



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118765273 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 11

(21) 申请号 202280092041.0

(22) 申请日 2022.12.20

(30) 优先权数据

63/291,910 2021.12.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/082021 2022.12.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/122588 EN 2023.06.29

(71) 申请人 融合制药公司

地址 加拿大安大略省

申请人 阿斯利康(英国)有限公司

(72) 发明人 S·阿格夫连 N·格林斯坦

I·R·杜菲 T·I·科斯特尼克

A·G·布坎南 Y·玛佐

S·卡斯图里兰根 杜群 C·杨

F·I·科默

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

专利代理师 彭昶

(51) Int.Cl.

C07D 257/02 (2006.01)

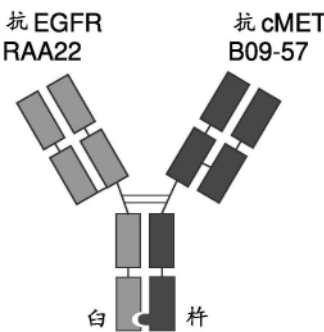
权利要求书8页 说明书63页 附图27页

(54) 发明名称

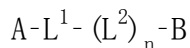
靶向EGFR-cMET的化合物及其用途

(57) 摘要

披露了化合物例如放射免疫缀合物,其包含螯合部分或其金属络合物、接头、以及同时靶向EGFR和cMET的抗体或其抗原结合片段。披露了这样的化合物的药物组合物以及使用这样的化合物或药物组合物治疗病况例如癌症的方法。



1. 一种包含式I的结构化合物,或其药学上可接受的盐:



式I

其中

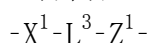
A为螯合部分或其金属络合物;

B为抗体或其抗原结合片段;

L^1 为键、 $C=O$ 、 $C=S$ 、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、任选地取代的 C_1-C_6 杂烷基、任选地取代的芳基、或任选地取代的杂芳基;

n 是1与5之间的整数(包括端值);并且

L^2 各自独立地具有式II的结构:



式II

其中

X^1 为 $-C(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)-*$ 、 $-C(S)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(S)-*$ 、 $-OC(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)O-*$ 、 $-NR^1C(O)NR^1-$ 、 $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-*$ 、 $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-*$ 、 $-O-$ 、或 $-NR^1-$,其中“*”表示与 L^3 的附接点,且 R^1 为氢、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、任选地取代的 C_1-C_6 杂烷基、任选地取代的芳基、或任选地取代的杂芳基;

L^3 为任选地取代的 C_1-C_{50} 烷基或任选地取代的 C_1-C_{50} 杂烷基;并且

Z^1 为 $-CH_2-#$ 、 $-C(O)-#$ 、 $-C(S)-#$ 、 $-OC(O)-#$ 、 $-C(O)O-#$ 、 $-NR^2C(O)-#$ 、 $-C(O)NR^2-#$ 或 $-NR^2-#$,其中“#”表示与B的附接点,且 R^2 为氢、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、任选地取代的 C_1-C_6 杂烷基、任选地取代的芳基或任选地取代的杂芳基,并且

其中该抗体或其抗原结合片段包含能够结合表皮生长因子受体(EGFR)的第一抗原结合结构域和能够结合cMET的第二抗原结合结构域,

其中该第一抗原结合结构域包含:

i. 包含以下互补决定区(CDR)的重链可变(VH)区:

具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1

具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2

具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3,

或其变体,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代;以及

ii. 包含以下CDR的轻链可变(VL)区:

具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1

具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2

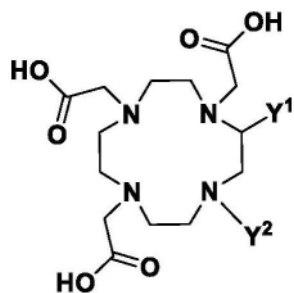
具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3,

或其变体,其中LCDR1、LCDR2和LCDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代。

2. 如权利要求1所述的化合物,其中所述螯合部分选自由以下组成的组:DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTMA((1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTAM(1,4,7,10-四(氨基甲酰甲基)-1,4,7,

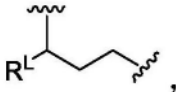
10-四氮杂环十二烷)、DOTPA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四丙酸)、DO3AM-乙酸(2-(4,7,10-三(2-氨基-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)乙酸)、DOTA-GA酸酐(2,2',2''-(10-(2,6-二氧化四氢-2H-吡喃-3-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸)、DOTP(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦酸))、DOTMP(1,4,6,10-四氮杂环癸烷-1,4,7,10-四亚甲基膦酸)、DOTA-4AMP(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(乙酰氨基-亚甲基膦酸))、CB-TE2A(1,4,8,11-四氮杂双环[6.6.2]十六烷-4,11-二乙酸)、NOTA(1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸)、NOTP(1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三(亚甲基膦酸))、TETPA(1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四丙酸)、TETA(1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四乙酸)、HEHA(1,4,7,10,13,16-六氮杂环十六烷-1,4,7,10,13,16-六乙酸)、PEPA(1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷-N,N',N'',N''',N''''-五乙酸)、H₄octapa(N,N'-双(6-羧基-2-吡啶甲基)-乙二胺-N,N'-二乙酸)、H₂dedpa(1,2-[[6-(羧基)-吡啶-2-基]-甲氨基]乙烷)、H₆phospa(N,N'-(亚甲基膦酸酯)-N,N'-[6-(甲氧羰基)吡啶-2-基]-甲基-1,2-二氨基乙烷)、TTHA(三亚乙基四胺-N,N,N',N'',N''',N''''-六乙酸)、D02P(四氮杂环十二烷二甲烷膦酸)、HP-D03A(羟丙基四氮杂环十二烷三乙酸)、EDTA(乙二胺四乙酸)、去铁胺、DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)、DTPA-BMA(二亚乙基三胺五乙酸-双甲基酰胺)和卟啉。

3. 如权利要求2所述的化合物,其中该化合物由式I-a或其金属络合物表示:



式 I-a

其中Y¹为-CH₂OCH₂(L²)_n-B、-C(O)(L²)_n-B或-C(S)(L²)_n-B,且Y²为-CH₂CO₂H;或者其中Y¹为H,且Y²为L¹-(L²)_n-B。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的化合物,其中L¹为 , 其中R¹为氢或-CO₂H。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的化合物,

其中该金属络合物包含选自由以下组成的组的金属:Bi、Pb、Y、Mn、Cr、Fe、Co、Zn、Ni、Tc、In、Ga、Cu、Re、镧系元素和锕系元素;或者

其中该金属络合物包含选自由以下组成的组的放射性核素:⁴⁴Sc、⁴⁷Sc、⁵⁵Co、⁶⁰Cu、⁶¹Cu、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁶Ga、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸²Rb、⁸⁶Y、⁸⁷Y、⁸⁹Zr、⁹⁰Y、⁹⁷Ru、⁹⁹Tc、^{99m}Tc、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹¹¹In、^{117m}Sn、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁹Tb、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²⁰¹Tl、²⁰³Pb、²¹¹At、²¹²Pb、²¹²Bi、²¹³Bi、²²³Ra、²²⁵Ac、²²⁷Th和²²⁹Th。

6. 如权利要求3-5中任一项所述的化合物,其中Y¹是H。

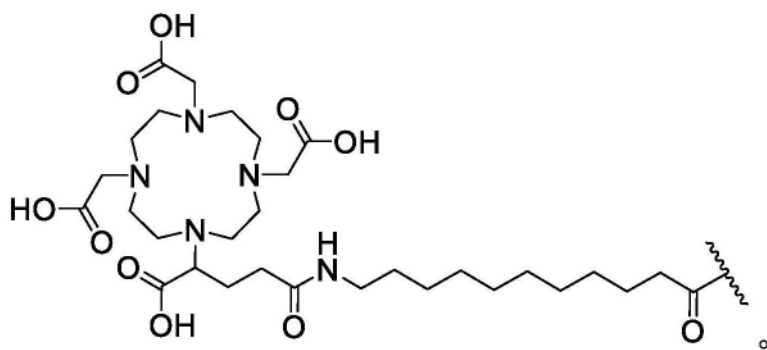
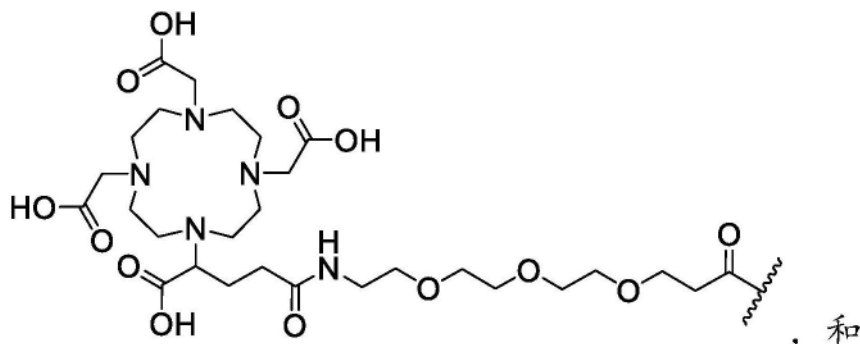
7. 如权利要求1-6中任一项所述的化合物,其中X¹为-C(O)NR¹-*或-NR¹C(O)-*,“*”表示与L³的附接点,且R¹为H。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的化合物, 其中 Z^1 为 $-CH_2-$ 。

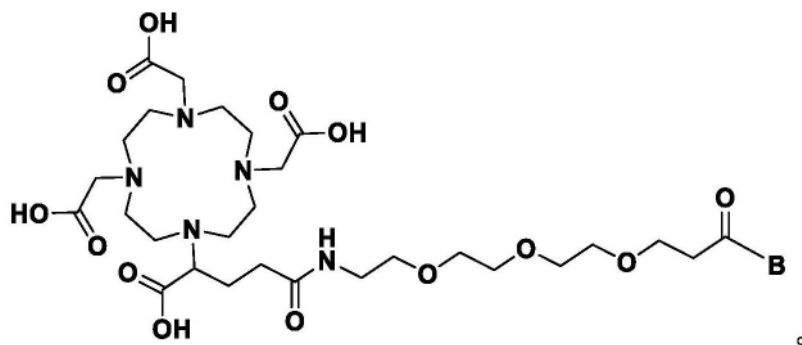
9. 如权利要求1-8中任一项所述的化合物, 其中n为1, 且L³包含(CH₂CH₂O)₂₋₂₀

10. 如权利要求1-8中任一项所述的化合物,其中n为1,且L³为(CH₂CH₂O)_m(CH₂)_w,其中m和w各自独立地为0与10之间的整数(包括端值),并且m和w中至少一个不为0。

11. 如权利要求1所述的化合物, 其中该化合物包含以下结构之一、或其金属络合物:



12. 如权利要求1所述的化合物, 其中该化合物包含以下结构、或其金属络合物:



13. 如权利要求1-12中任一项所述的化合物,其中A为螯合部分的金属络合物,且该金属络合物包含放射性核素。

14. 如权利要求13所述的化合物,其中该放射性核素为⁶⁸Ga、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu或²²⁵Ac。

15. 如权利要求13所述的化合物,其中该放射性核素为²²⁵Ac。

16. 如权利要求13所述的化合物, 其中该放射性核素为选自以下组成的组的 α 发射体: 砹-211 (^{211}At)、铋-212 (^{212}Bi)、铋-213 (^{213}Bi)、锕-225 (^{225}Ac)、镭-223 (^{223}Ra)、铅-212 (^{212}Pb)、钍-227 (^{227}Th) 和铽-149 (^{149}Tb)、或其子代。

17. 如权利要求16所述的化合物, 其中该 α 发射体为 ^{225}Ac 或其子代。

18. 如前述权利要求中任一项所述的化合物, 其中该第一抗原结合结构域包含:

i. 包含以下互补决定区 (CDR) 的重链可变 (VH) 区:

具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1

具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2

具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3;以及

ii. 包含以下CDR的轻链可变 (VL) 区:

具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1

具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2

具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3。

19. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中该第一抗原结合结构域能够以如下亲和力结合人EGFR,该亲和力低于包含抗体QD6的可变重链区序列和可变轻链区序列的抗原结合结构域能够结合人EGFR的亲和力,该可变重链区序列和可变轻链区序列分别如SEQ ID NO:47和48所示。

20. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中该第一抗原结合结构域包含:

a. 包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列的VH区;以及

b. 包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列的VL区。

21. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中该第二抗原结合结构域包含:

i. 包含以下CDR的VH区:

具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HCDR1

具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2

具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR3,

或其变体,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代;以及

ii. 包含以下CDR的VL区:

具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的LCDR1

具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的LCDR2

具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LCDR3,

或其变体,其中LCDR1、LCDR2和LCDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代。

22. 如权利要求21所述的化合物,其中该第二抗原结合结构域包含:

i. 包含以下CDR的VH区:

具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HCDR1

具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2

具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR3;以及

ii. 包含以下CDR的VL区:

具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的LCDR1

具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的LCDR2

具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LCDR3。

23. 如权利要求21或22所述的化合物,其中该第二抗原结合结构域包含:

a. 包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列的VH区;以及

b. 包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列的VL区。

24. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中该抗体或其抗原结合片段包含:

a. 第一重链,其中该第一重链包含该第一抗原结合结构域的VH区,以及第一重链恒定(CH)区或其片段;

b. 第一轻链,其中该第一轻链包含该第一抗原结合结构域的VL区,以及第一轻链恒定(CL)区或其片段;

c. 第二重链,其中该第二重链包含该第二抗原结合结构域的VH区,以及第二重链恒定(CH)区或其片段;以及

d. 第二轻链,其中该第二轻链包含该第二抗原结合结构域的VL区,以及第二轻链恒定(CL)区或其片段。

25. 如权利要求24所述的化合物,其中该第一CH区和该第二CH区各自包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列。

26. 如权利要求24或25所述的化合物,其中该第一重链和该第二重链形成异二聚体,任选地其中该第一重链和该第二重链中的一条包含位置354处的半胱氨酸(C)残基和位置366处的色氨酸(W)残基,并且另一条重链包含位置349处的半胱氨酸(C)残基、位置407处的缬氨酸(V)残基、位置366处的丝氨酸(S)和位置368处的丙氨酸(A),其中该恒定区的编号按照EU索引。

27. 如权利要求24-26中任一项所述的化合物,其中该抗体或其抗原结合片段包含:

a. 经修饰的CH区,其中该经修饰的CH区包含天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代;以及

b. 经修饰的相应CL区,其中该经修饰的CL包含天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代,

其中:

i. 该第一重链包含该经修饰的CH区并且该第一轻链包含该经修饰的相应CL区;或者

ii. 该第二重链包含该经修饰的CH区并且该第二轻链包含该经修饰的相应CL区,并且

其中该经修饰的CH区的取代的半胱氨酸和该经修饰的相应轻链的取代的半胱氨酸可以形成二硫键。

28. 如权利要求27所述的化合物,其中该经修饰的CH区包含在位置126处天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代;并且该经修饰的相应CL区包含在位置121处天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代,其中该恒定区的编号按照EU索引。

29. 如权利要求24-28中任一项所述的化合物,其中该第一CH区和/或该第二CH区包含突变以减少或消除该抗体或其抗原结合片段与一种或多种Fc γ 受体的结合。

30. 如权利要求24-29中任一项所述的化合物,其中该第一CH区和/或该第二CH区包含位置234处的苯丙氨酸、位置235处的谷氨酸和位置331处的丝氨酸,其中该恒定区的编号按

照EU索引。

31. 如权利要求24-30中任一项所述的化合物,其中:

- a. 该第一CH区包含与SEQ ID NO:39所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列;
- b. 该第二CH区包含与SEQ ID NO:40所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列;
- c. 该第一CL区包含与SEQ ID NO:41所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列;并且
- d. 该第二CL区包含与SEQ ID NO:34所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

32. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中该抗体或其抗原结合片段包含:

- a. 包含与SEQ ID NO:35所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的第一重链;
- b. 包含与SEQ ID NO:36所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的第二重链;
- c. 包含与SEQ ID NO:37所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的第一轻链;以及
- d. 包含与SEQ ID NO:38所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的第二轻链。

33. 如权利要求32所述的化合物,其中:

- a. 该第一重链包含具有SEQ ID NO:35所示序列的氨基酸序列;
- b. 该第二重链包含具有SEQ ID NO:36所示序列的氨基酸序列;
- c. 该第一轻链包含具有SEQ ID NO:37所示序列的氨基酸序列;并且
- d. 该第二轻链包含具有SEQ ID NO:38所示序列的氨基酸序列。

34. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中:

- a. 该能够结合EGFR的第一抗原结合结构域能够结合食蟹猴EGFR;
- b. 该能够结合EGFR的第一抗原结合结构域能够结合小鼠EGFR;
- c. 该能够结合cMET的第二抗原结合结构域能够结合食蟹猴cMET;
- d. 该第一抗原结合结构域对EGFR具有特异性;
- e. 该第二抗原结合结构域对cMET具有特异性;
- f. 该抗体或其抗原结合片段能够同时接合EGFR和cMET;
- g. 该抗体或其抗原结合片段能够被内化到细胞中;
- h. 当在体外细胞活力测定中测量时,该抗体或其抗原结合片段具有细胞毒性活性;和/或
- i. 该抗体或其抗原结合片段能够阻断EGFR和/或cMET的配体依赖性信号传导。

35. 如权利要求1所述的化合物,其中:

(a) 该第一抗原结合结构域包含:

- i. 包含以下互补决定区(CDR)的重链可变(VH)区:
具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1

具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2
 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3;以及
 ii. 包含以下CDR的轻链可变 (VL) 区:

具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1
 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2
 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3;并且

(b) 该第二抗原结合结构域包含:

i. 包含以下CDR的VH区:

具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HCDR1
 具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2
 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR3;以及

ii. 包含以下CDR的VL区:

具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的LCDR1
 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的LCDR2
 具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LCDR3。

36. 如前述权利要求中任一项所述的化合物, 其中该第一抗原结合结构域能够以如下Kd的亲和力结合人EGFR:

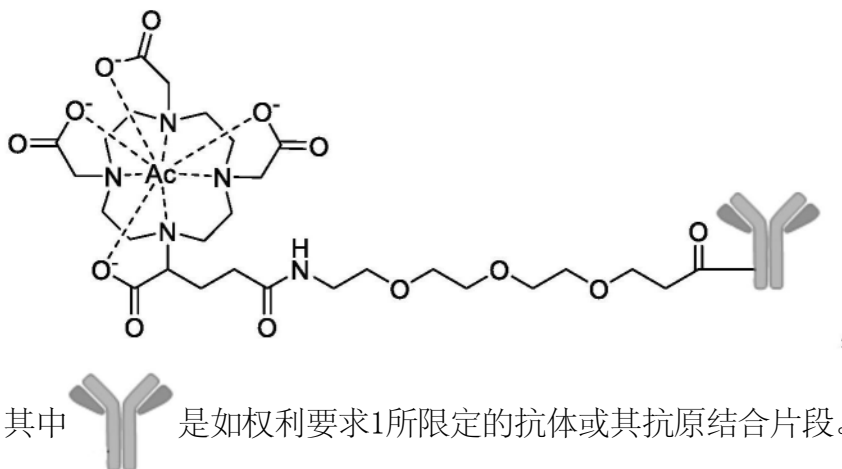
- a. 在10和100nM之间;
- b. 在20和80nM之间;
- c. 在30和75nM之间;或者
- d. 在35和50nM之间。

37. 如前述权利要求中任一项所述的化合物, 其中该第二抗原结合结构域能够以如下Kd的亲和力结合人cMET:

- a. 低于10nM;或者
- b. 低于5nM。

38. 如权利要求19、36和37中任一项所述的化合物, 其中该亲和力通过表面等离子体共振测量。

39. 如权利要求1所述的化合物, 其中该化合物包括以下结构:



其中  是如权利要求1所限定的抗体或其抗原结合片段。

40. 如权利要求39所述的化合物, 其中该抗体或其抗原结合片段经由赖氨酸残基的侧

链氨基基团连接至 $A-L^1-(L^2)_n-$ 。

41. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-40中任一项所述的化合物以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

42. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如权利要求1-40中任一项所述的化合物或如权利要求41所述的组合物。

43. 如权利要求42所述的方法,其中该癌症是选自由以下组成的组的实体瘤癌症:肾上腺皮质癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜腺癌、尤文肉瘤、胆囊癌、胶质瘤、头颈癌、肝癌、肺癌、神经母细胞瘤、神经内分泌癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、唾液腺样囊性癌、精母细胞性精原细胞瘤和葡萄膜黑色素瘤。

44. 如权利要求43所述的方法,其中该癌症是肺癌、结肠直肠癌、胰腺癌或头颈癌。

45. 如权利要求42-44中任一项所述的方法,该方法进一步包括施用抗增殖剂、放射增敏剂或免疫调节剂。

46. 如权利要求1-40中任一项所述的化合物或如权利要求41所述的药物组合物,用于在治疗癌症的方法中使用。

47. 如权利要求1-40中任一项所述的化合物或如权利要求41所述的药物组合物在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

靶向EGFR-cMET的化合物及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2021年12月20日提交的美国临时专利申请号63/291,910的优先权,该美国临时专利申请的全部内容出于所有目的通过引用特此并入。

背景技术

[0003] 非小细胞肺癌(NSCLC)仍然是全世界癌症相关死亡的主要原因。虽然随着EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(TKI)的开发,某些患者的晚期NSCLC的预后显著改善,但长期存活的转移性NSCLC患者仍然罕见。Lin等人最近的研究显示,在用埃罗替尼(erlotinib)或吉非替尼(gefitinib)治疗的EGFR突变型转移性NSCLC患者中5年存活率仅为14.6%。抗EGFR TKI易产生抗性,并且长期以来已知潜在的抗性机制是EGFR突变和cMET过表达的共存。在临床上测试的一种有希望的方法是埃万妥单抗(amivantamab),一种已经被批准用于治疗非小细胞肺癌的人EGFR-cMET双特异性抗体。靶向EGFR和cMET受体增加了治疗对癌细胞的特异性。

[0004] 通常,抗体的功效取决于靶中细胞的数量。另外,药物抗性仍然是靶向癌症疗法面临的主要挑战,其中原发性抗性和获得性抗性限制了靶向疗法的长期功效。抗性机制包括二级突变、致癌下游信号传导模块的激活、配体上调和替代生长因子受体的扩增。

[0005] 因此,仍然需要可以同时靶向EGFR和cMET而没有上述缺点的改善的治疗方法(例如癌症治疗方法)。

发明内容

[0006] 本披露涉及同时靶向EGFR和cMET的化合物(例如,放射免疫缀合物)、其药物组合物,以及使用这样的化合物或药物组合物治疗癌症的方法。与裸抗体不同,放射免疫缀合物不需要阻断受体功能以具有治疗功效;相反,放射免疫缀合物发射在有限范围内靶向周围肿瘤细胞的放射性粒子(例如, α 发射体),从而防止任何脱靶相关毒性。用于EGFR和cMET过表达的癌症的靶向EGFR-cMET的化合物(例如,放射免疫缀合物)利用EGFR-cMET络合物经历抗体触发的内化的能力,将靶向性放射性核素特异性递送到癌细胞内。抗体与正常健康组织/细胞上的任一受体单价结合不会导致内化。

[0007] 在某些实施例中,与目前一些已知的放射治疗剂相比,所提供的化合物(例如,放射免疫缀合物)表现出增加的排泄率(例如,在施用于哺乳动物之后),同时仍维持治疗功效。在一些实施例中,更快的排泄可以通过限制化合物在受试者体内停留的时间量来限制脱靶毒性。因此,在一些实施例中,所提供的化合物表现出降低的脱靶毒性。

[0008] 在一方面,提供了包含以下结构的化合物或其药学上可接受的盐:

[0009] $A-L^1-(L^2)_n-B$

[0010] 式I

[0011] 其中

[0012] A为螯合部分或其金属络合物;

[0013] B为抗体或其抗原结合片段;

[0014] L^1 为键、 $C=O$ 、 $C=S$ 、任选地取代的 C_1 - C_6 烷基、任选地取代的 C_1 - C_6 杂烷基、任选地取代的芳基、或任选地取代的杂芳基；

[0015] n 是1与5之间的整数(包括端值)；并且

[0016] L^2 各自独立地具有式II的结构：

[0017] $-X^1-L^3-Z^1-$

[0018] 式II

[0019] 其中

[0020] X^1 为 $-C(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)-*$ 、 $-C(S)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(S)-*$ 、 $-OC(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)-*$ 、 $-NR^1C(O)NR^1-$ 、 $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-*$ 、 $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-*$ 、 $-O-$ 、或 $-NR^1-$ ，其中“*”表示与 L^3 的附接点，且 R^1 为氢、任选地取代的 C_1 - C_6 烷基、任选地取代的 C_1 - C_6 杂烷基、任选地取代的芳基、或任选地取代的杂芳基；

[0021] L^3 为任选地取代的 C_1 - C_{50} 烷基或任选地取代的 C_1 - C_{50} 杂烷基；并且

[0022] Z^1 为 $-CH_2-#$ 、 $-C(O)-#$ 、 $-C(S)-#$ 、 $-OC(O)-#$ 、 $-C(O)O-#$ 、 $-NR^2C(O)-#$ 、 $-C(O)NR^2-#$ 或 $-NR^2-#$ ，其中“#”表示与B的附接点，且 R^2 为氢、任选地取代的 C_1 - C_6 烷基、任选地取代的 C_1 - C_6 杂烷基、任选地取代的芳基或任选地取代的杂芳基，并且

[0023] 其中该抗体或其抗原结合片段包含能够结合表皮生长因子受体(EGFR)的第一抗原结合结构域和能够结合cMET的第二抗原结合结构域，

[0024] 其中该第一抗原结合结构域包含：

[0025] i. 包含以下互补决定区(CDR)的重链可变(VH)区：

[0026] 具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1

[0027] 具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2

[0028] 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3，

[0029] 或其变体，其中HCDR1、HCDR2和HCDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代；以及

[0030] ii. 包含以下CDR的轻链可变(VL)区：

[0031] 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1

[0032] 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2

[0033] 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3，

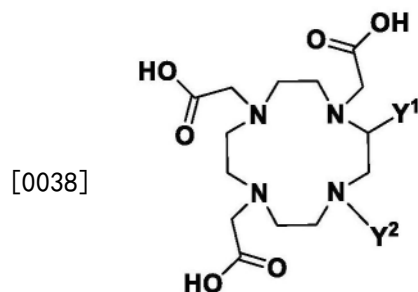
[0034] 或其变体，其中LCDR1、LCDR2和LCDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代。

[0035] 在一些实施例中，式I中的变量A为螯合部分，该螯合部分选自由以下组成的组：DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTMA((1R,4R,7R,10R)- α , α' , α'' , α''' -四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTAM(1,4,7,10-四(氨基甲酰甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷)、DOTPA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四丙酸)、DO3AM-乙酸(2-(4,7,10-三(2-氨基-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)乙酸)、DOTA-GA酸酐(2,2',2''-(10-(2,6-二氧化四氢-2H-吡喃-3-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸)、DOTP(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦酸))、DOTMP(1,4,6,10-四氮杂环癸烷-1,4,7,10-四亚甲基膦酸)、DOTA-4AMP(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(乙酰氨基-亚甲基膦酸))、CB-TE2A(1,4,8,11-四氮杂双环

[6.6.2]十六烷-4,11-二乙酸)、NOTA(1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸)、NOTP(1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三(亚甲基膦酸))、TETPA(1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四丙酸)、TETA(1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四乙酸)、HEHA(1,4,7,10,13,16-六氮杂环十六烷-1,4,7,10,13,16-六乙酸)、PEPA(1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷-N,N',N'',N''',N''''-五乙酸)、H₄octapa(N,N'-双(6-羧基-2-吡啶甲基)-乙二胺-N,N'-二乙酸)、H₂dedpa(1,2-[[6-(羧基)-吡啶-2-基]-甲氨基]乙烷)、H₆phospa(N,N'-(亚甲基膦酸酯)-N,N'-[6-(甲氧羰基)吡啶-2-基]-甲基-1,2-二氨基乙烷)、TTHA(三亚乙基四胺-N,N,N',N'',N''',N''''-六乙酸)、D02P(四氮杂环十二烷二甲烷膦酸)、HP-D03A(羟丙基四氮杂环十二烷三乙酸)、EDTA(乙二胺四乙酸)、去铁胺、DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)、DTPA-BMA(二亚乙基三胺五乙酸-双甲基酰胺)和卟啉。

[0036] 在某些实施例中,式I中的变量A是DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)或其金属络合物。

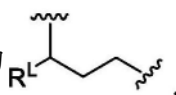
[0037] 在一些实施例中,该化合物由式I-a或其金属络合物表示:



式 I-a

[0039] 其中Y¹为-CH₂OCH₂(L²)_n-B、-C(O)(L²)_n-B或-C(S)(L²)_n-B,且Y²为-CH₂CO₂H;或者

[0040] 其中Y¹为H,且Y²为L¹-(L²)_n-B。在某些实施例中,Y¹为H。

[0041] 在一些实施例中,L¹为 , 且R¹为氢或-CO₂H。

[0042] 在某些实施例中,X¹为-C(O)NR¹-*或-NR¹C(O)-*,“*”表示与L³的附接点,且R¹为H。

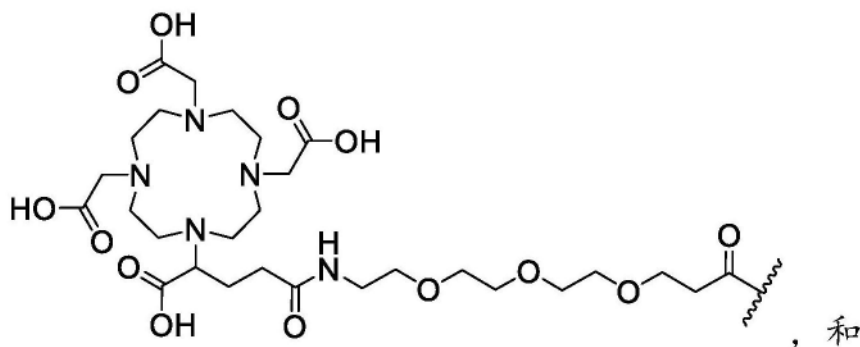
[0043] 在某些实施例中,Z¹为-CH₂-。

[0044] 在一些实施例中,L³包含(CH₂CH₂O)₂₋₂₀。在一些实施例中,L³为(CH₂CH₂O)_m(CH₂)_w,其中m和w各自独立地为0与10之间的整数(包括端值),并且m和w中至少一个不为0。

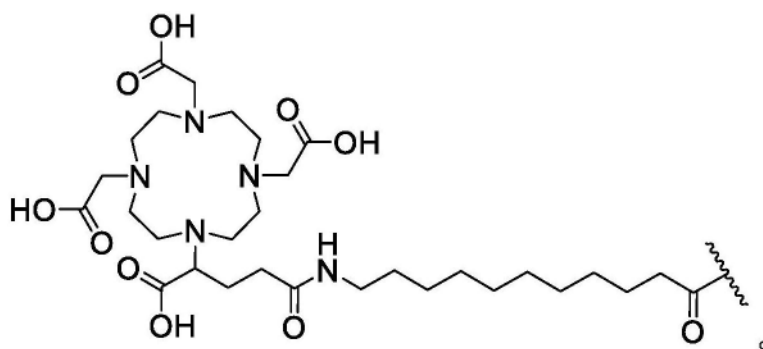
[0045] 在一些实施例中,金属络合物包含选自以下组成的组的金属:Bi、Pb、Y、Mn、Cr、Fe、Co、Zn、Ni、Tc、In、Ga、Cu、Re、镧系元素和锕系元素。在一些实施例中,金属络合物包含选自以下组成的组的放射性核素:⁴⁴Sc、⁴⁷Sc、⁵⁵Co、⁶⁰Cu、⁶¹Cu、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁶Ga、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸²Rb、⁸⁶Y、⁸⁷Y、⁸⁹Zr、⁹⁰Y、⁹⁷Ru、⁹⁹Tc、^{99m}Tc、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹¹¹In、^{117m}Sn、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁹Tb、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²⁰¹Tl、²⁰³Pb、²¹¹At、²¹²Pb、²¹²Bi、²¹³Bi、²²³Ra、²²⁵Ac、²²⁷Th和²²⁹Th。

[0046] 在一些实施例中,变量A是螯合部分的金属络合物。在一些这样的实施例中,金属络合物包含放射性核素。在一些实施例中,放射性核素为α发射体,例如选自以下组成的组的α发射体:砹-211(²¹¹At)、铋-212(²¹²Bi)、铋-213(²¹³Bi)、锕-225(²²⁵Ac)、镭-223(²²³Ra)、铅-212(²¹²Pb)、钍-227(²²⁷Th)和铽-149(¹⁴⁹Tb)、或其子代。在一些实施例中,放射性核素为⁶⁸Ga、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu或²²⁵Ac。在一些实施例中,放射性核素为²²⁵Ac或其子代。

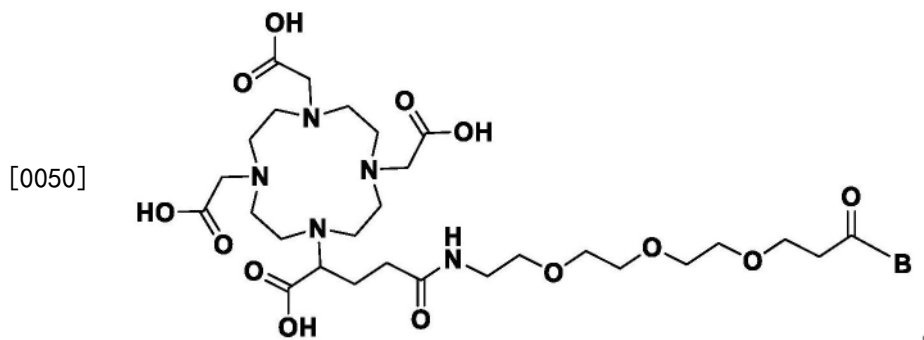
[0047] 在一些实施例中,具有式I的化合物包含以下结构之一、或其金属络合物:



[0048]



[0049] 在一些实施例中,化合物或其药学上可接受的盐包含以下结构、或其金属络合物:



[0051] 在一些实施例中,提及式I,变量A是螯合部分的金属络合物,并且该金属络合物包含放射性核素。在某些实施例中,放射性核素为 ^{68}Ga 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 或 ^{225}Ac 。在某些实施例中,放射性核素为 ^{225}Ac 。在某些实施例中,放射性核素为选自以下组成的组的 α 发射体:砹-211 (^{211}At)、铋-212 (^{212}Bi)、铋-213 (^{213}Bi)、锕-225 (^{225}Ac)、镭-223 (^{223}Ra)、铅-212 (^{212}Pb)、钍-227 (^{227}Th) 和铽-149 (^{149}Tb)、或其子代。在某些实施例中, α 发射体为 ^{225}Ac 或其子代。

[0052] 在一些实施例中,提及包含在具有式I的化合物中的抗体或其抗原结合片段,第一抗原结合结构域包含:

[0053] i. 包含以下互补决定区 (CDR) 的重链可变 (VH) 区:

[0054] 具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1

[0055] 具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2

[0056] 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3;以及

[0057] ii. 包含以下CDR的轻链可变 (VL) 区:

[0058] 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1

[0059] 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2

[0060] 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3。

[0061] 在一些实施例中,提及包含在具有式I的化合物中的抗体或其抗原结合片段,第一抗原结合结构域包含:

[0062] a.包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列的VH区;以及

[0063] b.包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列的VL区。

[0064] 在一些实施例中,提及包含在具有式I的化合物中的抗体或其抗原结合片段,第二抗原结合结构域包含:

[0065] i.包含以下CDR的VH区:

[0066] 具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HCDR1

[0067] 具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2

[0068] 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR3,

[0069] 或其变体,其中HCDR1、HCDR2和HCDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代;以及

[0070] ii.包含以下CDR的VL区:

[0071] 具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的LCDR1

[0072] 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的LCDR2

[0073] 具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LCDR3,

[0074] 或其变体,其中LCDR1、LCDR2和LCDR3中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代。

[0075] 在一些实施例中,提及包含在具有式I的化合物中的抗体或其抗原结合片段,第二抗原结合结构域包含:

[0076] i.包含以下CDR的VH区:

[0077] 具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HCDR1

[0078] 具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2

[0079] 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR3;以及

[0080] ii.包含以下CDR的VL区:

[0081] 具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的LCDR1

[0082] 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的LCDR2

[0083] 具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LCDR3。

[0084] 在一些实施例中,提及包含在具有式I的化合物中的抗体或其抗原结合片段,第二抗原结合结构域包含:

[0085] a.包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列的VH区;以及

[0086] b.包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列的VL区。

[0087] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含:

[0088] a.能够结合表皮生长因子受体(EGFR)的第一抗原结合结构域,该第一抗原结合结构域包含:

[0089] i.包含以下互补决定区(CDR)的重链可变(VH)区:

[0090] 具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1

[0091] 具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2

[0092] 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3;以及

[0093] ii.包含以下CDR的轻链可变(VL)区:

[0094] 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1

[0095] 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2

[0096] 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3;以及

[0097] b.能够结合cMET的第二抗原结合结构域,该第二抗原结合结构域包含:

[0098] i.包含以下CDR的VH区:

[0099] 具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HCDR1

[0100] 具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2

[0101] 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR3;以及

[0102] ii.包含以下CDR的VL区:

[0103] 具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的LCDR1

[0104] 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的LCDR2

[0105] 具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LCDR3。

[0106] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含:

[0107] a.第一重链,其中该第一重链包含该第一抗原结合结构域的VH区,以及第一重链恒定(CH)区或其片段;

[0108] b.第一轻链,其中该第一轻链包含该第一抗原结合结构域的VL区,以及第一轻链恒定(CL)区或其片段;

[0109] c.第二重链,其中该第二重链包含该第二抗原结合结构域的VH区,以及第二重链恒定(CH)区或其片段;以及

[0110] d.第二轻链,其中该第二轻链包含该第二抗原结合结构域的VL区,以及第二轻链恒定(CL)区或其片段。

[0111] 在一些实施例中,第一CH区和第二CH区各自包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0112] 在一些实施例中,第一重链和第二重链形成异二聚体,任选地其中该第一重链和该第二重链中的一条包含位置354处的半胱氨酸(C)残基和位置366处的色氨酸(W)残基,并且另一条重链包含位置349处的半胱氨酸(C)残基、位置407处的缬氨酸(V)残基、位置366处的丝氨酸(S)和位置368处的丙氨酸(A),其中该恒定区的编号按照EU索引。

[0113] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含:

[0114] a.经修饰的CH区,其中该经修饰的CH区包含天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代;以及

[0115] b.经修饰的相应CL区,其中该经修饰的CL包含天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代,

[0116] 其中：

[0117] i. 该第一重链包含该经修饰的CH区并且该第一轻链包含该经修饰的相应CL区；或者

[0118] ii. 该第二重链包含该经修饰的CH区并且该第二轻链包含该经修饰的相应CL区，并且

[0119] 其中该经修饰的CH区的取代的半胱氨酸和该经修饰的相应轻链的取代的半胱氨酸可以形成二硫键。

[0120] 在一些实施例中，经修饰的CH区包含在位置126处天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代；并且该经修饰的相应CL区包含在位置121处天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代，其中该恒定区的编号按照EU索引。

[0121] 在一些实施例中，第一CH区和/或第二CH区包含突变以减少或消除该抗体或其抗原结合片段与一种或多种Fc γ 受体的结合。

[0122] 在一些实施例中，第一CH区和/或第二CH区包含位置234处的苯丙氨酸、位置235处的谷氨酸和位置331处的丝氨酸，其中该恒定区的编号按照EU索引。

[0123] 在一些实施例中，具有式I的化合物特征在于：

[0124] a. 该第一CH区包含与SEQ ID NO:39所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列；

[0125] b. 该第二CH区包含与SEQ ID NO:40所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列；

[0126] c. 该第一CL区包含与SEQ ID NO:41所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列；以及

