



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119013297 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 22

(21) 申请号 202380031407.8

(22) 申请日 2023.03.31

(66) 本国优先权数据

202210345737.1 2022.04.02 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/085417 2023.03.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/186078 ZH 2023.10.05

(71) 申请人 普米斯生物技术(珠海)有限公司

地址 519080 广东省珠海市香洲区唐家湾
镇科技七路1号4栋10-B单元

(72) 发明人 吴凡 缪小牛 罗羿 王平

赵振廷

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 孔熹

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) 发明名称

针对c-Met的抗体及其用途

(57) 摘要

本申请涉及一种能够特异性结合c-Met的抗体或其抗原结合片段,以及包含其的免疫缀合物、药物组合物和试剂盒,本申请还涉及抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒或药物中的用途。所述抗体与表达或过表达c-Met的细胞具有较高的亲和力,还具有一定的热稳定性。并且,所述抗体能够抑制HGF-c-Met信号通路,从而使癌细胞凋亡,并抑制癌细胞的增殖,在肿瘤的靶向治疗中具有较大的应用潜能。

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023年10月5日 (05.10.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/186078 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/085417

(22) 国际申请日: 2023年3月31日 (31.03.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210345737.1 2022年4月2日 (02.04.2022) CN

(71) 申请人: 普米斯生物技术(珠海)有限公司(BIOTHEUS INC.) [CN/CN]; 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。

(72) 发明人: 吴凡(WU, Fan); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 缪小牛(MIAO, Xiaoni); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 罗羿(LUO, Yi); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 王平(WANG, Ping); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 赵振廷(ZHAO, Zhenting); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。

(74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务所有限公司(CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市西城区复兴门内大街158号远洋大厦F10层, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: ANTIBODY AGAINST C-MET AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 针对c-Met的抗体及其用途

(57) Abstract: The present application relates to an antibody capable of specifically binding to c-Met or an antigen-binding fragment thereof, and an immunoconjugate, a pharmaceutical composition and a kit comprising same. The present application also relates to use of the antibody or the antigen-binding fragment thereof in the preparation of the kit or a drug. The antibody has a relatively high affinity for cells expressing or overexpressing c-Met, and also has some thermal stability. Moreover, the antibody can inhibit the HGF-c-Met signal pathway, thereby causing cancer cells to undergo apoptosis and thus inhibiting the proliferation of cancer cells. The antibody has great potential for application in targeted therapy for tumors.

(57) 摘要: 本申请涉及一种能够特异性结合c-Met的抗体或其抗原结合片段, 以及包含其的免疫缀合物、药物组合物和试剂盒, 本申请还涉及抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒或药物中的用途。所述抗体与表达或过表达c-Met的细胞具有较高的亲和力, 还具有一定的热稳定性。并且, 所述抗体能够抑制HGF-c-Met信号通路, 从而使癌细胞凋亡, 并抑制癌细胞的增殖, 在肿瘤的靶向治疗中具有较大的应用潜能。



WO 2023/186078 A1

发明名称：针对c-Met的抗体及其用途

技术领域

[0001] 本申请属于生物医药技术领域，更具体地，本申请涉及能够特异性结合c-Met的抗体或其抗原结合片段，以及包含其的免疫缀合物、药物组合物和试剂盒，本申请还涉及所述抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒或药物中的用途。

背景技术

[0002] c-Met蛋白是一种受体酪氨酸激酶，从170kDa的前导蛋白经过翻译后修饰，转化为50kDa大小的 α 亚基，及145kDa的 β 亚基。通过二硫键连接后形成跨膜二聚体。目前c-Met已知的主要配体是肝细胞生长因子(HGF)。在接受HGF刺激后，c-Met胞内端的酪氨酸位Y1234，Y1235自行磷酸化，随后传递于Y1349和Y1356的磷酸，使得c-Met胞内端与框架因子结合。c-Met下游的信号激活通路包括PI3K/Akt，Rac1/Cdc42以及Erk/MAPK等，可显著影响细胞增值、迁移、浸润、管组织生成等相关表征。在c-Met蛋白自身磷酸化激活后，Cbl泛素连接酶启动此蛋白的泛素化，并随之进入降解过程。对c-Met通路进行负调控。

[0003] 研究表明，c-Met能够促进癌症生长，在多种肿瘤组织中高表达。而这使其成为抗癌药物开发的靶标。除传统的RTK小分子抑制剂以外，大分子靶向抗体的药物研发逐步推进并深入到临床研究。例如，抗c-Met单克隆抗体MetMab。也有例如TR1801的ADC分子，借助微管蛋白毒素tesirine，对MET低丰度，中等丰度，高丰度表达的小鼠肿瘤PDX模型均有效果。

[0004] 因此，需要开发一种新的抗c-Met单克隆抗体，以及其对应的人源化抗体，以提高亲和力，方便生产。

[0005] 发明内容

[0006] 本申请的发明人经过大量实验和反复摸索，提供了能够特异性结合c-Met的抗体或其抗原结合片段，所述抗体与表达或过表达c-Met的细胞具有较高的亲和力，还具有一定的热稳定性。并且，所述抗体能够抑制HGF-c-Met信号通路，从而使癌细胞凋亡，并抑制癌细胞的增殖。

[0007] 因此，在第一方面，本申请提供了一种能够特异性结合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：

[0008] (a) 包含下述3个互补决定区(CDRs)的重链可变区(VH)：

[0009] (i) VH CDR1，其由SEQ ID NO:19、21、23、25、27、29、31、33或35任一项所示的序列组成，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列，

[0010] (ii) VH CDR2，其由SEQ ID NO:37、39、41、43、45、47、49、51或53任一项所示的序列组成，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列，和

[0011] (iii) VH CDR3，其由SEQ ID NO:55、57、59、61、63、65、67、69或71任一项所示的序列组成，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列；

[0012] 和/或，

[0013] (b) 包含下述3个互补决定区(CDRs)的轻链可变区(VL)：

[0014] (iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO:20、22、24、26、28、30、32、34或36，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列，

[0015] (v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO:38、40、42、44、46、48、50、52或54，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列，和

[0016] (vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO:56、58、60、62、64、66、68、70或72，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列。

[0017] 在某些实施方案中，(i)-(vi)中任一项所述的置换为保守置换。

[0018] 在某些实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的CDR根据Kabat、IMGT或Chothia编号系统定义。

[0019] 在某些实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的CDR根据IMGT编号系统定义。

- [0020] 在某些实施方案中，如前所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：如下3个重链CDRs：如SEQ ID NO:19所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:37所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:55所示的VH CDR3；和/或，如下3个轻链CDRs：如SEQ ID NO:20所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:38所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:56所示的VL CDR3。
- [0021] 在某些实施方案中，如前所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：如下3个重链CDRs：如SEQ ID NO:21所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:39所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:57所示的VH CDR3；和/或，如下3个轻链CDRs：如SEQ ID NO:22所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:40所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:58所示的VL CDR3。
- [0022] 在某些实施方案中，如前所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：如下3个重链CDRs：如SEQ ID NO:23所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:41所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:59所示的VH CDR3；和/或，如下3个轻链CDRs：如SEQ ID NO:24所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:42所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:60所示的VL CDR3。
- [0023] 在某些实施方案中，如前所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：如下3个重链CDRs：如SEQ ID NO:25所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:43所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:61所示的VH CDR3；和/或，如下3个轻链CDRs：如SEQ ID NO:26所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:44所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:62所示的VL CDR3。
- [0024] 在某些实施方案中，如前所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：如SEQ ID NO:27所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:45所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:63所示的VH CDR3；和/或，如下3个轻链CDRs：如SEQ ID NO:28所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:46所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:64所示的VL CDR3。
- [0025] 在某些实施方案中，如前所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：如下3个重链CDRs：如SEQ ID NO:29所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:47所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:65所示的VH CDR3；和/或，如下3个轻链CDRs：如SEQ ID NO:30所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:48所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:66所示的VL CDR3。
- [0026] 在某些实施方案中，如前所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：如下3个重链CDRs：如SEQ ID NO:31所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:49所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:67所示的VH CDR3；和/或，如下3个轻链CDRs：如SEQ ID NO:32

所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:50所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:68所示的VL CDR3。

[0027] 在某些实施方案中，如前所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：如下3个重链CDRs：如SEQ ID NO:33所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:51所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:69所示的VH CDR3；和/或，如下3个轻链CDRs：如SEQ ID NO:34所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:52所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:70所示的VL CDR3。

[0028] 在某些实施方案中，如前所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：如下3个重链CDRs：如SEQ ID NO:35所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:53所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:71所示的VH CDR3；和/或，如下3个轻链CDRs：如SEQ ID NO:36所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:54所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:72所示的VL CDR3。

[0029] 在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段进一步包含人免疫球蛋白的框架区。

[0030] 在某些实施方案中，如前所述的抗体或其抗原结合片段包含：

[0031] (a) 重链可变区 (VH)，其包含选自下列的氨基酸序列：

[0032] (i) SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15或17任一项所示的序列；

[0033] (ii) 与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15或17任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个，3个，4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列；或

[0034] (iii) 与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15或17任一项所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%的序列同一性的序列；

[0035] 和/或

[0036] (b) 轻链可变区 (VL)，其包含选自下列的氨基酸序列：

[0037] (iv) SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16或18所示的序列；

[0038] (v) 与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16或18所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个，3个，4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列；或

- [0039] (vi)与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16或18所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%的序列同一性的序列。
- [0040] 在某些实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。
- [0041] 在某些实施方案中，如前所述抗体或其抗原结合片段包含：具有如SEQ ID NO:1所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:2所示的序列的VL。
- [0042] 在某些实施方案中，如前所述抗体或其抗原结合片段包含：具有如SEQ ID NO:3所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:4所示的序列的VL。
- [0043] 在某些实施方案中，如前所述抗体或其抗原结合片段包含：具有如SEQ ID NO:5所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:6所示的序列的VL。
- [0044] 在某些实施方案中，如前所述抗体或其抗原结合片段包含：具有如SEQ ID NO:7所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:8所示的序列的VL。
- [0045] 在某些实施方案中，如前所述抗体或其抗原结合片段包含：具有如SEQ ID NO:9所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:10所示的序列的VL。
- [0046] 在某些实施方案中，如前所述抗体或其抗原结合片段包含：具有如SEQ ID NO:11所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:12所示的序列的VL。
- [0047] 在某些实施方案中，如前所述抗体或其抗原结合片段包含：具有如SEQ ID NO:13所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:14所示的序列的VL。
- [0048] 在某些实施方案中，如前所述抗体或其抗原结合片段包含：具有如SEQ ID NO:15所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:16所示的序列的VL。
- [0049] 在某些实施方案中，如前所述抗体或其抗原结合片段包含：具有如SEQ ID NO:17所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:18所示的序列的VL。
- [0050] 在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：
- [0051] (a)人免疫球蛋白的重链恒定区(CH)或其变体，所述变体与其所源自的序列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(例如，至多20个、至多15个、至多10个、或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；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)；和/或

