗体 V-13 中各 ISVD 的拼接方式: 10A1-9A2-7A12	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLNLSDGSAVTADSVKGRFTISTDNKNSVYLQMNVLKPEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTQVTVSSGGGGSQSQLAESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISRSMISWYRQPPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDAKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFSSNHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGTQVTVSS
56	抗体 V-15 中各 ISVD 的拼接方式: 10A1-7A12-9A2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLNLSDGSAVTADSVKGRFTISTDNKNSVYLQMNVLKPEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGNIFSSNHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSQSQLAESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISRSMISWYRQPPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDAKNTVYLQMNVLKPEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSS
57	抗体 V-16 中各 ISVD 的拼接方式: hu10A1-hu7A12-9A2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLRLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSQSQLAESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISRSMISWYRQPPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSS
58	抗体 V-17 中各 ISVD 的拼接方式: hu10A1-hu7A12-hu9A2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLRLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISRSMISWYRQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSS
59	抗体 V-18 中各 ISVD 的拼接方式: hu10A1-hu7A12-hu7A12	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLRLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSS

		NSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSS
60	抗体 V-19 中各 ISVD 的拼接方式: hu10A1-hu9A2-hu9A2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAPGKERERVATLRLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTASRSPSGIRYYKPDYWGQGLTVTVSSGGGGGSQSQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTISRIMSWSYRQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSSGGGGGSQSQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTISRIMSWSYRQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSS
61	抗体 V-20 中各 ISVD 的拼接方式: hu5B10-hu7A12-hu9A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGTIIGTYTMAWYRQAPGKQREMVAIITPGGGSHHADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCNAKARWGTTEYWGQGLTVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTISRIMSWSYRQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSS
62	抗体 V-21 中各 ISVD 的拼接方式: hu5B10-hu7A12-hu7A12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGTIIGTYTMAWYRQAPGKQREMVAIITPGGGSHHADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCNAKARWGTTEYWGQGLTVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSS
63	抗体 V-22 中各 ISVD 的拼接方式: hu5B10-hu9A2-hu9A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGTIIGTYTMAWYRQAPGKQREMVAIITPGGGSHHADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCNAKARWGTTEYWGQGLTVTVSSGGGGSGQSQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTISRIMSWSYRQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTISRIMSWSYRQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSS
64	抗体 V-23 中各 ISVD 的拼接方式: hu9B8-hu7A12-hu9A2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPGKEREFAAINWNQGNNTYNTDSVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLTPEDTAVYYCAVRYNQASYLVARSSDYNWYGQGLTVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTISRIMSWSYRQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSS
65	抗体 V-24 中各 ISVD 的拼接方式: hu9B8-hu7A12-hu7A12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPGKEREFAAINWNQGNNTYNTDSVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLTPEDTAVYYCAVRYNQASYLVARSSDYNWYGQGLTVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSS

66	抗体 V-25 中各 ISVD 的拼接方式: hu9B8-hu9A2-hu9A2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAP GKEREFVAAINWNQGNNTYNTDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQ MNSLTPEDTAVYYCAVRYNQASYLVARSSDYNWQGQTLV TVSSGGGGSQSQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTISR SIMSWYRQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISR DNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTV TVSSGGGGSQSQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTISR SIMSWYRQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISR DNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTV VSS
多链多特异性		
		抗 EGFR 臂
70	hu10A1-Fc 扣 (Hole) 链	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAP GKERERVATLRLSDVSAVTADSVKGRFTISTDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTASRSPSGIRYKPDYWGQGLTVTVSSEPK SDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHA LHNHYTQKSLSLSPGK*
71	hu5B10-Fc 扣 (Hole) 链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGTIIGTYTMAWYRQAPG KQREMAIITPGGSHHADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMSL RAEDTAVYYCNAKARWGTT EYWGQGLTVTVSSEPKSSDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHY TQKSLSLSPGK*
72	hu9B8-Fc 扣 (Hole) 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPG KREFVAAINWNQGNNTYNTDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN NSLTPEDTAVYYCAVRYNQASYLVARSSDYNWQGQTLTVTS SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MEALHNHYTQKSLSLSPGK*
86	hu10A1 ^b -Fc 扣 (Hole) 链	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAP GKERERVATLQLSDVSAVTADSVKGRFTISTDN SKNSVYLQMN SLRAEDTAVYYCTASRSPSGIRYKPDYWGQGLTVTVSSEPK SDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHA LHNHYTQKSLSLSPGK*
		抗 cMet 臂
69	9A2-hu7A12-Fc 结 (Knob) 链	QSQLAESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISR SIMSWYRQPPGK ERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISR DVAKN TVYLQMN SLKPEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSSGGGGS GGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPG KQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSEPKSSDKTH TC

		PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
73	hu9A2-hu7A12-Fc 结 (Knob) 链	QSQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTISRSIMSWYRQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWQGGLTVTVSSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCP PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
74	hu9A2-hu9A2-Fc 结 (Knob) 链	QSQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTISRSIMSWYRQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWQGGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
75	hu7A12-hu7A12-Fc 结 (Knob) 链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
87	9A2-hu7A12 ^b -Fc 结 (Knob) 链	QSQLAESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISRSIMSWYRQPPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWQGQTQVTVSSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLIQAGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNLRSED TAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
单链多特异性抗体形式, C 末端带抗 HSA VHH		
67	hu10A1-hu7A12-9A2-	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAP

	抗 HSA-Alb8	GKERERVATLRLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTASRSPSGIRYYPDYWGQGLTVTVSSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQA PGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG SQSQLAESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISRIMS WYRQPPG KERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDAKNTVY LQMNS LKPEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSSGGGGGSEVQL VESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS
68	hu10A1-hu7A12- hu9A2-抗 HSA-Alb8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAP GKERERVATLRLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTASRSPSGIRYYPDYWGQGLTVTVSSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQA PGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG SQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTISRIMS WYRQAPG KERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSSGGGGGSEVQL VESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS
76	hu10A1-hu7A12- hu7A12-抗 HSA-Alb8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAP GKERERVATLRLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCTASRSPSGIRYYPDYWGQGLTVTVSSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQ APGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQ APGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGK LEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS
77	hu10A1-hu9A2- hu9A2-抗 HSA-Alb8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGSLHAMGWFRQAP GKERERVATLRLSDVSAVTADSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTASRSPSGIRYYPDYWGQGLTVTVSSGGG GSQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISRIMS WYRQAP GKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGGSQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISRIMS WYRQ APGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSSGGGGG EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS
78	hu5B10-hu7A12- hu9A2-抗 HSA-Alb8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASGTITGTYTMAWYRQAPG KQREMVAITPGGGSHHADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCNAKARWGTEYWGQGLTVTVSSGGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQRE FIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGGSGGG SQSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISRIMS WYRQAPG KERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSSGGGGGSEVQL VESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS

		SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
79	hu5B10-hu7A12- hu7A12-抗 HSA-Alb8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASGTIIGTYTMAWYRQAPG KQREMVAIITPGGGSHHADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMSSL RAEDTAVYYCNAKARWGTTEYWGQGLTVTVSSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQRE FIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPGKQREFI AYITTREITNYADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSRSSQGLTVTVSS
80	hu5B10-hu9A2- hu9A2-抗 HSA-Alb8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASGTIIGTYTMAWYRQAPG KQREMVAIITPGGGSHHADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMSSL RAEDTAVYYCNAKARWGTTEYWGQGLTVTVSSGGGGSSQSL VESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISRIMSWSYRQAPGKERD WVASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNASKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSSQSQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISRIMSWSYRQAPGKERD WVASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNASKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSS ISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
81	hu9B8-hu7A12- hu9A2-抗 HSA-Alb8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPG KREFVAAINWNQGNNTYNTDSVKGRFTISRDNASKNTVYLMQ NSLTPEDTAVYYCAVRYNQASYLVARSSDYNWYGQGLTVTVS SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGW FRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNASKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGG GGGGSSQSLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISRIMSWSYR QAPGKERDWVASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNASKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSSGGGGG EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNS LRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
82	hu9B8-hu7A12- hu7A12-抗 HSA-Alb8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPG KREFVAAINWNQGNNTYNTDSVKGRFTISRDNASKNTVYLMQ NSLTPEDTAVYYCAVRYNQASYLVARSSDYNWYGQGLTVTVS SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGW FRQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNASKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWF RQAPGKQREFIAYITTREITNYADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSGGGGGSE VQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGK GLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
83	hu9B8-hu9A2-hu9A2- 抗 HSA-Alb8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSYYAMAWFRQAPG KREFVAAINWNQGNNTYNTDSVKGRFTISRDNASKNTVYLMQ NSLTPEDTAVYYCAVRYNQASYLVARSSDYNWYGQGLTVTVS SGGGGSSQSLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISRIMSWSY RQAPGKERDWVASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNASKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSSGGGG SGGGGSSQSLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTISRIMSWSY

		RQAPGKERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGLTVTVSSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNNAKTTLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS
cMet 双表位抗体, M1 分子		
88	9A2-Fc 扣 (Hole) 链:	QSQLAESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISRIMS WYRQPPGK ERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMN KPEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
89	hu7A12 ^b -Fc (Knob) 链:	EVQLVESGGGLIQAGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPG KQREFIAYITREITNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMN RSED TAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
cMet 单表位抗体		
90	M-2 分子中的 9A2-Fc 链:	QSQLAESGGGLVQSGGSLGLSCVASGFTISRIMS WYRQPPGK ERDWWASIGSAGNTNYVDSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMN KPEDTAVYYCKTTLAVSFSEYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSRDELTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
91	M-3 分子中的 hu7A12 ^b -Fc 链:	EVQLVESGGGLIQAGGSLRLSCTASGNIFSSYHMGWFRQAPG KQREFIAYITREITNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMN RSED TAVYYCIADQSREIRRSWGQGLTVTVSSEPKSSDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP RDELTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
对照抗体 M4-M7 分子		
92	M-4 分子中的 anti-Covid-19 链	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFANINMGWYRQAP GKQRELVAIAADGSTGYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCKRELGPSSWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
93	M-5、M-6 或 M-7 分子中的 anti-Covid-19	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFANINMGWYRQAP GKQRELVAIAADGSTGYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMN

	链	SLKPEDTAVYYCKRELGPFSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGS AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGEAFNIYNMGWYRQAP GKQRELVATIAADGSTGYADSVKGRFTISRDNVKNKVDLQMN SLKPEDTAVYYCKRELGPFSWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK*
--	---	---

权利要求书

[权利要求 1]

一种特异性结合cMet的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)，其中所述ISVD包含或由VHH结构域组成，其中所述VHH结构域包含

(a)SEQ ID NO:16、39-40和121-130之一所示氨基酸序列中的3个CDR；

(b)SEQ ID NO:21、42和134-136之一所示氨基酸序列中的3个CDR；或

(c)SEQ ID NO:26所示氨基酸序列中的3个CDR；

优选地，所述VHH结构域包含：

(i)包含选自SEQ ID NO:18、41和131-133之一的氨基酸序列或由其组成的CDR1、分别包含SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由其组成的CDR2和CDR3；尤其是，分别包含SEQ ID NO:41、19和20的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；

(ii)分别包含SEQ ID NO:23-25的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；或者

(iii)分别包含SEQ ID NO:28-30的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；

再优选地，所述VHH结构域包含：

(a)SEQ ID NO:16、39-40和121-130之一的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；

(b)SEQ ID NO:21、42和134-136之一的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；或

(c)SEQ ID NO:26的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；

更优选地，所述VHH结构域包含：

(a)SEQ ID NO:16、39-40和121-130之一所示的氨基酸序列；

(b)SEQ ID NO:21、42和134-136之一所示的氨基酸序列；或
(c)SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列，
尤其是，所述VHH结构域包含SEQ ID NO:39或40的氨基酸序列，
或者包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[权利要求 2]

一种特异性结合EGFR的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)，其包含
或由VHH结构域组成，其中所述VHH结构域包含

(a)SEQ ID NO:1、31和94-99之一所示氨基酸序列中的3个CDR；

(b)SEQ ID NO:6、32、100-102之一所示氨基酸序列中的3个CD
R；或

(c)SEQ ID NO:11、36、84和105-114之一所示氨基酸序列中的3个
CDR；

优选地，所述VHH结构域包含：

(i)分别包含SEQ ID NO:3-5的氨基酸序列或由其组成的CDR1、C
DR2和CDR3；

(ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或由其组成的CDR1、包含SEQ
ID NO:9、34或103的氨基酸序列或由其组成的CDR2、以及包含S
EQ ID NO:10、35或104的氨基酸序列或由其组成的CDR3；尤其是
是，分别包含SEQ ID NO:8、34和35的氨基酸序列或由其组成的C
DR1、CDR2和CDR3；或者

