说明书

发明名称: 抗原结合蛋白及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2023年12月1日提交的中国专利申请202311639416.3的优先权，这些专利申请的全部内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及特异性结合HER2的纳米抗体或其抗原结合片段，含有所述纳米抗体或其抗原结合片段的组合物，编码所述抗体或其抗原结合片段的核酸分子。此外，本发明还涉及所述纳米抗体或其抗原结合片段在疾病的治疗和诊断中的应用。

背景技术

[0004] HER2，即人上皮生长因子受体-2，也被称为受体酪氨酸蛋白激酶ErbB-2，是表皮生长因子受体(EGFR)家族中的一种分子量为185kDa的受体酪氨酸激酶(RTK)。HER2通过形成同源二聚体或与EGFR家族中其它三位成员(HER1(EGFR，ErbB-1)、HER3(ErbB-3)、HER4(ErbB-4))构成异源二聚体，导致受体酪氨酸残基的磷酸化，进而激活多种与细胞增殖和肿瘤发展相关的信号途径，如PI3K-AKT-mTOR途径。目前尚未发现能与HER2直接结合的配体。此外，ErbB2可降低细胞周期蛋白(cyclin)D及c-myc的表达，这些蛋白螯合细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependentkinase，cdk)抑制剂p27kip1，使得它不能抑制cdk2活性并最终导致细胞增殖增加。

[0005] 随着研究的不断扩大和深入，发现HER2在多种肿瘤中表达和过度表达，目前已报道了HER2在乳腺癌、胃癌、肺癌、肠癌、卵巢癌等多种癌症种类中过量表达，且HER2过度表达导致乳腺癌预后差。因此临床上亟需靶向HER2的有效药物来治疗恶性肿瘤，目前已上市的以HER2为靶点的单抗有曲妥珠单抗和帕妥珠单抗。

[0006] 曲妥珠单抗(Trastuzumab)是由美国Genentech公司开发的靶向HER2的人源化单克隆抗体(专利号US5677171A和US5821337A)。曲妥珠单抗通过与HER2的胞外

结构域IV特异性结合，诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抑制基于HER2的信号传导而发挥抗肿瘤活性。曲妥珠单抗对过量表达HER2的肿瘤显示良好的治疗效果。1998年FDA批准曲妥珠单抗与紫杉醇联合用于HER2过表达晚期乳腺癌患者的一线治疗，或是作为单药用于治疗至少已经过一个周期化疗的HER2过表达的转移性乳腺癌。

[0007] 帕妥珠单抗(Pertuzumab)也是由美国Genentech公司开发(专利号US7862817B2)，帕妥珠单抗与HER2受体的胞外结构域II区结合，抑制二聚体的形成，从而抑制受体介导的信号转导通路。美国FDA于2012年批准了帕妥珠单抗与曲妥单抗和多西他赛联合用于治疗HER2阳性的晚期转移性乳腺癌患者。

[0008] 在过去的20年中，HER2靶向疗法显著改善了HER2过表达乳腺癌患者的预后。然而，只有大约15%的乳腺癌患者过表达HER2，其余大约85%的HER2低表达或阴性乳腺癌患者亟需更有效的HER2靶向治疗。其次，HER2阳性乳腺癌容易发生转移，尤其是在脑部。常规抗体的分子量约150kDa。来源于羊驼的单域抗体/纳米抗体，和人的Fc融合之后分子量只有大约75kDa，只有常规抗体的一半，与标准单克隆抗体相比具有更小的结构，具有更强的穿透血脑屏障能力，可以渗透进入肿瘤更核心部位，最大限度增加抗体药物结合肿瘤细胞的机会，产生更好的诊断和治疗肿瘤的效果。

[0009] 因此，提供一种针对HER2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

[0010] 本申请的发明人经过大量的研究，筛选获得了系列抗HER2的纳米抗体以及多肽构建体，所述纳米抗体或多肽构建体与HER2具有高结合活性，且不与Trastuzumab或Pertuzumab竞争性结合HER2抗原。特别地，本发明的纳米抗体或多肽构建体具有内吞活性，可以通过内吞介导毒素进入细胞内部，进而起到对肿瘤细胞的杀伤作用。在此基础上，由所述纳米抗体制备的人源化纳米抗体或多肽构建体仍然具有这些突出的活性。并且，所述纳米抗体或多肽构建体还具有分子量小，易于生产等特点。

[0011] 基于此，本申请还提供了含有所述纳米抗体或其抗原结合片段的缀合物，编码所述纳米抗体或其抗原结合片段的核酸分子及包含其的宿主细胞，以及相关用途。

[0012] 纳米抗体及其抗原结合片段

[0013] 在一个方面，本发明提供了特异性结合HER2的纳米抗体或其抗原结合片段。本文中所述的纳米抗体通常由4个构架区(FRs)和3个互补决定区(CDRs)组成，称为FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4，所述抗原结合片段包含该纳米抗体的至少一部分，该部分足以赋予该片段特异性结合HER2的能力。在一些实施方案中，本发明所述的纳米抗体可在N端或C端处截短以使其仅包含部分FR1和/或FR4，或缺少那些骨架区中的一个或两个，只要其实质上保持抗原结合和特异性即可。

[0014] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO:15−18任一项所示的VHH中含有的CDR1、CDR2以及CDR3。

[0015] 在某些实施方案中，所述CDR根据Kabat、Chothia或IMGT编号系统定义。

[0016] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含：如SEQ ID NO:1所示的CDR1；如SEQ ID NO:2或3所示的CDR2；以及，如SEQ ID NO:4所示的CDR3；其中，所述CDR按Kabat编号系统定义。

[0017] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含：如SEQ ID NO:5所示的CDR1；如SEQ ID NO:6所示的CDR2；以及，如SEQ ID NO:7所示的CDR3；其中，所述CDR按IMGT编号系统定义。

[0018] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含：如SEQ ID NO:8所示的CDR1；如SEQ ID NO:9或10所示的CDR2；以及，如SEQ ID NO:11所示的CDR3；其中，所述CDR按Kabat编号系统定义；或者，

[0019] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含：如SEQ ID NO:12所示的CDR1；如SEQ ID NO:13所示的CDR2；以及，如SEQ ID NO:14所示的CDR3；其中，所述CDR按IMGT编号系统定义。

[0020] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含驼源抗体的框架区序列。

[0021] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO：15所示的序列，或与其相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、或100％的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如，1个、2个、3个、4个或5个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO：15所示的序列。

[0022] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO：17所示的序列，或与其相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、或100％的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如，1个、2个、3个、4个或5个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO：17所示的序列。

[0023] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段是人源化的，即其中一或多个框架区已基本上由人类框架区替换。

[0024] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段进一步包含人免疫球蛋白的重链框架区(例如，人重链胚系抗体基因所编码的氨基酸序列中所包含的重链框架区)，所述重链框架区任选地包含一个或多个(例如，1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个)从人源残基至驼源残基的回复突变。

[0025] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO：16所示的序列，或与其相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、或100％的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如，1个、2个、3个、4个或5个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO：16所示的序列。

[0026] 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO：18所示的序列，或与其相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、或100％的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如，1个、2个、3个、4个或5个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO：18所示的序列。

[0027] 多肽构建体

[0028] 在另一个方面，本发明还提供了特异性结合HER2的多肽构建体，其包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段，以及免疫球蛋白Fc结构域。