[0127] d. 该第二CL区包含与SEQ ID NO:34所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0128] 在一些实施例中，抗体或其抗原结合片段包含：

[0129] a. 包含与SEQ ID NO:35所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的第一重链；

[0130] b. 包含与SEQ ID NO:36所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的第二重链；

[0131] c. 包含与SEQ ID NO:37所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的第一轻链；以及

[0132] d. 包含与SEQ ID NO:38所示序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的第二轻链。

[0133] 在一些实施例中，具有式I的化合物特征在于：

[0134] a. 该第一重链包含具有SEQ ID NO:35所示序列的氨基酸序列；

[0135] b. 该第二重链包含具有SEQ ID NO:36所示序列的氨基酸序列；

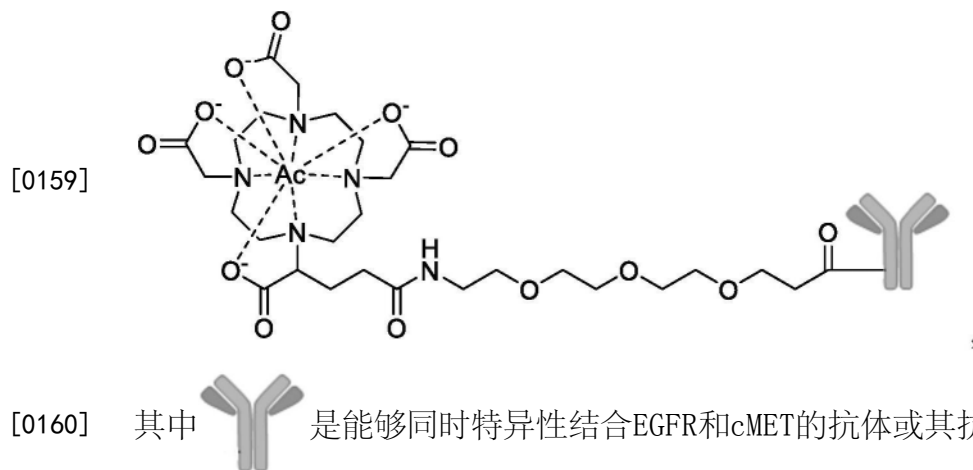
[0136] c. 该第一轻链包含具有SEQ ID NO:37所示序列的氨基酸序列；以及

[0137] d. 该第二轻链包含具有SEQ ID NO:38所示序列的氨基酸序列。

[0138] 在一些实施例中，具有式I的化合物特征在于：

[0139] a. 该能够结合EGFR的第一抗原结合结构域能够结合食蟹猴EGFR；

- [0140] b. 该能够结合EGFR的第一抗原结合结构域能够结合小鼠EGFR;
- [0141] c. 该能够结合cMET的第二抗原结合结构域能够结合食蟹猴cMET;
- [0142] d. 该第一抗原结合结构域对EGFR具有特异性;
- [0143] e. 该第二抗原结合结构域对cMET具有特异性;
- [0144] f. 该抗体或其抗原结合片段能够同时接合EGFR和cMET;
- [0145] g. 该抗体或其抗原结合片段能够被内化到细胞中;
- [0146] h. 当在体外细胞活力测定中测量时, 该抗体或其抗原结合片段具有细胞毒性活性; 和/或
- [0147] i. 该抗体或其抗原结合片段能够阻断EGFR和/或cMET的配体依赖性信号传导。
- [0148] 在一些实施例中, 具有式I的化合物特征在于第一抗原结合结构域能够以如下Kd的亲和力结合人EGFR:
- [0149] a. 在10和100nM之间;
- [0150] b. 在20和80nM之间;
- [0151] c. 在30和75nM之间; 或者
- [0152] d. 在35和50nM之间。
- [0153] 在一些实施例中, 具有式I的化合物特征在于第二抗原结合结构域能够以如下Kd的亲和力结合人cMET:
- [0154] a. 低于10nM; 或者
- [0155] b. 低于5nM。
- [0156] 在一些实施例中, 具有式I的化合物特征在于, 第一抗原结合结构域能够以如下亲和力结合人EGFR, 该亲和力低于包含抗体QD6的可变重链区序列和可变轻链区序列的抗原结合结构域能够结合人EGFR的亲和力, 该可变重链区序列和可变轻链区序列分别如SEQ ID NO: 47和48所示。
- [0157] 在一些实施例中, 上述结合亲和力通过表面等离子体共振测量。
- [0158] 在一些实施例中, 具有式I的化合物包含以下结构:



下述EGFR-cMET单克隆双特异性抗体RAA22/B09 DuetMab)。在一些实施例中, 抗体或其抗原结合片段经由赖氨酸残基的侧链氨基基团连接至 $A-L^1-(L^2)_n-$ 。

- [0161] 在另一方面, 本披露还涉及一种药物组合物, 其包含上述化合物之一以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

[0162] 仍在本发明范围内的是一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者(例如,人)施用治疗有效量的上述化合物或其相应的组合物。

[0163] 在一些实施例中,该癌症是选自由以下组成的组的实体瘤癌症:肾上腺皮质癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜腺癌、尤文肉瘤、胆囊癌、胶质瘤、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌或HNSCC)、肝癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌或NSCLC)、神经母细胞瘤、神经内分泌癌、卵巢癌、胰腺癌(例如,胰腺导管腺癌或PDAC)、前列腺癌、胃癌、肾细胞癌、唾液腺样囊性癌、精母细胞性精原细胞瘤和葡萄膜黑色素瘤。

[0164] 在一些实施例中,癌症是肺癌、结肠直肠癌、胰腺癌或头颈癌。

[0165] 在一些实施例中,本发明的治疗方法进一步包括向有需要的受试者(例如,人)施用抗增殖剂、放射增敏剂、免疫调控或免疫调节剂。

[0166] 仍在本披露范围内的是一种用于在治疗癌症的方法中使用的上述化合物或药物组合物。

[0167] 本披露进一步涵盖上述化合物或药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

附图说明

[0168] 图1A和1B分别是RAA22/B09-57和QD6/B09-57 DuetMab的图形描绘。所示的是抗EGFR RAA22和QD6的Fab、抗cMET B09-57的Fab以及臼(Hole)和杵(Knob)重链。结构绘制是单个结构域结构的合成。

[0169] 图2示出了通过Octet分析进行使用抗原捕获形式的同时结合研究。负载有人cMET抗原的传感器首先与抗体然后与人EGFR抗原进行连续的缔合和解离相互作用。Ass=缔合;Diss=解离;NI-NTA=镍-次氨基三乙酸。

[0170] 图3A示出了显示EGFR和c-Met物种交叉反应性的ELISA结果。高亲和力单特异性EGFR IgG QD6以及单价双特异性EGFR/cMET DuetMab QD6/B09与人、食蟹猴和小鼠EGFR结合。亲和力降低的单特异性EGFR IgG RAA22与QD6相比与人、食蟹猴和小鼠EGFR的结合更弱,且相应的单价双特异性EGFR/c-Met DuetMab RAA22/B09显示出相对于二价亲本IgG RAA22与人和食蟹猴EGFR的结合仍更弱,并且显示出与小鼠EGFR的标称结合。单特异性c-Met IgG B09以及所有双特异性变体显示与人和食蟹猴c-Met相当的结合,但与小鼠c-Met没有可检测的结合。

[0171] 图3B示出了显示EGFR和c-Met家族特异性的ELISA结果。所测试的抗体均未显示出与任何EGFR HER家族蛋白(HER2、HER3或HER4)或任何c-Met家族成员(Ron (CD136)或Semaphorin 3a)的任何可感知的结合。

[0172] 图4示出了RAA22/B09双特异性mAb的内化和向酸化细胞内隔室的运输使用pHAb pH敏感性染料(普洛麦格公司(Promega))标记的抗体显现。对照抗体包括R347同种型对照和单价双特异性对照抗体抗EGFR RAA22/R347和抗cMET B09/R347。将pHAb标记的抗体与NCI-H1975肺癌细胞一起在37℃和5% CO₂的加湿培养箱中以1.25μg/mL的浓度孵育。在指定时间点使用Cy3过滤器在Operetta高含量成像系统上捕获荧光图像。细胞荧光强度随时间增加被认为是内化和向酸性细胞内隔室的运输的证据,如通过pH敏感性荧光剂所测量的。

[0173] 图5示出了RAA22/B09双特异性mAb的内化和向酸化细胞内隔室的运输使用pHAb pH敏感性染料标记的抗体显现,但细胞用0.625 μ g/mL的较低浓度的抗体处理。

[0174] 图6A示出了QD6/B09和RAA22/B09单克隆抗体 (mAb) 在H1975细胞中内化的动力学。(a) 在内化开始时和1小时后,用针对细胞质的CellTracker Blue CMAC (蓝色) 以及用2.5 μ g/mL QD6/B09-AlexaFluor647 (品红色, 上图) 或2.5 μ g/mL RAA22/B09AlexaFluor-647 (品红色, 下图) 标记的细胞的图像叠加。细胞用CellTracker Blue CMAC标记,然后在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C下与mAb-AlexaFluor6457结合,并经受以下内化条件:(37 $^{\circ}$ C、70%湿度和5% CO₂)。

[0175] 图6B示出了QD6/B09和RAA22/B09单克隆抗体 (mAb) 在H1975细胞中内化的动力学。mAb-AlexaFluor647内化的时间过程通过使用算法 (材料和方法) 对动力学图像进行定量分析来确定。使用算法 (Vainshtein, 2015) 处理以5分钟间隔拍摄的动力学图像以确定细胞质中的抗体积累。对于QD6/B09-AlexaFluor647 (红色) 与RAA22/B09-AlexaFluor647 (蓝色), 细胞质中的抗体信号归一化为细胞中的抗体荧光 (细胞质中的级分), 显示为三个独立实验之一。使用公式 $F_{\text{细胞质}}(t) = (1 - e^{-k_{\text{int}} \cdot t}) \cdot F_{\text{最大}}$, 细胞质的曲线拟合, 从内化的时间过程计算内化速率常数 (k_{int}), 其中 $F_{\text{最大}}$, 细胞质是每个细胞的细胞质强度与每个细胞的总强度的最大比率。由 k_{int} 计算的QD6/B09的 $T_{1/2}$ 为 37.5 ± 10.6 min, RAA22/B09为 43.2 ± 15.5 (n = 3)。

[0176] 图7A示出了QD6/B09 DuetMab及其各自的单组对照抗体的内化曲线。通过每个构建体各自的膜和细胞质信号的时间过程显示内化曲线。QD6/B09组是使用Opera共聚焦荧光显微镜获得的。

[0177] 图7B示出了RAA22/B09 DuetMab及其各自的单组对照抗体的内化曲线。通过每个构建体各自的膜和细胞质信号的时间过程显示内化曲线。使用蔡司旋转盘共聚焦荧光显微镜获得该组。QD6/B09和QD6/IgG的相同曲线表明QD6/B09 DuetMab的EGFR-组驱动的内化模式, 而RAA22/B09 DuetMab需要EGFR和c-MET组均接合以有效内化。

[0178] 图8A示出了RAA22/B09在表达中等和高靶标c-MET和EGFR细胞表面受体的细胞中的内化曲线。所示的是H1975细胞中RAA22/B09-AF647的膜、细胞质和总信号。示出了2的一个代表性实验。H1975细胞显示总强度和膜强度的同时下降, 表明抗体从细胞表面解离。

[0179] 图8B等同于图8A, 但在HCC827细胞中。HCC827细胞在实验时间过程中具有稳定的总信号。膜信号的降低是衍生的抗体内化。

[0180] 图9A示出了RAA22/B09单组对照抗体在HCC827细胞中的内化。由于通过单组结合与EGFR的结合较弱, RAA22/IgG单组的强度曲线是RAA22/B09的约十分之一。

[0181] 图9B示出了B09/IgG单组与细胞膜解离, 表现为总信号和膜信号随时间同时下降。

[0182] 图10A是示意图, 描绘包含螯合物、接头和交联基团的双功能螯合物的一般结构。

[0183] 图10B是示意图, 描绘包含螯合物、接头和靶向性部分的双功能缀合物的一般结构。

[0184] 图10C和图10D是示意图, 描绘本文披露的两种示例性EGFR-cMET放射免疫缀合物 [¹⁷⁷Lu]-DOTA-抗EGFR-cMET和 [²²⁵Ac]-DOTA-抗EGFR-cMET的结构。

[0185] 图11是示意图, 描绘双功能螯合物4-{[11-氧代-11-(2,3,5,6-四氟苯氧基)十一烷基]氨基甲酰基}-2-[4,7,10-三(羧基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基]丁酸 (化合物B) 的合成。化合物B的合成描述于实例6。

[0186] 图12是示意图,描绘双功能螯合物4- {[2-(2-{2-[3-氧代-3-(2,3,5,6-四氟苯氧基)丙氧基]乙氧基}乙氧基)乙基]氨基甲酰基}-2-[4,7,10-三(羧基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基]丁酸(化合物C)的合成。化合物C的合成描述于实例7。

[0187] 图13是示意图,描绘用于合成 ^{177}Lu -化合物C-抗EGFR-cMET缀合物(例如,下述化合物E和化合物F)的缀合和放射性标记。参见实例8。

[0188] 图14A-图14B示出了在不存在(总结合)或存在(非特异性结合) $4\mu\text{M}$ 未标记抗体的情况下,化合物E与具有不同EGFR和c-MET表达水平的不同细胞系的结合。通过从总结合中减去非特异性结合来计算特异性结合。显示的值均为平均值 $\pm$ SEM($n=3$)。参见实例9。

[0189] 图15示出了在孵育后2h和24h时具有不同EGFR和c-MET表达水平的HCC827细胞、HT29细胞、H441细胞和H1975细胞中化合物E (10nM) 的内化(或体外残留)的结果。显示的值均为平均值 $\pm$ SEM($n=3$)。参见实例10。

[0190] 图16A-图16E示出了代表在静脉内注射后的指定时间点具有皮下异种移植物的雌性balb/c小鼠($n=3$)中注射化合物E (0.7MBq/ $2\mu\text{g}$) 的各种动物模型中的生物分布研究结果的图。每克组织注射剂量百分比(ID/g%) 绘制于x轴,并针对血液、骨骼、脑、心脏、肠、肾、肺、肝、胰腺、脾、胃、皮肤、尿液和膀胱以及肿瘤显示4、24、48、96和168小时的结果。参见实例11。

[0191] 图17A-图17C示出了代表静脉内注射化合物F (50-400nCi/ $2\mu\text{g}$)、冷抗体和溶媒后,雌性balb/c小鼠($n=5$) 的各种动物模型中体内功效研究结果的图。参见实例12。

具体实施方式

[0192] 放射免疫缀合物设计用于靶向疾病状态下上调的蛋白质或受体,以递送放射性有效载荷来损害和杀死目的细胞(放射免疫疗法)。递送放射性有效载荷会产生靶向的 α 、 β 、 γ 粒子或俄歇电子发射,这会对DNA造成直接影响(例如单链或双链DNA断裂) 或间接影响(例如旁观者效应或交叉火力效应(crossfire effect))。

[0193] 放射免疫缀合物通常含有生物靶向性部分(例如,能够特异性结合EGFR和cMET两者的抗体或其抗原结合片段)、放射性核素(例如, α 或 β 发射体)和连接两者的分子。当双功能螯合物附加到生物靶向性部分时,就会形成缀合物,从而使结构改变最小,同时保持靶亲和力。一旦进行放射性标记,就形成最终的放射免疫缀合物。

[0194] 双功能螯合物在结构上包含螯合物、接头和交联基团(图10A)。在开发新型双功能螯合物时,大部分精力都集中在分子的螯合部分。已经描述了几种双功能螯合物的实例,其中各种环状和非环状结构与靶向的部分缀合。[Bioconjugate Chem.[生物缀合物化学]2000,11,510-519;Bioconjugate Chem.[生物缀合物化学]2012,23,1029-1039;Mol Imaging Biol.[分子成像与生物学]2011,13,215-221,Bioconjugate Chem.[生物缀合物化学]2002,13,110-115.]

[0195] 开发安全有效的放射免疫缀合物的关键因素之一是最大化功效,同时最小化正常组织中的脱靶毒性。虽然这句话是开发新药的核心原则之一,但将其应用于放射免疫治疗剂却带来了新的挑战。放射免疫缀合物不需要像治疗性抗体所需的那样阻断受体,抑或像抗体药物缀合物(“ADC”)所需的那样在细胞内释放细胞毒性有效载荷,即可发挥治疗功效。然而,毒性粒子的发射是由于一级(放射性)衰变而发生的事件,并且在施用后可能在体内

的任何位置随机发生。一旦发生发射,发射范围内的周围细胞可能会受到损害,从而导致脱靶毒性的可能性。因此,限制这些发射对正常组织的暴露是开发新型治疗性放射免疫缀合物的关键。

[0196] 减少脱靶暴露的一个潜在方法是更有效地从体内(例如,从体内的正常组织中)去除放射性。其中一种机制是增加生物靶向剂的清除率。这种方法可能需要找到缩短生物靶向剂半衰期的方法,而生物靶向剂在这方面的描述欠缺。无论机制如何,增加药物清除率也会对药效学/功效产生负面影响,因为药物从体内更快地清除会降低作用部位的有效浓度,这反过来需要更高的总剂量,并且不会达到减少正常组织总放射性剂量的预期效果。

[0197] 其他努力则集中于加速含有放射性部分的分子部分的代谢。为此,已做出了一些努力,利用所谓的“可切割接头”来增加放射性从生物靶向剂中切割的速率。然而,可切割接头与放射免疫缀合物相关时具有不同的含义。Cornelissen等人将可切割接头描述如下:通过这些可切割接头,双功能螯合物通过还原的半胱氨酸与生物靶向剂附接,而其他人则描述了酶切割系统的使用,需要将放射免疫缀合物与切割剂/酶共同施用以释放[Mol Cancer Ther. [分子癌症治疗]2013,12(11),2472-2482;Methods Mol Biol. [分子生物学方法]2009,539,191-211;Bioconjug Chem. [生物缀合物化学]2003,14(5),927-33]。这些方法要么改变生物靶向性部分的性质(就半胱氨酸连接而言),要么从药物开发的角度来看不切实际(酶可切割系统),因为就提供的引文而言,需要施用两种药剂。

[0198] 除其他外,本披露提供了化合物,例如放射免疫缀合物,其在分解代谢和/或代谢之后更有效地从体内消除,从而更有效地从体内消除放射性,同时保持治疗功效。这种意想不到的优势是通过对双功能螯合物的接头区域进行修饰而实现的。

[0199] 在一些实施例中,与已知的双功能螯合物相比,所披露的免疫缀合物可以实现全身放射性的降低(例如,通过增加分解代谢/代谢产物的排泄程度),同时保持完整分子的药代动力学。在一些实施例中,这种放射性的降低是由于分解代谢/代谢副产物的清除,而不影响其他体外和体内特性,例如结合特异性(体外结合)、细胞保留和体内肿瘤摄取。因此,在一些实施例中,提供的化合物在保持中靶活性的同时,实现了人体中放射性的降低。

[0200] 定义

[0201] 如本文所用,术语靶向性部分的“结合(bind或binding)”意指与靶分子(例如,人EGFR-cMET,如本文所述)的至少暂时的相互作用或缔合。

[0202] 如本文所用,术语“双功能螯合物”是指包含螯合物、接头和交联基团的化合物。参见,例如图10A。“交联基团”是能够通过共价键连接两个或更多个分子(例如,连接双功能螯合物和靶向性部分)的反应性基团。

[0203] 如本文所用,术语“双功能缀合物”是指包含螯合物或其金属络合物、接头和靶向性部分(例如抗体或其抗原结合片段)的化合物。参见,例如图10B。

[0204] 如本文所用,术语“癌症”是指由恶性赘生细胞增殖引起的任何癌症,例如肿瘤、赘生瘤、癌、肉瘤、白血病和淋巴瘤。在一些实施例中,本披露的癌症包含表达EGFR和cMET的细胞(例如,肿瘤细胞),例如但不限于肺癌、结肠直肠癌、胰腺癌或头颈癌。

[0205] 如本文所用,术语“螯合物”是指可以在两个或更多个点与中心金属或放射性金属原子键合的有机化合物或其部分。

[0206] 如本文所用,术语“缀合物”是指含有螯合基团或其金属络合物、接头基团,且任选

地含有靶向性部分(例如抗体或其抗原结合片段)的分子。

[0207] 如本文所用,除非另有指明,否则短语“恒定区”在用于提及抗体或其片段(例如IgG1、IgG2、或IgG4恒定区)时旨在同时涵盖野生型恒定区和变体(例如,与野生型恒定区的参考序列具有至少85%、至少90%、至少92%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的恒定区)。

[0208] 如本文所用,术语“化合物”意指包括所描绘的结构的所有立体异构体、几何异构体和互变异构体。

[0209] 本文列举或描述的化合物可以是不对称的(例如,具有一个或多个立体中心)。除非另有指示,否则针对所有立体异构体,如对映异构体和非对映异构体。本披露中讨论的含有不对称取代碳原子的化合物能以光学活性或外消旋形式分离。如何从光学活性起始材料制备光学活性形式的方法是本领域已知的,例如通过拆分外消旋混合物或通过立体选择性合成。

[0210] 如本文所用,“检测剂”是指可用于通过定位含有抗原的细胞而诊断疾病的分子或原子。用检测剂标记多肽的各种方法是本领域已知的。检测剂的实例包括但不限于放射性同位素和放射性核素、染料(例如生物素-链霉亲和素络合物)、造影剂、发光剂(例如异硫氰酸荧光素或FITC、罗丹明、镧系磷光体、花青和近IR染料)和磁性剂,例如钆螯合物。

[0211] 如本文所用,术语“放射性核素”是指能够发生放射性衰变的原子(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}F 、 ^{35}S 、 ^{44}Sc 、 ^{47}Sc 、 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{89}Zr 、 ^{86}Y 、 ^{87}Y 、 ^{90}Y 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{149}Pm 、 ^{149}Tb 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{203}Pb 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{229}Th 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{82}Rb 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{201}Tl)。术语放射性核素(radioactive nuclide)、放射性同位素(radioisotope或radioactive isotope)也可用于描述放射性核素(radionuclide)。放射性核素可用作检测剂,如本文所述。在一些实施例中,放射性核素可用作治疗剂,例如, α 发射放射性核素。

[0212] 如本文所用,术语药剂(例如任何前述缀合物)的“有效量”是足以实现有益或期望结果(例如临床结果)的量,因此,“有效量”取决于其应用的上下文。例如,在治疗应用中,“有效量”可以是足以治愈或至少部分地阻抑病症及其并发症的症状,和/或足以基本上改善与该疾病或医学病况相关的至少一种症状的量。通常,本披露上下文中的“有效量”是本文披露的化合物(例如,放射免疫缀合物,例如Ac-225-放射免疫缀合物)在施用该化合物的部分患者中产生至少一些可测量的治疗反应或期望效果的量。例如,在癌症的治疗中,减少、预防、延迟、抑制或阻抑疾病或病况的任何症状的药剂或化合物将是治疗有效的。治疗有效量的药剂或化合物不是治愈疾病或病况所必需的,但是可以例如提供疾病或病况的治疗,从而延迟、阻碍或预防疾病或病况的发作,从而改善疾病或病况的症状,或者改变疾病或病况的期限。例如,个体的疾病或病况可能变得不太严重和/或恢复加快。可以通过施用单剂量或多(例如,至少两次、至少三次、至少四次、至少五次或至少六次)剂量来施用有效量。

[0213] 如本文所用,术语“免疫缀合物”是指包括靶向性部分(例如抗体(或其抗原结合片段)、纳米抗体、亲和体或来自纤连蛋白III型结构域的共有序列)的缀合物。在一些实施例中,免疫缀合物包含每靶向性部分平均至少0.10个缀合物(例如,每靶向性部分平均至少0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7或8个缀合物)。

[0214] 如本文所用,术语“放射性缀合物”是指包括放射性同位素或放射性核素(例如本文所述的任何放射性同位素或放射性核素)的任何缀合物。

[0215] 如本文所用,术语“放射免疫缀合物”是指包括放射性同位素或放射性核素(例如本文所述的任何放射性同位素或放射性核素)的任何免疫缀合物。本披露提供的放射免疫缀合物通常是指包含由放射性同位素或放射性核素形成的金属络合物的双功能缀合物。

[0216] 如本文所用,术语“放射免疫疗法”是指使用放射免疫缀合物产生治疗效果的方法。在一些实施例中,放射免疫疗法可以包括向有需要的受试者施用放射免疫缀合物,其中放射免疫缀合物的施用在受试者中产生治疗效果。在一些实施例中,放射免疫疗法可以包括向细胞施用放射免疫缀合物,其中施用放射免疫缀合物会杀死细胞。其中放射免疫疗法涉及选择性杀死细胞,在一些实施例中,细胞是患有癌症的受试者的癌细胞。

[0217] 如本文所用,术语“药物组合物”表示含有本文所述的放射免疫缀合物与药学上可接受的赋形剂配制的组合物。在一些实施例中,该药物组合物是在政府监管机构的批准下作为治疗哺乳动物疾病的治疗方案的一部分制造或销售的。药物组合物可以配制为例如用于以单位剂型(例如,片剂、胶囊、囊片、胶囊锭或糖浆)口服施用;用于局部施用(例如,作为乳膏、凝胶、洗剂或软膏);用于静脉内施用(例如,作为不含微粒栓子的无菌溶液并且在适合于静脉内使用的溶剂体系中);或以本文所述的任何其他配制品。

[0218] 如本文所用,“药学上可接受的赋形剂”是指除本文所述的化合物之外的任何成分(例如,能够悬浮或溶解活性化合物的溶媒),并且该成分具有对患者无毒和无炎的特性。赋形剂可包括例如:抗粘剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料(着色剂)、润肤剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或包衣、调味剂、香料、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、辐射防护剂、吸附剂、悬浮剂或分散剂、甜味剂或水合水。示例性赋形剂包括但不限于:抗坏血酸、组氨酸、磷酸盐缓冲液、丁基化羟基甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(二元)、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交联维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预糊化淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、棕榈酸视黄酯、虫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、羟基乙酸淀粉钠、山梨糖醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、硬脂酸、蔗糖、滑石粉、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C和木糖醇。

[0219] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”表示本文所述化合物的那些盐,在合理的医学判断范围内,这些盐适合用于与人和动物的组织接触,而不会产生过度毒性、刺激或过敏反应。药学上可接受的盐是本领域熟知的。例如,药学上可接受的盐描述于:Berge等人, J.Pharmaceutical Sciences[药物科学杂志]66:1-19,1977和Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use[药用盐:特性、选择与用途],(编辑P.H.Stahl和C.G.Wermuth), Wiley-VCH[威利-VCH出版社],2008。盐可以在本文所述化合物的最终分离和纯化过程中原位制备或通过使游离碱基团与合适的有机酸反应单独制备。

[0220] 本发明的化合物可以具有可电离基团,以便能够制备为药学上可接受的盐。这些盐可以是涉及无机酸或有机酸的酸加成盐,或者在本发明化合物的酸性形式的情况下,这些盐可以由无机碱或有机碱制备。通常,化合物作为药学上可接受的盐制备或使用,这些药学上可接受的盐作为药学上可接受的酸或碱的加成产物制备。合适的药学上可接受的酸和

碱是本领域中众所周知的,例如用于形成酸加成盐的盐酸、硫酸、氢溴酸、乙酸、乳酸、柠檬酸或酒石酸,以及用于形成碱式盐的氢氧化钾、氢氧化钠、氢氧化铵、咖啡因、各种胺。制备合适的盐的方法在本领域中已确立完善。

[0221] 代表性的酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙和镁,以及无毒的铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺和乙胺。

[0222] 如本文所用,术语“多肽”是指一串通过肽键相互连接的至少两个氨基酸。在一些实施例中,多肽可以包含至少3-5个氨基酸,其中每个通过至少一个肽键与其他氨基酸连接。本领域普通技术人员将理解,多肽可以包含一个或多个“非天然”氨基酸或其他实体,尽管如此,它们仍然能够整合到多肽链中。在一些实施例中,多肽可以被糖基化,例如多肽可以含有一个或多个共价连接的糖部分。在一些实施例中,单个“多肽”(例如,抗体多肽)可以包含两个或更多个单独的多肽链,这些多肽链在一些情况下可以例如通过一个或多个二硫键或以其他方式彼此连接。

[0223] “受试者”意指人或非人动物(例如,哺乳动物)。

[0224] “基本同一性”或“基本上相同”意指当两个序列进行最佳比对时,一条多肽序列与参考序列分别具有相同的多肽序列,或分别具有指定百分比的氨基酸残基,这些氨基酸残基在参考序列的相应位置处是相同的。例如,与参考序列“基本上相同”的氨基酸序列与参考氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。对于多肽而言,比较序列的长度通常将为至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75、90、100、150、200、250、300或350个连续氨基酸(例如全长序列)。可以使用序列分析软件在默认设置下测量序列同一性(例如,威斯康星州麦迪逊53705、大学道(University Avenue)1710的威斯康星大学生物技术中心(University of Wisconsin Biotechnology Center)的遗传计算组(Genetics Computer Group)的序列分析软件包)。这样的软件可以通过给各种取代、缺失和其他修饰指定同源性程度来匹配相似的序列。

[0225] 如本文所用,且为本领域所熟知,“治疗(to treat)”病况或对该病况(例如,本文所述的病况,如癌症)的“治疗(treatment)”是获得有益或期望结果(如临床结果)的方法。有益或期望的结果可包括但不限于:缓解或改善一种或多种症状或病况;减轻疾病、病症或病况的程度;疾病、病症或病况的稳定(即不恶化)状态;防止疾病、病症或病况的传播;延迟或减缓疾病、病症或病况的进展;改善或缓解疾病、病症或病况;以及缓解(无论是部分缓解还是完全缓解),无论是可检测的还是不可检测的。“缓解”疾病、病症或病况意指与不治疗时的程度或时间过程相比,疾病、病症或病况的程度和/或不良临床表现减轻和/或进展的

时间过程减缓或延长。

[0226] 如本文所用,除非另有明确陈述,否则术语“约”或“大约”在用于指定量值时包括所述的定量值本身。如本文所用,术语“约”或“大约”是指所述定量值的 $\pm 10\%$ 变化,除非上下文另有指示或推断。

[0227] 如本文所用,术语“靶向性部分”是指能够结合给定靶标的任何分子或分子的任何部分。术语“EGFR-cMET靶向性部分”是指能够同时结合EGFR和cMET的靶向性部分(例如,抗体或其抗原结合片段),例如抗EGFR-cMET抗体。

[0228] 如本文所用,术语“片段”当用于指EGFR或cMET片段时,是指N端和/或C端截短的EGFR或cMET或其蛋白质结构域。除非另有指明,否则根据本文所述实施例使用的EGFR或cMET片段保留了全长EGFR或cMET被本披露所述的EGFR-cMET靶向性部分识别和/或结合的能力。

[0229] 除非本文另有指示或上下文明显相矛盾,否则在描述本披露的上下文中(特别是在权利要求的上下文中)使用术语“一个/种(a/an)”和“该(the)”以及类似指示物将视为同时涵盖单数与复数。

[0230] 除非特别陈述或从上下文中显而易见,否则如本文所用的术语“或”应理解为具有包容性且涵盖“或”和“和”两者。

[0231] 本文所用的术语“和/或”将被视为对在具有或不具有另一指定特征或组分的情况下对指定多个特征或组分中的每一个的特定披露。

[0232] 除非另有指明,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”将视为开放性术语(即,意指“包括但不限于”)。术语“由……组成”应被理解为封闭式的。

[0233] 如本文所用,“抗体”是指其氨基酸序列包括特异性结合指定抗原或其片段的免疫球蛋白及其片段的多肽。根据本发明的抗体可以是任何类型(例如,IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)或亚型(例如,IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。本领域普通技术人员将理解,抗体的特征性序列或部分可以包括在抗体的一个或多个区域(例如,可变区、高变区、恒定区、重链、轻链及其组合)中发现的氨基酸。此外,本领域普通技术人员将理解,抗体的特征性序列或部分可以包括一个或多个多肽链,并且可以包括在相同多肽链或不同多肽链中发现的序列元件。

[0234] 如本文所用,“抗原结合片段”是指保留亲本抗体的结合特征的特异性的抗体的一部分。

[0235] 本披露的抗体或其抗原结合片段可以是分离的和/或基本上纯化的。

[0236] 化合物,例如免疫缀合物或放射免疫缀合物

[0237] 在一方面,本披露提供了包含以下结构的化合物例如免疫缀合物或放射免疫缀合物,或其药学上可接受的盐:

[0238] $A-L^1-(L^2)_n-B$

[0239] 式I

[0240] 其中

[0241] A为螯合部分或其金属络合物,

[0242] B为能够同时与EGFR和cMET结合的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段具有如本文所披露的特征;

[0243] L^1 为键、 $C=O$ 、 $C=S$ 、任选地取代的 C_1 - C_6 烷基、任选地取代的 C_1 - C_6 杂烷基、任选地取代的芳基、或任选地取代的杂芳基；

[0244] n 是1与5之间的整数(包括端值)；并且

[0245] L^2 各自独立地具有式II的结构：

[0246] $-X^1-L^3-Z^1-$

[0247] 式II

[0248] 其中

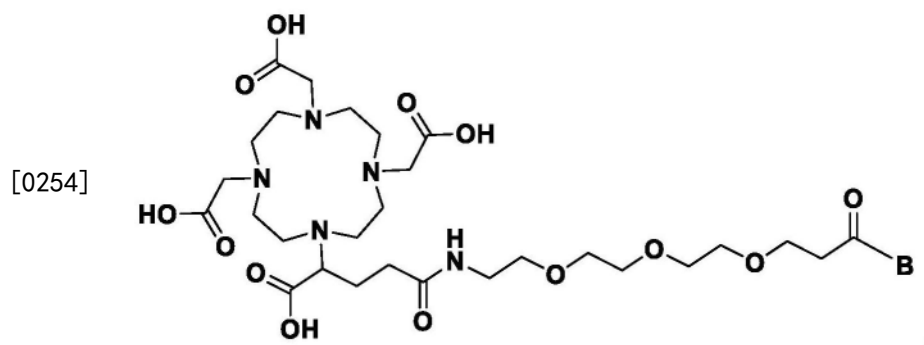
[0249] X^1 为 $-C(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)-*$ 、 $-C(S)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(S)-*$ 、 $-OC(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)O-*$ 、 $-NR^1C(O)NR^1-*$ 、 $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-*$ 、 $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-*$ 、 $-O-*$ 或 $-NR^1-*$ ；其中“*”表示与 L^3 的附接点，且 R^1 为氢、任选地取代的 C_1 - C_6 烷基、任选地取代的 C_1 - C_6 杂烷基或任选地取代的芳基或杂芳基；

[0250] L^3 为任选地取代的 C_1 - C_{50} 烷基或任选地取代的 C_1 - C_{50} 杂烷基；并且

[0251] Z^1 为 $-CH_2-#$ 、 $-C(O)-#$ 、 $-C(S)-#$ 、 $-OC(O)-#$ 、 $-C(O)O-#$ 、 $-NR^2C(O)-#$ 、 $-C(O)NR^2-#$ 或 $-NR^2-#$ ，其中“#”表示与B的附接点，且 R^2 为氢、任选地取代的 C_1 - C_6 烷基、任选地取代的 C_1 - C_6 杂烷基、任选地取代的芳基或任选地取代的杂芳基。

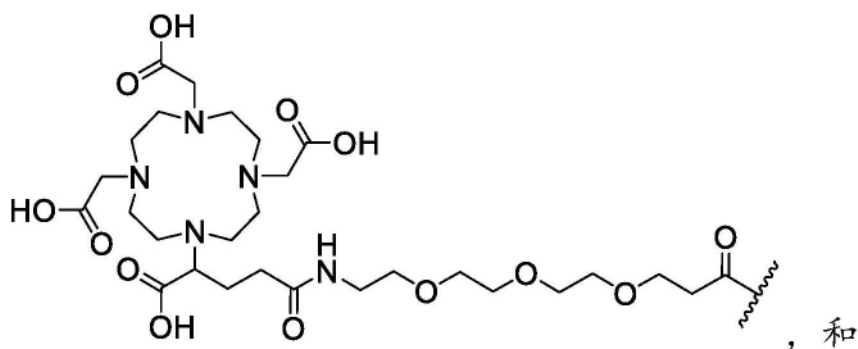
[0252] 烷基、杂烷基、芳基或杂芳基的典型取代基包括但不限于卤代(例如，F、Cl、Br、I)、OH、CN、硝基、氨基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 杂烷基、 C_{1-6} 杂环烷基、卤代烷基(例如 CF_3)、烷氧基(例如 OCH_3)、烷基氨基(例如， NH_2CH_3)、磺酰基、芳基和杂芳基。

[0253] 在一些实施例中，化合物(例如，免疫缀合物或放射免疫缀合物)具有或包含以下所示的结构、或其金属络合物：

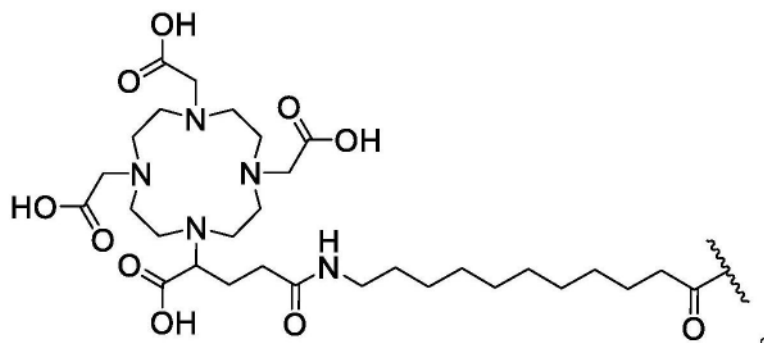


[0255] 其中B为本文披露的EGFR-cMET抗体或其抗原结合片段。

[0256] 在一些实施例中，具有式I的化合物包含以下结构之一、或其金属络合物：



[0257]



[0258] 在一些实施例中,所提供的化合物(例如,免疫缀合物或放射免疫缀合物)能够与具有不同EGFR和cMET表达水平的不同细胞系结合,结合的Kd值为至多约25nM、至多约20nM、至多约15nM、至多约12.5nM、至多约10nM、至多约7.5nM、至多约7nM、至多约6.5nM、至多约6nM、至多约5nM、至多约4nM、至多约3.5nM、至多约3nM或至多约2.5nM。在一些实施例中,所提供的化合物(例如,免疫缀合物或放射免疫缀合物)能够与具有不同EGFR和cMET表达水平的不同细胞系结合,结合的Kd值为约15nM、约12.5nM、约10nM、约7.5nM、约7nM、约6.5nM、约6nM、约5nM、约4nM、约3.5nM、约3nM或约2.5nM。

[0259] 在一些实施例中,如本文进一步所述,化合物(例如,免疫缀合物或放射免疫缀合物)包含螯合部分或其金属络合物,该金属络合物可以包含放射性核素。在一些这样的化合物中,螯合部分与EGFR-cMET靶向性部分(例如,EGFR-cMET抗体)的平均比率或中值比率为八或更少、七或更少、六或更少、五或更少、四或更少、三或更少、二或更少、或约为一。在一些化合物中,螯合部分与EGFR-cMET靶向性部分(例如,EGFR-cMET抗体)的平均比率或中值比率约为一。

[0260] 在一些实施例中,在将放射免疫缀合物施用于哺乳动物之后,通过肠道途径、肾脏途径或两者排泄的放射比例(占所施用的放射总量的比例)大于已施用了参考放射免疫缀合物的可比哺乳动物排泄的放射比例。“参考免疫缀合物”意指已知的放射免疫缀合物,其与本文所述的放射免疫缀合物至少在以下方面有所不同:(1)具有不同的接头;(2)具有不同大小的靶向性部分和/或(3)缺乏靶向性部分。在一些实施例中,参考放射免疫缀合物选自以下组成的组:[⁹⁰Y]-替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan) (Zevalin(⁹⁰Y)) 和 [¹¹¹In]-替伊莫单抗 (Zevalin(¹¹¹In))。