(iii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列或由其组成的CDR1、包含S
EQ ID NO:14、38、85、115-120之一的氨基酸序列或由其组成的
CDR2、以及包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由其组成的CDR
3；尤其是，分别包含SEQ ID NO:13、85和15，或SEQ ID NO:1
3、38和15的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；

再优选地，所述VHH结构域包含：

(a)SEQ ID NO:1、31和94-99之一的序列或与其具有至少90%、9
1%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性
的序列；

(b)SEQ ID NO:6、32、100-102之一的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；或

(c)SEQ ID NO:11、36、84和105-114之一的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；

更优选地，所述VHH结构域包含：

- (a)SEQ ID NO:1、31和94-99之一所示的氨基酸序列；
 - (b)SEQ ID NO:6、32、100-102之一所示的氨基酸序列；或
 - (c)SEQ ID NO:11、36、84和105-114之一所示的氨基酸序列；
- 尤其是，所述VHH结构域包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列，或者包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列，或者包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列，或者包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列。

- [权利要求 3] 一种结合分子，其包含根据权利要求1或2所述的ISVD。
- [权利要求 4] 根据权利要求3的结合分子，其包含或由选自以下的抗体组成：单结构域抗体、纳米抗体、重链抗体、单特异性抗体或多特异性抗体。
- [权利要求 5] 一种抗体，其包含至少一个(例如1个、2个、3个、4个或更多个)根据权利要求1所述的特异性结合cMet的ISVD。
- [权利要求 6] 根据权利要求5的抗体，其中所述抗体还包含至少一个(例如1个、2个、3个、4个或更多个)特异性结合EGFR的ISVD，优选地所述ISVD为根据权利要求2所述的ISVD。
- [权利要求 7] 根据权利要求5-6任一项的抗体，其中：
- (a)所述抗体特异性结合cMet，且包含两个特异性结合cMet上相同表位的ISVD；或者
 - (b)所述抗体特异性结合cMet，且包含两个特异性结合cMet上不同表位的ISVD。
- [权利要求 8] 根据权利要求5-7任一项的抗体，其中：

(a)所述抗体特异性结合EGFR和cMet，且包含至少一个(优选1个)特异性结合EGFR的ISVD以及两个特异性结合cMet上相同表位的ISVD，或者

(b)所述抗体特异性结合EGFR和cMet，且包含至少一个(优选1个)特异性结合EGFR的ISVD以及两个特异性结合cMet上不同表位的ISVD。

[权利要求 9]

根据权利要求5-8任一项的抗体，其中所述抗体包含特异性结合cMet的第一和第二ISVD，其中所述第一和第二ISVD分别为特异性结合cMet上相同表位的根据权利要求1所述的ISVD，

优选地，所述第一和第二ISVD包含：(i)包含选自SEQ ID NO:18或41的氨基酸序列或由其组成的CDR1、分别包含SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由其组成的CDR2和CDR3；或者(ii)分别包含SEQ ID NO:23-25的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；

再优选地，所述第一和第二ISVD包含与SEQ ID NO:16、39、40或SEQ ID NO:21或42之一所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；

再优选地，所述第一和第二ISVD包含SEQ ID NO:16、39、40或SEQ ID NO:21或42的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。

[权利要求 10]

根据权利要求5-9任一项的抗体，其中所述抗体包含特异性结合cMet的第一和第二ISVD，其中所述第一和第二ISVD分别为特异性结合cMet上不同表位的根据权利要求1所述的ISVD，

优选地，其中：所述第一ISVD包含第一抗cMet VHH结构域，所述第二ISVD包含第二抗cMet VHH结构域；或所述第一ISVD包含第二抗cMet VHH结构域，所述第二ISVD包含第一抗cMet VHH结构域，

其中所述第一抗cMet VHH结构域包含：分别包含SEQ ID NO:23-25的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；且所述第二抗cMet VHH结构域包含：包含选自SEQ ID NO:18或41的氨基酸序列或由其组成的CDR1、分别包含SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由其组成的CDR2和CDR3；

优选地，所述第一抗cMet VHH结构域包含与SEQ ID NO:21或42所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；且所述第二抗cMet VHH结构域包含与SEQ ID NO:16、39或40所示氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；

再优选地，所述第一抗cMet VHH结构域包含SEQ ID NO:21或42的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；且所述第二抗cMet VHH结构域包含SEQ ID NO:16、39或40的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。

优选地，所述第一ISVD包含第一抗cMet VHH结构域，所述第二ISVD包含第二抗cMet VHH结构域。

[权利要求 11]

根据权利要求5-10任一项的抗体，其中所述抗体还包含特异性结合EGFR的抗EGFR ISVD，其中所述抗EGFR ISVD为根据权利要求2所述的ISVD，

其中优选地所述抗EGFR ISVD包含：

(i)分别包含SEQ ID NOs:3、4和5的氨基酸序列或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；

(ii)分别包含SEQ ID NOs:8、9和10的氨基酸序列、或SEQ ID NOs:8、34和35的氨基酸序列、或SEQ ID NOs:8、103和104的氨基酸序列、或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；或者

(iii)分别包含SEQ ID NOs:13、14和15的氨基酸序列、或SEQ ID NOs:13、85和15的氨基酸序列，或SEQ ID NOs:13、38和15的氨基酸序列、或由其组成的CDR1、CDR2和CDR3；

再优选地，所述抗EGFR ISVD：

(a)包含SEQ ID NO:1、31和94-99之一所示氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；

(b)包含SEQ ID NO:6、32、100-102之一所示氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；或

(c)包含SEQ ID NO:11、36、84和105-114之一所示氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；

再优选地所述抗EGFR ISVD：

(a)包含SEQ ID NO:31所示氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；

(b)包含SEQ ID NO:32所示氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成；或

(c)包含SEQ ID NO:84所示氨基酸序列、或基本上由其组成、或由其组成。

[权利要求 12] 根据权利要求5-11任一项的抗体，其中所述抗体为单链形式或双链形式。

[权利要求 13] 根据权利要求5-12任一项的抗体，其中位于同一条多肽链上的ISVD之间经由一个或多个肽接头连接，优选地，所述肽接头包含(GGGGS)_n,其中n是1、2、3、4、5、6或7，例如，GGGGS(SEQ ID NO:43)或GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:44)。