[0029] 在本文中，所述Fc结构域也称为Fc区，是指包含CH2和CH3的重链恒定区的一部分。在一些实施方案中，Fc结构域包含铰链、CH2和CH3。当Fc结构域包含铰链时，铰链调节两个含Fc的多肽之间的二聚作用。Fc结构域可为任何抗体重链恒定区同型。在一些实施方案中，Fc结构域是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0030] 在某些实施方案中，本发明多肽构建体所包含的Fc结构域是天然Fc区，其包含与自然界中发现的Fc区的氨基酸序列一致的氨基酸序列。例如，所述Fc结构域可以是天然序列人类IgG1 Fc区、天然序列人类IgG2 Fc区、天然序列人类IgG3 Fc区或天然序列人类IgG4 Fc区。天然Fc区可具有效应子功能。示例性“效应子功能”包括与Fc受体结合；Clq结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；噬菌作用；对细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调；和B细胞活化等。可以通过将天然Fc区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基或化学修饰，产生功能改变，例如，改变抗体对效应子配体(如FcR或补体C1q)的亲和力，从而改变效应子功能(例如降低或增强)。

[0031] 因此，在某些实施方案中，本发明多肽构建体所包含的Fc结构域也可以是变异Fc区，其与天然Fc区相比可以包含一个或多个(例如1−10个，例如1−5个)氨基酸突变或化学修饰以改变本发明抗体的下列中的一个或更多个特性：Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能等。在某些实施

方案中，本发明多肽构建体所包含的Fc结构域具有降低或去除的效应子功能，例如是包含LALA突变的Fc结构域。

[0032] 在某些实施方案中，所述免疫球蛋白Fc结构域任选地通过肽接头连接至所述纳米抗体或其抗原结合片段的N端和/或C端(例如C端)。

[0033] 在某些实施方案中，所述免疫球蛋白Fc结构域是IgG的Fc结构域(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc结构域)。

[0034] 在某些实施方案中，所述免疫球蛋白Fc结构域是人免疫球蛋白Fc结构域，例如人IgG的Fc结构域(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc结构域)。

[0035] 在某些实施方案中，所述免疫球蛋白Fc结构域包含SEQ ID NO：19或20所示的序列，或与其相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、或100％的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如，1个、2个、3个、4个或5个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。在某些实施方案中，所述免疫球蛋白Fc结构域包含SEQ ID NO：19或20所示的序列。

[0036] 在某些实施方案中，所述多肽构建体包含SEQ ID NOs:21−24任一项所示的序列，或与其相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、或100％的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如，1个、2个、3个、4个或5个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。

[0037] 纳米抗体及多肽构建体的制备

[0038] 本发明的纳米抗体或多肽构建体可以用本领域已知的各种方法来制备，例如通过基因工程重组技术来获得。例如，通过化学合成或PCR扩增获得编码本发明纳米抗体或多肽构建体的DNA分子。将所得DNA分子插入表达载体内，然后转染宿主细胞。然后，在特定条件下培养转染后的宿主细胞，并表达本发明的抗体或多肽构建体。

[0039] 在另一个方面，本发明还提供了分离的核酸分子，其编码本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体。

[0040] 在另一个方面，本发明还提供了载体，其包含本发明的核酸分子。在某些实施方案中，所述载体为克隆载体或表达载体。

[0041] 在另一个方面，本发明还提供了宿主细胞，其包含本发明的核酸分子或载体。此类宿主细胞包括但不限于，原核细胞例如细菌细胞(如大肠杆菌细胞)，以及真核细胞例如真菌细胞(例如酵母细胞)，昆虫细胞，植物细胞和动物细胞(如哺乳动物细胞，例如小鼠细胞、人细胞等)。

[0042] 在另一个方面，本发明还提供了制备本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体的方法，其包括，在允许蛋白表达的条件下，培养本发明的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述纳米抗体或其抗原结合片段或所述多肽构建体。

[0043] 双特异性或多特异性抗体

[0044] 在另一个方面，本发明还提供了双特异性或多特异性抗体，其包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体。本发明还提供了本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体、或编码它们的核酸分子、载体或宿主细胞用于制备双特异性或多特异性抗体的用途。

[0045] 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HER2，并且额外地特异性结合一个或多个其他靶标。

[0046] 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。

[0047] 偶联物

[0048] 在另一个方面，本发明还提供了偶联物，其包括包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体或本发明的双特异性或多特异性抗体以及与其连接的偶联部分。

[0049] 在某些实施方案中，所述偶联部分选自治疗剂(如细胞毒剂、细胞因子、毒素或放射性核素)。

[0050] 在某些实施方案中，所述偶联物是抗体-药物偶联物(ADC)。

[0051] 药物组合物

[0052] 在另一个方面，本发明还提供了药物组合物，其含有本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体或偶联物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0053] 在某些实施方案中，所述药物组合物还包含另外的药学活性剂，例如抗肿瘤剂。

[0054] 在某些实施方案中，在所述药物组合物中，本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体或偶联物与所述另外的药学活性剂可以作为分开的组分或作为混合的组分提供。

[0055] 本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物可以配制成医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂(包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液)、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式和治疗用途。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：在适当的溶剂中掺入必需剂量的本发明的抗体或其抗原结合片段，以及任选地，同时掺入其他期望的成分(包括但不限于，pH调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合)，随后过滤除菌。此外，可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如，通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中。

[0056] 在某些示例性实施方案中，所述药学上可接受的载体和/或赋形剂包含无菌可注射液体(如水性或非水性悬浮液或溶液)。在某些示例性实施方案中，此类无菌可注射液体选自注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液(例如0.9％(w/v)NaCl)、葡萄糖溶液(例如5％葡萄糖)、含有表面活性剂的溶液(例如0.01％聚山梨醇20)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲溶液)、Ringer氏溶液及其任意组合。

[0057] 本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明所述的纳米抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、或偶联物。“预防有效量”是指，足以预防，阻止，或延迟疾病的发生的量。“治疗有效量”是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。治疗有效量可根据如下因素发生变化：待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

[0058] 检测应用

[0059] 试剂盒

[0060] 在另一个方面，本发明还提供了试剂盒，其包括本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体。

[0061] 在某些实施方案中，所述试剂盒包含缀合物，所述缀合物包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体，以及与所述纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体连接的可检测的标记，例如酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)、化学发光试剂(例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物)、荧光染料(例如荧光素或荧光蛋白)、放射性核素或生物素。

[0062] 在某些实施方案中，所述试剂盒包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体，以及特异性识别所述纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体的第二抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)、化学发光试剂(例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物)、荧光染料(例如荧光素或荧光蛋白)、放射性核素或生物素。

[0063] 嵌合抗原受体

[0064] 在另一方面，本申请还提供了嵌合抗原受体，其包含如前所述的纳米抗体或其抗原结合片段的抗原结合结构域或者如前所述的多肽构建体。

[0065] 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。

[0066] 分离的核酸分子

[0067] 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。

[0068] 载体

[0069] 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。

[0070] 宿主细胞

[0071] 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)。

[0072] 制药用途

[0073] 在另一个方面，本发明还提供了本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物用于制备药物的用途，所述药物用于在受试者中预防和/治疗肿瘤。