- [0052] (b) 人免疫球蛋白的轻链恒定区(CL)或其变体,所述变体与其所源自的序列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(例如,至多20个、至多15个、至多10个、或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合;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)。
- [0053] 在某些实施方案中,所述重链恒定区是IgG重链恒定区,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链恒定区。
- [0054] 在某些实施方案中,所述轻链恒定区是 κ 轻链恒定区或 λ 轻链恒定区。
- [0055] 在某些实施方案中,所述重链恒定区具有如SEQ ID NO:121所示的序列。
- [0056] 在某些实施方案中,所述轻链恒定区具有如SEQ ID NO:122所示的序列。
- [0057] 在某些实施方案中,如前所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、(Fab')²、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、双抗体(diabody)和单域抗体(sdAb)。
- [0058] 在某些实施方案中,所述抗体为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或多特异性抗体。
- [0059] 在某些实施方案中,所述抗原结合片段为Fab。
- [0060] 在某些实施方案中,所述抗原结合片段还包含Fc片段(例如,人IgG1的Fc片段)或其突变体。
- [0061] 在某些实施方案中,所述Fc片段具有LALA突变和knob突变;或者,所述Fc片段具有LALA突变和hole突变。
- [0062] 在某些实施方案中,所述Fc片段具有如SEQ ID NO:111或112所示的序列。
- [0063] 在另一方面,本申请提供了分离的核酸分子,其编码如前所述的抗体或其抗原结合片段。
- [0064] 在另一方面,本申请提供了载体,其包含如前所述的核酸分子。在某些实施方案中,所述载体为克隆载体或表达载体。
- [0065] 在另一方面,本申请提供了宿主细胞,其包含如前所述的核酸分子或如前所述的载体。在某些实施方案中,所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

- [0066] 在另一方面，本申请提供了制备如前所述的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养如前所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。
- [0067] 在另一方面，本申请提供了多特异性分子，其包含如前所述的抗体或其抗原结合片段。
- [0068] 在某些实施方案中，所述多特异性分子特异性结合c-Met，并且额外地特异性结合一个或多个其他靶标。
- [0069] 在某些实施方案中，所述多特异性分子是双特异性分子。
- [0070] 在某些实施方案中，所述双特异性分子还包含一种具有针对第二靶标的第二结合特异性的分子(例如第二抗体)。
- [0071] 在另一方面，本申请提供了免疫缀合物，其包含如前所述的抗体或其抗原结合片段或如前所述的多特异性分子，以及连接于所述抗体或其抗原结合片段或多特异性分子的治疗剂。
- [0072] 在某些实施方案中，所述治疗剂选自细胞毒剂。
- [0073] 在某些实施方案中，所述治疗剂选自烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂，及其任意组合。
- [0074] 在某些实施方案中，所述免疫缀合物是抗体-药物偶联物(ADC)。
- [0075] 在另一方面，本申请提供了药物组合物，其包含如前所述的抗体或其抗原结合片段，或如前所述的多特异性分子或者如前所述的免疫缀合物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。
- [0076] 在某些实施方案中，药物组合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，所述抗体或其抗原结合片段、多特异性分子或免疫缀合物与所述另外的药学活性剂作为分离的组分或作为同一组合物的组分提供。

[0079] 在另一方面，本申请提供了试剂盒，其含有如前所述的抗体或其抗原结合片段。

[0080] 在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶）、放射性核素、荧光染料、发光物质（如化学发光物质）或生物素。

[0081] 在某些实施方案中，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别如前所述的抗体或其抗原结合片段。

[0082] 在某些实施方案中，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶）、放射性核素、荧光染料、发光物质（如化学发光物质）或生物素。

[0083] 在另一方面，本申请提供了嵌合抗原受体，其包含如前所述的抗体或其抗原结合片段的抗原结合结构域。

[0084] 在某些实施方案中，所述抗原结合结构域包含如前所述的抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区。

[0085] 在某些实施方案中，所述抗原结合结构域是scFv。

[0086] 在某些实施方案中，所述嵌合抗原受体由免疫效应细胞（例如T细胞）所表达。

[0087] 在另一方面，本申请提供了一种抑制表达c-Met的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞的方法，其包括将所述肿瘤细胞与有效量的如前所述的抗体或其抗原结合片段，或如前所述的多特异性分子，或如前所述的免疫缀合物，或如前所述的药物组合物，或如前所述的嵌合抗原受体接触。

[0088] 在另一方面，本申请提供了一种如前所述的抗体或其抗原结合片段，或如前所述的多特异性分子，或如前所述的免疫缀合物，或如前所述的药物组合物，或如前所述的嵌合抗原受体，在制备药物中的用途，所述药物用于在受试者（例如人）中预防和/治疗肿瘤。

[0089] 在某些实施方案中，药物还包含另外的药学活性剂。

[0090] 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。

- [0091] 在某些实施方案中，所述肿瘤表达c-Met。
- [0092] 在某些实施方案中，所述肿瘤涉及c-Met的肿瘤细胞。在某些实施方案中，所述c-Met在所述肿瘤细胞表面上表达。
- [0093] 在某些实施方案中，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿(mycosis fungoides)、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤(CHL)、原发性纵膈大B细胞淋巴瘤、T细胞/组织细胞的富B细胞淋巴瘤、EBV阳性和阴性PTLD和EBV相关弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、浆母细胞性淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌和HHV8相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统(CNS)肿瘤，例如原发性CNS淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤。
- [0094] 在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。
- [0095] 如前所述的抗体或其抗原结合片段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c-Met的抗肿瘤疗法来治疗。
- [0096] (1) 将含有所述肿瘤细胞的样品与如前所述的抗体或其抗原结合片段接触；
- [0097] (2) 检测所述抗体或其抗原结合片段与c-Met之间复合物的形成。
- [0098] 在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记。
- [0099] 在某些实施方案中，所述c-Met是哺乳动物(例如，人，猴)的c-Met。
- [0100] 在某些实施方案中，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿(mycosis fungoides)、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤(CHL)、原发性纵膈大B细胞淋巴瘤、T细胞/组织细胞的富B细胞淋巴瘤、EBV阳性和阴性PTLD和EBV相关弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、浆母细胞性淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌和HHV8相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统(CNS)肿瘤，例如原发性CNS淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤。

- [0101] 在另一方面，本申请提供了一种用于在受试者中预防和/或治疗肿瘤的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的如前所述的抗体或其抗原结合片段，或如前所述的双特异性或多特异性分子，或如前所述的免疫缀合物，或如前所述的药物组合物，或如前所述的嵌合抗原受体，或如前所述的宿主细胞。
- [0102] 在某些实施方案中，所述肿瘤表达c-Met。
- [0103] 在某些实施方案中，所述肿瘤涉及表达c-Met的肿瘤细胞。在某些实施方案中，所述c-Met在所述肿瘤细胞表面上表达。
- [0104] 在某些实施方案中，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿(mycosis fungoides)、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤(CHL)、原发性纵膈大B细胞淋巴瘤、T细胞/组织细胞的富B细胞淋巴瘤、EBV阳性和阴性PTLD和EBV相关弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、浆母细胞性淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌和HHV8相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统(CNS)肿瘤，例如原发性CNS淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤。
- [0105] 在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。
- [0106] 在某些实施方案中，所述方法还包括施用另外的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。
- [0107] 在某些实施方案中，所述方法还包括施用另外的抗肿瘤疗法，例如手术、化学治疗、放射治疗、靶向治疗、免疫治疗、激素治疗、基因治疗或姑息治疗。
- [0108] 在另一方面，本申请提供了一种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，其包括以下步骤：
- [0109] (1)将含有所述肿瘤细胞的样品与如前所述的抗体或其抗原结合片段接触；
- [0110] (2)检测所述抗体或其抗原结合片段与c-Met之间复合物的形成。

- [0111] 在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记。
- [0112] 在某些实施方案中，所述c-Met是哺乳动物(例如，人，猴)的c-Met。
- [0113] 在某些实施方案中，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿(mycosis fungoides)、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤(CHL)、原发性纵膈大B细胞淋巴瘤、T细胞/组织细胞的富B细胞淋巴瘤、EBV阳性和阴性PTLD和EBV相关弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、浆母细胞性淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌和HHV8相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统(CNS)肿瘤，例如原发性CNS淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤。
- [0114] 在另一方面，本申请提供了一种检测c-Met在样品中的存在或其量的方法，其包括以下步骤：
- [0115] (1)将所述样品与如前所述的抗体或其抗原结合片段接触；
- [0116] (2)检测所述抗体或其抗原结合片段与c-Met之间复合物的形成或检测所述复合物的量。
- [0117] 在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记。
- [0118] 在某些实施方案中，所述c-Met是哺乳动物(例如，人，猴)的c-Met。
- [0119] 术语定义
- [0120] 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，本文中所用的分子遗传学、核酸化学、化学、分子生物学、生物化学、细胞培养、微生物学、细胞生物学、基因组学和重组DNA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。
- [0121] 如本文中所使用的，术语“抗体”是指，通常由两对多肽链(每对具有一条轻链(LC)和一条重链(HC))组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ (kappa)和 λ (lambda)轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通

过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由3个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，如可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH和VL区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各VH和VL由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对的可变区(VH和VL)分别形成抗原结合部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或Chothia&Lesk(1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人(1989) Nature 342:878-883的定义。

[0122] 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。在重链和轻链的可变区中各含有三个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)。

- [0123] 在本发明中，本发明的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，本发明的抗体或其抗原结合片段含有的CDR优选地通过Kabat、Chothia或IMGT编号系统确定。
- [0124] 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。
- [0125] 术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG(例如，IgG1, IgG2, IgG3或IgG4亚型)，IgA1, IgA2, IgD, IgE或IgM抗体。
- [0126] 如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”、“单抗”、“mAb”具有相同的含义且可互换使用可互换，其是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即，除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少2种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。此外，修饰语“单克隆”仅表明该抗体的特征为从高度同源的抗体群中获得，不能理解为需要通过任何特定方法来制备所述抗体。
- [0127] 本发明的单克隆抗体可以通过多种技术进行制备，例如杂交瘤技术(参见，例如Kohler等人，Nature, 256:495, 1975)，重组DNA技术(参见，例如美国专利申请4,816,567)，或噬菌体抗体库技术(参见，例如Clackson等. Nature352: 624-628, 1991，或Marks等. J. Mol. Biol. 222: 581-597, 1991)。
- [0128] 如本文中所使用的，术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽，其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与全长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技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。抗原结合片段的非限制性实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、互补决定区(CDR)片段、scFv、双抗体(diabody)、单域抗体(single domain antibody)、嵌合抗体、线性抗体(linear antibody)、纳米抗体(技术来自Domantis)、probody和