- [权利要求 14] 根据权利要求5-13任一项的抗体，其中所述抗体还包含增加半衰期的结构部分，优选免疫球蛋白Fc区或与人血清白蛋白结合的ISVD，任选地其中：
- 所述免疫球蛋白Fc区是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的Fc区；
 - 所述与人血清白蛋白结合的ISVD为包含或由VHH结构域组成的抗HSA ISVD，其中所述VHH结构域包含SEQ ID NO:46-48的CD R1-3。
- [权利要求 15] 根据权利要求5-14任一项的抗体，其中所述抗体包含第一多肽链和第二多肽链，其中，从N端到C端，
- 第一多肽链包含：特异性结合cMET的第一ISVD和免疫球蛋白Fc区；
- 第二多肽链包含：特异性结合cMET的第二ISVD和免疫球蛋白Fc区，
- 优选地，其中：
- 第一多肽链包含SEQ ID NO:88的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；且
 - 第二多肽链包含SEQ ID NO:89的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列，
- 再优选地，其中所述第一多肽链包含SEQ ID NO:88的序列或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:89的序列或由其组成。
- [权利要求 16] 根据权利要求5-14任一项的抗体，其中所述抗体包含第一多肽链和第二多肽链，其中，从N端到C端
- 第一多肽链包含：特异性结合EGFR的ISVD和免疫球蛋白Fc区，
- 第二多肽链包含：特异性结合cMET的第一ISVD、肽接头、特异性结合cMET的第二ISVD和免疫球蛋白Fc区。

- [权利要求 17] 根据权利要求5-14任一项的抗体，其中所述抗体包含单个多肽链，
其中，所述多肽链包含：特异性结合cMET的第一ISVD、特异性结合cMET的第二ISVD，以及特异性结合EGFR的ISVD，和任选地特异性结合HSA的ISVD，
优选地，从N端到C端，所述多肽链包含：
特异性结合EGFR的ISVD、第一肽接头、特异性结合cMET的第一ISVD、第二肽接头、特异性结合cMET的第二ISVD、以及任选地第三肽接头和特异性结合HSA的ISVD。
- [权利要求 18] 根据权利要求16的抗体，其中所述抗体包含第一多肽链和第二多肽链，其中：
-第一多肽链包含选自SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:86的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列，
-第二多肽链包含选自SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、或SEQ ID NO:87的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；且
优选地，其中：
(i)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73、75或74的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；
(ii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:72或86的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；

O:73、75或74的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；；

(iii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73、75或74的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；

(iv)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列、或由其组成；

再优选地，其中：

(i)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列、或由其组成；

(ii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列、或由其组成；

(iii)所述第一多肽链包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列、或由其组成；且所述第二多肽链包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列、或由其组成。

[权利要求 19]

根据权利要求17的抗体，其中所述抗体包含单条多肽链，其中所述多肽链包含选自SEQ ID NO:51-66的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性

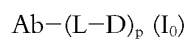
- 的序列；或者其中所述多肽链包含选自SEQ ID NO:67-68和76-83的序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列；
优选地其中所述多肽链包含选自SEQ ID NO:51-56的序列或由其组成。
- [权利要求 20] 根据权利要求5-19中任一项所述的抗体，其为特异性结合EGFR和cMet的多特异性抗体，且具有一个或多个以下特性：
- (1)以中等或较低亲和力结合EGFR，例如人EGFR；且特异性结合cMet，例如人cMet；
 - (2)与细胞表面表达的EGFR以较低水平结合；且特异性结合细胞表面表达的cMet；
 - (3)在配体HGF存在下，阻断配体HGF与细胞表面的cMet结合；
 - (4)被表达cMet的细胞内化；
 - (5)被表达EGFR的细胞内化；
 - (6)与人EGFR和食蟹猴EGFR具有交叉反应性；且与人cMet和食蟹猴cMet具有交叉反应性。
- [权利要求 21] 一种抗体，其包含至少一个根据权利要求2所述的特异性结合EGFR的ISVD，任选地还包含至少一个特异性结合cMet的ISVD，优选地所述特异性结合cMet的ISVD为根据权利要求1所述的ISVD。
优选地，所述抗体具有以下一个或多个特性：
- (1)以低亲和力结合EGFR，例如人EGFR；
 - (2)与人EGFR和食蟹猴EGFR具有交叉反应性。
- [权利要求 22] 分离的核酸，其编码权利要求1或2所述的ISVD、权利要求3或4所述的结合分子、或权利要求5-21任一项所述的抗体。
- [权利要求 23] 包含权利要求22的核酸的载体，优选地所述载体是表达载体。
- [权利要求 24] 包含权利要求22的核酸或权利要求23的载体的宿主细胞，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，更优选的选自大肠杆菌细胞、

酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备ISVD的其它细胞，最优选地，所述宿主细胞是HEK 293细胞或CHO细胞。

[权利要求 25] 一种制备方法，所述方法包括培养权利要求24的宿主细胞，任选地从所述宿主细胞或从培养基回收权利要求1或2所述的ISVD、权利要求3或4所述的结合分子、或权利要求5-21任一项所述的抗体。

[权利要求 26] 包含权利要求1或2所述的ISVD、权利要求3或4所述的结合分子、或权利要求5-21任一项所述的抗体的免疫缀合物或免疫融合物。

[权利要求 27] 具有式(I₀)的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物：



其中：

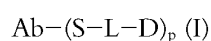
Ab是权利要求1或2所述的ISVD、权利要求3或4所述的结合分子、或权利要求5-21任一项所述的抗体；

L是连接子；

D是药物，例如抗肿瘤化合物；

p是选自1至16的整数，例如选自1-10、1-9、2-8、4-10、6-8、3-7、4-6、2-6的整数，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

[权利要求 28] 根据权利要求27所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体药物偶联物具有式(I)：



其中：

Ab是权利要求1或2所述的ISVD、权利要求3或4所述的结合分子、或权利要求5-21任一项所述的抗体；

L是连接子；

D是药物，例如抗肿瘤化合物；

p是选自1至16的整数，例如选自1-10、1-9、2-8、4-10、6-8、3-7、4-6、2-6的整数，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或12；和

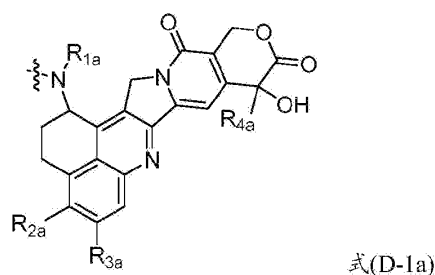
式(I)中的S是来自Ab的硫。

[权利要求 29]

根据权利要求27或28所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述药物是细胞毒性剂，例如喜树碱类化合物或澳瑞他汀类化合物。

[权利要求 30]

