



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118047832 A

(43) 申请公布日 2024.05.17

(21) 申请号 202410223066.0

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2017.11.15

C07K 5/062 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 1/06 (2006.01)

62/423,068 2016.11.16 US

C07K 1/08 (2006.01)

62/479,516 2017.03.31 US

(62) 分案原申请数据

201780083546.X 2017.11.15

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 R·巴布 G·陈 C·戴利

J·达席尔瓦 D·麦克唐纳

T·尼托利

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理人 吴瑜 张梦倩

权利要求书7页 说明书92页

序列表(电子公布) 附图17页

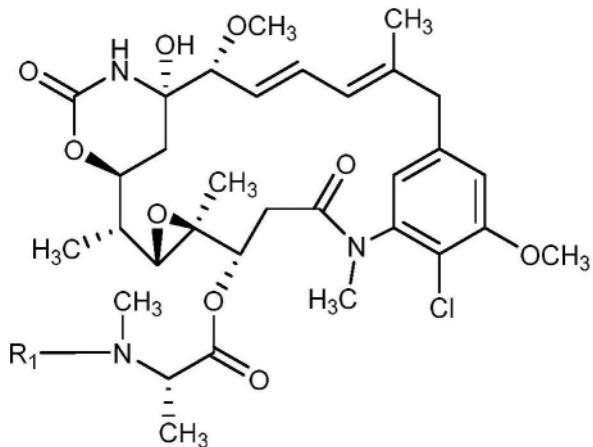
(54) 发明名称

与MET结合的抗MET抗体、双特异性抗原结合分子及其使用方法

(57) 摘要

本申请提供了结合MET的抗体和双特异性抗原结合分子及其使用方法。所述双特异性抗原结合分子包含第一和第二抗原结合结构域,其中所述第一和第二抗原结合结构域结合人MET的细胞外结构域的两种不同(优选非重叠的)表位。所述双特异性抗原结合分子能够阻断人MET与其配体HGF之间的相互作用。例如,与仅包含双特异性分子的一个抗原结合结构域的单价抗原结合分子相比,双特异性抗原结合分子可以表现出最小的或没有MET激动剂活性,所述单价抗原结合分子倾向于发挥不希望的MET激动剂活性。还包括抗体-药物缀合物(ADC),其包含与细胞毒性剂、放射性核素或其他部分连接的本申请提供的抗体或双特异性抗原结合分子,以及通过向受试者施用双特异性抗原结合分子或其ADC来治疗受试者的癌症的方法。

1. 一种化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物具有下式

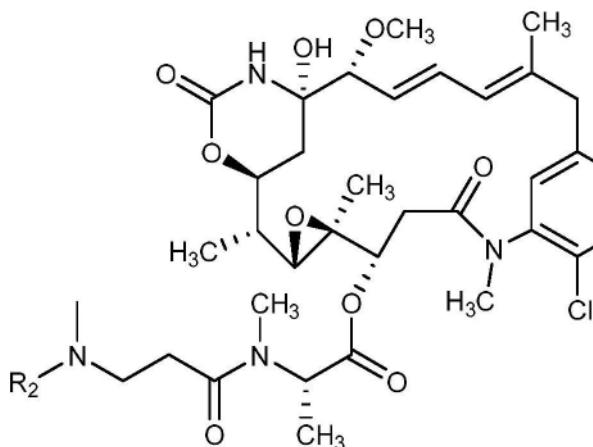


其中,  $R_1$  是 H、酰基、芳基氧羰基、杂芳基羰基或

,

烷基氧羰基,其中每一者任选地被取代。

2. 如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物具有下式

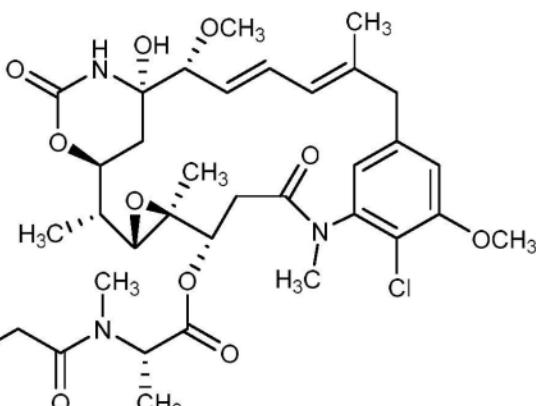
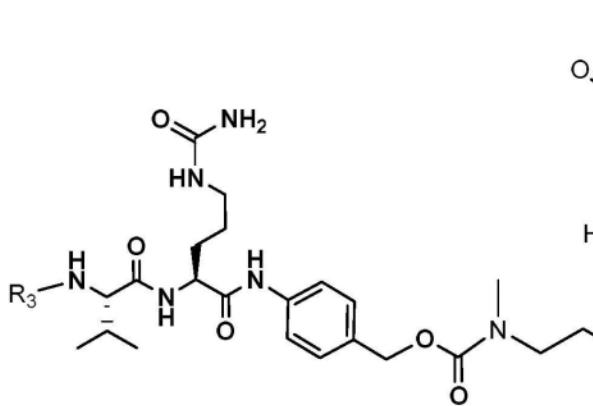


其中,  $R_2$  是 H、酰基、芳基氧羰基、杂芳

,

基羰基或烷基氧羰基,其中每一者任选地被取代。

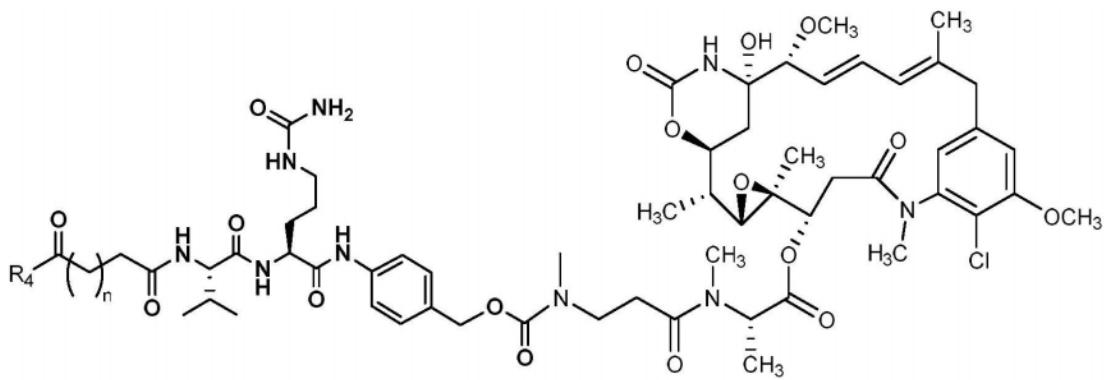
3. 如权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物具有下式



,

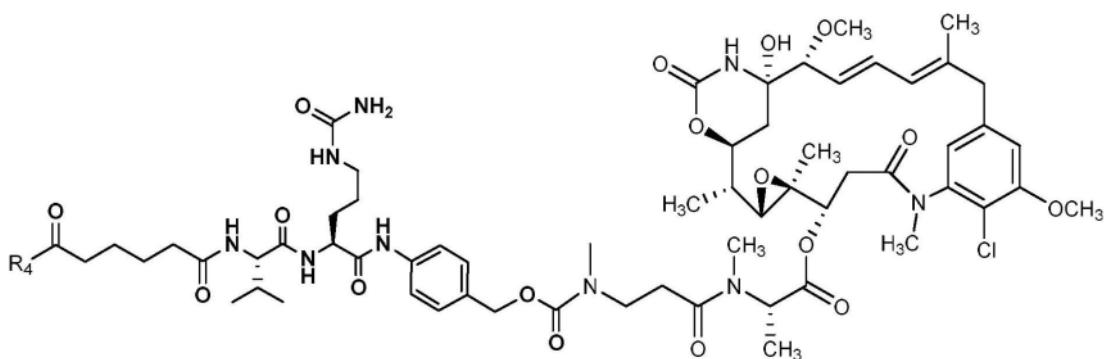
其中,  $R_3$  是 H、酰基、芳基氧羰基、杂芳基羰基或烷基氧羰基,其中每一者任选地被取代。

4. 如权利要求3所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物具有下式



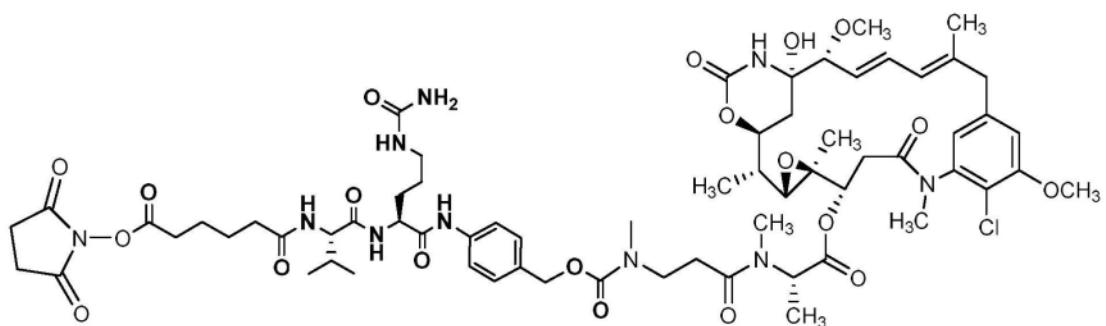
其中,  $n=0, 1, 2, 3, 4$  或  $5$ ;  $R_4$  是  $OH$ 、酰氧基、烷氧基、芳基氧基、杂芳基氧基、氨基或琥珀酰亚胺氨基, 其中每一者任选地被取代。

5. 如权利要求4所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物具有下式

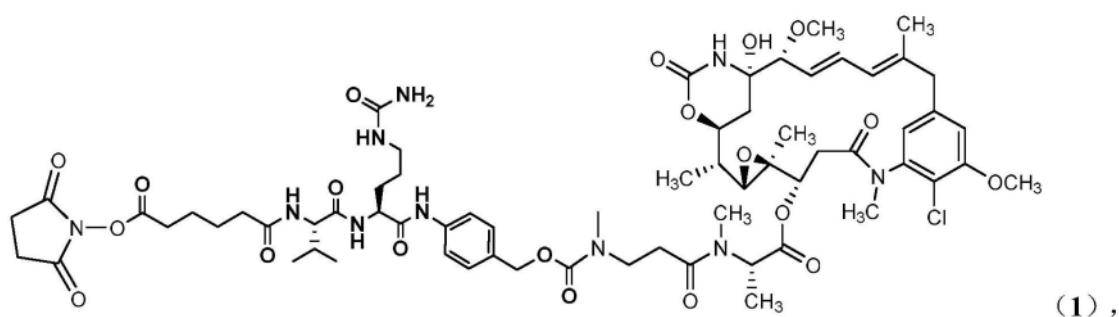


其中,  $R_4$  是  $OH$ 、酰氧基、烷氧基、芳基氧基、杂芳基氧基、氨基或琥珀酰亚胺氨基, 其中每一者任选地被取代。

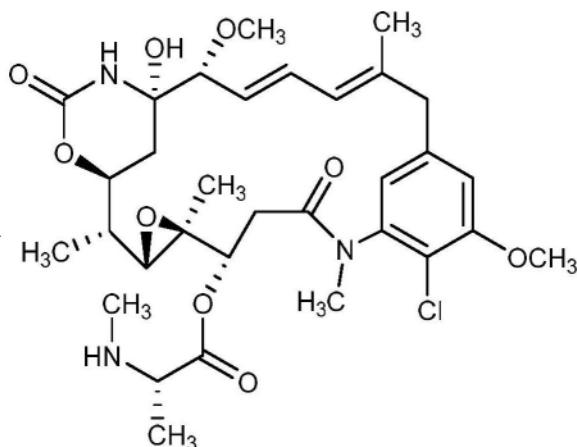
6. 如权利要求5所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物具有下式



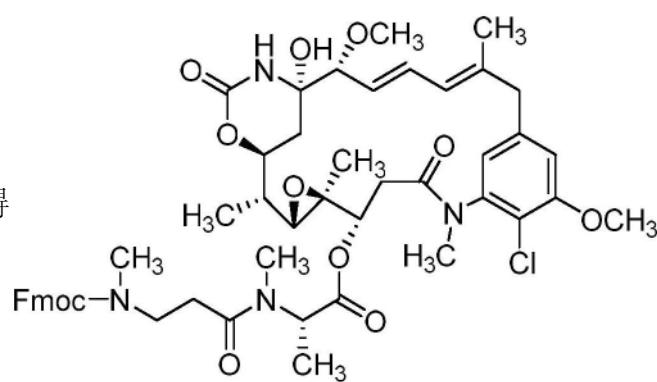
7. 一种制备具有下式的化合物或其药学上可接受的盐的方法



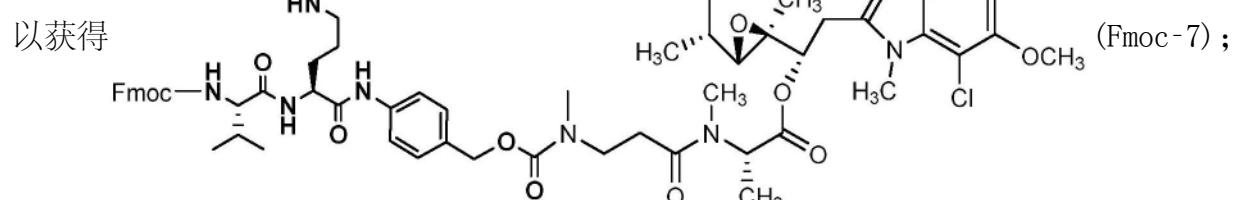
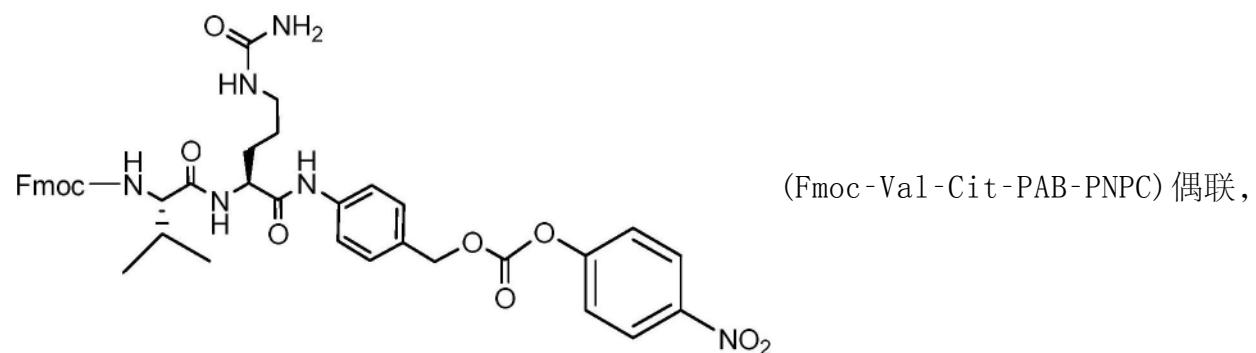
所述方法包括以下步骤:



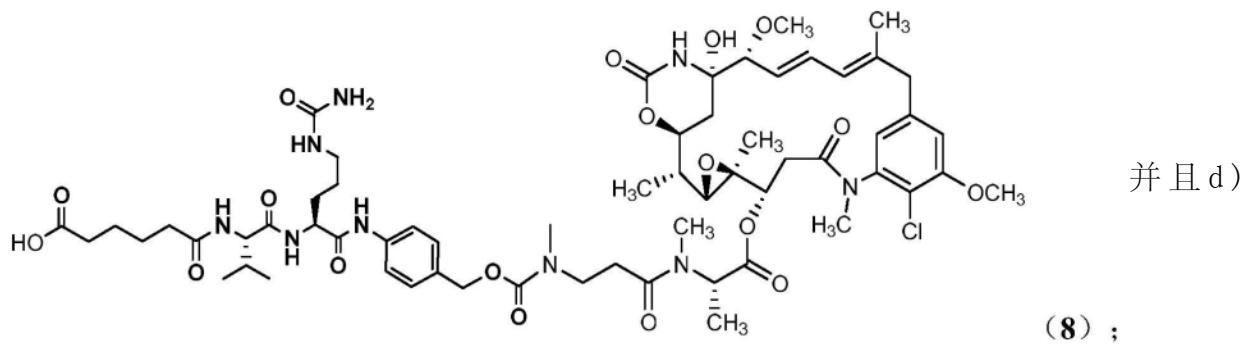
a) 在活化剂和碱的存在下, 将暴露于  
 Fmoc-N-Me-β-丙氨酸, 以获得



b) 使用哌啶从 (3) 中去除Fmoc保护, 随后与活化的酯

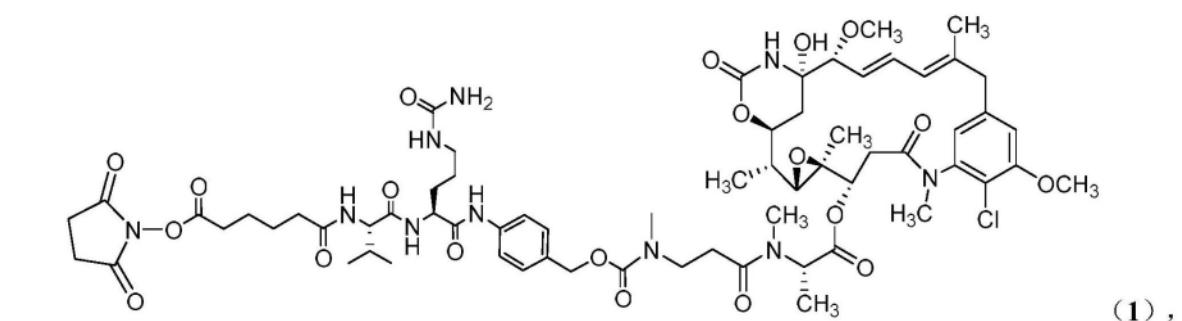


c) 使用哌啶从 (Fmoc-7) 中去除Fmoc保护(以获得化合物7), 随后在活化剂和碱的存在下使(化合物7)与己二酸偶联, 以获得



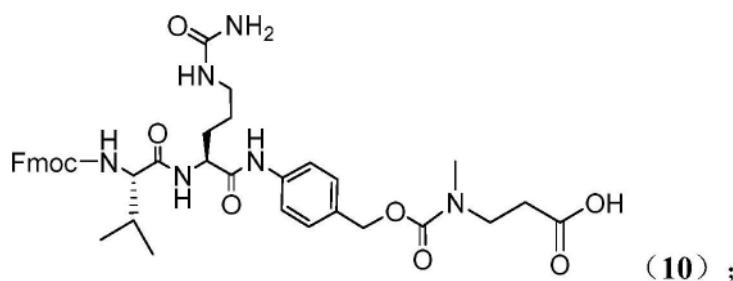
在活化剂和碱的存在下,将化合物8暴露于N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)以获得所述化合物(1)。

8. 一种制备具有下式的化合物或其药学上可接受的盐的方法

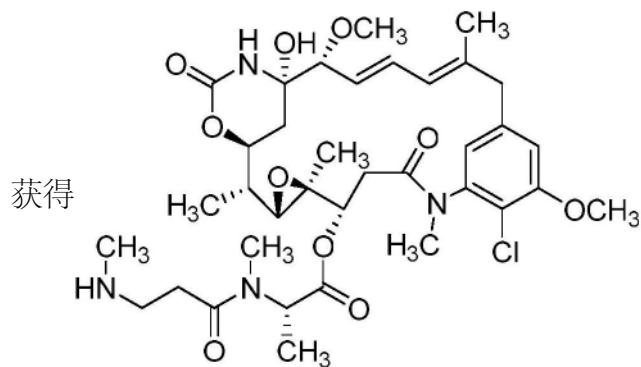


所述方法包括以下步骤:

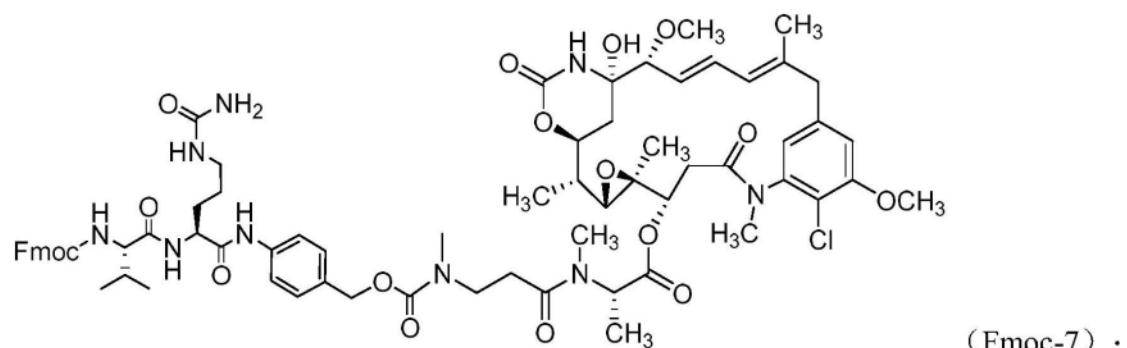
a) 将 暴露于活化的酯 Fmoc - Val - Cit - PAB - PNPC , 以获得



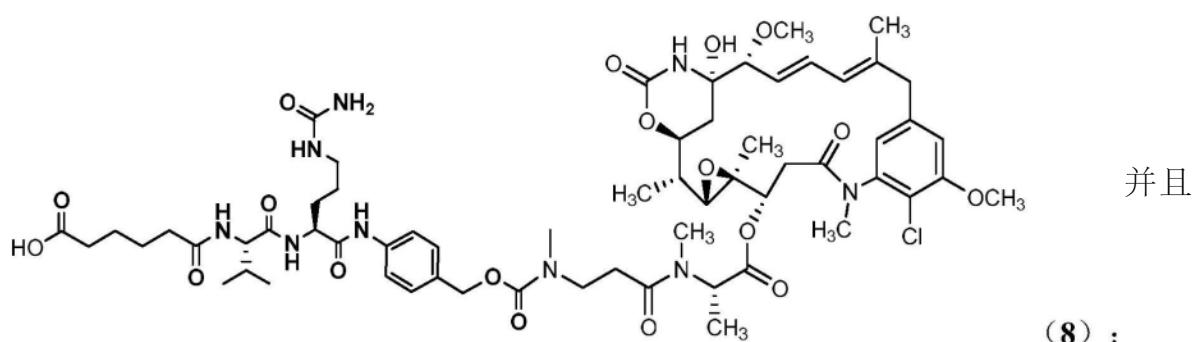
b) 使用哌啶从 中去除Fmoc保护,以



c) 在活化剂和碱的存在下, 将化合物(10)暴露于化合物(6), 以获得

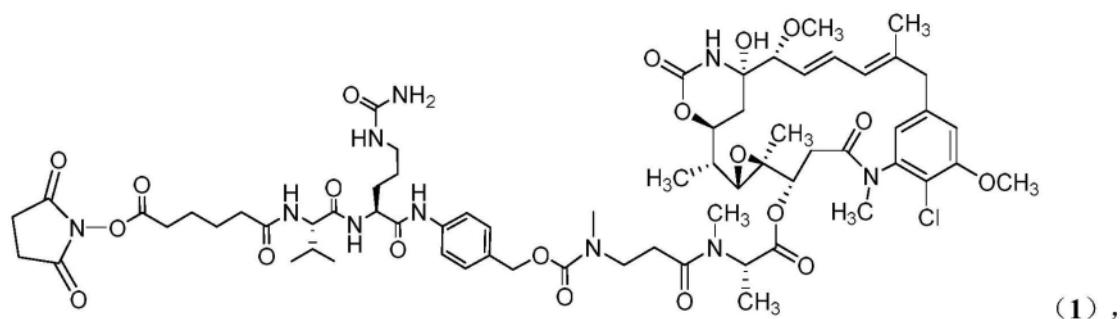


d) 使用哌啶从(Fmoc-7)中去除Fmoc保护(以获得化合物7), 随后在活化剂和碱的存在下使(化合物7)与己二酸偶联, 以获得化合物(8)

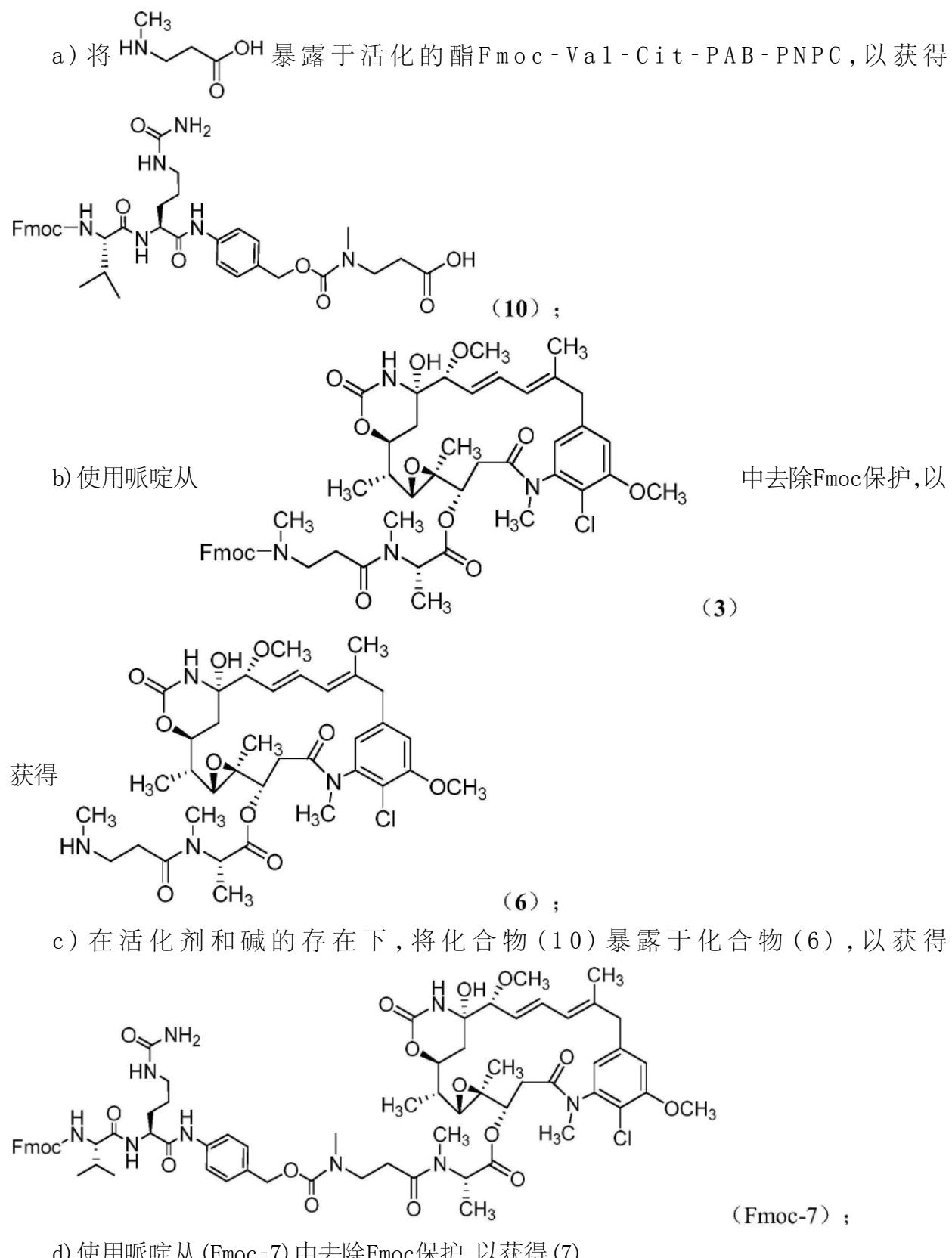


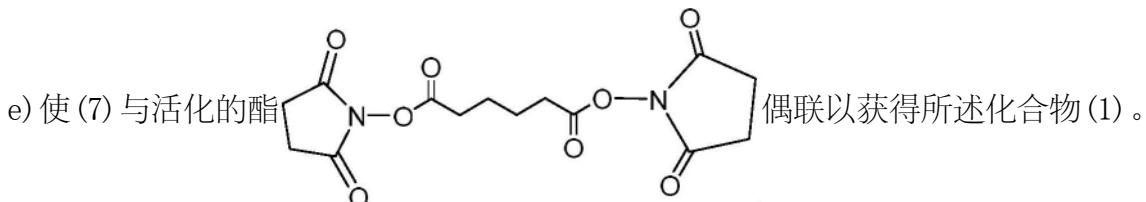
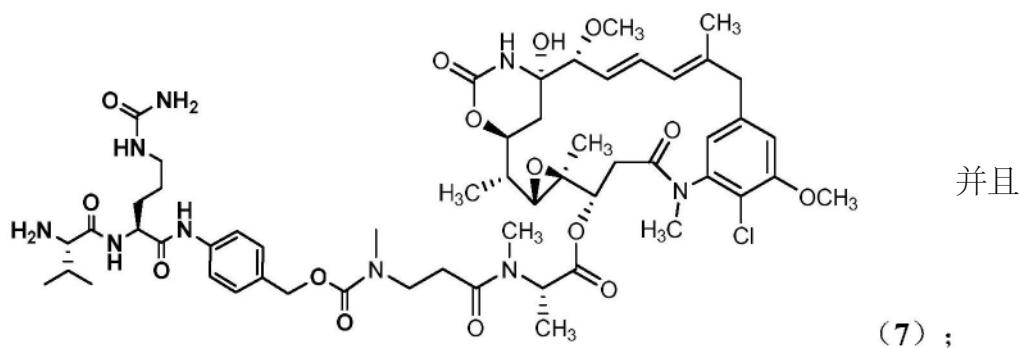
e) 在活化剂和碱的存在下, 将化合物8暴露于N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)以获得所述化合物(1)。

9. 一种制备具有下式的化合物或其药学上可接受的盐的方法



所述方法包括以下步骤:





10. 根据权利要求7-9中任一项所述的方法制备的产品。

## 与MET结合的抗MET抗体、双特异性抗原结合分子及其使用方法

[0001] 本申请是申请号为201780083546.X、申请日为2017年11月15日、发明名称为“与MET结合的抗MET抗体、双特异性抗原结合分子及其使用方法”的中国发明专利申请的分案申请,原申请为国际申请号为PCT/US2017/061757的国家阶段申请,该国际申请要求申请日为2016年11月16日、申请号为62/423,068的美国临时专利申请和申请日为2017年3月31日、申请号为62/479,516的美国临时专利申请的优先权。

### 发明领域

[0002] 本发明涉及特异性结合肝细胞生长因子受体 (c-Met或MET) 并调节MET信号转导的抗体、双特异性抗体及其抗原结合片段,以及这些抗体的抗体-药物偶联物,及其使用方法。

### 背景技术

[0003] 肝细胞生长因子 (HGF) (也称为离散因子 [SF]) 是异二聚体旁分泌生长因子,其通过与HGF受体 (HGFR) 相互作用而发挥其活性。HGFR是c-Met癌基因的产物,也称为MET。MET是一种受体酪氨酸激酶,由细胞外 $\alpha$ 链通过二硫桥键连接到跨膜 $\beta$ 链组成。HGF与MET的结合激活MET的激酶催化活性,导致 $\beta$ 链的Tyr 1234和Tyr 1235的磷酸化以及随后的下游信号传导通路的激活。

[0004] MET和/或HGF过表达、激活或扩增已被证明与非小细胞肺癌 (NSCLC) 、胃癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状腺癌、乳腺癌、头颈癌、结肠癌和肾癌有关 (Sierra和Tsao, Ther. Adv. Med. Oncol., 3 (1增刊) :S21-S35, 2011)。MET扩增被认为是NSCLC和食管胃恶性肿瘤中肿瘤发生的关键驱动因素。此外,导致MET外显子14缺失的突变已被描述为NSCLC的一个亚组中的致癌驱动因素。具有MET基因扩增的肿瘤细胞系的生长和存活高度依赖于MET。临床前数据提示,MET信号传导参与了多种肿瘤类型如NSCLC、结肠直肠癌和头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 对靶向疗法的抗药性。

[0005] 临床前和最近的临床结果均表明,携带这些基因改变的肿瘤对MET抑制剂有反应,证实MET是癌症驱动因素。各种单价MET阻断抗体正在临床开发中用于治疗各种癌症(参见美国专利号5,686,292;5,646,036;6,099,841;7,476,724;9,260,531;和9,328,173;以及美国专利申请公开号2014/0349310和2005/0233960)。那些抗体包括奥那妥珠单抗 (onartuzumab) (MetMab) 和艾碧妥珠单抗 (emibetuzumab) (Xiang等,Clin. Cancer Res. 19 (18) :5068-78, 2013和Rosen等,Clin. Cancer Res., 2016年10月10日公布,doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1418)。这些抗体中的一些阻断配体依赖性MET信号传导,但不太能有效阻断配体非依赖性的MET激活。

[0006] 仍然存在对改进的抗癌药物的显著未满足的医学需求,所述抗癌药物有效地阻断配体依赖性和配体非依赖性MET信号传导。

[0007] 发明简述

[0008] 本文提供结合人c-Met受体蛋白的抗体、抗体的抗原结合片段、二价单特异性抗体

的组合和双特异性抗体 (MET x MET)。所述抗体尤其可用于靶向表达MET的肿瘤细胞。抗MET抗体及其抗原结合部分可以以未修饰的形式单独使用,或者可以作为抗体-药物缀合物或双特异性抗体的一部分包括在内。

[0009] 通过审阅随后的详细描述,其他实施方案将变得显而易见。

[0010] 附图简述

[0011] 图1是说明本文公开的272种示例性MET x MET双特异性抗体的组分的矩阵。矩阵的每个编号单元表示包含“D1”抗原结合结构域和“D2”抗原结合结构域的独特双特异性抗体,其中所述D1抗原结合结构域包含来自沿Y轴列出的相应抗MET抗体的免疫球蛋白可变结构域 (HCVR/LCVR氨基酸序列对) 或CDR,并且其中所述D2抗原结合结构域包含来自沿X轴列出的相应抗MET抗体的免疫球蛋白可变结构域 (HCVR/LCVR氨基酸序列对) 或CDR。

[0012] 图2是基于荧光素酶的报告分子测定的示意图,所述测定用于评估在含有SRE-荧光素酶报告基因构建体的HEK293T细胞中,抗体诱导的MET通路激活或抗体对HGF诱导的通路激活的阻断作用。

[0013] 图3(A-B)是描绘相对光度单位 (RLU) 的线图,其表示随着抗体浓度 (log摩尔每升) 而改变的SRE-荧光素酶表达。实心方块 (■) 代表亲本二价单特异性抗体H4H13306P2,实心金字塔 (▲) 代表亲本二价单特异性抗体H4H13312P2,实心圆 (●) 代表单价抗体,实心菱形 (◆) 代表同种型对照,实心倒金字塔 (▼) 代表无配体。图3A描绘了只有抗体而不含HGF配体的情况。图3B描绘了抗体加HGF配体。

[0014] 图4(A-B)是描绘相对光度单位 (RLU) 的线图,其表示随着抗体浓度 (log摩尔每升) 而改变的SRE-荧光素酶表达。实心方块 (■) 代表抗MET单价抗体,实心圆 (●) 代表MET x MET双特异性抗体,实心菱形 (◆) 代表亲本抗体H4H13312P2。图4A描绘了只有抗体而不含HGF配体的情况。图4B描绘了抗体加HGF配体。

[0015] 图5是条形图,其描绘了随着用人二价单特异性抗MET抗体1-18、对照抗体和抗MET单价抗体的处理而改变的MET扩增的胃癌SNU5细胞的相对细胞生长。出于比较目的,抗体8 (横坐标) 是亲本抗体H4H13306P2,抗体11 (横坐标) 是亲本抗体H4H13312P2。

[0016] 图6 (A-B) 含有条形图,其描绘了随着用MET x MET双特异性抗体、对照抗体和抗MET单价抗体的处理而改变的MET扩增的细胞的相对细胞生长。图6A描绘了SNU5细胞的相对生长,其随着用对照抗体、0.1、1和10 $\mu$ g/mL的单价抗体和0.1、1和10 $\mu$ g/mL的MET x MET双特异性抗体的处理而改变。图6B描绘了EBC-1细胞的相对生长,其随着用对照抗体和0.1和1 $\mu$ g/mL的MET x MET双特异性抗体的处理而改变。

[0017] 图7(A-B)描绘了用对照抗体和MET x MET双特异性抗体处理后从Hs746T细胞提取的pMET (磷酸化MET)、MET、pErk (磷酸化Erk) 和微管蛋白 (用于上样对照) 的免疫印迹 (图7A),和用MET x MET双特异性抗体处理0、2和6小时后,Hs746T细胞中MET (和微管蛋白作为上样对照) 的表达 (图7B)。

[0018] 图8描绘了用对照抗体、MET x MET双特异性抗体、抗MET单特异性二价亲本抗体1、抗MET单特异性二价亲本抗体2和亲本抗体1和2的组合处理后,从Hs746T细胞提取的pMET、MET、pErk和微管蛋白 (用于上样对照) 的免疫印迹。

[0019] 图9描绘了用对照抗体和MET x MET双特异性抗体处理2、6和18小时后,Hs746T细胞中MET (和微管蛋白作为上样对照) 的表达的免疫印迹。

[0020] 图10(A-B)描绘了用对照抗体和MET x MET双特异性抗体处理后,从SNU5细胞提取的pMET、MET、pErk和微管蛋白(用于上样对照)的免疫印迹(图10A);和用对照抗体和抗MET单价抗体处理后,SNU5细胞中MET(和微管蛋白作为上样对照)的表达(图10B)。

[0021] 图11描绘了用对照抗体和MET x MET双特异性抗体处理后从EBC-1细胞提取的pMET、MET、pErk和微管蛋白(用于上样对照)的免疫印迹。

[0022] 图12是描绘在用对照抗体(实心方块■)、MET单价抗体(实心圆●)或MET x MET双特异性抗体(实心菱形◆)处理的动物中植入EBC-1细胞后,EBC-1肿瘤体积(立方毫米)随时间(天)的变化的线图。

[0023] 图13(A-B)含有条形图,其描绘了随着用MET x MET双特异性抗体、对照抗体和抗MET单价抗体的处理而改变的MET扩增的细胞的相对细胞生长。图13A描绘了Hs746T细胞的相对生长,其随着用对照抗体、MET x MET双特异性抗体、MET x MET亲本单特异性抗体1、MET x MET亲本单特异性抗体2和亲本抗体1和2的组合的处理而改变。图13B描绘了Hs746T细胞的相对生长,其随着用对照抗体、1、10及25 $\mu$ g/mL的单价抗体以及1、10及25 $\mu$ g/mL的MET x MET双特异性抗体的处理而改变。

[0024] 图14是条形图,其描绘了随着用对照抗体(C)、MET x MET双特异性抗体(MM)、MET x MET亲本单特异性抗体1(M1)、MET x MET亲本单特异性抗体2(M2)、亲本抗体1和2的组合(M1M2)以及MET激动剂肝细胞生长因子(HGF)的处理而改变的NCI-H596细胞的相对细胞生长。

[0025] 图15是描绘在用对照抗体(实心方块■)、MET单价抗体(实心圆●)或MET x MET双特异性抗体(实心菱形◆)处理的动物中植入Hs746T细胞后,Hs746T肿瘤体积(立方毫米)随时间(天)的变化的线图。

[0026] 图16A是描绘在用对照抗体(实心方块■)、1mg/mL的MET单价抗体(实心圆●)、10mg/mL的MET单价抗体(空心圆○)、1mg/mL的MET x MET双特异性抗体(实心菱形◆)或10mg/mL的MET x MET双特异性抗体(空心菱形◇)处理的动物中植入SNU5细胞后,SNU5肿瘤体积(立方毫米)随时间(天)的变化的线图。

[0027] 图16B是用对照抗体、10mg/kg的抗MET单价抗体和10mg/kg的MET x MET双特异性抗体处理后从小鼠异种移植模型中取出的SNU5肿瘤中提取的pMET、MET和微管蛋白(上样对照)的免疫印迹。

[0028] 图17是描绘在用对照抗体(实心方块■)、MET单价抗体(实心圆●)或MET x MET双特异性抗体(实心菱形◆)处理的动物中植入U87-MG细胞后,U87-MG肿瘤体积(立方毫米)随时间(天)的变化的线图。

[0029] 图18是描绘在用对照抗体(实心方块■)、MET单价抗体(实心圆●)或MET x MET双特异性抗体(空心菱形◇)处理的动物中植入U118-MG细胞后,U118-MG肿瘤体积(立方毫米)随时间(天)的变化的线图。

[0030] 图19是说明美登木素生物碱6的合成的示意图。

[0031] 图20是说明美登木素生物碱中间体1的合成的示意图。

[0032] 发明详述

[0033] 在描述本发明之前,应理解本发明不限于所述的特定方法和实验条件,因为这些方法和条件可以变化。还应理解,本文所用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,而无意

进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0034] 除非另有定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。如本文所用,术语“约”,当用于提及具体列举的数值时,意指值可以与列举值相差不超过1%。例如,如本文所用,表述“约100”包括99和101以及它们之间的所有值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0035] 尽管与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料可用于本发明的实践或测试,但现在描述优选的方法和材料。本说明书中提及的所有专利、申请和非专利出版物均通过引用整体并入本文。

[0036] MET蛋白

[0037] 本文所用的表述“MET”、“c-Met”等是指人膜跨越受体酪氨酸激酶,其包含(1) SEQ ID NO:145所示的氨基酸序列,和/或具有NCBI登录号NM\_001127500.2所示的氨基酸序列,代表同种型“a”的未加工的前原蛋白,(2) SEQ ID NO:146所示的氨基酸序列,和/或具有NCBI登录号NM\_000236.2所示的氨基酸序列,代表同种型“b”的未加工的前原蛋白,(3) SEQ ID NO:147所示的氨基酸序列,和/或具有NCBI登录号NM\_001311330.1所示的氨基酸序列,代表同种型“c”的未加工的前原蛋白,和/或(3)包含所有三种同种型共有的细胞质 $\alpha$ 亚基(SEQ ID NO:148)和跨膜 $\beta$ 亚基(分别为同种型a、b和c的SEQ ID NO:149、150或151)的成熟蛋白质。表述“MET”包括单体和多聚体MET分子。如本文所用,表述“单体人MET”是指不含或不具有任何多聚化结构域,并且在正常条件下作为单个MET分子存在而不与另一MET分子直接物理连接的MET蛋白或其部分。示例性单体MET分子是本文中称为“hMET.mmh”的分子,其包含SEQ ID NO:152的氨基酸序列(参见例如,本文实施例3)。如本文所用,表述“二聚体人MET”是指包含两个MET分子的构建体,所述两个MET分子通过接头、共价键、非共价键或通过多聚化结构域如抗体Fc结构域彼此连接。示例性二聚体MET分子是本文中称为“hMET.mFc”的分子,其包含SEQ ID NO:153的氨基酸序列(参见例如,本文实施例3)。

[0038] 本文对蛋白质、多肽和蛋白质片段的所有提及旨在表示相应蛋白质、多肽或蛋白质片段的人类形式,除非明确指出其来自非人类物种。因此,表述“MET”表示人MET,除非指定来自非人物种,例如“小鼠MET”、“猴子MET”等。

[0039] 如本文所用,表述“细胞表面表达的MET”是指在体外或体内在细胞表面上表达的一种或多种MET蛋白或其细胞外结构域,使得至少一部分MET蛋白暴露于细胞膜的细胞外侧,并且可接近抗体的抗原结合部分。“细胞表面表达的MET”可以包含在通常表达MET蛋白的细胞表面上表达的MET蛋白或由其组成。或者,“细胞表面表达的MET”可以包含在细胞表面上表达的MET蛋白或由其组成,所述细胞通常在其表面上不表达人MET,但是已经人工工程化以在其表面上表达MET。

[0040] 抗MET抗体及其抗原结合片段

[0041] 根据一个方面,提供了抗MET抗体(例如,单特异性抗MET抗体)。根据这一方面的示例性抗MET抗体列于本文的表1和2中。表1列出了可以衍生出本文公开的双特异性抗原结合分子(在本文中可与双特异性抗原结合蛋白互换使用)的示例性抗MET抗体的重链可变区(HCVR)、轻链可变区(LCVR)、重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3)和轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)的氨基酸序列标识符。表2列出了示例性抗MET抗体的HCVR、LCVR、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的核酸序列标识符。

[0042] 本发明还提供了特异性结合MET并激动(例如,激活)细胞中MET信号传导通路的抗体或其抗原结合片段,以及此类抗体在治疗环境中的用途,其中MET信号传导的激活将是有益的或治疗上有用的。此类激动剂抗MET抗体的非限制性实例包括本文称为“H4H14636D”的抗体,以及包含重链和轻链CDR (SEQ ID NO:28、30、32、140、142、144) 和/或其重链和轻链可变结构域 (SEQ ID NO:26/138) 的抗体及其抗原结合片段。

[0043] 本发明提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含HCVR,所述HCVR包含选自表1中列出的任何HCVR氨基酸序列的氨基酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0044] 本发明提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含LCVR,所述LCVR包含选自表1中列出的任何LCVR氨基酸序列的氨基酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0045] 本发明提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含HCVR和LCVR氨基酸序列对 (HCVR/LCVR) ,所述序列对包含表1中列出的任何HCVR氨基酸序列与表1中列出的任何LCVR氨基酸序列的配对。根据某些实施方案,抗体或其抗原结合片段包含表1中列出的任何示例性抗MET抗体中所含的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在某些实施方案中,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自下组:SEQ ID NO:2/138、10/138、18/138、26/138、34/138、42/138、50/138、58/138、66/138、74/138、82/138、90/138、98/138、106/138、114/138、122/138和130/138。

[0046] 本发明还提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含重链CDR1 (HCDR1) ,所述HCDR1包含选自表1中列出的任何HCDR1氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0047] 本发明还提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含重链CDR2 (HCDR2) ,所述HCDR2包含选自表1中列出的任何HCDR2氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0048] 本发明还提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含重链CDR3 (HCDR3) ,所述HCDR3包含选自表1中列出的任何HCDR3氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0049] 本发明还提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含轻链CDR1 (LCDR1) ,所述LCDR1包含选自表1中列出的任何LCDR1氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0050] 本发明还提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR1和LCDR1氨基酸序列对 (HCDR1/LCDR1) ,所述序列对包含表1中列出的任何HCDR1氨基酸序列与表1中列出的任何LCDR1氨基酸序列的配对。根据某些实施方案,抗体或其抗原结合片段包含表1中列出的任何示例性抗MET抗体中所含的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。在某些实施方案中, HCDR1/LCDR1氨基酸序列对选自下组:SEQ ID NO:4/140、12/140、20/140、28/140、36/140、44/140、52/140、60/140、68/140、76/140、84/140、92/140、100/140、108/140、116/140、124/140和132/140。

[0051] 本发明还提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含轻链CDR2 (LCDR2) ,所述LCDR2包含选自表1中列出的任何LCDR2氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有