这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。工程改造的抗体变体综述于Holliger等, 2005; *Nat Biotechnol*, 23:1126-1136中。

[0129] 如本文中所使用的，术语“全长抗体”意指，由两条“全长重链”和两条“全长轻链”组成的抗体。其中，“全长重链”是指这样的多肽链，其在N端到C端的方向上由重链可变区(VH)、重链恒定区CH1结构域、铰链区(HR)、重链恒定区CH2结构域、重链恒定区CH3结构域组成；并且，当所述全长抗体为IgE同种型时，任选地还包括重链恒定区CH4结构域。优选地，“全长重链”是在N端到C端方向上由VH、CH1、HR、CH2和CH3组成的多肽链。“全长轻链”是在N端到C端方向上由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成的多肽链。两对全长抗体链通过在CL和CH1之间的二硫键和两条全长重链的HR之间的二硫键连接在一起。本发明的全长抗体可以来自单一物种，例如人；也可以是嵌合抗体或人源化抗体。本发明的全长抗体包含分别由VH和VL对形成的两个抗原结合部位，这两个抗原结合部位特异性识别/结合相同的抗原。

[0130] 如本文中所使用的，术语“Fd”意指由VH和CH1结构域组成的抗体片段；术语“dAb片段”意指由VH结构域组成的抗体片段(Ward等人, *Nature* 341:544-546(1989))；术语“Fab片段”意指由VL、VH、CL和CH1结构域组成的抗体片段；术语“F(ab')²片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的抗体片段；术语“Fab'片段”意指还原连接F(ab')²片段中两个重链片段的二硫键后所获片段，由一条完整的轻链和重链的Fd片段(由VH和CH1结构域组成)组成。

[0131] 如本文中所使用的，术语“Fv”意指由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的抗体片段。Fv片段通常被认为是，能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为，六个CDR赋予抗体的抗原结合特异性。然而，即便是一个可变区(例如Fd片段，其仅仅含有三个对抗原特异的CDR)也能够识别并结合抗原，尽管其亲和力可能低于完整的结合位点。

[0132] 如本文中所使用的，术语“Fc”意指，由抗体的第一重链的第二、第三恒定区与第二重链的第二、第三恒定区经二硫键结合而形成的抗体片段。抗体的Fc片段具有多种不同的功能，但不参与抗原的结合。

[0133] 如本文中所使用的，术语“scFv”是指，包含VL和VH结构域的单个多肽链，其中所述VL和VH通过接头(linker)相连(参见，例如，Bird等人，*Science* 242:423-426(1988)；Huston等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883(1988)；和Pluckthun，*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第113卷，Roseburg和Moore编，Springer-Verlag，纽约，第269-315页(1994))。此类scFv分子可具有一般结构：NH₂-VL-接头-VH-COOH或NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄的接头，但也可使用其变体(Holliger等人(1993)，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448)。可用于本发明的其他接头由Alfthan等人(1995)，*Protein Eng.* 8:725-731，Choi等人(2001)，*Eur. J. Immunol.* 31:94-106，Hu等人(1996)，*Cancer Res.* 56:3055-3061，Kipriyanov等人(1999)，*J. Mol. Biol.* 293:41-56和Roovers等人(2001)，*Cancer Immunol.* 描述。在一些情况下，scFv的VH与VL之间还可以存在二硫键。在本发明的某些实施方案中，scFv可形成di-scFv，其指的是两个或两个以上单个scFv串联而形成抗体。在本发明的某些实施方案中，scFv可形成(scFv)₂，其指的是两个或两个以上单个scFv并联而形成抗体。

[0134] 如本文中所使用的，术语“单域抗体(single-domain antibody, sdAb)”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，其保持特异性结合全长抗体所结合的共同抗原的能力。单域抗体也称为纳米抗体(nanobody)。

[0135] 上述各个抗体片段均保持了特异性结合全长抗体所结合的共同抗原的能力，和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合。

[0136] 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)从给定的抗体(例如本发明提供的抗体)获得抗体的抗原结合片段(例如，

上述抗体片段)，并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

[0137] 在本文中，除非上下文明确指出，否则当提及术语“抗体”时，其不仅包括完整抗体，而且包括抗体的抗原结合片段。

[0138] 如本文中所使用的，术语“嵌合抗体(Chimeric antibody)”是指，这样的抗体，其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体(其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类)，且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体(其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类)，但无论如何，其仍保留对目标抗原的结合活性(U. S. P 4,816,567 to Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。在某些实施方案中，术语“嵌合抗体”可包括这样的抗体，其中抗体的重链和轻链可变区来自第一抗体，而抗体的重链和轻链恒定区来自第二抗体。

[0139] 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。

[0140] 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。用于两个序列的比較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。

[0141] 如本文中所使用的，术语“变体”，在多肽的情境中(包括多肽)也指包含已通过引入氨基酸残基置换、缺失或添加改变的氨基酸序列的多肽或肽。在某些情

况下，术语“变体”还指已被修饰(即，通过将任何类型的分子共价连接至多肽或肽)的多肽或肽。例如，但非限制性地，多肽可以被修饰，例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团进行的衍生化、蛋白水解切割、连接至细胞配体或其它蛋白质等。衍生多肽或肽可使用本领域技术人员已知的技术通过化学修饰来产生，所述技术包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外，变体具有与其所源自的多肽或肽相似、相同或改善的功能。

[0142] 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(KD)表示。在本发明中，术语“KD”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。

[0143] 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KD(参见Davies等人, Annual Rev Biochem, 1990; 59:439-473)。可用任何有效的方法测量KD、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。

[0144] 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， ^3H 、 ^{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

吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、钆衍生物如三联吡啶钆)、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合素(例如, 链霉亲和素)的生物素。

[0145] 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。

[0146] 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。

[0147] 如本文中所使用的, 术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如, 可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和PCR介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换, 例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质, 包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如, 赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极

性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如, 苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如, 酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此, 优选来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见, 例如, Brummell等人, *Biochem.* 32:1180-1187(1993); Kobayashi等人*Protein Eng.* 12(10):879-884(1999); 和Burks等人*Proc. Natl Acad. Set USA* 94:412-417(1997), 其通过引用并入本文)。

[0148] 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。

[0149] 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, 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), 醇和多元醇(如甘油)等。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂, 例如硫柳汞, 2-苯氧乙醇, 对羟苯甲酸酯, 三氯叔丁醇, 苯酚, 山梨酸等。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。

[0150] 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。

[0151] 如本文中所使用的，术语“受试者”是指哺乳动物，例如人、食蟹猴、小鼠。在某些实施方案中，所述受试者(例如人、食蟹猴、小鼠)患有与c-Met相关的疾病，或者，具有患有上述疾病的风险。

[0152] 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，预防疾病有效量是指，足以预防，阻止，或延迟所述疾病发生的量；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。

[0153] 如本文中所使用的，术语“单臂抗体”是指包含Fab段和Fc段的抗原结合片段，通常Fab段包含重链(例如，VH和CH1)以及轻链(例如，VL和CL)，Fc段包含恒定区(例如，CH2和CH3)。所述Fab段和Fc段可以通过接头或不通过接头连接。

本发明的单臂抗体可以通过多种方法进行制备或合成，例如，将编码Fab重链的序列和编码Fc的序列构建至同一载体中，并将编码Fab轻链的序列构建至另一载体中，将两种载体分别转化至宿主细胞中，以获得单臂抗体。

[0154] 如本文中所使用的，术语“双特异性抗体”是指其由第一抗体(或其片段)和第二抗体(或其片段)或抗体类似物通过偶联臂所形成的偶联物，偶联的方式包括但不限于化学反应、基因融合和酶促。双特异性抗体可通过各种方法连接或产生，例如参见Songsivilai等人的方法(Clin. Exp. Immunol., 79:315-321(1990))，以及Kostelny等人的方法(J. Immunol., 148:1547-1553(1992))。

[0155] 发明的有益效果

[0156] 与现有技术相比，本申请制备的抗体能够特异性结合c-Met的抗体或其抗原结合片段，进而特异性识别或结合表达c-Met的细胞。所述抗体与表达或过表达c-Met的细胞具有较高的亲和力，还具有一定的热稳定性。并且，所述抗体能够抑制HGF-c-Met信号通路，从而使癌细胞凋亡，并抑制癌细胞的增殖，在肿瘤的靶向治疗中具有较大的应用潜能。

[0157] 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

[0158] 图1显示了本申请实施例2中构建的抗体的结构示意图。

[0159] 图2显示了本申请的抗c-Met抗体和过表达c-Met的细胞的结合活性；其中，图2A和图2B为本申请抗体(抗体22、23、74、111、136、187、216、221、223)和对照抗体与HEK293-Hu c-Met细胞的结合活性；图2C和图2D为本申请抗体(抗体22、23、74、111、136、187、216、221、223)和对照抗体与HEK293-Rhec-Met细胞的结合活性。

[0160] 图3显示了本申请的抗c-Met抗体(抗体22、23、74、111、136、187、216、221、223)和对照抗体对HCC827细胞的抑制结果。

[0161] 图4显示了本申请的抗c-Met抗体(抗体136、187)和对照抗体对H596细胞的抑制结果。

[0162] 序列信息

[0163] 本发明涉及的部分序列的信息提供于下面的表1中。

[0164] 表1: 序列的描述

SEQ ID NO:	描述	序列
1	22-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTNYGISWVRQAP GQGLEWMGWISAYNGHTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCARDRRTGTSFFDYWGQGTLTVSS
2	22-VL	DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSKFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATY FCQQAYGFPLTFGGGTKVEIK
3	23-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAP GKGLEWVSVISGSGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM HSLRAEDTAVYYCAKVITFERGRTFDIWGQGTMTVTVSS
4	23-VL	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSFSDYLNWYRQKPGK APKLLLFAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY YCQQSYSPPYTFGQGTKLEIK
5	74-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQSP GKGLEWIGSIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCVRQVYDFWRDYGQGTTLTVSS
6	74-VL	DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINSWLAWYQQKPGK

		APNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFSLTISSLHPEDFATY YCQQAQGFPLTFGGGKTKVEIK
7	111-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASMKVSKASGNTFISYGINWVRQAP GQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSSAYM ELRNLRSDDTAVYYCATGDTTSSGYNYMDVWGKGTVT VSS
8	111-VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGSSPRTFGQGTKVDIK
9	136-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVTSVNYWVKWIRQ PPGKGLEWIGYISYSGNTNYPNLSKSRVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCVRAPYYMDVWSKGTVTVSS
10	136-VL	DIVMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAVSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY FCQQANSFPLTFGGGKTKVEIK
11	187-VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQSP GKGLEWIGSRYYSGNTYYNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLR SVTAADTAVYYCARQVYDYWRDWGQALVTVSS
12	187-VL	DIVMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGK APNLLIYAASNLPSPVPSRFSGSGSGTVFTLTISSLQPEDFATYY CQQSNSFPLTFGGGKTKVEIK
13	216-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRFLFCGASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQL NSLRAEDTAIYYCAKIVTVEAGRWLDPWGQGTMTVSS
14	216-VL	DIRMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIISNYLNWFQKPGKA PKLLIYATSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYSIPYTFGQGTKVEIK
15	221-VH	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAP GKGLEWVSVISGSGGSTYYEDSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKIVTVEAGRWLDPWGQGTMTVSS
16	221-VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGPSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPADFASY YCQQSYITPYTFGQGTKVEIK
17	223-VH	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGVGTYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQM NSLRVEDTAVYYCVRVMTVEFSRWLDPWGQGLTVTVSS
18	223-VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIITYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLNISLQPEDFATYY CQQANSLPYTFGQGTKVEIK
19	22-VH CDR1	GYTFTNYG
20	22-VL CDR1	QGISSW
21	23-VH CDR1	GFTFSSYA
22	23-VL CDR1	QSFSDY
23	74-VH CDR1	GGSISSSSYY

24	74-VL CDR1	QGINSW
25	111-VH CDR1	GNTFISYG
26	111-VL CDR1	QSVSSSY
27	136-VH CDR1	GGSVTSVNYY
28	136-VL CDR1	QGISSW
29	187-VH CDR1	GGSISSSSYY
30	187-VL CDR1	QGISSW
31	216-VH CDR1	GFTFSSYA
32	216-VL CDR1	QSIISNY
33	221-VH CDR1	GFTFSSYA
34	221-VL CDR1	QSVSSSY
35	223-VH CDR1	GFTFRNYA
36	223-VL CDR1	QSIITY
37	22-VH CDR2	ISAYNGHT
38	22-VL CDR2	AAS
39	23-VH CDR2	ISGSGGTT
40	23-VL CDR2	AAS
41	74-VH CDR2	IYYSGNT
42	74-VL CDR2	AAS
43	111-VH CDR2	ISAYNGNT
44	111-VL CDR2	GAF
45	136-VH CDR2	ISYSGNT
46	136-VL CDR2	AVS
47	187-VH CDR2	RYYSNT
48	187-VL CDR2	AAS
49	216-VH CDR2	ITGSGGST
50	216-VL CDR2	ATS
51	221-VH CDR2	ISGSGGST
52	221-VL CDR2	GPS
53	223-VH CDR2	ISGSGVGT
54	223-VL CDR2	AAS
55	22-VH CDR3	ARDRRTGTSFFDY
56	22-VL CDR3	QQAYGFPLT
57	23-VH CDR3	AKVITFERGRTFDI
58	23-VL CDR3	QQSYSPPYT
59	74-VH CDR3	VRQVYDFWRD
60	74-VL CDR3	QQAKGFPLT
61	111-VH CDR3	ATGDTTSSGYYNYYMDV
62	111-VL CDR3	QQYGSSPRT
63	136-VH CDR3	VRAPYYMDV
64	136-VL CDR3	QQANSFPLT
65	187-VH CDR3	ARQVYDYWRD
66	187-VL CDR3	QQSNSFPLT

67	216-VH CDR3	AKIVTVEAGRWLDP
68	216-VL CDR3	QQSYSIPYT
69	221-VH CDR3	AKVITFERGRTFDI
70	221-VL CDR3	QQSYITPYT
71	223-VH CDR3	VRVMTVEFSRWLDP
72	223-VL CDR3	QQANSLPYT
73	重链上游引物 1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG
74	重链上游引物 2	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG
75	重链上游引物 3	CCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAG
76	重链上游引物 4	CAAGGAGTCTGTCCGAGGTGCAG
77	重链下游引物 1	TGAGCAGCAGAACCTGGAGCCAAGGGATAGACAGATGGG GCTGTTGT
78	重链下游引物 2	TGAGCAGCAGAACCTGGAGCCAGTGGATAGACAGATGGG GCTGTTGT
79	轻链上游引物 1	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG
80	轻链上游引物 2	CTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG
81	轻链上游引物 3	ATTCTCTGTGTGCTCTGGATCTCTG
82	轻链下游引物 1	TGTTCAGAAGATGGTGGGAAGATAGATACAGTTGGTGCAG CATCAGC
83	重链上游引物 5	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGT GCAGCTGGTGCAG
84	重链上游引物 6	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGAGAGGT GCAGCTGGTGCAG
85	重链上游引物 7	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGAGAGGT GCAGCTGGTGGAG
86	重链上游引物 8	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGAGAGGT GCAGCTGTTGGAG
87	重链上游引物 9	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGT GCAGCTGCAGGAG
88	重链上游引物 10	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGT GCAGCTACAGCAGTG
89	重链上游引物 11	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGT TCAGCTGGTGCAG
90	重链上游引物 12	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGT CCAGCTGGTACAG
91	重链上游引物 13	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGT GCAGCTGGTGGAG
92	重链上游引物 14	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGAGAAGT GCAGCTGGTGGAG
93	重链上游引物 15	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGCT GCAGCTGCAGGAG
94	重链上游引物 16	GAGAAGCTGTTGCTGAAGCTTCTTTGGACAAGAGACAGGT ACAGCTGCAGCAG

95	重链下游引物 3	GCCAGGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGCTAGCTGAG GAGACGGTGACCAG
96	重链下游引物 4	GCCAGGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGCTAGCTGAA GAGACGGTGACCATTG
97	重链下游引物 5	GCCAGGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGCTAGCTGAG GAGACGGTGACCGTG
98	轻链上游引物 4	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCCGACATCCAGA TGACCCAGTC
99	轻链上游引物 5	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCCGACATCCAGT TGACCCAGTCT
100	轻链上游引物 6	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCCGATATCCGGAT GACCCAGTC
101	轻链上游引物 7	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCCGATATTGTGAT GACCCAGAC
102	轻链上游引物 8	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCCGATATTGTGAT GACTCAGTC
103	轻链上游引物 9	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCCGATGTTGTGA TGACTCAGTC
104	轻链上游引物 10	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCCGAAATTGTGT TGACACAGTC
105	轻链上游引物 11	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCCGAAATAGTGAT GACGCAGTC
106	轻链上游引物 12	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCCGAAATTGTGT TGACGCAGTCT
107	轻链上游引物 13	CCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCCGACATCGTGA TGACCCAGTC
108	轻链下游引物 2	GGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGAT YTCCACCTTGGTC
109	轻链下游引物 3	GGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGAT CTCCAGCTTGGTC
110	轻链下游引物 4	GGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTTGAT ATCCACTTGGTC
111	人 IgG1-Fc (LALA 突变, knob 突变)	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
112	Fc-LALA-hole	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG

113	单臂抗体 Amivantamab 的 Knob 重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAP GHGLEWMGWISAYNGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYM ELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGGQTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
114	单臂抗体 Amivantamab 的轻链	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISNWLAWFQHKPGK APKLLIYAASSLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQANSEFITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
115	单臂抗体 Amivantamab 和抗体 onartuzumab 的 Hole 重链	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
116	单臂抗体 LY2875358Kon b 重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYYMHWVRQA PGQGLEWMGRVNPNNRRGTTYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCARANWLDYWGQGTITVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
117	单臂抗体 LY2875358 的轻 链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICSVSSSVSSIYLHWYQQKPGK APKLLIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQVYSGYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
118	单臂抗体 LY2875358Hole 重链	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA

		LHNHYTQKSLSLSPG
119	抗体 onartuzumab 的 Knob 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAP GKGLEWVGMIDPSNSDTRFNPFKDRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
120	抗体 onartuzumab 的 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQ QKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
121	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSC
122	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

具体实施方式

[0165] 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。

[0166] 除非特别指明, 否则基本上按照本领域内熟知的以及在各种参考文献中描述的常规方法进行实施例中描述的实验和方法。例如, 本发明中所使用的免疫学、生物化学、化学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、基因组学和重组DNA等常规技术, 可参见萨姆布鲁克(Sambrook)、弗里奇(Fritsch)和马尼亚蒂斯(Maniatis), 《分子克隆: 实验室手册》(MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL), 第2次编辑(1989); 《当代分子生物学实验手册》(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)(F. M. 奥苏贝尔(F. M. Ausubel)等人编辑, (1987)); 《酶学方法》(METHODS IN ENZYMOLOGY)系列(学术出版公

司): 《PCR 2: 实用方法》(PCR 2:A PRACTICAL APPROACH) (M. J. 麦克弗森 (M. J. MacPherson)、B. D. 黑姆斯 (B. D. Hames) 和 G. R. 泰勒 (G. R. Taylor) 编辑 (1995)), 以及《动物细胞培养》(ANIMAL CELL CULTURE) (R. I. 弗雷谢尼 (R. I. Freshney) 编辑 (1987))。

[0167] 另外, 实施例未注明具体条件者, 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。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。本文中提及的全部公开案和其他参考资料以其全文通过引用合并入本文。

[0168] 实施例1. 抗c-Met抗体筛选

[0169] 1.1. 抗体文库的构建

[0170] 动物免疫

[0171] 将1 mg间质表皮转化因子 (cellular mesenchymal epithelial transition factor, c-Met) 抗原 (购自AcroBiosystems) 与弗氏佐剂等体积混合, 免疫5只全人源化小鼠 (购自Alloy公司), 每周一次, 共免疫4次, 刺激B细胞表达抗原特异性的抗体。4次免疫结束后, 取小鼠脾脏, 采用RNA提取试剂Trizol (购自Invitrogen) 提取总RNA。使用cDNA合成试剂盒 (购自Invitrogen) 反转录获得全人源化小鼠总cDNA。

[0172] 抗体基因扩增

[0173] 第一轮PCR: 利用如表1中所示的重链上游引物1-4 (SEQ ID NO:73至SEQ ID NO:76) 和重链下游引物1-2 (SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78), 以及轻链上游引物1-3 (SEQ ID NO:79至SEQ ID NO:81) 和轻链下游引物1 (SEQ ID NO:82), 从cDNA中扩增出全人源化抗体重、轻链可变区序列。

[0174] 上述PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳, 确定条带大小和单一性, 目的片段在400bp~500bp处。

[0175] 第二轮PCR: 利用如表1中所示的重链上游引物5-16 (SEQ ID NO:83至SEQ ID NO:94) 和重链下游引物3-5 (SEQ ID NO:95至SEQ ID NO:97), 以及轻链上游引物4-13 (SEQ ID NO:98至SEQ ID NO:107) 和轻链下游引物2-4 (SEQ ID NO:108至SEQ