根据权利要求27-29任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中D具有式(D-1a)或式(D-1b)所示结构：



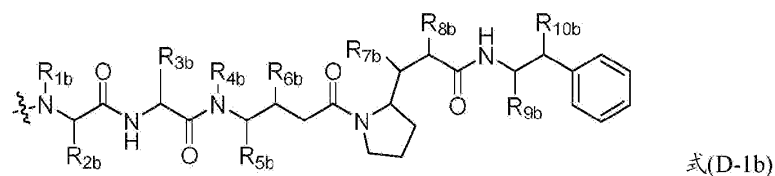
其中R_{1a}选自H和C₁-C₆烷基；

R_{2a}选自H、卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆卤代烷基、-OR_{5a}和-SR_{5a}；

R_{3a}选自H、卤素、CN、C₁-C₆烷基、C₁-C₆卤代烷基和-OR_{5a}；且

R_{4a}和R_{5a}独立地选自H和C₁-C₄烷基；

或者



其中R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b}和R_{8b}各自独立地选自C₁₋₈烷基；优选C₁₋₄烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；

R_{6b}和R_{7b}各自独立地选自C₁₋₈烷氧基，例如甲氧基、乙氧基或丙氧基；

R_{9b}选自C₁₋₈烷基和COOH；优选C₁₋₄烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或仲丁基；且

R_{10b}选自OH和H；

D结构式中的波浪线表示该价键与L连接。

[权利要求 31] 根据权利要求30所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中D具有式(D-1a)的结构，并且其中R_{1a}为H；R_{2a}为C₁–C₆烷基；R_{3a}为卤素，优选为–F；R_{4a}为C₁–C₄烷基，优选为乙基。

[权利要求 32] 根据权利要求30所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中D具有式(D-1b)的结构，并且其中

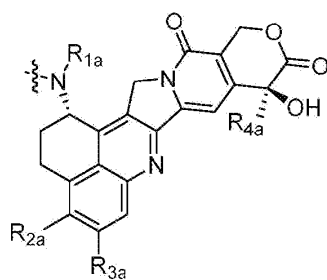
R_{1b}、R_{4b}和R_{8b}各自独立地选自C_{1–2}烷基；优选甲基；

R_{2b}、R_{3b}和R_{5b}各自独立地选自C_{3–4}烷基；

R_{6b}和R_{7b}各自独立地选自C_{1–2}烷氧基；且

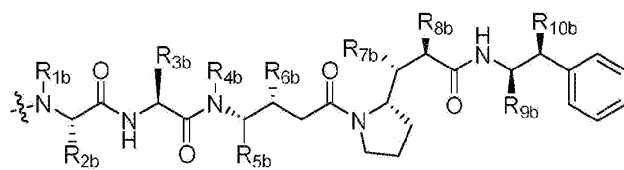
R_{9b}选自C_{1–4}烷基且R_{10b}为OH；或R_{9b}为COOH且R_{10b}为H。

[权利要求 33] 根据权利要求27–32任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中D具有式(D-2a)或式(D-2b)所示的结构：



式(D-2a),

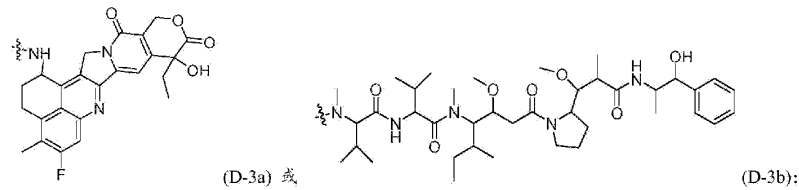
其中R_{1a}、R_{2a}、R_{3a}和R_{4a}如式(D-1a)中所定义；或



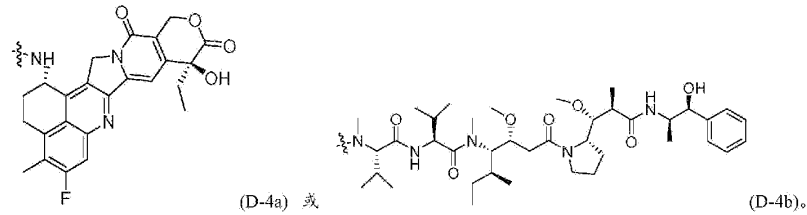
式(D-2b)

其中R_{1b}、R_{2b}、R_{3b}、R_{4b}、R_{5b}、R_{6b}、R_{7b}、R_{8b}、R_{9b}和R_{10b}如式(D-1b)中所定义。

[权利要求 34] 根据权利要求27–29任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中D具有式(D-3a)或(D-3b)所示的结构：

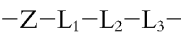


优选地，D具有式(D-4a)或(D-4b)所示的结构：



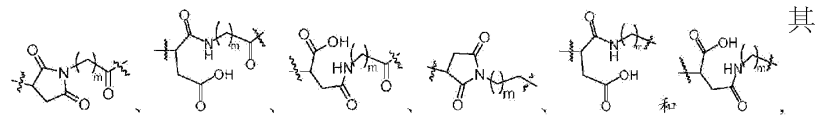
[权利要求 35] 根据权利要求27-29任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述药物是依喜替康(Exatecan)、Dxd、S N-38、单甲基溴瑞他汀E(MMAE)或MMAF。

[权利要求 36] 根据权利要求27-35任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中-L-具有如下结构：



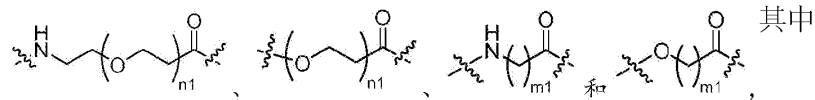
其中

Z选自



中m为选自1-10的整数，例如为1、2、3、4、5、6、7或8；

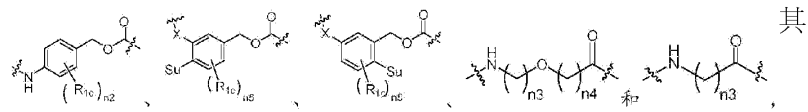
L₁选自不存在、



n₁和m₁各自独立地为选自0-20的整数，例如选自0-12的整数，例如1、2、3、4、5、6、7或8；

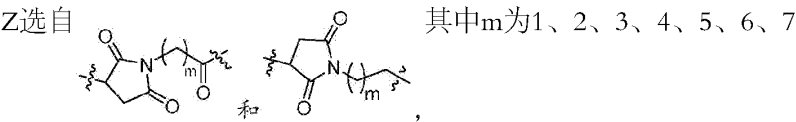
L₂是氨基酸残基或由2-8个氨基酸构成的肽残基；且

L₃选自：



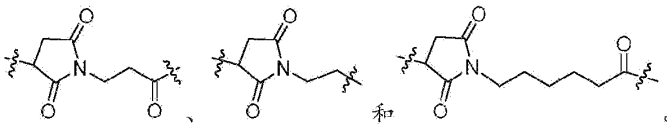
中X选自-NH-、-O-和-S-；R_{1c}各自独立地选自C₁₋₈烷基、C₁₋₈卤代烷基-、C₁₋₈烷氧基、卤素、硝基和氰基；Su各自独立地选自戊糖、戊糖醛酸、己糖和己糖醛酸；n₂为0、1、2、3或4；n₅为0、1、2或3；n₃和n₄独立地为1、2、3、4、5或6；和
其中，Z与Ab上的S连接，L₃与D连接。