至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0052] 本发明还提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR2和LCDR2氨基酸序列对(HCDR2/LCDR2),所述序列对包含表1中列出的任何HCDR2氨基酸序列与表1中列出的任何LCDR2氨基酸序列的配对。根据某些实施方案,抗体或其抗原结合片段包含表1中列出的任何示例性抗MET抗体中所含的HCDR2/LCDR2氨基酸序列对。在某些实施方案中, HCDR2/LCDR2氨基酸序列对选自下组:SEQ ID NO:6/142、14/142、22/142、30/142、38/142、46/142、54/142、62/142、70/142、78/142、86/142、94/142、102/142、110/142、118/142、126/142和134/142。

[0053] 本发明还提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含轻链CDR3(LCDR3),所述LCDR3包含选自表1中列出的任何LCDR3氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0054] 本发明还提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR3和LCDR3氨基酸序列对(HCDR3/LCDR3),所述序列对包含表1中列出的任何HCDR3氨基酸序列与表1中列出的任何LCDR3氨基酸序列的配对。根据某些实施方案,抗体或其抗原结合片段包含表1中列出的任何示例性抗MET抗体中所含的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。在某些实施方案中, HCDR3/LCDR3氨基酸序列对选自下组:SEQ ID NO:8/144、16/144、24/144、32/144、40/144、48/144、56/144、64/144、72/144、80/144、88/144、96/144、104/144、112/144、120/144、128/144和136/144。

[0055] 本发明还提供了特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段,其包含表1中列出的任何示例性抗MET抗体中所含的一组六个CDR(即,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)。在某些实施方案中,所述HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组选自下组:SEQ ID NO:4-6-8-140-142-144、12-14-16-140-142-144、20-22-24-140-142-144、28-30-32-140-142-144、36-38-40-140-142-144、44-44-48-140-142-144、52-54-56-140-142-144、60-62-64-140-142-144、68-70-72-140-142-144、76-78-80-140-142-144、84-86-88-140-142-144、92-94-96-140-142-144、100-102-104-140-142-144、108-110-112-140-142-144、116-118-120-140-142-144、124-126-128-140-142-144和132-134-136-140-142-144。

[0056] 在相关实施方案中,特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段包含由表1中列出的任何示例性抗MET抗体所定义的HCVR/LCVR氨基酸序列对内所含的一组六个CDR(即,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)。例如,特异性结合MET的抗体或其抗原结合片段包含HCVR/LCVR氨基酸序列对内所含的HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组,其选自下组:SEQ ID NO:4-6-8-140-142-144、12-14-16-140-142-144、20-22-24-140-142-144、28-30-32-140-142-144、36-38-40-140-142-144、44-44-48-140-142-144、52-54-56-140-142-144、60-62-64-140-142-144、68-70-72-140-142-144、76-78-80-140-142-144、84-86-88-140-142-144、92-94-96-140-142-144、100-102-104-140-142-144、108-110-112-140-142-144、116-118-120-140-142-144、124-126-128-140-142-144和132-134-136-140-142-144。

[0057] 用于鉴定HCVR和LCVR氨基酸序列内的CDR的方法和技术是本领域熟知的,并且可用于鉴定本文公开的指定HCVR和/或LCVR氨基酸序列内的CDR。可用于鉴定CDR的边界的示例性规则包括例如Kabat定义、Chothia定义和AbM定义。一般而言,Kabat定义基于序列可变

性,Chothia定义基于结构环区域的位置,AbM定义是Kabat和Chothia方法之间的折衷。参见例如,Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani等, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); 和Martin等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989)。公共数据库也可用于鉴定抗体内的CDR序列。

[0058] 本发明还提供了编码抗MET抗体或其部分的核酸分子。例如,本发明提供了编码表1中列出的任何HCVR氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的任何HCVR核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0059] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCVR氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的任何LCVR核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0060] 本发明还提供了编码表1中列出的任何HCDR1氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的任何HCDR1核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0061] 本发明还提供了编码表1中列出的任何HCDR2氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的任何HCDR2核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0062] 本发明还提供了编码表1中列出的任何HCDR3氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的任何HCDR3核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0063] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCDR1氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的任何LCDR1核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0064] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCDR2氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的任何LCDR2核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0065] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCDR3氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的任何LCDR3核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0066] 本发明还提供了编码HCVR的核酸分子,其中所述HCVR包含一组三个CDR(即,HCDR1-HCDR2-HCDR3),其中所述HCDR1-HCDR2-HCDR3氨基酸序列组如表1中列出的任何示例性抗MET抗体所定义。

[0067] 本发明还提供了编码LCVR的核酸分子,其中所述LCVR包含一组三个CDR(即,LCDR1-LCDR2-LCDR3),其中所述LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组如表1中列出的任何示例性抗MET抗体所定义。

[0068] 本发明还提供了编码HCVR和LCVR的核酸分子,其中所述HCVR包含表1中列出的任何HCVR氨基酸序列的氨基酸序列,并且其中所述LCVR包含表1中列出的任何LCVR氨基酸序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述核酸分子包含选自表2中列出的任何HCVR核酸序

列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列,和选自表2中列出的任何LCVR核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。在根据此方面的某些实施方案中,所述核酸分子编码HCVR和LCVR,其中所述HCVR和LCVR均衍生自表1中列出的相同抗MET抗体。

[0069] 本发明还提供了能够表达包含抗MET抗体的重链或轻链可变区的多肽的重组表达载体。例如,重组表达载体包含上述任何核酸分子,即编码表1中列出的任何HCVR、LCVR和/或CDR序列的核酸分子。在本公开范围内还包括引入了这些载体的宿主细胞,以及通过在允许产生抗体或抗体片段的条件下培养宿主细胞来产生所述抗体或其部分的方法,以及回收如此产生的抗体和抗体片段的方法。

[0070] 本发明提供了具有修饰的糖基化模式的抗MET抗体。在一些实施方案中,可以使用修饰以去除不期望的糖基化位点,或者在寡糖链上缺乏岩藻糖部分的抗体,例如,以增加抗体依赖性细胞毒性(ADCC)功能(参见Shield等(2002)JBC 277:26733)。在其他应用中,可以进行半乳糖基化的修饰以改变补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0071] MET x MET双特异性抗原结合分子

[0072] 本发明人已观察到,阻断HGF与MET结合的某些单特异性抗MET抗原结合分子可能会强烈激活MET信号传导(这对治疗分子而言是不良后果)。然而,本发明人惊奇地发现,同时结合MET蛋白细胞外结构域上的两个独立表位的双特异性抗原结合分子可有效阻断配体与MET的结合,同时几乎不引起MET信号传导的激动作用。

[0073] 因此,本发明提供了双特异性抗原结合分子,其包含第一抗原结合结构域(在本文中也称为“D1”)和第二抗原结合结构域(在本文中也称为“D2”)。通过双特异性抗原结合分子同时结合两个单独的MET表位导致有效的配体阻断,同时MET信号传导的激活最小。

[0074] 双特异性抗原结合分子,其包含特异性结合人MET的第一表位的第一抗原结合结构域(D1)和特异性结合人MET的第二表位的第二抗原结合结构域(D2),可以在本文中被称为“MET x MET双特异性抗体”、“MET x MET”或其他相关术语。在一些实施方案中,人MET的第一表位包含SEQ ID N0:155的第192-204位氨基酸。在一些实施方案中,人MET的第二表位包含SEQ ID N0:155的第305-315位氨基酸和第421-455位氨基酸。在一些实施方案中,人MET的第一表位包含SEQ ID N0:155的第192-204位氨基酸;人MET的第二表位包含SEQ ID N0:155的第305-315位氨基酸和第421-455位氨基酸。

[0075] 在某些实施方案中,MET x MET双特异性抗体的D1和D2结构域彼此不竞争。D1和D2之间对MET结合的不竞争意味着,D1和D2衍生的各个单特异性抗原结合蛋白彼此之间不竞争结合人MET。示例性抗原结合蛋白竞争测定是本领域已知的,其非限制性实例在本文其他地方描述。

[0076] 在某些实施方案中,D1和D2结合MET上的不同(例如,非重叠或部分重叠)表位,如本文其他地方所述。

[0077] 可以使用两种单独的单特异性抗MET抗体的抗原结合结构域构建MET x MET双特异性抗原结合分子。例如,可以使用本领域已知的标准方法产生单克隆单特异性抗MET抗体的集合。由此产生的各个抗体可以彼此成对测试与MET蛋白的交叉竞争。如果两种不同的抗MET抗体能够同时与MET结合(即,不相互竞争),那么可以将来自第一抗MET抗体的抗原结合

结构域和来自第二非竞争性的抗MET抗体的抗原结合结构域进行改造,得到如本发明所述的单个MET x MET双特异性抗体。

[0078] 根据本公开,双特异性抗原结合分子可以是单个多功能多肽,或者它可以是两个或更多个彼此共价或非共价缔合的多肽的多聚体复合物。通过本公开内容可以明显知道,任何能够同时结合MET分子的两个独立、不相同表位的抗原结合构建体,均被认为是双特异性抗原结合分子。如本领域普通技术人员已知的,可以使用标准分子生物学技术(例如,重组DNA和蛋白质表达技术)构建本发明所述的任何双特异性抗原结合分子或其变体。

[0079] **抗原结合结构域**

[0080] 本公开的双特异性抗原结合分子包含两个单独的抗原结合结构域(D1和D2)。如本文所用,表述“抗原结合结构域”是指能够特异性结合特定目标抗原(例如,人MET)的任何肽、多肽、核酸分子、支架型分子、肽展示分子或含多肽的构建体。如本文所用,术语“特异性结合”等意指抗原结合结构域与特定抗原形成复合物,其特征在于解离常数( $K_D$ )为500pM或更低,并且在普通测试条件下不结合其他不相关抗原。“不相关抗原”是彼此具有小于95%氨基酸同一性的蛋白质、肽或多肽。

[0081] 可以在本公开的上下文中使用的抗原结合结构域的示例性类别包括抗体、抗体的抗原结合部分、与特定抗原特异性相互作用的肽(例如,肽体)、与特定抗原特异性相互作用的受体分子、包含特异性结合特定抗原的受体的配体结合部分的蛋白质、抗原结合支架(例如,DARPins、HEAT重复蛋白、ARM重复蛋白、三十四肽重复蛋白和基于天然存在的重复蛋白的其他支架等[参见例如,Boersma和Pluckthun,2011,Curr.Opin.Biotechnol.22:849-857,以及其中引用的参考文献]),以及适体或其部分。

[0082] 用于确定两个分子是否彼此特异性结合的方法是本领域公知的,包括例如平衡透析、表面等离子体共振等。例如,如在本公开的上下文中使用的,抗原结合结构域包括结合特定抗原(例如,靶分子[T]或内化效应蛋白[E])或其部分的多肽,其中如在表面等离子体共振测定中测量的, $K_D$ 小于约500pM、小于约400pM、小于约300pM、小于约200pM、小于约100pM、小于约90pM、小于约80pM、小于约70pM、小于约60pM、小于约50pM、小于约40pM、小于约30pM、小于约20pM、小于约10pM、小于约5pM、小于约4pM、小于约2pM、小于约1pM、小于约0.5pM、小于约0.2pM、小于约0.1pM或小于约0.05pM。

[0083] 如本文所用,术语“表面等离子体共振”是指一种光学现象,其允许通过检测生物传感器基质内的蛋白质浓度的变化来分析实时相互作用,例如使用BIAcore<sup>TM</sup>系统(Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ)。

[0084] 如本文所用,术语“ $K_D$ ”是指特定蛋白质-蛋白质相互作用(例如,抗体-抗原相互作用)的平衡解离常数。除非另有说明,否则本文公开的 $K_D$ 值是指在25°C下通过表面等离子体共振测定法测定的 $K_D$ 值。

[0085] 如上所述,“抗原结合结构域”(D1和/或D2)可包含抗体或抗体的抗原结合片段或由其组成。如本文所用,术语“抗体”意指包含至少一个与特定抗原(例如人MET)特异性结合或相互作用的互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包括免疫球蛋白分子,其包含通过二硫键相互连接的四条多肽链,两条重(H)链和两条轻(L)链,以及其多聚体(例如IgM)。每条重链包含重链可变区(本文缩写为HCVR或V<sub>H</sub>)和重链恒定区。所述重链恒定区包含三个结构域C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为LCVR或

$V_L$ ) 和轻链恒定区。所述轻链恒定区包含一个结构域 ( $C_L$ 1)。 $V_H$  和  $V_L$  区可以进一步细分为高变区, 称为互补决定区 (CDR), 穿插有更保守的区域, 称为框架区 (FR)。每个  $V_H$  和  $V_L$  由三个CDR和四个FR组成, 从氨基端到羧基端按照以下顺序排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在不同的实施方案中, 本发明提供的抗体 (或其抗原结合部分) 的FR可以与人种系序列相同, 或者可以是天然的或人工修饰的。可以基于两个或更多个CDR的并列分析来定义氨基酸共有序列。

[0086] 本发明提供的双特异性抗原结合分子的D1和/或D2组分可包含全抗体分子的抗原结合片段或由其组成。如本文所用, 术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程化的多肽或糖蛋白, 其特异性结合抗原形成复合物。抗体的抗原结合片段可以例如使用任何合适的标准技术从完整抗体分子衍生, 例如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变结构域和任选地恒定结构域的DNA的重组基因工程技术。这种DNA是已知的和/或容易从例如商业来源、DNA文库 (包括例如噬菌体-抗体文库) 获得, 或可以合成。DNA可以通过化学方法或通过使用分子生物学技术进行测序和操纵, 例如, 将一个或多个可变和/或恒定结构域排列成合适的构型, 或引入密码子, 产生半胱氨酸残基, 修饰、添加或删除氨基酸等。

[0087] 抗原结合片段的非限制性实例包括: (i) Fab片段; (ii)  $F(ab')$ 2片段; (iii) Fd片段; (iv) Fv片段; (v) 单链Fv (scFv) 分子; (vi) dAb片段; 和 (vii) 由模拟抗体高变区 (例如, 分离的互补决定区 (CDR), 例如CDR3肽) 或受约束的FR3-CDR3-FR4肽的氨基酸残基组成的最小识别单位。其他工程化分子, 如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR接枝抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体 (例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块化免疫药物 (SMIP) 和鲨鱼可变IgNAR结构域也包括在本文所用的表述“抗原结合片段”内。

[0088] 抗体的抗原结合片段通常包含至少一个可变结构域。所述可变结构域可以具有任何大小或氨基酸组成, 并且通常包含至少一个CDR, 其与一个或多个框架序列相邻或在框内。在具有  $V_H$  结构域与  $V_L$  结构域缔合的抗原结合片段中,  $V_H$  和  $V_L$  结构域可以相对于彼此以任何合适的排列定位。例如, 可变区可以是二聚体并含有  $V_H-V_H$ 、 $V_H-V_L$  或  $V_L-V_L$  二聚体。或者, 抗体的抗原结合片段可含有单体  $V_H$  或  $V_L$  结构域。

[0089] 在某些实施方案中, 抗体的抗原结合片段可含有与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。在本公开的抗体的抗原结合片段内可以有的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括: (i)  $V_H-C_H$ 1; (ii)  $V_H-C_H$ 2; (iii)  $V_H-C_H$ 3; (iv)  $V_H-C_H$ 1- $C_H$ 2; (v)  $V_H-C_H$ 1- $C_H$ 2- $C_H$ 3; (vi)  $V_H-C_H$ 2- $C_H$ 3; (vii)  $V_H-C_L$ ; (viii)  $V_L-C_H$ 1; (ix)  $V_L-C_H$ 2; (x)  $V_L-C_H$ 3; (xi)  $V_L-C_H$ 1- $C_H$ 2; (xii)  $V_L-C_H$ 1- $C_H$ 2- $C_H$ 3; (xiii)  $V_L-C_H$ 2- $C_H$ 3; 和 (xiv)  $V_L-C_L$ 。在可变结构域和恒定结构域的任何构型中, 包括上文列出的任何示例性构型, 可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接, 或可以通过完整或部分铰链或连接区连接。铰链区可以由至少2个 (例如, 5、10、15、20、40、60或更多个) 氨基酸组成, 其得到在单个多肽分子中在相邻的可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外, 抗原结合片段可以包含上文列出的任何可变结构域和恒定结构域构型彼此非共价结合, 和/或与一个或多个单体  $V_H$  或  $V_L$  结构域非共价结合 (例如, 通过二硫键) 形成的同二聚体或异二聚体 (或其他多聚体)。

[0090] 本发明提供的双特异性抗原结合分子可包含人抗体和/或重组人抗体或其片段,

或由人抗体和/或重组人抗体或其片段组成。如本文所用,术语“人抗体”包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。尽管如此,人抗体还可在例如CDR中,特别是在CDR3中,包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所用,术语“人抗体”不旨在包括其中衍生自另一种哺乳动物物种如小鼠种系的CDR序列已经移植到人框架序列上的抗体。

[0091] 本公开的双特异性抗原结合分子可包含重组人抗体或其抗原结合片段或由重组人抗体或其抗原结合片段组成。如本文所用,术语“重组人抗体”旨在包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(下文进一步描述),从重组的组合人抗体文库中分离的抗体(下文进一步描述),从人免疫球蛋白基因的转基因动物(例如小鼠)分离的抗体(参见例如Taylor等(1992)Nucl. Acids Res. 20:6287-6295)或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,对此类重组人抗体进行体外诱变(或者,当使用人Ig序列的转基因动物时,进行体内体细胞诱变),并因此导致重组抗体的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区的氨基酸序列虽然是衍生自人种系V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>序列并与之相关的序列,但是其在体内可能不天然存在于人抗体种系库中。

[0092] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的,并且可以用于构建本发明公开的双特异性抗原结合分子。可以在本公开的上下文中使用的示例性双特异性形式包括但不限于例如基于scFv或双抗体双特异性形式、IgG-scFv融合、双可变结构域(DVD)-Ig、四源杂交瘤(Quadroma)、孔洞结构(knobs-into-holes)、共同轻链(例如,带有孔洞结构的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED) body、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双作用Fab(DAF)-IgG和Mab<sup>2</sup>双特异性形式(参见例如,Klein等2012,mAbs 4:6,1-11,以及其中引用的参考文献,用于前述形式的综述)。

[0093] 可包括在本发明提供的MET x MET双特异性抗原结合分子中的示例性抗原结合结构域(D1和D2)包括衍生自本发明公开的任何抗MET抗体的抗原结合结构域。例如,本公开包括MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含HCVR,所述HCVR包含选自表1中列出的任何HCVR氨基酸序列的氨基酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0094] 本发明还提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含LCVR,所述LCVR包含选自表1中列出的任何LCVR氨基酸序列的氨基酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其基本上相似的序列。

[0095] 本发明提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含HCVR和LCVR氨基酸序列对(HCVR/LCVR),所述序列对包含表1中列出的任何HCVR氨基酸序列与表1中列出的任何LCVR氨基酸序列的配对。根据某些实施方案,本发明提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含表1中列出的任何示例性抗MET抗体中所含的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

[0096] 本发明还提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构

域,所述抗原结合结构域包含重链CDR1 (HCDR1) ,所述HCDR1包含选自表1中列出的任何HCDR1氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0097] 本发明还提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含重链CDR2 (HCDR2) ,所述HCDR2包含选自表1中列出的任何HCDR2氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0098] 本发明还提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含重链CDR3 (HCDR3) ,所述HCDR3包含选自表1中列出的任何HCDR3氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0099] 本发明还提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含轻链CDR1 (LCDR1) ,所述LCDR1包含选自表1中列出的任何LCDR1氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0100] 本发明还提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含轻链CDR2 (LCDR2) ,所述LCDR2包含选自表1中列出的任何LCDR2氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0101] 本发明还提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含轻链CDR3 (LCDR3) ,所述LCDR3包含选自表1中列出的任何LCDR3氨基酸序列的氨基酸序列或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0102] 本发明提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含HCDR3和LCDR3氨基酸序列对 (HCDR3/LCDR3) ,所述序列对包含表1中列出的任何HCDR3氨基酸序列与表1中列出的任何LCDR3氨基酸序列的配对。根据某些实施方案,本公开提供了抗体或其抗原结合片段,其包含表1中列出的任何示例性抗MET抗体中所含的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。

[0103] 本发明还提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含表1中列出的任何示例性抗MET抗体中所含的一组六个CDR (即,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)。

[0104] 在一个相关的实施方案中,本公开提供了MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1或D2抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含由表1中列出的任何示例性抗MET抗体所定义的HCVR/LCVR氨基酸序列对中所含的一组六个CDR (即,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)。

[0105] 本发明提供的MET x MET双特异性抗原结合分子可包含衍生自表1的任何抗MET抗体的D1抗原结合结构域,和衍生自表1的任何其他抗MET抗体的D2抗原结合结构域。本公开的MET x MET双特异性抗体的非限制性实例描绘于图1中。图1是说明272个示例性MET x MET双特异性抗体的组分的矩阵。矩阵的每个编号单元(编号1至272)表示包含“D1”抗原结

合结构域和“D2”抗原结合结构域的独特双特异性抗体,其中所述D1抗原结合结构域包含来自沿Y轴列出的相应抗MET抗体的免疫球蛋白可变结构域(HCVR/LCVR氨基酸序列对)或CDR,并且其中所述D2抗原结合结构域包含来自沿X轴列出的相应抗MET抗体的免疫球蛋白可变结构域(HCVR/LCVR氨基酸序列对)或CDR。因此,例如,矩阵中显示的MET x MET双特异性抗原结合分子“编号10”包含来自示例性抗MET抗体H4H13290P2的包含HCVR/LCVR对或6-CDR组的D1抗原结合结构域,和来自示例性抗MET抗体H4H13321P2的包含HCVR/LCVR对或6-CDR组的D2抗原结合结构域。本发明提供的MET x MET双特异性抗体的其他实例描述于本文的实施例4中。

[0106] 作为非限制性说明性实例,本公开包括MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1抗原结合结构域和D2抗原结合结构域,其中所述D1抗原结合结构域包含SEQ ID NO:58/138的HCVR/LCVR氨基酸序列对,或包含SEQ ID NO:60-62-64-140-142-144的一组重链和轻链CDR(HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3),并且其中所述D2抗原结合结构域包含SEQ ID NO:82/138的HCVR/LCVR氨基酸序列对,或包含SEQ ID NO:84-86-88-140-142-144的一组重链和轻链CDR(HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)。具有这些序列特征的示例性MET x MET双特异性抗体是命名为H4H14639D的双特异性抗体,也称为第122号双特异性抗体,其包含衍生自H4H13306P2的D1和衍生自H4H13312P2的D2(参见实施例4,本文表5)。

[0107] 作为另一个非限制性说明性实例,本公开包括MET x MET双特异性抗原结合分子,其包含D1抗原结合结构域和D2抗原结合结构域,其中所述D1抗原结合结构域包含SEQ ID NO:18/138的HCVR/LCVR氨基酸序列对,或包含SEQ ID NO:20-22-24-140-142-144的一组重链和轻链CDR(HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3),并且其中所述D2抗原结合结构域包含SEQ ID NO:82/138的HCVR/LCVR氨基酸序列对,或包含SEQ ID NO:84-86-88-140-142-144的一组重链和轻链CDR(HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)。具有这些序列特征的示例性MET x MET双特异性抗体是命名为H4H14635D的双特异性抗体,也称为第42号双特异性抗体,其包含衍生自H4H13295P2的D1和衍生自H4H13312P2的D2(参见实施例4,本文表5)。

[0108] 多聚化组分

[0109] 在某些实施方案中,本发明提供的双特异性抗原结合分子还可包含一种或多种多聚化组分。多聚化组分可用于维持抗原结合结构域(D1和D2)之间的缔合。如本文所用,“多聚化组分”是能够与具有相同或相似结构或构成的第二多聚化组分缔合的任何大分子、蛋白质、多肽、肽或氨基酸。例如,多聚化组分可以是包含免疫球蛋白CH3结构域的多肽。多聚化组分的非限制性实例是免疫球蛋白的Fc部分,例如选自同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的IgG以及每个同种型组内的任何同种异型的Fc结构域。在某些实施方案中,多聚化组分是Fc片段或长度为1至约200个氨基酸的氨基酸序列,其含有至少一个半胱氨酸残基。在其他实施方案中,多聚化组分是半胱氨酸残基或含半胱氨酸的短肽。其他多聚化结构域包括包含亮氨酸拉链、螺旋环基序或卷曲螺旋基序或由其组成的肽或多肽。

[0110] 在某些实施方案中,本发明提供的双特异性抗原结合分子包含两个多聚化结构域M1和M2,其中D1连接至M1并且D2连接至M2,并且其中M1与M2的缔合促进D1和D2在单个双特异性抗原结合分子中与彼此的物理连接。在某些实施方案中,M1和M2彼此相同。例如,M1可以是具有特定氨基酸序列的Fc结构域,M2是具有与M1相同的氨基酸序列的Fc结构域。或者,

M1和M2可以在一个或多个氨基酸位置彼此不同。例如, M1可以包含第一免疫球蛋白(Ig)C<sub>H</sub>3结构域,M2可以包含第二Ig C<sub>H</sub>3结构域,其中第一和第二Ig C<sub>H</sub>3结构域彼此相差至少一个氨基酸,并且其中与具有相同M1和M2序列的参考构建体相比,至少一个氨基酸差异降低了靶向构建体与蛋白A的结合。在一个实施方案中,M1的Ig C<sub>H</sub>3结构域结合蛋白A并且M2的Ig C<sub>H</sub>3结构域含有降低或消除蛋白A结合的突变,例如H95R修饰(根据IMGT外显子编号;根据EU编号的H435R)。M2的C<sub>H</sub>3可进一步包含Y96F修饰(根据IMGT;根据EU的Y436F)。可以存在于M2的C<sub>H</sub>3内的其他修饰包括:在IgG1 Fc结构域的情况下,D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(根据IMGT;根据EU的D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I);在IgG2 Fc结构域的情况下,N44S、K52N和V82I(IMGT;根据EU的N384S、K392N和V422I);在IgG4 Fc结构域的情况下,Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(根据IMGT;根据EU的Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I)。

[0111] 本公开的双特异性抗原结合分子可以是“分离的”。如本文所用,“分离的双特异性抗原结合分子”是指已经从其自然环境的至少一种组分鉴定和分离和/或回收的双特异性抗原结合分子。例如,为了本公开的目的,已从生物体的至少一种组分或从产生抗体的组织或细胞中分离或移出的双特异性抗体是“分离的双特异性抗体”。分离的双特异性抗原结合分子还包括重组细胞内的原位分子。分离的双特异性抗原结合分子是已经过至少一个纯化或分离步骤的分子。根据某些实施方案,分离的双特异性抗原结合分子可以基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0112] 与衍生抗原结合蛋白或抗原结合结构域的相应种系序列相比,本发明公开的双特异性抗原结合分子或其抗原结合结构域(D1和/或D2)可以在重链和轻链可变结构域的框架区和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本发明公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定这类突变。本公开包括本发明公开的双特异性抗原结合分子或其抗原结合结构域(D1和/或D2),其衍生自本发明公开的任何氨基酸序列,其中一个或多个框架区和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为衍生抗体的种系序列的相应残基,或另一种人种系序列的相应残基,或相应种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。

[0113] 本领域普通技术人员从本发明公开的重链和轻链可变区序列开始,可以容易地产生许多双特异性抗原结合分子或其抗原结合结构域(D1和/或D2),其包含一个或多个个体种系突变或其组合。在某些实施方案中,V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>结构域内的所有框架区和/或CDR残基突变回在衍生抗体的原始种系序列中发现的残基。在其他实施方案中,仅将某些残基突变回原始种系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的后8个氨基酸内发现的突变残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3中发现的突变残基。在其他实施方案中,将一个或多个框架和/或CDR残基突变为不同种系序列(即,与最初衍生抗体的种系序列不同的种系序列)的相应残基。

[0114] 此外,本公开的双特异性抗原结合分子或其抗原结合结构域(D1和/或D2)可以含有框架区和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个体残基突变为特定种系序列的相应残基,而某些与原始种系序列不同的其他残基保持或突变为不同种系序列的相应残基。一旦获得,可以容易地测试含有一个或多个种系突变的双特异性抗原结合分子或其抗原结合结构域(D1和/或D2)的一种或多种所需特性,例如,改善的结合特

异性、增加的结合亲和力、改善或增强的拮抗或激动生物学特性(视情况而定)、降低的免疫原性等。以这种一般方式获得的双特异性抗原结合分子或其抗原结合结构域(D1和/或D2)包含在本公开中。

[0115] 变体

[0116] 本公开还包括抗MET抗体和双特异性抗原结合分子,其包含本发明公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的变体。包括在该方面内的示例性变体包括具有一个或多个保守取代的本发明公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的变体。例如,本公开包括抗MET抗体和MET x MET双特异性抗原结合分子,其HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列相对于本文表1中列出的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守氨基酸取代。

[0117] 包括在本公开的该方面内的示例性变体还包括与本发明公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有基本序列同一性的变体。如本文在氨基酸序列的上下文中所使用的,术语“基本同一性”或“基本上相同”是指两个氨基酸序列,当最佳比对时,例如通过使用默认空位权重的程序GAP或BESTFIT,共享至少95%、98%或99%的序列同一性。在某些实施方案中,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似化学特性(例如电荷或疏水性)的侧链(R基团)的另一氨基酸残基取代的氨基酸取代。通常,保守氨基酸取代基本上不会改变蛋白质的功能特性。在通过保守取代使两个或更多个氨基酸序列彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似程度以校正取代的保守性质。进行这种调整的手段是本领域技术人员所熟知的。参见例如Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331,以引用的方式并入本文中。具有相似化学性质的侧链的氨基酸组的实例包括(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸与苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,以及(7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代基是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。或者,保守替换是在Gonnet等(1992) *Science* 256:1443-1445(通过引用并入本文)公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“适度保守”替换是PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0118] 通常使用序列分析软件测量两个不同氨基酸序列之间的序列同一性。序列分析软件使用分配给各种取代、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸取代)的相似性量度来匹配相似序列。例如,GCG软件含有如GAP和BESTFIT的程序,其可以与默认参数一起使用以确定密切相关的多肽之间,例如来自不同生物体物种的同源多肽之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如,GCG Version 6.1。也可以使用FASTA (GCG Version 6.1中的一个程序)使用默认或推荐的参数比较多肽序列。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供查询和搜索序列之间最佳重叠区域的比对和百分比序列同一性(Pearson (2000),见上文)。当将本发明提供的序列与含有来自不同生物的大量序列的数据库进行比较时,另一种优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如Altschul等(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410和Altschul等人(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402,各自以引用的方式并入本文中。

[0119] 包含Fc变体的抗MET抗体和MET  $\times$  MET双特异性抗原结合分子

[0120] 根据本发明提供的某些实施方案,本发明提供了包含Fc结构域的抗MET抗体和MET  $\times$  MET双特异性抗原结合蛋白,所述Fc结构域包含一个或多个突变,例如在酸性pH下,与中性pH相比,所述突变增强或减弱抗体与FcRn受体的结合。例如,本公开包括在Fc结构域的C<sub>H</sub>2或C<sub>H</sub>3区中包含突变的抗MET抗体和MET  $\times$  MET双特异性抗原结合蛋白,其中所述突变增加Fc结构域在酸性环境(例如,在pH范围为约5.5至约6.0的胞内体中)中对FcRn的亲和力。当将抗体施用于动物时,这种突变可导致抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性实例包括例如在位置250(例如E或Q);250和428(例如L或F);252(例如L/Y/F/W或T)、254(例如S或T)和256(例如S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或在位置428和/或433(例如H/L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如H/F或Y)处的修饰;或在位置250和/或428处的修饰;或在位置307或308(例如308F、V308F)和434处的修饰。在一个实施方案中,修饰包含428L(例如M428L)和434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)和308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)和434(例如434Y)修饰;252、254和256(例如252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如308F或308P)。

[0121] 例如,本公开包括抗MET抗体和MET  $\times$  MET双特异性抗原结合蛋白,其包含Fc结构域,所述Fc结构域包含选自下组的一个或多个突变对或突变组:250Q和248L(例如,T250Q和M248L);252Y、254T和256E(例如,M252Y、S254T和T256E);428L和434S(例如,M428L和N434S);和433K和434F(例如,H433K和N434F)。前述Fc结构域突变的所有可能组合和本发明公开的抗体可变结构域内的其他突变都涵盖在本公开的范围内。

[0122] 本发明提供的抗原结合分子的生物学特征

[0123] 本发明提供了以高亲和力结合单体人MET的抗体及其抗原结合片段。例如,本公开包括结合单体人MET(例如,hMET.mmh)的抗MET抗体,其在25°C或37°C下通过表面等离子体共振,例如使用如本文实施例3中定义的测定形式,或基本上相似的测定测量的K<sub>D</sub>小于约230nM。根据某些实施方案,本发明提供了结合单体人MET的抗MET抗体,其在37°C下通过表面等离子体共振,例如使用如本文实施例3中定义的测定形式,或基本上相似的测定测量的K<sub>D</sub>小于约230nM、小于约200nM、小于约150nM、小于约100nM、小于约50nM、小于约25nM、小于约20nM、小于约10nM、小于约8nM、小于约6nM、小于约5nM、小于约4nM或小于约3nM。

[0124] 本公开还包括结合单体人MET(例如,hMET.mmh)的抗体及其抗原结合片段,其在25°C或37°C下通过表面等离子体共振,例如使用如本文实施例3中定义的测定形式,或基本上相似的测定测量的解离半衰期(t<sub>1/2</sub>)大于约1分钟。根据某些实施方案,本发明提供了结合单体人MET的抗MET抗体,其在37°C下通过表面等离子体共振,例如使用如本文实施例3中定义的测定形式,或基本上相似的测定测量的t<sub>1/2</sub>大于约1分钟、大于约2分钟、大于约4分钟、大于约6分钟、大于约8分钟、大于约10分钟、大于约12分钟、大于约14分钟、大于约16分钟、大于约18分钟或大于约20分钟或更长。

[0125] 本发明提供了以高亲和力结合二聚体人MET(例如,hMET.mFc)的抗体及其抗原结合片段。例如,本公开包括结合二聚体人MET的抗MET抗体,其在25°C或37°C下通过表面等离子体共振,例如使用如本文实施例3中定义的测定形式,或基本上相似的测定测量的K<sub>D</sub>小于约3nM。根据某些实施方案,本发明提供了结合二聚体人MET的抗MET抗体,其在37°C下通过表面等离子体共振,例如使用如本文实施例3中定义的测定形式,或基本上相似的测定测量

的 $K_D$ 小于约3nM、小于约2nM、小于约1nM、小于约0.9nM、小于约0.8nM、小于约0.7nM、小于约0.6nM、小于约0.5nM、小于约0.4nM、小于约0.3nM或小于约0.25nM。

[0126] 本发明还提供了结合二聚体人MET(例如, hMET.mFc)的抗体及其抗原结合片段, 其在25°C或37°C下通过表面等离子体共振, 例如使用如本文实施例3中定义的测定形式, 或基本上相似的测定测量的解离半衰期( $t_{1/2}$ )大于约4分钟。根据某些实施方案, 本发明提供了结合二聚体人MET的抗MET抗体, 其在37°C下通过表面等离子体共振, 例如使用如本文实施例3中定义的测定形式, 或基本上相似的测定测量的 $t_{1/2}$ 大于约4分钟、大于约5分钟、大于约10分钟、大于约20分钟、大于约30分钟、大于约40分钟、大于约50分钟、大于约60分钟、大于约70分钟、大于约80分钟、大于约90分钟、大于约100分钟、大于约105分钟或更长。

[0127] 本发明还提供了结合二聚体人MET(例如, hMET.mFc)的MET x MET双特异性抗原结合蛋白, 其在25°C或37°C下通过表面等离子体共振, 例如使用如本文实施例5中定义的测定形式, 或基本上相似的测定测量的解离半衰期( $t_{1/2}$ )大于约10分钟。根据某些实施方案, 本发明提供了结合二聚体人MET的MET x MET双特异性抗原结合蛋白, 其在37°C下通过表面等离子体共振, 例如使用如本文实施例5中定义的测定形式, 或基本上相似的测定测量的 $t_{1/2}$ 大于约10分钟、大于约20分钟、大于约30分钟、大于约40分钟、大于约50分钟、大于约60分钟、大于约70分钟、大于约80分钟、大于约90分钟、大于约100分钟、大于约200分钟、大于约300分钟、大于约400分钟、大于约500分钟、大于约600分钟、大于约700分钟、大于约800分钟、大于约900分钟、大于约1000分钟、大于约1100分钟或更长。

[0128] 本发明还提供了抗MET抗体和MET x MET双特异性抗原结合蛋白, 其在例如体外配体结合测定中阻断HGF和MET之间的相互作用。根据本发明提供的某些实施方案, 本发明提供了MET x MET双特异性抗原结合蛋白, 其阻断HGF与表达人MET的细胞的结合, 并且在不存在HGF信号传导的情况下诱导最小的MET激活或没有MET激活。例如, 本公开提供MET x MET双特异性抗原结合蛋白, 其在基于细胞的MET活性报告分子测定中表现出的MET激动剂活性是在使用仅包含D1或D2的单特异性抗体的等效活性报告分子测定中观察到的MET激动剂活性的小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%、小于5%、小于3%、小于2%或小于1%。

[0129] 本公开的抗体和抗原结合蛋白可具有一种或多种前述生物学特征, 或其任何组合。上述抗体的生物学特征列表并非旨在穷举。通过审阅本公开(包括本发明的工作实施例), 本发明提供的抗体的其他生物学特征对于本领域普通技术人员而言是显而易见的。

[0130] 抗体-药物缀合物(ADC)

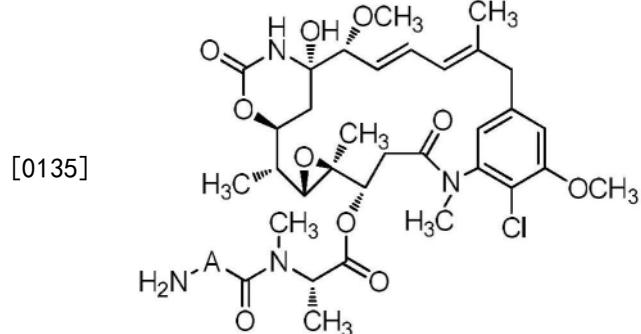
[0131] 本发明提供了抗体-药物缀合物(ADC), 其包含与治疗部分缀合的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合蛋白, 所述治疗部分为例如细胞毒性剂、化学治疗药物或放射性同位素。

[0132] 细胞毒性剂包括对细胞的生长、存活或繁殖有害的任何试剂, 包括但不限于微管蛋白相互作用剂和DNA损伤剂。根据本公开的该方面, 可与抗MET抗体缀合的合适细胞毒性剂和化学治疗剂的实例包括例如1-(2-氯乙基)-1,2-二甲磺酰肼、1,8-二羟基-双环[7.3.1]十三碳-4,9-二烯-2,6-二炔-13-酮、1-脱氢睾酮、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、9-氨基喜树碱、放线菌素D、鹅膏菌素、氨基喋呤、蛇形菌素、蒽环霉素、安曲霉素(AMC)、奥瑞他汀、博来霉素、白消安、丁酸、加利车霉素(如加利车霉素 $\gamma_1$ )、喜树碱、洋红霉

素、卡莫司汀、西马多丁、顺铂、秋水仙素、考布他汀、环磷酰胺、阿糖胞苷、细胞松弛素B、放线菌素、柔红霉素、达卡巴嗪、二乙酰氧基戊基阿霉素、二溴甘露醇、二羟基炭疽菌素二酮、地索拉唑、海兔毒素(如海兔毒素10)、阿霉素、多卡霉素、棘霉素、软珊瑚素、依米丁、埃博霉素、埃斯培拉霉素、雌莫司汀、溴化乙锭、依托泊苷、氟尿嘧啶、格尔德霉素、短杆菌肽D、糖皮质激素、伊立替康、驱动蛋白纺锤体蛋白(KSP)抑制剂、细霉素、环氧长春碱、利多卡因、洛莫司汀(CCNU)、美登木素生物碱、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、甲氨蝶呤、光辉霉素、丝裂霉素、米托恩醌、N8-乙酰亚精胺、鬼臼毒素、普鲁卡因、普萘洛尔、蝶啶、嘌呤霉素、吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)、根霉素、链脲佐菌素、他利霉素、紫杉醇、替尼泊苷、丁卡因、噻替派苯丁酸氮芥、茅屋霉素、托泊替康、微管溶素、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨和任何前述的衍生物。根据某些实施方案,与抗MET抗体缀合的细胞毒性剂是美登木素生物碱如DM1或DM4、茅屋霉素衍生物或海兔毒素衍生物。根据某些实施方案,与抗MET抗体缀合的细胞毒性剂是奥瑞他汀,例如MMAE、MMAF或其衍生物。本领域已知的其他细胞毒性剂也包括在本公开的范围内,包括例如蛋白质毒素,例如蓖麻毒素、艰难梭菌毒素、假单胞菌外毒素、蓖麻毒素、白喉毒素、肉毒杆菌毒素、泻根素、皂草素、商陆毒素(即,商陆毒素和商陆皂甙元)和其他,如Sapra等,Pharmacol.&Therapeutics,2013,138:452-469中列出的那些。

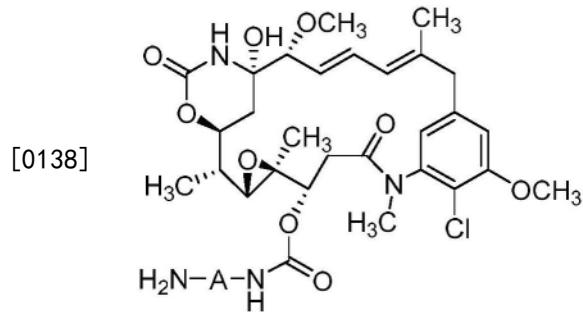
[0133] 在某些实施方案中,细胞毒性剂是美登木素生物碱,例如美登素的衍生物。合适的美登木素生物碱包括DM1、DM4或其衍生物、立体异构体或同位素体。合适的美登木素生物碱还包括但不限于WO 2014/145090A1、WO 2015/031396A1、US2016/0375147A1和US2017/0209591A1中公开的那些,其通过引用整体并入本文。

[0134] 在一些实施方案中,美登木素生物碱具有以下结构:



[0136] 其中A是任选取代的亚芳基或亚杂芳基。

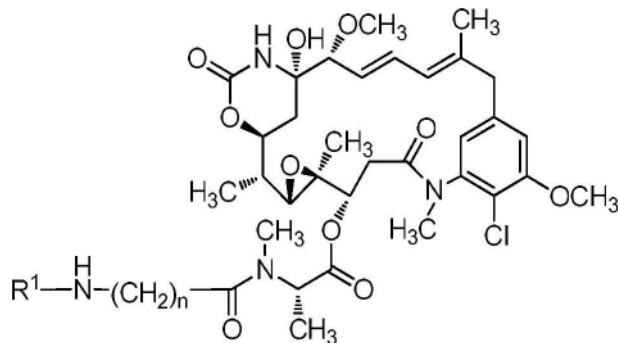
[0137] 在一些实施方案中,美登木素生物碱具有以下结构:



[0139] 其中A是任选取代的亚芳基或亚杂芳基。

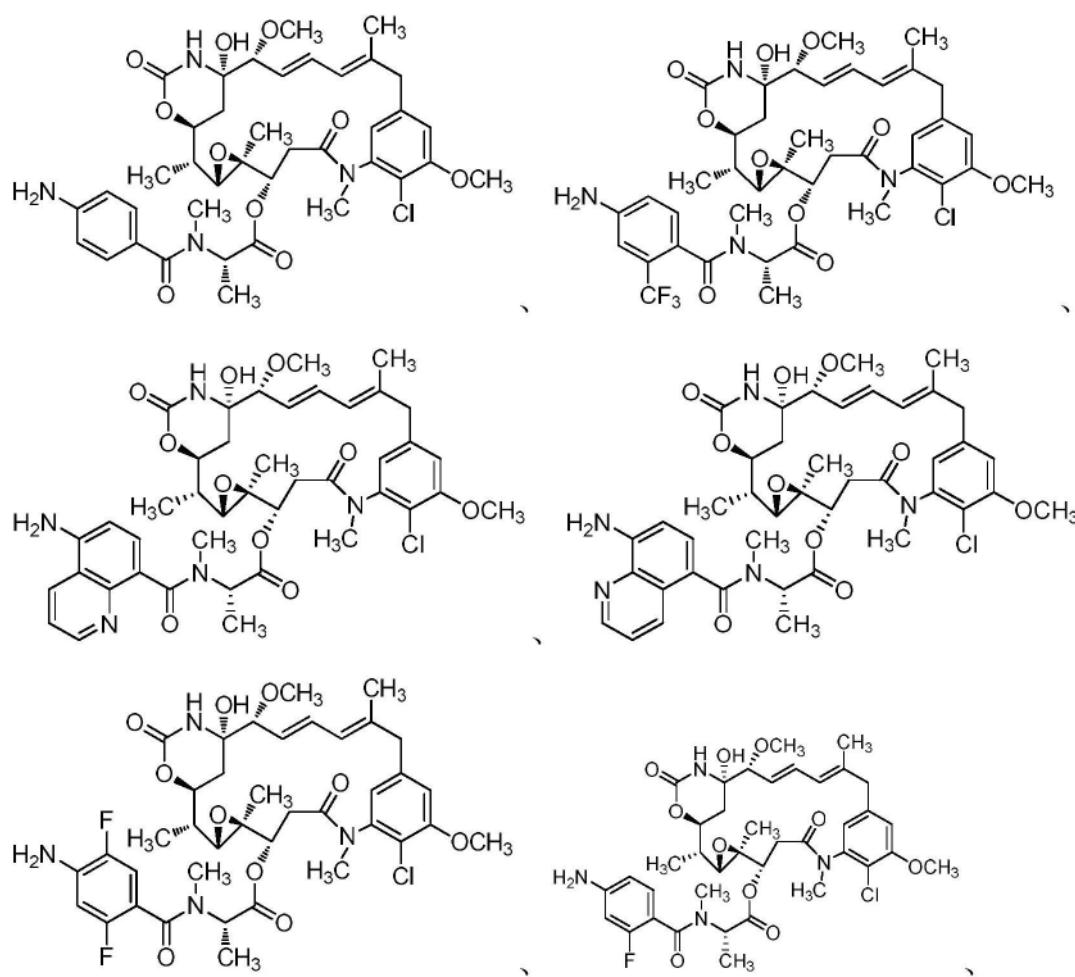
[0140] 在一些实施方案中,美登木素生物碱具有以下结构:

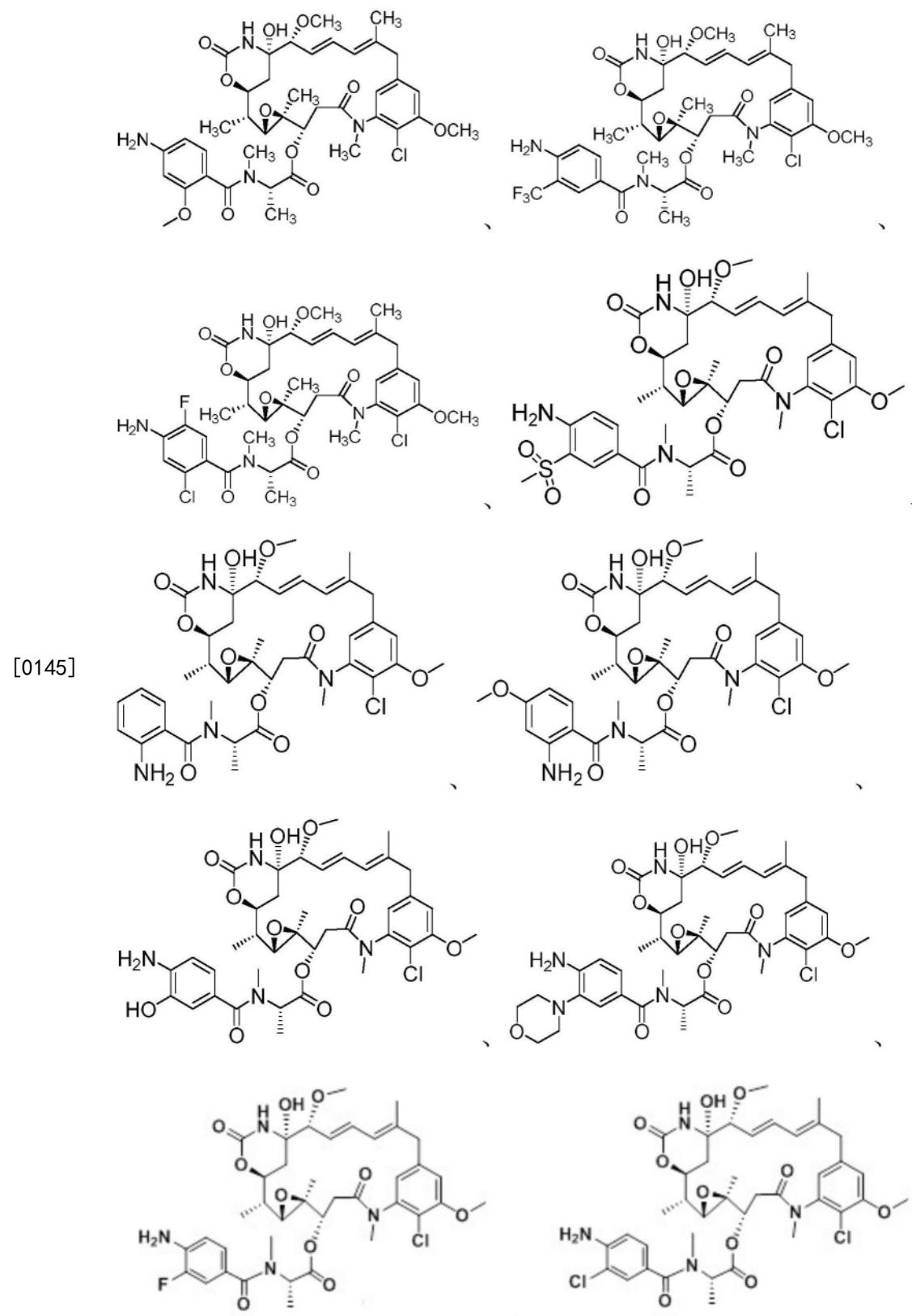
[0141]

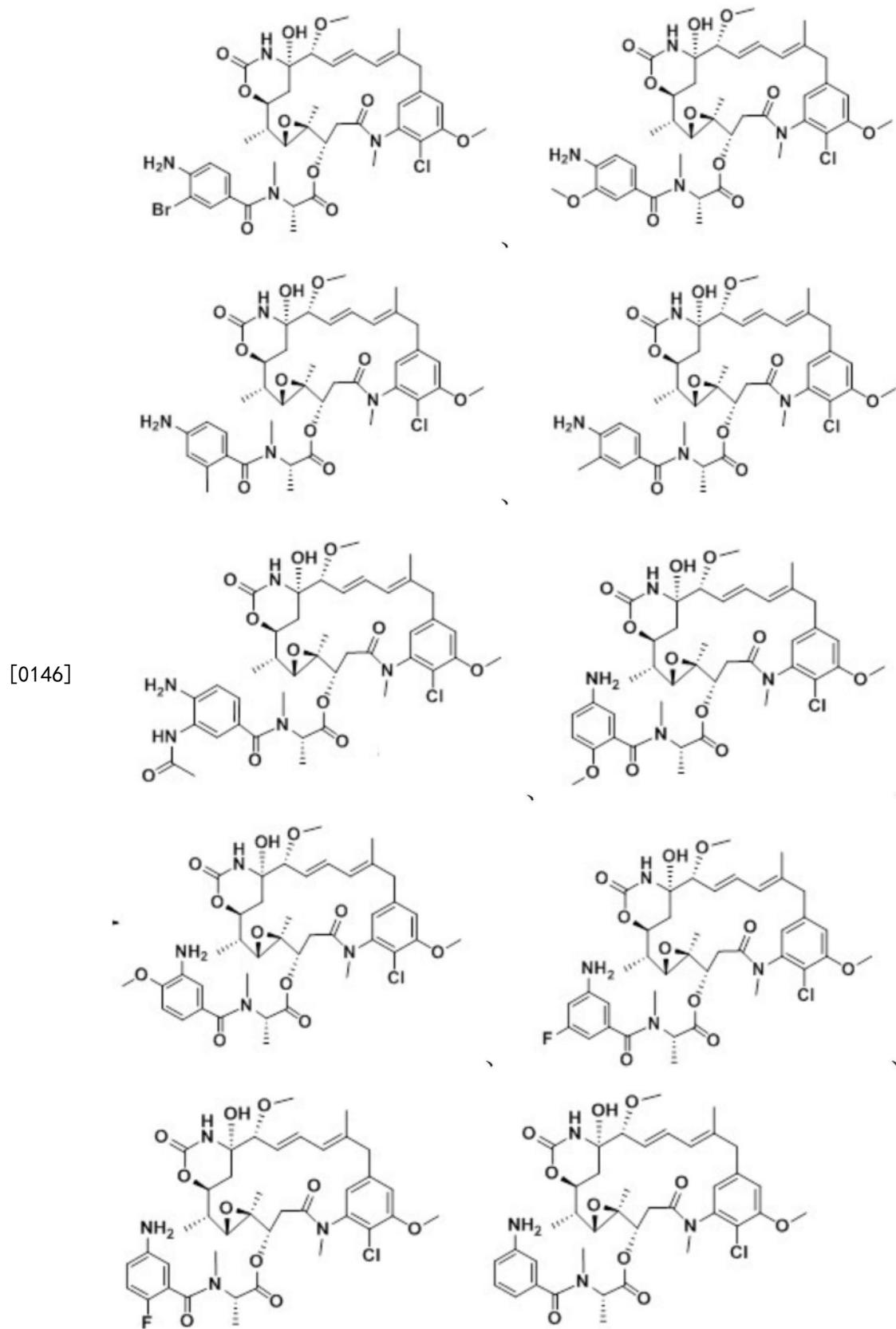
[0142] 其中n是1-12的整数,R<sup>1</sup>是烷基。

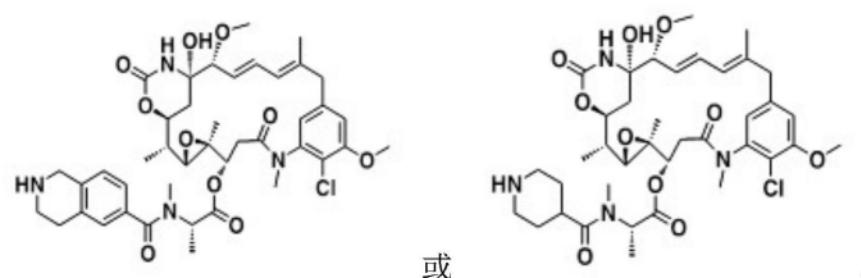
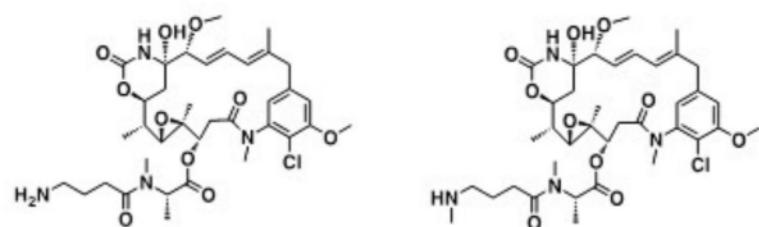
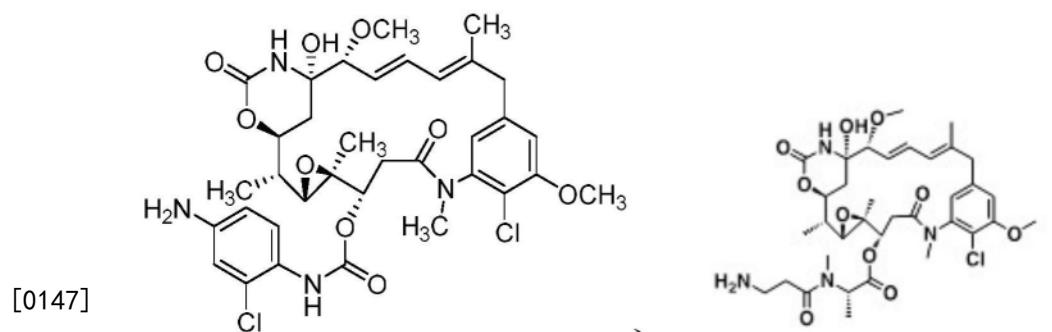
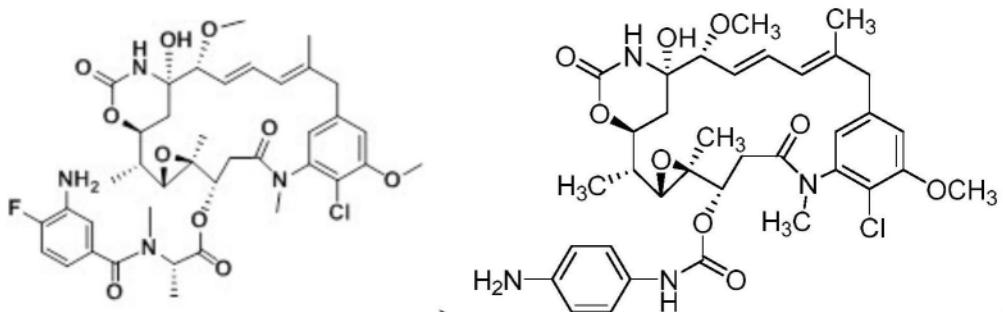
[0143] 在一些实施方案中,美登木素生物碱是:

[0144]

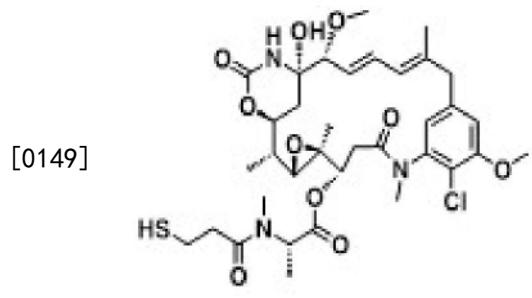




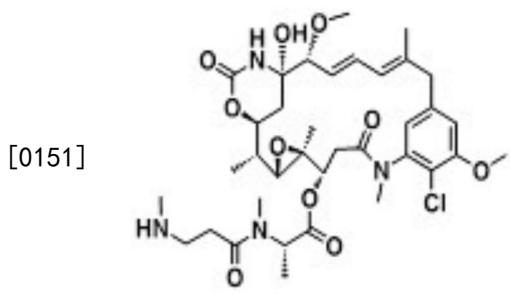




[0148] 在一些实施方案中,美登木素生物碱是:



[0150] 在一些实施方案中,美登木素生物碱是:



[0152] 本发明还提供了抗体-放射性核素缀合物(ARC),其包含与一种或多种放射性核素缀合的抗MET抗体。可以在本公开的该方面的上下文中使用的示例性放射性核素包括但不限于例如<sup>225</sup>Ac、<sup>212</sup>Bi、<sup>213</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>186</sup>Re、<sup>227</sup>Th、<sup>222</sup>Rn、<sup>223</sup>Ra、<sup>224</sup>Ra和<sup>90</sup>Y。

[0153] 在本发明提供的某些实施方案中,提供的ADC包含通过接头分子与细胞毒性剂(例如,上文公开的任何细胞毒性剂)缀合的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合蛋白。接头是将本发明所述的抗体或抗原结合蛋白与治疗部分例如细胞毒性剂连接、相接或结合的任何基团或部分。合适的接头可以见于例如Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins; Phillips, G.L., 编; Springer Verlag: New York, 2013; Antibody-Drug Conjugates; Ducry, L., 编; Humana Press, 2013; Antibody-Drug Conjugates; Wang, J., Shen, W.-C. 和 Zaro, J.L., 编; Springer International Publishing, 2015, 每个的内容通过引用整体并入本文。通常,本发明所述的抗体缀合物的合适的结合剂接头是这样的接头,其足够稳定以利用抗体的循环半衰期,并且同时能够在抗原介导的缀合物内化后释放其有效负载。接头可以是可切割的或不可切割的。可切割接头包括在内化后被细胞内代谢切割的接头,例如通过水解、还原或酶促反应切割。不可切割接头包括在内化后通过抗体的溶酶体降解释放附着的有效负载的接头。合适的接头包括但不限于酸不稳定接头、水解不稳定接头、酶促可切割接头、还原不稳定接头、自我牺牲型接头和不可切割接头。合适的接头还包括但不限于为或包含以下的那些:肽、葡糖昔酸、琥珀酰亚胺-硫醚、聚乙二醇(PEG)单元、腙、马来酰亚胺己酰单元、二肽单元、缬氨酸-瓜氨酸单元和对氨基苄基(PAB)单元。

[0154] 本领域已知的任何接头分子或接头技术可用于产生或构建本公开的ADC。在某些实施方案中,接头是可切割接头。根据其他实施方案,接头是不可切割接头。可以在本公开的上下文中使用的示例性接头包括包含或由以下组成的接头:例如MC(6-马来酰亚胺己酰基)、MP(马来酰亚胺丙酰基)、val-cit(缬氨酸-瓜氨酸)、蛋白酶可切割接头中的二肽位点val-alanine(缬氨酸-丙氨酸)、蛋白酶可切割接头中的二肽位点alanine-phenylalanine(丙氨酸-苯丙氨酸)、PAB(对氨基苄基)、SPP(4-(2-吡啶硫基)戊酸N-琥珀酰亚胺酯)、SMCC(4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸N-琥珀酰亚胺酯)、SIAB((4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸N-琥珀酰亚胺酯)及其变体和组合。可以在本公开的上下文中使用的接头的其他实例提供于例如US 7,754,681和Ducry, Bioconjugate Chem., 2010, 21:5-13, 以及其中引用的参考文献,其内容通过引用整体并入本文。

[0155] 在某些实施方案中,接头在生理条件下是稳定的。在某些实施方案中,接头是可切割的,例如,能够在酶存在下或在特定pH范围或值下释放至少有效负载部分。在一些实施方案中,接头包含酶可切割的部分。示例性的酶可切割部分包括但不限于肽键、酯键、腙和二硫键。在一些实施方案中,接头包含组织蛋白酶可切割的接头。

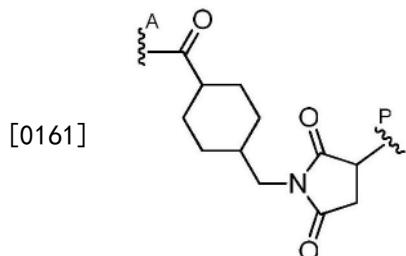
[0156] 在一些实施方案中,接头包含不可切割的部分。

[0157] 合适的接头还包括但不限于与单个结合剂例如抗体的两个半胱氨酸残基化学键合的那些。这种接头可用于模拟由于缀合过程而被破坏的抗体的二硫键。

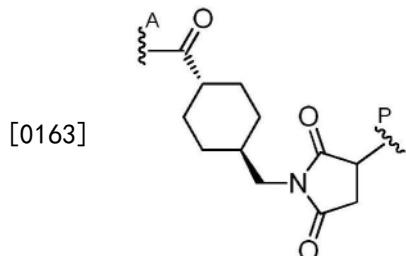
[0158] 在一些实施方案中,接头包含一个或多个氨基酸。合适的氨基酸包括天然的、非天然的、标准的、非标准的、蛋白原性的、非蛋白原性的和L-或D- $\alpha$ -氨基酸。在一些实施方案中,接头包含丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸或瓜氨酸、其衍生物或其组合。在某些实施方案中,氨基酸的一个或多个侧链与侧链基团连接,如下所述。在一些实施方案中,接头包含缬氨酸和瓜氨酸。在一些实施方案中,接头包含赖氨酸、缬氨酸和瓜氨酸。在一些实施方案中,接头包含赖氨酸、缬氨酸和丙氨酸。在一些实施方案中,接头包含缬氨酸和丙氨酸。

[0159] 在一些实施方案中,接头包含自我牺牲型基团。自我牺牲型基团可以是技术人员已知的任何此类基团。在特定的实施方案中,自我牺牲型基团是对氨基苄基(PAB)或其衍生物。有用的衍生物包括对氨基苄基氧基羰基(PABC)。技术人员将认识到,自我牺牲型基团能够进行化学反应,所述反应从有效负载释放接头的剩余原子。

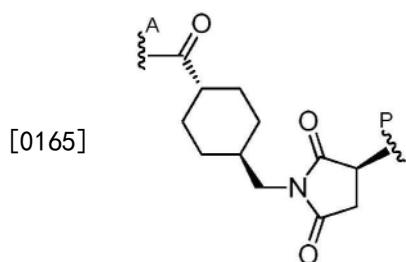
[0160] 在一些实施方案中,接头是:



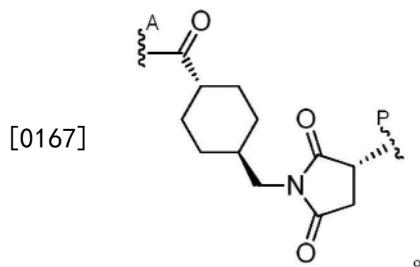
[0162] 其中 $\xi^A$ 是(例如,通过赖氨酸残基)与抗体或抗原结合蛋白连接的键,并且 $-\xi^P$ 是与细胞毒性剂(例如DM1)连接的键。在一些实施方案中,接头是:



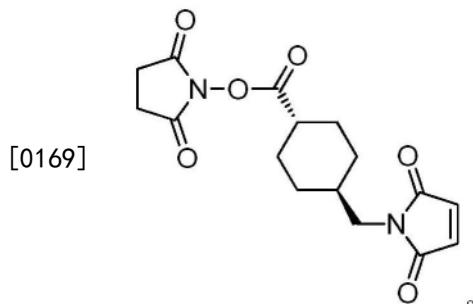
[0164] 其中 $\xi^A$ 是(例如,通过赖氨酸残基)与抗体或抗原结合蛋白连接的键,并且 $-\xi^P$ 是与细胞毒性剂(例如DM1)连接的键。在某些实施方案中,接头是:



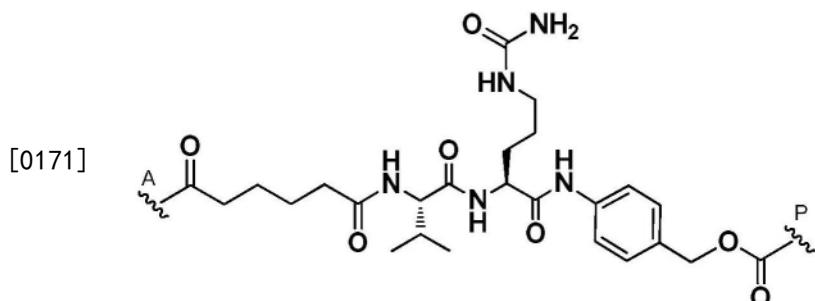
[0166] 在某些实施方案中,接头是:



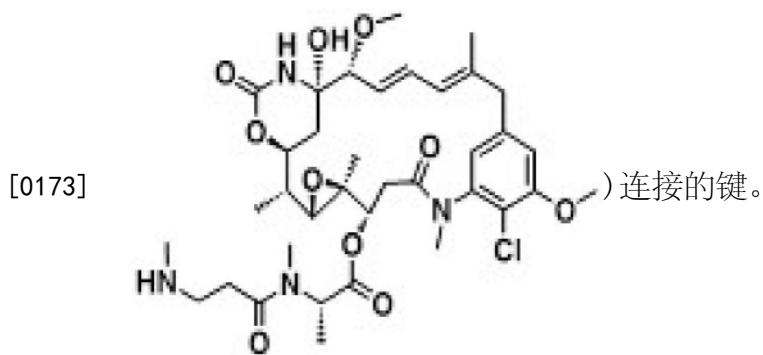
[0168] 在一些实施方案中,接头衍生自马来酰亚胺基甲基-4-反式-环己烷羧基琥珀酸酯:



[0170] 在一些实施方案中,接头是:



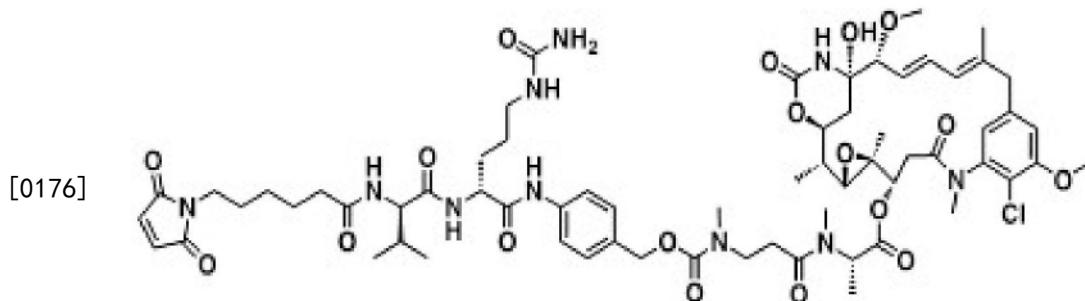
[0172] 其中 $\xi^A$ 是(例如,通过赖氨酸残基)与抗体或抗原结合蛋白连接的键,并且 $\xi^P$ 是与细胞毒性剂(例如具有下式的化合物:



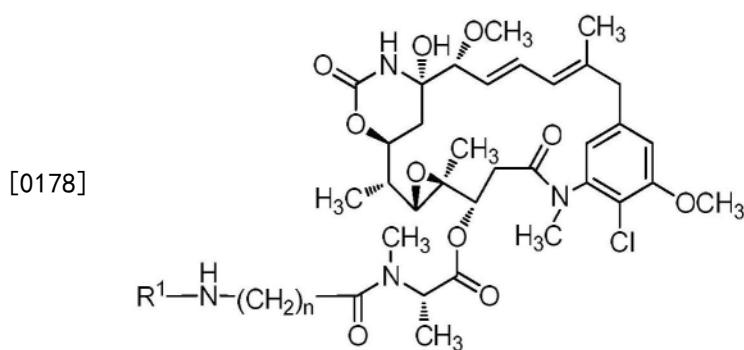
[0174] 本公开包含ADC,其中接头通过在抗体或抗原结合分子内的特定氨基酸处的连接将抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合蛋白与药物或细胞毒素连接。可以在该方面的上下文中使用的示例性氨基酸连接,例如赖氨酸(参见例如,US 5,208,020;US 2010/0129314;Hollander等,Bioconjugate Chem.,2008,19:358-361;WO 2005/089808;US 5,714,586;US2013/0101546;和US2012/0585592)、半胱氨酸(参见例如,US2007/0258987;WO

2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US2013/0101546; 和US 7,750,116)、硒代半胱氨酸(参见例如, WO 2008/122039; 和Hofer等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2008, 105:12451-12456)、甲酰甘氨酸(参见例如, Carrico等, Nat. Chem. Biol., 2007, 3:321-322; Agarwal等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2013, 110: 46-51, 和Rabuka等, Nat. Protocols, 2012, 10:1052-1067)、非天然氨基酸(参见例如 WO 2013/068874 和 WO 2012/166559) 和酸性氨基酸(参见例如, WO 2012/05982)。接头也可以通过与碳水化合物(参见例如, US2008/0305497、WO 2014/065661 和 Ryan 等, Food & Agriculture Immunol., 2001, 13:127-130) 和二硫键接头(参见例如, WO 2013/085925、WO 2010/010324、WO 2011/018611 和 Shaunak 等, Nat. Chem. Biol., 2006, 2:312-313) 的连接而与抗原结合蛋白缀合。还可以使用位点特异性缀合技术来指导缀合至抗体或抗原结合蛋白的特定残基(参见例如, Schumacher 等 J Clin Immunol (2016) 36 (增刊1): 100)。位点特异性缀合技术包括但不限于通过转谷氨酰胺酶的谷氨酰胺缀合(参见例如, Schibli, Angew Chemie Inter Ed. 2010, 49, 9995)。

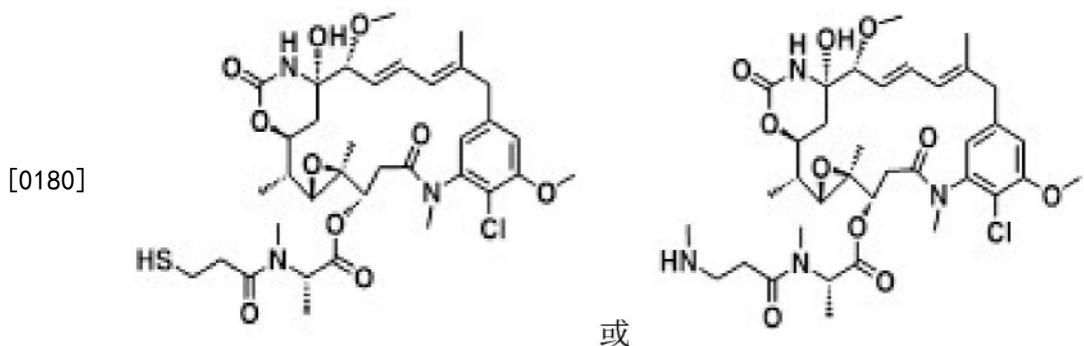
[0175] 根据某些实施方案,本公开提供了ADC,其中如本发明所述的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合蛋白与如国际专利公开 WO2014/145090 中所述的接头-药物组合物(例如,化合物“7”,在本文中也称为“M0026”并描绘如下)缀合,所述国际专利公开的公开内容通过引用整体并入本文:



[0177] 本发明还提供了抗体-药物缀合物,其包含本发明公开的单特异性抗MET抗体和 MET x MET 双特异性抗体,其中所述抗MET抗体或 MET x MET 双特异性抗体与细胞毒性剂缀合。在某些实施方案中,细胞毒性剂是美登木素生物碱。在某些实施方案中,美登木素生物碱是具有下式的化合物:



[0179] 其中n是1-12的整数,R<sup>1</sup>是烷基。在某些实施方案中,美登木素生物碱是

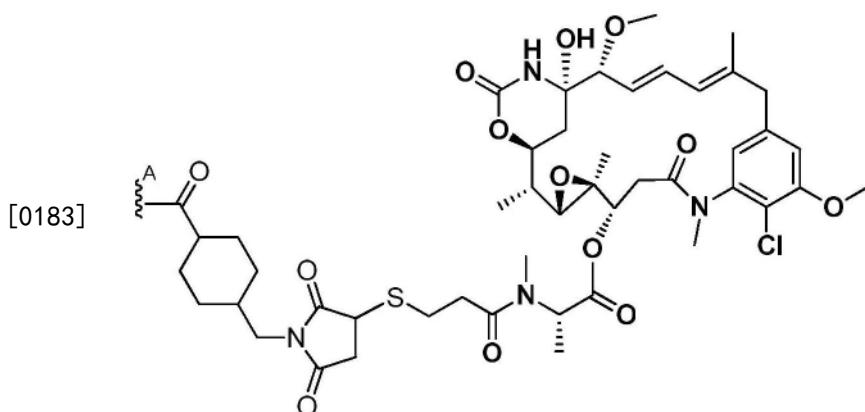


或

。

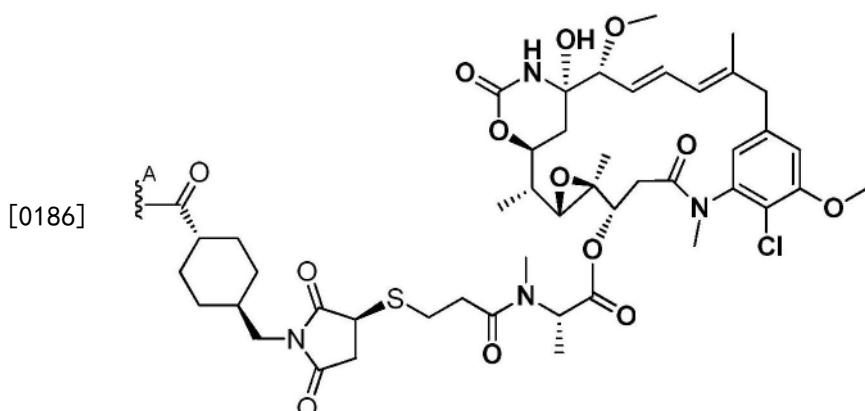
[0181] 在某些实施方案中,细胞毒性剂是美登木素生物碱,并且美登木素生物碱通过不可切割的接头共价连接于抗体。在某些实施方案中,细胞毒性剂是美登木素生物碱,并且美登木素生物碱通过可切割的接头共价连接于抗体。

[0182] 在一个实施方案中,抗体与以下物质缀合:



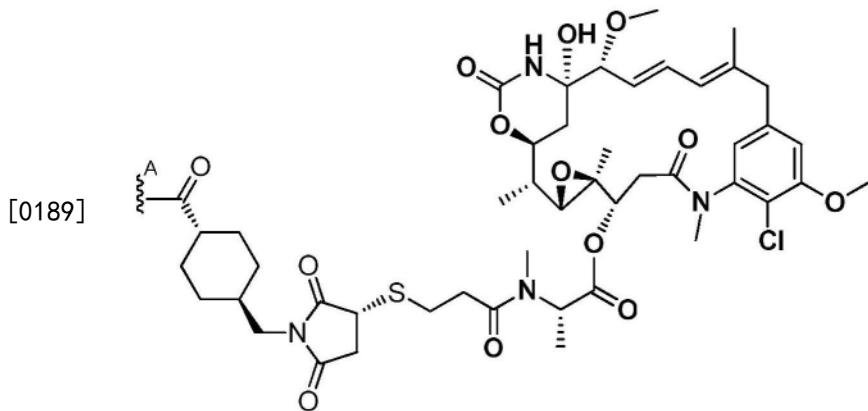
[0184] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键。

[0185] 在一个实施方案中,抗体与以下物质缀合:



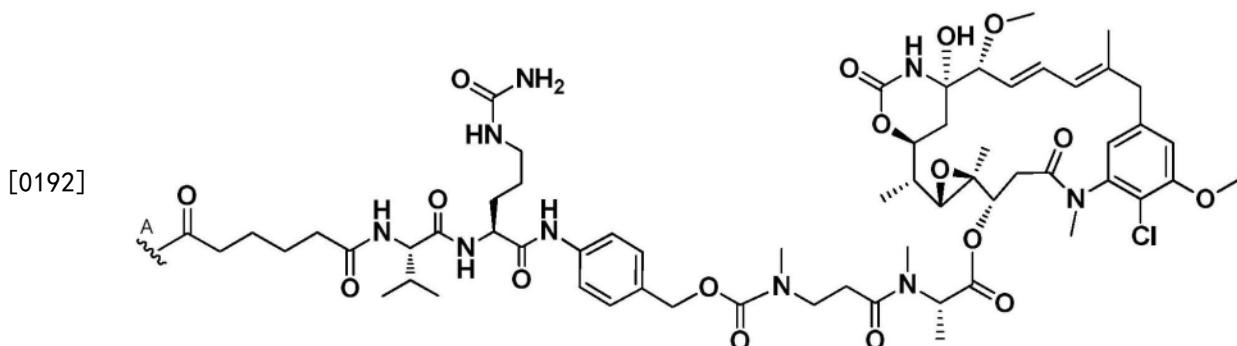
[0187] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键。

[0188] 在一个实施方案中,抗体与以下物质缀合:



[0190] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键。

[0191] 在一个实施方案中,抗体与以下物质缀合:



[0193] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键。

[0194] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

[0195]  $Ab - [L - Pay]_n$

[0196] 其中:

[0197]  $Ab$ 是如本发明所述的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合蛋白;

[0198]  $L$ 是接头;

[0199]  $Pay$ 是细胞毒性剂;并且

[0200]  $n$ 是1-10的整数。

[0201] 在一些实施方案中,Ab是抗MET抗体,其包含SEQ ID NO:82/138的HCVR/LCVR氨基酸序列对内的CDR。在一些实施方案中,Ab是抗MET抗体,其包含SEQ ID NO:82的HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:138的LCVR氨基酸序列。

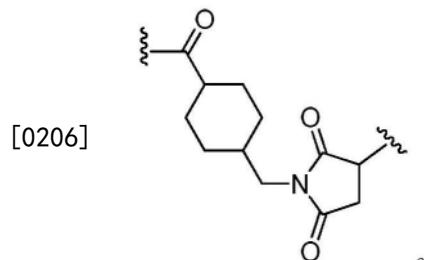
[0202] 在一些实施方案中,Ab是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:58的D1-HCVR氨基酸序列内的CDR和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列内的CDR。在一些方面,MET x MET双特异性抗原结合蛋白还包含SEQ ID NO:138的LCVR氨基酸序列内的CDR。在一些实施方案中,Ab是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:58的D1-HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列。在一些方面,MET x MET双特异性抗原结合蛋白还包含SEQ ID NO:138的LCVR氨基酸序列。

[0203] 在一些实施方案中,Ab是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:18的D1-HCVR氨基酸序列内的CDR和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列内的CDR。在一些方

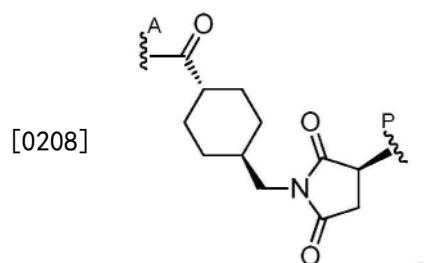
面, MET x MET双特异性抗原结合蛋白还包含SEQ ID NO:138的LCVR氨基酸序列内的CDR。在一些实施方案中,Ab是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:18的D1-HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列。

[0204] 在一些实施方案中,L是可切割的接头。在一些实施方案中,L是不可切割的接头。在一些实施方案中,L包含二肽。在一些实施方案中,L包含PAB部分。

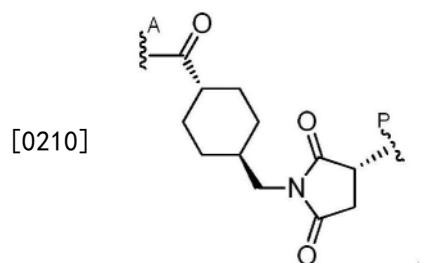
[0205] 在一些实施方案中,L包含具有以下结构的部分:



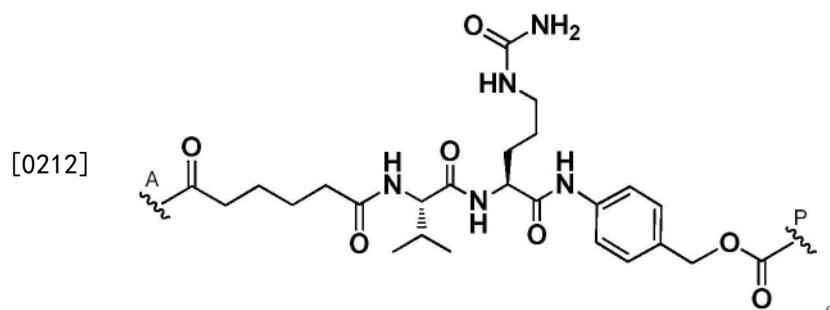
[0207] 在一些实施方案中,L包含具有以下结构的部分:



[0209] 在一些实施方案中,L包含具有以下结构的部分:



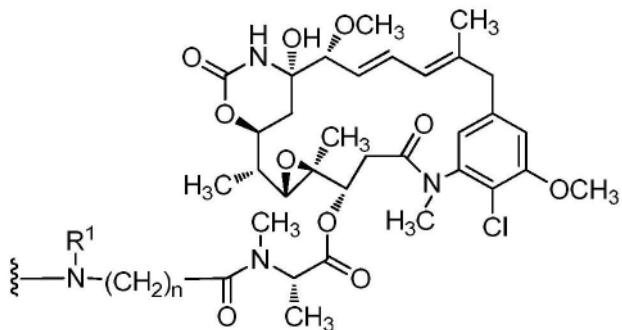
[0211] 在一些实施方案中,L包含具有以下结构的部分:



[0213] 在一些实施方案中,Pay是美登木素生物碱。

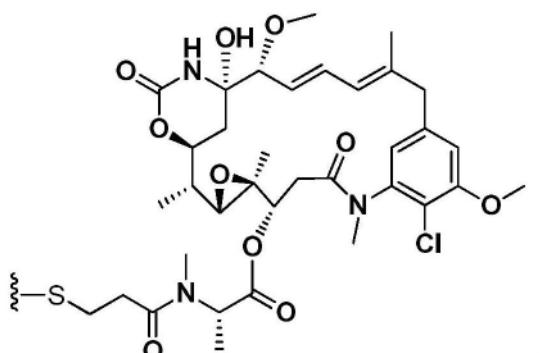
[0214] 在一些实施方案中,Pay是:

[0215]

[0216] 其中R<sup>1</sup>是烷基。

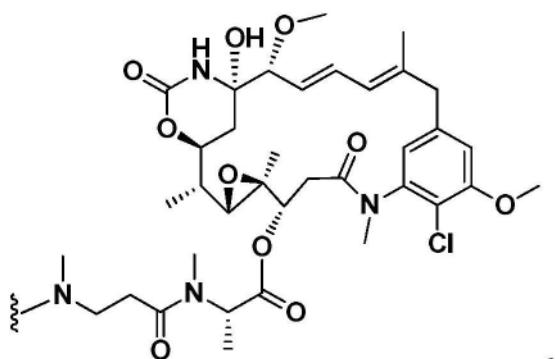
[0217] 在一些实施方案中,Pay是:

[0218]



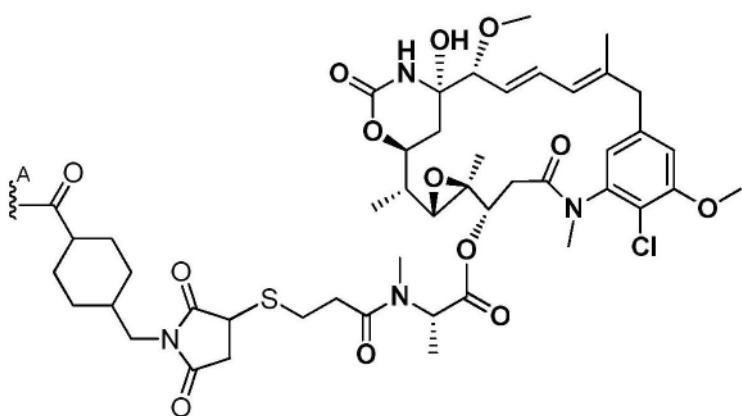
[0219] 在一些实施方案中,Pay是:

[0220]

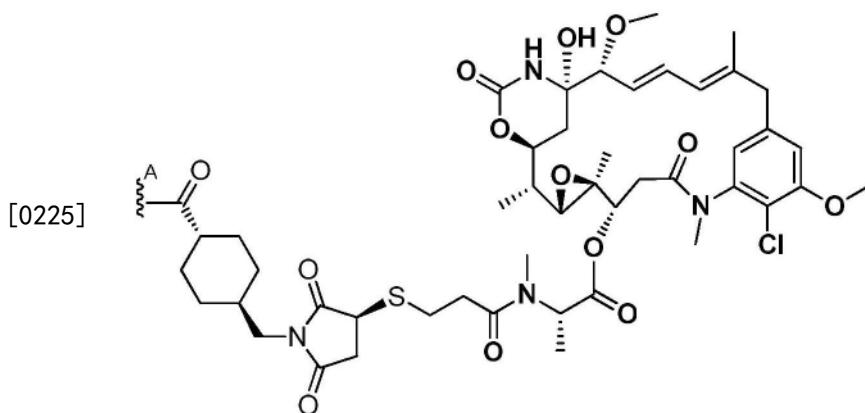


[0221] 在一些实施方案中,n是2至5的整数。在一些实施方案中,-L-Pay是:

[0222]

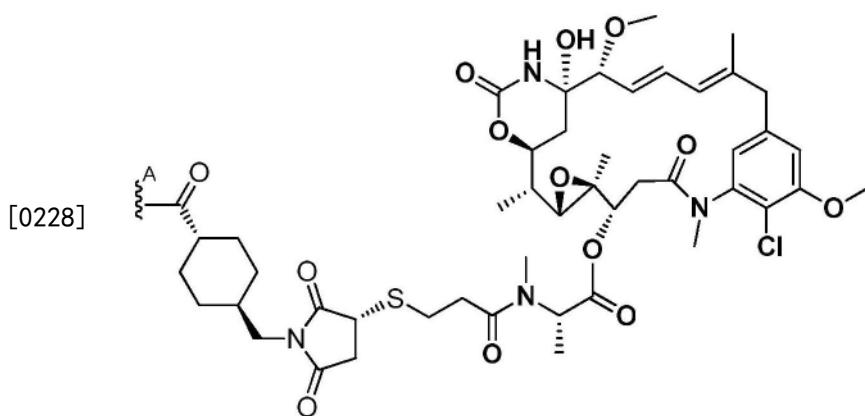
[0223] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键。

[0224] 在一些实施方案中,-L-Pay是:



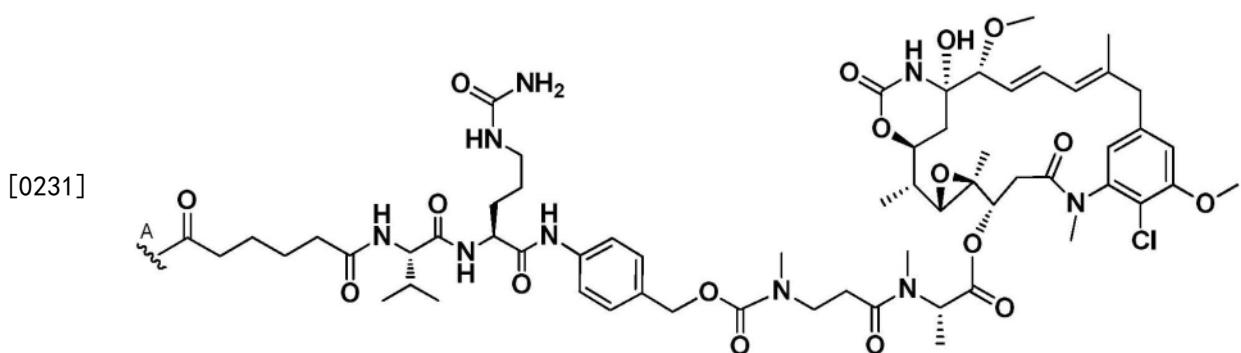
[0226] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键。

[0227] 在一些实施方案中, -L-Pay是



[0229] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键。

[0230] 在一些实施方案中, -L-Pay是:



[0232] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键。

[0233] 在一些实施方案中, 缀合物具有以下结构:

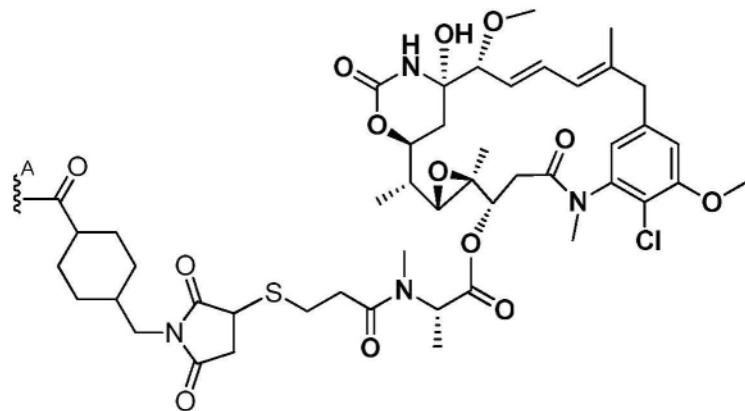
[0234]  $\text{Ab-}[\text{L-Pay}]_n$

[0235] 其中:

[0236] Ab是抗MET抗体, 其包含SEQ ID NO:82的HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:138的LCVR氨基酸序列;

[0237] L-Pay是

[0238]



[0239] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键;并且n是2-5的整数。

[0240] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

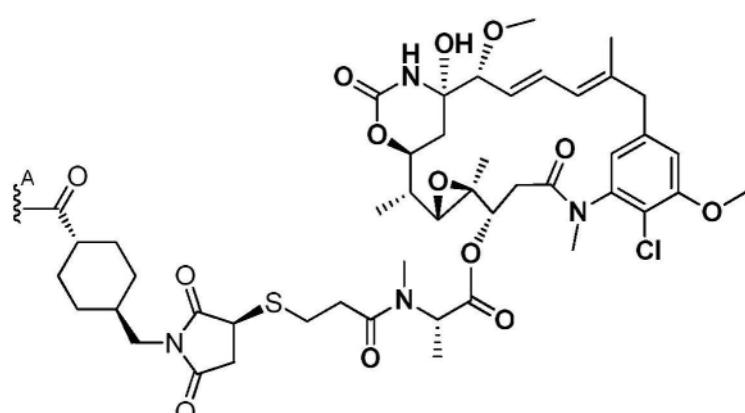
[0241] Ab- $[L\text{-Pay}]_n$

[0242] 其中:

[0243] Ab是抗MET抗体,其包含SEQ ID NO:82的HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:138的LCVR氨基酸序列;

[0244] L-Pay是

[0245]



[0246] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键;并且n是2-5的整数。

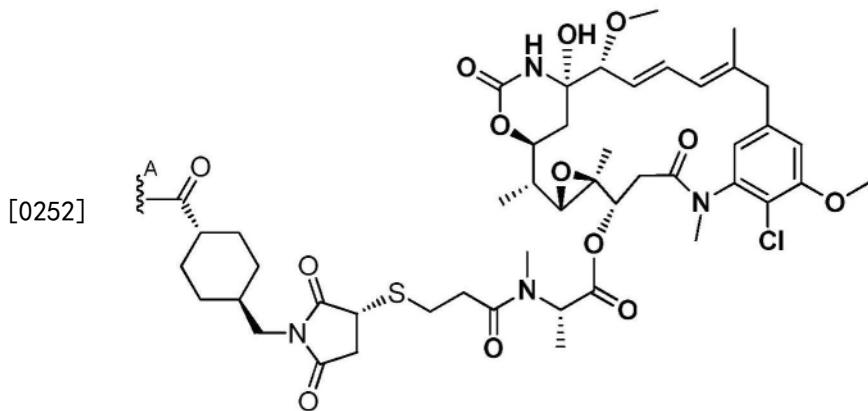
[0247] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