ID NO:110), 以第一轮PCR产物为模板进行第二轮序列扩增, 为重轻链基因加上同源臂。

[0176] 利用PCR纯化试剂盒(购自QIAGEN)回收目的片段。

[0177] 文库构建

[0178] 将线性化的酵母展示载体和第二轮的PCR产物混合后电转化入酿酒酵母(购自ATCC)中, 构建来自五只动物的抗c-Met全人源抗体文库, 并测定库容, 库容大小为 3×10^7 。

[0179] 1.2. c-Met抗体的筛选

[0180] c-Met蛋白的生物素化标记

[0181] 取适量体积的双蒸水溶解人c-Met蛋白(购自AcroBiosystems), 按照生物素标记试剂盒(购自Thermo)产品说明书, 将生物素溶解后与蛋白溶液混合, 于4℃孵育2小时。用脱盐柱(购自Thermo)去除多余的生物素, 脱盐柱预处理及样品收集操作均参考产品说明书步骤进行。

[0182] 磁珠分选(MACS)富集能与人c-Met特异性结合的酵母

[0183] 将实施例1.1中构建的抗体文库接种于SD-CAA扩增培养基(1L SD-CAA扩增培养基中含6.7g YNB、5g酪氨酸、13.62g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、7.44g NaH_2PO_4 和2%葡萄糖)中, 30℃, 225rpm培养过夜。取适量酵母细胞, 3000rpm×5min离心(以下离心操作均同此)去除培养基, 用SD-CAA诱导培养基重悬酵母细胞, 诱导过夜。测定诱导后的文库浓度, 取适量酵母细胞, 离心去除培养基。用50ml PBS重悬酵母细胞, 离心去除上清。用10ml PBS重悬酵母细胞。

[0184] 加入生物素标记的人c-Met蛋白(终浓度100nM), 室温孵育30min, 离心收集酵母细胞, 并用50ml PBS洗涤酵母3遍。用5ml清洗液重悬酵母细胞, 并加入200 μl SA磁珠(购自美天旋), 颠倒孵育10min。用PBS洗涤酵母和磁珠混合物3遍, 将混合物加入LS纯化柱(购自美天旋)中。将LS纯化柱放在磁力架上, 用PBS洗涤去除非特异性结合的酵母细胞。将纯化柱从磁力架上取出, 加入PBS洗脱酵母。洗脱下来的酵母离心后转入SD-CAA扩增培养基中进行扩增。

[0185] 流式细胞分选(FACS)获得高亲和力酵母细胞

[0186] 将经过MACS富集的酵母细胞接种于SD-CAA扩增培养基中。30℃，225rpm摇瓶培养过夜。用SD-CAA诱导培养基重悬酵母细胞，诱导过夜。加入抗-c-Myc鼠源抗体(购自Thermo)和100nM生物素标记的c-Met抗原，孵育10min。加入PBS清洗酵母3遍，加入羊抗小鼠IgG(H+L)Alexa Fluor Plus 488荧光抗体(购自Invitrogen)和链霉亲和素APC结合物荧光抗体(购自Invitrogen)，孵育15min。加入PBS重悬细胞，使用BD AriaIII仪器进行分选获得可与c-Met抗原有较高结合能力的酵母。

[0187] c-Met抗体候选分子抗体基因的调取

[0188] 通过MACS和FACS富集得到的能与c-Met抗原有较高结合能力的酵母菌液，涂布于SD-CAA的固体培养板上，然后挑取单克隆在SD-CAA扩增培养基中30℃，225rpm培养过夜，用0.1%的SDS处理扩增后的单克隆，离心并以上清作为模板进行PCR扩增，将PCR产物送测序以获得基因序列，共获得9株抗体，将它们分别命名为抗体22、23、74、111、136、187、216、221和223，具体序列如表1所示，其中，抗体的CDR序列均由IMGT编号系统(Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003)确定。

[0189] 实施例2. 单臂抗体的构建及表达纯化

[0190] 2.1. 抗体基因构建入pCDNA3.1表达载体

[0191] 将编码重链可变区(如SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15或17所示)的核苷酸序列与编码重链恒定区1(如SEQ ID NO:121所示)的核苷酸序列和编码人IgG1-Fc(LALA突变, knob突变)段(SEQ ID NO:111)的核苷酸序列相连，利用同源重组酶(购自Vazyme)构建到EcoR I/Not I双酶切线性化的pCDNA3.1载体中；将编码轻链可变区(如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16或18所示)的核苷酸序列与编码轻链恒定区(如SEQ ID NO:122所示)的核苷酸序列构建到EcoR I/XhoI I双酶切线性化的pCDNA3.1载体中；将编码Fc-LALA-hole(SEQ ID NO:112)的核苷酸序列构建到EcoR I/XhoI I双酶切线性化的pCDNA3.1载体中。流程按照商品说明书。同源重组产物转入Top10感受态细胞，涂布氨苄抗性平板，37℃培养过夜，挑取单克隆测序，并抽提质粒。

[0192] 2.2. 细胞转染及蛋白纯化

[0193] 采用ExpiCHO™表达系统试剂盒(购自Thermo), 将上述抽提的重链(Fc-LALA-knob)、轻链和Fc-LALA-hole (SEQ ID NO:112) 三种质粒共转入Expi-CHO细胞中, 以形成单个Fab的抗体结构(图1), 转染方法按照商品说明书, 细胞培养5天后收集上清利用蛋白A磁珠(购自金斯瑞)分选法纯化目的蛋白。将磁珠用适当体积的结合缓冲液(PBS+0.1%吐温20, pH 7.4)重悬(1-4倍磁珠体积)后加入至待纯化样品中, 室温孵育1小时, 期间温柔振荡。样品置于磁力架上(购自海狸), 弃去上清, 磁珠用结合缓冲液清洗3遍。按照磁珠体积的3-5倍体积加入洗脱缓冲液(0.1M柠檬酸钠, pH3.2)室温振荡5-10min, 置回磁力架上, 收集洗脱缓冲液, 转移至已加入中和缓冲液(1M Tris, pH 8.54)的收集管中混匀, 获得目的蛋白。

[0194] 实施例3. c-Met抗体亲和力测定

[0195] ForteBio亲和力测定按照现有的方法(Estep, P等人, 基于高通量法的抗体-抗原亲和力和表位结合的测定。MAbs, 2013. 5(2):p. 270-8)进行。简言之, 传感器在分析缓冲液中线下平衡30min, 然后线上检测60s建立基线, 在线加载如上所述获得的经纯化的抗体至AHQ传感器上。再将传感器放入100nM的人c-Met抗原中作用5min, 之后将传感器转移至PBS中解离5min。使用1:1结合模型进行动力学的分析。

[0196] 表2. 候选分子与人c-Met的亲和力

编号	KD(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)
22	4.29E-09	1.28E+05	5.48E-04
23	5.96E-10	1.60E+05	9.50E-05
74	6.01E-09	1.79E+05	1.08E-03
111	2.34E-09	1.60E+05	3.74E-04
136	2.93E-11	2.29E+05	6.71E-06
187	1.68E-09	2.20E+05	3.69E-04
216	6.54E-10	2.19E+05	1.43E-04
221	2.01E-09	1.84E+05	3.70E-04
223	9.76E-09	1.67E+05	1.63E-03

[0197] 实验也检测了候选分子与不同种属蛋白的交叉反应，包括食蟹猴来源的蛋白(购自AcroBiosystems)。

[0198] 表3. 候选分子与猴c-Met的亲合力

编号	KD(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)
22	1.90E-08	1.36E+05	2.59E-03
23	2.65E-08	5.69E+04	1.51E-03
74	9.70E-09	2.69E+05	2.60E-03
111	1.15E-08	1.02E+05	1.17E-03
136	1.16E-09	3.69E+05	4.26E-04
187	2.92E-09	3.24E+05	9.47E-04
216	3.84E-09	1.28E+05	4.93E-04
221	6.38E-08	3.01E+04	1.92E-03
223	1.62E-08	6.73E+04	1.09E-03

[0199] 实验结果如表2和表3所示，本申请的9种抗体与哺乳动物(例如，人，猴)的c-Met蛋白均具有一定的亲合力。

[0200] 蛋白构建及表达纯化方法同实施例2.2，利用HPLC检测获得蛋白的纯度。HPLC方法如下，流动相：150mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, pH7.0。色谱条件：检测波长：280nm，柱温：25℃，流速：0.35ml/min，检测时间：20min，Zenix-C SEC-300色谱柱(SEPAX 4.6×300mm, 3 μm)。

[0201] 表4. Anti-c-Met抗体的纯度检测结果

编号	单体比例(%)
22	97.20%
23	98.50%
74	98.00%
111	97.20%
136	94.80%
187	97.70%
216	97.30%
221	94.00%
223	96.80%

[0202] 实验结果如表4所示，本申请的9种抗体的纯度较高，均在94%及以上。

[0203] 实施例4. 抗c-Met样品的热稳定性

[0204] 利用DSC(Differential scanning calorimetry, 差示扫描量热法)检测不同抗体的热稳定性。将样品浓缩后用PBS稀释到1mg/ml；将5000×荧光显色剂Cypro Orange(购于Bio-Rad)用超纯水稀释50倍得到100×荧光显色剂Sypro Orange。取50 μl 1mg/ml的样品加入10 μl 100×荧光显色剂Sypro Orange、40 μl超纯水，混匀后，取30 μl加入到96孔PCR板中，每个样品做3个复孔，放入PCR仪中，设置升温程序为：25℃恒温5min，以0.5℃/min的速度升温至99℃。程序结束后在“Melt Curve”图中读取曲线的最低点的温度值，即为样品的T_m值。具体结果如下表8所示：

[0205] 表5. 抗c-Met抗体的T_m值

编号	T _m (°C)
22	67.34
23	67.95
74	67.42
111	64.26
136	67.86
187	67.42
216	67.42
221	67.42
223	67.42

