特异性结合 CDCP1 的单域抗体及其应用

技术领域

本发明涉及特异性结合 CDCP1 的单域抗体或其抗原结合片段，含有所述单域抗体或其抗原结合片段的多肽构建体和缀合物，编码所述单域抗体或其抗原结合片段的核酸分子及包含其的宿主细胞，以及相关用途。

背景技术

CUB 结构域包含蛋白 1(CUB-domain containing protein 1，CDCP1) 是总长度由 836 个氨基酸组成的 I 型跨膜蛋白。CDCP1 编码一个 135 kDa 的蛋白，胞外区有三个 CUB 结构域，CUB1 结构域与 CUB2 结构域之间的第 368/369 位或第 369/370 位的氨基酸位点被丝氨酸蛋白酶水解切割产生 70kDa 的片段（cleaved CDCP1）， CDCP1 的过表达和水解激活都有助于肿瘤患者细胞黏附的丧失，迁移的增加和不良预后/生存。在胞外域的 N 端侧具有 14 个 N-糖基化位点，已观察到 N-糖基化是 CDCP1 蛋白稳定和质膜定位的前提条件，且糖基化程度与癌细胞的转移性之间具有相关性。CDCP1 的细胞质结构域包含 5 个保守的酪氨酸残基，是 Src 家族激酶(SFK，如 Src、Fyn 和 Yes)的磷酸化位点。

CDCP1 在结肠直肠癌、肾癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌等肿瘤细胞中高表达，通过与肿瘤侵袭性中的重要信号传导途径相互作用，增加了癌细胞的迁移和侵袭性以及细胞存活率，CDCP1 过度表达与肿瘤预后较差有关。

专利 US20080008719A1 描述了抗 hCDCP1 单克隆抗体（克隆名： 25A11）以及使用该抗体的前列腺癌的筛选方法、诊断方法和治疗方法，公开了 25A11 上结合有皂草素的 ADC(antibody-drug-conjugate)化抗体在体外对 PC-3 癌细胞株显示出细胞毒性活性，通过将该 ADC 化抗体静脉内给药而发挥显著的肿瘤生长抑制活性。专利 US20200181281A1 描述了多个抗 CDCP1 抗体，公开了通过 MMAE(monomethyl auristatin E， 一甲基澳瑞他汀 E)而 ADC 化的抗 hCDCP1 抗体在体外对人结肠癌细胞株或乳腺癌显示出细胞毒性活性，且对移植了人结肠癌细胞株或乳腺癌细胞株的小鼠移植瘤模型中显示出抗肿瘤活性。专利 CN115176013A 描述了多个与人 CDCP1 结合且与人 CD34 阳性细胞的结合性低的抗 CDCP1 抗体，公开了通过吡咯并苯并二氮杂卓(PBD：pyrrolobenzodiazepine)而 ADC 化的抗 hCDCP1 抗体在体外对不同肿瘤细胞株显示出细

胞毒性活性，且对移植了人结肠癌细胞株或前列腺癌细胞株的小鼠移植瘤模型中显示出抗肿瘤活性。

常规抗体的分子量约 **150 kDa**。来源于羊驼的单域抗体，纳米抗体，和人的 **Fc** 融合之后分子量只有大约 **75kDa**，只有常规抗体的一半，可以渗透进入肿瘤更核心部位，最大限度增加抗体药物结合肿瘤细胞的机会，产生更好的诊断和治疗肿瘤的效果。

因此，提供一种针对 **CDCP1** 的单域抗体将具有较好的诊断和治疗肿瘤的前景。

发明内容

本申请的发明人经过大量的研究，筛选获得了系列抗 **CDCP1** 的单域抗体以及多肽构建体，所述单域抗体或多肽构建体与 **CDCP1** 具有高结合活性。特别地，本发明的单域抗体或多肽构建体能够增加肿瘤细胞的内吞活性，并对肿瘤细胞具有较强的杀伤活性。在此基础上，由所述单域抗体制备的人源化单域抗体或多肽构建体仍然具有这些突出的活性。并且，所述单域抗体或多肽构建体还具有分子量小，易于生产等特点。

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

<u>单域抗体及其抗原结合片段</u>

因此，在一方面，本申请提供了能够特异性结合 **CUB** 结构域包含蛋白 **1**（**CDCP1**）的单域抗体或其抗原结合片段，所述单域抗体或其抗原结合片段包含：

(a) CDR1，其具有：如 **SEQ ID NOs: 1**、**4**、**7** 任一项所示的序列，或与 **SEQ ID NOs: 1**、**4**、**7** 任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 **1** 个，**2** 个或 **3** 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

(b) CDR2，其具有：如 **SEQ ID NOs: 2**、**5**、**8** 任一项所示的序列，或与 **SEQ ID NOs: 2**、**5**、**8** 任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 **1** 个，**2** 个或 **3** 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；以及

(c) CDR3，其具有：如 **SEQ ID NOs: 3**、**6**、**9** 任一项所示的序列，或与 **SEQ ID NOs: 3**、**6**、**9** 任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 **1** 个，**2** 个或 **3** 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列。

在某些实施方案中，所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，所述单域抗体或其抗原结合片段包含：如 **SEQ ID NO: 1** 所示的 **CDR1**；如 **SEQ ID NO: 2** 所示的 **CDR2**；以及，如 **SEQ ID NO: 3** 所示的 **CDR3**。

在某些实施方案中，所述单域抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 4 所示的 CDR1；如 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR2；以及，如 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR3。

在某些实施方案中，所述单域抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 7 所示的 CDR1；如 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR2；以及，如 SEQ ID NO: 9 所示的 CDR3。

在另一方面，本申请提供了特异性结合 CUB 结构域包含蛋白 1（CDCP1）的单域抗体或其抗原结合片段，所述单域抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 10-27 任一项所示的重链可变区（VHH）中含有的 3 个 CDR。

在某些实施方案中，所述 VHH 中含有的 3 个 CDR 由 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

在某些实施方案中，如前所述的单域抗体或其抗原结合片段，其包含选自下列的氨基酸序列：

（i）如 SEQ ID NO: 10-27 任一项所示的序列；

（ii）与 SEQ ID NO: 10-27 任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个或 8 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 10-27 任一项所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列。

在某些实施方案中，所述的置换是保守置换。

单域抗体及其抗原结合片段

在另一方面，本申请提供了特异性结合 CDCP1 的多肽构建体，其包含如前所述的单域抗体或其抗原结合片段，以及免疫球蛋白 Fc 结构域。

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

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

在某些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 结构域包含 SEQ ID NO：28 或 29 所示的序

列，或与其相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的序列（例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的序列；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的序列）。

在某些实施方案中，所述多肽构建体具有如 SEQ ID NO: 30-47 任一项所示的序列。

分离的核酸分子

在另一方面，本申请还提供了分离的核酸分子，其编码如上所述的单域抗体或其抗原结合片段，或者如前所述的多肽构建体。

载体

在另一方面，本申请还提供了载体，其包含如上所述的核酸分子。在某些实施方案中，所述载体为克隆载体或表达载体。

宿主细胞

在另一方面，本申请还提供了宿主细胞，其包含如上所述的核酸分子或载体。此类宿主细胞包括但不限于，原核细胞例如细菌细胞（如大肠杆菌细胞），以及真核细胞例如真菌细胞（例如酵母细胞），昆虫细胞，植物细胞和动物细胞（如哺乳动物细胞，例如小鼠细胞、人细胞等）。在某些实施方案中，所述宿主细胞是微生物。

制备方法

本发明的单域抗体可以通过本领域已知的各种方法来制备，例如通过基因工程重组技术来获得。例如，通过化学合成或 PCR 扩增获得编码本发明单域抗体的 DNA 分子。将所得 DNA 分子插入表达载体内，然后转化/转染宿主细胞。然后，在特定条件下培养转化/转染后的宿主细胞，并表达本发明的单域抗体。

本发明的抗原结合片段可以通过水解完整的纳米抗体分子获得（参见 **Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985)**）。另外，这些抗原结合片段也可以直接由重组宿主细胞产生（**reviewed in Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)**）。本领域的普通技术人员完全知晓制备这些抗原结合片段的其它技术。

在另一方面，本申请还提供了制备如上所述的单域抗体或其抗原结合片段或者如前所述的多肽构建体的方法，其包括，在允许蛋白表达的条件下，培养如上所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述单域抗体或其抗原结合片段或者回收如前所

述的多肽构建体。

双特异性或多特异性抗体

在另一方面，本申请还提供了双特异性或多特异性抗体，其包含如上所述的单域抗体或其抗原结合片段或者如前所述的多肽构建体。

在某些实施方案中，所述双特异性或多特异性抗体特异性结合 **CDCP1**，并且额外地特异性结合一个或多个其他靶标。

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

缀合物

在一方面，本申请还提供了缀合物，其包含如上所述的单域抗体或其抗原结合片段或者如前所述的多肽构建体，以及连接于所述单域抗体或其抗原结合片段的治疗剂。

在某些实施方案中，所述治疗剂选自细胞毒剂。

在某些实施方案中，所述治疗剂选自烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂，及其任意组合。

在某些实施方案中，所述缀合物是抗体-药物偶联物（**ADC**）。

药物组合物

在一方面，本申请还提供了一种药物组合物，其包含如前所述的单域抗体或其抗原结合片段或者如前所述的多肽构建体，或如前所述的双特异性或多特异性抗体或者如前所述的缀合物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在某些实施方案中，药物组合物还包含另外的药学活性剂。