[权利要求 37] 根据权利要求36所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中

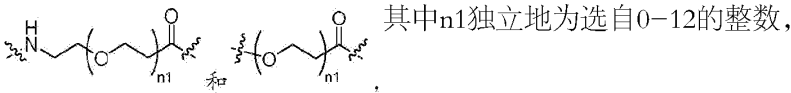


或8；

优选地，Z选自

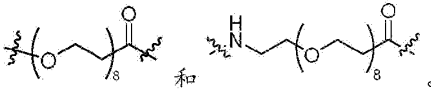


[权利要求 38] 根据权利要求36或37所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中L₁选自不存在、



例如1、2、3、4、5、6、7或8；

优选地，L₁选自不存在、



[权利要求 39] 根据权利要求36-38任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中L₂是氨基酸残基或由2、3、4、5、6或7个氨基酸构成的肽残基；优选地，其中所述氨基酸残基或氨基酸各自独立地选自缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、赖氨酸(Lys)、

瓜氨酸(Cit)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、异亮氨酸(Ile)、精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、甲硫氨酸(Met)、色氨酸(Trp)、半胱氨酸(Cys)、组氨酸(His)和苏氨酸(Thr);

更优选地,所述氨基酸残基或氨基酸各自独立地选自甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、瓜氨酸(Cit)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)、谷氨酸(Glu)和谷氨酰胺(Gln);

还更优选地,所述氨基酸残基或氨基酸各自独立地选自甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、丙氨酸(Ala)、瓜氨酸(Cit)和谷氨酸(Glu)。

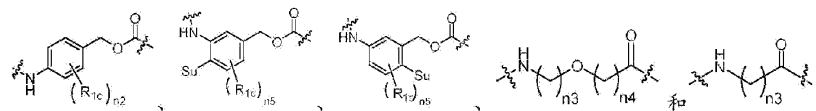
[权利要求 40]

根据权利要求36-38任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中 L_2 选自 $-Ala-$ 、 $-Val-$ 、 $-Gly-$ 、 $-Val-Ala-$ 、 $-Val-Cit-$ 、 $-Glu-Val-Cit-$ 、 $-Gly-Gly-Phe-Gly-$;

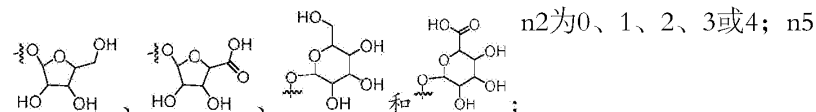
优选地, L_2 选自 $-Gly-$ 、 $-Val-Ala-$ 、 $-Val-Cit-$ 、 $-Glu-Val-Cit-$ 和 $-Gly-Gly-Phe-Gly-$ 。

[权利要求 41]

根据权利要求36-40任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中 L_3 选自:



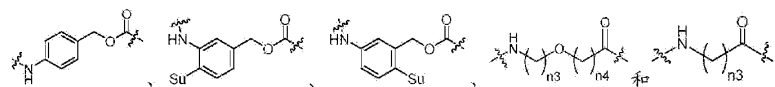
其中 R_{1c} 各自独立地选自 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 卤代烷基、 C_{1-8} 烷氧基、卤素、硝基和氰基; Su各自独立地选自



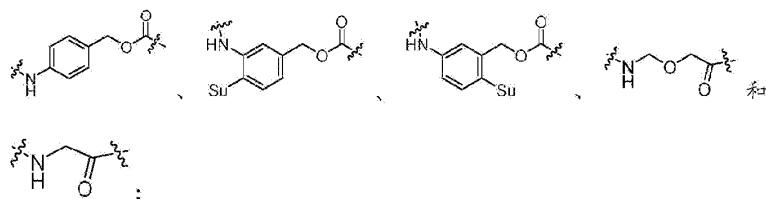
为0、1、2或3; 和 n_3 和 n_4 独立地为1、2、3、4、5或6。

[权利要求 42]

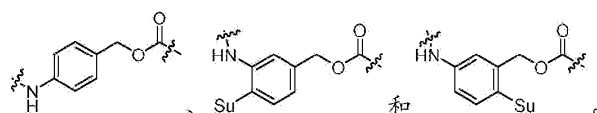
根据权利要求36-41任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中 L_3 选自:



优选地，L₃选自：

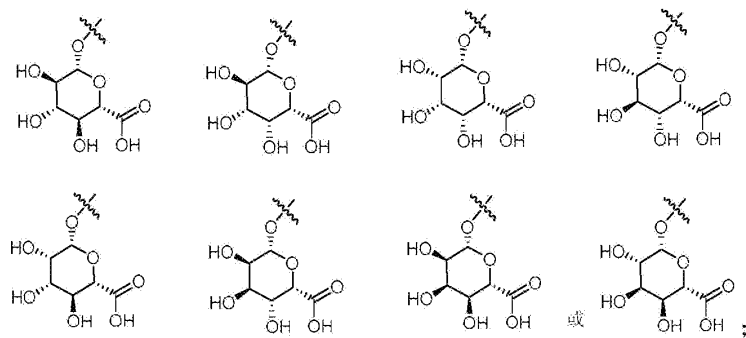


更优选地，L₃选自：

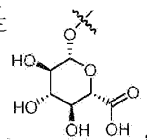


[权利要求 43]

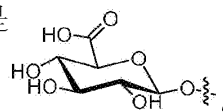
根据权利要求36-42任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中Su各自独立地是：