- [0206] 实验结果如表5所示，本申请的9种抗体均具有一定的热稳定。
- [0207] 实施例5. 抗c-Met纯化样品与人/恒河猴c-Met的细胞结合
- [0208] 为了验证本申请抗体与表达c-Met的哺乳动物细胞的结合能力，选取了3个现有抗体Amivantamab、LY2875358和onartuzumab作为对照抗体进行比较。
- [0209] 其中，Amivantamab和LY2875358对照抗体与本申请单臂抗体的构建过程相同，均按照实施例2的步骤进行。简单来说，对照抗体Amivantamab是将如SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114和SEQ ID NO:115所示的插入片段分别整合入质粒中，并将质粒共转入Expi-CHO细胞中；对照抗体LY2875358是将如SEQ ID NO:116，SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118所示的插入片段分别整合入质粒中，并将质粒共转入Expi-CHO细胞中。对照抗体onartuzumab则是将编码SEQ ID NO:119，SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:115的核苷酸序列分别插入质粒中，并将质粒共转入Expi-CHO细胞中。
- [0210] 通过转染克隆到MCS的人或恒河猴c-Met cDNA(购自Sino Biological)的pCH01.0载体(购自Invitrogen)产生过表达人c-Met的HEK293T细胞(HEK293-Hu c-Met)，以及过表达恒河猴c-Met的HEK293T细胞(HEK293-Rhe c-Met)。将扩大培养的HEK293-Hu c-Met/HEK293-Rhe c-Met细胞调整细胞密度至 2×10^6 cells/ml，100 μ l/孔加入96孔流式板，离心备用。将纯化的c-Met抗体用PBS稀释，100nM开始3倍稀释共10个点，将上述稀释好的样品100 μ l/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中，4 $^{\circ}$ C孵育30min，PBS清洗两次。100 μ l/孔加入用PBS稀释100倍的Goat F(ab')²Anti-Human IgG-Fc(PE)(购自Abcam)，4 $^{\circ}$ C孵育30min，PBS清洗两次。100 μ l/孔加入PBS重悬细胞，在CytoFlex(Bechman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。
- [0211] 在如上方法的测定实验中，实验结果如图2A，2B所示，本发明所有的抗c-Met单臂抗体和HEK293-Hu c-Met细胞均有结合活性。尤其是抗体136显示出了类似于对照抗体Amivantamab的强结合，且优于对照抗体LY2875358和对照抗体onartuzumab。图2C，2D显示，本发明所有的抗c-Met单臂抗体与HEK293-Rhe c-Met细胞的结合，类似于与人c-Met的结合。尤其是抗体136显示出了类似于Amivantamab的强结合，优于其他候选抗体及对照抗体。并且如表6，表7所示，

所有的抗c-Met筛选用单臂抗体都表现出了对于表达人c-Met和恒河猴c-Met细胞类似的结合能力(EC50)。

[0212] 表6. 抗c-Met单臂抗体和HEK293-Hu c-Met结合检测表

抗体克隆号	EC50 (nM)	EC50 (nM)
22	0.947	/
23	0.8211	/
74	1.901	/
85	2.092	/
111	25.72	/
136	0.4515	/
187	/	0.7322
216	/	0.744
221	/	1.731
222	/	0.78
223	/	0.7649
225	/	2.352
LY2875358 单臂抗体	1.245	1.391
Amivantamab 单臂抗体	0.3227	0.3957
Onartuzumab	1.032	0.5398

[0213] 表7. 抗c-Met单臂抗体和HEK293-Rhe c-Met结合检测

抗体克隆号	EC50 (nM)	EC50 (nM)
22	0.7258	/
23	0.7464	/
74	1.461	/
85	0.8092	/
111	26.17	/
136	0.3062	/
187	/	0.5922
216	/	0.6006
221	/	1.478
222	/	0.4646
223	/	1.064
225	/	7.536
LY2875358 单臂抗体	0.8682	0.7487
Amivantamab 单臂抗体	0.2414	0.2001
Onartuzumab	0.9699	1.241

[0214] 实施例6. 抗c-Met筛选用单臂抗体阻断HGF依赖的TKI抗性

[0215] HCC827细胞是购自于(中科院典藏细胞库)的人非小细胞肺癌细胞, 其高表达表皮生长因子受体EGFR(外显子19丢失)和c-Met受体。酪氨酸激酶抑制剂TKI小分子Gefitinib(吉非替尼, 是一种表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂)处理会诱导HCC827细胞凋亡。如果在这样的条件下同时加入HGF, 将激活c-Met通路从而诱导HCC827产生对于Gefitinib的抗性, 抑制凋亡。

[0216] 将扩大培养的HCC827细胞调整细胞密度至 2×10^4 细胞/ml, 100 μ l/孔加入96孔细胞培养板, 过夜培养备用。用1640培养基将待检测抗体用1640培养基稀释至1000nM, 将HGF稀释至800ng/mL, 将Gefitinib稀释至8 μ M, 将上述稀释好的抗体50 μ l/孔, HGF 25 μ l/孔, Gefitinib 25 μ l/孔, 按照实验需要加入上述带有细胞的96板中, 用1640培养基补足至总体积为200 μ l/孔, 37°C, 5%二氧化碳条件下培养3天后移除100 μ l培养基, 然后按100 μ l/孔加入Cell titer glo(购自Promega), 用酶标仪收集化学发光信号。

[0217] 实验结果如图3所示, 本申请的抗c-Met筛选用单臂抗体抑制了HGF-c-Met信号通路(例如, 抗体22、23、74、85、111、136和187), 从而恢复了Gefitinib诱导的HCC827凋亡。其中, 抗体136和187都表现出了显著的抑制活性, 显著优于

其它抗体(例如, 抗体22, 23, 74.85, 111, 216, 221, 222, 223和225), 甚至优于一些对照抗体。

[0218] 实施例7. 抗c-Met筛选用单臂抗体阻断HGF诱导的细胞增殖

[0219] H596细胞是购自于(ATCC)的人肺癌细胞表达EGFR和c-Met受体, HGF处理会诱导H596细胞增殖。如果在这样的条件下加入对照抗体, 会抑制HGF-c-Met信号通路, 从而抑制HGF对H596的诱导增值。将扩大培养的H596细胞调整密度为 3×10^4 细胞/ml, 100 μ l/孔加入96孔细胞培养板, 过夜培养备用。用1640培养基将待检测抗体稀释至400nM, 将HGF稀释至200ng/mL, 将上述稀释好的抗体50 μ l/孔, HGF 50 μ l/孔, 按照实验需要加入上述带有细胞的96板中, 用1640培养基补足至总体积为200 μ l/孔, 37°C, 5%二氧化碳条件下培养5天。5天后移除100 μ l培养基, 然后100 μ l/孔加入Cell titer glo(购自Promega), 用酶标仪收集化学发光信号。

[0220] 结果如图4所示, 抗c-Met筛选用单臂抗体136和187都显著的抑制了HGF诱导的H596细胞增殖。不仅如此, 抗体136的抑制效果优于全部的对照抗体。

[0221] 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]

能够特异性结合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：

(a) 包含下述3个互补决定区(CDRs)的重链可变区(VH)：

(i) VH CDR1，其由SEQ ID NO:19、21、23、25、27、29、31、33或35任一项所示的序列组成，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列，

(ii) VH CDR2，其由SEQ ID NO:37、39、41、43、45、47、49、51或53任一项所示的序列组成，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列，和

(iii) VH CDR3，其由SEQ ID NO:55、57、59、61、63、65、67、69或71任一项所示的序列组成，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列；

和/或，

(b) 包含下述3个互补决定区(CDRs)的轻链可变区(VL)：

(iv) VL CDR1，其由下述序列组成：SEQ ID NO:20、22、24、26、28、30、32、34或36，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列组成：SEQ ID NO:38、40、42、44、46、48、50、52或54，或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列，和

(vi) VL CDR3，其由下述序列组成：SEQ ID NO:56、58、60、62、64、66、68、70或72，或与其相比具有一个

或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个, 2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;

优选地, (i)-(vi)中任一项所述的置换为保守置换;

优选地, (i)-(vi)任一项中所述的CDR根据Kabat、IMGT或Chothia编号系统定义;

优选地, (i)-(vi)任一项中所述的CDR根据IMGT编号系统定义。

[权利要求 2]

权利要求1的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

(1)如下3个重链CDRs: 如SEQ ID NO:19所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:37所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:55所示的VH CDR3; 和/或, 如下3个轻链CDRs: 如SEQ ID NO:20所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:38所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:56所示的VL CDR3;

(2)如下3个重链CDRs: 如SEQ ID NO:21所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:39所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:57所示的VH CDR3; 和/或, 如下3个轻链CDRs: 如SEQ ID NO:22所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:40所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:58所示的VL CDR3;

(3)如下3个重链CDRs: 如SEQ ID NO:23所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:41所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:59所示的VH CDR3; 和/或, 如下3个轻链CDRs: 如SEQ ID NO:24所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:42所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:60所示的VL CDR3;

(4)如下3个重链CDRs: 如SEQ ID NO:25所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:43所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:61所示的VH CDR3; 和/或, 如下3个轻链CDRs: 如SEQ ID NO:26所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:44所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:62所示的VL CDR3;

(5)如下3个重链CDRs: 如SEQ ID NO:27所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:45所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:63所示的VH CDR3; 和/或, 如下3个轻链CDRs: 如SEQ ID NO:28所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:46所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:64所示的VL CDR3;

(6)如下3个重链CDRs: 如SEQ ID NO:29所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:47所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:65所示的VH CDR3; 和/或, 如下3个轻链CDRs: 如SEQ ID NO:30所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:48所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:66所示的VL CDR3;

(7)如下3个重链CDRs: 如SEQ ID NO:31所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:49所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:67所示的VH CDR3; 和/或, 如下3个轻链CDRs: 如SEQ ID NO:32所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:50所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:68所示的VL CDR3;

(8)如下3个重链CDRs: 如SEQ ID NO:33所示的VH CDR1、如SEQ ID NO: 51所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:69所示的VH CDR3; 和/或, 如下3个轻链CDRs: 如SEQ ID NO:34所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:52所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:70所示的VL CDR3; 或

(9)如下3个重链CDRs: 如SEQ ID NO:35所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:53所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:71所示的VH CDR3; 和/或, 如下3个轻链CDRs: 如SEQ ID NO:36所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:54所示的VL CDR2、如SEQ ID NO:72所示的VL CDR3;

优选地, 所述抗体或其抗原结合片段进一步包含人免疫球蛋白的框架区。

[权利要求 3]

权利要求1或2的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a)重链可变区(VH), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(i)SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15或17任一项所示的序列;

(ii)与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15或17任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个, 2个, 3个, 4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列; 或

(iii)与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15或17任一项所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、

至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%的序列同一性的序列；

和/或

(b)轻链可变区(VL)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv)SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16或18所示的序列；

(v)与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16或18所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个，2个，3个，4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列；或

(vi)与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16或18所示的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%的序列同一性的序列；

优选地，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1)具有如SEQ ID NO:1所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:2所示的序列的VL；

(2)具有如SEQ ID NO:3所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:4所示的序列的VL；

(3)具有如SEQ ID NO:5所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:6所示的序列的VL；

(4)具有如SEQ ID NO:7所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:8所示的序列的VL；

(5)具有如SEQ ID NO:9所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:10所示的序列的VL；

(6)具有如SEQ ID NO:11所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:12所示的序列的VL；

(7)具有如SEQ ID NO:13所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:14所示的序列的VL；