[0248] Ab- $[L\text{-Pay}]_n$

[0249] 其中:

[0250] Ab是抗MET抗体,其包含SEQ ID NO:82的HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:138的LCVR氨基酸序列;

[0251] L-Pay是



[0253] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键;并且n是2-5的整数。

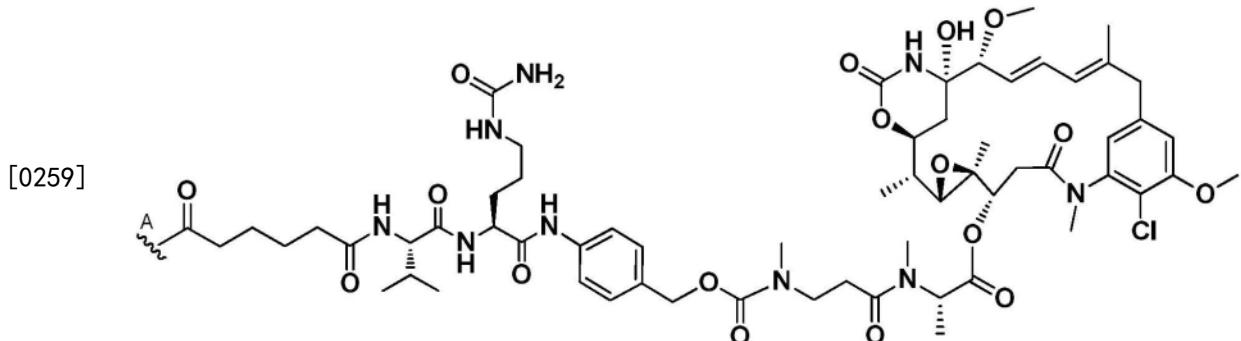
[0254] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

[0255]  $Ab-[L-Pay]_n$

[0256] 其中:

[0257]  $Ab$ 是抗MET抗体,其包含SEQ ID NO:82的HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:138的LCVR氨基酸序列;

[0258]  $L-Pay$ 是



[0260] 其中 $\xi^A$ 是与抗体连接的键;并且n是2-5的整数。

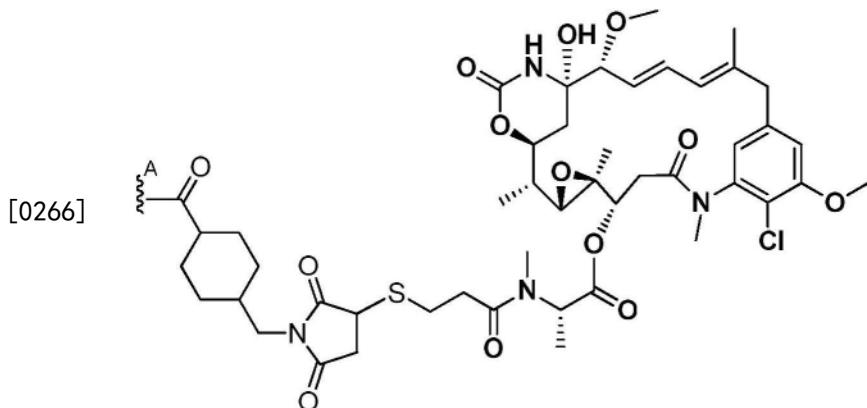
[0261] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

[0262]  $Ab-[L-Pay]_n$

[0263] 其中:

[0264]  $Ab$ 是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:58的D1-HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列;

[0265]  $L-Pay$ 是



[0267] 其中 $\xi^A$ 是与抗原结合蛋白连接的键;并且n是2-5的整数。

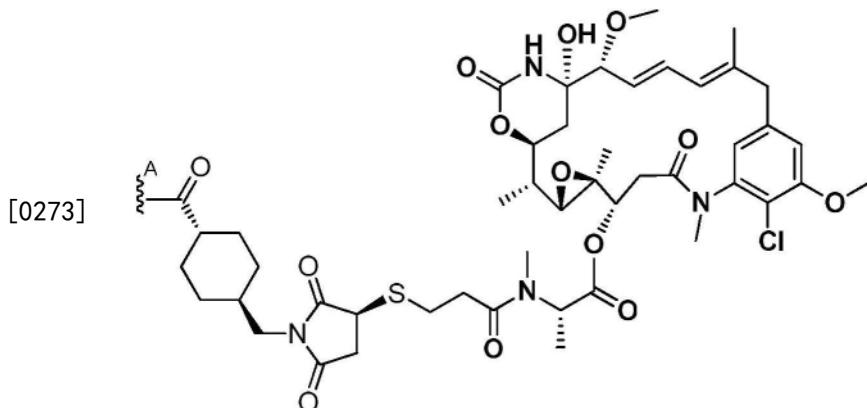
[0268] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

[0269]  $Ab-[L-Pay]_n$

[0270] 其中:

[0271]  $Ab$ 是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:58的D1-HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列;

[0272]  $L-Pay$ 是



[0274] 其中 $\xi^A$ 是与抗原结合蛋白连接的键;并且n是2-5的整数。

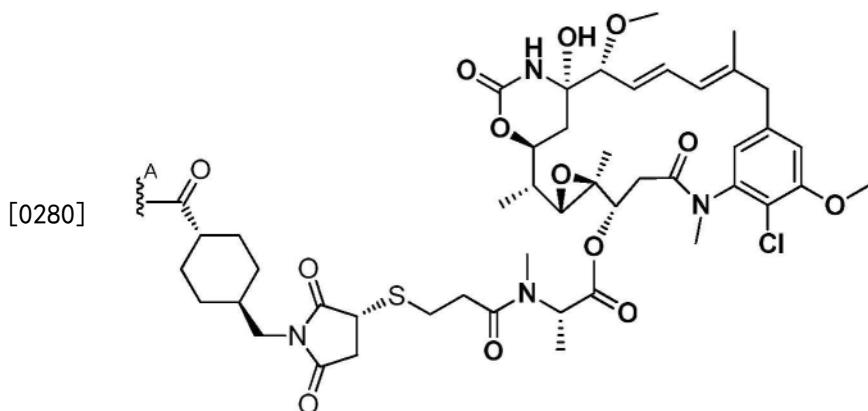
[0275] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

[0276]  $Ab-[L-Pay]_n$

[0277] 其中:

[0278]  $Ab$ 是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:58的D1-HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列;

[0279]  $L-Pay$ 是



[0281] 其中 $\xi^A$ 是与抗原结合蛋白连接的键;并且n是2-5的整数。

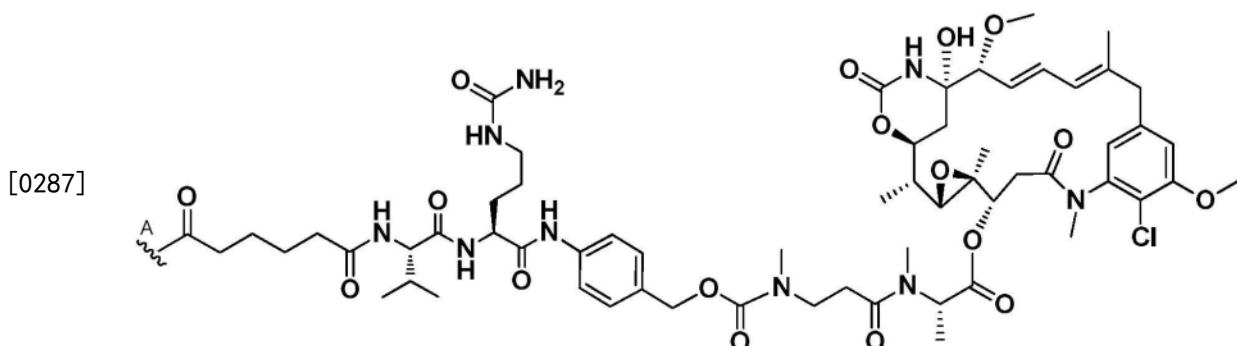
[0282] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

[0283]  $Ab-[L-Pay]_n$

[0284] 其中:

[0285]  $Ab$ 是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:58的D1-HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列;

[0286]  $L-Pay$ 是



[0288] 其中 $\xi^A$ 是与抗原结合蛋白连接的键;并且n是2-5的整数。

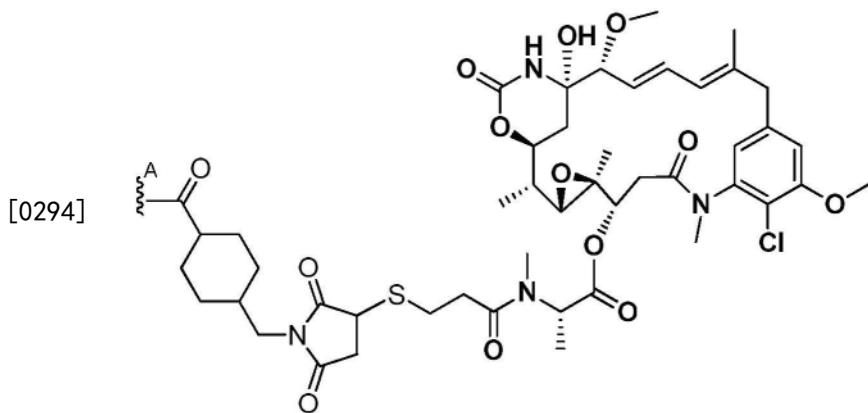
[0289] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

[0290]  $Ab-[L-Pay]_n$

[0291] 其中:

[0292]  $Ab$ 是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:18的D1-HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列;

[0293]  $L-Pay$ 是



[0295] 其中 $\xi^A$ 是与抗原结合蛋白连接的键;并且n是2-5的整数。

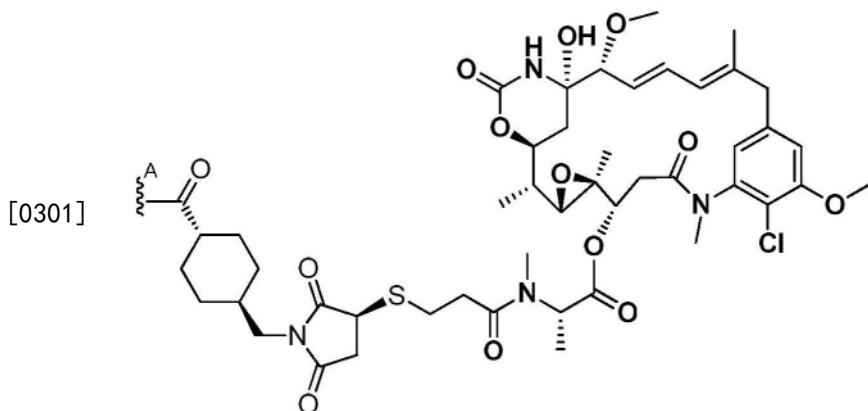
[0296] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

[0297]  $Ab - [L-Pay]_n$

[0298] 其中:

[0299]  $Ab$ 是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:18的D1-HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列;

[0300]  $L-Pay$ 是



[0302] 其中 $\xi^A$ 是与抗原结合蛋白连接的键;并且n是2-5的整数。

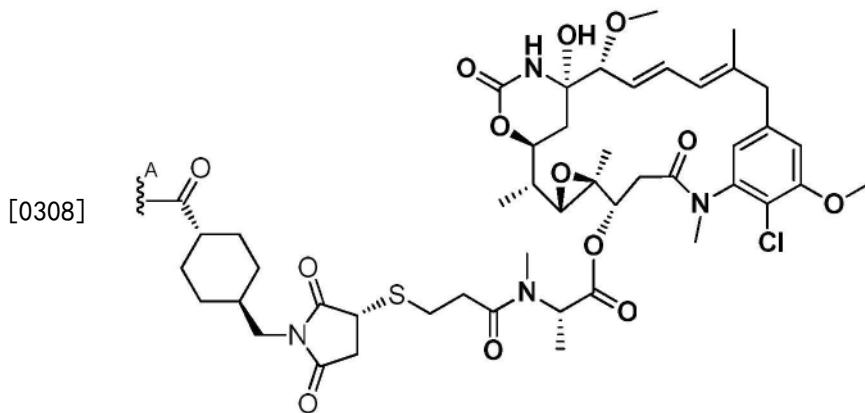
[0303] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

[0304]  $Ab - [L-Pay]_n$

[0305] 其中:

[0306]  $Ab$ 是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:18的D1-HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列;

[0307]  $L-Pay$ 是



[0309] 其中 $\xi^A$ 是与抗原结合蛋白连接的键;并且n是2-5的整数。

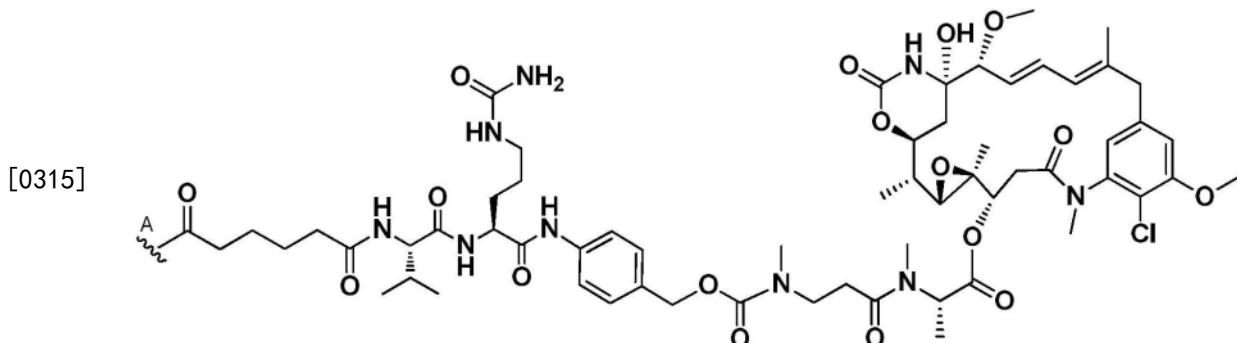
[0310] 在一些实施方案中,缀合物具有以下结构:

[0311]  $Ab - [L-Pay]_n$

[0312] 其中:

[0313]  $Ab$ 是MET x MET双特异性抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:18的D1-HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列;

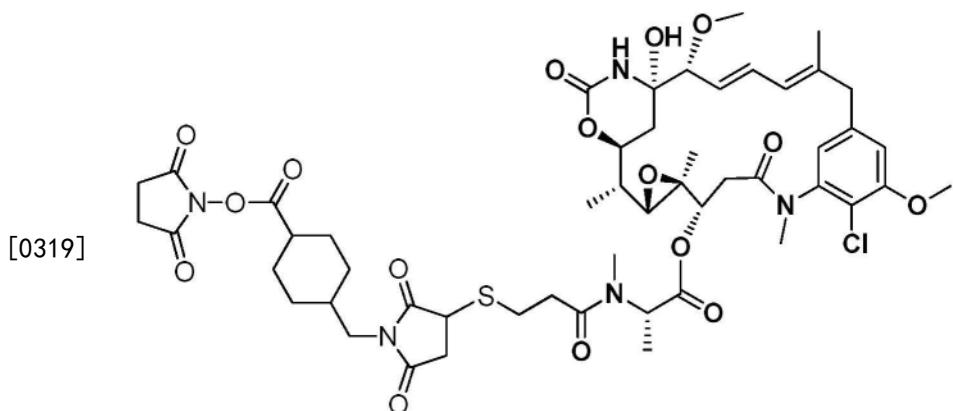
[0314]  $L-Pay$ 是



[0316] 其中 $\xi^A$ 是与抗原结合蛋白连接的键;并且n是2-5的整数。

[0317] 可以使用本领域普通技术人员已知的缀合条件制备本发明所述的抗体药物缀合物(参见例如,Doronina等.Nature Biotechnology 2003,21,7,778,其通过引用整体并入本文)。在一些实施方案中,通过使本发明所述的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合蛋白与包含所需接头和细胞毒性剂的化合物接触,制备抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合蛋白抗体药物缀合物,其中所述接头具有与抗体或抗原结合蛋白反应的部分,例如在抗体或抗原结合蛋白的所需残基处。

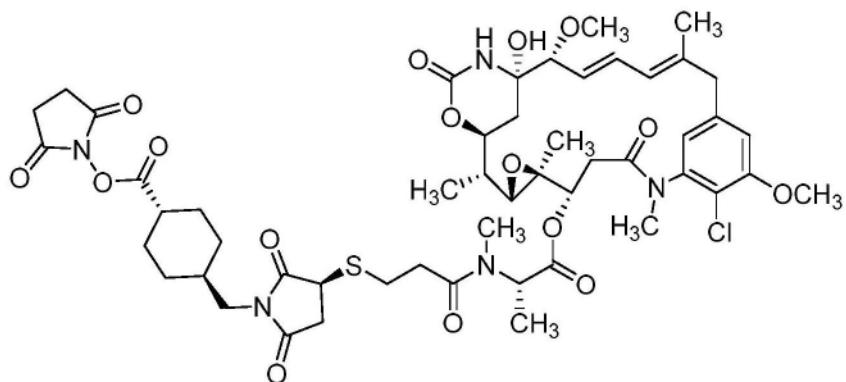
[0318] 在一些实施方案中,本发明提供了制备抗体-药物缀合物的方法,其包含使本发明所述的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合蛋白与具有下式A<sup>1</sup>的化合物:

 $A^1$ 

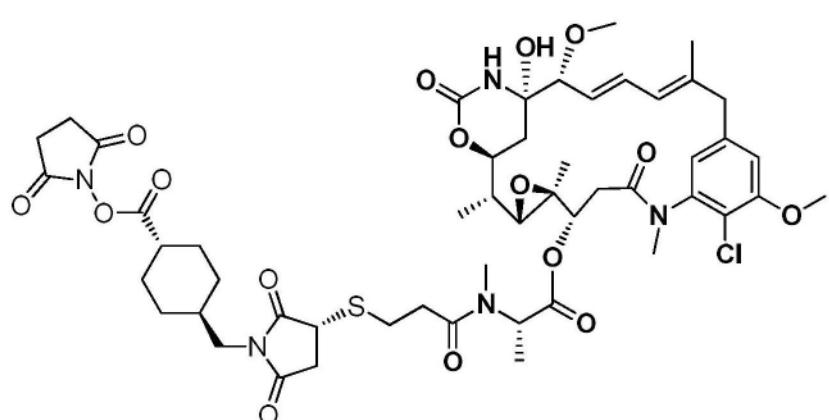
[0320] 和水性稀释剂接触。

[0321] 在一些实施方案中,式 $A^1$ 化合物以化学计量过量存在。在一些实施方案中,式 $A^1$ 化合物以5-6倍的化学计量过量存在。在一些实施方案中,水性稀释剂包含HEPES。在一些实施方案中,水性稀释剂包含DMA。

[0322] 在一些实施方案中,式 $A^1$ 化合物为式 $A^2$ 或 $A^3$ 化合物:

 $A^2$ 

[0323]

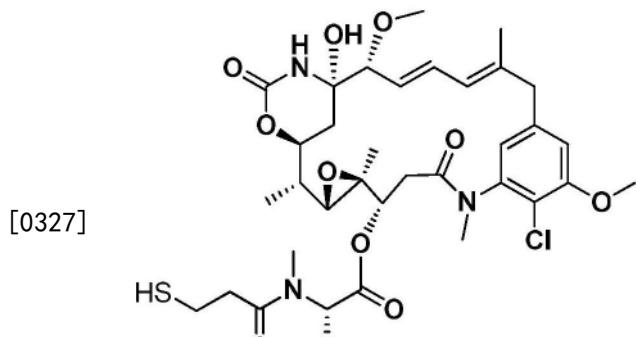
 $A^3$ 

[0324] 在一些实施方案中,式 $A^2$ 化合物是 $A^3$ 立体异构纯的。在一些实施方案中,式 $A^1$ 化合物包含式 $A^1$ 或 $A^2$ 化合物,其中 $A^1$ 或 $A^2$ 化合物以大于50%的非对映异构体过量存在。在某些实施方案中,非对映异构体过量超过70%。在某些实施方案中,非对映异构体过量超过90%。

在某些实施方案中,非对映异构体过量超过95%。

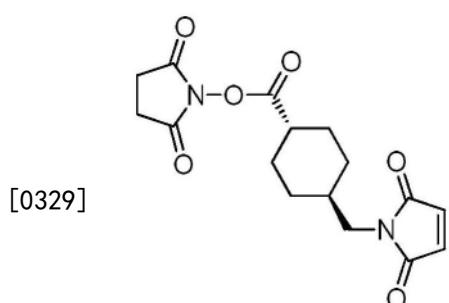
[0325] 术语“非对映异构体过量”是指所需单一非对映异构体的摩尔分数与组合物中剩余的非对映异构体相比的差异。非对映异构体过量计算如下: (单一非对映异构体的量) - (其他非对映异构体的量) / 1。例如,含有90%的1和10%的2、3、4或其混合物的组合物具有80% [(90-10) / 1]的非对映异构体过量。含有95%的1和5%的2、3、4或其混合物的组合物具有90% [(95-5) / 1]的非对映异构体过量。含有99%的1和1%的2、3、4或其混合物的组合物具有98% [(99-1) / 1]的非对映异构体过量。对于1、2、3或4中的任何一个,可以类似地计算非对映异构体过量。

[0326] 在一些实施方案中,通过使式(a)化合物:



(a)

[0328] 与式(b)化合物

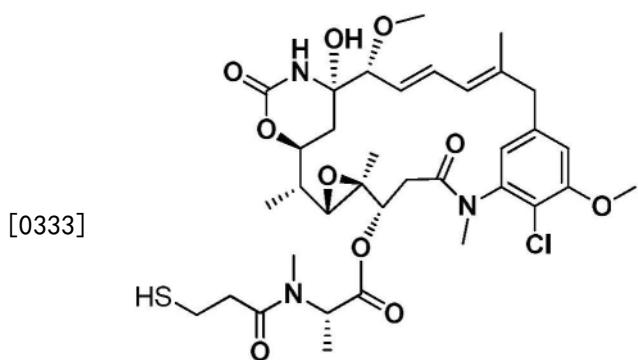


(b)

[0330] 在硅胶和稀释剂存在下接触来制备式A<sup>1</sup>化合物。在一些实施方案中,稀释剂包含有机溶剂和水。

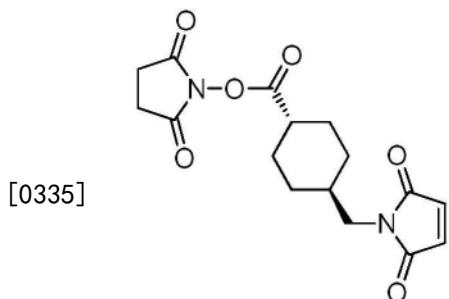
[0331] 本发明还提供了通过以下方法制备的产物:

[0332] (i) 使式(a)化合物:



(a)

[0334] 与式 (b) 化合物：

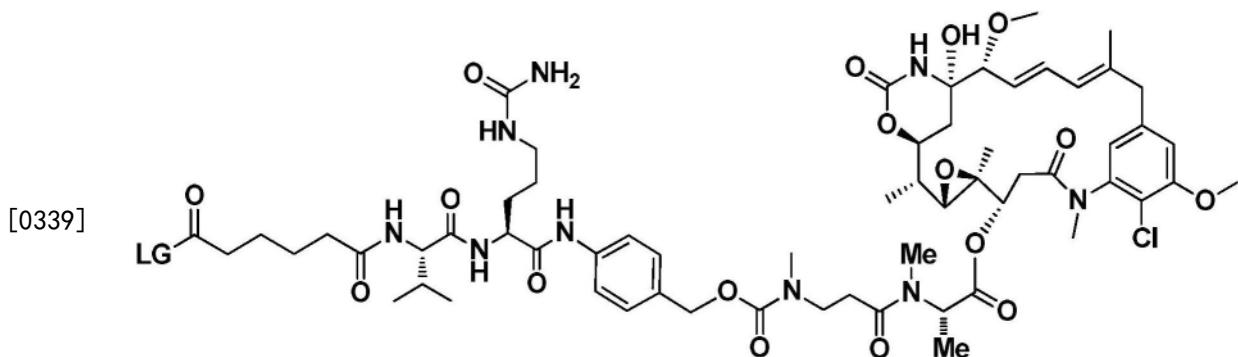


(b)

[0336] 在硅胶和稀释剂存在下接触合成中间体；并且

[0337] (ii) 使本发明所述的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合蛋白与中间体和水性稀释剂接触。

[0338] 在一些实施方案中，本发明提供了制备抗体-药物缀合物的方法，其包含使本发明所述的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合蛋白与具有下式B的化合物和水性稀释剂接触：

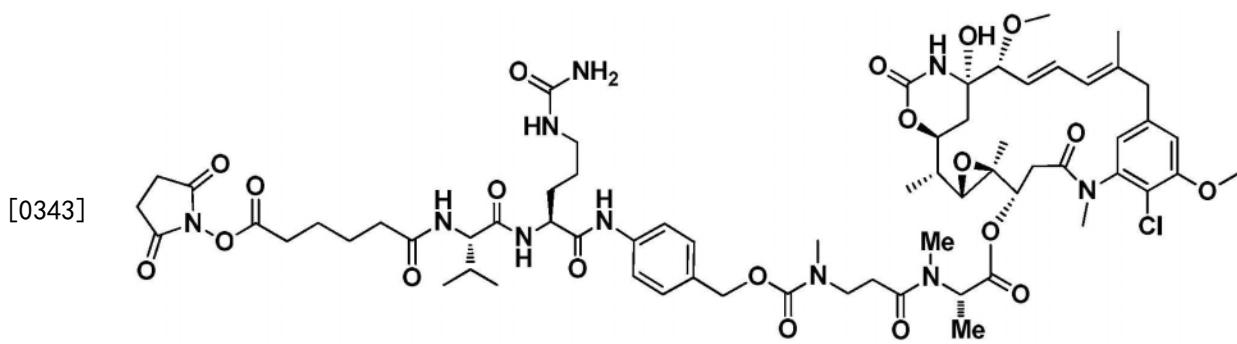


B

[0340] 其中LG是离去基团。

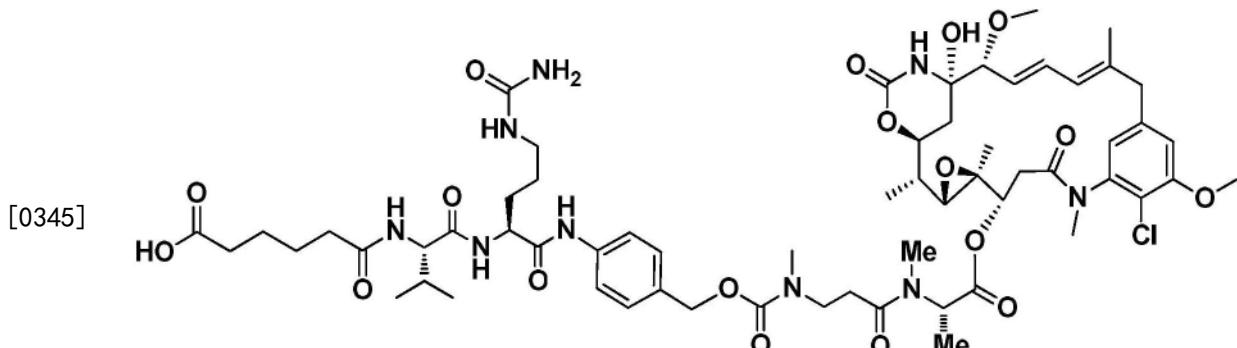
[0341] 在一些实施方案中，式B化合物以化学计量过量存在。在一些实施方案中，式B化合物以5-6倍的化学计量过量存在。在一些实施方案中，水性稀释剂包含HEPES。在一些实施方案中，水性稀释剂包含DMA。在一些实施方案中，-C(0)-LG是酯，例如NHS或三氟苯基酯。

[0342] 在一些实施方案中，式B化合物是式B<sup>1</sup>化合物：



B<sup>1</sup>。

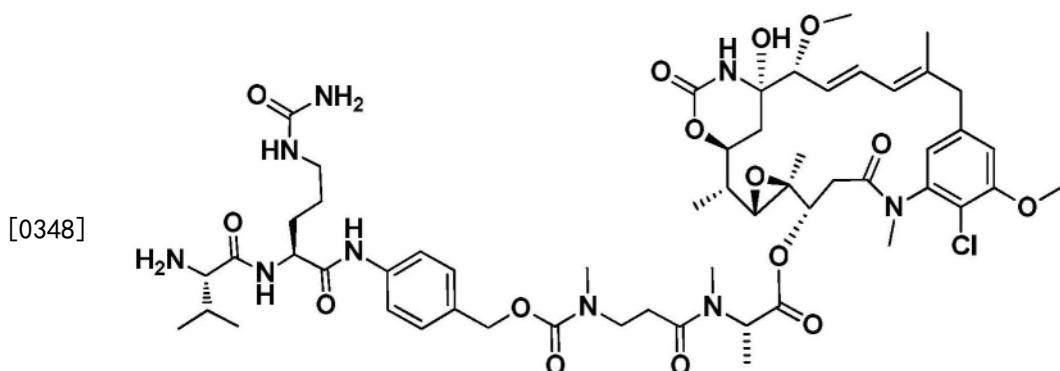
[0344] 在一些实施方案中,通过使式C化合物:



C

[0346] 与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、肽偶联试剂和有机稀释剂接触来制备式B<sup>1</sup>化合物。合适的肽偶联试剂包括那些激活(即,使反应性羧酸部分与亲核试剂反应)的试剂。在某些实施方案中,肽偶联试剂是N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)。在一些实施方案中,有机溶剂是二氯甲烷。

[0347] 在一些实施方案中,通过使式D化合物:



D

[0349] 与己二酸、肽偶联剂和有机溶剂接触来制备式C化合物。在某些实施方案中,肽偶联剂是2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氢喹啉(EEDQ)。在某些实施方案中,有机溶剂包含二氯甲烷。化合物D可如W02014/145090中所述制备。

[0350] 表位作图和相关技术

[0351] 抗体和抗原结合结构域结合的表位可以由MET蛋白的3个或更多个(例如,3、4、5、

6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个)氨基酸的单个连续序列组成。或者,相关表位可以由MET的多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)组成。在一些实施方案中,表位位于MET的配体结合结构域上或附近。在其他实施方案中,表位位于MET的配体结合结构域之外,例如,在MET表面上的位置,当与该表位结合时,抗体不干扰HGF与MET的结合。

[0352] 如本发明其他地方所述,MET x MET双特异性抗原结合分子的各个抗原结合结构域(D1和D2)可以相对于彼此结合不同的、或非重叠的、或部分重叠的表位。如本文所用,“部分重叠的表位”是指,通过本领域已知的任何表位作图方法所确定的(例如,X射线晶体学、丙氨酸扫描诱变、氢/氘交换[HDX]、结构域交换等),第一和第二表位共享少于5个、少于4个、少于3个或仅一个共同的氨基酸。D1和D2结构域可能彼此不具有竞争性。例如,在某些实施方案中,特定MET x MET双特异性抗原结合分子的D1结构域与其在MET上的表位的结合不抑制(或仅极少地抑制)MET x MET双特异性抗原结合分子的D2结构域与其在MET上的表位的结合。由于D1和D2组分的各个表位的非重叠(或至多部分重叠)性质,MET x MET双特异性抗原结合分子能够结合细胞表面上的单个MET分子。

[0353] 可以使用本领域普通技术人员已知的各种技术来确定与本公开的抗体和抗原结合结构域相互作用的MET上的表位。可用于确定特定抗体或抗原结合结构域的表位或结合结构域的示例性技术包括例如点突变(例如,丙氨酸扫描诱变、精氨酸扫描诱变等)、肽印迹分析(Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463)、蛋白酶保护和肽切割分析。另外,可以使用如抗原的表位切除、表位提取和化学修饰的方法(Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496)。可用于鉴定与抗体相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测的氢/氘交换。一般而言,氢/氘交换方法涉及对感兴趣的蛋白质进行氘标记,然后将抗体与氘标记的蛋白质结合。接下来,将蛋白质/抗体复合物转移到水中以允许在除抗体保护的残基(其保留氘标记)之外的所有残基处发生氢-氘交换。在抗体解离后,对靶蛋白进行蛋白酶切割和质谱分析,从而揭示氘标记的残基,其对应于抗体与之相互作用的特定氨基酸。参见例如,Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267 (2) :252-259; Engen和Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A。X射线晶体结构分析也可用于鉴定抗体与之相互作用的多肽内的氨基酸。

[0354] 本发明进一步提供了抗MET抗体(包括双特异性抗体),其与本发明所述的任何特定示例性抗体或抗原结合结构域(例如,包含本文表1中列出的任何氨基酸序列的抗体)结合相同的表位。同样地,本发明还提供了与本发明所述的任何特定示例性抗体(例如,包含本文表1中列出的任何氨基酸序列的抗体)竞争结合MET的抗MET抗体。在一些实施方案中,抗MET抗体结合的人MET表位包含SEQ ID NO:155的第192-204位氨基酸、第305-315位氨基酸和/或第421-455位氨基酸。在一些实施方案中,人MET的第一表位包含SEQ ID NO:155的第192-204位氨基酸;并且人MET的第二表位包含SEQ ID NO:155的第305-315位氨基酸和第421-455位氨基酸。

[0355] 通过使用本领域已知的和本发明示例的常规方法,可以容易地确定抗体是否与参考抗MET抗体结合相同表位,或与参考抗MET抗体竞争结合。例如,为了确定测试抗体是否与本发明提供的参考抗MET抗体结合相同的表位,允许参考抗体结合MET蛋白。接下来,评估测试抗体结合MET分子的能力。如果测试抗体在参考抗MET抗体饱和结合后仍能够结合MET,则可以得出结论,测试抗体与参考抗MET抗体结合的表位不同。另一方面,如果测试抗体在参

考抗MET抗体饱和结合后不能与MET分子结合,则测试抗体可以结合与参考抗MET抗体结合的表位相同的表位。然后可以进行额外的常规实验(例如,肽突变和结合分析)以确认观察到的测试抗体缺乏结合是否实际上是由于与参考抗体结合相同的表位或者是否是空间阻断(或另一个现象)导致观察到的结合不足。可以使用ELISA、RIA、Biacore、流式细胞术或本领域可获得的任何其他定量或定性抗体结合测定来进行这种实验。根据某些实施方案,如果在竞争性结合测定中测量到,例如一种抗体的1倍、5倍、10倍、20倍或100倍过量抑制另一种抗体至少50%,但优选75%、90%或甚至99%的结合,则两种抗体结合相同(或重叠)表位(参见例如,Junghans等,Cancer Res.1990;50:1495-1502)。或者,如果抗原中基本上所有减少或消除一种抗体结合的氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则认为这两种抗体结合相同的表位。如果减少或消除一种抗体结合的氨基酸突变中仅有一个子集减少或消除另一种抗体的结合,则认为两种抗体具有“重叠表位”。

[0356] 为了确定抗体是否与参考抗MET抗体竞争结合(或交叉竞争结合),上述结合方法以两个方向进行:在第一个方向,允许参考抗体在饱和条件下结合MET蛋白质,然后评估测试抗体与MET分子的结合。在第二个方向,使测试抗体在饱和条件下与MET分子结合,然后评估参考抗体与MET分子的结合。如果在两个方向上仅第一(饱和)抗体能够结合MET分子,则推断测试抗体和参考抗体竞争结合MET。如本领域普通技术人员所理解的,与参考抗体竞争结合的抗体可能不一定与参考抗体结合相同的表位,但可通过结合重叠或相邻的表位来空间阻断参考抗体的结合。

[0357] 人抗体的制备

[0358] 本发明提供的抗MET抗体和MET x MET双特异性抗体可以是完全人抗体。产生单克隆抗体(包括完全人单克隆抗体)的方法是本领域已知的。可以在本公开的上下文中使用任何这样的已知方法来制备特异性结合人MET的人抗体。

[0359] 例如,使用VELOCIMMUNE<sup>TM</sup>技术或用于产生完全人单克隆抗体的任何其他类似已知方法,最初分离具有人可变区和小鼠恒定区的MET的高亲和力嵌合抗体。如在下面的实验部分中,对抗体进行表征和选择以获得所需特征,包括亲和力、配体阻断活性、选择性、表位等。如果需要,将小鼠恒定区替换为所需的人恒定区,例如野生型或修饰的IgG1或IgG4,以产生完全人抗MET抗体。虽然选择的恒定区可根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特征存在于可变区中。在某些情况下,直接从抗原阳性B细胞中分离出完全人抗MET抗体。

[0360] 生物等效物

[0361] 本发明提供的抗MET抗体和抗体片段包括具有不同于所述抗体的氨基酸序列但保留结合人MET的能力的蛋白质。当与亲本序列比较时,此类变体抗体和抗体片段包含氨基酸的一个或多个添加、缺失或取代,但显示出与所述抗体的生物学活性基本上等效的生物学活性。同样地,与公开的序列相比,本公开的编码抗MET抗体的DNA序列包括包含核苷酸的一个或多个添加、缺失或取代的序列,但编码与本公开的抗MET抗体或抗体片段基本上生物等效的抗MET抗体或抗体片段。以上讨论了此类变体氨基酸和DNA序列的实例。

[0362] 例如,如果两种抗原结合蛋白或抗体是药物等效物或药物替代物,即,当在相似的实验条件下以相同的摩尔剂量(单剂量或多剂量)施用时,其吸收速率和吸收程度不显示显著差异,则认为它们是生物等效的。如果一些抗体在吸收程度上相同而在吸收速率上不同,

则可被视为等效物或药物替代物,但可被认为是生物等效的,因为吸收速率的这种差异是有意的并且反映在说明书中,对于例如长期使用而达到有效体内药物浓度不是必需的,并且对于所研究的特定药物产品而言被认为是医学上无关紧要的。

[0363] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白的安全性、纯度和效力没有临幊上有意义的差异,则它们是生物等效的。

[0364] 在一个实施方案中,如果患者可以在参照产品和生物产品之间切换一次或多次而与没有这种切换的持续治疗相比没有预期的不良反应风险增加,包括免疫原性的临幊显著变化,或者有效性降低,则两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0365] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白均通过对于使用条件常见的作用机制起作用,达到这些机制已知的程度,则它们是生物等效的。

[0366] 可以通过体内和体外方法证明生物等效性。生物等效性测量包括例如(a)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中在血液、血浆、血清或其他生物流体中测量抗体或其代谢物的浓度随时间的变化;(b)与人体内生物利用度数据相关并可合理预测人体内生物利用度数据的体外试验;(c)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中测量抗体(或其靶标)的适当急性药理作用随时间的变化;(d)在良好控制的临床试验中,确定抗体的安全性、有效性或生物利用度或生物等效性。

[0367] 可以通过例如进行残基或序列的各种取代或去除生物活性上不希望的末端或内部残基或序列来构建本发明提供的抗MET抗体的生物等效变体。例如,可以去除或用其他氨基酸替换不是生物活性必需的半胱氨酸残基,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫键。在其他情况下,生物等效抗体可包括抗MET抗体变体,其包含修饰抗体糖基化特征的氨基酸变化,例如消除或去除糖基化的突变。

#### [0368] 物种选择性和物种交叉反应性

[0369] 根据某些实施方案,本公开提供了与人MET结合但不与来自其他物种的MET结合的抗MET抗体(和包含抗MET抗原结合结构域的抗原结合分子)。本公开还包括与人MET和来自一种或多种非人物种的MET结合的抗MET抗体(和包含抗MET抗原结合结构域的抗原结合分子)。例如,抗MET抗体和抗原结合分子可以结合人MET,并且视具体情况而定,可以结合或不结合小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、食蟹猴、狨猴、恒河猴或黑猩猩MET中的一种或多种。根据某些示例性实施方案,本发明提供了特异性结合人MET和食蟹猴(例如食蟹猴(*Macaca fascicularis*))MET的抗MET抗体和抗原结合分子。其他抗MET抗体和抗原结合分子结合人MET,但不与食蟹猴MET结合或仅与食蟹猴MET弱结合。

#### [0370] 多特异性抗体

[0371] 如本文其他地方所述,本公开提供了包含两个不同抗原结合结构域的双特异性抗原结合分子,其中第一抗原结合结构域(D1)结合MET上的第一表位,并且其中第二抗原结合结构域(D2)结合MET上的第二表位。在某些实施方案中,D1和D2结构域结合的MET上的第一和第二表位是不同的,或不重叠的,或部分重叠的。根据该方面,D1结构域可包含本文表1中列出的任何HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列,并且D2结构域可包含本文表1中列出的任何其他HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列(只要D1结构域的结合特异性与D2结构域的结合特异性不同,和/或获得D1的抗原结合蛋白不与获得D2的抗原结合蛋白竞争结合MET)。在一些实施方案中,抗MET抗体结合的人MET表位包含SEQ ID NO:155的第192-204位氨基酸、第305-315位氨

基酸和/或第421-455位氨基酸。在一些实施方案中,人MET的第一表位包含SEQ ID NO:155的第192-204位氨基酸;并且人MET的第二表位包含SEQ ID NO:155的第305-315位氨基酸和第421-455位氨基酸。

[0372] 根据本公开的另一方面,还提供了常规双特异性抗体,其中所述双特异性抗体的一个臂结合人MET上的表位,并且所述双特异性抗体的另一个臂结合除MET之外的第二抗原。MET结合臂可包含本文表1中列出的任何HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列。在某些实施方案中,MET结合臂结合人MET并阻断HGF与MET的结合。在其他实施方案中,MET结合臂结合人MET但不阻断HGF与MET的结合。

[0373] 可以在本公开的上下文中使用的示例性双特异性抗体形式涉及使用第一免疫球蛋白(Ig)C<sub>H</sub>3结构域和第二Ig C<sub>H</sub>3结构域,其中第一和第二Ig C<sub>H</sub>3结构域有至少一个氨基酸彼此不同,并且其中与不具有氨基酸差异的双特异性抗体相比,至少一个氨基酸差异降低双特异性抗体与蛋白A的结合。在一个实施方案中,第一Ig C<sub>H</sub>3结构域结合蛋白A并且第二Ig C<sub>H</sub>3结构域含有降低或消除蛋白A结合的突变,例如H95R修饰(根据IMGT外显子编号;根据EU编号的H435R)。第二C<sub>H</sub>3可进一步包含Y96F修饰(根据IMGT;根据EU的Y436F)。可以存在于第二C<sub>H</sub>3内的其他修饰包括:在IgG1抗体的情况下,D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(根据IMGT;根据EU的D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I);在IgG2抗体的情况下,N44S、K52N和V82I(IMGT;根据EU的N384S、K392N和V422I);在IgG4抗体的情况下,Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(根据IMGT;根据EU的Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I)。上述双特异性抗体形式的变化涵盖在本发明的范围内。

[0374] 可以在本公开的上下文中使用的其他示例性双特异性形式包括但不限于例如基于scFv或双抗体双特异性形式、IgG-scFv融合、双可变结构域(DVD)-Ig、四源杂交瘤、孔洞结构(knobs-into-holes)、共同轻链(例如,带有孔洞结构的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED) body、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双作用Fab(DAF)-IgG和Mab<sup>2</sup>双特异性形式(参见例如,Klein等2012,mAbs 4:6,1-11,以及其中引用的参考文献,用于前述形式的综述)。还可以使用肽/核酸缀合构建双特异性抗体,例如,其中使用具有正交化学反应性的非天然氨基酸来产生位点特异性抗体-寡核苷酸缀合物,然后将其自组装成具有确定组成、价数和几何结构的多聚体复合物。(参见例如,Kazane等,J.Am.Chem.Soc.[Epub:2012年12月4日])。

### [0375] 治疗制剂和施用

[0376] 本发明提供了包含本发明的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子的药物组合物。药物组合物可以与合适的载体、赋形剂和其他提供改善的转移、递送、耐受性等的试剂一起配制。

### [0377] 抗体的治疗用途

[0378] 本发明提供的方法包括向有需要的受试者施用包含抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子(例如,包含本文表1中列出的任何HCVR/LCVR或CDR序列的抗MET,或包含本文表5中列出的任何D1和D2组分的MET x MET双特异性抗原结合分子)的治疗组合物。治疗组合物可包含本发明公开的任何抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子,和药学上可接受的载体或稀释剂。

### [0379] 抗MET抗体和MET x MET双特异性抗原结合分子尤其可用于治疗、预防和/或改善

与MET表达、信号传导或活性相关或由其介导的任何疾病或病症,或通过阻断MET和HGF之间的相互作用,或以其他方式抑制MET活性和/或信号传导,和/或促进受体内化和/或降低细胞表面受体数量可治疗的任何疾病或病症。

[0380] 例如,本公开的抗MET抗体和MET x MET双特异性抗原结合分子可用于治疗表达(或过表达)MET的肿瘤。例如,抗MET抗体和MET x MET双特异性抗原结合分子可用于治疗脑和脑膜、口咽、肺和支气管树、胃肠道、男性和女性生殖道、肌肉、骨骼、皮肤和附属物、结缔组织、脾脏、免疫系统、血液形成细胞和骨髓、肝脏和泌尿道,以及特殊的感觉器官如眼睛中出现的原发性和/或转移性肿瘤。在某些实施方案中,抗MET抗体和MET x MET双特异性抗原结合分子用于治疗以下一种或多种癌症:急性骨髓性白血病、成人T细胞白血病、星形细胞瘤、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、慢性骨髓白血病、结直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌(例如伴MET扩增的胃癌)、胶质母细胞瘤、头颈癌(例如头颈部鳞状细胞癌[HNSCC])、卡波西肉瘤、肾癌、平滑肌肉瘤、肝癌、肺癌(例如非小细胞肺癌[NSCLC])、淋巴瘤、恶性胶质瘤、恶性间皮瘤、黑色素瘤、间皮瘤、MFH/纤维肉瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、小细胞肺癌、滑膜肉瘤、甲状腺癌和维尔姆斯瘤。

[0381] 在本发明所述的治疗方法的上下文中,抗MET抗体和MET x MET双特异性抗原结合分子可以作为单一疗法(即,作为唯一的治疗剂)或与一种或多种另外的治疗剂(其实例在本文其他地方描述)组合施用。

[0382] 组合疗法和制剂

[0383] 本发明提供了组合物和治疗制剂,其包含本发明所述的任何抗MET抗体和MET x MET双特异性抗原结合分子与一种或多种另外的治疗活性组分的组合,以及包含向有此需要的受试者施用此类组合的治疗方法。

[0384] 抗MET抗体和MET x MET双特异性抗原结合分子可以与一种或多种选自下组的其他治疗活性组分共同配制和/或施用:MET拮抗剂(例如,抗MET抗体[例如,奥那妥珠单抗、艾碧妥珠单抗和H4H14639D]或MET的小分子抑制剂)、EGFR拮抗剂(例如,抗EGFR抗体[例如,西妥昔单抗或帕尼单抗]或EGFR的小分子抑制剂[例如,吉非替尼或厄洛替尼])、另一种EGFR家族成员如Her2/ErbB2、ErbB3或ErbB4的拮抗剂(例如,抗ErbB2[例如,曲妥珠单抗或T-DM1{KADCYLA®}]、抗ErbB3或抗ErbB4抗体或ErbB2、ErbB3或ErbB4活性的小分子抑制剂)、EGFRvIII的拮抗剂(例如,抗EGFRvIII抗体)、IGF1R拮抗剂(例如,抗IGF1R抗体)、B-raf抑制剂(例如,维罗非尼、索拉非尼、GDC-0879、PLX-4720)、PDGFR- $\alpha$ 抑制剂(例如,抗PDGFR- $\alpha$ 抗体)、PDGFR- $\beta$ 抑制剂(例如,抗PDGFR- $\beta$ 抗体或小分子激酶抑制剂,例如甲磺酸伊马替尼或苹果酸舒尼替尼)、PDGF配体抑制剂(例如,抗PDGF-A、-B、-C或-D抗体、适体、siRNA等)、VEGF拮抗剂(例如,VEGF-Trap,例如阿柏西普,参见例如US 7,087,411(在本文中也称为“VEGF抑制性融合蛋白”)、抗VEGF抗体(例如,贝伐单抗)、VEGF受体的小分子激酶抑制剂(例如,舒尼替尼、索拉非尼或帕唑帕尼)、DLL4拮抗剂(例如,US2009/0142354中公开的抗DLL4抗体,例如REGN421)、Ang2拮抗剂(例如,US2011/0027286中公开的抗Ang2抗体,例如H1H685P)、FOLH1拮抗剂(例如,抗FOLH1抗体)、STEAP1或STEAP2拮抗剂(例如,抗STEAP1抗体或抗STEAP2抗体)、TMPRSS2拮抗剂(例如,抗TMPRSS2抗体)、MSLN拮抗剂(例如,抗MSLN抗体)、CA9拮抗剂(例如,抗CA9抗体)、尿溶蛋白拮抗剂(例如,抗尿溶蛋白[例如,抗-UPK3A]抗体)、MUC16拮抗剂(例如,抗MUC16抗体)、Tn抗原拮抗剂(例如,抗Tn抗体)、CLEC12A拮抗剂(例如,抗CLEC12A

抗体)、TNFRSF17拮抗剂(例如,抗TNFRSF17抗体)、LGR5拮抗剂(例如,抗LGR5抗体)、单价CD20拮抗剂(例如,单价抗CD20抗体,如利妥昔单抗)、CD20 x CD3双特异性抗体、PD-1阻断剂(例如,抗PD-1抗体,如帕博利珠单抗或尼沃单抗)等。可以与本发明提供的抗体组合有益地施用的其他药剂包括例如他莫昔芬、芳香酶抑制剂和细胞因子抑制剂,包括小分子细胞因子抑制剂和与细胞因子如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18或其各自的受体结合的抗体。

[0385] 示例性地,PD-1抑制剂如抗PD-1抗体可以与如本发明所述的抗Met抗体-药物缀合物组合。目标患者群体特别包括具有过表达c-Met突变的肿瘤的患者,例如具有表达c-Met的非小细胞肺癌的患者。

[0386] 本发明提供了包含本发明所述的任何抗MET抗体和MET x MET双特异性抗原结合分子与一种或多种化学治疗剂组合的组合物和治疗制剂。化学治疗剂的实例包括烷化剂类,例如,塞替派和环磷酰胺(Cytoxin<sup>TM</sup>) ;磺酸烷基酯类,例如,白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类,例如,苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺类和甲基三聚氰胺类,包括六甲蜜胺(altretamine)、曲他胺(triethylenemelamine)、三乙烯磷酰胺(triethylenephosphoramide)、三乙烯硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramide)和三羟甲基三聚氰胺(trimethylomelamine);氮芥类,例如,苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlomaphazine)、胆磷酰胺(chlorophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝基脲类,例如,卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine);抗生素类,例如,阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、加利车霉素(calicheamicin)、卡柔比星(carabacin)、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiriomycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物类,例如,甲氨蝶呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(fluorouracil)(5-FU);叶酸类似物,例如,二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶酰三谷氨酸(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,例如,氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprime)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,例如,安西他滨(ancitabine)、阿扎

胞昔(azacitidine)、6-氮尿昔,卡莫氟(carmofur)、阿糖胞昔(cytarabine)、双脱氧尿昔(dideoxyuridine)、去氧氟尿昔(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿昔(floxuridine);雄激素类,例如,卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、表硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺类,例如,氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,例如,亚叶酸(folinic acid);醋葡醛内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖昔(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);安吖啶(amsacrine);贝他布昔(bestabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吖醌(diaziquone);依氟鸟氨酸(elfomithine);依利醋铵(elliptinium acetate);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟脲;香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);米托胍腙(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamnol);二胺硝吖啶(nitraerine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨氮芥(phenaemet);吡柔比星(pirarubicin);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼;丙卡巴肼(procabazine);PSK<sup>TM</sup>;雷佐生(razoxane);西索菲兰(sizofuran);螺旋锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2"-三氯三乙胺;乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);甲托辛(gacytosine);阿糖胞昔(arabinoside)("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉烷类,例如,紫杉醇(Taxol<sup>TM</sup>,Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)和多西紫杉醇(Taxotere<sup>TM</sup>;Aventis Antony,France);苯丁酸氮芥(chlorambucil);吉西他滨(gemcitabine);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,例如,顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin);长春碱(vinblastine);铂(platinum);依托泊昔(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺(ifosfamide);丝裂霉素C(mitomycin C);米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱(vincristine);长春瑞滨(vinorelbine);诺维本(navelline);能灭瘤(novantrone);替尼泊昔(teniposide);道诺霉素(daunomycin);氨基蝶呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊本膦酸盐(ibandronate);CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸(retinoic acid);埃斯波霉素(esperamicins);卡培他滨(capecitabine);和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。这一定义中还包括用以调控或抑制针对肿瘤的激素作用的抗激素剂,例如,抗雌激素和抗雄激素,所述抗雌激素包括例如他莫昔芬、雷诺昔芬(raloxifene)、芳香酶抑制4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、盐酸雷洛昔芬、LY 117018、奥那司酮(onapristone)和托瑞米芬(toremifene)(Fareston);,所述抗雄激素包括例如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、亮丙立德(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin);以及上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0387] 抗MET抗体和MET x MET双特异性抗原结合分子也可以与抗病毒药、抗生素、镇痛药、皮质类固醇、类固醇、氧、抗氧化剂、COX抑制剂、心脏保护剂、金属螯合剂、IFN- $\gamma$ 和/或NSAID组合施用和/或共同配制。

[0388] 其他治疗活性组分,例如上面列出的任何药剂或其衍生物,可以在即将施用抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子之前、同时或之后不久施用;(出于本公开的目的,

这种施用方案被认为是抗体与另外的治疗活性组分“组合”施用)。本公开包括药物组合物，其中抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子与一种或多种如本发明其他地方所述的另外的治疗活性组分共同配制。

**[0389] 施用方案**

**[0390]** 根据某些实施方案，多剂量的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子(或包含抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子和本发明提及的任何另外的治疗活性剂的组合的药物组合物)可以在限定的时间过程中施用于受试者。根据该方面的方法包括向受试者依次施用多个剂量的本发明提供的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子。如本文所用，“依次施用”是指每个剂量的抗体在不同的时间点施用于受试者，例如在隔开预定间隔(例如，数小时、数天、数周或数月)的不同天数。本公开包括以下方法：包含向患者依次施用单次初始剂量的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子，然后施用一次或多次第二剂量的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子，并且任选地随后施用一次或多次第三剂量的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子。

**[0391]** 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指施用抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子的时间顺序。因此，“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也称为“基线剂量”)；“第二剂量”是初始剂量后施用的剂量；“第三剂量”是在第二剂量后施用的剂量。初始、第二和第三剂量可以全部含有相同量的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子，但是在施用频率方面通常可以彼此不同。然而，在某些实施方案中，初始、第二和/或第三剂量中所含的抗体的量在治疗过程中彼此不同(例如，在适当时向上或向下调整)。在某些实施方案中，在治疗方案开始时施用两次或更多次(例如，2、3、4或5次)剂量作为“负荷剂量”，然后是以较低的频率施用的后续剂量(例如，“维持剂量”)。

**[0392] 抗体的诊断用途**

**[0393]** 本公开的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子也可用于检测和/或测量样品中的MET或MET表达细胞，例如用于诊断目的。例如，抗MET抗体或其片段可用于诊断以MET的异常表达(例如，过表达、表达不足、缺乏表达等)为特征的病况或疾病。MET的示例性诊断测定可包含例如使从患者获得的样品与抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子接触，其中抗体用可检测的标记或报告分子标记。或者，未标记的抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合分子可以与第二抗体组合用于诊断应用，所述第二抗体本身是可检测标记的。可检测的标记或报告分子可以是放射性同位素，如<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S或<sup>125</sup>I；荧光或化学发光部分，如荧光素或罗丹明；或酶，如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶。可用于检测或测量样品中MET的具体示例性测定包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫PET(例如，<sup>89</sup>Zr、<sup>64</sup>Cu等)和荧光激活的细胞分选(FACS)。

**[0394]** 可用于根据本公开的MET诊断测定的样品包括可从患者获得的任何组织或流体样品。通常，将测量从健康患者(例如，未患有与异常MET水平或活性相关的疾病或病况的患者)获得的特定样品中的MET水平，以初步建立MET的基线或标准水平。然后可以将该MET基线水平与从疑似患有MET相关疾病或病况的个体获得的样品中测量的MET水平进行比较。

**[0395]** 本发明提供的各个方面的实施方案也通过以下任意一个段落进行了描述。

**[0396]** 实施方案1.一种双特异性抗原结合分子，其包含：

**[0397]** 第一抗原结合结构域(D1)；和

- [0398] 第二抗原结合结构域(D2)；
- [0399] 其中D1特异性结合人MET的第一表位；并且
- [0400] 其中D2特异性结合人MET的第二表位。
- [0401] 实施方案2.如实施方案1所述的双特异性抗原结合分子,其中D1和D2彼此不竞争结合人MET。
- [0402] 实施方案3.如实施方案1或2所述的双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗原结合分子能够阻断人MET和HGF之间的相互作用。
- [0403] 实施方案4.如实施方案3所述的双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗原结合分子在基于细胞的MET活性报告分子测定中表现出最小的激动剂活性。
- [0404] 实施方案5.如实施方案3所述的双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗原结合分子在基于细胞的MET活性报告分子测定中不表现出MET激动剂活性。
- [0405] 实施方案6.如实施方案4所述的双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗原结合分子在基于细胞的MET活性报告分子测定中表现出的MET激动剂活性低于仅包含D1或D2的单价抗原结合分子的MET激动剂活性的10%。
- [0406] 实施方案7.如实施方案1至6中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗原结合分子促进细胞表面表达的MET的降解。
- [0407] 实施方案8.如实施方案1至7中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗原结合分子抑制具有MET基因改变的肿瘤的生长。
- [0408] 实施方案9.如实施方案1至7中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗原结合分子促进具有MET基因改变的肿瘤消退。
- [0409] 实施方案10.如实施方案1至9中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗原结合分子抑制肿瘤的生长,所述肿瘤的生长由自分泌HGF信号传导驱动。
- [0410] 实施方案11.如实施方案1至9中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中所述双特异性抗原结合分子促进肿瘤的肿瘤消退,所述肿瘤的生长由自分泌HGF信号传导驱动。
- [0411] 实施方案12.如实施方案1至11中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中D1包含三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3)和三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3),其中所述三个重链互补决定区在包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内,所述三个轻链互补决定区在包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内。
- [0412] 实施方案13.如实施方案12所述的双特异性抗原结合分子,其中HCDR1包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列;HCDR2包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列;HCDR3包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列;LCDR1包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列;LCDR2包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列;并且LCDR3包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列。
- [0413] 实施方案14.如实施方案13所述的双特异性抗原结合分子,其中HCDR1包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;HCDR2包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列;HCDR3包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列;LCDR1包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列;LCDR2包含SEQ ID NO:142的氨基酸序

列；并且LCDR3包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列。

[0414] 实施方案15. 如实施方案13所述的双特异性抗原结合分子，其中所述双特异性抗原结合分子包含HCVR和LCVR，其中所述HCVR包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列，所述LCVR包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0415] 实施方案16. 如实施方案15所述的双特异性抗原结合分子，其中所述双特异性抗原结合分子包含HCVR和LCVR，其中所述HCVR包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列，所述LCVR包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0416] 实施方案17. 如实施方案1至16中任一项所述的双特异性抗原结合分子，其中D2包含三个重链互补决定区 (HCDR1、HCDR2和HCDR3) 和三个轻链互补决定区 (LCDR1、LCDR2和LCDR3)，其中所述三个重链互补决定区在包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR) 内，所述三个轻链互补决定区在包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 内。

[0417] 实施方案18. 如实施方案17所述的双特异性抗原结合分子，其中HCDR1包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列；HCDR2包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列；HCDR3包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列；LCDR1包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列；LCDR2包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列；LCDR3包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0418] 实施方案19. 如实施方案18所述的双特异性抗原结合分子，其中HCDR1包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列；HCDR2包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列；HCDR3包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列；LCDR1包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列；LCDR2包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列；并且LCDR3包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列。

[0419] 实施方案20. 如实施方案18所述的双特异性抗原结合分子，其中所述双特异性抗原结合分子包含HCVR和LCVR，其中所述HCVR包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列，所述LCVR包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0420] 实施方案21. 如实施方案20所述的双特异性抗原结合分子，其中所述双特异性抗原结合分子包含HCVR和LCVR，其中所述HCVR包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列，所述LCVR包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列。

[0421] 实施方案22. 如实施方案1所述的双特异性抗原结合分子，其中所述人MET的第一表位包含SEQ ID NO:155的第192-204位氨基酸。

[0422] 实施方案23. 如实施方案1所述的双特异性抗原结合分子，其中所述人MET的第二表位包含SEQ ID NO:155的第305-315位氨基酸和第421-455位氨基酸。

[0423] 实施方案24. 如实施方案1所述的双特异性抗原结合分子，其中所述人MET的第一表位包含SEQ ID NO:155的第192-204位氨基酸；并且其中所述人MET的第二表位包含SEQ ID NO:155的第305-315位氨基酸和第421-455位氨基酸。

[0424] 实施方案25. 如实施方案1所述的双特异性抗原结合分子，其中所述双特异性抗原

结合分子与细胞毒素缀合。

[0425] 实施方案26. 如实施方案25所述的双特异性抗原结合分子, 其中所述细胞毒素选自下组: 生物毒素、化学治疗剂和放射性同位素。

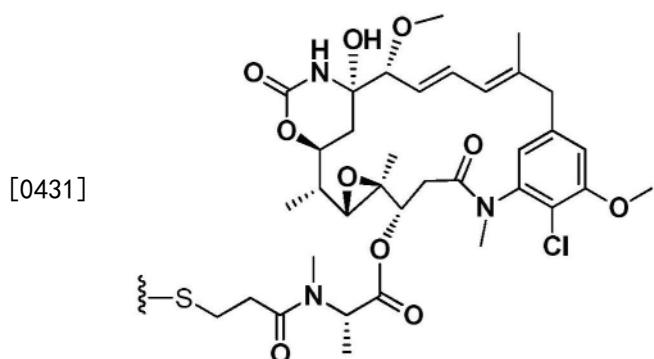
[0426] 实施方案27. 如实施方案25所述的双特异性抗原结合分子, 其中所述细胞毒素选自下组: 美登木素生物碱、奥瑞他汀、倍癌霉素、<sup>225</sup>Ac、<sup>227</sup>Th及其任何衍生物。

[0427] 实施方案28. 如实施方案1所述的双特异性抗原结合分子, 其中所述双特异性抗原结合分子通过接头与细胞毒性剂缀合。

[0428] 实施方案29. 如实施方案28所述的双特异性抗原结合分子, 其中所述细胞毒性剂是美登木素生物碱。

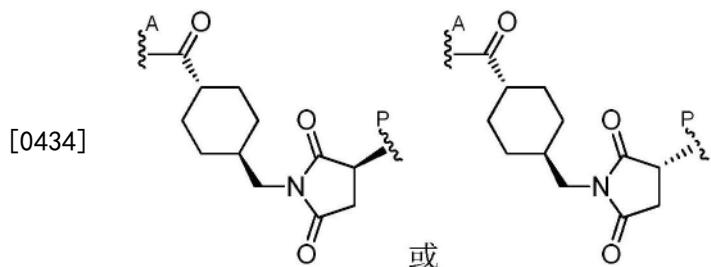
[0429] 实施方案30. 如实施方案29所述的双特异性抗原结合分子, 其中所述双特异性抗原结合分子包含SEQ ID NO:18或58的D1-HCVR氨基酸序列内的CDR和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列内的CDR。

[0430] 实施方案31. 如实施方案30所述的双特异性抗原结合分子, 其中所述美登木素生物碱是:



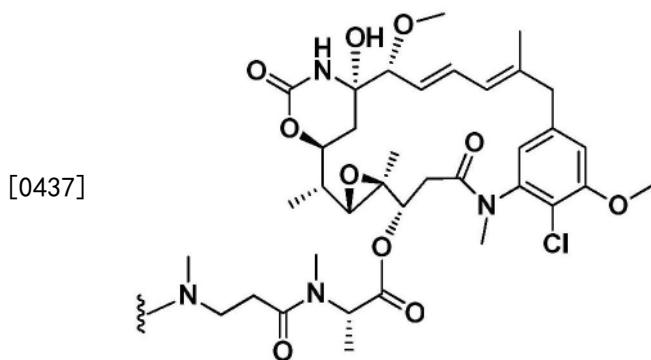
[0432] 其中 $\text{\textless}^{\text{A}}$ —是与所述接头连接的键。

[0433] 实施方案32. 如实施方案31所述的双特异性抗原结合分子, 其中所述接头是:



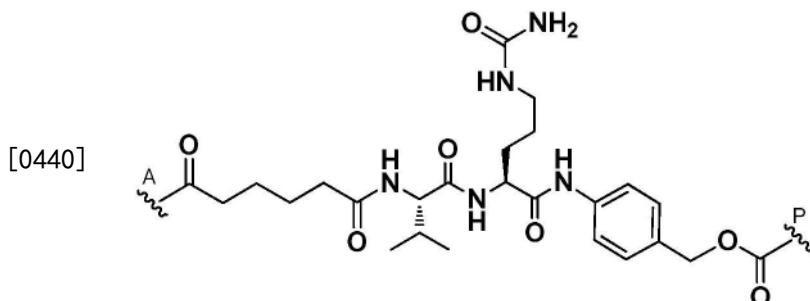
[0435] 其中用 $\text{\textless}^{\text{A}}$ 标注的键表示与所述双特异性抗原结合分子连接的键, 并且用 $\text{\textless}^{\text{P}}$ 标注的键表示与美登木素生物碱连接的键。

[0436] 实施方案33. 如实施方案29所述的双特异性抗原结合分子, 其中所述美登木素生物碱是



[0438] 其中 $\xi$ —是与所述接头连接的键。

[0439] 实施方案34. 如实施方案33所述的双特异性抗原结合分子,其中所述接头是:



[0441] 其中用 $\xi^A$ 标注的键表示与所述双特异性抗原结合分子连接的键,并且用 $\xi^P$ 标注的键表示与美登木素生物碱连接的键。

[0442] 实施方案35. 一种药物组合物,其包含如实施方案1所述的双特异性抗原结合分子和药学上可接受的载体。

[0443] 实施方案36. 一种治疗罹患具有MET基因改变的肿瘤和/或生长受自分泌HGF信号传导驱动的肿瘤的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用如实施方案1至34中任一项所述的双特异性抗原结合分子。

[0444] 实施方案37. 如实施方案36所述的方法,其中所述癌症选自下组:非小细胞肺癌(NSCLC)、胃癌、结肠直肠癌和头颈癌。

[0445] 实施方案38. 如实施方案36所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用第二抗癌治疗剂。

[0446] 实施方案39. 一种在受试者中治疗癌症、减少肿瘤生长和/或引起肿瘤消退的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用包含双特异性抗原结合分子和细胞毒素的抗体-药物缀合物(ADC),其中所述双特异性抗原结合分子包含:

[0447] 第一抗原结合结构域(D1);和

[0448] 第二抗原结合结构域(D2);

[0449] 其中D1特异性结合人MET的第一表位;并且

[0450] 其中D2特异性结合人MET的第二表位。

[0451] 实施方案40. 如实施方案39所述的方法,其中D1包含三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3)和三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3),其中所述三个重链互补决定区在包含SEQ ID NO:18或58的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内,所述三个轻链互补决

定区在包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内。

[0452] 实施方案41.如实施方案39所述的方法,其中D2包含三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3)和三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3),其中所述三个重链互补决定区在包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内,所述三个轻链互补决定区在包含SEQ ID NO:138的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内。

[0453] 实施方案42.如实施方案39所述的双特异性抗原结合分子,其中所述人MET的第一表位包含SEQ ID NO:155的第192-204位氨基酸。

[0454] 实施方案43.如实施方案39所述的双特异性抗原结合分子,其中所述人MET的第二表位包含SEQ ID NO:155的第305-315位氨基酸和第421-455位氨基酸。

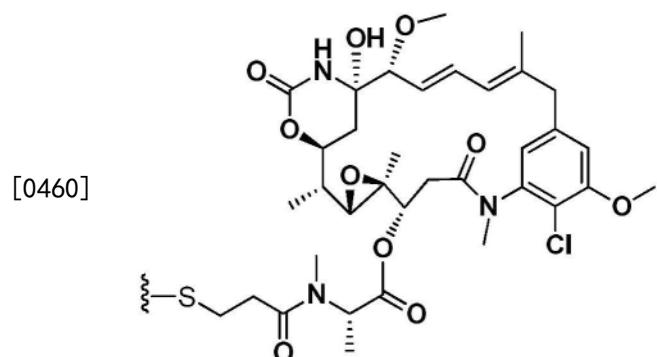
[0455] 实施方案44.如实施方案39所述的双特异性抗原结合分子,其中所述人MET的第一表位包含SEQ ID NO:155的第192-204位氨基酸;并且其中所述人MET的第二表位包含SEQ ID NO:155的第305-315位氨基酸和第421-455位氨基酸。

[0456] 实施方案45.如实施方案39所述的方法,其中所述细胞毒素选自下组:生物毒素、化学治疗剂和放射性同位素。

[0457] 实施方案46.如实施方案39所述的方法,其中所述细胞毒素选自下组:美登木素生物碱、奥瑞他汀、倍癌霉素、<sup>225</sup>Ac、<sup>227</sup>Th及其任何衍生物。

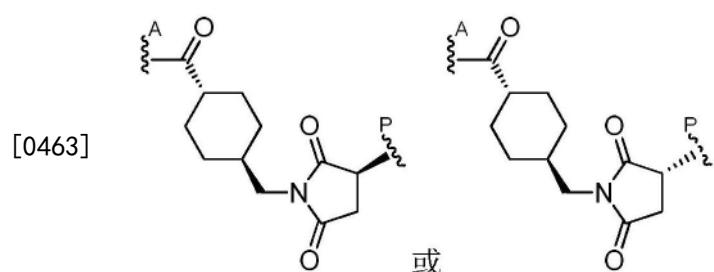
[0458] 实施方案47.如实施方案39所述的方法,其中所述双特异性抗原结合分子包含SEQ ID NO:58的D1-HCVR氨基酸序列内的CDR和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列内的CDR。

[0459] 实施方案48.如实施方案46所述的方法,其中所述细胞毒素通过接头与所述双特异性抗原结合分子缀合,并且其中所述细胞毒素是:



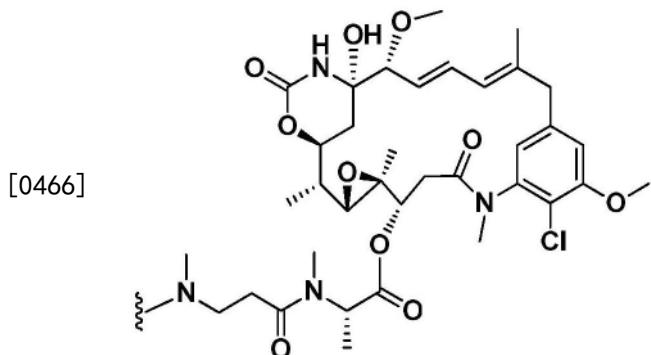
[0461] 其中 $\text{\textasciitilde}$ —是与接头连接的键。

[0462] 实施方案49.如实施方案48所述的方法,其中所述接头是:



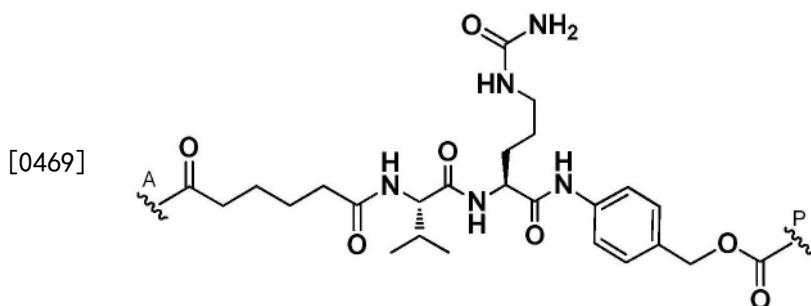
[0464] 其中用 $\text{\textasciitilde}^A$ 标注的键表示与所述双特异性抗原结合分子连接的键,并且用 $\text{\textasciitilde}^P$ 标注的键表示与所述细胞毒素连接的键。

[0465] 实施方案50. 如实施方案42所述的方法,其中所述细胞毒素通过接头与所述双特异性抗原结合分子缀合,并且其中所述细胞毒素是:



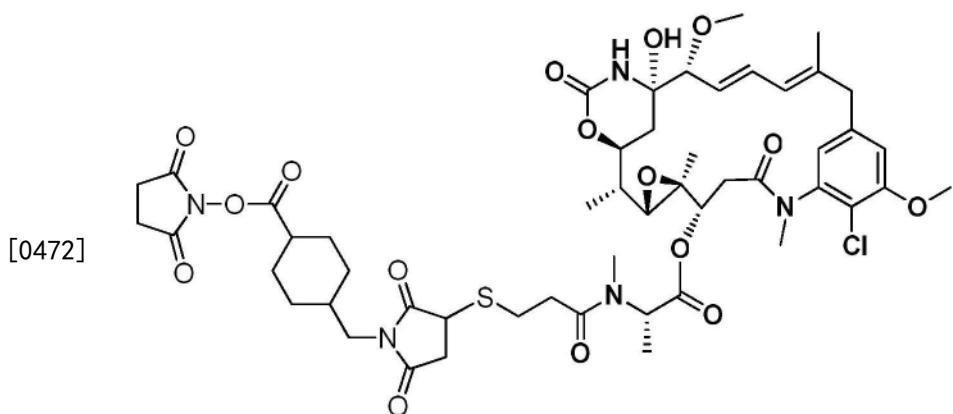
[0467] 其中 $\xi$ —是与所述接头连接的键。

[0468] 实施方案51. 如实施方案42所述的方法,其中所述接头是



[0470] 其中用 $\xi^A$ 标注的键表示与所述双特异性抗原结合分子连接的键,并且用 $\xi^P$ 标注的键表示与所述细胞毒素连接的键。

[0471] 实施方案52. 一种制备抗体-药物缀合物的方法,其包含使抗MET抗体或MET x MET 双特异性抗原结合蛋白与具有下式A<sup>1</sup>的化合物:



A<sup>1</sup>

[0473] 和水性稀释剂接触。

[0474] 实施方案53. 如实施方案52所述的方法,其中所述抗MET抗体包含SEQ ID NO:82/138的HCVR/LCVR氨基酸序列对内的CDR。

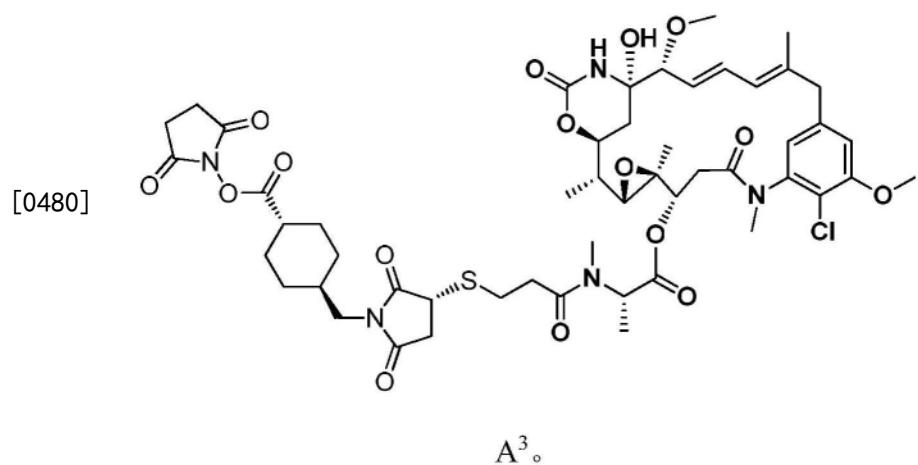
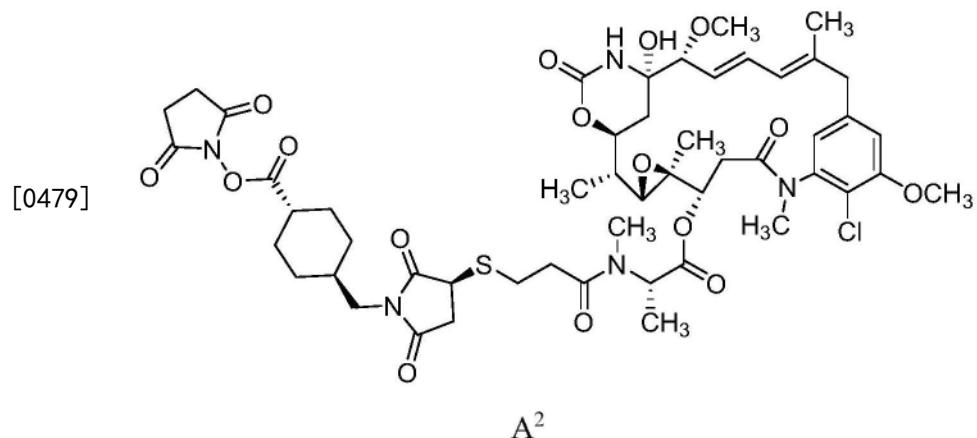
[0475] 实施方案54. 如实施方案52所述的方法,其中所述MET x MET双特异性抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:58的D1-HCVR氨基酸序列内的CDR和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列

内的CDR。

[0476] 实施方案55. 如实施方案52所述的方法,其中所述MET x MET双特异性抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:18的D1-HCVR氨基酸序列内的CDR和SEQ ID NO:82的D2-HCVR氨基酸序列内的CDR。

[0477] 实施方案56. 如实施方案52所述的方法,其中所述式A<sup>1</sup>化合物以化学计量过量存在。

[0478] 实施方案57. 如实施方案52所述的方法,其中所述式A<sup>1</sup>化合物包含式A<sup>2</sup>或A<sup>3</sup>化合物或其混合物:

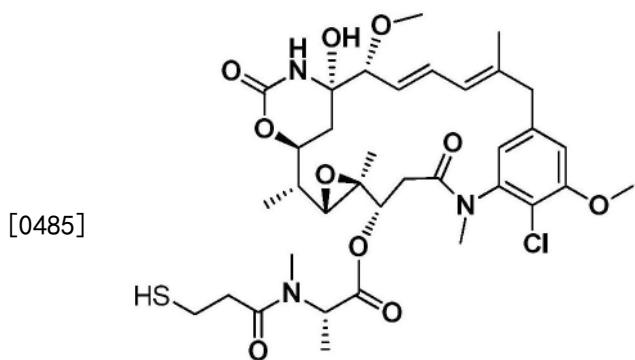


[0481] 实施方案58. 如实施方案52所述的方法,其中所述式A<sup>2</sup>化合物是立体定量纯的。

[0482] 实施方案59. 如实施方案52所述的方法,其中所述式A<sup>3</sup>化合物是立体定量纯的。

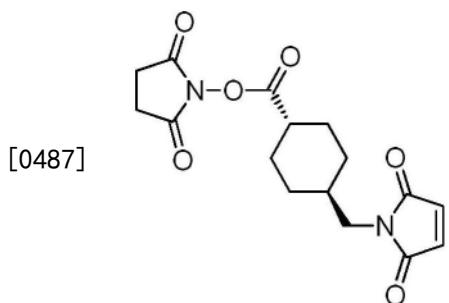
[0483] 实施方案60. 如实施方案52所述的方法,其中所述A<sup>1</sup>或A<sup>2</sup>化合物以大于50%、大于70%、大于90%或大于95%的非对映异构体过量存在。

[0484] 实施方案61. 如实施方案52所述的方法,其中所述式A<sup>1</sup>化合物是通过使式(a)化合物



(a)

[0486] 与式 (b) 化合物

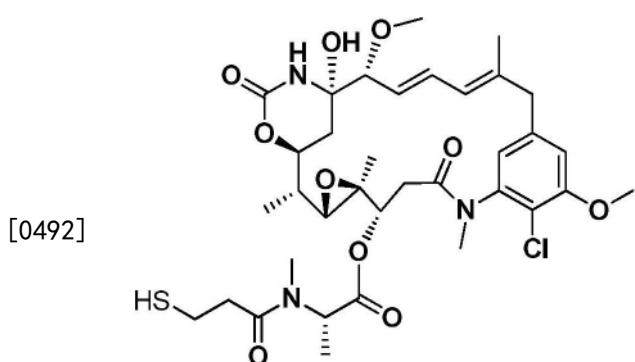


[0488] (b)

[0489] 在硅胶和稀释剂存在下接触来制备。

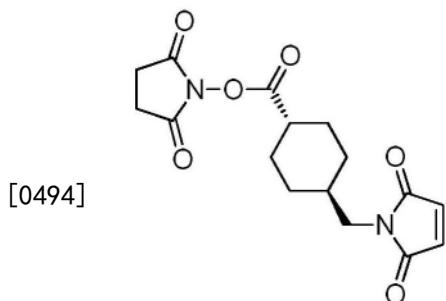
[0490] 实施方案62. 一种抗体-药物缀合物, 其通过以下方法制备:

[0491] (i) 使式 (a) 化合物:



(a)

[0493] 与式 (b) 化合物:



(b)

[0495] 在硅胶和稀释剂存在下接触合成中间体；并且

[0496] (ii) 使抗MET抗体或MET x MET双特异性抗原结合蛋白与所述中间体和水性稀释剂接触。

### 实施例

[0497] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明提供的方法和组合物的完整公开和描述，并且不旨在限制发明人认为是其发明的范围。已经努力确保关于所使用的数字（例如，量、温度等）的准确性，但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明，否则份数是重量份，分子量是平均分子量，温度是按摄氏度计并且压力是大气压或接近大气压。

[0498] 实施例1. 抗MET抗体的产生

[0499] 通过用包含与人Fc融合的重组人MET细胞外结构域的免疫原（R&D Systems, 目录号358-MT, Minneapolis, MN）使包含编码人免疫球蛋白重链和κ轻链可变区的DNA的基因工程小鼠免疫来获得抗MET抗体。用于免疫的小鼠表达“通用轻链”。即，在该小鼠中产生的抗体具有不同的重链可变区，但具有基本上相同的轻链可变结构域。

[0500] 通过MET特异性免疫测定监测抗体免疫应答。当达到所需的免疫应答时，收获脾细胞并与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其活力并形成杂交瘤细胞系。筛选并选择杂交瘤细胞系以鉴定产生MET特异性抗体的细胞系。使用该技术，获得了几种抗MET嵌合抗体（即，具有人可变结构域和小鼠恒定结构域的抗体）。另外，如US2007/0280945A1中所述，直接从抗原阳性B细胞分离几种完全人抗MET抗体而不与骨髓瘤细胞融合。

[0501] 在下面列出的实施例中详细描述根据本实施例的方法产生的示例性抗MET抗体的某些生物学特性，以及由其构建的双特异性抗体。

[0502] 实施例2. 重链和轻链可变区氨基酸和核酸序列

[0503] 表1列出了本发明所述的选定抗MET抗体的重链和轻链可变区以及CDR的氨基酸序列标识符。（如上所述，实施例1中产生的所有抗体具有相同的轻链可变区，因此也具有相同的轻链CDR序列）。相应的核酸序列标识符列于表2中。

[0504] 表1: 氨基酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:								
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	
[0505]	H4H13290P2	2	4	6	8	138	140	142	144
	H4H13291P2	10	12	14	16	138	140	142	144
	H4H13295P2	18	20	22	24	138	140	142	144
	H4H13299P2	26	28	30	32	138	140	142	144
	H4H13300P2	34	36	38	40	138	140	142	144
	H4H13301P2	42	44	46	48	138	140	142	144
	H4H13302P2	50	52	54	56	138	140	142	144
	H4H13306P2	58	60	62	64	138	140	142	144
[0506]	H4H13309P2	66	68	70	72	138	140	142	144
	H4H13311P2	74	76	78	80	138	140	142	144
	H4H13312P2	82	84	86	88	138	140	142	144
	H4H13313P2	90	92	94	96	138	140	142	144
	H4H13316P2	98	100	102	104	138	140	142	144
	H4H13318P2	106	108	110	112	138	140	142	144
	H4H13319P2	114	116	118	120	138	140	142	144
	H4H13325P2	122	124	126	128	138	140	142	144
	H4H13331P2	130	132	134	136	138	140	142	144

[0507] 表2:核酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:								
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	
[0508]	H4H13290P2	1	3	5	7	137	139	141	143
	H4H13291P2	9	11	13	15	137	139	141	143
	H4H13295P2	17	19	21	23	137	139	141	143
	H4H13299P2	25	27	29	31	137	139	141	143
	H4H13300P2	33	35	37	39	137	139	141	143
	H4H13301P2	41	43	45	47	137	139	141	143
	H4H13302P2	49	51	53	55	137	139	141	143
	H4H13306P2	57	59	61	63	137	139	141	143
	H4H13309P2	65	67	69	71	137	139	141	143
	H4H13311P2	73	75	77	79	137	139	141	143
	H4H13312P2	81	83	85	87	137	139	141	143
	H4H13313P2	89	91	93	95	137	139	141	143
	H4H13316P2	97	99	101	103	137	139	141	143
	H4H13318P2	105	107	109	111	137	139	141	143
	H4H13319P2	113	115	117	119	137	139	141	143
	H4H13325P2	121	123	125	127	137	139	141	143
	H4H13331P2	129	131	133	135	137	139	141	143

[0509] 抗体通常在本文中根据以下命名法提及:Fc前缀(例如“H4H”),随后是数字标识符(例如“13290”、“13291”、“13295”等),然后是“P2”后缀,如表1和2所示。因此,根据该命名法,抗体在本文中可称为例如“H4H13290P2”、“H4H13291P2”、“H4H13295P2”等。本文使用的抗体名称的前缀表示抗体的特定Fc区同种型。特别地,“H4H”抗体具有人IgG4 Fc(所有可变区都是完全人的,如抗体名称中的第一个‘H’所示)。如本领域普通技术人员所理解,具有特定Fc同种型的抗体可以转化为具有不同Fc同种型的抗体(例如,具有小鼠IgG4 Fc的抗体可以转化为具有人IgG1的抗体等),但无论如何,可变结构域(包括CDR)-其由表1和2中所示的数字标识符表示-将保持相同,并且无论Fc结构域的性质如何,都预期结合特性相同或基本上相似。

[0510] 实施例3.表面等离子体共振得出的人单克隆抗MET(单特异性)抗体的结合亲和力和动力学常数

[0511] 通过表面等离子体共振(Biacore 4000或T-200)在37°C测定人抗MET抗体的结合亲和力和动力学常数。在该实施例中测试的抗Met抗体是MET的二价单特异性结合物。将表达为人IgG4的抗体(称为“H4H”)捕获到通过与单克隆小鼠抗人Fc抗体(GE, BR-1008-39)胺偶联衍生的CM4或CM5 Biacore传感器表面上。各种浓度的可溶性单体(人(h)Met.mmh; SEQ ID NO:152; 食蟹猴(mf)Met.mmh; SEQ ID NO:154)或二聚体(hMet.mFc; SEQ ID NO:153)Met蛋白以30或50μL/分钟的流速注射到捕获抗MET-抗体的表面上。对hMET.mmh或hMET.mFc与捕获的单克隆抗体的结合监测4或5分钟并且对hMET.mmh或hMET.mFc在HBS-ET(0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v表面活性剂P20)或PBS-P(0.01M磷酸钠pH

7.4, 0.15M NaCl, 0.05% v/v表面活性剂P20)运行缓冲液中的解离监测10分钟。

[0512] 通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将实时传感图拟合至1:1结合模型来确定动力学缔合( $k_a$ )和解离( $k_d$ )速率常数。根据动力学速率常数计算结合解离平衡常数( $K_D$ )和解离半衰期( $t_{1/2}$ )：

$$[0513] K_D(M) = \frac{kd}{ka}, \text{ and } t_{1/2}(\text{min}) = \frac{\ln(2)}{60*kd}$$

[0514] 单特异性抗Met抗体与单体和二聚体Met蛋白的结合动力学参数如下表3所示。

[0515] 表3:在37℃下单特异性抗MET mAb的Biacore结合亲和力

在 37°C/抗体捕获形式下的结合					
抗体	分析物	ka (Ms <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (M)	T½ (min)
H4H13290P2	hMet.mmh	2.53E+05	8.03E-04	3.17E-09	14.4
	hMET.mFc	6.15E+05	3.15E-04	5.13E-10	36.6
	mfMet.mmh	1.23E+05	6.33E-04	5.16E-09	18.2
H4H13291P2	hMet.mmh	2.55E+04	2.38E-03	9.34E-08	4.8
	hMET.mFc	3.33E+05	3.39E-04	1.02E-09	34
	mfMet.mmh	3.70E+04	1.39E-03	3.76E-08	8.3
H4H13295P2	hMet.mmh	1.67E+04	5.40E-04	3.24E-08	21.4
	hMET.mFc	2.28E+05	2.64E-04	1.16E-09	43.8
	mfMet.mmh	1.65E+04	9.79E-04	5.93E-08	11.8
H4H13299P2	hMet.mmh	9.10E+04	7.80E-04	8.57E-09	14.8
	hMET.mFc	3.57E+05	3.14E-04	8.78E-10	36.8
	mfMet.mmh	1.13E+05	8.84E-04	7.86E-09	13.1
[0516] H4H13300P2	hMet.mmh	3.35E+04	2.43E-03	7.25E-08	4.8
	hMET.mFc	2.65E+05	2.95E-04	1.12E-09	39.1
	mfMet.mmh	5.13E+04	1.94E-03	3.77E-08	6.0
H4H13301P2	hMet.mmh	7.57E+04	6.22E-03	8.22E-08	1.9
	hMET.mFc	7.05E+05	1.14E-03	1.62E-09	10.1
	mfMet.mmh	6.85E+04	5.30E-03	7.74E-08	2.2
H4H13302P2	hMet.mmh	5.24E+04	2.46E-03	4.70E-08	4.7
	hMET.mFc	2.51E+05	5.84E-04	2.33E-09	19.8
	mfMet.mmh	3.56E+04	2.92E-03	8.20E-08	4.0
H4H13306P2	hMet.mmh	1.52E+05	1.66E-02	1.09E-07	0.7
	hMET.mFc	1.21E+06	2.60E-03	2.15E-09	4.4
	mfMet.mmh	1.21E+06	3.11E-02	2.58E-08	0.4
H4H13309P2	hMet.mmh	9.20E+04	5.87E-04	6.38E-09	19.7
	hMET.mFc	4.06E+05	2.67E-04	6.57E-10	43.3
	mfMet.mmh	1.23E+05	6.33E-04	5.16E-09	18.2
H4H13311P2	hMet.mmh	4.48E+04	5.19E-03	1.16E-07	2.2

[0517]	hMET.mFc	3.02E+05	4.68E-04	1.55E-09	24.7
		7.61E+04	6.04E-03	7.94E-08	1.9
	H4H13312P2	hMet.mmh	7.19E+04	1.63E-02	2.27E-07
		hMET.mFc	6.14E+05	1.71E-03	2.79E-09
		mfMet.mmh	1.47E+05	7.72E-03	5.24E-08
	H4H13313P2	hMet.mmh	8.78E+04	5.70E-03	6.49E-08
		hMET.mFc	7.50E+05	8.93E-04	1.19E-09
		mfMet.mmh	5.10E+04	4.08E-03	8.00E-08
	H4H13316P2	hMet.mmh	7.82E+04	1.51E-03	1.93E-08
		hMET.mFc	2.93E+05	1.08E-04	3.67E-10
		mfMet.mmh	NB	NB	NB
[0518]	H4H13318P2	hMet.mmh	3.30E+04	2.92E-03	8.83E-08
		hMET.mFc	3.52E+05	1.65E-04	4.67E-10
		mfMet.mmh	NB	NB	NB
[0519]	H4H13319P2	hMet.mmh	3.11E+04	2.38E-03	7.65E-08
		hMET.mFc	3.82E+05	5.42E-04	1.42E-09
		mfMet.mmh	2.66E+04	1.15E-03	4.33E-08
[0520]	H4H13325P2	hMet.mmh	9.53E+04	2.36E-03	2.48E-08
		hMET.mFc	3.06E+05	1.85E-04	6.05E-10
		mfMet.mmh	NB	NB	NB
[0521]	H4H13331P2	hMet.mmh	2.61E+05	8.73E-04	3.35E-09
		hMET.mFc	6.39E+05	1.56E-04	2.44E-10
		mfMet.mmh	1.61E+05	1.04E-03	6.47E-09

[0518] NB=在所用条件下未观察到结合

[0519] 如表3所示,几种抗体显示出与人和猴MET蛋白的高亲和力结合。

[0520] 实施例4. 抗Met抗体结合Met受体上的不同表位

[0521] 为了评估两种抗Met抗体是否能够彼此竞争结合MET上各自的表位,在OCTET® HTX生物传感器(FortéBio Corp., Menlo Park, CA)上使用实时无标记生物层干涉测量法(BLI)进行结合竞争测定。