[0261] 在一些实施例中,通过给定途径或系列途径排泄的放射比例比已施用参考放射免疫缀合物的可比哺乳动物通过相同一种或多种途径排泄的放射比例高至少10%、至少

15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。在一些实施例中,排泄的放射比例是施用参考放射免疫缀合物的可比哺乳动物排泄的放射比例的至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍、至少4倍、至少4.5倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍或至少10倍。排泄程度可以通过本领域已知的方法来测量,例如通过测量尿液和/或粪便中的放射性和/或通过测量一段时间内的全身放射性。还参见例如国际专利公开W0 2018/024869。

[0262] 在一些实施例中,排泄程度在施用后至少或约12小时、施用后至少或约24小时、施用后至少或约2天、施用后至少或约3天、施用后至少或约4天、施用后至少或约5天、施用后至少或约6天、或施用后至少或约7天的时间段内测量。

[0263] 在一些实施例中,在将化合物(例如免疫缀合物或放射免疫缀合物)施用于哺乳动物后,与参考化合物(例如参考缀合物,例如参考免疫缀合物,如参考放射免疫缀合物)相比,该化合物(例如免疫缀合物或放射免疫缀合物)表现出降低的脱靶结合效应(例如毒性)。在一些实施例中,这种降低的脱靶结合效应是化合物(例如,免疫缀合物或放射免疫缀合物)的特征,其还表现出如本文所述的更大的排泄率。

[0264] 靶向性部分

[0265] 靶向性部分包括能够结合(例如,能够特异性结合(specifically binding)、特异性结合(specifically binds to)等)给定靶标(例如,EGFR或cMET或EGFR-cMET)的任何分子或分子的任何部分。在一些实施例中,靶向性部分包含蛋白质或多肽。在一些实施例中,靶向性部分选自由以下组成的组:抗体或其抗原结合片段、纳米抗体、亲和体和来自纤连蛋白III型结构域的共有序列(例如,Centyrins或Adnectins)。在一些实施例中,部分既是靶向性部分又是治疗部分,即该部分能够结合给定靶标并且还赋予治疗益处。

[0266] 在一些实施例中,靶向性部分具有至少50kDa、至少75kDa、至少100kDa、至少125kDa、至少150kDa、至少175kDa、至少200kDa、至少225kDa、至少250kDa、至少275kDa或至少300kDa的分子量。

[0267] 在一些实施例中,靶向性部分能够同时特异性结合并抑制EGFR和cMET。“抑制”意指靶向性部分至少部分抑制EGFR、cMET或两者的一种或多种功能。在一些实施例中,靶向性部分削弱EGFR、cMET或两者的下游的信号传导,例如,导致具有不同EGFR和cMET表达水平的肿瘤细胞的生长受到抑制。

[0268] 靶标

[0269] EGFR

[0270] 人EGFR(也称为原癌基因c-ErbB-1、受体酪氨酸-蛋白激酶erbB-1和EC 2.7.10.1)是由UniProt P00533鉴定的蛋白质。由人EGFR基因(也称为ERBB、ERBB1和HER1)编码的mRNA的选择性剪接产生四种同种型:同种型1(UniProt:P00533-1,v2(上一次序列更新:1997年11月1日));同种型2(UniProt:P00533-2,v1),其包含相对于同种型1的取代F404L和L405S,并且其缺乏对应于同种型1的位置406至1210的氨基酸序列;同种型3(UniProt:P00533-3,v1),其包含同种型1的位置628至705处的取代,并且其缺乏对应于同种型1的位置706至1210的氨基酸序列;以及同种型4(UniProt:P00533-4),其包含相对于同种型1的取代C628S,并且其缺乏对应于同种型1的位置629至1210的氨基酸序列。

[0271] EGFR的结构和功能在例如Ferguson, Annu Rev Biophys. [生物物理学年度评论] (2008) 37:353-373中进行了综述。EGFR是一种跨膜蛋白,是表皮生长因子家族(EGF家族)成员的受体。该受体包含大的细胞外区、单跨跨膜结构域、细胞内近膜结构域、酪氨酸激酶结构域和C端调控区。EGFR与配体的结合诱导EGFR的C端调控区中的几个酪氨酸残基(Y992、Y1045、Y1068、Y1148和Y1173)发生受体二聚化和自磷酸化。

[0272] 异常的EGFR表达/活性与许多疾病有关,包括神经系统病症和许多癌症。

[0273] 在本说明书中,“EGFR”是指来自任何物种的EGFR并且包括来自任何物种的EGFR同种型、片段、变体或同源物。

[0274] cMet

[0275] 人cMET(也称为肝细胞生长因子受体(HGFR)或酪氨酸-蛋白激酶Met)是由UniProt P08581鉴定的蛋白质。由人MET基因编码的mRNA的选择性剪接产生三种同种型:同种型1(UniProt:P08581-1,v4(上一次序列更新:2009年7月7日));同种型2(UniProt:P08581-2),其中氨基酸序列“STWWKEPLNIVSFLFCFAS”插入在同种型1的位置755处;以及同种型3(UniProt:P08581-3)也称为可溶性met变体4,其中对应于同种型1的位置755至764的氨基酸序列被“RHNIALIQR”取代,并且其进一步缺乏对应于同种型1的位置765至1390的氨基酸序列。

[0276] cMET的结构在例如Gherardi, 2003中进行了综述,该文献通过引用以其全文并入本文。cMET是由二硫键连接的 α 链(50kDa)和 β 链(145kDa)组成的异二聚体。cMET包含介导结合肝细胞生长因子(HGF)的N端Sema结构域和细胞内激酶结构域。在细胞表面处的配体结合诱导cMET在其细胞内结构域上的自磷酸化,该细胞内结构域为下游信号传导分子提供停泊位点并激活若干信号传导级联。

[0277] cMET在上皮细胞表面的正常组织中表达。在许多人类肿瘤和癌症中观察到cMET过表达,这通常与转移表型和不良预后相关。已观察到高水平cMET表达的癌症的实例包括非小细胞肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、头颈鳞状细胞癌、乳腺癌和食道-胃癌。在这些癌症中,经常观察到EGFR和cMET的共表达。

[0278] 抗体或其抗原结合片段

[0279] 术语“抗体”描述了无论是天然的或部分或全部合成产生的免疫球蛋白。抗体可以是人抗体或人源化抗体。抗体优选地是单克隆抗体。抗体的实例是免疫球蛋白同种型,例如免疫球蛋白G(IgG),和它们的同种型亚类,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,以及其片段。

[0280] 如本文所用,术语“抗体”因此包括抗体片段,只要它们显示与相关靶分子的结合。抗体片段的实例包括Fv、scFv、Fab、scFab、F(ab')₂、Fab₂、双抗体、三抗体、scFv-Fc、微型抗体和单结构域抗体(例如VhH)等。除非上下文另有要求,否则如本文所用,术语“抗体”因此等同于“抗体或其片段”。

[0281] 抗体及其构建和使用方法是本领域熟知的,并且在例如Holliger和Hudson, Nature Biotechnology [自然生物技术] 23(9):1126-1136(2005)中描述。可以采用单克隆和其他抗体并使用重组DNA技术等技术来产生保留原始抗体的特异性的其他抗体或嵌合分子。这样的技术可以涉及将一种抗体的CDR或可变区引入不同的抗体中(EP-A-184187、GB 2188638A和EP-A-239400)。

[0282] 鉴于当今与单克隆抗体技术相关的技术,可以制备针对大多数抗原的抗体。抗原

结合结构域可以是抗体的一部分(例如Fab片段)或合成的抗体片段(例如单链Fv片段(ScFv))。针对所选抗原的合适的单克隆抗体可以通过已知技术制备,例如“Monoclonal Antibodies:A manual of techniques”[单克隆抗体:技术手册],H Zola (CRC Press[CRC出版社],1988)中和“Monoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and Applications”[单克隆杂交瘤抗体:技术与应用],J G RHurrell(CRC Press[CRC出版社],1982)中披露的那些。Neuberger,1988讨论了嵌合抗体。

[0283] 根据本披露的抗体包含抗原结合结构域。“抗原结合结构域”描述了结合靶抗原的全部或部分的分子的部分。当抗原较大时,抗体可以仅结合至抗原的特定部分,该部分称为表位。抗体的抗原结合位点可以由一个或多个抗体可变结构域提供。抗体的抗原结合位点优选包含可变轻链(VL)区和可变重链(VH)区。抗原结合结构域的VH区和VL区一起构成Fv区。

[0284] 抗原结合结构域通常包含六个互补决定区(CDR);三个在VH区:HCDR1、HCDR2和HCDR3,还有三个在VL区:LCDR1、LCDR2和LCDR3。这六个CDR一起定义了抗原结合结构域的互补位,该互补位是结合靶抗原的抗原结合结构域的一部分。

[0285] VH区和VL区包含每个CDR任一侧的框架区(FR),其为CDR提供支架。从N末端到C末端,VH区包含以下结构:N末端-[HFR1]-[HCDR1]-[HFR2]-[HCDR2]-[HFR3]-[HCDR3]-[HFR4]-C末端;并且VL区包含以下结构:N末端-[LFR1]-[LCDR1]-[LFR2]-[LCDR2]-[LFR3]-[LCDR3]-[LFR4]-C末端。

[0286] 有几种不同的惯例用于定义抗体CDR和FR,诸如Kabat,1991、Chothia,1987中描述的那些;如LeFranc,2015中描述的IMGT编号;以及如Retter,2005中描述的VBASE2。本文描述的抗体的VH区和VL区的CDR和FR根据Kabat(Kabat,1991)定义。

[0287] 包含至少两个抗原结合结构域(其中每个抗原结合结构域能够结合不同的靶标)的抗体可被称为“双特异性抗体”。相比之下,仅结合单个靶标(例如EGFR或cMET)的抗体被称为“单特异性抗体”。本披露提供了包含双特异性抗体或其抗原结合片段的化合物(例如,放射免疫缀合物),该双特异性抗体或其抗原结合片段包含能够结合EGFR的第一抗原结合结构域和能够结合cMET的第二抗原结合结构域。

[0288] 抗EGFR抗原结合结构域

[0289] 能够结合EGFR的抗原结合结构域包含能够结合EGFR的抗体的CDR。在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域另外包含能够结合EGFR的抗体的FR。也就是说,在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含能够结合EGFR的抗体的VH区和VL区。

[0290] 在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含是或源自EGFR结合抗体克隆RAA22的VH/VL区的VH区和VL区。

[0291] 在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含抗EGFR抗体克隆RAA22的三个HCDR或三个LCDR,优选地三个VH CDR和三个VL CDR。本文描述了抗体RAA22的VH和VL结构域序列,因此可以从所述序列确定所述抗体的三个VH和三个VL结构域CDR。

[0292] 在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含根据(1)的VH区:

[0293] (1)包含以下CDR的VH区:

[0294] 具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1

[0295] 具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2

- [0296] 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3。
- [0297] 在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含根据(1)的VH区,其中该VH区另外包含根据以下(2)的FR:
- [0298] (2)具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HFR1
- [0299] 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HFR2
- [0300] 具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HFR3
- [0301] 具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HFR4,
- [0302] 或其变体,其中HFR1、HFR2、HFR3或HFR4中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代。
- [0303] 在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含根据以下(3)的VH区:
- [0304] (3)包含根据(1)的CDR和根据(2)的FR的VH区。
- [0305] 在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含根据(4)的VH区:
- [0306] (4)包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%序列同一性、更优选地至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性之一的氨基酸序列的VH区。
- [0307] 在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含根据以下(5)的VL区:
- [0308] (5)包含以下CDR的VL区:
- [0309] 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1
- [0310] 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2
- [0311] 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3。
- [0312] 在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含根据上文(5)的VL区,其中该VL区另外包含根据以下(6)的FR:
- [0313] (6)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LFR1
- [0314] 具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LFR2
- [0315] 具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LFR3
- [0316] 具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LFR4,
- [0317] 或其变体,其中LFR1、LFR2、LFR3或LFR4中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代。
- [0318] 在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含VL区,该VL区包含根据上文(5)的CDR和根据上文(6)的FR。
- [0319] 在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含根据以下(7)的VL区:
- [0320] (7)包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%序列同一性、更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性之一的氨基酸序列的VL区。
- [0321] 在一些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域包含根据上文(1)至(4)中任一项的VH区和根据上文(5)至(7)中任一项的VL区。在一些实施例中,抗原结合结构域包含根据(1)、(3)和(4)中任一项的VH区和根据(5)和(7)之一的VL区。
- [0322] 抗cMET抗原结合结构域
- [0323] 能够结合cMET的抗原结合结构域包含能够结合cMET的抗体的CDR。在一些实施例

中,能够结合cMET的抗原结合结构域另外包含能够结合cMET的抗体的FR。也就是说,在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含能够结合cMET的抗体的VH区和VL区。

[0324] 在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含是或源自本文所述的cMET结合抗体克隆(即抗cMET抗体克隆B09-GL)的VH/VL区的VH区和VL区。

[0325] 在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含cMET结合抗体克隆B09-GL的三个HCDR或三个LCDR,优选地三个VH CDR和三个VL CDR。本文描述了抗体B09-GL的VH和VL结构域序列,因此可以从所述序列确定所述抗体的三个VH和三个VL结构域CDR。

[0326] 在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含根据以下(8)的VH区:

[0327] (8)包含以下CDR的VH区:

[0328] 具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HCDR1

[0329] 具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2

[0330] 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR3。

[0331] 在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含根据上文(8)的VH区,其中该VH区另外包含根据以下(9)的FR:

[0332] (9)具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HFR1

[0333] 具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HFR2

[0334] 具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HFR3

[0335] 具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HFR4,

[0336] 或其变体,其中HFR1、HFR2、HFR3或HFR4中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代。

[0337] 在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含根据以下(10)的VH:

[0338] (10)包含根据(8)的CDR和根据(9)的FR的VH区。

[0339] 在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含根据以下(11)的VH区:

[0340] (11)包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少70%序列同一性、更优选地至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性之一的氨基酸序列的VH区。

[0341] 在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含根据以下(12)的VL区:

[0342] (12)包含以下CDR的VL区:

[0343] 具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的LCDR1

[0344] 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的LCDR2

[0345] 具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LCDR3。

[0346] 在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含根据上文(12)的VL区,其中该VL区另外包含根据以下(13)的FR:

[0347] (13)具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的LFR1

[0348] 具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的LFR2

[0349] 具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的LFR3

[0350] 具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的LFR4,

[0351] 或其变体,其中LFR1、LFR2、LFR3或LFR4中的一个或多个中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸取代。

[0352] 在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含根据以下(14)的VL区:

[0353] (14)包含根据(12)的CDR和根据(13)的FR的VL区。

[0354] 在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含根据以下(15)的VL区:

[0355] (15)包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少70%序列同一性、更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性之一的氨基酸序列的VL区。

[0356] 在一些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域包含根据上文(8)至(11)中任一项的VH区和根据上文(12)至(15)中任一项的VL区。

[0357] 双特异性抗体的抗原结合结构域

[0358] 本发明提供了包含与放射性有效载荷缀合的抗体(即,双特异性抗体)或其抗原结合片段的化合物(例如,放射免疫缀合物),其中该放射免疫缀合物的抗体或其抗原结合片段包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,该第一抗原结合结构域包含能够结合EGFR的抗原结合结构域的CDR,该第二抗原结合结构域包含能够结合cMET的抗原结合结构域的CDR。在一些实施例中,第一抗原结合结构域包含能够结合EGFR的抗原结合结构域的CDR和FR,并且第二抗原结合结构域包含能够结合cMET的抗原结合结构域的CDR和FR。也就是说,在一些实施例中,化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或抗原结合片段包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,该第一抗原结合结构域包含能够结合EGFR的抗原结合结构域的VH区和VL区,并且该第二抗原结合结构域包含能够结合cMET的抗原结合结构域的VH区和VL区。

[0359] 在一些实施例中,能够结合EGFR的第一抗原结合结构域包含是或源自EGFR结合抗体克隆RAA22的VH/VL区的VH区和VL区,并且能够结合cMET的第二抗原结合结构域包含是或源自cMET结合抗体克隆B09-GL的VH/VL区的VH区和VL区。这样的双特异性抗体可以称为“RAA22/B09”或“RAA22/B09双特异性抗体”。

[0360] 在一些实施例中,第一抗原结合结构域包含:

[0361] 根据上文(1)至(4)中任一项的VH区和根据上文(5)至(7)中任一项的VL区;并且

[0362] 该第二抗原结合结构域包含:

[0363] 根据上文(8)至(11)中任一项的VH区和根据上文(12)至(15)中任一项的VL区。

[0364] 在某些实施例中,本发明的化合物(例如,放射免疫缀合物)包含抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0365] 能够结合表皮生长因子受体(EGFR)的第一抗原结合结构域;和

[0366] 能够结合cMET的第二抗原结合结构域,

[0367] 其中该第一抗原结合结构域包含:

[0368] (i)包含以下互补决定区(CDR)的重链可变(VH)区:

[0369] 具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1

[0370] 具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2

[0371] 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3;以及

[0372] (ii)包含以下CDR的轻链可变(VL)区:

[0373] 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1

[0374] 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2

- [0375] 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3。
- [0376] 在某些实施例中,第一抗原结合结构域包含:
- [0377] 包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的VH区;和
- [0378] 包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的VL区,
- [0379] 和/或第二抗原结合结构域包含:
- [0380] 包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的VH区;和
- [0381] 包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的VL区。
- [0382] 恒定区
- [0383] 在一些实施例中,本文所述的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白重链恒定(CH)区。在一些实施例中,CH是或源自IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA(例如IgA1、IgA2)、IgD、IgE或IgM的重链恒定区序列。
- [0384] 在一些实施例中,CH区是人免疫球蛋白G1恒定区(IGHG1;UniProt:P01857-1,v1;SEQ ID NO:33)或其片段。
- [0385] 在一些实施例中,CH区包含与SEQ ID NO:39或40的氨基酸序列具有至少70%序列同一性、更优选地至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性之一的氨基酸序列。
- [0386] 在一些实施例中,化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段包含重链,该重链包含如本文所述的VH区和如本文所述的CH区或由它们组成。
- [0387] 在一些实施例中,本文所述的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段包含免疫球蛋白轻链恒定(CL)区或其片段。在一些实施例中,CL区是或源自SEQ ID NO:34所示的 κ CL区。在一些实施例中,CL区是或源自SEQ ID NO:41所示的 λ CL区。在一些实施例中,化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段包含:是或源自SEQ ID NO:34所示的 κ CL区的第一CL区;以及是或源自SEQ ID NO:41所示的 λ CL区的第二CL区。
- [0388] 在一些实施例中,本文所述的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段包含:
- [0389] 第一重链,其中该第一重链包含该第一抗原结合结构域的VH区,以及第一重链恒定(CH)区或其片段;
- [0390] 第一轻链,其中该第一轻链包含该第一抗原结合结构域的VL区,以及第一轻链恒定(CL)区或其片段;
- [0391] 第二重链,其中该第二重链包含该第二抗原结合结构域的VH区,以及第二重链恒定(CH)区或其片段;和
- [0392] 第二轻链,其中该第二轻链包含该第二抗原结合结构域的VL区,以及第二轻链恒定(CL)区或其片段。
- [0393] 应当理解,当抗体或其抗原结合片段包含第一VH区和第一CH区时,这些区一起形成抗体或其抗原结合片段的第一重链,即第一VH区和第一CH区彼此连接。类似地,第二VH区

和第二CH区形成抗体或其抗原结合片段的第二重链；第一VL区和第一CL区形成抗体或其抗原结合片段的第一轻链；并且第二VL区和第二CL区形成抗体或其抗原结合片段的第二轻链。

[0394] 在一些实施例中，化合物（例如，放射免疫缀合物）的抗体或其抗原结合片段包含第一重链和第二重链，其中

[0395] (i) 该第一重链包含与SEQ ID NO:35所示重链的氨基酸序列具有至少70%序列同一性、更优选地至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性之一的氨基酸序列；并且

[0396] (ii) 该第二重链包含与SEQ ID NO:36所示重链的氨基酸序列具有至少70%序列同一性、更优选地至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性之一的氨基酸序列。

[0397] 在一些实施例中，本文所述的化合物（例如，放射免疫缀合物）的抗体或其抗原结合片段包含轻链，该轻链包含如本文所述的VL区和如本文所述的CL区或由它们组成。

[0398] 在一些实施例中，本文所述的化合物（例如，放射免疫缀合物）的抗体或其抗原结合片段包含第一轻链和第二轻链，其中

[0399] (i) 该第一轻链包含与SEQ ID NO:37所示轻链的氨基酸序列具有至少70%序列同一性、更优选地至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性之一的氨基酸序列；并且

[0400] (ii) 该第二轻链包含与SEQ ID NO:38所示轻链的氨基酸序列具有至少70%序列同一性、更优选地至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性之一的氨基酸序列。

[0401] 本文所述的化合物（例如，放射免疫缀合物）的抗体或其抗原结合片段的CH、CL、重链和/或轻链可以包含一个或多个修饰，例如以消除或降低Fc效应子功能，促进异二聚抗体或其抗原结合片段的形成，增加同源重链和轻链配对的功效，和/或协助缀合物形成，如下文更详细描述。已经修饰的CH、CL、重链和轻链可分别称为经修饰的CH、CL、重链和轻链。

[0402] 化合物（例如，放射免疫缀合物）的抗体或其抗原结合片段可以在重链的CH区中包含突变以减少或消除抗体或其抗原结合片段与一种或多种Fc γ 受体（例如Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIII）和/或与补体的结合。这样的突变消除或降低Fc效应子功能。用于减少或消除抗体与一种或多种Fc γ 受体和补体的结合的突变是已知的，并且包括例如Organesyan, 2008中描述的L234F/L235E/P331S的“三重突变”或“TM”。已知调节抗体效应子功能的其他突变在例如Wang, 2018中进行了描述。

[0403] 包含三重突变的CH区的实例是SEQ ID NO:39和40。因此，在一些实施例中，第一重链和第二重链中的一条包含具有与SEQ ID NO:39所示序列具有至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%序列同一性的氨基酸序列的CH区，而另一条重链包含具有与SEQ ID NO:40所示序列具有至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%序列同一性的氨基酸序列的CH区，其中CH区中的一条或两条（优选地两条）包含位置234处的苯丙氨酸、位置235处的谷氨酸和位置331处的丝氨酸，其中编号按照EU索引。

[0404] 包含含有三重突变的CH区的本披露的重链的实例是SEQ ID NO:35和36。因此，在一些实施例中，第一重链和第二重链中的一条具有与SEQ ID NO:35所示序列具有至少

70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%序列同一性的氨基酸序列,而另一条重链具有与SEQ ID NO:36所示序列具有至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%序列同一性的氨基酸序列,其中重链中的一条或两条(优选地两条)包含位置234处的苯丙氨酸、位置235处的谷氨酸和位置331处的丝氨酸,其中编号按照EU索引。

[0405] 化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段的VL区和CL区以及VH区和CH1区一起构成Fab区。化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段的其余部分构成Fc区。

[0406] 除非另有说明,否则恒定结构域中的氨基酸残基位置(包括如本文所述的氨基酸序列、取代、缺失和插入的位置)根据EU编号(Edelman,2007)进行编号。

[0407] 双特异性形式

[0408] 本披露提供了本文披露的化合物(例如,放射免疫缀合物)内的不对称IgG样双特异性抗体或其抗原结合片段。不对称双特异性分子对于每个靶标通常是单价的。如例如Klein,2012中所述,单价双特异性IgG的概念被认为具有独特的治疗优势,因为它们(i)不会引起受体同源二聚化,(ii)由于对每种抗原的亲合力丧失而潜在地具有对非靶组织降低的毒性,并且(iii)当两种抗原都被选择性地限制或在靶细胞上大量表达时具有更好的选择性。因此,在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段是不对称IgG样双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0409] 不对称IgG样双特异性抗体涉及两条不同重链的异源二聚化以及同源轻链和重链的正确配对。重链的异源二聚化可以通过几种技术来解决,诸如杵臼结构(knobs-into-holes)、CH3的静电转向、CH3链交换的工程化结构域和亮氨酸拉链。可以通过使用这些重链异源二聚化技术中的一种连同使用共同的轻链、CH1与CL之间的结构域交叉、重链和轻链与接头的偶联、来自两个单独的单克隆的重链-轻链二聚体的体外组装、整个Fab结构域的界面工程化或CH1/CL界面的二硫化物工程化来确保轻链与重链的正确配对。

[0410] 不对称IgG样双特异性抗体的特定例示形式称为“DuetMab”。DuetMab抗体使用KIH技术用于2个不同重链的异源二聚化,并通过用工程化的二硫键替换CH1-CL界面之一中的天然二硫键来增加同源重链和轻链配对的效力。与DuetMab相关的披露内容可以在例如美国专利号9,527,927和Mazor 2015中找到,这两篇参考文献通过引用以其全文并入本文。

[0411] 在一些实施例中,化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段包含:

[0412] (a) 经修饰的CH区,其中经修饰的重链包含天然非半胱氨酸氨基酸到半胱氨酸氨基酸的取代;和

[0413] (b) 经修饰的相应CL区,其中该经修饰的CL包含天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代,

[0414] 其中:

[0415] (i) 该第一重链包含该经修饰的CH区并且该第一轻链包含该经修饰的相应CL区;或者

[0416] (ii) 该第二重链包含该经修饰的CH区并且该第二轻链包含该经修饰的相应CL区。

[0417] 在一些实施例中,由天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代产生的经修饰的CH区的取代的半胱氨酸和由天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代产生的经修饰的相应CL区的取代的半胱氨酸可以形成二硫键。

[0418] 在一些实施例中,经修饰的CH区包含在位置126处天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代;并且经修饰的相应CL区包含在位置121处天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代,其中恒定区的编号按照EU索引。

[0419] 在一些实施例中,经修饰的CH区包含位置126处的天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代和位置219处的天然半胱氨酸氨基酸至非半胱氨酸氨基酸(例如至缬氨酸)的取代;并且经修饰的相应CL区包含位置121处的天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代和位置214处的天然半胱氨酸氨基酸至非半胱氨酸氨基酸(例如至缬氨酸)的取代,其中恒定区的编号按照EU索引。

[0420] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含第二CH区和第二相应轻链,其中第二CH区和第二相应CL不包含天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸氨基酸的取代并且不包含天然半胱氨酸至非半胱氨酸氨基酸的取代。

[0421] 化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段的功能特性

[0422] 结合亲和力

[0423] 本文所述的放射免疫缀合物的抗体或其抗原结合片段的特征可以在于能够结合EGFR的对EGFR具有特定亲和力的抗原结合结构域和/或能够结合cMET的对cMET具有特定亲和力的抗原结合结构域。化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段与同源抗原(例如人、小鼠或食蟹猴EGFR或cMET)的结合亲和力可以通过表面等离子体共振 (SPR) 使用例如Biacore来确定。可以使用抗体或其抗原结合片段来确定结合亲和力,例如作为包含能够结合EGFR的第一抗原结合结构域和能够结合cMET的第二抗原结合结构域的双特异性抗体的一部分。可替代地,可以使用对EGFR或cMET具有单特异性的抗体或其抗原结合片段来确定结合亲和力。在一些实施例中,使用如本文提供的或本领域已知的BIACore来确定结合亲和力。

[0424] 结合亲和力通常通过Kd(抗原结合结构域与其抗原之间的平衡解离常数)测量。众所周知,Kd值越低,抗原结合结构域的结合亲和力越高。例如,能够以10nM的Kd结合靶标的抗原结合结构域将被认为以高于能够以100nM的Kd结合相同靶标的抗原结合结构域的亲和力结合所述靶标。

[0425] 提及人EGFR可以指包含EGFR细胞外结构域的多肽,例如具有SEQ ID NO:42所示氨基酸序列的多肽。提及小鼠EGFR可以指由可从义翘神州(SinoBiological)获得的目录号51091-M08H的分子产生的多肽。提及食蟹猴EGFR可以指SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列。提及人cMET可以指具有SEQ ID NO:43所示氨基酸序列的多肽。提及小鼠cMET可以指由可从义翘神州获得的目录号50622-M08H的分子产生的多肽。提及食蟹猴cMET可以指SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列。

[0426] EGFR亲和力

[0427] 本文所述的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段可以包含能够以低亲和力结合EGFR的抗原结合结构域。如本文所用,“低亲和力”是指能够以等于或高于10nM的解离常数(Kd)结合人EGFR的第一抗原结合结构域。与包含能够以“较高亲和力”结合人EGFR的EGFR抗原结合结构域的缀合物相比,包含这样的低亲和力EGFR抗原结合结构域的本文所述的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或抗原结合片段可以在正常组织中显示出降低的中靶毒性,例如皮肤毒性,并且因此具有改善的安全性特征。如本文所用,“较高

亲和力”或“高亲和力”是指第一抗原结合结构域能够以低于10nM的Kd结合人EGFR。

[0428] 能够结合EGFR的抗原结合结构域能以Kd等于或高于10nM、15nM、20nM、25nM、30nM、35nM或40nM的亲和力结合人EGFR。可替代地,能够结合EGFR的抗原结合结构域能以在10与100nM之间、在20与100nM之间、在30与100nM之间、在40与100nM之间、在10与80nM之间、在20与80nM之间、在30与80nM之间、在40与80nM之间、在10与70nM之间、在20与70nM之间、在30与70nM之间、在40与70nM之间、在10与60nM之间、在20与60nM之间、在30与60nM之间、在40与60nM之间、在10与50nM之间、在20与50nM之间、在30与50nM之间、或在40与50nM之间的Kd结合人EGFR。

[0429] 能够结合EGFR的抗原结合结构域能以如下亲和力结合人EGFR,该亲和力低于包含抗体QD6的可变重链(VH)区序列和可变轻链(VL)区序列的抗原结合结构域的亲和力,该VH区序列和VL区序列分别如SEQ ID NO:47和48所示。

[0430] 例如,能够结合EGFR的抗原结合结构域能以Kd是包含分别如SEQ ID NO:47和48所示的抗体QD6的重链序列和轻链序列的抗原结合结构域结合人EGFR的Kd的至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍或7倍的亲和力结合人EGFR。可替代地,能够结合EGFR的抗原结合结构域能以Kd是包含分别如SEQ ID NO:47和48所示的抗体QD6的重链序列和轻链序列的抗原结合结构域结合人EGFR的Kd的2与10倍之间、3与10倍之间、4与10倍之间、5与10倍之间、6与10倍之间、7与10倍之间、2与9倍之间、3与9倍之间、4与9倍之间、5与9倍之间、6与9倍之间、7与9倍之间、2与8倍之间、3与8倍之间、4与8倍之间、5与8倍之间、6与8倍之间、7与8倍之间的亲和力结合人EGFR。

[0431] 能够结合EGFR的抗原结合结构域能以与包含分别如SEQ ID NO:15和16所示的抗体RAA22的可变重链区序列和可变轻链区序列的抗原结合结构域的亲和力相似的亲和力结合人EGFR。例如,能够结合EGFR的抗原结合结构域能以Kd与包含分别如SEQ ID NO:15和16所示的抗体RAA22的可变重链区序列和可变轻链区序列的抗原结合结构域结合人EGFR的Kd相差不到5倍、相差不到4倍、相差不到3倍、相差不到2倍、相差不到1倍或相差不到0.5倍的亲和力结合人EGFR。

[0432] 能够结合EGFR的抗原结合结构域也可以能够结合食蟹猴EGFR。例如,能够结合EGFR的抗原结合结构域能以Kd小于700nM、小于600nM、小于500nM、小于400nM、小于300nM或小于250nM的亲和力结合食蟹猴EGFR。可替代地,能够结合EGFR的抗原结合结构域能以Kd在100和700nM之间、在100和600nM之间、在100和500nM之间、在100和400nM之间、在100和300nM之间、在150和250nM之间、在100和200nM之间的亲和力结合食蟹猴EGFR。能够结合EGFR的抗原结合结构域能以如下Kd结合食蟹猴EGFR,该Kd是抗原结合结构域结合人EGFR的Kd的小于或等于10倍、9倍、8倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍。

[0433] 能够结合EGFR的抗原结合结构域也可以能够结合小鼠EGFR。例如,能够结合EGFR的抗原结合结构域能以Kd小于1 μ M、小于900nM、小于800nM、小于700nM、小于600nM或小于650nM的亲和力结合小鼠EGFR。可替代地,能够结合EGFR的抗原结合结构域能以在100nM与1 μ M之间、在200与900nM之间、在300与800nM之间、在400与700nM之间、在400与600nM之间、或在450与550nM之间的Kd结合小鼠EGFR。

[0434] 优选地,能够结合EGFR的抗原结合结构域能够结合人EGFR和食蟹猴EGFR。这种交叉反应性是有利的,因为它允许在临床前开发期间在食蟹猴中进行抗体和缀合物的剂量和

安全性测试。甚至更优选地,能够结合EGFR的抗原结合结构域能够结合人EGFR、食蟹猴EGFR和小鼠EGFR。例如,能够结合EGFR的抗原结合结构域可以能够以上述Kd值结合人EGFR、食蟹猴EGFR和小鼠EGFR(例如结合人EGFR的Kd在10与100nM之间,结合食蟹猴EGFR的Kd在100与700nM之间,且结合小鼠EGFR的Kd在100nM与1 μ M之间)。

[0435] cMET亲和力

[0436] 能够结合cMET的抗原结合结构域能以Kd低于20nM、15nM、12nM、11nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM或2.5nM的亲和力结合人cMET。可替代地,能够结合cMET的抗原结合结构域能以Kd在1与20nM之间、在1与15nM之间、在1与10nM之间、在1与9nM之间、在1与8nM之间、在1与7nM之间、在1与6nM之间、在1与5nM之间、在1与4nM之间、在1与3nM之间、在1与2.5nM、或2与2.5nM之间的亲和力结合人cMET。

[0437] 能够结合cMET的抗原结合结构域可以能够结合食蟹猴cMET。例如,可以能够结合cMET的抗原结合结构域能以Kd低于30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、或2.5nM的亲和力结合食蟹猴cMET。可替代地,能够结合cMET的抗原结合结构域能以Kd在1与20nM之间、在1与15nM之间、在1与10nM之间、在1与9nM之间、在1与8nM之间、在1与7nM之间、在1与6nM之间、在1与5nM之间、在1与4nM之间、在1与3nM之间、在1与2.5nM、或2与2.5nM之间的亲和力结合食蟹猴cMET。能够结合cMET的抗原结合结构域能以如下Kd的亲和力结合食蟹猴cMET,该Kd是抗原结合结构域结合人cMET的Kd的小于或等于10倍、9倍、8倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍、2倍、1倍。

[0438] 优选地,能够结合cMET的抗原结合结构域能够结合人cMET和食蟹猴cMET。这种交叉反应性是有利的,因为它允许在临床前开发期间在食蟹猴中进行抗体的剂量和安全性测试。例如,能够结合cMET的抗原结合结构域可以能够以上述Kd值结合人cMET和食蟹猴cMET(例如结合人cMET的Kd在1与20nM之间,且结合食蟹猴cMET的Kd在1与20nM之间)。

[0439] 特异性结合

[0440] 本文所述的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段可以包含能够特异性结合EGFR的抗原结合结构域。本文所述的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或抗原结合片段可以包含能够特异性结合cMET的抗原结合结构域。本文所述的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或抗原结合片段可以包含能够结合EGFR的第一抗原结合结构域(其是能够特异性结合EGFR的第一抗原结合结构域)和能够结合cMET的第二抗原结合结构域(其是能够特异性结合cMET的第一抗原结合结构域)。

[0441] 术语“特异性”可指抗原结合结构域将不显示与除其特异性结合配偶体(此处为EGFR或cMET)以外的分子的任何显著结合的情况。这样的分子被称为“非靶分子”。术语“特异性”也适用于抗体或其抗原结合片段对许多抗原携带的特定表位(例如EGFR或cMET上的表位)具有特异性的情况,在这种情况下抗体或其抗原结合片段将能够结合携带该表位的各种抗原。

[0442] 在一些实施例中,如果与非靶分子的结合程度小于抗体或其抗原结合片段与靶标的结合的约10%,如例如通过ELISA、SPR、生物层干涉测量法(BLI)、微量热泳动(MST)或通过放射免疫测定(RIA)所测量,则认为化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段未表现出与非靶分子的任何显著结合。可替代地,结合特异性可根据结合亲和力反映,其中本文所述的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段能够以比对另一

种非靶分子的亲和力大至少0.1个数量级的亲和力结合EGFR和/或cMET。在一些实施例中,本披露的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段能够以比对另一种非靶分子的亲和力大至少0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、或2.0个数量级之一的亲和力结合EGFR和/或cMET。

[0443] EGFR是受体的ErbB家族的成员,该家族是四种密切相关的受体酪氨酸激酶的亚家族:EGFR、HER2、HER3和HER4。RAA22抗原结合结构域不显示与HER2、HER3和HER4结合,表明该抗原结合结构域特异性结合EGFR。因此,在某些实施例中,能够结合EGFR的抗原结合结构域不与HER2、HER3或HER4结合,或者没有显示出对HER2、HER3或HER4的任何显著的结合。

[0444] cMET是受体酪氨酸激酶亚家族的成员,包括Ron和Sema 4a。B09-GL抗原结合结构域不与Ron和Sema 4a结合,表明该抗原结合结构域特异性结合cMET。因此,在某些实施例中,能够结合cMET的抗原结合结构域不与Ron、Sema 4a结合,或者没有显示出对Ron、Sema 4a的任何显著的结合。

[0445] 同时接合

[0446] 本文所述的包含能够结合EGFR的第一抗原结合结构域和能够结合cMET的第二抗原结合结构域的本披露的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段的特征可在于这两个抗原结合结构域同时接合它们各自的EGFR和cMET靶标的的能力。预期具有同时接合EGFR和cMET的能力的本披露的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段是有利的,因为已知许多肿瘤共表达EGFR和cMET两者,并且因此可以被本披露的化合物靶向。因此,在一些实施例中,本披露的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段能够同时接合EGFR和cMET。

[0447] 这些测量同时接合的方法的更多详细信息可以在实例中找到。

[0448] 抗体(或其抗原结合片段)内化

[0449] 本文所述的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段的特征可在于它们介导高效内化的能力。

[0450] 细胞对抗体或其抗原结合片段(或包含所述抗体或其抗原结合片段的化合物(例如,放射免疫缀合物))的内化可以通过以下来分析:使活细胞与该抗体或其抗原结合片段接触,并在足够的内化时间后检测抗体(或其抗原结合片段)或化合物(例如,放射免疫缀合物)。内化可以通过检测抗体(或其抗原结合片段)或化合物(例如,放射免疫缀合物)的定位来确定。当抗体(或其抗原结合片段)或化合物(例如,放射免疫缀合物)保留在细胞表面上(例如,在细胞表面上检测到,和/或在细胞内未检测到)时,确定抗体(或其抗原结合片段)或化合物(例如,放射免疫缀合物)未被内化。当在细胞内(例如,定位于细胞质或细胞器)检测到抗体(或其抗原结合片段)或化合物(例如,放射免疫缀合物)时,确定抗体(或其抗原结合片段)或化合物(例如,放射免疫缀合物)已被内化。

[0451] 用于显现抗体(或其抗原结合片段)或化合物(例如,放射免疫缀合物)是否能够介导高效内化的示例性方法涉及用在酸性pH下显示荧光的pH敏感性染料标记抗体,并将这些标记的抗体或缀合物添加到细胞。可通过监测荧光来检测细胞内化。如果观察到的荧光在一定时间段(例如48小时)大于标记的非结合对照抗体(或其抗原结合片段)或化合物(例如,放射免疫缀合物)的荧光,则认为抗体(或其抗原结合片段)或化合物(例如,放射免疫缀合物)能够介导内化并递送至溶酶体。这种显现抗体(或其抗原结合片段)内化的方法的更