[0074] 在某些实施方案中，所述肿瘤为HER2阳性肿瘤。

[0075] 在某些实施方案中，所述药物用于抑制表达HER2的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞。

[0076] 在某些实施方案中，药物还包含另外的药学活性剂。

[0077] 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。

[0078] 在某些实施方案中，所述肿瘤选自实体瘤，例如胃癌、肺癌、肝癌、头颈癌、皮肤癌、大肠癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、宫颈癌、间皮瘤、乳腺癌、结直肠癌或口腔鳞癌。

[0079] 在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

[0080] 预防和/或治疗肿瘤的方法

[0081] 在另一个方面，本发明还提供了用于在受试者中预防和/或治疗肿瘤的方法，其包括：给有此需要的受试者施用有效量的本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物。

[0082] 在某些实施方案中，所述肿瘤为HER2阳性肿瘤。

[0083] 在某些实施方案中，所述肿瘤选自实体瘤，例如胃癌、肺癌(如非小细胞肺癌)、肝癌、头颈癌、皮肤癌、大肠癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、宫颈癌、间皮瘤、乳腺癌、结直肠癌或口腔鳞癌。

[0084] 在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

[0085] 本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物可以配制成医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂(包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液)、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式和治疗用途。本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：在适当的溶剂中掺入必需剂量的本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物，以及任选地，同时掺入其他期望的成分(包括但不限于，pH调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合)，随后过滤除菌。此外，可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如，通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中，例如注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液(例如0.9％(w/v)NaCl)、葡萄糖溶液(例如5％葡萄糖)、含有表面活性剂的溶液(例如0.01％聚山梨醇20)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲溶液)、Ringer氏溶液及其任意组合。

[0086] 本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用，包括

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

[0087] 检测方法

[0088] 在另一个方面，本发明还提供了用于检测HER2在样品中的存在或其水平的方法，其包括使用本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体。在某些实施方案中，所述方法用于治疗目的，诊断目的，或者非治疗非诊断目的。

[0089] 在某些实施方案中，所述方法是免疫学检测，例如免疫印迹法、酶免疫测定法(例如ELISA)、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法。

[0090] 在某些实施方案中，所述方法包括使用缀合物，所述缀合物包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体，以及与所述纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体连接的可检测的标记，例如酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)、化学发光试剂(例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物)、荧光染料(例如荧光素或荧光蛋白)、放射性核素或生物素。

[0091] 在某些实施方案中，所述方法包括使用本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体，并且所述方法还包括使用携带可检测的标记(例如酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)、化学发光试剂(例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物)、荧光染料(例如荧光素或荧光蛋白)、放射性核素或生物素)的第二抗体来检测所述纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体。

[0092] 在某些实施方案中，所述方法包括：(1)将所述样品与本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、本发明的多肽构建体、或缀合物接触，所述缀合物包含本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体，以及与所述纳米抗体或其抗原结合片段或多肽构建体连接的可检测的标记，例如酶(例如辣根过氧化物酶

或碱性磷酸酶)、化学发光试剂(例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物)、荧光染料(例如荧光素或荧光蛋白)、放射性核素或生物素；(2)检测抗原–抗体免疫复合物的形成或检测所述免疫复合物的量。所述免疫复合物的形成表明存在HER2或表达HER2的细胞。

[0093] 在某些实施方案中，所述方法用于检测肿瘤是否能够通过靶向HER2的抗肿瘤疗法来治疗。在此类实施方案中，所述样品来自受试者，所述受试者患有肿瘤、怀疑患有肿瘤或具有患有肿瘤风险。在某些实施方案中，所述样品为来自受试者(例如哺乳动物，例如人)的细胞样品(例如包含肿瘤细胞的样品)或体液样品(例如血液)。在某些实施方案中，当存在HER2或表达HER2的细胞，和/或与参照水平相比(例如与无肿瘤疾病的患者相比)，HER2或表达HER2的细胞的量增加时，表明所述受试者适于靶向HER2的抗肿瘤疗法。

[0094] 检测试剂制备用途

[0095] 在另一个方面，本发明还提供了本发明的纳米抗体或其抗原结合片段或本发明的多肽构建体在制备用于检测HER2在样品中的存在或其水平或者用于检测肿瘤是否能够通过靶向HER2的抗肿瘤疗法来治疗的检测试剂中的用途。

[0096] 在某些实施方案中，所述检测试剂通过如上所述的本发明的方法来检测HER2在样品中的存在或其水平以及任选地检测肿瘤是否能够通过靶向HER2的抗肿瘤疗法来治疗。

[0097] 在某些实施方案中，所述样品为来自受试者(例如哺乳动物，例如人)的细胞样品(例如包含肿瘤细胞的样品)或体液样品(例如血液)。

[0098] 术语定义

[0099] 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。

[0100] 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”。

[0101] 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。

[0102] 如本文中所使用的，术语“驼源抗体”是指，经免疫接种或抗原入侵的骆驼科(Camelidae)动物(包括骆驼(Camel)、羊驼(Alpaca)和大羊驼(L.glama))所产生的针对该抗原的抗体。本领域技术人员已知，在骆驼科动物所产生的抗体中存在缺失轻链的“重链抗体”(Camelid heavy-chain antibody,HCAb)，这种抗体只包含一个重链可变区(variabledomain of heavy chain of HCAb,VHH)和两个常规的CH2与CH3区，并且单独克隆并表达出来的VHH区具有很好的结构稳定性与抗原结合活性，VHH是目前已知的可结合目标抗原的最小单位。

[0103] 如本文中所使用的，术语“纳米抗体(nanobody)”或“单域抗体”具有本领域技术人员通常理解的含义，可以互换使用。其是指由单个单体可变抗体结构域(例如单个重链可变区)所组成的抗体片段，通常来源于重链抗体(例如骆驼科动物抗体或鲨鱼抗体)的可变区。典型地，纳米抗体由4个构架区和3个互补性决定区组成，具有FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的结构。纳米抗体可在N端或C端处截短以使其仅包含部分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。

[0104] 如本文中所使用的，术语纳米抗体的“抗原结合片段”是指包含纳米抗体的片段的多肽，其保持特异性结合纳米抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与纳米抗体竞争对抗原的特异性结合，其也被称为“抗原结合部分”。通常参见，Fundamental Immunology,Ch.7(Paul,W.,ed.,第2版，Raven Press,N.Y.(1989)，其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组DNA技术或通过本发明纳米抗体的酶促或化学断裂产生本发明抗体的抗原结合片段。在一些实施方案中，所述纳米抗体的“抗原结合片段”与全长纳米抗体相比可在N端或C端处截短以使其仅包含部分FR1和/或FR4，或缺少那些骨架区中的一个或两个，只要其实质上保持抗原结合和特异性即可。

[0105] 可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如，重组DNA技术或酶促或化学断裂法)从给定的纳米抗体(例如本发明提供的纳米抗体)获得纳米抗体的抗原结合片