优选地，Su各自独立地是

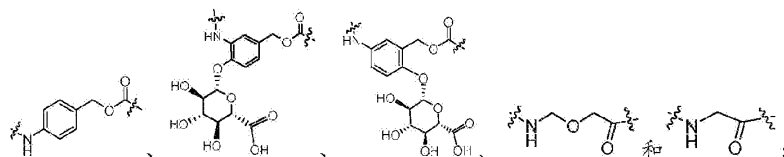


另外优选地，Su各自独立地是

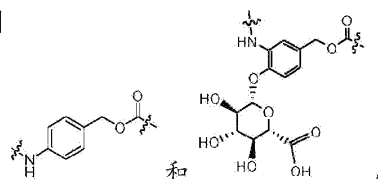


[权利要求 44]

根据权利要求36-43任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中L₃选自：

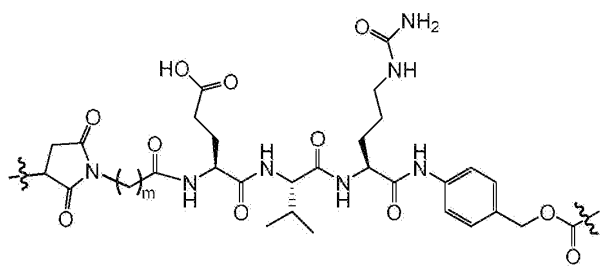
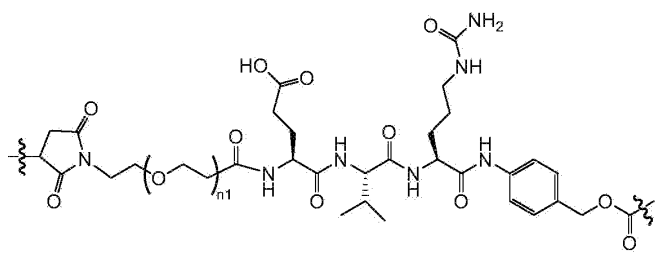
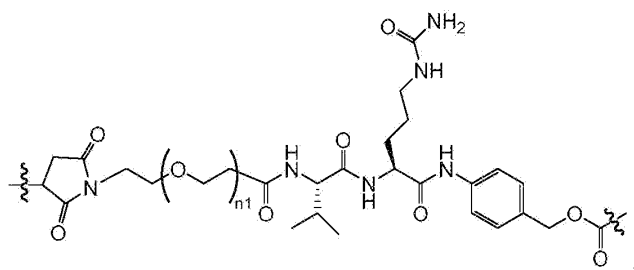
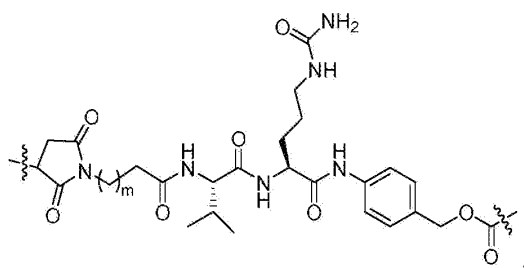
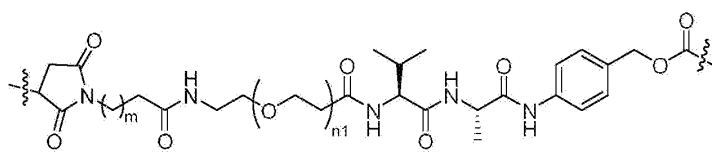


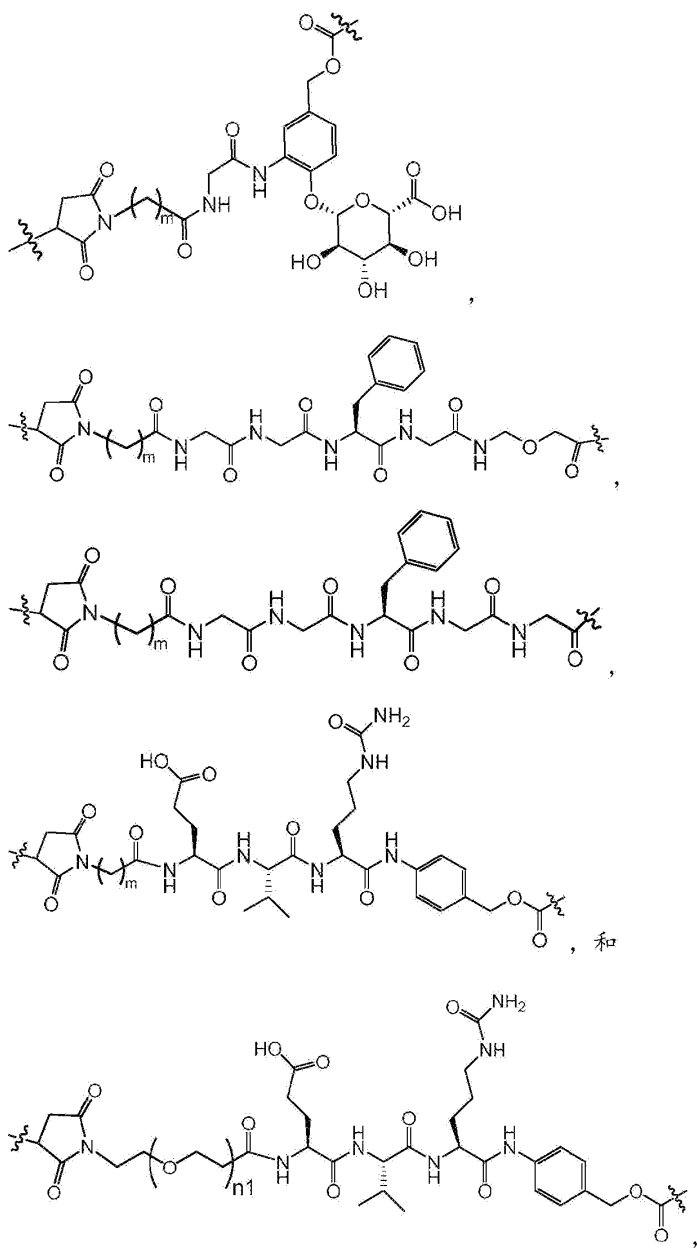
优选地， L_3 选自



[权利要求 45]

根据权利要求36所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中-Z-L₁-L₂-L₃-各自独立地选自如下结构：





