

抗 c-MET 纳米抗体及其用途

相关申请的交叉引用

本申请要求 2023 年 8 月 14 日提交的中国专利申请 202311018785.0 的优先权，该专利
5 申请的全部内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

本发明涉及特异性结合 c-MET 的纳米抗体或其抗原结合片段，含有所述纳米抗体或其
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
10 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。

技术背景

细胞间质上皮转换因子（cellular-mesenchymal epithelial transition factor，
c-MET）又称肝细胞生长因子受体（hepatocyte growth factor receptor，HGFR），是
15 MET 基因编码产生的具有自主磷酸化活性的跨膜受体，属于酪氨酸激酶受体超家族^[1]。
²¹。c-MET 的结构由 α 链和 β 链通过二硫键连接组成，分为胞外域、跨膜螺旋结构域
和胞内域。c-MET 的胞外域包含 3 个不同的功能区：覆盖整个 α 链和部分 β 链 N 端
的 SEMA 结构域，是配体结合的关键区域^[3]；有 4 个二硫键的胱氨酸富集域；有 4 个
免疫球蛋白区域^[4]。c-MET 的胞内域也由 3 个调控区组成，即含有 Tyr1003 和 Ser985
20 磷酸位点的近膜结构域，其主要对 c-Met 信号传导起到负调控的功能、含有 Tyr1234
和 Tyr1235 磷酸化位点的催化结构域，其主要是发生自身磷酸化活化下游信号，起到
正向调节酪氨酸激酶催化活性的作用、含有 Tyr1349 和 Tyr1356 的 C 端多功能结合区，
其主要是募集胞质中的各种蛋白因子和接头分子，起到传递信号的作用^[5, 6]。

肝细胞生长因子（HGF）是 c-MET 唯一已知的高亲和力配体^[7]，正常生理状态下，
25 当其与 c-MET 结合后，c-Met 通过形成二聚体和近膜区域若干位点的磷酸化实现活化，
激活下游的一系列信号通路，如 PI3K-Akt、Ras-MAPK、STAT-INK 等，从而发挥促进
细胞增殖、细胞生长、血管生成等一系列生物效应^[8]。研究发现，c-Met 通路异常
激活可促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移，最终驱动恶性肿瘤的发生和发展。据报道，
c-Met 信号通路在多种类型的实体瘤，如肺癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、皮肤癌、大肠
30 癌等均存在异常调节的现象，并且在结直肠癌肝转移，口腔鳞癌的形成、生长、转

移，乳腺癌、卵巢癌和胃癌的侵袭、转移，以及肝癌、肺癌和胰腺癌等发生发展中发挥重要的作用。c-MET 通路异常激活主要包括 MET14 外显子跳跃突变、MET 扩增和 MET 蛋白过表达 3 种类型^[9]，其中 MET14 外显子跳跃突变被认为是肺癌独立致癌驱动基因，在 NSCLC 患者中的发生率为 2-3%，在肺肉瘤样癌患者中高达 31.8%^[9-11]；
5 MET 高扩增在肺腺癌中发生率为 1.0%，尽管 MET 扩增的发生率不高，但常伴有较强的 MET 蛋白表达，同时也是预后不良的因素之一^[12]；MET 蛋白过表达在肺腺癌中的发生率可高达 65%，但并非作为原发致癌驱动因素，更多的时候是作为其他驱动基因激活后产生的二次事件，从而促进肿瘤的生长^[13]。

目前已报道了靶向人 c-MET 的单克隆抗体如 Telisotuzumab，基于该单抗的抗体
10 药物偶联物在非小细胞肺癌患者的治疗中已展现出良好的潜力。然而本领域对具备更优特性的靶向 c-MET 的抗肿瘤方法的需求并未得到满足。

发明内容

本申请的发明人经过大量的研究，筛选获得了能够特异性识别 c-MET 的胞外区域
15 的人源化纳米抗体及其结合抗原片段，且本发明采用来源于羊驼的纳米抗体，其分子量只有常规抗体的分子量（150 kDa）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，产生更好的治疗肿瘤的效果。

纳米抗体及其抗原结合片段

20 在一个方面，本发明提供了特异性结合 c-MET 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 c-MET 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
25 缺少那些骨架区中的一个或两个，只要其实质上保持抗原结合和特异性即可。

在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO: 1、14、15 任一项所示的 VHH 中含有的 CDR1、CDR2 以及 CDR3。

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

在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 2 所示
30 的 CDR1，如 SEQ ID NO: 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。

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 Chothia 编号系统定义。

- 5 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 所示的 CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 10 所示的 CDR3，其中，所述 CDR 按 IMGT 编号系统定义。

在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含驼源抗体的框架区序列。

- 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 1 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: 1 所示的序列。

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

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

- 在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 14 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: 14 所示的序列。

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

在某些实施方案中，所述纳米抗体或其抗原结合片段特异性结合人和/或猴 c-MET。

5 多肽构建体

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

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

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

因此，在某些实施方案中，本发明多肽构建体所包含的 Fc 结构域也可以是变异 Fc 区，其与天然 Fc 区相比可以包含一个或多个（例如 1-10 个，例如 1-5 个）氨基酸突变或化学修饰以改变本发明抗体的下列中的一个或更多特性：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。

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

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

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

在某些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 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，所述免疫球蛋白 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 16 所示的序列。

在某些实施方案中，所述多肽构建体包含 SEQ ID NOs: 11-13 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。

15 纳米抗体及多肽构建体的制备

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

20 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。

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。

25 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）。

30 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。

双特异性或多特异性抗体

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

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 **c-MET**，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。

偶联物

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

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）。

药物组合物

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

在某些实施方案中，所述药物组合物还包含另外的药学活性剂，例如抗肿瘤剂。

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

本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物可以配制成医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂（包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液）、吸入剂、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。

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（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。

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。

20 制药用途

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

在某些实施方案中，所述肿瘤为 c-MET 阳性肿瘤。在本文中，c-MET 阳性可由免疫组化和染色强度评价获得。

在某些实施方案中，所述肿瘤为 c-MET 通路异常激活的肿瘤。

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

30 在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

在某些实施方案中，所述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单独使用，或与另外的药理学活性剂（例如抗肿瘤剂）联合使用。

