



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118459588 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 09

(21) 申请号 202410570377.4

(22) 申请日 2019.03.12

(30) 优先权数据

1803892.7 2018.03.12 GB

1812487.5 2018.07.31 GB

1816841.9 2018.10.16 GB

(62) 分案原申请数据

201980017468.2 2019.03.12

(71) 申请人 森特萨制药(英国)有限公司

地址 英国柴郡

(72) 发明人 W·J·J·芬雷

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

专利代理人 刘晓杰 武晶晶

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

权利要求书3页 说明书59页

序列表(电子公布) 附图18页

(54) 发明名称

抗C-MET抗体

(57) 摘要

本文涉及一种抗C-MET抗体。具体地,本文提供了与C-MET特异性结合的抗体分子以及相关核酸分子、载体和宿主细胞。本文还提供了此类抗体分子的医学用途。本申请所请求保护的抗C-MET抗体是通过计算机工程选择的。已经生成了一些所述抗体,并且在哺乳动物表达系统中表达后进行了进一步表征。

1. 一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

(a) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYAQSYLH (SEQ ID NO:57)的LCDR1、RGSTRET (SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKESPLT (SEQ ID NO:47)的LCDR3;

(b) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRET (SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKESPLT (SEQ ID NO:47)的LCDR3;

(c) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRET (SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

(d) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

(e) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPSGGLANYAQKFQG (SEQ ID NO:54)的HCDR2和SEITTEFDY (SEQ ID NO:55)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVDSYANSYLH (SEQ ID NO:51)的LCDR1、RGSTRES (LCDR2; SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

(f) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:40)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

(g) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYAMH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、MGWINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:40)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

(h) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPNGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:42)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

(i) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYSMH (SEQ ID NO:43)的HCDR1、MGWINPSNGLANYAQKFQG (SEQ ID NO:44)的HCDR2和QEITTEFDI (SEQ ID NO:45)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVESYAQSYLH (SEQ ID NO:46)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSDPLT (SEQ ID NO:76)的LCDR3;

(j) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYTMH (SEQ ID NO:48)的HCDR1、MGWINPNGGLASYAQKFQG

(SEQ ID NO:49)的HCDR2和SEITTEQDY (SEQ ID NO:50)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVDSYANSYLH (SEQ ID NO:51)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKESPLT (SEQ ID NO:47)的LCDR3;或者

(k) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYTMH (SEQ ID NO:48)的HCDR1、MGWINPNGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:42)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVESYANSYLH (SEQ ID NO:52)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQYGSEPLT (SEQ ID NO:53)的LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合部分,其中

(a) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:1,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:2;

(b) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:3,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:4;

(c) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:5,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:6;

(d) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:7,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:8;或者

(e) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:9,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:10。

3. 一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

(a) HCDR1包括氨基酸序列G-Y-X₁-F-T-X₂-Y-X₃-M-H,其中X₁是I或任何其它氨基酸,X₂是A或任何其它氨基酸,并且X₃是Y或任何其它氨基酸 (SEQ ID NO:22);

(b) HCDR2包括M-G-X₁-I-X₂-P-X₃-X₄-G-X₅-X₆-X₇-Y-A-Q-K-F-Q-G,其中X₁是W或任何其它氨基酸,X₂是K或任何其它氨基酸,X₃是N或任何其它氨基酸,X₄是N或任何其它氨基酸,X₅是L或任何其它氨基酸,X₆是A或任何其它氨基酸,并且X₇是N或任何其它氨基酸 (SEQ ID NO:23);

(c) HCDR3包括X₁-E-I-T-T-X₂-X₃-D-X₄,其中X₁是S或任何其它氨基酸,X₂是E或任何其它氨基酸,X₃是F或任何其它氨基酸,并且X₄是Y或任何其它氨基酸 (SEQ ID NO:24);

(d) LCDR1包括氨基酸序列R-A-S-Q-S-V-X₁-S-Y-A-X₂-S-X₃-L-X₄,其中X₁是D或任何其它氨基酸,X₂是N或任何其它氨基酸,X₃是F或任何其它氨基酸,并且X₄是H或任何其它氨基酸 (SEQ ID NO:28);

(e) LCDR2包括X₁-X₂-S-X₃-R-E-X₄,其中X₁是R或任何其它氨基酸,X₂是A或任何其它氨基酸,X₃是T或任何其它氨基酸,并且X₄是S或任何其它氨基酸 (SEQ ID NO:29);并且

(f) LCDR3包括氨基酸序列Q-Q-X₁-X₂-X₃-X₄-P-L-T,其中X₁是S或任何其它氨基酸,X₂是K或任何其它氨基酸,X₃是E或任何其它氨基酸,并且X₄是D或任何其它氨基酸 (SEQ ID NO:30)。

4. 一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分与根据权利要求1到3中任一项所述的抗体或抗原结合部分交叉竞争与C-MET结合,并且

(a) 包括完全种系人骨架氨基酸序列;和/或

(b) 在HCDR2中不包括脱酰胺化位点;和/或

(c) 在HCDR2中不包括氧化位点;和/或

(d) 在LCDR1中不包括脱酰胺化位点;和/或

(e) 在LCDR1中不包括异构化位点;和/或

(f) 在LCDR1中不包括氧化位点;和/或

- (g) 在LCDR3中不包括酸水解位点;和/或
 - (h) 在LCDR2中不包括人T细胞表位序列;和/或
 - (i) 在LCDR3中不包括人T细胞表位序列;和/或
 - (j) (j) 与抗体h224G11的等电点相比,表现出更高的等电点;
和/或
 - (k) 当呈人IgG4 (S228P) 形式时,如通过等电聚焦测量的,表现出的等电点为8.0或更高。
5. 根据权利要求1到4中任一项所述的抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是人的、人源化的或嵌合的。
6. 根据权利要求1到5中任一项所述的抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分呈人IgG4形式,并且其中所述抗体或抗原结合部分具有
- (a) 约77°C到约81°C的熔融温度(T_m);和/或
 - (b) 大于约pH 7.4的等电点(pI)。
7. 一种免疫缀合物,其包括与治疗剂连接的根据权利要求1到6中任一项所述的抗体或抗原结合部分。
8. 根据权利要求7所述的免疫缀合物,其中所述治疗剂是细胞毒素、放射性同位素、化学治疗剂、免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂、促凋亡剂、细胞生长抑制酶、细胞溶解酶、治疗性核酸、抗血管生成剂、抗增殖剂或促凋亡剂。
9. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1到6中任一项所述的抗体或抗原结合部分或根据权利要求7或8所述的免疫缀合物以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。
10. 一种核酸分子,其对根据权利要求1到6中任一项所述的抗体或抗原结合部分的以下进行编码:
- (a) VH区氨基酸序列;
 - (b) VL区氨基酸序列;或者
 - (c) VH氨基酸序列和VL区氨基酸序列两者。

抗C-MET抗体

[0001] 申请是申请日为2019年3月12日、申请号为201980017468.2、发明名称为“抗C-MET抗体”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2019年3月12日、申请号为PCT/EP2019/056178)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2018年10月16日提交的英国专利申请第1816841.9号、于2018年7月21日提交的英国专利申请第1812487.5号和于2018年3月12日提交的英国专利申请第1803892.7号的权益,这些英国专利申请中的每一个英国专利申请的公开内容特此通过引用整体并入。

[0004] 以电子方式提交的文本文件的说明

[0005] 与本申请一起以电子方式提交的文本文件的内容通过引用整体并入本文:序列表的计算机可读格式副本(文件名:ULSL_001_03W0_SeqList_ST25.txt;记录日期:2019年3月11日;文件大小:124KB)。

技术领域

[0006] 本发明涉及与C-MET(也被称为MET、MET原癌基因、受体酪氨酸激酶、AUTS9、HGFR、RCCP2、DFNB97、OSFD)特异性结合的抗体分子及其医学用途。

背景技术

[0007] C-MET(也被称为MET、MET原癌基因、受体酪氨酸激酶、AUTS9、HGFR、RCCP2、DFNB97、OSFD)是属于免疫球蛋白超家族并且与主要由间充质细胞产生的可溶性因子HGF(肝细胞生长因子)结合的跨膜蛋白。C-MET是表达为一级单链前体蛋白的单个受体酪氨酸激酶,所述一级单链前体蛋白然后经历转译后切割以产生 α 亚基和 β 亚基,所述 α 亚基和 β 亚基通过二硫键连接以形成成熟受体。C-MET主要由上皮细胞表达并且还已经在多种其它细胞类型上观察到,所述其它细胞类型如内皮细胞、神经元、肝细胞、造血细胞、黑素细胞和新生心肌细胞。在与HGF结合后,此受体二聚化,从而激活其酪氨酸激酶活性。这种激酶活化引起在细胞存活、增殖和分化中发挥已知作用的信号转导分子的进一步下游活化。

[0008] C-MET的基因扩增和/或过表达与若干种重要类型的癌症(如非小细胞肺癌(NSCLC)、胃癌、胰腺癌、葡萄膜黑色素瘤和乳头状肾细胞癌)的进展密切相关。临床前证据和临床证据表明,在多种癌症中,阻断C-MET/HGF信号传导可以产生明显的治疗益处,但这主要是使用C-MET激酶功能的小分子抑制剂来实现的。耐药性突变通常在酪氨酸激酶抑制剂治疗后产生,从而使治疗功效丧失。通过阻断受体二聚化的能力来拮抗C-MET信号传导的治疗性抗体有可能通过以下两种机制介导抗肿瘤作用:1.通过将受体锁定为非活化性单体形式来强效抑制MET信号传导途径;2.抗体效应子功能介导的免疫细胞连接。

[0009] 大多数目前经批准的抗体治疗剂均源自经过免疫的啮齿动物。通过将鼠互补决定区(CDR)“移植”到人 ν 基因骨架序列中,那些抗体中的许多抗体已经经历了被称为“人源化”的过程(参见Nelson等人,2010,《自然综述:药物发现(Nat Rev Drug Discov)》9:767-

774)。此过程通常不准确,并且导致所得抗体的靶结合亲和力降低。为了恢复原始抗体的结合亲和力,通常在所移植v结构域的可变结构域骨架的关键位置处引入鼠残基(也被称为“回复突变”)。

[0010] 尽管已经显示,与具有完全鼠v结构域的抗体相比,通过CDR移植和回复突变进行人源化的抗体在临床上诱导的免疫应答率较低,但使用这种基本移植方法进行人源化的抗体仍具有显著的临床开发风险,因为在所移植CDR环中仍然具有潜在的物理不稳定性和免疫原性基序。如抗C-MET等抗体(其可能以其作用机制的一部分的形式参与免疫效应子功能)具有特别高的免疫原性风险,这是因为所述抗体可以促进C-MET+靶细胞的吞噬作用,从而导致抗体连同靶细胞的抗原加工。由于对蛋白质免疫原性的动物测试通常无法预测人的免疫应答,因此针对治疗用途的抗体工程集中于使经过纯化的蛋白质中的预测的人T细胞表位含量、非人种系氨基酸含量和聚集潜力最小化。

[0011] 因此,理想的人源化拮抗性抗C-MET抗体在v结构域中具有尽可能多的残基,所述残基与充分表征的人种系序列的骨架和CDR两者中存在的残基相同。与最大数量的潜在患者中高度表达的高稳定性种系的高水平同一性使治疗性抗体在临床上具有不想要的免疫原性的风险或在制造方面的非常高的“商品成本”最小化。

[0012] Townsend等人(2015;《美国国家科学院院刊(PNAS)》112:15354-15359)描述了一种用于产生抗体的方法,其中将源自大鼠、兔和小鼠抗体的CDR移植到优选的人骨架中,然后对所述CDR进行被称为“增强型二元取代(Augmented Binary Substitution)”的人种系化方法。尽管所述方法证明了原始抗体互补位中的基本可塑性,但在缺乏高度准确的抗体-抗原共晶体结构数据的情况下,仍然无法可靠地预测任何给定抗体的CDR环中的哪些单独的残基可以转换成人种系,以及以什么组合进行转换。此外,Townsend等人的研究未解决人种系中在去除开发风险基序可能有益的位置处存在的残基之外加入诱变。这是使所述过程本质上效率低下的技术限制,从而需要对起始抗体序列进行修饰的额外阶段。另外,目前无法准确预测单独的v结构域的蛋白质序列的远端位置中或者甚至配偶体v结构域上的什么修饰可以有助于在维持抗原结合亲和力和特异性的同时去除风险基序。

[0013] 因此,CDR种系化和开发质量优化是一个复杂的多因素问题,因为应优选地维持分子的多种功能性质,在这种情况下包含:靶结合特异性、对来自人和动物测试物种(例如,食蟹猴(*cynomolgus monkey*)),也被称为食蟹猕猴(*crab-eating macaque*),即,食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*))两者的C-MET的亲和力、v结构域生物物理稳定性和/或研究、临床和商业供应中使用的蛋白质表达平台的IgG产量。抗体工程化研究已经表明,关键CDR中甚至单一残基位置的突变都可能对所有这些期望的分子性质具有显著影响。

[0014] WO 2011151412A1描述了一种被称为“224G11”的拮抗性鼠抗C-MET IgG分子,并且还描述了人源化形式(h224G11)的制备。224G11的那些人源化形式是使用经典人源化技术产生的,即,通过将Kabat定义的鼠CDR移植到人重链和轻链骨架序列中,其中人骨架残基中的一些人骨架残基可能被回复突变为对应定位的224G11鼠残基。由于上述原因,WO 2011151412A1中描述的224G11的这种人源化形式并不理想。

发明内容

[0015] 本发明提供了多种抗C-MET抗体及其医学用途。

[0016] 根据本发明的一个方面,提供了一种抗体分子或其抗原结合部分,所述抗体分子与人C-MET并且任选地还与食蟹猴C-MET特异性结合,其中所述抗体分子或抗原结合部分包括具有以下的重链可变区:

[0017] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的HCDR1:G-Y-I或任何氨基酸(如T)-F-T-A或任何氨基酸(如S)-Y-Y或任何氨基酸(如A、S或T)-M-H(SEQ ID NO:22);

[0018] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的HCDR2:M-G-W或任何氨基酸(如I)-I-K或任何氨基酸(如N)-P-N或任何氨基酸(如S)-N或任何氨基酸(如G)-G-L或任何氨基酸(如S)-A或任何氨基酸(如T)-N或任何氨基酸(如S)-Y-A-Q-K-F-Q-G(SEQ ID NO:23);以及

[0019] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的HCDR3:S或任何氨基酸(如A/E/H/M/Q/T/V)-E-I-T-T-E或任何氨基酸(如D)-F或任何氨基酸(如L)-D-Y或任何氨基酸(如A/E/F/I/K/L/M/Q/S/V/W)(SEQ ID NO:24)。

[0020] 在本发明的各方面中,所述抗体分子或抗原结合部分的所述HCDR1可以不包含序列GYIFTAYTMH(SEQ ID NO:25;WO2011151412A1、US2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体HCDR1),所述抗体分子或抗原结合部分的所述HCDR2可以不包含序列MGWIKPNNGLANYAQKFQG(SEQ ID NO:26;WO 2011151412A1、US2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体HCDR1),和/或所述抗体分子或抗原结合部分的所述HCDR3可以不包含序列SEITTEFDY(SEQ ID NO:27;WO 2011151412A1、US 2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体HCDR3)。

[0021] 所述抗体分子或抗原结合部分可以进一步包括具有以下的轻链可变区:

[0022] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的LCDR1:R-A-S-Q-S-V-D或任何氨基酸(例如,S或E)-S-Y-A-N或任何氨基酸(例如,Q)-S-F或任何氨基酸(例如,Y)-L-H或任何氨基酸(例如,A)(SEQ ID NO:28);

[0023] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的LCDR2:R或任何氨基酸(例如,A)-A或任何氨基酸(例如,G)-S-T或任何氨基酸(例如,S)-R-E-S或任何氨基酸(例如,T)(SEQ ID NO:29);以及

[0024] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的LCDR3:Q-Q-S或任何氨基酸(例如,Y)-K或任何氨基酸(例如,G)-E或任何氨基酸(例如,D、S)-D或任何氨基酸(例如,S、E、R)-P-L-T(SEQ ID NO:30)。

[0025] 在本发明的各方面中,所述抗体分子或抗原结合部分的所述LCDR1可以不包含序列KSSESVDSYANSFLH(SEQ ID NO:31;WO 2011151412A1、US2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体LCDR1),和/或所述抗体分子或抗原结合部分的所述LCDR2可以不包含序列RASTRES(SEQ ID NO:32;WO 2011151412A1、US 2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体LCDR2),和/或所述抗体分子或抗原结合部分的所述LCDR3可以不包含序列QQSKEDPLT(SEQ ID NO:33;WO 2011151412A1、US 2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体LCDR3)。

[0026] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

[0027] (a) HCDR1包括氨基酸序列G-Y-X₁-F-T-X₂-Y-X₃-M-H,其中X₁是I或任何其它氨基酸,X₂是A或任何其它氨基酸,并且X₃是Y或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:22);

[0028] (b)HCDR2包括M-G-X₁-I-X₂-P-X₃-X₄-G-X₅-X₆-X₇-Y-A-Q-K-F-Q-G,其中X₁是W或任何其它氨基酸,X₂是K或任何其它氨基酸,X₃是N或任何其它氨基酸,X₄是N或任何其它氨基酸,X₅是L或任何其它氨基酸,X₆是A或任何其它氨基酸,并且X₇是N或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:23);

[0029] (c)HCDR3包括X₁-E-I-T-T-X₂-X₃-D-X₄,其中X₁是S或任何其它氨基酸,X₂是E或任何其它氨基酸,X₃是F或任何其它氨基酸,并且X₄是Y或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:24);

[0030] (d)LCDR1包括氨基酸序列R-A-S-Q-S-V-X₁-S-Y-A-X₂-S-X₃-L-X₄,其中X₁是D或任何其它氨基酸,X₂是N或任何其它氨基酸,X₃是F或任何其它氨基酸,并且X₄是H或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:28);

[0031] (e)LCDR2包括X₁-X₂-S-X₃-R-E-X₄,其中X₁是R或任何其它氨基酸,X₂是A或任何其它氨基酸,X₃是T或任何其它氨基酸,并且X₄是S或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:29);并且

[0032] (f)LCDR3包括氨基酸序列Q-Q-X₁-X₂-X₃-X₄-P-L-T,其中X₁是S或任何其它氨基酸,X₂是K或任何其它氨基酸,X₃是E或任何其它氨基酸,并且X₄是D或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:30)。

[0033] 在一些方面中,本发明提供了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

[0034] (a) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYQSYLH(SEQ ID NO:57)的LCDR1、RGSTRET(SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKESPLT(SEQ ID NO:47)的LCDR3;

[0035] (b) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH(SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRET(SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKESPLT(SEQ ID NO:47)的LCDR3;

[0036] (c) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH(SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRET(SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKSEPLT(SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0037] (d) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH(SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES(SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT(SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0038] (e) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPSGGLANYAQKFQG(SEQ ID NO:54)的HCDR2和SEITTEFDY(SEQ ID NO:55)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVDSYANSYLH(SEQ ID NO:51)的LCDR1、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT(SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0039] (f) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:40)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH(SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES(SEQ ID NO:38)

的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0040] (g) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYAMH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、MGWINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:40)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0041] (h) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPNGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:42)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0042] (i) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYSMH (SEQ ID NO:43)的HCDR1、MGWINPSNGLANYAQKFQG (SEQ ID NO:44)的HCDR2和QEITTEFDI (SEQ ID NO:45)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVESYAQSYLH (SEQ ID NO:46)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSDPLT (SEQ ID NO:76)的LCDR3;

[0043] (j) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYTMH (SEQ ID NO:48)的HCDR1、MGWINPNGGLASYAQKFQG (SEQ ID NO:49)的HCDR2和SEITTEQDY (SEQ ID NO:50)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVDSYANSYLH (SEQ ID NO:51)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKESPLT (SEQ ID NO:47)的LCDR3;或者

[0044] (k) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYTMH (SEQ ID NO:48)的HCDR1、MGWINPNGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:42)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVESYANSYLH (SEQ ID NO:52)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQYGSEPLT (SEQ ID NO:53)的LCDR3。

[0045] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

[0046] VH区氨基酸序列包括:

[0047] (a) SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:48的HCDR1;

[0048] (b) SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:54的HCDR2;以及

[0049] (c) SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:55的HCDR3;并且

[0050] VL区氨基酸序列包括:

[0051] (a') SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:57的LCDR1;

[0052] (b') SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:56的LCDR2;以及

[0053] (c') SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:76的LCDR3。

[0054] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

[0055] (a) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:1,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:2;

[0056] (b) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:3,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:4;

[0057] (c) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:5,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:6;

[0058] (d) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:7,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:8;或

者

[0059] (e) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:9,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:10。

[0060] 根据本发明还提供了一种免疫缀合物,所述免疫缀合物包括与治疗剂连接、融合或缀合的如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分。

[0061] 在另一方面中,本发明提供了一种核酸分子,所述核酸分子对如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分进行编码。

[0062] 进一步提供了一种载体,所述载体包括本发明的核酸分子。

[0063] 还提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞包括如本文所定义的本发明的核酸分子或载体。

[0064] 在另外一方面中,提供了一种产生抗C-MET抗体和/或其抗原结合部分的方法,所述方法包括:将本发明的宿主细胞在引起所述抗体和/或其抗原结合部分的表达和/或产生的条件下培养;以及从所述宿主细胞或培养物中分离所述抗体和/或抗原结合部分。

[0065] 在本发明的另一方面中,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的本发明的核酸分子或如本文所定义的本发明的载体。

[0066] 进一步提供了一种用于增强受试者的免疫应答的方法,所述方法包括施用有效量的如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的本发明的免疫缀合物或如本文所定义的本发明的核酸分子或如本文所定义的本发明的载体或如本文所定义的本发明的药物组合物。

[0067] 在另外一方面中,提供了一种用于治疗或预防受试者的癌症的方法,所述方法包括施用有效量的如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的本发明的免疫缀合物或如本文所定义的本发明的核酸分子或如本文所定义的本发明的载体或如本文所定义的本发明的药物组合物。

[0068] 本文进一步提供了如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物,其用作药剂。本发明还提供了如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的本发明的免疫缀合物或如本文所定义的本发明的核酸分子或如本文所定义的本发明的载体或如本文所定义的本发明的药物组合物,其用于治疗癌症。

[0069] 在另一方面中,本发明提供了如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或免疫缀合物或核酸分子或载体或治疗方法,其用于单独使用、结合第二治疗剂(例如,抗癌剂)依次或同时使用。

[0070] 在另外一方面中,提供了如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的本发明的免疫缀合物或如本文所定义的本发明的核酸分子或如本文所定义的本发明的载体或如本文所定义的本发明的药物组合物在制造用于治疗癌症的药剂中的用途。

[0071] 本发明还提供了一种用于治疗或预防受试者的自身免疫性疾病或炎性疾病的方法,所述方法包括施用有效量的如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如此处所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物。

[0072] 例如,所述自身免疫性疾病或炎性疾病可以是关节炎、哮喘、多发性硬化症、牛皮癣、克罗恩氏病(Crohn's disease)、炎性肠病、狼疮、格雷夫氏病(Grave's disease)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)或强直性脊柱炎。

[0073] 还提供了如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物,其用于治疗自身免疫性疾病或炎性疾病。

[0074] 进一步提供了如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物在制造用于治疗自身免疫性疾病或炎性疾病的药剂中的用途。

[0075] 本发明还提供了一种用于治疗或预防受试者的心血管疾病或纤维化疾病的方法,所述方法包括施用有效量的如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物。

[0076] 还提供了如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物,其用于治疗心血管疾病或纤维化疾病。

[0077] 进一步提供了如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物在制造用于治疗自身免疫性疾病、炎性疾病或纤维化疾病的药剂中的用途。

[0078] 在本发明的任何方面中,心血管疾病可以例如是冠心病或动脉粥样硬化。

[0079] 在本发明的任何方面中,纤维化疾病可以选自由以下组成的组:心肌梗塞、心绞痛、骨关节炎、肺纤维化、囊性纤维化、支气管炎和哮喘。

[0080] 本发明还提供了一种用于产生与人C-MET并且任选地还与食蟹猴C-MET特异性结合的抗体分子或其抗原结合部分的方法,所述方法包括以下步骤:

[0081] (1)将来自非人来源的抗C-MET CDR移植到人v结构域骨架中,以产生人源化抗C-MET抗体分子或其抗原结合部分;

[0082] (2)产生所述人源化抗C-MET抗体分子或其抗原结合部分的包括所述CDR中的一种或多种突变的克隆的噬菌体文库;

[0083] (3)针对与人C-MET并且任选地还与食蟹猴C-MET的结合筛选所述噬菌体文库;

[0084] (4)选择来自筛选步骤(3)的对人C-MET并且任选地还对食蟹猴C-MET具有结合特异性的克隆;以及

[0085] (5)由选自步骤(4)的克隆产生与人C-MET并且任选地还与食蟹猴C-MET特异性结合的抗体分子或其抗原结合部分。

[0086] 所述方法可以包括另外一个步骤:基于在步骤(4)中选择的克隆(例如,基于在步骤(4)中选择的克隆的CDR中的特定位置处的另外的探索性诱变)产生另外的克隆,以增强人源化和/或最小化人T细胞表位含量和/或改善步骤(5)中产生的抗体分子或其抗原结合部分中的制造性质。

附图说明

[0087] 图1A-图1B: 针对人和食蟹猴C-MET-Fc蛋白的文库源性抗C-MET Fab的直接结合ELISA和Alphascreen竞争筛选。克隆源自多个噬菌体选择分支, 其中在轮II-IV中的每一轮中, 在经过生物素化的人或食蟹猴C-MET蛋白上选择噬菌体群体。在每一轮选择之后, 在ELISA(图1A) 中将文库源性克隆筛选为针对人(huCMET) 和食蟹猴(cyCMET) 两者的周质表达性Fab蛋白, 并通过Alphascreen(图1B) 在阻断224G11 IgG结合于huCMET的结合方面进行筛选。每轮的平均值 $\pm$ SD值用灰色条表示。

[0088] 图2A-图2B: CDR残基对种系突变的耐受性的分析。分别针对V_L(SEQ ID NO:58-60)(图2A) 和V_H(SEQ ID NO:61-63)(图2B) 结构域示出了由表现出人和食蟹猴CMET交叉反应性的131个独特的Fab克隆构成的ELISA阳性群体的CDR中的鼠氨基酸保留频率的绘图。除了HCDR3中, 在其它CDR中仅绘制了用于人/鼠残基诱变的那些残基。X轴上的括号中注释的CDR残基与用于移植的人种系(IGKV3-20和IGHV1-46) 中存在的残基相同。CDR中的未处于括号中但值被设置为0的那些残基在移植过程期间突变为人种系。在两个绘图中, 在75%处的灰色虚线表示对人种系替代鼠残基的耐受性的截止值。

[0089] 图3中的A-B: 与人和食蟹猴C-MET-Fc蛋白结合的IgG的直接滴定ELISA。在直接结合ELISA中针对人(图3A) 和食蟹猴(图3B) C-MET-Fc蛋白(以nM) 滴定呈人IgG4(S228P) 形式的人源化h224G11、经移植克隆(移植物) 和文库源性和设计克隆。除了同种型IgG4对照物之外, 所有克隆均表现出针对C-MET的两种直系同源物的结合活性, 人和食蟹猴C-MET结合活性大致相同或有所提高。

[0090] 图4: Alphascreen中对IgG4(S228P) 蛋白的表位竞争分析。使用Alphascreen技术将抗C-MET IgG4(S228P) 克隆应用于表位竞争测定中。在此测定中, 通过文库源性和设计IgG在溶液中与224G11IgG4(S228P) 竞争与人C-MET蛋白结合来分析其对亲本224G11表位的保留率。所分析的所有克隆均显示出对与C-MET结合的224G11的强浓度依赖性中和作用。

[0091] 图5中的A-B: 文库源性和一级设计前导与人和食蟹猴C-MET+CHO-K1细胞的流式细胞术结合。检查呈IgG4(S228P) 形式的抗C-MET对照物h224G11和移植物、文库源性和设计前导在人C-MET转染的CHO-K1细胞(图5A) 和食蟹猴C-MET转染的CHO-K1细胞(图5B) 上的特异性结合。在500-0.08nM的浓度范围下测试IgG。在所有C-MET特异性抗体而非同种型对照IgG4中, 观察到针对人细胞系和食蟹猴细胞系两者的浓度依赖性结合。

[0092] 图6中的A-B: 与人和食蟹猴C-MET-Fc蛋白结合的IgG的直接滴定ELISA。在直接结合ELISA中针对人(图6A) 和食蟹猴(图6B) C-MET-Fc蛋白(以nM) 滴定呈人IgG4(S228P) 形式的人源化h224G11、经移植克隆(移植物) 和克隆08G07、MH7、MH7-1、MH7-2、MH7-3。除了同种型IgG4对照物之外, 所有克隆均表现出针对C-MET的两种直系同源物的结合活性, 人和食蟹猴C-MET结合活性大致相同或有所提高。

[0093] 图7: Alphascreen中对IgG4(S228P) 蛋白的表位竞争分析。使用Alphascreen技术在表位竞争测定中(以nM) 滴定呈人IgG4(S228P) 形式的抗人源化h224G11、经移植克隆(移植物) 和克隆08G07、MH7、MH7-1、MH7-2、MH7-3。在此测定中, 通过文库源性和设计IgG在溶液中与224G11 IgG4(S228P) 竞争与人C-MET蛋白结合来分析其对亲本224G11表位的保留率。所分析的所有克隆均显示出对与C-MET结合的224G11的强浓度依赖性中和作用。

[0094] 图8A-图8C: 文库源性和一级设计前导与人和食蟹猴C-MET+CHO-K1细胞的流式细

胞术结合。检查呈IgG4 (S228P)形式的人源化h224G11、经移植克隆(移植物)和克隆08G07、MH7、MH7-1、MH7-2、MH7-3在人C-MET转染的(图8A)、食蟹猴C-MET转染的(图8B)和未经转染的(图8C)CHO-K1细胞上的特异性结合。在500-0.08nM的浓度范围下测试IgG。在所有C-MET特异性抗体而非同种型对照IgG4中,观察到针对人细胞系和食蟹猴细胞系两者的浓度依赖性结合。