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

在某些实施方案中，所述单域抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性抗体或缀合物与所述另外的药学活性剂作为分离的组分或作为同一组合物的组分提供。

试剂盒

在另一方面，本申请还提供了试剂盒，其包含如上所述的单域抗体或其抗原结合片段或者如前所述的多肽构建体。

在某些实施方案中，所述单域抗体或其抗原结合片段或者所述多肽构建体带有可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶）、放射性核素、荧光染料、发光物质（如化学发光物质）或生物素。

在某些实施方案中，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别如前所述的单域抗体或其抗原结合片段或者如前所述的多肽构建体。

在某些实施方案中，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶）、放射性核素、荧光染料、发光物质（如化学发光物质）或生物素。

嵌合抗原受体

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

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

分离的核酸分子

在另一方面，本申请还提供了分离的核酸分子，其编码如前所述的嵌合抗原受体。

载体

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

宿主细胞

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

用途

在另一方面，本申请还提供了如前所述的单域抗体或其抗原结合片段，或如前所述的多肽构建体，或如前所述的双特异性或多特异性抗体，或如前所述的缀合物，或如前所述的药物组合物，或如前所述的试剂盒，或如前所述的嵌合抗原受体，在制备药物中的用途，所述药物用于在受试者中预防和/治疗肿瘤。

在某些实施方案中，所述肿瘤表达 **CDCP1**。

在某些实施方案中，所述药物用于抑制表达 **CDCP1** 的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞。

在某些实施方案中，药物还包含另外的药学活性剂。

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

在某些实施方案中，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿（**mycosis fungoids**）、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤（**CHL**）、原发性纵膈大 **B** 细胞淋巴瘤、**T** 细胞/组织细胞的富 **B** 细胞淋巴瘤、**EBV** 阳性和阴性 **PTLD** 和 **EBV** 相关弥漫性大 **B** 细胞淋巴瘤（**DLBCL**）、浆母细胞性淋巴瘤、结外 **NK/T** 细胞淋巴瘤、鼻咽癌和 **HHV8** 相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统（**CNS**）肿瘤，例如原发性 **CNS** 淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤。

在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

在另一方面，本申请还提供了如前所述的单域抗体或其抗原结合片段或者如前所述的多肽构建体在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测肿瘤是否能够通过靶向 **CDCP1** 的抗肿瘤疗法来治疗。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记。

在某些实施方案中，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿（**mycosis fungoids**）、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤（**CHL**）、原发性纵膈大 **B** 细胞淋巴瘤、**T** 细胞/组织细胞的富 **B** 细胞淋巴瘤、**EBV** 阳性和阴性 **PTLD** 和 **EBV** 相关弥漫性大 **B** 细胞淋巴瘤（**DLBCL**）、浆母细胞性淋巴瘤、结外 **NK/T** 细胞淋巴瘤、鼻咽癌和 **HHV8** 相关原发性渗出性淋巴

瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统（CNS）肿瘤，例如原发性 CNS 淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤。

方法

在另一方面，本申请还提供了一种检测 CDCP1（例如人 CDCP1）在样品中的存在或其量的方法，其包括以下步骤：

(1) 将所述样品与如前所述的单域抗体或其抗原结合片段或者如前所述的多肽构建体接触；

(2) 检测所述抗体或其抗原结合片段或者所述多肽构建体与 CDCP1 之间复合物的形成或检测所述复合物的量。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段或者所述多肽构建体带有可检测的标记。

在某些实施方案中，所述方法用于治疗目的，诊断目的，或者非治疗非诊断目的。

在另一方面，本申请还提供了一种用于降低 CDCP1 在细胞表面的表达水平的方法，其包括将所述细胞与如前所述的单域抗体或其抗原结合片段，或者如前所述的多肽构建体，或如前所述的双特异性或多特异性抗体，或如前所述的缀合物，或如前所述的药物组合物，或如前所述的试剂盒接触，使得 CDCP1 在所述细胞表面的表达水平降低；其中，所述细胞在其表面表达 CDCP1。

在某些实施方案中，所述细胞是表达 CDCP1 的肿瘤细胞。

在某些实施方案中，所述方法用于治疗目的，诊断目的，或者非治疗非诊断目的。

在另一方面，本申请还提供了一种预防和/治疗肿瘤的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的如前所述的单域抗体或其抗原结合片段，或如前所述的多肽构建体，或如前所述的双特异性或多特异性抗体，或如前所述的缀合物，或如前所述的药物组合物，或如前所述的试剂盒，或如前所述的嵌合抗原受体。

在某些实施方案中，所述肿瘤表达 CDCP1。

在某些实施方案中，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直

肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿（mycosis fungoids）、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤（CHL）、原发性纵膈大 B 细胞淋巴瘤、T 细胞/组织细胞的富 B 细胞淋巴瘤、EBV 阳性和阴性 PTLD 和 EBV 相关弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）、浆母细胞性淋巴瘤、结外 NK/T 细胞淋巴瘤、鼻咽癌和 HHV8 相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统（CNS）肿瘤，例如原发性 CNS 淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤。

在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

在另一方面，本申请还提供了一种检测肿瘤是否能够通过靶向 CDCP1 的抗肿瘤疗法来治疗的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的如前所述的单域抗体或其抗原结合片段或者如前所述的多肽构建体。

在某些实施方案中，所述单域抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记。

在某些实施方案中，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿（mycosis fungoids）、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤（CHL）、原发性纵膈大B细胞淋巴瘤、T细胞/组织细胞的富B细胞淋巴瘤、EBV阳性和阴性PTLD和EBV相关弥漫性大B细胞淋巴瘤（DLBCL）、浆母细胞性淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌和HHV8相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统（CNS）肿瘤，例如原发性 CNS淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤。

术语定义

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

当本文使用术语“例如”、“如”、“诸如”、“包括”、“包含”或其变体时，这些术

语将不被认为是限制性术语，而将被解释为表示“但不限于”或“不限于”。

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

如本文中所使用的，术语“单域抗体”具有本领域技术人员通常理解的含义，其是指由单个单体可变抗体结构域（例如单个重链可变区）所组成的抗体片段，通常来源于重链抗体（例如骆驼科动物抗体或鲨鱼抗体）的可变区。典型地，纳米抗体由4个构架区和3个互补性决定区组成，具有FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的结构。纳米抗体可在N端或C端处截短以使其仅包含部分FR1和/或FR4，或缺少那些骨架区中的一个或两个，只要其实质上保持抗原结合和特异性即可。单域抗体也称为纳米抗体，两者可互换使用。

如本文中所使用的，术语单域抗体的“抗原结合片段”是指包含单域抗体的片段的多肽，其保持特异性结合单域抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与单域抗体竞争对抗原的特异性结合，其也被称为“抗原结合部分”。通常参见，Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第2版，Raven Press, N.Y. (1989)，其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组DNA技术或通过本发明纳米抗体的酶促或化学断裂产生本发明抗体的抗原结合片段。在一些实施方案中，所述单域抗体的“抗原结合片段”与全长单域抗体相比可在N端或C端处截短以使其仅包含部分FR1和/或FR4，或缺少那些骨架区中的一个或两个，只要其实质上保持抗原结合和特异性即可。

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

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

如本文中所使用的，术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区中负责抗原结合的氨基酸残基。在纳米抗体中含有三个CDR，命名为CDR1、CDR2和CDR3。这些CDR的精确边界可根据本领域已知的各种编号系统进行定义，例如可按照Kabat编号系统（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public

Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991）、Chothia编号系统（Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人 (1989) Nature 342:878-883）或IMGT编号系统（Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003）中的定义。对于给定的纳米抗体，本领域技术人员将容易地鉴别各编号系统所定义的CDR。并且，不同编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的（例如，可参见Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003）。在本文中，纳米抗体的CDR优选地通过Kabat、Chothia和/或IMGT编号系统确定。

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

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

两个序列之间的百分比同一性的测定还可使用数学算法来实现。用于两个序列的比较的数学算法的一个非限制性实例是Karlin和Altschul的算法，1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268，如同Karlin和Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877中改进的。将这样的算法整合至Altschul等人, 1990, J. Mol. Biol. 215:403的NBLAST和XBLAST程序中。

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

两分子间的特异性结合性质可使用本领域公知的方法进行测定。一种方法涉及测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速度。“结合速率常数”（ka或kon）和“解离速率常数”（kdis或koff）两者都可通过浓度及缔合和解离的实际速率而计算得

出（参见Malmqvist M, Nature,1993, 361:186-187）。kdis/kon的比率等于解离常数K_D（参见Davies等人, Annual Rev Biochem, 1990; 59:439-473）。可用任何有效的方法测量K_D、kon和kdis值。在某些实施方案中，可以使用表面等离子体共振术（SPR）在Biacore中来测量解离常数。除此以外还可用生物发光干涉测量法或Kinexa来测量解离常数。

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

如本文中所使用的，术语“载体（vector）”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或P1来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如λ噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如SV40）。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

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

如本文中所使用的，术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如，可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和PCR介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换，例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似（例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质，包括形成共价键或氢键的能力等）的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链（例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸）、酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸）、不带电荷的极性侧链（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、非极性侧链（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、β分支侧链（例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香族侧链（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）的氨基酸。因此，优选用来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的（参见，例如，**Brummell**等人，**Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi**等人**Protein Eng. 12(10):879-884 (1999);** 和**Burks**等人**Proc. Natl Acad. Set USA 94:412-417 (1997)**，其通过引用并入本文）。

本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如，**Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates , Sunderland, Mass. (1991))**，其以引用的方式并入本文中。在本发明中，术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用**A**或**Ala**表示。