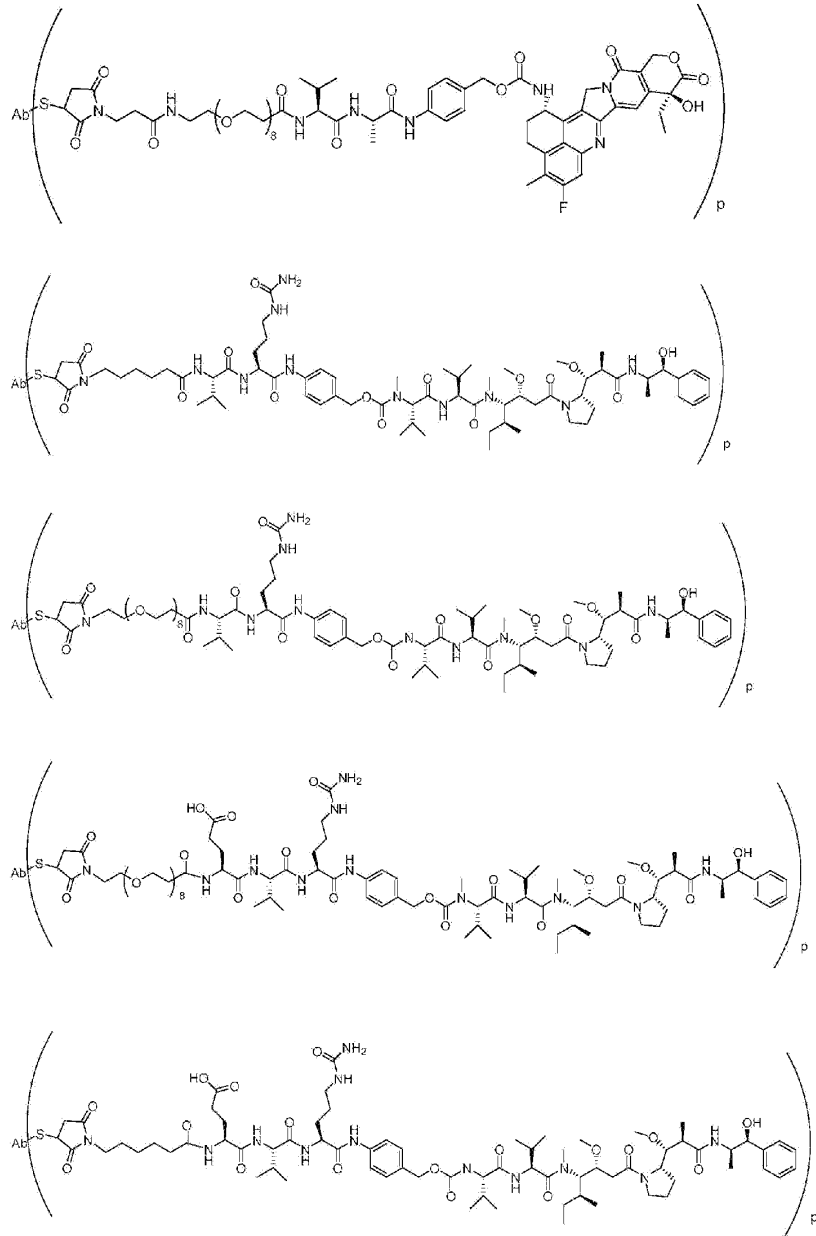
其中, m 各自独立地为选自1-10的整数, 例如为1、2、3、4、5、6、7或8;

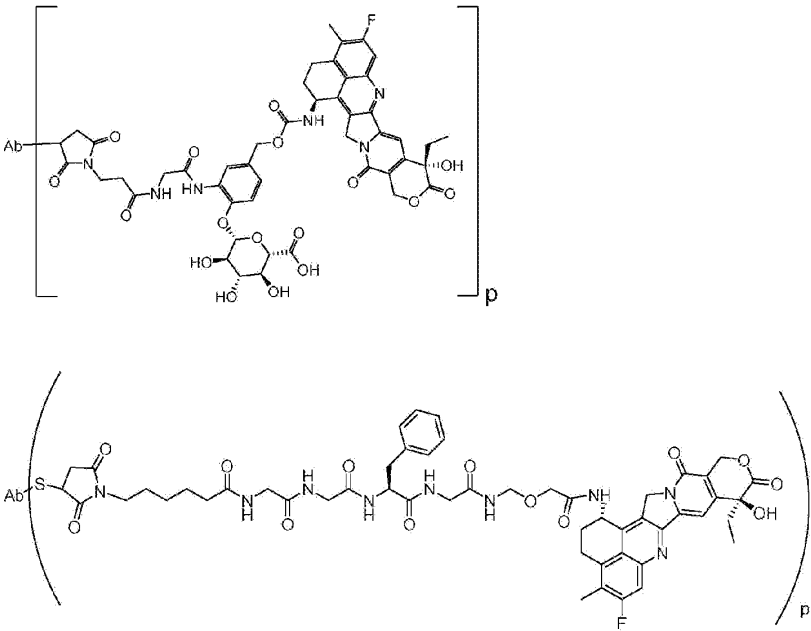
n_1 独立地为选自0-12的整数, 例如1、2、3、4、5、6、7或8, 优选为6或8; 和

其中, 所述基团左侧与Ab上的S连接, 右侧与D连接。

[权利要求 46]

根据权利要求27或28所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体药物偶联物是具有选自如下的结构的抗体药物偶联物：





其中Ab为权利要求1或2所述的ISVD、权利要求3或4所述的结合分子、或权利要求5-21任一项所述的抗体；和
p是选自1至16的整数，例如选自1-10、1-9、2-8、4-10、6-8、3-7、4-6、2-6的整数，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

[权利要求 47] 根据权利要求27-46任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中所述抗体-药物偶联物具有2-10、6-10、4-8、7-9或2-4或2-6的平均DAR。

[权利要求 48] 药物组合物，其包含权利要求1或2所述的ISVD、权利要求3或4所述的结合分子、权利要求5-21任一项所述的抗体、权利要求26所述的免疫缀合物或免疫融合物或者权利要求27-47任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物，以及可药用载体，并且任选地还包含一种或多种另外的药学活性多肽和/或化合物，例如，还包含选自溶瘤药物、细胞毒性剂、细胞因子和免疫检查点分子的抑制剂的其它治疗剂。

[权利要求 49] 权利要求1或2所述的ISVD、权利要求3或4所述的结合分子、权利要求5-21任一项所述的抗体、或权利要求26所述的免疫缀合物或免疫融合物或者权利要求27-47任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的用途，用作药物或用于制备药物，其中优选地所述药物用于治疗癌症，例如选自肺癌(例如肺鳞状细胞癌、肺腺癌、非小细胞肺癌)、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、胃癌、结肠癌和头颈癌(例如咽鳞癌)。