多详细信息可以在实例中找到。

[0452] 包含能够结合EGFR的第一抗原结合结构域和能够结合cMET的第二抗原结合结构域的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段的特征可在于与EGFR或cMET单特异性对照相比时它们介导更高效内化的能力。预期表现出这种特性的化合物(例如,放射免疫缀合物)的抗体或其抗原结合片段是有利的,因为预期它们对共表达两种靶标的肿瘤细胞表现出更大的选择性,并且可以使抗体或其抗原结合片段在不表现出显著水平的共表达的正常组织中的影响最小化。

[0453] 在一些实施例中,本文提供了包含抗体或抗原结合片段的化合物(例如,免疫缀合物或放射免疫缀合物),这些抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中该重链可变结构域包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且该轻链可变结构域包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中该CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3是下文提供的序列附件中描述的抗体的那些。

[0454] 在一些实施例中,提供了包含抗体或抗原结合片段的化合物(例如,免疫缀合物或放射免疫缀合物),这些抗体或抗原结合片段是序列附件中所示的抗体的变体,其中这样的抗体或抗原结合片段的CDR序列与序列附件中描述的抗体的CDR序列每个CDR相差不超过三个氨基酸残基(例如,三个或两个或一个氨基酸残基)。在一些实施例中,提供了包含抗体或抗原结合片段的化合物(例如,免疫缀合物或放射免疫缀合物),这些抗体或抗原结合片段是序列附件中所示的抗体的变体,其中这样的抗体或抗原结合片段具有一组六个CDR,其序列与序列附件中描述的抗体的CDR总共相差不超过三个氨基酸残基(例如,三个或两个或一个氨基酸残基)。

[0455] 在一些实施例中,提供了包含抗体或抗原结合片段的化合物(例如,免疫缀合物或放射免疫缀合物),这些抗体或抗原结合片段包含含有序列附件中描述的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域序列的重链可变结构域和轻链可变结构域。在一些实施例中,提供了包含抗体或抗原结合片段的化合物(例如,免疫缀合物或放射免疫缀合物),这些抗体或抗原结合片段是序列附件中所示的抗体的变体,其中这样的抗体或抗原结合片段具有(1)包含与序列附件中描述的抗体的重链可变结构域的氨基酸序列具有至少85%、至少87.5%、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%或至少99%同一性的氨基酸序列的重链结构域;以及(2)包含与序列附件中描述的相同抗体的轻链可变结构域的氨基酸序列具有至少85%、至少87.5%、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%或至少99%同一性的氨基酸序列的轻链结构域。

[0456] 序列附件

[0457] 抗EGFR抗体克隆RAA22的CDR序列

[0458] HCDR1-DNDFS (SEQ ID NO:1)

[0459] HCDR2-AIVAVFRTETYAQKFQD (SEQ ID NO:2)

[0460] HCDR3-RLMSAISGPGAPLLM (SEQ ID NO:3)

[0461] LCDR1-TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:4)

[0462] LCDR2-DVSKRPS (SEQ ID NO:5)

[0463] LCDR3-SSYTSSDTLEI (SEQ ID NO:6)

- [0464] 抗EGFR抗体克隆RAA22的FR序列
- [0465] HFR1-QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS (SEQ ID NO:7)
- [0466] HFR2-WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO:8)
- [0467] HFR3-RVKITADISTRRTTYMELSSLRSED TAVYYCAR (SEQ ID NO:9)
- [0468] HFR4-WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:10)
- [0469] LFR1-QSALTQPRSVSGSPGQSVTISC (SEQ ID NO:11)
- [0470] LFR2-WYQQHPGKAPKLMIIY (SEQ ID NO:12)
- [0471] LFR3-GVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC (SEQ ID NO:13)
- [0472] LFR4-FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:14)
- [0473] 抗EGFR抗体克隆RAA22的可变重链 (VH) 区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:15)
- [0474] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS D NDFS WVRQAPGQGLEWMGAIVAVFR TET Y A Q K F Q D R V K
ITADISTRRTTYMELSSLRSED TAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGT LVT VSS
- [0475] 抗EGFR抗体克隆RAA22的可变轻链 (VL) 区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:16) :
- [0476] QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIIYDVSKRPSGVPDRFSGSKS
GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSDTLEIFGGGTKLTVL
- [0477] 抗c-Met抗体克隆B09-GL的CDR序列
- [0478] HCDR1-DYYIH (SEQ ID NO:17)
- [0479] HCDR2-WMNPNSGNTGYAQKFQG (SEQ ID NO:18)
- [0480] HCDR3-GQGYTHS (SEQ ID NO:19)
- [0481] LCDR1-RASEGIYHWLA (SEQ ID NO:20)
- [0482] LCDR2-KASSLAS (SEQ ID NO:21)
- [0483] LCDR3-QQYSNYPPT (SEQ ID NO:22)
- [0484] 抗c-Met抗体克隆B09-GL的FR序列
- [0485] HFR1-QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT (SEQ ID NO:23)
- [0486] HFR2-WVRQATGQGLEWMG (SEQ ID NO:24)
- [0487] HFR3-RVTMTRDTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCAR (SEQ ID NO:25)
- [0488] HFR4-WGQGT MVT VSS (SEQ ID NO:26)
- [0489] LFR1-DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC (SEQ ID NO:27)
- [0490] LFR2-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:28)
- [0491] LFR3-GVPSRFSGSGTEFTLTISLQPD D F A T Y Y C (SEQ ID NO:29)
- [0492] LFR4-FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:30)
- [0493] 抗c-Met抗体克隆B09-GL的可变重链 (VH) 区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:31) :
- [0494] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIHWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVT
MTRDTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCARGQGYTHSWGQGT MVT VSS
- [0495] 抗c-Met抗体克隆B09-GL的可变轻链 (VL) 区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:32) :
- [0496] DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASEGIYHWLA W Y Q Q K P G K A P K L L I Y K A S S L A S G V P S R F S G S G S T
EFTLTISLQPD D F A T Y Y C Q Q Y S N Y P P T F G G G T K L E I K
- [0497] 人免疫球蛋白G1重链恒定 (CH) 区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:33) :
- [0498] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V

TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0499] 野生型人免疫球蛋白κ恒定区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:34) :

[0500] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0501] “EGFR-cMET TM”抗体中抗EGFR的重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:35) :

[0502] 以下取代加粗且加下划线:

[0503] 三重突变 (TM; L234F、L235E和P331S) ; “杵”突变 (T366W) ; 链间半胱氨酸突变
(F126C和C219V) ; 稳定化半胱氨酸突变 (S354C) , 其中残基的编号根据EU索引。

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDNDFS WVRQAPGQG
LEWMGAIVAVFRTETYAQKFQDRVKITADISTR TTYMELSSLRSED
TAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGTLVTVSSASTKGPSV CPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKS
[0504] VDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC
REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

[0505] “EGFR-cMET TM”抗体中抗c-Met的重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:36) :

[0506] 以下取代加粗且加下划线:

[0507] 三重突变 (TM; L234F、L235E和P331S) ; “臼”突变 (T366S、L368A和Y407V) ; 以及稳定
化半胱氨酸突变 (Y349C) , 其中残基的编号根据EU索引。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQATGQG
LEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRS
EDTAVYYCARGQGYTHSWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
[0508] STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL

- NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTK
- [0509] NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0510] “EGFR-cMET TM”抗体中抗EGFR的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:37):
- [0511] 以下取代加粗且加下划线:
- [0512] S121C和C214V,其中编号根据EU索引
- QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA
PKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS
- [0513] SYTSSDTLEIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPCSEELQANKATL
VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY
LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEVS
- [0514] “EGFR-cMET TM”抗体中抗c-Met的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:38):
- DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPK
LLIYKASSLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYS
- [0515] NYPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0516] 经修饰以包括“杵”突变、半胱氨酸以形成稳定化二硫桥、没有半胱氨酸插入并且具有TM的人免疫球蛋白G1 CH区的氨基酸序列(SEQ ID NO:39):
- [0517] 以下取代加粗且加下划线:
- [0518] 三重突变(TM;L234F、L235E和P331S);“杵”突变(T366W);链间半胱氨酸突变(F126C和C219V);稳定化半胱氨酸突变(S354C),其中残基的编号根据EU索引。
- ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
- [0519] KVDKRVEPKSYDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
- [0520] NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK
- [0521] 经修饰以包括“臼”突变、半胱氨酸以形成稳定化二硫桥、没有半胱氨酸插入并且具有TM的人免疫球蛋白G1 CH区的氨基酸序列(SEQ ID NO:40):
- [0522] 以下取代加粗且加下划线:
- [0523] 三重突变(TM;L234F、L235E和P331S);“臼”突变(T366S、L368A和Y407V);以及稳定化半胱氨酸突变(Y349C),其中残基的编号根据EU索引。

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEEEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
[0524] YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASEIEKTISKAKGQPR
EPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

[0525] 经修饰以包括S121C和C214V取代的人免疫球蛋白λ恒定区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:41):

GQPKAAPSVTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD
[0526] SSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT
HEGSTVEKTVAPTES

[0527] 人EGFR细胞外结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:42):

[0528] LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIAL
NTVERIPLNLQIIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSS
DFLSNMSMDFQNLHGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRES
CLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVDHGSVCVRACGADSYEMEEDGVR
KCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEI
TGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIIRGRTKQHGGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWK
KLFGTSGQKTKIIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSEC
IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPG
LEGCPNTPKIPS

[0529] 人c-Met细胞外结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:43):

[0530] ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHP
DCFPCQDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPS
QCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHLHSISVRLKETKDGMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPI
KYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDQTFHTRIIRFCSINSLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSK
PGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKYVNDFFNKIVNKNVRLQHFYGNHEHCFNRT
LLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVN
FLLDSHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGT
WTQQICLPAIYKVPNSAPLEGGRRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTNLKCTVGPAMNK
HFNMSIIISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAAGTLLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLSVSNISILEC
YTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSREDPIVYIEIHPTKSFISGGSTITGVGNLNSVSVPRMVINVHEAGRN
TVACQHRSNSEIICCTTPSLQQNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPVFKPFKPMISMGNENVLEIKGN
DIDPEAVKGEVLKVGKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNT

[0531] 食蟹猴c-Met细胞外结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:44):

[0532] ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETAIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHP
DCFPQCDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPN
QCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPHHPLHSISVRRLKETKDGMFLTDQSYIDVLPFRDSYPI
KYIHAFESNNFIYFLTVQRETLNAQTFHTRIIRFCSLNSGLHSMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSK
PGAQLARQIGASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKIYVNDFFNKIVNKNVNRCLQHFYGPNEHCFNRT
LLRNSSGCEARRDEYRAEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFVKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVN
FLLDSHPVSPEVIVEHPLNQNGYTLVVTGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECPSGT
WTQQICLPAIYKVFPPTSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTNLKCTVGPAMNK
HFNMSIIISNGHGTTQYSTFSYVDPIITSISPKYGPMAAGTLLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLSVSNSILEC
YTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVYIEHPTKSFISGGSTITGVGNLHSSVSPRMVINVHEAGRN
TVACQHRNSNEIICCTTPSLQQNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPVFKPFKPMISMGNENVLEIKGN
DIDPEAVKGEVLKVGKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNT

[0533] 食蟹猴EGFR细胞外结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO:46):

[0534] LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIAL
NTVERIPLNLQIIRGNMYENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSS
EFLSNMSMDFQNLHGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRES
CLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVDHGSVCVRACGADSYEMEEDGVR
KCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDTLSINATNIKHFNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEI
TGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWK
KLFGTSSQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCQNVSRGECVDKCNILEGEPREFVENSEC
IQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPG
LEGARNGPKIPS

[0535] 抗EGFR抗体克隆QD6的VH区的氨基酸序列(SEQ ID NO:47):

[0536] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSNDFSWVRQAPGQGLEWMGAIVAVVRTETYAQKFQDRVK
ITADISTRITTYMELSSLRSEDTAVYYCARRLMSAISGPGAPLLMWGQGTLVTVSS

[0537] 抗EGFR抗体克隆QD6的VL区的氨基酸序列(SEQ ID NO:48):

[0538] QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYIDVSRPSGVPDRFSGSKS
GNTASLTISGLQAEDEADYYCFSYTSSDTLEIFGGGTKLTVL

[0539] 螯合部分或其金属络合物

[0540] 螯合部分

[0541] 合适的螯合部分的实例包括但不限于:DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTMA((1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTAM(1,4,7,10-四(氨基甲酰甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷)、DOTPA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四丙酸)、DO3AM-乙酸(2-(4,7,10-三(2-氨基-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)乙酸)、DOTA-GA酸酐(2,2',2''-(10-(2,6-二氧代四氢-2H-吡喃-3-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸)、DOTP(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦酸))、DOTMP(1,4,6,10-四氮杂环癸烷-1,4,7,10-四亚甲基膦酸)、DOTA-4AMP(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(乙酰氨基-亚甲基膦酸))、CB-TE2A(1,4,8,11-四氮杂双环[6.6.2]十六烷-4,11-二乙酸)、NOTA(1,4,7-三

氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸)、NOTP(1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三(亚甲基膦酸))、TETPA(1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四丙酸)、TETA(1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四乙酸)、HEHA(1,4,7,10,13,16-六氮杂环十六烷-1,4,7,10,13,16-六乙酸)、PEPA(1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷-N,N',N'',N''',N''''-五乙酸)、H₄octapa(N,N'-双(6-羧基-2-吡啶甲基)-乙二胺-N,N'-二乙酸)、H₂dedpa(1,2-[[6-(羧基)-吡啶-2-基]-甲氨基]乙烷)、H₆phospa(N,N'-(亚甲基膦酸酯)-N,N'-[6-(甲氧羰基)吡啶-2-基]-甲基-1,2-二氨基乙烷)、TTHA(三亚乙基四胺-N,N,N',N'',N''',N''''-六乙酸)、D02P(四氮杂环十二烷二甲烷膦酸)、HP-D03A(羟丙基四氮杂环十二烷三乙酸)、EDTA(乙二胺四乙酸)、去铁胺、DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)、DTPA-BMA(二亚乙基三胺五乙酸-双甲基酰胺)、八齿-HOPO(八齿羟基吡啶酮)或卟啉。

[0542] 优选地,螯合部分选自DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTMA((1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、DOTAM(1,4,7,10-四(氨基甲酰甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷)、D03AM-乙酸(2-(4,7,10-三(2-氨基-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)乙酸)、DOTP(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦酸))、DOTA-4AMP(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(乙酰氨基-亚甲基膦酸)、NOTA(1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸)、和HP-D03A(10-(2-羟丙基)-1,4,7-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸)。

[0543] 在一些实施例中,螯合部分是DOTA。

[0544] 在一些实施例中,化合物包含螯合部分的金属络合物。例如,螯合基团可以用于与金属(例如锰、铁和钆)和同位素(例如,一般能量范围为60至10,000keV的同位素)(例如本文讨论的任何放射性同位素和放射性核素)的金属螯合物组合中。

[0545] 在一些实施例中,螯合部分可用作检测剂,并且包含这样可检测螯合部分的化合物因此可用作诊断剂或治疗诊断剂。

[0546] 放射性同位素和放射性核素

[0547] 在一些实施例中,金属络合物包含放射性核素。合适的放射性同位素和放射性核素的实例包括但不限于³H、¹⁴C、¹⁵N、¹⁸F、³⁵S、⁴⁴Sc、⁴⁷Sc、⁵⁵Co、⁶⁰Cu、⁶¹Cu、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁶Ga、⁶⁷Ga、⁶⁷Cu、⁶⁸Ga、⁷⁵Br、⁷⁶Br、⁷⁷Br、⁸²Rb、⁸⁹Zr、⁸⁶Y、⁸⁷Y、⁹⁰Y、⁹⁷Ru、⁹⁹Tc、^{99m}Tc、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁹Tb、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、^{117m}Sn、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²⁰¹Tl、²⁰³Pb、²¹¹At、²¹²Pb、²¹²Bi、²¹³Bi、²²³Ra、²²⁵Ac、²²⁷Th和²²⁹Th。

[0548] 在一些实施例中,金属络合物包含选自以下的放射性核素:⁴⁴Sc、⁴⁷Sc、⁵⁵Co、⁶⁰Cu、⁶¹Cu、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁶Ga、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸²Rb、⁸⁶Y、⁸⁷Y、⁸⁹Zr、⁹⁰Y、⁹⁷Ru、⁹⁹Tc、^{99m}Tc、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹¹¹In、^{117m}Sn、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁹Tb、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²⁰¹Tl、²⁰³Pb、²¹¹At、²¹²Pb、²¹²Bi、²¹³Bi、²²³Ra、²²⁵Ac、²²⁷Th和²²⁹Th。

[0549] 在某些实施例中,金属络合物包含选自以下的放射性核素:⁶⁸Ga、⁸⁹Zr、⁹⁰Y、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu和²²⁵Ac。在某些实施例中,金属络合物包含放射性核素¹⁷⁷Lu或²²⁵Ac。

[0550] 在一些实施例中,放射性核素为 α 发射体,例如砹-211(²¹¹At)、铋-212(²¹²Bi)、铋-213(²¹³Bi)、锕-225(²²⁵Ac)、镭-223(²²³Ra)、铅-212(²¹²Pb)、钍-227(²²⁷Th)、或铋-149(¹⁴⁹Tb)、或其子代。在一些实施例中, α 发射体为锕-225(²²⁵Ac)、或其子代。

[0551] 在某些实施例中,金属络合物包含 α 发射体²²⁵Ac或其子代。

[0552] 接头

[0553] 本发明的化合物包含以下式I的结构:

[0554] $A-L^1-(L^2)_n-B$

[0555] 式I

[0556] 其中每个变量都在上文的发明内容部分中定义。

[0557] 每个式I的化合物均包含接头部分,作为 $-L^1-(L^2)_n-$,其中:

[0558] L^1 为键、 $C=O$ 、 $C=S$ 、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、任选地取代的 C_1-C_6 杂烷基、任选地取代的芳基、或任选地取代的杂芳基;

[0559] n 是1与5之间的整数(包括端值);并且

[0560] 每个 L^2 独立地具有结构:

[0561] $-X^1-L^3-Z^1-$

[0562] 式II

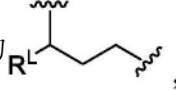
[0563] 其中:

[0564] X^1 为 $-C(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)-*$ 、 $-C(S)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(S)-*$ 、 $-OC(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)-*$ 、 $-NR^1C(O)NR^1-*$ 、 $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-*$ 、 $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-*$ 、 $-O-*$ 或 $-NR^1-*$;其中“*”表示与 L^3 的附接点,且 R^1 为氢、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、任选地取代的 C_1-C_6 杂烷基或任选地取代的芳基或杂芳基;

[0565] L^3 为任选地取代的 C_1-C_{50} 烷基或任选地取代的 C_1-C_{50} 杂烷基(例如, $(CH_2CH_2O)_{2-20}$);并且

[0566] Z^1 为 $-CH_2-#$ 、 $-C(O)-#$ 、 $-C(S)-#$ 、 $-OC(O)-#$ 、 $-C(O)O-#$ 、 $-NR^2C(O)-#$ 、 $-C(O)NR^2-#$ 或 $-NR^2-#$,其中“#”表示与B的附接点,且 R^2 为氢、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、任选地取代的 C_1-C_6 杂烷基、任选地取代的芳基或任选地取代的杂芳基。

[0567] 在一些实施例中, L^1 为任选地取代的 C_1-C_6 烷基或任选地取代的 C_1-C_6 杂烷基。在某些实施例中, L^1 是取代的 C_1-C_6 烷基或取代的 C_1-C_6 杂烷基,取代基包括杂芳基基团(例如,六元含氮杂芳基)。在一些实施例中, L^1 为 C_1-C_6 烷基。例如, L^1 为 $-CH_2CH_2-$ 。在一些实施例中, L^1

为键。在一些实施例中, L^1 为 , 其中 R^1 为氢或 $-CO_2H$ 。

[0568] 在一些实施例中, X^1 为 $-C(O)NR^1-*$ 、 $-NR^1C(O)-*$ 或 $-NR^1-$,“*”表示与 L^3 的附接点,且 R^1 为氢、任选地取代的 C_1-C_6 烷基、任选地取代的 C_1-C_6 杂烷基、任选地取代的芳基或任选地取代的杂芳基。在一些实施例中, X^1 为 $-C(O)NR^1-*$,“*”表示与 L^3 的附接点,且 R^1 为氢。

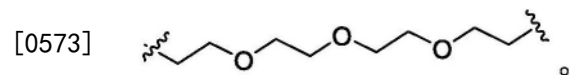
[0569] 在一些实施例中, L^3 为任选地取代的 C_1-C_{50} 烷基(例如, C_3-C_{30} 烷基、 C_3-C_{25} 烷基、 C_3-C_{20} 烷基、 C_3-C_{15} 烷基、 C_3-C_{10} 烷基、 C_5-C_{30} 烷基、 C_5-C_{25} 烷基、 C_5-C_{20} 烷基、 C_5-C_{15} 烷基、和 C_5-C_{10} 烷基)或任选地取代的 C_1-C_{50} 杂烷基(例如, C_3-C_{30} 杂烷基、 C_3-C_{25} 杂烷基、 C_3-C_{20} 杂烷基、 C_3-C_{15} 杂烷基、 C_3-C_{10} 杂烷基、 C_5-C_{30} 杂烷基、 C_5-C_{25} 杂烷基、 C_5-C_{20} 杂烷基、 C_5-C_{15} 杂烷基、和 C_5-C_{10} 杂烷基)。示例性 C_1-C_{50} 杂烷基为 C_5-C_{30} 聚乙二醇(例如, C_5-C_{25} 聚乙二醇、 C_5-C_{20} 聚乙二醇、 C_5-C_{15} 聚乙二醇)。在某些实施例中, L^3 为 C_5-C_{25} 聚乙二醇、 C_5-C_{20} 聚乙二醇、或 C_5-C_{15} 聚乙二醇。

[0570] 在一些实施例中, L^3 为任选地取代的 C_1-C_{50} 杂烷基(例如, C_1-C_{40} 杂烷基、 C_1-C_{30} 杂烷基、 C_1-C_{20} 杂烷基、 C_2-C_{18} 杂烷基、 C_3-C_{16} 杂烷基、 C_4-C_{14} 杂烷基、 C_5-C_{12} 杂烷基、 C_6-C_{10} 杂烷基、 C_8-C_{10} 杂烷基、 C_4 杂烷基、 C_6 杂烷基、 C_8 杂烷基、 C_{10} 杂烷基、 C_{12} 杂烷基、 C_{16} 杂烷基、 C_{20} 杂烷基或

C₂₄杂烷基)。

[0571] 在一些实施例中, L³为任选地取代的C₁-C₅₀杂烷基, 该杂烷基包含聚乙二醇(PEG)部分, 该部分包含1-20个氧乙烯(-O-CH₂-CH₂-)单元, 例如, 2个氧乙烯单元(PEG2)、3个氧乙烯单元(PEG3)、4个氧乙烯单元(PEG4)、5个氧乙烯单元(PEG5)、6个氧乙烯单元(PEG6)、7个氧乙烯单元(PEG7)、8个氧乙烯单元(PEG8)、9个氧乙烯单元(PEG9)、10个氧乙烯单元(PEG10)、12个氧乙烯单元(PEG12)、14个氧乙烯单元(PEG14)、16个氧乙烯单元(PEG16)、或18个氧乙烯单元(PEG18)。

[0572] 在某些实施例中, L³为任选地取代的C₁₋₅₀杂烷基, 该杂烷基包含聚乙二醇(PEG)部分, 该部分包含1-20个氧乙烯(-O-CH₂-CH₂-)单元或其部分。例如, L³包含如下所示的PEG3:

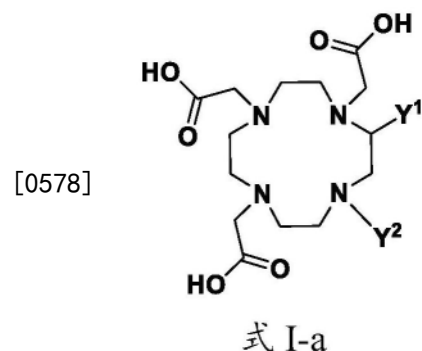


[0574] 在一些实施例中, L³为(CH₂CH₂O)_m(CH₂)_w, 并且m和w各自独立地为0与10之间的整数(包括端值), 并且m和w中至少一个不为0。

[0575] 在一些实施例中, L³是取代的C₁-C₅₀烷基或取代的C₁-C₅₀杂烷基, 取代基包括杂芳基基团(例如, 六元含氮杂芳基)。

[0576] 在一些实施例中, Z¹为CH₂、C=O或NR¹; 其中R¹为H、任选地取代的C₁-C₆烷基、任选地取代的C₁-C₆杂烷基、任选地取代的芳基、或任选地取代的杂芳基。

[0577] 在某些实施例中, A-L¹-(L²)_n-B可以由式I-a或其金属络合物表示:



[0579] 其中Y¹为-CH₂OCH₂(L²)_n-B、-C(O)(L²)_n-B或-C(S)(L²)_n-B, 且Y²为-CH₂CO₂H; 或其中Y¹为H, 且Y²为L¹-(L²)_n-B。

[0580] 交联基团

[0581] 在一些实施例中, 化合物(例如, 放射免疫缀合物)是使用包含螯合物、接头和交联基团的双功能螯合物合成的。一旦形成化合物(例如, 放射免疫缀合物), 交联基团可能不存在于化合物(例如, 放射免疫缀合物)中。

[0582] 在一些实施例中, 化合物(例如, 放射免疫缀合物)包含交联基团来代替靶向性部分或除了靶向性部分之外还包含交联基团(例如, 在一些实施例中, 式I中的B包含交联基团)。

[0583] 交联基团是能够通过共价键连接两个或更多个分子的反应性基团。交联基团可用于将接头和螯合部分连接至治疗部分或靶向性部分。交联基团也可用于在体内将接头和螯合部分连接至靶标。在一些实施例中, 交联基团是氨基反应性交联基团、甲硫氨酸反应性交联基团或硫醇反应性交联基团, 或者包含分选酶识别序列。在一些实施例中, 氨基反应性或

硫醇反应性交联基团包括活性酯,例如羟基琥珀酰亚胺酯、2,3,5,6-四氟苯酚酯、4-硝基苯酚酯或亚胺酸酯、酸酐、硫醇、二硫化物、马来酰亚胺、叠氮化物、炔烃、应变炔烃、应变烯烃、卤素、磺酸酯、卤代乙酰基、胺、酰肼、双吡丙啶、磷、四嗪、异硫氰酸酯或氧杂吡丙啶。在一些实施例中,分选酶识别序列可由末端甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(GGG)和/或LPTXG氨基酸序列构成,其中X是任何氨基酸。本领域的普通技术人员将理解,交联基团的使用不限于本文披露的特定构建体,而是可以包括其他已知的交联基团。

[0584] 药物组合物

[0585] 在一方面,本披露提供了药物组合物,其包含本文披露的化合物。这样的药物组合物可以被配制用于各种药物递送系统。一种或多种生理上可接受的赋形剂或载剂也可以包含在药物组合物中,用于适当的配制。用于在本披露中使用的相容的合适配制品的非限制性实例包括描述于以下中的那些:Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学],Mack Publishing Company[马克出版公司],Philadelphia,PA[宾夕法尼亚州费城],第17版,1985。关于药物递送方法的简要综述,参见例如Langer (Science[科学]249:1527-1533,1990)。

[0586] 药物组合物可以配制用于本文讨论的多种施用途径中的任一种(参见例如本文的“施用和剂量”小节),考虑缓释施用,例如通过储库注射或可蚀植入物或组分的方式。因此,本披露提供了包含本文披露的药剂(例如,放射免疫缀合物)的药物组合物,这些药剂溶解或悬浮于可接受的载剂中,该载剂优选为水性载剂,例如,水、缓冲水、盐水或PBS等。在一些实施例中,药物组合物含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,例如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂或去垢剂等。在一些实施例中,药物组合物被配制用于口服递送并且可以任选地包含惰性成分例如粘合剂或填充剂以配制单位剂型,例如片剂或胶囊。在一些实施例中,药物组合物被配制用于局部施用并且可以任选地包含惰性成分例如溶剂或乳化剂以配制乳膏、软膏、凝胶、糊剂或滴眼剂。

[0587] 在一些实施例中,所提供的药物组合物通过常规灭菌技术进行灭菌,例如可以进行无菌过滤。所得水溶液可直接包装使用,或冻干。例如,冻干制剂可以在施用前与无菌水性载剂混合。制剂的pH通常将在3和11之间,更优选在5和9之间或在6和8之间,并且最优选在6和7之间,如6至6.5。所得固体形式的组合物可以例如包装在多个单剂量单位中,每个单位含有固定量的上述一种或多种药剂,例如在片剂或胶囊的密封包装中。固体形式的药物组合物也可以包装在灵活数量的容器中,例如设计用于局部应用的乳膏或软膏的可挤压管中。

[0588] 治疗方法

[0589] 在一方面,本披露提供了治疗方法,该方法包括向有需要的受试者施用如本文披露的化合物(例如,放射免疫缀合物)。

[0590] 受试者

[0591] 在一些披露的方法中,向受试者施用疗法(例如,包含治疗剂)。在一些实施例中,受试者是哺乳动物,例如,人。

[0592] 在一些实施例中,受试者患有癌症或有患上癌症的风险。例如,受试者可能已诊断出患有癌症。例如,癌症可能是原发性癌症或转移性癌症。受试者可能患有任何阶段的癌症,例如I期、II期、III期或IV期,有或无淋巴结受累以及有或无转移。所提供的化合物(例

如,放射免疫缀合物)和组合物可以预防或减少癌症的进一步生长和/或以其他方式改善癌症(例如,预防或减少转移)。在一些实施例中,受试者未患癌症,但被确定有患上癌症的风险,例如由于存在一种或多种风险因素,如环境暴露、存在一种或多种基因突变或变体、家族史等。在一些实施例中,受试者未被诊断出患有癌症。

[0593] 在一些实施例中,癌症是包含表达EGFR和cMET的细胞的任何癌症。在某些实施例中,癌症为肺癌、结肠直肠癌、胰腺癌或头颈癌。

[0594] 施用和剂量

[0595] 本文披露的化合物(例如,放射免疫缀合物)及其药物组合物可以通过多种施用途径中的任一种施用,包括全身和局部施用途径。

[0596] 全身施用途径包括肠胃外途径和肠内途径。在一些实施例中,化合物(例如,放射免疫缀合物)或其药物组合物通过肠胃外途径施用,例如静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、颅内或皮内施用。在一些实施例中,化合物(例如,放射免疫缀合物)或其药物组合物静脉内施用。在一些实施例中,化合物(例如,放射免疫缀合物)或其药物组合物通过肠内施用途径施用,例如经胃肠道或口服。

[0597] 局部施用途径包括但不限于肿瘤周围注射和肿瘤内注射。

[0598] 可以施用药物组合物以进行放射治疗计划、诊断和/或治疗性治疗。当为了放射治疗计划或诊断目的而施用时,能以诊断有效剂量和/或有效确定治疗有效剂量的量将化合物(例如,放射免疫缀合物)施用给受试者。在治疗应用中,可以将药物组合物以足以治愈或至少部分阻抑病症及其并发症的症状的量施用于已经患有病况(例如癌症)的受试者(例如人)。足以实现此目的的量被定义为“治疗有效量”,即足以基本上改善与疾病或医学病况相关的至少一种症状的化合物的量。例如,在癌症的治疗中,减少、预防、延迟、抑制或阻抑疾病或病况的任何症状的药剂或化合物将是治疗有效的。治疗有效量的药剂或化合物不是治愈疾病或病况所必需的,但是可以例如提供疾病或病况的治疗,从而延迟、阻碍或预防疾病或病况的发作,从而改善疾病或病况的症状,或者改变疾病或病况的期限。例如,个体的疾病或病况可能变得不太严重和/或恢复加快。在一些实施例中,向受试者施用第一剂量的化合物(例如,放射免疫缀合物)或组合物,其量对于放射治疗计划有效,然后施用第二剂量或一组剂量的化合物(例如,放射免疫缀合物)或组合物,其量为治疗有效量。

[0599] 为了治疗包含表达EGFR和cMET的细胞的癌症,本发明的方法通常包括向有需要的受试者(例如,人)施用第一剂量的有效用于放射治疗计划的量的上文提供的化合物或组合物,随后施用治疗有效量的上文提供的化合物或组合物的后续剂量。

[0600] 在一些实施例中,在第一剂量中施用的化合物或组合物与在第二剂量中施用的化合物或组合物是相同的。

[0601] 在一些实施例中,在第一剂量中施用的化合物或组合物与在第二剂量中施用的化合物或组合物是不同的。

[0602] 治疗有效量可能取决于疾病或病况的严重程度以及受试者的其他特征(例如体重)。普通技术人员可考虑个体差异(例如受试者的年龄、体重和病况的差异)来确定所披露的化合物(例如,放射免疫缀合物)和组合物对于受试者(例如哺乳动物,如人)的治疗有效量。

[0603] 在一些实施例中,所披露的化合物(例如,放射免疫缀合物)表现出增强的靶向癌

细胞的能力。在一些实施例中,所披露的化合物(例如,放射免疫缀合物)的有效量低于(例如,小于或等于约90%、75%、50%、40%、30%、20%、15%、12%、10%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、或0.1%的)未缀合的和/或非放射性标记的靶向性部分的治疗效果的等效剂量。

[0604] 可以进行包含有效量的本文所披露的药物组合物的单次或多次施用,其中剂量水平和模式由治疗医生选择。可以根据受试者的疾病或病况的严重程度来确定和调整剂量和施用时间表,并可以按照临床医生通常实施的方法或本文所述的方法在整个治疗过程中进行监测。

[0605] 以下特定的实例应解释为仅仅是说明性的,并且不以任何方式限制本披露的其余部分。

[0606] 实例

[0607] 实例1-RAA22/B09 DuetMab设计和构建

[0608] 该实例描述了能够同时结合EGFR和c-Met的双特异性抗体分子的产生。

[0609] 1.1抗cMET抗体0021U3-B09的分离和鉴定

[0610] 基本上如(Vaughan, 1996)所述,在重组哺乳动物表达的生物素化单体人cMET(梅迪缪思有限公司(MedImmune))上的一系列重复淘选选择循环中从大型天然人scFv噬菌体展示文库中分离cMET特异性scFv抗体。来自第2轮选择输出的ScFv在细菌周质中表达并筛选它们在HGF:cMET **HTRF**®(均相时间分辨荧光)配体受体抑制结合测定中抑制人cMET受体与HGF配体结合的能力。选择表现出强抑制作用的最佳命中(hit)并进行DNA测序。基本上如(Persic; 1997)所述,然后将独特的基因转化为人免疫球蛋白G2(IgG2)抗体,并在哺乳动物细胞中产生。然后基于它们在HGF:cMET **HTRF**®结合测定中的抑制作用对纯化的抗体进行排序。选择最强效的抗体0021U3-B09用于进一步表征。

[0611] 1.2抗cMET抗体0021U3-B09的优化。

[0612] 为了最小化潜在的免疫原性,特异性靶向并改变0021U3-B09的可变框架区中的非Vernier框架残基(Foote和Winter 1992)以匹配最接近的人种系序列。在VH区,七个氨基酸残基发生突变以匹配参考人种系序列IGHV1-8*01。在VL区,三个残基发生突变以匹配参考人种系序列IGKV1-5*03。VH和VL区中的所有残基均成功地改变为种系残基而不丧失活性。基本上如(Kunkel 1985)所述,使用基于杂交的诱变方法对0021U3-B09进行亲和力优化。使用标准分子生物学技术,通过VH互补决定区3(CDR3)的寡核苷酸定向诱变,创建了来源于0021U3-B09序列的大型scFv文库。对文库进行基于亲和力的溶液相选择,以选择对人和食蟹猴cMET抗原具有更高亲和力的变体。筛选来自CDR靶向选择输出的粗含scFv周质提取物以提高HGF:cMET **HTRF**®结合测定中的抑制活性。对与亲本0021U3-B09相比表现出显著改善的抑制作用的变体进行DNA测序,并将独特的基因转化为人IgG2。然后根据它们的抑制作用对纯化的抗体进行排序。选择最强效的抗体B09-57用于进一步表征。

[0613] 1.3抗EGFR抗体Tdev-0004的分离和鉴定。

[0614] 基本上如(Vaughan, 1996)所述,在重组哺乳动物表达的生物素化单体人EGFR(梅迪缪思有限公司)上的一系列重复淘选选择循环中从大型天然人scFv噬菌体展示文库中分离EGFR特异性scFv抗体。在ELISA中筛选来自第3轮选择输出的ScFv展示噬菌体与人和食蟹猴EGFR的结合。选择显示交叉反应性的最佳命中并进行DNA测序。基本上如(Persic, 1997)

所述,然后将独特的基因转化为人免疫球蛋白G1 (IgG1) 抗体,并在哺乳动物细胞中产生。然后通过流式细胞术基于纯化的抗体与表达EGFR的细胞系A431的结合对纯化的抗体进行排序。选择表现出特异性细胞结合的抗体Tdev-0004用于进一步表征。

[0615] 1.4抗EGFR抗体Tdev-0004的优化。

[0616] 通过优化抗EGFR Tdev-0004mAb得到变体RAA22和QD6。Tdev-0004的VL框架与参考人种系序列IGLV2-11*01/IGLJ2具有100%匹配(参见https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/Idlink.cgi?seqname=IGLV2-11*01&taxid=9606&dbname=IG_DB%2Fimgt.Homo_sapiens.V.f.orf.p),然而,VH框架与最接近的人种系IGHV1-69*01/JH4具有79%同源性(参见https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/Idlink.cgi?seqname=IGHV1-69*01&taxid=9606&dbname=IG_DB%2Fimgt.Homo_sapiens.V.f.orf.p)。为了最小化潜在的免疫原性,最初通过突变所有13个非种系框架残基使VH区完全种系化。在种系化后,完全种系化变体与食蟹猴EGFR的结合显著受损。为了恢复与食蟹猴EGFR的结合,选择性回复突变了四种非种系残基:K68、I73、R76和T78。氨基酸残基通过Kabat编号系统编号(Kabat和Wu 1991)。所得的部分种系变体(命名为H4)被用作亲和力和优化的模板序列。根据制造商的说明书,使用QuikChange Lightning多位点定向诱变试剂盒(安捷伦公司(Agilent)),通过对所有六个CDR的简约诱变对变体H4进行亲和力优化。单个氨基酸诱变的VH和VL文库在细菌中表达为Fab片段,并在ELISA中筛选与人和食蟹猴EGFR的改善的结合。对与亲本H4相比表现出提高的结合的变体进行DNA测序,并将独特的基因转化为人IgG1。鉴定了在CDRH3中具有单个突变的变体RAA22。为了进一步提高亲和力,将单个阳性突变组合以创建组合文库,筛选与人和食蟹猴EGFR结合增强的变体。鉴定了在CDRL2、CDRL3和CDRH3中具有四个组合突变的变体QD6。

[0617] 1.5单价双特异性抗EGFR/cMET DuetMab抗体的产生。

[0618] 抗cMET mAb B09-57和抗EGFR mAb RAA22和QD6的可变结构域用于在DuetMab平台的骨架上构建单价双特异性抗EGFR/cMET抗体(Mazor, 2015)。特别地,将抗cMET B09-57的VH基因插入到携带“杵”突变(T366W)和替代的链间半胱氨酸突变(F126C和C219V)的人 γ -1恒定重链中。将B09-57的VL基因在构架中插入到被设计成与“杵”重链配对的携带相应的替代链间半胱氨酸突变(S121C和C214V)的人 κ 恒定结构域。类似地,将抗EGFR RAA22和亲和力优化的QD6的VH基因插入到携带“臼”突变(T366S、L368A和Y407V)的人 γ -1恒定重链中,而将RAA22和B09-57的VL基因在构架中插入到被设计成与“臼”重链配对的人 λ 恒定结构域中。此外,“杵”和“臼”重链的CH3结构域中的两个残基突变为半胱氨酸(“杵”中的S354C和“臼”中的Y349C)以形成稳定化二硫桥。Fc结构域被进一步工程化以在丝氨酸239(C239i/“Maia”)后携带半胱氨酸插入,其被设计成使得能够进行携带马来酰亚胺的细胞毒性药物的位点特异性缀合(Dimasi, 2017)。氨基酸残基通过Kabat编号系统编号(Kabat和Wu 1991)。组装的单价双特异性抗EGFR/cMET DuetMab抗体被命名为RAA22/B09-57和QD6/B09-57(图1)。从哺乳动物细胞产生DuetMab抗体,如前所述(Mazor, 2017)。