(8) 具有如SEQ ID NO:15所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:16所示的序列的VL；或

(9) 具有如SEQ ID NO:17所示的序列的VH和具有如SEQ ID NO:18所示的序列的VL。

[权利要求 4]

权利要求1-3任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 人免疫球蛋白的重链恒定区(CH)或其变体，所述变体与其所源自的序列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(例如，至多20个、至多15个、至多10个、或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；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)；和/或

(b) 人免疫球蛋白的轻链恒定区(CL)或其变体，所述变体与其所源自的序列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(例如，至多20个、至多15个、至多10个、或至多5个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合；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)；

优选地，所述重链恒定区是IgG重链恒定区，例如

IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链 恒定区；

优选地，所述轻链恒定区是 κ 轻链恒定区或 λ 轻链恒定区；

优选地，所述重链恒定区具有如SEQ ID NO:121所示的序列；

优选地，所述轻链恒定区具有如SEQ ID NO:122所示的序列。

[权利要求 5]

权利要求1-4任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，其中，

所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、(Fab')²、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、双抗体(diabody)和单域抗体(sdAb)；和/或，所述抗体为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或多特异性抗体；

优选地，所述抗原结合片段为Fab；

优选地，所述抗原结合片段还包含Fc片段(例如，人IgG1的Fc片段)或其突变体；

- 优选地，所述Fc片段具有LALA突变和knob突变；或者，所述Fc片段具有LALA突变和hole突变；
- 优选地，所述Fc片段具有如SEQ ID NO:111或112所示的序列。
- [权利要求 6] 分离的核酸分子，其编码权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
- [权利要求 7] 载体，其包含权利要求6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 8] 宿主细胞，其包含权利要求6的核酸分子或权利要求7的载体；优选地，所述宿主细胞是哺乳动物细胞。
- [权利要求 9] 制备权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养权利要求8所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。
- [权利要求 10] 多特异性分子，其包含权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段；
- 优选地，所述多特异性分子特异性结合c-Met，并且额外地特异性结合一个或多个其他靶标；
- 优选地，所述多特异性分子是双特异性分子；
- 优选地，所述双特异性分子还包含一种具有针对第二靶标的第二结合特异性的分子(例如第二抗体)。
- [权利要求 11] 免疫缀合物，其包含权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求10的多特异性分子，以及连接于所述抗体或其抗原结合片段或多特异性分子的治疗剂；
- 优选地，所述治疗剂选自细胞毒剂；
- 优选地，所述治疗剂选自烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂，及其任意组合；
- 优选地，所述免疫缀合物是抗体-药物偶联物(ADC)。

- [权利要求 12] 药物组合物，其包含权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或权利要求10所述的多特异性分子或者权利要求11所述的免疫缀合物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂；
优选地，药物组合物还包含另外的药学活性剂；
优选地，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物，例如烷化剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射性核素剂、放射增敏剂、抗血管生成剂、细胞因子、分子靶向药物、免疫检查点抑制剂或溶瘤病毒；
优选地，所述抗体或其抗原结合片段、多特异性分子或免疫缀合物与所述另外的药学活性剂作为分离的组分或作为同一组合物的组分提供。
- [权利要求 13] 试剂盒，其含有权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段；
优选地，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶）、放射性核素、荧光染料、发光物质（如化学发光物质）或生物素；
优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段；
优选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶）、放射性核素、荧光染料、发光物质（如化学发光物质）或生物素。
- [权利要求 14] 嵌合抗原受体，其包含权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段的抗原结合结构域；
优选地，所述抗原结合结构域包含权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区；
优选地，所述抗原结合结构域是scFv；
优选地，所述嵌合抗原受体由免疫效应细胞（例如T细胞）所表达。

- [权利要求 15] 一种抑制表达c-Met的肿瘤细胞生长和/或杀伤所述肿瘤细胞的方法，其包括将所述肿瘤细胞与有效量的权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或权利要求10所述的多特异性分子，或权利要求11所述的免疫缀合物，或权利要求12所述的药物组合物，或权利要求14所述的嵌合抗原受体接触。
- [权利要求 16] 权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或权利要求10所述的多特异性分子，或权利要求11所述的免疫缀合物，或权利要求12所述的药物组合物，或权利要求14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(例如人)中预防和/治疗肿瘤；
- 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，所述肿瘤表达c-Met；
- 优选地，所述肿瘤涉及c-Met的肿瘤细胞；优选地，所述c-Met在所述肿瘤细胞表面上表达；
- 优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、胰脏癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈部癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈样肉芽肿(mycosis fungoids)、默克尔细胞癌和其它恶性血液病、如经典型霍奇金淋巴瘤(CHL)、原发性纵膈大B细胞淋巴瘤、T细胞/组织细胞的富B细胞淋巴瘤、EBV阳性和阴性PTLD和EBV相关弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、浆母细胞性淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌和HHV8相关原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤，中枢神经系统(CNS)肿瘤，例如原发性CNS淋巴瘤，脊轴肿瘤，脑干神经胶质瘤。

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人。

[权利要求 17]

权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段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c-Met的抗肿瘤疗法来治疗；

(1)将含有所述肿瘤细胞的样品与权利要求1-5任一项所述的抗体或其抗原结合片段接触；

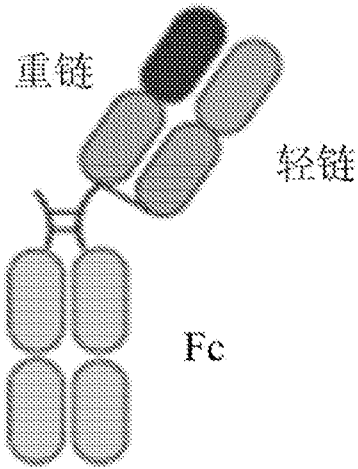
(2)检测所述抗体或其抗原结合片段与c-Met之间复合物的形成；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记；

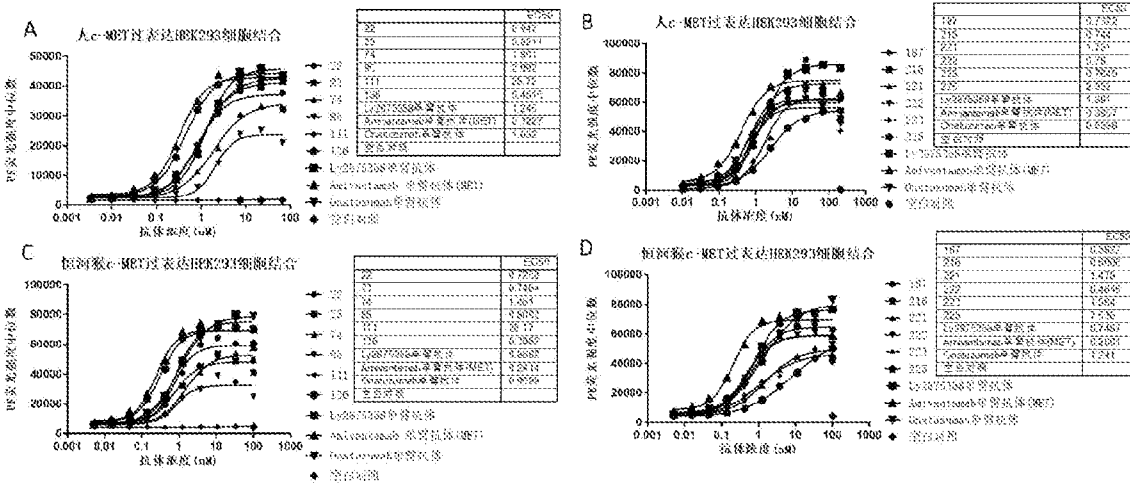
优选地，所述c-Met是哺乳动物(例如，人，猴)的c-Met；

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

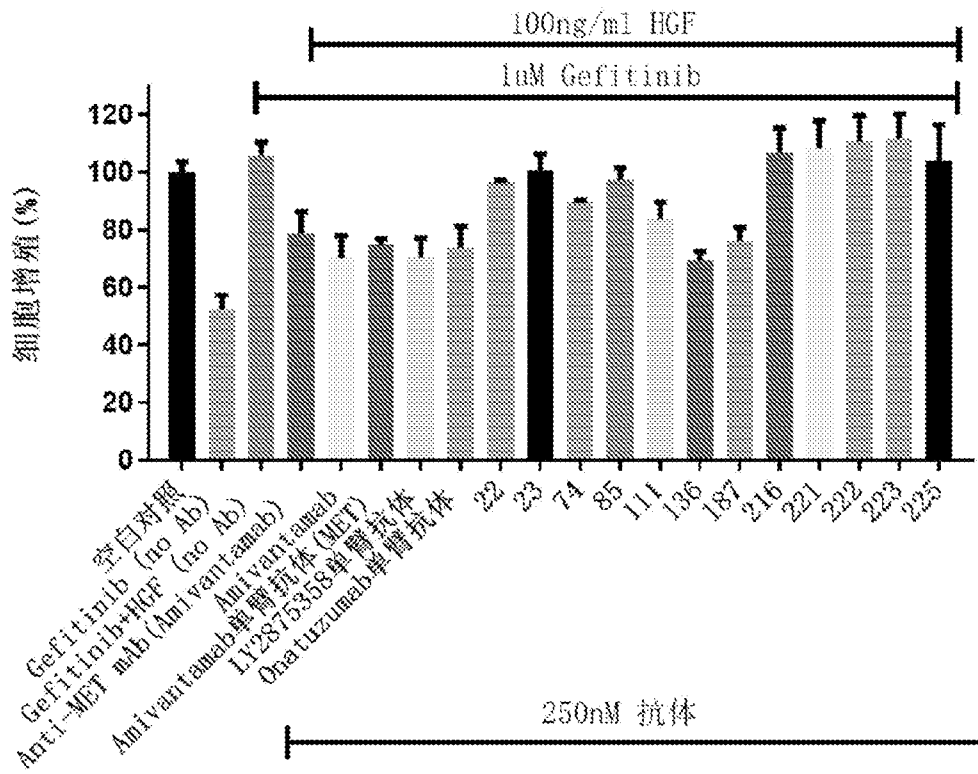
[图 1]



[图 2]