段，并且以与用于完整纳米抗体的方式相同的方式就特异性筛选纳米抗体的抗原结合片段。

[0106] 在本文中，除非上下文明确指出，否则当提及术语“单域抗体”或“纳米抗体”时，其不仅包括完整纳米抗体，而且包括纳米抗体的抗原结合片段。

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 如本文中所使用的，术语“Fc结构域”或“Fc区”意指，包含CH2和CH3的重链恒定区的一部分。抗体的Fc片段具有多种不同的功能，但不参与抗原的结合。由Fc区介导的“效应子功能”包括Fc受体结合；Clq结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；噬菌作用；对细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调；和B细胞活化等。在一些实施方案中，Fc区包含铰链、CH2和CH3。当Fc区包含铰链时，铰链调节两个含Fc的多肽之间的二聚作用。Fc区可为任何抗体重链恒定区同型，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0110] Fc结构域既可以包括天然Fc区，也可以包括变异Fc区。天然Fc区包含与自然界中发现的Fc区的氨基酸序列一致的氨基酸序列，例如天然序列人类Fc区包括天然序列人类IgG1 Fc区(非A和A同种异型)；天然序列人类IgG2 Fc区；天然序列人类IgG3 Fc区；及天然序列人类IgG4 Fc区，以及其天然存在的变异体。变异Fc区包

含因至少一个氨基酸修饰而与天然序列Fc区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。在一些实施方案中，变异Fc区可具备相比于天然Fc区改变的效应子功能(例如Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能)。

[0111] 如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，经基因工程改造的非人源抗体，其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言，人源化抗体的全部或部分CDR区来自于非人源抗体(供体抗体)，全部或部分的非CDR区(例如，可变区FR和/或恒定区)来自于人源免疫球蛋白(受体抗体)。在某些实施方案中，人源化抗体的CDR区来自于非人源抗体(供体抗体)，全部或部分的非CDR区(例如，可变区FR和/或恒定区)来自于人源免疫球蛋白(受体抗体)。人源化抗体通常保留了供体抗体的预期性质，包括但不限于，抗原特异性、亲和性、反应性等。在本申请中，供体抗体可以是有预期性质(例如，抗原特异性、亲和性、反应性等)的驼源抗体。为制备人源化抗体，可以使用本领域已知的方法将免疫动物的CDR区插入人源框架序列。在纳米抗体的语境下，人源化抗体可指人源化VHH，即其中一或多个骨架区已基本上由人类骨架区替换的VHH。在一些情形中，人类免疫球蛋白的某些骨架区(FR)由相应非人类残基替换。此外，人源化VHH可包含在初始VHH或人类骨架序列中均未发现、但被包括在内以进一步改进和优化VHH或含VHH的多肽的性能的残基。

[0112] 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。

[0113] 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。

[0114] 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。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 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。

[0119] 如本文中所使用的，术语“预防”是指，为了阻止或延迟疾病或病症或症状(例如，肿瘤)在受试者体内的发生而实施的方法。如本文中所使用的，术语“治疗”是指，为了获得有益或所需临床结果而实施的方法。为了本发明的目的，有益或所需的临床结果包括但不限于，减轻症状、缩小疾病的范围、稳定(即，不再恶化)疾病的状态，延迟或减缓疾病的发展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状(无论部分或全部)，无论是可检测或是不可检测的。此外，“治疗”还可以指，与期望的存活期相比(如果未接受治疗)，延长存活期。

[0120] 如本文中所使用的，术语“癌症”或“肿瘤”可互换使用，其是指以体内异常细胞的不受控生长为特征的一大类疾病。不受管制的细胞分裂可能导致恶性肿瘤或侵入邻近组织的细胞的形成，并可能通过淋巴系统或血流转移到身体的远端部位。癌症包括良性和恶性癌症以及休眠肿瘤或微转移。癌症也包括血液学恶性肿瘤。

[0121] 发明的有益效果

[0122] 本申请提供的抗HER2的纳米抗体或多肽构建体，其与HER2具有高结合活性。特别地，本发明的纳米抗体或多肽构建体具有内吞活性，可以通过内吞介导毒素进入细胞内部，进而起到对肿瘤细胞的杀伤作用。在此基础上，由所述纳米抗体或多肽构建体制备的人源化纳米抗体或多肽构建体仍然具有这些突出的活性。并且，所述纳米抗体或多肽构建体还具有分子量小，易于生产等特点。

[0123] 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

[0124] 图1显示了通过ELISA法检测的待选抗体对人HER2抗原的结合能力。

[0125] 图2显示了FACS实验中待选抗体对SK-BR-3细胞的结合活性。

[0126] 图3A显示了待选抗体在SK-BR-3细胞的内吞百分数。

[0127] 图3B显示了待选抗体在SK-BR-3细胞表面的MFI差值。

[0128] 图4显示了待选抗体-Fab-ZAP对SK-BR-3细胞的杀伤活性。

[0129] 图5A为待选抗体是否和Trastuzumab竞争性结合人重组HER2的测试结果。

[0130] 图5B为待选抗体是否和Pertuzumab竞争性结合人重组HER2的测试结果。

[0131] 图6显示了MHAB14-10人源化抗体和人重组HER2的ELISA结合曲线。

[0132] 图7显示了MHAB14-14人源化抗体和人重组HER2的ELISA结合曲线。

[0133] 图8显示了MHAB14-10人源化抗体和SK-BR-3细胞的流式结合曲线。

[0134] 图9显示了MHAB14-14人源化抗体和SK-BR-3细胞的流式结合曲线。

[0135] 图10显示了人源化抗体在SK-BR-3细胞的内吞百分数。

[0136] 图11显示了人源化抗体-Fab-ZAP在SK-BR-3细胞的杀伤曲线。

[0137] 图12为抗体MHAB14-14是否与Trastuzumab或Pertuzumab竞争性结合细胞表面HER2抗原的测试结果。

[0138] 图13显示了抗体MHAB14-14-6对不同种属HER2的ELISA结合曲线。

[0139] 图14显示了抗体MHAB14-14-6对EGFR家族蛋白的ELISA结合曲线。

[0140] 序列信息

[0141] 本发明涉及的部分序列的信息提供于下面的表1中。

[0142] 表1：序列的描述

SEQ ID NO:	序列名称	序列
1	MHAB14-10-Kabat-CDR1/ MHAB14-10-5-Kabat-CDR1	HYTMS
2	MHAB14-10-Kabat-CDR2	SITYGGVTTNYADSVKG
3	MHAB14-10-5-Kabat-CDR2	SITYGGVTTYYADSVKG
4	MHAB14-10-Kabat-CDR3/ MHAB14-10-5-Kabat-CDR3	DWTAAGLNH
5	MHAB14-10-IMGT-CDR1/ MHAB14-10-5-IMGT-CDR1	GITFRHYT
6	MHAB14-10-IMGT-CDR2/ MHAB14-10-5-IMGT-CDR2	ITYGGVTT
7	MHAB14-10-IMGT-CDR3/ MHAB14-10-5-IMGT-CDR3	HADWTAAGLNH
8	MHAB14-14-Kabat-CDR1/ MHAB14-14-6-Kabat-CDR1	NYPMN
9	MHAB14-14-Kabat-CDR2	VITRDGGVTRYAASVKG
10	MHAB14-14-6-Kabat-CDR2	VITRDGGVTYYADSVKG
11	MHAB14-14-Kabat-CDR3/ MHAB14-14-6-Kabat-CDR3	PNYNA
12	MHAB14-14-IMGT-CDR1/ MHAB14-14-6-IMGT-CDR1	GFIFGNYP
13	MHAB14-14-IMGT-CDR2/ MHAB14-14-6-IMGT-CDR2	ITRDGGVT
14	MHAB14-14-IMGT-CDR3/ MHAB14-14-6-IMGT-CDR3	HNPNYNA
15	MHAB14-10 VHH	QVQLVESGGGMVQPGGSLRLSCAASGITFRHYTM SWYRQAPGKERELVASITYGGVTTNYADSVKGRF TLSRDDAKTTAYLQMTGLKPEDTAVYYCHADWT AAGLNHWGQGTQVTVSS
16	MHAB14-10-5 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFRHYTMS WVRQAPGKERELVASITYGGVTTYYADSVKGRFT ISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCHADWTAA GLNHWGQGTQVTVSS
17	MHAB14-14 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFGNYPM NWYRQAPGKEREFVAVITRDGGVTRYAASVKGRF TITRDNAKNTVFLQMNSLKLEDTAVYYCHNPNYN AWGQGTQVTVAS

18	MHAB14-14-6 VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFGNYPM NWYRQAPGKEREFVAVITRDGGVTYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCHNPNYN AWGQGTQVTVSS
19	Fc-1	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	Fc-2	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	MHAB14-10	QVQLVESGGGMVQPGGSLRLSCAASGITFRHYTM SWYRQAPGKERELVASITYGGVTTNYADSVKGRF TLSRDDAKTTAYLQMTGLKPEDTAVYYCHADWT AAGLNHWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
22	MHAB14-10-5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFRHYTMS WVRQAPGKERELVASITYGGVTTYYADSVKGRFT ISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCHADWTAA GLNHWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
23	MHAB14-14	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFGNYPM NWYRQAPGKEREFVAVITRDGGVTRYAASVKGRF TITRDNAKNTVFLQMNSLKLEDTAVYYCHNPNYN AWGQGTQVTVASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
24	MHAB14-14-6	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFGNYPM NWYRQAPGKEREFVAVITRDGGVTYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCHNPNYN AWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT

		VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

具体实施方式

[0143] 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。

[0144] 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。

[0145] 实施例1.抗人HER2纳米抗体序列的获得

[0146] 1-1羊驼免疫及血清效价检测

[0147] 采用Her2/ERBB2 Protein,Human,Recombinant(ECD,His Tag)抗原(Sinobiological,Cat.No.10004-H08H)，免疫一只空白羊驼。初次免疫前采血10mL，作为阴性血清；初次免疫使用完全弗氏佐剂与1mg HER2抗原1:1混合后皮下多点注射。后分别于第三、五、七、九和十一周利用不完全弗氏佐剂与0.5mg HER2抗原1:1混合后皮下多点注射进行二次、三次、四次、五次和六次免疫，并于三次、四次、五次和六次免疫前采集10mL外周血，分离血清，用ELISA方法监测免疫反应。六免5天后，采集50mL外周血用于后续纳米抗体库构建。

[0148] 1-2特异性纳米抗体筛选与鉴定

[0149] 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。

[0150] 利用Her2/ERBB2 Protein,Human,Recombinant(ECD,His Tag)抗原(Sinobiological,Cat.No.10004-H08H)，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40条独特序列。

[0151] 1-3独特序列可溶性验证及抗体表达

[0152] 提取上述40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40个克隆的破碎后上清。采用ELISA检测40个克隆的破碎上清与人HER2抗原的结合活性(OD450如下表2所示)。

[0153] 选取其中与人HER2结合活性强的26条独特序列，将VHH序列整合到Human IgG1的Fc(LALA)序列(SEQ ID NO:19)，进行CHO瞬转，生产MHAB14待选抗体(本申请编号和筛选的独特序列对应如表3所示，后续MHAB14待选抗体的描述均使用本申请编号即MHAB14-1～26)，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。

[0154] 表2. 40个克隆的OD450结果

独特序列	OD450	独特序列	OD450
M26H2-2001	2.616	M26H2-3013	0.787
M26H2-2002	0.804	M26H2-3015	1.234
M26H2-2030	2.077	M26H2-3016	1.847
M26H2-2032	0.809	M26H2-3018	0.081
M26H2-2043	1.5	M26H2-3027	0.863
M26H2-2048	1.759	M26H2-3038	1.014
M26H2-2073	1.241	M26H2-3044	0.085
M26H2-2079	1.988	M26H2-3050	2.504
M26H2-2081	1.716	M26H2-3052	0.397（弱阳）
M26H2-2087	1.296	M26H2-3055	0.115
M26H2-2089	1.341	M26H2-3056	2.191
M26H2-2109	1.57	M26H2-3076	0.196
M26H2-2136	0.243（弱阳）	M26H2-3088	1.624
M26H2-2141	0.69	M26H2-3094	1.903
M26H2-2150	1.475	M26H2-3107	0.133
M26H2-2152	0.851	M26H2-3134	1.03
M26H2-2168	2.261	M26H2-3147	1.068
M26H2-2179-4	1.314	M26H2-3168	0.087
M26H2-3011	2.614	M26H2-3176	1.035
M26H2-3012	2.172	M26H2-3186	0.131
无关	0.073	1%M-PBS	0.058

[0155] 表3.编号对应

本申请编号	独特序列	本申请编号	独特序列
MHAB14-1	M26H2-3012	MHAB14-14	M26H2-2002
MHAB14-2	M26H2-3088	MHAB14-15	M26H2-2089
MHAB14-3	M26H2-3176	MHAB14-16	M26H2-2048
MHAB14-4	M26H2-3016	MHAB14-17	M26H2-2152
MHAB14-5	M26H2-3038	MHAB14-18	M26H2-2032
MHAB14-6	M26H2-3011	MHAB14-19	M26H2-2179-4
MHAB14-7	M26H2-3027	MHAB14-20	M26H2-2168
MHAB14-8	M26H2-3015	MHAB14-21	M26H2-2073
MHAB14-9	M26H2-3050	MHAB14-22	M26H2-2141
MHAB14-10	M26H2-3134	MHAB14-23	M26H2-2109
MHAB14-11	M26H2-3056	MHAB14-24	M26H2-2150
MHAB14-12	M26H2-2001	MHAB14-25	M26H2-2081
MHAB14-13	M26H2-2030	MHAB14-26	M26H2-2087

[0156] 实施例2.抗人HER2纳米抗体活性检测

[0157] 2-1ELISA结合实验

[0158] 使用ELISA法检测MHAB14待选抗体(抗人HER2 VHH的Fc融合蛋白)对人HER2抗原的结合能力。使用PBS将Her2/ERBB2 Protein,Human,Recombinant(ECD,His Tag)抗原(Sinobiological,Cat.No.10004-H08H)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1hr，然后PBST冲洗5次，加入待测抗体(待测抗体编号为MHAB14，阳性对照抗体为Trastuzumab，初始浓度为10μg/mL，进行7倍梯度稀释)，孵育1hr后使用PBST冲洗7次，洗去未结合抗体，加入1:50,000倍稀释的Goat Anti-Human IgG Fc(HRP)(Abcam,Cat.No.ab97225)，室温孵育30min。洗去多余二抗后，加入1-Step™Ultra TMB-ELISA Substrate Solution，(Absin,Cat.No.9178)，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。

[0159] 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。

[0160] 结果如图1和表4所示，MHAB14待选抗体与人HER2抗原的结合活性：除MHAB14-18和MHAB14-26外，其余序列EC50均小于阳性对照Trastuzumab。

[0161] 表4.EC_{50}结果

Ab	MHAB14-1	MHAB14-2	MHAB14-3	MHAB14-4	MHAB14-5	MHAB14-6	MHAB14-7	MHAB14-8	MHAB14-9
bottom	0.04436	0.0508	0.04783	0.04942	0.05478	0.05007	0.05335	0.04675	0.04201
Top	1.586	1.573	1.569	1.555	1.505	1.569	1.537	1.505	1.677
EC50(ng/mL)	1.557	1.78	1.993	1.861	1.692	2.126	1.602	1.659	1.809

[0162] 续表4.EC_{50}结果

Ab	MHAB14-10	MHAB14-11	MHAB14-12	MHAB14-13	MHAB14-14	MHAB14-15	MHAB14-16	MHAB14-17	MHAB14-18
bottom	0.05164	0.05189	0.053	0.04316	0.03073	0.05209	0.03982	0.04911	0.04617
Top	1.684	1.606	1.575	1.572	1.68	1.529	1.518	1.551	1.519
EC50(ng/mL)	1.764	1.752	1.78	1.906	3.014	1.837	1.74	1.836	7.876

[0163] 续表4.EC_{50}结果

Ab	MHAB14-19	MHAB14-20	MHAB14-21	MHAB14-22	MHAB14-23	MHAB14-24	MHAB14-25	MHAB14-26	Trastuzumab
bottom	0.06296	0.05487	0.05636	0.06074	0.0596	0.06232	0.0549	0.05622	0.04812
Top	1.667	1.706	1.681	1.633	1.664	1.618	1.658	0.0589	1.576
EC50(ng/mL)	1.488	1.852	1.81	1.726	1.947	1.828	2	N/A	4.244

[0164] 2-2 FACS结合实验

[0165] FACS实验中，利用内源表达人HER2的人乳腺癌SK-BR-3细胞(SK-BR-3细胞完全培养基的成分为：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)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.366916)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)。

[0166] 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。

[0167] FACS结合结果如图2所示，除MHAB14-26外，MHAB14待选抗体与SK-BR-3细胞的结合EC50均小于Trastuzumab。

[0168] 2-3内吞实验

[0169] 分别利用内源表达人HER2的人乳腺癌SK-BR-3细胞进行内吞活性检测。使用FACS buffer(含有2% FBS的PBS)制备1×10^6/mL细胞悬液和10μg/mL抗HER2的待测抗体溶液，将细胞悬液加入1.5mL EP管中，1200rpm，4℃离心3分钟，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3分钟，加入100μL FITC anti-human IgG Fc Antibody稀释液(Biolegend,Cat.no.366916)，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：

$$Internalization(\%)=100\%-MFI_T/MFI_{T0}\star100\%$$

[0170] 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。

[0171] 各时间段内吞百分数曲线如图3A所示，37℃下，MHAB14待选抗体在SK-BR-3细胞具有良好的内吞活性(其中，MHAB14-10内吞活性最优)，且内吞活性与Trastuzumab相当。

[0172] 待选抗体在SK-BR-3细胞表面的MFI差值曲线如图3B所示，由结果可知，37℃下，MHAB14-14在SK-BR-3细胞内吞的MFI差值最大(即其在SK-BR-3细胞内吞的抗体数绝对值最大)。

[0173] 2-4 Fab-ZAP法检测抗体内吞介导的细胞杀伤实验

[0174] 将人乳腺癌SK-BR-3细胞消化后用完全培养基(ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified,Catalog No.30-2007+10%FBS，Sigma-Aldrich,Cat.no.F8687+1%P/S，Gibco，Cat.no.15140-122)重悬，细胞密度调整为4E4 cells/mL，加入96

孔细胞培养板，每孔50μL，将细胞培养板放入37℃细胞培养箱培养16小时。第二天用培养基配制含有9nM ZAP-Fab的ZAP稀释液，然后用ZAP稀释液将抗体梯度稀释成4000pM至0.26pM(7个浓度梯度，1：5稀释)的工作液，37℃孵育15min后，将工作液加到细胞培养板中，每孔加入50μL，混匀后将细胞培养板放入37℃细胞培养箱继续孵育120小时。提前将7.5μL 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2小时，于酶标仪中震荡10s后读取数据，检测波长A490。利用公式killing rate％＝100％-(OD_{sample}-$OD_{Triton-X100}$)/(OD_{NT}-$OD_{Triton-X100}$)*100％计算细胞杀伤效率。

[0175] 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。

[0176] 内吞介导的细胞杀伤曲线如图4所示，MHAB14-10\MHAB14-14-Fab-ZAP对SK-BR-3细胞有良好的杀伤活性。综合FACS结合和内吞结果，将对MHAB14-10和MHAB14-14进行人源化并做后续筛选工作。

[0177] 其中，MHAB14-10的VHH序列如SEQ ID NO:15所示，Kabat定义的CDR1-CDR3序列分别如SEQ ID NO：1，2和4所示，IMGT定义的CDR1-CDR3序列分别如SEQ ID NO：5-7所示。其中，MHAB14-14的VHH序列如SEQ ID NO:17所示，Kabat定义的CDR1-CDR3序列分别如SEQ ID NO：8，9和11所示，IMGT定义的CDR1-CDR3序列分别如SEQ ID NO：12-14所示。

[0178] 2-5竞争性ELISA结合实验

[0179] 使用ELISA法检测MHAB14待选抗体MHAB14-10和MHAB14-14与Trastuzumab或Pertuzumab竞争性结合人HER2抗原的能力。使用PBS将Trastuzumab和Pertuzumab分别稀释至0.3μg/mL和1ug/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1hr，然后PBST冲洗5次。利用1％BSA/PBST稀释Her2/ERBB2 Protein,Human,Recombinant(ECD,His Tag)抗原(Sinobiological,Cat.No.10004-H08H)至0.4μg/mL，MHAB14-10，MHAB14-14和阳性对照抗体Trastuzumab或Pertuzumab稀释

至60ug/mL，进行3倍梯度稀释。先加入MHAB14-10和MHAB14-14稀释液，后加入50uL HER2，His Tag抗原稀释液，总计100μL/孔，室温孵育60min。使用PBST冲洗7次，洗去未结合抗体，加入1:12,000倍稀释的Anti-His tag Antibody(HRP),Mouse Monoclonal，(Sino Biological,Cat.No.105327-MM02T-H)，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。

[0180] 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。

[0181] ELISA结合结果如图5A和图5B所示，MHAB14-10和MHAB14-14均不与Trastuzumab或Pertuzumab竞争性结合HER2抗原。

[0182] 实施例3.抗人HER2纳米抗体人源化及活性检测

[0183] 对MHAB14-10和MHAB14-14的VHH分别进行人源化改造，获得两株人源化纳米抗体MHAB14-10-5(VHH如SEQ ID NO:16所示)和MHAB14-14-6(VHH如SEQ ID NO:18所示)。将上述VHH序列整合到人IgG1的Fc序列(SEQ ID NO:20)，并纯化表达用于后续活性实验。

[0184] 3-1 ELISA结合实验

[0185] 使用ELISA法检测MHAB14-10和MHAB14-14人源化序列对人HER2抗原的结合能力。使用PBS将Her2/ERBB2 Protein,Human,Recombinant(ECD,His Tag)抗原(Sinobiological,Cat.No.10004-H08H)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1hr，然后PBST冲洗5次，加入MHAB14-10和MHAB14-14人源化抗体(抗体编号分别为MHAB14-10-1～6和MHAB14-14-1～8，阳性对照抗体为Trastuzumab)，初始浓度为10μg/mL，进行7倍梯度稀释)，孵育1hr后使用PBST冲洗7次，洗去未结合抗体，加入1:50,000倍稀释的Goat Anti-Human IgG Fc(HRP)(Abcam,Cat.No.ab97225)，室温孵育30min。洗去多余二抗后，加入1-Step™Ultra TMB-ELISA Substrate Solution，(Absin,Cat.No.9178)，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。

[0186] 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。

[0187] 由ELISA结合结果可知，MHAB14-10人源化抗体与人HER2抗原的结合活性与parental MHAB14-10相当(图6和表5)。MHAB14-14-2、4、5、7人源化序列和HER2的亲和活性相较于parental MHAB14-14明显下降，其他序列基本相当(图7和表6)。

[0188] 表5.EC_{50}结果

Ab	MHAB14-10-1	MHAB14-10-2	MHAB14-10-3	MHAB14-10-4	MHAB14-10-5	MHAB14-10-6	MHAB14-10	Trastuzumab	Isotype control
bottom	0.003229	0.01163	0.02740	0.03107	0.01089	0.01117	0.01953	0.01167	N/A
Top	2.721	2.801	2.743	2.742	2.650	2.513	2.575	2.482	N/A
EC50(ng/mL)	1.653	1.696	1.308	1.290	1.466	1.004	1.193	2.575	N/A

[0189] 表6.EC_{50}结果

Ab	MHAB14-14-1	MHAB14-14-2	MHAB14-14-3	MHAB14-14-4	MHAB14-14-5	MHAB14-14-6	MHAB14-14-7	MHAB14-14-8	MHAB14-14	Isotype control
bottom	0.02584	0.04503	0.03630	0.05205	0.05103	0.02886	0.04843	0.02598	0.01802	N/A
Top	2.927	1.703	2.603	0.09980	~27.47	2.495	1.613	2.834	2.970	N/A
EC50(ng/mL)	1.406	N/A	2.857	N/A	N/A	4.972	N/A	2.207	2.006	N/A

[0190] 3-2 FACS结合实验

[0191] FACS实验中，利用内源表达人HER2的人乳腺癌SK-BR-3细胞检测MHAB14-10和MHAB14-14人源化抗体的结合，待测抗体梯度稀释(30000ng/mL,7500ng/mL,1875ng/mL,469ng/mL,117ng/mL,29ng/mL,7ng/mL and 1.8ng/mL)，使用Goat anti-Human IgG Fc Secondary Antibody二抗(Invitrogen,Cat.no.12-4998-82)检测待测

抗体的结合情况，流式细胞仪检测结合二抗的荧光强度(Mean Fluorescence Intensity，MFI)。

[0192] 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。

[0193] 结合曲线如图8和图9所示。由FACS结合结果可知，MHAB14-10人源化抗体与SK-BR-3细胞的结合活性与parental MHAB14-10相当(图8)。MHAB14-14-2人源化序列和HER2的亲和活性相较于parental MHAB14-14明显下降(同ELISA结果)，其他序列与parental MHAB14-14相当(图9)。

[0194] 3-3内吞实验

[0195] 分别利用内源表达人HER2的人乳腺癌SK-BR-3细胞进行内吞活性检测。使用FACS buffer(含有2% FBS的PBS)制备1×10^6/mL细胞悬液和10μg/mL抗HER2的待测抗体溶液，将细胞悬液加入1.5mL EP管中，1200rpm，4℃离心3分钟，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3分钟，加入100μL Goat anti-Human IgG Fc Secondary Antibody(Invitrogen,Cat.no.12-4998-82)二抗稀释液，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：

$$Internalization(\%)=100\%-MFI_T/MFI_{T0}\star100\%$$

[0196] 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。

[0197] 内吞百分数曲线如图10所示，由内吞结果可知，37℃下，MHAB14-10-5和MHAB14-14-6人源化抗体在SK-BR-3细胞具有良好的的内吞活性，且内吞活性与parental MHAB14-10和MHAB14-14相当。

[0198] 3-4 Fab-ZAP法检测抗体内吞介导的细胞杀伤实验

[0199] 将人乳腺癌SK-BR-3细胞消化后用完全培养基(ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified,Catalog No.30-2007+10%FBS，Sigma-Aldrich,Cat.no.F8687+

1% P/S，Gibco，Cat.no.15140-122)重悬，细胞密度调整为4E4cells/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16小时。第二天用培养基配制含有9nM ZAP-Fab的ZAP稀释液，然后用ZAP稀释液将抗体梯度稀释成4000pM至0.26pM(7个浓度梯度，1：5稀释)的工作液，37℃孵育15min后，将工作液加到细胞培养板中，每孔加入50μL，混匀后将细胞培养板放入37℃细胞培养箱继续孵育120小时。提前将7.5μL Triton-X100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2小时，于酶标仪中震荡10s后读取数据，检测波长A490。利用公式killing rate%＝100%-(ODsample-OD Triton-X100)/(ODNT-OD Triton-X100)*100%计算细胞杀伤效率。

[0200] 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。

[0201] 内吞介导的细胞杀伤曲线如图11所示，MHAB14-10-5-Fab-ZAP和MHAB14-14-6-Fab-ZAP对SK-BR-3均具有优越的杀伤活性。

[0202] 实施例4.竞争性FACS结合实验

[0203] 使用FACS法检测内源表达人HER2的人乳腺癌SK-BR-3细胞上待选抗体MHAB14-14与Trastuzumab或Pertuzumab竞争性结合细胞表面HER2抗原的能力。其中，使用SK-BR-3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)培养SK-BR-3细胞。用FACS buffer(含2% FBS的PBS)配制细胞悬液(2.0×10^6cell/ml)和抗体稀释液。先加入Trastuzumab(终浓度7.5ug/mL)和Pertuzumab(终浓度7.5ug/mL)或Isotype(终浓度7.5ug/mL)，再加入待选抗体MHAB14-14或Isotype梯度稀释液(终浓度梯度30000ng/mL,7500ng/mL,1875ng/mL,468.8ng/mL,117.2ng/mL,29.3ng/mL,7.3ng/mL and 1.8ng/mL)，置于冰上4℃孵育60min，使用FACS buffer清洗多余的一抗。再用100μL MonoRab™Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail[PE](GenScript,Cat.no.A02018)二抗稀释液(用含2% FBS的PBS buffer

稀释，稀释比1：200)检测待测抗体的结合情况，流式细胞仪检测PE荧光强度(Mean Fluorescence Intensity，MFI)。

[0204] 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。

[0205] 结合曲线如图12所示，由FACS结合结果可知，Trastuzumab和Pertuzumab浓度饱和的情况下，MHAB14-14还可以结合细胞表面HER2抗原。