[0095] 图9:开发风险ELISA。检查呈人IgG4 (S228P)形式的人源化h224G11和克隆08G07、MH7、MH7-1、MH7-2、MH7-3与带负电的生物分子胰岛素和双链DNA(dsDNA)的非特异性结合。所有前导克隆均显示出1.0的结合评分,这显著低于阴性对照IgG1优特克单抗(Ustekinumab)类似物和贝伐单抗(bevacizumab)类似物的结合评分。已经显示,如在博科西单抗(Bococizumab)类似物和布雷奴单抗(Briakinumab)类似物中所观察到的与胰岛素或dsDNA的强脱靶结合是治疗性抗体的不良药代动力学的高风险指示。

[0096] 图10A-图10C:IgG的电荷变体曲线。示出了呈IgG4 (S228P)形式的以下抗体的蛋白质电荷变体测定数据:图10A:(1)h224G11和(2)08G07;图10B:(3)MH7和(4)MH7-1;图10C:(5)MH7-2和(6)MH7-3。在所有图中,信号以荧光单位测量。

[0097] 图11:IgG的差示扫描量热法(DSC)。示出了呈IgG4 (S228P)形式的以下抗体的DSC测定数据:(mAb-1)h224G11、(mAb-2)08G07、(mAb-3)MH7、(mAb-4)MH7-1、(mAb-5)MH7-2和(mAb-6)MH7-3。

[0098] 图12:等电聚焦分析。示出了以下蛋白质样品的IEF测定数据:(1)IEF标志物SERVALYTTM3-10;(2)本妥昔单抗(Brentuximab)IgG1;(3)英夫利昔单抗(Infiximab)IgG1;(4)h224G11 IgG4 (S228P);(5)08G07 IgG4 (S228P);(6)MH7 IgG4 (S228P);(7)MH7-1 IgG4 (S228P);(8)MH7-2 IgG4 (S228P);和(9)MH7-3 IgG4 (S228P)。

具体实施方式

[0099] 根据本发明的第一方面,提供了一种抗体分子或其抗原结合部分,所述抗体分子与人C-MET并且任选地还与食蟹猴C-MET特异性结合,其中所述抗体分子或抗原结合部分包括具有以下的重链可变区:

[0100] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的HCDR1:G-Y-I或任何氨基酸(如T)-F-T-A或任何氨基酸(如S)-Y-Y或任何氨基酸(如A、S或T)-M-H(SEQ ID NO:22);

[0101] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的HCDR2:M-G-W或任何氨基酸(如I)-I-K或任何氨基酸(如N)-P-N或任何氨基酸(如S)-N或任何氨基酸(如G)-G-L或任何氨基酸(如S)-A或任何氨基酸(如T)-N或任何氨基酸(如S)-Y-A-Q-K-F-Q-G(SEQ ID NO:23);以及

[0102] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的HCDR3:S或任何氨基酸(如A/E/H/M/Q/T/V)-E-I-T-T-E或任何氨基酸(如D)-F或任何氨基酸(如L)-D-Y或任何氨基酸(如A/E/F/I/K/L/M/Q/S/V/W)(SEQ ID NO:24)。

[0103] 在一些方面中,本文所提供的抗C-MET抗体或抗原结合部分与包括SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19或由其组成的C-MET蛋白特异性结合。在一些方面中,本文所提供的抗C-MET抗体或抗原结合部分与具有与SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%相同的氨基酸序列的C-MET蛋白特异性结合。

[0104] 在本发明的各方面中,所述抗体分子或抗原结合部分的所述HCDR1可以不包含序列GYIFTAYTMH(SEQ ID NO:25;WO 2011151412A1、US2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体HCDR1),所述抗体分子或抗原结合部分的所述HCDR2可以不包含序列MGWIKPNGLANYAQKFQG(SEQ ID NO:26;WO 2011151412A1、US2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体HCDR1),和/或所述抗体分子或抗原结合部分的所述HCDR3可以不包含序列SEITTEFDY(SEQ ID NO:27;WO 2011151412A1、US 2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体HCDR3)。

[0105] 所述抗体分子或抗原结合部分可以进一步包括具有以下的轻链可变区:

[0106] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的LCDR1:R-A-S-Q-S-V-D或任何氨基酸(例如,S或E)-S-Y-A-N或任何氨基酸(例如,Q)-S-F或任何氨基酸(例如,Y)-L-H或任何氨基酸(例如,A)(SEQ ID NO:28);

[0107] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的LCDR2:R或任何氨基酸(例如,A)-A或任何氨基酸(例如,G)-S-T或任何氨基酸(例如,S)-R-E-S或任何氨基酸(例如,T)(SEQ ID NO:29);以及

[0108] 具有遵循以下顺序的氨基酸序列的LCDR3:Q-Q-S或任何氨基酸(例如,Y)-K或任何氨基酸(例如,G)-E或任何氨基酸(例如,D,S)-D或任何氨基酸(例如,S,E,R)-P-L-T(SEQ ID NO:30)。

[0109] 在本发明的各方面中,所述抗体分子或抗原结合部分的所述LCDR1可以不包含序列KSSESVDSYANSFLH(SEQ ID NO:31;WO 2011151412A1、US2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体LCDR1),和/或所述抗体分子或抗原结合部分的所述LCDR2可以不包含序列RASTRES(SEQ ID NO:32;WO 2011151412A1、US 2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体LCDR2),和/或所述抗体分子或抗原结合部分的所述LCDR3可以不包含序列QQSKEDPLT(SEQ ID NO:33;WO 2011151412A1、US 2013/0216527A1中公开的224G11鼠/人源化抗体LCDR3)。

[0110] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

[0111] (a)HCDR1包括氨基酸序列G-Y-X₁-F-T-X₂-Y-X₃-M-H,其中X₁是I或任何其它氨基酸,X₂是A或任何其它氨基酸,并且X₃是Y或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:22);

[0112] (b)HCDR2包括M-G-X₁-I-X₂-P-X₃-X₄-G-X₅-X₆-X₇-Y-A-Q-K-F-Q-G,其中X₁是W或任何其它氨基酸,X₂是K或任何其它氨基酸,X₃是N或任何其它氨基酸,X₄是N或任何其它氨基酸,X₅是L或任何其它氨基酸,X₆是A或任何其它氨基酸,并且X₇是N或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:23);

[0113] (c)HCDR3包括X₁-E-I-T-T-X₂-X₃-D-X₄,其中X₁是S或任何其它氨基酸,X₂是E或任何其它氨基酸,X₃是F或任何其它氨基酸,并且X₄是Y或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:24);

[0114] (d)LCDR1包括氨基酸序列R-A-S-Q-S-V-X₁-S-Y-A-X₂-S-X₃-L-X₄,其中X₁是D或任何其它氨基酸,X₂是N或任何其它氨基酸,X₃是F或任何其它氨基酸,并且X₄是H或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:28);

[0115] (e)LCDR2包括X₁-X₂-S-X₃-R-E-X₄,其中X₁是R或任何其它氨基酸,X₂是A或任何其它氨基酸,X₃是T或任何其它氨基酸,并且X₄是S或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:29);并且

[0116] (f)LCDR3包括氨基酸序列Q-Q-X₁-X₂-X₃-X₄-P-L-T,其中X₁是S或任何其它氨基酸,X₂是K或任何其它氨基酸,X₃是E或任何其它氨基酸,并且X₄是D或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:30)。在一些方面中,HCDR1 X₁是T。在一些方面中,HCDR2 X₃是N的保守取代。在一些方面中,HCDR2 X₄是N的保守取代。在一些方面中,HCDR2 X₇是N的保守取代。在一些方面中,LCDR1 X₂是N的保守取代。在一些方面中,LCDR1 X₃是F的保守取代。在一些方面中,LCDR2 X₃是T的保守取代。在一些方面中,LCDR2 X₄是S的保守取代。

[0117] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,所述VH区以从氨基端到羧基端的顺序包括FR1-HCDR1-FR2-HCDR2-FR3-HCDR3-FR4,所述VL区以从氨基端到羧基端的顺序包括FR1-LCDR1-FR2-LCDR2-FR3-LCDR3-FR4,其中HCDR1是SEQ ID NO:22,HCDR2是SEQ ID NO:23,HCDR3是SEQ ID NO:24,LCDR1是SEQ ID NO:28,LCDR2是SEQ ID NO:29并且LCDR3是SEQ ID NO:30,其中重链FR1、FR2、FR3和FR4氨基酸序列是SEQ ID NO:127中的重链FR1、FR2、FR3和FR4氨基酸序列(参见表2),并且其中轻链FR1、FR2、FR3和FR4氨基酸序列是SEQ ID NO:129中的轻链FR1、FR2、FR3和FR4氨基酸序列(参见表2)。

[0118] 如本文详述的,本发明的发明人首次成功使用源自WO 2011151412A1、US2013/0216527A1中公开的鼠抗C-MET抗体224G11的CDR序列产生了许多经过优化的抗C-MET抗体分子。在本发明的实施例中,已经选择对人C-MET和食蟹猴C-MET两者都具有结合特异性的这些抗体分子(以促进在合适的动物测试物种中的体内研究)。对如本文所描述的经过优化的抗体分子的进一步细化提高了可变结构域稳定性、提高了表达产量和/或降低了免疫原性。

[0119] 本发明的优选的经过优化的抗C-MET抗体分子在对应的鼠CDR或其它(如骨架)氨基酸位置处不必具有最大数量的人种系取代。如下文实验部分所详述的,发现就抗C-MET结合特性和/或其它期望特征而言,“最大程度人源化的”抗体分子不一定是“最大程度优化的”。

[0120] 本发明涵盖对本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分的氨基酸序列的修饰。例如,本发明包含抗体分子和其对应的抗原结合部分,所述抗原结合部分包括不会显著影响其性质的功能等同的可变区和CDR,并且还包含活性和/或亲和力增强或降低的变体。例如,可以使氨基酸序列突变以获得对C-MET具有期望结合亲和力的抗体。设想了包含长度范围为一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基端融合物的插入物,以及由单个或多个氨基酸残基构成的序列内插入物。末端插入物的实例包含具有N端甲硫氨酸残基的抗体分子或与表位标签融合的抗体分子。抗体分子的其它插入变体包含与酶或多肽的抗体的N端或C端连接的融合物,所述融合物增加抗体在血液循环中的半衰期。

[0121] 本发明的抗体分子或抗原结合部分可以包含经过糖基化的多肽和未经糖基化的多肽以及具有其它转译后修饰(例如用不同的糖进行的糖基化、乙酰化和磷酸化)的多肽。可以例如通过添加、去除或替代一个或多个氨基酸残基以形成或去除糖基化位点来使本发明的抗体分子或抗原结合部分突变,以改变这种转译后修饰。

[0122] 可以例如通过氨基酸取代来修饰本发明的抗体分子或抗原结合部分,以去除抗体中的潜在蛋白水解位点。

[0123] 在抗体分子或其抗原结合部分中,HCDR1可以具有以下氨基酸序列:G-Y-I/T-F-T-

A/S-Y-Y/S/T/A-M-H(SEQ ID NO:64);HCDR2可以具有以下氨基酸序列:M-G-W/I-I-K/N-P-N/S-N/G-G-L/S-A/T-N/S-Y-A-Q-K-F-Q-G(SEQ ID NO:65);并且HCDR3可以具有以下氨基酸序列:S/A/E/H/M/Q/T/V-E-I-T-T-E/D-F/L-D-Y/A/E/F/I/K/L/M/Q/S/V/W(SEQ ID NO:66)。

[0124] 例如,HCDR1可以具有以下氨基酸序列:G-Y-T-F-T-S-Y-A/S/T-M-H(SEQ ID NO:67);HCDR2可以具有以下氨基酸序列:M-G-W/I-I-N-P-S-G-G-S-T-S-Y-A-Q-K-F-Q-G(SEQ ID NO:68);并且HCDR3可以具有以下氨基酸序列:S/A/E/Q/T-E-I-T-T-E/D-F-D-Y/I(SEQ ID NO:69)。

[0125] 在抗体分子或其抗原结合部分中,LCDR1可以具有以下氨基酸序列:R-A-S-Q-S-V-D/S/E-S-Y-A-N/Q-S-F/Y-L-H/A(SEQ ID NO:70);LCDR2可以具有以下氨基酸序列:R/A-A/G-S-T/S-R-E-T/S(SEQ ID NO:71);并且LCDR3可以具有以下氨基酸序列:Q-Q-S/Y-K/G-E/D/S-D/S/E/R-P-L-T(SEQ ID NO:72)。

[0126] 例如,LCDR1可以具有以下氨基酸序列:R-A-S-Q-S-V-D/S/E-S-Y-A-N/Q-S-Y-L-H(SEQ ID NO:73);LCDR2可以具有以下氨基酸序列:R-G-S-T-R-E-T/S(SEQ ID NO:74);并且LCDR3可以具有以下氨基酸序列:Q-Q-S/Y-K/G-E/S-D/S/E-P-L-T(SEQ ID NO:75)。

[0127] 在本发明的特定实施例中,抗体分子或抗原结合部分可以包括:

[0128] (a) 氨基酸序列RASQSVESYAQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:46)、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)、QQSKSDPLT(LCDR3;SEQ ID NO:76)、GYIFTSYSMH(HCDR1;SEQ ID NO:43)、MGWINPSNGLANYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:44)、QEITTEFDI(HCDR3;SEQ ID NO:45)[克隆04F09];或者

[0129] (b) 氨基酸序列RASQSVDSYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:51)、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)、QQSKESPLT(LCDR3;SEQ ID NO:47)、GYIFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:48)、MGWINPNGLASYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:49)、SEITTEQDY(HCDR3;SEQ ID NO:50)[克隆07A01];或者

[0130] (c) 氨基酸序列RASQSVSSYAQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:57)、RASTRET(LCDR2;SEQ ID NO:77)、QQSKESPLT(LCDR3;SEQ ID NO:47)、GYTFTSYSMH(HCDR1;SEQ ID NO:78)、MGWINPNGLTNYAQKFRG(HCDR2;SEQ ID NO:79)、EEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:80)[克隆09A12];或者

[0131] (d) 氨基酸序列RASQSVSSYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:37)、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)、QQSKSDPLT(LCDR3;SEQ ID NO:76)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGWINPNNGSTNYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:81)、SEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:55)[克隆09B08];或者

[0132] (e) 氨基酸序列RASQSVESYAQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:46)、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)、QQSKEEPLT(LCDR3;SEQ ID NO:82)、GYIFTAYSMH(HCDR1;SEQ ID NO:83)、MGIKPSNGSTNYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:84)、AEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:85)[克隆07C10];或者

[0133] (f) 氨基酸序列RASQSVESYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:52)、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)、QQYGSEPLT(LCDR3;SEQ ID NO:53)、GYIFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:48)、MGWINPNNGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:42)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36)[克隆09E04];或者

[0134] (g) 氨基酸序列RASQSVDSYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:51)、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)、QQSKSEPLT(LCDR3;SEQ ID NO:39)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGWINPSGGLANYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:54)、SEITTFDFY(HCDR3;SEQ ID NO:55) [克隆08G07];或者

[0135] (h) 氨基酸序列RASQSVDSYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:51)、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)、QQSKSEPLT(LCDR3;SEQ ID NO:39)、GYIFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:48)、MGWIKPNNGSASYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:86)、SEITTFDFY(HCDR3;SEQ ID NO:55) [克隆04E10];或者

[0136] (i) 氨基酸序列RASQSVDSYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:51)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQSKSDPLT(LCDR3;SEQ ID NO:76)、GYIFTAYSMH(HCDR1;SEQ ID NO:83)、MGWIKPNNGSTNYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:87)、TEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:88) [克隆08G12];或者

[0137] (j) 氨基酸序列RASQSVSSYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:37)、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)、QQSKSEPLT(LCDR3;SEQ ID NO:39)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGWINPNGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:42)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH1];或者

[0138] (k) 氨基酸序列RASQSVSSYQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:57)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQSGSSPLT(LCDR3;SEQ ID NO:89)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGWINPNGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:42)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH2];或者

[0139] (l) 氨基酸序列RASQSVSSYQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:57)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQYGSSPLT(LCDR3;SEQ ID NO:90)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGWINPNGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:42)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH3];或者

[0140] (m) 氨基酸序列RASQSVSSYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:37)、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)、QQSKSEPLT(LCDR3;SEQ ID NO:39)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGWINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:40)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH4];或者

[0141] (n) 氨基酸序列RASQSVSSYQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:57)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQSGSSPLT(LCDR3;SEQ ID NO:89)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGWINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:40)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH5];或者

[0142] (o) 氨基酸序列RASQSVSSYQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:57)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQYGSSPLT(LCDR3;SEQ ID NO:90)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGWINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:40)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH6];或者

[0143] (p) 氨基酸序列RASQSVSSYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:37)、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)、QQSKSEPLT(LCDR3;SEQ ID NO:39)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:35)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆

MH7];或者

[0144] (q) 氨基酸序列RASQSVSSYAQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:57)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQSGSSPLT(LCDR3;SEQ ID NO:89)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:35)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH8];或者

[0145] (r) 氨基酸序列RASQSVSSYAQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:57)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQYGSSPLT(LCDR3;SEQ ID NO:90)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:35)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH9];或者

[0146] (s) 氨基酸序列RASQSVSSYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:37)、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)、QQSKSEPLT(LCDR3;SEQ ID NO:39)、GYTFTSYAMH(HCDR1;SEQ ID NO:41)、MGWINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:40)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH10];或者

[0147] (t) 氨基酸序列RASQSVSSYAQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:57)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQSGSSPLT(LCDR3;SEQ ID NO:89)、GYTFTSYAMH(HCDR1;SEQ ID NO:41)、MGWINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:40)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH11];或者

[0148] (u) 氨基酸序列RASQSVSSYAQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:57)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQYGSSPLT(LCDR3;SEQ ID NO:90)、GYTFTSYAMH(HCDR1;SEQ ID NO:41)、MGWINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:40)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH12];或者

[0149] (v) 氨基酸序列RASQSVSSYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:37)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQSKSEPLT(LCDR3;SEQ ID NO:39)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:35)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH7-1];或者

[0150] (w) 氨基酸序列RASQSVSSYANSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:37)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQSKESPLT(LCDR3;SEQ ID NO:47)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:35)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH7-2];或者

[0151] (x) 氨基酸序列RASQSVSSYAQSYLH(LCDR1;SEQ ID NO:57)、RGSTRET(LCDR2;SEQ ID NO:56)、QQSKESPLT(LCDR3;SEQ ID NO:47)、GYTFTSYTMH(HCDR1;SEQ ID NO:34)、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(HCDR2;SEQ ID NO:35)、QEITTEFDY(HCDR3;SEQ ID NO:36) [克隆MH7-3]。

[0152] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

[0153] 在一些方面中,本发明提供了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

[0154] (a) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且

VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYAQSYLH(SEQ ID NO:57)的LCDR1、RGSTRET(SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKESPLT(SEQ ID NO:47)的LCDR3;

[0155] (b) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH(SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRET(SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKESPLT(SEQ ID NO:47)的LCDR3;

[0156] (c) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH(SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRET(SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKSEPLT(SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0157] (d) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH(SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES(SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT(SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0158] (e) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPSGGLANYAQKFQG(SEQ ID NO:54)的HCDR2和SEITTEFDY(SEQ ID NO:55)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVDSYANSYLH(SEQ ID NO:51)的LCDR1、RGSTRES(LCDR2;SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT(SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0159] (f) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:40)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH(SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES(SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT(SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0160] (g) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYAMH(SEQ ID NO:41)的HCDR1、MGWINPSGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:40)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH(SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES(SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT(SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0161] (h) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPNGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:42)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH(SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES(SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT(SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0162] (i) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYSMH(SEQ ID NO:43)的HCDR1、MGWINPSNGLANYAQKFQG(SEQ ID NO:44)的HCDR2和QEITTEFDI(SEQ ID NO:45)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVESYAQSYLH(SEQ ID NO:46)的LCDR1、RGSTRES(SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSDPLT(SEQ ID NO:76)的LCDR3;

[0163] (j) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYTMH(SEQ ID NO:48)的HCDR1、MGWINPNGGLASYAQKFQG(SEQ ID NO:49)的HCDR2和SEITTEQDY(SEQ ID NO:50)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVDSYANSYLH(SEQ ID NO:51)的LCDR1、RGSTRES(SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKESPLT(SEQ ID NO:47)的LCDR3;或者

[0164] (k) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYTMH(SEQ ID NO:48)的HCDR1、

MGWINPNGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:42) 的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36) 的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVESYANSYLH (SEQ ID NO:52) 的LCDR1。

[0165] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH区包括表10中的VH区氨基酸序列中的任一个VH区氨基酸序列,并且所述VL区包括表10中的VL区氨基酸序列中的任一个VL区氨基酸序列。

[0166] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

[0167] (a) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:1,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:2;

[0168] (b) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:3,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:4;

[0169] (c) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:5,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:6;

[0170] (d) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:7,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:8;或者

[0171] (e) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:9,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:10。

[0172] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

[0173] (a) VH区氨基酸序列与SEQ ID NO:1至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%相同,并且VL区氨基酸序列与SEQ ID NO:2至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%相同;

[0174] (b) VH区氨基酸序列与SEQ ID NO:3至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%相同,并且VL区氨基酸序列与SEQ ID NO:4至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%相同;

[0175] (c) VH区氨基酸序列与SEQ ID NO:5至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%相同,并且VL区氨基酸序列与SEQ ID NO:6至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%相同;

[0176] (d) VH区氨基酸序列与SEQ ID NO:7至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%相同,并且VL区氨基酸序列与SEQ ID NO:8至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%相同;或者

[0177] (e) VH区氨基酸序列与SEQ ID NO:9至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%相同,并且VL区氨基酸序列与SEQ ID NO:10至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%相同。

[0178] 在一些方面中,可以分离如本文所定义的抗体或抗原结合部分。

[0179] 如本文所定义的抗体分子或抗原结合部分可以与包括本文所公开的CDR组的抗体或其抗原结合部分交叉竞争与C-MET结合。在一些实施例中,本发明提供了一种分离的抗C-

MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分与包括本文所公开的CDR组的抗体或抗原结合部分交叉竞争与C-MET结合;并且(a)包括完全种系人骨架氨基酸序列;(b)在LCDR1中不包括“DS”异构化位点;(c)在LCDR1中不包括“NS”脱酰胺化位点;(d)在LCDR1中不包括构成氧化危险的暴露的“F”侧链;(e)在HCDR2中不包括“NG”脱酰胺化位点;(e)在HCDR2中不包括“NN”脱酰胺化位点;(f)在HCDR2中不包括构成氧化危险的暴露的“W”侧链;和/或(g)在LCDR3中不包括“DP”酸水解位点;和/或(h)在LCDR2中不包括人T细胞表位序列;和/或(i)在LCDR3中不包括人T细胞表位序列;和/或(j)与抗体h224G11的等电点相比,表现出更高的等电点;和/或(k)当呈人IgG4(S228P)形式时,如通过等电聚焦测量的,表现出的等电点为8.0或更高。抗体h224G11的氨基酸序列可以在表2中找到。

[0180] 术语“交叉竞争(cross-compete或cross-competition)”和“交叉阻断(cross-block、cross-blocked或cross-blocking)”在本文中可互换地用于意指抗体或其部分直接或通过变构调节间接干扰本发明的抗C-MET抗体与靶C-MET(例如,人C-MET)结合的能力。可以使用竞争结合测定来确定抗体或其部分能够干扰另一种抗体与靶标结合的程度,并且因此确定是否可以将其说成是根据本发明进行交叉阻断或交叉竞争。结合竞争测定的一个实例是均相时间分辨荧光(HTRF)。一种特别合适的定量交叉竞争测定使用基于FACS或AlphaScreen的方法来测量经过标记的(例如,经过His标记的、经过生物素化的或经过放射性标记的)抗体或其部分和另一种抗体或其部分在其与靶标结合方面之间的竞争。通常,交叉竞争性抗体或其部分是例如这样的抗体或其部分:在交叉竞争测定中将与靶标结合,使得在测定期间并且在存在第二抗体或其部分的情况下,根据本发明的免疫球蛋白单个可变结构域或多肽的所记录替代高达以给定量存在的潜在交叉阻断性抗体或其片段进行的最大理论替代(例如,需要被交叉阻断的冷(例如,未经标记的)抗体或其片段进行的替代)的100%(例如,在基于FACS的竞争测定中)。优选地,交叉竞争性抗体或其部分的所记录替代介于10%与100%之间或介于50%与100%之间。

[0181] 如本文所定义的抗体分子或抗原结合部分可以是热稳定的。在一些情况下,抗体分子或抗原结合部分的热稳定性可以与鼠抗C-MET抗体224G11或h224G11的热稳定性基本上相同。在一些情况下,抗体分子或抗原结合部分的热稳定性可以高于鼠抗C-MET抗体224G11或h224G11的热稳定性。在一些实例中,抗体分子或抗原结合部分的熔融温度(T_m)可以为约77°C到约81°C,并且抗体分子或抗原结合部分可以呈人IgG4形式。在一些方面中,抗体分子或抗原结合部分的 T_m 可以为约77.2°C到约80.6°C,并且抗体分子或抗原结合部分可以呈人IgG4形式。在一些情况下,抗原结合部分是Fab。抗体分子或其抗原结合部分的熔融温度可以通过差示扫描量热法(DSC)测定来分析。

[0182] 在一些实例中,如本文所定义的抗体分子或抗原结合部分的等电点(pI)可以高于鼠抗C-MET抗体224G11或h224G11的等电点。在一些情况下,抗体分子或其抗原结合部分的pI可以大于约pH 7.3或大于约pH 7.4。例如,抗体分子或其抗原结合部分的pI可以为约pH7.3到约pH 8.5。抗体分子或其抗原结合部分的等电点可以通过蛋白质电荷变体测定来分析。

[0183] 如本文所定义的抗体分子或抗原结合部分可以包括去除转译后修饰(PTM)位点(例如,糖基化位点(N连接的或O连接的)、脱氨位点、磷酸化位点或异构化/片段化位点)的一种或多种取代、缺失和/或插入。

[0184] 已知超过350种PTM。PTM的关键形式包含(K和R残基的)磷酸化、糖基化(N连接的和O连接的)、sumo化(sumoylation)、棕榈酰化、乙酰化、硫酸盐化、豆蔻酰化、异戊烯化和甲基化。用于鉴定负责特定PTM的推定的氨基酸位点的统计方法在本领域中是众所周知的(参见Zhou等人,2016,《自然-实验室指南(Nature Protocols)》1:1318-1321)。设想了例如通过取代、缺失和/或插入来去除此类位点,然后任选地(实验上和/或理论上)测试(a)结合活性和/或(b)PTM的丧失。

[0185] 例如,已经鉴定了224G11鼠LCDR3(如本文所定义,即,氨基酸序列QQSKEDPLT(SEQ ID NO:33))在残基6和7(DP)处具有推定的酸水解位点。设想了例如通过取代D(如取代为S或E)来去除本发明的LCDR3中的等效位置处的此位点(如例如在表3和4中存在的克隆MH7和其它克隆中)。

[0186] 在另外一个实例中,已经鉴定了224G11鼠LCDR1(如本文所定义,即,氨基酸序列KSSESVD SYANSFLH(SEQ ID NO:31))在残基7(D)处具有推定的异构化位点。设想了例如通过取代D(如取代为S或E)来去除本发明的LCDR1中的等效位置处的此位点(如例如在表3和4中存在的克隆MH7和其它克隆中)。

[0187] 在另外一个实例中,已经鉴定了224G11鼠LCDR1(如本文所定义,即,氨基酸序列KSSESVD SYANSFLH(SEQ ID NO:31))在残基11(N)处具有推定的脱酰胺化位点。设想了例如通过取代N(如取代为Q)来去除本发明的LCDR1中的等效位置处的此位点(如例如在表3和4中存在的克隆04F09和其它克隆中)。

[0188] 在另外一个实例中,已经鉴定了224G11鼠LCDR1(如本文所定义,即,氨基酸序列KSSESVD SYANSFLH(SEQ ID NO:31))在残基13(F)处具有推定的氧化位点,其位于CDR环的已知溶剂暴露区中。设想了例如通过取代F(如取代为Y)来去除本发明的LCDR1中的等效位置处的此位点(如例如在表3和4中存在的克隆MH7和其它克隆中)。

[0189] 在另外一个实例中,已经鉴定了224G11鼠HCDR2(如本文所定义,即,氨基酸序列MGWIKPNNG LANYAQKFQG(SEQ ID NO:26))在残基3(W)处具有推定的氧化位点,其位于CDR环的已知溶剂暴露区中。设想了例如通过取代W(如取代为I)来去除本发明的HCDR2中的等效位置处的此位点(如例如在表3和4中存在的克隆MH7和其它克隆中)。

[0190] 在另外一个实例中,已经鉴定了224G11鼠HCDR2(如本文所定义,即,氨基酸序列MGWIKPNNG LANYAQKFQG(SEQ ID NO:26))在残基7(N)处具有推定的脱酰胺化位点,其位于CDR环的已知溶剂暴露区中。设想了例如通过取代N(如取代为S)来去除本发明的HCDR2中的等效位置处的此位点(如例如在表3和4中存在的克隆MH7和其它克隆中)。

[0191] 在另外一个实例中,已经鉴定了224G11鼠HCDR2(如本文所定义,即,氨基酸序列MGWIKPNNG LANYAQKFQG(SEQ ID NO:26))在残基8(N)处具有推定的脱酰胺化位点,其位于CDR环的已知溶剂暴露区中。设想了例如通过取代N(如取代为G)来去除本发明的HCDR2中的等效位置处的此位点(如例如在表3和4中存在的克隆MH7和其它克隆中)。

[0192] 抗体分子或其抗原结合部分可以是人的、人源化的或嵌合的。

[0193] 抗体分子或其抗原结合部分可以包括已经插入有CDR的一个或多个人可变结构域骨架支架。例如,VH区、VL区或VH区和VL区两者可以包括一个或多个人骨架区氨基酸序列。

[0194] 抗体分子或其抗原结合部分可以包括已经插入有对应的HCDR序列的IGHV1-46人种系支架。抗体分子或其抗原结合部分可以包括VH区,所述VH区包括已经插入有一组对应

的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列的IGHV1-46人种系支架氨基酸序列。

[0195] 抗体分子或其抗原结合部分可以包括已经插入有对应的LCDR序列的IGKV3-20人种系支架。抗体分子或其抗原结合部分可以包括VL区,所述VL区包括已经插入有一组对应的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列的IGKV3-20人种系支架氨基酸序列。

[0196] 抗体分子或其抗原结合部分可以包括已经插入有对应的HCDR序列的IGHV1-46人种系支架和已经插入有对应的LCDR序列的IGKV3-20人种系支架。抗体分子或其抗原结合部分可以包括VH区和VL区,所述VH区包括已经插入有一组对应的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列的IGHV1-46人种系支架氨基酸序列,所述VL区包括已经插入有一组对应的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列的IGKV3-20人种系支架氨基酸序列。HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列可以是表4或8中的克隆中的任一个克隆的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列(其中所有六个CDR序列均来自同一克隆)。