[0522] 简而言之,通过将抗五组氨酸抗体包被的OCTET®生物传感器(FortéBio Corp., #18-5079)浸没在含有20μg/mL hMET.mmh溶液的孔中5分钟而将约0.25nM表达有C端myc-myc-六组氨酸标签的人MET细胞外结构域(hMet.mmh)首先捕获到生物传感器上。然后通过浸入含有50μg/mL mAb-1溶液的孔5分钟,用第一抗MET单克隆抗体(随后称为mAb-1)使捕获抗原的生物传感器饱和。然后将生物传感器浸入含有50μg/mL第二抗MET单克隆抗体(随后称为mAb-2)溶液的孔中3分钟。在实验的每个步骤之间,在OCTET®HEPES-缓冲盐水-EDTA聚山梨醇酯20(HBS-EP)缓冲液中洗涤所有生物传感器。在实验过程中监测实时结合反应,并记录每个步骤结束时的结合反应。比较mAb-2与预先与mAb-1复合的抗MET结合的反

应，并使用50%抑制阈值确定不同抗MET单克隆抗体的竞争/非竞争行为。表4明确定义了在两个方向上竞争的抗体的关系，与结合的顺序无关。

[0523] 表4:抗MET抗体与hMET.mmh结合的交叉竞争

使用抗五组氨酸 Octet 生物传感器捕 获的第一 mAb (mAb-1)	与 mAb-1 竞争的 mAb-2 抗体	使用抗五组氨酸 Octet 生物传感器捕 获的第一 mAb (mAb-1)	与 mAb-1 竞争的 mAb-2 抗体
H4H13301P2	H4H13302P2	H4H13300P2	H4H13291P2
H4H13302P2	H4H13301P2		H4H13295P2
H4H13290P2	H4H13306P2		H4H13311P2
	H4H13316P2		H4H13318P2
H4H13306P2	H4H13290P2		H4H13319P2
	H4H13316P2		H4H13291P2
H4H13316P2	H4H13290P2		H4H13295P2
	H4H13306P2		H4H13300P2
	H4H13325P2		H4H13318P2
	H4H13331P2		H4H13319P2
H4H13325P2	H4H13316P2	H4H13318P2	H4H13291P2
	H4H13331P2		H4H13295P2
H4H13312P2	H4H13331P2		H4H13300P2
H4H13291P2	H4H13295P2		H4H13311P2
	H4H13300P2		H4H13319P2
H4H13295P2	H4H13311P2	H4H13319P2	H4H13291P2
	H4H13318P2		H4H13295P2
	H4H13319P2		H4H13300P2
H4H13311P2	H4H13291P2	H4H13311P2	H4H13311P2
	H4H13300P2		H4H13318P2
	H4H13311P2		H4H13316P2
	H4H13318P2	H4H13331P2	H4H13325P2
	H4H13319P2		H4H13312P2

[0526] 实施例5.具有对MET的不同表位具有特异性的两种不同抗原结合结构域的双特异性抗体的构建

[0527] 该实施例描述了包含两个不同抗原结合结构域(D1和D2)的双特异性抗体的构建，其中D1和D2衍生自不同的抗MET抗体，并因此结合MET细胞外结构域上的不同表位。

[0528] 用于构建本实施例的双特异性抗体的各个抗MET抗原结合结构域衍生自本文实施例1至3中描述的各种二价单特异性抗MET抗体。本发明所述的所有抗MET抗体包含相同(“共同”)轻链(包含SEQ ID NO:138的轻链可变区[LCVR]氨基酸序列,和SEQ ID NO:140、142和

144的轻链CDR [LCDR1、LCDR2和LCDR3] 氨基酸序列。另外,该实施例中说明的所有双特异性抗体含有衍生自示例性抗MET抗体H4H13312P2的“D2”臂。因此,该实施例中描述的所有双特异性抗体的抗原结合结构域 (D1和D2) 都包含该共同的轻链可变区,并且所有D2结合臂包含来自H4H13312P2的重链可变区;然而,就其D1重链可变区 (HCVR) 和重链CDR (HCDR) 而言,双特异性抗体彼此不同。该实施例的双特异性抗体的组分概述于表5中。

[0529] 表5:MET x MET双特异性抗体组分概述

[0530]	双特异性抗体	SEQ ID NO: (氨基酸序列)								
		第一抗原结合结构域(D1)				第二抗原结合结构域(D2)				
		D1-HCVR	D1-HCDR1	D1-HCDR2	D1-HCDR3	D2-HCVR	D2-HCDR1	D2-HCDR2	D2-HCDR3	
H4H14634D (No. 10)		H4H13290P2				H4H13312P2				
		2	4	6	8	82	84	86	88	

H4H14635D (No. 42)	H4H13295P2				H4H13312P2			
	18	20	22	24	82	84	86	88
H4H14636D (No. 74)	H4H13299P2				H4H13312P2			
	26	28	30	32	82	84	86	88
H4H14637D (No. 90)	H4H13301P2				H4H13312P2			
	42	44	46	48	82	84	86	88
H4H14638D (No. 106)	H4H13302P2				H4H13312P2			
	50	52	54	56	82	84	86	88
H4H14639D (No. 122)	H4H13306P2				H4H13312P2			
	58	60	62	64	82	84	86	88
H4H14640D (No. 138)	H4H13309P2				H4H13312P2			
	66	68	70	72	82	84	86	88
H4H14641D (No. 187)	H4H13313P2				H4H13312P2			
	90	92	94	96	82	84	86	88
H4H16445D (No. 26)	H4H13291P2				H4H13312P2			
	10	12	14	16	82	84	86	88
H4H16446D (No. 58)	H4H13300P2				H4H13312P2			
	34	36	38	40	82	84	86	88
H4H16447D (No. 154)	H4H13311P2				H4H13312P2			
	74	76	78	80	82	84	86	88
H4H16448D (No. 219)	H4H13318P2				H4H13312P2			
	106	108	110	112	82	84	86	88
H4H16449D (No. 235)	H4H13319P2				H4H13312P2			
	114	116	118	120	82	84	86	88

[0532] \*双特异性抗体标识符下的括号中的数字标记(例如,“No.10”)表示图1的MET x MET双特异性抗体矩阵中描绘的双特异性抗体编号。

[0533] 实施例6.表面等离子体共振得出的MET x MET人双特异性单克隆抗体的结合亲和力和动力学常数

[0534] 通过表面等离子体共振(Biacore 4000或T-200)在37°C测定根据本文实施例4构建的MET x MET双特异性抗体的结合亲和力和动力学常数。将表达为人IgG4的双特异性抗体(称为“H4H”)捕获到通过与单克隆小鼠抗人Fc抗体(GE, BR-1008-39)胺偶联衍生的CM4或CM5 Biacore传感器表面上。将各种浓度的可溶性单体MET蛋白(hMet.mmmh, SEQ ID NO:152)以30或50μL/分钟的流速注射到抗MET x MET双特异性抗体捕获表面上。对分析物与捕获的双特异性抗体的结合监测4或5分钟并且对分析物在HBS-ET (0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v表面活性剂P20)或PBS-P (0.01M磷酸钠pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.05% v/v表面活性剂P20)运行缓冲液中的解离监测10分钟。

[0535] 如实施例3中所述确定动力学结合( $k_a$ )和解离( $k_d$ )速率常数。

- [0536] 双特异性抗Met抗体与单体Met蛋白 (hMET.mmh) 的结合动力学参数显示于表6中。  
 [0537] 表6:在37℃下双特异性抗MET mAb的Biacore结合亲和力

在 37℃/抗体捕获形式下的结合					
双特异性抗体	分析物	ka (Ms <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (M)	T½ (min)
[0538]	H4H14634D	N/A	≤ 1E-5	N/A	≥ 1155
	H4H14635D	N/A	8.21E-05	N/A	140.6
	H4H14636D	N/A	≤ 1E-5	N/A	≥ 1155
	H4H14637D	N/A	3.26E-04	N/A	35.4
	H4H14638D	N/A	1.65E-04	N/A	70.2
	H4H14639D	N/A	1.63E-04	N/A	70.8
	H4H14640D	N/A	≤ 1E-5	N/A	≥ 1155
	H4H14641D	N/A	3.27E-04	N/A	35.3
	H4H16445D	N/A	3.93E-04	N/A	29.4
	H4H16446D	N/A	1.03E-04	N/A	111.8

- [0539] 如表6中所示,本发明所述的双特异性“MET x MET”抗体显示T1/2值高达大于1155分钟。  
 [0540] 如表7所示,双特异性抗体H4H14639D的解离速率显著低于其亲本抗体H4H13306P2和H4H13312P2的解离速率。

- [0541] 表7:在37℃下双特异性抗MET mAb和单特异性亲本的Biacore结合亲和力

在 37℃/抗体捕获形式下的结合			
抗体	分析物	kd (s <sup>-1</sup> )	T½ (min)
[0542]	H4H13306P2	1.66E-02	0.7
	H4H13312P2	8.40E-03	1.4
	H4H14639D	1.63E-04	70.8

- [0543] 实施例7.在SRE-萤光素酶报告分子生物测定中,抗-Met抗体阻断HFG介导的Met激活  
 [0544] 在基于荧光素酶的报告分子测定中检查了抗MET抗体阻断肝细胞生长因子 (HGF) 介导的MET激活的能力。生长因子HGF与其受体c-Met (MET) 的细胞外结构域结合,引发快速同源二聚化并激活几个下游信号级联。在该实施例中测试的抗MET抗体是MET的二价单特异性结合物,或抗MET“双特异性抗体”,其中所述双特异性抗体的每个臂与MET上的不同且独特的表位结合。

- [0545] 使用基于工程细胞的荧光素酶报告分子测定(图2)来确定抗MET抗体激活MET信号传导的能力(图3A;表8,第3列和第4列)和阻断配体介导的MET激活(图3B;表8,第1列和第2

列)。简而言之,CIGNAL<sup>TM</sup>Lenti SRE报告分子(luc)试剂盒(SABiosciences, Hilden, DE)用于产生HEK293/SRE-Luc细胞。选择HEK293(人胚肾)细胞是因为它们内源性表达c-Met。将HEK293/SRE-Luc细胞稳定地掺入血清反应元件(SRE)依赖性荧光素酶(Luc)报告分子(参见Dinter等, PLoS ONE 10(2):e0117774, 2015)。HEK293/SRE-Luc细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素/谷氨酰胺和1 $\mu$ g/ml嘌呤霉素的DMEM中培养。

[0546] 接下来,将2.0 $\times$  10<sup>5</sup>个HEK293/SRE-Luc细胞接种在96孔板中的荧光素酶测定培养基中,并在37°C, 5% CO<sub>2</sub>中培育过夜。通过向细胞中加入连续稀释的HGF(0.01pM至1.0nM)并在不存在抗体的情况下在37°C培育4-6小时后记录荧光素酶信号,产生肝细胞生长因子(HGF)剂量反应曲线。为了产生抗体抑制曲线,将细胞在37°C下与连续稀释的抗人MET抗体(1.1pM至200nM)预培育1小时。然后在记录信号之前再加入浓度为73pM或100pM的HGF四至六小时。另外,还评估了在不存在配体的情况下抗体激活c-Met的能力。

[0547] 使用ONE-Glo<sup>TM</sup>荧光素酶测定系统(Promega, Madison, WI)检测荧光素酶活性,并在Victor或Envision光度计(Perkin Elmer, Shelton, CT)上测量发射的光,并以相对光单位(RLU)表示。使用GRAPHPAD PRISM®在12点反应曲线上从四参数逻辑方程确定EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>值。报道了最高抗体剂量的HGF阻断百分比和MET激活倍数(仅mAb)。结果显示于表8中。

[0548] 表8:抗Met抗体阻断HGF介导的信号传导和在没有配体的情况下SRE-Luc的激活

[0549]	HEK293/SRE-Luc 阻断活性 (1h mAb 预结合)		配体 (HGF) 非依赖性 HEK293/SRE-Luc 激活	
	抗体 ID	%抑制	IC <sub>50</sub> (M)	倍数反应

[0550] 抗MET二价单特异性抗体

[0551]

表达有 hIgG1-Fc 的抗体				
H1H13301P2	42	3.3E-09	1.4	ND
H1H13316P2	86	4.0E-11	1.7	ND
表达有 hIgG4-Fc 的抗体				
H4H13312P2	48	7.7E-11	10.9	1.2E-10
H4H13325P2	69	1.3E-11	4.3	1.9E-10
H4H13316P2	74	7.8E-12	2.3	4.7E-11
H4H13302P2	45	1.6E-09	1.8	ND
H4H13313P2	47	2.3E-09	1.2	ND
H4H13301P2	40	1.5E-09	1.6	ND
H4H13295P2	70	5.5E-11	2.8	3.0E-10
H4H13306P2	67	ND	9.8	1.3E-11
H4H13291P2	61	1.3E-10	2.7	3.9E-10
H4H13319P2	67	5.2E-11	4.8	1.8E-10
H4H13309P2	77	2.0E-10	9.2	3.9E-10
H4H13318P2	77	1.0E-10	3.1	ND
H4H13300P2	69	1.2E-10	2.8	4.8E-10
H4H13290P2	56	< 2.0E-12	9.8	< 2.0E-12

[0552]

H4H13311P2	62	3.5E-11	5.2	3.0E-10
H4H13331P2	75	< 1.0E-11	7.1	2.3E-12
H4H13299P2	51	ND	14.4	3.7E-12

[0553]

抗MET双特异性抗体 (hIgG4-Fc)

[0554]

H4H14639D	95	2.4E-11	1.8	5.7E-11
H4H14640D	89	5.2E-10	2.5	6.8E-09
H4H14634D	85	9.7E-12	3.4	9.0E-11
H4H14635D	85	1.9E-10	2.2	1.4E-09
H4H14638D	79	1.1E-09	2.6	5.9E-09
H4H14641D	75	2.7E-09	4.4	8.4E-08
H4H14636D	74	ND	2.8	2.8E-10
H4H14637D	73	ND	2.1	4.1E-09
H4H16445D	81	5.2E-10	4.3	1.0E-09
H4H16446D	83	1.0E-09	4.0	1.4E-09
H4H16447D	76	8.6E-10	5.8	1.4E-09
H4H16448D	87	6.2E-10	4.3	9.1E-10
H4H16449D	85	3.2E-10	4.2	4.2E-10

[0555]

NT = 未测试; ND = 由于非S形曲线或不完全阻断, 未确定EC50/IC50。

[0556] 如表8中所概述,大多数抗体抑制SRE报告分子的激活,IC50值范围为<2.0pM至约1.0nM。几种示例性单特异性二价抗MET抗体,例如H4H13306P2和H4H13309P2,是SRE-luc激活的有效抑制剂,抑制百分比值分别为67%和77%。抗MET双特异性抗体(MET x MET)总体上表现出对SRE-luc激活的更大抑制。例如,MET x MET双特异性抗体H4H14639D显示出95%的抑制。另外,几种阻断抗体在不存在配体的情况下弱激活,倍数激活反应在基线水平以上0.8至14.4的范围内。

[0557] 同样如图3所示,二价单特异性抗体H4H13306P2和H4H13312P2各自在不存在HGF配体的情况下激活Met通路(图A)并且还阻断Met的HGF激活(图B)。

[0558] 还使用HEK293/SRE-Luc系统评估了双特异性MET x MET抗体(例如,H4H14639D)对HGF依赖性和HGF非依赖性MET激活的作用。在用各种浓度的MET抗体H4H14639D(MET x MET双特异性抗体)、单价抗MET抗体和H4H14639D亲本抗体H4H13312P2处理的HEK293T细胞中测量SRE驱动的荧光素酶活性,以确定HGF非依赖性MET激动作用的水平。虽然亲本抗MET单特异性二价抗体显示MET激动剂活性,但单价和MET x MET双特异性抗体均未显示MET激动剂活性(图4A)。

[0559] 在用各种浓度的MET抗体H4H14639D(MET x MET双特异性抗体)、单价抗MET抗体和H4H14639D亲本抗体H4H13312P2处理的HEK293T细胞中测量SRE驱动的荧光素酶活性,以确定HGF依赖性MET激动作用的抑制或阻断水平。虽然亲本抗MET单特异性二价抗体显示出一些HGF阻断活性,但单价和MET x MET双特异性抗体均显示出更大的HGF阻断(图4B)。

[0560] MET x MET双特异性抗体阻断HGF信号传导并表现出较低的MET激动剂活性。

[0561] 实施例8.抗Met抗体抑制Met扩增细胞的生长

[0562] 接下来,测试选择的抗Met抗体抑制MET扩增的SNU5细胞生长的能力。简言之,在浓度范围为1.5pM至100nM的抗MET抗体存在下,将 $2.5 \times 10^3$ 个人胃癌(SNU5)细胞接种于完全生长培养基中。SNU5完全生长培养基含有伊思考夫改良杜尔贝科培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、10% FBS和青霉素/链霉素/谷氨酰胺。将细胞培育5天,并使用CELLTITER-GLO®发光细胞活力测定试剂盒(Promega, Madison, WI)根据制造商的说明书测定活细胞数。

[0563] 如表9中所概述,几种抗MET抗体,例如H4H13312P2和H4H13325P2阻断SNU5生长超过50%,总IC50范围介于44pM至780pM。

[0564] 图5描绘了用各种抗MET二价单特异性抗体(即常规抗体)处理的SNU5细胞的相对细胞生长。常规MET抗体中的一部分抑制SNU5 MET扩增的胃癌细胞的生长(图5)。用 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的每种抗体处理96孔板中的SNU5细胞,并在5天后通过还原ALAMARBLUE®试剂(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)测定细胞生长。使用如美国专利7,892,550 B2(其通过引用整体并入本文)中所述的MetMab的重链和轻链可变序列产生单价MET抗体(图5第2列)。常规抗体8是H4H13306P2,常规抗体11是H4H13312P2,它们用于构建MET x MET双特异性抗体H4H14639D。

[0565] 在单独的生长测定中,在SNU5和非小细胞肺癌(NSCLC)细胞系EBC-1中评估了MET x MET双特异性抗体(即H4H14639D)的阻断活性,所述细胞系还显示扩增的Met基因和过表达MET(Lutterbach等,Cancer Res. 67 (5): 2081-2088, 2007)。EBC-1细胞的完全生长培养基含有MEM厄尔盐(Earle's Salt)、10%胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素/谷氨酰胺和MEM的非

必需氨基酸。根据SRE-荧光素酶读数, H4H14369D表现出MET活性的最大抑制百分比。在当前实验中, 在浓度范围为15pM至100nM的H4H14639D存在下, 将 $3.0 \times 10^3$ 个SNU5或EBC-1细胞接种于完全生长培养基中。将细胞在37°C, 5% CO<sub>2</sub>中培育3天。然后将细胞固定在4%甲醛中并用3μg/ml Hoechst 33342染色以标记细胞核。在 IMAGEEXPRESS® Micro XL (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 上获得图像, 并通过 METAXPRESS® 图像分析软件 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 测定核计数。从所有孔中减去用40nM洋地黄皂苷处理的细胞的背景核计数, 并将活力表示为未处理对照的百分比。通过10点反应曲线 (GRAPHPAD PRISM®) 上的四参数逻辑方程确定IC50值。IC50值和细胞杀伤百分比显示在表9中。

[0566] 表9: 抗MET抗体阻断SNU5生长

[0567]	抗体	%生长抑制	IC <sub>50</sub> (M)	抗体	%生长抑制	IC <sub>50</sub> (M)
	H4H13312P2	69	7.8E-10	H4H13291P2	24	ND
	H4H13325P2	57	4.4E-11	H4H13319P2	23	1.0E-10
	H4H13316P2	53	1.0E-10	H4H13309P2	22	1.0E-10
	H4H13302P2	40	1.1E-10	H4H13318P2	18	5.1E-11
	H4H13313P2	34	4.4E-11	H4H13300P2	16	ND
	H4H13301P2	33	7.4E-11	H4H13290P2	12	ND
	H1H13301P2	33	1.0E-10	H4H13311P2	8	ND
	H1H13316P2	30	2.0E-10	H4H13331P2	5	ND
	H4H13295P2	30	ND	H4H13299P2	-8	ND
	H4H13306P2	28	7.1E-11			

[0568] ND=由于非S形曲线或不完全阻断, 未确定IC50

[0569] 如下表10中所概述, MET x MET双特异性抗体H4H14639D分别抑制37%和40%的EBC-1和SNU5细胞的生长, 并且IC50分别为0.82nM和0.3nM。

[0570] 表10: 抗Met双特异性抗体阻断EBC-1和SNU5生长

[0571]	mAb	IC <sub>50</sub> (nM)		%生长抑制	
		EBC-1	SNU5	EBC-1	SNU5
[0572]	H4H14639D	0.82	0.30	37	40

[0573] 用0.1μg/mL、1μg/mL或10μg/mL的对照抗体、单价MET抗体或MET x MET双特异性抗体处理96孔板中的SNU5细胞(胃)。5天后通过还原ALAMARBLUE®试剂 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 测定细胞生长。与对照和单价抗体相比, MET x MET双特异性抗体显著降低了SNU5细胞的相对细胞生长(图6A)。

[0574] 同样, 评估了MET x MET双特异性抗体对EBC-1细胞生长的作用。将2,500个EBC-1细胞接种在96孔板中, 并在补充有10%FBS的杜尔贝科培养基中培养。用0.1μg/mL或1μg/mL的对照抗体或MET x MET双特异性抗体处理细胞, 随后在37°C, 5% CO<sub>2</sub>下培育。5天后, 通过在SPECTRAMAX® M3板读数器 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA) 中测量指示剂染料ALAMARBLUE®还原成其高荧光形式来测定相对细胞生长。结果显示在表11和图6B中。与对照抗体相比, MET x MET双特异性抗体 (H4H14639D) 显著降低了EBC-1细胞的相对细胞

生长(图6B)。

[0575] 几种二价单特异性和MET x MET二价的抗MET抗体是SRE-Luc激活的有效抑制剂，并且抑制Met扩增和MET过表达细胞系的生长。

[0576] 表11:抗Met双特异性抗体阻断EBC-1细胞生长

[0577]

	相对细胞生长(n=3)	标准偏差
对照	1.000	0.045
0.1 $\mu$ g/mL H4H14639D	0.397	0.032
1 $\mu$ g/mL H4H14639D	0.462	0.028

[0578] 实施例9.MET x MET双特异性抗体诱导NCI-H596 NSCLC细胞中的适度和瞬时MET通路活性

[0579] 在体外评估MET x MET双特异性抗体对人肺腺鳞癌细胞中MET通路的作用。

[0580] 将250,000个NCI-H596细胞接种在12孔板中，并在补充有10%FBS的RPMI培养基中培养。用50ng/ml的肝细胞生长因子(HGF)或10 $\mu$ g/ml的MET x MET双特异性抗体H4H14639D处理细胞，一式两份。随后将细胞在5%CO<sub>2</sub>中于37°C培育。在0、2、6或18小时后，制备细胞裂解物，将蛋白质含量标准化并进行免疫印迹分析。用ImageJ图像处理程序(T.Collins, BioTechniques 43:S25-S30,2007)量化MET磷酸化和ERK磷酸化。将磷酸化水平相对于微管蛋白上样对照标准化，并表示为相对于对照处理的倍数变化。结果概述在表12中。

[0581] 表12:MET和ERK的磷酸化

[0582]

处理(小时)	磷酸化MET(平均值±SD)	磷酸化ERK(平均值±SD)
对照(hFc) (18)	1.0±0.5	1.0±0.3
HGF(2)	202.3±38.7	16.7±1.6
HGF(6)	38.9±4.9	12.4±3.9
HGF(18)	59.2±24.4	12.4±0.9
H4H14639D(2)	69.7±7.0	2.2±0.9
H4H14639D(6)	9.9±7.4	0.3±0.4
H4H14639D(18)	1.4±0.1	0.1±0.1

[0583] HGF处理NCI-H596细胞诱导MET和ERK的强烈激活，其在2小时达到峰值并在18小时后持续。用H4H14636D双特异性抗体处理检测到适度的MET和ERK磷酸化，其分别经过18或6小时恢复至基线水平。

[0584] 实施例10.MET x MET双特异性抗体在Hs746T胃癌细胞中比单特异性抗体更有效地诱导MET降解并抑制通路活性

[0585] 在体外评估MET x MET双特异性抗体对人胃癌细胞的MET活性的作用。将250,000个Hs746T人胃癌细胞(H.Smith, J.Nat'l.Cancer Inst.62(2):225-230,1979)接种在12孔板中并在补充有10% FBS的改良杜尔贝科培养基中培养。用(1)5 $\mu$ g/ml hFc对照分子，(2)5 $\mu$ g/ml亲本二价单特异性抗MET抗体H4H13306P2，(3)5 $\mu$ g/ml亲本二价单特异性抗MET抗体H4H13312P2，(4)2.5 $\mu$ g/ml H4H13306P2和2.5 $\mu$ g/ml H4H13312P2的组合，或(5)5 $\mu$ g/ml MET x MET双特异性抗体H4H14639D处理细胞。随后将细胞在5% CO<sub>2</sub>,37°C下培育。18小时后，制备细胞裂解物，将蛋白质含量标准化并进行免疫印迹分析。用ImageJ图像处理程序(T.Collins, BioTechniques 43:S25-S30,2007)量化MET表达、MET磷酸化和ERK磷酸化。结

果概述于表13和图7A中,其描绘了原始免疫印迹数据。图7B描绘了用10 $\mu$ g/ml的MET x MET双特异性抗体处理0、2或6小时的细胞中的MET蛋白表达。用MET x MET双特异性抗体处理后,Hs747T细胞中的总MET水平随时间下降。对于MET扩增的人乳头状腺癌NCI-H820细胞系获得了类似的结果(Bean等,“MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib,” Proc.Natl.Acad.Sci.2007年12月26日,104(52):20932-20937)。

[0586] 表13:MET蛋白和MET/ERK通路激活的相对水平

分子	相对水平 MET 蛋白 (平均值 $\pm$ SD)	相对水平磷酸化 MET (平均值 $\pm$ SD)	相对水平磷酸化 ERK (平均值 $\pm$ SD)
对照(hFc)	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.03
H4H13306P2	0.61 $\pm$ 0.09	0.57 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.03
H4H13312P2	1.15 $\pm$ 0.19	0.93 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.11
H4H13306P2+H4H13312P2	1.06 $\pm$ 0.02	1.07 $\pm$ 0.10	1.04 $\pm$ 0.23
H4H14639D	0.41 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01

[0587] [0588] 双特异性抗体H4H14639D比其亲本常规抗体更有效地诱导MET降解。用H4H14636D处理比用亲本抗体或亲本抗体的组合更有效地抑制MET和ERK磷酸化。

[0589] 用对照抗体、MET x MET双特异性抗体H4H14639D、抗MET亲本抗体H4H13306P2、抗MET亲本抗体H4H13312P2以及亲本抗体1和2的组合处理Hs746T胃癌细胞,每种抗体10 $\mu$ g/ml或每种5 $\mu$ g/ml的亲本抗体组合,持续18小时。通过用指定的抗体进行免疫印迹测定MET表达(MET)和通路激活(pMET和pErk)(图8)。MET x MET双特异性抗体在Hs746T胃癌细胞系中比其亲本抗体更有效地抑制MET通路激活。

[0590] [0591] 实施例11.MET x MET双特异性抗体在NCI-H596肺癌细胞中比单特异性抗体更有效地诱导MET降解

评估了MET x MET双特异性抗体和亲本二价单特异性抗MET抗体对人肺腺鳞癌细胞上肝细胞生长因子受体(HGFR或MET)表达水平的作用。将250,000个NCI-H596人肺腺鳞癌细胞接种在12孔板中,并在补充有10% FBS的RPMI培养基中培养。用(1)5 $\mu$ g/ml hFc对照分子,(2)5 $\mu$ g/ml亲本二价单特异性抗MET抗体H4H13306P2,(3)5 $\mu$ g/ml亲本二价单特异性抗MET抗体H4H13312P2,(4)2.5 $\mu$ g/mL H4H13306P2和2.5 $\mu$ g/mL H4H13312P2的组合,或(5)5 $\mu$ g/ml MET x MET双特异性抗体H4H14639D处理细胞。随后将细胞在5% CO<sub>2</sub>,37°C下培育。18小时后,制备细胞裂解物,将蛋白质含量标准化并进行免疫印迹分析。用ImageJ图像处理程序(T.Collins,BioTechniques 43:S25-S30,2007)量化MET表达。结果概述于表14中。

[0592] 表14:MET蛋白的相对水平

分子	相对MET水平
对照 (hFc)	1 $\pm$ 0.03
H4H13306P2	0.50 $\pm$ 0.01
H4H13312P2	0.35 $\pm$ 0.04
H4H13306P2+H4H13312P2	0.61 $\pm$ 0.04

H4H14639D	0.24±0.01
-----------	-----------

[0594] NCI-H596 (MET外显子14跳跃突变) 肺癌细胞也用10 $\mu$ g/ml对照抗体或MET x MET双特异性抗体处理2、6或18小时。通过免疫印迹测定MET表达(图9),其显示了随着处理时间的增加MET x MET双特异性抗体诱导的MET降解。

[0595] 在NCI-H596肺癌细胞中,双特异性抗体H4H14636D比其亲本常规抗体更有效地诱导MET降解。

[0596] 实施例12.MET x MET双特异性抗体在SNU5胃癌细胞中比单特异性抗体更有效地诱导MET降解和抑制通路活性

[0597] 评估了二价单特异性抗MET抗体和几种MET x MET双特异性抗体对胃癌细胞上肝细胞生长因子受体(HGFR或MET)表达水平的作用。将人胃癌SNU5细胞接种在含有20%FBS+青霉素-链霉素-谷氨酰胺的伊思考夫培养基中。接种后24小时,用对照hFc、抗MET亲本二价单特异性抗体H4H13312P2或MET x MET双特异性抗体(H4H14634D、H4H14635D、H4H14636D、H4H14637D、H4H14638D、H4H14639D、H4H14640D、H4H14641D)处理细胞18小时。然后制备细胞裂解物并通过蛋白质印迹分析。检测免疫印迹的MET和微管蛋白。定量MET蛋白表达水平并相对于微管蛋白上样对照标准化。结果呈现于表15和图10B中。

[0598] 表15:MET蛋白的相对水平

0599]	分子	相对 MET 水平	分子	相对 MET 水平
[0600]	对照 (hFc)	1	H4H14637D	0.49
	H4H13312P2	0.62	H4H14638D	0.35
	H4H14634D	0.45	H4H14639D	0.27
	H4H14635D	0.27	H4H14640D	0.18
	H4H14636D	0.50	H4H14641D	0.31

[0601] 如上所述,用10 $\mu$ g/ml的对照抗体或MET x MET双特异性抗体或单价MET抗体处理SNU5癌细胞18小时。通过用指定的抗体进行免疫印迹测定MET表达(图10A和图10B)和通路激活(即pMET和pERK;图10A)。免疫印迹显示在图10中。

[0602] 用MET x MET双特异性抗体处理SNU5细胞比用二价单特异性抗MET抗体(H4H13312P2)、单价MET抗体或对照hFc处理诱导更有效的MET降解。用MET x MET双特异性抗体处理SNU5细胞抑制MET通路的下游效应子。MET扩增的非小细胞肺癌腺癌细胞系NCI-H1993获得了类似的结果(Kubo等,“MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors,” Int.J.Cancer 2009Apr 15;124(8):1778-1784)。

[0603] 实施例13.MET x MET双特异性抗体在EBC-1细胞中比单特异性抗体更有效地诱导MET降解、抑制通路活性和抑制肿瘤生长

[0604] 如上所述,用对照抗体或10 $\mu$ g/ml MET x MET双特异性抗体处理MET扩增的人肺鳞状细胞癌EBC-1细胞(Lutterbach等,“Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival,” Cancer Res.2007Mar 1;67(5):2081-8)18小时。通过用指定的抗体进行免疫印迹来确定MET表达和

通过pMET和pErk表达确定的MET通路激活。免疫印迹显示于图11中。

[0605] 用MET x MET双特异性抗体处理携带MET基因扩增的EBC-1细胞比用对照抗体处理诱导更有效的MET降解。用MET x MET双特异性抗体处理EBC-1细胞抑制了MET通路的下游效应子。

[0606] 在另一个实验中,将500万个EBC-1细胞皮下植入C.B.-17SCID小鼠的肋腹中。一旦肿瘤体积达到约150mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分成6组,每周用25mg/kg的对照抗体或25mg/kg的MET x MET双特异性抗体H4H14639D处理两次。在植入后监测肿瘤生长30天,并测量每个实验组随时间的肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)。结果显示在表16和图12中,其显示MET x MET双特异性抗体显著抑制EBC-1肿瘤的生长。

[0607] 表16:相对EBC-1肿瘤生长

处理	从处理开始时的肿瘤生长 (mm <sup>3</sup> )
	(平均值 ± SEM)
25 mg/kg 对照	1394 ± 226
25 mg/kg H4H14639D	89 ± 47

[0608] [0609] 实施例14.MET x MET双特异性抗体比单特异性抗体更有效地抑制Hs746T胃癌细胞的体外生长

[0610] 在体外评估MET x MET双特异性抗体对人胃癌细胞生长的作用。将2,500个Hs746T人胃癌细胞(H.Smith, J.Nat'l.Cancer Inst. 62(2):225-230, 1979)接种在96孔板中,并在补充有10% FBS的改良杜尔贝科培养基中培养。用(1)5μg/ml的单个二价单特异性抗MET抗体(H4H13306P2或H4H13312P2),(2)各2.5μg/ml的两种二价单特异性抗MET亲本抗体(H4H13306P2和H4H13312P2)的组合,或(3)5μg/ml的含有来自H4H13306P2的一个结合臂和来自H4H13312P2的另一个结合臂的双特异性抗体(H4H14639D)处理细胞。随后将细胞在5% CO<sub>2</sub>, 37°C下培育。5天后,通过在SPECTRAMAX® M3板读数器(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)中测量指示剂染料ALAMAR BLUE®(ThermoFischer Scientific, Waltham, MA)还原成其高荧光形式来确定相对细胞生长。荧光的增加与细胞生长相关。表17描述了相对于对照(未处理)Hs746T细胞生长标准化的每种抗体处理的相对Hs746T细胞生长。双特异性抗体H4H14639D比其单独或组合的亲本单特异性抗体更有效地抑制Hs746T细胞的增殖。

[0611] 表17:标准化的Hs746T细胞生长

	相对细胞生长 (n=3)	标准偏差
对照	1	0.133497801
H4H14639D	0.647408139	0.019090432
H4H13306P2	1.623312821	0.189647479
H4H13312P2	0.852680493	0.01728527
H4H13306P2+H4H13312P2	1.767720125	0.077445717

[0614] 用对照抗体、MET x MET双特异性抗体H4H14639D、抗MET亲本抗体H4H13306P2、抗MET亲本抗体H4H13312P2以及亲本抗体1和2的组合处理Hs746T胃癌细胞,每种抗体2 $\mu$ g/ml。5天后通过还原ALAMAR BLUE®试剂测定细胞生长(图13A)。MET x MET双特异性抗体相对于单独或组合的亲本抗体抑制细胞生长,并且在Hs746T胃癌细胞中比其亲本抗体更有效地抑制MET通路激活。

[0615] 96孔板中的Hs746T胃癌细胞用25 $\mu$ g/ml对照抗体,1 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml或25 $\mu$ g/ml单价MET抗体,或1 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml或25 $\mu$ g/ml MET x MET双特异性抗体处理。5天后,通过还原ALAMARBLUE®试剂测定Hs746T胃癌细胞生长(图13B)。MET x MET双特异性抗体有效地抑制MET扩增细胞的生长。

[0616] 实施例15.MET x MET双特异性抗体在体外不诱导NCI-H596肺癌细胞的生长

[0617] 在体外评估MET x MET双特异性抗体对人非小细胞肺癌(NSCLC)细胞(NCI-H596)生长的作用。将10,000个NCI-H596肺腺鳞癌细胞(Nair等,J.Nat'l.Cancer Inst.86(5):378-383,1994)接种在96孔板中的补充有1%胎牛血清(FBS)的一层0.66%琼脂培养基上。将细胞在补充有1% FBS与0.3%琼脂糖的RPMI 1640培养基中培养。用(1)5 $\mu$ g/ml的个体亲本二价单特异性抗MET抗体(H4H13306P2或H4H13312P2),(2)各2.5 $\mu$ g/ml的两种亲本二价单特异性抗MET抗体(H4H13306P2和H4H13312P2)的组合,(3)5 $\mu$ g/ml的含有来自H4H13306P2的一个结合臂和来自H4H13312P2的另一个结合臂的双特异性抗体(H4H14639D),或(4)100ng/ml的肝细胞生长因子(HGF)处理细胞。随后将细胞在5% CO<sub>2</sub>,37°C下培育。两周后,通过在SPECTRAMAX®M3板读数器(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)中测量指示剂染料ALAMAR BLUE®(ThermoFischer Scientific,Waltham,MA)还原成其高荧光形式来确定相对细胞生长。荧光的增加与细胞生长相关。表18和图14描绘了相对于对照(未处理)NCI-H596细胞生长标准化的每种抗体处理的相对NCI-H596细胞生长。用HGF处理NCI-H596肺癌细胞导致在软琼脂中有效诱导生长。与对照处理的细胞相比,MET x MET(图14中的MM)双特异性抗体H4H14639D没有显著改变生长。用各亲本二价单特异性抗体H4H13306P2(M1)或H4H13312P2(M2)单独或组合(H4H13306P2和H4H13312P2)(M1M2)观察到适度的细胞生长诱导。

[0618] 表18:标准化的NCI-H596细胞生长

[0619]		相对细胞生长(n=3)	标准偏差
	对照	1	0.030074808
	H4H14639D	1.070339237	0.075103746
	H4H13306P2	2.9593578	0.337877264
	H4H13312P2	1.686580346	0.145670753
	H4H13306P2+H4H13312P2	1.693724668	0.168651046
	HGF	7.87655937	0.46057617

[0620] 实施例16.MET x MET双特异性抗体比单特异性抗体更有效地抑制SNU5胃癌细胞的体外生长

[0621] 在体外评估MET x MET双特异性抗体对人胃癌细胞生长的作用。将2,500个SNU5人胃癌细胞(Ku和Park,Cancer Res.Treat.37(1):1-19,2005)接种在96孔板中,并在补充有20% FBS的伊思考夫改良杜尔贝科培养基中培养。用(1)5 $\mu$ g/ml的单个二价单特异性抗MET

抗体(H4H13306P2或H4H13312P2),(2)各2.5 $\mu$ g/ml的两种二价单特异性抗MET抗体(H4H13306P2和H4H13312P2)的组合,或(3)5 $\mu$ g/ml的含有来自H4H13306P2的一个结合臂和来自H4H13312P2的另一个结合臂的双特异性抗体(H4H14639D)处理细胞。随后将细胞在5%CO<sub>2</sub>,37℃下培育。5天后,通过在SPECTRAMAX® M3板读数器(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)中测量指示剂染料ALAMAR BLUE®(Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA)还原成其高荧光形式来确定相对细胞生长。荧光的增加与细胞生长相关。表19描述了相对于对照(未处理)SNU5细胞生长标准化的每种抗体处理的相对SNU5细胞生长。双特异性抗体H4H14639D比其亲本单特异性抗体更有效地抑制SNU5细胞的增殖。

[0622] 表19:标准化的SNU5细胞生长

		相对细胞生长 (n=3)	标准偏差
[0623]	对照	1	0.070814765
	H4H14639D	0.271100069	0.01324024
[0624]	H4H13306P2	0.766317547	0.061930288
	H4H13312P2	0.431990234	0.033183065
	H4H13306P2+H4H13312P2	0.331287005	0.012042949

[0625] 实施例17.MET x MET双特异性抗体诱导Hs746T肿瘤异种移植物的消退

[0626] 评估了MET x MET双特异性抗体对免疫受损小鼠模型中的人胃癌肿瘤的作用。将三百万个Hs746T人胃癌细胞皮下植入CB-17SCID小鼠的胁腹中(Bancroft等,J.Immunol.137(1):4-9,1986)。一旦肿瘤体积达到约200mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分成六组,每周用25mg/kg的对照抗体或25mg/kg的MET x MET双特异性抗体(H4H14639D)处理两次。对照组在植入后监测肿瘤生长16天,此时对照处理的肿瘤达到方案大小限制。对于H4H14639处理组,在植入后监测肿瘤生长30天。

[0627] 与处理开始时相比,用MET x MET双特异性抗体处理肿瘤诱导肿瘤大小在21天内消退。对照处理的肿瘤在16天的生长中显示体积平均增加约12倍(表20)。肿瘤体积随时间变化显示在图15中,其显示了由MET x MET双特异性抗体导致的Hs746T肿瘤消退。

[0628] 表20:Hs746T胃肿瘤生长

		抗体 (mg/kg)	从处理开始时的肿瘤生长(mm <sup>3</sup> ) (平均值 ± SEM)
[0629]	对照 (10)		1164 ± 138
	H4H14639D (25)		-215 ± 8.3

[0630] 实施例18.MET x MET双特异性抗体诱导SNU5肿瘤异种移植物的消退

[0631] 评估了MET x MET双特异性抗体对免疫受损小鼠模型中的人胃癌肿瘤的作用。将一千万个SNU5人胃癌细胞皮下植入CB-17SCID小鼠的胁腹。一旦肿瘤体积达到约500mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分成五组,每周用10mg/kg的对照抗体或1mg/kg或10mg/kg的MET x MET双特异性抗体(H4H14639D)处理两次。在植入后监测肿瘤生长81天,此时对照处理的肿瘤达到方案大

小限制。

[0632] 用1mg/kg或10mg/kg MET x MET抗体处理的小鼠的肿瘤分别显示平均大小减小约95%或98%。对照处理的肿瘤显示比处理开始时的体积平均增加约12倍(表21)。

[0633] 表21:SNU5胃肿瘤生长

[0634]	抗体 (mg/kg)	从处理开始时的肿瘤生长(mm <sup>3</sup> )
		(平均值 ± SEM)
	对照(10)	1123 ± 194
	H4H14639D (1)	-477 ± 43
	H4H14639D (10)	-492 ± 18

[0635] 每周用对照抗体、1mg/kg或10mg/kg的单价MET抗体,或1mg/kg或10mg/kg的MET x MET双特异性抗体处理两次皮下植入的SNU5肿瘤。在用MET x MET双特异性抗体处理的那些小鼠中随时间观察到MET扩增的SNU5肿瘤的有效和持续消退(即肿瘤体积减小)(图16,图A)。从研究结束的肿瘤中提取蛋白质,通过免疫印迹测定MET表达和MET磷酸化(pMET表达)所示的通路激活。相对于对照,MET x MET处理的小鼠(肿瘤)显示MET和pMET表达降低(图16B)。MET x MET双特异性抗体是具有MET扩增的肿瘤的有效抑制剂。

[0636] 实施例19.MET x MET双特异性抗体诱导U87-MG肿瘤异种移植植物的消退

[0637] 评估了MET x MET双特异性抗体对免疫受损小鼠模型中人胶质母细胞瘤的作用。将五百万个U87-MG人胶质母细胞瘤细胞(Vordermark和Brown, Int. J. Radiation Biol. 56 (4):1184-1193, 2003)皮下植入CB-17SCID小鼠的肋腹中。U87-MG胶质母细胞瘤异种移植模型由自分泌HGF信号传导驱动。一旦肿瘤体积达到约100mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分成六组,并用对照抗体或MET x MET双特异性抗体(H4H14639D)处理。每周两次给每只小鼠施用25mg/kg抗体(对照或MET x MET)。在植入后监测肿瘤生长29天,此时对照处理的肿瘤达到方案大小限制。

[0638] 用MET x MET抗体处理的小鼠的肿瘤显示平均大小减小约38%,而对照处理的肿瘤在29天的生长中显示体积平均增加约19倍(表22)。肿瘤体积随时间变化显示在图17中,其显示了由MET x MET双特异性抗体导致的U87-MG肿瘤消退。

[0639] 表22:胶质母细胞瘤肿瘤生长

[0640]	抗体 (mg/kg)	从处理开始时的肿瘤生长(mm <sup>3</sup> )
		(平均值 ± SEM)
	对照(25)	1777 ± 98
[0641]	H4H14639D (25)	-38 ± 18

[0642] 实施例20.MET x MET双特异性抗体抑制U118-MG肿瘤异种移植植物的生长

[0643] 评估了MET x MET双特异性抗体对免疫受损小鼠模型中人胶质母细胞瘤的作用。U118-MG胶质母细胞瘤异种移植模型由自分泌HGF信号传导驱动。将五百万个U118-MG人胶质母细胞瘤细胞(Olopade等,Cancer Research 52:2523-2529,1992)皮下植入CB-17SCID

小鼠的胁腹中。一旦肿瘤体积达到约100mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分成六组,并用对照抗体或MET x MET双特异性抗体(H4H14639D)处理。每周两次给每只小鼠施用25mg/kg抗体(对照或MET x MET)。植入后监测肿瘤生长72天。

[0644] MET抗体在72天期间抑制肿瘤生长99% (表23)。

[0645] 表23:胶质母细胞瘤肿瘤生长

[0646]	抗体 (mg/kg)	从处理开始时的肿瘤生长 (mm <sup>3</sup> ) (平均值 ± SEM)	与对照相比的肿瘤生长减少%
	对照(25)	1228 ± 123	-
	H4H14639D (25)	11 ± 18	99.1

[0647] 在另一个实验中,用25mg/kg对照抗体、单价MET抗体或MET x MET双特异性抗体每周处理小鼠皮下植入的U118-MG胶质母细胞瘤肿瘤两次。随时间测量每个实验组的肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)。结果如图18所示,其显示MET x MET双特异性抗体抑制U118-MG肿瘤的生长。

[0648] 实施例21:美登木素生物碱合成

[0649] 如下所述由化合物2(图19)合成美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-N-Me-β-丙氨酸-氨基甲酰基-(对氨基)苄基-瓜氨酸-缬氨酸-己二酰-琥珀酸酯(图20中的化合物1)。

[0650] 美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-Fmoc-N-Me-β-丙氨酸(化合物3,图19)。将脱乙酰基-美登素(化合物2,图19,0.433g,0.666mmol)、Fmoc-N-Me-β-Ala(0.434g,1.33mmol)和HATU(0.757g,1.99mmol)称重至干燥烧瓶中,溶于无水DMF(9mL)中,并用4-甲基吗啉(0.300mL,2.73mmol)处理。用橡胶隔膜密封烧瓶,用氩气吹扫,并在环境温度下搅拌反应物。3天后,将混合物蒸发成油状物,溶于乙腈和水中,并通过快速色谱法在275g C18硅胶柱(30-90%乙腈水溶液,20分钟,两相0.05%乙酸)上纯化。冷冻干燥产物分级,得到呈白色固体状的标题化合物。将粗产物在80g硅胶柱上纯化(EtOAc-5:5:1 EtOAc:DCM:MeOH,历时17分钟)。合并纯的级分,蒸发,真空干燥过夜,得到呈白色固体状的标题化合物(0.424g,66%)。MS (ESI+):C<sub>51</sub>H<sub>61</sub>C1N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>的计算值956.4;实验值956.9(M+H),979.0(M+Na),939.0(M-H<sub>2</sub>O+H)。