发明的有益效果

本申请提供的抗 **CDCP1** 的单域抗体或多肽构建体，其与 **CDCP1** 具有高结合活性。特别地，本发明的单域抗体或多肽构建体能够增加肿瘤细胞的内吞活性，并对肿瘤细胞具有较强的杀伤活性。在此基础上，由所述单域抗体或多肽构建体制备的人源化单域抗体或多肽构建体仍然具有这些突出的活性。并且，所述单域抗体或多肽构建体还具有分子量小，易于生产等特点。

下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员

将理解，下列附图和实施例仅用于说明本发明，而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述，本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

附图说明

图 1 显示了通过 ELISA 法检测的本申请的 18 个纳米抗体构建体对人 CDCP1 抗原的结合能力。

图 2 显示了通过 ELISA 法检测的本申请的 8 个纳米抗体构建体对人 CDCP1 抗原的结合能力。

图 3 显示了 FACS 实验中本申请的纳米抗体构建体对 HCT116 细胞（图 3A）和 SW480 细胞（图 3B）的结合活性。

图 4 显示了 FACS 实验中本申请的纳米抗体构建体与 PL45 细胞的结合活性。

图 5 显示了 HCT116 细胞（图 5A）和 SW480 细胞（图 5B）的内吞实验的结果。

图 6 显示了本申请的纳米抗体构建体对 HCT116 细胞的杀伤活性。

图 7 A 和图 7B 显示了通过 ELISA 法检测的本申请的人源化纳米抗体构建体与人 CDCP1 抗原的结合活性。

图 8 显示了 FACS 实验中本申请的人源化纳米抗体构建体与 HCT116 细胞的结合活性。

图 9 显示了 HCT116 细胞的内吞实验的结果。

图 10 显示了本申请的人源化纳米抗体构建体对 HCT116 细胞的杀伤活性。

图 11 显示了通过 ELISA 法检测的本申请的人源化纳米抗体构建体与人 CDCP1 抗原的结合活性。

图 12 显示了 FACS 实验中本申请的人源化纳米抗体构建体对 HCT116 细胞的结合活性。

图 13 显示了 HCT116 细胞的内吞实验的结果。

图 14 显示了本申请的人源化纳米抗体构建体对 HCT116 细胞的杀伤活性。

图 15 显示了通过 ELISA 法检测的本申请的人源化纳米抗体构建体与不同种属 CDCP1 抗原的结合能力。

图 16 显示了 FACS 实验中本申请的人源化纳米抗体构建体对 HCT116 细胞的结合活性。

图 17 显示了 FACS 实验中本申请的人源化纳米抗体构建体对 SW480 细胞的结合活性。

图 18 显示了 FACS 实验中本申请的人源化纳米抗体构建体对 PL45 细胞的结合活性。

图 19 显示了 FACS 实验中本申请的人源化纳米抗体构建体对 HT-29 细胞的结合活性。

图 20 显示了 FACS 实验中本申请的人源化纳米抗体构建体对 LNCaP 细胞的结合活性。

图 21 显示了本申请的人源化纳米抗体构建体对 HCT116 细胞的杀伤活性。

序列信息

本申请涉及的序列的描述提供于下表中。

表 1：序列信息

SEQ ID NO:	序列名称	序列
1	Kabat-CDR1	ANGMV
2	Kabat-CDR2	VISSSGSTNYADSVKG
3	Kabat-CDR3	AHYGQTY
4	Chothia-CDR1	GSDVSAN
5	Chothia-CDR2	SSSGS
6	Chothia-CDR3	AHYGQTY
7	IMGT-CDR1	GSDVSANG
8	IMGT-CDR2	ISSSGST
9	IMGT-CDR3	GVAHYGQTY
10	MHAB10-16 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQAPGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYLQMNNLKPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
11	MHAB10-16-1 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQAPGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYLQMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
12	MHAB10-16-2 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQAPGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYLQMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
13	MHAB10-16-3 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQAPGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYLQMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
14	MHAB10-16-4 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQAPGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYLQMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
15	MHAB10-16-5 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQAPGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYLQMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
16	MHAB10-16-6 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQAPGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYLQMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS

17	MHAB10-16-7 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
18	MHAB10-16-8 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
19	MHAB10-16-9 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
20	MHAB10-16-10 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNNLKPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
21	MHAB10-16-11 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
22	MHAB10-16-12 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
23	MHAB10-16-13 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
24	MHAB10-16-14 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
25	MHAB10-16-15 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
26	MHAB10-16-16 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
27	MHAB10-16-17 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSS
28	Fc-1	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	Fc-2	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	MHAB10-16	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNNLKPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

31	MHAB10-16-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	MHAB10-16-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
33	MHAB10-16-3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
34	MHAB10-16-4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	MHAB10-16-5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG

		NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
36	MHAB10-16-6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
37	MHAB10-16-7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
38	MHAB10-16-8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
39	MHAB10-16-9	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
40	MHAB10-16-10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNNLKPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

		WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
41	MHAB10-16-11	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	MHAB10-16-12	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
43	MHAB10-16-13	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
44	MHAB10-16-14	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKGREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
45	MHAB10-16-15	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYLCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

		GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	MHAB10-16-16	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	MHAB10-16-17	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDVSANGMVWHRQ APGKQREWVAVISSSGSTNYADSVKGRFTISRDSDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCGVAHYGQTYWGKGTLVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	25A11(MHAB10-PC1) HC	EVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYMYWVK QRPGQGLEWIGEINPSHGGTNFNEKFKNKATLTVDKSSST VYMQLSSLTSEDSAVYYCTRGGNYPYFAMDYWGQGTSVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
49	25A11(MHAB10-PC1) LC	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPD GTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
50	h14A043(MHAB10-PC2)HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDYYMNWVRQ APGQGLEWIGWIDPENANTIYDPKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCYGSSYRFTYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH

		KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
51	h14A043(MHAB10-PC2)LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYLYWYQQKPGQA PRPWIYLTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YCQQWSSNPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC

具体实施方式

现参照下列意在举例说明本发明（而非限定本发明）的实施例来描述本发明。

除非特别指明，本发明中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法，基本上参照 J. Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，1989，以及 F. M. Ausubel 等人，精编分子生物学实验指南，第 3 版，John Wiley & Sons, Inc.，1995 中所述的方法进行；限制性内切酶的使用依照产品制造商推荐的条件。本领域技术人员知晓，实施例以举例方式描述本发明，且不意欲限制本发明所要求保护的范围。

实施例 1. CDCP1 特异性抗体的生产

1.1. 生产 CDCP1 特异性抗体 25A11(MHAB10-PC1)

25A11(MHAB10-PC1)抗体的可变区来源于专利 US20080008719A1，将 VH 和 VL 序列分别整合到 Human IgG1-Kappa 的 CH 和 CL 序列，整合后抗体的重链的序列如 SEQ ID NO: 48 所示，抗体的轻链的序列如 SEQ ID NO: 49 所示。CHO 瞬转表达后抗体经 Protein A 纯化，溶解于 PBS 中，抗体溶液纯度（SEC，280nm）为 98.887%，内毒素（EU/mg）<1。分装后于-80℃冷冻保存。该抗体作为后续筛选实验的阳性对照抗体。

1.2. 生产 CDCP1 特异性抗体 h14A043(MHAB10-PC2)

h14A043(MHAB10-PC2)抗体的可变区来源于专利 US20230050380A1，将 VH 和 VL 序列分别整合到 Human IgG1-Kappa 的 CH 和 CL 序列，整合后抗体的重链的序列如 SEQ ID NO: 50 所示，整合后抗体的轻链的序列如 SEQ ID NO: 51 所示。CHO 瞬转表达后抗体经 Protein A 纯化，溶解于 PBS 中，抗体溶液纯度（SEC，280nm）为 79.69%。

该抗体作为后续抗人 CDCP1 人源化纳米抗体 MHAB10-16-14 活性检测实验的阳性对照抗体。

实施例 2. 抗人 CDCP1 纳米抗体序列的获得

2.1. 羊驼免疫及血清效价检测

采用 CDCP1 抗原（Genebank ID：Q9H5V8-1），免疫一只空白羊驼。初次免疫前采血 10mL，作为阴性血清；初次免疫使用完全弗氏佐剂与 0.5mg CDCP1 抗原 1:1 混合后皮下多点注射。后分别于第三、五、七周利用不完全弗氏佐剂与 0.25mg CDCP1 抗原 1:1 混合后皮下多点注射进行二次免疫、三次免疫和四次免疫，并于三次免疫和四次免疫前采集 10mL 外周血，分离血清，用 ELISA 方法监测免疫反应。四免 5 天后，采集 50mL 外周血用于后续纳米抗体库构建（根据血清免疫反应确定是否执行本次采血）。

表 2. 免疫信息

免疫时间	内容	佐剂	免疫剂量
初次免疫	取血 10mL,初次免疫	完全佐剂	CDCP1 抗原 0.5 mg
距初次免疫 13 天	二次免疫	不完全佐剂	CDCP1 抗原 0.25 mg
距二次免疫 14 天	取血 10mL,三次免疫	不完全佐剂	CDCP1 抗原 0.25 mg
距三次免疫 13 天	取血 10mL,四次免疫	不完全佐剂	CDCP1 抗原 0.25 mg
距四次免疫 5 天	取血 50mL	/	/