[0206] 实施例5.ELISA种属交叉实验

[0207] 使用ELISA法检测MHAB14-14-6(抗人HER2纳米抗体)对不同种属(人和猴)HER2抗原的结合能力。用PBS将Human HER2,His Tag(ACRO,Cat.No.HE2-H5225)和Cynomolgus HER2 Protein，His Tag(Sino Biological,Cat.No.90295-C08H)分别稀释至0.5μg/mL，以100μL/孔加入至酶标板(Corning，Cat.No.9018)中，4℃包被过夜。使用PBST冲洗3次，每孔加入200μL 3% BSA/PBST，室温封闭1hr，然后PBST冲洗5次，加入待测抗体，初始浓度为10μg/mL，进行10倍梯度稀释，室温孵育1hr后使用PBST冲洗7次，洗去未结合抗体，每孔加入100μL 1:50,000倍稀释的山羊抗人IgG Fc(HRP)(Abcam,Cat.No.ab97225)，室温孵育30min。使用PBST冲洗7次，洗去多余二抗后，每孔加入100μL 1-Step™Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Absin,Cat.No.9178)，室温避光显色15min，然后每孔加入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。

[0208] 所有实验结果以平均值±SEM(平均标准误差)表示。采用Prism(GraphPad)软件作图并进行数据分析。

[0209] 结果如图13所示和表7所示，MHAB14-14-6对人HER2和猴HER2均具有特异性结合作用，且结合活性相当。

[0210] 表7.MHAB14-14-6对人HER2和猴HER2的结合活性

	人（Human）HER2	猴（Cynomolgus）HER2
EC50 (ng/ml)	9.914	9.513

[0211] 实施例6.EGFR家族特异性结合ELISA

[0212] 使用ELISA法检测MHAB14-14-6(抗人HER2纳米抗体)对EGFR家族蛋白(HER1、HER2、HER3和HER4)的结合能力。用PBS将Human HER1,His Tag(Sino Biological,Cat.No.10001-H08H)；Human HER2,His Tag(ACRO,Cat.No.HE2-H5225)；Human HER3 Protein，His Tag(ACRO,Cat.No.ER3-H5223)和Human HER4 Protein，His Tag(Sino Biological,Cat.No.10363-H08H)分别稀释至0.5μg/mL，以100μL/孔加入至酶标板(Corning，Cat.No.9018)中，4℃包被过夜。使用PBST冲洗3次，每孔加入200μL 3% BSA/PBST，室温封闭1hr，然后PBST冲洗5次，加入待测抗体，初始浓度为10μg/mL，进行10倍梯度稀释)，室温孵育1hr后使用PBST冲洗7次，洗去未结合抗体，每孔加入100μL 1:50,000倍稀释的山羊抗人IgG Fc(HRP)(Abcam,Cat.No.ab97225)，室温孵育30min。使用PBST冲洗7次，洗去多余二抗后，每孔加入100μL 1-Step™Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Absin,Cat.No.9178)，室温避光显色15min，然后每孔加入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。

[0213] 所有实验结果以平均值±SEM(平均标准误差)表示。采用Prism(GraphPad)软件作图并进行数据分析。

[0214] 结果如图14所示和表8所示，MHAB14-14-6只结合HER2，对EGFR家族其他成员HER1、HER3和HER4没有结合活性。因此，本申请的抗体对EGFR家族蛋白具有突出的选择结合活性，对HER2具有特异的结合活性。

[0215] 表8.MHAB14-14-6对人HER1-4的结合活性

	Human HER1	Human HER2	Human HER3	Human HER4
EC50 (ng/ml)	N/A	8.45	N/A	N/A

[0216] 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。

权利要求书

[权利要求 1] 特异性结合上皮生长因子受体-2(HER2)的纳米抗体或其抗原结合片段，其中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO:15-18任一项所示的VHH中含有的CDR1、CDR2以及CDR3；

优选地，所述CDR根据Kabat、Chothia或IMGT编号系统定义。

[权利要求 2] 权利要求1所述的纳米抗体或其抗原结合片段，其包含：

(1)如SEQ ID NO:1所示的CDR1；如SEQ ID NO:2或3所示的CDR2；以及，如SEQ ID NO:4所示的CDR3；其中，所述CDR按Kabat编号系统定义；

(2)如SEQ ID NO:5所示的CDR1；如SEQ ID NO:6所示的CDR2；以及，如SEQ ID NO:7所示的CDR3；其中，所述CDR按IMGT编号系统定义；

(3)如SEQ ID NO:8所示的CDR1；如SEQ ID NO:9或10所示的CDR2；以及，如SEQ ID NO:11所示的CDR3；其中，所述CDR按Kabat编号系统定义；或者，

(4)如SEQ ID NO:12所示的CDR1；如SEQ ID NO:13所示的CDR2；以及，如SEQ ID NO:14所示的CDR3；其中，所述CDR按IMGT编号系统定义。

[权利要求 3] 权利要求1或2所述的纳米抗体或其抗原结合片段，其中所述纳米抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO：15或17所示的序列，或与其相比具有至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、或100％的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如，1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。

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

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

[权利要求 5] 权利要求4所述的纳米抗体或其抗原结合片段，其中所述纳米抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO：16或18所示的序列，或与其相比具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如，1个、2个、3个、4个或5个氨基酸置换、缺失或添加)的序列。

[权利要求 6] 特异性结合HER2的多肽构建体，其包含权利要求1-5任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段，以及免疫球蛋白Fc结构域；

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

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

优选地，所述免疫球蛋白Fc结构域包含SEQ ID NO：19或20所示的序列，或与其相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的序列(例如1个，2个，3个，4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合的序列)；

优选地，所述多肽构建体具有如SEQ ID NO:21-24任一项所示的序列。

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

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

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

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

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

优选地，所述双特异性或多特异性抗体特异性结合HER2，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。

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

优选地，所述偶联部分选自治疗剂(如细胞毒剂、细胞因子、毒素或放射性核素)；

优选地，所述偶联物是抗体−药物偶联物(ADC)。

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

优选地，所述药物组合物还包含另外的药学活性剂，例如抗肿瘤剂。

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

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

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

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

优选地，所述抗原结合结构域由免疫效应细胞(例如T细胞)所表达。

[权利要求 16] 分离的核酸分子，其编码权利要求15所述的嵌合抗原受体。

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

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

优选地，所述宿主细胞是免疫效应细胞(例如，T细胞或NK细胞)；

优选地，所述宿主细胞是嵌合抗原受体T细胞(CAR−T)。

[权利要求 19] 权利要求1−5任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段、权利要求6所述的多肽构建体、权利要求7所述的分离的核酸分子、权利要求8所述的载体、权利要求9所述的宿主细胞、权利要求11所述的双特异性或多特异性抗体、权利要求12所述的偶联物、或权利要求13所

述的药物组合物，或权利要求14所述的试剂盒，或权利要求15所述的嵌合抗原受体，在制备药物中的用途，所述药物用于在受试者中预防和/治疗肿瘤；

优选地，所述肿瘤表达HER2；

优选地，所述药物用于抑制表达HER2的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞；

优选地，药物还包含另外的药学活性剂；

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

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

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人。

[权利要求 20] 权利要求1−5任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段或权利要求6所述的多肽构建体在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测肿瘤是否能够通过靶向HER2的抗肿瘤疗法来治疗，或者用于检测HER2在样品中的存在或其水平；

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

[权利要求 21] 用于检测HER2在样品中的存在或其水平的方法，其包括使用权利要求1−5任一项所述的纳米抗体或其抗原结合片段或权利要求6所述的多肽构建体；

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