[0651] N-叔丁氧基羰基-N-甲基-β-丙氨酸琥珀酸酯(化合物4,图19)。通过本领域熟知的方法从商业Boc-N-Me-β-Ala-OH制备标题化合物(参见Widdison等,J.Med.Chem.,2006,49(14),4401)。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,CDCl<sub>3</sub>):δ3.62(br,2H),2.88(m,9H),1.47(s,9H)。

[0652] 美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-Boc-N-Me-β-丙氨酸(化合物5,图19)。方法A:将前一步骤的产物(化合物4,图19,0.453g,1.51mmol)和脱乙酰基-美登素(化合物2,图19,0.304g,0.468mmol)溶于3:1乙腈:水(8mL)中,用1M NaHCO<sub>3</sub>水溶液(0.5mL)处理,并在环境温度下搅拌18小时。当通过TLC确定反应完成时,然后将其与盐水一起搅拌10分钟并用乙酸乙酯(EtOAc)萃取三次。然后将合并的有机层用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,浓缩滤液,真空干燥,得到金色浓浆,通过快速柱色谱法在20g硅胶滤筒(0-10% MeOH的EtOAc溶液,历时15分钟)上纯化,得到呈白色固体状的标题化合物(0.084g,43%)。MS (ESI+):C<sub>41</sub>H<sub>59</sub>C1N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>的计算值834.4;实验值835.2(M+H),857.2(M+Na),817.4(M-H<sub>2</sub>O+H)。

[0653] 方法B:将Boc-N-Me-β-Ala-OH(0.294g,1.45mmol)溶于无水DMF(5mL)中,用五氟苯基二苯基次膦酸盐(FDPP,0.555g,1.44mmol)处理,并在环境温度下搅拌反应物30分钟。然后将混合物转移到含有脱乙酰基-美登素(化合物2,图19,0.462g,0.711mmol)和二异丙基

乙胺(DIEA, 0.250mL, 1.44mmol)在无水DMF(7mL)中的混合物的较大烧瓶中,用橡胶隔膜密封烧瓶,用氩气吹扫,并在环境温度下再次搅拌反应物。24小时后,将反应物真空浓缩成油状物,溶于乙酸乙酯(EtOAc, 2mL)中,并在40g硅胶滤筒上纯化(EtOAc-5:5:1EtOAc/DCM/MeOH,历时15分钟),得到呈淡黄色固体状的标题化合物(0.468g, 79%)。MS (ESI+): C<sub>41</sub>H<sub>59</sub>C1N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>的计算值834.4;实验值857.2(M+Na), 817.2(M-H<sub>2</sub>O+H)。

[0654] 美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-N-Me-β-丙氨酸(化合物6,图19)。方法A:将美登素-N-Me-L-Ala-Boc-N-Me-β-Ala(化合物5,图19,0.464g,0.555mmol)溶于乙腈/水/三氟乙酸的3:1:1混合物(7mL)中,用橡胶隔膜密封烧瓶,用氩气吹扫,并将反应物在环境温度下搅拌24小时,然后封盖并在-20℃下储存3天。将粗反应混合物温热至环境温度2小时,在真空中简单浓缩,在100g C18 RediSep Gold柱(20-80%乙腈水溶液,历时25分钟,在两种溶剂中均含0.1% TFA)上纯化,并将合并的纯级分在环境温度下部分蒸发,在干冰浴中冷冻,并冻干,得到呈淡黄色固体状的标题化合物(0.295g, 63%)。MS (ESI+): C<sub>36</sub>H<sub>51</sub>C1N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>的计算值734.3;实验值735.7(M+H), 1471.3(2M+H)。

[0655] 方法B:将美登素-N-Me-L-Ala-Fmoc-β-Ala(化合物3,图19,0.422g,0.441mmol)溶于5%哌啶的DMF溶液(6.00mL,3.04mmol)中,反应烧瓶用橡胶隔膜密封,用氩气吹扫,并将混合物在环境温度下搅拌。3小时后,通过LCMS完成反应,因此将其真空浓缩,密封,并在-20℃下储存过夜。将粗产物温热至环境温度,用乙腈和10%乙酸水溶液(各3mL)处理,在275g C18硅胶柱上通过快速色谱法纯化(10-90%乙腈水溶液,历时20分钟,两种溶剂中均含0.05%乙酸)。冷冻干燥产物级分,得到呈白色固体状的标题化合物。将固体用无水乙醚湿磨三次,过滤,用DCM将固体从玻璃料上洗掉,蒸发滤液并真空干燥,得到呈白色固体状的标题化合物(0.311g, 89%)。MS (ESI+): C<sub>36</sub>H<sub>51</sub>C1N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>的计算值734.3;实验值735.0(M+H)。

[0656] 美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-N-Me-β-丙氨酸-氨基甲酰基-(对氨基)苄基-瓜氨酸-缬氨酸-Fmoc(化合物7,图20)。步骤1:将前一步骤的产物(化合物6,图19,0.310g,0.390mmol)、1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAT,0.164g,1.20mmol)、碳酸氢钠(0.138g,1.64mmol)和Fmoc-缬氨酸-瓜氨酸-(对氨基)苄基-(对硝基苯基)碳酸酯(0.595g,0.776mmol,通过本领域已知的方法制备,参见Gangwar等,美国专利7,714,016B2)溶于无水DMF(10mL)中,用橡胶隔膜密封反应烧瓶,用氩气吹扫,并将混合物在环境温度下搅拌。24小时后,将反应物部分真空蒸发至约2-3mL,用10%乙酸水溶液和水(各约1mL)处理,溶于乙腈(约6mL)中,并通过快速色谱法在275g C18硅胶柱上纯化(30-90%乙腈水溶液,历时20分钟,两种溶剂中均含0.05%乙酸)。部分蒸发,冷冻和冻干,得到呈白色固体状的标题化合物(0.362g, 68%)。MS (ESI+): C<sub>70</sub>H<sub>88</sub>C1N<sub>9</sub>O<sub>17</sub>的计算值1361.6;实验值1362.1(M+H), 1384.1(M+Na), 1344.1(M-H<sub>2</sub>O+H)。

[0657] 步骤2:将前一步骤的产物(0.360g,0.264mmol)溶于5%哌啶的DMF溶液(7mL)中,用橡胶隔膜密封反应烧瓶,用氩气吹扫,并将混合物在环境温度下搅拌。3小时后,将反应物真空蒸发,将残余物用10%乙酸水溶液(2mL)处理,溶于乙腈(4mL)中,并通过快速色谱法在275g C18硅胶柱上纯化(10-70%乙腈水溶液,历时20分钟,在两种溶剂中均含0.05%乙酸)。合并纯级分,在-20℃下储存过夜,在25-30℃下真空部分蒸发,在干冰上冷冻,冻干6天,得到呈淡黄色固体状的标题化合物(0.303g, 95%)。MS (ESI+): C<sub>15</sub>H<sub>78</sub>C1N<sub>9</sub>O<sub>15</sub>的计算值1139.5;实验值1140.1(M+H), 1162.0(M+Na)。

[0658] 美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-N-Me- $\beta$ -丙氨酸-氨基甲酰基-(对氨基)苄基-瓜氨酸-缬氨酸-己二酸(化合物8,图20)。将前一步骤的产物(化合物7,图20,0.205g,0.171mmol)、己二酸(0.258g,1.77mmol)和2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氢喹啉(EEDQ,0.215g,0.869mmol)溶于无水DCM(10mL)和无水甲醇(5mL)中,用橡胶隔膜密封反应烧瓶,用氩气吹扫,并将混合物在环境温度下搅拌。21小时后,将反应物真空蒸发,将残余物溶于几毫升乙腈/水中,并通过快速色谱法在150g C18硅胶柱上纯化(20-80%乙腈水溶液,历时17分钟,两种溶剂中均含0.05%乙酸)。将纯级分部分蒸发,冷冻和冻干18小时,得到呈白色固体状的标题化合物(0.140g,65%)。MS (ESI+): C<sub>61</sub>H<sub>86</sub>C1N<sub>9</sub>O<sub>18</sub>的计算值1267.6;实验值1268.9 (M+H), 1290.9 (M+Na)。

[0659] 美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-N-Me- $\beta$ -丙氨酸-氨基甲酰基-(对氨基)苄基-瓜氨酸-缬氨酸-己二酰-琥珀酸酯(化合物1,图20)。将前一步骤的产物(化合物8,图20,0.061g,0.048mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(0.063g,0.55mmol)和N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC-HC1,0.071g,0.37mmol)溶于无水DCM(7mL)中,用橡胶隔膜密封反应烧瓶,用氩气吹扫,并将混合物在环境温度下搅拌。5天后,将反应物真空蒸发,将残余物溶于几毫升乙腈/水中,并通过快速色谱法在100g C18硅胶柱上纯化(30-90%乙腈水溶液,历时15分钟,两种溶剂中均含0.05%乙酸)。将最干净的产物级分部分蒸发,冷冻和冻干18小时,得到呈白色固体状的标题化合物(0.044g,67%)。MS (ESI+): C<sub>65</sub>H<sub>89</sub>C1N<sub>10</sub>O<sub>20</sub>的计算值1364.6;实验值1365.7 (M+H), 1387.7 (M+Na), 1347.7 (M-H<sub>2</sub>O+H)。<sup>1</sup>H-NMR (500MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ7.56 (d, J = 8.3Hz, 2H), 7.20 (d, J = 8.7Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.71 (m, 1H), 6.62 (d, J = 10.0Hz, 1H), 6.39 (dd, J = 15.1, 11.3Hz, 1H), 5.68 (dd, J = 15.3, 9.1Hz, 1H), 5.38-5.32 (m, 1H), 5.03 (t, J = 15.1Hz, 1H), 4.88 (d, J = 12.3Hz, 1H), 4.73 (d, J = 11.3Hz, 1H), 4.61 (dd, J = 9.1, 3.6Hz, 1H), 4.26 (d, J = 7.0Hz, 1H), 4.17 (t, J = 7.1Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.61 (d, J = 11.7Hz, 1H), 3.57 (d, J = 12.4Hz, 1H), 3.46 (d, J = 9.1Hz, 2H), 3.33 (s, 3H), 3.27 (t, J = 6.9Hz, 1H), 3.17-3.07 (m, 5H), 2.97 (dd, J = 16.6, 9.9Hz, 1H), 2.88 (d, J = 11.7Hz, 3H), 2.84 (s, 4H), 2.77 (s, 2H), 2.66 (s, 2H), 2.62 (t, J = 4.8Hz, 2H), 2.56 (d, J = 13.1Hz, 1H), 2.32 (t, J = 6.6Hz, 2H), 2.15 (d, J = 14.0Hz, 1H), 2.10 (q, J = 6.8Hz, 1H), 1.92 (s, 4H), 1.75 (m, 5H), 1.61 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.27 (d, J = 6.3Hz, 3H), 1.22 (dt, J = 12.7, 6.3Hz, 6H), 0.95 (t, J = 5.9Hz, 7H), 0.78 (s, 3H)。

[0660] 基于WO 2015/031396(例如,实施例2,第[00106]段)中描述的程序以单一非对映异构体形式合成DM1,其通过引用整体并入本文。

[0661] 实施例22.抗体缀合和缀合物的表征

[0662] 抗体缀合

[0663] 在环境温度下,将50mM HEPES,150mM NaCl,pH 8.0和10-15% (v/v) DMA中的抗体(H4H14639D、H4H13312P、H4H14635D和同种型对照;10-20mg/ml)与5-6倍过量的如实施例21中所述制备的SMCC-DM1非对映异构体(美登木素生物碱A)或美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-N-Me- $\beta$ -丙氨酸-氨基甲酰基-(对氨基)苄基-瓜氨酸-缬氨酸-己二酰-琥珀酸酯(化合物1,图20)(美登木素生物碱B)缀合2小时。通过尺寸排阻色谱法或大量超滤纯化缀合物并无菌过滤。通过UV光谱分析测定蛋白质浓度。尺寸排阻HPLC确定所有缀合物均>90%单体,并且RP-HPLC确定存在<1%未缀合的接头有效负载。根据Hamblett等(American

Association for Cancer Research.20040ct 15;10(20):7063-70)和/或天然与缀合的质量差异,通过UV分析所有缀合的抗体的接头有效负载值。表24中报告了有效负载与抗体的比率。

[0664] 表24:每种抗体药物缀合物的产率百分比和有效负载与抗体的比率

抗体	产率(%)	DAR (MS)	DAR (UV)
H4H14639D-美登木素生物碱 A	60	3.8	3.7
H4H14639D-美登木素生物碱 B	50	2.4	2.4
H4H13312P-美登木素生物碱 A	60	4.1	4.1
[0665] H4H13312P-美登木素生物碱 B	50	2.3	2.5
同种型对照 REGN1945-美登木素生物碱 B	70	2.3	2.5
同种型对照 REGN1945-美登木素生物碱 A	80	3.7	3.7

[0666] 通过液相色谱-质谱分析表征缀合物

[0667] 为了确定抗体上接头-有效负载的负载,将缀合物去糖基化,并通过LC-MS分析。

[0668] 对于测定,将50 $\mu$ g缀合物用milli-Q水稀释至终浓度为1mg/mL。将10 $\mu$ L PNGase F溶液[通过添加150 $\mu$ L PNGase F原液(New England Biolabs,目录号P0704L)和850 $\mu$ L milli-Q水并混合均匀制备PNGase F溶液]加入稀释的缀合物溶液中,然后在37°C下培育过夜。在LC-MS(Waters Synat G2-Si)上注射5 $\mu$ L每种样品,并在25分钟内用0.1mL/min梯度流动相20-40%洗脱(流动相A:0.1% v/v FA的H<sub>2</sub>O溶液;流动相B:0.1% v/v FA的乙腈溶液)。在80°C下在Waters Acuity BEH C4柱(1.0 $\times$ 50mM,1.7 $\mu$ M)上实现LC分离。

[0669] 使用Masslynx软件对质谱光谱进行解卷积,并使用以下等式计算药物与抗体的比率(DAR):

[0670] 1.根据分布峰强度(PI)的药物相对百分比(%) (D<sub>n</sub>):

[0671]  $D_n\% = PIn / \sum (PI0+PI1+PI2+\dots+PIi) \times 100$

[0672] ( $n=0,1,2,3,\dots,i$ )

[0673] 2.平均DAR计算:

[0674]  $DAR = \sum (1 \times D1\% + 2 \times D2\% + 3 \times D3\% + \dots + i \times Di\%)$

[0675] 实施例23.表面等离子体共振得出的缀合人单克隆抗MET(单特异性和双特异性)抗体的结合亲和力和动力学常数

[0676] 在Biacore 2000仪器上使用实时表面等离子体共振生物传感器测定法测定MET结合抗MET抗体的平衡解离常数( $K_d$ 值),所述抗MET抗体缀合了MCC-DM1非对映异构体(美登木素生物碱A)或美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-N-Me- $\beta$ -丙氨酸-氨基甲酰基-(对氨基)苄基-瓜氨酸-缬氨酸-己二酰-琥珀酸酯(化合物1,图20)(美登木素生物碱B)。通过与单克隆小鼠抗人Fc抗体(GE Healthcare, #BR-1008-39)的胺偶联来衍生Biacore传感器表面,以捕获表达

有人恒定区的抗MET ADC和亲本未修饰的抗体。在HEPES缓冲盐水 (HBS) - EP运行缓冲液 (0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v表面活性剂P20) 中进行Biacore结合研究。人MET在内部制备, 表达C端myc-myc-六组氨酸标签 (hMET-mmh)。将在HBS-EP运行缓冲液中制备的不同浓度 (3倍稀释) 的hMET-mmh (范围从30nM至1.1nM) 以40μL/min的流速注射到抗MET ADC或抗体捕获表面上。监测hMET-mmh与每种捕获的ADC和单克隆抗体的结合4分钟。随后, 在HBS-EP运行缓冲液中监测hMET-mmh解离6分钟。通过短暂注射20mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>再生抗人Fc表面。所有结合动力学实验均在25°C下进行。

[0677] 通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将实时传感图拟合至1:1结合模型来确定动力学结合 ( $k_a$ ) 和解离 ( $k_d$ ) 速率常数。通过从相应的分析物传感图中减去缓冲液注射传感图信号来双重参考所有传感图, 从而去除由抗体从捕获表面解离引起的伪影。根据动力学速率常数计算结合解离平衡常数 ( $K_D$ ) 和解离半衰期 ( $t_{1/2}$ ) :

$$[0678] K_D (M) = \frac{kd}{ka}, \text{ and } t_{1/2} (\text{min}) = \frac{\ln(2)}{60*kd}$$

[0679] 美登木素生物碱A或美登木素生物碱B缀合的抗Met单特异性和双特异性抗体的结合动力学参数如下表25所示, 一些实验重复两次进行。

[0680] 表25: 缀合的单特异性和双特异性单克隆抗MET抗体在25°C下的Biacore结合亲和力

抗体	捕获的 mAb (RU)	结合的抗原 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	t <sub>1/2</sub> (min)
<b>H4H13312P2</b>	<b>148.1±1.2</b>	<b>12.3</b>	<b>2.59E+05</b>	<b>5.35E-03</b>	<b>2.07E-08</b>	<b>2.2</b>
<b>H4H13312P2</b>	<b>142.7±0.3</b>	<b>12.1</b>	<b>1.87E+05</b>	<b>4.85E-03</b>	<b>2.59E-08</b>	<b>2.4</b>
<b>H4H13312P2-美登木素生物碱 A</b>	<b>232.6±0.5</b>	<b>11.9</b>	<b>1.82E+05</b>	<b>7.18E-03</b>	<b>3.94E-08</b>	<b>1.6</b>
<b>H4H13312P2-美登木素生物碱 B</b>	<b>263.0±2.6</b>	<b>10.9</b>	<b>1.80E+05</b>	<b>6.32E-03</b>	<b>3.51E-08</b>	<b>1.8</b>
<b>H4H14639D</b>	<b>283.6±4.4</b>	<b>82.8</b>	<b>5.90E+05</b>	<b>1.56E-03</b>	<b>2.64E-09</b>	<b>7.4</b>
<b>H4H14639D-美登木素生物碱 A</b>	<b>207.7±0.8</b>	<b>55.8</b>	<b>4.95E+05</b>	<b>1.81E-03</b>	<b>3.65E-09</b>	<b>6.4</b>
<b>H4H14639D-美登木素生物碱 B</b>	<b>227.5±0.4</b>	<b>55.4</b>	<b>4.83E+05</b>	<b>1.87E-03</b>	<b>3.86E-09</b>	<b>6.2</b>

<b>H4H14639D-美登木素生物碱 A</b>	<b>284.0±1.1</b>	<b>62.8</b>	<b>4.70E+05</b>	<b>1.76E-03</b>	<b>3.74E-09</b>	<b>6.6</b>
<b>H4H14639D-美登木素生物碱 B</b>	<b>268.7±0.7</b>	<b>72.8</b>	<b>4.91E+05</b>	<b>1.45E-03</b>	<b>2.95E-09</b>	<b>8.0</b>

[0683] 实施例24: 抗MET抗体药物缀合物 (ADC) 的体外效力

[0684] 为了确定本发明所述的抗MET抗体药物缀合物(ADC)的相对细胞杀伤效力,在表达不同水平的内源性MET的多个细胞系上进行了细胞杀伤测定。EBC-1 (Riken Cell Bank; #RBRC-RCB1965)、MKN-45 (JCRB; #JCRB0254)、NCI-H1993 (ATCC; #CRL-5909) 和 J.RT3 (ATCC; #TIB-153) 细胞系维持在 RPMI+10% FBS+1X 青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺 (P/S/G) 中, SNU-5 (ATCC; #CRL-5973) 维持在伊思考夫+10% FBS+1X P/S/G 中, Hs746t (ATCC; #HTB-135) 和 HEK293 (ATCC; #003041) 维持在 DME+10% FBS+1X P/S/G 中, MDA-MB-231 (ATCC; #HTB-26) 维持在不含 CO<sub>2</sub> 的 Liebowitz 的 L-15+10% FBS+1X P/S/G+1X 非必需氨基酸 (NEAA) 中, U87MG (ATCC; #HTB-14) 维持在 MEM 厄尔盐+15% FBS+1X P/S/G+1X NEAA 中, T47D (ATCC; #HTB-133) 维持在 RPMI 1640+10% FBS+1X P/S/G+10mM HEPES+1mM 丙酮酸钠+10ug/ml 牛胰岛素中和 A549 (ATCC; #CCL-185) 维持在 Kaighn 的营养混合物 F-12 (HAM 的 F-12K) +10% FBS+1X P/S/G 中。

[0685] 最初,通过流式细胞术在整个细胞系组中用未缀合的 H4H14635D、H4H14639D 和 H4H13312P2 抗体评估抗MET抗体的相对结合。简言之,将  $1 \times 10^6$  个细胞与 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  H4H14635D、H4H14639D、H4H13312P2 或同种型对照抗体 (REGN1945) 在冰上在 PBS+2% FBS (FACS 缓冲液) 中培养 30 分钟。用 FACS 缓冲液洗涤一次后,将细胞与 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 Alexa647 缀合的抗人二抗 (Jackson ImmunoResearch, #109-606-170) 在冰上培养 30 分钟。在用 FACS 缓冲液再洗涤一次后,用 Cytofix (BD Biosciences, #554655) 固定样品,用 FACS 缓冲液过滤并在 iQue 流式细胞仪 (Intellicyte) 上运行。使用 FlowJo 软件 (FlowJo LLC) 确定平均荧光强度 (MFI) 数据。FACS 结合表达为超过同种型对照水平的倍数 MFI 结合,并且结果概述在表 26 中。三种抗 Met 抗体的相对结合在每种细胞系上是相当的,并且范围是同种型对照的 447 倍至 7 倍。在 T47D、HEK293 或 J.RT3 细胞上未观察到任何测试的 3 种抗 MET 抗体的可检测结合。

[0686] 为了测定抗 MET ADC 的体外细胞毒性,评估了用 ADC 处理 3 或 6 天后的核计数。简言之,将细胞以 750-3000 个细胞/孔接种于 96 孔胶原包被的平板 (Greiner, VWR; #82050-812) 的完全生长培养基中,并在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下生长过夜。对于细胞活力曲线,将连续稀释的 ADC、未缀合的抗体或游离的有效负载加入到细胞中,终浓度范围为 100nM 至 0.01nM (基于毒素浓度),并在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下培育 3 或 6 天。随后用 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342 核染剂 (Invitrogen, #H3570) 处理细胞,同时用 4% 甲醛固定。在 ImageXpress micro XL (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 上获得图像,并通过 MetaXpress 图像分析软件 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 测定核计数。从所有孔中减去用 40nM 洋地黄皂苷处理的细胞的背景核计数,并将活力表示为未处理对照的百分比。通过 10 点反应曲线 (GraphPad Prism) 上的四参数逻辑方程确定 IC<sub>50</sub> 值。每个剂量-反应曲线的未处理条件也包括在分析中并表示为最低剂量。IC<sub>50</sub> 值和细胞杀伤百分比显示在表 27 和 28 中。

[0687] 如表 27 中所概述,抗 MET 抗体-药物缀合物 H4H14639D-美登木素生物碱 A 特异性地降低 Met 扩增的 EBC-1、SNU-5、MKN-45、NCI-H1993 和 Hs746t 细胞背景中的细胞活力,IC<sub>50</sub> 值范围为 0.35nM 至 0.96nM。杀死的细胞百分比 (最大杀死 %) 范围为 73% 至 100%。H4H14639D-美登木素生物碱 A 也特异性杀死了 84% 的 A549 细胞,IC<sub>50</sub> 值为 13.91nM。H4H14639D-美登木素生物碱 A 在低表达细胞系 (MDA-MB-231 和 U87MG) 和非表达 (T47D、HEK293 和 J.RT3) 细胞系中 IC<sub>50</sub> 值大于 37nM。类似缀合的同种型对照抗体杀死所有细胞系,IC<sub>50</sub> 值大于 35nM。甲基二硫化物形式的 DM1 (MeS-DM1) 杀死所有测试品系,IC<sub>50</sub> 值范围为 0.07nM 至 2.86nM。

[0688] 在另一个实验中,三种抗Met抗体(H4H14639D、H4H14635D和H4H13312P2)与美登木素生物碱A或美登木素生物碱B美登木素生物碱有效负载缀合,并在6天处理后在EBC-1、Hs746t、A549、ant T47D细胞中评估体外细胞毒性。如表28所概述,所有抗Met抗体-药物缀合物均有效且特异性地降低了Met阳性细胞的细胞活力,IC<sub>50</sub>值在EBC-1细胞中低至10pM,在Hs746t细胞中低至0.82nM,在A549细胞中低至3.5nM。杀死的细胞百分比在EBC-1细胞中大于95%,在Hs746t细胞中大于86%,在A549细胞中大于72%。T47D细胞(Met阴性)未被抗Met ADC特异性杀死。类似缀合的同种型对照抗体降低了所有测试细胞系中的细胞活力,IC<sub>50</sub>值在EBC-1细胞中大于5nM,在Hs746t细胞中大于33nM,在A549和T47D细胞中大于90nM。未缀合的H4H14639D降低了EBC-1、Hs746t和A549细胞的细胞活力,但其比缀合抗体的百分比更低。未缀合的H4H14635D和H4H13312P2在任何测试的细胞系中对活力几乎没有影响。甲基二硫化物形式的DM1(MeS-DM1)杀死所有测试品系,IC<sub>50</sub>值范围为0.12nM至1.39nM。相反,M24(美登木素生物碱B释放的有效负载)杀死细胞的IC50>100nM。

[0689] 表26:未缀合的MET抗体与肿瘤细胞系的FACS结合。

细胞系	FACS 结合 (超过同种型对照的 MFI 倍数)					
	未染色	仅二抗	REGN1945 (同种型对照)	H4H14635D	H4H14639D	H4H13312P2
<b>EBC-1</b>	0.7	0.6	1	263	252	147
<b>SNU-5</b>	1	1.2	1	477	454	235
<b>MKN-45</b>	1	0.8	1	183	156	94
<b>NCI-H1993*</b>	1	2	ND	ND	188	188
<b>Hs746t</b>	0.8	1.1	1	39	34	27
<b>MDA-MB-231</b>	3	5.6	1	11	12	7
<b>U87MG</b>	1.6	1.7	1	18	18	10
<b>T47D</b>	1	0.9	1	1.3	1	1.4
<b>A549</b>	0.7	0.5	1	12	10	7
<b>HEK293</b>	0.2	0.2	1	1.8	1.8	1.2
<b>J.RT3</b>	0.8	1	1	1.6	1.4	1.1

[0690] [0691] \*表示为超过NCI-H1993未染色的倍数。

[0692] 表27:3天体外细胞毒性测定中抗MET ADC的IC<sub>50</sub>和最大杀死%。

抗体-药物缀合物	EBC-1		SNU-5		MKN-45		NCI-H1993	
	IC <sub>50</sub> (nM)	最大杀 死%						
[0693]	DM1 (MeS-DM1)	2.22	90	1.22	99	2.73	85	2.86
	H4H14639D	0.82	37	0.30	40	ND	0	ND
	H4H14639D-美登木 素生物碱 A	0.96	89	0.40	100	0.35	86	0.41
	REGN1945-美登木 素生物碱 A	35.06	65	>100	14	>100	39	49.42

抗体-药物缀合物	Hs746t		MDA-MB-231		U87MG	
	IC <sub>50</sub> (nM)	最大 杀死%	IC <sub>50</sub> (nM)	最大杀 死%	IC <sub>50</sub> (nM)	最大杀死%
DM1 (游离药物)	1.46	81	1.53	89	0.61	89
H4H14639D	0.42	7	>100	6	>100	6
H4H14639D-美登木素生物碱 A	0.56	73	>100	48	100	58
REGN1945-美登木素生物碱 A	33.22	44	>100	42	94.71	58

抗体-药物缀合物	T47D		A549		HEK293		J.RT3	
	IC <sub>50</sub> (nM)	最大 杀死 %						
[0695]	DM1 (游离药物)	1.33	91	2.56	97	0.15	95	0.07
	H4H14639D	>100	0	>100	37	ND	0	>100
	H4H14639D-美登 木素生物碱 A	>100	6	13.91	84	40.90	65	37.82
	REGN1945-美登木 素生物碱 A	>100	1	>100	63	>100	44	39.79

[0696] 表28:6天体外细胞毒性测定中抗MET ADC的IC<sub>50</sub>和最大杀死%。

抗体-药物缀合物	EBC-1		Hs746t		T47D		A549	
	IC <sub>50</sub> (nM)	最大 杀死 %						
DM1 (MeS-DM1)	0.12	62	1.39	88	0.24	96	0.49	90
M24 (美登木素生物碱 B 释放的有效负载)	>100	32	>100	10	>100	0	>100	10
H4H14639D	0.37	66	0.44	35	>100	0	0.17	29
H4H14639D-美登木素生物碱 A	0.27	97	0.82	87	>100	3	6.01	86
H4H14639D-美登木素生物碱 B	0.01	96	0.86	90	>100	0	3.54	80
H4H13312P2	>100	30	>100	0	>100	0	>100	7
H4H13312P2-美登木素生物碱 A	0.39	95	1.59	87	>100	6	18.30	89
H4H13312P2-美登木素生物碱 B	0.07	95	0.89	90	>100	3	27.10	85
H4H14635D	>100	11	>100	7	>100	7	>100	0
H4H14635D-美登木素生物碱 A	0.76	96	1.76	86	>100	92	6.78	91
H4H14635D-美登木素生物碱 B	0.26	96	2.32	89	>100	2	21.40	72
REGN1945	>100	0	>100	0	>100	0	>100	1
REGN1945-美登木素生物碱 A	28.08	93	33.06	76	>100	14	93.40	49
REGN1945-美登木素生物碱 B	5.01	97	>100	0	>100	1	>100	15

[0699] 实施例25:针对胃癌细胞的体内功效

[0700] 将300万个Hs746T胃癌细胞皮下植入C.B.-17SCID小鼠的胁腹。一旦肿瘤体积达到约150mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分成6组,并用10mg/kg的对照抗体REGN1945-美登木素生物碱B或REGN1945-美登木素生物碱A或3或10mg/kg的H4H14639D-美登木素生物碱A或H4H14639D-美登木素生物碱B处理。所有抗体以每周一次的频率施用三次。植入后监测肿瘤生长37天。

[0701] 评估H4H14639D-美登木素生物碱A或H4H14639D-美登木素生物碱B对免疫受损小鼠中人肿瘤异种移植植物生长的作用,结果显示在表29中。用对照抗体REGN1945-美登木素生

物碱B或REGN1945-美登木素生物碱A处理的肿瘤在20天内生长达到方案大小限制。用3mg/kg的H4H14639D-美登木素生物碱A处理的肿瘤在27天内生长达到方案大小限制。在实验期间,用3mg/kg的H4H14639D-美登木素生物碱B处理的肿瘤的生长受到抑制。用10mg/kg的H4H14639D-美登木素生物碱A或H4H14639D-美登木素生物碱B处理肿瘤与处理开始时相比诱导了肿瘤大小的消退。

[0702] 表29:用抗Met-C抗体缀合物处理的SCID小鼠中的肿瘤生长

抗体(mg/kg)	从处理开始时的肿瘤生长(mm <sup>3</sup> ) (平均值 ± SD)
REGN1945-美登木素生物碱 A 10 mg/kg	1244 ± 199
REGN1945-美登木素生物碱 B 10 mg/kg	1345 ± 121
H4H14639D-美登木素生物碱 A 3 mg/kg	832 ± 15
H4H14639D-美登木素生物碱 A 10 mg/kg	-148 ± 0.17
H4H14639D-美登木素生物碱 B 3 mg/kg	19 ± 147
H4H14639D-美登木素生物碱 B 10 mg/kg	-137 ± 0

[0703]

[0704] 实施例26:针对肺癌细胞的体内功效

[0705] 将500万个EBC1肺癌细胞皮下植入C.B.-17SCID小鼠的肋腹。一旦肿瘤体积达到约170mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分成6组,并用15mg/kg的对照抗体REGN1945-美登木素生物碱B或2.5、5、10或15mg/kg的H4H14639D-美登木素生物碱B处理。抗体以每周一次的频率施用两次。植入后监测肿瘤生长73天。

[0706] 评估了H4H14639D对免疫受损小鼠中人肿瘤异种移植物生长的作用。用对照抗体REGN1945-美登木素生物碱B处理的肿瘤在24天内生长达到方案大小限制(IACUC方案要求杀死具有直径超过2cm,大约1500mm<sup>3</sup>的肿瘤的动物)。用2.5、5、10或15mg/kg的H4H14639D-美登木素生物碱B处理肿瘤与处理开始时相比诱导了肿瘤大小的消退。结果显示在表30中。

[0707] 表30:用抗Met-C抗体缀合物处理的SCID小鼠的肿瘤生长

抗体(mg/kg)	从处理开始时的肿瘤生长(mm <sup>3</sup> ) (平均值 ± SD)
REGN1945-美登木素生物碱 B 15 mg/kg	1106 ± 165
H4H14639D-美登木素生物碱 B 2.5 mg/kg	-142 ± 24
H4H14639D-美登木素生物碱 B 5 mg/kg	-163 ± 0
H4H14639D-美登木素生物碱 B 10 mg/kg	-173 ± 0
H4H14639D-美登木素生物碱 B 15 mg/kg	-179 ± 0

[0708] [0709] 实施例26:针对患者衍生的NSCLC肿瘤的体内功效

[0710] 将表达Met的NSCLC CTG-0165患者衍生的肿瘤皮下植入nu/nu裸鼠的胁腹。一旦肿瘤体积达到约150mm<sup>3</sup>,将小鼠随机分成6组,并用10mg/kg的对照抗体REGN1945-美登木素生物碱B或REGN1945-美登木素生物碱A或3或10mg/kg的H4H14639D-美登木素生物碱A或H4H14639D-美登木素生物碱B处理。所有抗体以每周一次的频率施用三次。植入后监测肿瘤生长61天。

[0711] 评估了H4H14639D-美登木素生物碱A或H4H14639D-美登木素生物碱B对免疫受损小鼠中人肿瘤异种移植物生长的作用。用对照抗体REGN1945-美登木素生物碱A或REGN1945-美登木素生物碱B处理的肿瘤在27天内生长达到方案大小限制。用3mg/kg的H4H14639D-美登木素生物碱A或H4H14639D-美登木素生物碱B处理的肿瘤的生长被抑制27天。用10mg/kg的H4H14639D-美登木素生物碱A或H4H14639D-美登木素生物碱B处理肿瘤与治疗开始相比诱导了肿瘤大小的消退。数据提供在表31中。

[0712] 表31:用抗Met-C抗体缀合物处理的裸鼠中的肿瘤生长

抗体(mg/kg)	从处理开始时的肿瘤生长(mm <sup>3</sup> ) (平均值 ± SD)
REGN1945-美登木素生物碱 A 10mg/kg	967 ± 136
REGN1945-美登木素生物碱 B 10mg/kg	1537 ± 373
H4H14639D-美登木素生物碱 A 3mg/kg	154 ± 227
H4H14639D-美登木素生物碱 A 10mg/kg	"-141 ± 2.3
H4H14639D-美登木素生物碱 B 3mg/kg	517 ± 362
H4H14639D-美登木素生物碱 B 10mg/kg	"-145 ± 2

[0713] [0714] 实施例27:基于氢/氘(H/D)交换的表位作图,抗Met抗体H4H13312P2、H4H13306P2和H4H14639D与人MET结合的表位作图

[0715] 进行实验以确定与抗Met抗体H4H13312P2、H4H13306P2和H4H14639D相互作用的人肝细胞生长因子受体胞外域(SEQ ID NO:155:表达由myc-myc-六组氨酸(.mmh)标签的人Met同种型1(Uniprot ID:P08581);以下称为hMet)的特定区域。H4H13312P2和H4H13306P2是二价单特异性抗Met抗体;H4H14639D是双特异性抗体,其包含两个结合Met上的不同表位的重链(分别来自H4H13312P2和H4H13306P2)以及通用轻链。(参见实施例5)。

[0716] 使用氢/氘(H/D)交换表位作图与质谱(HDX-MS)来确定上述抗体的结合表位。HDX方法的一般说明阐述在例如Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267 (2):252-259;以及Engen和Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A中。

[0717] 实验程序

[0718] 为了通过HDX在hMET上绘制抗Met抗体H4H13312P2、H4H13306P2和H4H14639D的结合表位,将各个抗体分别共价连接到NHS激活的Sepharose 4Fast Flow珠子(GE Healthcare, Pittsburgh, PA)。如下所述,使用两种方法“抗原上(On-Antigen)”和“复合物上(On-Complex)”来确认抗Met抗体的结合表位。

[0719] 在‘抗原上’实验条件下,将hMET在用D<sub>2</sub>O制备的PBS缓冲液中氘化5.0分钟或10.0分钟。通过短暂培育将氘化抗原与H4H13312P2或H4H13306P2抗体珠结合,然后用冰冷的低pH淬灭缓冲液从珠子中洗脱。将洗脱的样品手动加载到Waters H/DX-MS系统,该系统由整合的在线肽消化、截留、9.0分钟液相色谱(LC)分离和Synapt G2-Si MS数据采集组成。

[0720] 在‘复合物上’实验条件下,首先将hMET与H4H13312P2或H4H13306P2珠结合,然后通过在用D<sub>2</sub>O制备的PBS缓冲液中培育,氘化5.0分钟或10.0分钟。如上所述,通过Waters H/

DX-MS系统洗脱和分析氘化hMET。

[0721] 为了从hMET鉴定消化性肽,使用Waters ProteinLynx Global Server (PLGS) 软件处理来自未氘化样品的LC-MS<sup>E</sup>数据并针对人MET进行搜索。将鉴定的肽导入DynamX 3.0软件,并按以下两个标准过滤:1) 每个氨基酸的最小产物为0.3;2) 复制文件阈值为3.0。随后,DynamX 3.0软件在5分钟和10分钟的氘化时间点上自动计算“抗原上”和“复合物上”之间每种鉴定的肽的氘吸收差异。通过DynamX软件为质心值计算拾取的每个肽的单个同位素峰也被手动检查以确保氘吸收计算的准确性。

[0722] 通常,将高于0.2的氘化 $\Delta$ 值用作确定特异性结合表位的截止点。

[0723] 结果

[0724] 通过Waters Enzymate<sup>TM</sup>BEH胃蛋白酶柱(2.1x 30mm,5 $\mu$ m)进行在线胃蛋白酶消化,结合9.0分钟LC-MS<sup>E</sup>数据采集,当使用H4H13312P2抗体珠时,用‘抗原上’和‘复合物上’实验的可追踪的氘吸收量可再现地鉴定来自人MET的总共162种消化性肽。这些肽代表55.7%的序列覆盖率。在所有这些肽中,与单独抗原的氘化(‘抗原上’)相比,仅发现五个在结合H4H13312P2(‘复合物上’)时具有显著降低的氘化吸收。在这两种实验条件下这五种肽的质心值示于表32中。根据HDX数据,对应于由这五种肽覆盖的残基192-204的区域被定义为抗体H4H13312P2的结合表位。

[0725] 表32:与H4H13312P2结合后具有降低的氘吸收的hMET消化性肽

[0726]	hMET的残	5分钟氘化		10分钟氘化			
[0727]	基	复合物上 质心 $MH^+$	抗原上 质心 $MH^+$	$\Delta$	复合物上 质心 $MH^+$	抗原上 质心 $MH^+$	$\Delta$
	192-202	1351.25	1351.83	-0.58	1351.39	1352.27	-0.88
	192-203	1482.34	1482.94	-0.60	1482.50	1483.40	-0.90
	192-204	1629.84	1630.71	-0.87	1630.01	1631.10	-1.09
	193-202	1252.07	1252.79	-0.72	1252.25	1253.08	-0.83
	193-203	1383.22	1383.79	-0.57	1383.40	1384.17	-0.77

[0728] 对于使用H4H13306P2抗体珠进行的HDX实验,在“抗原上”和“复合物上”实验期间用可追踪的氘吸收可再现地鉴定出来自hMET的总共98种消化性肽。这98种肽代表52.1%的序列覆盖率。在所有这些肽中,与单独抗原的氘化(‘抗原上’)相比,观察到十二个在结合H4H13306P2(‘复合物上’)时具有显著降低的氘化吸收。在这两种实验条件下这十二种肽的质心值示于表33中。根据HDX数据,对应于这些肽所覆盖的残基305-315和残基421-455的区域被定义为抗体H4H13306P2的结合表位。

[0729] 表33:与H4H13306P2结合后具有降低的氘吸收的hMET消化性肽

hMET 的残基	5 分钟氘化			10 分钟氘化			
	复合物上质心 MH+	抗原上质心 MH+	Δ	复合物上质心 MH+	抗原上质心 MH+	Δ	
[0730]	305-312	818.20	818.83	-0.63	818.31	819.13	-0.82
	305-315	1161.50	1162.58	-1.08	1161.80	1162.95	-1.15
	306-313	818.48	818.97	-0.49	818.71	819.28	-0.57
	421-431	1206.24	1206.75	-0.51	1206.28	1206.95	-0.67
	421-435	1581.28	1581.84	-0.56	1581.41	1582.09	-0.68
	421-438	1941.58	1942.15	-0.57	1941.71	1942.39	-0.68
	422-438	1794.58	1795.04	-0.46	1794.72	1795.34	-0.62
	439-447	963.90	964.83	-0.93	963.97	965.24	-1.27
	439-455	1846.58	1847.79	-1.21	1847.24	1847.85	-0.61
	439-456	1960.24	1961.32	-1.08	1960.83	1961.42	-0.59
	441-455	1586.30	1587.71	-1.41	1587.33	1587.79	-0.46
	442-455	1487.50	1488.50	-1.00	1487.92	1488.54	-0.62

[0731] 使用与上述相同的方法确定双特异性抗Met抗体H4H14639D的结合表位。通过该方法确定的hMET上的H4H14639D结合表位对应于针对亲本抗体确定的表位。

[0732] 抗Met抗体H4H13312P2的结合表位:SEQ ID NO:155的AA192-204:VRRLKETKDGFMF (SEQ ID NO:156)。

[0733] 抗Met抗体H4H13306P2的结合表位:SEQ ID NO:155的AA305-315:LARQIGASLND (SEQ ID NO:157) 和SEQ ID NO:155的AA421-455:FIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNF (SEQ ID NO:158)。

[0734] 本发明不限于本文所述的具体实施方案的范围。实际上,除了本文所述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将从前面的描述和附图中变得显而易见。这些修改旨在落入所附权利要求的范围内。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
H4H13290P2																
H4H13291P2	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
H4H13295P2	33	34		35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
H4H13300P2	49	50	51		52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
H4H13299P2	65	66	67	68		69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
H4H13301P2	81	82	83	84	85		86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
H4H13302P2	97	98	99	100	101	102		103	104	105	106	107	108	109	110	111
H4H13306P2	113	114	115	116	117	118	119		120	121	122	123	124	125	126	127
H4H13309P2	129	130	131	132	133	134	135	136		137	138	139	140	141	142	143
H4H13311P2	145	146	147	148	149	150	151	152	153		154	155	156	157	158	159
H4H13312P2	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170		171	172	173	174	175
H4H13313P2	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187		188	189	190	191
H4H13316P2	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204		205	206	207
H4H13318P2	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221		222	223
H4H13319P2	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238		239
H4H13325P2	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	
H4H13331P2	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	