[0197] 在一些方面中,抗体分子或其抗原结合部分可以包括免疫球蛋白恒定区。在一些实施例中,所述免疫球蛋白恒定区是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2。在另外的实施例中,所述免疫球蛋白恒定区是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4(S228P)、IgA1或IgA2。所述抗体分子或其抗原结合部分可以包括免疫惰性的恒定区。在一些方面中,抗C-MET抗体或其抗原结合部分可以包括免疫球蛋白恒定区,所述免疫球蛋白恒定区包括野生型人IgG1恒定区、包括氨基酸取代L234A、L235A和G237A的人IgG1恒定区或包括氨基酸取代L234A、L235A、G237A和P331S的人IgG1恒定区。在一些方面中,抗C-MET抗体或其抗原结合部分可以包括免疫球蛋白恒定区,所述免疫球蛋白恒定区包括野生型人IgG2恒定区或野生型人IgG4恒定区。在一些方面中,抗C-MET抗体可以包括免疫球蛋白恒定区,所述免疫球蛋白恒定区包括表11中的氨基酸序列中的任一个氨基酸序列。表11中的Fc区序列开始于CH1结构域。在一些方面中,抗C-MET抗体可以包括免疫球蛋白恒定区,所述免疫球蛋白恒定区包括人IgG4、人IgG4(S228P)、人IgG2、人IgG1、人IgG1-3M或人IgG1-4M的Fc区的氨基酸序列。例如,与野生型人IgG4 Fc区相比,人IgG4(S228P)Fc区包括以下取代:S228P。例如,与野生型人IgG1Fc区相比,人IgG1-3M Fc区包括以下取代:L234A、L235A和G237A,而与野生型人IgG1 Fc区相比,人IgG1-4M Fc区包括以下取代:L234A、L235A、G237A和P331S。在一些方面中,免疫球蛋白分子的恒定区中的氨基酸残基的位置是根据EU命名法进行编号的(Ward等人,1995《免疫疗法(Therap. Immunol.)》,2:77-94)。在一些方面中,免疫球蛋白恒定区可以包括RDEL(T)(SEQ ID NO:20)基序或REEM(SEQ ID NO:21)基序(在表11中加下划线)。在小于RDEL(T)(SEQ ID NO:20)同种异型的人群中存在REEM(SEQ ID NO:21)同种异型。在一些方面中,抗C-MET抗体可以包括免疫球蛋白恒定区,所述免疫球蛋白恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个。在一些方面中,抗C-MET抗体可以包括表4或8中的克隆中的任一个克隆的六个CDR氨基酸序列和表11中的Fc区氨基酸序列中的任一个Fc区氨基酸序列。在一些方面中,抗C-MET抗体可以包括免疫球蛋白重链恒定区和免疫球蛋白轻链恒定区,所述免疫球蛋白重链恒定区包含表11中的Fc区氨基酸序列中的任一个Fc区氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链恒定区是κ轻链恒定区或λ轻链恒定区。

[0198] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区、轻链可变(VL)区以及重链恒定区,其中

[0199] (a) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH(SEQ ID NO:34)的HCDR1、

MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35) 的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36) 的HCDR3;VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYASLYH (SEQ ID NO:57) 的LCDR1、RGSTRET (SEQ ID NO:56) 的LCDR2和QQSKESPLT (SEQ ID NO:47) 的LCDR3;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0200] (b) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34) 的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35) 的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36) 的HCDR3;VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37) 的LCDR1、RGSTRET (SEQ ID NO:56) 的LCDR2和QQSKESPLT (SEQ ID NO:47) 的LCDR3;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0201] (c) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34) 的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35) 的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36) 的HCDR3;VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37) 的LCDR1、RGSTRET (SEQ ID NO:56) 的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39) 的LCDR3;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0202] (d) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34) 的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35) 的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36) 的HCDR3;VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37) 的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38) 的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39) 的LCDR3;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0203] (e) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34) 的HCDR1、MGWINPSGGLANYAQKFQG (SEQ ID NO:54) 的HCDR2和SEITTEFDY (SEQ ID NO:55) 的HCDR3;VL区氨基酸序列包括RASQSVDSYANSYLH (SEQ ID NO:51) 的LCDR1、RGSTRES (LCDR2;SEQ ID NO:38) 的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39) 的LCDR3;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0204] (f) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34) 的HCDR1、MGWINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:40) 的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36) 的HCDR3;VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37) 的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38) 的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39) 的LCDR3;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0205] (g) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYAMH (SEQ ID NO:41) 的HCDR1、MGWINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:40) 的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36) 的HCDR3;VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37) 的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38) 的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39) 的LCDR3;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0206] (h) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34) 的HCDR1、MGWINPNGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:42) 的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36) 的HCDR3;VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37) 的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38) 的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39) 的LCDR3;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0207] (i) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYSMH (SEQ ID NO:43)的HCDR1、MGWINPSNGLANYAQKFQG (SEQ ID NO:44)的HCDR2和QEITTEFDI (SEQ ID NO:45)的HCDR3;VL区氨基酸序列包括RASQSVESYAQSYLH (SEQ ID NO:46)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSDPLT (SEQ ID NO:76)的LCDR3;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0208] (j) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYTMH (SEQ ID NO:48)的HCDR1、MGWINPNGGLASYAQKFQG (SEQ ID NO:49)的HCDR2和SEITTEQDY (SEQ ID NO:50)的HCDR3;VL区氨基酸序列包括RASQSVDSYANSYLH (SEQ ID NO:51)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKESPLT (SEQ ID NO:47)的LCDR3;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;或者

[0209] (k) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYTMH (SEQ ID NO:48)的HCDR1、MGWINPNGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:42)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;VL区氨基酸序列包括RASQSVESYANSYLH (SEQ ID NO:52)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQYGSEPLT (SEQ ID NO:53)的LCDR3;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个。

[0210] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区、轻链可变(VL)区以及重链恒定区,其中

[0211] (a) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:1或由其组成;VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:2或由其组成;并且所述重链恒定区包括野生型人IgG4恒定区、包括氨基酸取代S228P的人IgG4恒定区、野生型人IgG2恒定区;野生型人IgG1恒定区或包括氨基酸取代L234A、L235A和G237A的人IgG1恒定区;

[0212] (b) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:3或由其组成;VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:4或由其组成;并且所述重链恒定区包括野生型人IgG4恒定区、包括氨基酸取代S228P的人IgG4恒定区、野生型人IgG2恒定区;野生型人IgG1恒定区或包括氨基酸取代L234A、L235A和G237A的人IgG1恒定区;

[0213] (c) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:5或由其组成;VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:6或由其组成;并且所述重链恒定区包括野生型人IgG4恒定区、包括氨基酸取代S228P的人IgG4恒定区、野生型人IgG2恒定区;野生型人IgG1恒定区或包括氨基酸取代L234A、L235A和G237A的人IgG1恒定区;

[0214] (d) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:7或由其组成;VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:8或由其组成;并且所述重链恒定区包括野生型人IgG4恒定区、包括氨基酸取代S228P的人IgG4恒定区、野生型人IgG2恒定区;野生型人IgG1恒定区或包括氨基酸取代L234A、L235A和G237A的人IgG1恒定区;或者

[0215] (e) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:9或由其组成;VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:10或由其组成;并且所述重链恒定区包括野生型人IgG4恒定区、包括氨基酸取代S228P的人IgG4恒定区、野生型人IgG2恒定区;野生型人IgG1恒定区或包括氨基酸取代L234A、L235A和G237A的人IgG1恒定区。

[0216] 在一些方面中,本文公开了一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区、轻链可变(VL)区以及重链恒定区,其中

[0217] (a) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:1或由其组成;VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:2或由其组成;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0218] (b) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:3或由其组成;VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:4或由其组成;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0219] (c) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:5或由其组成;VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:6或由其组成;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;

[0220] (d) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:7或由其组成;VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:8或由其组成;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个;或者

[0221] (e) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:9或由其组成;VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:10或由其组成;并且所述重链恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个。

[0222] 抗体分子或其抗原结合部分可以是Fab片段、F(ab)₂片段、Fv片段、四聚体抗体、四价抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、结构域特异性抗体、单结构域抗体、单克隆抗体或融合蛋白。在一个实施例中,抗体可以是与第一抗原和第二抗原特异性结合的双特异性抗体,其中所述第一抗原是C-MET并且所述第二抗原不是C-MET。在例如Holliger和Hudson(2005,《自然生物技术(Nature Biotechnol.)》23(9):1126-1136)中描述了抗体分子和其构建和使用方法。

[0223] 在本发明的另一方面中,提供了一种免疫缀合物,所述免疫缀合物包括与治疗剂连接的如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分。

[0224] 合适的治疗剂的实例包含细胞毒素、放射性同位素、化学治疗剂、免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂、促凋亡剂、细胞生长抑制酶和细胞溶解酶(例如,RNase)。另外的治疗剂包含治疗性核酸,如对免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂或促凋亡剂进行编码的基因。这些药物描述语不是互相排斥的,并且因此可以使用一个或多个上述术语来描述治疗剂。

[0225] 在免疫缀合物中使用的合适的治疗剂的实例包含紫杉烷(taxane)、美登素(maytansine)、CC-1065和倍癌霉素(duocarmycin)、卡利奇霉素(calicheamicin)和其它烯二炔(enediyne)以及澳瑞他汀(auristatin)。其它实例包含抗叶酸类药物(anti-folate)、长春花生物碱(vinca alkaloid)和蒽环类药物(anthracycline)。免疫缀合物中还可以使用植物毒素、其它生物活性蛋白、酶(即,ADEPT)、放射性同位素、光敏剂。另外,可以使用如脂质体或聚合物等二级载剂作为细胞毒性药剂来制备缀合物。合适的细胞毒素包含抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的药剂。代表性细胞毒素包含抗生素、微管蛋白聚合抑制剂、与DNA结合并破坏DNA的烷基化剂以及破坏蛋白质合成或必需细胞蛋白(如蛋白激酶、磷酸酶、拓扑异构酶、酶和周期素)的功能的药剂。

[0226] 代表性细胞毒素包含但不限于阿霉素(doxorubicin)、道诺霉素(daunorubicin)、伊达比星(idarubicin)、阿柔比星(aclarubicin)、佐柔比星(zorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、表柔比星(epirubicin)、卡柔比星(carubicin)、诺加霉素(nogalamycin)、美诺立尔(menogaril)、吡柔比星(pitarubicin)、戊柔比星(valrubicin)、阿糖胞苷(cytarabine)、吉西他滨(gemcitabine)、三氟尿苷(trifluridine)、安西他滨(ancitabine)、依诺他滨(enocitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、喷司他丁(pentostatin)、溴尿苷(broxuhdine)、卡培他滨

(capecitabine)、克拉屈滨(cladhbine)、地西他滨(decitabine)、氟尿苷(floxuhdine)、氟达拉滨(fludarabine)、谷氏菌素(gougerotin)、嘌呤霉素(puromycin)、喃氟啉(tegafur)、噻唑呋林(tiazofuhn)、阿霉素(adhamycin)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、达卡巴嗪(dacarbazine)、长春花碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、米托蒽醌、博来霉素(bleomycin)、氮芥(mechlorethamine)、泼尼松(prednisone)、丙卡巴嗪(procarbazine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、氟尿嘧啶(flurouracils)、依托泊苷(etoposide)、紫杉醇(taxol)、紫杉醇类似物、铂(如顺铂和卡铂)、丝裂霉素(mitomycin)、噻替哌(thiotepa)、紫杉烷、长春新碱、道诺霉素、表柔比星、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素、他莫西芬(tamoxifen)、伊达比星、多拉司他汀(dolastatin)/澳瑞他汀、哈密特林(hemiasterlin)、埃斯培拉霉素(esperamicin)和美登醇(maytansinoid)。

[0227] 合适的免疫调节剂包含阻断激素对肿瘤的作用的抗激素类药物和抑制细胞因子产生、下调自身抗原表达或使MHC抗原隐蔽的免疫抑制剂。

[0228] 还提供了一种核酸分子,所述核酸分子对如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分进行编码。核酸分子可以对本文所描述的抗C-MET抗体或其抗原结合部分的(a)VH区氨基酸序列;(b)VL区氨基酸序列;或(c)VH氨基酸序列和VL区氨基酸序列两者进行编码。在一些方面中,可以分离如本文所定义的核酸分子。

[0229] 进一步提供了一种载体,所述载体包括如本文所定义的本发明的核酸分子。所述载体可以是表达载体。

[0230] 还提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞包括如本文所定义的本发明的核酸分子或载体。所述宿主细胞可以是重组宿主细胞。

[0231] 在另外一方面中,提供了一种产生抗C-MET抗体和/或其抗原结合部分的方法,所述方法包括:将本发明的宿主细胞在引起所述抗体和/或其抗原结合部分的表达和/或产生的条件下培养;以及从所述宿主细胞或培养物中分离所述抗体和/或抗原结合部分。

[0232] 在本发明的另一方面中,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的本发明的核酸分子或如本文所定义的本发明的载体。

[0233] 本发明还提供了一种用于抑制细胞中的C-MET信号传导的方法,所述方法包括使所述细胞与本文所描述的抗C-MET抗体分子或其抗原结合部分接触。在一些实施例中,本发明的抗C-MET抗体分子或抗原结合部分将C-MET锁定为非活化单体形式。

[0234] 进一步提供了一种用于增强受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的本发明的免疫缀合物或如本文所定义的本发明的核酸分子或如本文所定义的本发明的载体或如本文所定义的本发明的药物组合物。在一些实施例中,本发明的抗C-MET抗体分子或抗原结合部分通过抗体效应子功能介导的连接与受试者的免疫细胞连接。

[0235] 在另外一方面中,提供了一种用于治疗或预防受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的本发明的免疫缀合物或如本文所定义的本发明的核酸分子或如本文所定义的本发明的载体或如本文所定义的本发明的药物组合物。

[0236] 例如,所述癌症可以是胃肠道间质瘤(GIST)、胰腺癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、周围神经系统癌、食道癌、宫颈癌、子宫或子宫内膜癌、口腔癌或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆道癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤或血液组织癌。

[0237] 本发明还提供了如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的本发明的免疫缀合物或如本文所定义的本发明的核酸分子或如本文所定义的本发明的载体或如本文所定义的本发明的药物组合物,其用于治疗癌症。

[0238] 在另一方面中,本发明提供了如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或免疫缀合物或核酸分子或载体以及治疗方法,其用于单独使用、结合第二治疗剂(例如,抗癌剂)依次或同时使用。

[0239] 在另外一方面中,提供了如本文所定义的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的本发明的免疫缀合物或如本文所定义的本发明的核酸分子或如本文所定义的本发明的载体或如本文所定义的本发明的药物组合物在制造用于治疗癌症的药剂中的用途。

[0240] 本发明还提供了一种用于治疗或预防受试者的自身免疫性疾病或炎性疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如此处所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物。

[0241] 例如,所述自身免疫性疾病或炎性疾病可以是关节炎、哮喘、多发性硬化症、牛皮癣、克罗恩氏病、炎性肠病、狼疮、格雷夫氏病和桥本氏甲状腺炎或强直性脊柱炎。

[0242] 还提供了如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物,其用于治疗自身免疫性疾病或炎性疾病。

[0243] 进一步提供了如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物在制造用于治疗自身免疫性疾病或炎性疾病的药剂中的用途。

[0244] 本发明还提供了一种用于治疗或预防受试者的心血管疾病或纤维化疾病的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如此处所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物。

[0245] 还提供了如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物,其用于治疗心血管疾病或纤维化疾病。

[0246] 进一步提供了如本文所定义的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所定义的免疫缀合物或如本文所定义的核酸分子或如本文所定义的载体或如本文所定义的药物组合物在制造用于治疗心血管疾病或纤维化疾病的药剂中的用途。

[0247] 在本发明的任何方面中,心血管疾病可以例如是冠心病或动脉粥样硬化。

[0248] 在本发明的任何方面中,纤维化疾病可以是例如心肌梗塞、心绞痛、骨关节炎、肺纤维化、哮喘、囊性纤维化或支气管炎。

[0249] 在一个实施例中,本发明提供了一种包括本文所公开的氨基酸序列的抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其用于治疗。

[0250] 本发明的药物组合物可以包括药学上可接受的赋形剂、载剂或稀释剂。药学上可接受的赋形剂可以是进入药物组合物中的化合物或化合物组合,所述化合物或化合物组合不会引起二级反应,并且允许例如促进抗C-MET抗体分子的施用、增加其寿命和/或其在体内的功效或增加其在溶液中的溶解度。这些药学上可接受的媒剂是众所周知的,并且将由本领域的技术人员根据抗C-MET抗体分子的施用模式进行调整。

[0251] 在一些实施例中,抗C-MET抗体分子可以以冻干形式提供,以在施用前复原。例如,冻干的抗体分子可以在施用于个体之前在无菌水中复原并与盐水混合。

[0252] 抗C-MET抗体分子通常将以药物组合物的形式施用,所述药物组合物除了抗体分子之外还可以包括至少一种组分。因此,药物组合物除了抗C-MET抗体分子之外还可以包括药学上可接受的赋形剂、载剂、缓冲剂、稳定剂或本领域的技术人员众所周知的其它材料。此类材料应该是无毒的,并且不应该干扰抗C-MET抗体分子的功效。载剂或其它材料的确切性质将取决于施用途,施用可以通过推注、输注、注射或任何其它合适的途径进行,如下文所讨论的。

[0253] 对于例如通过注射进行的肠胃外施用,例如,皮下或静脉内施用,包括抗C-MET抗体分子的药物组合物可以采用不含热原且具有合适的pH、等渗性和稳定性的肠胃外可接受的水溶液的形式。本领域的相关技术人员完全能够使用例如等渗媒剂(如氯化钠注射液、林格氏注射液(Ringe's Injection)、乳酸化林格氏注射液)制备合适的溶液。可以根据需要使用防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂,包含缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,如抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化六甲铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟苯甲酸烷基酯,如对羟苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3'-戊醇;以及间甲酚);低分子量多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包含葡萄糖、甘露糖或葡聚糖;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反离子,如钠;金属络合物(例如,Zn蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0254] 根据要治疗的病状,包括抗C-MET抗体分子的药物组合物可以单独使用或结合其它治疗同时或依次施用。

[0255] 如本文所描述的抗C-MET抗体分子可以在人或动物体的治疗方法中使用,包含预防性(prophylactic或preventative)治疗(例如,在个体的病状发作之前进行以降低个体发生病状的风险、延缓其发作或在发作后减轻其严重程度的治疗)。治疗方法可以包括向有需要的个体施用抗C-MET抗体分子。

[0256] 施用通常地以“治疗有效量”进行,所述治疗有效量足以显示对患者的益处。这种益处可以是至少改善至少一种症状。实际施用量以及施用率和施用时程将取决于所治疗疾病的性质和严重程度、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病状、病症的原因、组合物的递送部位、施用方法、施用时间安排以及执业医师已知的其它因素。治疗处方(例如,关于剂量等的决定)由全科医生和其它医师负责,并且可以取决于症状的严重程度和/或所治疗

疾病的进展。抗体分子的适当剂量在本领域中是众所周知的 (Ledermann J.A. 等人, 1991, 《国际癌症杂志 (Int. J. Cancer)》47:659-664; Bagshawe K.D. 等人, 1991, 《抗体、免疫缀合物和放射性药物 (Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals)》4:915-922)。可以使用在本文中或在《医师案头参考 (Physician's Desk Reference)》(2003) 中指示的针对所施用药剂的类型的具体剂量。抗体分子的治疗有效量或合适剂量可以通过在动物模型中比较其体外活性和体内活性来确定。用于将小鼠和其它试验动物中的有效剂量外推至人的方法是已知的。确切剂量将取决于许多因素, 包含抗体是用于预防还是用于治疗、要治疗区域的大小和位置、抗体的确切性质 (例如, 完整抗体、片段) 以及与抗体连接的任何可检测标记物或其它分子的性质。

[0257] 对于全身性应用, 典型的抗体剂量范围为100 μ g到1g, 并且对于局部应用, 典型的抗体剂量范围为1 μ g到1mg。可以在开始时施用较高的负荷剂量, 然后施用一个或多个较低的剂量。通常, 抗体将是完整抗体, 例如, IgG4 (S228P) 或IgG4同种型。这是用于成年患者的单次治疗的剂量, 所述剂量可以针对儿童和婴儿按比例调整, 并且还可以针对其它抗体形式与分子量成比例地调整。根据医生的判断, 可以以每天一次、每周两次、每周一次或每月一次的间隔重复治疗。个体的治疗时间表可以取决于抗体组合物的药代动力学和药效学性质、施用途径和所治疗病状的性质。

[0258] 治疗可以是周期性的, 并且施用之间的时段可以是约两周或更长时间, 例如, 约三周或更长时间、约四周或更长时间、约每月或更长时间一次、约五周或更长时间或约六周或更长时间。例如, 可以每两周到四周或每四周到八周进行治疗。可以在外科手术之前和/或之后给予治疗, 和/或可以在外科手术治疗或有创手术的解剖部位处直接施用或施加治疗。上文描述了合适的调配物和施用途径。

[0259] 在一些实施例中, 本文所描述的抗C-MET抗体分子可以以皮下注射剂的形式施用。例如对于长期或短期预防/治疗, 可以使用自动注射器施用皮下注射剂。

[0260] 在一些实施例中, 抗C-MET抗体分子的治疗效果可以在血清中持续抗体半衰期的数倍, 这取决于剂量。例如, 抗C-MET抗体分子的单个剂量的治疗效果可以在个体中持续1个月或更长时间、2个月或更长时间、3个月或更长时间、4个月或更长时间、5个月或更长时间或6个月或更长时间。

[0261] 本发明还提供了一种用于产生与人C-MET并且任选地还与食蟹猴C-MET特异性结合的抗体分子或其抗原结合部分的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0262] (1) 将来自非人来源的抗C-MET CDR移植到人 ν 结构域骨架中, 以产生人源化抗C-MET抗体分子或其抗原结合部分;

[0263] (2) 产生所述人源化抗C-MET抗体分子或其抗原结合部分的包括所述CDR中的一种或多种突变的克隆的噬菌体文库;

[0264] (3) 针对与人C-MET并且任选地还与食蟹猴C-MET的结合选择所述噬菌体文库;

[0265] (4) 筛选来自选择步骤(3)的对人C-MET并且任选地还对食蟹猴C-MET具有结合特异性的克隆; 以及

[0266] (5) 由选自步骤(4)的克隆产生与人C-MET并且任选地还与食蟹猴C-MET特异性结合的抗体分子或其抗原结合部分。

[0267] 所述方法可以包括另外一个步骤: 基于在步骤(4)中选择的克隆 (例如, 基于在步

骤(4)中选择的克隆的CDR中的特定位置处的另外的探索性诱变)产生另外的克隆,以增强人源化和/或最小化人T细胞表位含量和/或改善步骤(5)中产生的抗体分子或其抗原结合部分中的制造性质。

[0268] 适用于上述方法的细化如下文实例1所述。

[0269] 如本文所使用的,术语“C-MET”是指MET蛋白和其保留C-MET的至少部分生物活性的变体。在一些情况下,如本文所使用的,C-MET包含具有天然序列C-MET的所有哺乳动物物种,包含人、大鼠、小鼠和鸡。术语“C-MET”可以用于包含人C-MET的变体、亚型和物种同源物。本发明的抗体可以与来自除了人之外的物种的C-MET,特别是来自食蟹猴(*cynomolgus monkey*或*Macaca fascicularis*)的C-MET交叉反应。表12中提供了人和食蟹猴C-MET氨基酸序列的实例。在某些实施例中,抗体可以对人C-MET具有完全特异性,并且可以不表现出非人交叉反应性。

[0270] 如本文所使用的,在本发明的抗体或“抗C-MET拮抗剂抗体”(可互换地称为“抗C-MET抗体”)的上下文中使用的“拮抗剂”是指能够结合C-MET并抑制C-MET生物活性和/或由C-MET信号传导介导的一个或多个下游途径的抗体。抗C-MET拮抗剂抗体涵盖可以(包含显著地)阻断、拮抗、抑制或降低C-MET生物活性(包含由C-MET信号传导(如受体结合和/或诱发对C-MET的细胞应答)介导的下游途径)的抗体。出于本发明的目的,将明确理解的是,术语“抗C-MET拮抗剂抗体”涵盖C-MET本身和C-MET生物活性或活性或生物活性的后果在任何有意义的程度上都基本上无效、减少或中和的所有术语、标题和功能状态和特性。

[0271] 如果抗体相比于其与其它受体结合以更大的亲和力、亲合力、更容易地和/或以更长的持续时间结合,则所述抗体与C-MET“特异性结合”、“特异性相互作用”、“优先结合”、“结合”或“相互作用”。

[0272] “抗体分子”是能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点来与靶标(如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)特异性结合的免疫球蛋白分子。如本文所使用的,术语“抗体分子”不仅涵盖完整的多克隆抗体或单克隆抗体,而且还涵盖任何抗原结合片段(例如,“抗原结合部分”)或其单链、包括抗体的融合蛋白以及包括抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它经修饰构型,包含例如但不限于scFv、单结构域抗体(例如,鲨鱼抗体和骆驼抗体)、大抗体、微型抗体、胞内抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、v-NAR和双-scFv。

[0273] “抗体分子”涵盖任何类的抗体,如IgG、IgA或IgM(或其亚类),并且抗体不需要属于任何特定类。根据重链的恒定区的抗体氨基酸序列,可以将免疫球蛋白归为不同类。存在五大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类中的几类可以进一步分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0274] 如本文所使用的,术语抗体分子的“抗原结合部分”是指完整抗体的保留与C-MET特异性结合的能力的一个或多个抗体片段。抗体分子的抗原结合功能可以由完整抗体的片段执行。涵盖在抗体分子的术语“抗原结合部分”内的结合片段的实例包含Fab;Fab';F(ab')₂;由VH结构域和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;单结构域抗体(dAb)片段和分离的互补决定区(CDR)。

[0275] 术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C端区。“Fc区”可以是天然序列Fc区或变

体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可以变化,但通常将人IgG重链Fc区定义为从位置Cys226处的氨基酸残基或从Pro230延伸到其羧基端。Fc区中的残基的编号为如Kabat中的EU索引的编号。免疫球蛋白的Fc区通常包括两个恒定结构域CH2和CH3。如本领域中已知的,Fc区可以以二聚体形式或单体形式存在。

[0276] 抗体的“可变区”是指抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区中的任一者或两者。如本领域中已知的,重链和轻链的可变区各自自由通过三个互补决定区(CDR)(也被称为高变区)连接的四个骨架区(FR)组成,并有助于形成抗体的抗原结合位点。当选择位于CDR侧翼的FR时,例如,当人源化或优化抗体时,来自含有同一规范类的CDR序列的抗体的FR是优选的。

[0277] 本申请中使用的CDR定义组合了在本领域中已经创建的许多不同的、经常是冲突的方案中使用的结构域,所述方案基于免疫球蛋白库分析和在分离方面和抗体与抗原的共晶体方面对抗体进行的结构分析的组合(参见Swindells等人的评论,2016,abYsis:整合的抗体序列和结构管理、分析和预测(abYsis: Integrated Antibody Sequence and Structure-Management, Analysis, and Prediction)《分子生物学期刊(JMol Biol)》[PMID:27561707;电子公开2016年8月22日])。本文所使用的CDR定义(“统一”定义)结合了所有此类现有洞悉的经验教训,并包含对潜在介导靶结合互补性的完整残基景观(landscape)进行采样所需的所有适当环位置。

[0278] 表1示出了如本文所定义的224G11鼠抗C-MET抗体CDR的氨基酸序列(“统一”方案)与用于定义相同CDR的众所周知的替代性系统的比较。

[0279] 如本文所使用的术语“保守取代”是指将一个氨基酸用不会显著有害地改变功能活性的另一氨基酸替代。“保守取代”的优选实例是将一个氨基酸用在以下BLOSUM 62取代矩阵中的值 ≥ 0 的另一氨基酸替代(参见Henikoff和Henikoff,1992,《美国国家科学院院刊》89:10915-10919):

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	0	-3	-2	0
R	-1	5	0	-2	-3	1	0	-2	0	-3	-2	2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	6	1	-3	0	0	0	1	-3	-3	0	-2	-3	-2	1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	1	6	-3	0	2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	1	0	0	-3	5	2	-2	0	-3	-2	1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	2	-4	2	5	-2	0	-3	-3	1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4	2	-3	1	0	-3	-2	-1	-3	-1	3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4	-2	2	0	-3	-2	-1	-2	-1	1
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5	0	-2	-1	-1	-1	-1	1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6	-4	-2	-2	1	3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7	-1	-1	-4	-3	-2
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4	1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11	2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

[0281] 术语“单克隆抗体”(Mab)是指源自单个拷贝或克隆(包含例如任何真核、原核或噬菌体克隆)的抗体或其抗原结合部分,而不是用于产生单克隆抗体的方法。优选地,本发明

的单克隆抗体存在于同质或基本上同质的群体中。

[0282] “人源化”抗体分子是指作为含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合亚序列)的非人(例如,鼠)抗体分子或其抗原结合部分的某种形式。人源化抗体可以是来自接受者的CDR的残基被来自如小鼠、大鼠或兔等具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)的CDR的残基替代的人免疫球蛋白(接受者抗体)。

[0283] “人抗体或完全人抗体”是指源自携带人抗体基因的转基因小鼠或人细胞的抗体分子或其抗原结合部分。

[0284] 术语“嵌合抗体”旨在指代可变区序列源自一个物种并且恒定区序列源自另一个物种的抗体分子或其抗原结合部分,如可变区序列源自小鼠抗体并且恒定区序列源自人抗体的抗体分子。

[0285] “抗体-药物缀合物”和“免疫缀合物”是指与细胞毒素剂、细胞抑制剂和/或治疗剂缀合的抗体分子或其抗原结合部分,包含与C-MET结合的抗体衍生物。

[0286] 本发明的抗体分子或其抗原结合部分可以使用本领域众所周知的技术来产生,例如,重组技术、噬菌体展示技术、合成技术或此类技术的组合或本领域中熟知的其它技术。