5 预防和/或治疗肿瘤的方法

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

在某些实施方案中，所述肿瘤为 **c-MET** 阳性肿瘤。

10 在某些实施方案中，所述肿瘤为 **c-MET** 通路异常激活的肿瘤。

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

在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

15 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 and 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
20 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、
25 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。
30

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
5 给药途径/方式是胃肠外给药（例如静脉注射或推注，皮下注射，腹膜内注射，肌肉注射）。技术人员应理解，给药途径和/或方式将根据预期目的而发生变化。在某些实施方案中，本发明的纳米抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、双特异性或多特异性抗体、偶联物或药物组合物通过静脉注射或推注给予。

10 检测应用

试剂盒

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

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

在某些实施方案中，所述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
20 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。

检测方法

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

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

30 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。

5 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。

10 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 c-MET 或表达 c-MET 的细胞。

在某些实施方案中，所述方法用于检测肿瘤是否能够通过靶向 c-MET 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 c-MET 或表达 c-MET 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），c-MET 或表达 c-MET 的细胞的量增加时，表明所述受试者适于靶向 c-MET 的抗肿瘤疗法。

检测试剂制备用途

25 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 c-MET 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 c-MET 的抗肿瘤疗法来治疗的检测试剂中的用途。

在某些实施方案中，所述检测试剂通过如上所述的本发明的方法来检测 c-MET 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 c-MET 的抗肿瘤疗法来治疗。

30 在某些实施方案中，所述样品为来自受试者（例如哺乳动物，例如人）的细胞样品（例

如包含肿瘤细胞的样品)或体液样品(例如血液)。

术语定义

在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的细胞培养、分子生物学、生物化学、核酸化学、免疫学等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。

如本文中所使用的,术语“细胞间质上皮转换因子(**cellular-mesenchymal epithelial transition factor, c-MET**)”是指,**MET**基因编码产生的具有自主磷酸化活性的跨膜受体,属于酪氨酸激酶受体超家族,其序列是本领域技术人员公知的(参见,例如**NCBI GENBANK**数据库登录号:**AAI30421.1**)。**c-MET**可以与肝细胞生长因子(**HGF**)结合,激活**PI3K-Akt**、**Ras-MAPK**、**STAT-INK**等下游多条重要信号通路。**c-MET**通路正常表达时促进组织的分化与修复,调节异常时则促进肿瘤细胞的增殖与转移。

如本文中所使用的,术语“**c-MET**通路异常激活”具有本领域技术人员公知的含义,其包括**MET14**外显子跳跃突变、**MET**扩增和/或**MET**蛋白过表达。**c-MET**通路异常激活在多种类型的实体瘤中发生,包括但不限于胃癌、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、结直肠癌和口腔鳞癌等。

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(variable domain of heavy chain of **HCAb**, **VHH**)和两个常规的**CH2**与**CH3**区,并且单独克隆并表达出来的**VHH**区具有很好的结构稳定性与抗原结合活性,**VHH**是目前已知的可结合目标抗原的最小单位。

如本文中所使用的,术语“纳米抗体(**nanobody**)”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。纳米抗体也称为单域抗体 (**single-domain antibody, sdAb**)，两者可互换使用。

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。

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

在本文中，除非上下文明确指出，否则当提及术语“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。

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 **IMGT** 编号系统 (**Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003**)、**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**)、或 **Chothia** 编号系统 (**Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883**) 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**）。

在本发明中，本发明的纳米抗体或其抗原结合片段含有的 **CDR** 可根据本领域已知的各种编号系统确定。在某些实施方案中，本发明的纳米抗体或其抗原结合片段含有的 **CDR** 优选地通过 **IMGT**、**Kabat**、或 **Chothia** 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“Fc 结构域”或“Fc 区”意指，包含 CH2 和 CH3 的重链恒定区的一部分。抗体的 Fc 片段具有多种不同的功能，但不参与抗原的结合。由 Fc 区介导的“效应子功能”包括 Fc 受体结合；C1q 结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；噬菌作用；对细胞表面受体(例如 B 细胞受体)的下调；和 B 细胞活化等。在一些实施方案中，Fc 区包含铰链、CH2 和 CH3。当 Fc 区包含铰链时，铰链调节两个含 Fc 的多肽之间的二聚作用。Fc 区可为任何抗体重链恒定区同型，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

10 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
15 实施方案中，变异 Fc 区可具备相比于天然 Fc 区改变的效应子功能(例如 Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能)。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，经基因工程改造的非人源抗体，其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言，人源化抗体的全部或部分 CDR 区来自于非人源抗体(供体抗体)，全部或部分的非 CDR 区(例如，可
20 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
25 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
30 残基。

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

两分子间的特异性结合性质可使用本领域公知的方法进行测定。一种方法涉及测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速度。“结合速率常数”(k_a 或 k_{on})和“解离速率常数”(k_{dis} 或 k_{off})两者都可通过浓度及缔合和解离的实际速率而计算得出(参见 Malmqvist M, *Nature*, 1993, 361:186-187)。 k_{dis}/k_{on} 的比率等于解离常数 K_D (参见 Davies 等人, *Annual Rev Biochem*, 1990; 59:439-473)。可用任何有效的方法测量 K_D 、 k_{on} 和 k_{dis} 值，例如使用表面等离子体共振术(SPR)在 *Biacore* 中来测量解离常数，或者使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，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“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。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如，两个 DNA 分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据，或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据)，那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间

的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目×100的函数。例如，如果两个序列的10个位置中有6个匹配，那么这两个序列具有60%的同一性。例如，DNA序列CTGACT和CAGGTT共有50%的同一性(总共6个位置中有3个位置匹配)。通常，在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。