图1

HGF -/+ Ab 仅Ab

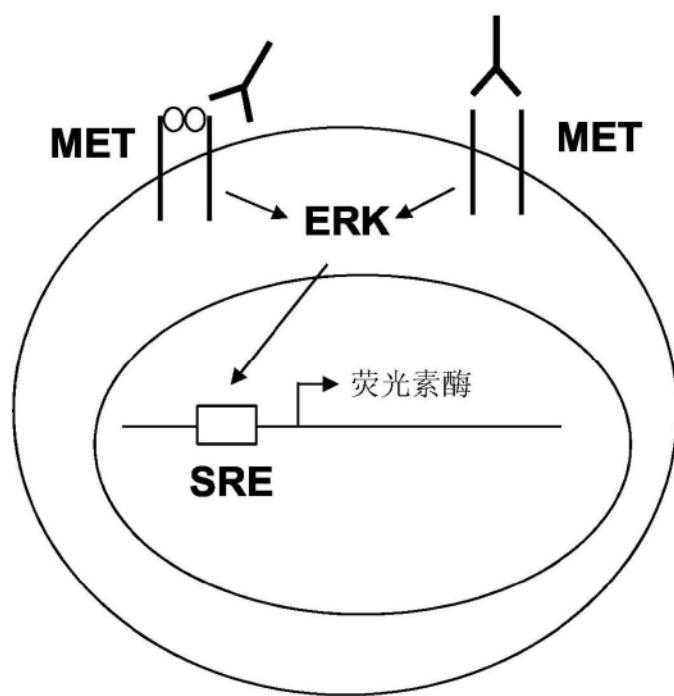


图2

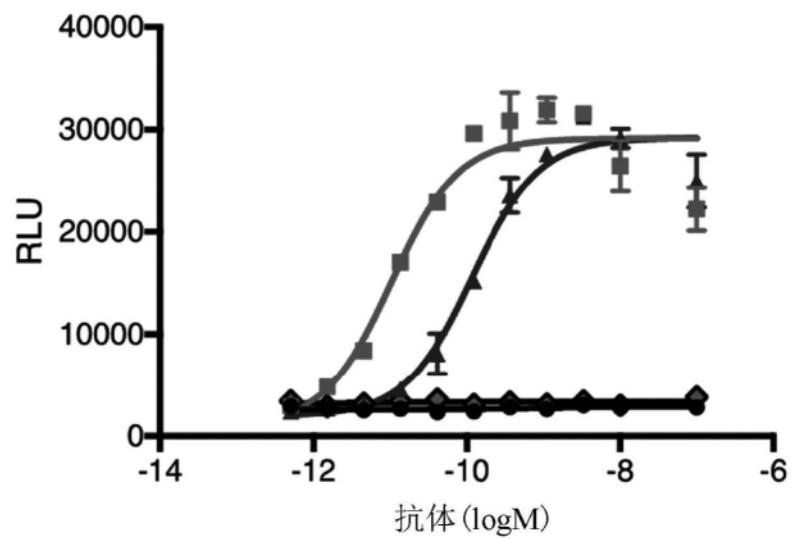


图3A

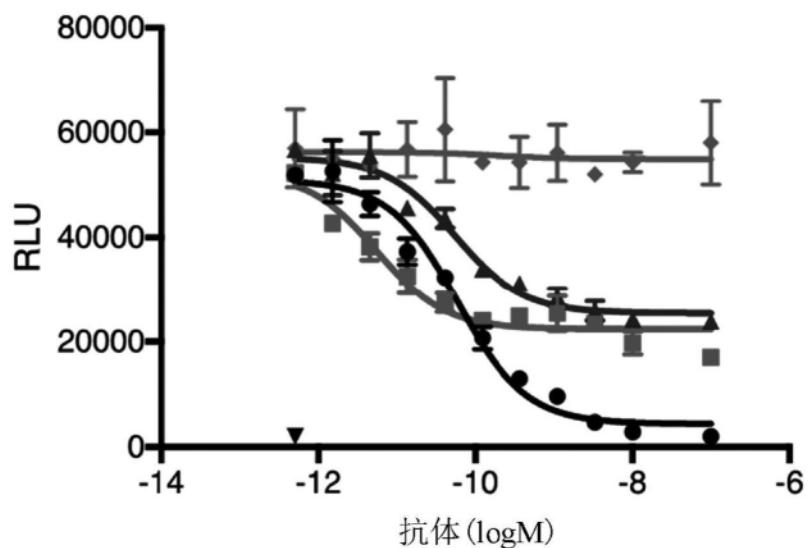


图3B

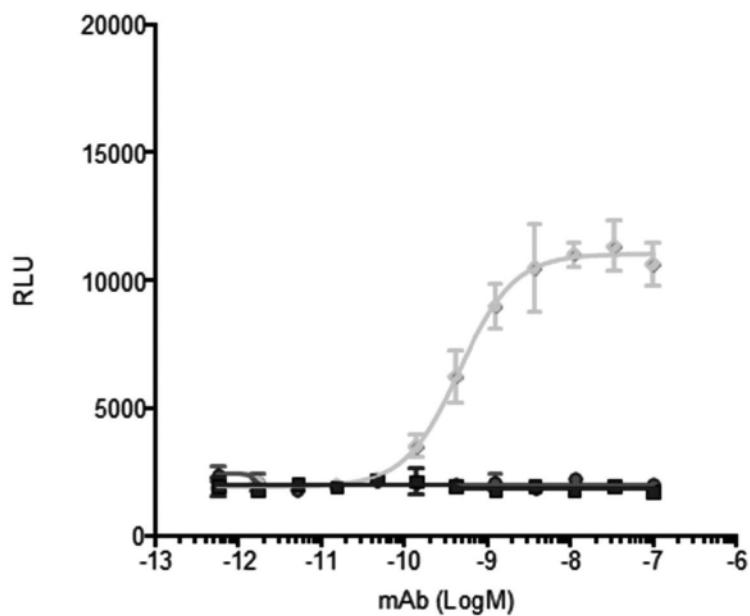


图4A

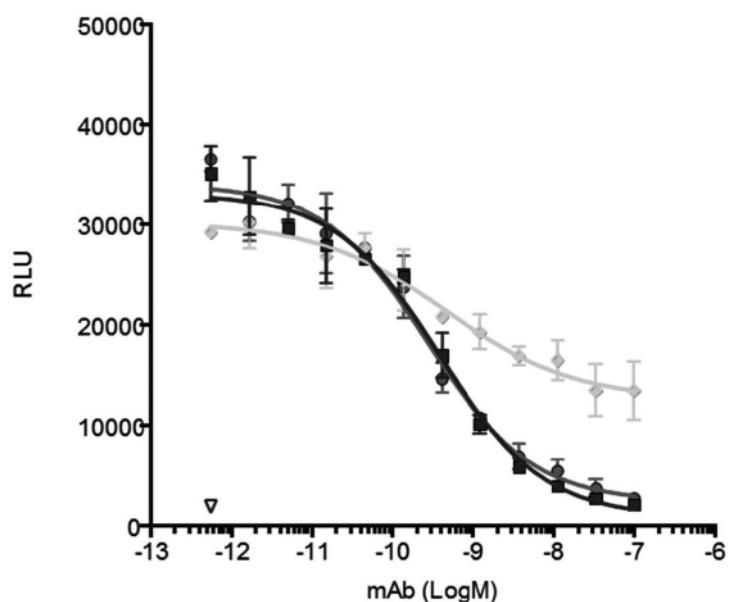


图4B

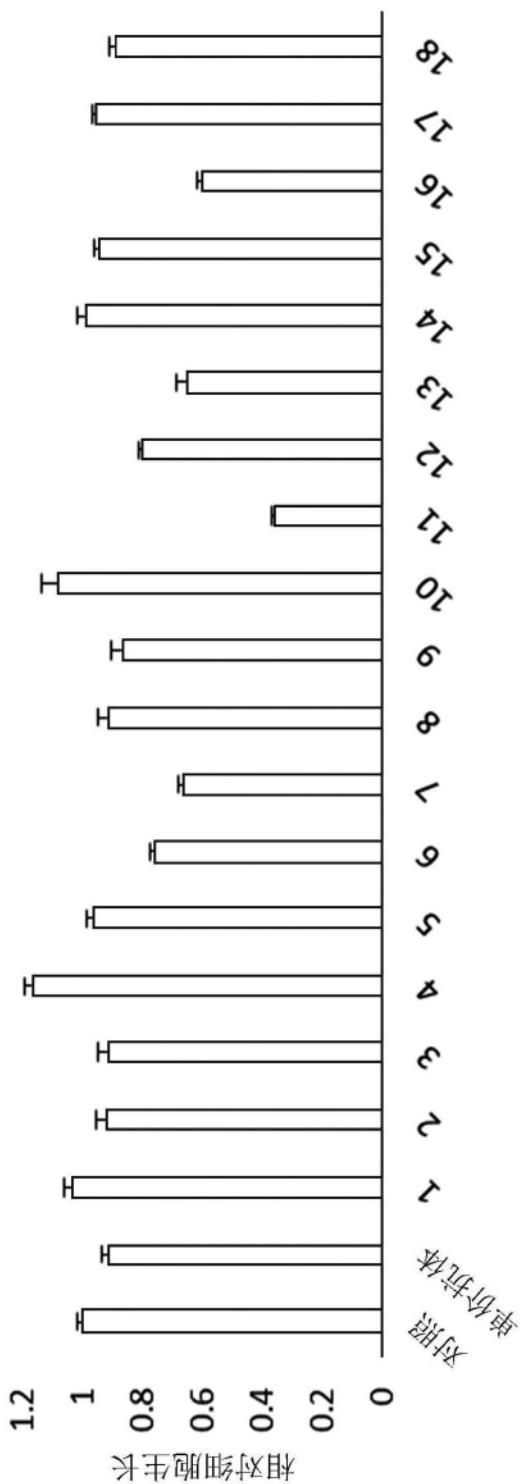


图5

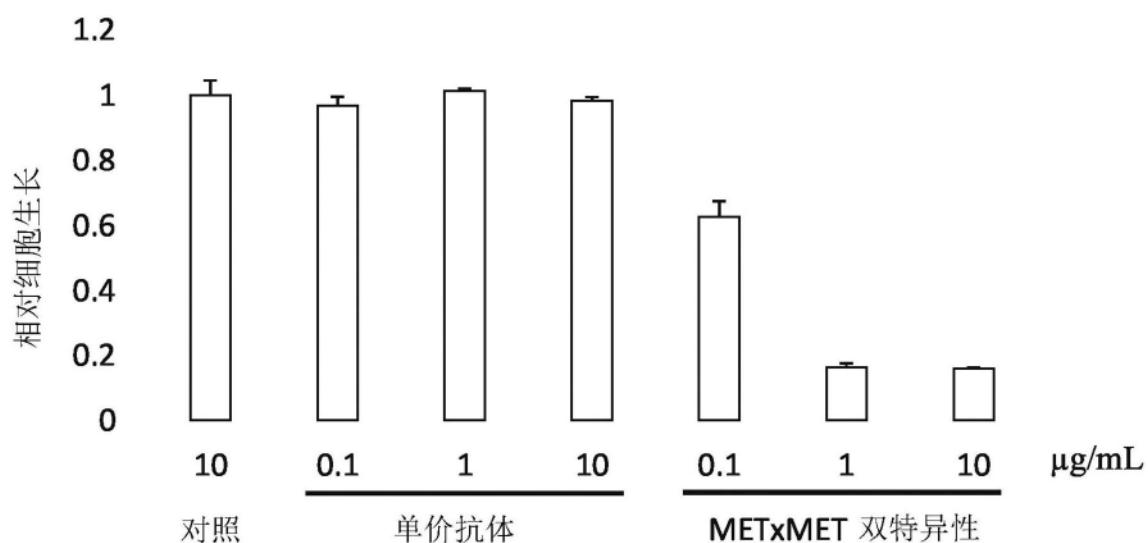


图6A

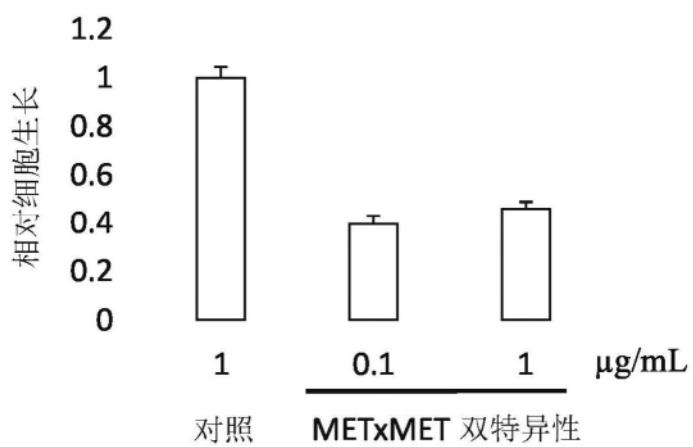


图6B

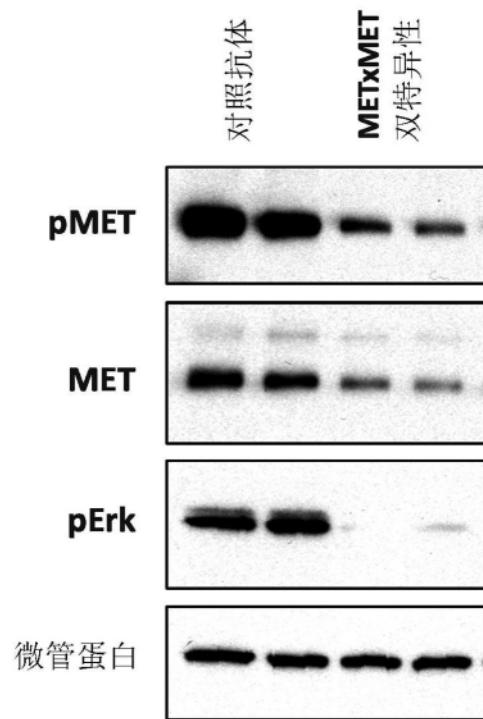


图7A

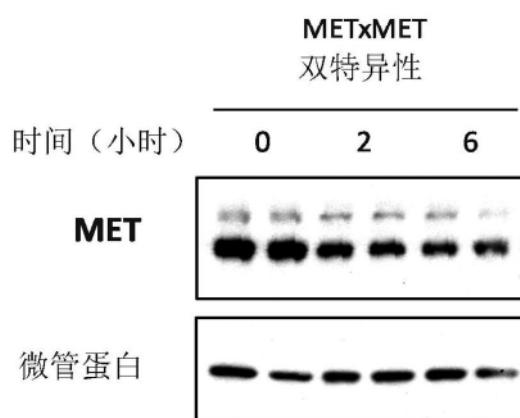


图7B

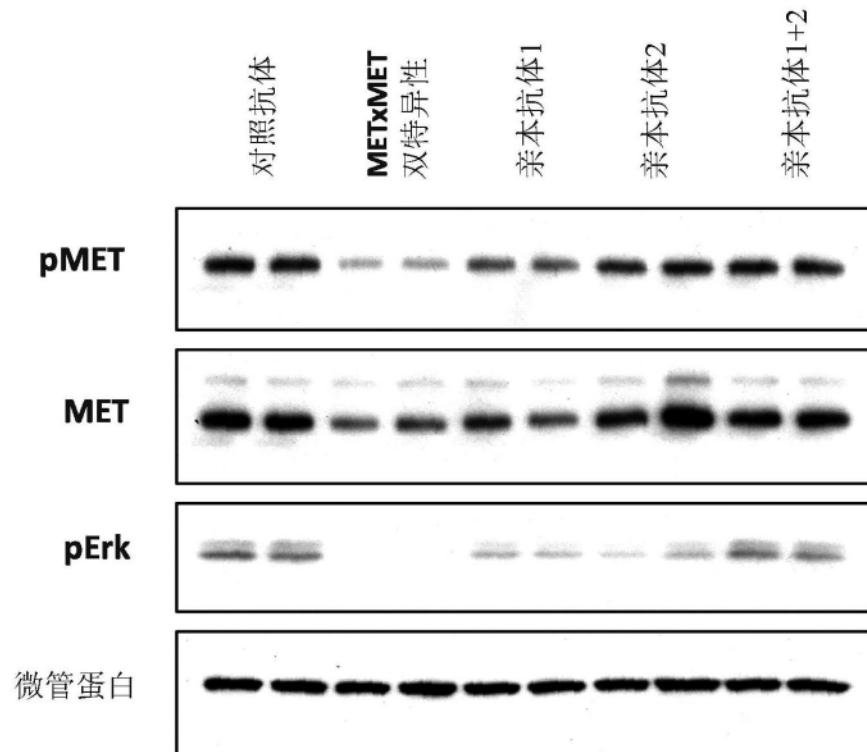


图8

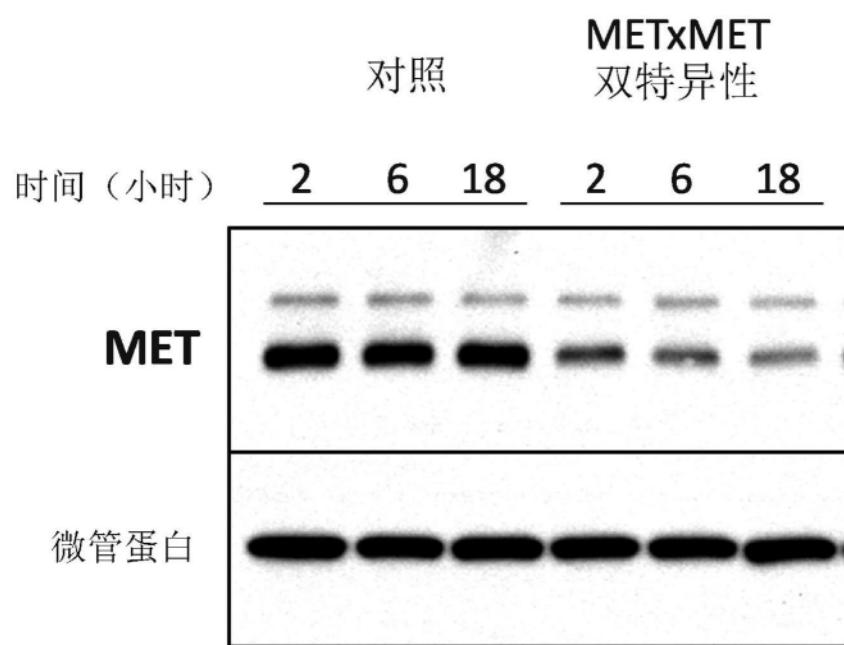


图9

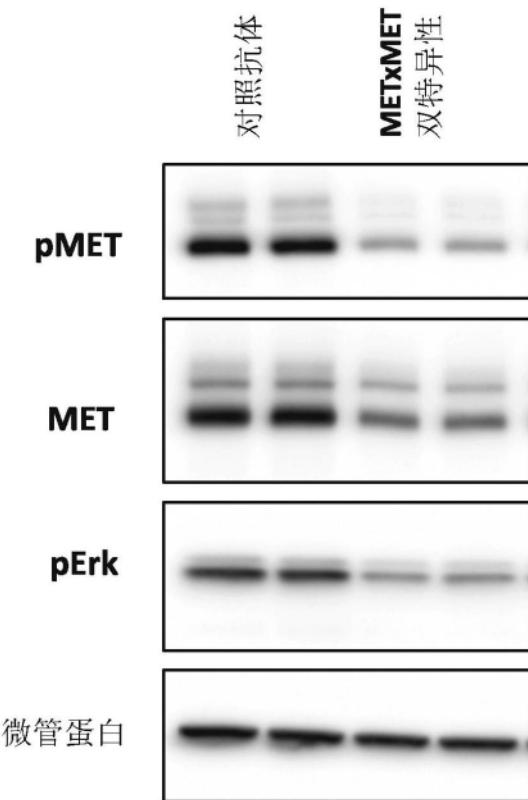


图10A

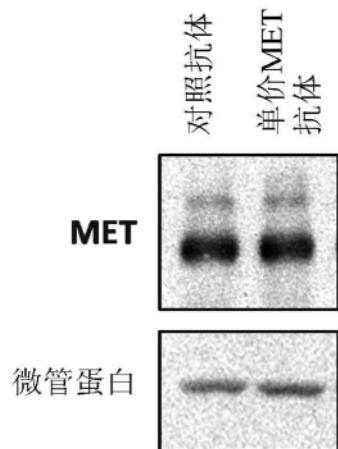


图10B

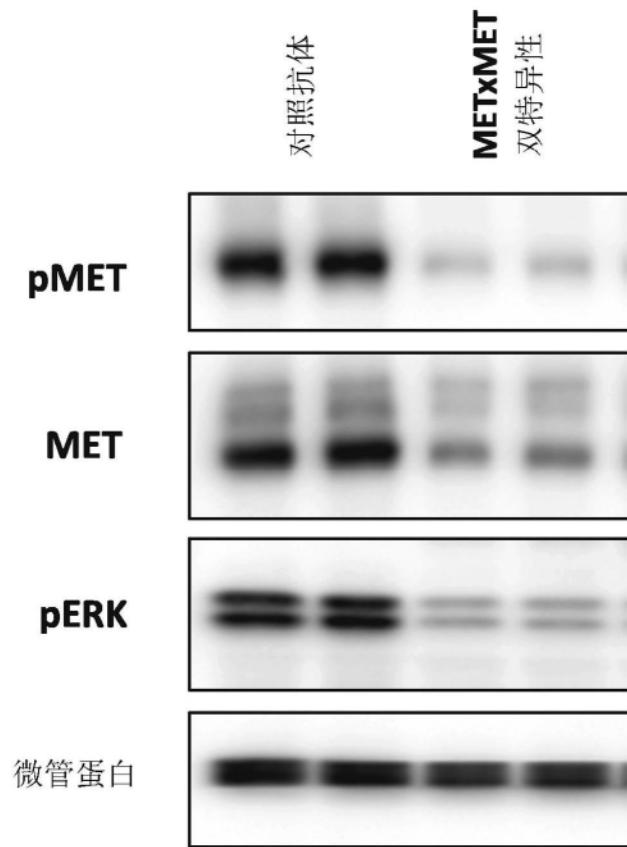


图11

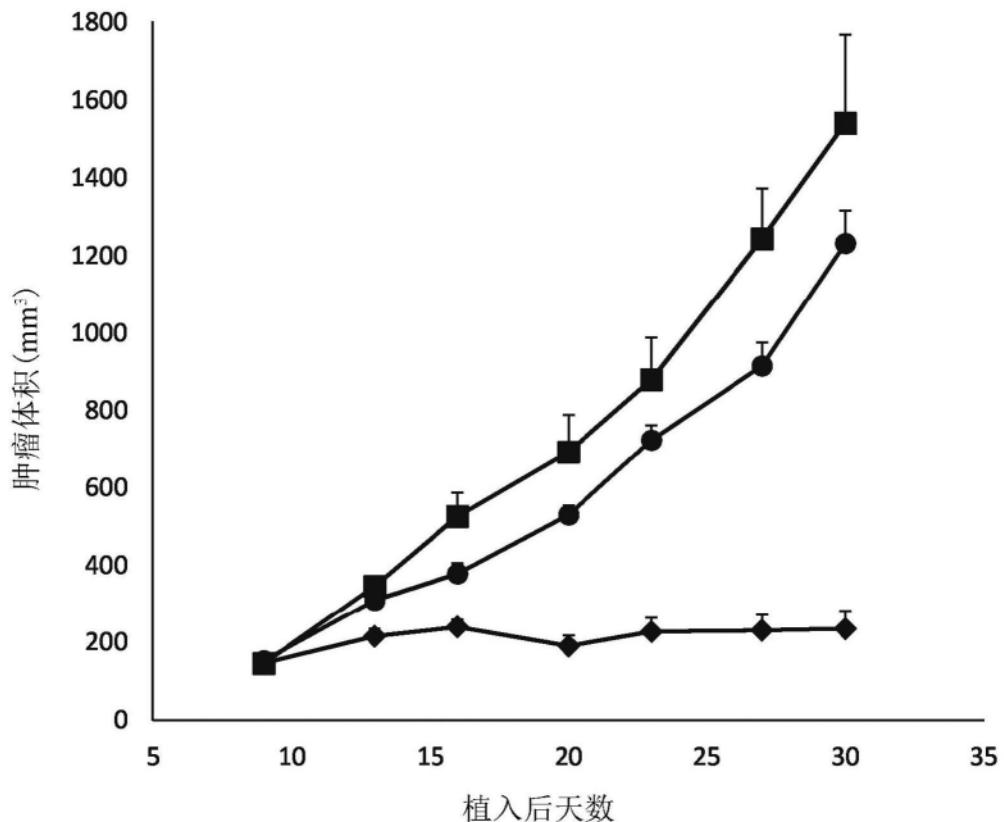


图12

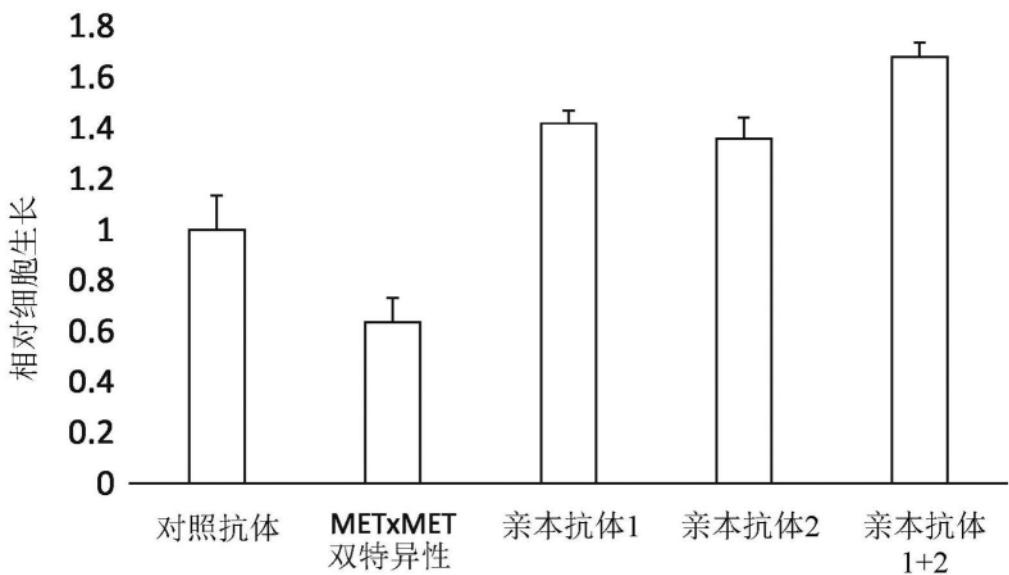


图13A

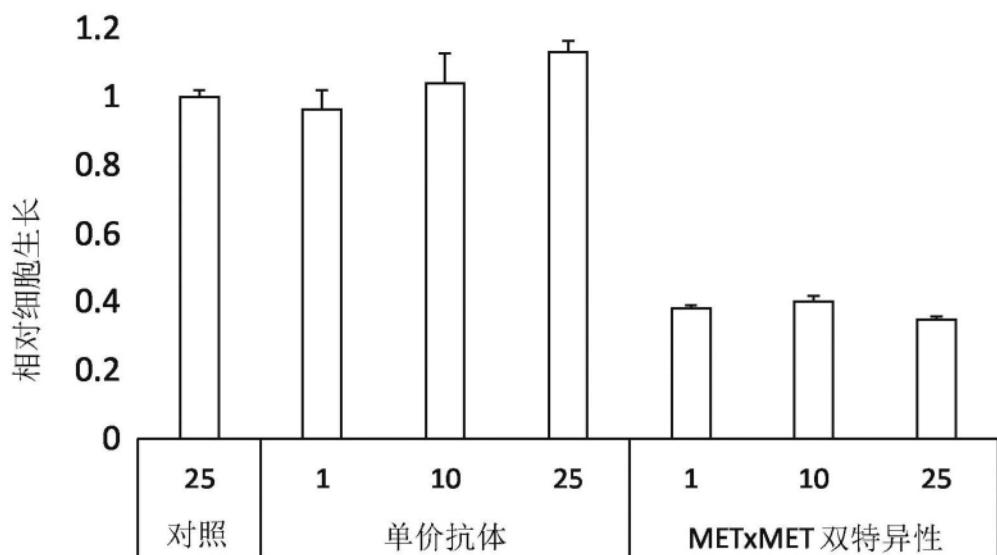


图13B

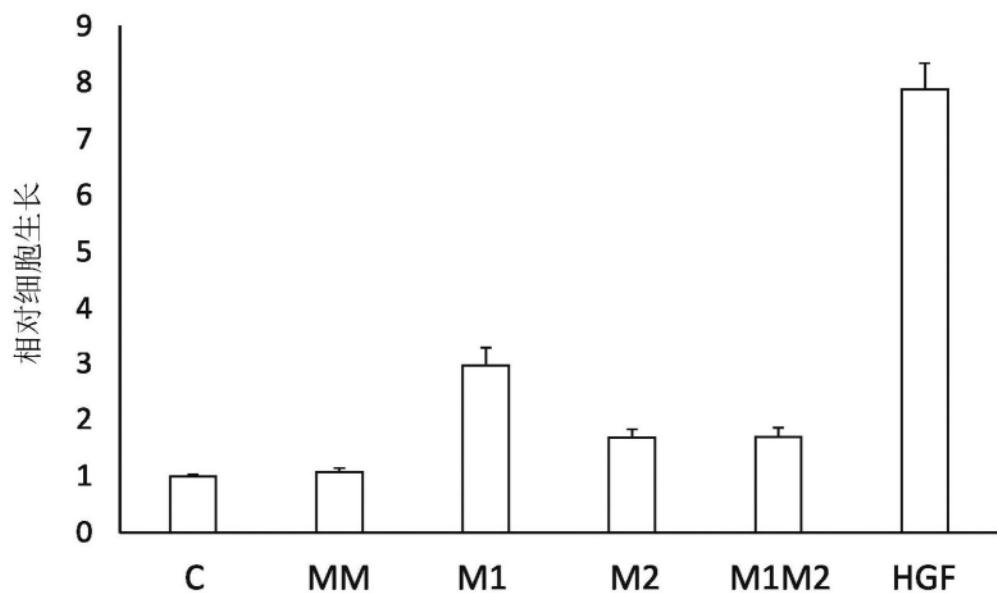


图14

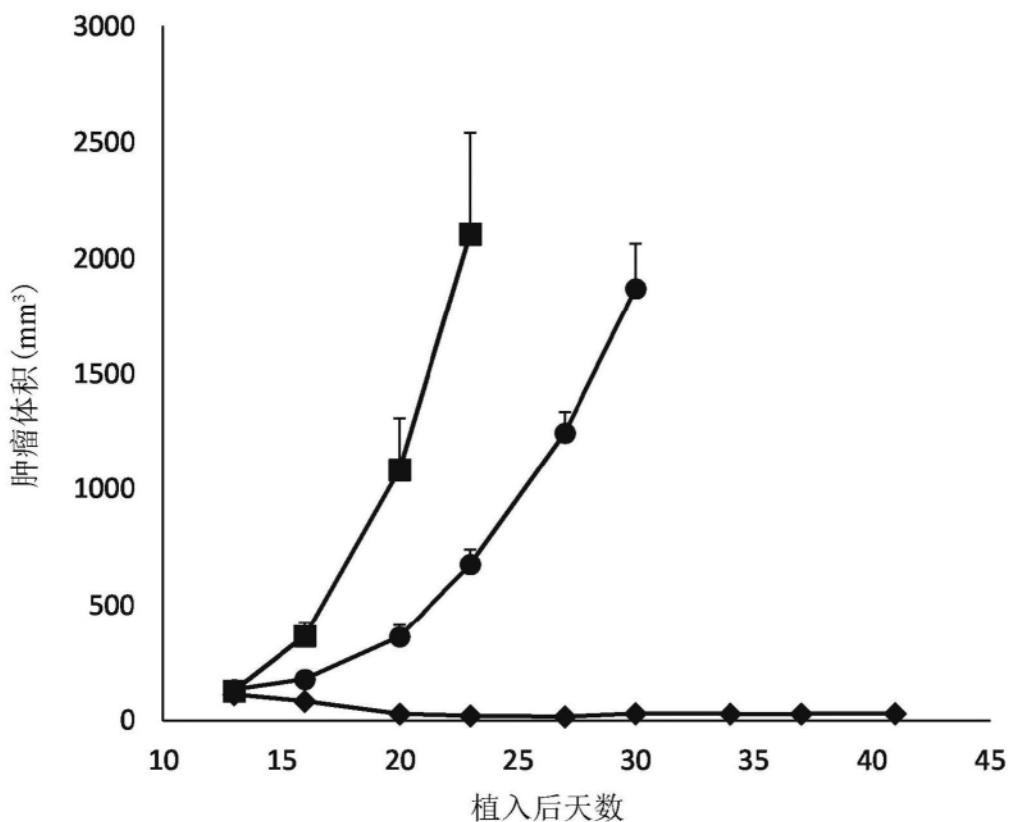


图15

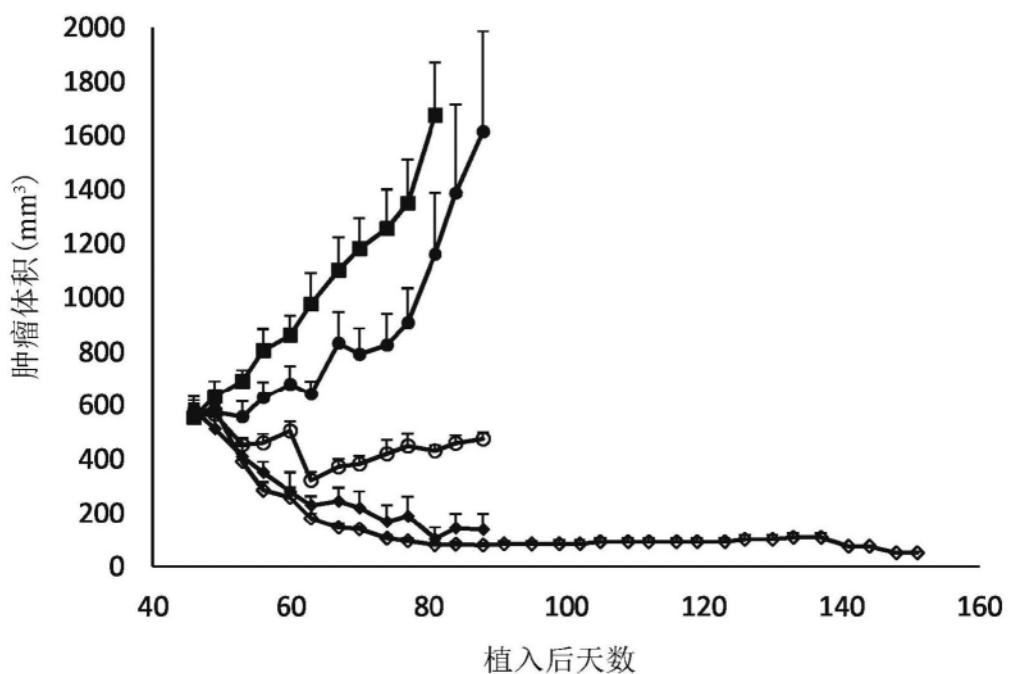


图16A

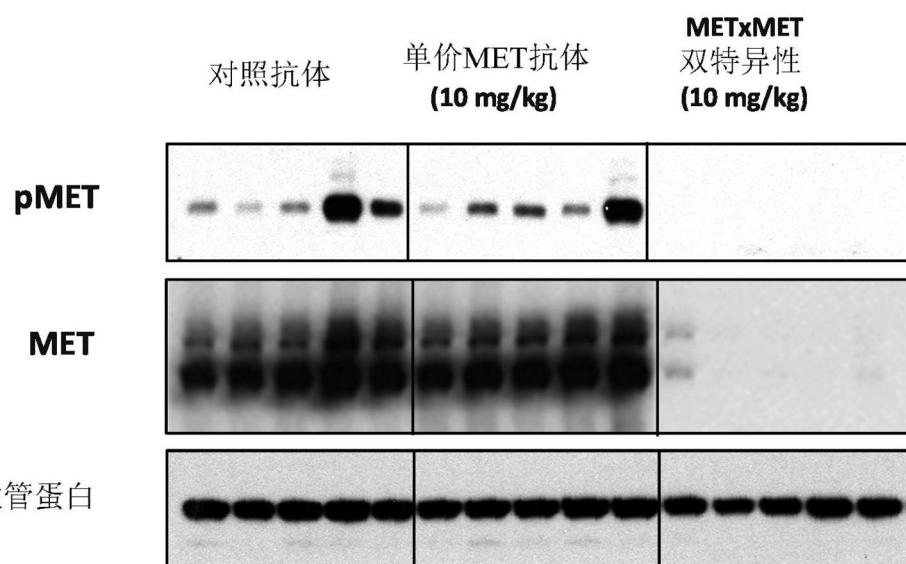


图16B

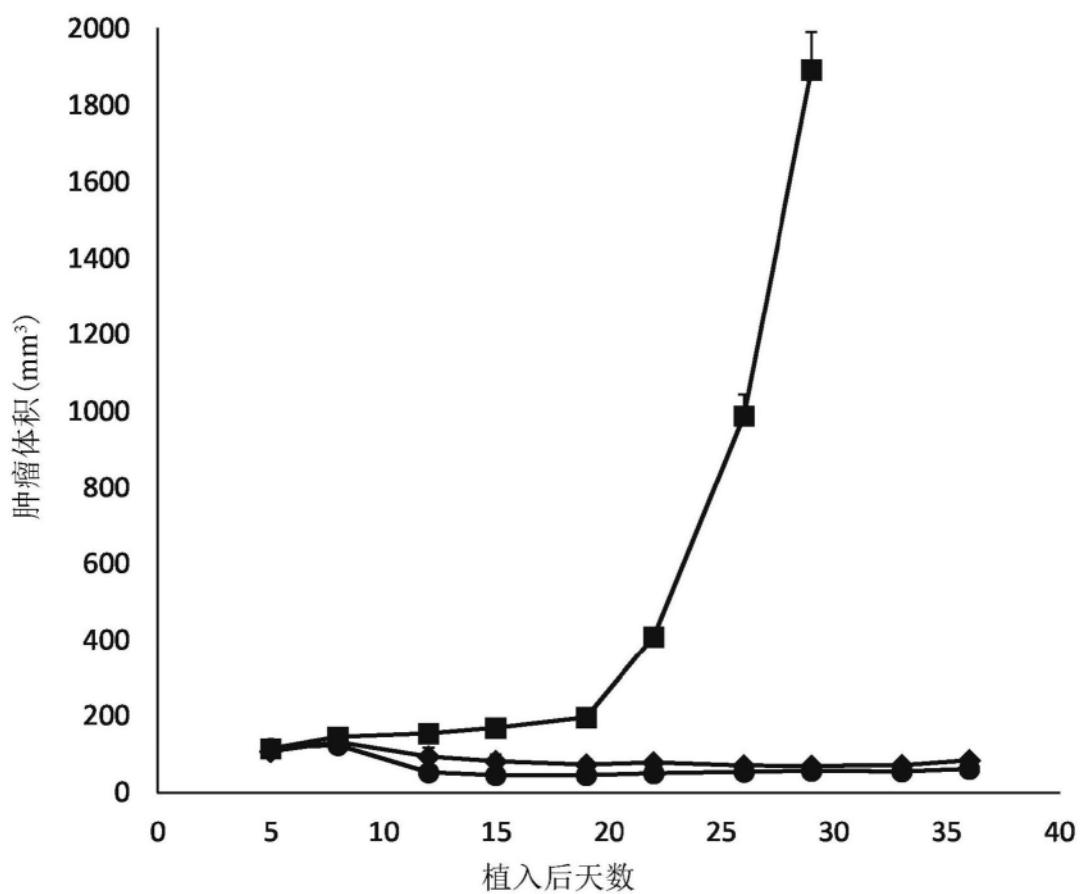


图17

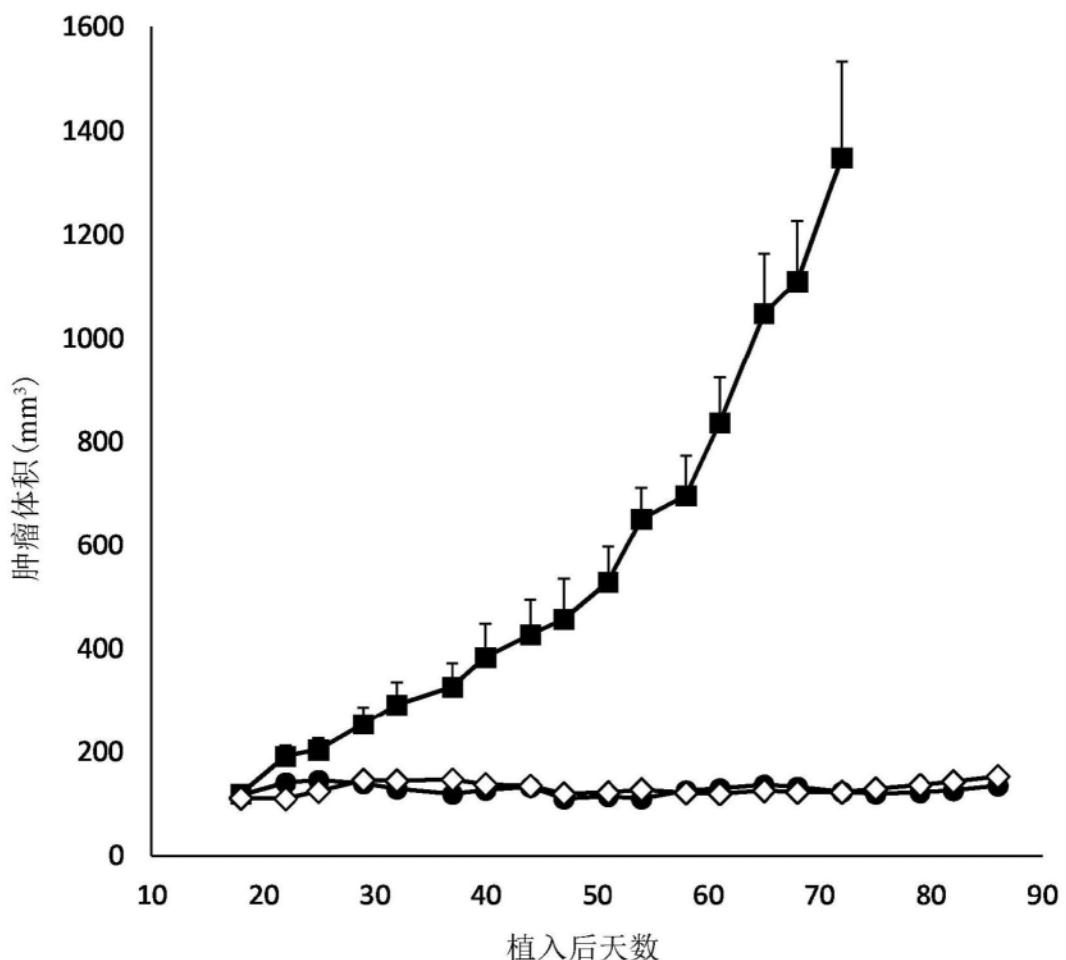


图18

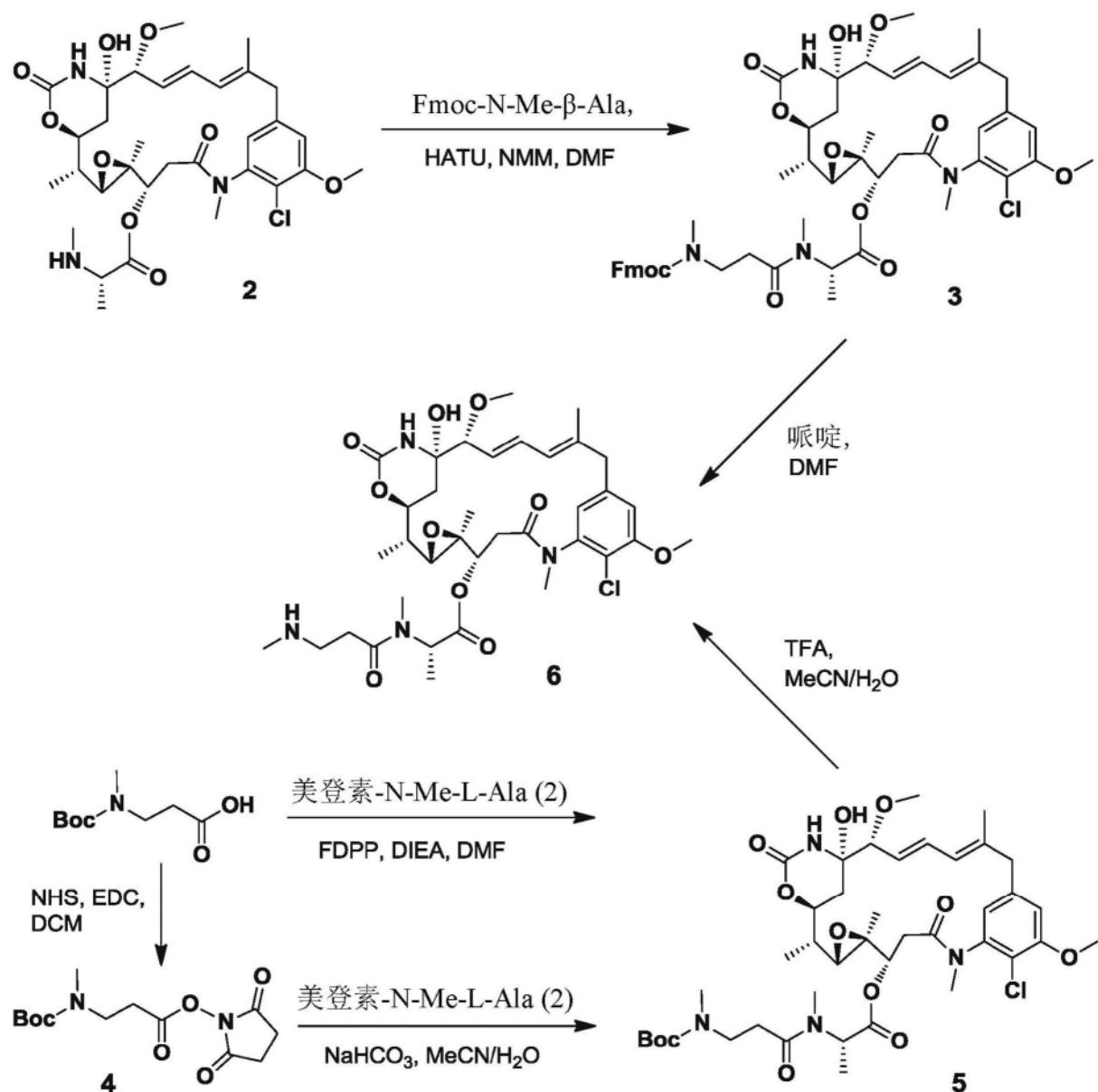


图19

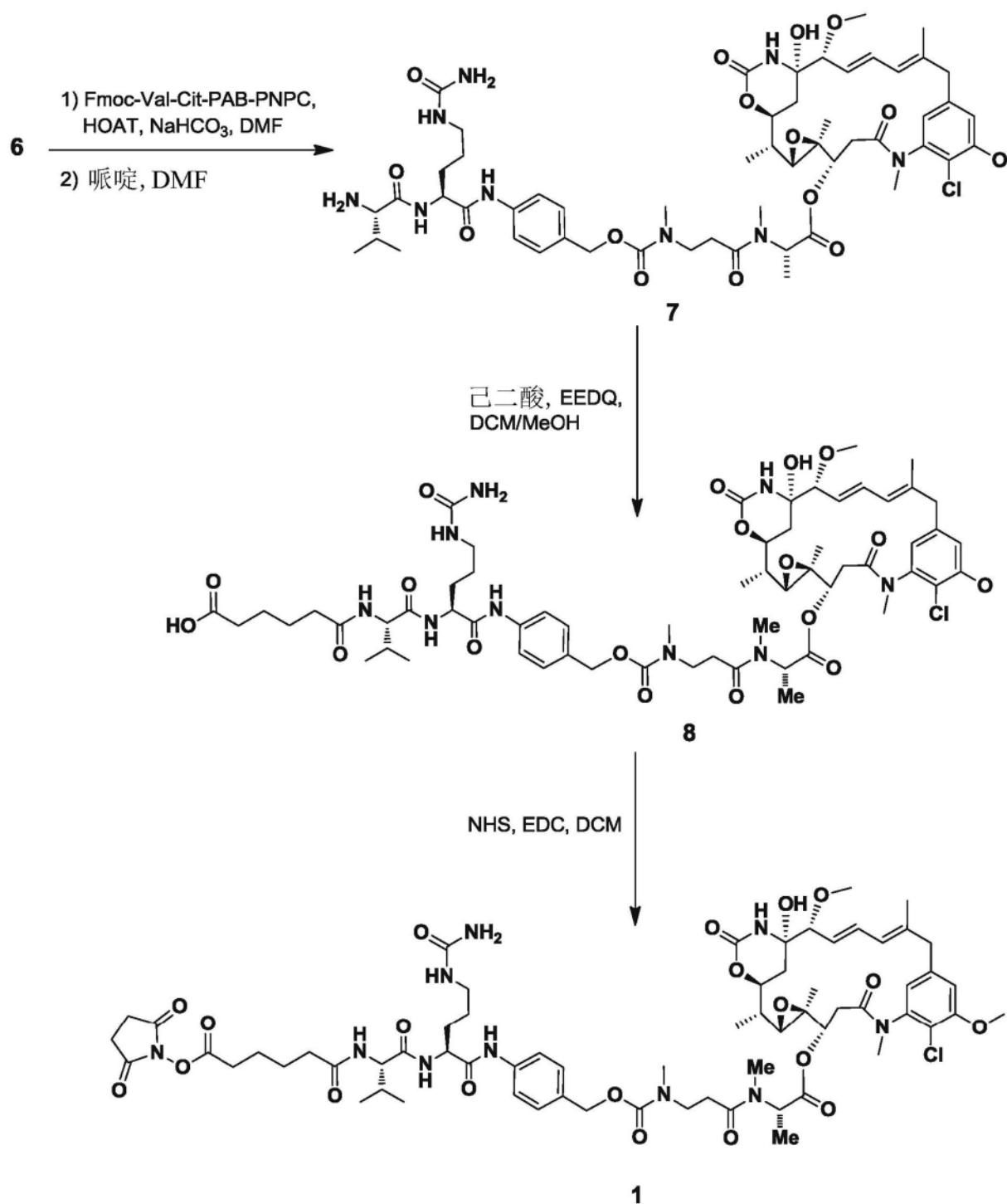


图20