[0619] 还认识到,如果Fc骨架的效应子功能降低或除去,则可能减轻免疫毒性并改善药代动力学。因此,我们还引入了L234F/L235E/P331S(EU编号)的“三重突变体(TM)”,其先前已被证明可以降低抗体分子中的Fc效应子功能(Organesyan, 2008; Hay, 2016)。将这些TM构建体工程化,使得c-MET组携带“臼”突变,且EGFR组携带“杵”突变。

[0620] 所产生的“EGFR-cMET TM”DuetMab(包含来自RAA22和B09的可变区,其中引入了TM)具有下表中所示的氨基酸序列:

[0621]		“EGFR-cMET TM”
	EGFR 重链	35
[0622]	c-Met 重链	36
	EGFR 轻链	37
	c-Met 轻链	38

[0623] 实例2-生物化学和生物物理特性

[0624] 本实例测试了RAA22、QD6和B09-57单克隆抗体和RAA22/B09-57和QD6/B09-57双特异性抗体分子的各种生物化学和生物物理特性,包括它们分别对EGFR和c-Met的结合亲和力以及它们同时结合两种抗原的能力。

[0625] 2.1DuetMab和亲本mAb对EGFR和cMET的结合亲和力。

[0626] 使用BIAcore T200仪器(宾夕法尼亚州匹兹堡的通用电气医疗集团(GE Healthcare,Pittsburgh,PA))上的抗体捕获测定,在25℃下通过SPR确定重组人、食蟹猴和鼠EGFR和cMET抗原的EGFR-cMET DuetMab的动力学速率常数(k_{on} 和 k_{off})和平衡解离常数(Kd)。将小鼠抗人IgG固定在CM4传感器芯片上,最终表面密度为约2000共振单位(RU)。还使用相同的固定化方案在该传感器芯片上制备了参照流动细胞表面。制备5-20nM的测试制品抗体和对照制品抗体在仪器缓冲液(HBS-EP缓冲液;0.01M HEPES,pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA和0.005% P-20)中的溶液,以及纯化的EGFR(0.27-200nM人,0.4-900nM食蟹猴和4-1000nM鼠)或cMET蛋白(0.27-66nM人和0.27-22nM食蟹猴)在仪器缓冲液中的3倍系列稀释液。使用序贯方法用于动力学测量。首先将抗体以10 μ L/分钟的流速注射到捕获表面上。在捕获的抗体的结合稳定后,将单一浓度的分析物以75 μ L/分钟的流速注射到捕获表面和参照表面上。得到的结合反应曲线产生缔合相数据。在注射分析物之后,然后将流切换回仪器缓冲液15分钟以允许收集解离相数据,接着是10mM甘氨酸,pH 1.5的1分钟脉冲,以在芯片上再生抗体捕获表面。从各浓度分析物的双份注射中记录针对测试制品抗体和对照制品抗体的结合反应。此外,在整个注射系列过程中,穿插若干缓冲液注射。选定缓冲液注射与参照细胞反应一起使用以校正原始数据组的注射伪影和/或非特异性结合相互作用,通常称为“双重参照”。将校正的结合数据全局拟合至1:1结合模型(Biacore T200评估软件2.0,宾夕法尼亚州匹兹堡的通用电气医疗集团)。计算的动力学参数(k_{on} 和 k_{off})和以 k_{off}/k_{on} 确定的Kd显示在表1中。

[0627] 表1DuetMab和亲本IgG对EGFR和cMET抗原的动力学

[0628]

抗体	抗原	K_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	K_d (nM)
RAA22 IgG	人 EGFR	4.41×10^4	2.06×10^{-3}	46.6
	食蟹猴 EGFR	3.54×10^4	6.01×10^{-3}	169.8
	小鼠 EGFR	4.03×10^4	1.90×10^{-2}	488.0
	人 cMET			
	食蟹猴 cMET	在 200nM 下未检测到结合		
	小鼠 cMET			
QD6 IgG	人 EGFR	1.48×10^5	2.92×10^{-4}	2.0
	食蟹猴 EGFR	1.14×10^5	2.88×10^{-4}	2.5
	小鼠 EGFR	1.67×10^5	7.35×10^{-4}	4.4
	人 cMET			
	食蟹猴 cMET	ND		
	小鼠 cMET			
B09-57 IgG	人 EGFR			
	食蟹猴 EGFR	在 200nM 下未检测到结合		
	小鼠 EGFR			
	人 cMET	5.63×10^5	8.82×10^{-4}	1.6
	食蟹猴 cMET	1.04×10^6	1.94×10^{-3}	1.9
	小鼠 cMET	在 200nM 下未检测到结合		
RAA22/B09-57 DuetMab	人 EGFR	4.47×10^4	2.01×10^{-3}	45.0
	食蟹猴 EGFR	2.78×10^4	5.48×10^{-3}	197.0
	小鼠 EGFR	3.54×10^4	2.06×10^{-2}	575.4
	人 cMET	4.43×10^5	9.86×10^{-4}	2.2
	食蟹猴 cMET	9.74×10^5	2.12×10^{-3}	2.2
	小鼠 cMET	ND		
QD6/B09-57 DuetMab	人 EGFR	6.35×10^4	3.74×10^{-4}	5.9
	食蟹猴 EGFR	2.10×10^5	5.85×10^{-4}	2.8
	小鼠 EGFR	1.26×10^5	7.80×10^{-4}	6.2
	人 cMET	4.25×10^5	6.96×10^{-4}	1.6
	食蟹猴 cMET	9.58×10^5	2.06×10^{-3}	2.2
	小鼠 cMET	ND		

[0629] ^aND: 未确定。使用BIACore仪器进行EGFR和cMET的可溶性单体形式的动力学测量。
Kd由数据的非线性拟合计算为 k_{off}/k_{on} 的比率。

[0630] 从以上数据可以看出,与QD6/B09-57相比,双特异性抗体分子QD6/B09-57以高亲和力和力(约2nM Kd)结合人cMet并且以高亲和力(约6nM Kd)结合人EGFR,而双特异性抗体分子RAA22/B09-57以类似高亲和力(约2nM Kd)结合人c-Met,但以降低的亲和力(约45nM Kd)结合人EGFR。

[0631] 2.2DuetMab与EGFR和cMET的同时结合。

[0632] 基本上如(Mazor, 2015)所述,在Octet384仪器上通过生物层干涉测量法测量对重组人EGFR和cMET蛋白的同时结合研究。简言之,最初在NI-NTA生物传感器上捕获在测定缓冲液[PBS pH 7.2, 3mg/mL牛血清白蛋白(BSA), 0.05% (v/v) Tween 20]中的5 μ g/mL的His-标记的cMET抗原。在洗涤步骤除去任何未结合的蛋白质后,分别负载的生物传感器进行连续的缔合和解离相互作用,首先与66nM的抗体相互作用,然后与500nM的EGFR抗原相互作用。使用Octet384软件v.9.0对数据进行非线性拟合,由此计算缔合和解离曲线。如图2所

示,DuetMab表现出与两种抗原同时结合,而亲本抗cMET IgG仅表现出与cMET的特异性结合,并且两种抗EGFR IgG不表现出与负载cMET的传感器的结合。

[0633] 2.3EGFR和cMet特异性

[0634] 通过ELISA确定EGFR和cMET物种旁系同源物和密切相关的家族成员的特异性。简言之,在PBS中以1 μ g/mL制备抗原溶液并将50微升包被在半面积ELISA测定板上。洗涤板,并在室温下用含有0.005% Tween-20的1% BSA的PBS (PBS-T) 阻断一小时。将孔在PBS-T中洗涤4次。如图3所示,使用一抗,其中:R374 (非结合IgG1同种型对照抗体)、B09 (抗cMET抗体)、QD6 (抗EGFR抗体)、RAA22 (抗EGFR抗体)、QD6/B09 (双特异性EGFR/c-MET DuetMab)、RAA22/B09 (双特异性EGFR/c-MET DuetMab)、PaniX (抗EGFR抗体)、MetMab (抗cMET抗体) 和Mab11311 (抗HER4抗体)。除了HER4结合mAb对照MAB1131 (该系列以1 μ g/mL开始) 之外,将孔与以1:3稀释系列 (以10 μ g/mL开始并以0.002 μ g/mL结束) 稀释于PBS-T中的50微升所示一抗一起孵育。将孔在PBS-T中洗涤4次,然后将50 μ l在PBS-T中以1:5000稀释的山羊抗人Fab HRP-标记的二抗添加到各孔中并在室温下孵育一小时。向所有孔中添加50微升TMB底物溶液并在室温下孵育5-30分钟,直到在阳性对照孔中观察到强信号。向所有孔中添加50微升TMB终止溶液,在SpectraMax M5微孔板读取器上在450nm处读取吸光度。在SoftMax Pro 5软件中分析数据并使用GraphPad Prism 7绘图软件绘图。

[0635] 为了确定物种交叉反应性,如上所述进行ELISA测定。如图3A所示,高亲和力EGFR IgG QD6以及单价双特异性EGFR/cMET DuetMab QD6/B09与人、食蟹猴和小鼠EGFR结合并在ELISA测定中给出强信号。相比之下,与QD6相比,降低亲和力的EGFR IgG RAA22与人、食蟹猴和小鼠EGFR结合较弱。与小鼠EGFR的结合较弱,但可检测。相应的单价双特异性EGFR/cMET DuetMab RAA22/B09显示出相对于二价亲本IgG RAA22与人和食蟹猴EGFR的结合仍更弱,并且显示出与小鼠EGFR的标称结合。cMET IgG B09以及所有双特异性变体显示出与人和食蟹猴cMET相当的结合。没有检测到任何抗体与小鼠cMET的结合。这些结果与在BIAcore仪器上通过表面等离子体共振测量确定的结合动力学一致 (上表1)。

[0636] 如图3B所示,亲本IgG或衍生的双特异性抗体都没有表现出与任何EGFR HER家族蛋白、HER2、HER3或HER4的可测量的结合。类似地,没有抗体显示与cMET家族成员Ron (CD136) 或Semaphorin3a的显著结合。

[0637] 这些结果证明,亲本IgG和得到的双特异性抗体与它们的同源靶标特异性结合,而与密切相关的家族物种没有可检测的结合。

[0638] 实例3-使用pH敏感性染料监测抗体内化和向酸化隔室的运输

[0639] 在正常非肿瘤组织中的靶表达可能导致毒性,这些毒性通过减少有效载荷递送至靶组织而降低抗体缀合物的治疗窗口。本披露的化合物 (例如,放射免疫缀合物) 的双特异性抗体或其抗原结合片段的设计旨在使缀合物在表现出很少或没有靶标共表达的正常组织中的影响最小化,同时使抗体分子 (即,有效载荷递送溶媒) 向共表达两种靶标的肿瘤细胞的递送最大化。为了评估使用EGFR亲和力降低的双特异性抗体RAA22/B09的双重靶向是否提供相对于单一靶标接合的选择性优势,我们使用pH敏感性染料标记的抗体进行研究以比较双特异性mAb与包含双特异性的单价亲本抗体的内化效率。

[0640] 使用pHAb pH敏感性染料 (普洛麦格公司) 标记的抗体促进抗体内化和向酸化的细胞内隔室 (诸如溶酶体和核内体) 运输的显现。该染料在pH>7时显示非常低的荧光,但在

酸性pH时变为强荧光,在约pH 5时达到最大值。简言之,根据制造商的建议,用pHAb胺反应性染料标记抗体。标记的抗体是:R347 IgG1同种型对照、单价双特异性对照抗体抗EGFR抗体RAA22/R347和抗cMET B09/R347,以及EGFR/cMET单价双特异性抗体RAA22/B09。将共表达中等水平EGFR(约33,000相对受体密度)和cMET(约50,000相对受体密度)的NCI-H1975肺癌细胞以100微升体积在补充有10%胎牛血清的RPMI生长培养基中以 2×10^5 个细胞/mL的密度铺板到透明底黑壁96孔测定板中。将板在加湿培养箱中在37℃和5% CO₂下培养过夜。然后将板在冰上冷却30分钟,然后在预冷的生长培养基中添加不同浓度的pHAb标记的双特异性和单价对照抗体。将培养物在冰上再冷却30分钟,然后使用Cy3过滤器在Operetta高含量成像系统上读取荧光,并将该初始读数指定为时间零点。将板移回37℃培养箱,并在3、6、24、30和48小时获取额外读数。

[0641] 使用1.25μg/mL的pHAb标记的mAb处理NCI H1975细胞的代表性内化实验显示在图4中。非结合IgG1同种型对照抗体R347在任何时间点均未显示可检测的荧光。EGFR/cMET双特异性抗体RAA22/B09在处理3小时后表现出细胞内荧光并且荧光强度持续增加直至48小时。单价EGFR结合对照抗体RAA22/R347从24小时开始显示非常弱的荧光,其在48小时没有显著增加。单价单特异性cMET结合对照抗体B09/R347在24小时显示中等荧光,到48小时进一步增加。然而,单特异性cMET抗体的荧光信号的强度与双特异性RAA22/B09相比是中等的,表明在本文测试的双靶标表达细胞系中,双特异性抗体比单特异性亲本抗体具有更大的内化效率。当用0.625μg/mL的pHAb标记的mAb处理细胞时,双特异性抗体与单特异性对照之间的差异甚至更显著(图5)。单特异性抗体即使在48小时也显示非常小的荧光,而双特异性RAA22/B09抗体在处理3小时后再次显示细胞内荧光并且荧光强度持续增加直至48小时。这些结果与双重靶向双特异性抗体介导高效内化到共表达EGFR和cMET的细胞中的假设一致。同时,与双特异性抗体相比,单特异性亲本抗体显示出降低的摄取和荧光强度。这些结论的逻辑延伸表明双特异性抗体在仅表达一种但不表达两种靶标的组织中可能表现得更像单特异性抗体,这通常适用于EGFR和cMET。特别值得注意的是,pHAb标记的亲合力降低的EGFR对照mAb RAA22/R347表现出可忽略的摄取和荧光。这种降低的与EGFR的结合可以使抗体缀合物在表达显著水平的EGFR但很少或没有cMET的正常组织诸如皮肤中的影响最小化。

[0642] 实例4-使用共聚焦显微术监测抗体内化

[0643] 标记的DuetMab的内化动力学:使用活细胞共聚焦荧光显微术在体外评估RAA22/B09和QD6/B09抗体。

[0644] 4.1材料和方法

[0645] H1975和HCC827细胞来自ATCC。RAA22/B09、QD6/B09和单组衍生物来自梅迪缪思有限公司。QD6/B09和来源于非特异性人IgG1NMGC的具有IgG Fab组的单组特异性对照QD6/IgG和B09/IgG来自梅迪缪思有限公司。RAA22/B09和来源于非特异性人IgG1 R347的单组特异性对照RAA22/IgG和B09/IgG来自梅迪缪思有限公司。RPMI (11875-093)、HEPES (15630106)、丙酮酸钠(11360070)、AlexaFluor®647 (A-20186) 单克隆抗体标记试剂盒、Zeba™旋转脱盐柱(87767)和CellTracker™Blue CMAC (C2110) 来自加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命科技公司(Life Technologies, Carlsbad, CA)。Accutase细胞脱离溶液(423201)来自加利福尼亚州圣迭戈的百进生化技术公司(BioLegend, San Diego, CA)。HyClone热灭活胎牛血清(SH30071.03HI)来自马萨诸塞州马尔伯勒的通用电气生命科学公司(GE Life

Sciences,Marlborough,MA)。PBS (21-040) 来自纽约州康宁的康宁公司(Corning Incorporated,Corning,NY)。FcR阻断试剂(130-059-901)来自加利福尼亚州奥本的美天旋生物技术有限公司(Miltenyi Biotec Inc.,Auburn,CA)。聚丙烯圆底管(352063)来自加利福尼亚州圣荷西的BD生物科学公司(BD Biosciences, San Jose,CA)。CellCarrier 384孔微孔板来自珀金埃尔默公司(PerkinElmer Inc.) (目录号6007550, 马萨诸塞州沃尔瑟姆(Waltham,MA))。

[0646] AlexaFluor缀合物的制备

[0647] 根据制造商说明书使用抗体标记试剂盒将单克隆抗体与AlexaFluor-647染料缀合。简言之,将50-100微克在碳酸氢钠缓冲液(pH=8.3)中的抗体与反应性染料试剂在温和搅拌下在室温下孵育1h。根据制造商的说明书,使用带40K MWCO并用1X PBS平衡的Zeba™旋转盐柱,通过尺寸排阻色谱法除去未掺入的染料。

[0648] 用于染色的细胞的培养和制备

[0649] 使用含有10%胎牛血清(FBS)的培养基RPMI-1640将贴壁H1975或HCC827细胞在CO₂培养箱中的T-75烧瓶中培养至初始接种后达到80%-90%汇合。在实验当天,使用Accutase将生长在T-75烧瓶中的贴壁单层解离成细胞悬浮液。将分离的细胞用1x PBS洗涤两次,使用300xg离心5min。然后将细胞以2×10⁶个细胞/mL的浓度重悬于无酚RPMI中并用于染色。

[0650] 用于成像的细胞染色

[0651] 将2×10⁶个细胞/mL的细胞悬浮液与在无酚RPMI中制备的1μM CellTracker™Blue CMAC在37℃下在CO₂培养箱中孵育30min。通过在4℃下以300xg离心5min用无酚RPMI洗涤两次来除去未掺入的CellTracker™Blue CMAC染料。然后将细胞在冰上冷却并用10uL FcR阻断试剂每1×10⁶个细胞阻断15分钟。将2×10⁵个细胞等分到5mL圆底管中,并与最终浓度为2.5μg/mL的荧光抗体一起孵育。在4℃下通过离心除去未结合的荧光试剂后,将细胞重悬于含有100mM HEPES、1mM丙酮酸钠和1% FBS的无酚RPMI中。将细胞以每孔5,000个细胞的密度转移到384孔成像板的多个孔中,并且在图像获取之前在4℃下以2,200rpm短暂离心2min。

[0652] 使用共聚焦荧光显微术获得细胞图像

[0653] 将成像板(384孔形式)中的染色细胞如先前所述(Vainshtein,2015)在Opera共聚焦荧光成像系统上成像或转移到具有40X/1.2NA LCIPlan Apo物镜的Zeiss Axio Observer.Z1倒置显微镜(纽约州桑伍德的蔡司显微镜公司(Carl Zeiss Microscopy, Thornwood,NY))上。对于使用蔡司显微镜的实验,使用培养箱XLmulti SDARK(德国埃尔巴赫的培康股份有限公司(PeCon GmbH,Erbach,Germany))将成像环境保持在37℃、5% CO₂和70%湿度下。用405、488、561和63nm固态激光(纽约州桑伍德的蔡司显微镜公司)照射样品。使用具有Evolve 512EMCCD(亚利桑那州图森的光度计公司(Photometrics,Tucson,AZ))的Yokogawa CSU-X1旋转盘单元(日本东京的横河电机株式会社(Yokogawa Electric Corporation,Tokyo,Japan))在指定时间获取一系列图像。在图像获取之前,使用染色细胞的等分试样确定曝光参数,诸如激光功率、曝光时间、相机增益等。使用ZEN 2.3(纽约州桑伍德的蔡司显微镜公司)处理图像并使用Columbus软件(马萨诸塞州沃尔瑟姆的珀金埃尔默公司)分析。

[0654] 图像内化分析算法

[0655] 先前描述了用于抗体内化定量的算法 (Vainsthein, 2015), 具有以下更新和修改。用于迭代图像处理的参考通道源自细胞的CellTracker™Blue CMAC (CTB) 染色。信号通道仍然来源于成像器的抗体-AlexaFluor-647通道。使用算法定义的参数通过算法处理图像, 这些参数最初被设置为默认值, 然后针对每种细胞类型和实验进行优化。图像的CTB染色用于使用阈值来识别细胞, 以检测图像上具有比其周围的排除区域更高强度的区域, 这些排除区域具有低于阈值的荧光强度信号。其余已识别的细胞对象被指定为“总细胞”。根据形态学特性面积 (在 $120-600\mu\text{m}^2$ 之间的对象) 和圆度 (>0.5) 进一步筛选细胞。然后使用算法定义的参数在对象边界周围构建所接受细胞中的“膜区域”和“细胞质区域”。每个区域的荧光强度用于监测抗体相关的AlexaFluor-647信号。每个区域的荧光强度报告为所接受细胞中所有像素总和的平均值。

[0656] 细胞质中抗体相关荧光的累积用于定量抗体内化的动力学。为了确保由于细胞染色和荧光强度的可变性导致的结果的可比性, 用每个时间点的总细胞信号将细胞质信号归一化, 并使用以下公式指定为内化分率: $\text{内化分率} = \text{强度 (细胞质)} / (\text{强度 (细胞质)} + \text{强度 (膜)})$ 。通过使用以下公式对数据进行曲线拟合, 由内化时间过程计算内化速率常数 k_{int} : $F_{\text{细胞质}}(t) = (1 - e^{-k_{\text{int}} \cdot t}) \cdot F_{\text{最大, 细胞质}}$, 其中 $F_{\text{最大, 细胞质}}$ 是每个细胞的细胞质强度与每个细胞的总强度的最大比率。使用Graphpad Prism (加利福尼亚州拉霍亚的格拉夫派得软件公司 (GraphPad Software, La Jolla, CA)) 进行数据的曲线拟合。内化半衰期 ($T_{1/2}$) 计算为 $\ln(2)$ 与 k_{int} 之比率。

[0657] 4.2RAA22/B09和QD6/B09的体外内化

[0658] AlexaFluor647 (AF647) 主要标记的DuetMab的内化动力学: 使用EGFR和c-MET表达细胞系H1975在体外评估RAA22/B09和QD6/B09抗体。将每种抗体预结合到细胞上, 然后使用活细胞共聚焦荧光显微术监测抗体从细胞表面到细胞质的易位。图6示出了两种抗体在经受内化条件之前 ($T=0$) 主要定位于细胞表面, 并且在1小时 ($T=1\text{h}$) 后易位至细胞质区域 (蓝色)。在内化的时间过程中每5分钟获取动力学图像, 并使用定量算法 (参见上文) 处理以确定内化动力学常数和半衰期。图6B示出了QD6/B09和RAA22/B09的非常可比较的内化动力学, 其中半衰期分别为 $37.5 \pm 10.6\text{min}$ 和 $43.2 \pm 15.5\text{min}$ 。

[0659] 为了评估抗体内化的模式并研究每个组对DuetMab的整体内化的贡献, 我们评估了在同时表达EGFR和c-MET的H1975细胞中针对duet QD6/B09的单组特异性对照抗体分子QD6/IgG和B09/IgG以及针对duet RAA22/B09的RAA22/IgG和B09/IgG的内化。由于只有一个组对靶受体是特异性的, 因此对照抗体只能通过一个受体内化, 从而消除了作为内化模式的双重受体靶向和交联。

[0660] QD6/B09 (图7A) 和RAA22/B09 (图7B) 的内化曲线呈现了非常相似的膜mAb-AF647信号的一致减少模式, 其中细胞质中mAb-AF647信号分别增加, 这是内化的典型特征。然而, 它们的单组构建体显示出非常不同的内化曲线。单组QD6/IgG具有与QD6/B09DuetMab几乎相同的内化时间过程 (图7A, 左侧和中间), 表明QD6/B09 duet的内化主要由分子的EGFR-组驱动, B09-组的贡献最小。实际上, B09/IgG构建体显示出非常小的内化水平 (图7B, 右侧)。膜信号的快速和广泛减少对应于细胞质信号的非常适度的增加, 可能是由于预结合的B09/IgG从细胞表面上的c-MET受体广泛解离。抗体的解离随后导致B09/IgG的适度内化。这些结

果表明,QD6/B09 duet的内化主要由分子的EGFR-组驱动,B09-组的贡献最小。

[0661] 相比之下,当与其单组对照抗体相比时,RAA22/B09 DuetMab显示出非常不同的内化曲线。如图7B所示,RAA22/B09 DuetMab的细胞质强度值分别是RAA22-IgG和B09-IgG的细胞质强度值的10.98倍和4.70倍。虽然B09/IgG的低效内化可能归因于其显著的解离(如上所述),但是RAA22/IgG确实经历了快速内化。然而,由于EGFR-组的亲和力较低,因此RAA22/IgG分子的数目(基于荧光强度)是RAA22-B09 DuetMab的10.98分之一。与单组构建体相反,进入细胞质的duet RAA22/B09 mAb的显著增加量表明,两个抗体组必须与靶受体接合以驱动内化。该发现表明,QD6/B09和RAA22/B09 DuetMab具有不同的内化机制,其中QD6/B09主要由EGFR组驱动,但RAA22/B09需要EGFR和c-MET组两者用于接合。

[0662] 4.3RAA22/B09在具有不同水平的靶受体的细胞系中的内化

[0663] 由于EGFR和c-MET组与靶受体的结合促进了RAA22/B09受体在H1975细胞中的内化,我们检测了EGFR和c-MET受体数量的增加是否会影响内化特性。在H1975细胞中通过蛋白质印迹确定的相应受体水平对于EGFR为约33,000并且对于c-MET为约50,000,并且在HCC827细胞中对于EGFR为约790,000并且对于c-MET为约523,000。RAA22/B09在H1975(培养基受体)和HCC827(高受体)细胞中的内化曲线显示HCC827细胞的内化显著增加(图8)。

[0664] 正如预期的那样,对应于EGFR和c-MET RAA22/B09的总体水平分别23.9倍和10.4倍的增加,与HCC827细胞的结合平均是H1975的8.9倍($T=0,3.1 \times 10^7$ MFI对 3.5×10^6 MFI)。在HCC827细胞中内化水平(通过峰值细胞质强度判断)高21.7倍,表明在表达高水平靶受体的细胞中,进入细胞质的抗体浓度显著较高。重要的是,除了显著不同的强度之外,HCC827与H1975细胞之间的内化曲线(随时间推移的膜和细胞质信号)也显著不同。在高表达HCC827细胞中,RAA22/B09-AF647膜信号的降低对应于RAA22-B09细胞质信号的相互增加,其中总RAA22/B09信号在时间过程中维持,表明与两种受体的强双组抗体相互作用和随后的内化。在H1975细胞中,总强度和膜强度同时降低,表明部分预结合抗体可能已从细胞表面解离并且无法在细胞内进行内化。在HCC827细胞中观察到RAA22/IgG和B09/IgG的内化指示解离的类似特征,其中单组接合不能提供有效结合并且容易解离(图9A和图9B)。该数据表明,当RAA22/B09在H1975细胞中进行内化时,存在受体相互作用的混合模式(单组和双组接合)。总之,这些数据表明靶细胞受体表达水平是RAA22/B09内化的程度和效率的重要决定因素。

[0665] 实例5.放射性药物的一般材料和方法

[0666] 镱-177可以从ITM Medical Isotopes公司获得,以0.05N盐酸溶液中的三氯化镱形式获得;铟-111可作为0.05N盐酸溶液中的三氯化铟从BWXT获得;并且铯-225可作为三硝酸铯-225从橡树岭国家实验室(Oak Ridge National Laboratories)获得,或作为三氯化铯-225从加拿大核能实验室(Canadian Nuclear Laboratories)获得。

[0667] 分析型HPLC-MS可以使用Waters Acquity HPLC-MS系统进行,该系统由Waters Acquity二元溶剂管理器、Waters Acquity样品管理器(样品冷却至10℃)、Water Acquity柱管理器(柱温30℃)、Waters Acquity光电二极管阵列检测器(在254nm和214nm处监测)、带电喷雾电离的Waters Acquity TQD和Waters Acquity BEH C18(2.1×50)(1.7μm)柱构成。制备型HPLC可以使用Waters HPLC系统进行,该系统由Waters 1525二元HPLC泵、Waters 2489UV/可见光检测器(在254nm和214nm处监测)和Waters XBridge Prep苯基或C18 19×

100mm (5 μ m) 柱构成。

[0668] HPLC洗脱法1:Waters Acquity BEH C18 2.1 $\times$ 50mm (1.7 μ m) 柱;流动相A:H₂O (0.1%v/v TFA);流动相B:乙腈 (0.1%v/v TFA);流速=0.3mL/min;初始=90% A,3-3.5min=0% A,4min=90% A,5min=90% A。

[0669] HPLC洗脱法2:Waters XBridge Prep 苯基19 $\times$ 100mm (5 μ m) 柱;流动相A:H₂O (0.1%v/v TFA);流动相B:乙腈 (0.1%v/v TFA);流速:10mL/min;初始=80% A,13min=0% A。

[0670] HPLC洗脱法3:Waters Acquity BEH C18 2.1 $\times$ 50mm (1.7 μ m) 柱;流动相A:H₂O (0.1%v/v TFA);流动相B:乙腈 (0.1%v/v TFA);流速=0.3mL/min;初始=90% A,8min=0% A,10min=0% A,11min=90% A,12min=90% A。

[0671] HPLC洗脱法4:Waters XBridge Prep C18 OBD 19 $\times$ 100mm (5 μ m) 柱;流动相A:H₂O (0.1%v/v TFA);流动相B:乙腈 (0.1%v/v TFA);流速:10mL/min;初始=80% A,3min=80% A,13min=20% A,18min=0% A。

[0672] HPLC洗脱法5:Waters XBridge Prep C18 OBD 19 $\times$ 100mm (5 μ m) 柱;流动相A:H₂O (0.1%v/v TFA);流动相B:乙腈 (0.1%v/v TFA);流速:10mL/min;初始=90% A,3min=90% A,13min=0% A,20min=0% A。

[0673] HPLC洗脱法6:Waters XBridge Prep C18 OBD 19 $\times$ 100mm (5 μ m) 柱;流动相A:H₂O (0.1%v/v TFA);流动相B:乙腈 (0.1%v/v TFA);流速:10mL/min;初始=75% A,13min=0% A,15min=0% A。

[0674] HPLC洗脱法7:Waters XBridge Prep C18 OBD 19 $\times$ 100mm (5 μ m) 柱;流动相A:H₂O (0.1%v/v TFA);流动相B:乙腈 (0.1%v/v TFA);流速:10mL/min;初始=80% A,12min=0% A,15min=0% A。

[0675] HPLC洗脱法8:Waters XBridge Prep C18 OBD 19 $\times$ 100mm (5 μ m) 柱;流动相A:H₂O (0.1%v/v TFA);流动相B:乙腈 (0.1%v/v TFA);流速:10mL/min;初始=90% A,12min=0% A,15min=0% A。

[0676] 分析型尺寸排阻色谱法 (SEC) 可使用Waters系统进行,该系统由Waters 1525二元HPLC泵、Waters 2489UV/可见光检测器 (在280nm处监测)、Bioscan Flow Count放射性检测器 (FC-3300) 和TOSOH TSKgel G3000SWxl (7.8 $\times$ 300mm) 柱构成。等度SEC方法的流速可以为例如mL/min,流动相为0.1M磷酸盐、0.6M NaCl、0.025%叠氮化钠,pH=7。

[0677] 可以使用MALDI Bruker Ultraflex extreme光谱仪进行MALDI-MS (正离子)。

[0678] 放射薄层色谱法 (radioTLC) 可用Bioscan AR-2000成像扫描仪进行,并可在iTLC-SG玻璃微纤维色谱纸 (安捷伦科技公司 (Agilent Technologies), SGI0001) 板上使用柠檬酸盐缓冲液 (0.1M, pH 5.5) 进行。

[0679] 实例6.4- {[11-氧代-11- (2,3,5,6-四氟苯氧基) 十一烷基] 氨基甲酰基} -2-[4,7,10-三 (羧基甲基) -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基] 丁酸 (化合物B) 的合成

[0680] 双功能螯合物4- {[11-氧代-11- (2,3,5,6-四氟苯氧基) 十一烷基] 氨基甲酰基} -2-[4,7,10-三 (羧基甲基) -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基] 丁酸 (化合物B) 可根据图11中提供的方案合成。向5- (叔丁氧基) -5-氧代-4- (4,7,10-三 (2- (叔丁氧基) -2-氧代乙基) -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基) 戊酸 (DOTA-GA- (tBu)₄, 50mg, 0.07mmol) 在ACN (2.0mL) 中的溶液中添加DSC (50mg, 0.21mmol), 然后添加吡啶 (0.20mL, 2.48mmol)。将反应在室温下搅拌

1小时。在室温下,向反应混合物中添加11-氨基十一酸(70mg,0.36mmol),然后添加PBS溶液(1.0mL)。将反应在室温下搅拌72小时。将反应混合物用注射器过滤器过滤,并采用方法6通过Prep-HPLC直接纯化,得到中间体2-A。

[0681] 在室温下向中间体2-A(40mg,0.03mmol)、TFP(90mg,0.54mmol)和EDC(40mg,0.27mmol)在ACN(1.0mL)中的溶液中添加吡啶(0.05mL,50mg,0.62mmol)。将溶液在室温下搅拌24小时。使用方法7将反应通过Prep-HPLC直接纯化,在使用Biotage V10快速蒸发器浓缩后得到蜡状中间体2-B。

[0682] 将中间体2-B溶解于DCM/TFA(1.0mL/2.0mL)中,并在室温下搅拌24小时。将反应通过空气流浓缩,并使用方法8通过Prep-HPLC直接纯化,浓缩后得到透明蜡状的化合物B。通过HPLC-MS洗脱法3对等分试样进行分析。

[0683] ^1H NMR(600MHz,DMSO- d_6) δ 7.99-7.88(m,1H),7.82(t,J=5.5Hz,1H),3.78(宽s,4H),3.43(宽s,12H),3.08(宽s,4H),3.00(m,3H),2.93(宽s,3H),2.77(t,J=7.2Hz,2H),2.30(宽s,2H),1.88(宽s,2H),1.66(p,J=7.3Hz,2H),1.36(m,4H),1.32-1.20(m,9H)。

[0684] 实例7.4- {[2-(2-{2-[3-氧代-3-(2,3,5,6-四氟苯氧基)丙氧基]乙氧基}乙氧基)乙基]氨基甲酰基}-2-[4,7,10-三(羧基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基]丁酸(化合物C)的合成

[0685] 双功能螯合物4- {[2-(2-{2-[3-氧代-3-(2,3,5,6-四氟苯氧基)丙氧基]乙氧基}乙氧基)乙基]氨基甲酰基}-2-[4,7,10-三(羧基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基]丁酸(化合物C)根据图12中提供的方案合成。

[0686] 向5-(叔丁氧基)-5-氧代-4-(4,7,10-三(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)戊酸(DOTA-GA(tBu)₄,100mg,0.143mmol)在ACN(8.0mL)中的溶液中添加DSC(73mg,0.285mmol)和吡啶(0.80mL,9.89mmol)。将反应混合物在环境温度下搅拌90min。将该溶液添加到100mL圆底烧瓶中的氨基-PEG3-酸(63mg,0.285mmol,在1.2mL DMF中)的半溶液中。在环境温度下4小时后,通过在空气流下浓缩至干燥来处理反应。通过HPLC洗脱法2纯化粗物质(将粗物质溶解于6mL 20% ACN/H₂O中)。汇集含有产物的级分,真空浓缩,然后与ACN(3x 2mL)共蒸发。

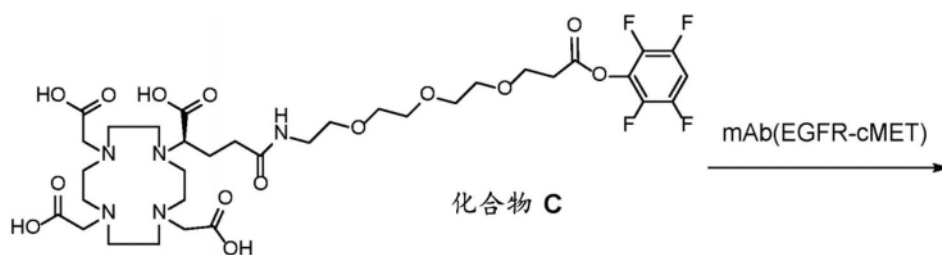
[0687] 向含有中间体1-A(82mg,60 μ mol)的小瓶中添加ACN(2mL)、NEt₃(50 μ L,360 μ mol,6当量)、HBTU(23mg,60 μ mol,1当量)和TFP溶液(50mg,300 μ mol,5当量,溶解于250 μ L ACN中)。将所得澄清溶液在环境温度下搅拌3小时。通过在空气流下将溶液浓缩至干燥来处理反应,然后用ACN/H₂O(1:1,共3mL)稀释,并使用洗脱法4在制备型HPLC上进行纯化。汇集含有产物的级分,真空浓缩,然后与ACN(3x 2mL)共蒸发。获得呈澄清残留物的中间体1-B。

[0688] 向含有中间体1-B(67mg,64 μ mol)的小瓶中添加DCM(2mL)和TFA(2mL)。将所得溶液在环境温度下搅拌16小时。另外添加TFA(2mL),并且在环境温度下将反应搅拌6小时。将反应在空气流下浓缩至干燥,粗产物最终溶解于ACN/H₂O(1mL的10% ACN/H₂O)。然后使用洗脱法5通过制备型HPLC纯化粗反应溶液。将含有产物的级分汇集、冷冻并冻干。获得呈白色固体的化合物C。通过HPLC-MS洗脱法3对等分试样进行分析。

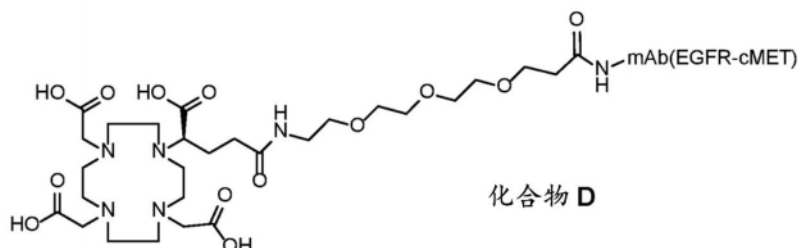
[0689] ^1H NMR(DMSO- d_6 ,600MHz) δ 7.97-7.91(m,2H),3.77(t,2H,J=6.0Hz),3.58-3.55(m,2H),3.53-3.48(m,8H),3.44-3.38(m,10H),3.23-3.08(m,11H),3.02(t,2H,J=6.0Hz),2.93(宽s,4H),2.30(宽s,2H),1.87(宽s,2H)。

[0690] 实例8.用于合成包含EGFR-cMET抗体的放射免疫缀合物的缀合和放射性标记

[0691] 8.1.免疫缀合物化合物D的合成

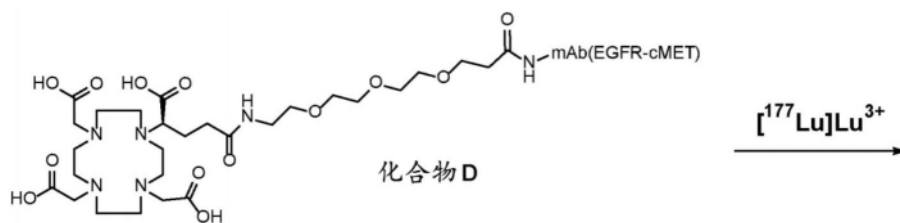


[0692]