[0287] 术语“分离的分子”(其中分子是例如多肽、多核苷酸或抗体)是这样的分子,所述分子由于其衍生起源或来源而:(1)与在所述分子的天然状态下伴随所述分子的天然缔合的组分不缔合,(2)基本上不含来自同一物种的其它分子,(3)由来自不同物种的细胞表达或(4)在自然界中不存在。因此,化学合成的或在不同于天然来源细胞的细胞系统中表达的分子将与其天然缔合的组分“分离”。还可以通过使用本领域中众所周知的纯化技术进行的分离使分子基本不含天然缔合的组分。分子纯度或同质性可以通过本领域中众所周知的多种手段来测定。例如,可以使用聚丙烯酰胺凝胶电泳并且使用本领域中众所周知的技术将凝胶染色以使多肽可视化,从而测定多肽样品的纯度。为了某些目的,可以通过使用HPLC或本领域众所周知的其它纯化手段来提供更高分辨率。

[0288] 术语“表位”是指分子的能够由抗体分子或其抗原结合部分识别并在抗体分子的抗原结合区中的一个或多个抗原结合区处结合的部分。表位可以由一级、二级或三级蛋白质结构的限定区组成,并且包含由抗体的抗原结合区或其抗原结合部分识别的靶标的二级结构单元或结构域的组合。表位可以同样由如氨基酸或糖侧链等分子的限定的化学活性表面分组组成,并且具有特异性三维结构特征以及特异性电荷特性。如本文所使用的术语“抗原表位”定义为多肽的抗体分子可以特异性结合(如通过本领域中众所周知的任何方法所测定的,例如通过常规免疫测定、抗体竞争性结合测定或通过x射线晶体学或相关的结构测定方法(例如,NMR)测定的)的一部分。

[0289] 术语“结合亲和力”或“KD”是指特定抗原-抗体相互作用的解离速率。KD是解离速率(也被称为“脱离速率(off-rate) (k_{off})”)与缔合速率或“结合速率(on-rate) (k_{on})”之比。因此, K_D 等于 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$,并表示为摩尔浓度(M)。因此, K_D 越小,结合亲和力越强。因此,与1nM的KD相比,1 μ M的KD指示弱结合亲和力。可以使用本领域中既定的方法来确定抗体的KD值。一种用于确定抗体的KD的方法是使用表面等离子体共振(SPR),通常使用生物传感器系统,如Biacore[®]系统来确定。

[0290] 术语“效力”是生物活性的量度,并且可以被指定为IC₅₀或有效抑制在如本文所描

述的C-MET活性测定中测量的50%活性的抗体或抗体药物缀合物相对于抗原C-MET的浓度。

[0291] 如本文所使用的短语“有效量”或“治疗有效量”是指实现期望治疗结果所需的量(按剂量,针对时间段以及针对施用方式)。有效量至少是对受试者赋予治疗益处所需的活性剂的最小量,但小于毒性量。

[0292] 本文中关于本发明的抗体分子的生物活性所使用的术语“抑制”或“中和”意指抗体基本上拮抗、禁止、阻止、抑制、减慢、破坏、消除、停止、减少或逆转例如被抑制的疾病的进展或严重程度的能力,包含但不限于抗体分子相对于C-MET的生物活性或结合相互作用。

[0293] “宿主细胞”包含可以是或已经是用于掺入多核苷酸插入的一个或多个载体的接受者的单个细胞或细胞培养物。宿主细胞包含单个宿主细胞的后代,并且由于天然的、偶然的或故意的突变,后代(在形态学上或基因组DNA互补物上)可能不一定与原始亲本细胞完全相同。宿主细胞包含用本发明的一种或多种多核苷酸体内转染的细胞。

[0294] 如本文所使用的,“载体”意指能够在宿主细胞中递送并且优选地表达一个或多个所关注的基因或序列的构建体。载体的实例包含但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂缩合的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体以及某些真核细胞,如生产细胞。

[0295] 除非另有指示,否则本文所使用的术语“治疗”意指逆转此类术语所适用的病症或病状或此类病症或病状的一种或多种症状、使其缓解、抑制其进展、延迟其进展、延迟其发作或使其得到预防。除非另有指示,否则本文所使用的术语“治疗”是指如上文所定义的治疗动作。术语“治疗”还包含受试者的辅助和新辅助治疗。为避免疑义,本文中对“治疗”的提及包含对治愈性、缓解性和预防性治疗的提及。为避免疑义,本文中对“治疗”的多次提及还包含对治愈性、缓解性和预防性治疗的多次提及。

[0296] 应理解的是,当在本文中无论何处用语言“包括”来描述实施例时,还提供了根据“由……组成”和/或“主要由……组成”描述的在其它方面类似实施例。

[0297] 在根据马库什(Markush)组或其它替代方案分组来描述本发明的方面或实施例的情况下,本发明不仅涵盖整体列出的整个组,而且还涵盖所述组的单独的每个成员和主组的所有可能子组,也涵盖缺少组成员中的一或多个组成员的主组。本发明还设想明确地排除所要求保护的发明中的组成员中的任何组成员中的一或多个组成员。

[0298] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术术语和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。在发生冲突的情况下,应以本说明书(包含定义)为准。贯穿本说明书和权利要求书,词语“包括(comprise)”或如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”等变体应当被理解为暗示包含所述整数或整数组,但不排除任何其它整数或整数组。除非上下文另外要求,否则单数术语应包含复数含义,并且复数术语应包含单数含义。术语“例如(e.g.或for example)”之后的任何一或多个实例并不意味着穷举或限制。

[0299] 除非另有指示,否则本发明的实践将采用在本领域技术范围内的常规分子生物学(包含重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学技术。

[0300] 现在将参考附图描述本发明的特定非限制性实施例。

[0301] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式:

[0302] 1.一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻

链可变(VL)区,其中

[0303] (a) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYAQSYLH (SEQ ID NO:57)的LCDR1、RGSTRET (SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKESPLT (SEQ ID NO:47)的LCDR3;

[0304] (b) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRET (SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKESPLT (SEQ ID NO:47)的LCDR3;

[0305] (c) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRET (SEQ ID NO:56)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0306] (d) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGIINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:35)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0307] (e) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPSGGLANYAQKFQG (SEQ ID NO:54)的HCDR2和SEITTEFDY (SEQ ID NO:55)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVDSYANSYLH (SEQ ID NO:51)的LCDR1、RGSTRES (LCDR2; SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0308] (f) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:40)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0309] (g) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYAMH (SEQ ID NO:41)的HCDR1、MGWINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:40)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0310] (h) VH区氨基酸序列包括GYTFTSYTMH (SEQ ID NO:34)的HCDR1、MGWINPNGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:42)的HCDR2和QEITTEFDY (SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVSSYANSYLH (SEQ ID NO:37)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSEPLT (SEQ ID NO:39)的LCDR3;

[0311] (i) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYSMH (SEQ ID NO:43)的HCDR1、MGWINPSNGLANYAQKFQG (SEQ ID NO:44)的HCDR2和QEITTEFDI (SEQ ID NO:45)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVESYAQSYLH (SEQ ID NO:46)的LCDR1、RGSTRES (SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKSDPLT (SEQ ID NO:76)的LCDR3;

[0312] (j) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYTMH (SEQ ID NO:48)的HCDR1、MGWINPNGGLASYAQKFQG (SEQ ID NO:49)的HCDR2和SEITTEQDY (SEQ ID NO:50)的HCDR3;并且

VL区氨基酸序列包括RASQSVDSYANSYLH(SEQ ID NO:51)的LCDR1、RGSTRES(SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQSKESPLT(SEQ ID NO:47)的LCDR3;或者

[0313] (k) VH区氨基酸序列包括GYIFTSYTMH(SEQ ID NO:48)的HCDR1、MGWINPNGGSTSYAQKFQG(SEQ ID NO:42)的HCDR2和QEITTEFDY(SEQ ID NO:36)的HCDR3;并且VL区氨基酸序列包括RASQSVESYANSYLH(SEQ ID NO:52)的LCDR1、RGSTRES(SEQ ID NO:38)的LCDR2和QQYGSEPLT(SEQ ID NO:53)的LCDR3。

[0314] 2. 根据实施方式1所述的抗体或抗原结合部分,其中

[0315] (a) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:1,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:2;

[0316] (b) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:3,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:4;

[0317] (c) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:5,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:6;

[0318] (d) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:7,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:8;或者

[0319] (e) VH区氨基酸序列包括SEQ ID NO:9,并且VL区氨基酸序列包括SEQ ID NO:10。

[0320] 3. 一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

[0321] (a) HCDR1包括氨基酸序列G-Y-X₁-F-T-X₂-Y-X₃-M-H,其中X₁是I或任何其它氨基酸,X₂是A或任何其它氨基酸,并且X₃是Y或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:22);

[0322] (b) HCDR2包括M-G-X₁-I-X₂-P-X₃-X₄-G-X₅-X₆-X₇-Y-A-Q-K-F-Q-G,其中X₁是W或任何其它氨基酸,X₂是K或任何其它氨基酸,X₃是N或任何其它氨基酸,X₄是N或任何其它氨基酸,X₅是L或任何其它氨基酸,X₆是A或任何其它氨基酸,并且X₇是N或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:23);

[0323] (c) HCDR3包括X₁-E-I-T-T-X₂-X₃-D-X₄,其中X₁是S或任何其它氨基酸,X₂是E或任何其它氨基酸,X₃是F或任何其它氨基酸,并且X₄是Y或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:24);

[0324] (d) LCDR1包括氨基酸序列R-A-S-Q-S-V-X₁-S-Y-A-X₂-S-X₃-L-X₄,其中X₁是D或任何其它氨基酸,X₂是N或任何其它氨基酸,X₃是F或任何其它氨基酸,并且X₄是H或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:28);

[0325] (e) LCDR2包括X₁-X₂-S-X₃-R-E-X₄,其中X₁是R或任何其它氨基酸,X₂是A或任何其它氨基酸,X₃是T或任何其它氨基酸,并且X₄是S或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:29);并且

[0326] (f) LCDR3包括氨基酸序列Q-Q-X₁-X₂-X₃-X₄-P-L-T,其中X₁是S或任何其它氨基酸,X₂是K或任何其它氨基酸,X₃是E或任何其它氨基酸,并且X₄是D或任何其它氨基酸(SEQ ID NO:30)。

[0327] 4. 一种抗C-MET抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分与根据实施方式1到3中任一项所述的抗体或抗原结合部分交叉竞争与C-MET结合,并且

[0328] (a) 包括完全种系人骨架氨基酸序列;和/或

[0329] (b) 在HCDR2中不包括脱酰胺化位点;和/或

[0330] (c) 在HCDR2中不包括氧化位点;和/或

[0331] (d) 在LCDR1中不包括脱酰胺化位点;和/或

[0332] (e) 在LCDR1中不包括异构化位点;和/或

[0333] (f) 在LCDR1中不包括氧化位点;和/或

- [0334] (g) 在LCDR3中不包括酸水解位点;和/或
- [0335] (h) 在LCDR2中不包括人T细胞表位序列;和/或
- [0336] (i) 在LCDR3中不包括人T细胞表位序列;和/或
- [0337] (j) (j) 与抗体h224G11的等电点相比,表现出更高的等电点;和/或
- [0338] (k) 当呈人IgG4(S228P)形式时,如通过等电聚焦测量的,表现出的等电点为8.0或更高。
- [0339] 5. 根据实施方式1到4中任一项所述的抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是人的、人源化的或嵌合的。
- [0340] 6. 根据实施方式1到5中任一项所述的抗体或抗原结合部分,其中所述VH区、所述VL区或所述VH区和所述VL区两者包括一个或多个人骨架区氨基酸序列。
- [0341] 7. 根据实施方式1到6中任一项所述的抗体或抗原结合部分,其中所述VH区、所述VL区或所述VH区和所述VL区两者包括已经插入有所述CDR的人可变区骨架支架氨基酸序列。
- [0342] 8. 根据实施方式1或3所述的抗体或抗原结合部分,其中所述VH区包括已经插入有HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列的IGHV1-46人种系支架氨基酸序列。
- [0343] 9. 根据实施方式1、3和8中任一项所述的抗体或抗原结合部分,其中所述VL区包括已经插入有LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列的IGKV3-20人种系支架氨基酸序列。
- [0344] 10. 根据实施方式1到9中任一项所述的抗体或抗原结合部分,其中所述抗体包括免疫球蛋白恒定区。
- [0345] 11. 根据实施方式10所述的抗体或抗原结合部分,其中所述免疫球蛋白恒定区是IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY。
- [0346] 12. 根据实施方式11所述的抗体或抗原结合部分,其中所述免疫球蛋白恒定区是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2。
- [0347] 13. 根据实施方式10所述的抗体或抗原结合部分,其中所述免疫球蛋白恒定区是免疫惰性的。
- [0348] 14. 根据实施方式10所述的抗体或抗原结合部分,其中所述免疫球蛋白恒定区是野生型人IgG4恒定区、包括氨基酸取代S228P的人IgG4恒定区、野生型人IgG1恒定区、包括氨基酸取代L234A、L235A和G237A的人IgG1恒定区或野生型人IgG2恒定区。
- [0349] 15. 根据实施方式13所述的抗体或抗原结合部分,其中所述免疫球蛋白恒定区包括SEQ ID NO:11-17中的任一个。
- [0350] 16. 根据实施方式1到15中任一项所述的抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分是Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、单结构域抗体(dAb)、大抗体、微型抗体、胞内抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、v-NAR或双-scFv。
- [0351] 17. 根据实施方式1到16中任一项所述的抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是单克隆的。
- [0352] 18. 根据实施方式1到17中任一项所述的抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是四聚体抗体、四价抗体或多特异性抗体。
- [0353] 19. 根据实施方式1到18中任一项所述的抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是与第一抗原和第二抗原特异性结合的双特异性抗体,其中所述第一抗原是C-MET并且所述第

二抗原不是C-MET。

[0354] 20. 根据实施方式1到19中任一项所述的抗体或抗原结合部分, 其中所述抗体或抗原结合部分与 (a) 人C-MET或 (b) 人C-MET和食蟹猴C-MET特异性结合。

[0355] 21. 根据实施方式1到20中任一项所述的抗体或抗原结合部分, 其中所述抗体或抗原结合部分呈人IgG4形式, 并且其中所述抗体或抗原结合部分具有

[0356] (a) 约77°C到约81°C的熔融温度(T_m); 和/或

[0357] (b) 大于约pH 7.4的等电点(pI)。

[0358] 22. 一种免疫缀合物, 其包括与治疗剂连接的根据实施方式1到21中任一项所述的抗体或抗原结合部分。

[0359] 23. 根据实施方式22所述的免疫缀合物, 其中所述治疗剂是细胞毒素、放射性同位素、化学治疗剂、免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂、促凋亡剂、细胞生长抑制酶、细胞溶解酶、治疗性核酸、抗血管生成剂、抗增殖剂或促凋亡剂。

[0360] 24. 一种药物组合物, 其包括根据实施方式1到21中任一项所述的抗体或抗原结合部分或根据实施方式22或23所述的免疫缀合物以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

[0361] 25. 一种核酸分子, 其对根据实施方式1到21中任一项所述的抗体或抗原结合部分的以下进行编码:

[0362] (a) VH区氨基酸序列;

[0363] (b) VL区氨基酸序列; 或者

[0364] (c) VH氨基酸序列和VL区氨基酸序列两者。

[0365] 26. 一种表达载体, 其包括根据实施方式25所述的核酸分子。

[0366] 27. 一种重组宿主细胞, 其包括根据实施方式25所述的核酸分子或根据实施方式26所述的表达载体。

[0367] 28. 一种产生抗C-MET抗体或其抗原结合部分的方法, 所述方法包括:

[0368] 将包括根据实施方式26所述的表达载体的重组宿主细胞在使所述核酸分子得到表达的条件下培养, 由此产生所述抗体或抗原结合部分; 以及

[0369] 从所述宿主细胞或培养物中分离所述抗体或抗原结合部分。

[0370] 29. 一种用于增强受试者的免疫应答的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方式1到21中任一项所述的抗体或抗原结合部分、根据实施方式22或23所述的免疫缀合物或根据实施方式24所述的药物组合物。

[0371] 30. 一种治疗受试者的癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、心血管疾病或纤维化疾病的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方式1到21中任一项所述的抗体或抗原结合部分、根据实施方式22或23所述的免疫缀合物或根据实施方式24所述的药物组合物。

[0372] 31. 根据实施方式30所述的方法, 其中所述癌症是胃肠道间质瘤(GIST)、胰腺癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、周围神经系统癌、食道癌、宫颈癌、子宫或子宫内膜癌、口腔癌或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆道癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤或血液组织癌。

[0373] 32. 根据实施方式30所述的方法, 其中所述自身免疫性疾病或所述炎性疾病是关节炎、哮喘、多发性硬化症、牛皮癣、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、炎性肠病、狼疮、格雷夫氏病 (Grave's disease)、桥本氏甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis) 或强直性脊柱炎。

[0374] 33. 根据实施方式30所述的方法, 其中所述心血管疾病是冠心病或动脉粥样硬化。

[0375] 34. 根据实施方式30所述的方法, 其中所述纤维化疾病是心肌梗塞、心绞痛、骨关节炎、肺纤维化、囊性纤维化、支气管炎或哮喘。

[0376] 35. 根据实施方式1到21中任一项所述的抗体或抗原结合部分、根据实施方式22或23所述的免疫缀合物或根据实施方式24所述的药物组合物, 其用于治疗癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、心血管疾病或纤维化疾病。

[0377] 36. 根据实施方式35所述的供使用的抗体或抗原结合部分、免疫缀合物或药物组合物, 其中所述癌症是胃肠道间质瘤 (GIST)、胰腺癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、周围神经系统癌、食道癌、宫颈癌、子宫或子宫内膜癌、口腔癌或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆道癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤或血液组织癌。

[0378] 37. 根据实施方式35所述的供使用的抗体或抗原结合部分、免疫缀合物或药物组合物, 其中所述自身免疫性疾病或所述炎性疾病是关节炎、哮喘、多发性硬化症、牛皮癣、克罗恩氏病、炎性肠病、狼疮、格雷夫氏病、桥本氏甲状腺炎或强直性脊柱炎。

[0379] 38. 根据实施方式35所述的供使用的抗体或抗原结合部分、免疫缀合物或药物组合物, 其中所述心血管疾病是冠心病或动脉粥样硬化。

[0380] 39. 根据实施方式35所述的供使用的抗体或抗原结合部分、免疫缀合物或药物组合物, 其中所述纤维化疾病是心肌梗塞、心绞痛、骨关节炎、肺纤维化、囊性纤维化、支气管炎或哮喘。

[0381] 40. 根据实施方式1到21中任一项所述的抗体或抗原结合部分、根据实施方式22或23所述的免疫缀合物或根据实施方式24所述的药物组合物, 其用作药剂。

[0382] 实例1: 经过优化的抗C-MET治疗性抗体的产生

[0383] 介绍

[0384] 在此实例中, 成功产生了一组经过优化的拮抗性抗C-MET抗体。这些抗C-MET抗体良好表达、生物物理上稳定、高度可溶并且与优选的人种系具有最高的氨基酸序列同一性。

[0385] 材料和方法

[0386] C-MET文库产生和选择

[0387] 通过大规模寡核苷酸合成和PCR组装C-MET Fab库。然后, 将经过扩增的Fab库通过限制-连接克隆到噬菌粒载体中, 转化到大肠杆菌TG-1细胞中, 并且基本上如先前详细描述的那样拯救噬菌体库 (Finlay等人, 2011, 《分子生物学方法 (Methods Mol Biol.)》681: 383-401)。

[0388] 通过以下来进行噬菌体选择: 用经过生物素化的C-MET靶蛋白 (人或食蟹猴) 涂覆链霉亲和素磁性微珠, 将珠粒用PBS洗涤三次并重悬于pH为7.4的PBS加上5%脱脂乳蛋白中。在第1轮选择中, 将这些珠粒以100nM靶蛋白涂覆, 之后在随后的三轮中降低抗原浓度。在每一轮中, 在重新感染到TG1细胞中之前, 使用胰蛋白酶洗脱噬菌体。

[0389] 周质提取物产生 (小规模)

[0390] 在单独的大肠杆菌克隆中产生可溶性Fab。用异丙基1-硫-β-D-吡喃半乳糖苷诱导对数生长期的大肠杆菌TG1细胞。通过冷冻/解冻循环产生含有可溶性Fab的周质提取物：将细菌细胞团粒在-20℃下冷冻过夜，然后在室温下解冻，并重悬于pH为7.4的PBS中。在室温下振荡并离心后收集含有可溶性Fab的上清液。

[0391] IgG表达和纯化

[0392] 将对前导组抗C-MET抗体的重链和轻链可变结构域连同h224G11和经移植物(移植物)进行编码的哺乳动物密码子优化的合成基因克隆到分别包括IgG4(S228P) (“IgG4(S228P)”；在铰链中含有使分子的三级结构稳定的S228P突变的人IgG4)和人Cκ结构域的哺乳动物表达载体中。将含重链和轻链载体共转染到哺乳动物表达系统中，然后对IgG进行基于蛋白质A的纯化，在变性和非变性SDS-PAGE上进行定量和QC。

[0393] Fab和IgG的直接结合ELISA

[0394] 初始地，通过结合ELISA评估前导组与重组蛋白的结合和交叉反应性。将人C-MET人Fc标记的重组蛋白和食蟹猴C-MET人Fc标记的重组蛋白以1μg/ml涂覆到MaxiSorp™平底96孔板的表面上。以两倍连续稀释从500nM到0.98nM滴定经过纯化的IgG样品，并允许其与经过涂覆的抗原结合。使用小鼠抗c-myc抗体，然后使用与辣根过氧化物酶缀合的驴抗小鼠IgG来检测Fab。使用与辣根过氧化物酶缀合的小鼠抗人IgG来检测IgG。用3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液(TMB)使结合信号可视化，并在450nm下测量吸光度。如前所述通过ELISA在带负电的生物分子表面上进行IgG结合分析以计算脱靶结合和PK风险(参见Avery等人，2018,《单克隆抗体(MAbs)》10:(2),244-255)。

[0395] IgG4(S228P)抗体的Alphascreen表位竞争测定

[0396] 在384孔白色微量滴定板(葛莱娜公司(Greiner))中以25μl的最终体积进行AlphaScreen测定(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))。反应缓冲液含有pH为7.3的1x PBS(Oxoid公司(Oxoid),目录号BR0014G)和0.05%(v/v) Tween® 20(西格玛公司(Sigma),目录号P9416)。以三倍连续稀释以50nM的最终浓度开始滴定经过纯化的IgG样品，并在室温下与最终浓度为1nM的经过生物素化的人C-MET-His(Acrobiosystems公司(Acrobiosystems))一起温育20分钟。添加亲本IgG和抗人IgG4(S228P)受体珠，并将混合物在室温下温育1小时。随后添加链霉亲和素供体珠，并在室温下温育30分钟。在EnVision多标签读板器(珀金埃尔默公司)中测量光的发射，并使用EnVision管理器软件进行分析。将值报告为每秒计数(CPS)，并针对串扰进行校正。

[0397] IgG在溶液中对单体人和食蟹猴C-MET的亲合力的Biacore®分析

[0398] 在Biacore® 3000(GE)上用含抗原溶液通过SPR确定经过纯化的IgG的亲合力(KD)。针对两个通道，按照向导说明，使用胺偶联在pH为4.5的乙酸盐缓冲液中将小鼠抗人抗体(CH1特异性)固定在CM5传感器芯片上，达到2000RU的水平。一个通道用于背景信号校正。使用pH为7.4的标准运行缓冲液HBS-EP。通过以20微升/分钟单次注射pH为1.5的10μl 10mM甘氨酸进行再生。以30微升/分钟以50nM注射IgG样品，持续2分钟，然后是60秒的解离速率。以30微升/分钟以两倍连续稀释从100nM到6nM注射单体抗原(经过His标记的人C-MET或经过His标记的食蟹猴C-MET)，持续2分钟，然后是300秒的解离速率。使用Biacore® 3000评估(BIA评估)软件分析获得的传感图。通过相对于1:1Langmuir结合模型同时拟合缔

合相和解离相来计算KD。

[0399] IgG的流式细胞术

[0400] 在FAC中测试经过纯化的IgG与在CHO-K1稳定细胞系和CHO-K1野生型细胞上表达的人和食蟹猴C-MET的结合。以三倍连续稀释从500nM到0.08nM滴定IgG样品。用与FITC缀合的小鼠抗人IgG检测IgG的结合。通过在流式细胞仪(Attune™ NxT声波聚焦细胞仪,英杰公司(Invitrogen)/赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific))的BL-1通道检测器中检查每样品10000个细胞的平均荧光强度(MFI)来分析结果。在GraphPad Prism软件(加利福尼亚州拉贾亚市的GraphPad软件公司(GraphPad Software, La Jolla, CA))中使用MFI值和4个参数来计算EC50值。

[0401] 抗体v结构域T细胞表位含量:计算机分析

[0402] 使用基于鉴定T细胞表位在治疗性抗体和蛋白质中的位置的计算机技术(Abzena有限公司(Abzena, Ltd.))来评估抗体v结构域中的潜在免疫原性。使用iTope™来分析与人MHC II类具有杂乱高亲和力结合的肽的关键前导的VL和VH区序列。杂乱高亲和力MHC II类结合性肽被认为与T细胞表位的存在相关,所述T细胞表位是药物蛋白质的临床免疫原性的高风险指示。iTope™软件预测肽的氨基酸侧链与34个人MHC II类等位基因的开放端结合凹槽内的特定结合袋(具体地袋位置;p1、p4、p6、p7和p9)之间的有利相互作用。这些等位基因表示世界上最常见的HLA-DR等位基因,而在任何特定种族群体中最普遍存在的等位基因不占任何权重。所述等位基因中有二十个等位基因含有“开放式”p1构型,并且14个含有“封闭式”构型,其中位置83处的甘氨酸被缬氨酸替代。关键结合残基的位置是通过在计算机中产生与跨越测试蛋白质序列重叠八个氨基酸的9mer肽来实现的。此过程以高准确度成功地区分与MHC II类分子结合或不与其结合的肽。

[0403] 此外,使用TCED™(T Cell Epitope Database™)来搜索与先前通过其它蛋白质序列的体外人T细胞表位作图分析鉴定的T细胞表位的匹配来分析所述序列。TCED™用于在由源自不相关的蛋白质和抗体序列的肽构成的大型(>10,000个肽)数据库中搜索任何测试序列。

[0404] 差示扫描量热法(DSC)分析

[0405] 使用运行版本1.22软件的MicroCal PEAQ-DSC(英国马尔文的马尔文仪器公司(Malvern Instruments, Malvern, UK))对测试物品的Tm进行分析。将样品以200°C/小时的速率在20到110°C的范围内加热。基于蛋白质浓度对热数据进行归一化。根据加热扫描数据确定蛋白质的Tm。

[0406] 电荷变体测定

[0407] 根据制造商的方案,在LabChip GXII Touch HT(英国比肯斯菲尔德的珀金埃尔默公司(PerkinElmer, Beaconsfield, UK))上通过蛋白质电荷变体测定确定测试物品的电荷变体曲线。

[0408] 等电聚焦测定

[0409] 对前导IgG4(S228P)蛋白进行IEF分析,以评估pI的可能差异。使用Invitrogen™Novex™pH 3-10IEF蛋白凝胶,使用Novex™IEF样品缓冲液pH 3-10,Novex™IEF阳极和阴极缓冲液进行电泳。

[0410] 基于IEF pI标志物值(Serva公司(Serva))估计pI值。包含本妥昔单抗和英夫利昔

单抗IgG1作为对照物。

[0411] 结果和讨论

[0412] CDR移植到优选的人种系 ν 基因上

[0413] 初始地,使用CDR移植将拮抗性鼠抗C-MET IgG 224G11(224G11;参见WO 2011151412A1和表2)的CDR引入到人种系免疫球蛋白 ν 结构域骨架序列支架中。为了使工程努力偏向于具有最佳的药物样性质的最终领先的治疗性IgG化合物,选择将亲本抗体的CDR移植到“优选的”种系支架IGHV1-46和IGKV3-20上,已知所述种系支架具有良好溶解性、高物理稳定性并在经过表达的人抗体库中高频率使用。

[0414] 在表2中概述了这些支架和所移植CDR的定义。在表2中还示出了嵌合性抗C-MET抗体m224G11和人源化h224G11的重链和轻链序列。尽管此CDR移植过程是众所周知的,但是预测给定的一组人 ν 结构域序列是否将充当非人CDR移植的合适受体骨架仍然是个问题。使用不合适的骨架可能导致靶结合功能丧失、蛋白质稳定性问题或者甚至最终IgG的表达受损。因此,后来将IGHV1-46/IGKV3-20移植物作为CDR诱变和选择经过改进的克隆的模板。

[0415] 文库产生和筛选

[0416] 将经过CDR移植的IGKV3-20/IGHV1-46 ν 结构域序列组合成Fab噬菌体展示形式,并通过寡核苷酸合成和组装产生诱变文库盒。将最终的Fab文库连接到噬菌体展示载体中,并通过电穿孔转化到大肠杆菌中,以产生 2.5×10^9 个独立的克隆。通过跨两个 ν 结构域对96个克隆进行测序来验证文库构建质量。此测序数据表明,已经以约50%(或者例如,在对3个氨基酸进行编码的位置中为33%)的频率对每个变化位置处的鼠或人种系残基进行编码的位置进行了有效采样。使用辅助噬菌体M13拯救文库,并在多个独立的分支中对经过生物素化的人和食蟹猴C-MET-Fc蛋白进行选择。

[0417] 选择后筛选和DNA测序表明,存在131个独特的人和食蟹猴C-MET结合性Fab克隆,所述人和食蟹猴C-MET结合性Fab克隆在ELISA(图1A)中表现出与人和食蟹猴C-MET的强结合并且在Alphascreen测定(图1B)中对224G11 IgG4(S228P)与人C-MET的结合的抑制作用>50%。在这131个克隆中,骨架序列保持完全种系,而在所有CDR中还观察到人源化突变(表3)。基于CDR种系化水平相对于与人和食蟹猴C-MET-Fc两者的结合的ELISA和Alphascreen信号对前导克隆进行排名。然后,将来自此排名的前9个克隆的 ν 结构域亚克隆到IgG表达载体中,以进行如下的进一步测试(表4)。