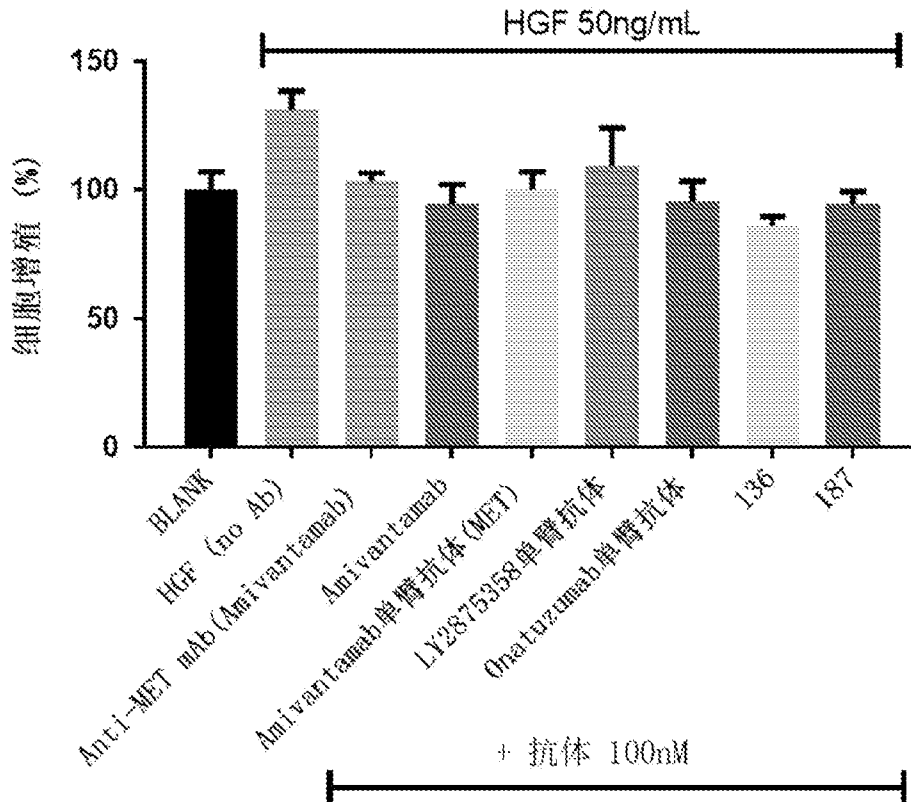


[图 3]



细则 26,
30. 05. 2023

[图 4]



细则 26,
30. 05. 2023

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/085417

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i;C12N 15/13(2006.01)j;A61K 39/395(2006.01)j;A61P35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System: 抗体, 单抗, 肝细胞生长因子, 受体, antibody, monoclonal, hepatocyte growth factor, HGF, receptor, c-Met, 本申请的SEQ ID NOs: 19-72, SEQ ID NOs: 19-72 of the application

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101415730 A (NOVARTIS AG) 22 April 2009 (2009-04-22) entire document, in particular claims, description embodiments 1-5, table 5, and abstract	1-17 (in part)
X	US 2005054019 A1 (AMGEN FREMONT INC.; PFIZER;) 10 March 2005 (2005-03-10) entire document, in particular claims, description, embodiments I, II, table 6, and abstract	1-17 (in part)
X	CN 110770254 A (CHONG KUN DANG PHARMACEUTICAL CORP.) 07 February 2020 (2020-02-07) entire document, in particular claims, description embodiments 1-5, table 22 and abstract	1-17 (in part)

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 April 2023

Date of mailing of the international search report

14 May 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/085417

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **1-17 (in part)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claim 1 relates to amino acid sequences of a great number of possible CDRs, and can even cover the amino acid sequence of any CDR, which violates the requirements of PCT Article 5 and 6. In addition, such definitions lead to novelty overflow. Therefore, the search for claims 1-17 is limited to being based on a specific CDR combination defined by amino acid sequences of six determined CDRs of a heavy chain and a light chain in claim 2.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/085417

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101415730	A	22 April 2009	AU	2007245181	A1	08 November 2007
				PE	20080352	A1	12 June 2008
				BRPI	0709917	A2	05 July 2011
				MX	2008012485	A	10 October 2008
				KR	20080113218	A	29 December 2008
				CL	2007000851	A1	14 March 2008
				US	2009175860	A1	09 July 2009
				US	8101727	B2	24 January 2012
				CA	2646048	A1	08 November 2007
				TW	200815470	A	01 April 2008
				RU	2008142833	A	10 May 2010
				AR	060241	A1	04 June 2008
				WO	2007126799	A2	08 November 2007
				WO	2007126799	A3	03 April 2008
				EP	2004693	A2	24 December 2008
				EP	2004693	B1	06 June 2012
				JP	2009532026	A	10 September 2009
				JP	5536445	B2	02 July 2014
ES	2386738	T3	28 August 2012				
<hr/>							
US	2005054019	A1	10 March 2005	HN	2004000285	A	27 April 2006
				US	7498420	B2	03 March 2009
				JP	2007501013	A	25 January 2007
				CA	2534563	A1	24 February 2005
				NL	1026776	A1	07 February 2005
				NL	1026776	C2	02 August 2005
				UY	28453	A1	28 February 2005
				TW	200523269	A	16 July 2005
				US	2014086914	A1	27 March 2014
				US	8821869	B2	02 September 2014
				US	2012321614	A1	20 December 2012
				US	8562985	B2	22 October 2013
				AR	047717	A1	15 February 2006
				BRPI	0413272	A	10 October 2006
				PA	8608401	A1	03 March 2005
				GB	0417384	D0	08 September 2004
				GB	2404660	A	09 February 2005
				US	2010040629	A1	18 February 2010
				US	8163280	B2	24 April 2012
				GT	200400149	A	22 February 2005
PE	20050727	A1	01 October 2005				
WO	2005016382	A1	24 February 2005				
EP	1660127	A1	31 May 2006				
EP	1660127	A4	01 August 2007				
<hr/>							
CN	110770254	A	07 February 2020	MY	192630	A	29 August 2022
				US	2020231681	A1	23 July 2020
				US	11479612	B2	25 October 2022
				AU	2018278730	A1	14 November 2019
				AU	2018278730	B2	04 February 2021
				MX	2019014316	A	27 January 2020
				PH	12019550233	A1	20 July 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/085417

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 3061704 A1	06 December 2018
		NZ 758605 A	29 July 2022
		EP 3630844 A1	08 April 2020
		EP 3630844 A4	03 March 2021
		KR 20180131470 A	10 December 2018
		KR 102078292 B1	19 February 2020
		RU 2019143101 A3	30 June 2021
		RU 2019143101 A	16 July 2021
		BR 112019025070 A2	23 March 2021
		JP 2020522258 A	30 July 2020
		TW 201900678 A	01 January 2019
		TWI 707869 B	21 October 2020

A. 主题的分类 C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P35/00 (2006.01) i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C07K; C12N; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, 中国专利生物序列检索系统:抗体, 单抗, 肝细胞生长因子, 受体, antibody, monoclonal, hepatocyte growth factor, HGF, receptor, c-Met, 本申请的SEQ ID NOs: 19-72		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101415730 A (诺瓦提斯公司) 2009年4月22日 (2009 - 04 - 22) 全文, 尤其是权利要求书、说明书实施例1-5、表5和摘要	1-17 (部分)
X	US 2005054019 A1 (AMGEN FREMONT INC; PFIZER;) 2005年3月10日 (2005 - 03 - 10) 全文, 尤其是权利要求书、说明书实施例I、II、表6和摘要	1-17 (部分)
X	CN 110770254 A (株式会社钟根堂) 2020年2月7日 (2020 - 02 - 07) 全文, 尤其是权利要求书、说明书实施例1-5、表22和摘要	1-17 (部分)
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年4月12日		国际检索报告邮寄日期 2023年5月14日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 吴永庆 电话号码 (+86) 010-62089161

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的;
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. 权利要求： 1-17（部分）
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
权利要求1涉及极大数量的可能的CDR的氨基酸序列，甚至可以涵盖任意的CDR的氨基酸序列，违反了《PCT条约》第5条和第6条的要求。另外这样的限定将导致新颖性溢出。所以，权利要求1-17的检索限制到基于权利要求2中以重链和轻链的6个确定的CDR的氨基酸序列限定的具体CDR组合。

3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/085417

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101415730	A	2009年4月22日	AU	2007245181	A1	2007年11月8日
				PE	20080352	A1	2008年6月12日
				BR- PI	0709917	A2	2011年7月5日
				MX	2008012485	A	2008年10月10日
				KR	20080113218	A	2008年12月29日
				CL	2007000851	A1	2008年3月14日
				US	2009175860	A1	2009年7月9日
				US	8101727	B2	2012年1月24日
				CA	2646048	A1	2007年11月8日
				TW	200815470	A	2008年4月1日
				RU	2008142833	A	2010年5月10日
				AR	060241	A1	2008年6月4日
				WO	2007126799	A2	2007年11月8日
				WO	2007126799	A3	2008年4月3日
				EP	2004693	A2	2008年12月24日
				EP	2004693	B1	2012年6月6日
				JP	2009532026	A	2009年9月10日
				JP	5536445	B2	2014年7月2日
				ES	2386738	T3	2012年8月28日
US	2005054019	A1	2005年3月10日	HN	2004000285	A	2006年4月27日
				US	7498420	B2	2009年3月3日
				JP	2007501013	A	2007年1月25日
				CA	2534563	A1	2005年2月24日
				NL	1026776	A1	2005年2月7日
				NL	1026776	C2	2005年8月2日
				UY	28453	A1	2005年2月28日
				TW	200523269	A	2005年7月16日
				US	2014086914	A1	2014年3月27日
				US	8821869	B2	2014年9月2日
				US	2012321614	A1	2012年12月20日
				US	8562985	B2	2013年10月22日
				AR	047717	A1	2006年2月15日
				BR- PI	0413272	A	2006年10月10日
				PA	8608401	A1	2005年3月3日
				GB	0417384	D0	2004年9月8日
				GB	2404660	A	2005年2月9日
				US	2010040629	A1	2010年2月18日
				US	8163280	B2	2012年4月24日
				GT	200400149	A	2005年2月22日
PE	20050727	A1	2005年10月1日				
WO	2005016382	A1	2005年2月24日				
EP	1660127	A1	2006年5月31日				
EP	1660127	A4	2007年8月1日				
CN	110770254	A	2020年2月7日	MY	192630	A	2022年8月29日
				US	2020231681	A1	2020年7月23日
				US	11479612	B2	2022年10月25日
				AU	2018278730	A1	2019年11月14日
				AU	2018278730	B2	2021年2月4日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/085417

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		MX	2019014316	A	2020年1月27日
		PH	12019550233	A1	2020年7月20日
		CA	3061704	A1	2018年12月6日
		NZ	758605	A	2022年7月29日
		EP	3630844	A1	2020年4月8日
		EP	3630844	A4	2021年3月3日
		KR	20180131470	A	2018年12月10日
		KR	102078292	B1	2020年2月19日
		RU	2019143101	A3	2021年6月30日
		RU	2019143101	A	2021年7月16日
		BR	112019025070	A2	2021年3月23日
		JP	2020522258	A	2020年7月30日
		TW	201900678	A	2019年1月1日
		TWI	707869	B	2020年10月21日