2.2. 特异性纳米抗体筛选与鉴定

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

利用 CDCP1 抗原（KACTUS, Cat.No. CDC-HM101），对单域抗体噬菌体展示库进行淘选富集实验后，筛选后挑选单克隆进行 Phage-ELISA 检测，挑选 CDR 区域氨基酸序列不同的候选克隆，最终挑选出 37 条独特序列，具体的信息请见下述表 3。

2.3. 独特序列可溶性验证及抗体表达

提取上述 37 个阳性克隆质粒，分别转入 E.coli Rosetta，0.4mM IPTG 20℃ 200rpm 诱导表达过夜。次日，离心，将沉淀用 PBS 重悬，超声破碎，离心获取 37 个克隆的破碎后上清。采用 ELISA 检测 37 个克隆的破碎上清与人 CDCP1 抗原的结合活性（OD_{450} 如下述表 3 所示）。

表 3. 37 个克隆的 OD_{450} 结果

独特序列	OD_{450}	独特序列	OD_{450}
MH1-6-C-1-1	0.086	MH1-6-C-2-28	3.3
MH1-6-C-1-2	0.072	MH1-6-C-2-29	1.594
MH1-6-C-1-7	0.093	MH1-6-C-2-31	0.139
MH1-6-C-1-11	1.36	MH1-6-C-2-33	1.743
MH1-6-C-1-16	0.148	MH1-6-C-2-35	3.324
MH1-6-C-1-21	2.372	MH1-6-C-2-36	1.156
MH1-6-C-1-30	0.52	MH1-6-C-2-38	2.962
MH1-6-C-1-43	0.29	MH1-6-C-2-43	0.33
MH1-6-C-1-44	1.632	MH1-6-C-2-47	3.272
MH1-6-C-1-52	0.065	MH1-6-C-2-50	0.304
MH1-6-C-1-53	0.32	MH1-6-C-2-61	0.158
MH1-6-C-1-55	3.233	MH1-6-C-2-62	3.081
MH1-6-C-1-59	3.272	MH1-6-C-2-68	0.327
MH1-6-C-1-62	3.243	MH1-6-C-3-7	3.105
MH1-6-C-1-72	0.414	MH1-6-C-3-8	2.882
MH1-6-C-1-88	1.926	MH1-6-C-3-11	1.683
MH1-6-C-2-7	0.154	MH1-6-C-3-52	0.16
MH1-6-C-2-10	0.252	MH1-6-C-3-87	0.141
MH1-6-C-2-20	2.266	阳性（2PDL）	0.64
无关	0.124	1%M-PBS	0.093

选取与人 CDCP1 结合活性强的序列，将 VHH 序列整合到 Human IgG1 的 Fc（LALA）序列（SEQ ID NO: 29），委托上海百英生物科技有限公司进行 CHO 瞬转表达服务，生产 MHAB10 待选抗体（表达编号和南昌大佳科技有限公司的独特序列对应下述表 4 所示，后续 MHAB10 待选抗体的描述均使用表达编号即 MHAB10-1~26），表达后抗体经 Protein A 纯化，溶解于 PBS 中，抗体溶液纯度（SEC，280nm）均>95%，内毒素（EU/mg） <1。分装后于-80℃保存。

表 4. 独特序列所对应的表达编号

表达编号	独特序列
MHAB10-1	MH1-6-C-1-11
MHAB10-2	MH1-6-C-1-30
MHAB10-3	MH1-6-C-1-52
MHAB10-4	MH1-6-C-1-72
MHAB10-5	MH1-6-C-1-88
MHAB10-6	MH1-6-C-2-7
MHAB10-7	MH1-6-C-2-10

MHAB10-8	MH1-6-C-2-20
MHAB10-9	MH1-6-C-2-28
MHAB10-10	MH1-6-C-2-29
MHAB10-11	MH1-6-C-2-35
MHAB10-12	MH1-6-C-2-38
MHAB10-13	MH1-6-C-2-40
MHAB10-14	MH1-6-C-2-43
MHAB10-15	MH1-6-C-2-47
MHAB10-16	MH1-6-C-2-50
MHAB10-17	MH1-6-C-2-68
MHAB10-18	MH1-6-C-3-7
MHAB10-19	MH1-6-C-2-188
MHAB10-20	MH1-6-C-2-201
MHAB10-21	MH1-6-C-2-216
MHAB10-22	MH1-6-C-2-226
MHAB10-23	MH1-6-C-2-245
MHAB10-24	MH1-6-C-2-254
MHAB10-25	MH1-6-C-2-263
MHAB10-26	MH1-6-C-2-276

实施例 3. 抗人 CDCP1 纳米抗体活性检测

3.1. ELISA 结合实验

使用 ELISA 法检测 MHAB10 待选抗体（ 抗人 CDCP1 纳米抗体 Fc 融合蛋白）对人 CDCP1 抗原的结合能力。使用 PBS 将 CDCP1，His Tag (KACTUS, Cat.No. CDC-HM101)稀释至 0.5μg/mL，以 100μL/孔加入至 ELISA 板（Corning，Cat.No. 9018）中，2℃-8℃包被过夜。使用 PBST 冲洗 3 次，加入 1% BSA/PBST 室温封闭 1h，然后 PBST 冲洗 5 次，加入待测抗体（待测抗体编号为 MHAB10，阳性对照抗体为 25A11，即 MHAB10-PC1 ），初始浓度为 10μg/mL ，进行 10 倍梯度稀释），孵育 1h 后使用 PBST 冲洗 7 次，洗去未结合抗体，加入 1:50,000 倍稀释的 Goat Anti-Human IgG Fc(HRP) (Abcam, Cat.No. ab97225)，室温孵育 30min。洗去多余二抗后，加入 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution，(Absin, Cat.No. 9178)， 100μL/孔，室温避光显色 10min，然后加入 100μL TMB 终止液 (Absin, Cat.No. abs9472)终止反应。使用酶标仪读取波长 450nm 处吸收值，使用 Graphpad 绘制四参数曲线。所有实验结果以平均值 ± SEM（平均标准误差）表示。采用 Prism 6（GraphPad）软件作图并进行数据分析。

ELISA 结合结果（图 1 和图 2）显示与人 CDCP1 抗原的结合活性最强的 MHAB10

待选抗体 TOP 10 为 MHAB10-2、3、8、9、10、11、13、16、17、26，且这 10 个抗体与人 CDCP1 抗原的结合活性均强于阳性对照抗体 25A11，即 MHAB10-PC1。将对这 10 个抗体进行后续的 FACS 结合活性检测。

3.2. FACS 结合实验

FACS 实验中，利用 HCT116 细胞完全培养基（ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007+10%FBS，Sigma-Aldrich, Cat.no. F8687+1% P/S，Gibco， Cat.no. 15140-122）和 SW480 细胞完全培养基（ATCC-formulated Leibovitz's L-15 Medium, Catalog No. 30-2008+10%FBS，Sigma-Aldrich, Cat.no. F8687+1% P/S，Gibco， Cat.no. 15140-122）分别培养人结直肠癌 HCT116 细胞和 SW480 细胞。进一步的，为防止胰酶对 fl-CDCP1 的剪切，利用 Versene（Gibco, Cat.no.15040-066）对 HCT116 细胞和 SW480 细胞进行消化。然后分别利用内源表达人 CDCP1 的人结直肠癌 HCT116 细胞和 SW480 细胞检测待选抗体的结合，待测抗体梯度稀释 (30000ng/mL, 7500ng/mL, 1875ng/mL, 468.8ng/mL, 117.2ng/mL, 29.3ng/mL, 7.3ng/mL and 1.8ng/mL)，使用 100μL FITC anti-human IgG Fc Antibody 二抗（Biolegend, Cat.no. 410720）检测待测抗体的结合情况，流式细胞仪检测 FITC 荧光强度（Mean Fluorescence Intensity，MFI）。所有实验结果以平均值 ± SEM（平均标准误差）表示。采用 Prism 6（GraphPad）软件作图并进行数据分析。

结合曲线如图 3 所示，图 3A 为 HCT116 细胞的结果，图 3B 为 SW480 细胞的结果。由 FACS 结合结果可知，MHAB10 待选抗体与 HCT116 和 SW480 细胞的结合活性相似，其中，MHAB10-11 和 MHAB10-16 的结合活性最强，将对这两个抗体进行后续的内吞和内吞介导的细胞杀伤活性检测。

3.3. FACS 结合实验检测待选抗体与人 Cleaved CDCP1 的结合活性

FACS 实验中，利用 PL45 细胞完全培养基（ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Catalog No. 30-2002+10%FBS，Sigma-Aldrich, Cat.no. F8687+1% P/S，Gibco， Cat.no. 15140-122）培养人胰腺导管腺癌 PL45 细胞，然后分别利用内源表达人 Cleaved CDCP1 的 PL45 细胞检测待选抗体的结合，待测抗体梯度稀释 (30000ng/mL, 7500ng/mL, 1875ng/mL, 468.8ng/mL, 117.2ng/mL, 29.3ng/mL, 7.3ng/mL and 1.8ng/mL)，使用 100μL FITC anti-human IgG Fc Antibody 二抗（Biolegend, Cat.no.