5 这样的比对可通过使用，例如，可通过计算机程序例如Align程序(DNAstar, Inc.)方便地进行的Needleman等人(1970)*J. Mol. Biol.* 48: 443-453的方法来实现。还可使用已整合入ALIGN程序(版本2.0)的E. Meyers和W. Miller (*Comput. Appl Biosci.*, 4:11-17 (1988))的算法，使用PAM120权重残基表(weight residue table)、12的缺口长度罚分和4的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外，可使用已整合入

10 GCG软件包(可在www.gcg.com上获得)的GAP程序中的Needleman和Wunsch (*J Mol Biol.* 48:444-453 (1970))算法，使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及16、14、12、10、8、6或4的缺口权重(gap weight)和1、2、3、4、5或6的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

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

15 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

20 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，优选来自

25 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。此外，氨基酸残基还可以分成通过可选物理和功能特性限定的类别。例如，含醇基残基(S和T)，脂肪族残基(I、L、V和M)，环烯基相关残基(F、H、W和Y)，疏水性残基(A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W和Y)，带负电的残基(D和E)，极性残基(C、D、E、H、K、N、Q、R、S和T)，带正电的残基(H、K和R)，小残基(A、C、D、G、N、P、S、T和V)，极小残基(A、G和S)，涉及转角形成的残基(A、C、D、E、

30

G、H、K、N、Q、R、S、P 和 T)，柔性残基 (Q、T、K、S、G、P、D、E 和 R)。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)。

5 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。

10 如本文中所使用的, 术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂, 其是本领域公知的(参见例如 *Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995*), 并且包括但不限于: pH 调节剂, 表面活性剂, 佐剂, 离子强度增强剂, 稀释剂, 维持渗透压的试剂, 延迟吸收的试剂, 防腐剂。例如,

15 pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子, 阴离子或者非离子型表面活性剂, 例如 Tween-80。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂, 例如对羟苯甲酸酯, 三氯叔丁醇, 苯酚, 山梨酸等。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、NaCl 及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水, 水性缓冲液(如缓冲盐水),

20 醇和多元醇(如甘油)等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义, 其能够稳定药物中的活性成分的期望活性, 包括但不限于谷氨酸钠, 明胶, SPGA, 糖类(如山梨醇, 甘露醇, 淀粉, 蔗糖, 乳糖, 葡聚糖, 或葡萄糖), 氨基酸(如谷氨酸, 甘氨酸), 蛋白质(如干燥乳清, 白蛋白或酪蛋白)或其降解产物(如乳白蛋白水解物)等。在某些示例性实施方案中, 所述药学上可接受的载体或赋形剂包括无菌可注射液体(如水性或非

25 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。

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

30 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。

如本文中所使用的，术语“受试者”是指哺乳动物，例如人、猴、小鼠。在某些实施方案中，所述受试者（例如人、猴、小鼠）患有与c-MET相关的疾病（例如，涉及c-MET阳性的肿瘤），或者，具有患有上述疾病的风险。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如，涉及c-MET阳性的肿瘤）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟所述疾病的发生的量；治疗疾病有效量是指，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。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于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。

如本文中所使用的，术语“抗体介导的内吞”是指抗体在与细胞表面抗原结合后穿过细胞膜的现象。

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

发明的有益效果

本发明的纳米抗体能够特异性识别c-MET，并且具备良好的内吞活性以及内吞介导的细胞杀伤活性，对于肿瘤（特别是表达c-MET的肿瘤）的治疗具有良好潜力。此外，本发明的人源化纳米抗体不仅保留了亲本抗体的功能和性质，而且具有较高的人源化程度，从而可安全地施用给人受试者，而不引发免疫原性反应。此外，本发明的纳米抗体分子量只有常规抗体的分子量的一半，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，产生更好的治疗肿瘤的效果。综上，本发明的纳米抗体具有重要的临床价值。

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可实施。

附图说明

- 图 1：待选抗体与人 c-MET 抗原结合的 ELISA 测定结果。
- 图 2：待选抗体与人 c-MET 抗原结合的 FACS 测定结果。
- 图 3A-3B：待选抗体的利用内源表达人 c-MET 的人胃癌细胞 Hs746T 的内吞活性检测结果。图 3A 是各时间段内吞百分数曲线；图 3B 是 37°C 4h 内吞结果。
- 图 4：待选抗体的基于 Fab-ZAP 法的抗体内吞介导的细胞杀伤实验。
- 图 5：MHAB07-3 及其人源化抗体与人 c-MET 抗原结合的 FACS 测定结果。
- 图 6：MHAB07-3 及其人源化抗体和阳性对照抗体与人 c-MET 抗原结合的 FACS 测定结果。
- 图 7A-7B：MHAB07-3 及其人源化抗体的利用内源表达人 c-MET 的人胃癌细胞 Hs746T 的内吞活性检测结果。图 7A 是各时间段内吞百分数曲线；图 7B 是 37°C 4h 内吞结果。
- 图 8：MHAB07-3 及其人源化抗体的基于 Fab-ZAP 法的抗体内吞介导的细胞杀伤实验。
- 图 9：MHAB07-3-2 对不同种属（人、猴、小鼠和大鼠）c-MET 抗原的结合能力检测结果。

序列信息

表 1：本发明涉及的序列的信息描述于下面的表中：

SEQ ID NO	描述	序列
1	MHAB07-3 VHH	QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITNTYVMGWFRQA PGKERELQAAITWTVGSTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYL QMNSLKPEDTAVYYCAASRFSAWPPRGTLGWNSWGQGT QVTVSS
2	MHAB07-3 VHH-CDR1 (Kabat 定义)	TYVMG

3	MHAB07-3 VHH-CDR2 (Kabat 定义)	AITWTVGSTYYVDSVKG
4	MHAB07-3 VHH-CDR3 (Kabat 定义)	SRFSAWPPRGTLGEWNS
5	MHAB07-3 VHH-CDR1 (Chothia 定义)	GRITNTY
6	MHAB07-3 VHH-CDR2 (Chothia 定义)	TWTVGS
7	MHAB07-3 VHH-CDR3 (Chothia 定义)	SRFSAWPPRGTLGEWNS
8	MHAB07-3 VHH-CDR1 (IMGT 定义)	GRITNTYV
9	MHAB07-3 VHH-CDR2 (IMGT 定义)	ITWTVGST
10	MHAB07-3 VHH-CDR3 (IMGT 定义)	AASRFSAWPPRGTLGEWNS
11	MHAB07-3	QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITNTYVMGWFRQA PGKERELQAAITWTVGSTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYL QMNSLKPEDTAVYYCAASRFSAWPPRGTLGEWNSWGQGT QVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	MHAB07-3-1	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRITNTYVMGWVRQA PGKEREFQAAITWTVGSTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYL QMNSLRPEDTAVYYCAASRFSAWPPRGTLGEWNSWGQGT QVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	MHAB07-3-2	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRITNTYVMGWVRQA PGKEREFVAAITWTVGSTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYL QMNSLRPEDTAVYYCAASRFSAWPPRGTLGEWNSWGQGT QVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	MHAB07-3-1 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRITNTYVMGWVRQA PGKEREFQAAITWTVGSTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYL

		QMNSLRPEDTAVYYCAASRFSAPPRGTLGEWNSWGQGT QVTVSS
15	MHAB07-3-2 VHH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRITNTYVMGWVRQA PGKEREFVAAITWTVGSTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYL QMNSLRPEDTAVYYCAASRFSAPPRGTLGEWNSWGQGT QVTVSS
16	人 IgG1 的 Fc (LALA)	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

具体实施方式

现在于以下非限制性实施例中描述本发明。

本领域技术人员知晓，实施例以举例方式描述本发明，且不意欲限制本申请所要求保护的5 范围。实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1：抗人 c-MET 纳米抗体序列的获得

1-1. 特异性纳米抗体筛选与鉴定

10 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 c-MET 抗原（ACRO, Cat. MET-H5227），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 43 条独特序列。

15 1-2. 独特序列可溶性验证及抗体表达

提取上述 43 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 43 个克隆的破碎后上清。采用 ELISA 检测 43 个克隆的破碎上清与人 c-MET 抗原的结合活性（OD450 如下表 2 所示）。部分克隆显示阴性（有可能是 VHH 二抗无法识别造成的假阴性，有待验证，故此筛选步骤不直接剔除这些独特序列）。

表 2：43 个克隆与人 c-MET 抗原的结合活性

独特序列	OD450	独特序列	OD450
MH172-HGFR-1-2	0.199	MH172-HGFR-2-10	3.234
MH172-HGFR-1-6	0.102	MH172-HGFR-2-21	0.23
MH172-HGFR-1-8	0.749	MH172-HGFR-2-27	2.21

MH172-HGF R-1-13	0.221	MH172-HGF R-2-32	0.454
MH172-HGF R-1-21	0.211	MH172-HGF R-2-173	3.227
MH172-HGF R-1-22	0.136	MH172-HGF R-7-1-8	0.206
MH172-HGF R-1-24	0.229	MH172-HGF R-7-1-10	0.298
MH172-HGF R-1-28	0.202	MH172-HGF R-7-1-12	0.166
MH172-HGF R-1-29	0.231	MH172-HGF R-7-1-27	1.818
MH172-HGF R-1-31	0.175	MH172-HGF R-7-1-66	1.426
MH172-HGF R-1-32	0.183	MH172-HGF R-7-1-79	0.898
MH172-HGF R-1-38	2.935	MH172-HGF R-7-2-20	1.592
MH172-HGF R-1-40	2.653	MH172-HGF R-7-2-21	3.227
MH172-HGF R-1-42	0.164	MH172-HGF R-7-2-47	0.213
MH172-HGF R-1-47	2.878	MH172-HGF R-7-2-52	1.101
MH172-HGF R-1-51	0.362	MH172-HGF R-7-2-65	0.991
MH172-HGF R-1-72	0.432	MH172-HGF R-7-2-79	3.41
MH172-HGF R-1-73	0.372	MH172-HGF R-7-2-83	1.114
MH172-HGF R-1-79	2.209	MH172-HGF R-7-2-89	2.477
MH172-HGF R-2-1	3.382	MH172-HGF R-7-2-90	1.974
MH172-HGF R-2-4	3.169	MH172-HGF R-7-2-92	3.259
MH172-HGF R-2-6	0.12	PBS	0.077

选取与人 c-MET 结合活性强，CDR3 区未出现半胱氨酸残基（cysteine，C），且理论 PI 值>7 的独特序列，将 VHH 序列整合到人 IgG1 的 Fc（LALA）序列（SEQ ID NO:16），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 18 条 MHB07 待选抗体（如表 3 所示），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 3：MHB07 待选抗体

编号	Unique seq	OD450	Unique seq/PBS
MHAB07 - 1	MH172-7-H-2-79	3.41	44.28571429
MHAB07 - 2	MH172-H-2-1	3.382	43.92207792
MHAB07 - 3	MH172-7-H-2-92	3.259	42.32467532
MHAB07 - 4	MH172-7-H-2-21	3.227	41.90909091
MHAB07 - 5	MH172-H-2-4	3.169	41.15584416
MHAB07 - 6	MH172-H-2-27	2.21	28.7012987
MHAB07 - 7	MH172-7-H-2-90	1.974	25.63636364
MHAB07 - 8	MH172-7-H-2-20	1.592	20.67532468
MHAB07 - 9	MH172-7-H-1-66	1.426	18.51948052
MHAB07 - 10	MH172-7-H-2-83	1.114	14.46753247
MHAB07 - 11	MH172-7-H-2-52	1.101	14.2987013
MHAB07 - 12	MH172-H-1-73	0.372	4.831168831
MHAB07 - 13	MH172-H-1-51	0.362	4.701298701
MHAB07 - 14	MH172-H-2-21	0.23	2.987012987
MHAB07 - 15	MH172-H-1-21	0.211	2.74025974
MHAB07 - 16	MH172-7-H-1-8	0.206	2.675324675
MHAB07 - 17	MH172-H-1-31	0.175	2.272727273
MHAB07 - 18	MH172-H-2-6	0.12	1.558441558
	PBS	0.077	1

实施例 2：抗体纯化及活性检测

2-1. ELISA 结合实验

使用 ELISA 法检测 MHB07 待选抗体（抗人 c-MET 纳米抗体）对人 c-MET 抗原的结合能力。用 PBS 将 Human c-MET, His Tag (Sino Biological,Cat.No. 10692-H08H) 稀释至 0.5 µg/mL，以 100 µL/孔加入至酶标板(Corning, Cat.No. 9018)中，4℃包被过夜。使用 PBST 冲洗 3 次，每孔加入 200 µL 3% BSA/PBST，室温封闭 1hr，然后 PBST 冲洗 5 次，加入待测抗体（待测抗体编号为 MHAB07-01~14/16/17，阳性对照抗体为 MHB07-PC (Telisotuzumab)，初始浓度为 10 µg/mL，进行 4 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 100 µL 1:50,000 倍稀释的山羊抗人 IgG Fc(HRP) (Abcam, Cat.No. ab97225)，室温孵育 30 min。使用 PBST 冲洗 7 次，洗去多余二抗后，每孔加入 100 µL 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Absin, Cat.No. 9178)，室温避光显色 15min，然后每孔加入 100 µL TMB 终止液(Absin, Cat.No. abs9472)终止反应。使用酶标仪读取波长 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。

结果如图 1 和表 4 所示，MHB07 待选抗体与人 c-MET 抗原的结合活性最强的 10 个抗体为：MHAB07-01~11，将对这 11 条序列进行后续的 FACS 结合活性检测。

表 4：MHB07 待选抗体 ELISA 结合实验

	MHAB07-1	MHAB07-2	MHAB07-3	MHAB07-4	MHAB07-6	MHAB07-7	MHAB07-9	MHAB07-10	MHAB07-11	MHAB07-12	MHAB07-13	MHAB07-14	MHAB07-16	MHAB07-17	MHB07-PC	Isotype
Bottom	0.05577	0.06358	0.05539	0.01914	0.002245	0.03806	0.05079	0.0394	0.04187	0.05681	0.05572	0.05673	0.05579	0.06309	0.04074	0.05819
Top	2.034	1.921	1.895	2.771	1.593	1.546	1.577	2.205	1.803	0.06641	2.81	1673	0.5013	0.748	2.024	0.07945
EC50 (ng/ml)	0.7951	0.8379	0.7886	1.321	28.38	1.045	13.09	10.17	3.028	+infinity	884.5	239554	~20432	10538	9.25	~4086
等电点	7.68	8.29	8.28	7.69	7.18	6.43	6.73	8.28	8.04	6.29	7.31	8.44	7.68	8.26		
表达量 mg/L	373	269.8	258.5	263	228	252.8	236.5	177	228	278.5	24	178	323	209		
纯度 (SEC, 280nm)	99.95%	98.78%	99.72%	99.28%	100.00%	99.01%	99.92%	99.96%	99.02%	99.44%	/	99.96%	99.08%	98.22%		

2-2. FACS 结合实验

FACS 实验中，利用内源表达人 c-MET 的人胃癌细胞 Hs746T（培养于 Hs746T 细胞完全培养基：Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATCC,Cat.No. 30-2002)+10% FBS(Sigma-Aldrich, Cat.No. F8687)+1% P/S(Gibco, Cat.No. 15140-122)）检测待选抗体的结合，待测抗体起始浓度 30 µg/mL，进行 3 倍梯度稀释(30000 ng/mL、10000

ng/mL、3333.33ng/mL、1111.11ng/mL、370.37ng/mL、123.46ng/mL、41.15ng/mL 和 13.72 ng/mL)，加 100 μ L/孔 FITC 抗人 IgG Fc 抗体二抗（1:200 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）。

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

FACS 结合结果如图 2 和表 5 所示，MHAB07-01/02/03/04/05 与 Hs746T 结合活性强于 MHB07-PC，将对这 5 个抗体进行后续的内吞和内吞介导的细胞杀伤活性检测。

表 5：MHB07 待选抗体 FACS 结合实验

	MHAB07-01	MHAB07-02	MHAB07-03	MHAB07-04	MHAB07-05	MHAB07-06	MHAB07-07	MHAB07-08	MHAB07-09	MHAB07-10	MHAB07-11	MHAB07-PC	Isotype
Bottom	-419.5	~-446767	-6972	~-48519	9.084	434.9	114.6	504.5	-299.3	-345.6	50.7	610	-123.6
Top	13808	~ 29010	42900	~ 215489	12176	1309	511.2	3816	1201	3429	5249	8344	722.3
EC50 (ng/ml)	161	~ 0.0	41247	4.381e+014	109.6	~ 9662	~ 46.48	208.7	11573	856.9	~ 414.0	787.9	~ 9745

10

2-3. 内吞实验

利用内源表达 c-MET 的人胃癌细胞 Hs746T（培养于 Hs746T 细胞完全培养基：Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATCC,Cat.No. 30-2002)+10% FBS(Sigma-Aldrich, Cat.No. F8687)+1% P/S(Gibco, Cat.No. 15140-122)）检测待选抗体的内吞活性。使用 FACS buffer(含有 2% FBS 的 PBS)制备 1×10^6 /mL 细胞悬液和 10 μ g/mL 抗 c-MET 的待测抗体溶液，将细胞悬液加入 15 mL EP 管中，1200 rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 3min，弃上清。分别吸 2 mL 的待测抗体溶液加到细胞中，重悬后置于冰上孵育 30 min，再用预冷的 FACS buffer 清洗 3 次。再用 2 mL DMEM 完全培养基重悬细胞，混匀后将细胞加到 96 孔板中，100 μ L/孔。分别置于 4 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 孵育 0h、1h、2h 和 4h(双复孔)。各个时间段孵育结束后，1200 rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 3min，每孔加入 100 μ L FITC 抗人 IgG Fc 抗体稀释液（1:200，Biolegend, Cat.no. 410720），4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min，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：

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

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

各时间段内吞百分数曲线如图 3A 所示，由图 3B 的 37 $^{\circ}$ C 4h 内吞结果可知，

MHAB07-01/02/03/04/05 在 Hs746T 细胞中具有良好的内吞活性。

2-4. Fab-ZAP 法检测抗体内吞介导的细胞杀伤实验

将人胃癌细胞 Hs746T 细胞(培养于 Hs746T 细胞完全培养基: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATCC,Cat.No. 30-2002)+10% FBS(Sigma-Aldrich, Cat.No. F8687)+1% P/S(Gibco, Cat.No. 15140-122)) 消化后用完全培养基重悬计数, 细胞密度调整为 4E4 cell/mL, 每孔 50 μL (约 1500 cell) 加入 96 孔细胞板, 放入 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱培养 16 hr。用 DMEM 完全培养基配制含有 9nM ZAP-Fab 的 ZAP 稀释液, 然后用 ZAP 稀释液将抗体梯度稀释成 10nM 至 128fM (8 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 50 μL, 混匀后将细胞培养板放入 37°C 细胞培养箱继续孵育 120 hr。提前将 7.5 μL Triton-X 100 加到未加抗体-Fab-ZAP 处理的细胞孔中, 孵育 30 min, 此孔作为阳性对照。未加抗体-Fab-ZAP 或 Triton-X100 处理的细胞孔 (NT) 为阴性对照。然后在细胞培养板中每孔加入 20 μL MTS (Promega, Cat: G3598B), 37°C 细胞培养箱中孵育 2 小时, 于酶标仪中震荡 10s 后读取数据, 检测波长 A490。利用公式 $\text{killing rate}\% = 100\% - (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{Triton-X100}}) / (\text{OD}_{\text{NT}} - \text{OD}_{\text{Triton-X100}}) * 100\%$ 计算细胞杀伤效率。

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

内吞介导的细胞杀伤曲线如图 4 所示, 图 4 和表 6 的结果说明 MHB07 待选抗体对 Hs746T 的杀伤活性相似, 综合 FACS 结合、内吞结果和序列人源化程度, 获得了优选抗体 MHAB07-03, 其 VHH 序列如 SEQ ID NO: 1 所示, Kabat 定义的 CDR1-CDR3 序列分别如 SEQ ID NO: 2-4 所示, Chothia 定义的 CDR1-CDR3 序列分别如 SEQ ID NO: 5-7 所示, IMGT 定义的 CDR1-CDR3 序列分别如 SEQ ID NO: 8-10 所示。后续将对 MHAB07-03 进行人源化并做后续筛选工作。

表 6: Fab-ZAP 法检测抗体内吞介导的细胞杀伤实验

	MHAB07-01	MHAB07-02	MHAB07-03	MHAB07-04	MHAB07-05	MHB07- PC	Isotype
Bottom	51.44	43.65	46.82	45.46	21.43	49.69	N/A
Top	83.52	82.98	79.54	81.78	72.59	83.23	N/A
EC50 (pM)	~ 7.972	5.681	~ 17.44	7.915	4.879	~ 19.94	N/A

实施例 3：抗人 c-MET 纳米抗体人源化及活性检测

对 MHAB07-03 的 VHH 进行人源化改造,获得两株人源化纳米抗体 MHAB07-3-1 (VHH 如 SEQ ID NO: 14 所示) 和 MHAB07-3-2 (VHH 如 SEQ ID NO: 15 所示)。根据实施例 1 中的方法, 将上述 VHH 序列整合到人 IgG1 的 Fc (LALA) 序列 (SEQ ID NO:16), 并纯化表达用于后续活性实验。

3-1. FACS 结合实验

3-1-1. 抗人 c-MET 纳米抗体及其人源化抗体的 FACS 结合实验

FACS 实验中, 利用内源表达人 c-MET 的人胃癌细胞 Hs746T (培养于 Hs746T 细胞完全培养基: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATCC,Cat.No. 30-2002)+10% FBS(Sigma-Aldrich, Cat.No. F8687)+1% P/S(Gibco, Cat.No. 15140-122)) 检测 MHAB07-3 及其人源化抗体的结合活性, 待测抗体起始浓度 30 µg/mL , 先进行 2 倍梯度稀释, 再 5 倍梯度稀释 (30000 ng/mL、15000 ng/mL、7500 ng/mL、1500 ng/mL、300 ng/mL、60 ng/mL、12 ng/mL、2.4 ng/mL、0.48 ng/mL、0.096 ng/mL 和 0.0192 ng/mL), 加 100 µL/孔 Alexa Fluor® 488 AffiniPure 山羊抗人 IgG(H+L)二抗 (1:300 Yeasen, Cat:33126ES60) 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 5 所示, 由图 5 和表 7 结果可知, MHAB07-3-1, MHAB07-3-2 与人 c-MET 抗原的结合活性相较于 parental MHAB07-3 未发生明显减弱, 则选择 MHAB07-3-1, MHAB07-3-2 进行后续内吞和内吞介导的细胞杀伤活性检测。

表 7: 抗人 c-MET 纳米抗体及其人源化抗体的 FACS 结合实验

	MHAB07-3	MHAB07-3-1	MHAB07-3-2	Isotype
Bottom	2173	2329	1758	N/A
Top	172721	164809	158478	N/A
EC50 (ng/ml)	62.32	77.68	82.92	N/A
等电点	8.28	8.32	8.32	
表达量 (mg/L)	258.5	293	240	
纯度 (SEC,280nm)	99.72%	99.44%	98.83%	

3-1-2. 抗人 c-MET 纳米抗体及其人源化抗体与阳性对照抗体的 FACS 结合实验

FACS 实验中，利用内源表达人 c-MET 的人胃癌细胞 Hs746T（培养于 Hs746T 细胞完全培养基: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATCC,Cat.No. 30-2002)+10% FBS(Sigma-Aldrich, Cat.No. F8687)+1% P/S(Gibco, Cat.No. 15140-122)）检测 MHAB07-3 及其人源化抗体 MHAB07-3-2 相较于阳性对照抗体 MHB07-PC (Telisotuzumab)的结合活性,待测抗体起始浓度 30 μg/mL ,进行 4 倍梯度稀释 (30000 ng/mL、7500 ng/mL、1875 ng/mL、468.75 ng/mL、117.19 ng/mL、29.30 ng/mL、7.32 ng/mL、1.83 ng/mL 、0.46 ng/mL 、0.11 ng/mL、0.03 ng/mL 和 0.007ng/mL) , 共 12 个稀释点, 加 100 μL/孔荧光二抗染色（ PE Goat anti-Human IgG Fc Secondary Antibody, Invitrogen, 货号 12-4998-82 , 1: 200 稀释）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）。