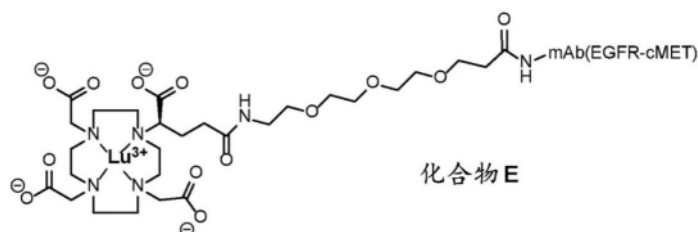


[0693] 向133mL无菌溶液容器中装入EGFR-cMET单克隆双特异性抗体RAA22/B09 DuetMab的PBS (磷酸盐缓冲盐水) 溶液 (58.8mL; 5.1mg/mL; 300mg), 随后装入5.88mL碳酸盐缓冲液 (1.0M, pH9.5) 和2.83mL的化合物C的0.001M HCl溶液 (7.7当量; 17.3mg在3.00mL中; 该溶液在使用之前立即制备)。通过pH条测定所得混合物的pH为约9.5-10。使反应在室温下反应两小时。将乙酸铵 (28.1g) 添加到反应混合物中, 然后将所得溶液加载到5mL Cytiva HiTrap Butyl HP (HIC) 柱上 (首先将HIC柱用含tween的乙酸钠缓冲盐水 (SABST; 50mL) 进行预处理, 随后用乙酸铵溶液 (50mL; 0.42g/mL) 处理)。将HIC柱用乙酸铵溶液 (10mL) 洗涤, 然后将产物用SABST (约10mL) 洗脱。将产物溶液用SABST稀释至大约15mL, 并加载到用SABST (250mL) 预处理的Cytiva 15mL HiPrep 26/10脱盐柱上。将产物级分用SABST (大约16mL) 洗脱以提供澄清无色液体, 其中使用尺寸排阻色谱法-高效液相色谱法 (SEC-HPLC) 的分析指示形成化合物D (15.9mL, 14.8mg/mL, 234.9mg, 78%)。使用基质辅助激光解吸电离飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱法确定5.3的螯合物与抗体比率 (CAR), 并且由EGFR-cMET抗体与免疫缀合物化合物D之间的质荷比的差异来计算。

[0694] 8.2放射免疫缀合物化合物E的放射合成



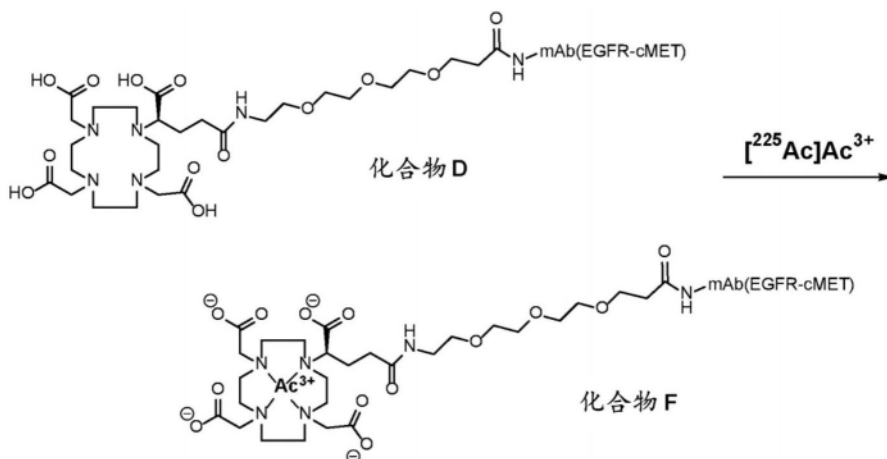
[0695]



[0696] 向1.5mL Eppendorf管中装入化合物D的SABST溶液 (0.100mL; 2.00mg/mL;

0.200mg), 然后装入0.04M的 $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ 的HCl溶液(2.2mCi)。在室温下20min后, 反应混合物的iTLC分析(硅胶(SG)板, 0.02M柠檬酸盐缓冲液(5% MeOH)作为流动相)显示放射化学转化率(RCC)为>97%。使用1mL装有Sephadex G50树脂(用SABST水合)的柱进行纯化。使用SABST洗脱产物级分并合并。添加L-抗坏血酸钠和二亚乙基三胺五乙酸钙三钠盐合物(DTPA)的SABST溶液, 在合成结束(EOS)时通过iTLC和SEC-HPLC对所得配制品(约10mM L-抗坏血酸钠, 1mM DTPA)的分析指示形成化合物E(364 μL , 0.431mg/mL, 10.1mCi/mg比活性, >95%放射化学纯度, 和>99%化学纯度)。

[0697] 8.3放射免疫缀合物化合物F的放射合成



[0698]

[0699] 向1.5mL Eppendorf管中装入化合物D的SABST溶液(0.193mL; 2.07mg/mL; 0.400mg), 然后装入0.001M的 $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ 的HCl溶液(24 μCi)。在35 $^{\circ}\text{C}$ 下120min后, 将反应通过添加DTPA(2 μL 的0.1M SABST溶液)淬灭。反应混合物的iTLC分析(SG板, 0.02M柠檬酸盐缓冲液(5% MeOH)作为流动相)显示RCC为99%。使用1mL装有G50树脂(用SABST水合)的柱进行纯化。使用SABST洗脱产物级分并合并。添加L-抗坏血酸钠和DTPA的SABST溶液, 在EOS时通过iTLC和SEC-HPLC对所得配制品(约10mM L-抗坏血酸钠, 1mM DTPA)的分析指示形成化合物F(448 μL , 0.680mg/mL, 0.053mCi/mg比活性, >99%放射化学纯度, 和>99%化学纯度)。

[0700] 实例9. $[^{177}\text{Lu}]$ -化合物C-抗EGFR-cMET缀合物的体外结合

[0701] 进行研究以评估 $[^{177}\text{Lu}]$ -化合物C-抗EGFR-cMET缀合物(即化合物E)与四种不同细胞系:HCC827细胞、HT29细胞、H441细胞和H1975细胞的受体结合亲和力。本研究遵循下述程序。

[0702] 该测定的目的是确保放射免疫缀合物在表达EGFR和/或cMET的细胞系(包括HT29、H441、HT29、HCC827和H1975)中维持天然抗体的结合特征。实验前一天, 将细胞($1.5-2 \times 10^5$)接种于48孔微孔板的500 μL 补充培养基中。在测定开始时, 将细胞用PBS洗涤一次, 然后在不存在和存在4 μM 冷抗体的情况下用递增浓度的化合物E(0.05nM至100nM)处理[分别是总结合(TB)和非特异性结合(NSB)]。将板在4 $^{\circ}\text{C}$ 下轻轻摇动孵育约3小时。孵育后, 用PBS洗涤细胞两次, 然后用1% Triton-X-100裂解。将裂解物转移到 γ 计数管中, 并在Wizard 1470 γ 计数器上与化合物E标准品一起运行, 以确定每种裂解物的放射性量(以每分钟计数(CPM)为单位)。使用标准蛋白质定量测定法, 对每个孔中剩余的裂解物(25 μL)进行蛋白质含量分析。

[0703] 总结合值、特异性结合值和非特异性结合值 (fmol/mg) 与缀合物浓度的关系如图 14A-图14B所示。Kd和Bmax是通过将特异性结合数据与单点双曲线模型进行曲线拟合 (Graph Pad Prism软件, 版本9) 而得出的。结合数据揭示了Kd的理想值。在HCC827 (2861 ± 207) 和HT29 (2351 ± 237) 中观察到最高的Bmax (fmol/mg), 随后是H441 (1195 ± 153) 和H1975 (498 ± 42)。

[0704] 观察到EGFR-cMET缀合物 (即化合物E) 表现出与HCC827细胞约9.9nM、与HT29细胞约5.7nM、与H441细胞约15.5nM、以及与H1975细胞约6.0nM的高结合亲和力。

[0705] 实例10. [¹⁷⁷Lu]-化合物C-抗EGFR-cMET缀合物的内化评估

[0706] 该内化测定旨在确定放射性标记的接头抗体衍生物的细胞保留程度。该测定依赖于EGFR-cMET受体与抗体结合时内化的固有能力和追踪放射性标记化合物的能力。在这里, 将恒定量的放射免疫缀合物与四种不同的细胞系一起孵育固定的时间, 并通过计算内化的放射性占总细胞相关活性的百分比量来确定残留。

[0707] 按照下述方案, 进行研究以评估 [¹⁷⁷Lu]-化合物C-抗EGFR-cMET缀合物 (即化合物E) 与HCC827细胞、HT29细胞、H441细胞和H1975细胞的四种不同细胞系的内化。

[0708] 该测定旨在确定放射免疫缀合物化合物E的细胞保留程度。简言之, 将上述细胞系以 3×10^5 个细胞/孔的浓度接种于三个24孔板中的完全培养基中 (孵育时间0h、2h和24h)。第二天, 倒出培养基, 将细胞用无菌PBS洗涤一次, 然后用化合物E (10nM) 在37℃下处理2-3小时。孵育后, 立即将所有板放在冰上, 并将培养基弃入预先标记的 (非结合) γ 计数管中。将细胞用无菌PBS洗涤一次, 轻轻摇动, 并倒入 (未结合标记的) γ 管中。在0小时时间点添加强酸洗涤缓冲液 (pH 2.5, 500 μ L), 在4℃下, 5分钟, 然后将缓冲液收集到预先标记的 (膜结合) γ 计数管中。然后用300 μ L 1% Triton X-100在室温下轻轻摇动裂解细胞30分钟。将250 μ L细胞裂解物转移到 γ 计数管中并计数10分钟。将弱酸洗涤缓冲液 (pH 4.6, 500 μ L) 添加到2小时和24小时的板中, 在4℃下15min。然后将缓冲液收集到预先标记的 (膜结合) γ 计数管中。将1mL温热的培养基添加到板中, 在37℃下分别进一步孵育2小时和24小时。按照规定的孵育时间, 将板放在冰上并按以下方式处理——将培养基倒出并收集到预先标记的 (流出) γ 管中。然后用1mL冷PBS洗涤板一次, 并将其添加到流出管中。将强酸洗涤缓冲液添加到所有孔中, 并将板在冰上孵育5分钟。然后将酸洗涤部分收集到预先标记的 (回收的) γ 管中。室温下用300 μ L 1% Triton X-100裂解细胞30分钟。将250 μ L细胞裂解物转移到预先标记的 (保留) γ 计数管中并计数10分钟。将25 μ L细胞裂解物级分转移至96孔板进行蛋白质定量 (Pierce BCA蛋白质测定)。

[0709] 内化研究的结果显示在图15中。残留百分比确定为CPM (裂解物) 或CPM (流出+回收+裂解物)。孵育后24小时在HCC827中观察到最低的流出%, 随后是在HT29、H441和H1975中 (分别为约25%、30%、35%和45%)。在这种情况下, EGFR+cMET受体的表达水平与细胞保留之间似乎存在相关性。

[0710] 实例11. 各种动物模型中 [¹⁷⁷Lu]-化合物C-抗EGFR-cMET缀合物的体内生物分布

[0711] 按照以下方案, 使用五种不同的细胞系异种移植小鼠模型来评估 [¹⁷⁷Lu]-DOTA-抗EGFR-cMET缀合物 (即, 化合物E) 的体内生物分布。

[0712] 肿瘤接种: 将细胞用PBS洗涤并用0.25%胰蛋白酶EDTA分离。将收获的细胞以如下浓度重悬于PBS和Matrigel (BD公司, 奥克维尔, 安大略省) 的1:1混合物中:

[0713] HCC827:50x 10⁶个细胞/mL

[0714] HT29:20x 10⁶个细胞/mL

[0715] H1975:50x 10⁶个细胞/mL

[0716] H292:30x 10⁶个细胞/mL

[0717] H441:50x 10⁶个细胞/mL

[0718] 将100μL混合物皮下注射到5至7周龄的雌性Balb/c NCI无胸腺NCr-nu/nu小鼠(查尔斯河实验室(Charles River Laboratories))的右肋腹。在接种后约7-10天当肿瘤体积达到150-200mm³时开始放射性注射,除了在接种后3周达到相同大小的HCC827异种移植物以外。

[0719] 生物分布研究:通过侧尾静脉给五组的3只皮下肿瘤小鼠(如上所述)静脉内注射200μL含有大约0.74MBq ¹⁷⁷Lu的化合物E(约2μg抗体)。在注射后的特定时间点(4h、24h、48h、96h和168h),每个时间点一组用异氟醚麻醉,通过心脏穿刺放血,然后安乐死以通过解剖收集血液和不同器官。用任何残留血液的PBS冲洗肿瘤和器官,吸干并收集到预先称重的γ计数管中。使用γ计数器测量组织样品每分钟所含的放射计数,然后使用校准标准将其转换为衰变校正的活性μCi。使用活性测量和样品重量来计算每克组织重量的注射剂量百分比(ID/g%)。

[0720] 结果以每克组织注射剂量百分比(ID/g%)表示,并描绘于图16A-图16E。化合物E的生物分布研究显示出IgG的典型生物分布特征,在正常器官中的摄取水平可接受。在H292>H441>HT29和H1975异种移植物中观察到最高的肿瘤摄取(ID/g%)[分别为约75%(96h, 168h),约35%(48h,96h),约29%(48h,96h)和约20%(48h,96h)]。在HCC827异种移植物模型中,肿瘤摄取(ID/g%)在48h达到峰值,其中化合物E为约25%,并且在注射后96h和168h下降至约17%。由于缓慢的肿瘤生长速率,HCC827异种移植物模型未用于疗法研究。

[0721] 实例12. 各种动物模型中 [²²⁵Ac]-化合物C-抗EGFR-cMET缀合物的体内功效

[0722] 研究旨在评估不同剂量的镅-225标记的放射免疫缀合物(化合物F)与冷抗体克隆和/或溶媒对照相比的功效。

[0723] 用四个递增剂量的化合物F(²²⁵Ac放射性标记的EGFR-cMET抗体)进行功效研究,并与冷抗体和/或溶媒对照进行比较。使用H441、HT29和H1975肿瘤异种移植物进行治疗功效研究。对于每项研究,通过侧尾静脉向6-7组荷瘤动物(n=5)静脉内注射200μL化合物。化合物F的活性剂量为50-400纳居里(nCi),配制在20mM柠檬酸钠(pH 5.5)、0.82%NaCl和0.01%Tween-80缓冲液中。作为对照,施用非放射性标记的非缀合抗体,其蛋白质质量当量对应于研究中测试的化合物F的最高放射性剂量。每周使用游标卡尺对肿瘤进行两个尺寸的测量2-3次,持续至少60天。肿瘤长度定义为最长尺寸,宽度垂直于肿瘤长度测量。同时对动物进行称重。每天评估整体身体状况和一般行为。肿瘤体积(mm)通过卡尺测量结果以椭圆形形式计算:肿瘤生长表示为相对肿瘤体积(RTV),即第X天测量的肿瘤体积除以给药当天测量的肿瘤体积。在所有模型中,200nCi和400nCi在所有小鼠中实现长期肿瘤消退(图17A-图17C)。在H441模型中观察到使用50nCi和100nCi剂量均达到最佳反应,在几只小鼠中显示出肿瘤抑制和消退。在H1975模型中,50nCi显著延迟了所有小鼠中的肿瘤生长,并且100nCi治疗组显示出混合反应,包括肿瘤生长延迟、肿瘤抑制和消退。在HT29模型中,用50nCi或100nCi剂量未观察到功效,除了用100nCi显示肿瘤抑制的一只小鼠。

[0724] 参考文献

[0725] 上文引用了许多出版物以便更全面地描述和披露本披露以及本披露所属领域的技术水平。下面提供了这些参考文献的完整引用。这些参考文献中的每一篇整体并入本文。

[0726]

Ariyawutya korn, 2016	Ariyawutyakorn, W., S. Saichaemchan, and M. Varella-Garcia, <i>Understanding and Targeting MET Signaling in Solid Tumors - Are We There Yet?</i> Journal of Cancer, 2016. 7 (6): p. 633-649.
Arteaga, 2014	Arteaga, C.L. and J.A. Engelman, <i>ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics</i> . Cancer Cell, 2014. 25 (3): p. 282-303.
Bachleitner- Hofmann, 2008	Bachleitner-Hofmann, T., et al., <i>HER kinase activation confers resistance to MET tyrosine kinase inhibition in MET oncogene-addicted gastric cancer cells</i> . Mol Cancer Ther, 2008. 7 : p. 3499-3508.
Bardelli, 2013	Bardelli, A., et al., <i>Amplification of the MET Receptor Drives Resistance to Anti-EGFR Therapies in Colorectal Cancer</i> . Cancer Discovery, 2013. 3 (6): p. 658-673.
Bean, 2007	Bean, J., et al., <i>MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib</i> . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. 104 (52): p. 20932-20937.
Belalcazar, 2010	Belalcazar, A., et al., <i>Targeting the Met pathway in lung cancer</i> . Expert review of anticancer therapy, 2012. 12 (4): p. 519-528.
Benedettini, 2010	Benedettini, E., et al., <i>Met activation in non-small cell lung cancer is associated with de novo resistance to EGFR inhibitors and the development of brain metastasis</i> . The American journal of pathology, 2010. 177 (1): p. 415-423.
Bertotti, 2015	Bertotti, A. and F. Sassi, <i>Molecular Pathways: Sensitivity and Resistance to Anti-EGFR Antibodies</i> . Clinical Cancer Research, 2015.
Birchmeier, 2003	Birchmeier, C., et al., <i>Met, metastasis, motility and more</i> . Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4 : p. 915-925.
Boccaccio, 2014	Boccaccio, C., P. Luraghi, and P.M. Comoglio, <i>MET-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors: An Old Liaison Rooted in Colorectal Cancer Stem Cells</i> . 2014. p. 3647-3651.
Bouattour, 2018	Bouattour, M., et al., <i>Recent developments of c-Met as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma</i> . Hepatology (Baltimore, Md.), 2018. 67 (3): p. 1132-1149.
Cappuzzo, 2009	Cappuzzo, F., et al., <i>Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients</i> . J Clin Oncol, 2009. 27 (10): p. 1667-74.
Chan, 2017	Chan, D.L.H., et al., <i>Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors for</i>

[0727]

	<i>metastatic colorectal cancer</i> . Cochrane Database Syst Rev, 2017. 6 : p. CD007047.
Chong, 2013	Chong, C.R. and P.A. Janne, <i>The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer</i> . Nature medicine, 2013. 19 (11): p. 1389-1400.
Chothia, 1987	Chothia, C. and Lesk, A.M., <i>Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins</i> . J. Mol. Biol. 1987, 196:901-917
Choueiri, 2017	Choueiri, T.K., et al., <i>Biomarker-Based Phase II Trial of Savolitinib in Patients With Advanced Papillary Renal Cell Cancer</i> . J Clin Oncol, 2017. 35 (26): p. 2993-3001.
Corso, 2010	Corso, S., et al., <i>Activation of HER family members in gastric carcinoma cells mediates resistance to MET inhibition</i> . Molecular Cancer, 2010. 9 (1): p. 121.
Cunningham, 2004	Cunningham, D., et al., <i>Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer</i> . N Engl J Med, 2004. 351 (4): p. 337-45.
De Bacco, 2012	De Bacco, F., et al., <i>The MET Oncogene Is a Functional Marker of a Glioblastoma Stem Cell Subtype</i> . Cancer research, 2012. 72 (17): p. 4537-4550.
Dimasi, 2017	Dimasi et al. <i>Efficient Preparation of Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Cysteine Insertion</i> . Mol Pharmaceuticals, 2017, 14(5) 1501-1516
Dokala, 2005	Dokala, A. and S.S. Thakur, <i>Extracellular region of epidermal growth factor receptor: a potential target for anti-EGFR drug discovery</i> . Oncogene, 2016. 36 : p. 2337.
Engelman, 2007	Engelman, J.A., et al., <i>MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling</i> . Science, 2007. 316 : p. 1039-1043.
Garber, 2014	Garber, K., <i>MET inhibitors start on road to recovery</i> . Nature reviews. Drug discovery, 2014. 13 (8): p. 563-565.
Gherardi, 2013	Gherardi et al., <i>Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor</i> . Proc Natl Acad Sci U.S.A., 2003, 100(21): 12039-12044
Giordano, 1989	Giordano, S., et al., <i>Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein</i> . Nature, 1989. 339 : p. 155-156.
Gisterek, 2011	Gisterek, I., et al., <i>Prognostic role of c-met expression in breast cancer patients</i> . Rep Pract Oncol Radiother, 2011. 16 (5): p. 173-7.
Gou, 2016	Gou, L.Y., et al., <i>The coexistence of MET over-expression and an EGFR T790M mutation is related to acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer</i> . Oncotarget, 2016.
Guo, 2008	Guo, A., et al., <i>Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met</i> . Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105 (2): p. 692-697.
Guo, 2014	Guo, B., et al., <i>Prognostic value of MET gene copy number and protein expression in patients with surgically resected non-small cell lung cancer: a meta-analysis of published literatures</i> . PLoS One, 2014. 9 (6): p. e99399.
Haura, 2013	Haura, E.B. and M.A. and Smith, <i>Signaling Control by Epidermal Growth Factor Receptor and MET: Rationale for Cotargeting Strategies in Lung Cancer</i> .

[0728]

	Journal of Clinical Oncology, 2013. 31 (32): p. 4148.
Hay, 2016	Hay et al., <i>Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447</i> . Oncoimmunology, 2016 5 (8):e1208875.
Huang, 2014	Huang, L., et al., <i>MET expression plays differing roles in non-small-cell lung cancer patients with or without EGFR mutation</i> . Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 2014. 9 (5): p. 725-728.
Jimeno, 2009	Jimeno, A., et al., <i>KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection</i> . J Clin Oncol, 2009. 27 (7): p. 1130-6.
Jun, 2013	Jun, H.J., R.T. Bronson, and A. Charest, <i>Inhibition of EGFR induces a c-MET driven stem cell population in Glioblastoma</i> . Stem cells (Dayton, Ohio), 2013.
Kabat, 1991	Kabat, E.A. et al. <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991
Karamouzis, 2009	Karamouzis, M.V., P.A. Konstantinopoulos, and A.G. Papavassiliou, <i>Targeting MET as a strategy to overcome crosstalk-related resistance to EGFR inhibitors</i> . The Lancet Oncology, 2009. 10 (7): p. 709-717.
Kim, 2017a	Kim, J.H., B.J. Kim, and H.S. Kim, <i>Clinicopathological impacts of high c-Met expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. 8 (68): p. 113120-113128.
Kim, 2017b	Kim, J.H., B.J. Kim, and H.S. Kim, <i>Clinicopathological impacts of high c-Met expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. 8 (43): p. 75478-75487.
Kim, 2017c	Kim, J.H., et al., <i>Prognostic value of c-Met overexpression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis and review</i> . Oncotarget, 2017. 8 (52): p. 90351-90357.
Klein, 2012	Klein et al. <i>Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies</i> . MAbs, 2012, 4 :653-63
Knickelbein, 2015	Knickelbein, K. and L. Zhang, <i>Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer</i> . Genes Dis, 2015. 2 (1): p. 4-12.
Kondo, 2013	Kondo, S., et al., <i>Clinical impact of c-Met expression and its gene amplification in hepatocellular carcinoma</i> . International journal of clinical oncology, 2013. 18 (2): p. 207-213.
Lacouture, 2006	Lacouture, M.E., <i>Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors</i> . Nature reviews.Cancer, 2006. 6 (10): p. 803-812.
LeFranc, 2015	LeFranc, M.P. et al., <i>IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on.</i> , Nucleic Acids Res. 2015, 43 (Database issue):D413-22.
Li, 2011	Li, C., et al., <i>c-Met Is a Marker of Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Target</i> . Gastroenterology, 2011. 141 (6): p. 2218-2227.e5.
Liska, 2011	Liska, D., et al., <i>HGF Rescues Colorectal Cancer Cells from EGFR Inhibition via MET Activation</i> . Clinical Cancer Research, 2011. 17 (3): p. 472-482.
Liu, 2015	Liu, Y., et al., <i>Prognostic value of c-Met in colorectal cancer: a meta-analysis</i> .

[0729]

	World J Gastroenterol, 2015. 21 (12): p. 3706-10.
Luraghi, 2014	Luraghi, P., et al., <i>MET Signaling in Colon Cancer Stem-like Cells Blunts the Therapeutic Response to EGFR Inhibitors</i> . Cancer research, 2014. 74 (6): p. 1857-1869.
Madoz-Gúrpide, 2016	Madoz-Gúrpide, J., et al., <i>Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer</i> . 2016. p. 1-13.
Marano, 2015	Marano, L., et al., <i>c-Met targeting in advanced gastric cancer: An open challenge</i> . Cancer letters, 2015. 365 (1): p. 30-36.
Mazor, 2017	Mazor, Y., et al., <i>Enhanced tumor-targeting selectivity by modulating bispecific antibody binding affinity and format valence</i> . Sci Rep, 2017. 7 : p. 40098.
Mazor, 2015	Mazor, Y., et al., <i>Insights into the molecular basis of a bispecific antibody's target selectivity</i> . MAbs, 2015. 7 (3): p. 461-9.
McDermott, 2010	McDermott, U., et al., <i>Acquired Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer Cells to MET Kinase Inhibition Is Mediated by a Switch to Epidermal Growth Factor Receptor Dependency</i> . Cancer research, 2010. 70 (4): p. 1625-1634.
Miyamoto, 2011	Miyamoto, M., et al., <i>Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma</i> . British journal of cancer, 2011. 105 (1): p. 131-138.
Mo, 2017	Mo, H.N. and P. Liu, <i>Targeting MET in cancer therapy</i> . Chronic Dis Transl Med, 2017. 3 (3): p. 148-153.
Moore, 2016	Moore, S.L., et al., <i>A Novel Bispecific Antibody Targeting EGFR and cMet that is Effective Against EGFR Inhibitor- Resistant Lung Tumors</i> . Cancer research, 2016.
Neuberger, 1988	Neuberger et al., 1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799
Nicholson, 2001	Nicholson, R.I., J.M. Gee, and M.E. Harper, <i>EGFR and cancer prognosis</i> . Eur J Cancer, 2001. 37 : p. 9-15.
Organ, 2011	Organ, S.L. and M.S. Tsao, <i>An overview of the c-MET signaling pathway</i> . Therapeutic advances in medical oncology, 2011. 3 (1 Suppl): p. S7-S19.
Organesyan, 2008	Organesyan et al. <i>Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions</i> . Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008 ;64(Pt 6):700-4.
Ou, 2016	Ou, S.-H.I., N. Agarwal, and S.M. Ali, <i>High MET amplification level as a resistance mechanism to osimertinib (AZD9291) in a patient that symptomatically responded to crizotinib treatment post-osimertinib progression</i> . Lung Cancer, 2016. 98 (Supplement C): p. 59-61.
Persic, 1997	Persic et al. <i>An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries</i> . Gene, 1997, 187: 9-18.
Peters, 2012	Peters, S. and A.A. Adjei, <i>MET: a promising anticancer therapeutic target</i> . Nature reviews.Clinical oncology, 2012. 9 (6): p. 314-326.

[0730]

Prat, 1991	Prat, M., et al., <i>The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors</i> . International journal of cancer. Journal international du cancer, 1991. 49 (3): p. 323-328.
Puri, 2008	Puri, N. and R. Salgia, <i>Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer</i> . J Carcinog, 2008. 7 : p. 9.
Remon, 2018	Remon, J., et al., <i>Osimertinib and other third-generation EGFR TKI in EGFR-mutant NSCLC patients</i> . Ann Oncol, 2018. 29 (suppl_1): p. i20-i27.
Retter, 2005	Retter, I., et al., <i>"VBASE2, an integrative V gene database"</i> . Nucl. Acids Res. 2005, 33 (suppl 1): D671-D674
Rho, 2009	Rho, J.K., et al., <i>The role of MET activation in determining the sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors</i> . Molecular cancer research : MCR, 2009. 7 (10): p. 1736-1743.
Rocha-Lima, 2007	Rocha-Lima, C.M., et al., <i>EGFR targeting of solid tumors</i> . Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center, 2007. 14 (3): p. 295-304.
Sacco, 2015	Sacco, J.J. and M.J. Clague, <i>Dysregulation of the Met pathway in non-small cell lung cancer: implications for drug targeting and resistance</i> . Transl Lung Cancer Res, 2015. 4 (3): p. 242-52.
Saltz, 2004	Saltz, L.B., et al., <i>Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor</i> . J Clin Oncol, 2004. 22 (7): p. 1201-8.
Seshacharyulu, 2012	Seshacharyulu, P., et al., <i>Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy</i> . Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2012. 16 (1): p. 15-31.
Sierra, 2011	Sierra, J.R. and M.-S. Tsao, <i>c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer</i> . Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2011. 3 (1 suppl): p. S21-S35.
Sohn, 2014	Sohn, J., et al., <i>cMET Activation and EGFR-Directed Therapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer</i> . Journal of Cancer, 2014. 5 (9): p. 745-753.
Suda, 2010	Suda, K., et al., <i>Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer</i> . Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2010. 16 (22): p. 5489-5498.
Troiani, 2016	Troiani, T., et al., <i>Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence</i> . ESMO open, 2016. 1 (5): p. e000088.
Trusolino, 2010	Trusolino, L., A. Bertotti, and P. Comoglio, <i>MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer</i> . Nature reviews. Molecular cell biology, 2010. 11 (12): p. 834.
Vainshtein, 2015	Vainshtein et al., <i>Quantitative measurement of the target-mediated internalization kinetics of biopharmaceuticals</i> , Pharm Res., 2015. 32 : 286-299.
Vaughan, 1996	Vaughan, et al., <i>Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library</i> , Nat Biotechnol., 1996. 14 : p. 309
Vecchione, 2011	Vecchione, L., et al., <i>EGFR-targeted therapy</i> . Special Issue - Gastroenterology, 2011. 317 (19): p. 2765-2771.

[0731]

Vsiansky, 2018	Vsiansky, V., et al., <i>Prognostic role of c-Met in head and neck squamous cell cancer tissues: a meta-analysis</i> . Scientific Reports, 2018. 8 (1): p. 10370.
Wang, 2018	Wang, X. et al., <i>IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions</i> Protein Cell . 2018;9(1):63-73
Wu, 2017	Wu, Y.-L., et al., <i>Does c-Met remain a rational target for therapy in patients with EGFR TKI-resistant non-small cell lung cancer?</i> Cancer Treatment Reviews, 2017. 61 : p. 70-81.
Xu, 2016	Xu, Y.P., et al., <i>C-Met as a Molecular Marker for Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Its Association with Clinical Outcome</i> . Journal of Cancer, 2016. 7 (5): p. 587-594.
Yan, 2015	Yan, S., et al., <i>Prognostic significance of c-Met in breast cancer: a meta-analysis of 6010 cases</i> . Diagn Pathol, 2015. 10 : p. 62.
Zhang, 2016	Zhang, Y., Z. Du, and M. Zhang, <i>Biomarker development in MET-targeted therapy</i> . Oncotarget, 2016. 7 (24): p. 37370-37389.
Zhang, 2015	Zhang, Y.W., <i>Promise and challenges on the horizon of MET-targeted cancer therapeutics</i> . World J Biol Chem, 2015. 6 (2): p. 16-27.
Zucali, 2008	Zucali, P.A., et al., <i>Role of cMET expression in non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitors</i> . Annals of Oncology, 2008. 19 (9): p. 1605-1612.

[0732] 对于标准分子生物学技术,参见Sambrook,J.,Russel,D.W.Molecular Cloning,A Laboratory Manual.[分子克隆:实验室手册]第3版2001,Cold Spring Harbor,New York [纽约冷泉港]:Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社]。

[0733] 其他实施例

[0734] 尽管已经联系其特定实施例描述了本发明,但是将理解,它能够进一步修改,并且本申请旨在覆盖按照本发明的一般原理,本发明的任何变化、用途、或改编,并且包括本披露的此类偏离,只要其落入本发明从属领域内的已知的或常规的实践内,并且可以适用于前文列出的基本特征。