410720）检测待测抗体的结合情况，流式细胞仪检测 FITC 荧光强度（Mean Fluorescence Intensity，MFI）。所有实验结果以平均值 ± SEM（平均标准误差）表示。采用 Prism 6（GraphPad）软件作图并进行数据分析。

结合曲线如图 4 所示，由 FACS 结合结果可知，MHAB10 待选抗体与 PL45 细胞的结合活性与内源表达人 CDCP1 的人结直肠癌 HCT116 细胞和 SW480 细胞的结合活性趋势一致，其中，MHAB10-11 和 MHAB10-16 的结合活性最强。

3.4. 内吞实验

分别利用内源表达人 CDCP1 的人结直肠癌 HCT116 细胞和 SW480 细胞进行内吞活性检测。使用 FACS buffer(含有 2% FBS 的 PBS)制备 1×10^6/mL 细胞悬液和 10μg/mL 抗 CDCP1 的待测抗体溶液，将细胞悬液加入 1.5mL EP 管中，1200rpm，4℃离心 3min，弃上清。分别吸 1.5mL 的待测抗体溶液加到细胞中，置于冰上孵育 30min，利用预冷的 200μL/孔 FACS buffer 清洗四次。用 1.5mL 完全培养基重悬细胞，混匀后将细胞加到 96 孔板中，100μL/孔。分别置于 4℃和 37℃孵育 0h、1h、2h 和 4h（双复孔）。孵育结束后，1200rpm，4℃离心 3min，加入 100μL FITC anti-human IgG Fc Antibody 稀释液（ Biolegend, Cat.no. 410720 ），4℃孵育 30min，洗净未结合的二抗后，使用流式细胞仪检测 FITC 荧光强度（Mean Fluorescence Intensity，MFI），计算内吞比率，计算公式如下：

$$\text{Internalization (\%)} = 100\% - MFI_T/\ MFI_{T0}*100\%$$

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

内吞百分数曲线如图 5 所示，图 5A 为 HCT116 细胞的结果，图 5B 为 SW480 细胞的结果。由内吞结果可知，37℃下，MHAB10 待选抗体在 HCT116 和 SW480 细胞具有良好的的内吞活性，且趋势一致，即 MHAB10-16 的内吞活性显著强于 MHAB10-11 和阳性对照抗体（25A11）(MHAB10-PC1)。

3.5. Fab-ZAP 法检测抗体内吞介导的细胞杀伤实验

将人结直肠癌 HCT116 细胞消化后用完全培养基（ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007+10%FBS，Sigma-Aldrich, Cat.no. F8687+1% P/S，Gibco， Cat.no. 15140-122）重悬，细胞密度调整为 1E4cells/mL，加入 96 孔细胞

培养板，每孔 50μL ，将细胞培养板放入 37℃ 细胞培养箱培养 16h。第二天用培养基配制含有 9nM ZAP-Fab 的 ZAP 稀释液，然后用 ZAP 稀释液将抗体梯度稀释成 1.6nM 至 0.5pM（ 6 个浓度梯度，1：5 稀释）的工作液，37ºC 孵育 15min 后，将工作液加到细胞培养板中，每孔加入 50μL，混匀后将细胞培养板放入 37℃细胞培养箱继续孵育 120h。提前将 7.5μL Triton-X 100 加到未加抗体-Fab-ZAP 处理的细胞孔中，孵育 30min，此孔作为阳性对照。未加抗体-Fab-ZAP 或 Triton-X100 处理的细胞孔（NT）为阴性对照。然后在细胞培养板中每孔加入 20μL MTS（Promega，Cat：G3598B），37℃细胞培养箱中孵育 2h，于酶标仪中震荡 10s 后读取数据，检测波长 A490。 利用公式 killing rate%=100%-(OD_{sample}-$OD_{Triton-X100}$)/(OD_{NT}-$OD_{Triton-X100}$)*100%计算细胞杀伤效率。

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

内吞介导的细胞杀伤结果如表 5 和图 6 所示，MHAB10-16-Fab-ZAP 对 HCT116 细胞有良好的杀伤活性。综合 FACS 结合和内吞结果，将对 MHAB10-16 进行人源化并做后续筛选工作。

表 5. 内吞介导的细胞杀伤结果

	MHAB10-16	Isotype
Bottom	4.235	N/A
Top	61.50	N/A
EC_{50} (pM)	13.83	N/A

实施例 4. 抗人 CDCP1 纳米抗体人源化及活性检测

4.1. MHAB10-16 纳米抗体以及人源化纳米抗体的制备

经过测序和分析获得了 MHAB10-16 纳米抗体的 CDR 序列（根据 IMGT 编号系统（Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003）所定义）、VHH 序列以及完整序列，具体的序列信息如表 1 和下述表 6 所示。

表 6. MHAB10-16 纳米抗体序列信息

编号系统	CDR1	CDR2	CDR3	VHH
Kabat	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 10
Chothia	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10
IMGT	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10

进一步的，通过对原始驼源抗体 MHAB10-16 的序列进行数据库序列分析，明确参考的人源序列 Germeline，进行人源化序列的设计，第一轮人源化后人源化程度至少有 82%，将其构建成纳米抗体-Fc 融合蛋白（构建 MHAB10-16-1 至 MHAB10-16-10 共 10 个分子），在 CHO 细胞中进行瞬转表达，根据人源化程度，亲和力和表达量进行第二轮人源化。第二轮人源化后，将其构建成纳米抗体-Fc 融合蛋白（构建 MHAB10-16-11 至 MHAB10-16-17 共 7 个分子），在 CHO 细胞中进行瞬转表达并验证其结合活性。

共制备获得了 17 个人源化纳米抗体，分别命名为 MHAB10-16-1 至 MHAB10-16-17，具体的序列信息如表 1 所示。

4.2. ELISA 结合实验

使用 ELISA 法检测 MHAB10-16 人源化序列对人 CDCP1 抗原的结合能力。使用 PBS 将 CDCP1，His Tag (KACTUS, Cat.No. CDC-HM101)稀释至 0.5μg/mL，以 100μL/孔加入至 ELISA 板（Corning，Cat.No. 9018）中，2℃-8℃包被过夜。使用 PBST 冲洗 3 次，加入 1% BSA/PBST 室温封闭 1h，然后 PBST 冲洗 5 次，加入 MHAB10-16 人源化抗体（抗体编号分别为 MHAB10-16-1~8，阳性对照抗体为 25A11，即 MHAB10-PC1），初始浓度为 10μg/mL ，进行 10 倍梯度稀释），孵育 1h 后使用 PBST 冲洗 7 次，洗去未结合抗体，加入 1:50,000 倍稀释的 Goat Anti-Human IgG Fc(HRP) (Abcam, Cat.No. ab97225)，室温孵育 30min。洗去多余二抗后，加入 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution，(Absin, Cat.No. 9178)，100μL/孔，室温避光显色 15min，然后加入 100μL TMB 终止液 (Absin, Cat.No. abs9472)终止反应。使用酶标仪读取波长 450nm 处吸收值，使用 Graphpad 绘制四参数曲线。

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

由 ELISA 结合结果可知（图 7A、图 7B 和表 7），MHAB10-16 人源化抗体和人 CDCP1 抗原的结合活性与 parental MHAB10-16 基本相当，且均高于阳性对照抗体 25A11，即 MHAB10-PC1。

MHAB10-16 与 MHAB10-16-1 至 MHAB10-16-8 的 ELISA 结合 EC_{50} 结果如下述表 7 所示。

表 7. ELISA 结合 EC_{50} 结果

Ab	MHAB10-16	MHAB10-16-1	MHAB10-16-2	MHAB10-16-3	MHAB10-16-4	MHAB10-16-5
bottom	0.04478	0.04434	0.04546	0.0343	0.04623	0.03866
Top	1.791	2.177	2.16	2.153	2.178	2.169
EC_{50}(ng/mL)	5.446	4.112	3.625	2.981	3.823	3.601
MW（kDa）	76kDa	76kDa	76kDa	76kDa	76kDa	76kDa
等电点	7.68	7.27	7.27	7.75	7.75	7.27
表达量（mg/L）	366.5	88.0	102.0	112.0	108.0	97.0
纯度（SEC,280nm）	98.663%	99.236%	99.307%	99.306%	99.287%	99.324%

续表 7. ELISA 结合 EC_{50} 结果

Ab	MHAB10-16-6	MHAB10-16-7	MHAB10-16-8	25A11	MHAB10-16-9*	MHAB10-16-10*
bottom	0.05571	0.04918	0.04826	0.03954		
Top	2.06	2.065	2.061	1.901		
EC_{50}(ng/mL)	4.558	4.85	5.264	11.47		
MW（kDa）	76kDa	76kDa	76kDa	146kDa	76kDa	76kDa
等电点	7.75	7.75	7.27	7.85	7.7	7.27
表达量（mg/L）	98.0	121.0	171.0	461.1	261.0	91.0
纯度（SEC,280nm）	99.385%	99.324%	99.686%	98.89%	99.386%	99.662%

注：MHAB10-16-9*和 MHAB10-16-10*为第一轮人源化和第二轮人源化之间，为探索表达量变化的中间体序列（序列为 MHAB10-16-1 分别突变的两个变体，序列信息详见表 1），未检测 ELISA 结合活性。

4.3. FACS 结合实验

FACS 实验中，利用内源表达人 CDCP1 的人结直肠癌 HCT116 细胞检测 MHAB10-16 人源化抗体的结合，待测抗体梯度稀释 (7500ng/mL, 1875ng/mL, 375ng/mL, 75ng/mL, 15ng/mL, 3ng/mL and 0.6ng/mL)，使用 100μL Alexa Fluor ® 488 AffiniPure Goat Anti- Human IgG(H+L)二抗（YEASEN, Cat.no. 33126ES60）检测待测抗体的结合情况，流式细胞仪检测结合二抗的荧光强度（Mean Fluorescence Intensity，MFI）。