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 6 所示，由图 6 和表 8 结果可知，MHAB07-3，MHAB07-3-2 与肿瘤细胞表面的人 c-MET 抗原的结合活性强于阳性对照抗体 MHB07-PC (Telisotuzumab) 。

表 8: 抗人 c-MET 纳米抗体及其人源化抗体与阳性对照抗体的 FACS 结合实验

	MHAB07-3	MHAB07-3-2	MHB07-PC	Isotype
Bottom	13898	22682	18015	N/A
Top	735974	697025	647284	N/A
EC50 (ng/ml)	72.23	64.20	309.7	N/A

3-2. 内吞实验

利用内源表达人 c-MET 的人胃癌细胞 Hs746T 检测待选抗体的内吞活性。使用 FACS buffer(含有 2% FBS 的 PBS)制备 1×10⁶/mL 细胞悬液和 10 μg/mL 抗 c-MET 的待测抗体溶液，将细胞悬液加入 15 mL EP 管中，1200 rpm，4℃离心 3min，弃上清。分别吸 2 mL 的待测抗体溶液加到细胞中，重悬后置于冰上孵育 30 min，再用预冷的 FACS buffer 清洗 3 次。再用 2 mL DMEM 完全培养基重悬细胞，混匀后将细胞加到 96 孔板中，100 μL/孔。分别置于 4℃和 37℃孵育 0h、1h、2h 和 4h（双复孔）。各个时间段孵育结束后,1200 rpm,4℃离心 3min,加入 100 μL Alexa Fluor® 488 AffiniPure 山羊抗人 IgG(H+L)二抗（YEASEN, Cat.no. 33126ES60）稀释液，4℃孵育 30 min，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:

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

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

5 内吞百分数曲线如图 7A 所示。由图 7B 内吞结果可知, 37°C 下内吞 4h, MHAB07-3、MHAB07-3-1 和 MHAB07-3-2 在 Hs746T 细胞具有良好的内吞活性, MHAB07-3-1 和 MHAB07-3-2 相较 parental MHAB07-3 内吞活性未发生明显减弱, 且强于 MHB07-PC。

3-3. Fab-ZAP 法检测抗体内吞介导的细胞杀伤实验

10 将人胃癌细胞 Hs746T 细胞(培养于 Hs746T 细胞完全培养基: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATCC, Cat.No. 30-2002)+10% FBS(Sigma-Aldrich, Cat.No. F8687)+1% P/S(Gibco, Cat.No. 15140-122)) 消化后用完全培养基重悬计数, 细胞密度调整为 4E4 cell/mL, 每孔 50 µL (约 1500 cell) 加入 96 孔细胞板, 放入 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱培养 16 hr。用 DMEM 完全培养基配制含有 9nM ZAP-Fab 的 ZAP 稀释液, 15 然后用 ZAP 稀释液将抗体梯度稀释成 4nM 至 32fM (10 个浓度梯度, 1: 5 稀释 (前 5 个点) 后 1:2 稀释 (后 5 个点)) 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 50 µL, 混匀后将细胞培养板放入 37°C 细胞培养箱继续孵育 120 hr。提前将 7.5 µL Triton-X 100 加到未加抗体-Fab-ZAP 处理的细胞孔中, 孵育 30 min, 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 20 对照。然后在细胞培养板中每孔加入 20 µL MTS (Promega, Cat: G3598B), 37°C 细胞培养箱中孵育 2 小时, 于酶标仪中震荡 10s 后读取数据, 检测波长 A490。利用公式 $\text{killing rate\%} = 100\% - (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{Triton-X100}}) / (\text{OD}_{\text{NT}} - \text{OD}_{\text{Triton-X100}}) * 100\%$ 计算细胞杀伤效率。

所有实验结果以平均值 ± SEM (平均标准误差) 表示。采用 Prism 6 (GraphPad) 25 软件作图并进行数据分析。

内吞介导的细胞杀伤曲线如图 8 所示, 结果统计在表 9 中。结果显示 MHAB07-3-1 和 MHAB07-3-2 的对 Hs746T 细胞的 Fab-ZAP 杀伤与 MHAB07-3 相似, 综合 FACS 结合、内吞结果和序列人源化程度的筛选, MHAB07-3-1 展现出最高的人源化水平且具有良好的结合活性、内吞活性和内吞介导的细胞杀伤。

30 表 9: Fab-ZAP 法检测抗体内吞介导的细胞杀伤实验

	MHAB07-3	MHAB07-3-1	MHAB07-3-2	MHB07-PC	Isotype
Bottom	8.795	9.618	16.19	15.36	N/A
Top	93.84	94.42	95.93	98.35	N/A
EC50 (pM)	2.501	1.954	2.626	12.75	N/A

3-4. 种属交叉活性

使用 ELISA 法检测 MHAB07-3-2 (抗人 c-MET 纳米抗体) 对不同种属 (人、猴、小鼠和大鼠) c-MET 抗原的结合能力。用 PBS 将人 c-MET (Human c-MET, His Tag (Sino Biological,Cat.No. 10692-H08H)); 猴 c-MET (Cynomolgus, Rhesus c-MET Protein , His Tag (Sino Biological,Cat.No. 90304-C08H)); 小鼠 c-MET (Mouse c-MET Protein, His Tag (Sino Biological,Cat.No. 50622-M08H)) 和大鼠 c-MET (Rat c-MET Protein , hFc Tag (Sino Biological,Cat.No. 80004-R02H)) 分别稀释至 0.5 μg/mL, 以 100 μL/孔加入至酶标板(Corning, Cat.No. 9018)中, 4℃包被过夜。使用 PBST 冲洗 3 次, 每孔加入 200 μL 3% BSA/PBST, 室温封闭 1hr, 然后 PBST 冲洗 5 次, 加入待测抗体, 初始浓度为 10 μg/mL, 进行 10 倍梯度稀释), 室温孵育 1hr 后使用 PBST 冲洗 7 次, 洗去未结合抗体, 每孔加入 100 μL 1:50,000 倍稀释的山羊抗人 IgG Fc(HRP) (Abcam, Cat.No. ab97225), 包被 Rat c-MET Protein 的孔加入 100 μL 1:10,000 倍稀释的 Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail [HRP](金斯瑞, A02016), 室温孵育 30 min。使用 PBST 冲洗 7 次, 洗去多余二抗后, 每孔加入 100 μL 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Absin, Cat.No. 9178), 室温避光显色 15min, 然后每孔加入 100 μL TMB 终止液(Absin, Cat.No. abs9472)终止反应。使用酶标仪读取波长 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。

结果如图 9 和表 10 所示, MHAB07-3-2 只结合人 c-MET 和猴 c-MET, 且对人 c-MET 和猴 c-MET 的结合活性相当, 不结合小鼠 c-MET 和大鼠 c-MET。

表 10: 人、猴、小鼠和大鼠 c-MET 抗原种属交叉活性检测

	MHAB07-3	MHAB07-3-1	MHAB07-3-2	MHB07-PC	Isotype
Bottom	8.795	9.618	16.19	15.36	N/A
Top	93.84	94.42	95.93	98.35	N/A

EC50 (pM)	2.501	1.954	2.626	12.75	N/A
-----------	-------	-------	-------	-------	-----

5 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。本发明的全部范围为由所附权利要求及其任何等同物给出。

参考文献

[1] Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G. Targeting MET in cancer: rationale and progress. Nat Rev Cancer. 2012;12(2):89-103.

[2] Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. Nature. 1987;327(6119):239-42.

[3] Kong-Beltran M, Stamos J, Wickramasinghe D. The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. Cancer Cell. 2004;6(1):75-84.

15 [4] Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, Finch J, Youles ME, Ofverstedt LG, et al. Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(11):4046-51.

[5] Uchikawa E, Chen Z, Xiao GY, Zhang X, Bai XC. Structural basis of the activation of c-MET receptor. Nat Commun. 2021;12(1):4074.

20 [6] Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. Cell. 1994;77(2):261-71.

[7] Fasolo A, Sessa C, Gianni L, Broggin M. Seminars in clinical pharmacology: an introduction to MET inhibitors for the medical oncologist. Ann Oncol. 2013;24(1):14-20.

25 [8] Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(12):834-48.

[9] Drilon A, Clark JW, Weiss J, Ou SI, Camidge DR, Solomon BJ, et al. Antitumor activity of crizotinib in lung cancers harboring a MET exon 14 alteration. Nat Med. 2020;26(1):47-51.

- [10] Baldacci S, Kherrouche Z, Descarpentries C, Wislez M, Dansin E, Furlan A, et al. [MET exon 14 splicing sites mutations: A new therapeutic opportunity in lung cancer]. *Rev Mal Respir.* 2018;35(8):796-812.
- [11] Tong JH, Yeung SF, Chan AW, Chung LY, Chau SL, Lung RW, et al. MET
5 Amplification and Exon 14 Splice Site Mutation Define Unique Molecular Subgroups of
Non-Small Cell Lung Carcinoma with Poor Prognosis. *Clin Cancer Res.* 2016;22(12):3048-56.
- [12] Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected
non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol.* 2009;27(10):1667-74.
- 10 [13] Comoglio PM, Trusolino L, Boccaccio C. Known and novel roles of the MET
oncogene in cancer: a coherent approach to targeted therapy. *Nat Rev Cancer.*
2018;18(6):341-58.

权 利 要 求

1. 特异性结合 c-MET 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: 1、14、15 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。

2. 权利要求 1 所述的纳米抗体或其抗原结合片段，其包含：

(a) 如 SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，如 SEQ ID NO: 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；

或，

(b) 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 Chothia 编号系统定义；

或，

(c) 如 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR1，如 SEQ ID NO: 9 所示的 CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 10 所示的 CDR3，其中，所述 CDR 按 IMGT 编号系统定义。

3. 权利要求 1 或 2 所述的纳米抗体或其抗原结合片段，其中所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 1 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。

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

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

5. 权利要求 4 所述的纳米抗体或其抗原结合片段，其中所述纳米抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 14 或 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。

6. 特异性结合 c-MET 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 的 Fc 结构域）；

优选地，所述免疫球蛋白 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 16 所示的序列；

优选地，所述多肽构建体包含 SEQ ID NOs: 11-13 任一项所示的序列。

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

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

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

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

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

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

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

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

优选地，所述偶联部分选自治疗剂（如细胞毒剂、细胞因子、毒素或放射性核素）。

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

优选地，所述药物组合物还包含另外的药学活性剂，例如抗肿瘤剂。

14. 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；

优选地，所述肿瘤为 c-MET 阳性肿瘤；

优选地，所述肿瘤为 c-MET 通路异常激活的肿瘤；

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；

优选地，所述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单独使用，或与另外的药

学活性剂（例如抗肿瘤剂）联合使用。

15. 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；

优选地，所述肿瘤为 c-MET 阳性肿瘤；

优选地，所述肿瘤为 c-MET 通路异常激活的肿瘤；

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。

16. 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。

17. 用于检测 c-MET 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。

18. 用于检测肿瘤是否能够通过靶向 c-MET 的抗肿瘤疗法来治疗的方法，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 所述的多肽构建体来检测来自受试者的样品中 c-MET 的存在或其水平；

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；

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）。

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或权利要求 6 所述的多肽构建体在制备用于检测 c-MET 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 c-MET 的抗肿瘤疗法来治疗的检测试剂中的用途；

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）。