一种多肽及其用于构建包含共同轻链的双特异性抗体中的应用

相关申请的交叉引用

本专利申请要求于 2024 年 3 月 22 日提交的申请号为 CN202410331237.1 的中国发明专利申请的优先权权益，在此将其全部内容引入用于所有目的。

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体而言，本发明涉及一种肽及其作为抗体轻链的用途以及包含所述肽作为共同轻链的抗 EGFR 和/或 c-Met 的抗体。

背景技术

表皮生长因子受体（EGFR）的体细胞突变是非小细胞肺癌（NSCLC）、转移性结直肠癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、胰腺癌和乳腺癌等癌症中最常见的致癌驱动因素之一，特别是在非小细胞肺癌中更为显著。虽然针对 EGFR 信号通路的分子靶向药物已显示出强大的临床疗效，但患者常常会出现耐药性，耐药机制通常是不可避免的。例如，研究发现，存在 EGFR 突变的非小细胞肺癌细胞通过多种途径（包括 c-Met 受体通路的激活）获得了对 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂（EGFR-TKI）的耐药性。

在这些机制中，c-MET 受体与 EGFR 耐药性之间密切关系。c-MET 是肝细胞生长因子（HGF）受体，具备酪氨酸激酶活性。c-MET 原癌基因通过 ERBB3-PI3K-AKT、MAPK-ERK1/2T 等通路，绕过被抑制的 EGFR 磷酸化通路，从而产生扩增效应。这种扩增的 c-MET 通过旁路激活下游信号转导，避免了 EGFR-TKIs 的作用，促使癌细胞继续增殖，最终导致患者对 EGFR-TKIs 产生耐药性。c-MET 通常在大多数正常组织中低表达或不表达，但在肺癌、肝癌、胰腺癌以及甲状腺癌等肿瘤组织中可见其高表达。

针对 EGFR 和 c-MET 的双靶点治疗，采用双特异性抗体能够有效地同时阻断这两个受体的信号传导，抑制肿瘤的生长和存活。同时，这类抗体还能够增强抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用（ADCC），从而提升对肿瘤细胞的杀伤潜力。研究表明，这类双特异性抗体能够同时结合 EGFR 和 c-MET，并引发这两个靶标受体在各种肿瘤细胞中的共降解，而单独使用或联合使用单抗则无法达到这种效果。由于双特异性抗体的机制依赖于 EGFR 和 c-MET 的共

表达，因此相比单纯的 EGFR 抑制剂，双靶点双特异性抗体的毒性较低，具有较大的治疗优势。

目前制备双特异性抗体的常规方法往往需要同时转染四个质粒，以分别表达不同的两个重链和两个轻链。但是这四个多肽链在组装成抗体时，有可能出现轻重链错配的问题。本领域已经提出了多种策略来解决双特异性抗体组装时的轻重链错配；在这些策略中，已有人提出可以采用同一个多肽，作为共同轻链与靶向两个不同靶标蛋白（例如 EGFR 和 c-MET）的抗体的重链分别配对，从而构建得到对该两个靶标蛋白均具有结合亲和力与特异性的双特异性抗体。所得的双特异性抗体在结构上类似于传统的单克隆抗体；进而，可知该多肽还可以作为共同轻链与源自对更多靶标蛋白的抗体的重链配对，由此构建得到对更多不同靶标蛋白具有结合亲和力和特异性的抗体。

发明内容

本发明的目的是提供一种多肽，其作为抗体的轻链可变区或轻链，可以与对某个靶标蛋白（抗原）具有结合亲和力和/或特异性的抗体的重链可变区或重链，或与两个或甚至更多个分别对不同靶标蛋白（抗原）具有结合亲和力和/或特异性的抗体重链可变区或重链，构建成抗体。本发明的另一个目的是提供包含所述多肽作为轻链可变区或轻链的抗体，例如采取同二聚体或异二聚体形式的抗体。

本发明的技术方案如下。

第一方面，本发明提供一种多肽，所述多肽的氨基酸序列包含：SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列；SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列。

SEQ ID NO. 40：SASSSVTFMH

SEQ ID NO. 41：DTSNLAS

SEQ ID NO. 42：QQWGDDPPYT

进一步地，所述多肽包含 SEQ ID NO. 20 所示的氨基酸序列。

SEQ ID NO. 20:

DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSSVTFMHWYQQKPGTSPKRWIY
DTSNLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQWGDDPPYTFG

QGTRLEIK

进一步地，所述多肽包含 SEQ ID NO. 29 所示的氨基酸序列。

SEQ ID NO. 29:

DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSSVTFMHWYQQKPGTSPKRWIY
DTSNLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQWGDDPPYTFG
QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

本发明提供的所述多肽作为抗体的轻链可变区或轻链，能够分别与对不同靶标蛋白（抗原）具有结合亲和力和/或特异性的抗体的重链可变区或重链，构建得到抗体，所述抗体保留或具有更强的对该靶标蛋白（抗原）的结合亲和力和/或特异性以及相应的生物学活性等等。

构建得到的抗体可以具有任何结构形式，例如单克隆抗体或 scFv、dsFv、(dsFv)2、Fab、Fab'、F(ab')2 或 Fv 等抗体形式。例如，所述多肽作为抗体的轻链可变区或轻链，能够分别与对某个靶标蛋白（抗原）具有结合亲和力和/或特异性的抗体的重链可变区或重链，构建得到一种仍对该靶标蛋白（抗原）具有结合亲和力和/或特异性的抗体，该抗体是具有两个相同重链和两个相同轻链的同二聚体形式的抗体（为单特异性抗体）。或者，例如，所述多肽作为抗体的轻链可变区或轻链，与分别对两个靶标蛋白（抗原）具有结合亲和力和/或特异性的两个抗体的重链可变区或重链，构建得到一种仍对该两个靶标蛋白（抗原）分别具有结合亲和力和/或特异性的抗体，该抗体是具有两个不同重链和两个相同轻链的异二聚体形式的抗体（为双特异性抗体）。甚至，本发明提供的所述多肽还可用于构建对更多靶标蛋白（抗原）具有结合亲和力和/或特异性的多特异性抗体。

第二方面，本发明提供一种核酸分子，所述核酸分子包含编码第一方面所述多肽的核苷酸序列。

第三方面，本发明提供第一方面所述多肽或第二方面所述核酸分子在构建抗体中的应用。

实验证明，作为抗体轻链或轻链可变区，本发明第一方面提供的多肽能够

与对不同靶标蛋白（抗原）具有结合亲和力和/或特异性的抗体的重链或抗体重链可变区，构建得到新的抗体，所述抗体保留（甚至具有更强的）对该靶标蛋白（抗原）的结合亲和力和/或特异性以及生物学活性等等。

根据本发明的具体实施方式，所述靶标蛋白可以是表皮生长因子受体（EGFR）或肝细胞生长因子受体（c-Met 或 HGFR）。在本发明的上下文中，所述表皮生长因子受体或肝细胞生长因子受体均可以是哺乳动物的，灵长类动物或啮齿类动物的、更优选人的 EGFR 或 c-Met（HGFR）。

相应地，如上文第一方面中所述，构建得到的抗体可以为具有两条相同重链和两条相同轻链的同二聚体形式的抗体，或具有两条不同重链和两条相同轻链的异二聚体形式的抗体。所述多肽可作为抗体的轻链或轻链可变区。

第四方面，本发明提供一种抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含本发明第一方面提供的多肽；其中，所述多肽可以作为所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区或轻链。

在本发明的上下文中，所述抗原结合片段为抗体的能够特异性结合靶标蛋白的任何功能片段，在本发明的上下文中，“靶标蛋白”与“抗原”可互换使用。

本发明提供的抗体或其抗原结合片段可以是 IgG 样抗体，也可以是 scFv、dsFv、(dsFv)2、Fab、Fab'、F(ab')2 或 Fv 等抗体形式。在本发明中，“IgG 样抗体”是指所述抗体或其抗原结合片段具有两个 Fab 臂和可选的 Fc 区，为传统单克隆抗体（mAb）结构或类似结构。在本发明中，“Fab 臂”是指 Fab 片段（Antigen-binding fragment），其由完整的轻链（可变区和恒定区）和部分重链结构（可变区和一个恒定区片段）组成，轻链与重链通过二硫键连接。

因此，例如，本发明提供的抗体或其抗原结合片段在其轻链可变区中包含本发明第一方面提供的氨基酸序列，作为轻链 CDRs；或者，本发明提供的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO. 20 所示的氨基酸序列，作为轻链可变区（VL）。或者，本发明提供的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO. 29 所示的氨基酸序列，作为轻链。

进一步地，所述抗体或其抗原结合片段还可以包含重链可变区（VH），所述重链可变区与所述轻链可变区形成针对靶标蛋白的结合结构域。根据本发明的具体实施方式，所述靶标蛋白可以是表皮生长因子受体（EGFR）或肝细胞

生长因子受体（c-Met 或 HGFR）。

根据本发明的具体实施方式，所述抗体或其抗原结合片段分别包含如下所示的重链 CDRs（HCDR1、HCDR2 和 HCDR3）和轻链 CDRs（LCDR1、LCDR2 和 LCDR3）：

(1) 包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 38 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 39 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3；

(2) 包含 SEQ ID NO. 30 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 43 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3；或

(3) 包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 37 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3。

进一步地，所述抗体或其抗原结合片段可以包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含：

(1) SEQ ID NO. 13 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 14 所示的氨基酸序列；

(2) SEQ ID NO. 19 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 20 所示的氨基酸序列；

(3) SEQ ID NO. 15 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 20 所示的氨基酸序列；或

(4) SEQ ID NO. 17 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 20 所示的氨基酸序列。

所述抗体或其抗原结合片段可以是鼠抗、嵌合抗体或人源化抗体；并且，可以进一步包含重链恒定区和轻链恒定区。根据本发明的具体实施方式，所述重链恒定区可以是 IgG1 或 IgG4 的重链恒定区；所述轻链恒定区可以是 kappa 或 lambda 轻链恒定区。例如，所述抗体的重链恒定区包含 SEQ ID NO. 21

（hIgG1）所示的氨基酸序列；所述抗体的轻链恒定区包含 SEQ ID NO. 22（hkappa）所示的氨基酸序列。或者，所述抗体的重链恒定区包含 SEQ ID NO. 23（hIgG1；Knob）或 SEQ ID NO. 24（hIgG1；Hole）所示的氨基酸序列；所述抗体的轻链恒定区包含 SEQ ID NO. 22 所示的氨基酸序列。

本发明提供的抗体或其抗原结合片段可以具有至少两个 VH+VL 结构域组合（进一步地，两个 Fab 臂），所述结构域组合可以是彼此相同的，由此结合相同的靶标蛋白（抗原）。在这种情况下，所述抗体或其抗原结合片段在其至少两个 VH+VL 结构域组合中包含相同的选自上文(1)至(3)提供的 HCDR1 至 HCDR3 以及 LCDR1 至 LCDR3 的氨基酸序列组合，或者包含相同的选自上文(1)至(4)提供的重链和轻链可变区的氨基酸序列组合。所述抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区和轻链恒定区。例如上文所述，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO. 21 所示的氨基酸序列；所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO. 22 所示的氨基酸序列。进一步地，所述抗体或其抗原结合片段具有重链和轻链，例如是单克隆抗体，具有相同的两个重链和相同的两个轻链。

或者，本发明提供的抗体或其抗原结合片段的所述至少两个 VH+VL 结构域组合（进一步地，至少两个 Fab 臂）可以是不同的，由此结合不同的靶标蛋白（抗原）。在这种情况下，所述抗体在其至少两个 VH+VL 结构域组合（进一步地，至少两个 Fab 臂）中包含不同的选自上文(1)至(3)提供的 HCDR1 至 HCDR3 以及 LCDR1 至 LCDR3 的氨基酸序列组合，或者包含不同的选自上文(1)至(4)提供的重链和轻链可变区的氨基酸序列组合。在这种情况下优选的是，所述抗体或其抗原结合片段的所述至少两个 VH+VL 结构域组合（进一步地，至少两个 Fab 臂）包含相同的轻链 CDRs 序列组合，或者包含相同的轻链 VL 序列。例如，所述至少两个 VH+VL 结构域组合（进一步地，至少两个 Fab 臂）均具有：包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1；包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2；和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3。进一步地，例如，所述两个 VH+VL 结构域组合（进一步地，两个 Fab 臂）均具有：包含 SEQ ID NO. 20 所示氨基酸序列的轻链可变区。

根据本发明的具体实施方式，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 结合 c-Met 的第一 VH+VL 结构域组合（进一步地，Fab 臂），所述第一 VH+VL 结构域组合具有：包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，

包含 SEQ ID NO. 38 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO. 39 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 的 LCDR3；和

结合 EGFR 的第二 VH+VL 结构域组合（进一步地，Fab 臂），所述第二 VH+VL 结构域组合具有：包含 SEQ ID NO. 30 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 43 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 的 LCDR3；或

(2) 结合 c-Met 的第一 VH+VL 结构域组合（进一步地，Fab 臂），所述第一 VH+VL 结构域组合具有：包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1；包含 SEQ ID NO. 38 所示氨基酸序列的 HCDR2；和包含 SEQ ID NO. 39 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1；包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2；和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3；和

结合 EGFR 的第二 VH+VL 结构域组合（进一步地，Fab 臂），所述第二 VH+VL 结构域组合具有：包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 37 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1；包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2；和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3。

根据本发明的具体实施方式，进一步地，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 结合 c-Met 的第一 VH+VL 结构域组合（进一步地，Fab 臂），所述第一 VH+VL 结构域组合具有：包含 SEQ ID NO. 19 所示氨基酸序列的重链可变区，包含 SEQ ID NO. 20 所示氨基酸序列的轻链可变区；和

结合 EGFR 的第二 VH+VL 结构域组合（进一步地，Fab 臂），所述第二 VH+VL 结构域组合具有：包含 SEQ ID NO. 15 所示氨基酸序列的重链可变区，包含 SEQ ID NO. 20 所示氨基酸序列的轻链可变区；或

(2) 结合 c-Met 的第一 VH+VL 结构域组合（进一步地，Fab 臂），所述第一 VH+VL 结构域组合具有：包含 SEQ ID NO. 19 所示氨基酸序列的重链可变

区，包含 SEQ ID NO. 20 所示氨基酸序列的轻链可变区；和

结合 EGFR 的第二 VH+VL 结构域组合（进一步地，Fab 臂）所述第二 VH+VL 结构域组合具有：包含 SEQ ID NO. 17 所示氨基酸序列的重链可变区，包含 SEQ ID NO. 20 所示氨基酸序列的轻链可变区。

在这种情况下，所述抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区和/或轻链恒定区。例如，所述抗体的重链恒定区包含 SEQ ID NO. 21 所示的氨基酸序列；所述抗体的轻链恒定区包含 SEQ ID NO. 22 所示的氨基酸序列。或者，所述抗体的重链恒定区包含 SEQ ID NO. 23（hIgG1; Knob）或 SEQ ID NO. 24（hIgG1; Hole）所示的氨基酸序列；所述抗体的轻链恒定区包含 SEQ ID NO. 22 所示的氨基酸序列。

进一步地，所述抗体为双特异性抗体，所述双特异性抗体具有不同的两个重链，但包含相同的两个轻链。根据本发明的具体实施方式，所述双特异性抗体可以包含 SEQ ID NO. 29 所示的氨基酸序列，作为轻链。

根据本发明的具体实施方式，本发明提供的双特异性抗体示于“具体实施方式”中的表 15。表 15 中的双特异性抗体包括如下结构域：

双特异性抗体 H15H1YCHV2xH22A12-2HV3-hIgG1，其包含分别针对 c-Met 和 EGFR 的两个 Fab 臂，其中一个 Fab 臂包含靶向 c-Met 的重链可变区（SEQ ID NO. 19）与轻链可变区（SEQ ID NO. 20），另一个 Fab 臂包含靶向 EGFR 的重链可变区（SEQ ID NO. 15）与轻链可变区（SEQ ID NO. 20）；该双特异性抗体包含两个相同的轻链可变区（SEQ ID NO. 20）和相应的两个相同的轻链（SEQ ID NO. 29）；

双特异性抗体 H15H1YCHV2xH103G9-3HV2-hIgG1，其包含分别针对 c-Met 和 EGFR 的两个 Fab 臂，其中一个 Fab 臂包含靶向 c-Met 的重链可变区（SEQ ID NO. 19）与轻链可变区（SEQ ID NO. 20），另一个 Fab 臂包含靶向 EGFR 的重链可变区（SEQ ID NO. 17）与轻链可变区（SEQ ID NO. 20）；该双特异性抗体包含两个相同的轻链可变区（SEQ ID NO. 20）和相应的两个相同的轻链（SEQ ID NO. 29）。

进一步地，表 15 中的双特异性抗体各自作为 IgG 样抗体，均包含不同的两个重链（重链 1 和重链 2）和相同的两个轻链：

双特异性抗体 H15H1YCHV2xH22A12-2HV3-hIgG1，其包含 SEQ ID NO. 25 所示氨基酸序列作为重链 1，包含 SEQ ID NO. 26 所示氨基酸序列作为重链

2，并且包含 SEQ ID NO. 29 所示氨基酸序列作为相同的轻链;

双特异性抗体 H15H1YCHV2xH103G9-3HV2-hIgG1，其包含 SEQ ID NO. 27 所示氨基酸序列作为重链 1，包含 SEQ ID NO. 28 所示氨基酸序列作为重链 2，并且包含 SEQ ID NO. 29 所示氨基酸序列作为相同的轻链。

第五方面，本发明提供一种组合物，其包含本发明第一方面所述多肽、第二方面所述核酸分子或者第四方面所述抗体或其抗原结合片段。所述组合物优选地可以为药物组合物，其进一步可任选地包含药学上可接受的辅料、载体或赋形剂。所述药物组合物可以制成医学或药学领域已知的各种剂型，经适用方式施用。

第六方面，本发明提供第一方面所述多肽、第二方面所述核酸分子、第四方面所述抗体或其抗原结合片段或者第五方面所述药物组合物在制备药物中的用途。

所述药物可以是抗体类药物，其用于治疗其靶标蛋白或抗原表达相关疾病，例如 EGFR 和/或 c-Met 表达相关疾病。例如，所述药物用于治疗肿瘤或癌症，诸如肺癌（如非小细胞肺癌、小细胞肺癌）、肝癌、胰腺癌、胃癌、结直肠癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、乳腺癌、食管癌、胆管癌、鼻咽癌、黑色素瘤。

第七方面，本发明提供一种疾病治疗方法，所述方法包括给有此需要的受试者施用本发明第一方面所述多肽、第二方面所述核酸分子、第四方面所述抗体或其抗原结合片段或者第五方面所述药物组合物。

本发明提供的方法用于治疗肿瘤或癌症。优选地，所述肿瘤或癌症为肺癌（如非小细胞肺癌、小细胞肺癌）、肝癌、胰腺癌、胃癌、结直肠癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、乳腺癌、食管癌、胆管癌、鼻咽癌、黑色素瘤。所述受试者为哺乳动物，优选为灵长类动物或啮齿类动物，更优选为人。

第八方面，本发明还提供一种结合 EGFR 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含如下所示的重链 CDRs（HCDR1、HCDR2 和 HCDR3）和轻链 CDRs（LCDR1、LCDR2 和 LCDR3）:

(1) 包含 SEQ ID NO. 30 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 31 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 33 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 34 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 35 所示氨基酸序列的 LCDR3；

(2) 包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 37 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 33 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 34 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 35 所示氨基酸序列的 LCDR3；

(3) 包含 SEQ ID NO. 30 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 43 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 33 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 34 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 35 所示氨基酸序列的 LCDR3；

(4) 包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 37 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 33 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 34 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 35 所示氨基酸序列的 LCDR3。

优选地，所述结合 EGFR 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含:

(1) SEQ ID NO. 10 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 11 所示的氨基酸序列；

(2) SEQ ID NO. 12 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 11 所示的氨基酸序列；

(3) SEQ ID NO. 15 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 16 所示的氨基酸序列；或

(4) SEQ ID NO. 17 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 18 所示的氨基酸序列。

所述抗体或其抗原结合片段可以是鼠抗、嵌合抗体或人源化抗体；并且，可以进一步包含重链恒定区和轻链恒定区。根据本发明的具体实施方式，所述重链恒定区可以是 IgG1 或 IgG4 的重链恒定区；所述轻链恒定区可以是 kappa 或 lambda 轻链恒定区。例如，所述抗体的重链恒定区包含 SEQ ID NO. 21（hIgG1）所示的氨基酸序列；所述抗体的轻链恒定区包含 SEQ ID NO. 22

（hkappa）所示的氨基酸序列。或者，所述抗体的重链恒定区包含 SEQ ID NO. 23（hIgG1； Knob）或 SEQ ID NO. 24（hIgG1； Hole）所示的氨基酸序列；所述抗体的轻链恒定区包含 SEQ ID NO. 22 所示的氨基酸序列。

第九方面，本发明还提供一种结合 c-Met 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含如下所示的重链 CDRs（HCDR1、HCDR2 和 HCDR3）和轻链 CDRs（LCDR1、LCDR2 和 LCDR3）:

包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 38 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 39 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3。

优选地，所述结合 c-Met 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含:

(1) SEQ ID NO. 13 所示的氨基酸序列; 和 SEQ ID NO. 14 所示的氨基酸序列；或

(2) SEQ ID NO. 19 所示的氨基酸序列; 和 SEQ ID NO. 20 所示的氨基酸序列。

所述抗体或其抗原结合片段可以是鼠抗、嵌合抗体或人源化抗体；并且，可以进一步包含重链恒定区和轻链恒定区。根据本发明的具体实施方式，所述重链恒定区可以是 IgG1 或 IgG4 的重链恒定区；所述轻链恒定区可以是 kappa 或 lambda 轻链恒定区。例如，所述抗体的重链恒定区包含 SEQ ID NO. 21（hIgG1）所示的氨基酸序列；所述抗体的轻链恒定区包含 SEQ ID NO. 22（hkappa）所示的氨基酸序列。或者，所述抗体的重链恒定区包含 SEQ ID NO. 23（hIgG1； Knob）或 SEQ ID NO. 24（hIgG1； Hole）所示的氨基酸序列；所述抗体的轻链恒定区包含 SEQ ID NO. 22 所示的氨基酸序列。

第十方面，本发明提供第八方面所述结合 EGFR 的抗体或其抗原结合片段或第九方面所述结合 c-Met 的抗体或其抗原结合片段在制备药物中的用途。

所述药物可以是抗体类药物，其用于治疗其靶标蛋白或抗原表达相关疾病，例如 EGFR 和/或 c-Met 表达相关疾病。例如，所述药物用于治疗肿瘤或癌症，诸如肺癌（如非小细胞肺癌、小细胞肺癌）、肝癌、胰腺癌、胃癌、结

直肠癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、乳腺癌、食管癌、胆管癌、鼻咽癌、黑色素瘤。

相对于现有技术，本发明提供了一种多肽，该多肽源自一株特定的抗c-Met人源化抗体的轻链可变区或轻链。所述多肽可以作为双特异性抗体的共同轻链，与对其他靶标蛋白（例如 EGFR）具有结合亲和力和/或特异性的抗体的重链可变区或重链一起，构建得到一种双特异性抗体。实验证明，所述双特异性抗体保持了、甚至显示出对两个不同靶标蛋白的更强结合亲和力和/或特异性。因此，本发明提供的多肽具有作为共同轻链可变区或轻链用于构建双特异性抗体的应用潜力。此外，本发明还提供了包含所述多肽作为共同的轻链可变区或轻链的抗体，例如抗 EGFR 和/或 c-Met 的抗体。

附图说明

以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

图 1 示出了抗 EGFR 的鼠源抗体和对照抗体与 EGFR 过表达细胞的结合活性；

图 2 示出了抗 EGFR 的鼠源抗体和对照抗体对 EGFR 与 EGF 结合的阻断活性；

图 3 示出了抗 EGFR 的鼠源抗体和对照抗体对 EGFR 信号传导的阻断活性；

图 4 示出了抗 EGFR 的人源化抗体和对照抗体与 EGFR 过表达细胞的结合活性；

图 5 示出了抗 EGFR 的人源化抗体和对照抗体对 EGFR 与 EGF 结合的阻断活性；

图 6 示出了抗 EGFR 的人源化抗体和对照抗体对 EGFR 信号传导的阻断活性；

图 7 示出了抗 c-Met 的鼠源抗体和对照抗体与 c-Met 表达细胞的结合活性；

图 8 示出了抗 c-Met 的鼠源抗体和对照抗体对 c-Met 与 HGF 结合的阻断活性；

图 9 示出了抗 c-Met 的鼠源抗体和对照抗体对 c-Met 信号传导的阻断活

性;

图 10 示出了抗 c-Met 的人源化抗体和对照抗体与 c-Met 表达细胞的结合活性;

图 11 示出了抗 c-Met 的人源化抗体和对照抗体对 c-Met 与 HGF 结合的阻断活性;

图 12 示出了抗 c-Met 的人源化抗体和对照抗体对 c-Met 信号传导的阻断活性;

图 13 示出了抗 EGFR 的人源化抗体、EGFR×c-Met 双特异性抗体和对照抗体与 EGFR 过表达细胞的结合活性;

图 14 示出了抗 c-Met 的人源化抗体、EGFR×c-Met 双特异性抗体和对照抗体与 c-Met 过表达细胞的结合活性;

图 15 示出了 EGFR×c-MET 双特异性抗体和对照抗体对 EGFR 与 EGF 结合的阻断活性;

图 16 示出了 EGFR×c-MET 双特异性抗体和对照抗体对 c-Met 与 HGF 结合的阻断活性;

图 17 示出了 EGFR×c-Met 双特异性抗体和对照抗体对 EGFR、c-Met 信号传导的阻断活性;

图 18 示出了 EGFR×c-Met 双特异性抗体和对照抗体对肿瘤生长的抑制活性。

实施发明的最佳方式

以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法如无特殊说明，均为常规方法；下述实施例中所用的材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。

在构建抗体时，下述实施例中采用了以下恒定区序列:

> 人重链 CH1 及 FC 序列（SEQ ID NO. 21）:

hIgG1-WT:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

> 人轻链 CL 序列（SEQ ID NO. 22）:
hkappa:
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 人重链 Knob CH1 及 FC 序列（hIgG1；SEQ ID NO. 23）:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR
DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

> 人重链 Hole CH1 及 FC 序列（hIgG1；SEQ ID NO. 24）:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR
DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

在下述实施例中采用了以下对照抗体:

Cetuximab: 申请人自制，Cat #: KA-1398-01;

MCLA129-METV2-hIgG1: 申请人自制，Cat #: KB-1214；采用已知 EGFR×c-Met 特异性抗体 MCLA-129 中抗 c-Met 的可变区序列与人轻链 CL 序列（SEQ ID NO. 22）、人重链 Knob CH1 及 FC 序列（SEQ ID NO. 23）构建得到;

JNJ372-EGFR×c-Met: 申请人自制，Cat #: KB-1123; 采用已知 EGFR×c-Met 特异性抗体 Amivantamab（JNJ-372）的可变区序列，通过 KIH+crossmab 双抗组装技术构建得到;

MCLA129V1: 申请人自制，Cat #: KB-1217; 即已知 EGFR×c-Met 特异性抗体 MCLA-129;

AZD9592-hIgG1: 申请人自制，Cat #: KB-1380; 为阿斯利康的 AZD9592（EGFR/c-Met ADC）中的抗体部分。

实施例 1 共同轻链的筛选

分析现有技术，发现 KV4 这一类的 germline 在小鼠中的表达频率比较高、以更高频率与小鼠重链配对，因此选择这一类的 germline 序列，在其中挑选出比较容易人源化、溶解性好、免疫原性低、没有潜在修饰位点的如下小鼠 germline 序列 KV4-59。

> KV4-59（SEQ ID NO. 1）:

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC**QQWSSNPP**FGSGTKLEIK

对上述序列进行改造。由于轻链的 CDR3（见下划线所示; 根据 KABAT 定义方法得到）在抗体与抗原结合的亲和力发挥重要作用，因此在 CDR3 后添加氨基酸，以提高与潜在抗原的亲和力。得到以下三条序列:

> KV4-59-1（SEQ ID NO. 2）:

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC**QQWSSNPP*YT***FGSGTKLEIK

> KV4-59-2（SEQ ID NO. 3）:

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC**QQWSSNPP*WT***FGSGTKLEIK

> KV4-59-3（SEQ ID NO. 4）:

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC**QQWSSNPP*FT***FGSGTKLEIK

将上述三条序列分别作为抗体轻链可变区序列，与如下的鼠抗鸡卵溶菌酶抗体的重链可变区序列以及人的重链和轻链恒定区，构建嵌合抗体。

> 鼠抗鸡卵溶菌酶抗体的重链可变区序列（SEQ ID NO. 5）:

LDVKLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSFTSGYYWNWIRLFPGNKLEWMGYVSYFGT
NNYNPSLKNRFSITRDTSKNQFFLKLNSVSTEDTATYYCARGEEWDWSFDVWGTGTTV
TVSS

通过检测三个嵌合抗体的抗原结合亲和力、表达量、热稳定性、溶解性、冻融稳定性等性质，确认当 KV4-59-1（SEQ ID NO. 2）作为抗体轻链可变区序列时，构建得到的抗体具有更佳性质。

实施例 2 转基因小鼠的构建

根据 C57 小鼠抗体 lambda 轻链基因序列，设计 sgRNA，采用 Cas9-gRNA 靶点效率检测试剂盒（唯尚立德，Cat #: VK007-30T）体外验证，选择切割效率高的 sgRNA 序列 TGAATGCCATGTACTTATGG（SEQ ID NO. 6）；AAGTTCAGCTCCTAAAATGG（SEQ ID NO. 7）。合成该 sgRNA 序列，并与 spCas91.1 蛋白显微注射到小鼠受精卵中，sgRNA 介导 Cas9 蛋白剪切目标基因待删除片段的两端，导致 DNA 双链断裂，基因组两端通过非同源末端连接（NHEJ）方式进行 DNA 修复，中间的目的片段被删除，实现目标基因敲除。小鼠出生 2 周后，进行基因型鉴定，确认 lambda 基因已敲除。

根据 C57 小鼠抗体 kappa 轻链基因序列，设计 sgRNA，采用 Cas9-gRNA 靶点效率检测试剂盒（唯尚立德，Cat #: VK007-30T）体外验证，选择切割效率高的 sgRNA 序列 IGK-L1: GTGAATGCCATGTACTTATGG（SEQ ID NO. 8）；IGK-R1: CAAGTTCAGCTCCTAAAATGG（SEQ ID NO. 9）。合成该 sgRNA 序列，并与 spCas91.1 蛋白显微注射到小鼠受精卵中，sgRNA 介导 Cas9 蛋白剪切目标位置的 DNA 产生缺口，利用带同源臂以及目的片段 KV4-59-1（SEQ ID NO. 2）的 Donor DNA 片段，通过同源重组方式在目标位置实现 DNA 片段的敲入。小鼠出生 2 周后，进行基因型鉴定，确认共同轻链基因已敲入。选择 lambda 基因敲除的杂合子小鼠与共同轻链敲入的杂合子小鼠进行交配繁育，每一子代出生 2 周，进行基因型鉴定，检测共同轻链基因敲入和 lambda 敲除情况，直到得到全部等位基因共同轻链基因敲入和 lambda、kappa 均敲除的小鼠。

实施例 3 分泌抗 EGFR 抗体的杂交瘤细胞的制备

用 EGFR-mFc（康源博创生物科技（北京）有限公司（“康源博创”），

Cat #: KP-1151）作为免疫原免疫实施例 2 构建的小鼠。选取效价较高的小鼠，取血清；解剖后取脾脏，分离脾细胞。将该脾细胞与培养的骨髓瘤细胞进行融合，得到杂交瘤细胞。采用 ELISA 检测杂交瘤细胞上清液与抗原蛋白 EGFR-His（康源博创，Cat #: KP-1150）的结合活性，得到多个分泌抗 EGFR 抗体的阳性杂交瘤细胞株。

从阳性杂交瘤细胞株获得抗 EGFR 的鼠源抗体，其可变区序列如下（其中重链和轻链 CDR 以下划线示出，其根据 KABAT 定义方法得到，下文同），其中鼠源抗体 22A12-2 与 103G9-3 具有相同的轻链：

22A12-2（抗 EGFR 的鼠源抗体 1；又命名为“KD-22-0198”）

> EGFR-22A12-2，VH（SEQ ID NO. 10；HCDR1/HCDR2/HCDR3：SEQ ID NO. 30/SEQ ID NO. 31/SEQ ID NO. 32）:

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNDGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAREILYYVTSFYFDYWGQGTTLTVSS

> EGFR-22A12-2，VL（SEQ ID NO. 11; LCDR1/LCDR2/LCDR3: SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34/SEQ ID NO. 35）:

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSATSSIGYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTFYSLTISSMEAEDAATYYCQLWSSDPPYTFGGGTKLEIK

103G9-3（抗 EGFR 的鼠源抗体 2；又命名为“KD-22-0220”）

> EGFR-103G9-3，VH（SEQ ID NO. 12；HCDR1/HCDR2/HCDR3：SEQ ID NO. 36/SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 32）:

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQSHGKSLEWIGDINPNNDDTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAREILYYVTSFYFDYWGQGTTLTVSS

> EGFR-103G9-3，VL（SEQ ID NO. 11; LCDR1/LCDR2/LCDR3: SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34/SEQ ID NO. 35）:

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSATSSIGYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTFYSLTISSMEAEDAATYYCQLWSSDPPYTFGGGTKLEIK

实施例 4 抗 EGFR 的鼠源抗体与 EGFR 过表达细胞的结合活性

将待检测的抗体梯度稀释，与过表达 EGFR 的 CT26 细胞（康源博创，Cat #: KC-1451）共孵育，然后与抗鼠的二抗 PE anti-mouse IgG Fc（Biolegend，Cat #: 405307）共孵育，或与抗人的二抗 Goat anti-human IgG-PE（SouthernBiotech，Cat #: 2010-09）共孵育。流式细胞仪检测结合在细胞上的抗体信号，结果见表 1 和图 1。

表 1. 抗 EGFR 的鼠源抗体和对照抗体与 EGFR 过表达细胞的结合活性

抗体	EC50 (μg/mL)
Cetuximab	0.01554
22A12-2	0.02418
103G9-3	0.02256

实施例 5 抗 EGFR 的鼠源抗体对 EGFR 与 EGF 结合的阻断活性

将待检测的抗体梯度稀释，与 0.4μg/ml 的 EGFR-mFc（康源博创，Cat #: KP-1148）或 EGFR-hFc（康源博创，Cat #: KP-1149）共孵育，然后与包被有 EGF-His（2μg/ml，Acro，Cat #: EGF-H52H3）的 ELISA 板孵育，最后与抗鼠的二抗 HRP anti-mouse IgG（SIGMA，Cat #: A9309）共孵育，或与抗人的二抗 HRP anti-human IgG（SIGMA，Cat #: A0170）共孵育。酶标仪检测结合信号，结果见表 2 和图 2。

表 2. 抗 EGFR 的鼠源抗体和对照抗体对 EGFR 与 EGF 结合的阻断活性

抗体	IC50 (μg/mL)
Cetuximab	0.4083
22A12-2	1.579
103G9-3	0.9592

实施例 6 抗 EGFR 的鼠源抗体对 EGFR 信号传导的阻断活性

将待检测的抗体梯度稀释，与 293T-NFAT-Luc2-EGFR（康源博创，Cat #: KC-2952，EGFR 信号激活后表达荧光素酶）共孵育 30 分钟，然后加入 EGF-His（20ng/ml，Acro，Cat #: EGF-H52H3）继续过夜培养。检测激活荧光素酶信号，无 EGF 孵育的为本底激活，加 EGF 后激活强度增加的倍数和抗体浓度作相关曲线，结果见表 3 和图 3。

表 3. 抗 EGFR 的鼠源抗体和对照抗体对 EGFR 信号传导的阻断活性

抗体	IC50 (μg/mL)
Cetuximab	0.3462
22A12-2	0.3735
103G9-3	0.2595

实施例 7 抗 EGFR 的鼠源抗体对 EGFR 的亲和力

ForteBio Octet 检测抗体对 EGFR 的亲和力。流动相 EGFR-His（康源博创，Cat #: KP-1150）浓度依次为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.12nM，亲和力检测结果见表 4。

表 4. 抗 EGFR 的鼠源抗体和对照抗体对 EGFR 的亲和力

抗体	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
Cetuximab	1.67E-09	1.09E+06	1.81E-03
22A12-2	1.15E-09	9.65E+05	1.11E-03
103G9-3	7.31E-10	9.89E+05	7.23E-04

实施例 8 抗 EGFR 的人源化抗体、嵌合抗体的构建

将 2 个抗 EGFR 的鼠源抗体的重链和轻链可变区进行人源化改造，得到人源化抗体序列；其中轻链可变区得到 2 个人源化版本。将人源化抗体序列的编码序列分别与人 IgG1 的重链恒定区（SEQ ID NO. 21）和人 kappa 的轻链恒定区（SEQ ID NO. 22）的编码序列相连接，获得的编码基因克隆到真核表达载体中，表达并获得 2 个抗 EGFR 的人源化抗体，分别命名为 H22A12-2V3-1-hIgG1 和 H103G9-3V2-2-hIgG1，其重链、轻链可变区序列和重链、轻链全长如下（其中重链和轻链 CDR 以下划线示出）。

此外，将 2 个抗 EGFR 的鼠源抗体的重链和轻链可变区的编码序列分别与人 IgG1 的重链恒定区（SEQ ID NO. 21）和人 kappa 的轻链恒定区（SEQ ID NO. 22）的编码序列相连接，获得的编码基因克隆到真核表达载体中，表达并获得 2 个抗 EGFR 的嵌合抗体。

H22A12-2V3-1-hIgG1（抗 EGFR 的人源化抗体 1；又命名为“KA-2029”）

> EGFR-H22A12-2V3-1-hIgG1，VH（SEQ ID NO. 15; HCDR1/HCDR2/HCDR3: SEQ ID NO. 30/SEQ ID NO. 43/SEQ ID NO. 32）：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWIGDINPNDAG

TSYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREILYYVTSFYFDYWGQGTT
VTVSS

> EGFR-H22A12-2V3-1-hIgG1，VL（SEQ ID NO. 16；LCDR1/LCDR2/LCDR3：SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34/SEQ ID NO. 35）：

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSATSSIGYMHWYQQKPDTSPKRWIYDTSKLASGVPSRF
SGSGSGTDYTLTINSLEAEDAATYYCQLWSSDPPYTFGQGTRLEIK

H103G9-3V2-2-hIgG1（抗 EGFR 的人源化抗体 2；又命名为“KA-2034”）

> EGFR-H103G9-3V2-2-hIgG1，VH（SEQ ID NO. 17；HCDR1/HCDR2/HCDR3：SEQ ID NO. 36/SEQ ID NO. 37/SEQ ID NO. 32）：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWIGDINPNNDDT
NYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREILYYVTSFYFDYWGQGTT
VTVSS

> EGFR-H103G9-3V2-2-hIgG1，VL（SEQ ID NO. 18；LCDR1/LCDR2/LCDR3：SEQ ID NO. 33/SEQ ID NO. 34/SEQ ID NO. 35）：

DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCSATSSIGYMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPSRF
SGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQLWSSDPPYTFGQGTRLEIK

实施例 9 抗 EGFR 的人源化抗体与 EGFR 过表达细胞的结合活性

将待检测的抗体梯度稀释，与过表达 EGFR 的 CT26 细胞（康源博创，Cat #：KC-2063）共孵育，然后与抗人的二抗 Goat anti-human IgG-PE（SouthernBiotech，Cat #：2010-09）共孵育。流式细胞仪检测结合在细胞上的抗体信号，结果见表 5 和图 4。

表 5. 抗 EGFR 的人源化抗体和对照抗体与 EGFR 过表达细胞的结合活性

抗体	EC50 (μg/mL)	MFI.Max
Cetuximab	0.008277	53630
H22A12-2V3-1-hIgG1	0.01533	59797
H103G9-3V2-2-hIgG1	0.01116	58085

实施例 10 抗 EGFR 的人源化抗体对 EGFR 与 EGF 结合的阻断活性

将待检测的抗体梯度稀释，与过表达 EGFR 的 CT26 细胞（康源博创，

Cat #: KC-1451）共孵育，然后与 0.2μg/ml 的 EGF-mFc（Acro，Cat #: EGF-H525b）共孵育，最后与 FITC anti-mouse IgG2a（1:500，Biolegend，Cat #: 407106）共孵育。流式细胞仪检测结合在细胞上的抗体信号，结果见表 6 和图 5。

表 6. 抗 EGFR 的人源化抗体和对照抗体对 EGFR 与 EGF 结合的阻断活性

抗体	IC50 (μg/mL)
Cetuximab	0.005269
H22A12-2V3-1-hIgG1	0.01106
H103G9-3V2-2-hIgG1	0.009781

实施例 11 抗 EGFR 的人源化抗体对 EGFR 信号传导的阻断活性

将待检测的抗体梯度稀释，与 293T-NFAT-Luc2-EGFR（康源博创，Cat #: KC-2952，EGFR 信号激活后表达荧光素酶）共孵育 30 分钟，然后加入 EGF-His（20ng/ml，Acro，Cat #: EGF-H52H3）继续过夜培养。检测激活荧光素酶信号，无 EGF 孵育的为本底激活，加 EGF 后激活强度增加的倍数和抗体浓度作相关曲线，结果见表 7 和图 6。

表 7. 抗 EGFR 的人源化抗体和对照抗体对 EGFR 信号传导的阻断活性

抗体	IC50 (nM)
Cetuximab	0.2552
H22A12-2V3-1-hIgG1	0.3032
H103G9-3V2-2-hIgG1	0.2617

实施例 12 分泌抗 c-Met 抗体的杂交瘤细胞的制备

用 HGFR SEMA-mFc（康源博创，Cat #: KP-1271）作为免疫原免疫实施例 2 构建的小鼠。选取效价较高的小鼠，取血清；解剖后取脾脏，分离脾细胞。将该脾细胞与培养的骨髓瘤细胞进行融合，得到杂交瘤细胞。采用 ELISA 检测杂交瘤细胞上清液与抗原蛋白的结合活性，得到多个分泌抗 c-Met 抗体的阳性杂交瘤细胞株。

从阳性杂交瘤细胞株获得抗 c-Met 鼠源抗体，其可变区序列如下（其中重链和轻链 CDR 以下划线示出，其根据 KABAT 定义方法得到，下文同）：

15H1Y1C（抗 c-Met 的鼠源抗体，又命名为“KD-23-0480”）

> MET-15H1Y1C，VH（SEQ ID NO. 13；HCDR1/HCDR2/HCDR3：SEQ ID NO. 36/SEQ ID

NO. 38/SEQ ID NO. 39):

EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGYTFTDYYINWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTD YNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCASDLNGNYEVDYWGQGTSVTV SS

> MET-15H1Y1C，VL（ SEQ ID NO. 14; LCDR1/LCDR2/LCDR3: SEQ ID NO. 40/SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42):

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVTFMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWGDDPPYTFGGGTKLEIK

实施例 13 抗 c-Met 的鼠源抗体与 c-Met 表达细胞的结合活性

将待检测的抗体梯度稀释，与表达 c-Met 的人胃癌细胞 MKN45 细胞（康源博创，Cat #: KC-0412）共孵育，然后与抗鼠的二抗 PE anti-mouse IgG Fc（Biolegend，Cat #: 405307）共孵育，或与抗人的二抗 Goat anti-human IgG-PE（SouthernBiotech，Cat #: 2010-09）共孵育。流式细胞仪检测结合在细胞上的抗体信号，结果见表 8 和图 7。

表 8. 抗 c-Met 的鼠源抗体和对照抗体与 c-Met 表达细胞的结合活性

抗体	EC50 (μg/mL)
MCLA129-METV2-hIgG1	0.04975
15H1Y1C	0.02612

实施例 14 抗 c-Met 的鼠源抗体对 c-Met 与 HGF 结合的阻断活性

将待检测的抗体梯度稀释，与表达 c-Met 的人胃癌细胞 MKN45 细胞（康源博创，Cat #: KC-0412）共孵育，然后与 0.04μg/ml 的 HGF-His（Acro，Cat #: HGF-H52H3）共孵育，最后与抗 His 的抗体 APC anti-His Tag（1:500，Biolegend，Cat #: 362605）共孵育。流式细胞仪检测结合在细胞上的抗体信号，结果见表 9 和图 8。

表 9. 抗 c-Met 的鼠源抗体和对照抗体对 c-Met 与 HGF 结合的阻断活性

抗体	IC50 (μg/mL)
MCLA129-METV2-hIgG1	0.1345
15H1Y1C	0.05016

实施例 15 抗 c-Met 的鼠源抗体对 c-Met 信号传导的阻断活性

将待检测的抗体梯度稀释，与 293T-SRE-Luc2-MET（康源博创，Cat #: KC-2056，c-Met 信号激活后表达荧光素酶）共孵育 30 分钟，然后加入 RH-HGF（1ng/ml，Acro，Cat #: HGF-H5218）继续过夜培养。检测激活荧光素酶信号，无 RH-HGF 孵育的为本底激活，加 RH-HGF 后激活强度增加的倍数和抗体浓度作相关曲线，结果见表 10 和图 9。

表 10. 抗 c-Met 的鼠源抗体和对照抗体对 c-Met 信号传导的阻断活性

抗体	IC50 (μg/mL)
MCLA129-METV2-hIgG1	0.042
15H1Y1C	0.012

实施例 16 抗 c-Met 的人源化抗体、嵌合抗体的构建

将抗 c-Met 的鼠源抗体的重链和轻链可变区进行人源化改造，得到人源化抗体序列。将人源化抗体序列的编码序列分别与人 IgG1 的重链恒定区（SEQ ID NO. 21）和人 kappa 的轻链恒定区（SEQ ID NO. 22）的编码序列相连接，获得的编码基因克隆到真核表达载体中，表达并获得 1 个抗 c-Met 的人源化抗体，命名为 H15H1Y1CV2-hIgG1，其重链、轻链可变区序列和重链、轻链全长如下（其中重链和轻链 CDR 以下划线示出）。

此外，将抗 c-Met 的鼠源抗体的重链和轻链可变区的编码序列分别与人 IgG1 的重链恒定区（SEQ ID NO. 21）和人 kappa 的轻链恒定区（SEQ ID NO. 22）的编码序列相连接，获得的编码基因克隆到真核表达载体中，表达并获得 1 个抗 c-Met 的嵌合抗体。

H15H1Y1CV2-hIgG1（抗 c-Met 的人源化抗体；又命名为“KA-2427”）

> MET-H15H1Y1CV2-hIgG1，VH（SEQ ID NO. 19；HCDR1/HCDR2/HCDR3：SEQ ID NO. 36/SEQ ID NO. 38/SEQ ID NO. 39）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGKGLEWIGDINPNNGGTDYNQKFKDRATLTVDKSTSTAYMELRSLRSEDTAVYFCASDLNGNYEVDYWGQGTTVTVSS

> MET-H15H1Y1CV2-hIgG1，VL（SEQ ID NO. 20；LCDR1/LCDR2/LCDR3：SEQ ID NO. 40/SEQ ID NO. 41/SEQ ID NO. 42）

DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSSVTFMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSNLASGVPSRF

SGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQWGDDPPYTFGQGTRLEIK

实施例 17 抗 c-Met 的人源化抗体与 c-Met 表达细胞的结合活性

将待检测的抗体梯度稀释，与表达 c-Met 的人胃癌细胞 MKN45 细胞（康源博创，Cat #: KC-0412）共孵育，然后与抗人的二抗 Goat anti-human IgG-PE（SouthernBiotech，Cat #: 2010-09）共孵育。流式细胞仪检测结合在细胞上的抗体信号，结果见表 11 和图 10。

表 11. 抗 c-Met 的人源化抗体和对照抗体与 c-Met 表达细胞的结合活性

抗体	EC50 (μg/mL)
MCLA129-METV2-hIgG1	0.06661
H15H1Y1CV2-hIgG1	0.01492

实施例 18 抗 c-Met 的人源化抗体对 c-Met 与 HGF 结合的阻断活性

将待检测的抗体梯度稀释，与表达 c-Met 的人胃癌细胞 MKN45 细胞（康源博创，Cat #: KC-0412）共孵育，然后与 0.04μg/ml 的 HGF-His（Acro，Cat #: HGF-H52H3）共孵育，最后与抗 His 的抗体 APC anti-His Tag（1:500，Biolegend ，Cat #: 362605）共孵育。流式细胞仪检测结合在细胞上的抗体信号，结果见表 12 和图 11。

表 12. 抗 c-Met 的人源化抗体和对照抗体对 c-Met 与 HGF 结合的阻断活性

抗体	IC50 (μg/mL)
MCLA129-METV2-hIgG1	0.2104
H15H1Y1CV2-hIgG1	0.02541

实施例 19 抗 c-Met 的人源化抗体对 c-Met 信号传导的阻断活性

将待检测的抗体梯度稀释，与 293T-SRE-Luc2-MET（康源博创，Cat #: KC-2056，c-Met 信号激活后表达荧光素酶）共孵育 30 分钟，然后加入 RH-HGF（1ng/ml，Acro，Cat #: HGF-H5218）继续过夜培养。检测激活荧光素酶信号，无 RH-HGF 孵育的为本底激活，加 RH-HGF 后激活强度增加的倍数和抗体浓度作相关曲线，结果见表 13 和图 12。

表 13. 抗 c-Met 的人源化抗体和对照抗体对 c-Met 信号传导的阻断活性

抗体	IC50 (μg/mL)

MCLA129-METV2-hIgG1	0.021
H15H1Y1CV2-hIgG1	0.007

实施例 20 抗 c-Met 的人源化抗体对 c-Met（HGFR）的亲和力

ForteBio Octet 检测抗体对 c-Met 的亲和力。流动相人 c-Met-His（康源博创，Cat #: KP-1153）浓度依次为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.12nM，亲和力检测结果见表 14。

表 14. 抗 c-Met 的人源化抗体和对照抗体对 c-Met 的亲和力

抗体	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
MCLA129-METV2-hIgG1	3.79E-09	1.89E+05	7.17E-04
H15H1Y1CV2-hIgG1	2.75E-10	5.75E+05	1.58E-04

实施例 21 EGFR×c-Met 双特异性抗体的构建

将抗 c-Met 的人源化抗体 H15H1Y1CV2-hIgG1 的轻链可变区（SEQ ID NO. 20）与人 kappa 轻链恒定区（SEQ ID NO. 22）的编码序列相连接，得到双特异性抗体的共同轻链。

将抗 c-Met 的人源化抗体 H15H1Y1CV2-hIgG1 的重链可变区（SEQ ID NO. 19）与人重链 Knob CH1 及 FC 序列（SEQ ID NO. 23）的编码序列相连接；将抗 EGFR 的人源化抗体 1 即 H22A12-2V3-1-hIgG1 的重链可变区（SEQ ID NO. 15）与人重链 Hole CH1 及 FC 序列（SEQ ID NO. 24）的编码序列相连接，或者将抗 EGFR 的人源化抗体 2 即 H103G9-3V2-2-hIgG1 的重链可变区（SEQ ID NO. 17）与人重链 Hole CH1 及 FC 序列（SEQ ID NO. 24）的编码序列相连接。

将获得的上述编码序列分别克隆到真核表达载体中，得到四个重组表达质粒（分别是编码共同轻链的 1 个质粒，编码靶向 c-Met 的重链的 1 个质粒、分别编码靶向 EGFR 的重链的 2 个质粒）。利用 HEK293F 表达系统瞬时共转染三种质粒（选择编码靶向 EGFR 的重链的 2 个质粒之一）来生产 EGFR×c-Met 双特异性抗体。简言之，对于 1L 摇瓶，HEK293F 细胞以 1×10^6 个/mL 密度接种在 250mL 培养基中，110rpm，5% CO_2 温育；次日将预先准备的 3 个表达载体与转染试剂按照一定比例混合后，以 2×10^6 个/mL 细胞密度，将转染复合物添加至细胞中，24h 后补加营养物质及 DNA 抑制剂；细胞培养 5-7d 后，收取表达上清，离心，过滤，选择 MabSelectSure 亲和层析柱(GE Healthcare)进行

纯化，纯化后抗体，通过 SDS-PAGE 电泳检测纯度，用 Nanodrop 检测抗体浓度。

得到的 EGFR×c-Met 双特异性抗体所包含的结构域及其序列见表 15 与下文（下文序列中斜体为恒定区）。

表 15. 包含共同轻链的 EGFR×c-Met 双特异性抗体

双特异性抗体	靶向 c-Met 的重链		靶向 EGFR 的重链		共同轻链		
	重链可变区	重链恒定区	重链可变区	重链恒定区	轻链可变区	轻链恒定区	轻链
H15H1YCHV2×H22A12-2HV3-hIgG1	SEQ ID NO. 19	SEQ ID NO. 23【Knob】	SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 24【Hole】	SEQ ID NO. 20	SEQ ID NO. 22	SEQ ID NO. 29
H15H1YCHV2×H103G9-3HV2-hIgG1	SEQ ID NO. 19	SEQ ID NO. 23【Knob】	SEQ ID NO. 17	SEQ ID NO. 24【Hole】	SEQ ID NO. 20	SEQ ID NO. 22	SEQ ID NO. 29

H15H1YCHV2xH22A12-2HV3-hIgG1（EGFR×c-Met 双特异性抗体 1；又命名为“KA-2597”）

> MET-H15H1Y1CV2-Knob（重链 1，SEQ ID NO. 25；VH：SEQ ID NO. 19；CH[Knob]：SEQ ID NO. 23）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGKGLEWIGDINPNNGGTDYNQKFKDRATLTVDKSTSTAYMELRSLRSEDTAVYFCASDLNGNYEVDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

> EGFR-H22A12-2V3-Hole（重链 2，SEQ ID NO. 26；VH：SEQ ID NO. 15；CH[Hole]：SEQ

ID NO. 24）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWIGDINPNDAG TSYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREILYYVTSFYFDYWGQGTT VTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG*

> 共同轻链（SEQ ID NO. 29； VL： SEQ ID NO. 20； LC： SEQ ID NO. 22）

DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSSVTFMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSNLASGVPSRF SGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQWGDDPPYTFGQGTRLEIK*RTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

H15H1YCHV2×H103G9-3HV2-hIgG1（EGFR×c-Met 双特异性抗体 2；又命名为“KA-2599”）

> MET-H15H1Y1CV2-Knob（重链 1，SEQ ID NO. 27； VH： SEQ ID NO. 19； CH[Knob]: SEQ ID NO. 23）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGKGLEWIGDINPNNGGT DYNQKFKDRATLTVDKSTSTAYMELRSLRSEDTAVYFCASDLNGNYEVDYWGQGTTVT VSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG*

> EGFR-H103G9-3HV2-Hole（重链 2，SEQ ID NO. 28； VH： SEQ ID NO. 17； CH[Hole]: SEQ ID NO. 24）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWIGDINPNNDDT NYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREILYYVTSFYFDYWGQGTT VTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG*

> 共同轻链（SEQ ID NO. 29；VL：SEQ ID NO. 20；LC：SEQ ID NO. 22）

DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSSVTFMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSNLASGVPSRF SGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQWGDDPPYTFGQGTRLEIK*RTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

实施例 22 抗 EGFR 的人源化抗体、抗 c-Met 的人源化抗体、EGFR×c-Met 双特异性抗体与 EGFR 过表达、c-Met（HGFR）过表达细胞的结合活性

构建过表达 EGFR 的 CT26 细胞，命名为“CT26-EGFR 细胞”（康源博创，Cat #：KC-2063）。构建过表达 c-Met 的 CHOK1 细胞，命名为“CHOK1-cMET 细胞”（康源博创，Cat #：KC-2524）。

将待检测的抗体梯度稀释，与 CT26-EGFR 细胞或 CHOK1-cMET 细胞共孵育，然后与抗人的二抗 Goat anti-human IgG-PE（SouthernBiotech，Cat #：2010-09）共孵育。流式细胞仪检测结合在细胞上的抗体信号，结果见表 16 和图 13（EGFR），表 17 和图 14（c-Met）。

表16. 抗EGFR的人源化抗体、EGFR×c-Met双特异性抗体和对照抗体与EGFR过表达细胞的结合活性

抗体	EC50 (μg/mL)	MFI.Max
JNJ372-EGFR×c-Met	0.0672	46140
MCLA129V1	0.5458	37975
AZD9592-hIgG1	N/A	18728

H15H1YCHV2×H22A12-2HV3-hIgG1	0.06741	103802
H15H1YCHV2×H103G9-3HV2-hIgG1	0.0801	74245

表 17. 抗 c-Met 的人源化抗体、EGFR×c-Met 双特异性抗体和对照抗体与 c-Met 过表达细胞的结合活性

抗体	EC50 (ug/mL)	MFI.Max
JNJ372-EGFR×c-Met	0.1222	13582
MCLA129V1	0.3421	14863
AZD9592-hIgG1	0.02142	10969
MCLA129-METV2-hIgG1	0.08725	7714
H15H1Y1CV2-hIgG1	0.006105	7335
H15H1YCHV2×H22A12-2HV3-hIgG1	0.01205	14598
H15H1YCHV2×H103G9-3HV2-hIgG1	0.01784	11731

实施例 23 EGFR×c-Met 双特异性抗体与人 EGFR、c-Met（HGFR）的亲和力

ForteBio Octet 检测抗体对 EGFR、c-Met 的亲和力。流动相分别采用人 EGFR-His（康源博创，Cat #: KP-1150）和人 c-Met-His（康源博创，Cat #: KP-1153），浓度依次为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.12nM。结果见表 18。

表 18. EGFR×c-Met 双特异性抗体和对照抗体与 EGFR、c-Met 的亲和力

抗体	抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
JNJ372-EGFR×cMet	人 HGFR（c-Met）	5.35E+05	2.93E-04	5.49E-10
MCLA129V1	人 HGFR（c-Met）	2.05E+05	2.53E-04	1.23E-09
AZD9592-hIgG1	人 HGFR（c-Met）	4.73E+05	8.80E-04	1.86E-09
H15H1YCHV2×H22A12-2HV3-hIgG1	人 HGFR（c-Met）	7.77E+05	1.63E-05	2.10E-11

H15H1YCHV2×H103G9-3HV2-hIgG1	人 HGFR（c-Met）	7.12E+05	1.69E-04	2.37E-10
JNJ372-EGFR×cMet	人 EGFR	3.87E+05	1.28E-03	3.31E-09
MCLA129V1	人 EGFR	3.96E+05	4.32E-03	1.09E-08
AZD9592-hIgG1	人 EGFR	1.43E+05	1.79E-03	1.26E-08
H15H1YCHV2×H22A12-2HV3-hIgG1	人 EGFR	1.04E+06	1.06E-03	1.02E-09
H15H1YCHV2×H103G9-3HV2-hIgG1	人 EGFR	1.61E+06	1.62E-03	1.01E-09

实施例 24 EGFR×c-MET 双特异性抗体对 EGFR 与 EGF 结合的阻断活性

将待检测的抗体梯度稀释，与过表达 EGFR 的 CT26 细胞（康源博创，Cat #: KC-1451）共孵育，然后与 0.2μg/ml 的 EGF-mFc（Acro，Cat #: EGF-H525b）共孵育，最后与 FITC anti-mouse IgG2a（1:500，Biolegend，Cat #: 407106）共孵育。流式细胞仪检测结合在细胞上的抗体信号，结果见表 19 和图 15。

表 19. EGFR×c-MET 双特异性抗体和对照抗体对 EGFR 与 EGF 结合的阻断活性

抗体	IC50 (μg/mL)
MCLA129V1	7.627
AZD9592-hIgG1	N/A
H15H1YCHV2×H22A12-2HV3-hIgG1	0.3545
H15H1YCHV2×H103G9-3HV2-hIgG1	1.137

实施例 25 EGFR×c-MET 双特异性抗体对 c-Met 与 HGF 结合的阻断活性

将待检测的抗体梯度稀释，与表达 c-MET 的人胃癌细胞 MKN45 细胞（康源博创，Cat #: KC-0412）共孵育，然后与 0.04μg/ml 的 HGF-His（Acro，Cat #: HGF-H52H3）共孵育，最后与抗 His 的抗体 APC anti-His Tag（1:500，Biolegend Cat #: 362605）共孵育。流式细胞仪检测结合在细胞上的抗体信号，结果见表 20 和图 16。

表 20. EGFR×c-MET 双特异性抗体和对照抗体对 c-Met 与 HGF 结合的阻断活性

抗体	IC50 (μg/mL)
JNJ372-EGFR×cMet	0.0155

MCLA129V1	0.03721
AZD9592-hIgG1	0.0324
H15H1YCHV2×H22A12-2HV3-hIgG1	0.005727
H15H1YCHV2×H103G9-3HV2-hIgG1	0.01044

实施例 26 EGFR×c-Met 双特异性抗体对 EGFR、c-Met 信号传导的阻断活性

将待检测的抗体以 10μg/ml 的终浓度分别与 H1975 细胞(康源博创,Cat #: KC-1566）共孵育，同时加入 50ng/ml 终浓度的 EGF-mFc（Acro，Cat #: EGF-H525b）和 100ng/ml 终浓度的 HGF-His（Acro，Cat #: HGF-H52H3），37℃共孵育 15min 后，每孔加裂解液裂解细胞，然后通过 western blotting 测量细胞中 EGFR、c-Met、Akt 和 Erk 的磷酸化水平，以分析 EGFR 和 c-Met 信号传导通路的激活，由此评估抗体抑制 EGFR 和 c-Met 信号传导通路的效率，结果见图 17。

结果显示，两种 EGFR×c-Met 双特异性抗体对 EGFR 和 c-Met 信号传导通路的抑制效率均显著强于对照抗体。

实施例 27 EGFR×c-Met 双特异性抗体对肿瘤生长的抑制活性

免疫缺陷小鼠 B-NDG（百奥赛图，Cat #: 110586）皮下接种一百万个过表达 HGF 的 H1975 肿瘤细胞（康源博创，Cat #: KC-1566），每周 3 次测量肿瘤大小，肿瘤体积计算为=0.5×长×宽×高。当肿瘤生长到~100mm^3 时，将移植瘤小鼠随机分组并静脉注射待检测的抗体。抗体每周注射 2 次，连续注射 3 次后改为每周注射 1 次。结果见图 18。

结果显示，EGFR×c-MET 双特异性抗体 KA-2597 显著抑制肿瘤生长，并且抑瘤效果优于对照抗体。

以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明，本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形，只要不脱离本发明的精神，均应属于本发明所附权利要求的范围。

权 利 要 求

1. 一种多肽，所述多肽的氨基酸序列包含：SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列；SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的多肽，其特征在于，所述多肽包含 SEQ ID NO. 20 所示的氨基酸序列；

优选地，所述多肽包含 SEQ ID NO. 29 所示的氨基酸序列。

3. 一种核酸分子，其包含编码权利要求 1 或 2 所述的多肽的核苷酸序列。

4. 权利要求 1 或 2 所述的多肽或者权利要求 3 所述的核酸分在构建抗体中的应用。

5. 一种抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含权利要求 1 或 2 所述的多肽；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含权利要求 1 或 2 所述的多肽作为轻链可变区或轻链；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段为 IgG 样抗体或 scFv、dsFv、(dsFv)2、Fab、Fab'、F(ab')2 或 Fv 等抗体形式。

6. 根据权利要求 5 所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段分别包含如下所示的重链 CDRs（HCDR1、HCDR2 和 HCDR3）和轻链 CDRs（LCDR1、LCDR2 和 LCDR3）：

(1) 包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 38 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 39 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3；

(2) 包含 SEQ ID NO. 30 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 43 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；

和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3；或

(3) 包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 37 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含：

(1) SEQ ID NO. 13 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 14 所示的氨基酸序列；

(2) SEQ ID NO. 19 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 20 所示的氨基酸序列；

(3) SEQ ID NO. 15 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 20 所示的氨基酸序列；或

(4) SEQ ID NO. 17 所示的氨基酸序列；和 SEQ ID NO. 20 所示的氨基酸序列。

8. 根据权利要求 5 至 7 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段具有至少两个 VH+VL 结构域组合，其是相同的，由此结合相同的靶标蛋白；或是不同的，由此结合不同的靶标蛋白；

优选地，所述两个 VH+VL 结构域组合具有：包含 SEQ ID NO. 20 所示氨基酸序列的轻链可变区。

9. 根据权利要求 5 至 8 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 结合 c-Met 的第一 VH+VL 结构域组合，其具有：包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 38 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO. 39 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40

所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 的 LCDR3；和

结合 EGFR 的第二 VH+VL 结构域组合，其具有：包含 SEQ ID NO. 30 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 43 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 的 LCDR3；或

(2) 结合 c-Met 的第一 VH+VL 结构域组合，其具有：包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1；包含 SEQ ID NO. 38 所示氨基酸序列的 HCDR2；和包含 SEQ ID NO. 39 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1；包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2；和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3；

结合 EGFR 的第二 VH+VL 结构域组合，其具有：包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 37 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3；和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1；包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2；和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3。

10. 根据权利要求 5 至 9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 结合 c-Met 的第一 VH+VL 结构域组合，其具有：包含 SEQ ID NO. 19 所示氨基酸序列的重链可变区，包含 SEQ ID NO. 20 所示氨基酸序列的轻链可变区；

结合 EGFR 的第二 VH+VL 结构域组合，其具有：包含 SEQ ID NO. 15 所示氨基酸序列的重链可变区，包含 SEQ ID NO. 20 所示氨基酸序列的轻链可变区；或

(2) 结合 c-Met 的第一 VH+VL 结构域组合，其具有：包含 SEQ ID NO. 19 所示氨基酸序列的重链可变区，包含 SEQ ID NO. 20 所示氨基酸序列的轻链可变区；

结合 EGFR 的第二 VH+VL 结构域组合，其具有：包含 SEQ ID NO. 17 所示氨基酸序列的重链可变区，包含 SEQ ID NO. 20 所示氨基酸序列的轻链可变

区。

11. 根据权利要求 5 至 10 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区和/或轻链恒定区；

优选地，所述抗体为双特异性抗体。

12. 一种组合物，其包含权利要求 1 或 2 所述的多肽、权利要求 3 所述的核酸分子或者权利要求 5 至 11 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

13. 权利要求 1 或 2 所述的多肽、权利要求 3 所述的核酸分子、权利要求 5 至 11 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求 12 所述的组合物在制备药物中的用途。

14. 一种抗 EGFR 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含如下所示的重链 CDRs（HCDR1、HCDR2 和 HCDR3）和轻链 CDRs（LCDR1、LCDR2 和 LCDR3）:

(1) 包含 SEQ ID NO. 30 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 31 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和，包含 SEQ ID NO. 33 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 34 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 35 所示氨基酸序列的 LCDR3;

(2) 包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 37 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和，包含 SEQ ID NO. 33 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 34 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 35 所示氨基酸序列的 LCDR3;

(3) 包含 SEQ ID NO. 30 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 43 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和，包含 SEQ ID NO. 33 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 34 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 35 所示氨基酸序列的 LCDR3;

(4) 包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 37 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 32 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和，包含 SEQ ID NO. 33 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 34 所

示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 35 所示氨基酸序列的 LCDR3。

15. 一种抗 c-Met 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含如下所示的重链 CDRs（HCDR1、HCDR2 和 HCDR3）和轻链 CDRs（LCDR1、LCDR2 和 LCDR3）:

包含 SEQ ID NO. 36 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO. 38 所示氨基酸序列的 HCDR2，包含 SEQ ID NO. 39 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和，包含 SEQ ID NO. 40 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO. 41 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO. 42 所示氨基酸序列的 LCDR3。