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

结合曲线如图 8 所示，EC_{50} 结果如表 8 所示。由 FACS 结合结果可知，MHAB10-16 人源化抗体和 HCT116 细胞的结合活性与 parental MHAB10-16 相当，将综合 EC_{50} 和人源化水平，选择开发潜力最佳的 3 个抗体（ MHAB10-16-3、4、7）进行后续的内吞和内吞介导的细胞杀伤活性检测。

MHAB10-16 与 MHAB10-16-1 至 MHAB10-16-8 的 ELISA 结合 EC_{50} 结果如下述表 8 所示。

表 8. FACS 结合 EC_{50} 结果

Ab	MHAB10-16	MHAB10-16-1	MHAB10-16-2	MHAB10-16-3	MHAB10-16-4
bottom	857.2	1131	1183	1098	699.7
Top	61580	62167	63376	64039	64729
EC_{50}(ng/mL)	64.16	78.41	80.03	73.95	67.49

续表 8. FACS 结合 EC_{50} 结果

Ab	MHAB10-16-5	MHAB10-16-6	MHAB10-16-7	MHAB10-16-8	Isotype
bottom	984.4	1087	1208	1012	N/A
Top	63037	63158	62316	62207	N/A
EC_{50}(ng/mL)	71.96	66.12	82.93	78.15	N/A

4.4. 内吞实验

分别利用内源表达人 CDCP1 的人结直肠癌 HCT116 细胞进行内吞活性检测。使用 FACS buffer(含有 2% FBS 的 PBS)制备 1×10^6/mL 细胞悬液和 10μg/mL 抗 CDCP1 的待测抗体溶液，将细胞悬液加入 1.5mL EP 管中，1200rpm，4℃离心 3min，弃上清。分别吸 1.5mL 的待测抗体溶液加到细胞中，置于冰上孵育 30min，利用预冷的 200μL/孔 FACS buffer 清洗四次。用 1.5mL 完全培养基重悬细胞，混匀后将细胞加到 96 孔板中，100μL/孔。分别置于 4℃和 37℃孵育 0h、1h、2h 和 4h（双复孔）。孵育结束后， 1200rpm，4℃离心 3min，加入 100μL Alexa Fluor ® 488 AffiniPure Goat Anti- Human IgG(H+L)二抗（YEASEN, Cat.no. 33126ES60）稀释液，4℃孵育 30min，洗净未结合的二抗后，使用流式细胞仪检测 FITC 荧光强度（Mean Fluorescence Intensity，MFI），计算内吞比率，计算公式如下：

$$\text{Internalization (\%)} = 100\% - MFI_T / MFI_{T0} * 100\%$$

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

内吞百分数曲线如图 9 所示。由内吞结果可知，37℃下，MHAB10-16 人源化抗体在 HCT116 细胞具有良好的的内吞活性，且 MHAB10-16-3、4、7 的内吞活性与 parental MHAB10-16 基本相当，且均高于阳性对照抗体为 25A11，即 MHAB10-PC1。

4.5. Fab-ZAP 法检测抗体内吞介导的细胞杀伤实验

将人结直肠癌 HCT116 细胞消化后用完全培养基（ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007+10%FBS，Sigma-Aldrich, Cat.no. F8687+1% P/S，Gibco， Cat.no. 15140-122）重悬，细胞密度调整为 1E4cells/mL，加入 96 孔细胞培养板，每孔 50μL ，将细胞培养板放入 37℃ 细胞培养箱培养 16h。第二天用培养基配制含有 9nM ZAP-Fab 的 ZAP 稀释液，然后用 ZAP 稀释液将抗体梯度稀释成 1.6nM 至 0.5pM（ 6 个浓度梯度，1：5 稀释）的工作液，37°C 孵育 15min 后，将工作液加到细胞培养板中，每孔加入 50μL，混匀后将细胞培养板放入 37℃细胞培养箱继续孵育 120h。提前将 7.5μL Triton-X 100 加到未加抗体-Fab-ZAP 处理的细胞孔中，孵育 30min，此孔作为阳性对照。未加抗体-Fab-ZAP 或 Triton-X100 处理的细胞孔（NT）为阴性对照。然后在细胞培养板中每孔加入 20μL MTS（Promega，Cat：G3598B），37℃细胞培养箱中孵育 2h，于酶标仪中震荡 10s 后读取数据，检测波长 A490。利用公式 killing rate%=100%-(OD_{sample}-$OD_{Triton-X100}$)/(OD_{NT}-$OD_{Triton-X100}$)*100%计算细胞杀伤效率。

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

内吞介导的细胞杀伤结果如表 9 和图 10 所示，与 parental MHAB10-16 相比，MHAB10-16 人源化抗体对 HCT116 的杀伤活性相似。

表 9. 内吞介导的细胞杀伤结果

	MHAB10-16	MHAB10-16-3	MHAB10-16-4	MHAB10-16-7	Isotype
Bottom	9.830	13.08	12.95	14.15	N/A
Top	67.60	75.57	73.16	77.55	N/A
EC_{50} (pM)	16.82	~ 31.79	21.22	24.27	N/A

实施例 5. 抗人 CDCP1 纳米抗体第二轮人源化及活性检测

5.1. ELISA 结合实验

使用 ELISA 法检测 MHAB10-16 人源化序列对人 CDCP1 抗原的结合能力。使用 PBS 将 CDCP1, His Tag (KACTUS, Cat.No. CDC-HM101)稀释至 0.5μg/mL，以 100μL/孔加入至 ELISA 板（Corning，Cat.No. 9018）中，2℃-8℃包被过夜。使用 PBST 冲洗 3 次，加入 1% BSA/PBST 室温封闭 1h，然后 PBST 冲洗 5 次，加入 MHAB10-16 人源化抗体（抗体编号分别为 MHAB10-16-11~17，阳性对照抗体为 25A11，即 MHAB10-PC1），初始浓度为 10μg/mL ，进行 10 倍梯度稀释），孵育 1h 后使用 PBST 冲洗 7 次，洗去未结合抗体，加入 1:50,000 倍稀释的 Goat Anti-Human IgG Fc(HRP) (Abcam, Cat.No. ab97225)，室温孵育 30min。洗去多余二抗后，加入 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution，(Absin, Cat.No. 9178)，100μL/孔，室温避光显色 15min，然后加入 100μL TMB 终止液 (Absin, Cat.No. abs9472)终止反应。使用酶标仪读取波长 450nm 处吸收值，使用 Graphpad 绘制四参数曲线。

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

由 ELISA 结合结果可知（图 11 和表 10），MHAB10-16 人源化抗体和人 CDCP1 抗原的结合活性与 parental MHAB10-16 基本相当，且均高于阳性对照抗体 25A11，即 MHAB10-PC1。

MHAB10-16 与 MHAB10-16-11 至 MHAB10-16-17 的 ELISA 结合 EC_{50} 结果如下述表 10 所示。

表 10. ELISA 结合 EC_{50} 结果

Ab	MHAB10-16	MHAB10-16-11	MHAB10-16-12	MHAB10-16-13	MHAB10-16-14
bottom	0.04939	0.05216	0.05168	0.05401	0.0514
Top	1.607	1.588	1.598	1.594	1.584
EC_{50}(ng/mL)	2.969	4.769	4.169	4.868	4.283
等电点	7.68	7.7	8.07	8.07	7.7
表达量（mg/L）	366.5	85	99	155	241
纯度（SEC,280nm）	98.66%	99.07%	98.91%	99.01%	99.28%

续表 10. ELISA 结合 EC_{50} 结果

Ab	MHAB10-16-15	MHAB10-16-16	MHAB10-16-17	25A11	Isotype
bottom	0.051	0.04907	0.04786	0.041	N/A
Top	1.576	1.562	1.563	1.355	N/A
EC_{50}(ng/mL)	4.89	5.473	5.372	10.13	N/A
等电点	8.07	8.07	7.7	7.85	N/A
表达量（mg/L）	202	165	184	461.1	N/A
纯度（SEC,280nm）	99.22%	99.15%	98.23%	98.89%	N/A

5.2. FACS 结合实验

FACS 实验中，利用内源表达人 CDCP1 的人结直肠癌 HCT116 细胞检测 MHAB10-16 人源化抗体的结合，待测抗体梯度稀释 (30000ng/mL, 7500ng/mL, 1875ng/mL, 375ng/mL, 75ng/mL, 15ng/mL, 3ng/mL, 0.6ng/mL , 0.12ng/mL 和 0.024ng/mL) ，使用 100μL Alexa Fluor ® 488 AffiniPure Goat Anti- Human IgG(H+L)二抗（YEASEN, Cat.no. 33126ES60）检测待测抗体的结合情况，流式细胞仪检测结合二抗的荧光强度（Mean Fluorescence Intensity，MFI）。

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

结合曲线如图 12 所示，EC_{50} 结果如表 11 所示。由 FACS 结合结果可知，MHAB10-16 人源化抗体与 HCT116 细胞的结合活性相较于 parental MHAB10-16 未发生明显减弱，综合表达水平、EC_{50} 和人源化水平，选择开发潜力最佳的 4 个抗体（ MHAB10-16-13、14、15、16）进行后续的内吞和内吞介导的细胞杀伤活性检测。

MHAB10-16 与 MHAB10-16-11 至 MHAB10-16-17 的 FACS 结合 EC_{50} 结果如下述表 11 所示。

表 11. FACS 结合 EC_{50} 结果

Ab	MHAB10-16	MHAB10-16-11	MHAB10-16-12	MHAB10-16-13	MHAB10-16-14
bottom	410.0	817.8	679.6	637.1	818.7
Top	56199	53442	53916	54198	52921
EC_{50}(ng/mL)	55.34	69.47	74.15	72.61	80.91