[0418] 虽然在直接源自文库选择的前导克隆的所有CDR中都观察到了种系化突变,但仍然可能的是,序列分析可能将进一步的克隆设计成具有最大程度人源化。因此,将具有针对人和食蟹猴蛋白质的结合信号的131个序列独特的命中用于分析此功能表征群体的CDR中鼠氨基酸的保留频率。将位置氨基酸保留频率表示为在 V_L 结构域和 V_H 结构域中存在的百分比(分别地,图2A和B)。在一系列组合设计中,将RF<75%的鼠残基视为可能不是靶结合互补位所必需的并且可能对种系化开放的位置(表4)。在令人惊讶的发现中,HCDR1和HCDR2中的10个鼠残基均未表现出高于75%的保留频率(图2A)。此分析强有力地表明,可以使HCDR3外部的整个 V_H 序列与IGHV1-46具有种系同一性。相比而言,在 V_L 结构域中,源自h224G11序列的16个鼠CDR残基中的8个鼠CDR残基以>75%的频率保留(图3A)。

[0419] 对含有RF>75%的那些鼠残基的组合的设计赋予前缀“MH”(MH=最大程度人源化)。总共产生4个设计 V_H 结构域和3个设计 V_L 结构域。将这些构建体以矩阵方式共转染,以创

建总共12种最终设计IgG(表4)。通过基因合成产生MH和文库源性克隆v结构域并且将其(连同对照抗体)克隆到人表达载体中以便以IgG4(S228P)形式产生。所有IgG均容易表达且易于从哺乳动物细胞的瞬时转染纯化。

[0420] 前导IgG特异性和效力特性

[0421] 然后,以直接滴定ELISA形式测试上文所描述的经过纯化的IgG与人和食蟹猴C-MET-Fc的结合(图3A和B)。此分析表明,所有文库源性和设计(MH)克隆均保留了对人和食蟹猴C-MET的结合活性,所述结合活性与h224G11 IgG4(S228P)的结合活性相当或相对于后者有所提高。

[0422] 建立Alphascreen测定,以测试IgG和h224G11 IgG在与经过生物素化的单体人C-MET结合方面的表位竞争。在此测定中,更有效地区分表现最好的文库源性和设计IgG。虽然所有克隆均表现出完全浓度依赖性中和作用,并且大多数克隆相比h224G11对h224G11表位表现出相当或提高的竞争(图4),但有些克隆表现出的表位竞争效力较低,包含:08B12、04E10、09B08、07C10。

[0423] 对所有IgG与溶液相单体人和食蟹猴C-MET蛋白的结合亲和力进行Biacore®分析。在所有情况下,均获得了具有低Chi²值的准确的1:1结合亲和力(表5)。这些分析表明,在Fab和IgG ELISA和Alphascreen测定中始终产生最高EC50和IC50值的文库源性克隆显示出与人和食蟹猴C-MET的最高亲和力结合。出乎意料的是,与h224G11相比,文库源性克隆08G07、04F09、09E04、07A01和设计克隆MH4和MH7全都表现出对人C-MET的结合亲和力显著提高(表5)。重要的是,这些亲和力提高在食蟹猴结合中得以重演,其中这些克隆中的每个克隆表现出的亲和力在人C-MET亲和力的2倍之内。人与食蟹猴靶直系同源物之间小于3倍的亲和力差异在临床前药物开发分析中高度有益,因为它们可以允许对例如猴安全性、PK和PD建模实验进行显著更好的设计和解释。Biacore®分析还表明,在Alphascreen测定(图4)中观察到的克隆08B12、04E10、09B08、07C10的表位竞争效力降低是由人C-MET结合亲和力降低,而非结合表位的任何改变驱动的。

[0424] 另外,对MH克隆的亲和力的比较证实了LCDR3在维持结合亲和力方面的影响,因为相比克隆MH7,位置3和4处的残基“SK”的突变均导致克隆MH8和MH9对人和食蟹猴C-MET两者的KD损失约10到20倍(表5)。对克隆MH4和MH10的比较还证实,HCDR1残基8的突变(T到A)导致克隆MH10对人C-MET的结合亲和力降低约2倍,但对食蟹猴C-MET的亲和力没有显著降低(表5)。然而,重要的是,克隆MH10中的此T>A突变使HCDR1对于人种系序列IGHV1-3来说是完全种系的。由于IGHV1-3和IGHV1-46在从T>A突变起的N或C端方向上都是序列相同的10个氨基酸,因此由于胸腺耐受性,这使HCDR1序列对人t细胞表位来说是完全去免疫的(人t细胞表位基于核心9-mer氨基酸序列)。

[0425] 上文概述的发现证实,MH7克隆可以完全保留h224G11的结合亲和力、表位特异性和物种交叉反应性(并且相对于后者有所提高),同时在VH结构域中仅保留单个非种系氨基酸(不包含不存在对应种系的HCDR3)。另外,MH7的完全种系化HCDR2去除了h224G11抗体中存在的3个潜在的氨基酸开发责任序列:位置3(W)处的推定氧化风险加上位置7和8(均为N)处的两个脱酰胺化风险基序。在MH7的轻链中,去除了h224G11中存在的三个另外的开发责任序列:LCDR1位置7中的“DS”天冬氨酸异构化基序和LCDR1位置13(F)处的氧化风险以及LCDR3中位置6处的“DP”酸水解基序。这些一级序列改善在抗体治疗剂的制造和临床开发两

者中具有直接后果,因为它们全都是潜在的蛋白质降解风险基序,从而导致内在产物异质性。这种风险基序可能导致成本高昂的开发问题,其中必须进行多个过程修饰以最大化完整抗体产量并最小化产物异质性。降解基序也是临床开发风险,因为体内的抗体分解加速会降低分子的半衰期和效力。

[0426] 在细胞膜处的前导IgG结合特异性的流式细胞术分析

[0427] 通过流式细胞术分析C-MET抗体在细胞表面处的浓度依赖性结合。用人或食蟹猴C-MET全长cDNA稳定地转染CHO-K1细胞。然后,在500-0.08nM的浓度范围内以IgG4 (S228P)形式测试所有抗C-MET IgG和同种型对照IgG4 (S228P) 与人(图5A)和食蟹猴(图5B)CHO-K1细胞的结合。除了同种型对照物之外,所有IgG均显示出与人和食蟹猴C-MET+细胞的浓度依赖性结合,所述浓度依赖性结合与h224G11的浓度依赖性结合相当或相对于后者有所提高,其中在每种情况下,最大MFI均比同种型IgG4的观察到的背景信号高10倍以上。与h224G11相比,包含MH1、MH4、MH7和MH10在内的若干个克隆表现出与人和食蟹猴+CHO-K1细胞的结合的结合曲线较强并且EC50值有所提高(表6)。

[0428] 抗体v结构域T细胞表位分析

[0429] 将基于鉴定T细胞表位在治疗性抗体和蛋白质中的位置的计算机技术(Abzena有限公司)用于评估h224G11和前导抗体v结构域两者的免疫原性。用重叠的9mer肽(其中每个肽与最后一个肽重叠8个残基)分析v-结构域序列,针对34种MHC II类同种异型中的每一种对所述肽进行测试。基于潜在的“拟合”以及与MHC II类分子的相互作用对每个9mer进行评分。通过软件计算的肽得分介于0与1之间。突出显示产生高平均结合得分(在iTope™评分功能中,>0.55)的肽,并且如果>50%的MHC II类结合性肽(即,34个等位基因中的17个)具有高结合亲和力(得分>0.6),则此类肽被定义为是被视为有高风险含有CD4+T细胞表位的“高亲和力”MHC II类结合性肽。低亲和力MHC II类结合性肽与大量(>50%)等位基因结合,其中结合得分>0.55(但并不是多数>0.6)。使用TCED™对序列进行进一步分析。将序列用于通过BLAST搜索来查询TCED™,以便鉴定来自在Abzena有限公司进行的先前体外T细胞表位作图研究中刺激T细胞应答的无关蛋白质/抗体的肽(T细胞表位)之间的任何高序列同源性。

[0430] 将肽分为以下四类:高亲和力外来(“HAF”-高免疫原性风险)、低亲和力外来(“LAF”-低免疫原性风险)、TCED+ (先前在TCED™数据库中鉴定的表位)和种系表位(“GE”-具有高MHC II类结合亲和力的人种系肽序列)。由于T细胞耐受性,种系表位9mer肽不太可能具有免疫原性潜力,这已经通过使用广泛的种系肽进行的研究得以验证。重要的是,这种种系v结构域表位(进一步由人抗体恒定区中的类似序列辅助)还竞争在抗原呈递细胞的膜处进行MHC II类占据,从而降低外来肽呈递足以达到T细胞刺激所需的“活化阈值”的风险。因此,高GE含量是抗体治疗剂的临床开发中的一种有益特性。

[0431] 如表7所示,尽管已经将h224G11 v结构域序列人源化到种系骨架序列上,但发现其仍含有显著的外来表位风险。在VL结构域中,发现h224G11含有两个HAF肽基序(“LLIYRASTR”(SEQ ID NO:91)和“IYRASTRES”(SEQ ID NO:92),两者均含有LCDR2残基)和一个LAF基序(“VAVYYCQQS”(SEQ ID NO:93))。在VH结构域中,也发现h224G11含有两个HAF肽基序(“IFTAYTMH”(SEQ ID NO:94),其含有HCDR1残基;以及“VYYCARSEI”(SEQ ID NO:95),其含有HCDR3残基)和一个LAF基序(“MGWIKPNNG”(SEQ ID NO:96),其含有HCDR2残基)。

[0432] 与h224G11相比,关键前导v结构域表现出肽表位含量的显著有益变化(表7)。由于

已经对在不需要h224G11的CDR(表2、表4)中包含的许多鼠残基的情况下维持抗MET效力的抗体成功选择了此处进行的v结构域工程化过程,所以在文库源性和设计克隆中烧蚀了h224G11的v结构域中存在的多个HAF和LAF表位,从而导致HAF和/或LAF含量降低(表7)。还发现GE表位含量在前导克隆的VH区中显著增加,并且在任何前导克隆中均未观察到TCED+表位(表7)。这些发现通过克隆MH7例示,其中VH结构域CDR 1和2的近乎完全的种系化不仅去除了若干个开发责任序列(如上文所描述的),而且烧蚀了HAF肽基序“IFTAYTMHW”(SEQ ID NO:97)和LAF基序“MGWIKPNNG”(SEQ ID NO:96),同时安置了两个跨越骨架II和HCDR2(“LEWMGIINP(SEQ ID NO:97)”和“MGIINPSGG”(SEQ ID NO:98))的新GE。因此,克隆MH7在其VH结构域中仅留下单个潜在的外来表位(表7)。

[0433] 重要的是,观察到,在LCDR1中进行的去除若干个前导(表4)中的开发责任基序的广泛诱变并未产生任何T细胞表位风险基序。还通过在前导克隆的CDR中存在的种系化突变消除了h224G11 VL序列中存在的多个外来表位。例如,发现在位置9处含有突变S>T的所有前导克隆中烧蚀了h224G11的LCDR2中存在的HAF肽“IYRASTRES”(SEQ ID NO:92)(表4)。类似地,在如在多个文库源性和设计克隆中存在的LCDR3序列“QQYGSEPLT”(SEQ ID NO:53)和“QQSKESPLT”(SEQ ID NO:47)中烧蚀了h224G11的LCDR3中的LAF肽基序(表4)。由于克隆MH7和07A01两者均含有免疫原性潜力降低的多个CDR序列,并且相比h224G11表现出表位特异性得以维持并且亲和力得以提高(表5,图4),因此上文的发现允许设计第二代最大程度去免疫的克隆MH7-1、MH7-2和MH7-3(表7、表8)。克隆MH7-3不仅提高了克隆MH7的预测的免疫原性,而且还通过转化具有基序“QS”的LCDR1的位置11和12处的氨基酸“NS”去除了最终的CDR氨基酸责任基序(脱酰胺化风险位点)(表8)。

[0434] 第二代设计克隆的分析

[0435] 克隆MH7-1、MH7-2和MH7-3易于表达并纯化为IgG4(S22P),并且然后以直接滴定ELISA形式测试与人和食蟹猴C-MET-Fc的结合(图6A、6B)。此分析表明,所有3个克隆全都保留了对人和食蟹猴C-MET的完全结合活性,所述完全结合活性与h224G11、经移植物、MH7和08G07 IgG4(S228P)蛋白的完全结合活性相当或相对于后者有所提高。

[0436] 然后使用如上文所描述的Alphascreen测定来测试IgG和h224G11 IgG在与经过生物素化的单体人C-MET结合方面的表位竞争。此分析表明,所有3个克隆均保留了与h224G11的完全表位反应性相当的完全表位反应性(图7)。

[0437] 在流式细胞术分析中,在500-0.08nM的浓度范围内以IgG4(S228P)形式分别测试克隆08G07、MH7、MH7-1、MH7-2、MH7-3、h224G11、经移植物和同种型对照IgG与人(图8A)、食蟹猴(图8B)和未经转染(图8C)的CHO-K1细胞的结合。除了同种型对照物之外,所有IgG均显示出与人和食蟹猴C-MET+细胞的浓度依赖性结合,所述浓度依赖性结合与h224G11的浓度依赖性结合相当或相对于后者有所提高,其中在每种情况下,最大MFI均比同种型IgG4的观察到的背景信号高10倍以上。在任何IgG中均未观察到针对未经转染的细胞的结合。

[0438] 在旨在鉴定人体内不良PK风险的多反应性ELISA中(Avery等人,《单克隆抗体》,2018),克隆08G07、MH7、MH7-1、MH7-2、MH7-3和h224G11全都显示出针对胰岛素和dsDNA两者的基线信号(所有反应评分均为1.0)。这些信号低于临床上批准的阴性对照抗体贝伐单抗和优特克单抗的信号(评分4.0-6.0)。在人体内的PK很短的阳性对照抗体布雷奴单抗和博科西单抗两者均表现出>15.0的强阳性信号。

[0439] 在对与经过纯化的重组胞外域的结合亲和力的Biacore®分析中,克隆MH7-1、MH7-2、MH7-3全都保留了对C-MET的人和食蟹猴两者的直系同源物的高结合亲和力(表9)。

[0440] 电荷变体分析

[0441] 电荷异质性分析在表征单克隆抗体方面很重要,因为其提供有关产物质量、均匀性和稳定性的信息。酶促转译后修饰(如糖基化、赖氨酸截短)或纯化和储存期间的化学修饰(如氧化或脱酰胺化)可能引起重组蛋白的异质性。蛋白质电荷变体测定(如LabChip® GXII Touch HT)允许相对于主峰鉴定碱性和酸性蛋白质变体。这种微流控芯片技术在荧光标记之后对蛋白质电荷变体进行电泳分离。在图10中描绘了使用此方法分析的呈IgG4(S228P)形式的六种抗体(08G07、MH7、MH7-1、MH7-2、MH7-3和h224G11)的电荷变体曲线。对于人IgG而言,不同寻常的是,h224G11的IgG4形式在可用的测定中未实现全分辨率,这是由于其pI值明显很低(制造商建议的主要亚型的pI范围为7.0到9.5),因此,当分析此蛋白质时,仅鉴定出3种亚型,因为可能无法分辨其它酸性更高(pI<7.0)的亚型(图10)。相比之下,呈IgG4形式的克隆08G07、MH7、MH7-1、MH7-2、MH7-3显示出更均匀、分辨率好、复杂度低的曲线,其中主要亚型占总蛋白质的60%以上。图10中所示的曲线表明,h224G11 IgG4的主要亚型的pI接近7.0,而克隆08G07、MH7、MH7-1、MH7-2和MH7-3IgG4的pI全都显著更高,这是由于与h224G11相比,所述克隆的一级CDR序列中带负电的残基数量减少。另外,与h224G11相比,克隆08G07、MH7、MH7-1、MH7-2和MH7-3的CDR中的脱酰胺化风险基序的含量降低可以进一步减少-ve电荷(酸性)变体的存在。与h224G11相比,呈IgG4形式的前导克隆的pI的这种意想不到的显著增加在临床调配中可能非常有益。优选的是,用于抗体液体调配物的缓冲液的pH为酸性pH,如pH 6,以最小化例如脱酰胺化事件在储存期间的进展。为了使抗体在溶液中聚集的风险最小化,因此有益的是,最终抗体的主要功能性pI在碱性范围内,高于pH 7.4,并且优选地高于pH 8.0。

[0442] 另外,在DSC测定中对呈IgG4(S228P)形式的所有抗体08G07、MH7、MH7-1、MH7-2、MH7-3和h224G11进行分析,以确定其热稳定性,这是分子的总体物理稳定性的替代度量(图11)。发现所有6种IgG具有高度类似的热稳定Fab结构,其中T_m值的跨度很窄(77.2-80.6℃)。

[0443] 由于无法通过电荷变体测定分辨h224G11的电荷亚型的完整范围,因此通过等电聚焦(IEF)实验性地检查了h224G11和前导克隆08G07、MH7、MH7-1、MH7-2和MH7-3的pI特性。还包含对照IgG1蛋白本妥昔单抗和英夫利昔单抗,并且其显示出预期的曲线(图12)。在此分析中,证实了电荷变体测定的发现,其中克隆h224G11表现出的pI范围显著低于在08G07、MH7、MH7-1、MH7-2和MH7-3中观察到的pI范围(图12)。对于克隆h224G11,其IgG4(S228P)蛋白跨pI范围7.4到约8.2表现出可见的电荷亚型(IEF上的带)。在7.4范围内的电荷亚型不仅是一种调配风险,而且还有风险使血液中的溶解度差,因为所述电荷亚型的pI与哺乳动物血液的pH相同,从而可能导致在人体内聚集。相比而言,前导克隆08G07表现出从>7.8到约8.3的可见亚型(图12)。重要的是,克隆MH7、MH7-1、MH7-2和MH7-3相对于08G07全都又进一步有所提高。实际上,直到克隆MH7.3的克隆的pI的逐步提高是明显的,所述克隆MH7.3从pI 8.0到>8.3表现出一系列可见亚型,其中主要亚型处于8.3处(图12)。由于所有前导克隆的v结构域骨架区都相同,因此,此发现再次表明,非人诱变的应用以及CDR中的带负电的残基和天冬酰胺的去除不仅明确驱动了CDR环中的转译后修饰的风险降低,而且还驱动了前导

克隆的总体真实pI值的显著提高,从而提高所有克隆08G07、MH7、MH7-1、MH7-2和MH7-3的调配质量和潜在的体内表现。

[0444] 本文概述的组合分析表明,令人惊讶的是,对这些抗体的CDR中的种系和非种系氨基酸两者进行深度采样允许同时优化最终分子的免疫原性风险和化学稳定性风险两者,而不会显著损害最终分子的效力或生物物理稳定性。

[0445] 尽管已经参考优选实施例或示例性实施例描述了本发明,但是本领域的技术人员将认识到,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对本发明进行各种修改和变化,并且本文中清楚地设想到了此类修改。既不旨在对本文所公开的和在所附权利要求中阐述的具体实施例进行限制,也不应推断出任何限制。

[0446] 本文所引用的所有文档或文档部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文,特此明确地出于任何目的通过引用整体并入。如果所并入文档或文档部分中的一个或多个定义的术语与本申请中所述术语的定义相矛盾,则以本申请中出现的定义为准。然而,对本文所引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请的提及并不并且不应当被视为对其构成有效的现有技术或形成世界上任何国家的公知常识的一部分的承认或任何形式暗示。

[0447] 表1.此处所定义的224G11抗C-MET CDR的氨基酸序列(“统一”方案)与替代性定义的比较。

方案	<u>HCDR1</u>	<u>HCDR2</u>	<u>HCDR3</u>	<u>LCDR1</u>	<u>LCDR2</u>	<u>LCDR3</u>
统一	GYIFTA	MGWIKPNN	SEIT	KSSESVDSY	RA	QQSKE
	YTMH	GLANYAQK	TEFDY	ANSFLH	STRES	DPLT
	(SEQ ID	FQG	(SEQ ID	(SEQ	(SEQ	(SEQ
	NO:	(SEQ ID NO:	NO:	(SEQ ID NO:	ID NO:	ID NO:
	100)	106)	113)	117)	121)	123)
Kab at	AYT	WIKPNNG	SEIT	KSSESVDSY	RA	QQSKE
	MH	LANYAQKF	TEFDY	ANSFLH	STRES	DPLT
	(SEQ ID	QG	(SEQ ID	(SEQ ID NO:	(SEQ	(SEQ
	NO:	(SEQ ID NO:	NO:	117)	ID NO:	ID NO:
	101)	107)	113)		121)	123)
Chot ia	GYIFTA	KPNNG	SEIT	KSSESVDSY	RA	QQSKE
	Y	L	TEFDY	ANSFLH	STRES	DPLT
	(SEQ ID		(SEQ ID	(SEQ ID NO:	(SEQ	(SEQ
	NO:	(SEQ ID NO:	NO:	117)	ID NO:	ID NO:
	102)	108)	113)		121)	123)
IMG T	GYIFTA	IKPNNG	ARSEIT	ESVDSY	RA	QQSKE
	YT	LA	TEFDY	ANSF	S	DPLT
	(SEQ ID		(SEQ ID	(SEQ ID NO:	(SEQ	(SEQ

	NO: 103)	(SEQ ID NO: 109)	NO: 114)	118)	ID NO: 123)	ID NO: 123)
	ASGYIF	IKPNNG	SEIT	SSESVDSY	RA	SKE
	TAYTM	LANYAQKF	TEFD	ANSF	STRES	DPL
	H	QG	(SEQ ID NO: 115)	(SEQ ID NO: 119)	(SEQ ID NO: 121)	(SEQ ID NO: 124)
	(SEQ ID NO: 104)	(SEQ ID NO: 110)				
	GYIFTA	WIKPNNG	SEIT	KSESVDSY	RA	QQSKE
[0449]	YTMH	LAN	TEFDY	ANSFLH	STRES	DPLT
	(SEQ ID NO: 100)	(SEQ ID NO: 111)	(SEQ ID NO: 113)	(SEQ ID NO: 117)	(SEQ ID NO: 121)	(SEQ ID NO: 123)
	TAYT	MGWIKPNN	ARSEIT	VDSY	LLIYR	QQSKE
	MH	GLAN	TEFD	ANSFLHWY	ASTRE	DPL
	(SEQ ID NO: 105)	(SEQ ID NO: 112)	(SEQ ID NO: 116)	(SEQ ID NO: 120)	(SEQ ID NO: 122)	(SEQ ID NO: 125)
	Cont act					

[0450] 表2.h224G11抗C-MET v结构域和人种系CDR移植物的氨基酸序列。

<u>V 结构域</u>	<u>人种系¹</u>	<u>氨基酸序列²</u>
h224		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTMHWV
G11- VH	IGHV1-2	RQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANYAQKFOGRVTMTRD
		TSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARSEITTEFDYWGQGT
		LVTVSS
		(SEQ ID NO: 126)
[0451]		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTMHWV
VH		RQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANYAQKFOGRVTMTRD
移植	IGHV1-46 ³	TSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSEITTEFDYWGQGT
物		LVTVSS
		(SEQ ID NO: 127)
h224		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSESVDSYANSFLHW
G11- VL	IGKV4-1	YQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
		SSLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGGGTKVEIK
		(SEQ ID NO: 128)
[0452]		EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVDSYANSFLHWY
VL 移植	IGKV3-20 ³	QQKPGQAPRLLIYRASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
植物		LEPEDFAVYYCQQSKEDPLTFGGGGTKVEIK
		(SEQ ID NO: 129)

[0453] ¹用于基于IMGT系统进行移植的人种系定义。²CDR残基以粗体加下划线表示。如上所述,本稿件中使用的“统一”CDR定义是相比于经典Kabat定义的扩展定义。上文的每个序列按以下顺序示出骨架区 (FR) 和CDR: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。³移植植物在骨架

区中是完全种系的,用作CDR突变文库构建的模板。

[0454] 表3.来自131个独特的抗C-MET v结构域的独特CDR的氨基酸序列。

[0455]

LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR2	HCDR2	HCDR3
RASQSV DSYANS FLA (SEQ ID NO: 130)	AAST RES (SEQ ID NO: 143)	QQSGE DPLTF (SEQ ID NO: 150)	GYIFTA YSMH (SEQ ID NO: 83)	MGIIKP NGGLA SYAQKF QG (SEQ ID NO: 174)	MGIIKP SGGSTN YAQKF QG (SEQ ID NO: 193)	MGIIKPN GGSANY AQKFQG (SEQ ID NO: 215)	AEITTEFD Y (SEQ ID NO: 85)
RASQSV DSYANS FLH (SEQ ID NO: 131)	AGST RES (SEQ ID NO: 144)	QQSGE EPLTF (SEQ ID NO: 151)	GYIFTA YYMH (SEQ ID NO: 168)	MGIIKP NGGSTS YAQKF QG (SEQ ID NO: 175)	MGIIKP SNGLAS YAQKF QG (SEQ ID NO: 194)	MGIIKPN NGSASY AQKFQG (SEQ ID NO: 216)	EEITTEFD Y (SEQ ID NO: 80)
RASQSV DSYANS YLA (SEQ ID NO: 132)	AGST RET (SEQ ID NO: 145)	QQSGE SPLTF (SEQ ID NO: 152)	GYIFTS YSMH (SEQ ID NO: 43)	MGIIKP NNGSTS YAQKF QG (SEQ ID NO: 176)	MGIIKP NGGLTN YAQKF QG (SEQ ID NO: 195)	MGIIKPS GGLANY AQKFQG (SEQ ID NO: 217)	HEITTEFD Y (SEQ ID NO: 238)

[0456]

RASQSV DSYANS YLH (SEQ ID NO: 51)	RASS RES (SEQ ID NO: 146)	QQSGS DPLTF (SEQ ID NO: 153)	GYIFTS YTMH (SEQ ID NO: 48)	MGIKP SNGSTN YAQKF QG (SEQ ID NO: 84)	MGIINP NGGLTS YAQKF QG (SEQ ID NO: 196)	MGIKPS NGSASY AQKFQG (SEQ ID NO: 218)	MEITTEF DY (SEQ ID NO: 239)
RASQSV DSYAQS FLH (SEQ ID NO: 133)	RASS RET (SEQ ID NO: 147)	QQSGS EPLTF (SEQ ID NO: 154)	GYIFTS YYMH (SEQ ID NO: 169)	MGIKP SNGSTS YAQKF QG (SEQ ID NO: 177)	MGIINP NGGSA NYAQK FQG (SEQ ID NO: 197)	MGIINPN GGLASY AQKFQG (SEQ ID NO: 219)	QEITTEFD I (SEQ ID NO: 45)
RASQSV DSYAQS YLA (SEQ ID NO: 134)	RAST RET (SEQ ID NO: 77)	QQSGS RPLTF (SEQ ID NO: 155)	GYTFTA YSMH (SEQ ID NO: 170)	MGIINP NNGSAS YAQKF QG (SEQ ID NO: 178)	MGIINP NGGST NYAQK FQG (SEQ ID NO: 198)	MGIINPN GGSASY AQKFQG (SEQ ID NO: 220)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
RASQSV DSYAQS YLH (SEQ ID NO: 135)	RGSS RES (SEQ ID NO: 148)	QQSGS SPLTF (SEQ ID NO: 156)	GYTFTA YTMH (SEQ ID NO: 171)	MGIINP SGGLA NYAQK FQG (SEQ ID NO: 179)	MGIINP NNGLA SYAQKF QG (SEQ ID NO: 199)	MGIINPN NGLANY AQKFQG (SEQ ID NO: 221)	QEITTELD Y (SEQ ID NO: 240)
RASQSV ESYANS FLA (SEQ ID NO: 136)	RGSS RET (SEQ ID NO: 149)	QQSKE EPLTF (SEQ ID NO: 157)	GYTFTA YYMH (SEQ ID NO: 172)	MGIINP SGGSTN YAQKF QG (SEQ ID NO: 180)	MGIINP SGGSAS YAQKF QG (SEQ ID NO: 200)	MGIINPS GGLASY AQKFQG (SEQ ID NO: 222)	SEITTEFD Y (SEQ ID NO: 55)
RASQSV ESYANS YLA (SEQ ID NO: 137)	RGST RES (SEQ ID NO: 150)	QQSKE SPLTF (SEQ ID NO: 158)	GYTFTS YSMH (SEQ ID NO: 78)	MGIINP SGGSTS YAQKF QG (SEQ ID NO: 181)	MGIINP SNGLA NYAQK FQG (SEQ ID NO: 201)	MGIINPS NGSTNY AQKFQG (SEQ ID NO: 223)	SEITTEED Y (SEQ ID NO: 241)

[0457]

NO: 137)	NO: 38)	158)		(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 201)	NO: 223)	
RASQSV ESYANS YLH (SEQ ID NO: 52)	RGST RET (SEQ ID NO: 56)	QQSKS DPLTF (SEQ ID NO: 159)	GYTFTS YTMH (SEQ ID NO: 34)	MGWIK PNGGST NYAQK FQG (SEQ ID NO: 181)	MGIINP SNGLAS YAQKF QG (SEQ ID NO: 202)	MGIINPS NGSTSY AQKFQG (SEQ ID NO: 224)	SEITTEFD A (SEQ ID NO: 242)
RASQSV ESYAQS FLH (SEQ ID NO: 138)		QQSKS EPLTF (SEQ ID NO: 160)	GYTFTS YYMH (SEQ ID NO: 173)	MGWIK PNNGSA SYAQKF QG (SEQ ID NO: 86)	MGIINP SNGLTS YAQKF QG (SEQ ID NO: 203)	MGWIKP NGGLTS YAQKFQ G (SEQ ID NO: 225)	SEITTEFD E (SEQ ID NO: 243)
RASQSV ESYAQS YLH (SEQ ID NO: 46)		QQSKS SPLTF (SEQ ID NO: 161)		MGWIK PSGGST SYAQKF QG (SEQ ID NO: 182)	MGIINP SNGSAN YAQKF QG (SEQ ID NO: 204)	MGWIKP NNGLTS YAQKFQ G (SEQ ID NO: 226)	SEITTEFD F (SEQ ID NO: 244)
RASQSV SSYANS FLH (SEQ ID NO: 139)		QQYGS DPLTF (SEQ ID NO: 162)		MGWIK PSNGLA SYAQKF QG (SEQ ID NO: 183)	MGWIK PNGGL ANYAQ KFQG (SEQ ID NO: 205)	MGWIKP NNGSAN YAQKFQ G (SEQ ID NO: 227)	SEITTEFD I (SEQ ID NO: 245)
RASQSV SSYANS YLA (SEQ ID NO: 140)		QQYGS EPLTF (SEQ ID NO: 163)		MGWIK PSNGSA NYAQK FQG (SEQ ID NO: 184)	MGWIK PNGGSA SYAQKF QG (SEQ ID NO: 206)	MGWIKP NNGSTN YAQKFQ G (SEQ ID NO: 87)	SEITTEFD K (SEQ ID NO: 246)
RASQSV		QQYK		MGWIK	MGWIK	MGWIKP	SEITTEFD

[0458]

SSYANS YLH (SEQ ID NO: 37)		EEPLTF (SEQ ID NO: 164)		PSNGSA SYAQKF QG (SEQ ID NO: 185)	PNGGST SYAQKF QG (SEQ ID NO: 207)	SGGLTS YAQKFQ G (SEQ ID NO: 228)	L (SEQ ID NO: 247)
RASQSV SSYAQS FLA (SEQ ID NO: 141)		QQYK ESPLTF (SEQ ID NO: 165)		MGWIK PSNGST SYAQKF QG (SEQ ID NO: 186)	MGWIK PNNGST SYAQKF QG (SEQ ID NO: 208)	MGWIKP SNGLTS YAQKFQ G (SEQ ID NO: 229)	SEITTEFD M (SEQ ID NO: 248)
RASQSV SSYAQS FLH (SEQ ID NO: 142)		QQYKS DPLTF (SEQ ID NO: 166)		MGWIN PNGGLT NYAQK FRG (SEQ ID NO: 79)	MGWIN PNGGL ASYAQ KFQG (SEQ ID NO: 49)	MGWIKP SNGSTN YAQKFQ G (SEQ ID NO: 230)	SEITTEFD Q (SEQ ID NO: 249)
RASQSV SSYAQS YLH (SEQ ID NO: 57)		QQYKS SPLTF (SEQ ID NO: 167)		MGWIN PNGGLT SYAQKF QG (SEQ ID NO: 187)	MGWIN PNGGLT NYAQK FQG (SEQ ID NO: 209)	MGWINP NNGSAS YAQKFQ G (SEQ ID NO: 231)	SEITTEFD S (SEQ ID NO: 250)
				MGWIN PNNGL ANYAQ KFQG (SEQ ID NO: 188)	MGWIN PNGGST NYAQK FQG (SEQ ID NO: 210)	MGWINP NNGLTN YAQKFQ G (SEQ ID NO: 232)	SEITTEFD V (SEQ ID NO: 251)
				MGWIN PNNGL ASYAQ KFQG (SEQ ID	MGWIN PNGGST SYAQKF QG (SEQ ID	MGWINP NNGSAN YAQKFQ G (SEQ ID	SEITTEFD W (SEQ ID NO: 252)

[0459]

				NO: 189)	NO: 42)	NO: 233)	
				MGWIN PSGGLA SYAQKF QG (SEQ ID NO: 190)	MGWIN PNNGST NYAQK FQG (SEQ ID NO: 81)	MGWINP NNGSAS YAQKFQ G (SEQ ID NO: 234)	SEITTELD Y (SEQ ID NO: 253)
				MGWIN PSGGSA SYAQKF QG (SEQ ID NO: 191)	MGWIN PNNGST SYAQKF QG (SEQ ID NO: 211)	MGWINP SGGLAN YAQKFQ G (SEQ ID NO: 54)	SEITTEQD Y (SEQ ID NO: 50)
				MGWIN PSGGST SYAQKF QG (SEQ ID NO: 40)	MGWIN PSGGLT SYAQKF QG (SEQ ID NO: 212)	MGWINP SGGLTN YAQKFQ G (SEQ ID NO: 235)	SEITTEW DY (SEQ ID NO: 254)
				MGWIN PSNGLA NYAQK FQG (SEQ ID NO: 44)	MGWIN PSGGSA NYAQK FQG (SEQ ID NO: 213)	MGWINP SNGSAS YAQKFQ G (SEQ ID NO: 236)	TEITTEFD Y (SEQ ID NO: 88)
				MGWIN PSNGLT NYAQK FQG (SEQ ID NO: 192)	MGWIN PSGGST NYAQK FQG (SEQ ID NO: 214)	MGWINP SNGSTS YAQKFQ G (SEQ ID NO: 237)	VEITTEFD L (SEQ ID NO: 255)

[0460] 表4.独特的文库源性和设计人/食蟹猴交叉反应性抗C-MET IgG的CDR的氨基酸序列。

[0461]

克隆	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
04F09	RASQSV ESYAQS YLH (SEQ ID NO: 46)	RGSTRE S (SEQ ID NO: 38)	QQSKSD PLT (SEQ ID NO: 76)	GYIFTS YSMH (SEQ ID NO: 43)	MGWINPSNGL ANYAQKFQG (SEQ ID NO: 44)	QEITTEFD I (SEQ ID NO: 45)
07A01	RASQSV DSYANS YLH (SEQ ID NO: 51)	RGSTRE S (SEQ ID NO: 38)	QQSKES PLT (SEQ ID NO: 47)	GYIFTS YTMH (SEQ ID NO: 48)	MGWINPNGG LASAQKFQG (SEQ ID NO: 49)	SEITTEQD Y (SEQ ID NO: 50)
09A12	RASQSV SSYAQS YLH (SEQ ID NO: 57)	RASTRE T (SEQ ID NO: 77)	QQSKES PLT (SEQ ID NO: 47)	GYTFTS YSMH (SEQ ID NO: 78)	MGWINPNGG LTNYAQKFRG (SEQ ID NO: 79)	EEITTEFD Y (SEQ ID NO: 80)
09B08	RASQSV SSYANS YLH (SEQ ID NO: 37)	RGSTRE S (SEQ ID NO: 38)	QQSKSD PLT (SEQ ID NO: 76)	GYTFTS YTMH (SEQ ID NO: 34)	MGWINPNNG STNYAQKFQG (SEQ ID NO: 81)	SEITTDFFD Y (SEQ ID NO: 55)
07C10	RASQSV ESYAQS YLH (SEQ ID NO: 46)	RGSTRE S (SEQ ID NO: 38)	QQSKEE PLT (SEQ ID NO: 82)	GYIFTA YSMH (SEQ ID NO: 83)	MGIKPSNGST NYAQKFQG (SEQ ID NO: 84)	AEITTEFD Y (SEQ ID NO: 85)
09E04	RASQSV ESYANS YLH (SEQ ID NO: 52)	RGSTRE S (SEQ ID NO: 38)	QQYGSE PLT (SEQ ID NO: 53)	GYIFTS YTMH (SEQ ID NO: 48)	MGWINPNGG STSYAQKFQG (SEQ ID NO: 42)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
08G07	RASQSV DSYANS YLH (SEQ ID NO: 51)	RGSTRE S (SEQ ID NO: 38)	QQSKSE PLT (SEQ ID NO: 39)	GYTFTS YTMH (SEQ ID NO: 34)	MGWINPSGGL ANYAQKFQG (SEQ ID NO: 54)	SEITTDFFD Y (SEQ ID NO: 55)

[0462]

04E10	RASQSV DSYANS YLH (SEQ ID NO: 51)	RGSTRE S (SEQ ID NO: 38)	QQSKSE PLT (SEQ ID NO: 39)	GYIFTS YTMH (SEQ ID NO: 48)	MGWIKPNNG SASYAQKFQG (SEQ ID NO: 86)	SEITTEED Y (SEQ ID NO: 241)
08B12	RASQSV DSYANS YLH (SEQ ID NO: 51)	RGSTRE T (SEQ ID NO: 56)	QQSKSD PLT (SEQ ID NO: 76)	GYIFTA YSMH (SEQ ID NO: 83)	MGWIKPNNG STNYAQKFQG (SEQ ID NO: 87)	TEITTEFD Y (SEQ ID NO: 88)
MH1	RASQSV SSYANS YLH (SEQ ID NO: 37)	RGSTRE S (SEQ ID NO: 38)	QQSKSE PLT (SEQ ID NO: 39)	GYTFTS YTMH (SEQ ID NO: 34)	MGWINPNGG STSYAQKFQG (SEQ ID NO: 42)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
MH2	RASQSV SSYAQS YLH (SEQ ID NO: 57)	RGSTRE T (SEQ ID NO: 56)	QQSGSS PLT (SEQ ID NO: 89)	GYTFTS YTMH (SEQ ID NO: 34)	MGWINPNGG STSYAQKFQG (SEQ ID NO: 42)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
MH3	RASQSV SSYAQS YLH (SEQ ID NO: 57)	RGSTRE T (SEQ ID NO: 56)	QQYGSS PLT (SEQ ID NO: 90)	GYTFTS YTMH (SEQ ID NO: 34)	MGWINPNGG STSYAQKFQG (SEQ ID NO: 42)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
MH4	RASQSV SSYANS YLH (SEQ ID NO: 37)	RGSTRE S (SEQ ID NO: 38)	QQSKSE PLT (SEQ ID NO: 39)	GYTFTS YTMH (SEQ ID NO: 34)	MGWINPSGGS TSYAQKFQG (SEQ ID NO: 40)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
MH5	RASQSV SSYAQS YLH (SEQ ID NO: 57)	RGSTRE T (SEQ ID NO: 56)	QQSGSS PLT (SEQ ID NO: 89)	GYTFTS YTMH (SEQ ID NO: 34)	MGWINPSGGS TSYAQKFQG (SEQ ID NO: 40)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
MH6	RASQSV SSYAQS YLH (SEQ ID	RGSTRE T (SEQ ID	QQYGSS PLT (SEQ ID	GYTFTS YTMH (SEQ ID	MGWINPSGGS TSYAQKFQG (SEQ ID NO:	QEITTEFD Y (SEQ ID

[0463]

	NO: 57)	NO: 56)	NO: 90)	NO: 34)	40)	NO: 36)
MH7	RASQSV SSYANS YLH (SEQ ID NO: 37)	RGSTRE S (SEQ ID NO: 38)	QQSKSE PLT (SEQ ID NO: 39)	GYTFTS YTMH (SEQ ID NO: 34)	MGIINPSGGST SYAQKFQG (SEQ ID NO: 35)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
MH8	RASQSV SSYAQS YLH (SEQ ID NO: 57)	RGSTRE T (SEQ ID NO: 56)	QQSGSS PLT (SEQ ID NO: 89)	GYTFTS YTMH (SEQ ID NO: 34)	MGIINPSGGST SYAQKFQG (SEQ ID NO: 35)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
MH9	RASQSV SSYAQS YLH (SEQ ID NO: 57)	RGSTRE T (SEQ ID NO: 56)	QQYGSS PLT (SEQ ID NO: 90)	GYTFTS YTMH (SEQ ID NO: 34)	MGIINPSGGST SYAQKFQG (SEQ ID NO: 35)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
MH10	RASQSV SSYANS YLH (SEQ ID NO: 37)	RGSTRE S (SEQ ID NO: 38)	QQSKSE PLT (SEQ ID NO: 39)	GYTFTS YAMH (SEQ ID NO: 41)	MGWINPSGGS TSYAQKFQG (SEQ ID NO: 40)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
MH11	RASQSV SSYAQS YLH (SEQ ID NO: 57)	RGSTRE T (SEQ ID NO: 56)	QQSGSS PLT (SEQ ID NO: 89)	GYTFTS YAMH (SEQ ID NO: 41)	MGWINPSGGS TSYAQKFQG (SEQ ID NO: 40)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)
MH12	RASQSV SSYAQS YLH (SEQ ID NO: 57)	RGSTRE T (SEQ ID NO: 56)	QQYGSS PLT (SEQ ID NO: 90)	GYTFTS YAMH (SEQ ID NO: 41)	MGWINPSGGS TSYAQKFQG (SEQ ID NO: 40)	QEITTEFD Y (SEQ ID NO: 36)

[0464] 表5. 与人和食蟹猴单体C-MET结合的IgG的Biacore®亲和力值。

	人 C-MET				食蟹猴 C-MET			
克隆名 称	<u>ka</u> (1/Ms)	<u>kd</u> (1/s)	<u>Chi2</u>	<u>KD</u> (nM)	<u>ka</u> (1/Ms)	<u>kd</u> (1/s)	<u>Chi2</u>	<u>KD</u> (nM)

[0465]

	移植物	9.90E+04	3.70E-05	0.836	0.37	2.30E+05	5.20E-05	0.089	0.22
	h224G11	9.00E+04	4.20E-05	0.795	0.47	2.50E+05	1.10E-04	0.742	0.46
	08G07	6.34E+04	7.54E-06	0.191	0.12	1.00E+05	2.40E-05	1.15	0.24
	04F09	1.40E+05	1.80E-05	0.966	0.13	2.90E+05	5.60E-05	0.203	0.19
	09E04	8.50E+04	1.60E-05	0.545	0.18	1.70E+05	6.40E-05	1.04	0.39
	07A01	5.60E+04	1.30E-05	0.139	0.24	9.40E+04	1.60E-05	1.6	0.17
	MH4	8.70E+04	2.50E-05	1.62	0.28	2.60E+05	4.90E-05	0.099	0.19
	MH7	9.80E+04	2.90E-05	0.882	0.3	2.70E+05	5.20E-05	0.121	0.19
	MH10	7.10E+04	4.40E-05	0.496	0.63	1.80E+05	3.60E-05	1.07	0.2
	MH1	9.47E+04	7.11E-05	0.689	0.75	1.80E+05	2.60E-05	1.21	0.14
[0466]	07C10	1.20E+05	9.40E-05	0.03	0.78	6.50E+04	2.10E-04	0.213	3.2
	09B08	3.70E+04	4.10E-05	0.064	1.1	6.00E+04	1.20E-05	0.135	0.2
	04E10	3.10E+04	5.00E-05	0.055	1.6	4.90E+04	1.10E-04	0.099	2.2
	MH5	7.70E+04	1.50E-04	0.883	2	1.70E+05	2.10E-04	1.63	1.3
	09A12	7.40E+04	1.50E-04	0.671	2	1.60E+05	2.30E-04	0.919	1.5
	MH8	6.60E+04	1.50E-04	0.638	2.2	1.60E+05	2.10E-04	0.736	1.3
	MH2	7.30E+04	1.80E-04	1.2	2.5	2.40E+05	2.10E-04	0.068	0.87
	MH11	6.20E+04	1.60E-04	0.323	2.6	1.50E+05	1.80E-04	0.589	1.2
	MH12	5.60E+04	3.70E-04	0.134	6.5	1.10E+05	4.30E-04	1.29	4
	MH9	5.90E+04	3.90E-04	0.164	6.6	1.10E+05	4.80E-04	1.89	4.3
	MH03	6.80E+04	5.10E-05	0.505	7.6	1.50E+05	6.20E-05	1.06	4.1

[0467]	MH6	6.50E+04	$5.30E-04$	0.475	8.2	1.60E+05	$6.30E-04$	0.861	4
	08B12	3.70E+04	$3.10E-04$	0.051	8.4	5.40E+04	$4.30E-04$	0.039	8.1

[0468] 表6. 与人和食蟹猴CHO-K1结合的IgG的流式细胞术EC50值。

克隆	EC50 (nM)	
	hucME T	cycMET
MH7	1.14	0.54
MH9	1.23	0.65
MH8	1.24	0.57
MH12	1.25	0.51
MH6	1.33	0.72
MH2	1.59	0.34
MH3	1.66	0.27
MH11	1.68	0.69
MH4	1.72	0.48
MH5	1.76	0.3
MH1	2.02	0.26
MH10	2.14	0.46
09A12	2.33	0.28
09E04	2.9	1.11
08G07	4.19	0.68
h224G11	6.83	0.82
07A01	7.44	1.74
09B08	9.3	3.78
07C10	9.59	2.82
04E10	9.66	2.94
08B12	11.67	1.34
04F09	12.41	0.64
同种型 IgG4	N.D.	N.D.

N.D.-未确定

[0470] 表7. 通过iTOPETM和TCEDTM预测的v结构域中的人T细胞表位含量。

克隆名称	种系表位	低亲和力外来	高亲和力外来	TCED+
h224G11 VL	4	1	2	0
h224G11 VH	7	1	2	0
08G07 VL	1	2	1	0
08G07 VH	8	1	1	0
07A01 VL	1	1	1	0
07A01 VH	8	2	2	0
MH1 VL	1	2	1	0
MH1 VH	8	2	1	0
MH4 VL	1	2	1	0
MH4 VH	8	1	1	0
MH7 VL	1	2	1	0
MH7 VH	10	0	1	0
MH7-1 VL	1	2	0	0
MH7-1 VH	10	0	1	0
MH7-2 VL	1	1	0	0
MH7-2 VH	10	0	1	0
MH7-3 VL	1	1	0	0
MH7-3 VH	10	0	1	0

[0472] 表8.独特的去免疫的设计人/食蟹猴交叉反应性抗C-MET IgG的CDR的氨基酸序列。

克隆	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
MH7-1	RASQSVSSY ANSYLH (SEQ ID NO: 37)	RGSTRET (SEQ ID NO: 56)	QQSKSEPLT (SEQ ID NO: 39)	GYTFTSY TMH (SEQ ID NO: 34)	MGIINPSGGS TSYAQKFQG (SEQ ID NO: 35)	QEITTEFDY (SEQ ID NO: 36)
MH7-2	RASQSVSSY ANSYLH (SEQ ID NO: 37)	RGSTRET (SEQ ID NO: 56)	QQSKESPLT (SEQ ID NO: 47)	GYTFTSY TMH (SEQ ID NO: 34)	MGIINPSGGS TSYAQKFQG (SEQ ID NO: 35)	QEITTEFDY (SEQ ID NO: 36)
MH7-3	RASQSVSSY AQSYLH (SEQ ID NO: 57)	RGSTRET (SEQ ID NO: 56)	QQSKESPLT (SEQ ID NO: 47)	GYTFTSY TMH (SEQ ID NO: 34)	MGIINPSGGS TSYAQKFQG (SEQ ID NO: 35)	QEITTEFDY (SEQ ID NO: 36)

[0474] 表9.与人和食蟹猴单体C-MET结合的IgG的BIAcore®亲和力值。

	克隆 名称	人 C-MET				食蟹猴 C-MET			
		k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	Chi2	KD (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	Chi2	KD (nM)
[0475]	MH7.1	9.79E+04	1.51E-04	0.11	1.54	1.81E+05	1.98E-04	0.683	1.1
	MH7.2	9.32E+04	1.98E-04	0.108	2.12	1.83E+05	1.59E-04	0.394	0.87
	MH7.3	9.44E+04	1.23E-04	0.137	1.31	1.68E+05	1.74E-04	0.687	1.03
[0476]	表10. 抗体可变区氨基酸序列的实例。								
[0477]	抗体MH7-3重链可变 (VH) 区								
[0478]	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYTMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSL RSED TAVYYCARQEITTEFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) 抗体MH7-3轻 链可变 (VL) 区								
[0479]	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYAQSYLHWYQQKP GQAPRLLIYRGSTRETGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQSKEPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:2)								
[0480]	抗体MH7-2重链可变 (VH) 区								
[0481]	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYTMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSL RSED TAVYYCARQEITTEFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:3) 抗体MH7-2轻 链可变 (VL) 区								
[0482]	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYANSYLHWYQQKP GQAPRLLIYRGSTRETGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQSKEPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:4)								
[0483]	抗体MH7-1重链可变 (VH) 区								
[0484]	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYTMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSL RSED TAVYYCARQEITTEFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:5) 抗体MH7-1轻 链可变 (VL) 区								
[0485]	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYANSYLHWYQQKP GQAPRLLIYRGSTRETGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQSKSEPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:6)								
[0486]	抗体MH7重链可变 (VH) 区								
[0487]	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYTMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSL RSED TAVYYCARQEITTEFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:7) 抗体MH7轻链 可变 (VL) 区								
[0488]	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYANSYLHWYQQKP GQAPRLLIYRGSTRESGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQSKSEPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:8)								
[0489]	抗体08G07重链可变 (VH) 区								
[0490]	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYTMHWVRQAP GQGLEWMGWINPSGGLANYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSS LRSED TAVYYCARSEITTEFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:9) 抗体08G07轻 链可变 (VL) 区								
[0491]	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVDSYANSYLHWYQQK PGQAPRLLIYRGSTRESGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQSKSEPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:10)								
[0492]	表11. 抗体Fc区氨基酸序列的实例。								
[0493]	人IgG4野生型								
[0494]	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV								

VTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO:11)

[0495] 人IgG4 (S228P)

[0496] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO:12)

[0497] 人IgG1野生型

[0498] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

[0499] 人IgG1-3M

[0500] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

[0501] 人IgG2野生型

[0502] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15)

[0503] 人IgG1野生型“REEM”同种异型

[0504] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:16)

[0505] 人IgG1-3M“REEM”同种异型

[0506] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17)

[0507] 表12.C-MET蛋白氨基酸序列的实例。

[0508] 人C-MET序列

[0509] MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNY
IYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVF
PHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPLHSISVRRLKETK
DGFMFLLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDATFHTRIIRFCSINSLHSYMEMPLECIL
TEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKIVNDDFNKI
VNKNVNRCLQHFYGPNEHCFNRLLRNSSGCEARRDEYRTEFTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGLTIAN
LGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLS
APPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVFNPNSAPLEGGTRLTIC

[0510] GWDFGFRRNNKFDLKK

[0511] TRVLLGNESCTLTLESTMTLTKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGH

[0512] GTTQYSTFSYVDPVIT

[0513] SISKYGPAGGTLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSN

[0514] SILECYTPAQTISTEF

[0515] AVKLKIDLANRETSIFSYPREDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKN

[0516] LNSVSVPRMVINVH

[0517] EAGRNFTVACQHRNSEIICCTTPSLQQNLQLPLKTKAFFMLD

[0518] GILSKYFDLIYVHNPV

[0519] FKPFKPMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKNSCE

[0520] NIHLHSEAVLCTVPNDL

[0521] LKLNSSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFGLIAGVVSISTAL

[0522] LLLLGFLLWLKKRKQ

[0523] IKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNEVDY

[0524] RATFPEDQFPNSSQNGS

[0525] CRQVQYPLTDMSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNPELVQA

[0526] VQHVVIGPSSLIVHF

[0527] NEVIGRGHFGCVYHGTLDDNDGKKIHCAVKSLNRITDIGEVSQF

[0528] LTEGIIMKDFSHPNVL

[0529] SLLGICLRSEGSPLVVLPMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGF

[0530] GLQVAKGMKYLASKKF

[0531] VHRDLAARNCMLDEKFTVKVADFGLARDMYDKEYYSVHNKT

[0532] GAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAP

[0533] PYPDVNTFDITVYLLQGRLLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAE

[0534] MRPSFSELVSRISAIFSTFIGEHYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLS

[0535] SEDNADDEV

[0536] TRPASFWETS (SEQ ID NO:18)

[0537] 食蟹猴C-MET序列

[0538]

mkapavlvpg ilvllftlvq rsngeckeal aksemnvnmk yqlpnftaet
aiqnvilheh hiflgatnyi yvlneedlqk vaeyktgpvl ehpdcfpcqd
csskanlsgg vwkdninmal vvdtyyddql iscgsvnrgt cqrhvfphnh
tadiqsevhc ifspqieepn qcpdcvvsal gakvlssvkd rfinffvgnt
inssyfphhp lhsisvrrlk etkdgfmflt dqsyidvlpe frdsypikyi
hafesnnfiy fltvqretln aqtfhtriir fcslnsglhs ymemplecil
tekrkkrstk kevfnilqaa yvskpgaqla rqigaslndd ilfgvfaqsk
pdsaepmdrs amcafpikyv ndffnkivnk nnvrclqghfy gpnhehcfnr
tllrnssgce arrdeyraef ttalqrvdlf mgqfsevlft sistfvgkdl
tianlgtseg rfmqvvsrs gpstphvnfl ldshpvspev ivehplnqng
ytlvtgkki tkiplnglgc rhfqscsqcl sappfvqcgw chdkcvrsee
cpsgtwtqqi clpaiykvfp tsapleggtr lticgwdfgf rrrnnkfdlkk
trvllgnesc tltilsestmn tlkctvgpam nkhnfnmsiii snghgttqys
tfsyvdpiit sispykypma ggtiltltgn ylnsgnsrhi siggktctlk
svsnsilecy tpaqtistef avklkidlan retsifsyre dpivyehipt
ksfisggsti tgvgknlhsv svprmvinvh eagrnftvac qhrsnseiic
cttpslqqln lqlplktkaf fml dgilsky fdliyvhnvp fkpfekevpmi
smgnenvlei kgndidpeav kgevlkvgnk scenihlhse avlctvpndl
lklinselnie wkqaisstvl gkvivqpdqn ftgliagvvs isialllllg
lflwlkkrkq ikdlgselvr ydarvhtphl drlvsarsvs pttemvsnes
vdyratfped qfpnssqngs crqvqypltd mspiltsgds disspllqnt
vhidlsalnp elvqavqhv v igpsslivhf neviggrghfg cvyhgltldn

dgkkihcavk slnritdige vsqfltegi mkd fshpnl sllgiclrse
gsplvvlpym khgdlnfir nethnptvkd ligfglqvak gmkyaskkf
vhrdlaarnc mldekftvk adfglardmy dkeyysvhnk tgaklpvkwm
aleslqtqkf ttksdvwsfg vllwelmtgr appypdvntf ditvyllqgr
rllqpeycpd plyevmlkcw hpkaemrpsf selvrisai fstfigehyv
hvnatyvvnk cvapypslls sednaddevdt (SEQ ID NO: 19)

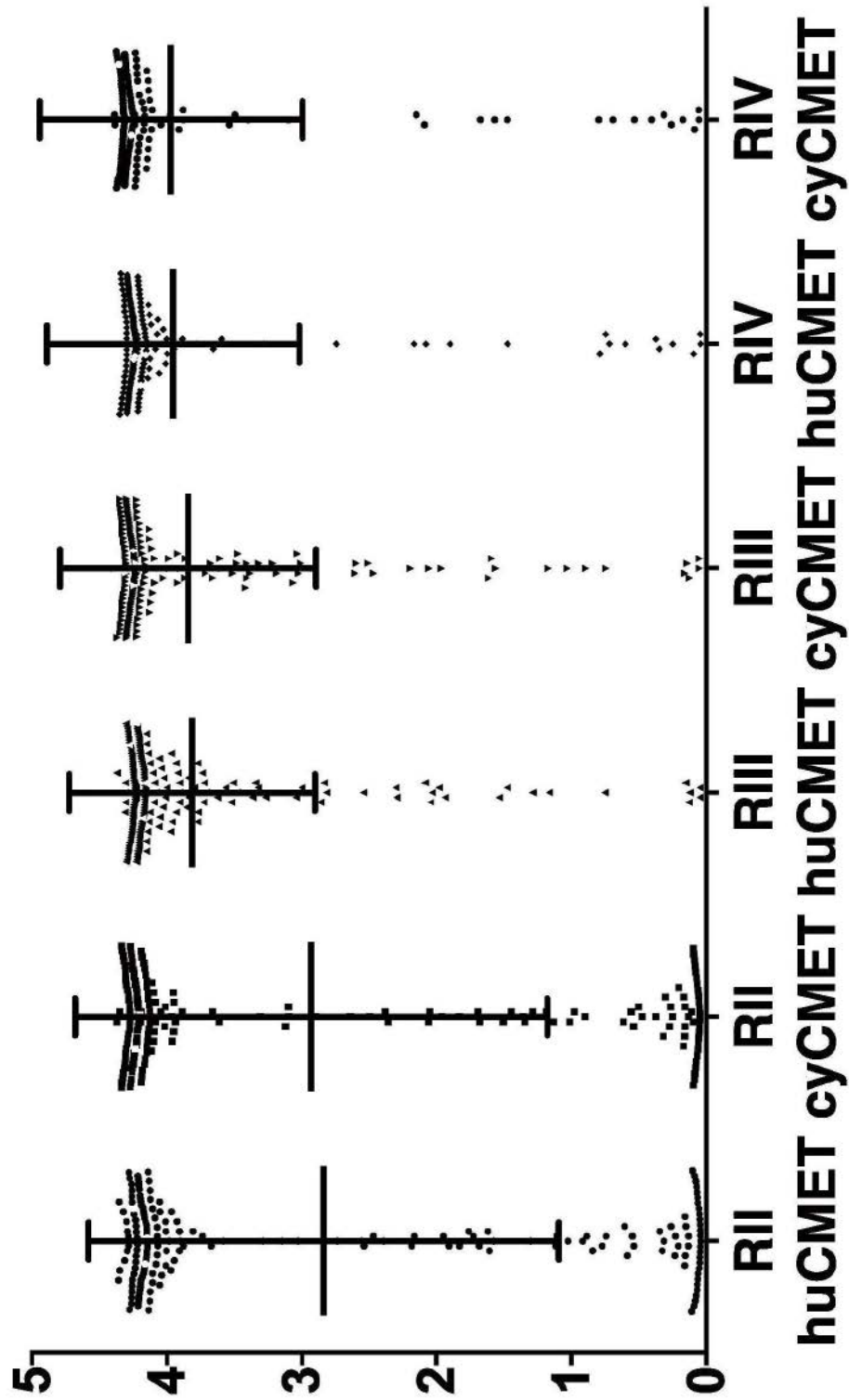


图1A

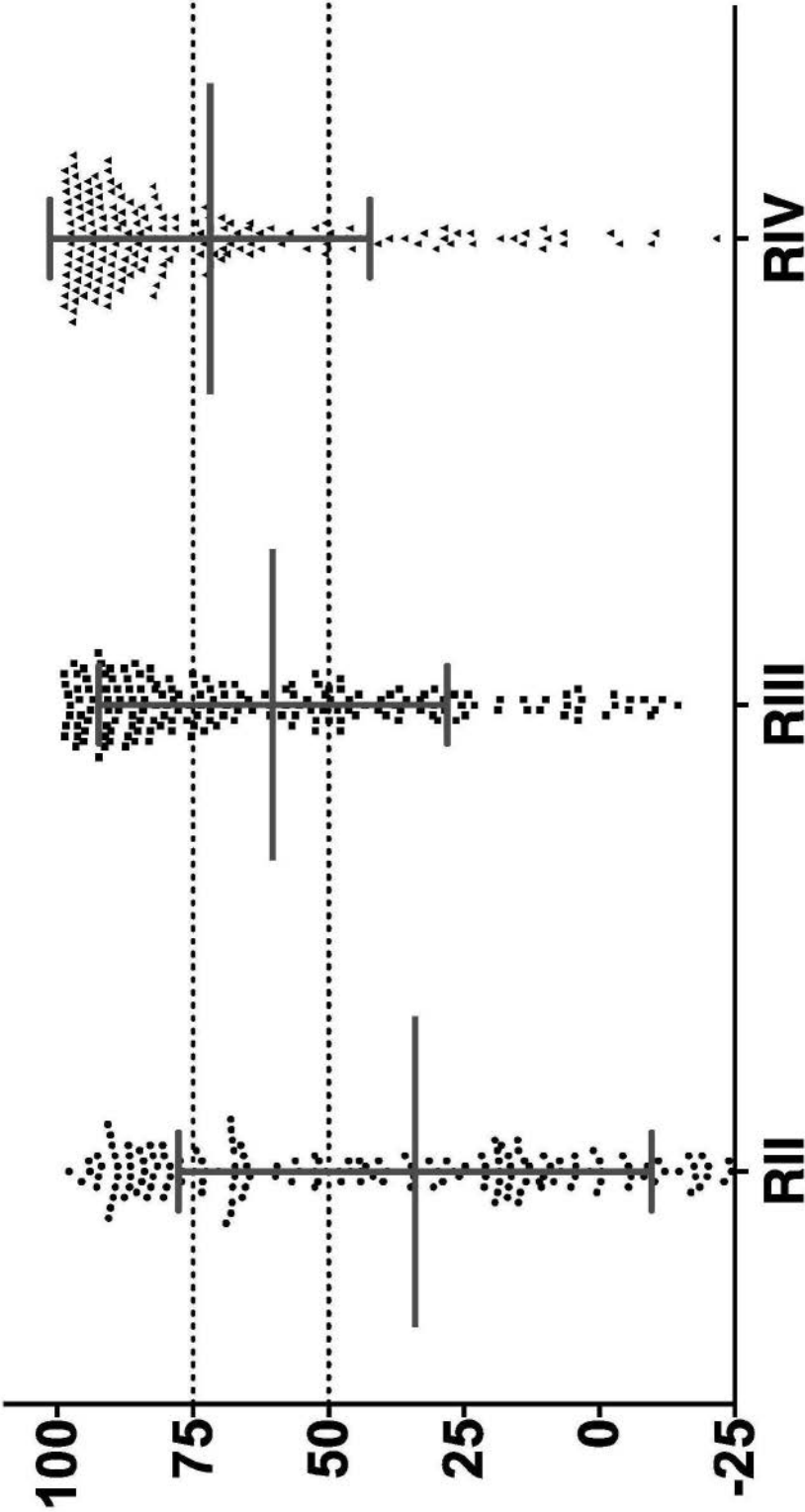


图1B

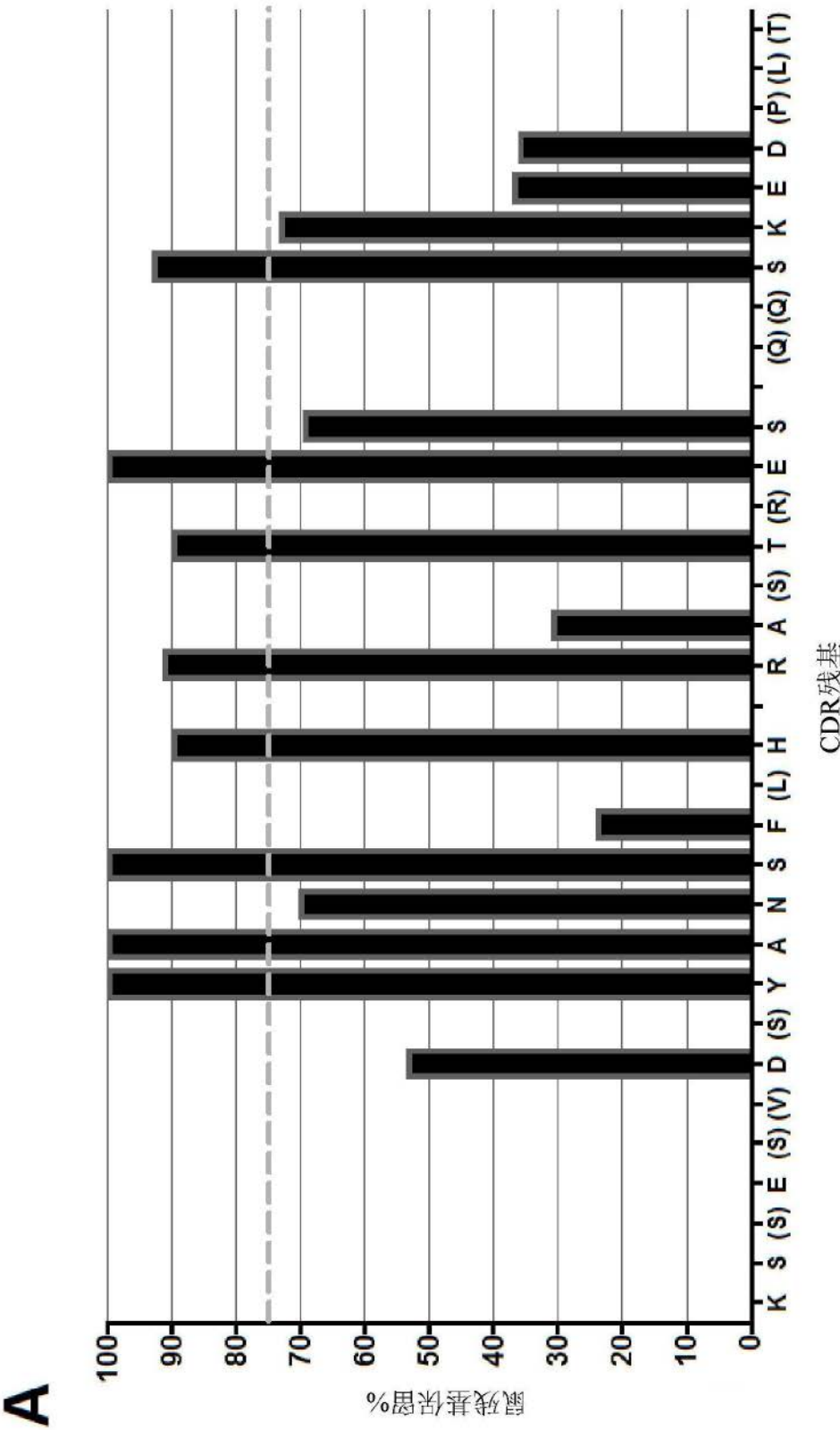


图2A

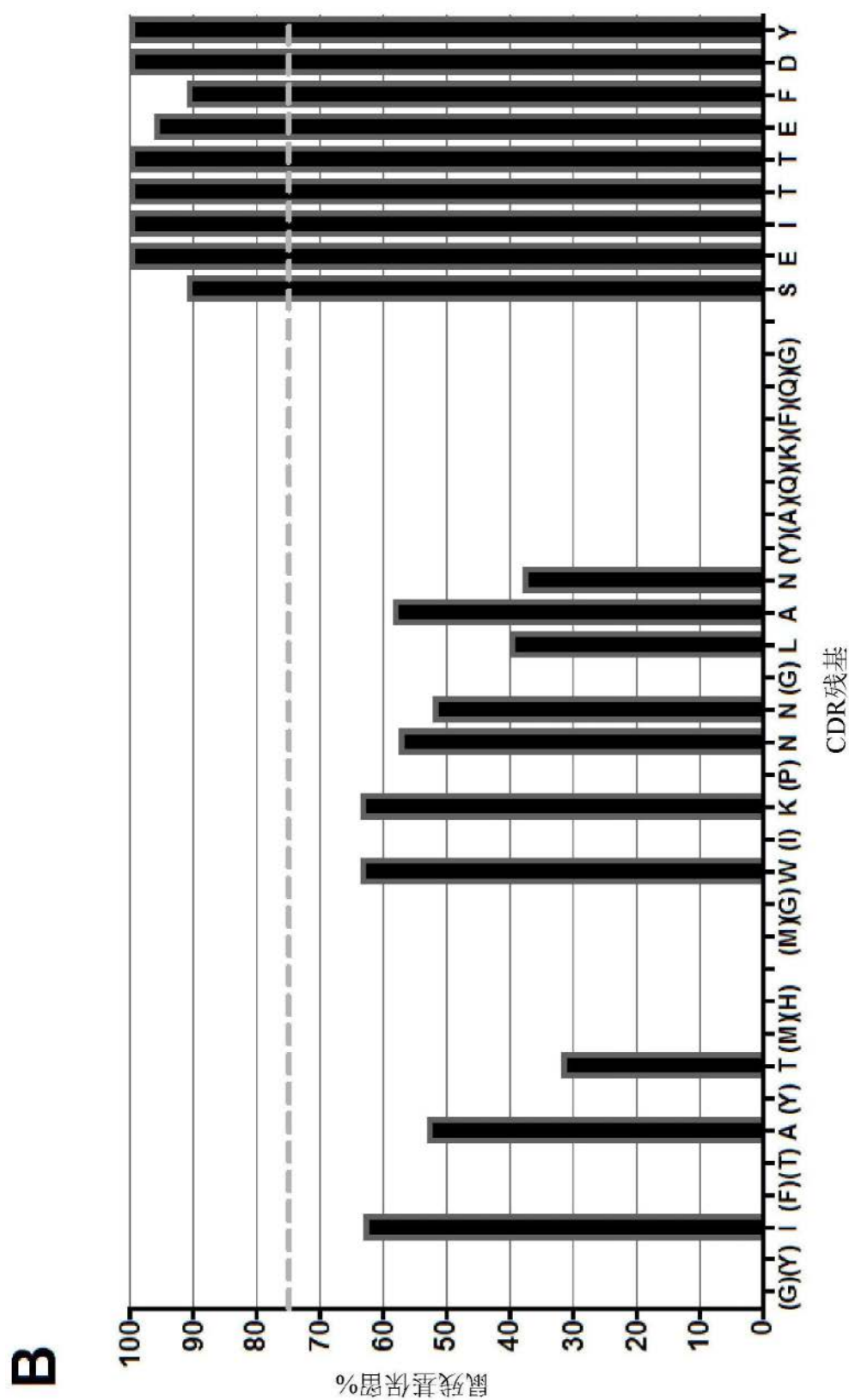


图2B

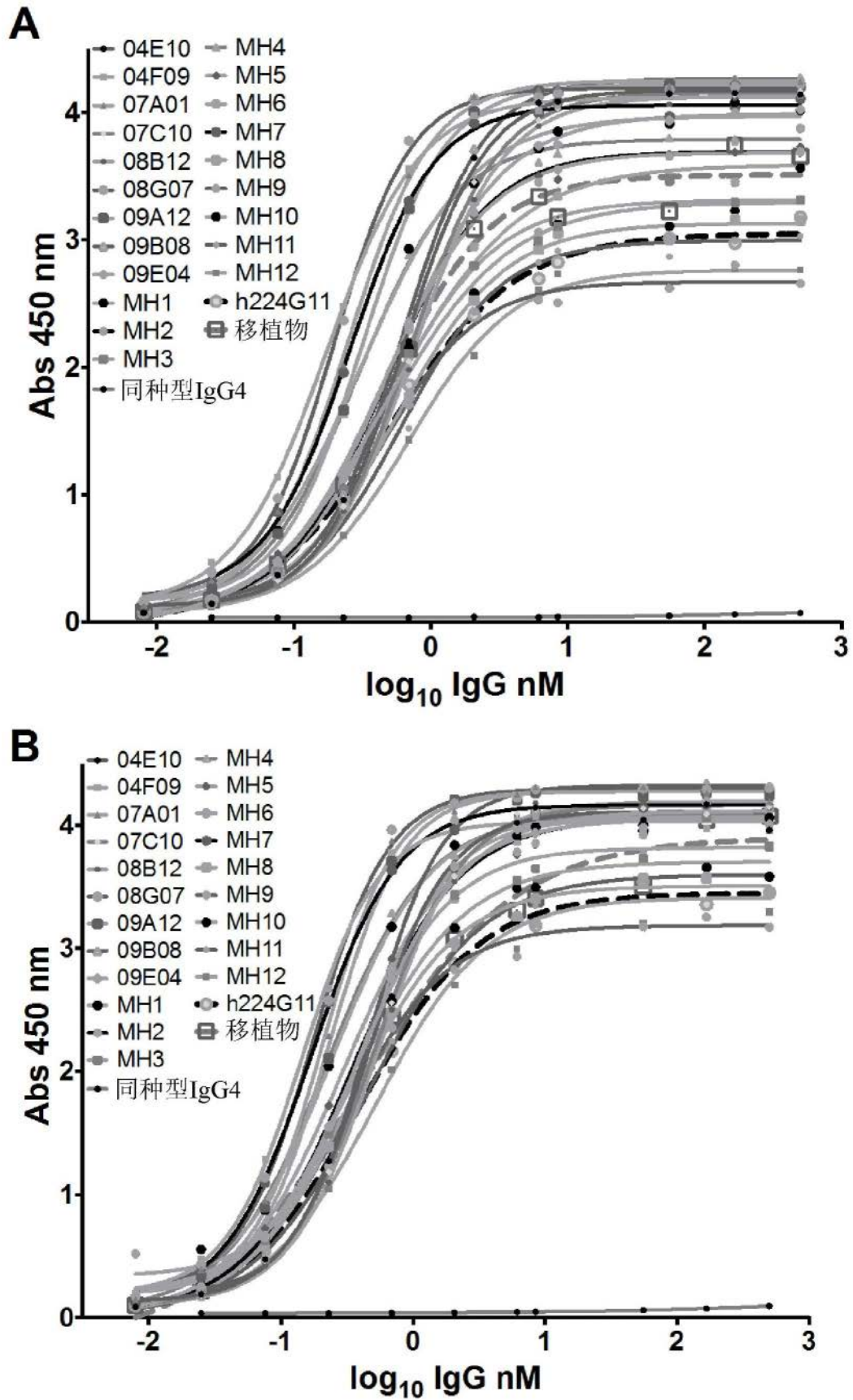


图3

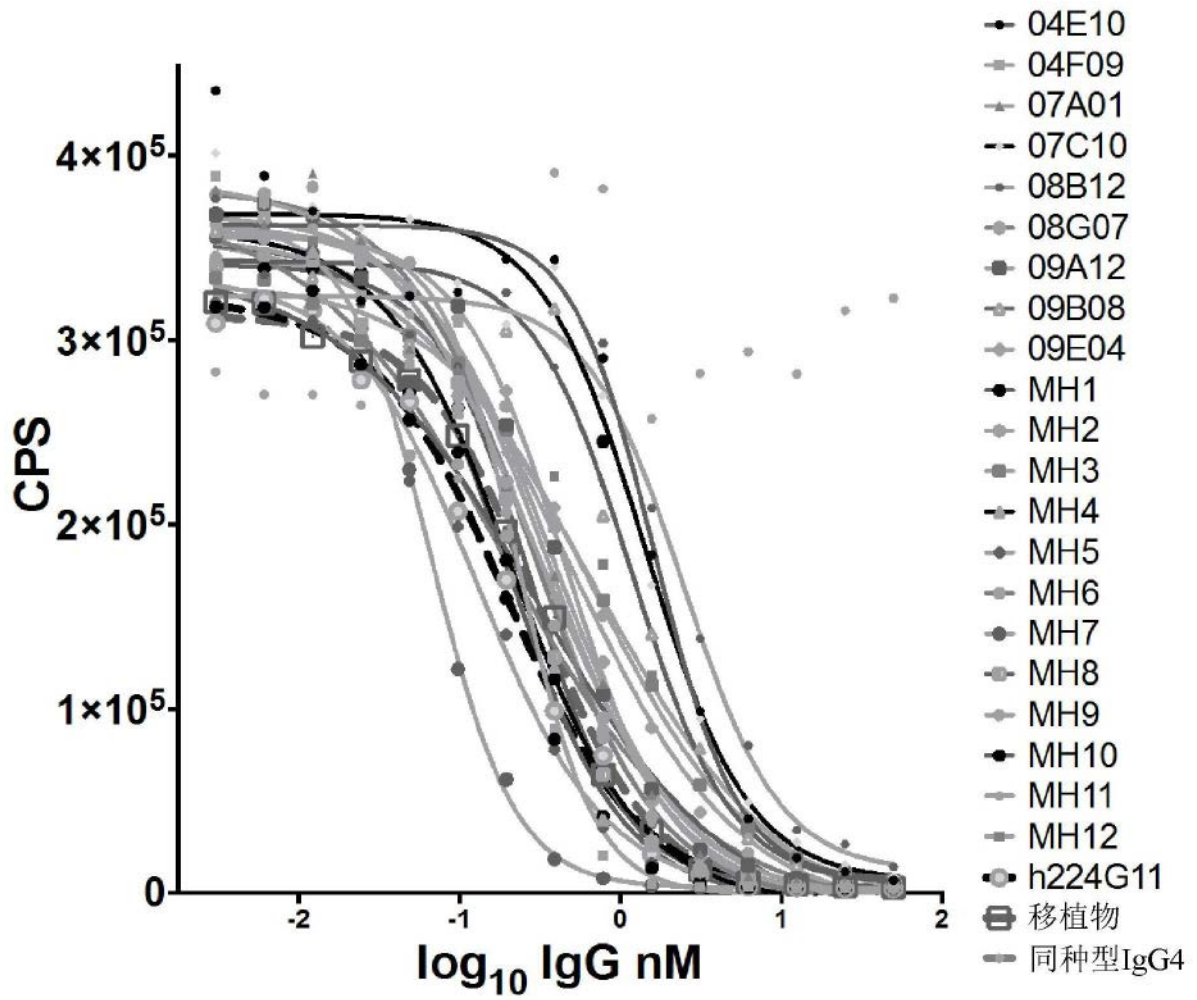


图4

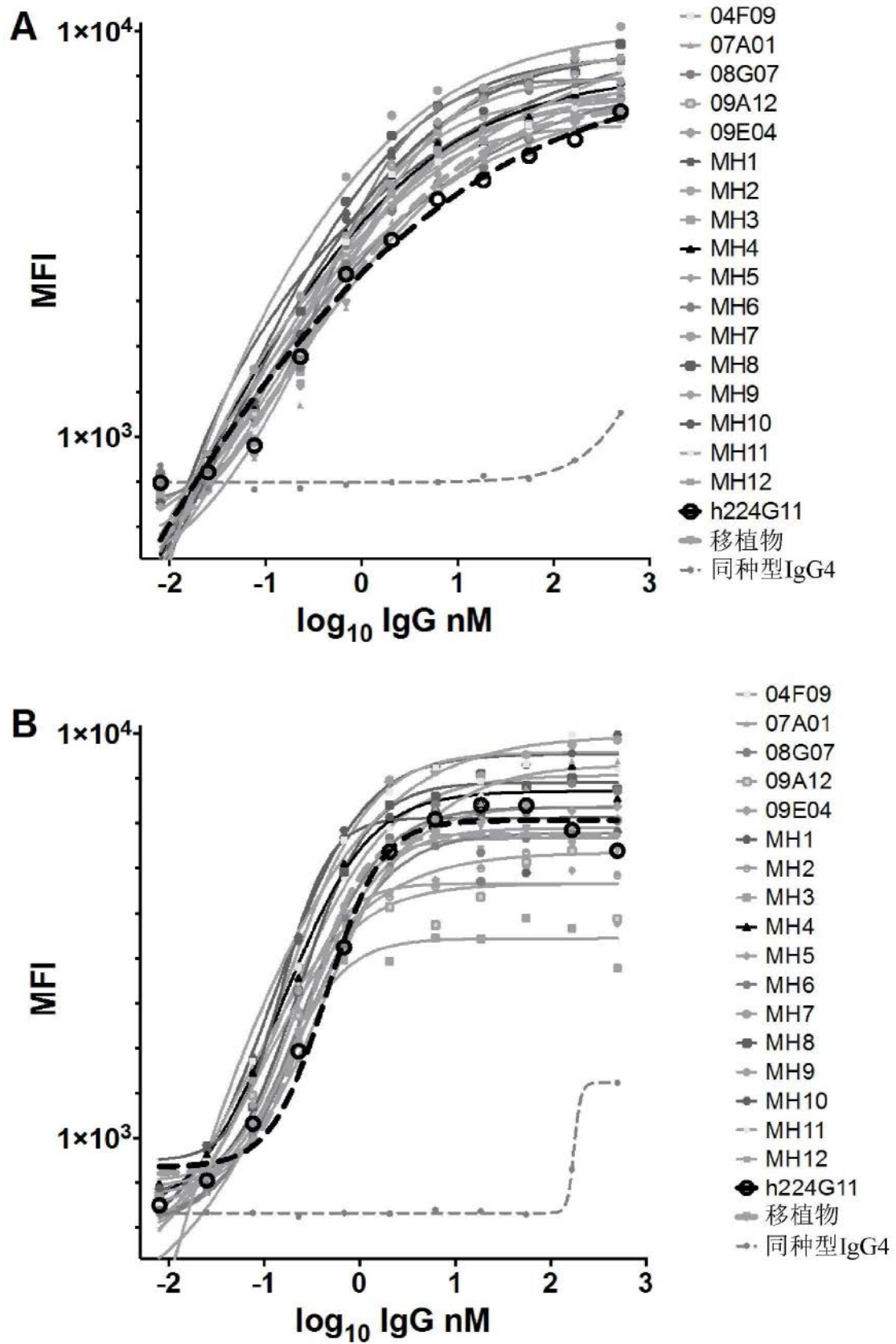


图5

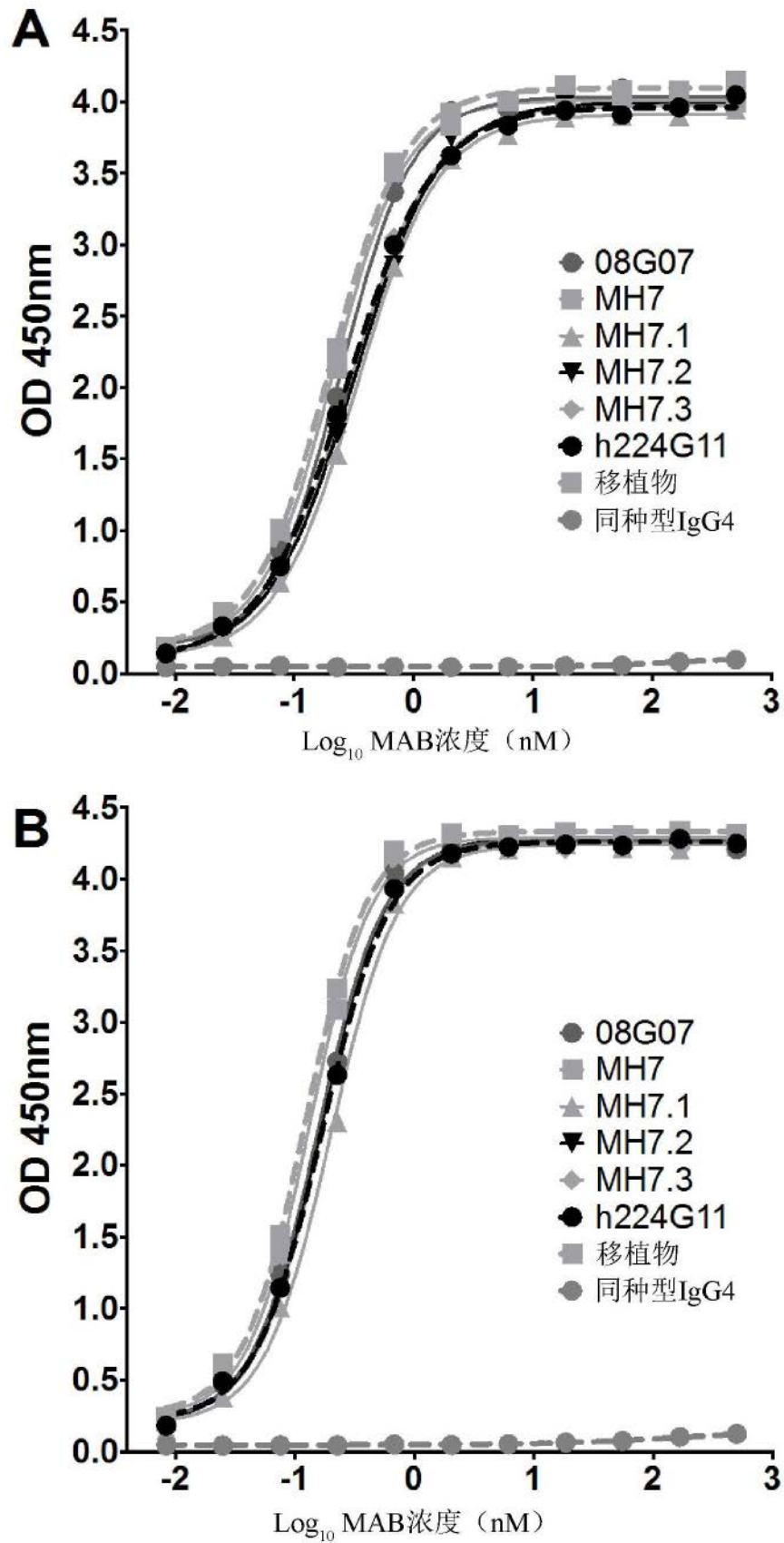


图6

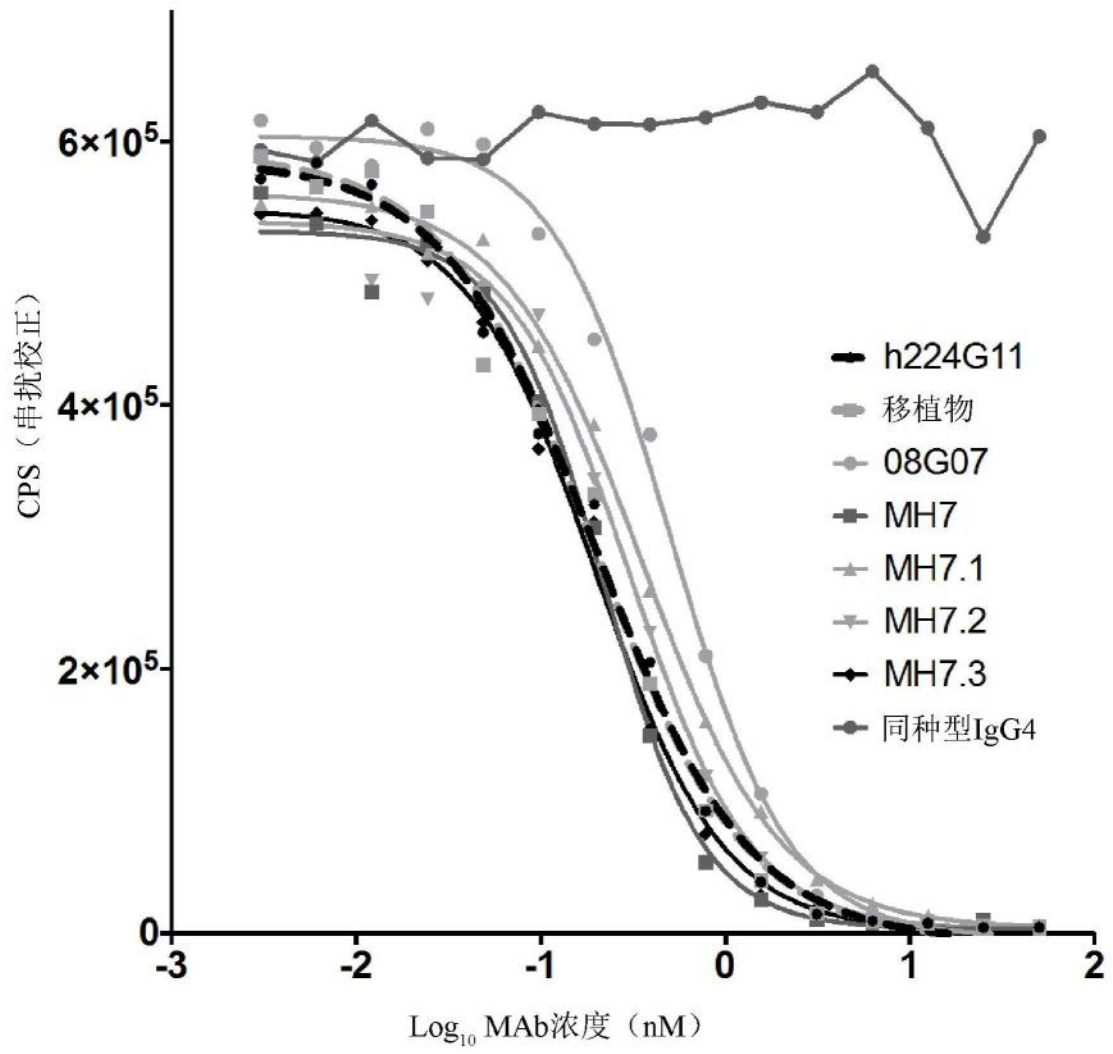


图7

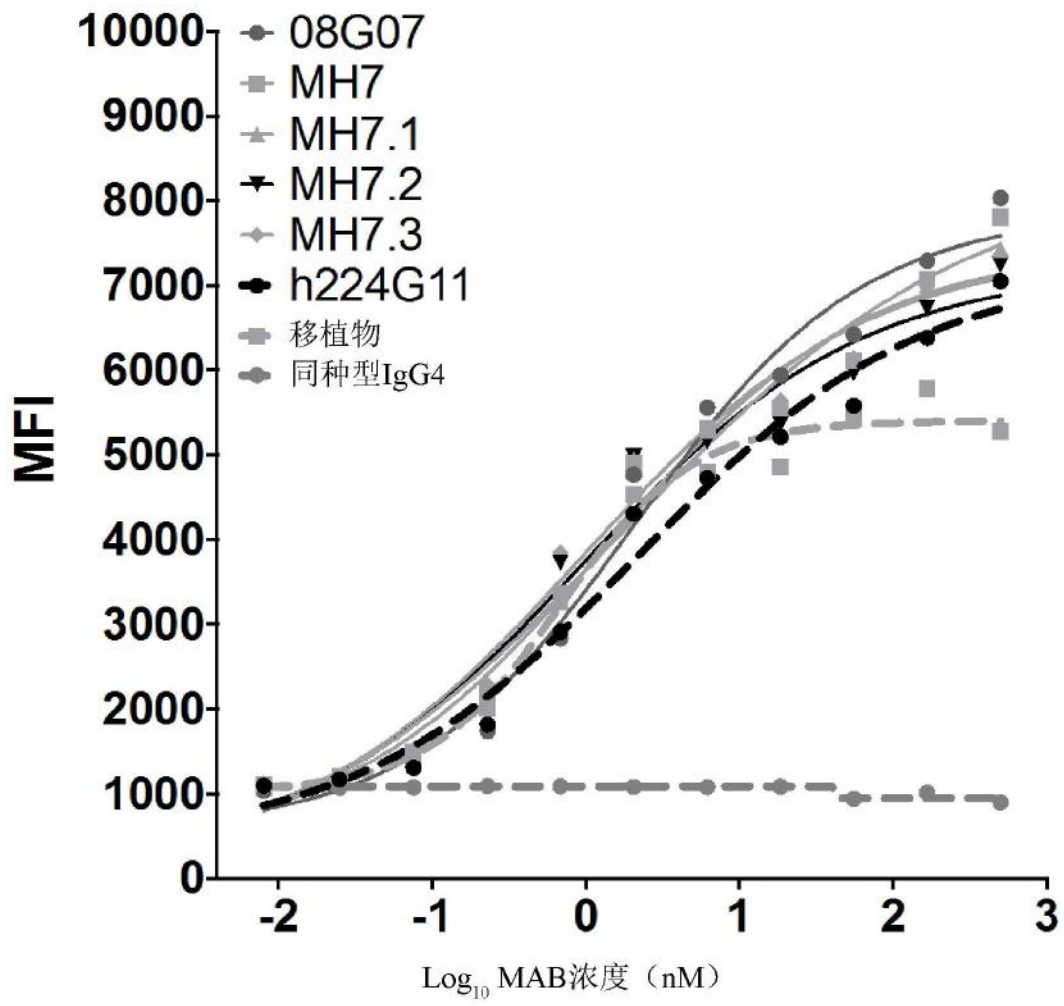


图8A

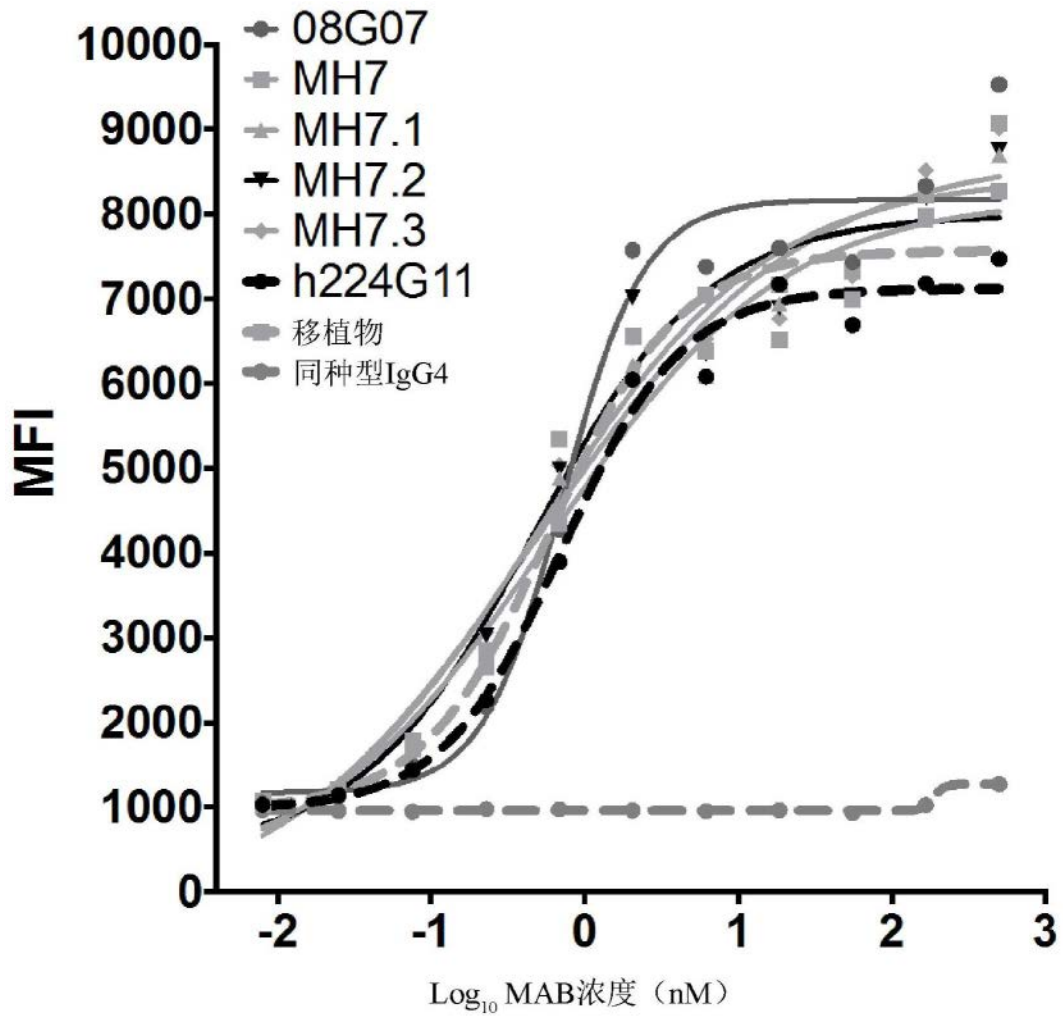


图8B

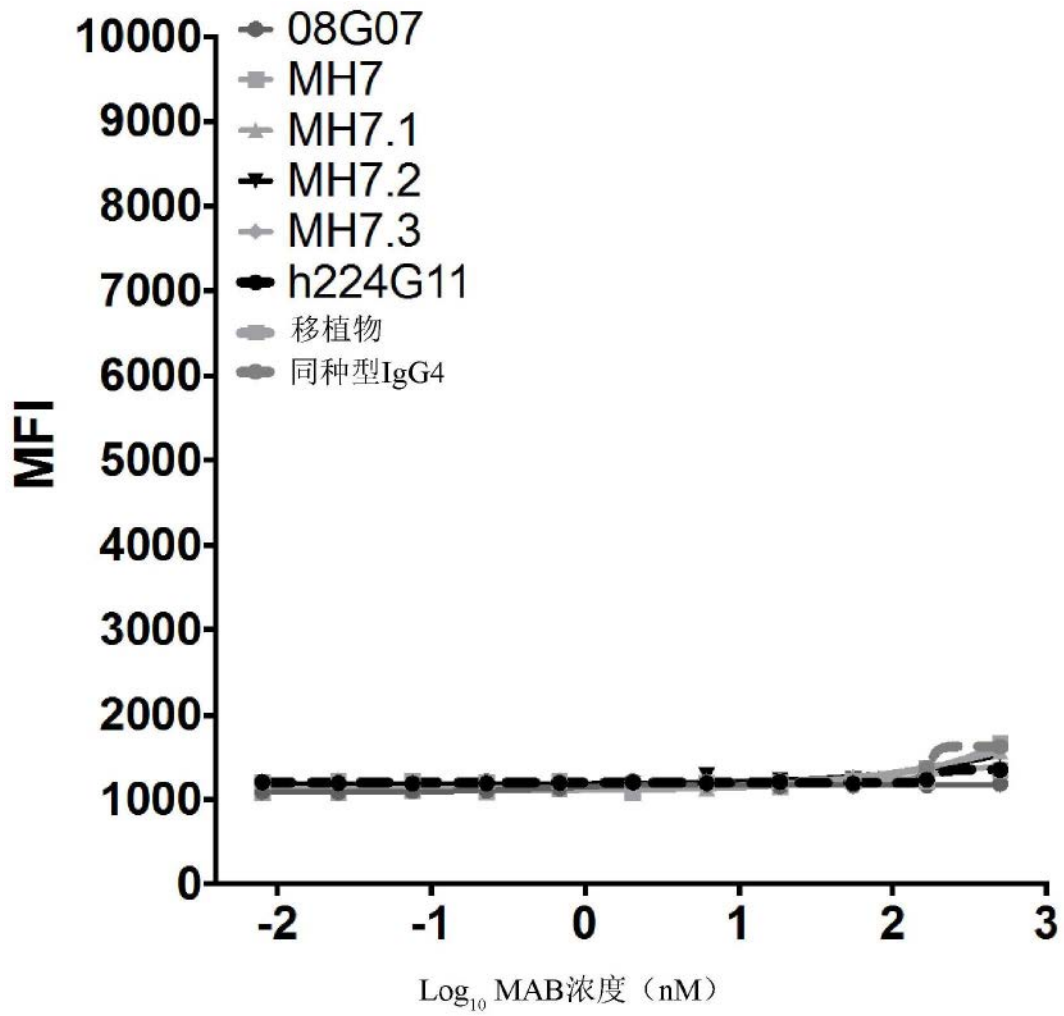


图8C

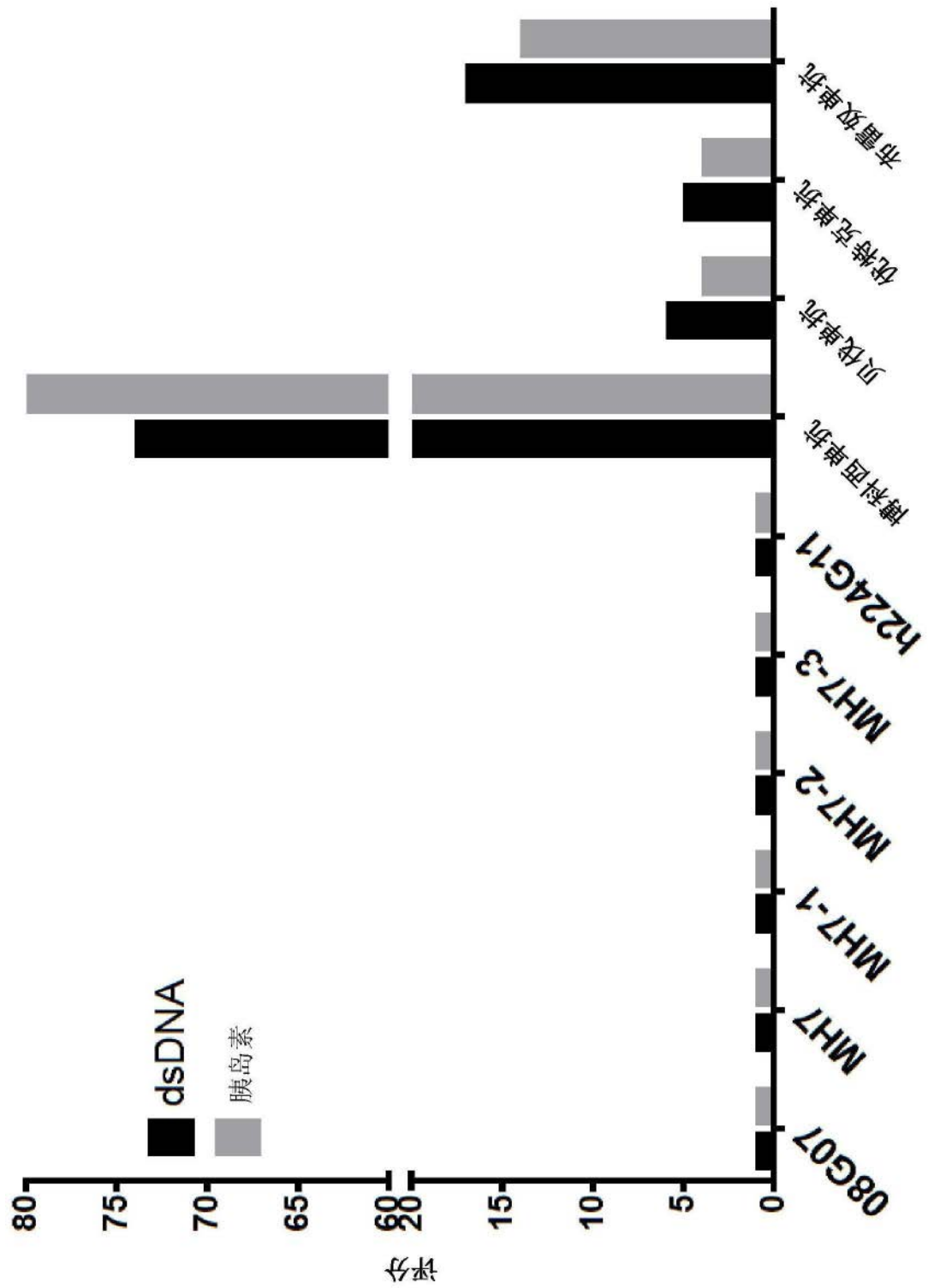


图9

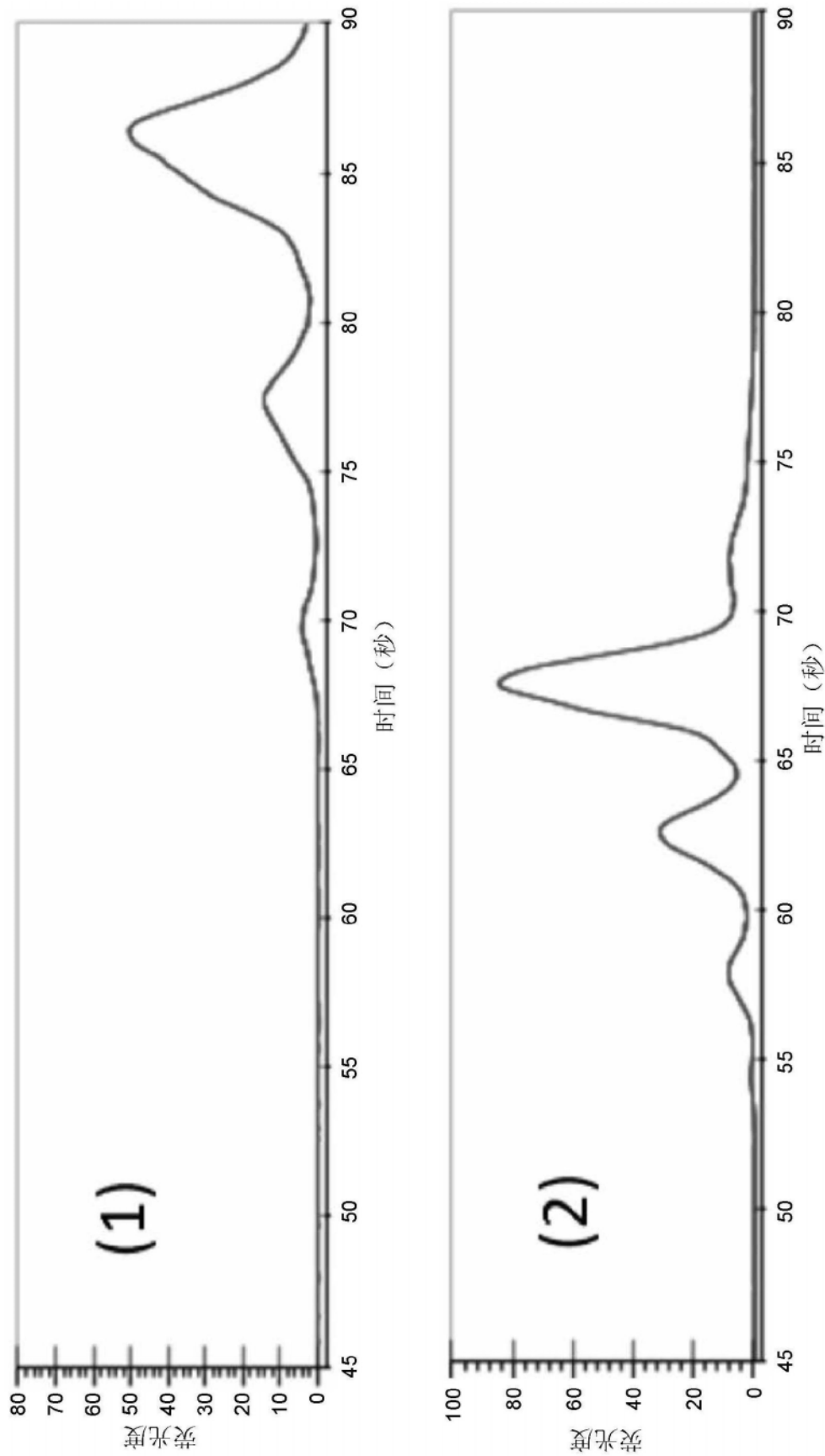


图10A

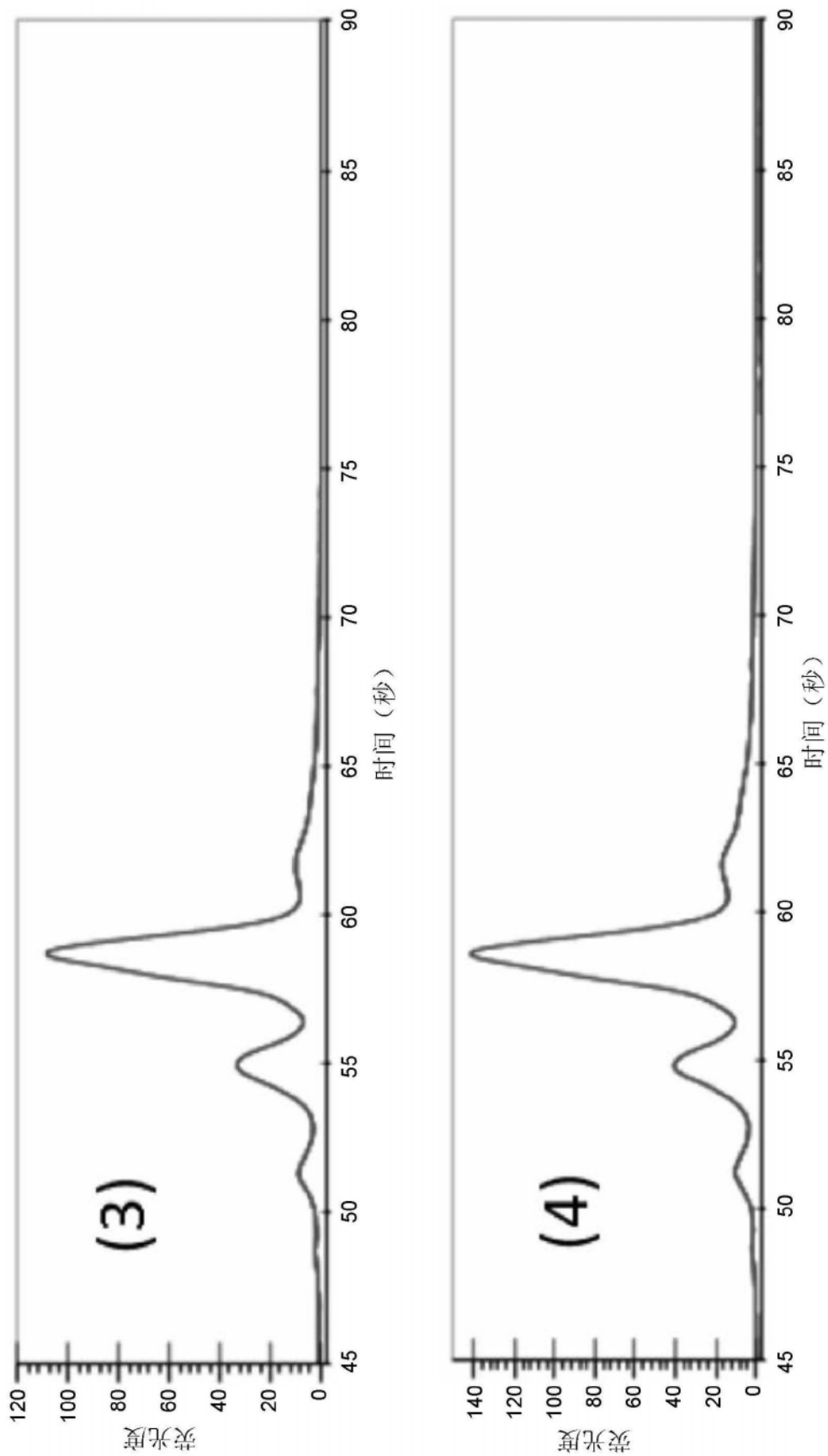


图10B

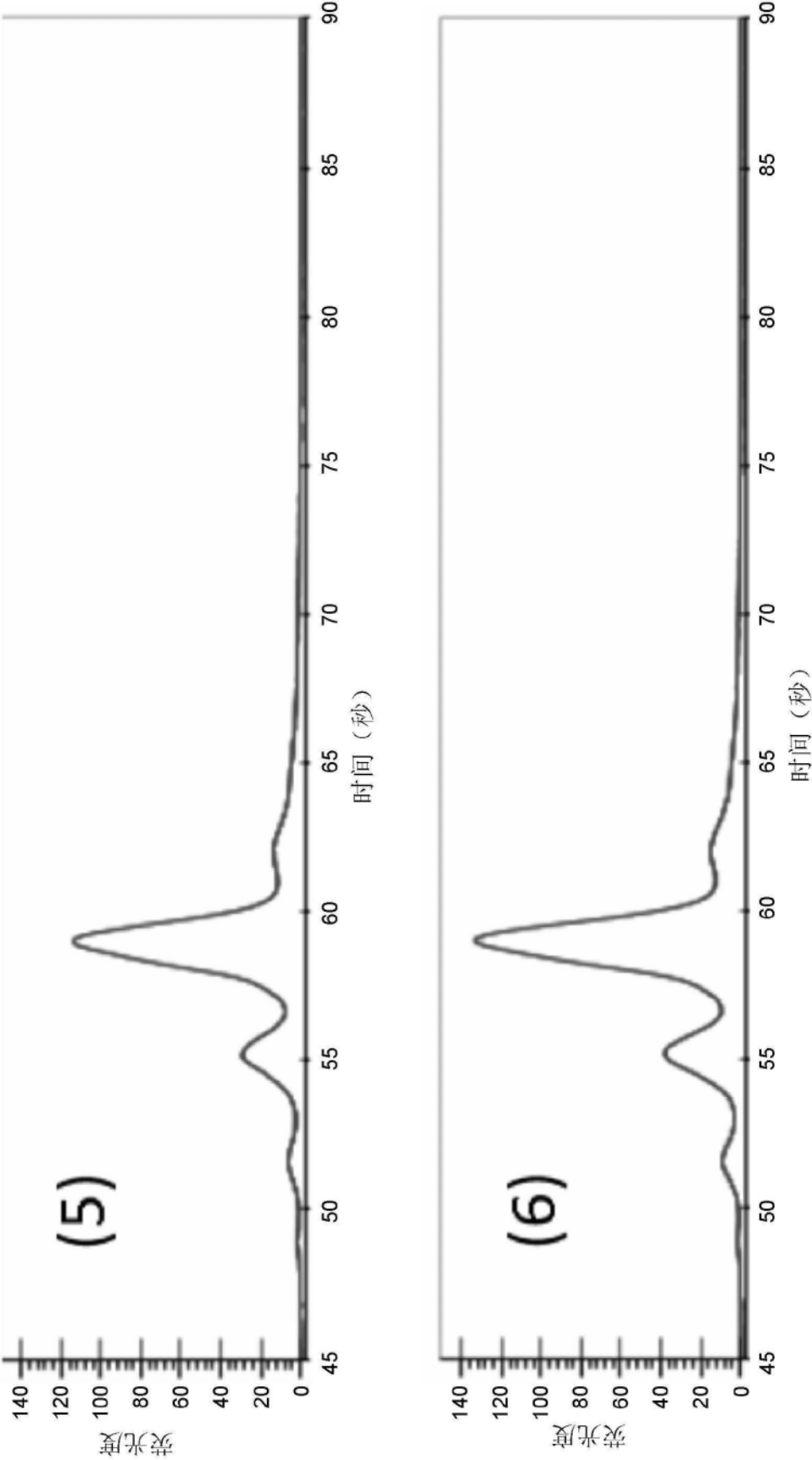


图10C

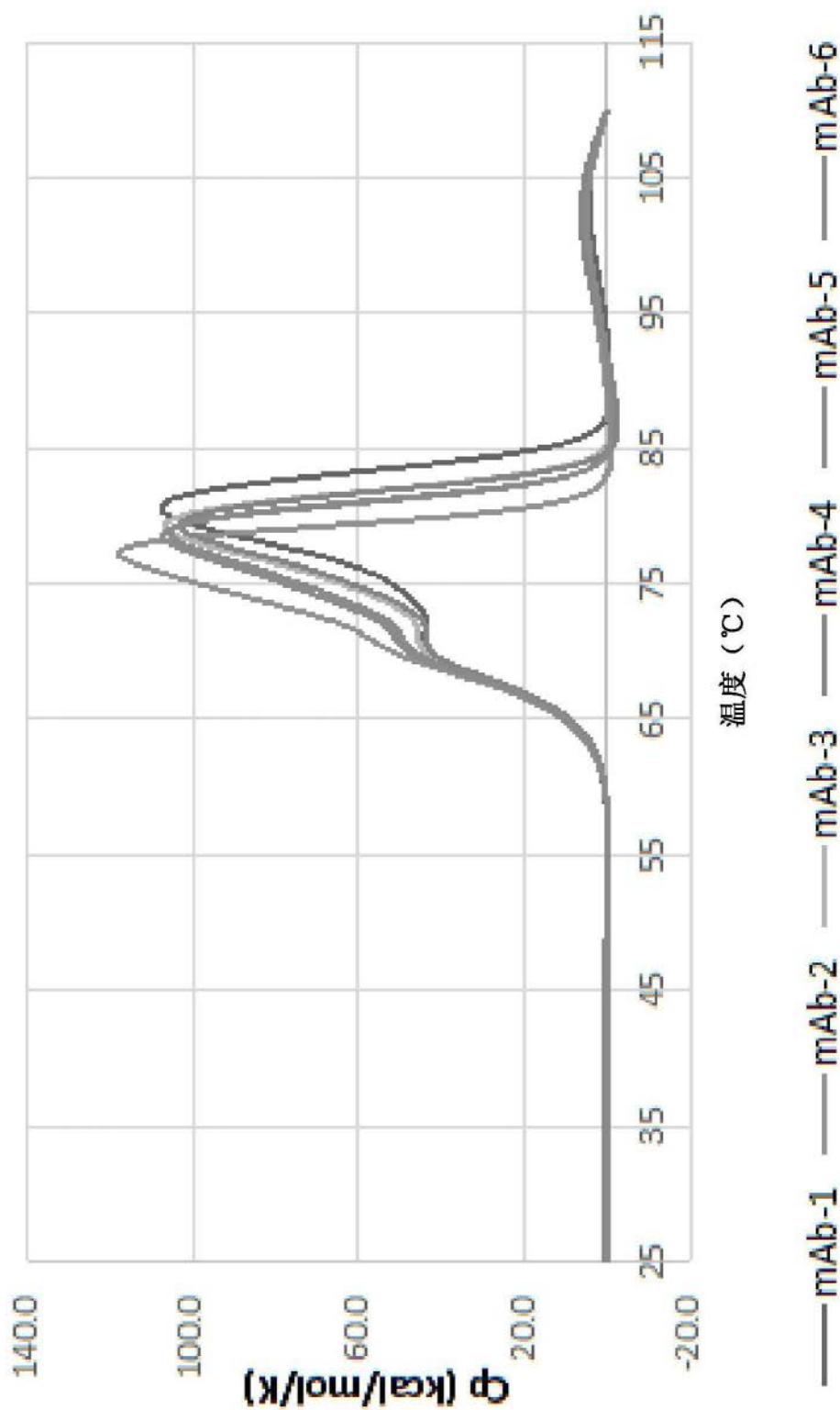


图11

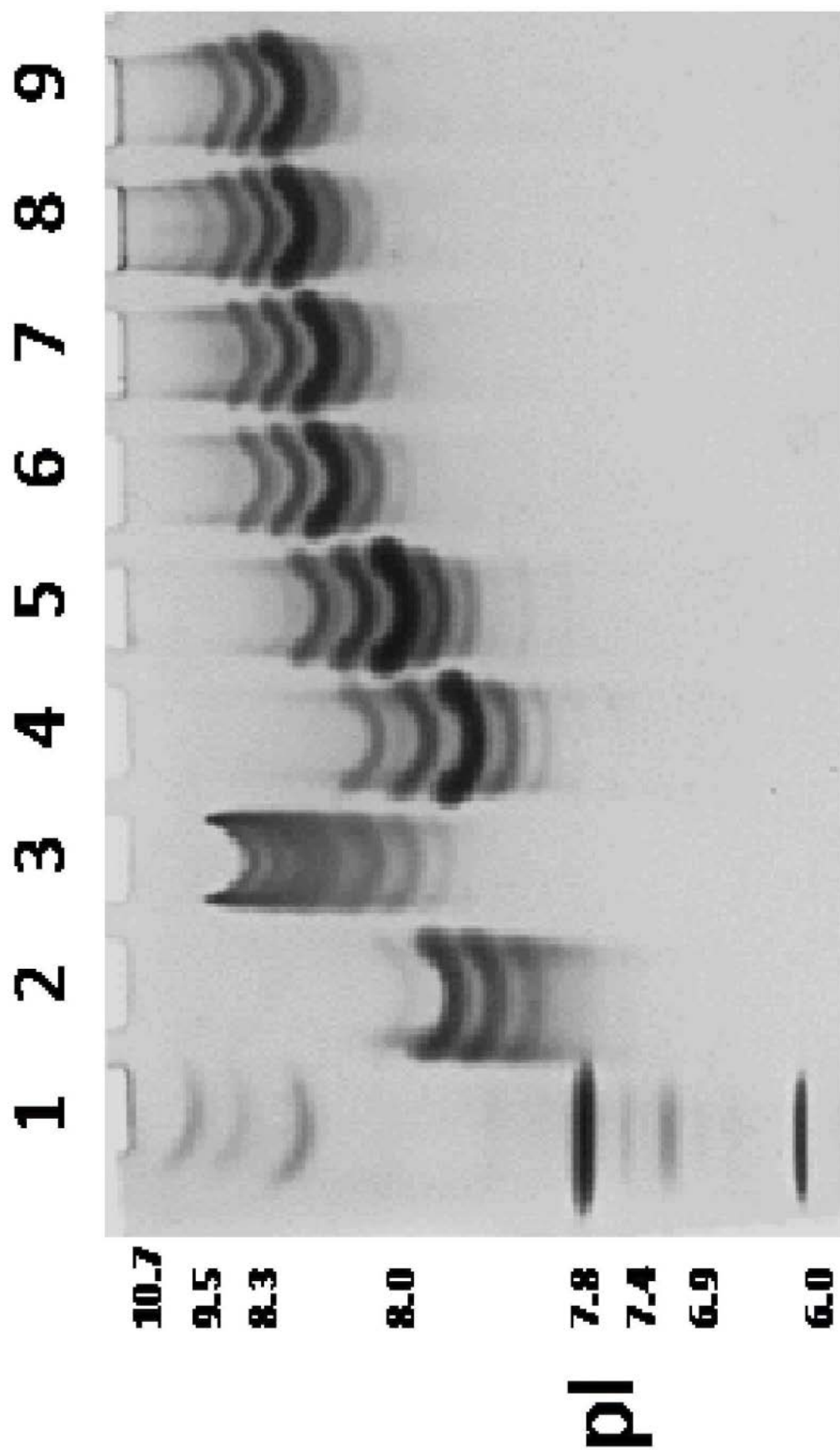


图12