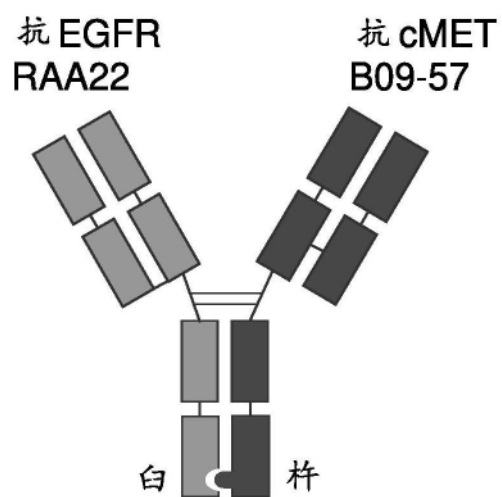


图1A

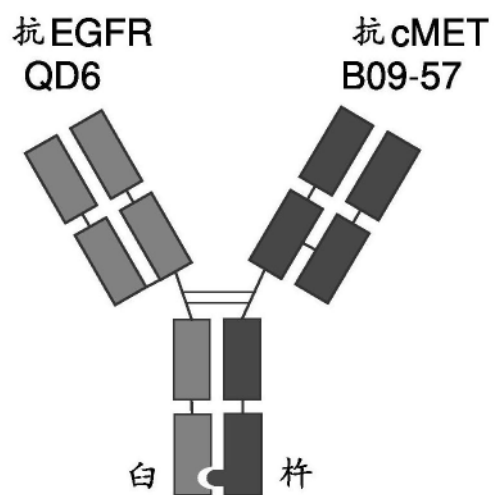


图1B

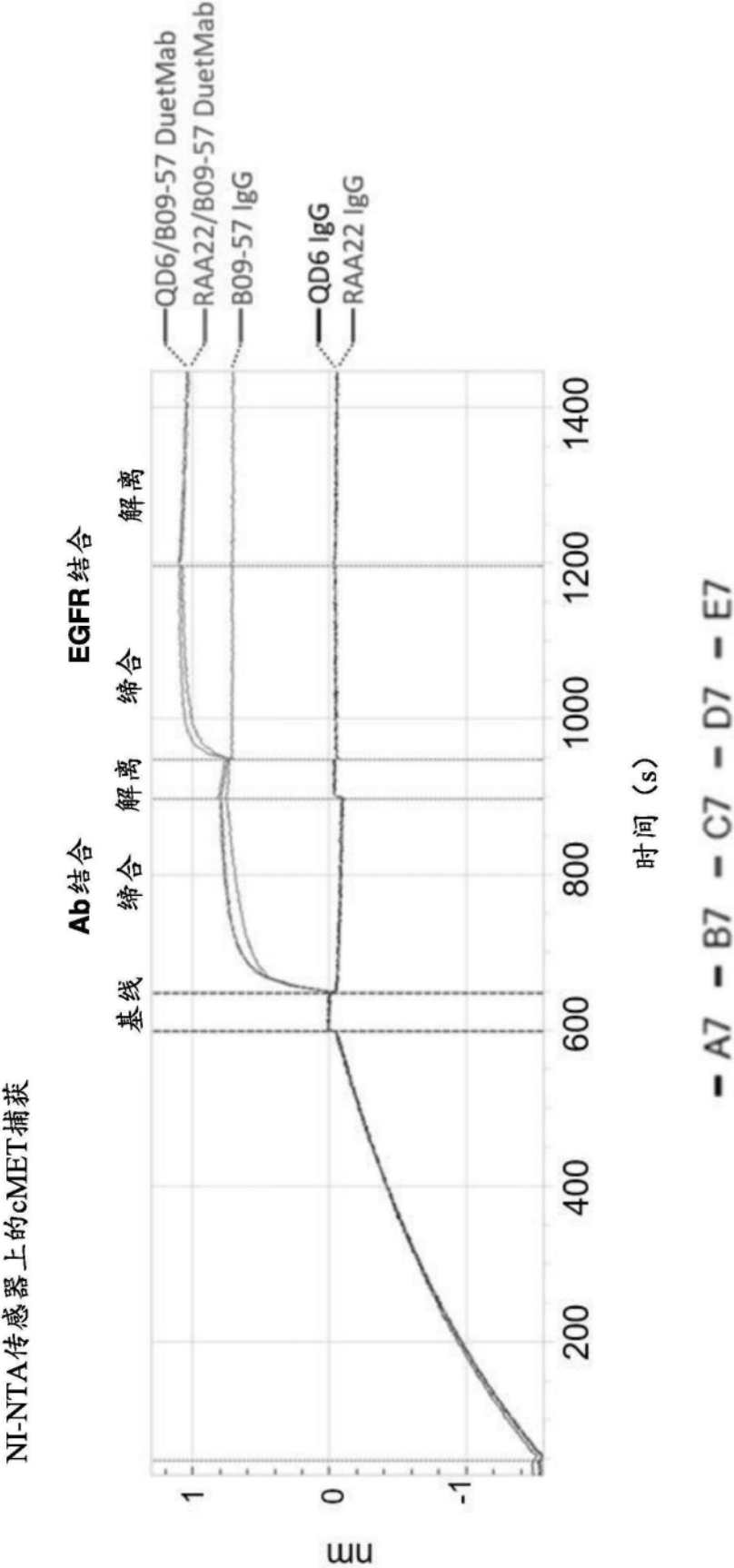


图2

EGFR 和 cMET 物种特异性

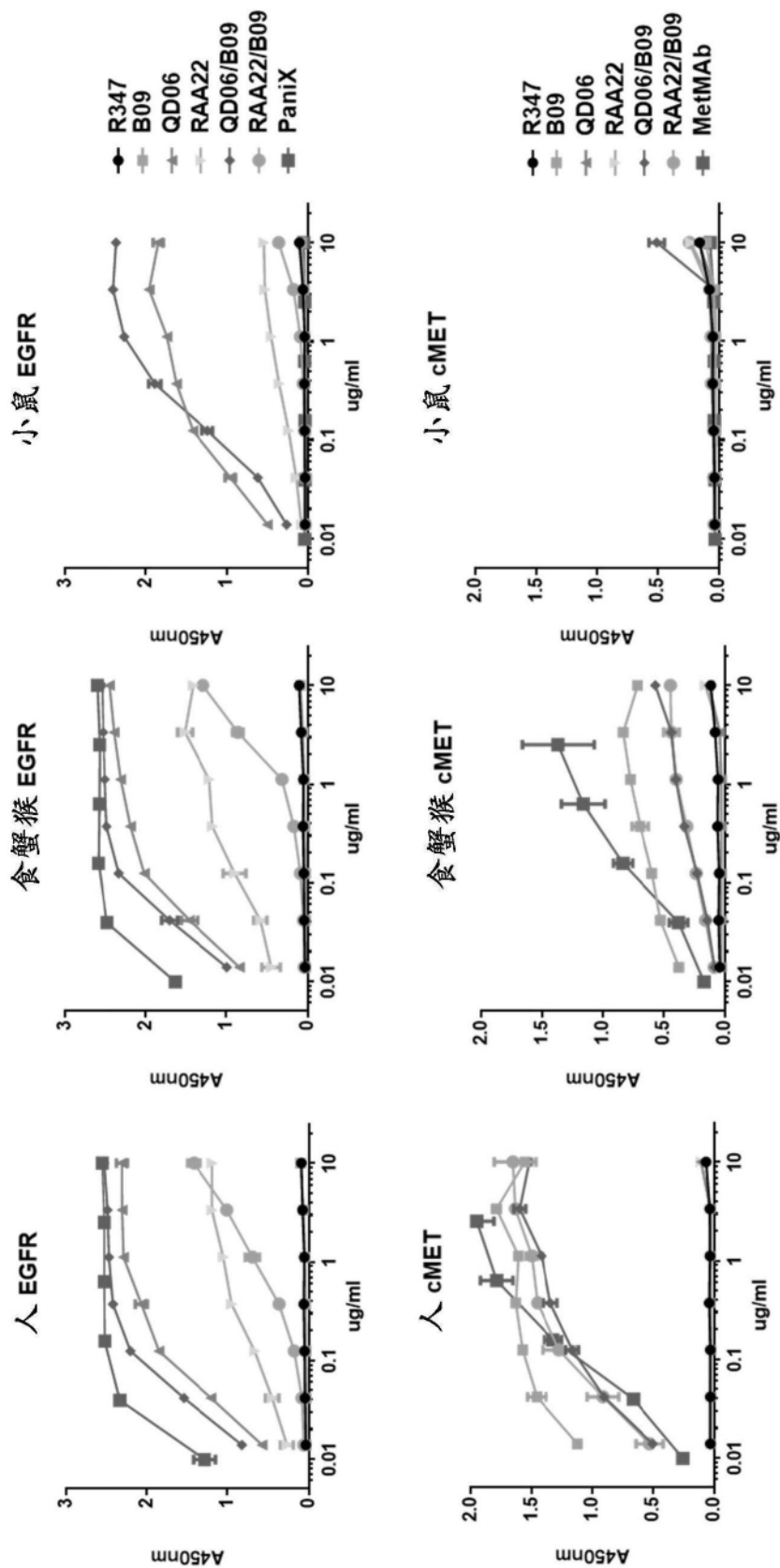


图3A

EGFR 和 cMET 家族特异性

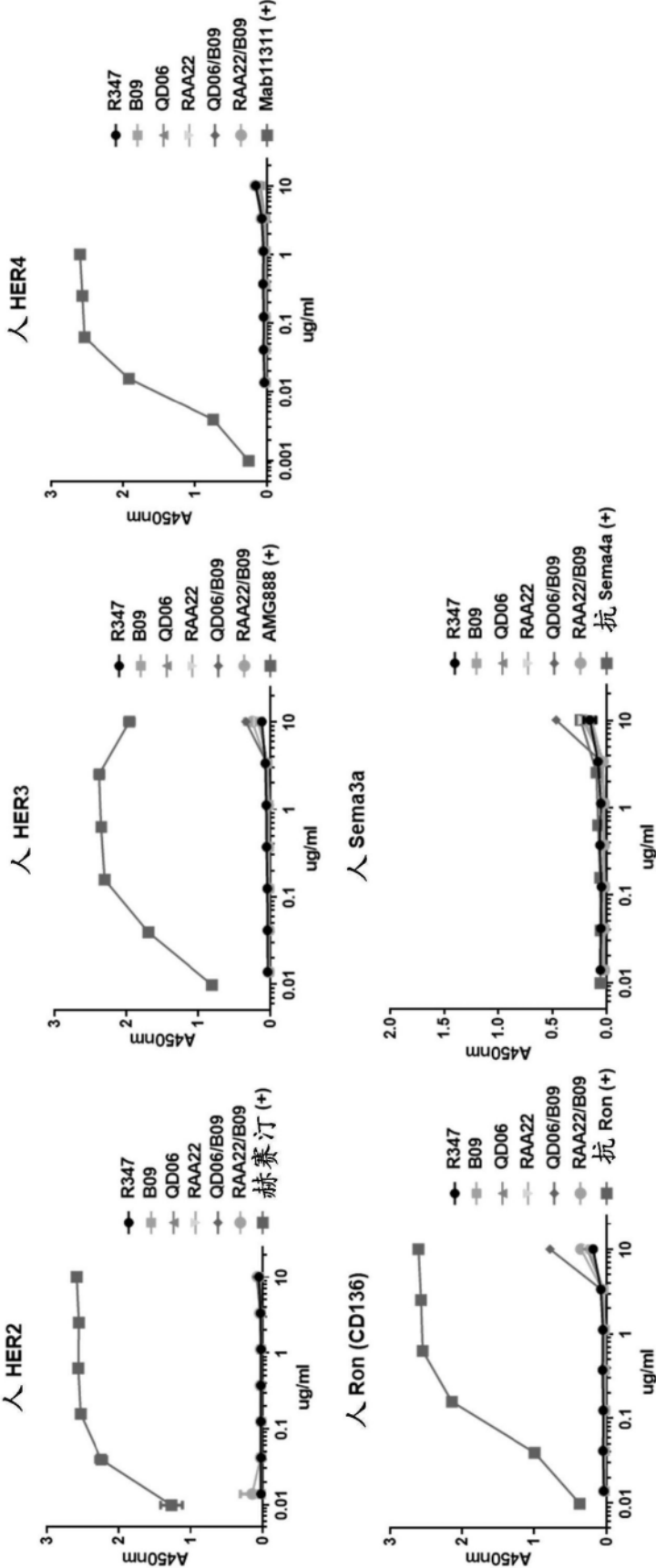


图3B

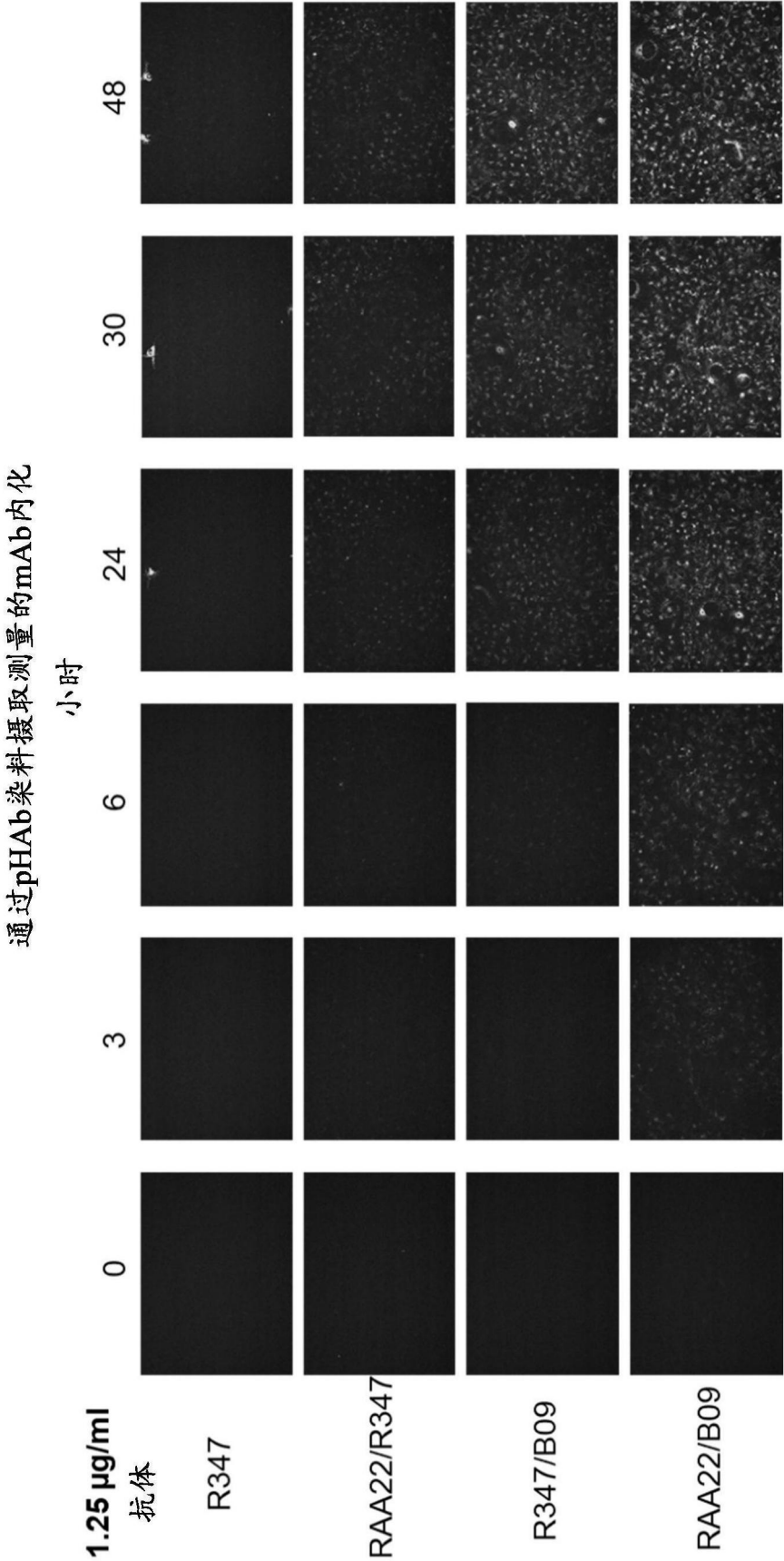


图4

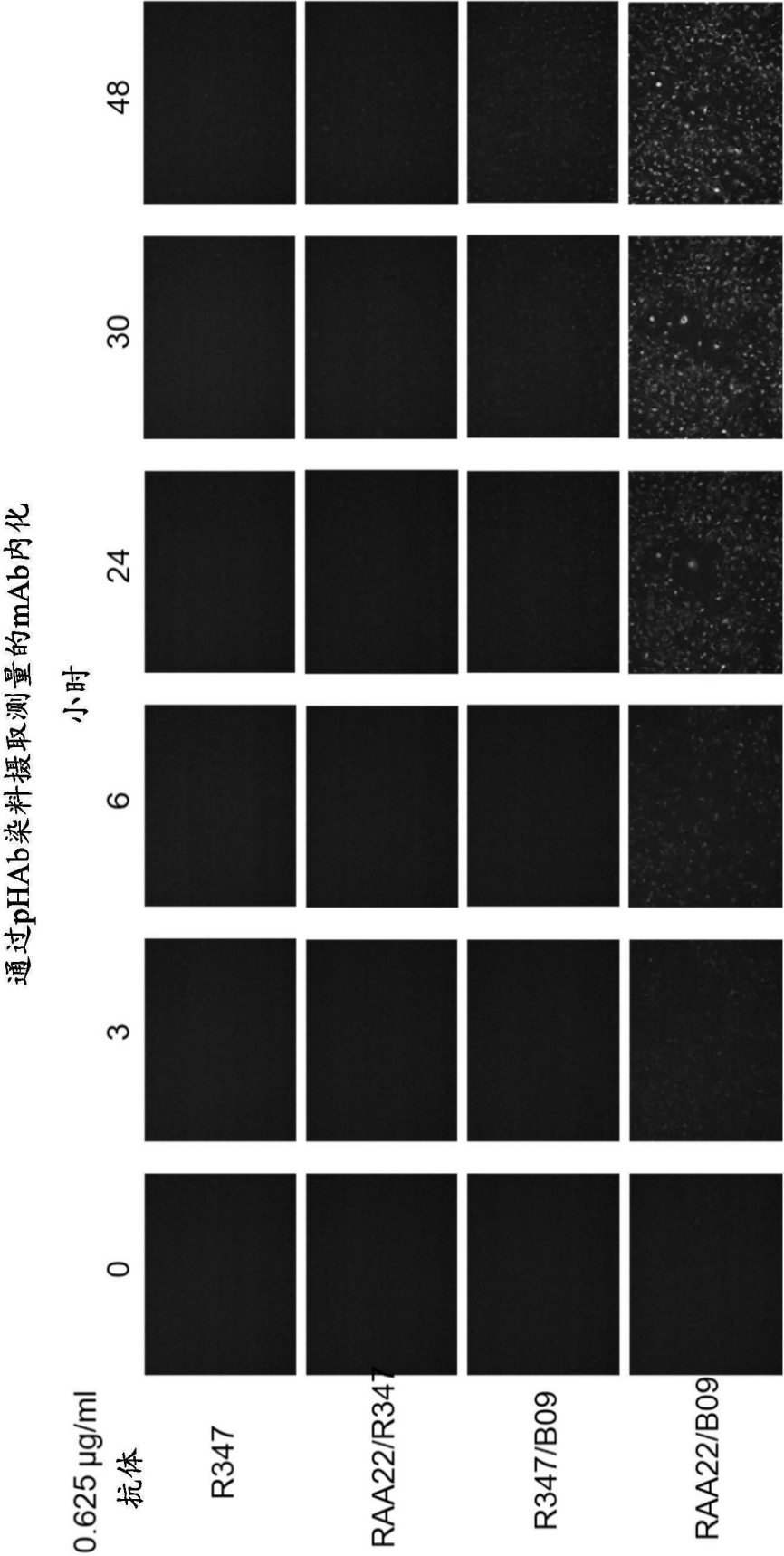


图5

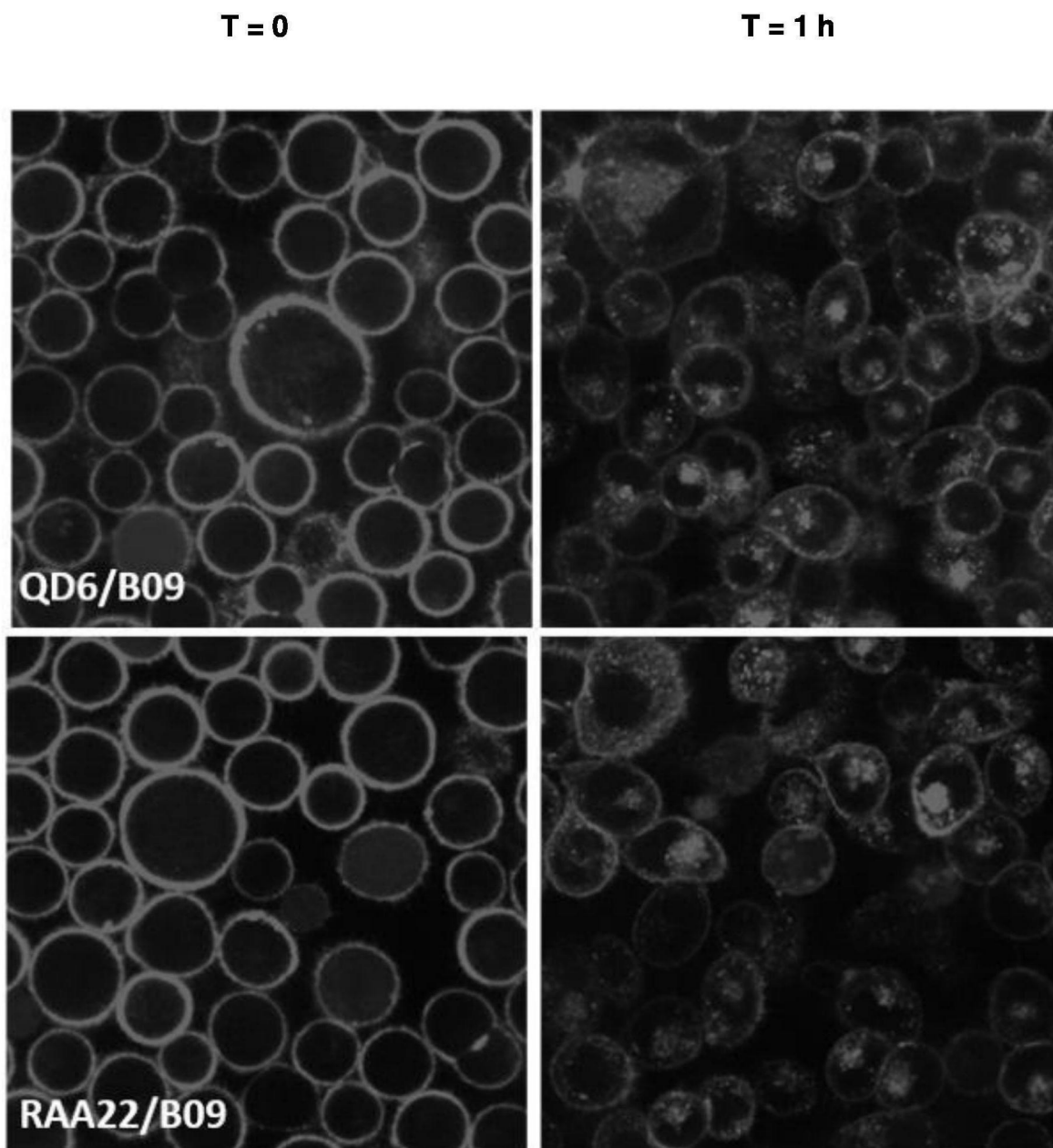


图6A

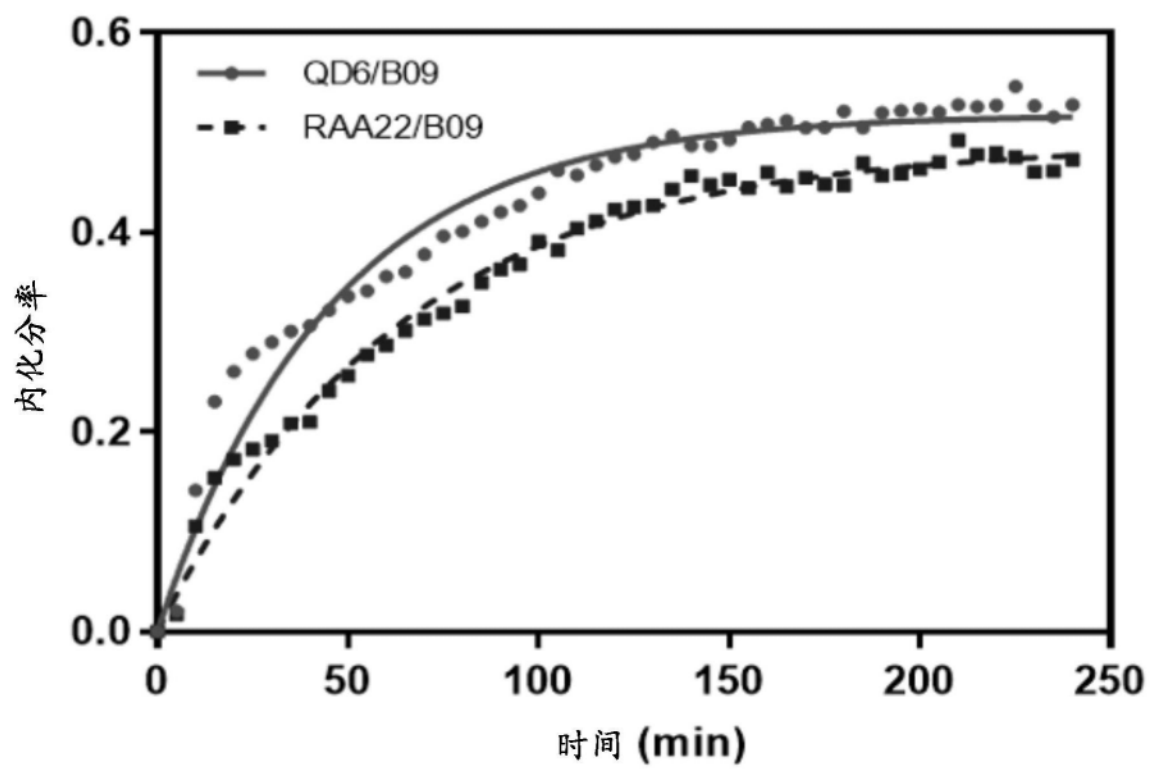


图6B

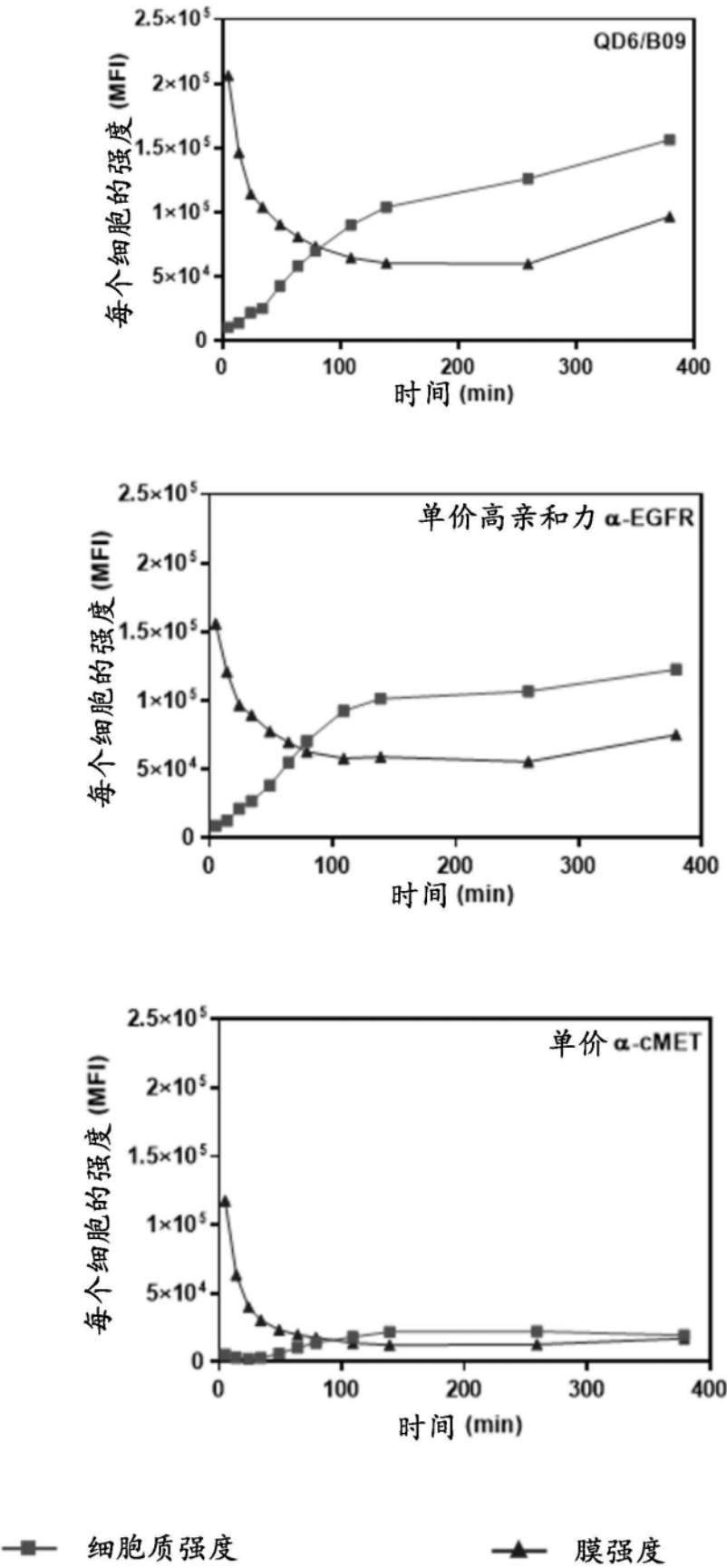


图7A

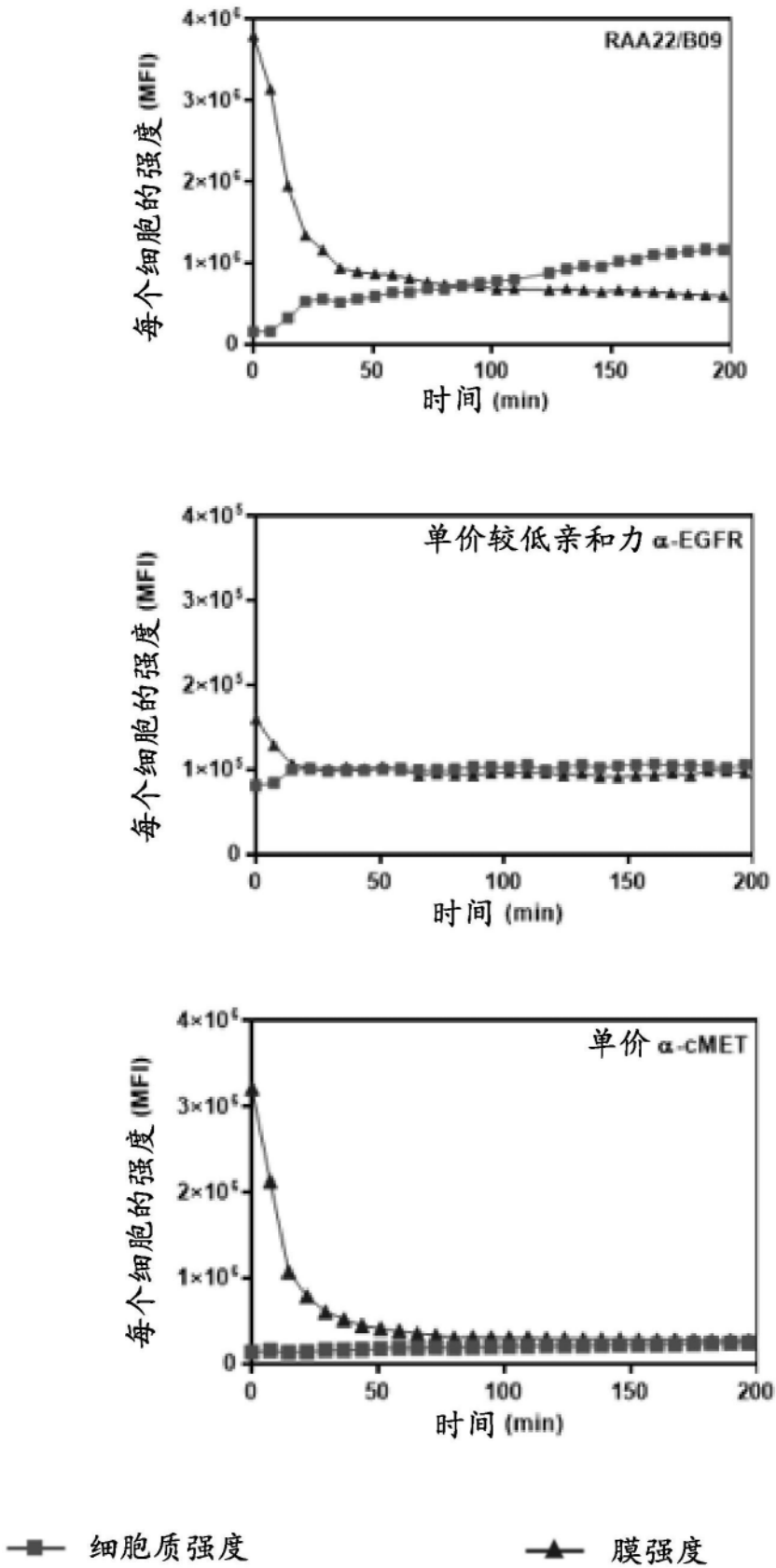


图7B

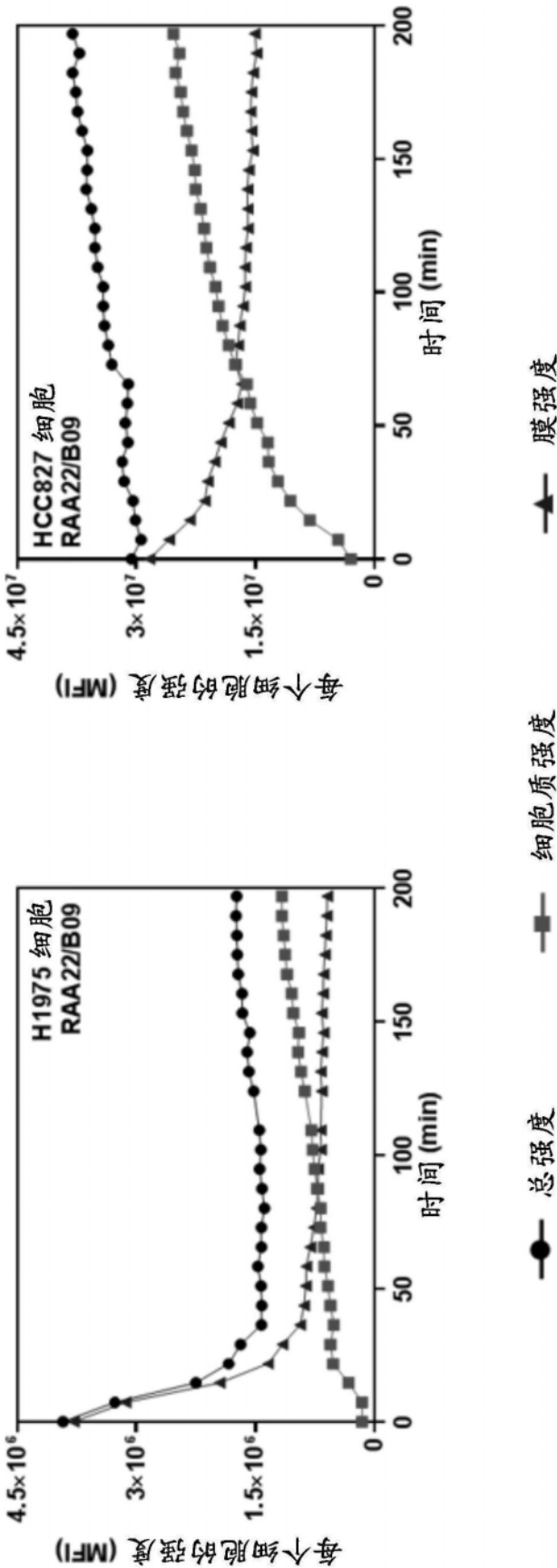


图 8A

图 8B

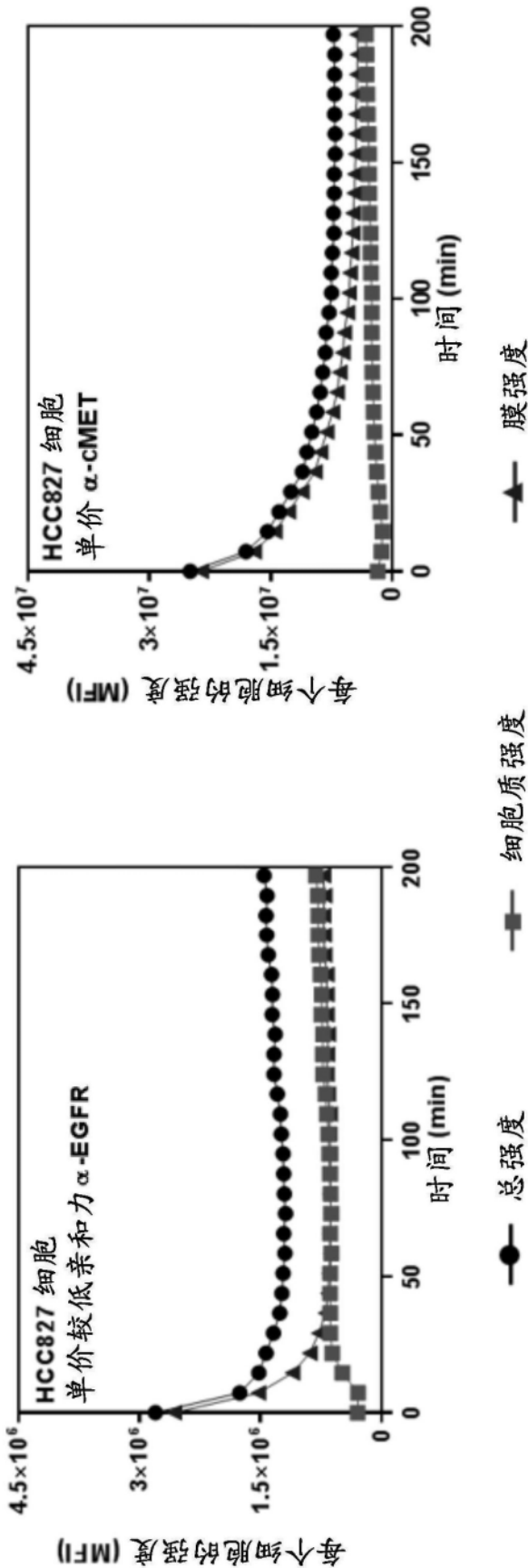


图 9B

图 9A



图10A



图10B

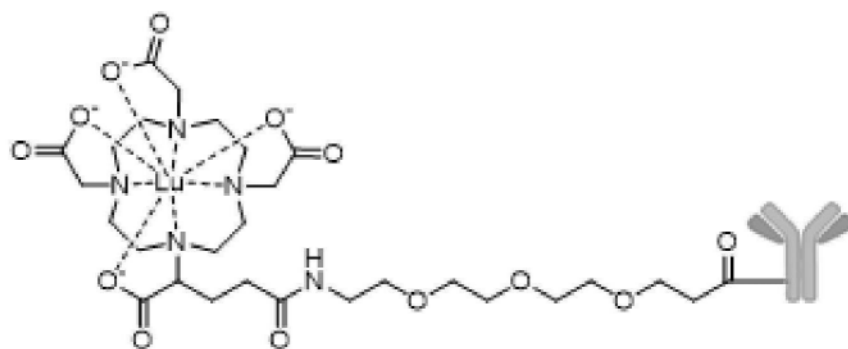


图10C

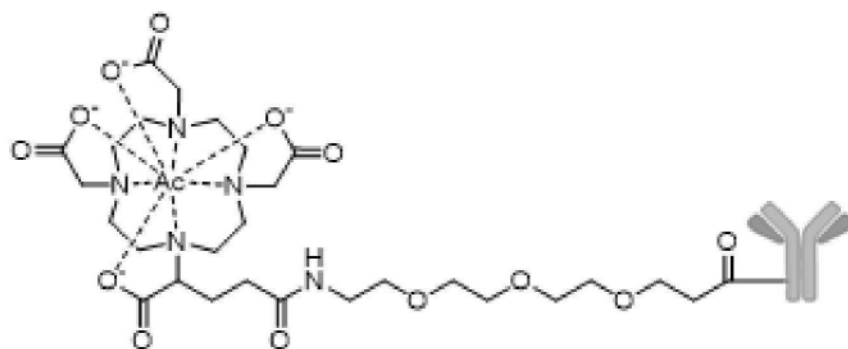


图10D

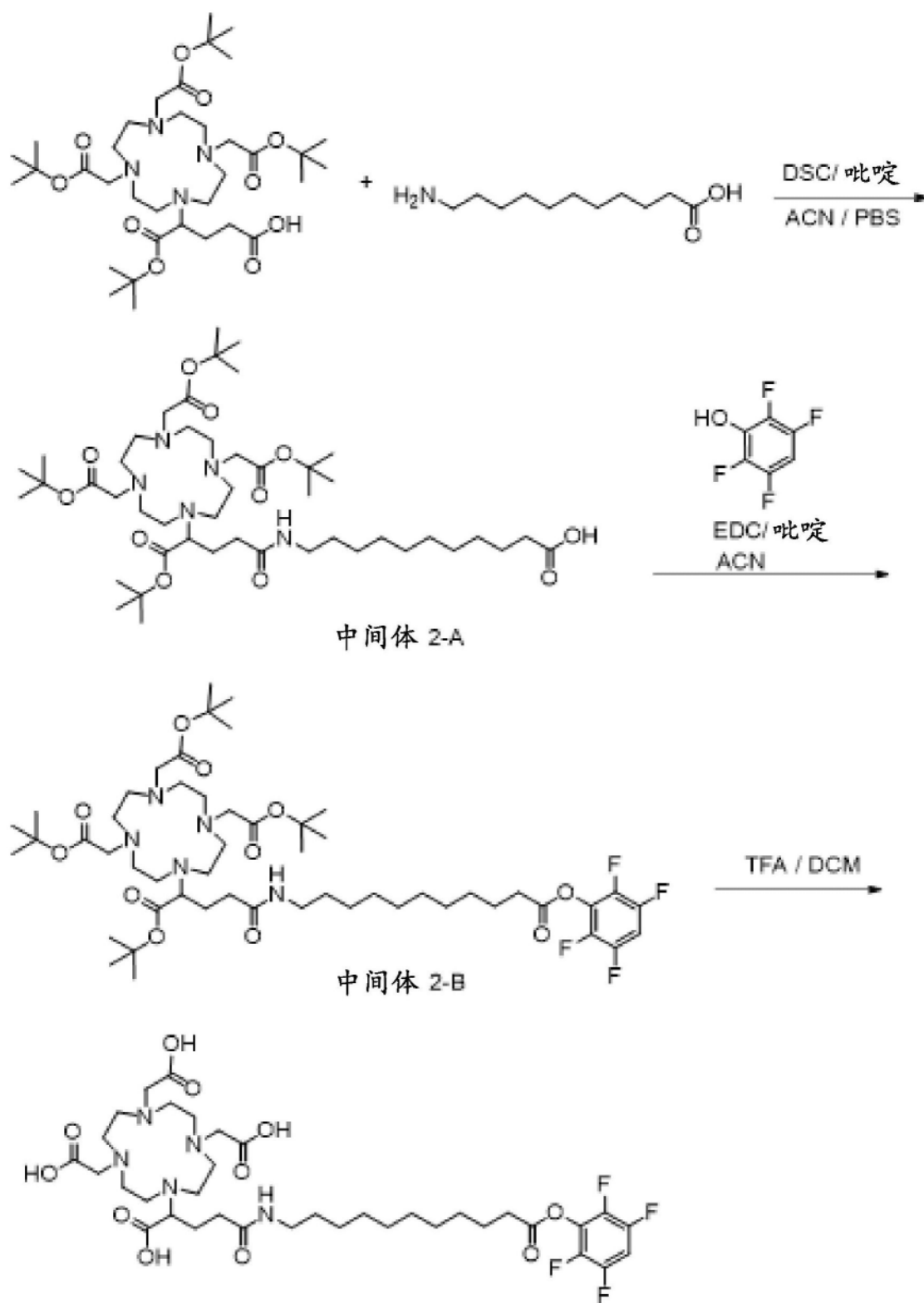


图11

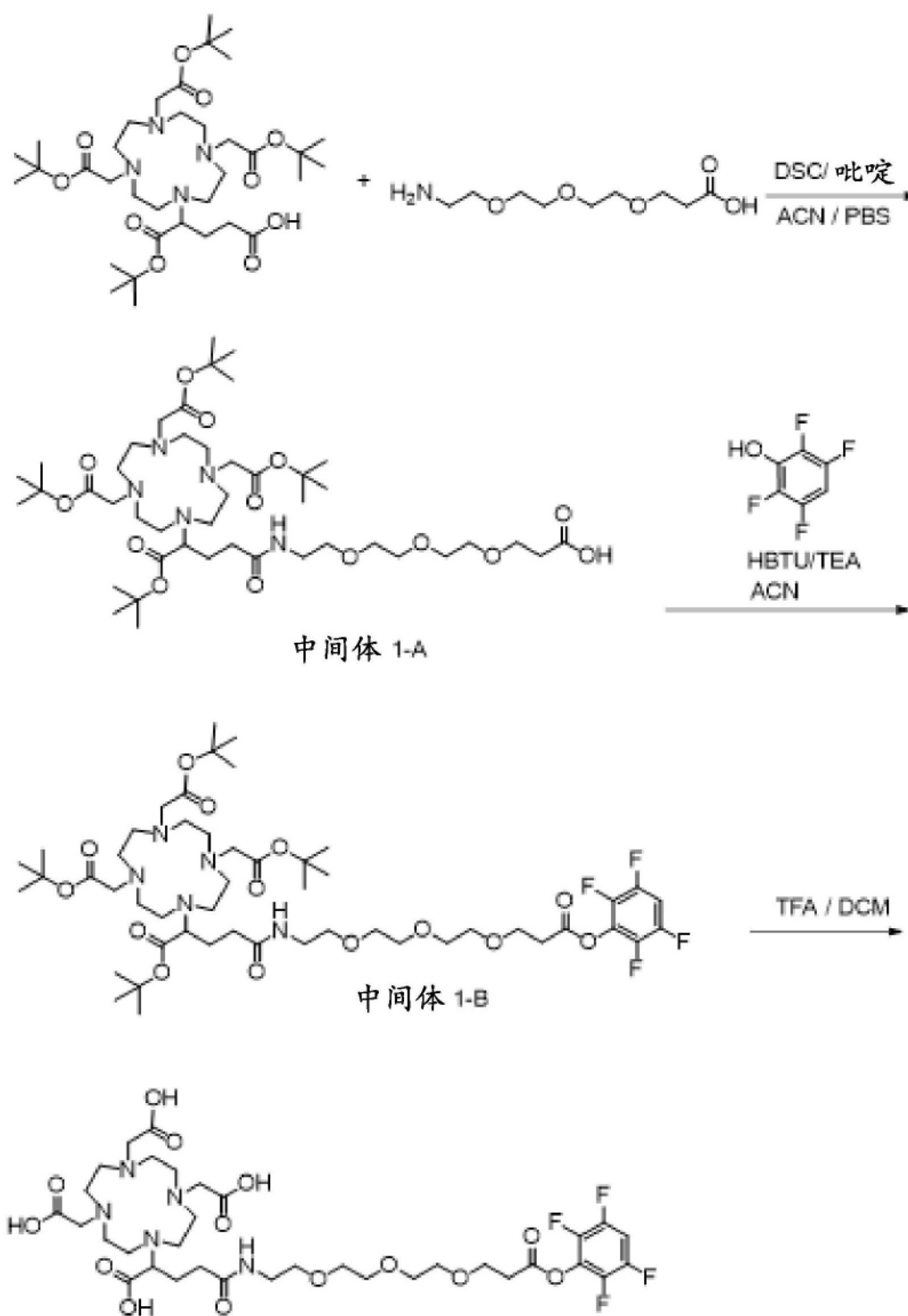


图12

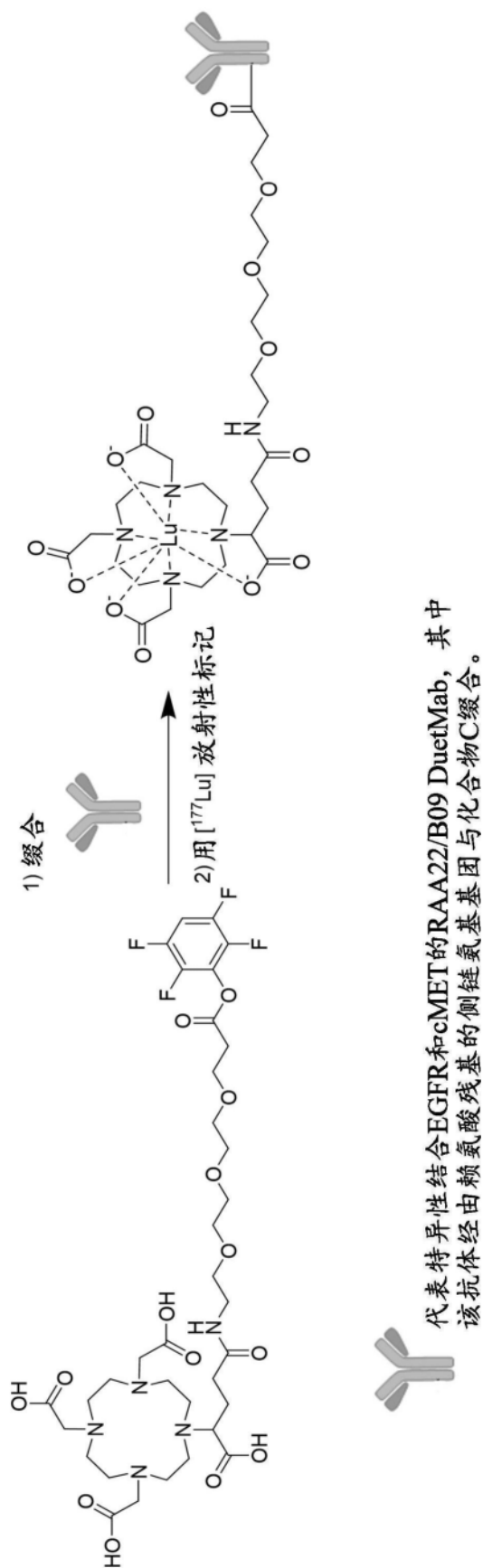


图13

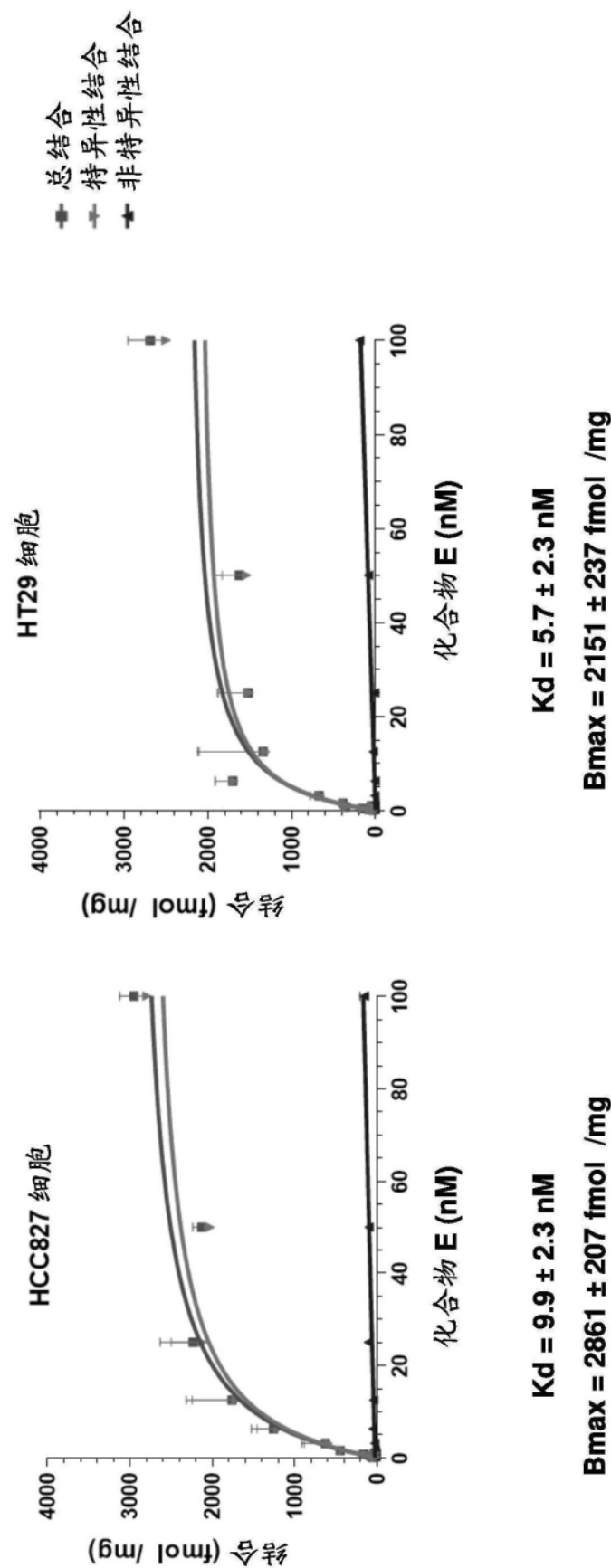


图14A

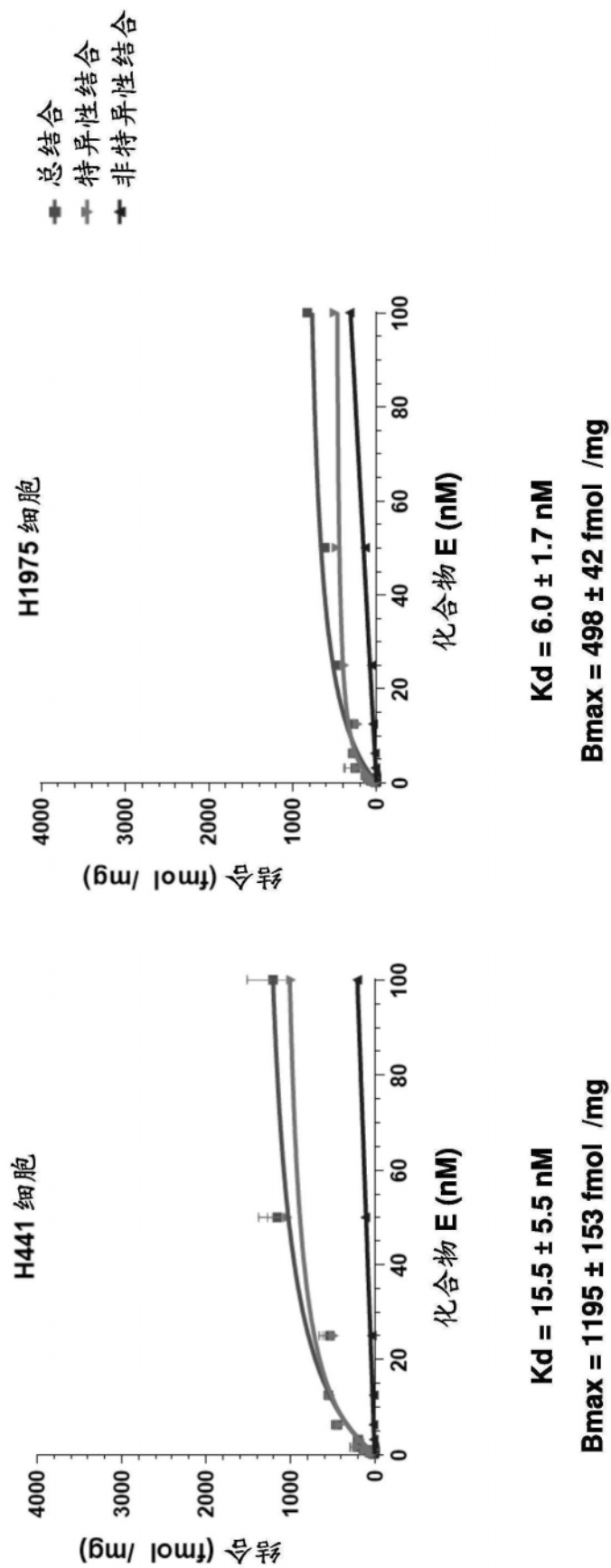


图14B

化合物E内化

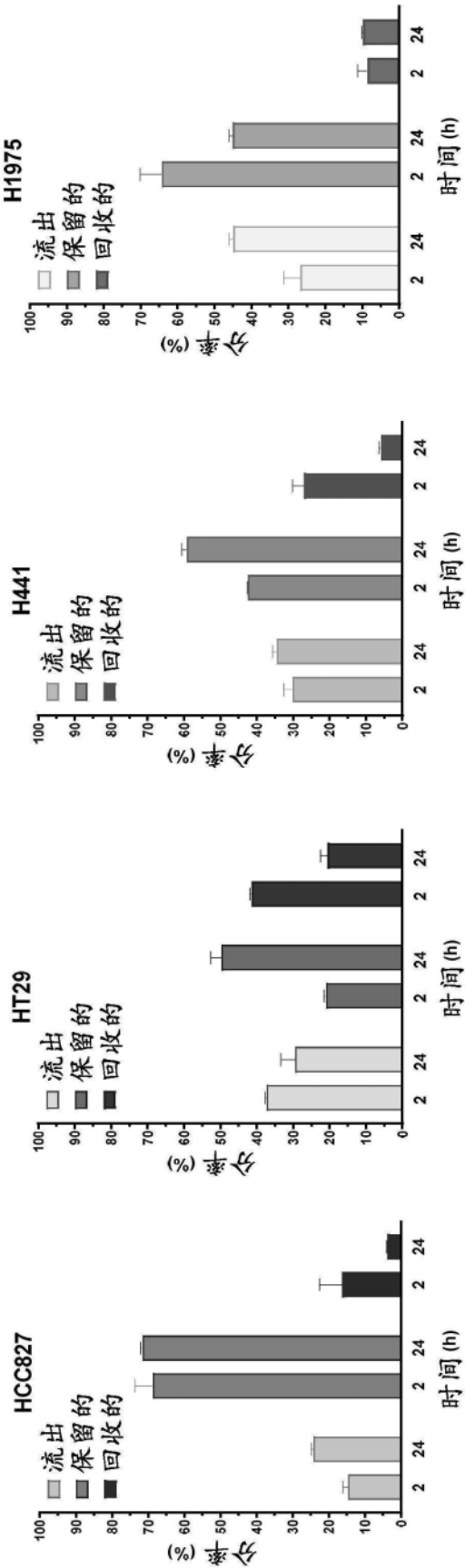


图15

H441模型中化合物E的生物分布研究

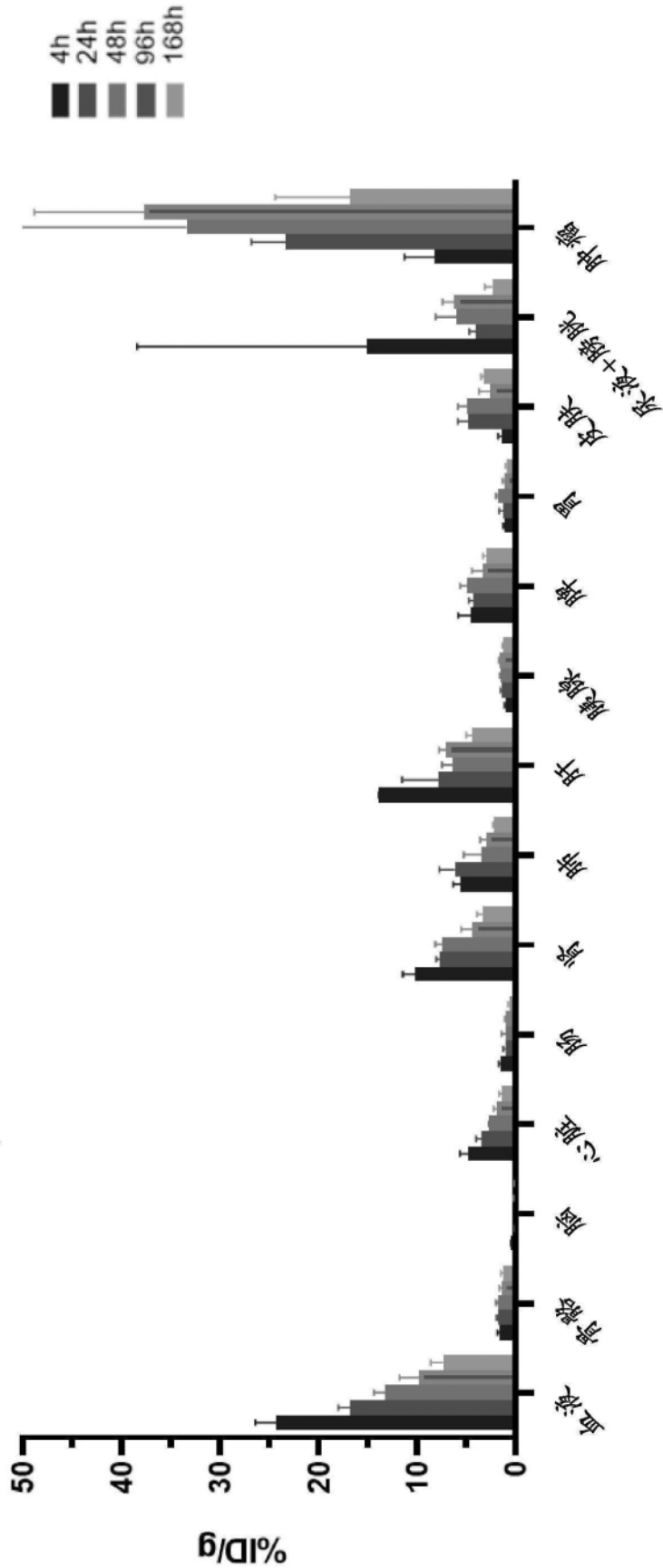


图16A

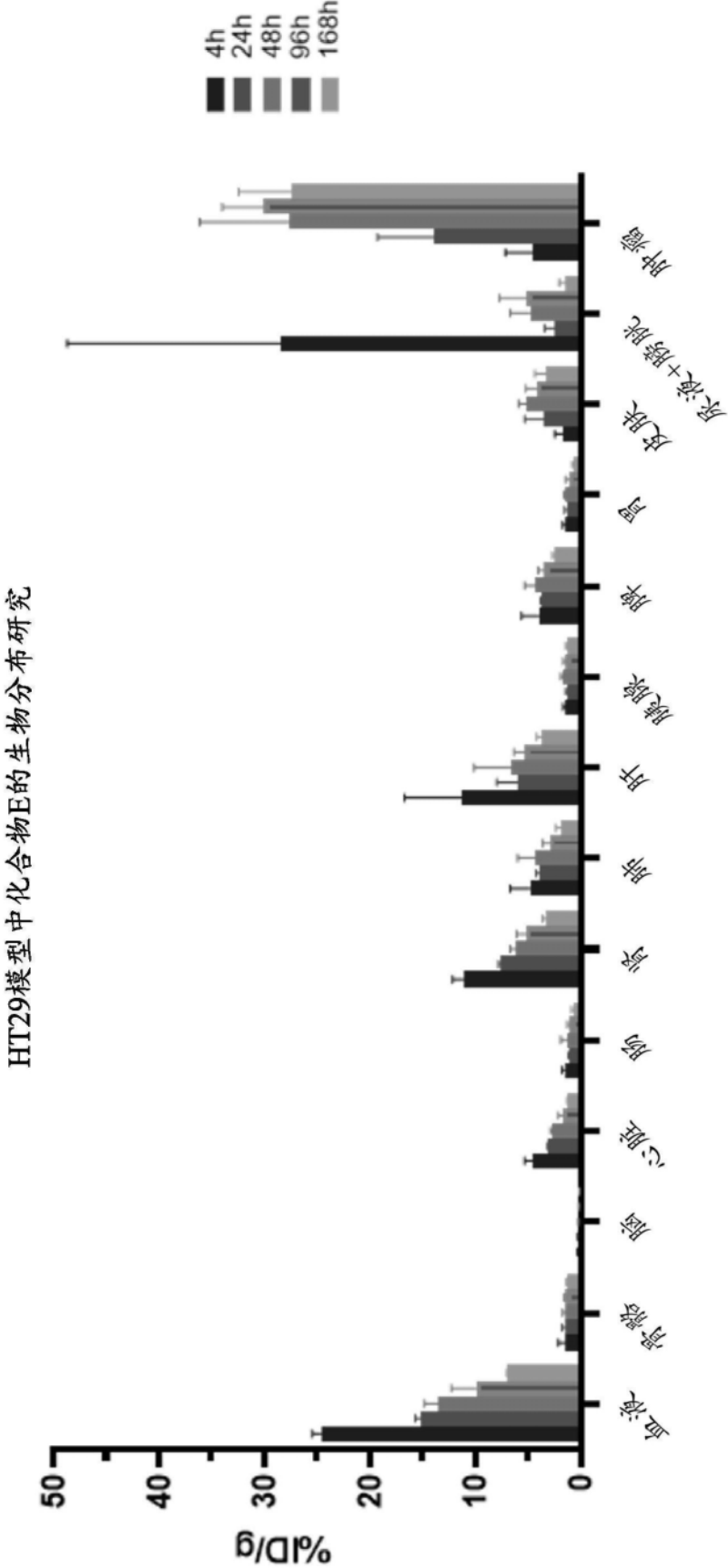


图16B

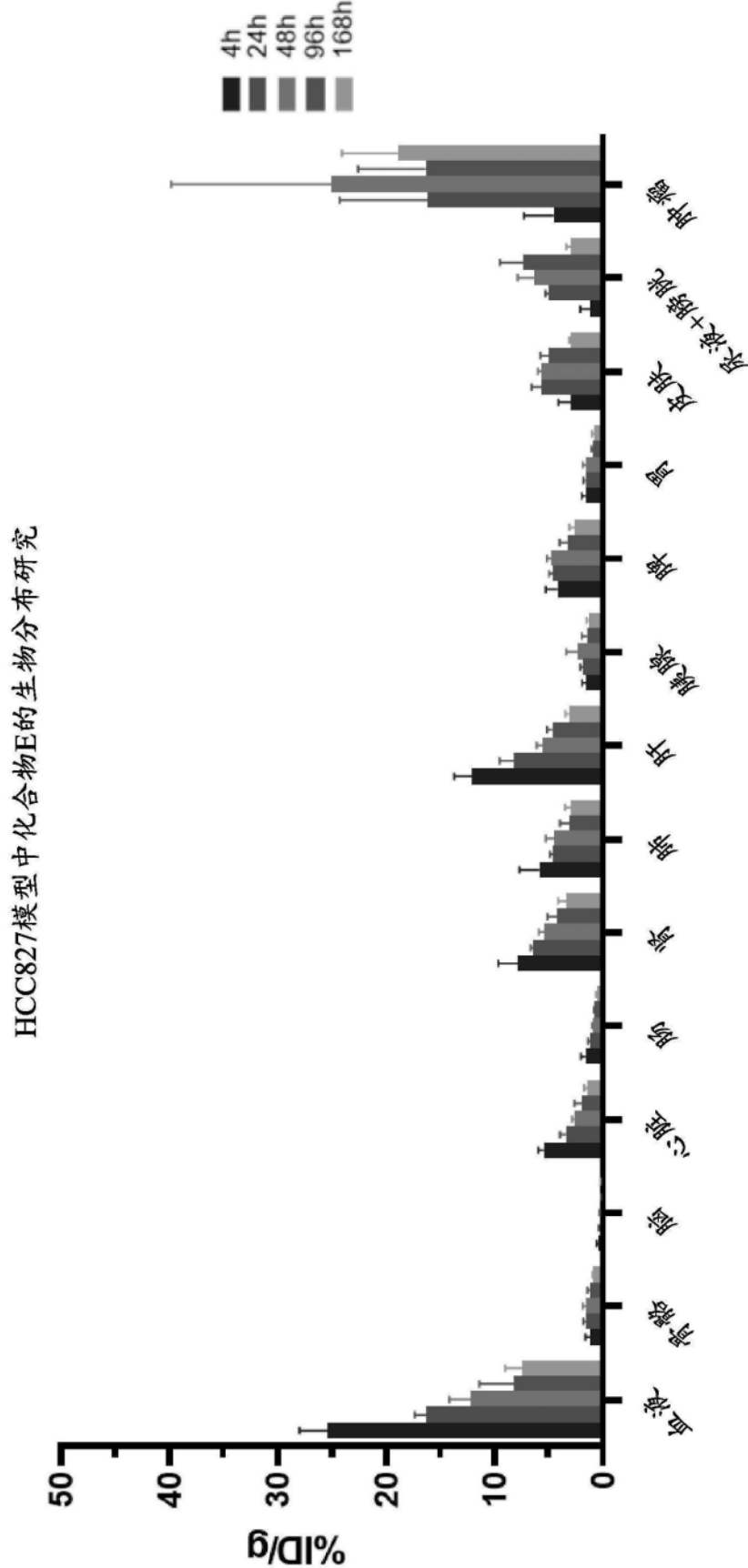


图16C

H1975模型中化合物E的生物分布研究

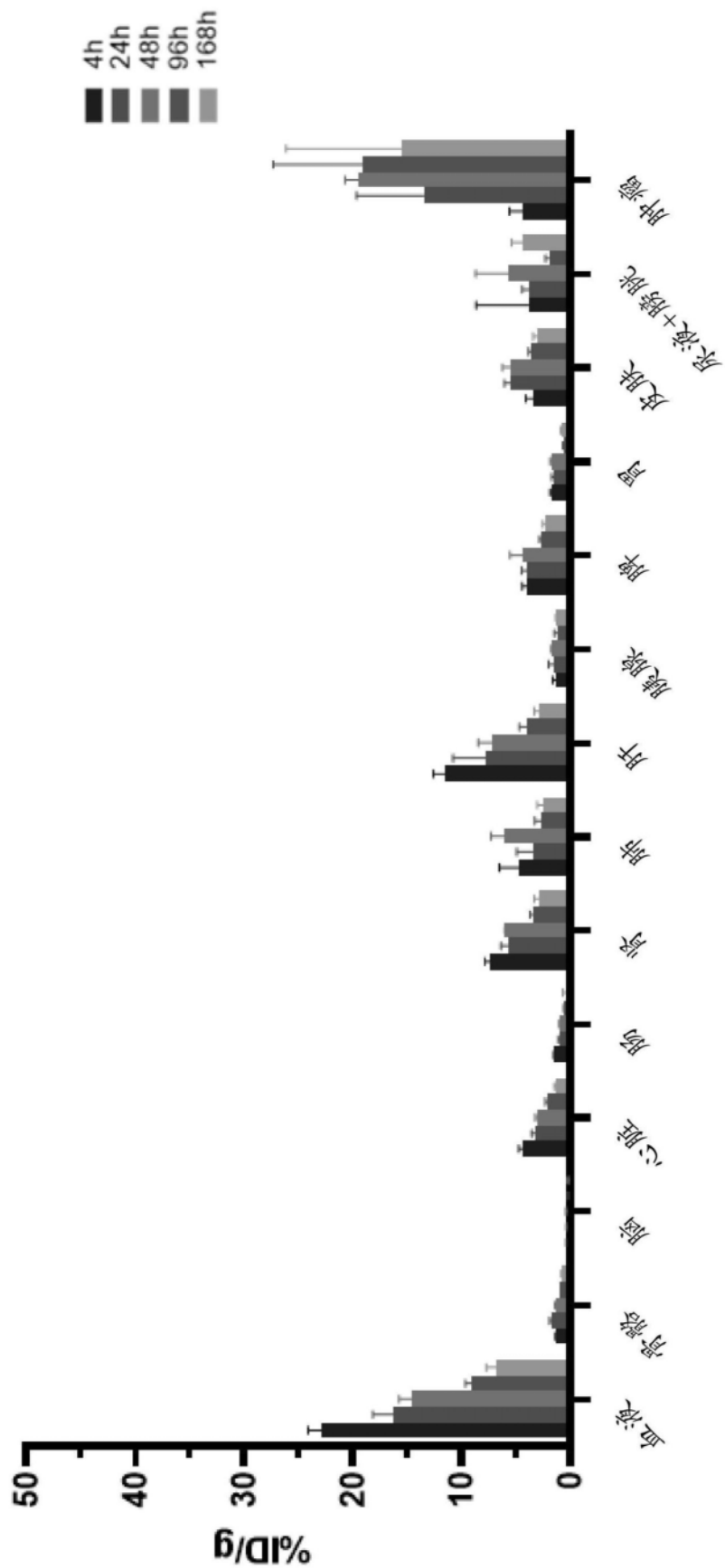


图16D

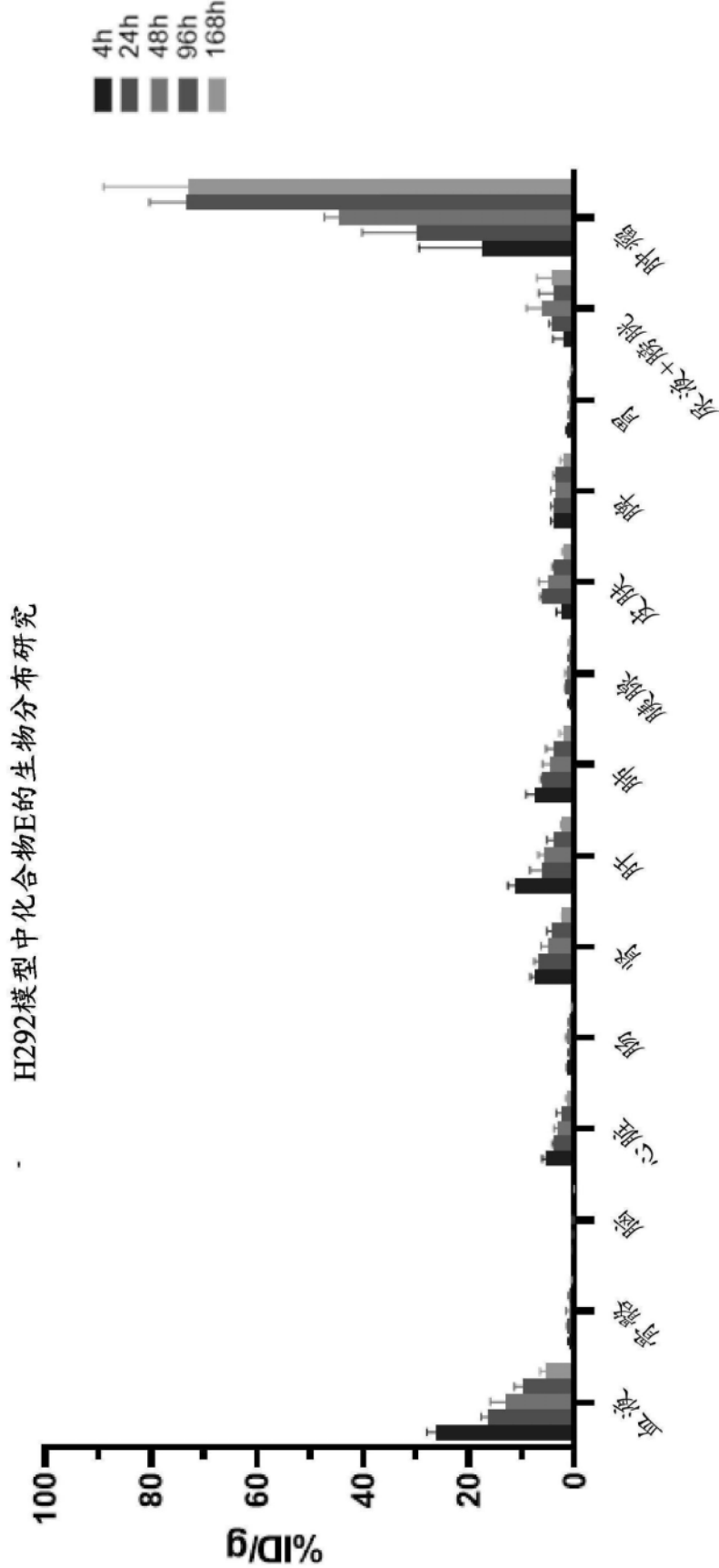


图16E

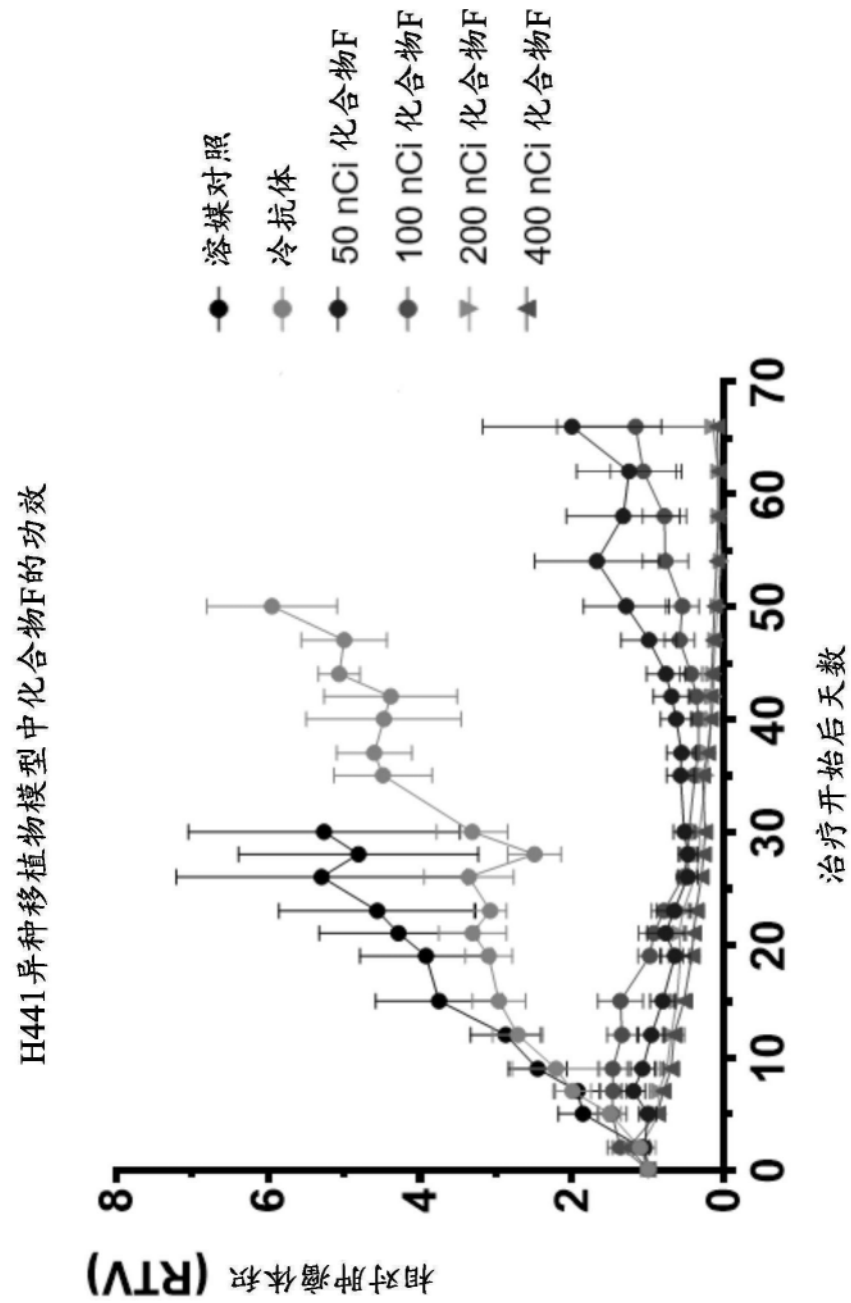


图17A

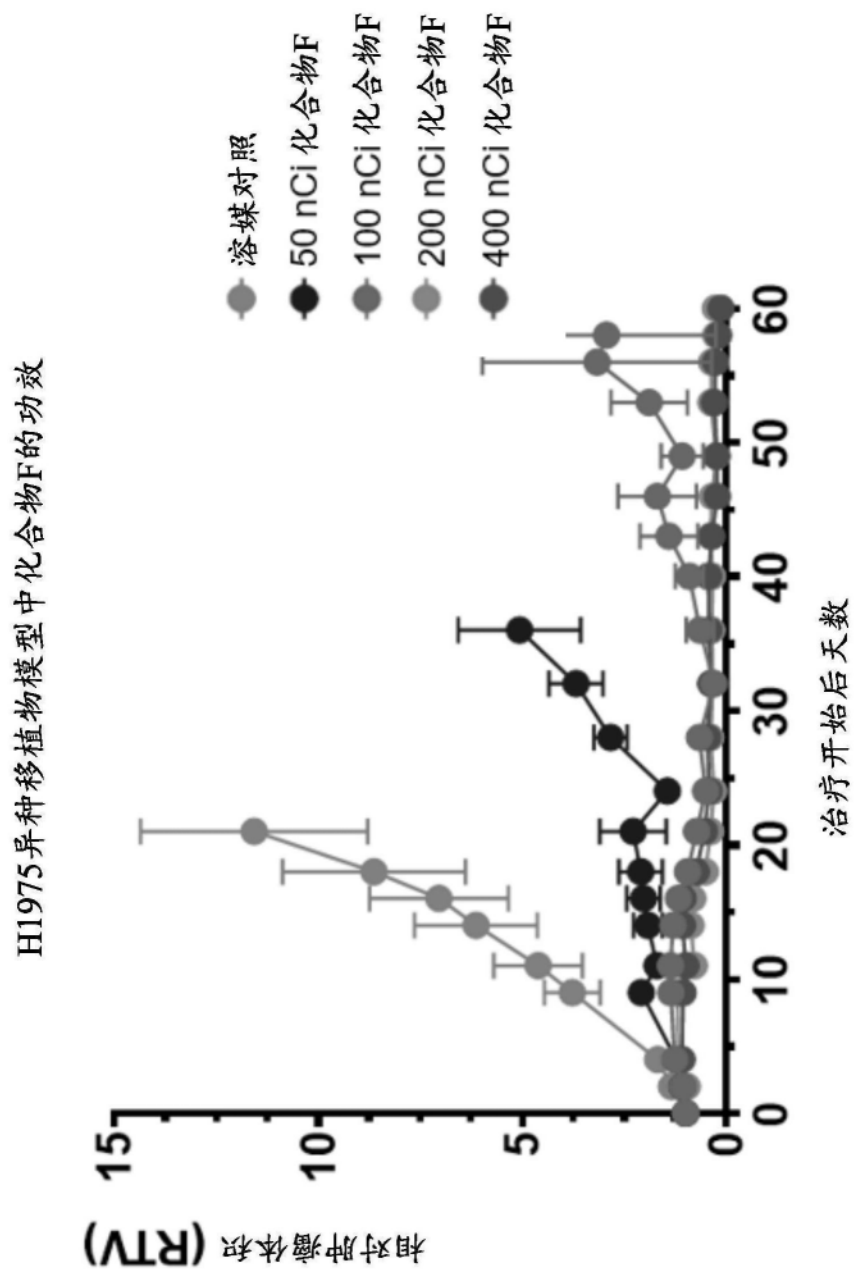


图17B

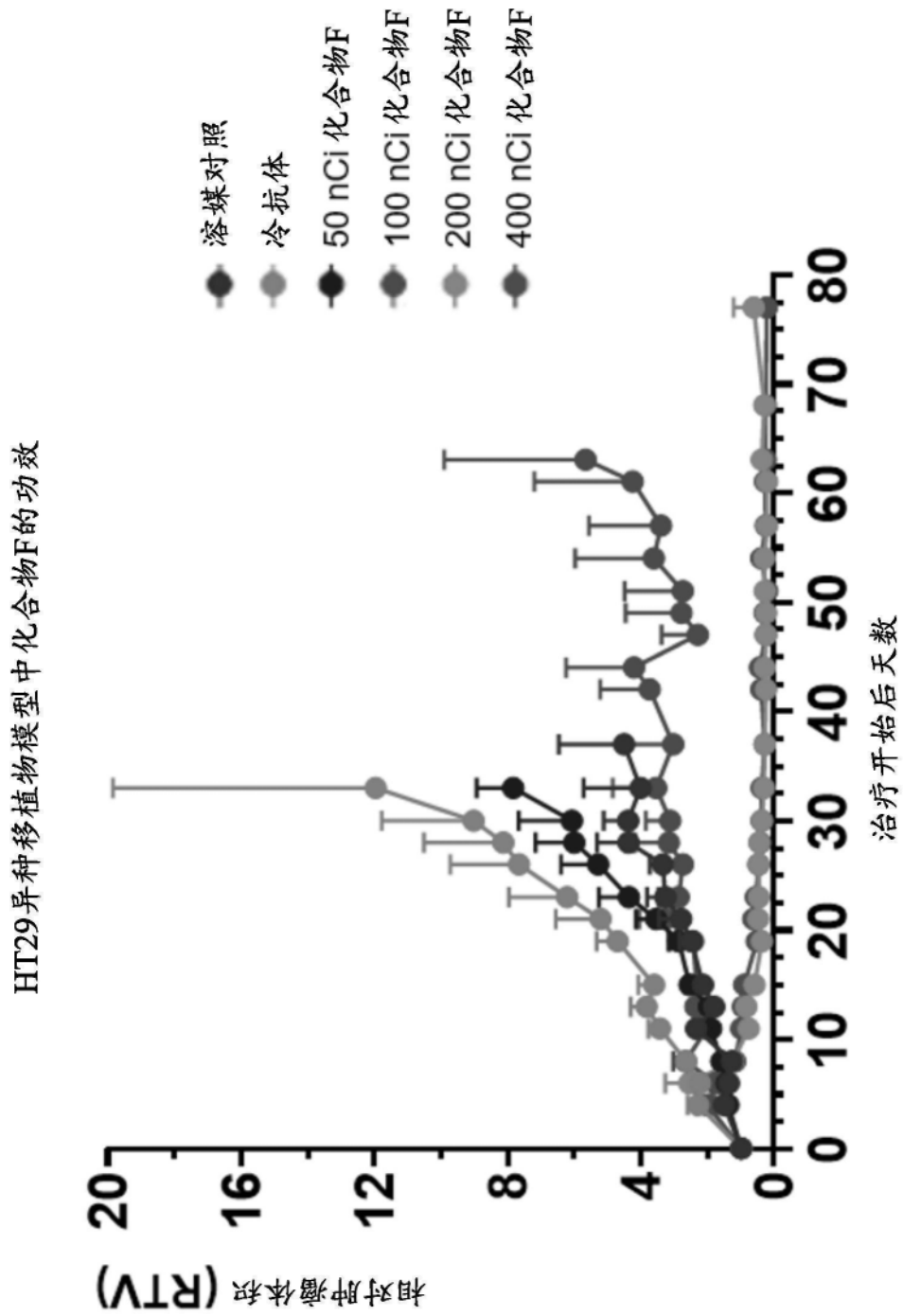


图17C