续表 11. FACS 结合 EC_{50} 结果

Ab	MHAB10-16-15	MHAB10-16-16	MHAB10-16-17	Isotype
bottom	695.1	863.8	889.2	N/A
Top	53893	53396	52859	N/A
EC_{50}(ng/mL)	96.25	92.19	118.9	N/A

5.3. 内吞实验

分别利用内源表达人 CDCP1 的人结直肠癌 HCT116 细胞进行内吞活性检测。使用 FACS buffer(含有 2% FBS 的 PBS)制备 1×10^6/mL 细胞悬液和 10μg/mL 抗 CDCP1 的待测抗体溶液，将细胞悬液加入 1.5mL EP 管中，1200rpm，4℃离心 3min，弃上清。分别吸 1.5mL 的待测抗体溶液加到细胞中，置于冰上孵育 30min，利用预冷的 200μL/孔 FACS buffer 清洗四次。用 1.5mL 完全培养基重悬细胞，混匀后将细胞加到 96 孔板中，100μL/孔。分别置于 4℃和 37℃孵育 0h、1h、2h 和 4h（双复孔）。孵育结束后， 1200rpm，4℃离心 3min，加入 100μL Alexa Fluor ® 488 AffiniPure Goat Anti- Human IgG(H+L)二抗（YEASEN, Cat.no. 33126ES60）稀释液，4℃孵育 30min，洗净未结合的二抗后，使用流式细胞仪检测 FITC 荧光强度（Mean Fluorescence Intensity，MFI），计算内吞比率，计算公式如下：

$$\text{Internalization (\%)} = 100\% - MFI_T / \ MFI_{T0} * 100\%$$

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

内吞百分数曲线如图 13 所示。由内吞结果可知，37℃下，MHAB10-16 人源化抗体在 HCT116 细胞具有良好的的内吞活性， MHAB10-16-13、14、15、16 的内吞活性相似， 且 MHAB10-16-13、14、15、16 的内吞活性与 parental MHAB10-16 基本相当，且均显著的高于阳性对照抗体 25A11，即 MHAB10-PC1。

5.4. Fab-ZAP 法检测抗体内吞介导的细胞杀伤实验

将人结直肠癌 HCT116 细胞消化后用完全培养基（ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007+10%FBS， Sigma-Aldrich, Cat.no. F8687+1% P/S，Gibco， Cat.no. 15140-122）重悬，细胞密度调整为 1E4cells/mL，加入 96 孔细胞培养板，每孔 50μL ，将细胞培养板放入 37℃ 细胞培养箱培养 16h。第二天用培养基配制含有 9nM ZAP-Fab 的 ZAP 稀释液，然后用 ZAP 稀释液

将抗体梯度稀释成 1.6nM 至 0.5pM（ 6 个浓度梯度，1：5 稀释）的工作液，37°C 孵育 15min 后，将工作液加到细胞培养板中，每孔加入 50μL，混匀后将细胞培养板放入 37°C细胞培养箱继续孵育 120h。提前将 7.5μL Triton-X 100 加到未加抗体-Fab-ZAP 处理的细胞孔中，孵育 30min，此孔作为阳性对照。未加抗体-Fab-ZAP 或 Triton-X100 处理的细胞孔（NT）为阴性对照。然后在细胞培养板中每孔加入 20μL MTS（Promega，Cat：G3598B），37°C细胞培养箱中孵育 2h，于酶标仪中震荡 10s 后读取数据，检测波长 A490。 利用公式 killing rate%=100%-(OD_{sample}-$OD_{Triton-X100}$)/(OD_{NT}-$OD_{Triton-X100}$)*100%计算细胞杀伤效率。

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

内吞介导的细胞杀伤曲线如图 14 所示，MHAB10-16-13、14、15、16 的内吞活性与 parental MHAB10-16 基本相当。

实施例 6. 抗人 CDCP1 人源化纳米抗体 MHAB10-16-14 的活性检测

6.1. ELISA 结合实验

使用 ELISA 法检测抗人 CDCP1 人源化纳米抗体 MHAB10-16-14 和阴性对照 Isotype 对不同种属 CDCP1 抗原的结合能力。使用 PBS 将人 CDCP1, His Tag (KACTUS, Cat.No. CDC-HM101)、恒河猴 CDCP1, His Tag (KACTUS, Cat.No. CDC-CM101）稀释至 0.5μg/mL，以 100μL/孔加入至 ELISA 板（Corning，Cat.No. 9018）中，2°C-8°C包被过夜。使用 PBST 冲洗 3 次，加入 1% BSA/PBST 室温封闭 1h，然后 PBST 冲洗 5 次，加入人源化抗体 MHAB10-16-14（阴性对照抗体为 Isotype 抗体，初始浓度为 10μg/mL ，进行 10 倍梯度稀释），孵育 1h 后使用 PBST 冲洗 7 次，洗去未结合抗体，加入 1:50,000 倍稀释的 Goat Anti-Human IgG Fc(HRP) (Abcam, Cat.No. ab97225)，室温孵育 30min。洗去多余二抗后，加入 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution，(Absin, Cat.No. 9178)， 100μL/孔，室温避光显色 15min，然后加入 100μL TMB 终止液 (Absin, Cat.No. abs9472)终止反应。使用酶标仪读取波长 450nm 处吸收值，使用 Graphpad 绘制四参数曲线。

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

由 ELISA 结合结果可知（表 12 和图 15）， MHAB10-16-14 可特异性结合

人 、恒河猴 CDCP1 抗原，且结合活性相当。

表 12. ELISA 结合 EC_{50} 结果

抗体	MHAB10-16-14		Isotype	
抗原种属	人	恒河猴	人	恒河猴
Bottom	0.04535	0.04412	N/A	N/A
Top	1.795	1.768	N/A	N/A
EC_{50} (pM)	3.372	4.052	N/A	N/A

6.2. FACS 结合实验

FACS 实验中，利用内源表达人 CDCP1 的人结直肠癌 HCT116、人结直肠癌 SW480、人胰腺导管腺癌 PL45、人结直肠癌 HT-29 和人前列腺癌 LNCaP 细胞检测人源化抗体 MHAB10-16-14 的结合（阳性对照抗体为 h14A043，即 MHAB10-PC2），待测抗体梯度稀释 (30000ng/mL, 6000ng/mL, 1200ng/mL, 240ng/mL, 48ng/mL, 9.6ng/mL, 1.92ng/mL and 0.384ng/mL)，使用 100μL FITC anti-human IgG Fc Antibody 二抗（Biolegend, Cat.no. 366916）检测待测抗体的结合情况，流式细胞仪检测结合二抗的荧光强度（Mean Fluorescence Intensity，MFI）。

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

结合曲线如图 16-20 以及表 13 所示。 由 FACS 结合结果可知，MHAB10-16-14 可以特异性结合不同人源肿瘤细胞（以人结直肠癌 HCT116、人结直肠癌 SW480、人胰腺导管腺癌 PL45、人结直肠癌 HT-29 和人前列腺癌 LNCaP 细胞为例）， 而且 MHAB10-16-14 结合活性均强于阳性对照抗体 h14A043。

表 13.FACS 结合 EC_{50} 结果

		MHAB10-16-14	h14A043	Isotype
EC_{50} (ng/mL)	HCT116	139.1	11868	N/A
	SW480	95.80	2420	N/A
	PL45	167.0	N/A	N/A
	HT-29	153.3	N/A	N/A
	LNCaP	206.5	2207	N/A

6-3 Fab-ZAP 法检测 MHAB10-16-14 抗体内吞介导的细胞杀伤实验

将人结直肠癌 HCT116 细胞消化后用完全培养基（ATCC-formulated McCoy‘s

5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007+10%FBS，Sigma-Aldrich, Cat.no. F8687+1% P/S，Gibco， Cat.no. 15140-122）重悬，细胞密度调整为 1E4cells/mL，加入 96 孔细胞培养板，每孔 50μL ，将细胞培养板放入 37℃ 细胞培养箱培养 16h。第二天用培养基配制含有 9nM ZAP-Fab 的 ZAP 稀释液，然后用 ZAP 稀释液将抗体梯度稀释成 2nM 至 0.16pM（阳性对照抗体为 h14A043 ，即 MHAB10-PC2。浓度设置为：8 个浓度梯度，前三个点 1：5 稀释，后 1：2 稀释两次，再 1：5 稀释）的工作液，37°C 孵育 15min 后，将工作液加到细胞培养板中，每孔加入 50μL，混匀后将细胞培养板放入 37℃细胞培养箱继续孵育 120h。提前将 7.5μL Triton-X 100 加到未加抗体-Fab-ZAP 处理的细胞孔中，孵育 30min，此孔作为阳性对照。未加抗体-Fab-ZAP 或 Triton-X100 处理的细胞孔（NT）为阴性对照。然后在细胞培养板中每孔加入 20μL MTS（Promega，Cat：G3598B），37℃细胞培养箱中孵育 2h，于酶标仪中震荡 10s 后读取数据，检测波长 A490。 利用公式 killing rate%=100%-(OD_{sample}-$OD_{Triton-X100}$)/(OD_{NT}-$OD_{Triton-X100}$)*100%计算细胞杀伤效率。

