



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119587692 A

(43) 申请公布日 2025.03.11

(21) 申请号 202411779087.7

(22) 申请日 2019.10.07

(30) 优先权数据

102018000009282 2018.10.09 IT

(62) 分案原申请数据

201980080611.2 2019.10.07

(83) 生物保藏信息

ABC PD 08003 2008.04.16

ABC PD 05006 2005.12.29

(71) 申请人 皮埃尔法布雷医药公司

地址 法国拉沃尔

(72) 发明人 E·维格纳 C·巴西利克

T·克雷帕尔迪 P·M·科蒙利奥

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟 程云

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书2页 说明书27页
序列表(电子公布) 附图21页

(54) 发明名称

用于治疗肿瘤和/或转移的抗Met Fab-Fc

(57) 摘要

本公开涉及用于治疗肿瘤和/或转移的抗Met Fab-Fc。本公开涉及一种抗Met抗体片段,其包含单个抗原结合臂和Fc区,其中所述抗原结合臂由具有如SEQ IDNo.:7、8中所列明的氨基酸序列的可变区限定,并且其中所述抗Met抗体片段可用在肿瘤和/或转移的治疗中。

1. 人源化抗Met抗体片段与另一种抗体、小分子酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、其他细胞毒性剂、抗血管生成剂、细胞因子和/或生长抑制剂用于制备组合疗法药物的用途,其中:

所述人源化抗Met抗体片段包含单个抗原结合臂和Fc区,其中所述Fc区包含第一和第二Fc多肽的复合物,其中所述抗体片段包含:

i) 第一多肽,所述第一多肽包含一个人源化轻链可变(VL)结构域和一个人轻链恒定(CL)结构域,其中沿N-至C-末端的方向,所述人源化VL结构域与所述人CL结构域融合;

ii) 第二多肽,所述第二多肽包含一个人源化重链可变(VH)结构域、一个人重链恒定CH1结构域和所述第一Fc多肽,其中所述第一Fc多肽包含一个人铰链区、一个人恒定CH2结构域和一个人恒定CH3结构域,其中沿N-至C-末端的方向,所述人源化VH结构域与所述人CH1结构域融合,所述人CH1结构域与所述人铰链区融合,所述人铰链区与所述人CH2结构域融合,而所述人CH2结构域与所述人CH3结构域融合;和

iii) 第三多肽,所述第三多肽包含所述第二Fc多肽,其中所述第二Fc多肽包含一个人铰链区、一个人恒定CH2结构域和一个人恒定CH3结构域,其中沿N-至C-末端的方向,所述人铰链区与所述CH2结构域融合,所述CH2结构域与所述人CH3结构域融合,其中所述人铰链区在N-末端处被截短。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中:

所述人源化VL结构域含有三个互补决定区(CDR),所述三个互补决定区由SEQ ID No.: 1、2和3所示的氨基酸序列组成,并且其中所述人源化VL结构域具有SEQ ID No.: 7所示的氨基酸序列;以及

所述人源化VH结构域含有三个互补决定区(CDR),所述三个互补决定区由SEQ ID No.: 4、5和6所示的氨基酸序列组成,并且其中所述人源化VH结构域具有SEQ ID No.: 8所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述人源化抗Met抗体片段和所述其他抗体、小分子酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、其他细胞毒性剂、抗血管生成剂、细胞因子和/或生长抑制剂包含在相同的制剂中。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述人源化抗Met抗体片段和所述其他抗体、小分子酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、其他细胞毒性剂、抗血管生成剂、细胞因子和/或生长抑制剂包含在不同的制剂中。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述人源化抗Met抗体片段在所述其他抗体、小分子酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、其他细胞毒性剂、抗血管生成剂、细胞因子和/或生长抑制剂之前或之后施用。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述人CL结构域为人轻 κ 型结构域。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述人铰链区和所述人恒定结构域CH1、CH2和CH3来自人IgG1。

8. 根据权利要求1所述的用途,其中所述两个Fc多肽在所述铰链区通过分子间二硫键连接。

9. 根据权利要求1所述的用途,其中所述第一Fc多肽和所述第二Fc多肽在界面处相遇,并且所述第一和所述第二Fc多肽中的一个在所述界面处包含杆,而所述第一和所述第二Fc多肽中的另一个在所述界面处包含臼,其中所述杆可定位到所述臼中。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述第一和所述第二Fc多肽中的一个包含突变的CH3恒定结构域,其中所述突变的CH3恒定结构域在位置389处携带氨基酸突变,其中位置389处的原始氨基酸已被突变以导入比所述原始氨基酸具有更大侧链体积的氨基酸;并且其中所述第一和所述第二Fc多肽中的另一个包含突变的CH3恒定结构域,其中所述突变的CH3恒定结构域在位置389、391和438处携带三个氨基酸突变,其中原始氨基酸已被突变以导入比所述原始氨基酸具有更小侧链体积的氨基酸,其中所述氨基酸编号是根据Kabat的EU编号方案。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中位置389、391和438处的原始氨基酸分别为苏氨酸、亮氨酸和酪氨酸;并且其中在所述第一和所述第二Fc多肽的一个中,位置389中的苏氨酸已被突变为色氨酸;并且其中在所述第一和所述第二Fc多肽的另一个中,位置389处的苏氨酸已被突变为丝氨酸、位置391处的亮氨酸已被突变为丙氨酸而位置438处的酪氨酸已被突变为缬氨酸。

12. 根据权利要求1所述的用途,其中所述人CL结构域具有如SEQ ID No.:9中所列明的氨基酸序列而所述人CH1结构域具有如SEQ ID No.:10中所列明的氨基酸序列。

13. 根据权利要求1所述的用途,其中所述第一Fc多肽具有如SEQ ID No.:11中所列明的氨基酸序列,而所述第二Fc多肽具有如SEQ ID No.:12中所列明的氨基酸序列。

14. 根据权利要求1所述的用途,其中当与Met结合时,所述人源化抗Met抗体片段诱导Met的胞外结构域的脱落。

15. 根据权利要求1所述的用途,其所述组合疗法药物用于治疗患有肿瘤和/或转移的患者,其中所述患者携带MET基因的遗传改变。

16. 根据权利要求1所述的用途,其所述组合疗法药物用于治疗患有肿瘤和/或转移的患者,其中所述患者携带野生型MET基因。

用于治疗肿瘤和/或转移的抗Met Fab-Fc

[0001] 本申请是2019年10月07日提交的专利申请《用于治疗肿瘤和/或转移的抗Met Fab-Fc》(申请号2019800806112)的分案申请。

技术领域

[0002] 本公开涉及用于治疗肿瘤和/或转移的新型抗体衍生治疗剂。

背景技术

[0003] 癌症是一种其中体细胞内源基因发生突变的遗传性疾病。癌细胞中只有少数几个基因—称为癌基因和肿瘤抑制基因—发生了改变并驱动肿瘤发生。激活的癌基因是促进剂,而失活的肿瘤抑制基因则缺失癌细胞生长的制动器。在发现致癌的突变基因之后,出现了一种关于癌基因的新概念:“癌基因成瘾”,这指的是尽管存在大量的遗传改变,但癌细胞仍然依赖于单一的原癌蛋白来实现其持续增殖或存活。因此,采取了新的治疗手段以开发用于治疗癌症的“靶标疗法”。在过去的20年里,由致癌的突变基因编码的蛋白质的药理靶向—通过化学药物或抗体—代表了消除突变细胞和抗击癌症疾病的最前沿武器。靶向疗法有望比常规的细胞毒性化学疗法更有效,且副作用通常更少。然而,只有在其肿瘤中携带改变的特异性靶基因的患者才有可能受益于靶向疗法。因此,并行地需要个性化的药物以通过对患者肿瘤的全面基因组图谱分析来评估有成药性的遗传损伤。

[0004] MET癌基因编码具有多效性功能的独特受体酪氨酸激酶。当发生遗传改变(通过点突变、基因融合、易位和/或扩增)时,MET将凭借其激活侵袭性生长程序的能力而引发细胞的转化。因此,导致组成型Met激酶过度激活的MET遗传损伤会引发并维持转化的表型(“MET成瘾”)¹。

[0005] MET遗传损伤发生在大多数实体瘤中,总发生率为1-4%,并能够上调其激酶活性¹。点突变集中在对肝细胞生长因子(HGF)配体结合或受体信号传导至关重要的结构域(SEMA结构域、近膜结构域和催化结构域)中。最近,下一代测序揭示在3%的非小细胞肺癌中发生外显子14剪接位点突变²,其导致外显子跳跃和MET转录产物近膜区域的缺失,其中丝氨酸残基(Ser985)负调控Met激酶活性³并且Met的内在化和降解需要酪氨酸残基(Tyr1003)⁴。

[0006] 在由MET引起的“侵袭性生长”程序中,增殖反应与迁移、存活、细胞外基质降解和细胞极性诱导挂钩⁵。细胞努力使这些生物学反应适应不利的条件和/或逃逸以找到更便利的环境。在敌对的情况下,Met因多种刺激如缺氧、炎性细胞因子、促血管生成因子、促分裂原和甚至HGF自身—经由转录上调—而过度表达。最后,Met在辐射诱导的DNA损伤的情况下过度表达并通过促进DNA修复的激活和癌细胞的程序性细胞死亡的规避而帮助抵抗放射疗法。

[0007] 已开发了若干Met-靶向分子以以选择性、稳健且高度有效的方式擦除极度活跃的Met信号传导。这些药物包括:HGF拮抗剂(阻断抗体或诱饵)、靶向Met受体的mAb和化学酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。抗Met mAb潜在地代表了在抗击由MET驱动癌症的战役中的一大步。

如今,四种抗Met mAb已进入早期临床试验:MetMab(奥那妥珠单抗,Roche)、LY2875358(依玛妥珠单抗,Eli Lilly&Company)、ARGX-111(Argenx)、SAIT301(Samsung)和Sym015(Symphogen A/S)一两种抗体的混合物。它们通过以竞争性方式阻断HGF与MET的结合(奥那妥珠单抗,ARGX-111)和/或下调MET(依玛妥珠单抗,SAIT301,Sym015)而发挥作用。

[0008] 鼠DN30 mAb(在WO 2007/090807中公开)是一种IgG2A,其与人Met受体的胞外结构域结合并仅诱导一些Met触发的生物学效应⁶。由于其允许与两个不同的抗原分子同时结合的二价性质,故其将部分地激活受体磷酸化,从而导致以类似于天然配体所获得的方式稳定受体复合物。在单价DN30 Fab片段(MvDN30)中未观察到对Met的这种有害的部分激动活性⁷。将二价DN30亲本抗体转化为单价Fab片段将释放DN30抗Met抗体的治疗潜力,从而产生完全拮抗剂分子。然而,由于其低分子量,Fab的短半衰期是其在治疗中部署的严重限制。本发明人因此开发了新的工程化分子,称为DCD(双恒定结构域Fab),其以存在于DN30 Fab中的恒定结构域的复制为特征:DCD-1,其中复制串联进行;和DCD-2,其中轻链和重链的恒定结构域相互交换(在WO 2014/108829中公开)。两种新的重组分子在体外均显示出与原始Fab相当的生物化学性质,可充当完全的Met拮抗剂。在体内,在全身施用后,新的重组分子将减少Met成瘾的肿瘤生长。DCD-1和DCD-2显示出比原始DN30 Fab改善的药代动力学特征,但两个都没有取得与原始的mAb相当的行为⁸。

[0009] 先前已有报道,通过删除一通过分子工程方法一两个抗体臂中之一,也可实现抗体从二价形式向单价形式的转化(在WO 2005/063816中公开)。数据报告了分子的体内稳定性的改善,这主要归因于与器官中表达的Fc受体结合的Fc结构域的活性。

发明内容

[0010] 本公开的目的在于提供一种新型抗肿瘤剂,其衍生自一种可用于肿瘤患者治疗的单克隆抗体,即DN30单克隆抗体。

[0011] 根据本发明,因在所附权利要求中明确提及的主题而实现了上述目的,这些权利要求应理解为构成本公开的一个组成部分。

[0012] 本发明涉及包含单个抗原结合臂和Fc区的抗Met抗体片段,其中所述Fc区包含第一和第二Fc多肽的复合物。所述抗体片段包含:

[0013] (i) 第一多肽,其包含一个人源化轻链可变(VL)结构域和一个人轻链恒定(CL)结构域,其中沿N-至C-末端的方向,人源化轻链可变(VL)结构域与人轻链恒定(CL)结构域融合,并且其中人源化轻链可变(VL)结构域含有三个互补决定区(CDR),它们具有SEQ ID No.:1、2和3中所列明的氨基酸序列,并且其中人源化VL结构域具有如SEQ ID No.:7中所列明的氨基酸序列;

[0014] (ii) 第二多肽,其包含一个人源化重链可变(VH)结构域、一个人重链恒定CH1结构域和第一Fc多肽,其中所述第一Fc多肽包含一个人铰链区、一个人恒定CH2结构域和一个人恒定CH3结构域,其中沿N-至C-末端的方向,人源化重链可变(VH)结构域与人重链恒定CH1结构域融合,人重链恒定CH1结构域与人铰链区融合,人铰链区与人恒定CH2结构域融合,而人恒定CH2结构域与人恒定CH3结构域融合,并且其中人源化重链可变(VH)结构域含有三个互补决定区(CDR),其具有SEQ ID No.:4、5和6中所列明的氨基酸序列,并且其中人源化VH结构域具有如SEQ ID No.:8中所列明的氨基酸序列;

[0015] (iii) 第三多肽,其包含第二人Fc多肽,其中所述第二人Fc多肽包含一个铰链区、一个人恒定CH2结构域和一个人恒定CH3结构域,其中沿N-至C-末端的方向,铰链区与人CH2恒定结构域融合,人CH2恒定结构域与人CH3恒定结构域融合,其中铰链区在N-末端处被截短。

[0016] 上述抗体片段的改善的治疗性质取决于可变区的结构,而不仅仅是由于抗体的单价形式和/或Fc区的存在。

[0017] 本发明还涉及一种产品,其在单个瓶中或在两个瓶中包含(a)如上所定义的抗Met抗体片段和药学上可接受的媒介物,以及(b)人Met的细胞外部分和药学上可接受的媒介物,其中人Met的细胞外部分能够以稳定的方式与肝细胞生长因子(HGF)结合,并在由抗Met抗体片段识别的表位内含有至少一个氨基酸突变以防止抗Met抗体片段与其的结合。

附图说明

[0018] 现将仅通过示意性而非限制性的实例并参考附图来详细描述本发明,其中:

[0019] 图1:DN30抗体及其单价衍生物的示意图。(A)原始鼠二价mAb;(B)MvDN30,嵌合Fab;(C)ch0A-DN30,嵌合单价“单臂”抗体;(D)h0A-DN30,人源化单价“单臂”抗体;(E)0A-DN30抗体在还原和非还原条件下进行SDS-PAGE。凝胶用Gel Code蓝染色。

[0020] 图2:单价DN30-衍生分子与Met的结合。(A)MvDN30、ch0A-DN30、h0A-DN30抗体(液相)与人Met-Fc嵌合体(固相)的ELISA结合分析。(B)h0A-DN30-c103E08(液相)与Met-Fc嵌合体(固相)的ELISA结合分析;测定中包括人、小鼠、大鼠、猴来源的Met。使用抗人k链抗体揭示了结合。O.D.:光密度;AU:任意单位。每个点为三次重复值的平均值;条代表标准偏差。图形下方的表格报道了Kd值、结合最大值(Bmax)和拟合得分(R²)。(C)h0A-DN30-c103E08与Met结合的流式细胞仪分析,该Met在一组源自不同物种的细胞系(EBC-1,人肺癌;C2C12小鼠肌肉成肌细胞;H9C2大鼠心脏成肌细胞;MDCK狗肾细胞;Cos-7猴肾细胞)的表面处表达。新分子以高亲和力与人Met-Fc结合;抗体与人、大鼠、狗和猴Met交叉反应。

[0021] 图3:单价DN30衍生分子的激动活性。分散测定。将HPAF-II细胞与指定浓度的HGF(Met配体)、DN30 mAb(部分激动剂)、MvDN30(完全拮抗剂)和嵌合或人源化单臂抗体一起孵育24小时。所有DN30衍生的单价分子都不诱导细胞分散,细胞分散是Met介导的生物学反应。

[0022] 图4:在经单价DN30衍生分子处理的细胞中Met的脱落(shedding)和下调。将A549细胞在无血清培养基中与指定的渐增浓度的MvDN30、ch0A-DN30或h0A-DN30衍生物一起孵育48小时。通过使用抗Met抗体对细胞提取物进行蛋白质印迹分析来确定总的Met水平。检测到的条带对应于受体的成熟形式(p145 Met)。作为上样对照,用不相关的蛋白质(黏着斑蛋白)探测滤膜。通过使用抗Met抗体的条件培养基的蛋白质印迹分析来确定Met的脱落。检测到的条带对应于受体脱落的胞外结构域(p80 Met胞外域)。表格报告了按相应的黏着斑蛋白信号归一化的每个蛋白质印迹条带的像素强度定量,如使用ImageJ软件通过光密度法所测量。所有的单价单臂抗体均下调Met并诱导Met脱落。

[0023] 图5:单价DN30衍生分子对Met激活的抑制。将GTL-16(归因于通过MET基因扩增维持的受体过度表达的携带组成型活性Met的MET成瘾细胞)在加入h0A-DN30或ch0A-DN30抗体(1000或250nM)的无血清培养基中孵育24小时。通过用对磷酸化的Tyr^{1234/1235}Met残基(主

要的磷酸化位点)特异性的抗Met抗体进行蛋白质印迹法,确定总的细胞裂解物中的Met激活。用抗Met抗体再次探测相同的印迹。为了控制蛋白质负荷,还用抗黏着斑蛋白抗体对滤膜进行了探测。嵌合和人源化单臂抗体会抑制Met磷酸化。

[0024] 图6:经单价DN30衍生分子处理的MET成瘾细胞的活力。将GTL-16人胃癌细胞接种在96孔板中的10% FCS培养基中。24小时后,用渐增浓度的MvDN30、chOA-DN30或hOA-DN30抗体将细胞再处理72小时。通过Cell titer-glo评价细胞数目。曲线图呈现了相对于未经处理的对照而言活细胞的百分数。每个点为三次重复值的平均值。表格报告了经计算的IC₅₀值和拟合得分(R²)。单臂分子抑制MET成瘾细胞的细胞生长。

[0025] 图7:通过用单价DN30衍生分子处理诱导的MET成瘾细胞的增殖和死亡。(A) 增殖测定:将GTL-16人胃癌细胞接种在6孔板中的10% FCS培养基中。24小时后,用固定浓度(1μM)的MvDN30、chOA-DN30或hOA-DN30-c103E08将细胞再处理48小时。然后向培养基中添加EdU(10nμM),再保持2小时。按照Click-iT EdU流式细胞术测定的程序通过细胞荧光计分析确定S期细胞的百分数。曲线图呈现了对于APC染色阴性和阳性的细胞(EdU+, S期细胞)。表格报告了S期细胞的百分数。(B) 细胞毒性测定:将GTL-16人胃癌细胞接种在96孔板中的10% FCS培养基中。24小时后,用渐增浓度的MvDN30、chOA-DN30或hOA-DN30-c103E08将细胞再处理48小时。通过Cell-Tox Green测定法评价细胞毒性。图形呈现了相对于未经处理的对照而言细胞毒性的增加。每个点为三次重复值的平均值。表格报告了EC₅₀计算值和拟合得分(R²)。单臂分子有效地阻断MET成瘾细胞中的增殖并诱导细胞毒性。

[0026] 图8:在用hOA-DN30-c103E08处理的细胞中HGF诱导的细胞运动性。将HPAF-II细胞用指示浓度的hOA-DN30-c103E08单独地或与DecoyMet^{K842E}组合地(与hOA-DN30-c103E08相同的量)预处理18小时,然后与HGF(6.25ng/ml)一起孵育24小时)。hOA-DN30-c103E08抑制HGF诱导的细胞运动性;与DecoyMet^{K842E}的组合更有效地抵抗细胞反应。

[0027] 图9:经hOA-DN30-c103E08处理的细胞的侵袭。将HPAF-II细胞接种在涂有基质胶的Transwell滤膜的上腔室中的无血清培养基中,该培养基含单独的0.5μM的hOA-DN30-c103E08或与1μM的DecoyMet^{K842E}的组合。在下腔室中加入具有HGF(25ng/ml)的培养基。24小时后,通过染色和显微镜观察来评价迁移到滤膜下部的细胞。hOA-DN30-c103E08抑制HGF诱导的细胞侵袭;与DecoyMet^{K842E}的组合阻断生物反应。

[0028] 图10:hOA-DN30-c103E08对PD-L1表达的调制。单独地或与250nM hOA-DN30-c103E08组合地采用50ng/ml的IFN-γ处理GTL-16细胞。48小时后,裂解细胞;通过蛋白质印迹评价总蛋白提取物上的PD-L1表达和Met激活。作为上样对照,用抗GAPDH抗体探测滤膜。

[0029] 图11:MvDN30、DN30 mAb和hOA-DN30-c103E08的体内药代动力学特征。向免疫缺陷小鼠静脉内注射单剂量(100μg)的MvDN30、DN30 mAb或hOA-DN30。在不同的时间点采集外周血。通过ELISA测量治疗分子的血清浓度。图形呈现了循环的分子的数量与时间的关系。样品一式三份;条表示标准偏差。

[0030] 图12:通过用单价DN30衍生物治疗来抑制体内MET成瘾肿瘤生长。在免疫缺陷NOD-SCID小鼠的腹侧面中接种1×10⁶GTL-16MET成瘾胃癌细胞。当肿瘤的平均体积达到68.4±5.4mm³时,将小鼠随机分为4个均匀的组并用30mg/kg的MvDN30、chOA-DN30或hOA-DN30-c103E08通过静脉内注射进行处理,每周2次。作为对照,一组用相同体积的PBS(媒介物)处理。用卡尺定期监测肿瘤的生长。15天后,处死小鼠。(A) 肿瘤生长的动力学;(B) 实验结束时

以未经处理组的百分数报告的肿瘤体积。h0A-DN30-c103E08比ch0A-DN30更有效地抑制MET成癌肿瘤生长。

[0031] 图13:通过h0A-DN30-c103E08处理对体内MET成癌肿瘤生长的剂量反应抑制。在免疫缺陷NOD-SCID小鼠的腹侧面中接种 1×10^6 GTL-16MET成癌胃癌细胞。8天后,肿瘤的平均体积达到 $80.7 \pm 2\text{mm}^3$,将小鼠随机分为5个均匀的组并用渐增浓度的h0A-DN30-c103E08通过静脉内注射进行处理。作为对照,一组用相同体积的PBS(媒介物)处理。用卡尺定期监测肿瘤的生长。17天后,处死小鼠,切除肿瘤并称量。(A)肿瘤生长的动力学;(B)肿瘤重量。h0A-DN30-c103E08以剂量反应特性抑制MET成癌的肿瘤生长。

[0032] 图14:ch0A-DN30和h0A-DN30-c103E08抗体的VL、VH、CL和CH1结构域的氨基酸序列。互补决定区序列用加粗的、带下划线的字符突出显示。

[0033] 图15:0A-DN30的第一和第二Fc多肽的氨基酸序列。第一和第二Fc多肽的CH3结构域内的氨基酸突变—分别是产生杵和臼所必需的一用加粗的、带下划线的字符突出显示。

[0034] 图16:DecoyMet的突变形式的氨基酸序列。氨基酸突变K842E以加粗的、带下划线的字符突出显示。

具体实施方式

[0035] 在以下描述中,给出了许多具体细节以提供对实施方案的透彻理解。可在没有—个或多个所述具体细节的情况下,或者在有其他方法、部件、材料等的情况下实践实施方案。在其他情况下,未示出或详细描述熟知的结构、材料或操作以避免混淆实施方案的方面。

[0036] 在整个本说明书中,对“一个实施方案”或“实施方案”的提及意味着结合该实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在至少一个实施方案中。因此,在整个本说明书中各处出现的表述“在一个实施方案中”或“在实施方案中”不一定都指同一个实施方案。此外,可以任何合适的方式在一个或多个实施方案中组合这些特定的特征、结构或特性。

[0037] 本文提供的标题仅为方便起见,而不解释实施方案的范围或含义。

[0038] 本公开涉及用于治疗肿瘤和/或转移的新型治疗剂。

[0039] 据估计,每年有超过200,000名患者“MET成癌”,而Met抑制可潜在地导致该疾病的缓解。考虑到突变会随年龄的增长而累积并且在未来的20年里老年人口将增加,故癌症的负担预计会增加并将对全球的患者管理医疗保健资源产生重大影响。在胃癌、食管癌、结直肠癌、肾癌、肺癌、黑素瘤和脑瘤中已发现导致“MET成癌”的遗传改变(参见COSMIC数据库:www.sanger.ac.uk)。此外,已发现一批MET遗传损伤是结直肠癌和非小细胞肺癌(NSCLC)中对许多其他靶向疗法的耐药性的一种获得性机制⁹。

[0040] Met在转移中的作用还与Met帮助细胞适应恶劣环境的能力有关。Met驱动转移能力不仅取决于遗传和表观遗传学改变,还取决于肿瘤基质组织的HGF旁分泌,肿瘤基质组织由多种细胞类型组成,包括成纤维细胞、驻留的上皮细胞、周细胞、成肌纤维细胞、血管和淋巴管内皮细胞及免疫系统的浸润细胞。

[0041] 如今,Met已被识别为癌症特异性靶标来:(i)个性化治疗具有MET突变/扩增(“对MET成癌”)的肿瘤;(ii)预防/逆转由Met驱动的对其他靶向癌症疗法的原发性和继发性耐药性;(iii)预防/逆转由Met驱动的侵袭/转移表型¹。

[0042] DN30抑制活性依赖于其促进在细胞表面处作用的金属蛋白酶ADAM-10的生理活性的能力¹⁰,该酶会从质膜释放受体的完整细胞外部分(Met脱落),Met胞内激酶结构域随后迅速降解¹¹。这些过程的结果是, Met从细胞表面物理移除,而胞外结构域则充当可溶性的“诱饵”,通过螯合HGF防止配体结合。因此, DN30的优势在于同时抑制Met的HGF依赖性和HGF无关性激活¹²。

[0043] 与其他抗Met抗体相比, DN30通过一种独特的机制来阻断受体功能,该机制引起不同且协同的作用: (i) 通过胞外域的“脱落”从细胞表面移除Met; (ii) 螯合HGF配体; (iii) 抑制膜处Met受体的同二聚化或异二聚化; (iv) 刺激受体降解。因此, DN30提供了一石二鸟的机会,从而允许最佳地阻断Met通路,因为它不仅可潜在地作用于癌细胞,而且可潜在地作用于肿瘤微环境(内皮细胞、成纤维细胞和巨噬细胞的HGF驱动生物学反应)。

[0044] 本发明基于的想法是,为了借助于抗Met抗体达到对肿瘤的最高治疗潜力,必须应用一种分子,该分子: i) 不会引起、甚至也不会部分引起Met激活时所诱发的细胞内反应,即不是激动剂也不是部分激动剂; ii) 通过不同于配体(HGF)置换的作用机制削弱Met的激活; iii) 具有有利的药代动力学特征,适合在临床中采用; iv) 合理地不在人类中产生免疫反应。为满足所有上述考虑事项,本发明人通过将其转换为“单臂”形式而将鼠DN30抗体一其通过脱落机制阻断Met激活一转化为完全人源化的单价且高度稳定的分子,下文中命名为“h0A-DN30”。

[0045] 在一个实施方案中,本发明涉及包含单个抗原结合臂和Fc区的抗Met抗体片段,其中所述Fc区包含第一和第二Fc多肽的复合物。所述抗体片段包含以下、优选由以下组成:

[0046] (i) 第一多肽,其包含以下、优选由以下组成:一个人源化轻链可变(VL)结构域和一个人轻链恒定(CL)结构域,其中沿N-至C-末端的方向,人源化轻链可变(VL)结构域与人轻链恒定(CL)结构域融合,其中人源化轻链可变(VL)结构域含有三个互补决定区(CDR),其具有SEQ ID No.:1、2和3中所列明的氨基酸序列,并且其中人源化轻链可变(VL)结构域具有如SEQ ID No.:7中所列明的氨基酸序列;

[0047] (ii) 第二多肽,其包含一个人源化重链可变(VH)结构域、一个人重链恒定CH1结构域和第一Fc多肽,其中所述第一Fc多肽包含一个人铰链区、一个人恒定CH2结构域和一个人恒定CH3结构域,其中沿N-至C-末端的方向,人源化重链可变(VH)结构域与人重链恒定CH1结构域融合,人重链恒定CH1结构域与人铰链区融合,人铰链区与人恒定CH2结构域融合,而人恒定CH2结构域与人恒定CH3结构域融合,并且其中人源化重链可变(VH)结构域含有三个互补决定区(CDR),其具有SEQ ID No.:4、5和6中所列明的氨基酸序列,并且其中人源化重链可变(VH)结构域具有如SEQ ID No.:8中所列明的氨基酸序列;

[0048] (iii) 第三多肽,其包含以下、优选由以下组成:第二Fc多肽,其中所述第二Fc多肽包含以下、优选由以下组成:一个人铰链区、一个人恒定CH2结构域和一个人恒定CH3结构域,其中沿N-至C-末端的方向,铰链区与人CH2恒定结构域融合,人CH2恒定结构域与人CH3恒定结构域融合,其中铰链区在N-末端处被截短。

[0049] 在一个实施方案中,人轻链恒定(CL)结构域为人轻 κ 型结构域。

[0050] 在一个实施方案中,人铰链区及人恒定结构域CH1、CH2和CH3来自人IgG1。

[0051] 在一个实施方案中,两个Fc多肽在铰链区通过分子间二硫键连接。

[0052] 在一个实施方案中,第一Fc多肽和第二Fc多肽在界面处相遇,并且第一和第二Fc

多肽中的一个在界面处包含杵,而第一和第二Fc多肽中的另一个在界面处包含臼,其中所述杵可定位到所述臼中。

[0053] 在一个优选的实施方案中,第一和第二Fc多肽中的一个包含突变的CH3恒定结构域,其中所述突变的CH3恒定结构域在位置389处携带氨基酸突变,其中位置389处的原始氨基酸已被突变以导入比原始氨基酸具有更大侧链体积的氨基酸,从而在Fc多肽之间的界面处产生杵;并且其中第一和第二Fc多肽中的另一个包含突变的CH3恒定结构域,其中所述突变的CH3恒定结构域在位置389、391和438处携带三个氨基酸突变,其中原始氨基酸已被突变以导入比原始氨基酸具有更小侧链体积的氨基酸,从而在Fc多肽之间的界面处产生臼,其中所述杵可定位到所述臼中,并且其中氨基酸编号根据的是Kabat的EU编号方案(Sequences of proteins of immunological interest,第5版,Vol.1,1991(NIH,马里兰州贝塞斯达)中第688-696页)。

[0054] 在一个仍然优选的实施方案中,位置389、391和438处的原始氨基酸分别为苏氨酸、亮氨酸和酪氨酸;并且其中在第一和第二Fc多肽中的一个中,位置389中的苏氨酸已被突变为色氨酸;并且其中在第一和第二Fc多肽中的另一个中,位置389处的苏氨酸已被突变为丝氨酸、位置391处的亮氨酸已被突变为丙氨酸而位置438处的酪氨酸已被突变为缬氨酸。

[0055] 在一个优选的实施方案中,人轻链恒定(CL)结构域具有如SEQ ID No.:9中所列明的氨基酸序列而人重链恒定CH1结构域具有如SEQ ID No.:10中所列明的氨基酸序列。

[0056] 在一个优选的实施方案中,第一人Fc多肽具有如SEQ ID No.:11中所列明的氨基酸序列,而第二人Fc多肽具有如SEQ ID No.:12中所列明的氨基酸序列。

[0057] 在一个实施方案中,本发明涉及编码如上文所公开的抗Met抗体片段的分离的核酸。

[0058] 在一个实施方案中,本发明涉及包含两种或更多种重组核酸的组合物,所述重组核酸共同编码如上文所公开的抗Met抗体片段。

[0059] 当与Met结合时,本文公开的抗Met抗体片段将诱导Met的胞外结构域的脱落。当与Met结合时,所述抗Met抗体片段对Met不发挥激动活性。当与Met结合时,所述抗Met抗体片段将抑制Met磷酸化。当与Met结合时,所述抗Met抗体片段会进一步阻断MET成瘾细胞中的增殖并诱导细胞毒性。当与Met结合时,所述抗Met抗体片段会进一步抑制由肝细胞生长因子(HGF)诱导的细胞运动性和细胞侵袭。本说明书的目的抗Met抗体片段的前述性质为所述抗体片段提供了抗肿瘤和/或抗转移活性。

[0060] 如本文所用,表述“抗原结合臂”是指本发明的抗体片段的具有特异性结合目标靶分子的能力的组成部分。抗原结合臂是免疫球蛋白轻链和重链的可变结构域序列(VL和VH)(包括CDR和框架区)与免疫球蛋白轻链和重链的恒定结构域序列(CL和CH)的复合体。

[0061] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式为非天然重组抗体,其含有极少的源自非人免疫球蛋白的氨基酸残基。就绝大部分而言,人源化抗体为人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的高变区(即互补决定区—CDR)的残基被替换为具有所需的特异性、亲和力和性质的来自非人物种的高变区的残基(供体抗体)。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基可被替换为相应的非人残基。

[0062] 此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰

是为了进一步改善抗体性能。通常,人源化抗体包含两个可变结构域,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,而所有或基本上所有的框架残基(FR)为人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。关于更多详情,参见¹³⁻¹⁵。也参见以下综述文章和其中引用的参考文献:¹⁶⁻¹⁸。

[0063] 如本文所用,术语“Fc区”通常是指包含免疫球蛋白重链的C-末端多肽序列的二聚体复合物,其中C-末端多肽序列为可通过完整抗体的木瓜蛋白酶消化而获得的多肽序列。Fc区可包含天然或变异的Fc序列。尽管免疫球蛋白重链的Fc序列的边界可能不同,但根据Kabat的EU编号方案,人IgG1重链Fc序列通常定义为从Asp 234与Thr 238之间包含的氨基酸残基延伸到Fc序列的羧基末端。免疫球蛋白的Fc序列通常包含一个铰链区、两个恒定结构域:CH2结构域和CH3结构域,并任选地包含CH4结构域。在本文中,“Fc多肽”指的是构成Fc区的多肽之一。Fc区会增加抗体片段与包含抗原结合臂的Fab分子相比的稳定性。

[0064] 如本文所用,“铰链区”、“铰链序列”及其变型具有本领域已知的含义,其在例如Janeway等,Immuno Biology:the immune system in health and disease(Elsevier Science Ltd.,NY)(第4版,1999)和^{19,20}中有说明。

[0065] 如本文所用,短语“截短的铰链区”是指包含部分而非全部铰链序列的多肽。截短的铰链区能够与“第一”Fc多肽连接。如果不存在野生型铰链序列,则“第二”Fc多肽中的其余序列将包含能够与“第一”Fc多肽连接的组分。例如,所述组分可以是能够形成二硫键的修饰残基或外加半胱氨酸残基。

[0066] “杵”是指至少一个氨基酸侧链,其从第一Fc多肽的界面突出并因此可定位在相邻界面(即,第二Fc多肽的界面)中的互补的臼中以稳定异源多聚体,从而比例如同源多聚体的形成更有利于异源多聚体的形成。杵可存在于原始界面中或可以合成方式引入(例如,通过改变编码界面的核酸)。通常,改变编码第一多肽的界面的核酸以编码杵。为此,用编码至少一个比原始氨基酸残基具有更大侧链体积的“导入”氨基酸残基的核酸替换编码第一多肽的界面中的至少一个“原始”氨基酸残基的核酸。应理解,可有不止一个原始和相应的导入残基。被替换的原始残基的数目上限为第一多肽的界面中残基的总数。

[0067] “臼”是指至少一个氨基酸侧链,其从第二Fc多肽的界面凹进并因此容纳相邻的第一Fc多肽的界面上的相应杵。臼可存在于原始界面中或可以合成方式引入(例如,通过改变编码界面的核酸)。通常,改变编码第二多肽的界面的核酸以编码臼。为此,用编码至少一个比原始氨基酸残基具有更小侧链体积的“导入”氨基酸残基的核酸替换编码第二多肽的界面中的至少一个“原始”氨基酸残基的核酸。应理解,可有不止一个原始和相应的导入残基。被替换的原始残基的数目上限为第二多肽的界面中残基的总数。

[0068] 杵“可定位”到臼中,这意味着杵和臼分别在第一Fc多肽和第二Fc多肽的界面上的空间位置及杵和臼的尺寸使得杵可就位于臼中而不明显干扰界面处第一和第二多肽的正常缔合。由于杵通常不从界面的轴垂直地延伸并具有优选的构象,故杵与相应的臼的对准依赖于基于三维结构如通过X-射线晶体学或核磁共振(NMR)获得的三维结构对杵/臼对建模。这可使用本领域普遍认可的技术实现。

[0069] 如本文所用,抗Met抗体片段的表述“非激动剂活性”是指不发挥引起、甚至是部分引起Met激活时所诱发的细胞反应的任何活性的抗Met抗体片段。抗Met抗体片段的非激动

剂活性可通过常规技术如蛋白质印迹法、免疫荧光、免疫组织化学、ELISA、细胞荧光计分析或任何其他方法通过评价磷酸化的Met水平来测量,所述其他方法包括使用在与所述非激动剂抗体一起孵育细胞时将特异性识别Met、或如果磷酸化将特异性识别Met残基Tyr¹²³⁴⁻¹²³⁵ (即, Met的主要磷酸化位点²¹) 或如果磷酸化将特异性识别Met残基Tyr^{1349/1356} (即, Met的停泊位点²³) 的抗体。作为一个替代方案,可应用与通过HGF处理所诱导的反应相比较地对抗体处理时的细胞生物学反应进行的评估。

[0070] 本发明还涉及一种产品,其在单个瓶中或在两个瓶中包含 (a) 如本文所公开的抗Met抗体片段和药学上可接受的媒介物,以及 (b) 人Met的细胞外部分和药学上可接受的媒介物,其中人Met的细胞外部分能够以稳定的方式与肝细胞生长因子 (HGF) 结合并在由抗Met抗体片段识别的表位内含有至少一个氨基酸突变以防止抗Met抗体片段与其的结合。

[0071] 在一个实施方案中,人Met的细胞外部分含有SEMA、PSI、IPT-1、IPT-2、IPT-3和IPT-4结构域。

[0072] 在一个优选的实施方案中,人Met的细胞外部分具有如SEQ ID No.:13中所列明的氨基酸序列,其中在SEQ ID No.:13的位置797和位置875之间的至少一个氨基酸经突变以防止抗Met抗体片段与其的结合。

[0073] 在一个更优选的实施方案中,人Met的细胞外部分具有SEQ ID No.:14中所列明的氨基酸序列。

[0074] 本说明书还涉及一种编码人Met的细胞外部分的核酸分子,该细胞外部分能够以稳定的方式与肝细胞生长因子 (HGF) 结合并在由抗Met抗体片段识别的表位内含有至少一个氨基酸突变以防止抗Met抗体片段与其的结合,优选地人Met的细胞外部分具有SEQ ID No.:14中所列明的氨基酸序列。

[0075] 如本文所用,表述“人Met的细胞外部分能够以稳定的方式与人HGF结合”指的是人Met的细胞外部分以不高于100nM的经计算Kd与HGF结合。

[0076] 如本文所用,表述“人Met的细胞外部分在由抗Met抗体片段识别的表位处含有至少一个氨基酸突变”指的是在Met的细胞外部分内存在一个或多个能够在Met的细胞外部分内诱导修饰的突变(即,氨基酸取代和/或缺失和/或插入),该修饰将防止上述区域被抗Met抗体可变结构域占用。鉴于其公知常识(由在DNA复制过程中使用特定引物生成在给定DNA序列中包含单个核苷酸变化的cDNA的可能性代表;参见Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1982),技术人员不需要关于实现人Met的细胞外部分的突变形式的进一步详情,该突变形式保留与人HGF结合的能力但不与抗Met抗体片段结合。因此,本发明决不能理解为仅涵盖如本文所公开的人Met的突变细胞外部分(即,SEQ ID No.:14),因为本领域技术人员根据公知常识可得到具有SEQ ID No.:13的人Met的细胞外部分的将防止抗Met抗体与其的结合的其他突变形式。

[0077] 术语“SEMA”、“PSI”、“IPT-1”、“IPT-2”、“IPT-3”和“IPT-4”是指构成Met的细胞外区域的Met结构域。这样的结构域名称属于技术人员的公知常识,如由^{23,24}所代表。SEMA结构域是与脑信号蛋白和神经丛蛋白共有的蛋白质相互作用模块,其涵盖Met (SEQ ID No.:13) 的氨基酸25-516之间的区域;PSI是与神经丛蛋白、脑信号蛋白和整联蛋白共有的结构域,其涵盖Met (SEQ ID No.:13) 的氨基酸519-561之间的区域;IPT结构域—重复四次—是与神经丛蛋白和转录因子共有的免疫球蛋白样区域,其涵盖MET (SEQ ID No.:13) 的氨基酸563-

934之间的区域。详细来说,IPT重复1覆盖SEQ ID No.:13的氨基酸位置563-656,IPT重复2覆盖SEQ ID No.:13的氨基酸位置657-740,IPT重复3覆盖SEQ ID No.:13的氨基酸位置741-837,IPT重复4覆盖SEQ ID No.:13的氨基酸位置838-934。

[0078] 本发明还涉及如本文所公开的抗Met抗体片段任选地与如本文所公开的人Met的细胞外部分组合地用于治疗患有肿瘤和/或转移的患者的治疗用途,其中所述患者携带MET基因的遗传改变。

[0079] 本发明还涉及如本文所公开的抗Met抗体片段与如本文所公开的人Met的细胞外部分组合地用于治疗患有肿瘤和/或转移的患者的治疗用途,其中所述患者携带野生型MET基因。

[0080] 在一个方面,本发明提供了一种在受试者中治疗肿瘤和/或转移的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的抗Met抗体片段,其任选地与人Met的细胞外部分组合,由此治疗所述病况。

[0081] 在一个方面,本发明提供了一种抑制表达Met的细胞的生长的方法,所述方法包括使所述细胞与本文公开的抗Met抗体片段接触,其任选地与本发明的人Met的细胞外部分组合,从而使得所述细胞的生长受到抑制。

[0082] 在一个方面,本发明提供了一种治疗性治疗患有癌性肿瘤和/或转移的哺乳动物的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所公开的抗Met抗体片段,其任选地与人Met的细胞外部分组合,从而有效地治疗所述哺乳动物。

[0083] 在一个方面,本发明提供了一种用于治疗细胞增殖性病症的方法,所述方法包括向需要这种治疗的受试者施用有效量的本公开的目的抗Met抗体片段,其任选地与人Met的细胞外部分组合,从而有效地治疗或预防所述细胞增殖性病症。

[0084] 在一个方面,本发明提供了一种在哺乳动物中治疗性治疗肿瘤和/或转移的方法,其中所述肿瘤的生长至少部分地取决于Met/HGF系统的生长增强效应,该效应是细胞增殖的增加、细胞凋亡的保护或两者共同的结果。所述方法包括使肿瘤细胞与有效量的抗Met抗体片段接触,其任选地与有效量的本发明的人Met的细胞外部分组合,从而有效地治疗所述肿瘤和/或转移。

[0085] 可用任选地与人Met的细胞外部分组合的抗Met抗体有效治疗的肿瘤选自乳腺癌、结直肠癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、中枢神经系统癌症、肾癌、肝癌、膀胱癌、胃癌、头颈部肿瘤细胞、乳头状癌(例如,甲状腺)、黑素瘤、淋巴瘤、骨髓瘤、神经胶质瘤/成胶质细胞瘤(例如,间变性星形胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、间变性少突胶质细胞瘤、间变性少突胶质星形细胞瘤)、白血病细胞、肉瘤、横纹肌肉瘤或属于原发性不明癌(CUP)的肿瘤。

[0086] 在一个实施方案中,在本发明的方法中治疗性靶向的细胞为过度增殖和/或增生细胞。在一个实施方案中,在本发明的方法中靶向的细胞为异常增生的细胞。在又一个实施方案中,在本发明的方法中靶向的细胞为转移性细胞。在再一个实施方案中,在本发明的方法中靶向的细胞为属于维持肿瘤和/或转移的微环境的Met表达细胞。

[0087] 本发明人证实,通过CH3结构域的经选择点突变获得并导致有效的Fc异二聚化的单臂结构产生单价形式的抗体。

[0088] 单价对于DN30归因于抗体的二价天然结构的最终激动活性的避免至关重要。

[0089] 出人意料且令人惊奇地,本发明人发现DN30的一种人源化单臂形式(即,h0A-DN30-c103E08)在体外和体内均显示出强大的抑制性质。

[0090] 与相应的嵌合形式(以下称为“ch0A-DN30”)和本文公开的所有其他人源化单臂衍生物(称为“h0A-DN30抗体”) (关于从DN30衍生的所有单臂抗体的详细描述,参见“材料和方法”部分)相比,h0A-DN30-c103E08在体外显示出优异的活性。出人意料地,与受试的其他0A-DN30嵌合或人类抗体相比,h0A-DN30-c103E08以更高的亲和力与Met结合。无法预测地,本发明人发现脱落反应因提高DN30抗体对Met的亲和力而增强。因此,以磷酸化的Met受体的量来衡量,对Met激活的抑制作用更强。这些活性转化为Met介导的生物学反应的抑制。在非常低的剂量下发生MET成瘾肿瘤细胞生长的削弱;h0A-DN30-c103E08 IC₅₀在分析中包括的对0A-DN30嵌合或人类抗体测量的所有那些IC₅₀中是最低的。对肿瘤细胞生长的更好抑制可能是由于更广泛的细胞增殖阻断和/或更明显的细胞毒性增加。

[0091] h0A-DN30-c103E08在体内也显示出改善的治疗潜力。如果用MvDN30进行比较,则这是期望的,因为其分子量低,MvDN30是一种具有高的肾清除率的分子。MvDN30不良的药代动力学性质会大大影响该分子在体内实验模型中的性能。

[0092] 人们可能认为达到比肾清除临界值高的分子量本身足以引起最佳的治疗反应,但事实并非如此。实际上,用DN30 mAb的DCD-1和DCD-2衍生物—相对于MvDN30具有增大尺寸的重组分子—获得的结果清楚地表明,药代动力学特征仅得到部分改善,并且治疗反应限于肿瘤生长率的降低⁸。

[0093] h0A-DN30-c103E08的优异活性可能部分归因于Fc区的存在,该区由于与Fc受体的结合而在抗体的组织/器官分布中产生差异,从而提供高度有利的药代动力学特征。

[0094] 在奥那妥珠单抗应用过程中已讨论并公开了与因Fc区的存在而致的体内稳定性有关的积极方面。该单抗是以单臂形式设计的一种抗Met抗体²⁵。然而,该抗体在细菌中产生,因此不被糖基化。因此,它缺乏激活抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力。相反,h0A-DN30-c103E08在哺乳动物细胞中产生并因此必须被认为完全能够引起Fc效应子功能。

[0095] h0A-DN30-c103E08与奥那妥珠单抗的作用机理也不同。第一种抗体诱导Met受体脱落、从细胞表面擦除Met并像海绵一样将HGF吸收在细胞外环境中,而第二种抗体则与HGF竞争Met结合。因此,h0A-DN30抑制Met独立于维持癌受体的异常激活的机制,而奥那妥珠单抗仅在配体依赖性激活的情况下有效。

[0096] Fc区的存在不是h0A-DN30-c103E08所获得的体内治疗反应的显著改善的原因,因为该结构域存在于所有受试的人源化和嵌合单臂抗体中。人源化和嵌合单臂抗体不共有的是可变区,抗体的结合位点位于可变区中。特别地, DN30 CDR—在所有衍生物中都相同—插入框架区中。抗体的这些部分,即便不直接涉及形成结合口袋,也包括称为游标(Vernier)残基的特定氨基酸²⁶,这些氨基酸可影响CDR结构的最终构象并因此可决定抗体对抗原的最终亲和力。DN30 CDR与框架序列(即,c103E08的重链和轻链可变结构域的序列)组合将产生具有更强亲和力的抗Met抗体,这很可能是因为该序列组合生成的结合口袋与Met受体上的相应表位更匹配。抗体与Met之间更稳健的相互作用进一步实现了受体的脱落和Met介导的生物学反应的随之削弱。这与因单臂形式而改善的血浆稳定性相结合产生了一种具有对抗MET成瘾/驱动癌症的出乎意料的优异活性的抗体—即c103E08。

[0097] Basilico等人²⁷中报道的数据显示,HGF和Met的同时靶向在肿瘤和/或转移的治疗中产生更高的治疗稳健性。本文见证的实验数据出乎意料地显示,借助于hOA-DN30与DecoyMet^{K842E}的组合对MET/HGF轴的抑制优于将MvDN30与DecoyMet^{K842E}组合应用时所获得的抑制。实际上,将侵袭测试中获得的结果(这里在图9中报告)与Basilico等人²⁷中发表的结果相比较发现,如果MvDN30是该组合的一部分,则hOA-DN30将消除HGF驱动的癌细胞侵袭,同时残余活性仍然存在。

[0098] 无MET遗传改变的癌细胞利用由MET癌基因触发的“生理”程序作为“权宜(expedient)”来促进恶性表型并响应于应激条件如缺氧、电离辐射或化学疗法而释放侵袭性的转移表型。“权宜”要求由其配体HGF刺激野生型MET。本文提供的数据显示,在MET“权宜”的情况下,击中MET/HGF轴的两侧的同时干预将导致改善的抑制活性。hOA-DN30-c103E08通过胞外域的“脱落”来诱导MET从细胞表面的物理移除。后者释放在细胞外环境中并充当HGF的“诱饵”。重组DecoyMet的外源供给将增强由hOA-DN30-c103E08生成的内源DecoyMet的HGF螯合活性。hOA-DN30-c103E08和DecoyMet^{K842E}的组合同时作用于表达Met的癌细胞和分泌HGF的肿瘤基质。这允许HGF驱动的Met信号传导的最佳阻滞并因此对于荷有表达依赖于MET来维持侵袭/转移表型的野生型MET的肿瘤的大批患者来说是一种可靠的治疗选择。

[0099] 鉴于与重组DNA技术有关的领域的公知常识,如由Maniatis T.Molecular cloning:A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory(1982)所代表,技术人员可容易地以蛋白质的形式或以编码蛋白质的核酸分子的形式制造本文公开的蛋白质(即,人源化抗Met抗体和人Met的细胞外部分)。例如,可遵循以下标准程序:(i)合成相应的cDNA序列,(ii)将cDNA插入到适合通过常规重组DNA方法在哺乳动物中表达的质粒中,(iii)用哺乳动物细胞系的上述质粒进行瞬时或稳定的共转染,(iv)收集培养物上清液,(v)通过重组蛋白的亲亲和层析纯化。

[0100] 包含本发明的一种或多种活性成分,即单独的或与人Met的细胞外部分组合的人源化抗Met抗体片段的治疗组合物可用生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编,1980)以水溶液、冻干或其他干燥制剂的形式制备。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并包括:缓冲剂;抗氧化剂;防腐剂;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯基吡咯烷酮;氨基酸;单糖、二糖和其他碳水化合物;螯合剂;糖;成盐抗衡离子;金属络合物和/或非离子表面活性剂。制剂还可含有对于所治疗的特定适应症所必要的其他一种或多种活性化合物,优选具有互补的活性、不会不利地影响单独的或与人Met的细胞外部分组合的hOA-DN30的治疗活性的那些。这样的分子合适地以对于预期目的有效的量组合存在。

[0101] 也可将所述一种或多种活性成分夹陷于借助例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编(1980)中公开的技术制备的微胶囊中。

[0102] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有本发明的活性成分的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质呈成型制品例如膜或微胶囊的形式。

[0103] 本发明的一种或多种活性成分可单独地或与另一种抗体、小分子酪氨酸激酶抑制剂、一种或多种化疗剂(包括化疗剂的混合物)、一种或多种其他细胞毒性剂、一种或多种抗

血管生成剂、细胞因子和/或一种或多种生长抑制剂组合地使用。这样的上述组合疗法包括组合施用(其中将两种或更多种药剂包括在相同或单独的制剂中)和单独施用,在这种情况下,h0A-DN30的施用可在一种或多种辅助治疗之前和/或之后进行。

[0104] 本发明的一种或多种活性成分(和一种或多种辅助治疗剂)通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内,并且如果需要局部治疗,可病灶内施用。本发明的一种或多种活性成分可合适地通过脉冲输注来施用,特别是用下降剂量的活性成分。给药可通过任何合适的途径进行,例如通过注射,如静脉内或皮下注射,这部分地取决于施用是短暂的还是长期的。

[0105] 本发明的一种或多种活性成分将按照与良好的医疗实践一致的方式配制、给药和施用。在此背景下考虑的因素包括正在治疗的特定病症、正在治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的原因、药剂的递送部位、施用的方法、施用的时间安排及执业医师已知的其他因素。本发明的一种或多种活性成分不必但可任选地与目前用于预防或治疗所讨论的病症的一种或多种药剂一起配制。这样的其他药剂的有效量取决于制剂中存在的本发明的一种或多种活性成分的量、病症或治疗的类型及上面讨论的其他因素。这些通常以与上文所用相同的剂量和施用途径使用,或以迄今所采用剂量的约1至99%使用。

[0106] 对于疾病的治疗,本发明的一种或多种活性成分(当单独地或与一种或多种其他药剂如一种或多种化疗剂组合地使用时)的适当剂量将取决于待治疗的疾病的类型,疾病的严重性和病程、活性成分是出于预防还是治疗目的而施用、患者的临床病史和对本发明的活性成分的反应均应适当考虑,并由主治医师决定。

[0107] h0A-DN30适合一次或通过一系列治疗施用于患者。取决于疾病的类型和严重性,约1mg/kg至30mg/kg的抗体是用于向患者施用的初始候选剂量,无论是例如通过一次或多次单独的施用还是通过连续输注。取决于上述因素,一种典型的日剂量可在约1 μ g/kg至100mg/kg或更多的范围内。对于若干天或更长时间的重复施用,取决于病情,持续治疗直至出现期望的疾病症状抑制。抗体片段的一种示例性剂量在约0.05mg/kg至约20mg/kg的范围内。因此,可向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg的一种或多种剂量(或其任何组合)。这样的剂量可间歇地施用,例如,每周或每三周(例如,使得患者接受约二至约二十个剂量的抗体,例如约六个剂量的抗体)。可施用初始较高的负荷剂量,然后施用一个或多个较低的剂量。一种示例性的给药方案包括施用约4mg/kg的初始负荷剂量,然后每周施用约2mg/kg抗体的维持剂量。然而,其他剂量方案可为有用的。通过常规技术和测定很容易监测该疗法的进展。关于组合疗法,人Met的细胞外部分优选在递送h0A-DN30的同时递送并与h0A-DN30成比例地给药,优选但不限于摩尔比1:1的h0A-DN30:DecoyMet^{K842E},取决于疾病的类型和严重性。

[0108] 结果

[0109] DN30抗体的嵌合和人源化单臂形式的生成。

[0110] 通过经典的分子生物学技术,本发明人用源自人免疫球蛋白的恒定结构域取代了DN30 mAb重链和轻链的恒定结构域。用人 κ 型结构域(在天然人抗体中更有代表性的结构域)取代轻链恒定结构域,而用源自人IgG1的同源结构域(可诱导ADCC/CDC的结构域)取代重链恒定结构域。

[0111] Fair Journey Biologics已使用噬菌体展示文库方法实现了DN30小鼠抗体的人

源化。他们从偏离的FR(框架)残基的鉴定和最近的人类V种系的分析开始,该种系选自对于CDR1-CDR2具有相同的规范式折叠组合的种系,使用了可用的工具和数据库:来自UCL的Andrew Martin博士的abYsistool外加<http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/>和<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>。在生成噬菌体展示文库—其中已进行了VH和VL区的随机化—时,已完成了四轮亲和力驱动的噬菌体展示筛选。在此过程的最后,选择具有最高人类同一性和同源性的DN30人源化变体。通过经典的分子生物学技术将可变区与源自人免疫球蛋白的恒定结构域序列(即人κ轻链和IgG1重链恒定结构域)连接。

[0112] 为了使嵌合和人源化抗体成为单臂单链形式,已在CH3区中插入了特定的氨基酸修饰以产生‘杵臼’结构^{28,29};一个CH3结构域携带杵突变:³⁸⁹T→W,另一个CH3结构域携带臼突变:³⁸⁹T→S;³⁹¹L→A;⁴³⁸Y→V。将编码嵌合或人源化轻链、嵌合或人源化重链(在CH3结构域中突变)和人Fc结构域(在CH3结构域中突变)的cDNA克隆到表达质粒中,然后在真核细胞中表达。通过亲和层析和凝胶过滤从细胞培养物上清液纯化组装的单臂抗体。图1示出了DN30衍生物和经纯化的重组OA-DN30分子在非还原和还原条件下的SDS-Page分离的示意图。

[0113] DN30单臂抗体以高亲和力识别Met。

[0114] 通过ELISA测定法分析了嵌合或人源化DN30抗体的经纯化单臂形式与Met受体的结合。作为参考,分析中包括嵌合DN30 Fab (MvDN30)¹²。该测定法组装为包括在固相中的Met-Fc和在液相中的DN30衍生物。使用抗人κ链抗体揭示了结合。数据显示,嵌合和人源化抗体均与Met结合,hOA-DN30-c103E08显示出最高的亲和力(图2的A)。

[0115] hOA-DN30-c103E08与非人Met受体的交叉反应性分析。

[0116] 本发明人通过进行以下测定分析了hOA-DN30-c103E08的物种交叉反应性:(i)用人、小鼠、大鼠和猴来源的经纯化Met胞外结构域进行ELISA测定(图2B);(ii)进行抗体与由人、小鼠、大鼠、狗和猴来源的细胞表达的表面Met的结合的流式细胞仪分析(图2C)。实验的结果表明,hOA-DN30-c103E08与人、大鼠、狗、猴来源的Met结合,而与小鼠Met的相互作用非常弱。

[0117] DN30单臂抗体不发挥激动性质。

[0118] 本发明人在高度灵敏的测定(分散测定)中测试了新的DN30衍生物是否会显示出Met激动活性。用递增浓度的抗体将HPAF-II人胰腺癌细胞(其代表用于测定响应于HGF刺激的细胞运动性的标准体系)刺激24小时。作为阳性对照,测定中包括HGF和二价DN30 mAb。虽然用阳性对照刺激的细胞明显分散,但用所有单价DN30衍生物(MvDN30、chOA-DN30和hOA-DN30抗体)处理的细胞的表型与未经处理的细胞的表型不可区分(图3)。

[0119] hOA-DN30强力诱导Met“脱落”。

[0120] 本发明人还研究了hOA-DN30是否保持促进受体脱落和下调的能力。将A549细胞与递增浓度的chOA-DN30和hOA-DN30抗体一起孵育。作为参考,测定中包括MvDN30。48小时后,使用针对Met的细胞外部分的单克隆抗体通过免疫印迹法对在条件培养基中释放的Met胞外域进行评分。还使用相同的抗体针对细胞裂解物测定了Met的总细胞水平。该分析揭示,所有的OA-DN30抗体均诱导了Met脱落,从而导致可溶性Met胞外域在细胞外空间中的释放并从细胞表面物理移除Met(图4)。出乎意料的是,与测试中包括的所有其他DN30衍生物相比,hOA-DN30-c103E08的活性更优异。

[0121] hOA-DN30-c103E08强力抑制Met磷酸化。

[0122] 本发明人研究了chOA-DN30和hOA-DN30抗体是否抑制源自人癌的细胞(即GTL-16)中的Met磷酸化。这些细胞具有组成型活性Met,这是由于基因扩增导致受体过度表达的结果。通过用抗phosphoMet抗体进行免疫印迹法来确定Met的激活。如图5中所示,所有分子均以剂量反应模式削弱Met磷酸化/激活。诱导细胞中Met水平的最强削弱的hOA-DN30-c103E08是更具活性的DN30衍生物。

[0123] hOA-DN30-c103E08强力抑制MET成瘾细胞生长。

[0124] Met抑制剂仅可在MET成瘾细胞中削弱细胞生长(活力),MET成瘾细胞依赖于Met信号传导来实现增殖/存活。为了测试DN30衍生物的活性,将呈指数生长的GTL-16细胞(MET成瘾人胃癌细胞)与递增浓度的chOA-DN30或hOA-DN30抗体一起孵育。测定中包括MvDN30作为阳性对照。72小时后,使用基于发光的ATP测定法测定细胞活力。所有的DN30衍生物均以剂量依赖性方式抑制MET成瘾细胞生长(图6)。hOA-DN30-c103E08显示出最高的抑制,IC₅₀比MvDN30低2.5倍,比chOA-DN30低5.4倍,并比其他hOA-DN30抗体低至少5.2倍(参见图6中的表)。

[0125] hOA-DN30-c103E08在阻断MET成瘾细胞中的增殖和诱导细胞毒性方面高度有效。

[0126] 为了进一步分析DN30衍生物对MET成瘾细胞生长所发挥的抑制作用的机制,本发明人评价了细胞增殖和细胞毒性,比较了MvDN30、chOA-DN30和hOA-DN30-c103E08。将GTL-16细胞与单剂量(1 μ M)的DN30衍生物一起孵育并通过用ClickIT Edu流式细胞术测定法测量被处于细胞周期的S期的细胞掺入的Edu(一种胸苷类似物)来评估细胞增殖。测定中包括MvDN30作为阳性对照。该分析揭示,与对照相比,DN30衍生物影响增殖,因为处于S期的经处理细胞的百分数急剧降低。特别地,最有效的分子为hOA-DN30-c103E08,其中仅4.9%的细胞仍在增殖(与对照相比减少84.2%)。在用chOA-DN30处理的群体中的增殖细胞为14.97%(与对照相比减少52%)(图7的A)。

[0127] 为了测试DN30衍生物是只诱导增殖的阻断还是它们也引起细胞毒性,将呈指数生长的MET成瘾GTL-16细胞与递增浓度的chOA-DN30或hOA-DN30-c103E08一起孵育。测定中包括MvDN30作为阳性对照。72小时后,通过向细胞中添加CellTox™绿色染料并测量细胞的荧光来测定细胞毒性,细胞的荧光与死细胞的数目成正比。所有的DN30衍生物均以剂量依赖性方式在GTL-16细胞中诱导了细胞毒性(图7的B)。hOA-DN30-c103E08显示出最高的诱导,EC₅₀分别比MvDN30和chOA-DN30低1.3倍和6.1倍。

[0128] hOA-DN30-c103E08单独和与DecoyMet组合抑制HGF诱导的细胞运动性。

[0129] 本发明人测试了hOA-DN30-c103E08抑制HPAF-II人胰腺癌细胞的HGF依赖性细胞运动性的能力。将细胞与或不与HGF一起孵育并用递增剂量的hOA-DN30-c103E08处理。24小时后,对细胞集落进行染色和分析。在该测定中,hOA-DN30-c103E08强力降低了HGF依赖性细胞分散(图8)。

[0130] 在上述细胞体系中,据报道,通过同时阻断配体(HGF)和受体(Met),可更有效地抑制HGF诱导的生物学反应²⁷。因此,本发明人测试了hOA-DN30-c103E08与DecoyMet^{K842E}的组合是否诱导更高的治疗反应。DecoyMet^{K842E}是一种重组的可溶性受体,其涵盖Met的整个细胞外区域,携带有将消除与DN30的相互作用的突变;其以高亲和力结合HGF并通过像海绵一样吸收和中和HGF及通过与仍存在于细胞表面上的完整Met受体形成异二聚体从而使它们失活来抑制配体驱动的生物活性。当两种分子等摩尔量组合时,完全逆转分散表型的有

效剂量比能够引起相似的细胞表型的单独的h0A-DN30-c103E08的剂量低4倍(图8)。

[0131] h0A-DN30-c103E08单独和与DecoyMet组合抑制HGF诱导的细胞侵袭。

[0132] 本发明人测试了h0A-DN30-c103E08抑制HPAF-II细胞的HGF依赖性细胞侵袭的能力。将细胞接种在涂有基质胶的Transwell滤膜的上腔室中的无血清培养基中,该培养基含单独的h0A-DN30-c103E08(0.5 μ M)或与DecoyMetK842E的组合(1 μ M)。使下腔室充满含有HGF(25ng/ml)的培养基。24小时后,通过染色和显微镜观察来评价迁移到滤膜的下部分上的细胞。在此测定中,h0A-DN30-c103E08强力减少了HGF依赖性细胞侵袭;h0A-DN30-c103E08与DecoyMet^{K842E}的组合几乎消除了细胞反应(图9)。

[0133] h0A-DN30-c103E08解除PD-L1表达的干扰素- γ 诱导。

[0134] 程序性细胞死亡配体1(PD-L1)和程序性细胞死亡受体1(PD-1)是关键的称为免疫检查点的调制分子,在免疫反应与肿瘤微环境之间的界面处发挥核心作用³⁰。它们可显著削弱免疫系统控制肿瘤进展的能力。肿瘤细胞表达PD-L1是可诱导的并且干扰素 γ (IFN γ)是最有效的诱导剂³¹。

[0135] 本发明人分析了h0A-DN30-c103E08对Met的抑制是否可调制IFN γ 通路和因此的PD-L1调节(图10)。用INF γ 处理MET成瘾GTL-16细胞48小时并分析IFN γ 可诱导的PD-L1表达。在未受刺激的情况下,PD-L1是不可检测的,而在暴露于IFN γ 时,其一致上调。用h0A-DN30-C103E08处理48小时显著削弱了由IFN γ 诱导的PD-L1的上调。

[0136] h0A-DN30-c103E08在体内显示出有利的药代动力学特征。

[0137] 本发明人研究了h0A-DN30-C103E08与MvDN30和嵌合DN30 mAb相比的药代动力学特性。通过静脉内注射向免疫缺陷小鼠递送单剂量的上述分子。在递送后的不同时间点收集来自经处理小鼠的外周血。通过对血清样品进行的ELISA确定所研究分子的循环浓度。h0A-DN30-c103E08循环水平与针对mAb所测量的相当,并总是高于MvDN30(图11)。

[0138] h0A-DN30-c103E08在体内削弱MET成瘾肿瘤的生长

[0139] 在MET成瘾模型上测试DN30衍生物在体内抑制肿瘤生长的能力。在NOD-SCID小鼠的腹侧面中皮下注射 1×10^6 个GTL-16细胞。1周后,将携带可触及的肿瘤的小鼠随机分为4个均匀的处理组:媒介物(n=6)、MvDN30(n=6)、h0A-DN30-c103E08(n=5)、ch0A-DN30(n=5)。每周两次以30mg/Kg通过静脉内注射来递送抗体;为了施用相同的量的分子,按相同的时间表以15mg/kg递送MvDN30,因为单臂抗体的分子量是MvDN30的两倍(即,0A-DN30形式为约100KDa而MvDN30为约50KDa)。MvDN30无效一如从其短的血浆半衰期所预期—而单臂衍生物均抑制了肿瘤生长(图12的A)(h0A-DN30-c103E08和ch0A-DN30分别相对于媒介物的P=0.0007和0.05)。令人惊奇的是,h0A-DN30-c103E08比ch0A-DN30远更有效:在h0A-DN30-c103E08的情况下,处理后的质量比对照组小87.8%,而在ch0A-DN30的情况下,处理后的质量比对照组小52.9%(图12的B)(h0A-DN30-c103E08相对于ch0A-DN30的P=0.009)。本发明人进一步进行了剂量反应实验来分析h0A-DN30-c103E08的抑制活性。维持上述实验条件,将小鼠随机分为5个均匀的组并通过每周三次静脉内注射以不同剂量的h0A-DN30-c103E08来处理。10、30和60mg/kg的剂量在阻断肿瘤生长方面高度有效,而3.3mg/kg的处理与对照组无统计学差异(图13)。

[0140] 材料和方法

[0141] 细胞培养

[0142] A549人肺腺癌细胞、HPAF-II人胰腺癌细胞、C2C12小鼠肌肉成肌细胞、H9C2(2-1)大鼠心脏成肌细胞、MDCK狗肾细胞和Cos-7猴肾细胞得自ATCC/LGC Standards S.r.l.(意大利塞斯托圣乔瓦尼);GTL-16细胞系为源自MKN-45细胞(人胃癌细胞,可由日本大阪的Japanese Collection of Research Bioresources得到)的克隆,其MET基因拷贝数与亲本细胞系不同³²。GTL-16细胞系可由意大利Interlab Cell Line Collection(ICLC)的Advanced Biotechnology Center(ABC)得到,登录号为ICLC PD 08003。人肺癌EBC-1来自Japanese Collection of Research Bioresources)。DN30杂交瘤可由意大利Interlab Cell Line Collection(ICLC)的Advanced Biotechnology Center(ABC)得到,登录号为ICLC PD 05006。

[0143] 所有细胞均按供应商的建议培养。测试所有细胞培养物的支原体污染。

[0144] DN30抗体的嵌合和人单臂形式的生成。

[0145] 对于嵌合DN30抗体:已通过基因合成生成了分别编码轻链(VL-CL)、重链(VH-CH1-CH2-CH3)和Fc结构域(CH2-CH3)的三个单独的cDNA。可变区(小鼠序列)来自DN30抗体(SEQ ID:15和16);人源的恒定区源自人免疫球蛋白,特别地,轻链包括人 κ 型恒定结构域(GenBank序列ID#:DI165992),而重链包括人IgG1恒定结构域(GenBank序列ID#:DJ392898)。在编码序列的C-末端处,重链包括His-TAG(SEQ ID:38、39)而Fc包括strep-TAG(SEQ ID:40、41)。

[0146] 对于人源化DN30抗体:Fair Journey Biologics已使用噬菌体展示文库方法通过DN30小鼠抗体的种系筛选实现了人源化。他们从偏离的FR(框架)残基的鉴定和最近的人类V种系的分析开始,该种系选自对于CDR1-CDR2具有相同的规范式折叠组合的种系,使用了可用的工具和数据库:来自UCL的Andrew Martin博士的abYsistool外加<http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/>和<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>。在生成噬菌体展示文库—其中已进行了VH和VL区的随机化—时,已完成了四轮亲和力驱动的噬菌体展示筛选。在此过程结束时,选择五种具有最高人类同一性和同源性的不同DN30人源化变体,即克隆03E08、03G05、03F04、03H08和04H08。通过经典的分子生物学技术将可变区与源自人免疫球蛋白的恒定结构域序列,即人 κ 轻链和IgG1重链恒定结构域进行连接。

[0147] 为使嵌合和人源化抗体成为单臂形式(ch0A-DN30和h0A-DN30抗体):已在CH3区中插入了特定的氨基酸修饰以产生‘杵臼’结构^{28,29}。“杵臼”被证实是一种有效的设计策略,可比同二聚体增强异二聚体的形成。该策略基于结构域界面重塑,在抗体Fc片段的CH3区中引入空间互补突变,CH3区是人IgG分子的H链之间蛋白质-蛋白质相互作用的最广泛位点。一条链,VH-CH1-CH2-CH3多肽,包括³⁸⁹T→W(杵突变),其中小氨基酸被较大的氨基酸所取代;相反,另一条链,CH2-CH3多肽,包括大残基被较小残基的替换:³⁸⁹T→S;³⁹¹L→A;⁴³⁸Y→V(臼突变)。这些突变是通过噬菌体展示技术³³优化后选择的,其中随机替代了与伴侣CH3结构域上的杵相邻的残基389、391和438。杵臼工程化便于异二聚体的组装,包括三条不同的氨基酸链(VL-CL+VH-CH1-CH2-CH3+CH2-CH3)代替同二聚体,即真实的抗体(VL-CL+VH-CH1-CH2-CH3)₂或仅Fc域(CH2-CH3)₂。

[0148] 在N-末端处,CH2-CH3多肽包括对应于截短的人较链区的序列。在根据Kabat的EU编号方案的位置233处,缺失是必要的以排除半胱氨酸,其涉及在轻链恒定结构域(CL)的C-末端位置处与半胱氨酸形成链间二硫键。此外,为了允许CH2-CH3多肽进入蛋白质合成的

RER/Golgi通路—就像抗体的轻链 (VL-CL) 和重链 (VH-CH1-CH2-CH3) 那样—在N-末端处,在截短的铰链区之前包括一个对应于DN30重链的信号肽的序列。

[0149] 本文公开的嵌合抗Met抗体片段 (ch0A-DN30) 由以下组成:

- [0150] (i) 具有SEQ ID No.:15中所列明的氨基酸序列的轻链可变结构域;
- [0151] (ii) 具有SEQ ID No.:16中所列明的氨基酸序列的重链可变结构域;
- [0152] (iii) 具有SEQ ID No.:9中所列明的氨基酸序列的人轻链恒定 (CL) 结构域;
- [0153] (iv) 具有SEQ ID No.:10中所列明的氨基酸序列的人重链恒定CH1结构域;
- [0154] (v) 具有SEQ ID No.:11中所列明的氨基酸序列的第一人Fc多肽;和
- [0155] (vi) 具有SEQ ID No.:12中所列明的氨基酸序列的第二人Fc多肽。

[0156] 本公开的目的人源化抗Met抗体片段 (h0A-DN30-c103E08) 由以下组成:

- [0157] (i) 具有SEQ ID No.:7中所列明的氨基酸序列的人源化轻链可变结构域;
- [0158] (ii) 具有SEQ ID No.:8中所列明的氨基酸序列的人源化重链可变结构域;
- [0159] (iii) 具有SEQ ID No.:9中所列明的氨基酸序列的人轻链恒定 (CL) 结构域;
- [0160] (iv) 具有SEQ ID No.:10中所列明的氨基酸序列的人重链恒定CH1结构域;
- [0161] (v) 具有SEQ ID No.:11中所列明的氨基酸序列的第一人Fc多肽;和
- [0162] (vi) 具有SEQ ID No.:12中所列明的氨基酸序列的第二人Fc多肽。

[0163] 人源化抗Met抗体片段 (h0A-DN30-c103G05) 由以下组成:

- [0164] (i) 具有SEQ ID No.:17中所列明的氨基酸序列的人源化轻链可变结构域;
- [0165] (ii) 具有SEQ ID No.:18中所列明的氨基酸序列的人源化重链可变结构域;
- [0166] (iii) 具有SEQ ID No.:9中所列明的氨基酸序列的人轻链恒定 (CL) 结构域;
- [0167] (iv) 具有SEQ ID No.:10中所列明的氨基酸序列的人重链恒定CH1结构域;
- [0168] (v) 具有SEQ ID No.:11中所列明的氨基酸序列的第一人Fc多肽;和
- [0169] (vi) 具有SEQ ID No.:12中所列明的氨基酸序列的第二人Fc多肽。

[0170] 人源化抗Met抗体片段 (h0A-DN30-c103F04) 由以下组成:

- [0171] (i) 具有SEQ ID No.:19中所列明的氨基酸序列的人源化轻链可变结构域;
- [0172] (ii) 具有SEQ ID No.:20中所列明的氨基酸序列的人源化重链可变结构域;
- [0173] (iii) 具有SEQ ID No.:9中所列明的氨基酸序列的人轻链恒定 (CL) 结构域;
- [0174] (iv) 具有SEQ ID No.:10中所列明的氨基酸序列的人重链恒定CH1结构域;
- [0175] (v) 具有SEQ ID No.:11中所列明的氨基酸序列的第一人Fc多肽;和
- [0176] (vi) 具有SEQ ID No.:12中所列明的氨基酸序列的第二人Fc多肽。

[0177] 本公开的目的人源化抗Met抗体片段 (h0A-DN30-c103E08) 由以下组成:

- [0178] (i) 具有SEQ ID No.:21中所列明的氨基酸序列的人源化轻链可变结构域;
- [0179] (ii) 具有SEQ ID No.:22中所列明的氨基酸序列的人源化重链可变结构域;
- [0180] (iii) 具有SEQ ID No.:9中所列明的氨基酸序列的人轻链恒定 (CL) 结构域;
- [0181] (iv) 具有SEQ ID No.:10中所列明的氨基酸序列的人重链恒定CH1结构域;
- [0182] (v) 具有SEQ ID No.:11中所列明的氨基酸序列的第一人Fc多肽;和
- [0183] (vi) 具有SEQ ID No.:12中所列明的氨基酸序列的第二人Fc多肽。

[0184] 本公开的目的人源化抗Met抗体片段 (h0A-DN30-c104H08) 由以下组成:

- [0185] (i) 具有SEQ ID No.:23中所列明的氨基酸序列的人源化轻链可变结构域;

- [0186] (ii) 具有SEQ ID No.:24中所列明的氨基酸序列的人源化重链可变结构域;
- [0187] (iii) 具有SEQ ID No.:9中所列明的氨基酸序列的人轻链恒定 (CL) 结构域;
- [0188] (iv) 具有SEQ ID No.:10中所列明的氨基酸序列的人重链恒定CH1结构域;
- [0189] (v) 具有SEQ ID No.:11中所列明的氨基酸序列的第一人Fc多肽;和
- [0190] (vi) 具有SEQ ID No.:12中所列明的氨基酸序列的第二人Fc多肽。

[0191] 嵌合和人单臂抗体的表达和纯化

[0192] 将编码上述轻链(对于人源化轻链,SEQ ID No.:25、26、27、28、29中所列明的核苷酸序列;对于嵌合轻链,SEQ ID No.:30中所列明的核苷酸序列)、重链(对于人源化重链,SEQ ID No.:31、32、33、34、35中所列明的核苷酸序列;对于嵌合重链,SEQ ID No.:36中所列明的核苷酸序列)和Fc(SEQ ID No.:37中所列明的核苷酸序列)的cDNA克隆到通常可获得的表达载体(例如pcDNA3.1质粒,目录号V79020,Invitrogen Corporation(加利福尼亚州卡马里奥))中并用于转染ExpiCHO-S细胞(目录号:A29127,ThermoFisher Scientific)。优化载体比率以使期望的97.5kDa异二聚体(OA-Ab)的输出最大化并使任何150kDa的二价同二聚体(真正的Mab)的存在最小化。分别对于轻链、全长重链(“杆”载体)和Fc(“臼”载体)的最佳比率为1:1:2。这种情况导致存在的同二聚体的量最少,异二聚体大约占总蛋白质的85%。瞬时表达由ExpiFectamine™CHO转染试剂(目录号A29130,ThermoFisher Scientific)提供动力。生产9天后收获上清液。使用Hitrap MabSelect Sure柱(目录号GE29-0491-04,Sigma Aldrich)在ÄKTAPure 25色谱系统上纯化OA-DN30抗体。随后使用pH 3.0的0.1M柠檬酸缓冲液洗脱OA-DN30抗体。收集洗脱的级分并用pH 9.0的1M Tris-HCl中和(以每ml洗脱的蛋白质0.15ml的比率)。在GE AKTA Prime液相色谱系统(GE Healthcare Life Sciences)上通过经1x PBS(pH 7.4)-平衡的Superdex 200 26/600尺寸排阻色谱柱(目录号GE28-9893-36,Sigma Aldrich)进一步纯化OA-DN30抗体,其中含OA-Ab的级分与同二聚体级分(mAb或Fc)分离。合并含OA-DN30抗体的制备型SEC级分并通过SDS-PAGE分析以确定纯度。还测试了合并的级分的内毒素水平。来自制备型SEC纯化的最终合并级分显示不存在任何二价同二聚体,并存在少量(<5%)较小的≈70kDa谱带,其对应于杆-杆Fc同二聚体。

[0193] 突变的Met胞外域的生成、表达和纯化

[0194] 从如GenBank中所公开的保藏编号为X54559的人Met胞外域序列开始并使用QuickChange II定点突变试剂盒(目录号200524,Agilent Technologies(加利福尼亚州圣克拉拉))按照制造商的说明来以合成方式生成携带单个氨基酸取代的人MET胞外域(DecoyMet)的cDNA序列。该程序需要设计包含所需的点突变的正义和反义寡核苷酸。采用了以下寡核苷酸:

[0195] -突变K842E:

[0196] 正义5'-gtacataatcctgtggtttgagccttttgaaaagccagtg-3'(SEQ ID No.:42);

[0197] 反义5'-cactggccttttcaaaaggctcaaacacaggattatgtac-3'(SEQ ID No.:43)。

[0198] 通过用表达编码DecoyMet突变体的cDNA的pcDNA3.1质粒(目录号V79020,Invitrogen Corporation(加利福尼亚州卡里马奥))瞬时转染HEK-293T细胞来产生工程化的可溶性受体。将转染的细胞饿三天并收集含可溶性受体的细胞培养物上清液。按照制造商的说明使用HisTrap HP色谱柱(目录号17524701,GE Healthcare(德国弗莱堡))通过亲

和层析来进行重组蛋白的纯化。通过U-Protein Express BV (荷兰乌特勒支) 进行大规模的蛋白质生产和纯化。

[0199] 人DecoyMet的变体(DecoyMET^{K842E})具有SEQ ID No.:14中所列明的氨基酸序列。

[0200] 通过SDS-PAGE+考马斯蓝分析经纯化的蛋白质

[0201] 按照标准方法在存在或不存在 β -巯基乙醇的情况下通过SDS-PAGE将经纯化的OA-DN30抗体(1 μ g)分离到4-12%丙烯酰胺梯度凝胶中。分析中包括分子量标记物(目录号1610374, Bio-Rad)。Gel Code Blue Stain试剂(目录号24590, Thermo Fisher Scientific)揭示分离到凝胶中的多肽。

[0202] ELISA结合测定

[0203] 为了分析Met与DN30衍生物之间的相互作用,将经纯化的Met-Fc嵌合体(目录号358-MT-100, R&D Systems, 100ng/孔)固定在ELISA板上。在用0.5% BSA饱和后,在37°C下孵育1小时,然后加入在液相中的渐增浓度的抗体(MvDN30、chOA-DN30或hOA-DN30抗体, 0-500nM, 在PBS-BSA 0.5%-吐温0.1%中制备)。使用缀合了HRP的抗人k链抗体(目录号A7164, Sigma-Aldrich)揭示结合,然后与TMB(目录号T8665, Sigma Aldrich)一起孵育。通过多标记酶标仪VICTOR-X4(Perkin Elmer Instruments INC. (马萨诸塞州沃特曼))定量比色测定。使用Prism软件(GraphPad)分析和拟合数据。

[0204] 为了进行hOA-DN30-c103E08(液相)与源自不同物种的Met-Fc嵌合体(固相)的ELISA结合分析,在测定中包括了人(目录号358-MT-100, R&D Systems)、鼠(目录号50622-M02H, Sino Biological)、大鼠(目录号80004-R02H, Sino Biological)和猴(目录号90304-C02H, Sino Biological)来源的Met。程序与如上文所述的程序相同。

[0205] 流式细胞仪结合分析

[0206] 为了使hOA-DN30-c103E08与细胞表面处表达的Met结合,用StemProTMAccutaseTM细胞解离试剂(目录号A1110501, ThermoFisher Scientific)处理 2×10^5 个EBC-1、C2C12、H9C2、MDCK或Cos-7细胞,收集并在4°C下于PBS-2% FCS中孵育1小时。通过将细胞与10 μ g/ml hOA-DN30-c103E08一起在PBS-2% BSA中于4°C下孵育30分钟来进行抗体染色。在用PBS-2% BSA洗涤6次后,将细胞与1:100稀释的抗人IgG-APC(目录号109-606-088, Jackson Immuno Research)一起在4°C下孵育30分钟并然后洗涤以除去未结合的抗体。将细胞用DAPI(3 μ l的1 μ g/ml工作溶液, Sigma-Aldrich, 目录号10236276001)在4°C下共染色5分钟并通过Summit 4.3软件(Dako)分析Met表达。将源自同种型对照(抗人APC IgG)的荧光信号设定为阈值($0 < \text{MFI} < 10^1$)。如果平均荧光强度(MFI)高于阈值($\text{MFI} > 10^1$),则认为细胞对于Met表达呈阳性。

[0207] Met脱落的分析

[0208] 将近汇合的A549单层细胞用PBS洗涤两次,然后在无血清培养基中与渐增浓度(37、111、333、1000nM)的DN-30衍生物一起孵育。48小时后,收集条件培养基并用Laemmli缓冲液裂解细胞。使用抗Met抗体(3D4, 目录号08-1366, Invitrogen Corporation)通过蛋白质印迹法测定15 μ g总细胞蛋白中的Met蛋白水平;作为上样对照,还用抗黏着斑蛋白抗体(克隆hVIN-1, 目录号V9131, Sigma Life Science)探测滤膜。使用针对受体胞外结构域的抗人HGFR/Met抗体(目录号AF276, R&D Systems)通过蛋白质印迹法测定15 μ l细胞培养物上清液中的Met胞外域水平。使用抗小鼠IgG1 HRP缀合二抗(目录号JI115035003, Jackson

ImmunoResearch) 和ECL体系(目录号W1015, Promega)进行蛋白质检测。蛋白质印迹条带使用ImageJ软件定量。

[0209] MET磷酸化测定

[0210] 将血清饥饿的GTL-16细胞与DN30衍生物(1000或250nM)一起孵育24小时。使用以下一抗通过蛋白质印迹法分析总细胞裂解物:抗Met phospho-Tyr^{1234/1235}(D26, 目录号3077, Cell Signaling Technology); 抗Met(3D4, 目录号08-1366, Invitrogen Corporation); 和抗黏着斑蛋白(克隆hVIN-1, 目录号V9131, Sigma Life Science)。使用抗小鼠IgG1和抗兔IgG(目录号JI111035003)HRP缀合二抗和ECL体系进行蛋白检测。蛋白质印迹条带使用ImageJ软件定量。

[0211] 体外生物学检测

[0212] 对于细胞分散测定, 将HPAF-II细胞(8000/孔)接种在96孔板中的完全培养基中。为了分析抗体的激动活性, 在24小时后向培养基中加入HGF(8ng/ml, 阳性对照, 目录号294-HG-025, R&D Systems)或抗体(DN30 mAb、MvDN30、chOA-DN30、hOA-DN30抗体, 全在200nM的浓度下)。为了分析抑制活性, 单独地或与DecoyMet^{K842E} 1:1组合地加入渐增浓度(0-4 μ M)的hOA-DN30-c103E08。再经过24小时后, 用6.25ng/ml的HGF将细胞刺激24小时。然后将细胞用11%的戊二醛(目录号340855, Sigma-Aldrich)固定, 用0.1%的结晶紫(目录号C3886, Sigma-Aldrich)染色, 并通过显微镜观察(显微镜Leica DM2000)来分析。用QICAM Fast1394彩色数码相机(QImaging)捕获图像。

[0213] 对于细胞侵袭测定, 将HPAF-II细胞(1.5×10^5 /孔)悬浮在单独或与1 μ M DecoyMet^{K842E}组合地存在0.5 μ M hOA-DN30-c103E08的无血清培养基中, 并接种在预涂有30 μ g/孔的基质胶Matrix(目录号354234, Corning Inc.)的transwell腔室的上隔壁上。向腔室的下隔壁中加入补充有2% FBS和6.25ng/ml HGF的培养基。24小时后, 机械移除transwell滤膜的上侧上的细胞, 同时用11%的戊二醛固定迁移通过膜的细胞并用0.1%的结晶紫染色。用Image-J软件定量细胞侵袭。

[0214] 对于活力测定, 将GTL-16细胞以2000个细胞/孔接种在96孔板中的10% FBS培养基中。24小时后, 将培养基换成含10% FBS外加待测试的分子(渐增浓度-0至10 μ M)的新鲜培养基。72小时后使用CellTiter-Glo(目录号G7573, Promega Corp)按照制造商的说明评价细胞活力。用VICTOR X4检测化学发光。

[0215] 对于增殖测定, 将350000个GTL-16细胞接种在6孔板中的10% FCS培养基中。24小时后, 用固定浓度(1 μ M)的DN30衍生物将细胞再处理48小时。然后, 向培养基中加入10 μ M的EdU(目录号A10044, Thermo Fisher)并再处理2小时。按照Click-iTTMEdU Alexa FluorTM488流式细胞术测定(目录号C10425, Thermo Fisher)的程序通过细胞荧光计分析确定S期细胞的%。

[0216] 对于细胞毒性测定, 将2000个GTL-16细胞接种在96孔板中的10% FCS培养基中。24小时后, 用渐增浓度的DN30衍生物将细胞再处理48小时。通过Cell-ToxTM Green细胞毒性测定(目录号G8741, Promega)按照制造商的说明评价细胞毒性。

[0217] PD-L1表达分析

[0218] 将近汇合的GTL-16细胞用50ng/ml IFN γ -1b(Miltenyi Biotec, 目录号130-096-484)(每24小时更换一次)与250nM hOA-DN30-c103E08组合地处理48小时。然后在Laemli

缓冲液中裂解单层细胞并对45 μ g总蛋白进行8% SDS-PAGE凝胶电泳。按标准方法将蛋白质从凝胶转移到iBlot Transfer硝酸纤维素膜(Life Technologies, 目录号IB23001)上。通过抗PD-L1抗体(E1L3N, 目录号13684, Cell Signaling Technology)检测PD-L1表达。通过抗MET phospho-Tyr^{1234/1235}(D26)抗体检查P-Met水平。作为上样对照,用抗GAPDH(D4C6R, 目录号97166, Cell Signaling Technology)探测滤膜。使用HRP缀合山羊抗小鼠IgG(目录号JI115035003)或抗兔IgG(目录号JI111035144)二抗(均来自Jackson ImmunoResearch)和ECL体系来进行蛋白质检测。

[0219] 体内实验

[0220] 所有动物程序均按照皮埃蒙特癌症研究基金会动物实验伦理委员会和意大利卫生部批准的协议进行。NOD-SCID小鼠购自Charles River(意大利卡尔科)。

[0221] 对于药代动力学分析,给NOD-SCID小鼠静脉内注射单剂量(100 μ g)的hOA-DN30-c103E08。在不同的时间点采集外周血:10分钟、30分钟、1小时、4小时、8小时、24小时、48小时、72小时、120小时。通过如上文在结合测定部分中所述的ELISA测量治疗分子的血清浓度,在通过连续稀释不同的经纯化分子而获得的标准曲线的线性部分上内插样品的吸光度值。每个时间点为4只小鼠的平均值。

[0222] 对于肿瘤生长分析,向NOD-SCID小鼠的腹侧面中接种 1×10^6 个GTL-16细胞。每周两次通过卡尺测量来监测肿瘤的生长。使用下式计算肿瘤体积: $V = 4/3\pi(x/2)(y/2)(z/2)$,其中x、y和z为肿瘤块的高度、宽度和深度。当肿瘤达到70-100mm³的体积(在细胞注射后大约一周)时,将小鼠随机分成均匀的组。在一种情况下,产生4个组(PBS-媒介物、MvDN30、chOA-DN30、hOA-DN30-c103E08;所有抗体30mg/kg,每周2次);在另一情况下,产生5个组(PBS-媒介物、hOA-DN30-c103E08 60mg/kg、30mg/kg、10mg/kg、3.3mg/kg;所有剂量均每周3次)。通过静脉内注射来施用分子。在实验结束时(治疗15或17天),处死小鼠,切除肿瘤并称重。

[0223] 统计分析

[0224] 使用Microsoft Office Excel 2010软件(Microsoft Corporation)来计算平均值和标准偏差(SD)。为了计算K_d值,使用GraphPad Prism软件(GraphPad Software)根据非线性回归、单位点结合双曲线来分析和拟合来自ELISA测定的数据。为了计算IC₅₀和EC₅₀值,使用GraphPad Prism软件根据非线性回归sigmoidal剂量反应曲线来分析和拟合数据。所有实验均重复至少两次。附图示出了一个代表性实验。

承认用于专利目的的微生物保存布达佩斯条约

国际表格

METIS PRECISION MEDICINE SB S.r.l. Via Magenta 35 Torino Italy		Duplicate Declaration of viability issued under Rule 10.2 By the Deposit International Authority specified below
I. Depositor		II. Identification of the microorganism (hybridoma or cell line)
Metheresis Translational Research S.A. Via alla Campagna, 2° 6900 Lugano (CH)		Accession number assigned by the Deposit International Authority: PD 08003 Date of deposit or transfer: 16 April 2008
Dipart. Scienze Oncologiche Univ. di Torino Strada Provinciale 142, Km 3.95 10060 Candiolo (TO)		
New Owner – Assignee of Metheresis Translational Research S.A.		
METIS PRECISION MEDICINE SB S.r.l. Via Magenta 35 Torino Italy		
III. Declaration of viability		
The viability of the microorganism identified under point II has been controlled on 6 May 2008. At that date, the above referenced microorganism resulted <input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> not viable		
IV. Conditions for carrying out the test¹		
V. Deposit International Authority		
Name: Centro di Biotecnologie Avanzate (CBA) Interlab Cell Line Collection		Signature of the Legal Representative of the Deposit International Authority or of an authorized officer: Dr. Carlo Castelli The liquidator
Address: L.go R. Benzi, 10 16132 GENOVA - ITALY		

[0225]

¹ Fill in only if the information was requested and if the test result was negative
 Form BP/9 (single page)

承认用于专利目的的微生物保存布达佩斯条约

国际表格

Istituto per la Ricerca e la Cura del Cancro (IRCC) Div. Oncologia Molecolare Strada provinciale 142 10060 CANDIOLO (Torino)		Receipt of original deposit Issued under Rule 7.1 By the Deposit International Authority specified below
I. Identification of the microorganism (hybridoma or cell line)		
Identifying reference provided by depositor: DN-30	Accession number assigned by the Deposit International Authority: PD 05006	
II. Scientific description and/or proposed taxonomic designation		
The identified hybridoma under point I. was accompanied by		
<input checked="" type="checkbox"/> a scientific description	<input type="checkbox"/> a proposed taxonomic description	
III. Receipt and acceptance		
This Deposit International Authority accepts the hybridoma identified under point I., received on December 29, 2005 (date of original deposit)		
IV. Receipt of requested conversion		
The cell line identified under point I. has been received by this Deposit International Authority on _____ (date of original deposit)		
A request of converting the original deposit in a deposit under the provisions of the Budapest Treaty has been received on _____ (date of request of conversion)		
V. Deposit International Authority		
Name: Centro di Biotecnologie Avanzate (CBA) Interlab Cell Line Collection	Signature of the Legal Representative of the Deposit International Authority or of an authorized officer:	
Address: L.go R. Benzi, 10 16132 GENOVA - ITALY	Dr. Paolo Rolleri CBA President	

Form BP/4 (single page)

[0227] 参考文献

[0228] 1.Comoglio PM,Trusolino L,Boccaccio C.Known and novel roles of the MET oncogene in cancer:a coherent approach to targeted therapy.Nat Rev Cancer 2018;18(6):341-358;doi 10.1038/s41568-018-0002-y.

[0229] 2.Kong-Beltran M,Seshagiri S,Zha J,Zhu W,Bhawe K,Mendoza N et al.Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer.Cancer Res 2006;66(1):283-289;doi 10.1158/0008-5472.CAN-05-2749.

[0230] 3.Gandino L,Longati P,Medico E,Prat M,Comoglio PM.Phosphorylation of serine 985negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase.J

Biol Chem 1994;269(3):1815-1820.

[0231] 4. Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N, Giordano S. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* 2002;416(6877):187-190;doi 10.1038/416187a.

[0232] 5. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(12):834-848;doi 10.1038/nrm3012.

[0233] 6. Prat M, Crepaldi T, Pennacchietti S, Bussolino F, Comoglio PM. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *J Cell Sci* 1998;111(Pt 2):237-247.

[0234] 7. Pacchiana G, Chiriaco C, Stella MC, Petronzelli F, De Santis R, Galluzzo M et al. Monovalency unleashes the full therapeutic potential of the DN-30 anti-Met antibody. *J Biol Chem* 2010;285(46):36149-36157;e-pub ahead of print 2010/09/10;doi10.1074/jbc.M110.134031.

[0235] 8. Cignetto S, Modica C, Chiriaco C, Fontani L, Milla P, Michieli P et al. Dual Constant Domain-Fab: A novel strategy to improve half-life and potency of a Met therapeutic antibody. *Mol Oncol* 2016;10(6):938-948;e-pub ahead of print 2016/03/28;doi 10.1016/j.molonc.2016.03.004.

[0236] 9. Wang Q, Yang S, Wang K, Sun SY. MET inhibitors for targeted therapy of EGFR TKI-resistant lung cancer. *J Hematol Oncol* 2019;12(1):63;e-pub ahead of print 2019/06/21;doi 10.1186/s13045-019-0759-9.

[0237] 10. Schelter F, Kobuch J, Moss ML, Becherer JD, Comoglio PM, Boccaccio C et al. A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J Biol Chem* 2010;285(34):26335-26340;doi10.1074/jbc.M110.106435.

[0238] 11. Foveau B, Ancot F, Leroy C, Petrelli A, Reiss K, Vingtdoux V et al. Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol Biol Cell* 2009;20(9):2495-2507;doi10.1091/mbc.E08-09-0969.

[0239] 12. Vigna E, Chiriaco C, Cignetto S, Fontani L, Basilico C, Petronzelli F et al. Inhibition of ligand-independent constitutive activation of the Met oncogenic receptor by the engineered chemically-modified antibody DN30. *Mol Oncol* 2015;9(9):1760-1772;doi 10.1016/j.molonc.2015.05.007.

[0240] 13. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986;321(6069):522-525;doi 10.1038/321522a0.

[0241] 14. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988;332(6162):323-327;doi 10.1038/332323a0.

[0242] 15. Presta LG. Antibody engineering. *Curr Opin Biotechnol* 1992;3(4):394-

398.

[0243] 16. Vaswani SK, Hamilton RG. Humanized antibodies as potential therapeutic drugs. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81(2):105-115; quiz 115-106, 119; doi 10.1016/S1081-1206(10)62794-9.

[0244] 17. Hurle MR, Gross M. Protein engineering techniques for antibody humanization. *Curr Opin Biotechnol* 1994;5(4):428-433.

[0245] 18. Harris WJ. Production of humanized monoclonal antibodies for in vivo imaging and therapy. *Biochem Soc Trans* 1995;23(4):1035-1038.

[0246] 19. Bloom JW, Madanat MS, Marriott D, Wong T, Chan SY. Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4. *Protein Sci* 1997;6(2):407-415; doi 10.1002/pro.5560060217.

[0247] 20. Humphreys DP, Chapman AP, Reeks DG, Lang V, Stephens PE. Formation of dimeric Fabs in *Escherichia coli*: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tail piece sequences and growth conditions. *J Immunol Methods* 1997;209(2):193-202.

[0248] 21. Ferracini R, Longati P, Naldini L, Vigna E, Comoglio PM. Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1991;266(29):19558-19564.

[0249] 22. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 1994;77(2):261-271.

[0250] 23. Gherardi E, Love CA, Esnouf RM, Jones EY. The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* 2004;14(6):669-678; doi 10.1016/j.sbi.2004.10.010.

[0251] 24. Bork P, Doerks T, Springer TA, Snel B. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 1999;24(7):261-263.

[0252] 25. Merchant M, Ma X, Maun HR, Zheng Z, Peng J, Romero M et al. Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(32):E2987-2996; doi 10.1073/pnas.1302725110.

[0253] 26. Makabe K, Nakanishi T, Tsumoto K, Tanaka Y, Kondo H, Umetsu M et al. Thermodynamic consequences of mutations in vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody, 528. *J Biol Chem* 2008;283(2):1156-1166; e-pub ahead of print 2007/10/17; doi 10.1074/jbc.M706190200.

[0254] 27. Basilico C, Modica C, Maione F, Vigna E, Comoglio PM. Targeting the MET oncogene by concomitant inhibition of receptor and ligand via an antibody-"decoy" strategy. *Int J Cancer* 2018; e-pub ahead of print 2018/04/25; doi 10.1002/ijc.31550.

- [0255] 28. Ridgway JB, Presta LG, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* 1996;9(7): 617-621.
- [0256] 29. Zhu Z, Presta LG, Zapata G, Carter P. Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation. *Protein Sci* 1997;6(4):781-788; doi10.1002/pro.5560060404.
- [0257] 30. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2008;8(6):467-477; doi 10.1038/nri2326.
- [0258] 31. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* 2017;19(6):1189-1201; doi 10.1016/j.celrep.2017.04.031.
- [0259] 32. Rege-Cambrin G, Scaravaglio P, Carozzi F, Giordano S, Ponzetto C, Comoglio PM et al. Karyotypic analysis of gastric carcinoma cell lines carrying an amplified c-met oncogene. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;64(2):170-173.
- [0260] 33. Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J Mol Biol* 1997;270(1):26-35; doi 10.1006/jmbi.1997.1116.

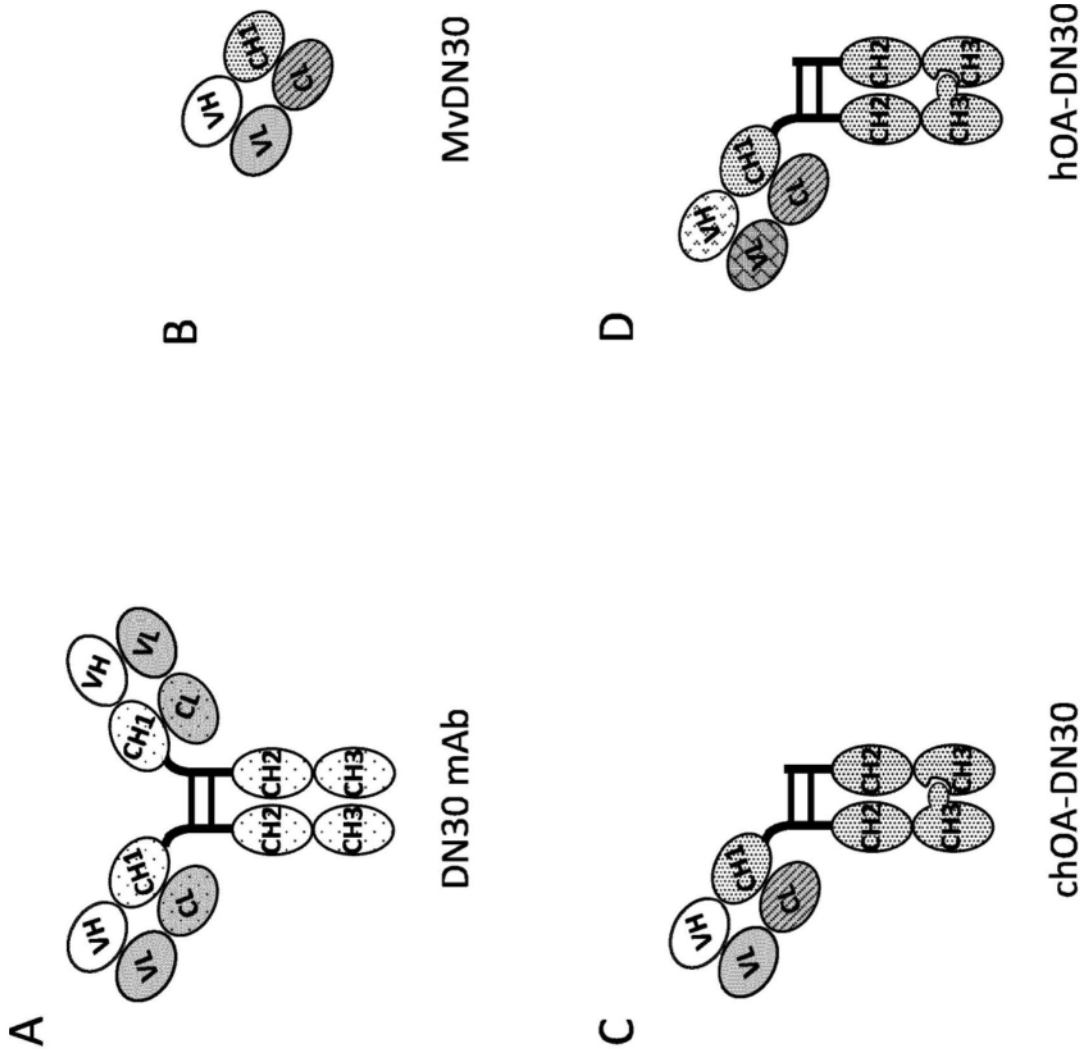


图1

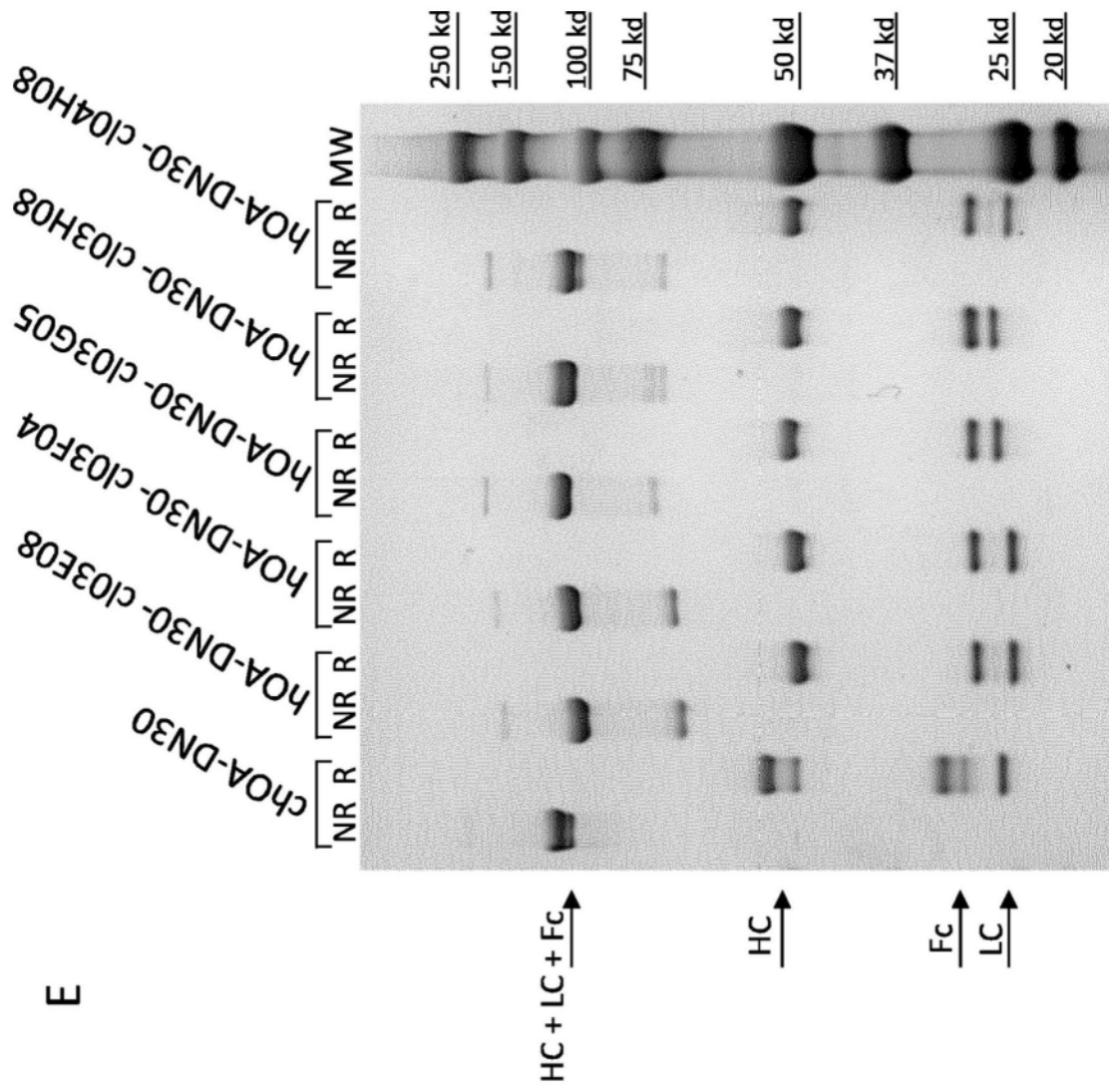


图1续

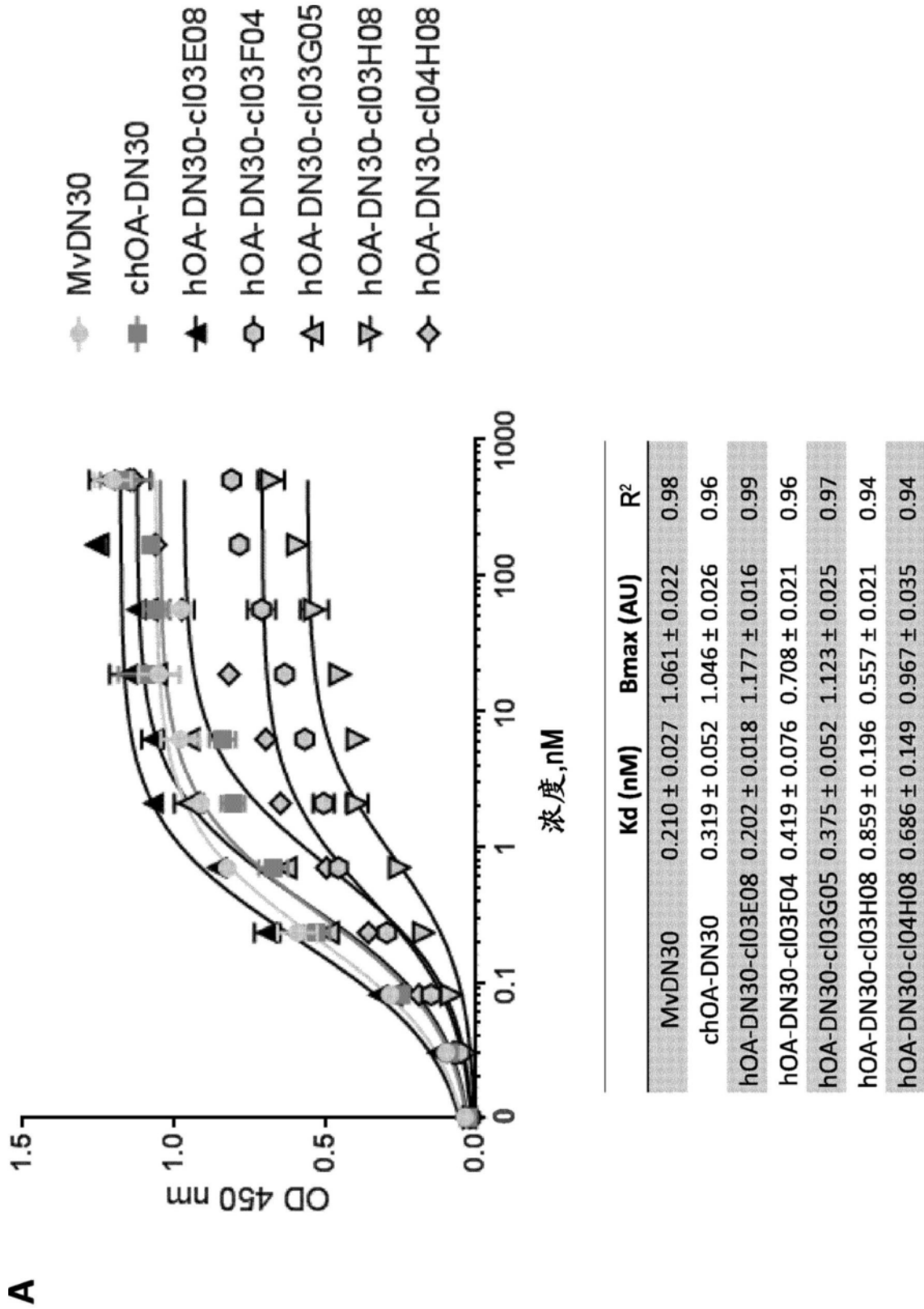
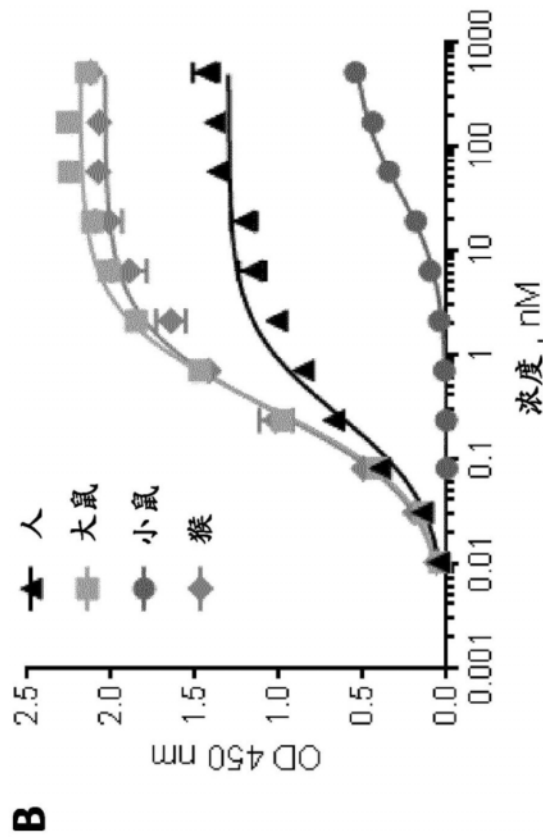


图2



	Kd (nM)	Bmax (AU)	R ²
人	0.262 ± 0.037	1.303 ± 0.029	0,97
大鼠	0.325 ± 0.016	2.189 ± 0.017	0,99
小鼠	35.99 ± 2.381	0.568 ± 0.012	0,99
猴	0.273 ± 0.021	2.041 ± 0.025	0,99

图2续

C

阴性对照

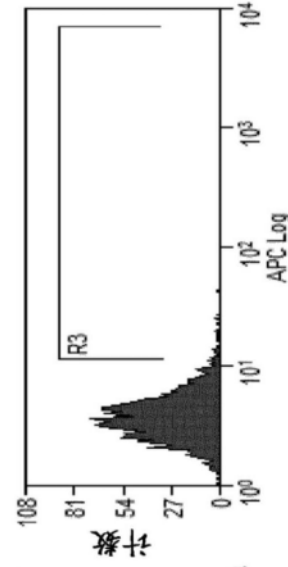
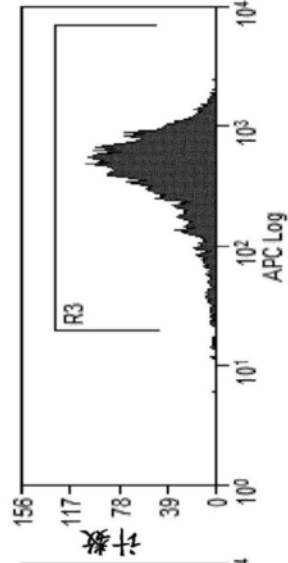
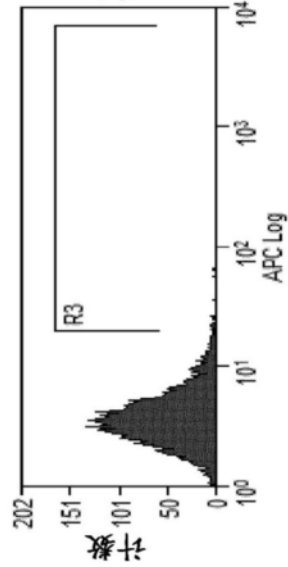
人 (EBC1)

小鼠 (C2C12)

MET+ (R3): 1.09%

MET+ (R3): 99.14%

MET+ (R3): 2.17%



大鼠 (H9C2)

狗 (MDCK)

猴 (COS-7)

MET+ (R3): 94.15%

MET+ (R3): 93.10%

MET+ (R3): 97.74%

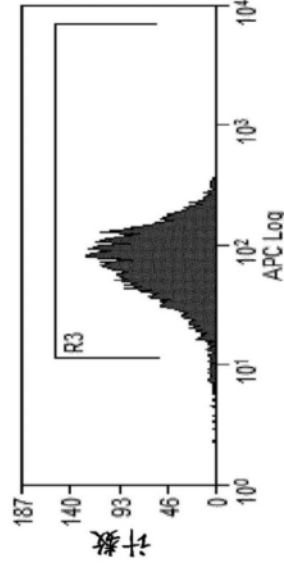
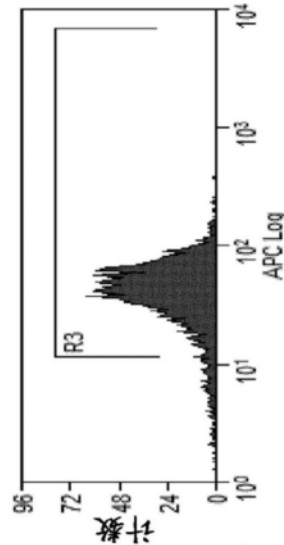
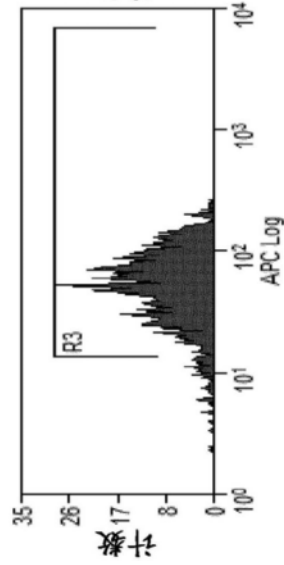


图2续

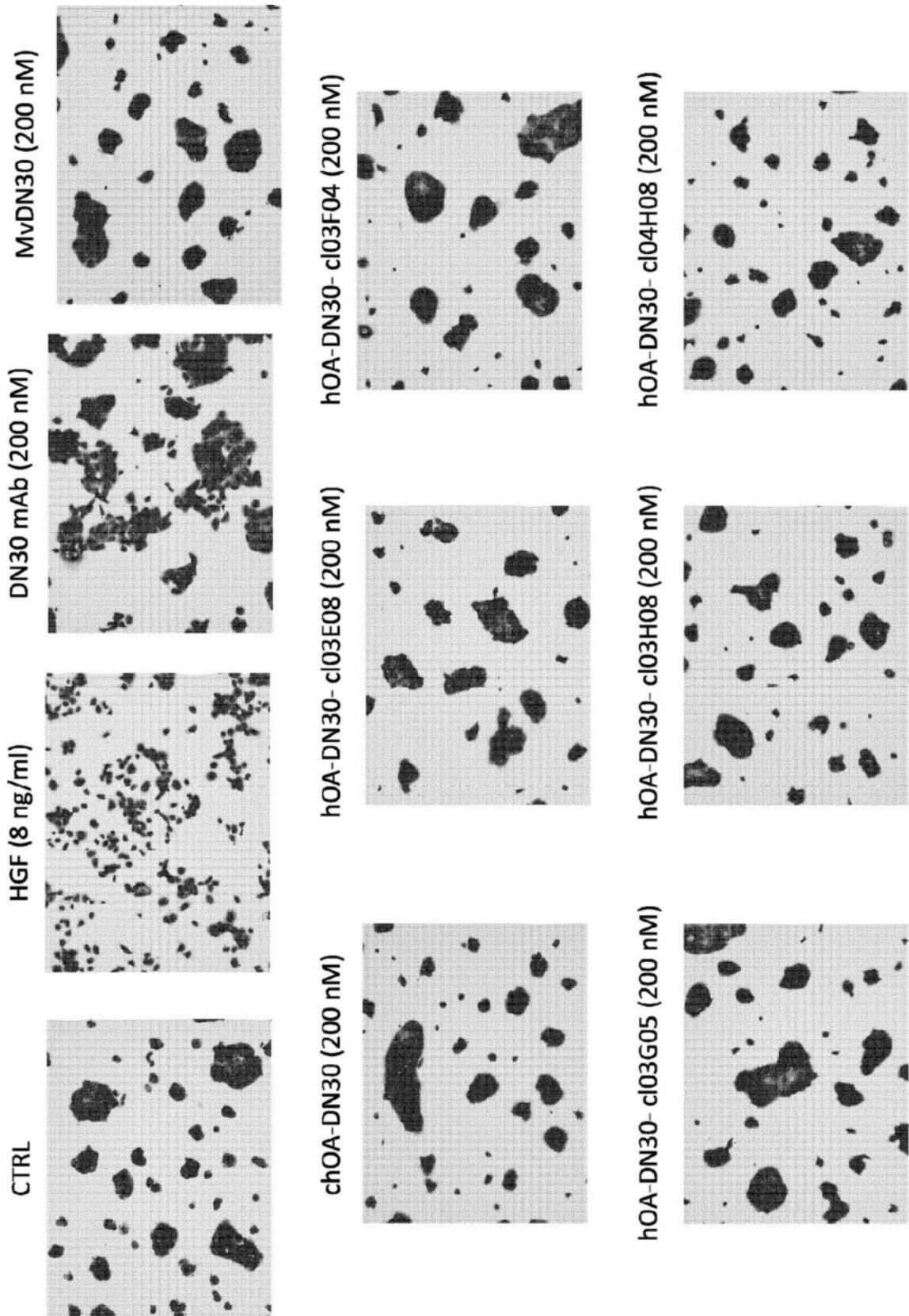


图3

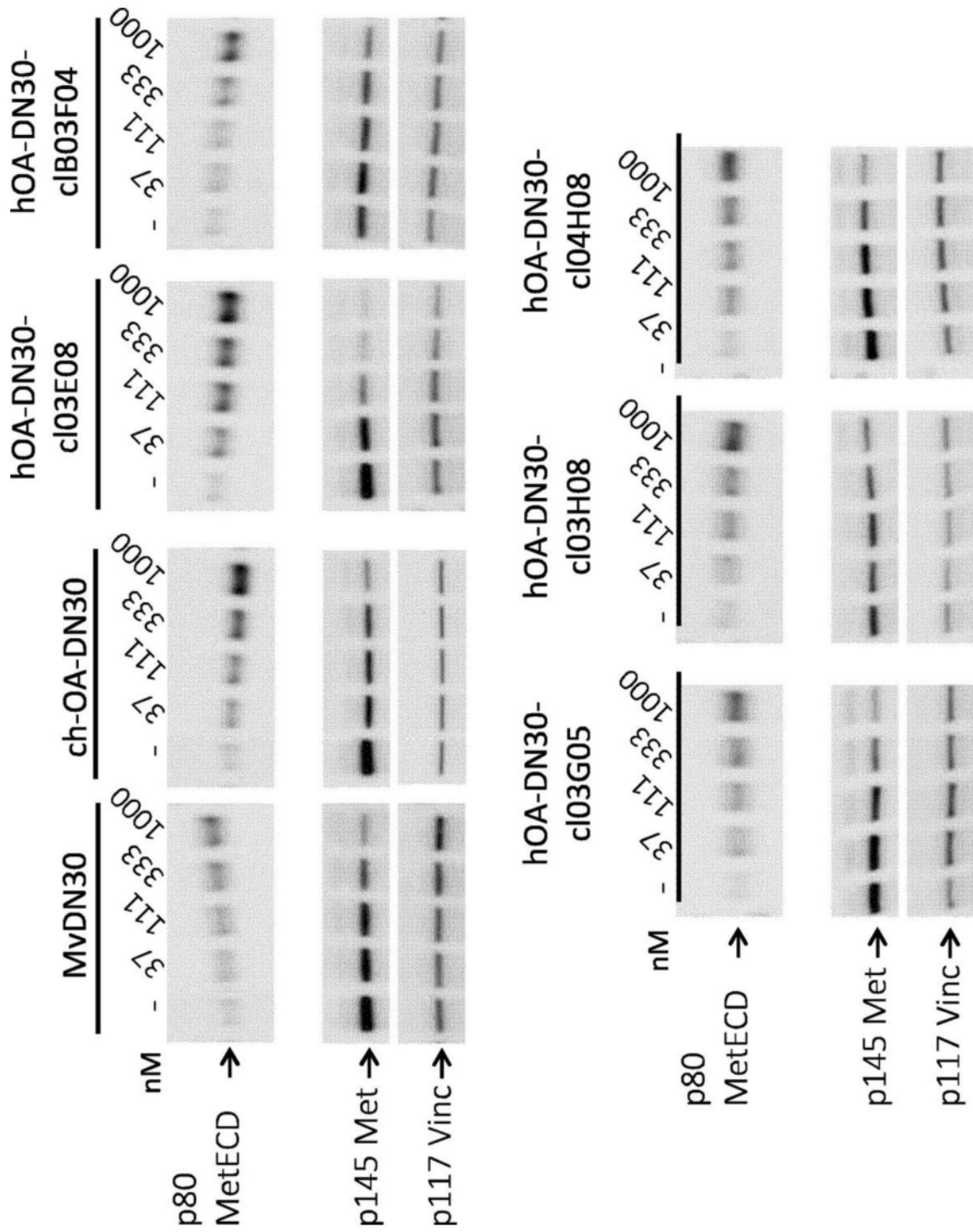


图4

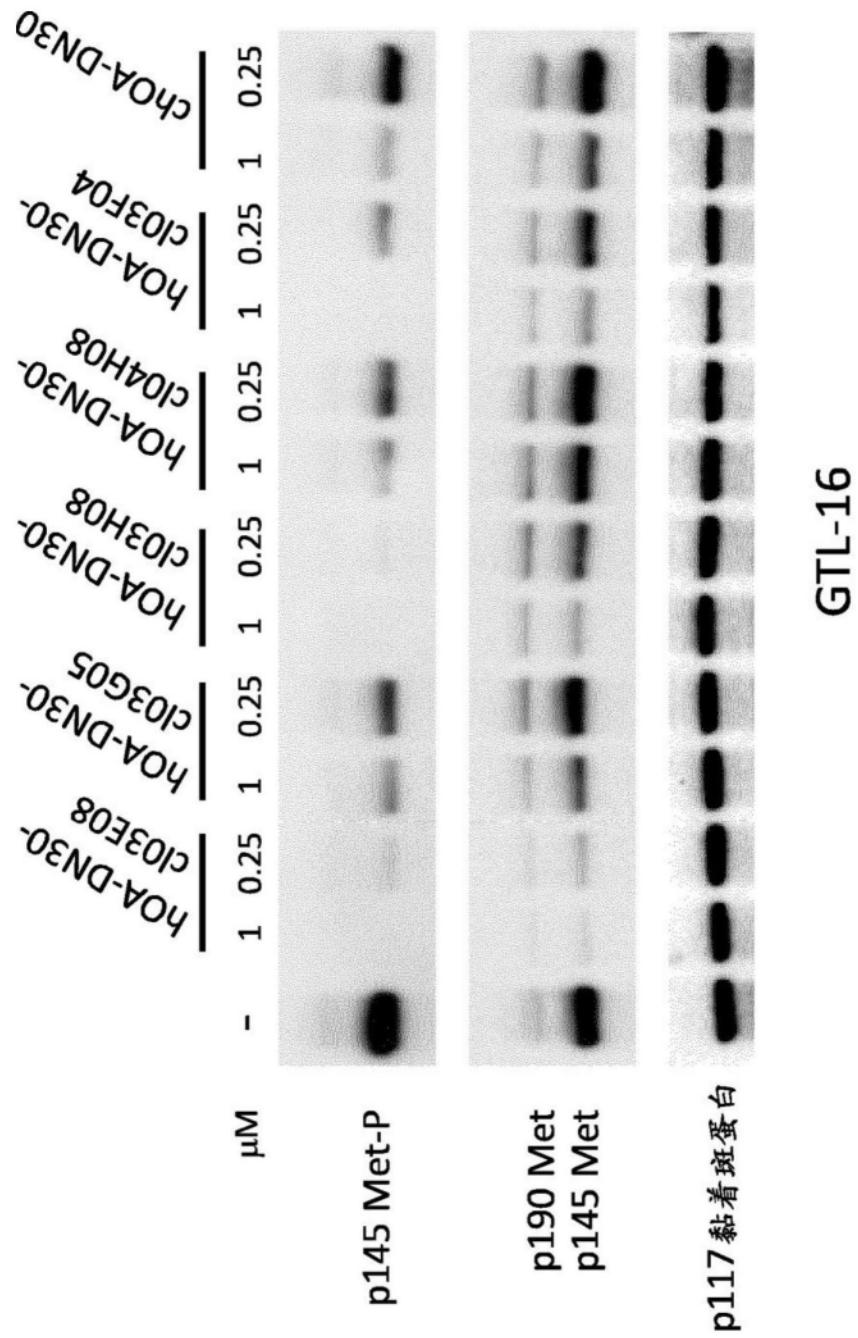
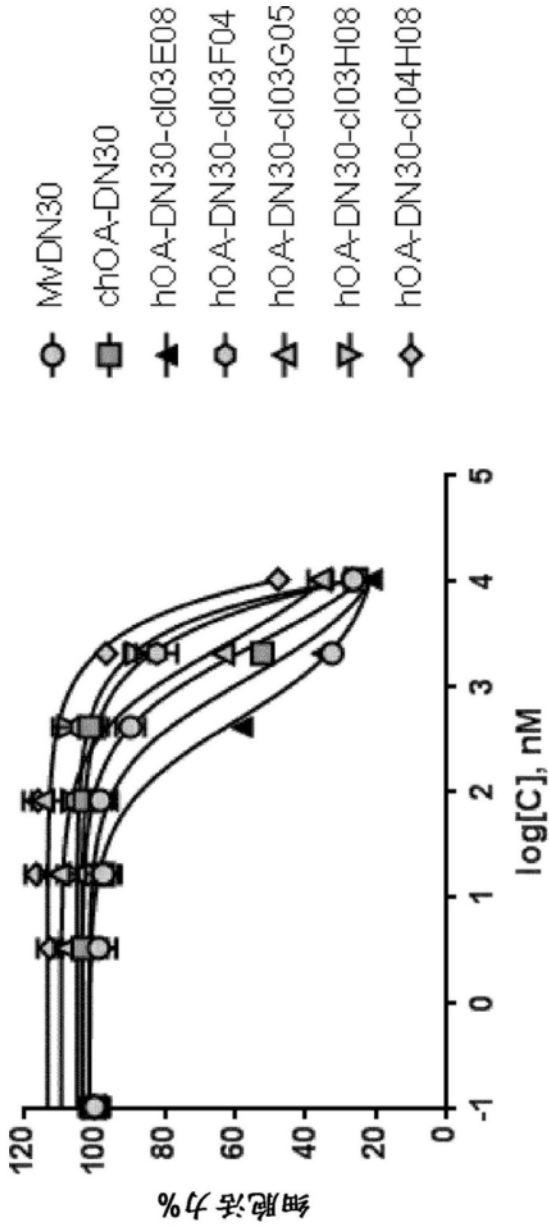


图5

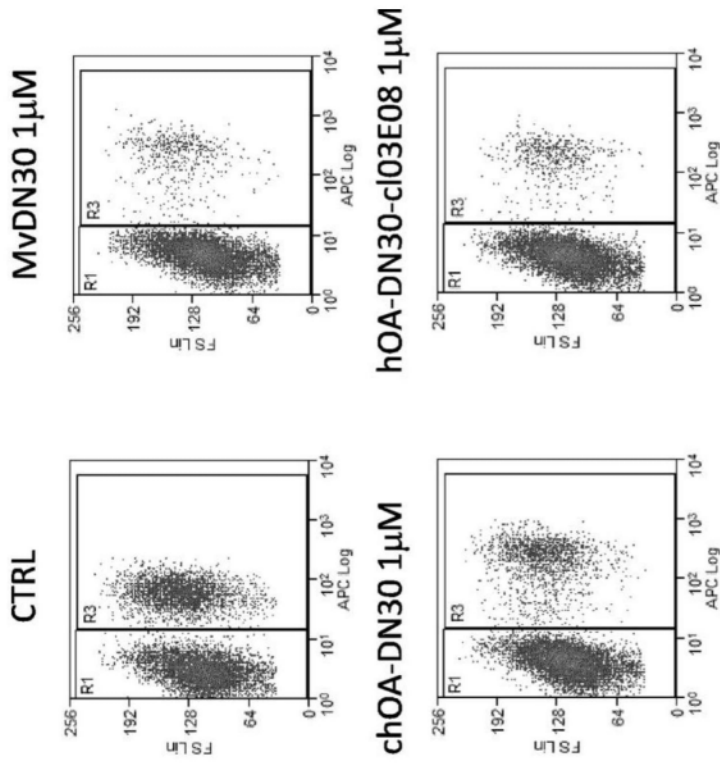


	IC50 (nM)	R ²
MvDN30	1136±1.08	0.94
chOA-DN30	2489±1.77	0.96
hOA-DN30-cl03E08	460±1.07	0.98
hOA-DN30-cl03F04	52310±7.68	0.94
hOA-DN30-cl03G05	2381±1.31	0.95
hOA-DN30-cl03H08	N/A*	-
hOA-DN30-cl04H08	115726±311.2	0.91

* N/A: 不适用, 因为数据拟合不明确

图6

A

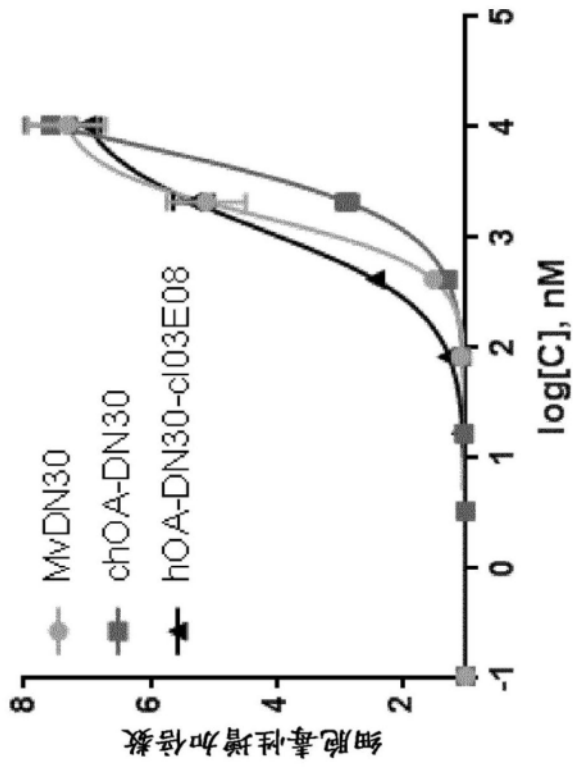


GTL-16

	% EdU+ 细胞 (R3)
CTRL	31,17 %
MvDN30	5.20 %
chOA-DN30	14.97%
hOA-DN30-cl03E08	4.92%

图7

B



GTL-16

	EC50 (nM)	R ²
MvDN30	1486±1.08	0.98
chOA-DN30	6807±1.77	0.99
hOA-DN30-c103E08	1116±1.07	0.99

图7续

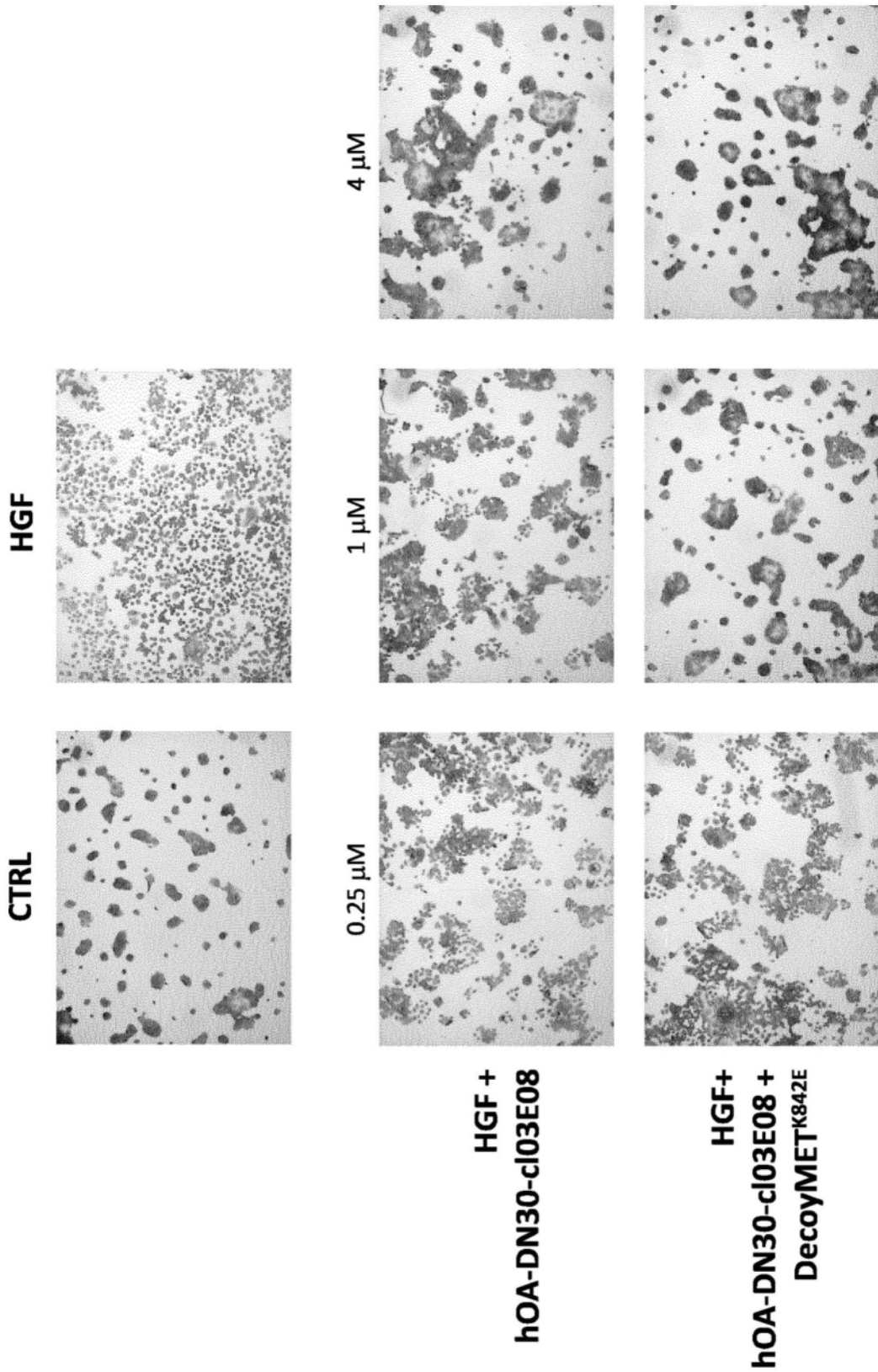


图8

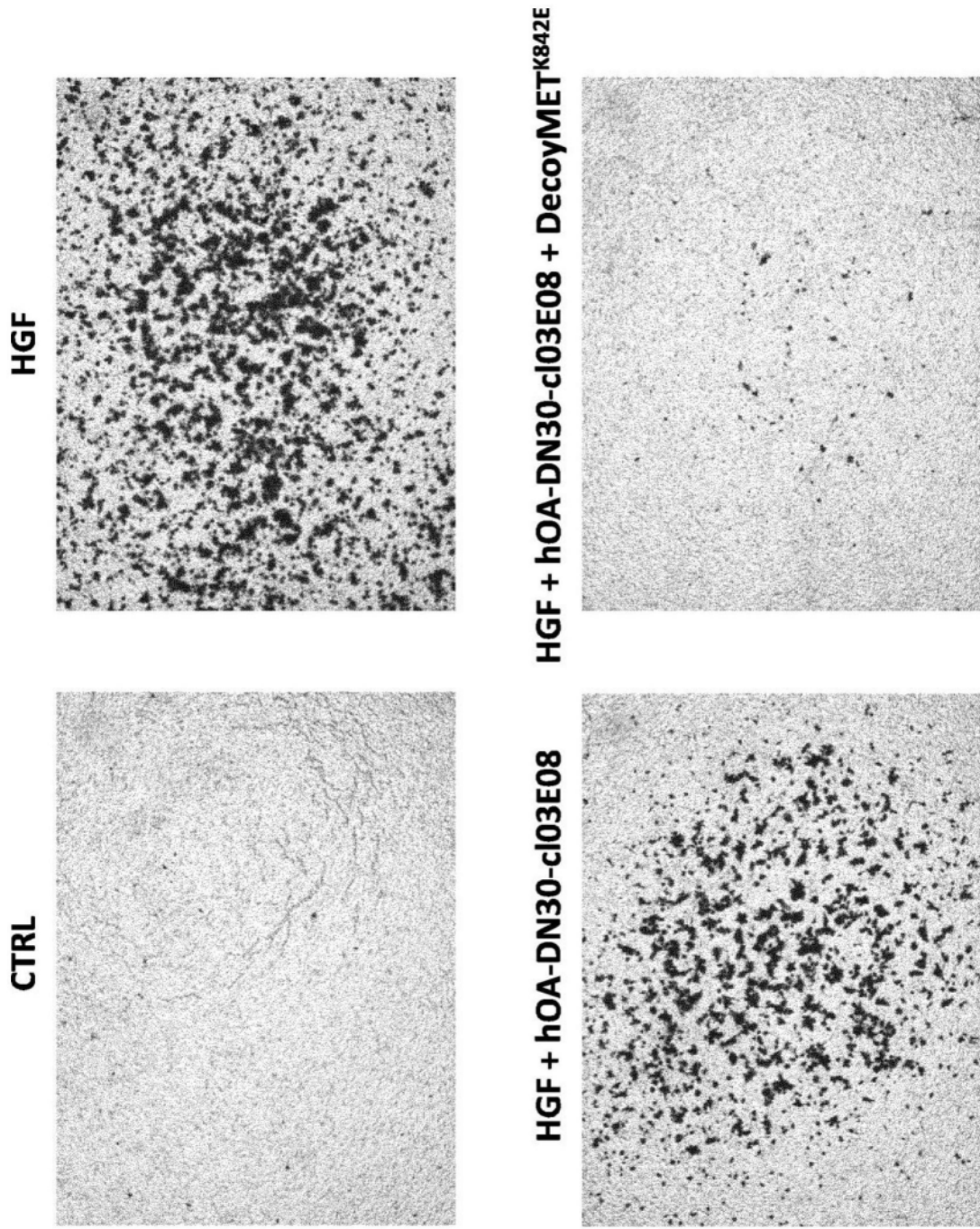


图9

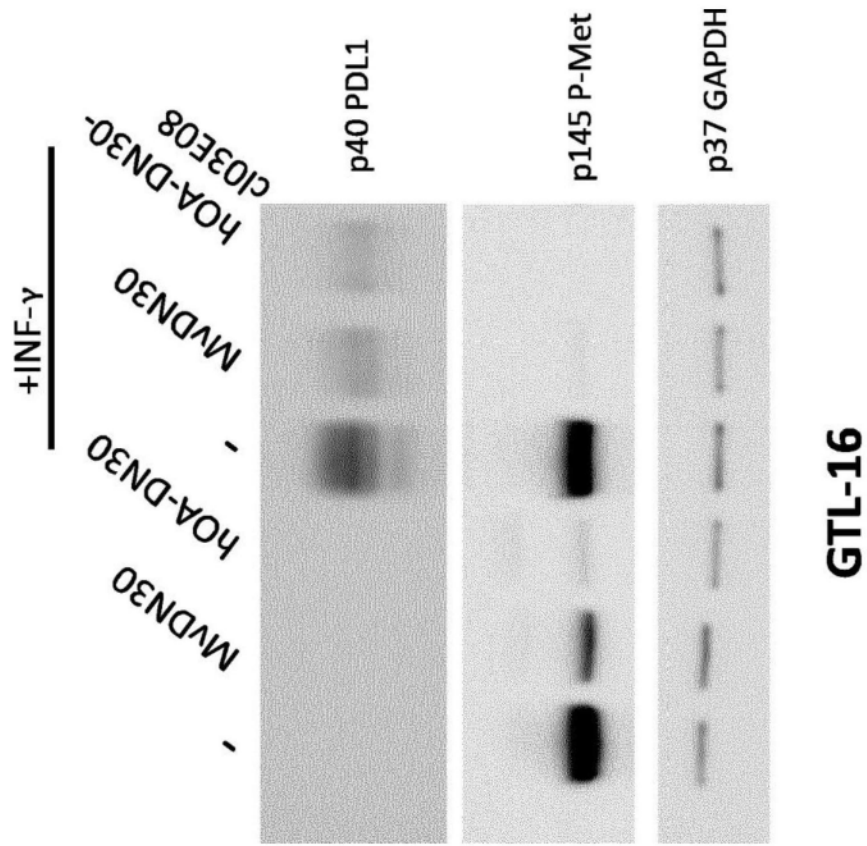


图10

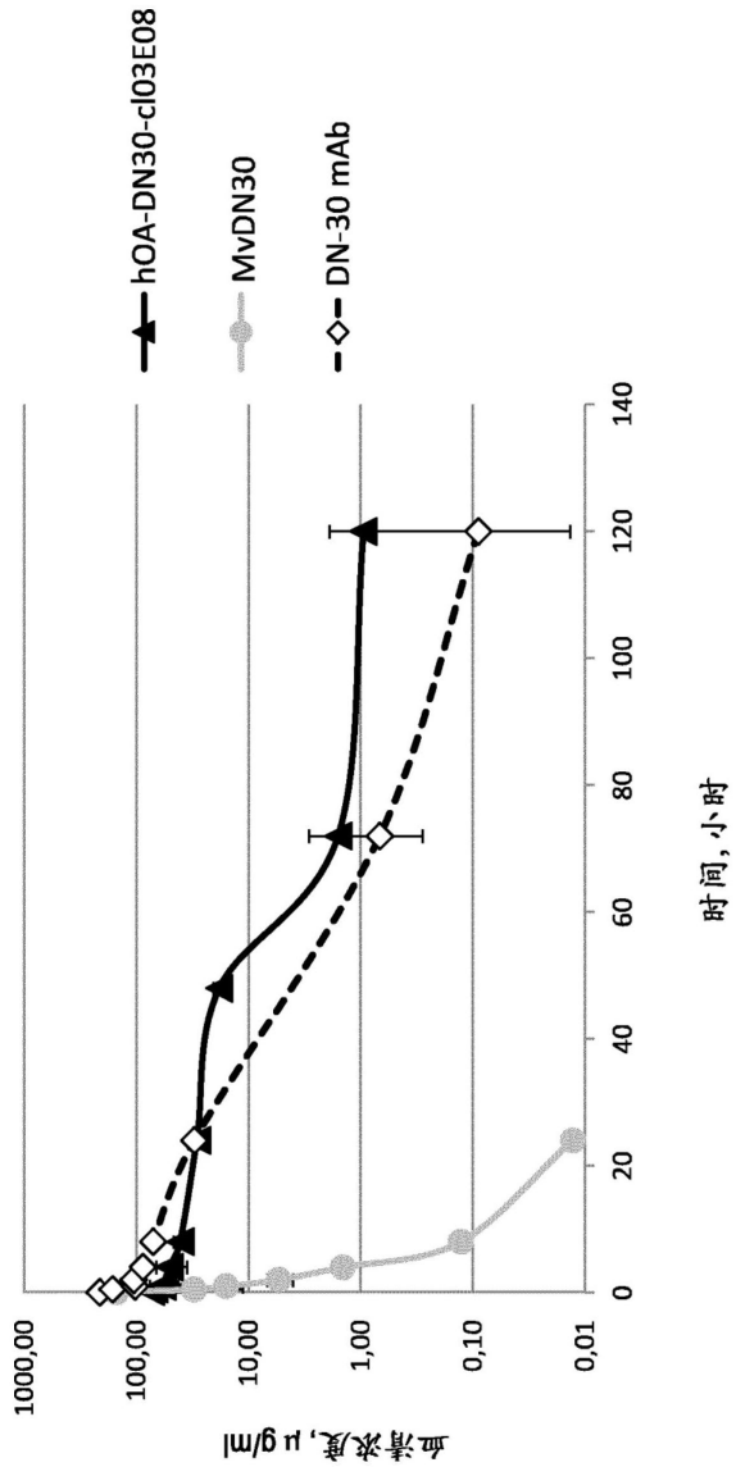


图11

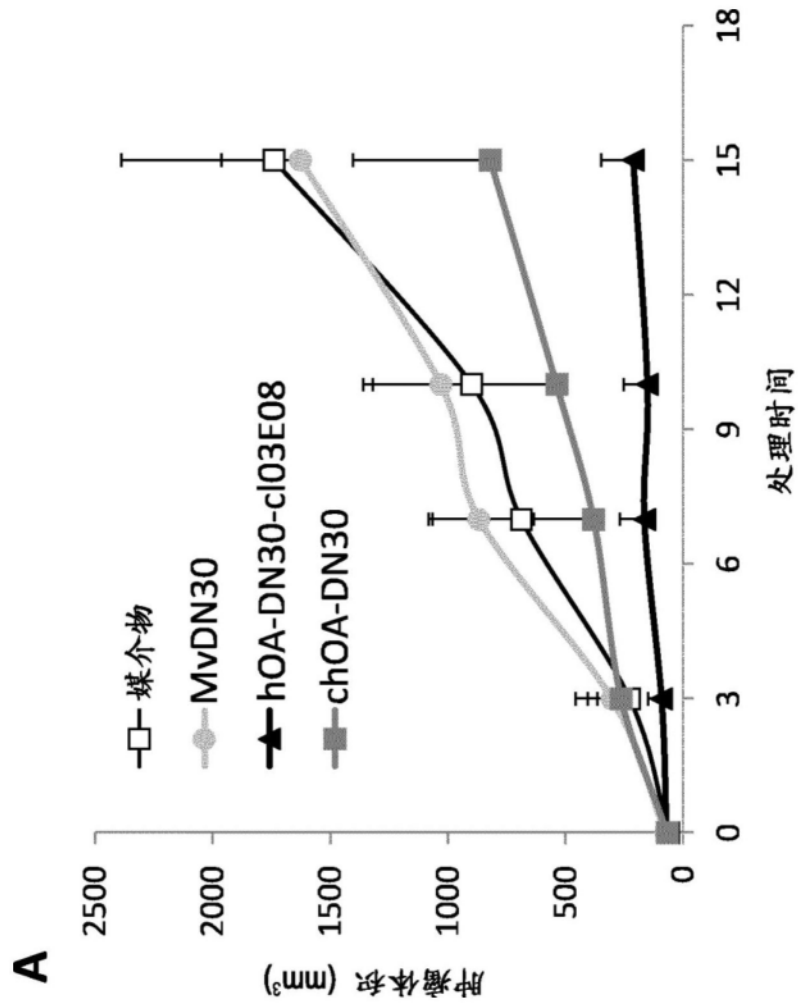


图12

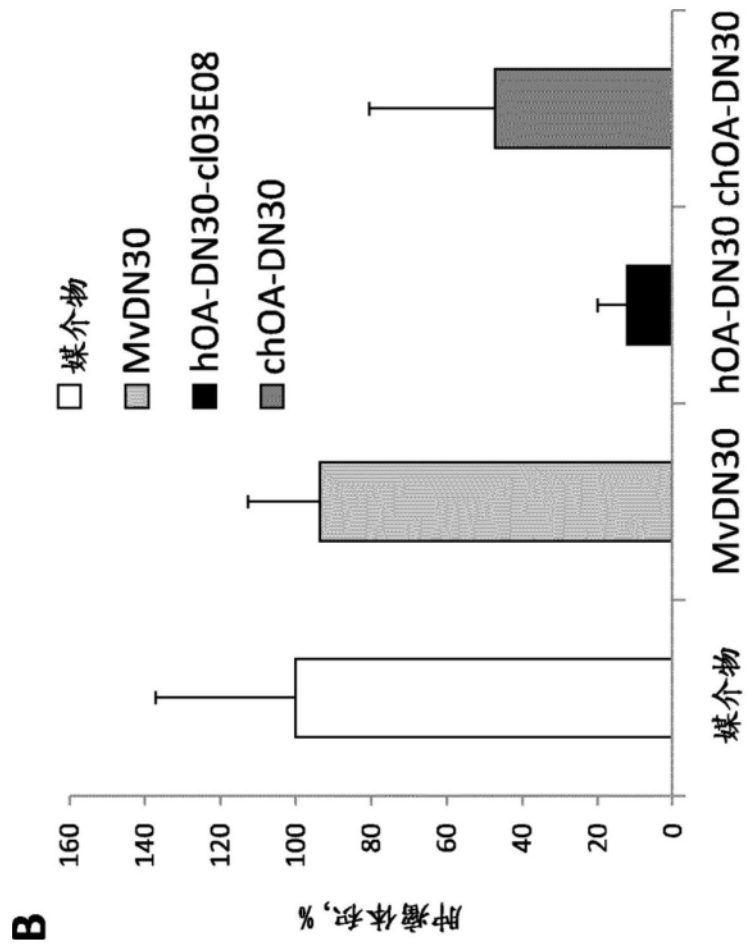


图12续

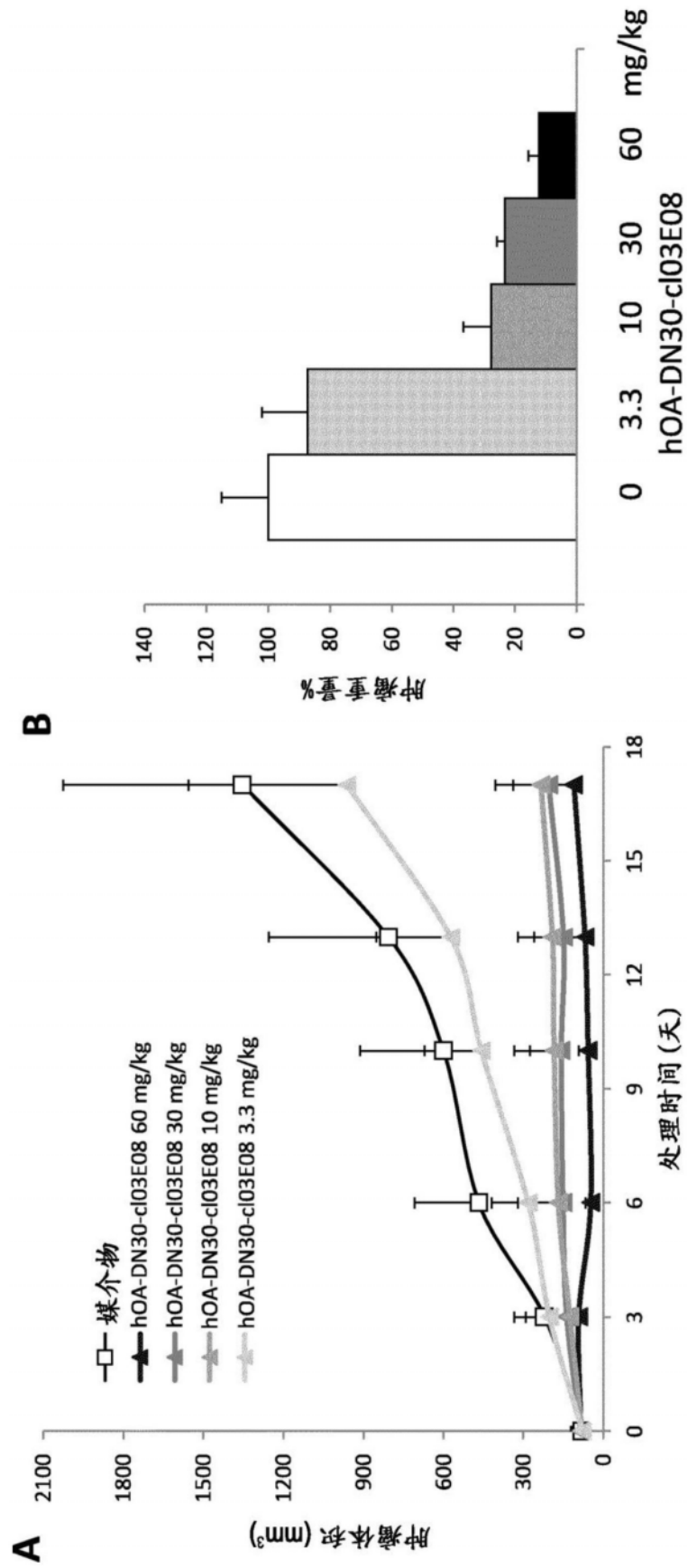


图13

Seq. ID N°7: VL-c103E08 人源化
 METDTILLWVLLWVPGSTGDI VLTQSPDLSAVSLGQRATINCKASQSVDYDGGYSMSWFQQKPGQPPKLL
 IYAASNLESGVPARFSGSGGTDFTLTITSSLAEDVATYYCQQSYEDPLTFGGGTKVEIK

Seq. ID N°8: VH-c103E08 人源化
 MGWSYIILFLVATATDGHSSQVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYFTSYWIHWVRQAPGQGLEWIGEIN
PSSGRTNYNEKFKNRVTVTVDKSTSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASRGYWGQGTTLTVSS

Seq. ID N°9: 人 CI
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST
 LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Seq. ID N°10: 人 CHI
 ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV

图14

Seq. ID N° 11: 第一Fc(杆突变)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN
 HVTQKSLSLSPGK

Seq. ID N° 12: 第二Fc(白突变)

MGWSYIILFLVATATDGHSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQQ
 NVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图15

Seq. ID N°14: DecoyMet 突变 K842E -TAGs

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVI~~L~~HEHHIFLGATNYIYV
 LNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFCQCDCSSKANLSGGVWKDNI~~N~~MALVVD~~T~~YYDDQLISCGSVNRGTCQRH
 VFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQPCDCVVSALGAKVLS~~S~~VKDRFINFFVGN~~T~~INSSYFFPDHPLHSISV
 RRLKETKDGFMFLTDQSYIDVLP~~E~~FRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRE~~T~~LDAQTFHTRIIRFCSINSGL
 HSYMEMPL~~E~~CILTEKRRKRRSTKKEVFNILLQAAVYVKPGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRS
 AMCAFPIKYVNDFFNKIVNKN~~N~~VRCLQHFYGP~~N~~HEHCFNR~~T~~LLRNS~~S~~GC~~E~~ARRDEYRTEFTTALQRVDLFMG
 QFSEVLLTSISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVSRSGPSTPHVNFLLD~~S~~HPVSP~~E~~VIVEHTLNQNGYTLV
 ITGKKITKIPLNGLGRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEEC~~L~~SGTWTQQICLPAIYKVFPNSAPLE
 GGTRLTICGWDFGFR~~R~~NNKFDLKKTRVLLGNE~~S~~CTLLTLESE~~T~~MNTL~~K~~CTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTQ
 YSTFSYVDPVIT~~S~~ISPKYGP~~M~~AGGTL~~L~~LTGN~~Y~~LN~~S~~GN~~S~~RHISIGGKTCTL~~K~~SV~~S~~NSILECYTPAQTI~~S~~TEF
 AVKLLIDLANRETSIFSYREDPIVYEIHP~~T~~KSFISGGSTITGVGKNLNSVSPRMVINVHEAGR~~N~~FTVACQH
 RSNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGI~~L~~SKYFDLIYVHN~~P~~VFE~~P~~FEK~~P~~VMI~~S~~MGNEN~~V~~LEIKGND
 IDPEAVKGEVLKVG~~N~~KSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQ~~A~~ISSTVLGKVI~~V~~QPDQ~~N~~FTASGA
 AWSHPQFEKGA~~A~~WSHPQFEKGA~~A~~WSHPQFEKGA~~A~~HHHHH

图16