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

内吞介导的细胞杀伤曲线如图 21 和表 14 所示，MHAB10-16-14 对 HCT116 的杀伤活性明显强于阳性对照抗体 h14A043。

表 14. 内吞介导的细胞杀伤结果

	MHAB10-16-14	h14A043	Isotype
Bottom	20.75	22.04	N/A
Top	51.66	39.90	N/A
EC_{50} (pM)	21.72	40.95	N/A

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

权 利 要 求

1. 能够特异性结合 CUB 结构域包含蛋白 1（CDCP1）的单域抗体或其抗原结合片段，所述单域抗体或其抗原结合片段包含：

(a) CDR1，其具有：如 SEQ ID NOs: 1、4、7 任一项所示的序列，或与 SEQ ID NOs: 1、4、7 任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

(b) CDR2，其具有：如 SEQ ID NOs: 2、5、8 任一项所示的序列，或与 SEQ ID NOs: 2、5、8 任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；以及

(c) CDR3，其具有：如 SEQ ID NOs: 3、6、9 任一项所示的序列，或与 SEQ ID NOs: 3、6、9 任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

优选地，所述的置换是保守置换；

优选地，所述单域抗体或其抗原结合片段包含：

（1）如 SEQ ID NO: 1 所示的 CDR1；如 SEQ ID NO: 2 所示的 CDR2；以及，如 SEQ ID NO: 3 所示的 CDR3；

（2）如 SEQ ID NO: 4 所示的 CDR1；如 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR2；以及，如 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR3；或者，

（3）如 SEQ ID NO: 7 所示的 CDR1；如 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR2；以及，如 SEQ ID NO: 9 所示的 CDR3。

2. 特异性结合 CUB 结构域包含蛋白 1（CDCP1）的单域抗体或其抗原结合片段，所述单域抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 10-27 任一项所示的重链可变区（VHH）中含有的 3 个 CDR；

优选地，所述 VHH 中含有的 3 个 CDR 由 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

3. 权利要求 1 或 2 的单域抗体或其抗原结合片段，其包含选自下列的氨基酸序列：

（i）如 SEQ ID NO: 10-27 任一项所示的序列；

（ii）与 SEQ ID NO: 10-27 任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个或 8 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

（iii）与 SEQ ID NO: 10-27 任一项所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列；

优选地，所述的置换是保守置换。

4. 特异性结合 CDCP1 的多肽构建体，其包含权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段，以及免疫球蛋白 Fc 结构域；

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

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

优选地，所述免疫球蛋白 Fc 结构域包含 SEQ ID NO：28 或 29 所示的序列，或与其相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的序列（例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的序列；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的序列）；

优选地，所述多肽构建体具有如 SEQ ID NO: 30-47 任一项所示的序列。

5. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段，或者权利要求 4 所述的多肽构建体。

6. 载体，其包含权利要求 5 所述的核酸分子；优选地，所述载体为克隆载体或表达载体。

7. 宿主细胞，其包含权利要求 5 所述的核酸分子或权利要求 6 所述的载体。

8. 制备权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段或者权利要求 4 所述

的多肽构建体的方法，其包括，在允许蛋白表达的条件下，培养权利要求 7 所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述单域抗体或其抗原结合片段或者回收所述多肽构建体。

9. 双特异性或多特异性抗体，其包含权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段或者权利要求 4 所述的多肽构建体；

优选地，所述双特异性或多特异性抗体特异性结合 CDCP1，并且额外地特异性结合一个或多个其他靶标；

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

10. 缀合物，其包含权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段或者权利要求 4 所述的多肽构建体，以及连接于所述单域抗体或其抗原结合片段的治疗剂；

优选地，所述治疗剂选自细胞毒剂；

优选地，所述治疗剂选自烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂，及其任意组合；

优选地，所述缀合物是抗体-药物偶联物（ADC）。

11. 药物组合物，其包含权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段或者权利要求 4 所述的多肽构建体，或权利要求 9 所述的双特异性或多特异性抗体或者权利要求 10 所述的缀合物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂；

优选地，药物组合物还包含另外的药学活性剂；

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

优选地，所述单域抗体或其抗原结合片段、双特异性或多特异性抗体或缀合物与所述另外的药学活性剂作为分离的组分或作为同一组合物的组分提供。

12. 试剂盒，其含有权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段或者权利

要求 4 所述的多肽构建体；

优选地，所述单域抗体或其抗原结合片段或者所述多肽构建体带有可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶）、放射性核素、荧光染料、发光物质（如化学发光物质）或生物素；

优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段或者权利要求 4 所述的多肽构建体；

优选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶）、放射性核素、荧光染料、发光物质（如化学发光物质）或生物素。

13. 嵌合抗原受体，其包含权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段的抗原结合结构域或者权利要求 4 所述的多肽构建体；

优选地，所述抗原结合结构域由免疫效应细胞（例如 T 细胞）所表达。

14. 分离的核酸分子，其编码权利要求 13 所述的嵌合抗原受体。

15. 载体，其包含权利要求 14 所述的分离的核酸分子；优选地，其用于制备嵌合抗原受体 T 细胞。

16. 宿主细胞，其包含权利要求 14 所述的分离的核酸分子或权利要求 15 所述的载体；

优选地，所述宿主细胞是免疫效应细胞（例如，T 细胞或 NK 细胞）；

优选地，所述宿主细胞是嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）。

17. 权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段，或权利要求 4 所述的多肽构建体，或权利要求 9 所述的双特异性或多特异性抗体，或权利要求 10 所述的缀合物，或权利要求 11 所述的药物组合物，或权利要求 12 所述的试剂盒，或权利要求 13 所述的嵌合抗原受体，在制备药物中的用途，所述药物用于在受试者中预防和/治疗肿瘤；优选地，所述肿瘤表达 CDCP1；

优选地，所述药物用于抑制表达 CDCP1 的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞；

优选地，药物还包含另外的药学活性剂；

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

优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿（**mycosis fungoids**）、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤（**CHL**）、原发性纵膈大 **B** 细胞淋巴瘤、**T** 细胞/组织细胞的富 **B** 细胞淋巴瘤、**EBV** 阳性和阴性 **PTLD** 和 **EBV** 相关弥漫性大 **B** 细胞淋巴瘤（**DLBCL**）、浆母细胞性淋巴瘤、结外 **NK/T** 细胞淋巴瘤、鼻咽癌和 **HHV8** 相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统（**CNS**）肿瘤，例如原发性 **CNS** 淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人。

18. 权利要求 **1-3** 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段或者权利要求 **4** 所述的多肽构建体在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测肿瘤是否能够通过靶向 **CDCP1** 的抗肿瘤疗法来治疗；

优选地，所述单域抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记；

优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿（**mycosis fungoids**）、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤（**CHL**）、原发性纵膈大 **B** 细胞淋巴瘤、**T** 细胞/组织细胞的富 **B** 细胞淋巴瘤、**EBV** 阳性和阴性 **PTLD** 和 **EBV** 相关弥漫性大 **B** 细胞淋巴瘤（**DLBCL**）、浆母细胞性淋巴瘤、结外 **NK/T** 细胞淋巴瘤、鼻咽癌和 **HHV8** 相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统（**CNS**）肿瘤，例如原发性 **CNS** 淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤。

19. 一种检测 **CDCP1**（例如人 **CDCP1**）在样品中的存在或其量的方法，其包括以下

步骤：

(1) 将所述样品与权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段或者权利要求 4 所述的多肽构建体接触；

(2) 检测所述单域抗体或其抗原结合片段或所述多肽构建体与 CDCP1 之间复合物的形成或检测所述复合物的量；

优选地，所述单域抗体或其抗原结合片段或所述多肽构建体带有可检测的标记。

20. 一种用于降低 CDCP1 在细胞表面的表达水平的方法，其包括将所述细胞与权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段，或者权利要求 4 所述的多肽构建体，或权利要求 9 所述的双特异性或多特异性抗体，或权利要求 10 所述的缀合物，或权利要求 11 所述的药物组合物，或权利要求 12 所述的试剂盒接触，使得 CDCP1 在所述细胞表面的表达水平降低；其中，所述细胞在其表面表达 CDCP1；

优选地，所述细胞是表达 CDCP1 的肿瘤细胞。

21. 一种预防和/或治疗肿瘤的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段，或权利要求 4 所述的多肽构建体，或权利要求 9 所述的双特异性或多特异性抗体，或权利要求 10 所述的缀合物，或权利要求 11 所述的药物组合物，或权利要求 12 所述的试剂盒，或权利要求 13 所述的嵌合抗原受体；

优选地，所述肿瘤表达 CDCP1；

优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿（mycosis fungoids）、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤（CHL）、原发性纵膈大 B 细胞淋巴瘤、T 细胞/组织细胞的富 B 细胞淋巴瘤、EBV 阳性和阴性 PTLD 和 EBV 相关弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）、浆母细胞性淋巴瘤、结外 NK/T 细胞淋巴瘤、鼻咽癌和 HHV8 相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统（CNS）肿瘤，例如原发性 CNS 淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人。

22.一种检测肿瘤是否能够通过靶向 CDCP1 的抗肿瘤疗法来治疗的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的权利要求 1-3 任一项所述的单域抗体或其抗原结合片段或者权利要求 4 所述的多肽构建体；

优选地，所述单域抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记；

优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿（mycosis fungoids）、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤（CHL）、原发性纵膈大 B 细胞淋巴瘤、T 细胞/组织细胞的富 B 细胞淋巴瘤、EBV 阳性和阴性 PTLD 和 EBV 相关弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）、浆母细胞性淋巴瘤、结外 NK/T 细胞淋巴瘤、鼻咽癌和 HHV8 相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统（CNS）肿瘤，例如原发性 CNS 淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤。