



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.03.03**

**(21)** Номер заявки  
**201991136**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.11.15**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2017.01)

**(54) АНТИТЕЛА К МЕТ, БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ  
МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ МЕТ, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

**(31)** 62/423,068; 62/479,516

**(32)** 2016.11.16; 2017.03.31

**(33)** US

**(43)** 2019.09.30

**(86)** PCT/US2017/061757

**(87)** WO 2018/093866 2018.05.24

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Бабб Роберт, Чен Ганг, Дэли  
Кристофер, Дасилва Джон,  
Макдоналд Дуглас, Ниттоли Томас  
(US)**

**(74)** Представитель:  
**Угрюмов В.М., Глухарёва А.О.,  
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,  
Лебедев В.В., Костюшенкова М.Ю.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.  
(RU)**

**(56)** WO-A2-2011110642

WO-A2-2013064701

WO-A1-2005058965

L. LIU ET AL.: "LY2875358, a Neutralizing and Internalizing Anti-MET Bivalent Antibody, Inhibits HGF-Dependent and HGF-Independent MET Activation and Tumor Growth", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 20, no. 23, 17 September 2014 (2014-09-17), pages 6059-6070, XP055425191, US, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0543, the whole document for instance, the abstract

WO-A1-2011150454

GREENALL SAMEER A. ET AL.: "Non-agonistic bivalent antibodies that promote c-MET degradation and inhibit tumor growth and others specific for tumor related c-MET", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, vol. 7, no. 4, 1 April 2012 (2012-04-01), pages e34658.1-e34658.10, XP002697775, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0034658 Retrieved from the Internet: URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0034658> [retrieved on 2012-04-12], the whole document in particular, abstract

EP-A1-2963058

WO-A2-2006015371

**(57)** В настоящем документе представлены антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают МЕТ, и способы их применения. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы содержат первый и второй антигенсвязывающие домены, где первый и второй антигенсвязывающие домены связываются с двумя разными (предпочтительно неперекрывающимися) эпитопами внеклеточного домена МЕТ человека. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы способны к блокированию взаимодействия между МЕТ человека и его лигандом HGF. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы могут характеризоваться минимальной агонистической активностью в отношении МЕТ или не характеризоваться ею вовсе, например, по сравнению с моновалентными антигенсвязывающими молекулами, которые содержат только один из антигенсвязывающих доменов биспецифической молекулы, которые имеют тенденцию проявлять нежелательную агонистическую активность в отношении МЕТ. Также включены конъюгаты антитела и лекарственного средства (ADC), содержащие представленные в настоящем документе антитела или биспецифические антигенсвязывающие молекулы, связанные с цитотоксическим средством, радионуклидом или другим компонентом, а также способы лечения рака у субъекта путем введения субъекту биспецифической антигенсвязывающей молекулы или ADC на ее основе.

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антителам, биспецифическим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, а также конъюгатам антитела и лекарственного средства таких антител, которые специфически связывают рецептор фактора роста гепатоцитов (с-Met или MET) и модулируют сигнальную трансдукцию с участием MET, и способам их применения.

### Перечень последовательностей

Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с настоящим описанием в электронном виде посредством EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII с названием файла 10316WO01\_Sequence\_Listing\_ST25\_2017\_11\_06.TXT, дата создания 6 ноября 2017 года, и размером приблизительно 136 кБ. Перечень последовательностей, содержащийся в этом документе формата ASCII, является частью настоящего описания и включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Предшествующий уровень техники изобретения

Фактор роста гепатоцитов (HGF) (также известный как рассеивающий фактор [SF]) представляет собой гетеродимерный паракринный фактор роста, который проявляет свою активность за счет взаимодействия с рецептором HGF (HGFR). HGFR является продуктом онкогена с-Met, и также известен как MET. MET является рецепторной тирозинкиназой, состоящей из трансмембранной бета-цепи, связанной посредством дисульфидного мостика с внеклеточной альфа-цепью. Связывание HGF с MET активирует киназную каталитическую активность MET, что приводит в результате к фосфорилированию Tyr 1234 и Tyr 1235 бета-цепи и последующей активации нисходящих сигнальных путей.

Было показано, что сверхэкспрессия, активация или амплификация MET и/или HGF вовлечены в развитие немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), форм карциномы желудка, яичника, поджелудочной железы, щитовидной железы, молочной железы головы и шеи, толстой кишки и почки (Sierra and Tsao, Ther. Adv. Med. Oncol., 3(1 Suppl): S21-S35, 2011). Считается, что амплификация MET является ключевым фактором онкогенеза при формах NSCLC и пищеводно-желудочных злокачественных новообразованиях. Кроме того, мутации, обуславливающие делецию экзона 14 MET, были описаны в качестве онкогенных факторов при вариантах NSCLC. Линии опухолевых клеток, характеризующиеся амплификацией гена MET, в значительной степени зависят от MET в контексте роста и выживания. Данные доклинических исследований свидетельствуют о вовлечении передачи сигнала с участием MET в развитие резистентности к видам таргетной терапии при многих типах опухолей, таких как NSCLC, рак толстой и прямой кишки и плоскоклеточная карцинома головы и шеи (HNSCC).

Как доклинические, так и последние клинические результаты свидетельствуют о том, что в случае опухолей с такими генетическими изменениями наблюдается ответ на ингибиторы MET, что подтверждает роль MET в качестве фактора развития рака. Различные моновалентные блокирующие антитела к MET находятся в стадии клинической разработки для лечения различных форм рака (см. патенты США № 5686292; 5646036; 6099841; 7476724; 9260531 и 9328173; и публикации заявок на патент США № 2014/0349310 и 2005/0233960). Такие антитела включают онартузумаб (MetMab) и эмибегузумаб (Xiang et al., Clin. Cancer Res. 19(18): 5068-78, 2013, и Rosen et al, Clin. Cancer Res., Published October 10, 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1418). Некоторые из этих антител блокируют лиганд-зависимую передачу сигнала с участием MET, но не столь же эффективны в блокировании лиганд-независимой активации MET.

Все еще остается значительная неудовлетворенная медицинская потребность в усовершенствованных противораковых лекарственных средствах, которые эффективно блокируют как лиганд-зависимую, так и лиганд-независимую передачу сигнала с участием MET.

### Краткое раскрытие изобретения

В настоящем документе представлены антитела, антигенсвязывающие фрагменты антител, комбинации бивалентных моноспецифических антител и биспецифические антитела, которые связывают рецепторный белок с-Met человека (MET × MET). Антитела являются пригодными, среди прочего, для нацеливания на опухолевые клетки, которые экспрессируют MET. Антитела к MET и их антигенсвязывающие части можно применять отдельно в немодифицированной форме, или они могут быть включены в виде части конъюгата антитела и лекарственного средства или биспецифического антитела.

Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора нижеследующего подробного описания.

### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой таблицу, в которой проиллюстрированы компоненты 272 иллюстративных биспецифических антител MET × MET, описанных в настоящем документе. Каждая пронумерованная ячейка таблицы соответствует уникальному биспецифическому антителу, содержащему антигенсвязывающий домен "D1" и антигенсвязывающий домен "D2", где антигенсвязывающий домен D1 содержит переменный домен иммуноглобулина (пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR) или CDR из соответствующего антитела к MET, приведенного по оси Y, и где антигенсвязывающий домен D2 содержит переменный домен иммуноглобулина (пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR) или CDR из соответствующего антитела к MET, приведенного по оси X.

Фиг. 2 представляет собой схематическое изображение анализа с использованием репортерной системы на основе люциферазы, применяемого для оценки индуцированной антителом активации сигнального пути с участием MET или блокирования антителом HGF-индуцированной активации сигнального пути в клетках HEK293T, содержащих конструкцию SRE-репортерный ген люциферазы.

Фиг. 3(A-B) представляют собой линейные графики, на которых показаны относительные световые единицы (RLU), отображающие экспрессию SRE-люциферазы в зависимости от логарифма концентрации антитела в молях на литр. Закрашенные квадраты (■) соответствуют исходному бивалентному моноспецифическому антителу H4H13306P2, закрашенные пирамиды (▲) соответствуют исходному бивалентному моноспецифическому антителу H4H13312P2, закрашенные круги (●) соответствуют моновалентному антителу, закрашенные ромбы (◆) соответствуют изотипическому контролю и закрашенные перевернутые пирамиды (▼) соответствуют отсутствию лиганда. На фиг. 3A показано только антитело без лиганда HGF. На фиг. 3B показаны антитела и лиганд HGF.

Фиг. 4(A-B) представляют собой линейные графики, на которых показаны относительные световые единицы (RLU), отображающие экспрессию SRE-люциферазы в зависимости от логарифма концентрации антитела в молях на литр. Закрашенные квадраты (■) соответствуют моновалентному антителу к MET, закрашенные круги (●) соответствуют биспецифическому антителу MET × MET и закрашенные ромбы (◆) соответствуют исходному антителу H4H13312P2. На фиг. 4A показано только антитело без лиганда HGF. На фиг. 4B показаны антитела и лиганд HGF.

Фиг. 5 представляет собой гистограмму, на которой показан относительный рост клеток рака желудка SNU5 с амплифицированным Met в зависимости от обработки бивалентными моноспецифическими антителами человека к MET 1-18, контрольным антителом и моновалентным антителом к MET. В целях сравнения антитело 8 (ось абсцисс) представляет собой исходное антитело H4H13306P2, и антитело 11 (ось абсцисс) представляет собой исходное антитело H4H13312P2.

Фиг. 6(A-B) представляют собой гистограммы, на которых показан относительный рост клеток с амплифицированным Met в зависимости от обработки биспецифическим антителом MET × MET, контрольным антителом и моновалентным антителом к MET. На фиг. 6A показан относительный рост клеток SNU5 в зависимости от обработки контрольным антителом, моновалентным антителом при 0,1, 1 и 10 мкг/мл и биспецифическим антителом MET × MET при 0,1, 1 и 10 мкг/мл. На фиг. 6B показан относительный рост клеток EBC-1 в зависимости от обработки контрольным антителом и биспецифическим антителом MET × MET при 0,1 и 1 мкг/мл.

На фиг. 7(A-B) показаны иммуноблоттограммы pMET (фосфорилированного MET), MET, pErk (фосфорилированного Erk) и тубулина (в качестве контроля нагрузки), выделенных из клеток Hs746T после обработки контрольным антителом и биспецифическим антителом MET × MET (фиг. 7A), и экспрессии MET (и тубулина в качестве контроля нагрузки) в клетках Hs746T после обработки биспецифическим антителом MET × MET в течение 0, 2 и 6 ч (фиг. 7B).

На фиг. 8 показана иммуноблоттограмма pMET, MET, pErk и тубулина (в качестве контроля нагрузки), выделенных из клеток Hs746T после обработки контрольным антителом, биспецифическим антителом MET × MET, моноспецифическим бивалентным исходным антителом 1, моноспецифическим бивалентным исходным антителом 2 к MET и комбинацией исходных антител 1 и 2.

На фиг. 9 показана иммуноблоттограмма экспрессии MET (и тубулина в качестве контроля нагрузки) в клетках Hs746T после обработки контрольным антителом и биспецифическим антителом MET × MET в течение 2, 6 и 18 ч.

На фиг. 10(A-B) показаны иммуноблоттограммы pMET, MET, pErk и тубулина (в качестве контроля нагрузки), выделенных из клеток SNU5 после обработки контрольным антителом и биспецифическим антителом MET × MET (фиг. 10A); и экспрессии MET (и тубулина в качестве контроля нагрузки) в клетках SNU5 после обработки контрольным антителом и моновалентным антителом к MET (фиг. 10B).

На фиг. 11 показана иммуноблоттограмма pMET, MET, pErk и тубулина (в качестве контроля нагрузки), выделенных из клеток EBC-1 после обработки контрольным антителом и биспецифическим антителом MET × MET.

Фиг. 12 представляет собой линейный график, на котором показано изменение объема опухоли EBC-1 в кубических миллиметрах в зависимости от времени в днях после имплантации клеток EBC-1 животным, обработанным контрольным антителом (закрашенный квадрат ■), моновалентным антителом к MET (закрашенный круг ●) или биспецифическим антителом MET × MET (закрашенный ромб ◆).

Фиг. 13(A-B) представляют собой гистограммы, на которых показан относительный рост клеток с амплифицированным Met в зависимости от обработки биспецифическим антителом MET × MET, контрольным антителом и моновалентным антителом к MET. На фиг. 13A показан относительный рост клеток Hs746T в зависимости от обработки контрольным антителом, биспецифическим антителом MET × MET, исходным моноспецифическим антителом 1 MET × MET, исходным моноспецифическим антителом 2 MET × MET и комбинацией исходных антител 1 и 2. На фиг. 13B показан относительный рост клеток Hs746T в зависимости от обработки контрольным антителом, моновалентным антителом при 1, 10 и 25 мкг/мл и биспецифическим антителом MET × MET при 1, 10 и 25 мкг/мл.

Фиг. 14 представляет собой гистограмму, на которой показан относительный рост клеток NCI-H596 в зависимости от обработки контрольным антителом (С), биспецифическим антителом MET × MET (ММ), исходным моноспецифическим антителом 1 MET × MET (М1), исходным моноспецифическим антителом 2 MET × MET (М2), комбинацией исходных антител 1 и 2 (М1М2) и фактором роста гепатоцитов (HGF) в качестве агониста MET.

Фиг. 15 представляет собой линейный график, на котором показано изменение объема опухоли Hs746T в кубических миллиметрах в зависимости от времени в днях после имплантации клеток Hs746T животным, обработанным контрольным антителом (закрашенный квадрат ■), моновалентным антителом к MET (закрашенный круг ●) или биспецифическим антителом MET × MET (закрашенный ромб ◆).

Фиг. 16А представляет собой линейный график, на котором показано изменение объема опухоли SNU5 в кубических миллиметрах в зависимости от времени в днях после имплантации клеток SNU5 животным, обработанным контрольным антителом (закрашенный квадрат ■), моновалентным антителом к MET при 1 мг/мл (закрашенный круг ●), моновалентным антителом к MET при 10 мг/мл (незакрашенный круг ○), биспецифическим антителом MET × MET при 1 мг/мл (закрашенный ромб ◆) или биспецифическим антителом MET × MET при 10 мг/мл (незакрашенный ромб ◇).

Фиг. 16В представляет собой иммуноблоттограмму pMET, MET и тубулина (контроль нагрузки), выделенных из клеток опухоли SNU5, удаленной у мыши с ксенотрансплантатной моделью после обработки контрольным антителом, 10 мг/кг моновалентного антитела к MET и 10 мг/кг биспецифического антитела MET × MET.

Фиг. 17 представляет собой линейный график, на котором показано изменение объема опухоли U87-MG в кубических миллиметрах в зависимости от времени в днях после имплантации клеток U87-MG животным, обработанным контрольным антителом (закрашенный квадрат ■), моновалентным антителом к MET (закрашенный круг ●) или биспецифическим антителом MET × MET (закрашенный ромб ◆).

Фиг. 18 представляет собой линейный график, на котором показано изменение объема опухоли U118-MG в кубических миллиметрах в зависимости от времени в днях после имплантации клеток U118-MG животным, обработанным контрольным антителом (закрашенный квадрат ■), моновалентным антителом к MET (закрашенный круг ●) или биспецифическим антителом MET × MET (незакрашенный ромб ◇).

Фиг. 19 представляет собой схематическое изображение синтеза мейтанзиноида 6.

Фиг. 20 представляет собой схематическое изображение синтеза промежуточного соединения 1 мейтанзиноида.

### Подробное раскрытие изобретения

Перед тем, как будет описано настоящее изобретение, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и условиями проведения экспериментов, поскольку такие способы и условия могут различаться. Также следует понимать, что применяемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления, и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все применяемые в настоящем документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны рядовому специалисту в данной области, к которой относится настоящее изобретение. В контексте настоящего документа термин "приблизительно" при применении в отношении конкретного указанного числового значения означает, что значение может отличаться от указанного значения не более чем на 1%. Например, в контексте настоящего документа выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101 и все промежуточные значения (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя для реализации на практике или тестирования настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, подобные или эквивалентные таковым, описанным в настоящем документе, предпочтительными являются способы и материалы, описанные в настоящем документе. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Белок MET.

Выражения "MET", "с-Met" и т.д. в контексте настоящего документа относятся к трансмембранной рецепторной тирозинкиназе человека, предусматривающей: (1) аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 145, и/или имеющей аминокислотную последовательность, изложенную под номером доступа в NCBI NM\_001127500.2, представляющую собой непротессированный предшественник пропротеина изоформы "a", (2) аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 146, и/или имеющей аминокислотную последовательность, изложенную под номером доступа в NCBI NM\_000236.2, представляющую собой непротессированный предшественник пропротеина изоформы "b", (3) аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 147, и/или имеющей аминокислотную последовательность, изложенную под номером доступа в NCBI NM\_001311330.1, представляющую собой непротессированный предшественник пропротеина изоформы "c", и/или (3) зрелый белок, содержащий цитоплазматическую субъединицу альфа (SEQ ID NO: 148), общую для всех трех

изоформ, и трансмембранную субъединицу бета (SEQ ID NO: 149, 150 или 151 изоформы а, b и с соответственно). Выражение "MET" включает как мономерные, так и мультимерные молекулы MET. В контексте настоящего документа выражение "мономерный MET человека" означает белок MET или его часть, который не содержит или не имеет каких-либо доменов, обеспечивающих мультимеризацию, и который в нормальных условиях существует в виде одной молекулы MET без прямой физической связи с другой молекулой MET. Иллюстративная мономерная молекула MET представляет собой молекулу, называемую в настоящем документе "hMET.mmh", содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152 (см., например, пример 3 в настоящем документе). В контексте настоящего документа выражение "димерный MET человека" означает структуру, содержащую две молекулы MET, соединенные между собой посредством линкера, ковалентной связи, нековалентной связи или посредством домена, обеспечивающего мультимеризацию, такого как Fc-домен антитела. Иллюстративная димерная молекула MET представляет собой молекулу, называемую в настоящем документе "hMET.mFc", содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153 (см., например, пример 3 в настоящем документе).

Подразумевается, что все упоминаемые в настоящем документе белки, полипептиды и фрагменты белка относятся к человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они относятся к виду, отличному от человека. Таким образом, выражение "MET" означает MET человека, если не указано, что он относится к виду, отличному от человека, например, "MET мыши", "MET обезьяны" и т.д.

В контексте настоящего документа выражение "экспрессируемый на поверхности клетки MET" означает один или несколько белков MET или его(их) внеклеточный домен, который(е) экспрессируется(ются) на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, так что по меньшей мере часть белка MET экспонирована на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающего участка антитела. "Экспрессируемый на поверхности клетки MET" может содержать или состоять из белка MET, экспрессируемого на поверхности клетки, которая в нормальных условиях экспрессирует белок MET. В качестве альтернативы, "экспрессируемый на поверхности клетки MET" может содержать или состоять из белка MET, экспрессируемого на поверхности клетки, которая в нормальных условиях не экспрессирует MET человека на ее поверхности, а была искусственно сконструирована с возможностью экспрессии MET на ее поверхности.

Антитела к MET и их антигенсвязывающие фрагменты.

В соответствии с одним аспектом представлены антитела к MET (например, моноспецифические антитела к MET). Иллюстративные антитела к MET в соответствии с этим аспектом перечислены в табл. 1 и 2 в настоящем документе. В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к MET, из которых могут быть получены биспецифические антигенсвязывающие молекулы (в настоящем документе применяется взаимозаменяемо с биспецифическим антигенсвязывающим белком), раскрытые в настоящем документе. В табл. 2 представлены идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к MET.

Также в настоящем документе представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают MET и оказывают агонистическое действие (например, активация) в отношении сигнального пути с участием MET в клетках, а также применение таких антител в терапевтических условиях, при которых активация передачи сигнала с участием MET будет благоприятной или терапевтически полезной. Неограничивающие примеры таких агонистических антител к MET включают антитело, называемое в настоящем документе "H4H14636D", а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR тяжелой и легкой цепей (SEQ ID NO: 28, 30, 32, 140, 142, 144) и/или их переменные домены тяжелой и легкой цепей (SEQ ID NO: 26/138).

В настоящем документе представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают MET, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей HCVR, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

В настоящем документе представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают MET, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей LCVR, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

В настоящем документе представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают MET, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), предусматривающую любую из приведенных в табл. 1 аминокислотных последователь-



ностей.

Также в настоящем документе представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают MET, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), предусматривающую любую из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей HCDR3 в паре с любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей LCDR3. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в пределах любого из приведенных в табл. 1 иллюстративных антител к MET. Согласно определенным вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 8/144, 16/144, 24/144, 32/144, 40/144, 48/144, 56/144, 64/144, 72/144, 80/144, 88/144, 96/144, 104/144, 112/144, 120/144, 128/144 и 136/144.

Также в настоящем документе представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают MET, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в пределах любого из приведенных в табл. 1 иллюстративных антител к MET. Согласно определенным вариантам осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-140-142-144, 12-14-16-140-142-144, 20-22-24-140-142-144, 28-30-32-140-142-144, 36-38-40-140-142-144, 44-46-48-140-142-144, 52-54-56-140-142-144, 60-62-64-140-142-144, 68-70-72-140-142-144, 76-78-80-140-142-144, 84-86-88-140-142-144, 92-94-96-140-142-144, 100-102-104-140-142-144, 108-110-112-140-142-144, 116-118-120-140-142-144, 124-126-128-140-142-144 и 132-134-136-140-142-144.

Согласно сходному варианту осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают MET, содержат набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в пределах пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено для любого из приведенных в табл. 1 иллюстративных антител к MET. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают MET, содержат набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в пределах пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-140-142-144, 12-14-16-140-142-144, 20-22-24-140-142-144, 28-30-32-140-142-144, 36-38-40-140-142-144, 44-46-48-140-142-144, 52-54-56-140-142-144, 60-62-64-140-142-144, 68-70-72-140-142-144, 76-78-80-140-142-144, 84-86-88-140-142-144, 92-94-96-140-142-144, 100-102-104-140-142-144, 108-110-112-140-142-144, 116-118-120-140-142-144, 124-126-128-140-142-144 и 132-134-136-140-142-144.

Способы и методики идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в данной области, и их можно применять для идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей определенных HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные общепринятые подходы, которые можно применять для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение на основе модели антитела. В общих чертах, определение по Kabat основывается на вариативности последовательностей, определение по Chothia основывается на расположении областей структурных петель, а определение на основе модели антитела является компромиссом между подходами по Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Для идентификации последовательностей CDR в пределах антитела также можно использовать общедоступные базы данных.

Также в настоящем документе представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела к MET или их части. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим любую из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей HCVR; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 2 последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих HCVR, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Также представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей LCVR; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 2 последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих LCVR, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Также представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей HCDR1; согласно определенным вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из



Также в настоящем документе представлены рекомбинантные векторы экспрессии, способные к экспрессии полипептида, содержащего вариабельную область тяжелой или легкой цепей антитела к MET. Например, рекомбинантные векторы экспрессии содержат любую из молекул нуклеиновых кислот, упоминаемых выше, т.е. молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 1. Также в объем настоящего раскрытия включены клетки-хозяева, в которые вводили такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих возможность продукции антител или фрагментов антител, и выделения полученных таким образом антител и фрагментов антител.

В настоящем документе представлены антитела к MET с модифицированным профилем гликозилирования. Согласно некоторым вариантам осуществления может быть пригодна модификация с удалением нежелательных сайтов гликозилирования или отсутствие у антитела фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, с целью усиления функции, представляющей собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Согласно другим вариантам применения, с целью модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC) можно выполнять модификацию в отношении галактозилирования.

### **Биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET**

Авторы настоящего изобретения наблюдали, что определенные моноспецифические антигенсвязывающие молекулы, связывающие MET, которые блокируют связывание HGF с MET, склонны к сильной активации передачи сигнала с участием MET (нежелательное последствие для терапевтической молекулы). Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, однако, что биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые одновременно связываются с двумя отдельными эпитопами на внеклеточном домене белка MET, являются эффективными в блокировании связывания лиганда с MET, обуславливая при этом небольшое агонистическое действие в отношении передачи сигнала с участием MET.

Соответственно, в настоящем документе представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен (также называемый в настоящем документе "D1") и второй антигенсвязывающий домен (также называемый в настоящем документе "D2"). Одновременное связывание двух отдельных эпитопов MET биспецифической антигенсвязывающей молекулой приводит в результате к эффективному блокированию лиганда с минимальной активацией передачи сигнала с участием MET.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые содержат первый антигенсвязывающий домен (D1), который специфически связывает первый эпитоп MET человека, и второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфически связывает второй эпитоп MET человека, могут называться в настоящем документе как "биспецифические антитела MET × MET", "MET × MET", или другими сходными терминами. Согласно некоторым вариантам осуществления первый эпитоп MET человека содержит аминокислоты 192-204 SEQ ID NO: 155. Согласно некоторым вариантам осуществления второй эпитоп MET человека содержит аминокислоты 305-315 и 421-455 SEQ ID NO: 155. Согласно некоторым вариантам осуществления первый эпитоп MET человека содержит аминокислоты 192-204 SEQ ID NO: 155; и второй эпитоп MET человека содержит аминокислоты 305-315 и 421-455 SEQ ID NO: 155.

Согласно определенным вариантам осуществления домены D1 и D2 биспецифического антитела MET × MET не конкурируют друг с другом. Отсутствие конкуренции между D1 и D2 за связывание с MET означает, что соответствующие моноспецифические антигенсвязывающие белки, из которых были получены D1 и D2, не конкурируют друг с другом за связывание с MET человека. В данной области известны иллюстративные анализы конкуренции антигенсвязывающих белков, неограничивающие примеры которых описаны в другом месте настоящего документа.

Согласно определенным вариантам осуществления D1 и D2 связываются с разными (например, неперекрывающимися или частично перекрывающимися) эпитопами на MET, как описано в другом месте настоящего документа.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET могут быть сконструированы с применением антигенсвязывающих доменов двух отдельных моноспецифических антител к MET. Например, серия моноклональных моноспецифических антител к MET может быть получена с применением стандартных известных в данной области способов. Полученные таким образом отдельные антитела можно тестировать попарно друг против друга на предмет перекрестной конкуренции за связывание с белком MET. Если два разных антитела к MET способны связываться с MET одновременно (т.е. не конкурируют друг с другом), тогда антигенсвязывающий домен из первого антитела к MET и антигенсвязывающий домен из второго неконкурентного антитела к MET могут быть сконструированы в виде одного биспецифического антитела MET × MET в соответствии с настоящим раскрытием.

В соответствии с настоящим раскрытием биспецифическая антигенсвязывающая молекула может представлять собой один полифункциональный полипептид, или она может представлять собой мультимерный комплекс из двух или более полипептидов, которые ковалентно или нековалентно связаны друг с другом. Как будет ясно из настоящего раскрытия, любая антигенсвязывающая конструкция, которая способна связывать одновременно два отдельных неидентичных эпитопа молекулы MET, считается биспе-

цифической антигенсвязывающей молекулой. Любая из описанных в настоящем документе биспецифических антигенсвязывающих молекул или ее вариантов может быть сконструирована с применением стандартных методов молекулярной биологии (например, технологии рекомбинантных ДНК и белковой инженерии), как будет известно специалисту в данной области.

#### Антигенсвязывающие домены

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему раскрытию содержат два отдельных антигенсвязывающих домена (D1 и D2). В контексте настоящего документа выражение "антигенсвязывающий домен" означает любой пептид, полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты, молекулу каркасного типа, представляющую пептид молекулу или содержащую полипептид конструкцию, которые способны к специфическому связыванию конкретного представляющего интерес антигена (например, МЕТ человека). Термин "специфически связывает" и т.п. в контексте настоящего документа означает, что антигенсвязывающий домен образует с конкретным антигеном комплекс, характеризующийся константой диссоциации ( $K_D$ ) 500 пМ или меньше, и не связывает другие неродственные антигены в обычных условиях тестирования. "Неродственные антигены" представляют собой белки, пептиды или полипептиды, которые характеризуются по отношению друг к другу идентичностью аминокислот менее 95%.

Иллюстративные категории антигенсвязывающих доменов, которые можно применять в контексте настоящего раскрытия, включают антитела, антигенсвязывающие части антител, пептиды, которые специфически взаимодействуют с конкретным антигеном (например, пептитела), рецепторные молекулы, которые специфически взаимодействуют с конкретным антигеном, белки, содержащие лигандсвязывающую часть рецептора, которая специфически связывает конкретный антиген, антигенсвязывающие скаффолд-белки (например, DARPIn, белки с HEAT-повторами, белки с ARM-повторами, белки с тетратрикопептидными повторами и другие скаффолд-белки на основе встречающихся в природе белков с повторами и т.д., [см., например, Boersma and Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849-857 и цитируемые в ней ссылки]), и их аптамеры и части.

Способы определения того, связываются ли специфически две молекулы друг с другом, хорошо известны в данной области, и они включают, например, равновесный диализ, метод поверхностного плазмонного резонанса и т.д. Например, антигенсвязывающий домен, применяемый в контексте настоящего раскрытия, включает полипептиды, которые связывают конкретный антиген (например, целевую молекулу [Т] или интернализирующийся эффекторный белок [Е]) или его часть с  $K_D$  менее чем приблизительно 500 пМ, менее чем приблизительно 400 пМ, менее чем приблизительно 300 пМ, менее чем приблизительно 200 пМ, менее чем приблизительно 100 пМ, менее чем приблизительно 90 пМ, менее чем приблизительно 80 пМ, менее чем приблизительно 70 пМ, менее чем приблизительно 60 пМ, менее чем приблизительно 50 пМ, менее чем приблизительно 40 пМ, менее чем приблизительно 30 пМ, менее чем приблизительно 20 пМ, менее чем приблизительно 10 пМ, менее чем приблизительно 5 пМ, менее чем приблизительно 4 пМ, менее чем приблизительно 2 пМ, менее чем приблизительно 1 пМ, менее чем приблизительно 0,5 пМ, менее чем приблизительно 0,2 пМ, менее чем приблизительно 0,1 пМ или менее чем приблизительно 0,05 пМ, как измерено в анализе на основе явления поверхностного плазмонного резонанса.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс" в контексте настоящего документа относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать взаимодействия в режиме реального времени путем выявления изменений концентраций белков на матрице в виде биосенсора, например, с применением системы BIAcore™ (Biacore Life Sciences, подразделение GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси).

Термин " $K_D$ " в контексте настоящего документа означает равновесную константу диссоциации конкретного белок-белкового взаимодействия (например, взаимодействия антитело-антиген). Если не указано иное, значения  $K_D$ , раскрытые в настоящем документе, относятся к значениям  $K_D$ , определенным с помощью анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

Как указано выше, "антигенсвязывающий домен" (D1 и/или D2) может содержать или состоять из антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела. Термин "антитело" в контексте настоящего документа означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащие по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, МЕТ человека). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные друг с другом дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (в настоящем документе сокращено как HCVR или  $V_H$ ) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (в настоящем документе сокращено как LCVR или  $V_L$ ) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен ( $C_{L1}$ ).  $V_H$ - и  $V_L$ -области дополнительно могут быть разделены на гипервариабельные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных, от аминоконца к карбокси-концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно раз-

личным вариантам осуществления FR представленных в настоящем документе антител (или их антигенсвязывающей части) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественным или искусственным образом модифицированы. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определять на основе сравнительного анализа двух или более CDR.

Компоненты D1 и/или D2 биспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем документе, могут содержать или состоять из антигенсвязывающих фрагментов молекул полных антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.д. в контексте настоящего документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или полученный с помощью методов генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полных антител с применением любых подходящих стандартных методик, таких как методики на основе протеолитического расщепления или методы генетической инженерии рекомбинантных ДНК, предусматривающие осуществление манипуляций и экспрессии ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антител. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, ДНК-библиотек (включая, например, фаговые библиотеки антител), или она может быть синтезирована. ДНК можно подвергать секвенированию и химическим манипуляциям с применением методов молекулярной биологии, например, чтобы разместить один или несколько переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для включения кодонов, внесения цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) молекулы одноцепочечных Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперпеременную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), как, например, CDR3-пептид), или пространственно ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, наноантитела (например, моновалентные наноантитела, бивалентные наноантитела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, в контексте настоящего документа также охвачены выражением "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав, и обычно будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая примыкает к одной или нескольким каркасным последовательностям или находится с ними в одной рамке считывания. В антигенсвязывающих фрагментах с V<sub>H</sub>-доменом, ассоциированным с V<sub>L</sub>-доменом, V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-домены могут быть расположены относительно друг друга в любой подходящей конфигурации. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> или V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V<sub>H</sub>- или V<sub>L</sub>-домен.

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые можно найти в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему раскрытию, включают: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; и (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из приведенных выше иллюстративных конфигураций, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно соединены друг с другом, либо могут быть соединены посредством полной или частичной шарнирной области или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают гибкое или полугибкое соединение расположенных рядом переменных и/или константных доменов в пределах одной молекулы полипептида. Более того, антигенсвязывающий фрагмент может предусматривать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из приведенных выше конфигураций переменных и константных доменов, нековалентно связанные друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными V<sub>H</sub>- или V<sub>L</sub>-доменами (например, посредством дисульфидной(дисульфидных) связи(связей)).

Представленные в настоящем документе биспецифические антигенсвязывающие молекулы могут содержать или состоять из антител человека и/или рекомбинантных антител человека, или их фрагментов. В контексте настоящего документа термин "антитело человека" включает антитела с переменными и константными областями, происходящими из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека тем не менее могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, вследствие му-

таций, введенных посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или вследствие соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако подразумевается, что в контексте настоящего документа термин "антитело человека" не включает антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, например, мыши, были привиты на каркасные последовательности человека.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему раскрытию могут содержать или состоять из рекомбинантных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов. Подразумевается, что термин "рекомбинантное антитело человека" в контексте настоящего документа включает все антитела человека, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью рекомбинантных способов, как, например, антитела, экспрессированные с применением рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека (дополнительно описано ниже), антитела, полученные у животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью других способов, которые включают объединение последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат вариабельные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако согласно определенным вариантам осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают *in vitro* мутагенезу (или, в случае если применяют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, *in vivo* соматическому мутагенезу), и, следовательно, аминокислотные последовательности V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят из последовательностей V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> зародышевой линии человека, или являются родственными им, могут не существовать в природе в рамках зародышевого набора антител человека *in vivo*.

Способы получения биспецифических антител известны в данной области, и их можно применять для конструирования биспецифических антигенсвязывающих молекул, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные биспецифические форматы, которые можно применять в контексте настоящего раскрытия, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или в виде диатела, биспецифические форматы в виде слияний IgG-scFv, Ig с двойными вариабельными доменами (DVD), Quadroma, антитела со структурой "выступ во впадину", антитела с общей легкой цепью (например, антитела с общей легкой цепью со структурой "выступ во впадину" и т.д.), CrossMab, CrossFab, полученного на основе технологии SEED антитела ((SEED)body), антитела, полученного путем опосредованной лейциновой застежки димеризации, Duobody, IgG1/IgG2, IgG с Fab двойного действия (DAF) и биспецифические форматы Mab<sup>2</sup> (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 и цитируемые в ней ссылки, для обзора перечисленных выше форматов).

Иллюстративные антигенсвязывающие домены (D1 и D2), которые могут быть включены в биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET, представленные в настоящем документе, включают антигенсвязывающие домены, происходящие из любых из раскрытых в настоящем документе антител к MET. Например, настоящее раскрытие включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей HCVR, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Также в настоящем документе представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей LCVR, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

В настоящем документе представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), предусматривающую любую из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей HCVR в паре с любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей LCVR. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам MET × MET, содержащим антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в пределах любого из приведенных в табл. 1 иллюстративных антител к MET.

Также в настоящем документе представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR1 тяжелой цепи

(HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей HCDR1, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Также представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET  $\times$  MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей HCDR2, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Также представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET  $\times$  MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей HCDR3, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Также представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET  $\times$  MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей LCDR1, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Также представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET  $\times$  MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей LCDR2, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Также представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET  $\times$  MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей LCDR3, или в значительной степени подобную ей последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Также представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET  $\times$  MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), предусматривающую любую из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей HCDR3 в паре с любой из приведенных в табл. 1 аминокислотных последовательностей LCDR3. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в пределах любого из приведенных в табл. 1 иллюстративных антител к MET.

Также представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET  $\times$  MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в пределах любого из приведенных в табл. 1 иллюстративных антител к MET.

Согласно сходному варианту осуществления настоящее раскрытие относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам MET  $\times$  MET, содержащим антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в пределах пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено для любого из приведенных в табл. 1 иллюстративных антител к MET.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET  $\times$  MET, представленные в настоящем документе, могут содержать антигенсвязывающий домен D1, происходящий из любого из антител к MET табл. 1, и антигенсвязывающий домен D2, происходящий из любого другого антитела к MET табл. 1. Неограничивающие примеры биспецифических антител MET  $\times$  MET по настоящему раскрытию представлены на фиг. 1. Фиг. 1 представляет собой таблицу, в которой проиллюстрированы компоненты 272 иллюстративных биспецифических антител MET  $\times$  MET. Каждая пронумерованная ячейка таблицы (под номерами 1-272) соответствует уникальному биспецифическому антителу, содержащему антигенсвязывающий домен "D1" и антигенсвязывающий домен "D2", где антигенсвязывающий домен D1 содержит переменный домен иммуноглобулина (пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR) или CDR из соответствующего антитела к MET, приведенного по оси Y, и где антигенсвязывающий домен

D2 содержит вариабельный домен иммуноглобулина (пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR) или CDR из соответствующего антитела к MET, приведенного по оси X. Таким образом, например, показанная в табл. биспецифическая антигенсвязывающая молекула MET × MET "номер 10" содержит антигенсвязывающий домен D1, содержащий пару HCVR/LCVR или набор 6-CDR из иллюстративного антитела к MET H4H13290P2, и антигенсвязывающий домен D2, содержащий пару HCVR/LCVR или набор 6-CDR из иллюстративного антитела к MET H4H13321P2. Дополнительные примеры представленных в настоящем документе биспецифических антител MET × MET описаны в примере 4 в настоящем документе.

В качестве неограничивающего иллюстративного примера, настоящее раскрытие включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 и антигенсвязывающий домен D2, где антигенсвязывающий домен D1 содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 58/138 или набор CDR тяжелой и легкой цепей (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), предусматривающий SEQ ID NO: 60-62-64-140-142-144, и где антигенсвязывающий домен D2 содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 82/138 или набор CDR тяжелой и легкой цепей (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), предусматривающий SEQ ID NO: 84-86-88-140-142-144. Иллюстративное биспецифическое антитело MET × MET с такими характеристиками в отношении последовательностей представляет собой биспецифическое антитело, обозначенное H4H14639D, также называемое биспецифическим антителом № 122, которое содержит D1, происходящий из H4H13306P2, и D2, происходящий из H4H13312P2 (см. пример 4, табл. 5 в настоящем документе).

В качестве дополнительного неограничивающего иллюстративного примера, настоящее раскрытие включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 и антигенсвязывающий домен D2, где антигенсвязывающий домен D1 содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 18/138 или набор CDR тяжелой и легкой цепей (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), предусматривающий SEQ ID NO: 20-22-24-140-142-144, и где антигенсвязывающий домен D2 содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 82/138 или набор CDR тяжелой и легкой цепей (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), предусматривающий SEQ ID NO: 84-86-88-140-142-144. Иллюстративное биспецифическое антитело MET × MET с такими характеристиками в отношении последовательностей представляет собой биспецифическое антитело, обозначенное H4H14635D, также называемое биспецифическим антителом № 42, которое содержит D1, происходящий из H4H13295P2, и D2, происходящий из H4H13312P2 (см. пример 4, табл. 5 в настоящем документе).

Компоненты, обеспечивающие мультимеризацию.

Согласно определенным вариантам осуществления представленные в настоящем документе биспецифические антигенсвязывающие молекулы могут также содержать один или несколько компонентов, обеспечивающих мультимеризацию. Компоненты, обеспечивающие мультимеризацию, могут функционировать для поддержания ассоциации антигенсвязывающих доменов между собой (D1 и D2). В контексте настоящего документа "компонент, обеспечивающий мультимеризацию", представляет собой макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которые обладают способностью к ассоциации со вторым компонентом, обеспечивающим мультимеризацию, с такими же или подобными структурой или составом. Например, компонент, обеспечивающий мультимеризацию, может представлять собой полипептид, содержащий C<sub>H</sub>3-домен иммуноглобулина. Неограничивающим примером компонента, обеспечивающего мультимеризацию, является Fc-часть иммуноглобулина, например Fc-домен IgG, выбранного из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в пределах каждой изотипической группы. Согласно определенным вариантам осуществления компонент, обеспечивающий мультимеризацию, представляет собой Fc-фрагмент или аминокислотную последовательность длиной от 1 до приблизительно 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один цистеиновый остаток. Согласно другим вариантам осуществления компонент, обеспечивающий мультимеризацию, представляет собой цистеиновый остаток или короткий цистеин-содержащий пептид. Другие домены, обеспечивающие мультимеризацию, включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из "лейциновой застёжки", мотива "спираль-петля" или мотива "двойная спираль".

Согласно определенным вариантам осуществления представленные в настоящем документе биспецифические антигенсвязывающие молекулы содержат два домена, обеспечивающих мультимеризацию, M1 и M2, где D1 соединен с M1, а D2 соединен с M2, и где ассоциация M1 с M2 способствует физической связи D1 и D2 друг с другом в пределах одной биспецифической антигенсвязывающей молекулы. Согласно определенным вариантам осуществления M1 и M2 являются идентичными друг другу. Например, M1 может представлять собой Fc-домен с конкретной аминокислотной последовательностью, и M2 представляет собой Fc-домен с такой же аминокислотной последовательностью, что и у M1. В качестве альтернативы, M1 и M2 могут отличаться друг от друга по одному или нескольким положениям аминокислот. Например, M1 может содержать первый C<sub>H</sub>3-домен иммуноглобулина (Ig), а M2 может содержать второй C<sub>H</sub>3-домен Ig, где первый и второй C<sub>H</sub>3-домены Ig отличаются друг от друга по меньшей

мере на одну аминокислоту и где по меньшей мере одно отличие по аминокислоте обеспечивает снижение способности нацеливающей конструкции связываться с белком А по сравнению с эталонной конструкцией, имеющей идентичные последовательности M1 и M2. Согласно одному варианту осуществления C<sub>H</sub>3-домен Ig M1 связывает белок А, а C<sub>H</sub>3-домен Ig M2 предусматривает мутацию, которая обуславливает снижение или устранение способности к связыванию с белком А, как, например, модификация H95R (согласно IMGT-нумерации мутаций в экзонах; H435R согласно EU-нумерации). C<sub>H</sub>3 M2 может дополнительно предусматривать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые можно найти в пределах C<sub>H</sub>3 M2, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае Fc-домена IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае Fc-домена IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае Fc-домена IgG4.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему раскрытию могут быть "выделенными". "Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула" в контексте настоящего документа означает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая была идентифицирована и отделена от и/или извлечена из по меньшей мере одного компонента ее естественного окружения. Например, биспецифическое антитело, которое было отделено от и/или извлечено по меньшей мере из одного компонента организма или из ткани или клетки, в которых антитело вырабатывается, для целей настоящего раскрытия является "выделенным биспецифическим антителом". Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула также включает молекулы *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные биспецифические антигенсвязывающие молекулы являются молекулами, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с определенными вариантами осуществления выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Раскрытые в настоящем документе биспецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие домены (D1 и/или D2) могут предусматривать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых антигенсвязывающие белки или антигенсвязывающие домены были получены. Такие мутации легко могут быть установлены путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее раскрытие включает раскрытые в настоящем документе биспецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие домены (D1 и/или D2), которые происходят из любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей, где одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных и/или CDR-областей подвергают мутации с заменой на соответствующий(е) остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело, или соответствующий(е) остаток(ки) другой последовательности зародышевой линии, или подлежат консервативной аминокислотной замене соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения по отношению к последовательности в настоящем документе в совокупности называют "герминативными мутациями").

Специалист в данной области исходя из раскрытых в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей легко сможет получить множество биспецифических антигенсвязывающих молекул или их антигенсвязывающих доменов (D1 и/или D2), которые предусматривают одну или несколько отдельных герминативных мутаций или их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления все из остатков каркасных и/или CDR-областей в пределах V<sub>H</sub>- и/или V<sub>L</sub>-доменов подвергают обратной мутации к остаткам, обнаруживаемым в исходной последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки подвергают обратной мутации к исходной последовательности зародышевой линии, например только подвергнутые мутации остатки, обнаруживаемые в пределах 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только подвергнутые мутации остатки, обнаруживаемые в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько из остатков каркасных и/или CDR-областей подвергают мутации с заменой на соответствующий(е) остаток(ки) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально происходит антитело).

Кроме того, биспецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие домены (D1 и/или D2) по настоящему раскрытию могут предусматривать любую комбинацию двух или более герминативных мутаций в пределах каркасных и/или CDR-областей, например, где определенные отдельные остатки подвергают мутации с заменой на соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как определенные другие остатки, которые отличаются от таковых в исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются, или их подвергают мутации с заменой на соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения бис-

пецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие домены (D1 и/или D2), которые предусматривают одну или несколько герминативных мутаций, можно без труда подвергать тестированию в отношении одного или нескольких требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в соответствующих случаях), сниженная иммуногенность и т.д. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие домены (D1 и/или D2), полученные таким общим способом, охвачены объемом настоящего раскрытия.

#### Варианты.

Изобретение также включает антитела к МЕТ и биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие варианты любых из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR. Иллюстративные варианты, включенные в этот аспект, включают варианты любых из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR с одной или несколькими консервативными заменами. Например, настоящее раскрытие включает антитела к МЕТ и биспецифические антигенсвязывающие молекулы МЕТ × МЕТ, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами по сравнению с любыми из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 1 в настоящем документе.

Иллюстративные варианты, включенные в этот аспект настоящего раскрытия, также включают варианты, характеризующиеся значительной степенью идентичности последовательностей с любыми из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR. В контексте настоящего документа, что касается аминокислотных последовательностей, термин "значительная степень идентичности" или "в значительной степени идентичный" означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с применением стандартных штрафов за открытие гэпа, характеризуются по меньшей мере 95, 98 или 99% идентичностью последовательностей. Согласно определенным вариантам осуществления положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется на другой аминокислотный остаток с боковой цепью (R-группа) с подобными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательностей или степень подобия могут быть увеличены с внесением поправки на консервативную природу замены. Способы внесения такой корректировки хорошо известны специалисту в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенную в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические боковые цепи с гидроксильной группой: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами для консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативное замещение представляет собой любое изменение с положительным значением в логарифмической таблице вероятностей PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенной в настоящий документ посредством ссылки. "Средне консервативное" замещение представляет собой любое изменение с неотрицательным значением в логарифмической таблице вероятностей PAM250.

Идентичность последовательностей между двумя разными аминокислотными последовательностями, как правило, определяют с применением программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа последовательностей позволяет сопоставлять подобные последовательности с помощью определения подобия с учетом разных замен, делеций и других модификаций, включая консервативные аминокислотные замены. К примеру, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно применять с использованием параметров по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантным вариантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с применением FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между заданными и искомыми последовательностями (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении представленной в настоящем до-

кументе последовательности с базой данных, содержащей множество последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности, BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET, содержащие варианты Fc.

В соответствии с определенными представленными в настоящем документе вариантами осуществления представлены антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие белки MET × MET, содержащие Fc-домен, предусматривающий одну или несколько мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антитела с FcRn-рецептором, например, при кислом pH, в сравнении с нейтральным pH. Например, настоящее раскрытие включает антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие белки MET × MET, предусматривающие мутацию в C<sub>H</sub>2- или C<sub>H</sub>3-области Fc-домена, где мутация(и) повышает(ют) аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T); 254 (например, S или T); и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и модификацию 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, настоящее раскрытие включает антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие белки MET × MET, содержащие Fc-домен, предусматривающий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в пределах раскрытых в настоящем документе вариативных доменов антитела включены в объем настоящего раскрытия.

Биологические характеристики представленных в настоящем документе антигенсвязывающих молекул.

В настоящем документе представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают мономерный MET человека с высокой аффинностью. Например, настоящее раскрытие включает антитела к MET, которые связывают мономерный MET человека (например, hMET.mmh) с K<sub>D</sub> менее чем приблизительно 230 нМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления представлены антитела к MET, которые связывают мономерный MET человека при 37°C с K<sub>D</sub> менее чем приблизительно 230 нМ, менее чем приблизительно 200 нМ, менее чем приблизительно 150 нМ, менее чем приблизительно 100 нМ, менее чем приблизительно 50 нМ, менее чем приблизительно 25 нМ, менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 8 нМ, менее чем приблизительно 6 нМ, менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ или менее чем приблизительно 3 нМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Настоящее раскрытие также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают мономерный MET человека (например, hMET.mmh) с полупериодом диссоциации (t<sub>1/2</sub>) более чем приблизительно 1 мин, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления представлены антитела к MET, которые связывают мономерный MET человека при 37°C с t<sub>1/2</sub> более чем приблизительно 1 мин, более чем приблизительно 2 мин, более чем приблизительно 4 мин, более чем приблизительно 6 мин, более чем приблизительно 8 мин, более чем приблизительно 10 мин, более чем приблизительно 12 мин, более чем приблизительно 14 мин, более чем приблизительно 16 мин, более чем приблизительно 18 мин или более чем приблизительно 20 мин или дольше, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

В настоящем документе представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые свя-

зывают димерный MET человека (например, hMET.mFc) с высокой аффинностью. Например, настоящее раскрытие включает антитела к MET, которые связывают димерный MET человека с  $K_D$  менее чем приблизительно 3 нМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления представлены антитела к MET, которые связывают димерный MET человека при 37°C с  $K_D$  менее чем приблизительно 3 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 0,9 нМ, менее чем приблизительно 0,8 нМ, менее чем приблизительно 0,7 нМ, менее чем приблизительно 0,6 нМ, менее чем приблизительно 0,5 нМ, менее чем приблизительно 0,4 нМ, менее чем приблизительно 0,3 нМ или менее чем приблизительно 0,25 нМ, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Также в настоящем документе представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают димерный MET человека (например, hMET.mFc) с полупериодом диссоциации ( $t_{1/2}$ ) более чем приблизительно 4 мин, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления представлены антитела к MET, которые связывают димерный MET человека при 37°C с  $t_{1/2}$  более чем приблизительно 4 мин, более чем приблизительно 5 мин, более чем приблизительно 10 мин, более чем приблизительно 20 мин, более чем приблизительно 30 мин, более чем приблизительно 40 мин, более чем приблизительно 50 мин, более чем приблизительно 60 мин, более чем приблизительно 70 мин, более чем приблизительно 80 мин, более чем приблизительно 90 мин, более чем приблизительно 100 мин, более чем приблизительно 105 мин или дольше, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Также в настоящем документе представлены биспецифические антигенсвязывающие белки MET  $\times$  MET, которые связывают димерный MET человека (например, hMET.mFc) с полупериодом диссоциации ( $t_{1/2}$ ) более чем приблизительно 10 мин, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например с применением формата анализа, определенного в примере 5 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления представлены биспецифические антигенсвязывающие белки MET  $\times$  MET, которые связывают димерный MET человека при 37°C с  $t_{1/2}$  более чем приблизительно 10 мин, более чем приблизительно 20 мин, более чем приблизительно 30 мин, более чем приблизительно 40 мин, более чем приблизительно 50 мин, более чем приблизительно 60 мин, более чем приблизительно 70 мин, более чем приблизительно 80 мин, более чем приблизительно 90 мин, более чем приблизительно 100 мин, более чем приблизительно 200 мин, более чем приблизительно 300 мин, более чем приблизительно 400 мин, более чем приблизительно 500 мин, более чем приблизительно 600 мин, более чем приблизительно 700 мин, более чем приблизительно 800 мин, более чем приблизительно 900 мин, более чем приблизительно 1000 мин, более чем приблизительно 1100 мин или дольше, как измерено с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 5 в настоящем документе, или в значительной степени подобного анализа.

Также в настоящем документе представлены антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие белки MET  $\times$  MET, которые блокируют взаимодействие между HGF и MET, например, *in vitro* анализе связывания лиганда. В соответствии с определенными представленными в настоящем документе вариантами осуществления представлены биспецифические антигенсвязывающие белки MET  $\times$  MET, которые блокируют связывание HGF с клетками, экспрессирующими MET человека, и индуцируют минимальную активацию MET, или вовсе ее не индуцируют, в отсутствие передачи сигнала с участием HGF. Например, настоящее раскрытие относится к биспецифическим антигенсвязывающим белкам MET  $\times$  MET, которые характеризуются степенью агонистической активности в отношении MET в клеточном анализе активности MET с использованием репортерной системы, которая составляет менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 3%, менее 2% или менее 1% агонистической активности в отношении MET, наблюдаемой в эквивалентном анализе активности с использованием репортерной системы с применением моноспецифического антитела, содержащего D1 или D2 отдельно.

Антитела и антигенсвязывающие белки по настоящему раскрытию могут обладать одной или несколькими из вышеупомянутых биологических характеристик или любой их комбинацией. Приведенный выше список биологических характеристик антител не является исчерпывающим. Другие биологические характеристики представленных в настоящем документе антител будут очевидны для специалиста в данной области из обзора настоящего раскрытия, включая демонстрационные примеры в настоящем документе.

Конъюгаты антитела и лекарственного средства (ADC).

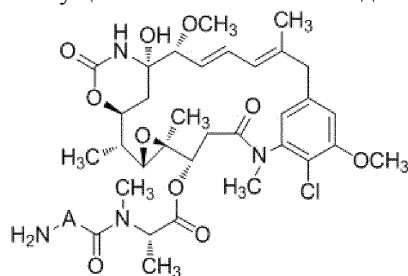
В настоящем документе представлены конъюгаты антитела и лекарственного средства (ADC), со-

держат антитело к MET или биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET, конъюгированные с терапевтическим компонентом, таким как цитотоксическое средство, химиотерапевтическое лекарственное средство или радиоизотоп.

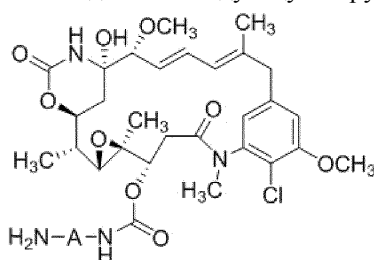
Цитотоксические средства включают любое средство, которое негативно влияет на рост, жизнеспособность или размножение клеток, включая без ограничения взаимодействующие с тубулином средства и повреждающие ДНК средства. Примеры подходящих цитотоксических средств и химиотерапевтических средств, которые можно конъюгировать с антителами к MET в соответствии с этим аспектом настоящего раскрытия, включают, например, 1-(2-хлорэтил)-1,2-диметансульфонил гидразин, 1,8-дигидрокси-бицикло[7.3.1]тридека-4,9-диен-2,6-диин-13-он, 1-дигидротестостерон, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, 9-аминокамптотецин, актиномицин D, амантины, аминоптерин, ангидин, антрациклин, антрамицин (АМС), ауристатины, блеомицин, бусульфид, масляную кислоту, калихеамицины (например, калихеамицин  $\gamma_1$ ), камптотецин, карминомицины, кармустины, цемадотины, цисплатин, колхицин, комбретастины, циклофосфамид, цитарабин, цитохалазин В, дактиномицин, даунорубин, декарбазин, диацетоксипентилдоксорубин, дибромманнит, дигидроксиантрацидин, дисоразолы, доластатин (например, доластатин 10), доксорубин, дуокармицин, эхиномицины, элеутерины, эметин, эпотилоны, эсперицины, эстрамустины, бромистый этидий, этопозид, фторурацилы, гелданамицины, грамицидин D, глюкокортикоиды, иринотеканы, ингибиторы кинезина веретена деления (KSP), лептомицины, лейрозины, лидокаин, ломустин (CCNU), майтанзиноиды, хлорметин гидрохлорид, мелфалан, меркаптопурины, метоптерины, метотрексат, митрамицин, митомицин, митоксантрон, N8-ацетилспермидин, подофиллотоксины, прокаин, пропранолол, птеридины, пуромидин, пирролобензодиазепины (PBD), ризоксины, стрептозотозин, таллизомидины, таксол, тенопозид, тетракаин, тиюэпу хлорамбуцил, томаймицины, топотеканы, тубулизин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбины и производные любого из вышеперечисленного. В соответствии с определенными вариантами осуществления цитотоксическое средство, которое конъюгируют с антителом к MET, представляет собой майтанзиноид, такой как DM1 или DM4, производное томаймицина или производное доластатина. В соответствии с определенными вариантами осуществления цитотоксическое средство, которое конъюгируют с антителом к MET, представляет собой ауристатин, такой как MMAE, MMAF или их производные. Другие известные в данной области цитотоксические средства включены в объем настоящего раскрытия, включая, например, белковые токсины, такие как риксин, токсин *C. difficile*, экзотоксин *pseudomonas*, риксин, дифтерийный токсин, ботулотоксин, бриодин, сапорин, токсины лаконоса американского (т.е. фитолакка-токсин и фитолаккагенин) и другие, как, например, изложенные в Sapra et al., *Pharmacol. & Therapeutics*, 2013, 138:452-469.

Согласно определенным вариантам осуществления цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, например, производное майтанзина. Подходящие майтанзиноиды включают DM1, DM4 или их производные, стереоизомеры или изотопологи. Подходящие майтанзиноиды также включают без ограничения таковые, раскрытые в WO 2014/145090 A1, WO 2015/031396 A1, US 2016/0375147 A1 и US 2017/0209591 A1, включенные в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

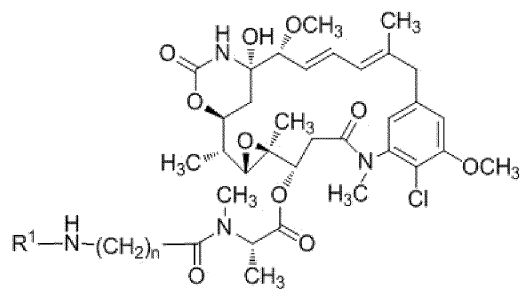
Согласно некоторым вариантам осуществления майтанзиноид имеет следующую структуру:



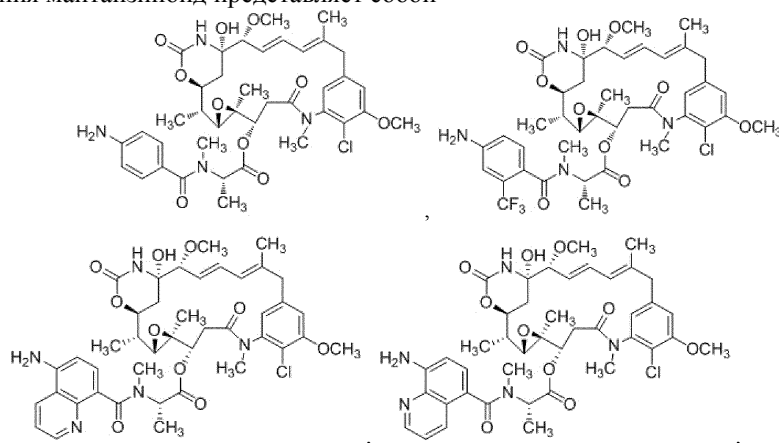
где А представляет собой необязательно замещенный арилен или гетероарил. Согласно некоторым вариантам осуществления майтанзиноид имеет следующую структуру:

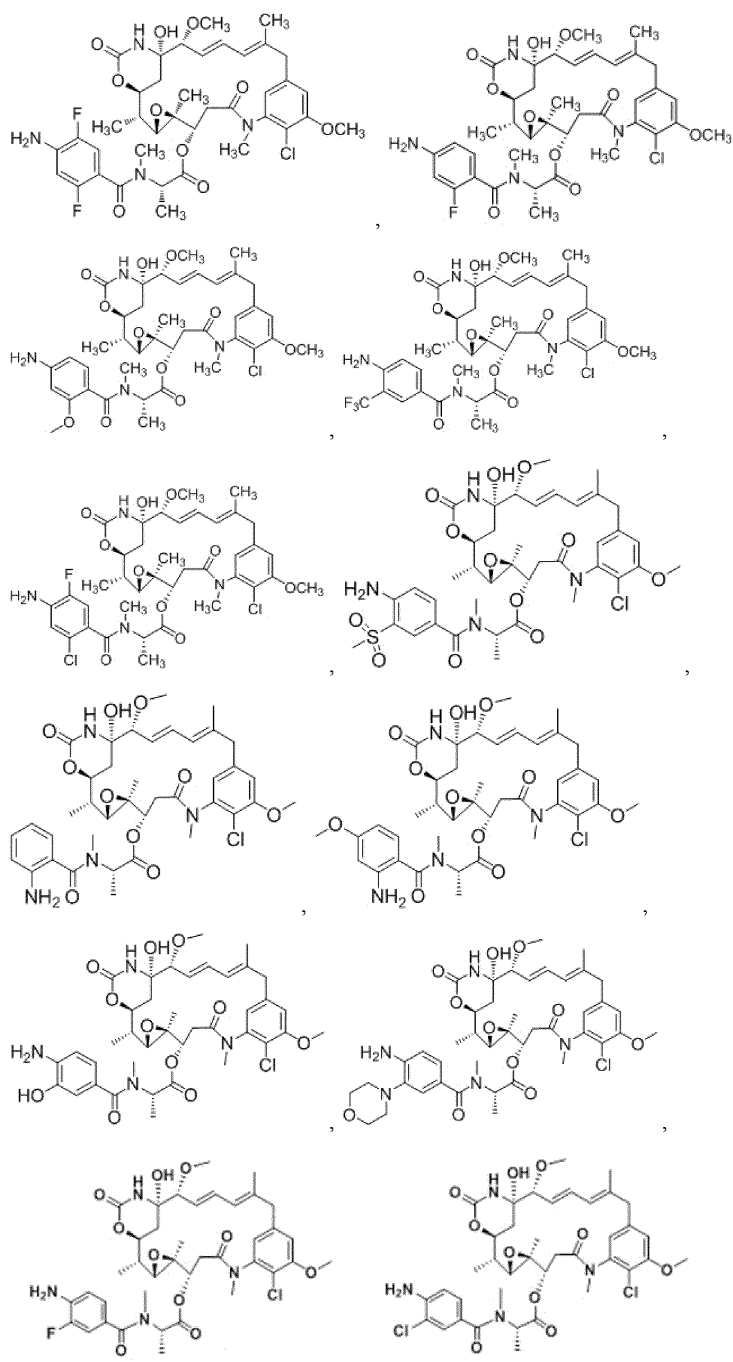


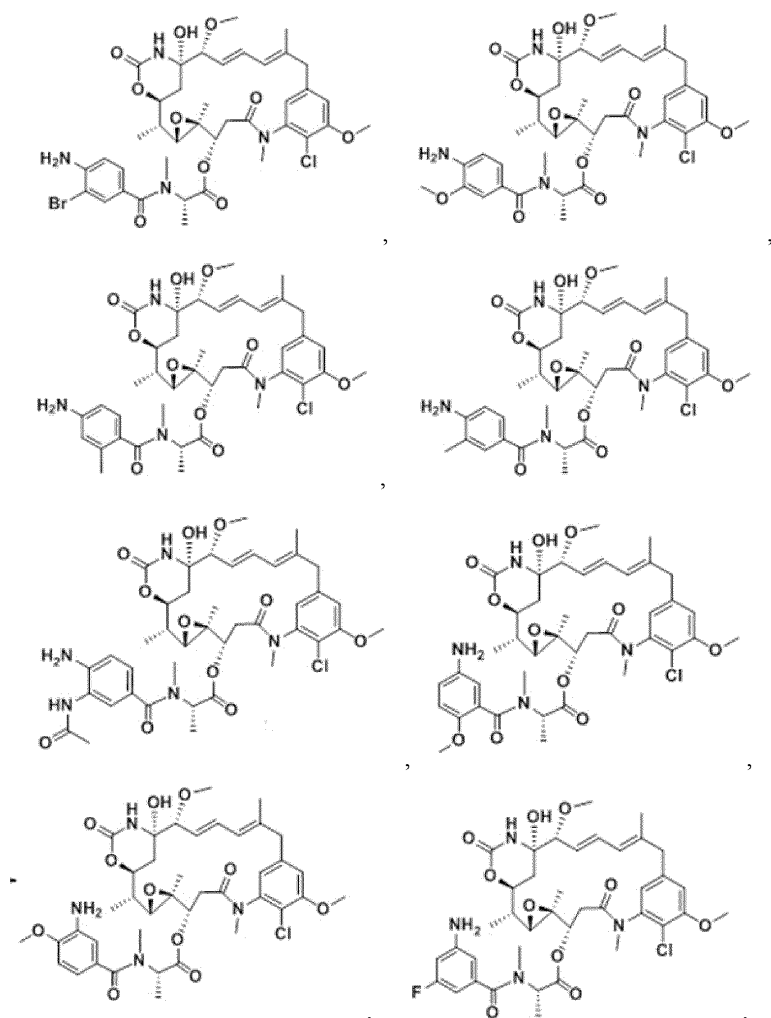
где А представляет собой необязательно замещенный арилен или гетероарил. Согласно некоторым вариантам осуществления майтанзиноид имеет следующую структуру:

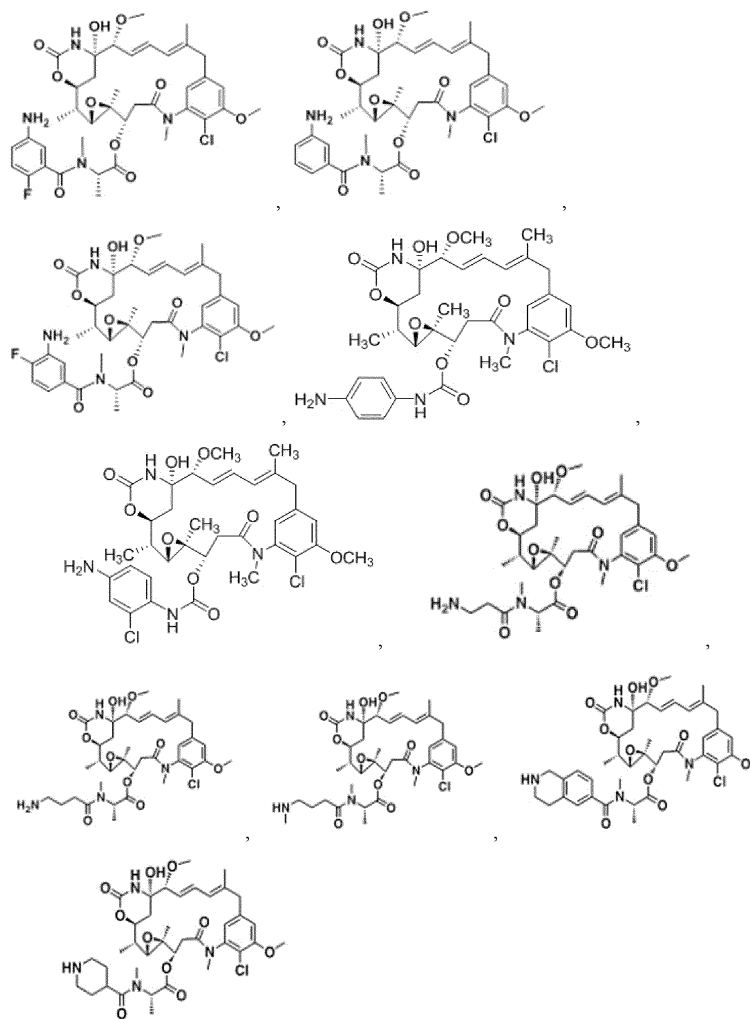


где  $n$  равняется целому числу от 1 до 12, и  $R^1$  представляет собой алкил. Согласно некоторым вариантам осуществления майтанзиноид представляет собой

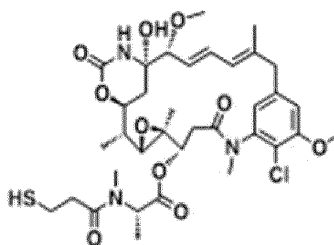




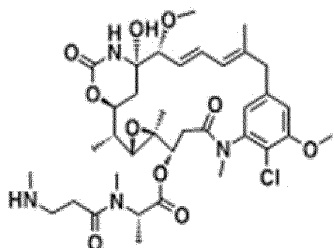




Согласно некоторым вариантам осуществления майтанзиноид представляет собой



Согласно некоторым вариантам осуществления майтанзиноид представляет собой



Также в настоящем документе представлены конъюгаты антитела и радионуклида (ARC), содержащие антитела к MET, конъюгированные с одним или несколькими радионуклидами. Иллюстративные радионуклиды, которые можно применять в контексте такого аспекта настоящего раскрытия, включают без ограничения, например,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{227}\text{Th}$ ,  $^{222}\text{Rn}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$  и  $^{90}\text{Y}$ .

Согласно определенным представленным в настоящем документе вариантам осуществления представлены ADC, содержащие антитело к MET или биспецифический антигенсвязывающий белок MET  $\times$  MET, конъюгированные с цитотоксическим средством (например, любым из раскрытых выше цитотоксических средств) посредством линкерной молекулы. Линкеры представляют собой любую группу или фрагмент, которые соединяют, присоединяют или связывают описанные в настоящем документе антите-

ло или антигенсвязывающие белки с терапевтическим компонентом, например цитотоксическим средством. Подходящие линкеры можно найти, например, в *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins*; Phillips G.L., Ed.; Springer Verlag: New York, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry L., Ed.; Humana Press, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Wang J., Shen W.-C., and Zaro J.L., Eds.; Springer International Publishing, 2015, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. В целом, подходящие связывающие средства линкеры для описанных в настоящем документе конъюгатов на основе антител представляют собой таковые, которые являются достаточно стабильными для использования времени полужизни в кровотоке антитела и в то же время способны к высвобождению их нагрузки после антиген-опосредованной интернализации конъюгата. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры включают линкеры, которые расщепляются за счет внутриклеточных метаболических процессов после интернализации, например, расщепляются посредством гидролиза, восстановления или ферментативной реакции. Нерасщепляемые линкеры включают линкеры, которые высвобождают присоединенную "нагрузку" посредством лизосомного разрушения антитела после интернализации. Подходящие линкеры включают без ограничения неустойчивые к действию кислот линкеры, неустойчивые к гидролизу линкеры, расщепляемые ферментами линкеры, неустойчивые к восстановлению линкеры, саморасщепляющиеся линкеры и нерасщепляемые линкеры. Подходящие линкеры также включают без ограничения таковые, которые представляют собой пептиды, глюкурониды, сукцинимид-тиоэфиры, полиэтиленгликолевые (PEG) звенья, гидразоны, малкапроиловые звенья, дипептидные звенья, валин-цитруллиновые звенья и пара-аминобензиловые (PAB) звенья, или которые содержат перечисленное.

Для создания или конструирования ADC по настоящему раскрытию можно применять любую известную в данной области линкерную молекулу или технологию получения линкеров. Согласно определенным вариантам осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В соответствии с другими вариантами осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. Иллюстративные линкеры, которые можно применять в контексте настоящего раскрытия, включают линкеры, которые содержат, например, MC (6-малеимидокапроил), MP (малеимидопропаноил), val-cit (валин-цитруллин), val-ala (валин-аланин), дипептидный участок в расщепляемом протеазой линкере, ala-phe (аланин-фенилаланин), дипептидный участок в расщепляемом протеазой линкере, PAB (п-аминобензиль-оксикарбонил), SPP (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат), SMCC (N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), SIAB (N-сукцинимидил-(4-йод-ацетил)аминобензоат) и их варианты и комбинации, или состоят из перечисленного. Дополнительные примеры линкеров, которые можно применять в контексте настоящего раскрытия, представлены, например, в US 7754681 и в *Ducry, Bioconjugate Chem.*, 2010, 27:5-13 и цитируемых в них ссылках, содержания которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте.

Согласно определенным вариантам осуществления линкеры являются стабильными в физиологических условиях. Согласно определенным вариантам осуществления линкеры являются расщепляемыми, к примеру, способными к высвобождению по меньшей мере части нагрузки в присутствии фермента или при конкретном диапазоне или значении pH. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит расщепляемый ферментом фрагмент. Иллюстративные расщепляемые ферментом фрагменты включают без ограничения пептидные связи, сложноэфирные связи, гидразоны и дисульфидные связи. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер предусматривает расщепляемый катепсином линкер.

Согласно некоторым вариантам осуществления линкер предусматривает нерасщепляемый фрагмент.

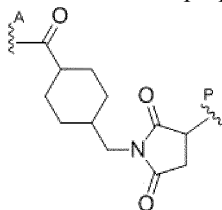
Подходящие линкеры также включают без ограничения таковые, химически связанные с двумя цистеиновыми остатками одного связывающего средства, например, антитела. Такие линкеры могут служить для имитации дисульфидных связей антитела, которые разрушаются в результате процесса конъюгации.

Согласно некоторым вариантам осуществления линкер предусматривает одну или несколько аминокислот. Подходящие аминокислоты включают природные, искусственные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные и L-или D- $\alpha$ -аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит аланин, валин, глицин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, их производное, или их комбинацию. Согласно определенным вариантам осуществления одна или несколько боковых цепей аминокислот связаны с боковой цепью, описанной ниже. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит валин и цитруллин. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит лизин, валин и цитруллин. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит лизин, валин и аланин. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит валин и аланин.

Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит саморасщепляющуюся группу. Саморасщепляющаяся группа может представлять собой любую такую группу, известную специалистам в данной области. Согласно конкретным вариантам осуществления саморасщепляющаяся группа пред-

ставляет собой п-аминобензил (РАВ) или его производное. Пригодные производные включают п-аминобензилоксикарбонил (РАВС). Специалистам в данной области будет понятно, что саморасщепляющаяся группа способна к осуществлению химической реакции, в результате которой из нагрузки высвобождаются остальные атомы линкера.

Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой



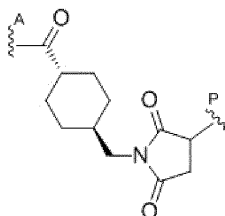
где



является связью с антителом или антигенсвязывающим белком (например, посредством лизинового остатка) и



является связью с цитотоксическим средством (например, DM1). Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой



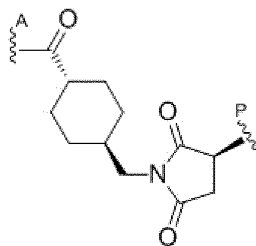
где



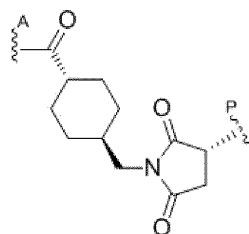
является связью с антителом или антигенсвязывающим белком (например, посредством лизинового остатка) и



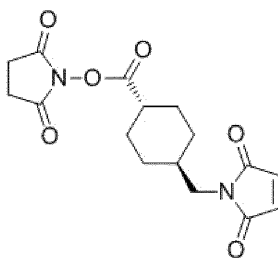
является связью с цитотоксическим средством (например, DM1). Согласно определенным вариантам осуществления линкер представляет собой



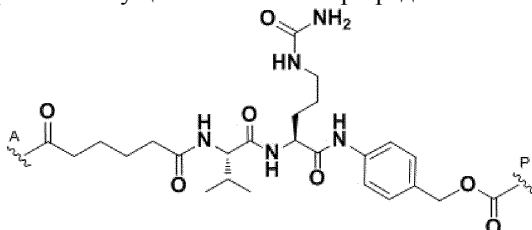
Согласно определенным вариантам осуществления линкер представляет собой



Согласно некоторым вариантам осуществления линкер получен из малеимидилметил-4-транс-циклогексанкарбоксисукцината



Согласно некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой



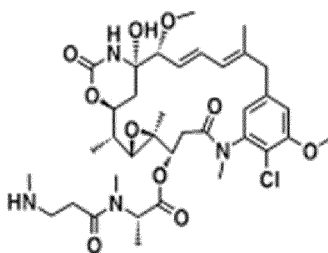
где



является связью с антителом или антигенсвязывающим белком (например, посредством лизинового остатка) и

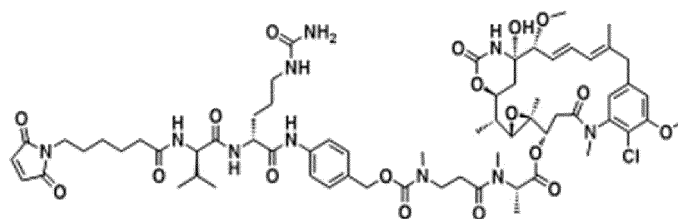


является связью с цитотоксическим средством (например, соединением, характеризующимся следующей формулой:



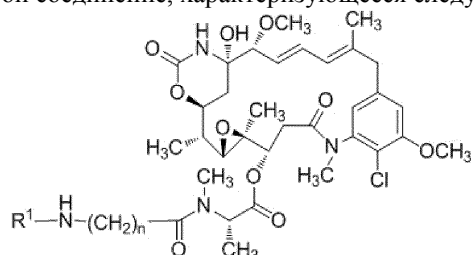
Настоящее раскрытие предусматривает ADC, в которых линкер соединяет антитело к MET или биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET с лекарственным средством или цитотоксическим средством посредством присоединения по конкретной аминокислоте в пределах антитела или антигенсвязывающей молекулы. Иллюстративные присоединения по аминокислоте, которые можно применять в контексте этого аспекта, предусматривают, например, лизин (см., например, US 5208020; US 2010/0129314; Hollander et al, Bioconjugate Chem., 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5714586; US 2013/0101546; и US 2012/0585592), цистеин (см., например, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; и US 7750116), селеноцистеин (см., например, WO 2008/122039; и Hofer et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2008, 105:12451-12456), формилглицин (см., например, Carrico et al, Nat. Chem. Biol., 2007, 3:321-322; Agarwal et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2013, 110:46-51, и Rabuka et al, Nat. Protocols, 2012, 10:1052-1067), искусственные аминокислоты (см., например, WO 2013/068874 и WO 2012/166559) и кислые аминокислоты (см., например, WO 2012/05982). Линкеры могут также быть конъюгированы с антигенсвязывающим белком посредством присоединения к углеводам (см., например, US 2008/0305497, WO 2014/065661 и Ryan et al, Food & Agriculture Immunol., 2001, 13:127-130) и дисульфидным линкерам (см., например, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611 и Shaunak et al, Nat. Chem. Biol., 2006, 2:312-313). Для прямой конъюгации с конкретными остатками антитела или антигенсвязывающего белка также можно использовать методики сайт-специфической конъюгации (см., например, Schumacher et al. J. Clin. Immunol. (2016) 36 (Suppl 1): 100). Методики сайт-специфической конъюгации включают без ограничения конъюгацию по глутамину с помощью трансглутаминазы (см., например, Schibli, Angew Chemie Inter Ed. 2010, 49, 9995).

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к ADC, где антитело к MET или биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET, как описано в настоящем документе, конъюгированы с композицией линкер-лекарственное средство, как изложено в международной публикации заявки на патент WO 2014/145090, (например, соединение "7", также называемое в настоящем документе "M0026" и представленное ниже), раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте:

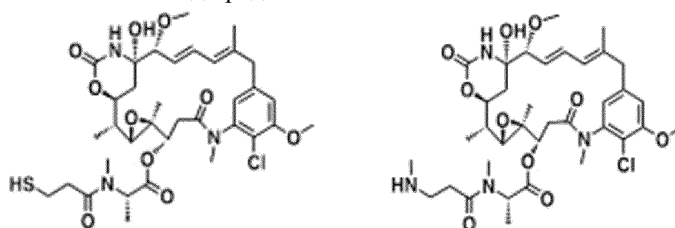


7

В настоящем документе также представлены конъюгаты антитела и лекарственного средства, содержащие моноспецифические антитела к MET и биспецифические антитела MET  $\times$  MET, раскрытые в настоящем документе, где указанное антитело к MET или биспецифическое антитело MET  $\times$  MET конъюгированы с цитотоксическим средством. Согласно определенным вариантам осуществления цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид. Согласно определенным вариантам осуществления майтанзиноид представляет собой соединение, характеризующееся следующей формулой:

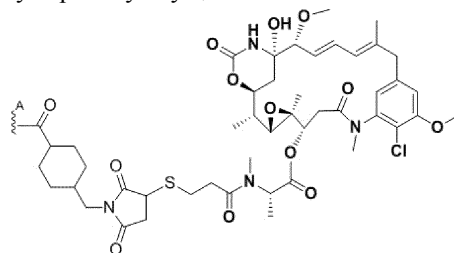


где  $n$  равняется целому числу от 1 до 12, и  $R^1$  представляет собой алкил. Согласно определенным вариантам осуществления майтанзиноид представляет собой



или

Согласно определенным вариантам осуществления цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, и при этом майтанзиноид ковалентно соединен с антителом посредством нерасщепляемого линкера. Согласно определенным вариантам осуществления цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, и при этом майтанзиноид ковалентно соединен с антителом посредством расщепляемого линкера. Согласно одному варианту осуществления антитело конъюгировано с

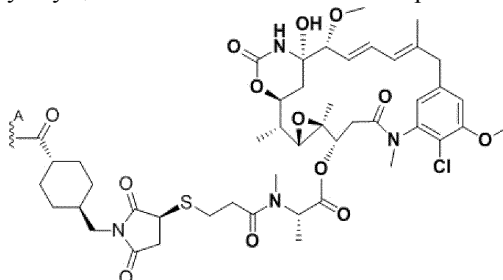


где



является связью с антителом.

Согласно одному варианту осуществления антитело конъюгировано с

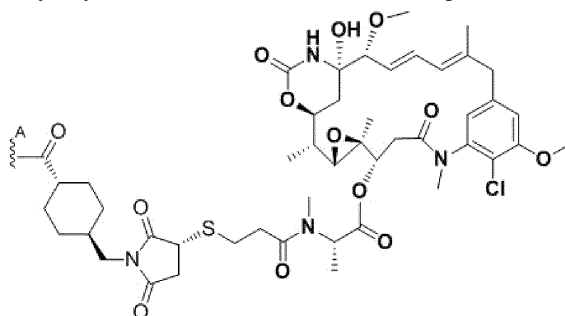


где



является связью с антителом.

Согласно одному варианту осуществления антитело конъюгировано с

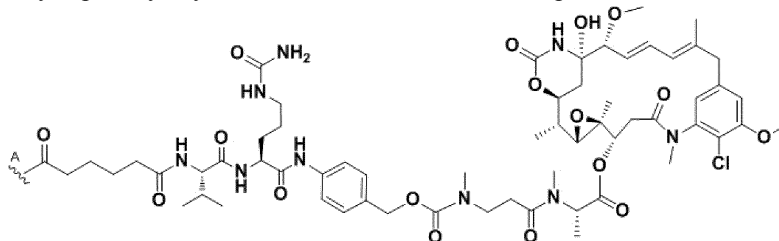


где



является связью с антителом.

Согласно одному варианту осуществления антитело конъюгировано с



где



является связью с антителом.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой антитело к MET или описанный в настоящем документе биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET;

L представляет собой линкер;

Pay представляет собой цитотоксическое средство; и

n равняется целому числу от 1 до 10.

Согласно некоторым вариантам осуществления Ab представляет собой антитело к MET, содержащее CDR в пределах пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 82/138. Согласно некоторым вариантам осуществления Ab представляет собой антитело к MET, содержащее аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 82 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 138.

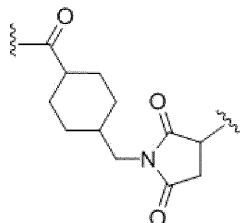
Согласно некоторым вариантам осуществления Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET, содержащий CDR в пределах аминокислотной последовательности D1-HCVR SEQ ID NO: 58 и CDR в пределах аминокислотной последовательности D2-HCVR SEQ ID NO: 82. Согласно некоторым аспектам биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET дополнительно содержит CDR в пределах аминокислотной последовательности LCVR SEQ ID NO: 138. Согласно некоторым вариантам осуществления Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET, содержащий аминокислотную последовательность D1-HCVR SEQ ID NO: 58 и аминокислотную последовательность D2-HCVR SEQ ID NO: 82. Согласно некоторым аспектам биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET дополнительно содержит аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 138.

Согласно некоторым вариантам осуществления Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET, содержащий CDR в пределах аминокислотной последовательности D1-HCVR SEQ ID NO: 18 и CDR в пределах аминокислотной последовательности D2-HCVR SEQ ID NO: 82. Согласно некоторым аспектам биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET дополнительно содержит CDR в пределах аминокислотной последовательности LCVR SEQ ID NO: 138. Согласно некоторым вариантам осуществления Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET, содержащий аминокислотную последовательность D1-HCVR SEQ ID NO: 18 и ами-

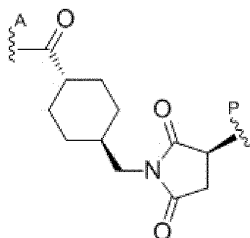
нокислотную последовательность D2-HCVR SEQ ID NO: 82.

Согласно некоторым вариантам осуществления L представляет собой расщепляемый линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления L представляет собой нерасщепляемый линкер. Согласно некоторым вариантам осуществления L предусматривает дипептид. Согласно некоторым вариантам осуществления L предусматривает PAB-фрагмент.

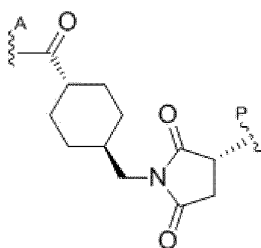
Согласно некоторым вариантам осуществления L предусматривает фрагмент, характеризующийся следующей структурой:



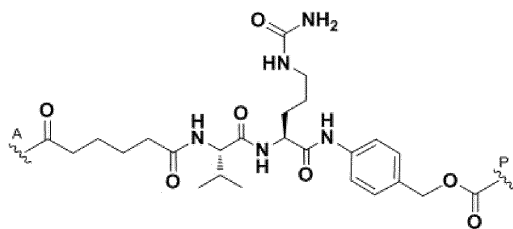
Согласно некоторым вариантам осуществления L предусматривает фрагмент, характеризующийся следующей структурой:



Согласно некоторым вариантам осуществления L предусматривает фрагмент, характеризующийся следующей структурой:

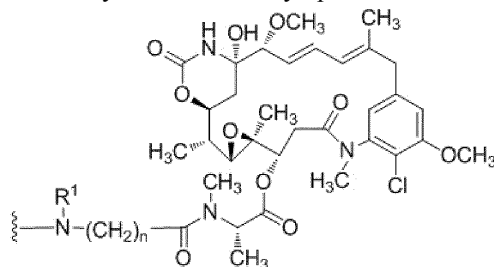


Согласно некоторым вариантам осуществления L предусматривает фрагмент, характеризующийся следующей структурой:



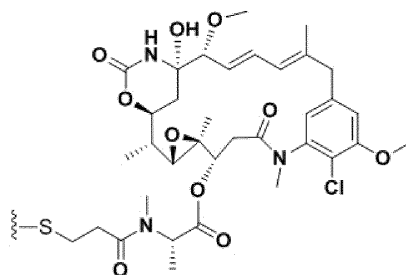
Согласно некоторым вариантам осуществления Рау представляет собой майтанзиноид.

Согласно некоторым вариантам осуществления Рау представляет собой

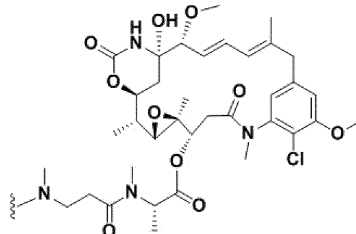


где R<sup>1</sup> представляет собой алкил.

Согласно некоторым вариантам осуществления Рау представляет собой

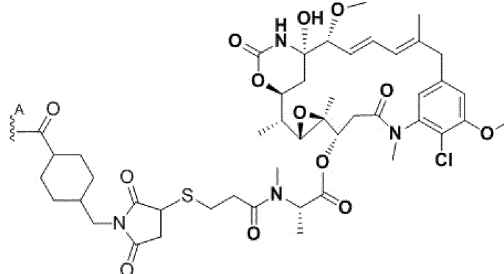


Согласно некоторым вариантам осуществления Рау представляет собой



Согласно некоторым вариантам осуществления n равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления -L-Рау представляет собой

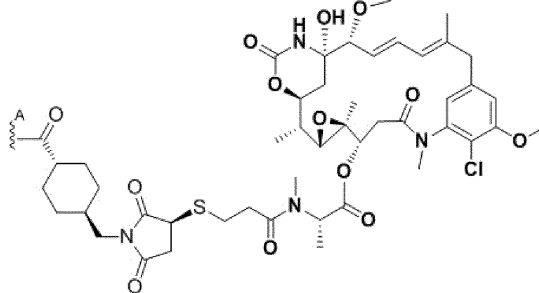


где



является связью с антителом.

Согласно некоторым вариантам осуществления -L-Рау представляет собой

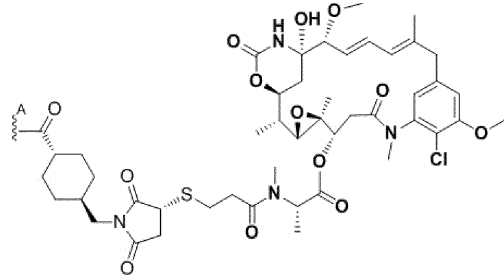


где



является связью с антителом.

Согласно некоторым вариантам осуществления -L-Рау представляет собой

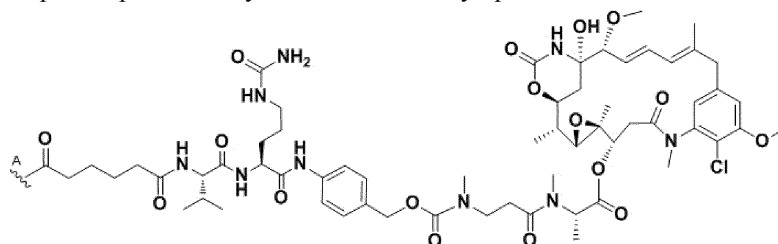


где



является связью с антителом.

Согласно некоторым вариантам осуществления -L-Pay представляет собой



где



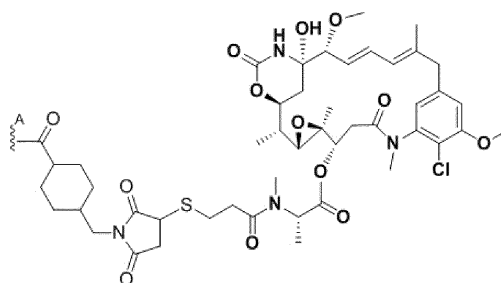
является связью с антителом.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой антитело к MET, содержащее аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 82 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 138;

L-Pay представляет собой



где



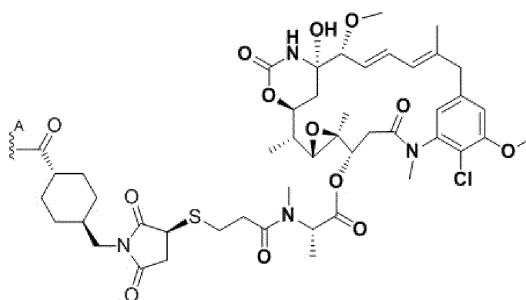
является связью с антителом; и n равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой антитело к MET, содержащее аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 82 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 138;

L-Pay представляет собой



где



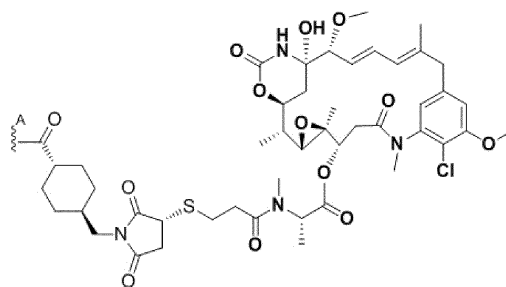
является связью с антителом; и n равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой антитело к MET, содержащее аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 82 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 138;

L-Pay представляет собой



где



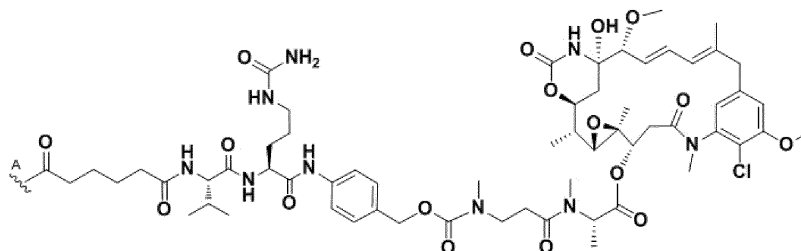
является связью с антителом; и n равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой антитело к MET, содержащее аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 82 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 138;

L-Pay представляет собой



где



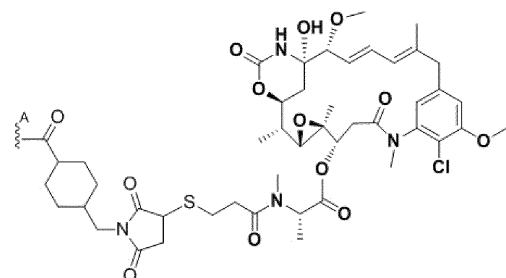
является связью с антителом; и n равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET, содержащий аминокислотную последовательность D1-HCVR SEQ ID NO: 58 и аминокислотную последовательность D2-HCVR SEQ ID NO: 82;

L-Pay представляет собой



где



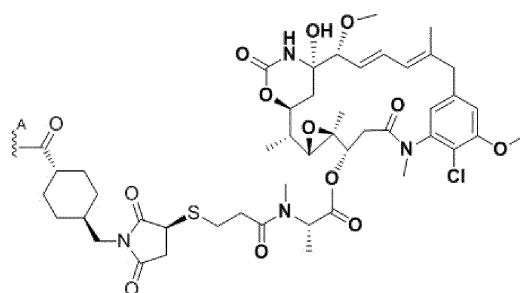
является связью с антигенсвязывающим белком; и n равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET, содержащий аминокислотную последовательность D1-HCVR SEQ ID NO: 58 и аминокислотную последовательность D2-HCVR SEQ ID NO: 82;

L-Pay представляет собой



где

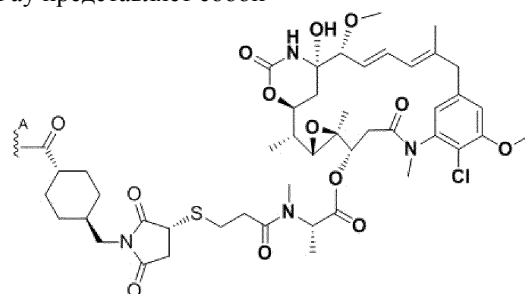


является связью с антигенсвязывающим белком; и  $n$  равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET  $\times$  MET, содержащий аминокислотную последовательность D1-HCVR SEQ ID NO: 58 и аминокислотную последовательность D2-HCVR SEQ ID NO: 82; L-Pay представляет собой



где



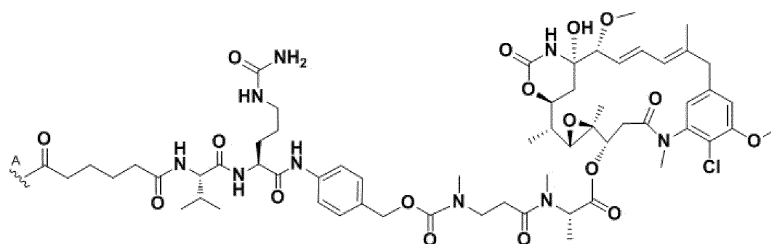
является связью с антигенсвязывающим белком; и  $n$  равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET  $\times$  MET, содержащий аминокислотную последовательность D1-HCVR SEQ ID NO: 58 и аминокислотную последовательность D2-HCVR SEQ ID NO: 82;

L-Pay представляет собой



где



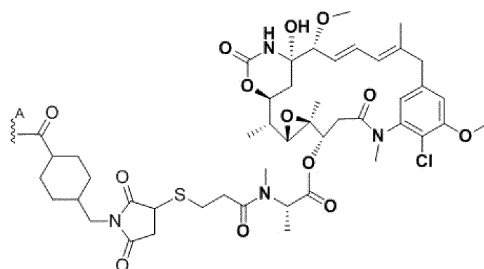
является связью с антигенсвязывающим белком; и  $n$  равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET  $\times$  MET, содержащий аминокислотную последовательность D1-HCVR SEQ ID NO: 18 и аминокислотную последовательность D2-HCVR SEQ ID NO: 82;

L-Pay представляет собой



где



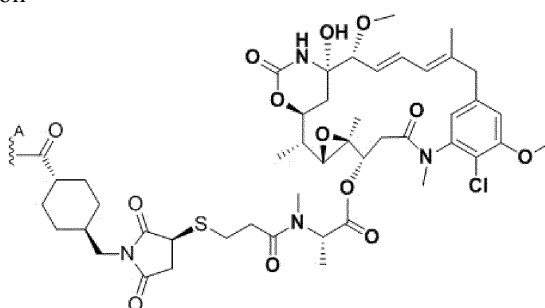
является связью с антигенсвязывающим белком; и  $n$  равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET  $\times$  MET, содержащий аминокислотную последовательность D1-HCVR SEQ ID NO: 18 и аминокислотную последовательность D2-HCVR SEQ ID NO: 82;

L-Pay представляет собой



где



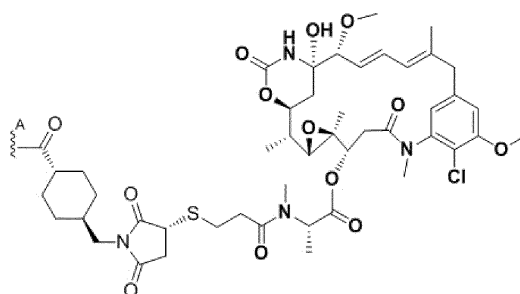
является связью с антигенсвязывающим белком; и  $n$  равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET  $\times$  MET, содержащий аминокислотную последовательность D1-HCVR SEQ ID NO: 18 и аминокислотную последовательность D2-HCVR SEQ ID NO: 82;

L-Pay представляет собой



где



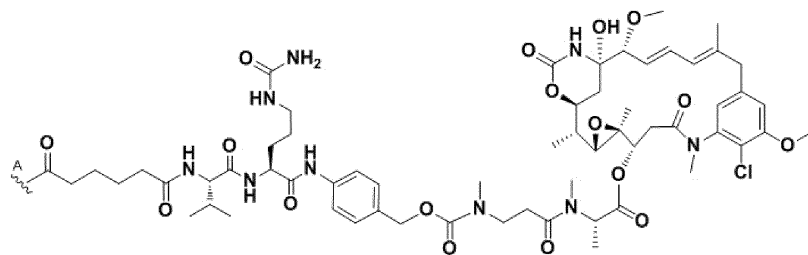
является связью с антигенсвязывающим белком; и  $n$  равняется целому числу от 2 до 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок MET  $\times$  MET, содержащий аминокислотную последовательность D1-HCVR SEQ ID NO: 18 и аминокислотную последовательность D2-HCVR SEQ ID NO: 82;

L-Pau представляет собой



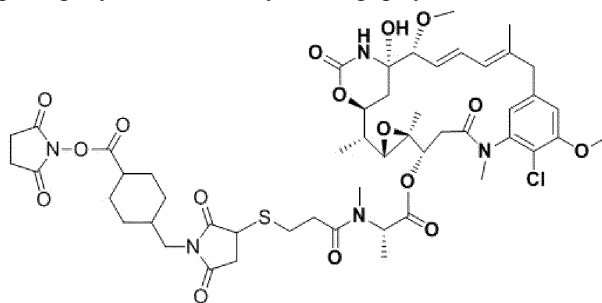
где



является связью с антигенсвязывающим белком; и  $p$  равняется целому числу от 2 до 5.

Описанные в настоящем документе конъюгаты антитела и лекарственного средства можно получать с применением условий конъюгации, известных специалистам в данной области (см., например, Doronina et al. Nature Biotechnology 2003, 21, 7, 778, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства на основе антитела к MET или биспецифического антигенсвязывающего белка MET  $\times$  MET получают путем приведения описанных в настоящем документе антитела к MET или биспецифического антигенсвязывающего белка MET  $\times$  MET в контакт с соединением, предусматривающим требуемый линкер и цитотоксическое средство, где указанный линкер содержит фрагмент, который является реактивным в отношении антитела или антигенсвязывающего белка, например, в отношении требуемого остатка антитела или антигенсвязывающего белка.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлены способы получения конъюгата антитела и лекарственного средства, предусматривающие приведение описанных в настоящем документе антитела к MET или биспецифического антигенсвязывающего белка MET  $\times$  MET в контакт с соединением, характеризующимся следующей формулой A<sup>1</sup>:

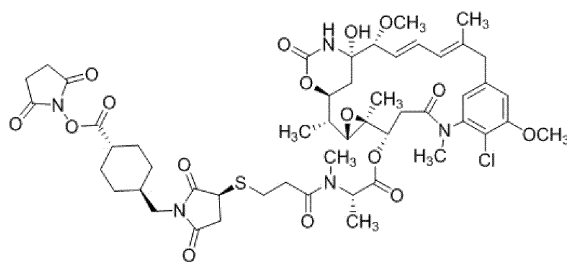
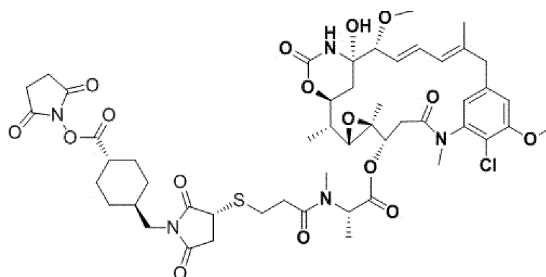


A<sup>1</sup>

и водным разбавителем.

Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы A<sup>1</sup> присутствует в стехиометрическом избытке. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы A<sup>1</sup> присутствует в 5-6-кратном стехиометрическом избытке. Согласно некоторым вариантам осуществления водный разбавитель предусматривает HEPES. Согласно некоторым вариантам осуществления водный разбавитель предусматривает DMA.

Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы A<sup>1</sup> представляет собой соединение формулы A<sup>2</sup> или A<sup>3</sup>.

A<sup>2</sup>A<sup>3</sup>

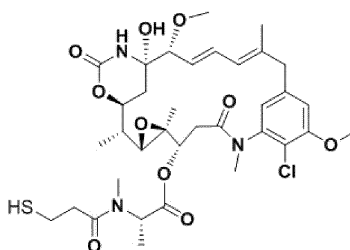
Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы A<sup>2</sup> представляет собой стехиометрически чистое A<sup>3</sup>. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения формулы A<sup>1</sup> предусматривает соединение формулы A<sup>1</sup> или A<sup>2</sup>, где соединение A<sup>1</sup> или A<sup>2</sup> присутствует в диастереоизомерном избытке более 50%. Согласно определенным вариантам осуществления диастереоизомерный избыток составляет более 70%. Согласно определенным вариантам осуществления диастереоизомерный избыток составляет более 90%. Согласно определенным вариантам осуществления диастереоизомерный избыток составляет более 95%.

Термин "диастереоизомерный избыток" относится к разнице между молярной долей требуемого одного диастереоизомера и остальных диастереоизомеров в композиции. Диастереоизомерный избыток рассчитывают следующим образом:

(количество одного диастереоизомера)-(количество других диастереоизомеров)/1.

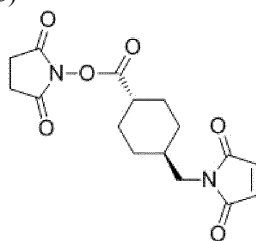
Например, композиция, которая содержит 90% 1 и 10% 2, 3, 4 или их смеси характеризуется диастереоизомерным избытком 80% [(90-10)/1]. Композиция, которая содержит 95% 1 и 5% 2, 3, 4 или их смеси характеризуется диастереоизомерным избытком 90% [(95-5)/1]. Композиция, которая содержит 99% 1 и 1% 2, 3, 4 или их смеси характеризуется диастереоизомерным избытком 98% [(99-1)/1]. Диастереоизомерный избыток аналогичным образом может быть рассчитан для любого из 1, 2, 3 или 4.

Согласно некоторым вариантам осуществления соединения формулы A<sup>1</sup> получают путем приведения соединения формулы (a):



(a)

в контакт с соединением формулы (b)

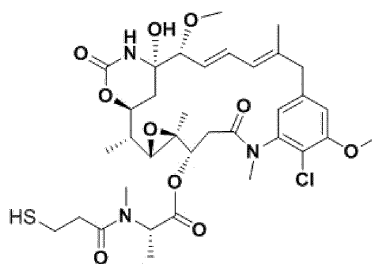


(b)

в присутствии силикагеля и разбавителя. Согласно некоторым вариантам осуществления разбавитель предусматривает органический растворитель и воду.

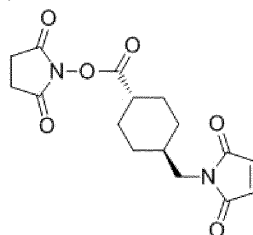
В настоящем документе также представлен продукт, полученный с помощью следующего способа:

(i) приведение соединения формулы (a):



(a)

в контакт с соединением формулы (b):

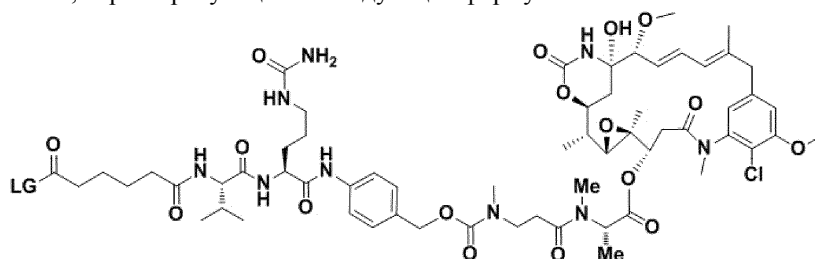


(b)

в присутствии силикагеля и разбавителя для синтеза промежуточного соединения; и

(ii) приведение описанных в настоящем документе антитела к MET или биспецифического антиген-связывающего белка MET  $\times$  MET в контакт с промежуточным соединением и водным разбавителем.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлены способы получения конъюгата антитела и лекарственного средства, предусматривающие приведение описанных в настоящем документе антитела к MET или биспецифического антигенсвязывающего белка MET  $\times$  MET в контакт с соединением, характеризующимся следующей формулой В:

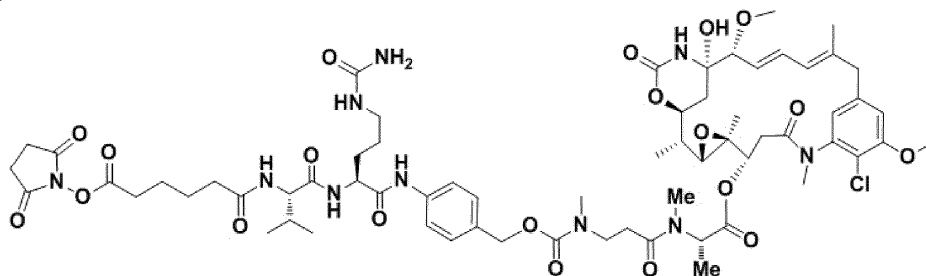


В

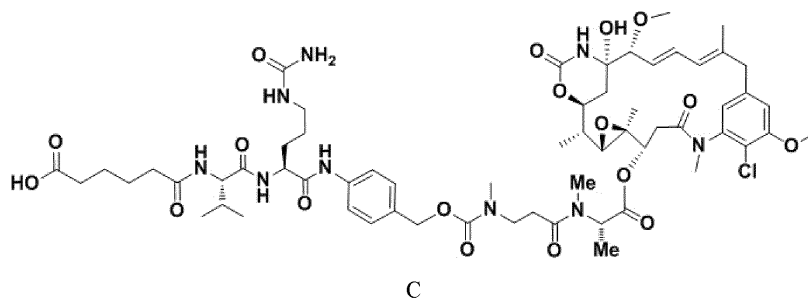
где LG представляет собой уходящую группу, и водным разбавителем.

Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы В присутствует в стехиометрическом избытке. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы В присутствует в 5-6-кратном стехиометрическом избытке. Согласно некоторым вариантам осуществления водный разбавитель предусматривает HEPES. Согласно некоторым вариантам осуществления водный разбавитель предусматривает DMA. Согласно некоторым вариантам осуществления -C(O)-LG представляет собой сложный эфир, например, NHS- или трифторфениловый эфир.

Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы В представляет собой соединение формулы В<sup>1</sup>:

В<sup>1</sup>.

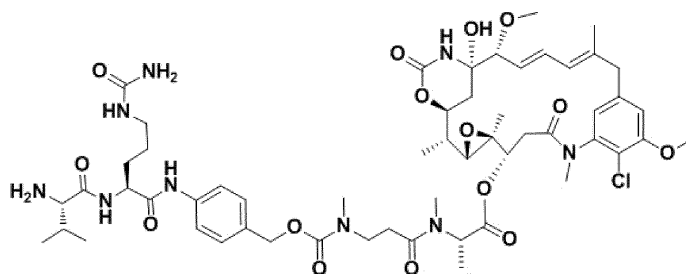
Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы В<sup>1</sup> получают путем приведения соединения формулы С



C

в контакт с N-гидроксисукцинимидом (NHS), конденсирующим реагентом для образования пептидной связи и органическим разбавителем. Подходящие реагенты для образования пептидной связи включают таковые, которые активируют, т.е. делают реакционноспособными, фрагменты карбоновой кислоты для возможности вступления в реакцию с нуклеофилом. Согласно определенным вариантам осуществления реагент для образования пептидной связи представляет собой N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид (EDC). Согласно некоторым вариантам осуществления органический растворитель представляет собой дихлорметан.

Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы C получают путем приведения соединения формулы D



D

в контакт с адипиновой кислотой, реагентом для образования пептидной связи и органическим растворителем. Согласно определенным вариантам осуществления реагент для образования пептидной связи представляет собой 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохиолин (EEDQ). Согласно определенным вариантам осуществления органический растворитель предусматривает дихлорметан. Соединение D можно получать, как описано в WO 2014/145090.

Картирование эпитопов и связанные технологии.

Эпитоп, с которым связываются антитела и антигенсвязывающие домены, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка MET. В качестве альтернативы, соответствующий эпитоп может состоять из множества прерывающихся аминокислот (или аминокислотных последовательностей) MET. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп находится на лиганд-связывающем домене MET, или вблизи него. Согласно другим вариантам осуществления эпитоп находится вне лиганд-связывающего домена MET, например, в местоположении на поверхности MET, в котором антитело, при связывании с таким эпитопом, не препятствует связыванию HGF с MET.

Как описано в другом месте настоящего документа, отдельные антигенсвязывающие домены (D1 и D2) биспецифических антигенсвязывающих молекул MET × MET могут связываться с обособленными, или неперекрывающимися, или частично перекрывающимися эпитопами, относительно друг друга. В контексте настоящего документа выражение "частично перекрывающиеся эпитопы" означает, что первый и второй эпитопы имеют менее 5, менее 4, менее 3 или только одну общую аминокислоту, как определено с помощью любой известной в данной области методики картирования эпитопов (например, рентгеноструктурного анализа, аланинсканирующего мутагенеза, водородно-дейтериевого обмена [HDX], обмена доменами и т.д.). Домены D1 и D2 могут быть неконкурирующими друг с другом. Например, согласно определенным вариантам осуществления связывание домена D1 конкретной биспецифической антигенсвязывающей молекулы MET × MET с его эпитопом на MET не ингибирует (или ингибирует лишь на минимальном уровне) связывание домена D2 биспецифической антигенсвязывающей молекулы MET × MET с его эпитопом на MET. Благодаря неперекрывающейся (или, по большей части, частично перекрывающейся) природе соответствующих эпитопов компонентов D1 и D2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET способны связываться с одной молекулой MET на поверхности клетки.

Для определения эпитопа на MET, с которым взаимодействуют антитела и антигенсвязывающие домены по настоящему раскрытию, можно применять различные методики, известные специалистам в данной области. Иллюстративные методики, которые можно применять для определения эпитопа или

связывающего домена конкретного антитела или антигенсвязывающего домена включают, например, точечный мутагенез (например, аланинсканирующий мутагенез, аргининсканирующий мутагенез и т.д.), блот-анализ пептидов (Reineke, 2004, *Methods Mol. Biol.* 248:443-463), анализ по обусловленной липидным бислоем защите от протеаз и анализ расщепления пептидов. Кроме того, можно использовать такие способы, как метод вырезания эпитопа, метод выделения эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который можно применять для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водородно-дейтериевого обмена предусматривает мечение представляющего интерес белка дейтерием, с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду для обеспечения возможности водородно-дейтериевого обмена по всем остаткам, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются меченными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, с выявлением таким образом меченных дейтерием остатков, которые соответствуют специфическим аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело, также можно применять рентгеноструктурный анализ.

Также в настоящем документе представлены антитела к MET (включая биспецифические антитела), которые связываются с тем же эпитопом, что и любые из конкретных иллюстративных антител или антигенсвязывающих доменов, описанных в настоящем документе (например, антител, содержащих любые из аминокислотных последовательностей, представленных в табл. 1 в настоящем документе). Аналогичным образом, также в настоящем документе представлены антитела к MET, которые конкурируют за связывание с MET с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антител, содержащих любые из аминокислотных последовательностей, представленных в табл. 1 в настоящем документе). Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп MET человека, с которым связываются антитела к MET, содержит аминокислоты 192-204, аминокислоты 305-315 и/или аминокислоты 421-455 SEQ ID NO: 155. Согласно некоторым вариантам осуществления первый эпитоп MET человека содержит аминокислоты 192-204 SEQ ID NO: 155; и второй эпитоп MET человека содержит аминокислоты 305-315 и 421-455 SEQ ID NO: 155.

С применением стандартных способов, известных в данной области и приведенных в настоящем документе в качестве примера, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к MET, или конкурирует ли с ним за связывание. Например, для определения того, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное представленное в настоящем документе антитело к MET, обеспечивают связывание эталонного антитела с белком MET. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой MET. Если тестируемое антитело способно связываться с MET после насыщающего связывания с использованием эталонного антитела к MET, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с эпитопом, отличным от такового для эталонного антитела к MET. Напротив, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой MET после насыщающего связывания с использованием эталонного антитела к MET, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным антителом к MET. Затем можно осуществлять дополнительные стандартные эксперименты (например, мутирование пептидов и анализы связывания) для подтверждения того, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено связыванием с тем же эпитопом, что и эпитоп для эталонного антитела, или же за отсутствие наблюдаемого связывания отвечает стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого типа можно осуществлять с применением ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого известного из данной области количественного или качественного анализа связывания антител. В соответствии с определенными вариантами осуществления два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела обеспечивает ингибирование связывания другого по меньшей мере на 50%, а предпочтительно 75, 90 или даже 99%, как измерено в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502). В качестве альтернативы, считается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если практически все мутации по аминокислотам в антигене, которые снижают или исключают связывание одного антитела, снижают или исключают связывание другого. Считается, что два антитела связывают "перекрывающиеся эпитопы", если только подмножество мутаций по аминокислотам, которые снижают или исключают связывание одного антитела, снижают или исключают связывание другого.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с эталонным антителом к MET, осуществляют описанный выше метод на основе связывания в двух направлениях: При осуществлении метода в первом направлении обеспечивают связывание эталонного антитела с белком MET в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой MET. При осуществлении метода во втором направлении обеспечивают связы-

вание тестируемого антитела с молекулой MET в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой MET. Если, при осуществлении метода в обоих направлениях, только первое (насыщающее связывание) антитело способно к связыванию с молекулой MET, то делают вывод, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с MET. Как будет понятно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно должно связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела за счет связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Получение антител человека.

Представленные в настоящем документе антитела к MET и биспецифические антитела MET  $\times$  MET могут являться полностью человеческими антителами. Способы получения моноклональных антител, включая полностью человеческие моноклональные антитела, известны в данной области. Любые из таких известных способов можно применять в контексте настоящего раскрытия для получения антител человека, которые специфически связываются с MET человека.

С применением, например, технологии VELOCIMMINE™, или любого другого подобного известного способа получения полностью человеческих моноклональных антител, сперва выделяют высокоаффинные химерные антитела к MET с вариательной областью человека и константной областью мыши. Как описано ниже в разделе с экспериментами, определяют характеристики антител и отбирают их в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, блокирующую активность в отношении лиганда, избирательность, эпитоп и т.д. При необходимости константные области мыши замещают требуемой константной областью человека, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированных IgG1 или IgG4, с получением полностью человеческого антитела к MET. Тогда как выбранная константная область может варьировать в соответствии с конкретным применением, характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности в отношении мишени свойственны вариательной области. В определенных случаях полностью человеческие антитела к MET выделяют непосредственно из антиген-положительных В-клеток.

Биоэквиваленты.

Представленные в настоящем документе антитела к MET и фрагменты антител охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от таковых у описанных антител, но при этом сохраняют способность связывать MET человека. Такие варианты антител и фрагменты антител предусматривают одно или несколько добавлений, делеций, или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но характеризуются биологической активностью, которая, по сути, эквивалентна таковой у описанных антител. Аналогично, кодирующие антитело к MET последовательности ДНК по настоящему раскрытию охватывают последовательности, которые предусматривают одно или несколько добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело к MET или фрагмент антитела, которые, по сути, являются биоэквивалентами антитела к MET или фрагмента антитела по настоящему раскрытию. Примеры таких вариантов аминокислотных и ДНК-последовательностей обсуждаются выше.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими вариантами, скорость и степень абсорбции которых не характеризуется значимым различием при введении в одинаковой молярной дозе в аналогичных условиях проведения эксперимента, как в виде однократной дозы, так и в виде многократных доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими вариантами, если они являются эквивалентными по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все еще могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в инструкции по применению лекарственного препарата, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при длительном применении, и не считаются значимыми с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка считаются биоэквивалентными, если клинически значимые различия в их безопасности, чистоте и эффективности отсутствуют.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно переводить один или несколько раз с лечения референтным препаратом на лечение биологическим препаратом, и наоборот, без ожидаемого повышения риска возникновения нежелательных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или уменьшенную эффективность, по сравнению с продолжающейся терапией без такого перевода.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба функционируют по общему механизму или механизмам действия в отношении состояния или состояний, при условии, что такие механизмы являются известными.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с помощью *in vivo* и *in vitro* способов. Определение биоэквивалентности включает, например, (а) *in vivo* тест у людей или других млекопитающих, в

котором измеряют концентрацию антитела или его метаболитов в крови, плазме крови, сыворотке крови или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) *in vitro* тест, результаты которого коррелировали с данными по биодоступности *in vivo* у человека, и который является достаточно прогностическим в отношении таких данных; (c) *in vivo* тест у людей или других млекопитающих, в котором соответствующий немедленный фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется в зависимости от времени; и (d) клиническое испытание в строго контролируемых условиях, в котором устанавливают безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты представленных в настоящем документе антител к MET могут быть сконструированы, например, путем выполнения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно удалять или замещать другими аминокислотами для предотвращения образования лишних или неуместных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других случаях биоэквивалентные антитела могут включать варианты антитела к MET, предусматривающие изменения по аминокислоте, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые исключают или устраняют гликозилирование.

Межвидовая избирательность и межвидовая перекрестная реактивность.

Настоящее раскрытие в соответствии с определенными вариантами осуществления относится к антителам к MET (и антигенсвязывающим молекулам, содержащим антигенсвязывающие домены антитела к MET), которые связываются с MET человека, но не с MET другого вида. Настоящее раскрытие также включает антитела к MET (и антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающие домены антитела к MET), которые связываются с MET человека и с MET одного или несколько видов, отличных от человека. Например, антитела к MET и антигенсвязывающие молекулы могут связываться с MET человека, и могут связывать или не связывать, в соответствующих случаях, один или несколько из MET мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макаки-резуса или шимпанзе. В соответствии с определенными иллюстративными вариантами осуществления представлены антитела к MET и антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают MET человека и MET яванского макака (т.е. *Maca fascicularis*). Другие антитела к MET и антигенсвязывающие молекулы связывают MET человека, но не связывают, или связывают слабо, MET яванского макака.

Полиспецифические антитела.

Как описано в другом месте настоящего документа, настоящее раскрытие относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим два разных антигенсвязывающих домена, где первый антигенсвязывающий домен (D1) связывает первый эпитоп на MET, и где второй антигенсвязывающий домен (D2) связывает второй эпитоп на MET. Согласно определенным вариантам осуществления первый и второй эпитопы на MET, с которыми связываются домены D1 и D2, являются обособленными, или неперекрывающимися, или частично перекрывающимися. В соответствии с этим аспектом домен D1 может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в табл. 1 в настоящем документе, и домен D2 может содержать любую другую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в табл. 1 в настоящем документе (при условии, что специфичность связывания домена D1 отличается от специфичности связывания домена D2, и/или антигенсвязывающий белок, из которого был получен D1, не конкурирует за связывание с MET с антигенсвязывающим белком, из которого был получен D2). Согласно некоторым вариантам осуществления эпитоп MET человека, с которым связываются антитела к MET, содержит аминокислоты 192-204, аминокислоты 305-315 и/или аминокислоты 421-455 SEQ ID NO: 155. Согласно некоторым вариантам осуществления первый эпитоп MET человека содержит аминокислоты 192-204 SEQ ID NO: 155; и второй эпитоп MET человека содержит аминокислоты 305-315 и 421-455 SEQ ID NO: 155.

В соответствии с отдельным аспектом настоящего раскрытия также представлены обычные биспецифические антитела, где одно плечо биспецифического антитела связывается с эпитопом на MET человека, а другое плечо биспецифического антитела связывается со вторым антигеном, отличным от MET. MET-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в табл. 1 в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления MET-связывающее плечо связывает MET человека и блокирует связывание HGF с MET. Согласно другим вариантам осуществления MET-связывающее плечо связывает MET человека, но не блокирует связывание HGF с MET.

Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно применять в контексте настоящего раскрытия, предусматривает применение первого C<sub>H</sub>3-домена иммуноглобулина (Ig) и второго C<sub>H</sub>3-домена Ig, где первый и второй C<sub>H</sub>3-домены Ig отличаются друг от друга по меньшей мере по одной аминокислоте, и где отличие по меньшей мере по одной аминокислоте обуславливает снижение способности связывания биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, не характеризующимся таким отличием по аминокислоте. Согласно одному варианту осуществления первый C<sub>H</sub>3-домен Ig связывает белок А, а второй C<sub>H</sub>3-домен Ig предусматривает мутацию, которая обу-

сглаживает снижение или устранение способности к связыванию с белком А, как, например, модификация Н95R (согласно IMGT-нумерации мутаций в экзонах; Н435R согласно EU-нумерации). Второй С<sub>H</sub>3 может дополнительно предусматривать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые можно найти в пределах второго С<sub>H</sub>3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае IgG1-антител; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае IgG2 антител; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае IgG4-антител. Вариации описанного выше формата биспецифического антитела включены в объем настоящего раскрытия.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно применять в контексте настоящего раскрытия, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или в виде диатела, биспецифические форматы в виде слияний IgG-scFv, Ig с двойными вариабельными доменами (DVD), Quadroma, антитела со структурой "выступ во впадину", антитела с общей легкой цепью (например, антитела с общей легкой цепью со структурой "выступ во впадину" и т.д.), CrossMab, CrossFab, полученного на основе технологии SEED антитела ((SEED)body), антитела, полученного путем опосредованной лейциновой застезкой димеризации, Duobody, IgG1/IgG2, IgG с Fab двойного действия (DAF) и биспецифические форматы Mab<sup>2</sup> (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 и цитируемые в ней ссылки, для обзора перечисленных выше форматов). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с применением конъюгирования пептид/нуклеиновая кислота, например, где применяют аминокислоты не природного происхождения с перекрестной химической активностью для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самособираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтический состав и введение.

В настоящем документе представлены фармацевтические композиции, содержащие антитела к MET или биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции могут быть составлены с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.д.

Терапевтические применения антител.

В настоящем документе представлены способы, предусматривающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, содержащей антитело к MET или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу MET × MET (например, антитело к MET, содержащее любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в табл. 1 в настоящем документе, или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу MET × MET, содержащую любой из компонентов D1 и D2, представленных в табл. 5 в настоящем документе). Терапевтическая композиция может содержать любое из антител к MET или биспецифических антигенсвязывающих молекул MET × MET, раскрытых в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET являются пригодными, среди прочего, для лечения, предупреждения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, опосредованного экспрессией, передачей сигнала или активностью MET, или ассоциированного с перечисленным, или которое поддается лечению путем блокирования взаимодействия между MET и HGF, или путем ингибирования активности и/или передачи сигнала MET другим способом, и/или путем содействия интернализации рецептора и/или уменьшения числа рецепторов на поверхности клетки.

Например, антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET по настоящему раскрытию являются пригодными для лечения опухолей, которые экспрессируют (или сверхэкспрессируют) MET. Например, антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET можно применять для лечения первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в головном мозге и мозговых оболочках, ротоглотке, легком и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужских и женских половых путях, мышце, кости, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, органах иммунной системы, из форменных элементов крови и в костном мозге, печени и мочевых путях и специализированных органах чувств, таких как глаз. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET применяют для лечения одной или нескольких из следующих форм рака: острый миелоидный лейкоз, Т-клеточный лейкоз у взрослых, формы астроцитомы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарцинома, хронический миелоидный лейкоз, рак толстой и прямой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка (например, рак желудка с амплификацией MET), глиобластома, рак головы и шеи (например, плоскоклеточная карцинома головы и шеи [HNSCC]), саркома Капоши, рак почки, формы лейомиосаркомы, рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого [NSCLC]), формы лимфомы, формы злокачественной глиомы, злокачественная мезотелиома, меланома, мезотелиома, MFH/фибросаркома, множественная миелома, рак носоглотки, остеосаркома, рак яичника,

карцинома поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточная карцинома, рабдомиосаркома, мелкоклеточный рак легкого, синовиальная саркома, рак щитовидной железы и опухоль Вильмса.

В контексте описанных в настоящем документе способов лечения антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET  $\times$  MET можно вводить в качестве монотерапии (т.е. в качестве единственного терапевтического средства) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами (примеры которых описаны другом месте настоящего документа).

Комбинированные терапевтические препараты и составы.

В настоящем документе представлены композиции и терапевтические составы, содержащие любое из антител к MET и биспецифических антигенсвязывающих молекул MET  $\times$  MET, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, предусматривающие введение таких комбинаций нуждающимся в этом субъектам.

Антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET  $\times$  MET можно составлять совместно с и/или вводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, выбранными из группы, состоящей из: антагонист MET (например, антитело к MET [например, онартузумаб, эмибетузумаб и H4N14639D] или низкомолекулярный ингибитор MET), антагонист EGFR (например, антитело к EGFR [например, цетуксимаб или панитумумаб] или низкомолекулярный ингибитор EGFR [например, гефитиниб или эрлотиниб]), антагонист другого члена семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, антитело к ErbB2 [например, трастузумаб или T-DM1 {KADCYLA®}], антитело к ErbB3 или к ErbB4 или низкомолекулярный ингибитор активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагонист EGFRvIII (например, антитело к EGFRvIII), антагонист IGF1R (например, антитело к IGF1R), ингибитор B-raf (например, вемурафениб, сорафениб, GDC-0879, PLX-4720), ингибитор PDGFR- $\alpha$  (например, антитело к PDGFR- $\alpha$ ), ингибитор PDGFR- $\beta$  (например, антитело к PDGFR- $\beta$  или низкомолекулярный киназный ингибитор, такой как, например, иматиниба мезилат или сунитиниба малат), ингибитор лиганда PDGF (например, антитело, аптамер, siRNA и т.д., связывающиеся с PDGF-A, -B, -C или -D), антагонист VEGF (например, белок-ловушка для VEGF (VEGF-Trap), такой как афлиберцепт, см., например, US 7087411 (также называемый в настоящем документе "ингибирующим VEGF слитым белком), антитело к VEGF (например, бевацизумаб), низкомолекулярный киназный ингибитор рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), антагонист DLL4 (например, антитело к DLL4, раскрытое в US 2009/0142354, такое как REGN421), антагонист Ang2 (например, антитело к Ang2, раскрытое в US 2011/0027286, такое как H1H685P), антагонист FOLH1 (например, антитело к FOLH1), антагонист STEAP1 или STEAP2 (например, антитело к STEAP1 или антитело к STEAP2), антагонист TMPRSS2 (например, антитело к TMPRSS2), антагонист MSLN (например, антитело к MSLN), антагонист CA9 (например, антитело к CA9), антагонист уроплакина (например, антитело к уроплакину [например, к UPK3A]), антагонист MUC16 (например, антитело к MUC16), антагонист антигена Tn (например, антитело к Tn), антагонист CLEC12A (например, антитело к CLEC12A), антагонист TNFRSF17 (например, антитело к TNFRSF17), антагонист LGR5 (например, антитело к LGR5), моновалентный антагонист CD20 (например, моновалентное антитело к CD20, такое как ритуксимаб), биспецифическое антитело к CD20  $\times$  CD3, PD-1-блокирующее средство (например, антитело к PD-1, такое как пембролизумаб или ниволумаб) и т.д. Другие средства, которые можно успешно вводить в комбинации с представленными в настоящем документе антителами, включают, например, тамоксифен, ингибиторы ароматазы и ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или с их соответствующими рецепторами.

Для иллюстрации, ингибитор PD-1, такой как антитело к PD-1, можно комбинировать с конъюгатом антитела к Met и лекарственного средства, описанного в настоящем документе. Целевая популяция пациентов включает, в частности, таких пациентов с опухолями, которые сверхэкспрессируют мутантный c-Met, например, пациента с немелкоклеточным раком легкого с экспрессией c-Met.

В настоящем документе представлены композиции и терапевтические составы, содержащие любое из антител к MET и биспецифических антигенсвязывающих молекул MET  $\times$  MET, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими химиотерапевтическими средствами. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (Cytosan<sup>TM</sup>); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодоба, карбоквон, метуредоба и уредоба; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилмеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, хлорметин, гидрохлорид лорметина, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевинны, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин,

даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин, эпирубин, эзорубин, ида-рубин, марцелломицин, митомицины, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепло-мицин, потфиروмицин, пуромин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберци-дин, убенимекс, зиностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пу-рина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцита-бин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепи-тиостан, тестостерон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, мито-тан, трилостан; добавку для восполнения фолиевой кислоты, такую как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демексолон; диазихон; эфлорнитин; эллиптиния ацетат; этоглюцид; нитрат галлия; гидро-ксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK™; разоксан; ши-зофиллан; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазихон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; вин-дзин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепу; таксаны, например паклитаксел (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси) и доцетаксел (Taxotere™, Aventis Antony, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги препаратов на основе платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; эпопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин C; митоксантрон; вин-крисдин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоклутетин; кселоду; ибандро-нат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту; эспермицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного. Также в это определение включены противогормональные средства, которые ре-гулируют или ингибируют действие гормонов в отношении опухолей, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, 4(5)-имидазолы, ингибирующие ароматазу, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (Fareston); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, ки-слоты или производные любого из вышеперечисленного.

Антитела к MET и биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET × MET также можно вводить и/или составлять в комбинации с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгети-ками, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, ингибиторами COX, кардиопротекторами, хелаторами, IFN-гамма и/или NSAID.

Дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы), например любое из приведенных выше средств или их производных, можно вводить непосредственно перед, одновременно или сразу по-сле введения антитела к MET или биспецифической антигенсвязывающей молекулы MET × MET; (для целей настоящего раскрытия такие схемы введения считаются введением антитела "в комбинации с" до-полнительным терапевтически активным компонентом). Настоящее раскрытие включает фармацевтиче-ские композиции, в которых антитело к MET или биспецифическая антигенсвязывающая молекула MET × MET составлена совместно с одним или несколькими из дополнительных терапевтически активных компонентов, как описано в другом месте настоящего документа.

#### Схемы введения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления многократные дозы антитела к MET или биспецифической антигенсвязывающей молекулы MET × MET (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к MET или биспецифической антигенсвязывающей молекулы MET × MET и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упоминаемых в настоящем доку-менте) можно вводить субъекту в течение определенного промежутка времени. Способы в соответствии с этим аспектом предусматривают последовательное введение субъекту многократных доз представлен-ных в настоящем документе антитела к MET или биспецифической антигенсвязывающей молекулы MET × MET. В контексте настоящего документа "последовательное введение" означает, что каждую дозу ан-титела субъекту вводят в разные моменты времени, например в разные дни, разделенные заданным ин-тервалом (например, в часы, дни, недели или месяцы). Настоящее раскрытие включает способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту единичной начальной дозы антитела к MET или биспецифической антигенсвязывающей молекулы MET × MET, с последующим введением одной или нескольких доз второй очереди антитела к MET или биспецифической антигенсвязывающей молекулы MET × MET, и необязательно с последующим введением одной или нескольких доз третьей очереди ан-титела к MET или биспецифической антигенсвязывающей молекулы MET × MET.

Термины "начальная доза", "дозы второй очереди" и "дозы третьей очереди" относятся к временной последовательности введения антитела к MET или биспецифической антигенсвязывающей молекулы MET × MET. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят вначале курса лечения (также называется "исходной дозой"); "дозы второй очереди" представляют собой дозы, которые

вводят после начальной дозы; и "дозы третьей очереди" представляют собой дозы, которые вводят после доз второй очереди. Начальная доза, дозы второй и третьей очереди могут содержать одинаковое количество антитела к MET или биспецифической антигенсвязывающей молекулы MET  $\times$  MET, но в целом могут отличаться друг от друга с учетом частоты введения. Однако согласно определенным вариантам осуществления количества антитела, содержащиеся в начальной дозе, дозах второй и третьей очереди, отличаются друг от друга (например, по мере необходимости скорректированы по возрастающей или по убывающей) в ходе курса лечения. Согласно определенным вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят вначале курса лечения в качестве "нагрузочных доз", с последующими дозами, которые вводят реже (например, "поддерживающие дозы").

Диагностические применения антител.

Антитело к MET или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу MET  $\times$  MET по настоящему раскрытию также можно применять для выявления и/или измерения MET или MET-экспрессирующих клеток в образце, например, в диагностических целях. Например, антитело к MET или его фрагмент можно применять для диагностирования состояния или заболевания, характеризующихся аномальной экспрессией (например, сверхэкспрессией, низким уровнем экспрессии, отсутствием экспрессии и т.д.) MET. Иллюстративные диагностические анализы для MET могут предусматривать, например, приведение образца, полученного от пациента, в контакт с антителом к MET или биспецифической антигенсвязывающей молекулой MET  $\times$  MET, где антитело метят с помощью детектируемой метки или репортерной молекулы. В качестве альтернативы, немеченное антитело к MET или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу MET  $\times$  MET можно использовать для диагностических применений в комбинации со вторичным антителом, которое является меченым для возможности выявления. Детектируемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  или  $^{125}\text{I}$ ; флуоресцентное или хемилюминесцентное вещество, такое как флуоресцеин или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно применять для выявления или измерения MET в образце, включают ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA), иммуно-PET (например,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  и т.д.) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

Образцы, которые можно применять в диагностических анализах по MET в соответствии с настоящим раскрытием, включают любой образец ткани или жидкости организма, который можно получить от пациента. В общем случае, уровни MET в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, который не страдает от заболевания или состояния, ассоциированных с аномальными уровнями или активностью MET), будут измерять сначала для установления исходного, или стандартного, уровня MET. Такой исходный уровень MET затем можно сопоставлять с уровнями MET, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие MET-ассоциированных заболеваний или состояний.

### Примеры

Следующие примеры приведены с целью предоставления специалистам в данной области полного раскрытия и описания того, как выполнять и применять представленные в настоящем документе способы и композиции, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают как свое изобретение. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении применяемых значений (например, количеств, температуры и т.д., однако следует учитывать наличие некоторых погрешностей и отклонений в экспериментах. Если не указано иное, части являются частями по весу, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура приведена в градусах Цельсия и давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Получение антител к MET.

Антитела к MET получали путем иммунизации полученной с помощью методов генной инженерии мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариabельные области тяжелой цепи и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, иммуногеном, предусматривающим рекомбинантную конструкцию в виде внеклеточного домена MET человека, слитого с Fc человека (R&D Systems, номер по каталогу 358-MT, Миннеаполис, Миннесота). У мышей, используемых для иммунизации, экспрессируется "универсальная легкая цепь". То есть антитела, вырабатываемые у этой мыши, имеют разные вариabельные области тяжелой цепи, но практически идентичные вариabельные домены легкой цепи.

Гуморальный иммунный ответ отслеживали с применением MET-специфического иммунологического анализа. Когда требуемый иммунный ответ был достигнут, спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши для сохранения жизнеспособности первых и для получения линий клеток гибридомы. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбору для идентификации клеточных линий, которые продуцируют MET-специфические антитела. С применением такой методики были получены несколько химерных антител к MET (т.е. антител, имеющих вариabельные домены человека и константные домены мыши). Кроме того, несколько полностью человеческих антител к MET были выделены непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в US

2007/0280945 A1.

Определенные биологические свойства иллюстративных антител к МЕТ, полученных в соответствии со способами в этом примере, и сконструированных из них биспецифических антител, подробно описаны в представленных ниже примерах.

Пример 2. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот для вариабельных областей тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей и CDR выбранных антител к МЕТ, описанных в настоящем документе. (Как отмечалось выше, все антитела, полученные в примере 1, имеют одинаковую вариабельную область легкой цепи, и, следовательно, также одинаковые последовательности CDR легкой цепи). Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в табл. 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

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

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

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

Антитела, как правило, названы в настоящем документе в соответствии со следующей системой обозначений: префикс, соответствующий Fc (например, "H4H"), затем следует числовой идентификатор (например, "13290", "13291", "13295" и т.д.), затем следует суффикс "P2", как показано в табл. 1 и 2. Таким образом, в соответствии с такой системой обозначений антитело в настоящем документе может быть названо, например, "H4H13290P2", "H4H13291P2", "H4H13295P2" и т.д. Префикс в применяемых в настоящем документе обозначениях антител указывает на конкретный изотип по Fc-области антитела. В частности, антитело "H4H" содержит Fc IgG4 человека (все переменные области являются полностью человеческими, на что указывает первая "H" в обозначении антитела). Как будет понятно специалисту в данной области, антитело с Fc конкретного изотипа можно преобразовать в антитело с Fc другого изотипа (например, антитело с Fc IgG4 мыши можно преобразовать в антитело с Fc IgG1 человека и т.д.), но, в любом случае, переменные домены (включая CDR) - которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в таблицах 1 и 2 - будут оставаться такими же, а свойства связывания, как ожидается, будут идентичными или в значительной степени подобными, независимо от происхождения Fc-домена.

Пример 3. Полученные на основе метода поверхностного плазменного резонанса показатели аффинности связывания и кинетические константы моноклональных антител человека к MET (моноспецифических).

Показатели аффинности связывания и кинетические константы антител человека к MET определяли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (Biacore 4000 или T-200) при 37°C. Тестируемые в этом примере антитела к MET представляли собой бивалентные моноспецифические связывающие MET молекулы. Антитела, экспрессируемые как IgG4 человека (обозначенные "H4H"), захватывали на поверхности сенсора CM4 или CM5 от Biacore, дериватизированной посредством связывания по аминокислотной группе с моноклональным антителом мыши к Fc человека (GE, BR-1008-39). Различными концентрациями растворимых мономерных (человека (h) Met.mmh; SEQ ID NO: 152; macaca fascicularis (mf) Met.mmh; SEQ ID NO: 154) или димерных (hMet.mFc; SEQ ID NO: 153) белков Met путем впрыскивания покрывали поверхность с захваченным антителом к MET при скорости потока 30 или 50 мкл/мин. Связывание hMET.mmh или hMET.mFc с захваченным моноклональным антителом отслеживали в течение 4 или 5 мин, а диссоциацию hMET.mmh или hMET.mFc в подвижном буфере HBS-ET (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активное вещество P20) или PBS-P (0,01 M фосфат натрия, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05% об./об. поверхностно-активное вещество P20) отслеживали в течение 10 мин.

Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем аппроксимации кривых сенсограмм, записываемых в режиме реального времени, к модели связывания 1:1 с при-

менением программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0с. Константу диссоциации ( $K_D$ ) для равновесного связывания и полупериод диссоциации ( $t_{1/2}$ ) рассчитывали исходя из кинетических констант скорости как

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a} \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Параметры кинетики связывания моноспецифических антител к МЕТ с мономерным и димерным белком МЕТ показаны ниже в табл. 3.

Таблица 3. Показатели аффинности связывания в анализе Вiascore для моноспецифических mAb к МЕТ при 37°C

| Связывание при 37°C/формат с захватом антитела |                        |                           |                          |                  |                 |
|------------------------------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------|-----------------|
| Антитело                                       | Анализируемое вещество | $k_a$ (Ms <sup>-1</sup> ) | $k_d$ (s <sup>-1</sup> ) | $K_D$ (молярная) | $T_{1/2}$ (мин) |
| H4H13290P2                                     | hMet.mmh               | 2,53E+05                  | 8,03E-04                 | 3,17E-09         | 14,4            |
|                                                | hMET.mFc               | 6,15E+05                  | 3,15E-04                 | 5,13E-10         | 36,6            |
|                                                | mfMet.mmh              | 1,23E+05                  | 6,33E-04                 | 5,16E-09         | 18,2            |
| H4H13291P2                                     | hMet.mmh               | 2,55E+04                  | 2,38E-03                 | 9,34E-08         | 4,8             |
|                                                | hMET.mFc               | 3,33E+05                  | 3,39E-04                 | 1,02E-09         | 34              |
|                                                | mfMet.mmh              | 3,70E+04                  | 1,39E-03                 | 3,76E-08         | 8,3             |
| H4H13295P2                                     | hMet.mmh               | 1,67E+04                  | 5,40E-04                 | 3,24E-08         | 21,4            |
|                                                | hMET.mFc               | 2,28E+05                  | 2,64E-04                 | 1,16E-09         | 43,8            |
|                                                | mfMet.mmh              | 1,65E+04                  | 9,79E-04                 | 5,93E-08         | 11,8            |
| H4H13299P2                                     | hMet.mmh               | 9,10E+04                  | 7,80E-04                 | 8,57E-09         | 14,8            |
|                                                | hMET.mFc               | 3,57E+05                  | 3,14E-04                 | 8,78E-10         | 36,8            |
|                                                | mfMet.mmh              | 1,13E+05                  | 8,84E-04                 | 7,86E-09         | 13,1            |
| H4H13300P2                                     | hMet.mmh               | 3,35E+04                  | 2,43E-03                 | 7,25E-08         | 4,8             |
|                                                | hMET.mFc               | 2,65E+05                  | 2,95E-04                 | 1,12E-09         | 39,1            |
|                                                | mfMet.mmh              | 5,13E+04                  | 1,94E-03                 | 3,77E-08         | 6,0             |
| H4H13301P2                                     | hMet.mmh               | 7,57E+04                  | 6,22E-03                 | 8,22E-08         | 1,9             |
|                                                | hMET.mFc               | 7,05E+05                  | 1,14E-03                 | 1,62E-09         | 10,1            |
|                                                | mfMet.mmh              | 6,85E+04                  | 5,30E-03                 | 7,74E-08         | 2,2             |
| H4H13302P2                                     | hMet.mmh               | 5,24E+04                  | 2,46E-03                 | 4,70E-08         | 4,7             |
|                                                | hMET.mFc               | 2,51E+05                  | 5,84E-04                 | 2,33E-09         | 19,8            |
|                                                | mfMet.mmh              | 3,56E+04                  | 2,92E-03                 | 8,20E-08         | 4,0             |
| H4H13306P2                                     | hMet.mmh               | 1,52E+05                  | 1,66E-02                 | 1,09E-07         | 0,7             |
|                                                | hMET.mFc               | 1,21E+06                  | 2,60E-03                 | 2,15E-09         | 4,4             |
|                                                | mfMet.mmh              | 1,21E+06                  | 3,11E-02                 | 2,58E-08         | 0,4             |
| H4H13309P2                                     | hMet.mmh               | 9,20E+04                  | 5,87E-04                 | 6,38E-09         | 19,7            |
|                                                | hMET.mFc               | 4,06E+05                  | 2,67E-04                 | 6,57E-10         | 43,3            |
|                                                | mfMet.mmh              | 1,23E+05                  | 6,33E-04                 | 5,16E-09         | 18,2            |
| H4H13311P2                                     | hMet.mmh               | 4,48E+04                  | 5,19E-03                 | 1,16E-07         | 2,2             |
|                                                | hMET.mFc               | 3,02E+05                  | 4,68E-04                 | 1,55E-09         | 24,7            |
|                                                | mfMet.mmh              | 7,61E+04                  | 6,04E-03                 | 7,94E-08         | 1,9             |
| H4H13312P2                                     | hMet.mmh               | 7,19E+04                  | 1,63E-02                 | 2,27E-07         | 0,7             |
|                                                | hMET.mFc               | 6,14E+05                  | 1,71E-03                 | 2,79E-09         | 6,7             |
|                                                | mfMet.mmh              | 1,47E+05                  | 7,72E-03                 | 5,24E-08         | 1,5             |
| H4H13313P2                                     | hMet.mmh               | 8,78E+04                  | 5,70E-03                 | 6,49E-08         | 2               |
|                                                | hMET.mFc               | 7,50E+05                  | 8,93E-04                 | 1,19E-09         | 12,9            |
|                                                | mfMet.mmh              | 5,10E+04                  | 4,08E-03                 | 8,00E-08         | 2,8             |
| H4H13316P2                                     | hMet.mmh               | 7,82E+04                  | 1,51E-03                 | 1,93E-08         | 7,6             |
|                                                | hMET.mFc               | 2,93E+05                  | 1,08E-04                 | 3,67E-10         | 107,4           |
|                                                | mfMet.mmh              | NB                        | NB                       | NB               | NB              |
| H4H13318P2                                     | hMet.mmh               | 3,30E+04                  | 2,92E-03                 | 8,83E-08         | 4               |
|                                                | hMET.mFc               | 3,52E+05                  | 1,65E-04                 | 4,67E-10         | 70,2            |
|                                                | mfMet.mmh              | NB                        | NB                       | NB               | NB              |
| H4H13319P2                                     | hMet.mmh               | 3,11E+04                  | 2,38E-03                 | 7,65E-08         | 4,9             |

| Связывание при 37°C/формат с захватом антитела |                        |                                          |                          |                  |                 |
|------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------|--------------------------|------------------|-----------------|
| Антитело                                       | Анализируемое вещество | $k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | $k_d$ (s <sup>-1</sup> ) | $K_D$ (молярная) | $T_{1/2}$ (мин) |
|                                                | hMET.mFc               | 3,82E+05                                 | 5,42E-04                 | 1,42E-09         | 21,3            |
|                                                | mfMet.mmh              | 2,66E+04                                 | 1,15E-03                 | 4,33E-08         | 10,0            |
| H4N13325P2                                     | hMet.mmh               | 9,53E+04                                 | 2,36E-03                 | 2,48E-08         | 4,9             |
|                                                | hMET.mFc               | 3,06E+05                                 | 1,85E-04                 | 6,05E-10         | 62,4            |
|                                                | mfMet.mmh              | NB                                       | NB                       | NB               | NB              |
| H4N13331P2                                     | hMet.mmh               | 2,61E+05                                 | 8,73E-04                 | 3,35E-09         | 13,2            |
|                                                | hMET.mFc               | 6,39E+05                                 | 1,56E-04                 | 2,44E-10         | 74,1            |
|                                                | mfMet.mmh              | 1,61E+05                                 | 1,04E-03                 | 6,47E-09         | 11,1            |

NB - связывание в применяемых условиях не наблюдали.

Как показано в табл. 3, несколько антител характеризовались высокой аффинностью связывания с белком MET человека и обезьяны.

Пример 4. Антитела к MET связываются с обособленными эпитопами на рецепторе Met.

Для оценки того, способны ли два антитела к MET конкурировать друг с другом за связывание с их соответствующими эпитопами на MET, проводили анализ конкуренции за связывание с применением интерферометрического анализа биослоя (BLI) в режиме реального времени без применения метки на биосенсоре OCTET® HTX (ForteBio Corp., Менло-Парк, Калифорния).

Вкратце, примерно 0,25 нМ внеклеточного домена MET человека, экспрессируемого с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (hMet.mmh), сперва захватывали на поверхности покрытых антителом к пента-His биосенсоров OCTET® (ForteBio Corp., № 18-5079) путем погружения биосенсоров на 5 мин в лунки, содержащие 20 мкг/мл раствора hMET.mmh. Затем биосенсоры с захваченным антигеном насыщали первым моноклональным антителом к MET (далее называемым mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствор mAb-1 на 5 мин. Затем биосенсоры погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствор второго моноклонального антитела к MET (далее называемого mAb-2) на 3 мин. Все биосенсоры промывали в буфере OCTET® FIEPES-забуференный солевой раствор-EDTA полисорбат 20 (HBS-EP) в промежутке между каждой стадией эксперимента. Ответ в отношении связывания в режиме реального времени отслеживали в течение эксперимента и в конце каждой стадии ответ в отношении связывания регистрировали. Ответ в отношении связывания mAb-2 с антителом к MET, предварительно связавшимся в комплекс с mAb-1, сравнивали и определяли конкурентный/неконкурентный характер связывания разных моноклональных антител к MET с применением 50% порога ингибирования. В табл. 4 явным образом определены взаимосвязи антител, конкурирующих в обоих направлениях, независимо от порядка связывания.

Таблица 4. Перекрестная конкуренция антител к MET за связывание с hMET.mmh

| Первое mAb (mAb-1),<br>захваченное с<br>применением<br>покрытых<br>антителом к пента-<br>His биосенсоров<br>Octet | Антитела mAb-2,<br>которые<br>конкурируют с<br>mAb-1 | Первое mAb (mAb-1),<br>захваченное с<br>применением<br>покрытых<br>антителом к пента-<br>His биосенсоров<br>Octet | Антитела mAb-2,<br>которые<br>конкурируют с<br>mAb-1 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| H4H13301P2                                                                                                        | H4H13302P2                                           | H4H13300P2                                                                                                        | H4H13291P2                                           |
| H4H13302P2                                                                                                        | H4H13301P2                                           |                                                                                                                   | H4H13295P2                                           |
| H4H13290P2                                                                                                        | H4H13306P2                                           |                                                                                                                   | H4H13311P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13316P2                                           |                                                                                                                   | H4H13318P2                                           |
| H4H13306P2                                                                                                        | H4H13290P2                                           |                                                                                                                   | H4H13319P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13316P2                                           | H4H13311P2                                                                                                        | H4H13291P2                                           |
| H4H13316P2                                                                                                        | H4H13290P2                                           |                                                                                                                   | H4H13295P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13306P2                                           |                                                                                                                   | H4H13300P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13325P2                                           |                                                                                                                   | H4H13318P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13331P2                                           |                                                                                                                   | H4H13319P2                                           |
| H4H13325P2                                                                                                        | H4H13316P2                                           | H4H13318P2                                                                                                        | H4H13291P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13331P2                                           |                                                                                                                   | H4H13295P2                                           |
| H4H13312P2                                                                                                        | H4H13331P2                                           |                                                                                                                   | H4H13300P2                                           |
| H4H13291P2                                                                                                        | H4H13295P2                                           |                                                                                                                   | H4H13311P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13300P2                                           |                                                                                                                   | H4H13319P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13311P2                                           | H4H13319P2                                                                                                        | H4H13291P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13318P2                                           |                                                                                                                   | H4H13295P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13319P2                                           |                                                                                                                   | H4H13300P2                                           |
| H4H13295P2                                                                                                        | H4H13291P2                                           |                                                                                                                   | H4H13311P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13300P2                                           |                                                                                                                   | H4H13318P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13311P2                                           | H4H13331P2                                                                                                        | H4H13316P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13318P2                                           |                                                                                                                   | H4H13325P2                                           |
|                                                                                                                   | H4H13319P2                                           |                                                                                                                   | H4H13312P2                                           |

Пример 5. Конструирование биспецифических антител с двумя разными антигенсвязывающими доменами, специфическими в отношении разных эпитопов MET.

В этом примере описано конструирование биспецифических антител, содержащих два разных антигенсвязывающих домена (D1 и D2), где D1 и D2 происходят из разных антител к MET и, следовательно, связываются с отдельными эпитопами на внеклеточном домене MET.

Отдельные антигенсвязывающие домены антитела к MET, применяемые для конструирования биспецифических антител этого примера, были получены из различных бивалентных моноспецифических антител к MET, описанных в примерах 1-3 в настоящем документе. Все описанные в настоящем документе антитела к MET содержат одинаковую ("общую") легкую цепь (содержащую аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи [LCVR] SEQ ID NO: 138 и аминокислотные последовательности CDR [LCDR1, LCDR2 и LCDR3] легкой цепи SEQ ID NO: 140, 142 и 144). Кроме того, все из биспецифических антител, проиллюстрированных в этом примере, содержат плечо "D2", происходящее из иллюстративного антитела к MET H4H13312P2. Таким образом, оба антигенсвязывающих домена (D1 и D2) всех из биспецифических антител, описанных в этом примере, содержат такую общую варибельную область легкой цепи, и все связывающие плечи D2 содержат варибельную область тяжелой цепи из H4H13312P2; однако биспецифические антитела отличаются друг от друга в контексте их варибельных областей тяжелой цепи D1 (HCVR) и CDR тяжелой цепи (HCDR). Компоненты биспецифических антител из этого примера приведены в табл. 5.

Таблица 5. Краткое описание компонентов биспецифического антитела MET × MET

| Биспецифическое антитело | SEQ ID NO: (аминокислотные последовательности) |          |          |          |                                      |          |          |          |
|--------------------------|------------------------------------------------|----------|----------|----------|--------------------------------------|----------|----------|----------|
|                          | Первый антигенсвязывающий домен (D1)           |          |          |          | Второй антигенсвязывающий домен (D2) |          |          |          |
|                          | D1-HCVR                                        | D1-HCDR1 | D1-HCDR2 | D1-HCDR3 | D2-HCVR                              | D2-HCDR1 | D2-HCDR2 | D2-HCDR3 |
| H4H14634D<br>(№ 10)      | H4H13290P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 2                                              | 4        | 6        | 8        | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| H4H14635D<br>(№ 42)      | H4H13295P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 18                                             | 20       | 22       | 24       | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| Биспецифическое антитело | Первый антигенсвязывающий домен (D1)           |          |          |          | Второй антигенсвязывающий домен (D2) |          |          |          |
|                          | D1-HCVR                                        | D1-HCDR1 | D1-HCDR2 | D1-HCDR3 | D2-HCVR                              | D2-HCDR1 | D2-HCDR2 | D2-HCDR3 |
|                          | D1-HCVR                                        | D1-HCDR1 | D1-HCDR2 | D1-HCDR3 | D2-HCVR                              | D2-HCDR1 | D2-HCDR2 | D2-HCDR3 |
| H4H14636D<br>(№ 74)      | H4H13299P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 26                                             | 28       | 30       | 32       | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| H4H14637D<br>(№ 90)      | H4H13301P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 42                                             | 44       | 46       | 48       | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| H4H14638D<br>(№ 106)     | H4H13302P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 50                                             | 52       | 54       | 56       | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| H4H14639D<br>(№ 122)     | H4H13306P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 58                                             | 60       | 62       | 64       | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| H4H14640D<br>(№ 138)     | H4H13309P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 66                                             | 68       | 70       | 72       | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| H4H14641D<br>(№ 187)     | H4H13313P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 90                                             | 92       | 94       | 96       | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| H4H16445D<br>(№ 26)      | H4H13291P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 10                                             | 12       | 14       | 16       | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| H4H16446D<br>(№ 58)      | H4H13300P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 34                                             | 36       | 38       | 40       | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| H4H16447D<br>(№ 154)     | H4H13311P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 74                                             | 76       | 78       | 80       | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| H4H16448D<br>(№ 219)     | H4H13318P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 106                                            | 108      | 110      | 112      | 82                                   | 84       | 86       | 88       |
| H4H16449D<br>(№ 235)     | H4H13319P2                                     |          |          |          | H4H13312P2                           |          |          |          |
|                          | 114                                            | 116      | 118      | 120      | 82                                   | 84       | 86       | 88       |

\* номерное обозначение в скобках под идентификаторами биспецифических антител (например, "№ 10") указывает на номер биспецифического антитела, обозначенный в табл. биспецифических антител MET × MET на фиг. 1.

Пример 6. Полученные на основе метода поверхностного плазменного резонанса показатели аффинности связывания и кинетические константы биспецифических моноклональных антител человека MET × MET.

Показатели аффинности связывания и кинетические константы биспецифических антител MET × MET, сконструированных в соответствии с примером 4 в настоящем документе, определяли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (Biacore 4000 или T-200) при 37°C. Биспецифические антитела, экспрессируемые как IgG4 человека (обозначенные "H4H"), захватывали на поверхности сенсора CM4 или CM5 от Biacore, дериватизированной посредством связывания по аминокислоте с моноклональным антителом мыши к Fc человека (GE, BR-1008-39). Различными концентрациями растворимого мономерного белка MET (hMet.mmh, SEQ ID NO: 152) путем впрыскивания покрывали поверхность с

захваченным биспецифическим антителом к MET × MET при скорости потока 30 или 50 мкл/мин. Связывание анализируемого вещества с захваченным биспецифическим антителом отслеживали в течение 4 или 5 мин, а диссоциацию анализируемого вещества в подвижном буфере HBS-ET (0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активное вещество P20) или PBS-P (0,01 М фосфат натрия, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 0,05% об./об. поверхностно-активное вещество P20) отслеживали в течение 10 мин.

Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли, как описано в примере 3.

Параметры кинетики связывания биспецифических антител к MET с мономерным белком MET (hMET.mmh) показаны в табл. 6.

Таблица 6. Показатели аффинности связывания в анализе Biacore для биспецифических mAb к MET при 37°C

| Связывание при 37°C/формат с захватом антитела |                        |                           |                          |                  |                 |
|------------------------------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------|-----------------|
| Биспецифическое антитело                       | Анализируемое вещество | $k_a$ (Ms <sup>-1</sup> ) | $k_d$ (s <sup>-1</sup> ) | $K_D$ (молярная) | $T_{1/2}$ (мин) |
| H4N14634D                                      | hMet.mmh               | н.д.                      | $\leq 1E-5$              | н.д.             | $\geq 1155$     |
| H4N14635D                                      | hMet.mmh               | н.д.                      | 8,21E-05                 | н.д.             | 140,6           |
| H4N14636D                                      | hMet.mmh               | н.д.                      | $\leq 1E-5$              | н.д.             | $\geq 1155$     |
| H4N14637D                                      | hMet.mmh               | н.д.                      | 3,26E-04                 | н.д.             | 35,4            |
| H4N14638D                                      | hMet.mmh               | н.д.                      | 1,65E-04                 | н.д.             | 70,2            |
| H4N14639D                                      | hMet.mmh               | н.д.                      | 1,63E-04                 | н.д.             | 70,8            |
| H4N14640D                                      | hMet.mmh               | н.д.                      | $\leq 1E-5$              | н.д.             | $\geq 1155$     |
| H4N14641D                                      | hMet.mmh               | н.д.                      | 3,27E-04                 | н.д.             | 35,3            |
| H4N146445D                                     | hMet.mmh               | н.д.                      | 3,93E-04                 | н.д.             | 29,4            |
| H4N146446D                                     | hMet.mmh               | н.д.                      | 1,03E-04                 | н.д.             | 111,8           |
| H4N146447D                                     | hMet.mmh               | н.д.                      | 8,48E-04                 | н.д.             | 13,6            |
| H4N146448D                                     | hMet.mmh               | н.д.                      | 5,92E-04                 | н.д.             | 19,5            |
| H4N146449D                                     | hMet.mmh               | н.д.                      | 2,94E-04                 | н.д.             | 39,3            |

Как показано в табл. 6, биспецифические антитела "MET × MET", описанные в настоящем документе, характеризуются значениями  $T_{1/2}$  вплоть до более чем 1155 мин.

Как показано в табл. 7, скорость диссоциации для биспецифического антитела H4N14639D значительно ниже скоростей диссоциации каждого из его исходных антител, H4N13306P2 и H4N13312P2.

Таблица 7. Показатели аффинности связывания в анализе Biacore для биспецифического mAb к MET и моноспецифических исходных антител при 37°C

| Связывание при 37°C/формат с захватом антитела |                        |                          |                 |
|------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|-----------------|
| Антитело                                       | Анализируемое вещество | $k_d$ (s <sup>-1</sup> ) | $T_{1/2}$ (мин) |
| H4N13306P2                                     | hMet.mmh               | 1,66E-02                 | 0,7             |
| H4N13312P2                                     | hMet.mmh               | 8,40E-03                 | 1,4             |
| H4N14639D                                      | hMet.mmh               | 1,63E-04                 | 70,8            |

Пример 7. Антитела к MET блокируют HGF-опосредованную активацию Met в биологическом анализе с использованием репортерной системы SRE-люциферазы.

Способность антител к MET блокировать опосредованную фактором роста гепатоцитов (HGF) активацию MET изучали в анализе с использованием репортерной системы на основе люциферазы. Фактор роста HGF связывается с внеклеточным доменом его рецептора c-Met (MET), запуская быструю гомодимеризацию и активируя несколько нисходящих сигнальных каскадов. Тестируемые в этом примере антитела к MET представляли собой бивалентные моноспецифические связывающие MET молекулы или "биспецифические" антитела к MET, в которых каждое плечо биспецифического антитела связывается с отличающимся и обособленным эпитопом на MET.

Разработанный клеточный анализ с использованием репортерной системы на основе люциферазы (фиг. 2) применяли для определения способности антител к MET активировать передачу сигнала с участием MET (фиг. 3, панель А; табл. 8, столбцы 3 и 4) и блокировать лиганд-опосредованную активацию MET (фиг. 3, панель В; табл. 8, столбцы 1 и 2). Вкратце, набор SIGNAL™ Lenti SRE Reporter (luc) Kit (SABiosciences, Хильден, Германия) применяли для получения клеток HEK293/SRE-Luc. Были выбраны клетки HEK293 (эмбриональной почки человека), поскольку они эндогенно экспрессируют с-Met. В геноме клеток HEK293/SRE-Luc стабильно встроен зависимый от элемента ответа на сыворотку (SRE) репортерный ген люциферазы (Luc) (см. Dinter et al., PLoS ONE 10(2): e0117774, 2015). Клетки HEK293/SRE-Luc культивировали в DMEM, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой (FBS), пенициллином/стрептомицином/глутамином и 1 мкг/мл пурамицина.

Затем  $2,0 \times 10^5$  клеток HEK293/SRE-Luc высевали в среду для люциферазного анализа в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Кривые зависимости "доза-эффект" для фактора роста гепатоцитов (HGF) получали путем добавления к клеткам серийно разведенного HGF (от 0,01 пМ до 1,0 нМ) и считывания сигнала люциферазы после инкубации при 37°C в течение от четырех до шести часов в отсутствие антител. Для получения кривых ингибирования для антител клетки предварительно инкубировали в течение одного часа при 37°C с серийно разведенными антителами к MET человека (от 1,1 пМ до 200 нМ). Затем добавляли HGF в концентрации 73 или 100 пМ еще на четыре-шесть часов перед считыванием сигнала. Также отдельно оценивали способность антител активировать с-Met в отсутствие лиганда.

Активность люциферазы выявляли с применением системы для люциферазного анализа ONE-Glo™ (Promega, Мадисон, Висконсин) и излучаемый свет измеряли на люминометре Victor или Envision (Perkin Elmer, Шелтон, Коннектикут) и данные выражали в виде относительных световых единиц (RLU). Значения EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> определяли на основе уравнения четырехпараметрической логистической модели по кривой ответа из 12 точек с применением GRAPFIPAD PRISM®. Блокирование HGF в процентах и кратность активации MET (только mAb) регистрировали для наиболее высокой дозы антитела. Результаты показаны в табл. 8.

Таблица 8. Блокирование антителом к MET HGF-опосредованной передачи сигнала и активации SRE-Luc в отсутствие лиганда

|             | Блокирующая активность в отношении HEK293/SRE-Luc (предварительное связывание с mAb в течение 1 ч) |                      | Независимая от лиганда (HGF) активация HEK293/SRE-Luc |                      |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------|----------------------|
| ID антитела | % Ингибирования                                                                                    | IC <sub>50</sub> (M) | Кратность ответа                                      | EC <sub>50</sub> (M) |

## Бивалентные моноспецифические антитела к MET

| <i>Антитела, экспрессируемые с hIgG1-Fc</i> |    |           |      |           |
|---------------------------------------------|----|-----------|------|-----------|
| H1H13301P2                                  | 42 | 3,3E-09   | 1,4  | ND        |
| H1H13316P2                                  | 86 | 4,0E-11   | 1,7  | ND        |
| <i>Антитела, экспрессируемые с hIgG4-Fc</i> |    |           |      |           |
| H4H13312P2                                  | 48 | 7,7E-11   | 10,9 | 1,2E-10   |
| H4H13325P2                                  | 69 | 1,3E-11   | 4,3  | 1,9E-10   |
| H4H13316P2                                  | 74 | 7,8E-12   | 2,3  | 4,7E-11   |
| H4H13302P2                                  | 45 | 1,6E-09   | 1,8  | ND        |
| H4H13313P2                                  | 47 | 2,3E-09   | 1,2  | ND        |
| H4H13301P2                                  | 40 | 1,5E-09   | 1,6  | ND        |
| H4H13295P2                                  | 70 | 5,5E-11   | 2,8  | 3,0E-10   |
| H4H13306P2                                  | 67 | ND        | 9,8  | 1,3E-11   |
| H4H13291P2                                  | 61 | 1,3E-10   | 2,7  | 3,9E-10   |
| H4H13319P2                                  | 67 | 5,2E-11   | 4,8  | 1,8E-10   |
| H4H13309P2                                  | 77 | 2,0E-10   | 9,2  | 3,9E-10   |
| H4H13318P2                                  | 77 | 1,0E-10   | 3,1  | ND        |
| H4H13300P2                                  | 69 | 1,2E-10   | 2,8  | 4,8E-10   |
| H4H13290P2                                  | 56 | < 2,0E-12 | 9,8  | < 2,0E-12 |
| H4H13311P2                                  | 62 | 3,5E-11   | 5,2  | 3,0E-10   |
| H4H13331P2                                  | 75 | < 1,0E-11 | 7,1  | 2,3E-12   |
| H4H13299P2                                  | 51 | ND        | 14,4 | 3,7E-12   |

## Биспецифические антитела к MET (hIgG4-Fc)

|           |    |         |     |         |
|-----------|----|---------|-----|---------|
| H4N14639D | 95 | 2,4E-11 | 1,8 | 5,7E-11 |
| H4N14640D | 89 | 5,2E-10 | 2,5 | 6,8E-09 |
| H4N14634D | 85 | 9,7E-12 | 3,4 | 9,0E-11 |
| H4N14635D | 85 | 1,9E-10 | 2,2 | 1,4E-09 |
| H4N14638D | 79 | 1,1E-09 | 2,6 | 5,9E-09 |
| H4N14641D | 75 | 2,7E-09 | 4,4 | 8,4E-08 |
| H4N14636D | 74 | ND      | 2,8 | 2,8E-10 |
| H4N14637D | 73 | ND      | 2,1 | 4,1E-09 |
| H4N16445D | 81 | 5,2E-10 | 4,3 | 1,0E-09 |
| H4N16446D | 83 | 1,0E-09 | 4,0 | 1,4E-09 |
| H4N16447D | 76 | 8,6E-10 | 5,8 | 1,4E-09 |
| H4N16448D | 87 | 6,2E-10 | 4,3 | 9,1E-10 |
| H4N16449D | 85 | 3,2E-10 | 4,2 | 4,2E-10 |

NT - не тестировали; ND -  $EC_{50}/IC_{50}$  не определяли ввиду наличия кривых несигмоидальной формы или неполного блокирования.

Как представлено в табл. 8, большинство антител ингибировали активацию SRE-репортера со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от  $<2,0$  пМ до приблизительно 1,0 нМ. Несколько иллюстративных моноспецифических бивалентных антител к MET, таких как H4N13306P2 и H4N13309P2, были сильными ингибиторами активации SRE-luc, с процентными значениями ингибирования 67 и 77% соответственно. Биспецифические антитела к MET (MET  $\times$  MET) в целом характеризовались более высокой степенью ингибирования активации SRE-luc. Например, биспецифическое антитело MET  $\times$  MET H4N14639D характеризовалось 95%-ным ингибированием. Кроме того, несколько блокирующих антител были слабо активирующими в отсутствие лиганда, с кратностью ответов в виде активации в диапазоне от 0,8 до 14,4 выше исходных уровней.

Также, как показано на фиг. 3, каждое из бивалентных моноспецифических антител H4N13306P2 и H4N13312P2 активирует сигнальный путь с участием Met в отсутствие лиганда HGF (панель A), и также блокирует HGF-активацию Met (панель B).

Эффект биспецифического антитела MET  $\times$  MET (например, H4N14639D) в отношении HGF-зависимой и HGF-независимой активации MET также оценивали с применением системы HEK293/SRE-Luc. SRE-зависимую активность люциферазы измеряли в клетках HEK293T, обработанных антителами к MET H4N14639D (биспецифическое антитело MET  $\times$  MET), моновалентным антителом к MET и H4N13312P2 на основе исходного антитела H4N14639D при различных концентрациях с целью определения уровня HGF-независимого агонистического действия в отношении MET. В то время как для исходного моноспецифического бивалентного антитела к MET наблюдали агонистическую активность в отношении MET, ни для моновалентного, ни для биспецифического антитела MET  $\times$  MET агонистическую активность в отношении MET не наблюдали (фиг. 4, панель A).

SRE-зависимую активность люциферазы измеряли в клетках FIEK293T, обработанных антителами к MET H4N14639D (биспецифическое антитело MET  $\times$  MET), моновалентным антителом к MET и H4N13312P2 на основе исходного антитела H4N14639D при различных концентрациях с целью определения уровня ингибирования или блокирования HGF-зависимого агонистического действия в отношении MET. В то время как для исходного моноспецифического бивалентного антитела к MET наблюдали некоторую блокирующую активность в отношении HGF, как для моновалентного, так и для биспецифического антитела MET  $\times$  MET наблюдали более высокую степень блокирования HGF (фиг. 4, панель B).

Биспецифическое антитело MET  $\times$  MET блокирует передачу сигнала с участием HGF и характеризуется низкой агонистической активностью в отношении MET.

Пример 8. Антитела к MET ингибируют рост клеток с амплифицированным Met.

Далее выбранные антитела к MET тестировали на предмет их способности ингибировать рост клеток SNU5 с амплифицированным Met. Вкратце,  $2,5 \times 10^3$  клеток карциномы желудка человека (SNU5) высевали в полную среду для выращивания в присутствии антител к MET в концентрациях в диапазоне от 1,5 пМ до 100 нМ. Полная среда для выращивания SNU5 содержала среду Дульбекко в модификации Искова, 10% FBS и пенициллин/стрептомицин/глутамин. Клетки инкубировали в течение 5 дней, и число живых клеток определяли с применением набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CELLTITER-GLO® (CELLTITER-GLO® Luminescent Cell Viability Assay kit) (Promega, Мадисон, Висконсин) в соответствии с инструкциями производителя.

Как представлено в табл. 9, несколько антител к MET, такие как H4N13312P2 и H4N13325P2, блокировали рост SNU5 более чем на 50%, с общими значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 44 до 780 пМ.

На фиг. 5 показан относительный рост клеток SNU5, обработанных различными бивалентными моноспецифическими антителами к MET (т.е. обычными антителами). Подмножество обычных антител к MET ингибирует рост клеток рака желудка SNU5 с амплифицированным Met (фиг. 5). Клетки SNU5 в 96-луночных планшетах обрабатывали каждым антителом при 10 мкг/мл, и рост клеток определяли спустя 5 дней по восстановлению реагента ALAMARBLUE® (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Моновалентное антитело к MET (столбик 2, фиг. 5) получали с применением последовательностей варибельной области тяжелой и легкой цепей MetMab, как изложено в заявке на патент США 7892550 B2, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Обычное антитело 8 представляет собой H4N13306P2, и обычное антитело 11 представляет собой H4N13312P2, которые применяли для конструирования биспецифического антитела MET × MET H4N14639D.

В отдельном анализе роста блокирующую активность биспецифического антитела MET × MET (т.е. H4N14639D) оценивали как у SNU5, так и у линии клеток немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) EBC-1, которая также характеризуется наличием амплифицированного гена Met и сверхэкспрессирует MET (Lutterbach et al., Cancer Res. 67(5): 2081-2088, 2007). Полная среда для выращивания в случае клеток EBC-1 содержала MEM с солями Эрла, 10% фетальную телячью сыворотку (FBS), пенициллин/стрептомицин/глутамин и заменимые аминокислоты для MEM. H4N14369D характеризовалось наиболее сильным ингибированием активности MET в соответствии с показателями анализа с использованием системы SRE-люцифераза. В рассматриваемом эксперименте  $3,0 \times 10^3$  клеток SNU5 или EBC-1 высевали в полную среду для выращивания в присутствии H4N14639D в концентрациях в диапазоне от 15 пМ до 100 нМ. Клетки инкубировали в течение 3 дней при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки фиксировали в 4% формальдегиде и окрашивали 3 мкг/мл красителя Hoechst 33342 для мечения ядер. Изображения получали на IMAGEEXPRESS® Micro XL (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния), и количества ядер определяли с помощью программного обеспечения для анализа изображений METAEXPRESS® (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Фоновое количество ядер у клеток, обработанных 40 нМ дигитонина, вычитали из всех лунок, и жизнеспособность выражали в процентах относительно необработанных контролен. Значения  $EC_{50}$  определяли на основе уравнения четырехпараметрической логистической модели по кривой ответа из 10 точек (GRAPHPAD PRISM®). Значения  $EC_{50}$  и уничтожение клеток в процентах показаны в табл. 9.

Таблица 9. Антитело к MET, блокирующее рост SNU5

| Антитело   | % Ингибирования роста | $IC_{50}$ (М) | Антитело   | % Ингибирования роста | $IC_{50}$ (М) |
|------------|-----------------------|---------------|------------|-----------------------|---------------|
| H4N13312P2 | 69                    | 7,8E-10       | H4N13291P2 | 24                    | ND            |
| H4N13325P2 | 57                    | 4,4E-11       | H4N13319P2 | 23                    | 1,0E-10       |
| H4N13316P2 | 53                    | 1,0E-10       | H4N13309P2 | 22                    | 1,0E-10       |
| H4N13302P2 | 40                    | 1,1E-10       | H4N13318P2 | 18                    | 5,1E-11       |
| H4N13313P2 | 34                    | 4,4E-11       | H4N13300P2 | 16                    | ND            |
| H4N13301P2 | 33                    | 7,4E-11       | H4N13290P2 | 12                    | ND            |
| H1N13301P2 | 33                    | 1,0E-10       | H4N13311P2 | 8                     | ND            |
| H1N13316P2 | 30                    | 2,0E-10       | H4N13331P2 | 5                     | ND            |
| H4N13295P2 | 30                    | ND            | H4N13299P2 | -8                    | ND            |
| H4N13306P2 | 28                    | 7,1E-11       |            |                       |               |

ND -  $IC_{50}$  не определяли ввиду наличия кривых несигмоидальной формы или неполного блокирования.

Как представлено в табл. 10, ниже, биспецифическое антитело MET × MET H4N14639D ингибировало рост клеток EBC-1 и SNU5 на 37 и 40%, и при этом  $IC_{50}$  составляли 0,82 и 0,3 нМ соответственно.

Таблица 10. Биспецифическое антитело к Met блокирует рост EBC-1 и SNU5

| mAb       | $IC_{50}$ (нМ) |      | % Ингибирования роста |      |
|-----------|----------------|------|-----------------------|------|
|           | EBC-1          | SNU5 | EBC-1                 | SNU5 |
| H4N14639D | 0,82           | 0,30 | 37                    | 40   |

Клетки SNU5 (желудка) в 96-луночных планшетах обрабатывали контрольным антителом, моно-

лентным антителом к MET или биспецифическим антителом MET × MET при 0,1, 1 или 10 мкг/мл. Рост клеток определяли спустя 5 дней по восстановлению реагента ALAMARBLUE® (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Биспецифическое антитело MET × MET обеспечивало существенное уменьшение относительного роста клеток SNU5 по сравнению с контрольным и моновалентным антителом (фиг. 6, панель А).

Аналогичным образом оценивали эффект биспецифического антитела MET × MET в отношении роста клеток EBC-1. 2500 клеток EBC-1 высевали в 96-луночный планшет и культивировали в среде Дульбекко, дополненной 10% FBS. Клетки обрабатывали контрольным антителом или биспецифическим антителом MET × MET при 0,1 или 1 мкг/мл, а затем инкубировали с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Спустя 5 дней относительный рост клеток определяли путем измерения восстановления индикаторного красителя ALAMARBLUE® до его высокофлуоресцентной формы на планшет-ридере SPECTRAMAX® M3 (Molecular Devices, LLC, Саннивейл, Калифорния). Результаты показаны в табл. 11 и на фиг. 6, панель В. Биспецифическое антитело MET × MET (H4N14639D) обеспечивало существенное уменьшение относительного роста клеток EBC-1 по сравнению с контрольным антителом (фиг. 6, панель В).

Несколько антител к MET, как бивалентные моноспецифические, так и бивалентные MET × MET, являются сильными ингибиторами активации SRE-Luc и ингибируют рост линий клеток с амплифицированным Met и MET-сверхэкспрессирующих линий клеток.

Таблица 11. Биспецифическое антитело к Met блокирует рост клеток EBC-1

|                      | Относительный рост<br>клеток (n=3) | Стандартное отклонение |
|----------------------|------------------------------------|------------------------|
| Контроль             | 1,000                              | 0,045                  |
| 0,1 мкг/мл H4N14639D | 0,397                              | 0,032                  |
| 1 мкг/мл H4N14639D   | 0,462                              | 0,028                  |

Пример 9. Биспецифическое антитело MET × MET индуцирует незначительную и временную активацию сигнального пути с участием MET в клетках NSCLC NCI-H596.

Эффект биспецифического антитела MET × MET в отношении сигнального пути с участием MET в клетках аденокарциномы легкого человека оценивали *in vitro*.

250000 клеток NCI-H596 высевали в 12-луночный планшет и культивировали в среде RPMI, дополненной 10 % FBS. Клетки обрабатывали фактором роста гепатоцитов (HGF) при 50 нг/мл или биспецифическим антителом MET × MET H4N14639D при 10 мкг/мл в двух повторах. Затем клетки инкубировали в 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Спустя 0, 2, 6 или 18 ч готовили клеточные лизаты, нормализовали содержание белка и осуществляли иммуноблот-анализ. Фосфорилирование MET и фосфорилирование ERK определяли количественно с помощью программы обработки изображений ImageJ (T. Collins, BioTechniques 43: S25-S30, 2007). Уровни фосфорилирования нормализовали к тубулину в качестве контроля нагрузки и выражали в виде кратности изменения относительно контрольной обработки. Результаты приведены в табл. 12.

Таблица 12. Фосфорилирование MET и ERK

| Обработка (часы)    | Фосфо-MET (среднее ± SD) | Фосфо-ERK (среднее ± SD) |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| Контроль (hFc) (18) | 1,0 ± 0,5                | 1,0 ± 0,3                |
| HGF (2)             | 202,3 ± 38,7             | 16,7 ± 1,6               |
| HGF (6)             | 38,9 ± 4,9               | 12,4 ± 3,9               |
| HGF (18)            | 59,2 ± 24,4              | 12,4 ± 0,9               |
| H4N14639D (2)       | 69,7 ± 7,0               | 2,2 ± 0,9                |
| H4N14639D (6)       | 9,9 ± 7,4                | 0,3 ± 0,4                |
| H4N14639D (18)      | 1,4 ± 0,1                | 0,1 ± 0,1                |

Обработка HGF клеток NCI-H596 индуцировала сильную активацию MET и ERK, которая достигала пика через 2 часа и сохранялась спустя 18 ч. Незначительный уровень фосфорилирования MET и ERK выявляли в случае обработки биспецифическим антителом H4N14636D, который возвращался к исходным уровням через 18 или 6 ч соответственно.

Пример 10. Биспецифическое антитело MET × MET индуцирует разрушение MET и ингибирует активацию сигнального пути сильнее, чем моноспецифические антитела, в клетках рака желудка Hs746T.

Эффект биспецифического антитела MET × MET в отношении активности MET клеток карциномы желудка человека оценивали *in vitro*. 250000 клеток карциномы желудка человека Hs746T (H. Smith, J.

Natl. Cancer Inst. 62(2): 225-230, 1979) высевали в 12-луночный планшет и культивировали в модифицированной среде Дульбекко, дополненной 10% FBS. Клетки обрабатывали (1) 5 мкг/мл контрольной молекулы hFc, (2) 5 мкг/мл исходного бивалентного моноспецифического антитела к MET H4N13306P2, (3) 5 мкг/мл исходного бивалентного моноспецифического антитела к MET H4N13312P2, (4) комбинацией 2,5 мкг/мл H4N13306P2 и 2,5 мкг/мл H4N13312P2 или (5) 5 мкг/мл биспецифического антитела MET × MET H4N14639D. Затем клетки инкубировали с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Спустя 18 ч готовили клеточные лизаты, нормализовали содержание белка и осуществляли иммуноблот-анализ. Экспрессию MET, фосфорилирование MET и фосфорилирование ERK определяли количественно с помощью программы обработки изображений ImageJ (T. Collins, BioTechniques 43: S25-S30, 2007). Результаты приведены в табл. 13 и на фиг. 7, панель А, на которой показаны первичные данные иммуноблот-анализа. На панели В фиг. 7 показаны результаты по экспрессии белка MET в клетках, которые обрабатывали биспецифическим антителом MET × MET при 10 мкг/мл в течение 0, 2 или 6 ч. Общие уровни MET в клетках Hs747T со временем снижались после обработки биспецифическим антителом MET × MET. Подобные результаты были получены для линии клеток папиллярной аденокарциномы человека NCI-H820 с амплифицированным геном MET (Bean et al., "MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib," Proc. Natl. Acad. Sci. 2007 Dec 26, 104(52): 20932-20937).

Таблица 13. Относительные уровни белка MET и активация сигнального пути MET/ERK

| Молекула              | Относительный уровень белка MET (среднее ± SD) | Относительный уровень фосфо-MET (среднее ± SD) | Относительный уровень фосфо-ERK (среднее ± SD) |
|-----------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Контроль (hFc)        | 1,00 ± 0,06                                    | 1,00 ± 0,06                                    | 1,00 ± 0,03                                    |
| H4N13306P2            | 0,61 ± 0,09                                    | 0,57 ± 0,02                                    | 0,41 ± 0,03                                    |
| H4N13312P2            | 1,15 ± 0,19                                    | 0,93 ± 0,04                                    | 0,39 ± 0,11                                    |
| H4N13306P2+H4N13312P2 | 1,06 ± 0,02                                    | 1,07 ± 0,10                                    | 1,04 ± 0,23                                    |
| H4N14639D             | 0,41 ± 0,02                                    | 0,20 ± 0,01                                    | 0,04 ± 0,01                                    |

Биспецифическое антитело, H4N14639D, индуцировало разрушение MET сильнее, чем его исходные обычные антитела. Фосфорилирование как MET, так и ERK ингибировалось более эффективно путем обработки H4N14636D, по сравнению с исходными антителами или комбинацией исходных антител.

Клетки рака желудка Hs746T обрабатывали контрольным антителом, биспецифическим антителом MET × MET H4N14639D, исходным антителом к MET H4N13306P2, исходным антителом к MET H4N13312P2 и комбинацией исходных антител 1 и 2, при этом каждое антитело при 10 мкг/мл или комбинация исходных антител при 5 мкг/мл каждое, в течение 18 ч. Экспрессию MET (MET) и активацию сигнального пути (pMET и pErk) определяли с помощью иммуноблоттинга с использованием указанных антител (фиг. 8). Биспецифическое антитело MET × MET ингибирует активацию сигнального пути с участием MET более эффективно, чем его исходные антитела в клетках рака желудка Hs746T.

Пример 11. Биспецифическое антитело MET × MET индуцирует разрушение MET сильнее, чем моноспецифические антитела, в клетках рака легкого NCI-H596.

Оценивали эффект биспецифического антитела MET × MET и исходных бивалентных моноспецифических антител к MET в отношении уровней экспрессии рецептора фактора роста гепатоцитов (HGFR или MET) на поверхности клеток аденосквамозной карциномы легкого человека. 250000 клеток аденосквамозной карциномы легкого человека NCI-H596 высевали в 12-луночный планшет и культивировали в среде RPMI, дополненной 10% FBS. Клетки обрабатывали (1) 5 мкг/мл контрольной молекулы hFc, (2) 5 мкг/мл исходного бивалентного моноспецифического антитела к MET H4N13306P2, (3) 5 мкг/мл исходного бивалентного моноспецифического антитела к MET H4N13312P2, (4) комбинацией 2,5 мкг/мл H4N13306P2 и 2,5 мкг/мл H4N13312P2 или (5) 5 мкг/мл биспецифического антитела MET × MET H4N14639D. Затем клетки инкубировали с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Спустя 18 ч готовили клеточные лизаты, нормализовали содержание белка и осуществляли иммуноблот-анализ. Экспрессию MET определяли количественно с помощью программы обработки изображений ImageJ (T. Collins, BioTechniques 43: S25-S30, 2007). Результаты приведены в табл. 14.

Таблица 14. Относительный уровень белка MET

| Молекула              | Относительный уровень MET |
|-----------------------|---------------------------|
| Контроль (hFc)        | 1 ± 0,03                  |
| H4N13306P2            | 0,50 ± 0,01               |
| H4N13312P2            | 0,35 ± 0,04               |
| H4N13306P2+H4N13312P2 | 0,61 ± 0,04               |
| H4N14639D             | 0,24 ± 0,01               |

Клетки рака легкого NCI-H596 (с мутацией пропуска экзона 14 MET) также обрабатывали контрольными или биспецифическими антителами MET × MET при 10 мкг/мл в течение 2, 6 или 18 ч. Экспрессию MET определяли с помощью иммуноблоттинга (фиг. 9), в котором было показано индуцированное биспецифическим антителом MET × MET разрушение MET с возрастанием продолжительности обработки.

Биспецифическое антитело, H4N14636D, индуцирует разрушение MET сильнее, чем его исходные обычные антитела, в клетках рака легкого NCI-H596.

Пример 12. Биспецифические антитела MET × MET индуцируют разрушение MET и ингибируют активацию сигнального пути сильнее, чем моноспецифические антитела, в клетках рака желудка SNU5.

Оценивали эффект бивалентного моноспецифического антитела к MET и нескольких биспецифических антител MET × MET в отношении уровней экспрессии рецептора фактора роста гепатоцитов (HGFR или MET) на поверхности клеток карциномы желудка. Клетки карциномы желудка человека SNU5 высевали в среду Искова, содержащую 20% FBS и пенициллин-стрептомицин-глутамин. Через 24 ч после высевания клетки обрабатывали контрольным hFc, исходным бивалентным моноспецифическим антителом к MET H4N13312P2 или биспецифическими антителами MET × MET (H4N14634D, H4N14635D, H4N14636D, H4N14637D, H4N14638D, H4N14639D, H4N14640D, H4N14641D) в течение 18 ч. Затем готовили клеточные лизаты и анализировали их с помощью вестерн-блоттинга. Иммуноблоты изучали в отношении MET и тубулина. Уровень экспрессии белка MET определяли количественно и нормализовали относительно тубулина в качестве контроля нагрузки. Результаты представлены в табл. 15 и на фиг. 10, панель В.

Таблица 15. Относительный уровень белка MET

| Молекула       | Относительный уровень MET | Молекула  | Относительный уровень MET |
|----------------|---------------------------|-----------|---------------------------|
| Контроль (hFc) | 1                         | H4N14637D | 0,49                      |
| H4N13312P2     | 0,62                      | H4N14638D | 0,35                      |
| H4N14634D      | 0,45                      | H4N14639D | 0,27                      |
| H4N14635D      | 0,27                      | H4N14640D | 0,18                      |
| H4N14636D      | 0,50                      | H4N14641D | 0,31                      |

Раковые клетки SNU5 обрабатывали контрольным антителом, или биспецифическим антителом MET × MET, или моновалентным антителом к MET при 10 мкг/мл в течение 18 ч, как описано выше. Экспрессию MET (фиг. 10, панели А и В) и активацию сигнального пути (т.е. pMET и pERK; панель А) определяли с помощью иммуноблоттинга с использованием указанных антител. Иммуноблоттограммы показаны на фиг. 10.

Обработка клеток SNU5 биспецифическими антителами MET × MET индуцировала более сильное разрушение MET, чем обработка бивалентным моноспецифическим антителом к MET (H4N13312P2) (Фиг. 10, панель В), моновалентным антителом к MET или контрольным hFc. Обработка клеток SNU5 биспецифическим антителом MET × MET обеспечивала ингибирование нисходящих эффекторов сигнального пути с участием MET. Подобные результаты были получены для линии клеток немелкоклеточного рака легкого NCI-H1993 с амплифицированным геном MET (Kubo et al., "MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors," Int. J. Cancer 2009 Apr 15; 124(8): 1778-1784).

Пример 13. Биспецифическое антитело MET × MET индуцирует разрушение MET, ингибирует активацию сигнального пути и ингибирует рост опухоли сильнее, чем моноспецифические антитела, в клетках EBC-1.

Клетки плоскоклеточной карциномы легкого человека EBC-1 с амплифицированным Met (Lutterbach et al., "Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival," Cancer Res. 2007 Mar 1; 67(5):2081-8) обрабатывали контрольным антителом или 10 мкг/мл биспе-

цифического антитела MET × MET в течение 18 ч, как описано выше. Уровень экспрессии MET и активацию сигнального пути с участием MET, установленные по экспрессии pMET и pEtk, определяли с помощью иммуноблоттинга с использованием указанных антител. Иммуноблоттограммы показаны на фиг. 11.

Обработка клеток EBC-1, которые характеризуются амплификацией гена MET, биспецифическими антителами MET × MET, индуцировала более сильное разрушение MET, чем обработка контрольным антителом. Обработка клеток EBC-1 биспецифическим антителом MET × MET обеспечивала ингибирование нисходящих эффекторов сигнального пути с участием MET.

В другом эксперименте мышам C.B.-17 SCID в бок подкожно имплантировали 5 миллионов клеток EBC-1. После того, как показатели объема опухоли достигали примерно 150 мм<sup>3</sup>, мышам рандомизировали в группы по 6 и обрабатывали два раза в неделю контрольным антителом при 25 мг/кг или биспецифическим антителом MET × MET H4N14639D при 25 мг/кг. Рост опухоли отслеживали в течение 30 дней после имплантации и в динамике измеряли объем опухоли (мм<sup>3</sup>) для каждой экспериментальной группы. Результаты показаны в табл. 16 и на фиг. 12, из которой видно, что биспецифическое антитело MET × MET существенно ингибирует рост опухолей EBC-1.

Таблица 16. Показатели относительного роста опухолей EBC-1

| Обработка          | Рост опухоли (мм <sup>3</sup> ) от начала обработки<br>(среднее ± SEM) |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 25 мг/кг контроль  | 1394 ± 226                                                             |
| 25 мг/кг H4N14639D | 89 ± 47                                                                |

Пример 14. Биспецифическое антитело MET × MET ингибирует *in vitro* рост клеток рака желудка Hs746T сильнее, чем моноспецифические антитела.

Эффект биспецифического антитела MET × MET в отношении роста клеток карциномы желудка человека оценивали *in vitro*. 2500 клеток карциномы желудка человека Hs746T (H. Smith, J. Nat'l. Cancer Inst. 62(2): 225-230, 1979) высевали в 96 планшет и культивировали в модифицированной среде Дульбекко, дополненной 10% FBS. Клетки обрабатывали (1) отдельными бивалентными моноспецифическими антителами к MET (H4N13306P2 или H4N13312P2) при 5 мкг/мл, (2) комбинацией двух бивалентных моноспецифических исходных антител к MET (H4N13306P2 и H4N13312P2) при 2,5 мкг/мл каждое или (3) биспецифическим антителом, содержащим одно связывающее плечо из H4N13306P2, а другое связывающее плечо из H4N13312P2 (H4N14639D), при 5 мкг/мл. Затем клетки инкубировали с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Спустя 5 дней определяли относительный рост клеток путем измерения восстановления индикаторного красителя, ALAMAR BLUE® (ThermoFischer Scientific, Уолтем, Массачусетс), до его высокофлуоресцентной формы на планшет-ридере SPECTRAMAX® M3 (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Возрастающий уровень флуоресценции коррелирует с ростом клеток. в табл. 17 показаны результаты по относительному росту клеток Hs746T для каждой обработки антителом, нормализованные к контрольному росту клеток Hs746T (без обработки). Биспецифическое антитело, H4N14639D, ингибирует пролиферацию клеток Hs746T сильнее, чем его исходные моноспецифические антитела, отдельно или в комбинации.

Таблица 17. Нормализованный рост клеток Hs746T

|                       | Относительный рост<br>клеток (n=3) | Стандартное<br>отклонение |
|-----------------------|------------------------------------|---------------------------|
| Контроль              | 1                                  | 0,133497801               |
| H4N14639D             | 0,647408139                        | 0,019090432               |
| H4N13306P2            | 1,623312821                        | 0,189647479               |
| H4N13312P2            | 0,852680493                        | 0,01728527                |
| H4N13306P2+H4N13312P2 | 1,767720125                        | 0,077445717               |

Клетки рака желудка Hs746T обрабатывали контрольным антителом, биспецифическим антителом MET × MET H4N14639D, исходным антителом к MET H4N13306P2, исходным антителом к MET H4N13312P2 и комбинацией исходных антител 1 и 2, каждое антитело при 2 мкг/мл. Рост клеток определяли спустя 5 дней по восстановлению реагента ALAMAR BLUE® (фиг. 13, панель А). Биспецифическое антитело MET × MET ингибировало рост клеток по сравнению с исходными антителами, применяемыми отдельно или в комбинации, и ингибировало активацию сигнального пути с участием MET более эффективно, чем его исходные антитела, в клетках рака желудка Hs746T.

Клетки рака желудка Hs746T в 96-луночных планшетах обрабатывали 25 мкг/мл контрольного антитела, 1, 10 или 25 мкг/мл моновалентного антитела к MET или 1, 10 или 25 мкг/мл биспецифического антитела MET × MET. Рост клеток рака желудка Hs746T определяли спустя 5 дней по восстановлению реагента ALAMARBLUE® (фиг. 13, панель В). Биспецифическое антитело MET × MET сильно ингиби-

рует рост клеток с амплифицированным Met.

Пример 15. Биспецифическое антитело MET × MET не индуцирует рост клеток рака легкого NCI-H596 *in vitro*.

Эффект биспецифического антитела MET × MET в отношении роста клеток немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) человека (NCI-H596) оценивали *in vitro*. 10000 клеток аденокарциномы легкого NCI-H596 (Nair et al., J. Nat'l. Cancer Inst. 86(5): 378-383, 1994) высевали в 96-луночные планшеты на слой 0,66% агара в среде, дополненной 1% фетальной телячьей сывороткой (FBS). Клетки культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 1% FBS с 0,3% агарозой. Клетки обрабатывали (1) отдельными исходными бивалентными моноспецифическими антителами к MET (H4N13306P2 или H4N13312P2) при 5 мкг/мл, (2) комбинацией двух исходных бивалентных моноспецифических антител к MET (H4N13306P2 и H4N13312P2) при 2,5 мкг/мл каждое, (3) биспецифическим антителом, содержащим одно связывающее плечо из H4N13306P2, а другое связывающее плечо из H4N13312P2 (H4N14639D), при 5 мкг/мл, или (4) 100 нг/мл фактора роста гепатоцитов (HGF). Затем клетки инкубировали с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Спустя две недели определяли относительный рост клеток путем измерения восстановления индикаторного красителя, ALAMAR BLUE® (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, Массачусетс), до его высокофлуоресцентной формы на планшет-ридере SPECTRAMAX® M3 (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Возрастающий уровень флуоресценции коррелирует с ростом клеток. в табл. 18 и на фиг. 14 показаны результаты по относительному росту клеток NCI-H596 для каждой обработки антителом, нормализованные к контрольному росту клеток NCI-H596 (без обработки). Обработка клеток рака легкого NCI-H596 HGF приводила в результате к сильной индукции роста в мягком агаре. Биспецифическое антитело MET × MET (MM на фиг. 14) H4N14639D не приводило к существенному изменению роста по сравнению с клетками, обработанными контролем. Незначительную индукцию роста клеток наблюдали в случае каждого исходного бивалентного моноспецифического антитела H4N13306P2 (M1) или H4N13312P2 (M2) отдельно, или в комбинации (H4N13306P2 и H4N13312P2) (M1M2).

Таблица 18. Нормализованный рост клеток NCI-H596

|                       | Относительный рост<br>клеток (n=3) | Стандартное отклонение |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------|
| Контроль              | 1                                  | 0,030074808            |
| H4N14639D             | 1,070339237                        | 0,075103746            |
| H4N13306P2            | 2,9593578                          | 0,337877264            |
| H4N13312P2            | 1,686580346                        | 0,145670753            |
| H4N13306P2+H4N13312P2 | 1,693724668                        | 0,168651046            |
| HGF                   | 7,87655937                         | 0,46057617             |

Пример 16. Биспецифическое антитело MET × MET ингибирует *in vitro* рост клеток рака желудка SNU5 сильнее, чем моноспецифические антитела.

Эффект биспецифического антитела MET × MET в отношении роста клеток карциномы желудка человека оценивали *in vitro*. 2500 клеток карциномы желудка человека SNU5 (Ku and Park, Cancer Res. Treat. 37(1): 1-19, 2005) высевали в 96-луночный планшет и культивировали в среде Дульбекко в модификации Искова, дополненной 20% FBS. Клетки обрабатывали (1) отдельными бивалентными моноспецифическими антителами к MET (H4N13306P2 или H4N13312P2) при 5 мкг/мл, (2) комбинацией двух бивалентных моноспецифических антител к MET (H4N13306P2 и H4N13312P2) при 2,5 мкг/мл каждое или (3) биспецифическим антителом, содержащим одно связывающее плечо из H4N13306P2, а другое связывающее плечо из H4N13312P2 (H4N14639D), при 5 мкг/мл. Затем клетки инкубировали с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Спустя 5 дней определяли относительный рост клеток путем измерения восстановления индикаторного красителя, ALAMAR BLUE® (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, Массачусетс), до его высокофлуоресцентной формы на планшет-ридере SPECTRAMAX® M3 (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Возрастающий уровень флуоресценции коррелирует с ростом клеток. в табл. 19 показаны результаты по относительному росту клеток SNU5 для каждой обработки антителом, нормализованные к контрольному росту клеток SNU5 (без обработки). Биспецифическое антитело, H4N14639D, ингибирует пролиферацию клеток SNU5 сильнее, чем его исходные моноспецифические антитела.

Таблица 19. Нормализованный рост клеток SNU5

|                       | Относительный рост клеток (n=3) | Стандартное отклонение |
|-----------------------|---------------------------------|------------------------|
| Контроль              | 1                               | 0,070814765            |
| H4N14639D             | 0,271100069                     | 0,01324024             |
| H4N13306P2            | 0,766317547                     | 0,061930288            |
| H4N13312P2            | 0,431990234                     | 0,033183065            |
| H4N13306P2+H4N13312P2 | 0,331287005                     | 0,012042949            |

Пример 17. Биспецифическое антитело MET × MET индуцирует регрессию опухолевого ксенотрансплантата Hs746T.

Оценивали эффект биспецифического антитела MET × MET в отношении карциномы желудка человека в модели с использованием иммунодефицитных мышей. Мышам CB-17 SCID в бок подкожно имплантировали три миллиона клеток карциномы желудка человека Hs746T (Bancroft et al., J. Immunol. 137(1): 4-9, 1986). После того как показатели объема опухоли достигали примерно 200 мм<sup>3</sup>, мышей рандомизировали в группы по шесть и обрабатывали два раза в неделю контрольным антителом при 25 мг/кг или биспецифическим антителом MET × MET (H4N14639D) при 25 мг/кг. Рост опухоли отслеживали в течение 16 дней после имплантации для контрольной группы, в случае если обработанные контролем опухоли достигали предельных согласно протоколу размеров. В случае группы обработки H4N14639D рост опухоли отслеживали в течение 30 дней после имплантации.

Обработка опухолей биспецифическим антителом MET × MET приводила к индукции регрессии размера опухоли за 21 день, по сравнению с началом обработки. В случае обработанных контролем опухолей наблюдали приблизительно 12-кратное среднее увеличение объема за 16 дней роста (табл. 20). Объем опухоли в динамике, в случае которого наблюдали регрессию опухоли Hs746T благодаря биспецифическому антителу MET × MET, показан на фиг. 15.

Таблица 20. Рост опухоли желудка Hs746T

| Антитело (мг/кг) | Рост опухоли (мм <sup>3</sup> ) с момента начала обработки (среднее ± SEM) |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Контроль (10)    | 1164 ± 138                                                                 |
| H4N14639D (25)   | -215 ± 8,3                                                                 |

Пример 18. Биспецифическое антитело MET × MET индуцирует регрессию опухолевого ксенотрансплантата SNU5.

Оценивали эффект биспецифического антитела MET × MET в отношении карциномы желудка человека в модели с использованием иммунодефицитных мышей. Мышам CB-17 SCID в бок подкожно имплантировали десять миллионов клеток карциномы желудка человека SNU5. После того как показатели объема опухоли достигали примерно 500 мм<sup>3</sup>, мышей рандомизировали в группы по пять и обрабатывали два раза в неделю контрольным антителом при 10 мг/кг или биспецифическим антителом MET × MET (H4N14639D) либо при 1 мг/кг, либо при 10 мг/кг. Рост опухоли отслеживали в течение 81 дня после имплантации, в случае если обработанные контролем опухоли достигали предельных согласно протоколу размеров.

В случае опухолей у мышей, обработанных 1 или 10 мг/кг антитела MET × MET, было продемонстрировано среднее уменьшение размера, составляющее приблизительно 95% или 98% соответственно. В случае обработанных контролем опухолей наблюдали приблизительно 12-кратное среднее увеличение объема с момента начала обработки (табл. 21).

Таблица 21. Рост опухоли желудка SNU5

| Антитело (мг/кг) | Рост опухоли (мм <sup>3</sup> ) с момента начала обработки (среднее ± SEM) |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Контроль (10)    | 1123 ± 194                                                                 |
| H4N14639D (1)    | -477 ± 43                                                                  |
| H4N14639D (10)   | -492 ± 18                                                                  |

Имплантированные подкожно опухоли SNU5 дважды в неделю обрабатывали контрольным антителом, моновалентным антителом к MET при 1 или 10 мг/кг или биспецифическим антителом MET × MET при 1 или 10 мг/кг. Сильную и устойчивую регрессию опухолей SNU5 с амплифицированным Met (т.е. уменьшение объема опухоли) наблюдали со временем у мышей, обработанных биспецифическим антителом MET × MET (фиг. 16, панель А). Из опухолей по окончании исследования выделяли белок, и с помощью иммуноблоттинга определяли экспрессию MET и активацию сигнального пути по фосфорилиро-

ванию MET (экспрессии pMET). У обработанных MET × MET мышей (в опухолях) наблюдали уменьшение уровней экспрессии MET и pMET по сравнению с контролями (фиг. 16, панель B). Биспецифическое антитело MET × MET является сильным ингибитором опухолей с амплификацией гена MET.

Пример 19. Биспецифическое антитело MET × MET индуцирует регрессию опухолевого ксенотрансплантата U87-MG.

Оценивали эффект биспецифического антитела MET × MET в отношении глиобластомы человека в модели с использованием иммунодефицитных мышей. Мышам CB-17 SCID в бок подкожно имплантировали пять миллионов клеток глиобластомы человека U87-MG (Vordermark and Brown, Int. J. Radiation Biol. 56(4): 1184-1193, 2003). Ксенотрансплантатные модели глиобластомы U87-MG находятся под контролем аутокринной передачи сигнала с участием HGF. После того как показатели объема опухоли достигали примерно 100 мм<sup>3</sup>, мышей рандомизировали в группы по шесть и обрабатывали контрольным антителом или биспецифическим антителом MET × MET (H4N14639D). Каждой мыши два раза в неделю вводили 25 мг/кг антитела (контрольного или MET × MET). Рост опухоли отслеживали в течение 29 дня после имплантации, в случае если обработанные контролем опухоли достигали предельных согласно протоколу размеров.

В случае опухолей у мышей, обработанных антителом MET × MET, было продемонстрировано среднее уменьшение размера, составляющее приблизительно 38%, тогда как в случае обработанных контролем опухолей наблюдали приблизительно 19-кратное среднее увеличение объема за 29 дней роста (табл. 22). Объем опухоли в динамике, в случае которого наблюдали регрессию опухоли U87-MG благодаря биспецифическому антителу MET × MET, показан на фиг. 17.

Таблица 22. Рост опухоли при глиобластоме

| Антитело<br>(мг/кг) | Рост опухоли (мм <sup>3</sup> ) с момента<br>начала обработки (среднее ± SEM) |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Контроль (25)       | 1777 ± 98                                                                     |
| H4N14639D (25)      | -38 ± 18                                                                      |

Пример 20. Биспецифическое антитело MET × MET ингибирует рост опухолевого ксенотрансплантата U118-MG.

Оценивали эффект биспецифического антитела MET × MET в отношении глиобластомы человека в модели с использованием иммунодефицитных мышей. Ксенотрансплантатные модели глиобластомы U118-MG находятся под контролем аутокринной передачи сигнала с участием HGF. Мышам CB-17 SCID в бок подкожно имплантировали пять миллионов клеток глиобластомы человека U118-MG (Olopade et al., Cancer Research 52: 2523-2529, 1992). После того как показатели объема опухоли достигали примерно 100 мм<sup>3</sup>, мышей рандомизировали в группы по шесть и обрабатывали контрольным антителом или биспецифическим антителом MET × MET (H4N14639D). Каждой мыши два раза в неделю вводили 25 мг/кг антитела (контрольного или MET × MET). Рост опухоли отслеживали в течение 72 дней после имплантации.

Антитело к MET ингибировало рост опухоли на 99% в течение 72-дневного периода времени (табл. 23).

Таблица 23. Рост опухоли при глиобластоме

| Антитело<br>(мг/кг) | Рост опухоли (мм <sup>3</sup> ) с<br>момента начала обработки<br>(среднее ± SEM) | % Подавления роста<br>опухоли по сравнению с<br>контролем |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Контроль (25)       | 1228 ± 123                                                                       | -                                                         |
| H4N14639D (25)      | 11 ± 18                                                                          | 99,1                                                      |

В другом эксперименте имплантированные подкожно глиобластомы U118-MG у мышей обрабатывали дважды в неделю 25 мг/кг контрольного антитела, моновалентного антитела к MET или биспецифического антитела MET × MET. В динамике измеряли объем опухоли (мм<sup>3</sup>) для каждой экспериментальной группы. Результаты показаны на фиг. 18, из которой видно, что биспецифическое антитело MET × MET ингибирует рост опухолей U118-MG.

Пример 21. Синтез майтанзиноидов.

Майтанзин-3-N-метил-L-аланин-N-Ме-бета-аланин-карбамил-(п-амино)бензил-цитруллин-валин-адилоил-сукцинат (соединение 1 на фиг. 20) синтезировали из соединения 2 (фиг. 19), как описано ниже.

Майтанзин-3-N-метил-L-аланин-Fmoc-N-Ме-бета-аланин (соединение 3, фиг. 19). Деацетил-майтанзин (соединение 2, фиг. 19, 0,433 г, 0,666 ммоль), Fmoc-N-Ме-бета-Ala (0,434 г, 1,33 ммоль) и HATU (0,757 г, 1,99 ммоль) взвешивали в сухую колбу, растворяли в безводном DMF (9 мл) и обрабатывали 4-метилморфолином (0,300 мл, 2,73 ммоль). Колбу герметично закрывали крышкой с резиновой мембраной, продували аргоном и реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 3 дня смесь выпаривали до масла, растворяли в ацетонитриле и воде и очищали с помощью флэш-

хроматографии на колонке 275 г C18 с силикагелем (30-90% ацетонитрил в воде в течение 20 мин, 0,05% уксусная кислота в обоих фазах). С помощью лиофилизации фракций продукта получали титульное соединение в виде белого твердого вещества. Неочищенный продукт очищали на колонке 80 г с силикагелем (EtOAc - 5:5:1 EtOAc:DCM:MeOH в течение 17 мин). Чистые фракции объединяли, выпаривали и сушили в вакууме в течение ночи с получением титульного соединения в виде белого твердого вещества (0,424 г, 66%). MS (ESI, пол.): рассчитано для  $C_{51}H_{61}ClN_4O_{12}$ , 956,4; найдено 956,9 (M+H), 979,0 (M+Na), 939,0 (M-H<sub>2</sub>O+H).

N-трет-бутоксикарбонил-N-метил-бета-аланиновый сложный эфир янтарной кислоты (соединение 4, фиг. 19). Титульное соединение получали из коммерческого Вос-N-Ме-бета-Ala-OH с помощью способа, хорошо известного в данной области (ср. Widdison et al., J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4401). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 3,62 (bm, 2H), 2,88 (m, 9H), 1,47 (s, 9H).

Майтанзин-3-N-метил-L-аланин-Вос-N-Ме-бета-аланин (соединение 5, фиг. 19).

Способ А: продукт из предшествующей стадии (соединение 4, фиг. 19, 0,453 г, 1,51 ммоль) и деацетил-майтанзин (соединение 2, фиг. 19, 0,304 г, 0,468 ммоль) растворяли в смеси ацетонитрил:вода 3:1 (8 мл), обрабатывали 1М водным NaHCO<sub>3</sub> (0,5 мл) и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 18 ч. По завершении реакции, что определяли с помощью TLC, реакционную смесь затем перемешивали с соевым раствором в течение 10 мин и трижды экстрагировали этилацетатом (EtOAc). Объединенные органические слои затем сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, и фильтрат концентрировали и сушили в вакууме до состояния сиропа золотистого цвета, который очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на 20 г картридже с силикагелем (0-10% MeOH в EtOAc в течение 15 мин) с получением титульного соединения в виде белого твердого вещества (0,084 г, 43%). MS (ESI, пол.): рассчитано для  $C_{41}H_{59}ClN_4O_{12}$ , 834,4; найдено 835,2 (M+H), 857,2 (M+Na), 817,4 (M-H<sub>2</sub>O+H).

Способ В: Вос-N-Ме-бета-Ala-OH (0,294 г, 1,45 ммоль) растворяли в безводном DMF (5 мл), обрабатывали дифенилфосфинатом пентафторфенила (FDPP, 0,555 г, 1,44 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 30 мин. Затем смесь переносили в колбу большего размера, содержащую смесь деацетил-майтанзина (соединение 2, фиг. 19, 0,462 г, 0,711 ммоль) и диизопропилэтиламина (DIEA, 0,250 мл, 1,44 ммоль) в безводном DMF (7 мл), колбу герметично закрывали крышкой с резиновой мембраной, продували аргоном и реакционную смесь снова перемешивали при температуре окружающей среды. Через 24 ч реакционную смесь концентрировали в вакууме до состояния масла, растворяли в этилацетате (EtOAc, 2 мл) и очищали на 40 г картридже с силикагелем (EtOAc - 5:5:1 EtOAc:DCM/MeOH в течение 15 мин) с получением титульного соединения в виде бледно-желтого твердого вещества (0,468 г, 79%). MS (ESI, пол.): рассчитано для  $C_{41}H_{59}ClN_4O_{12}$ , 834,4; найдено 857,2 (M+Na), 817,2 (M-H<sub>2</sub>O+H).

Майтанзин-3-N-метил-L-аланин-N-Ме-бета-аланин (соединение 6, фиг. 19).

Способ А: майтанзин-N-Ме-L-Ala-Вос-N-Ме-бета-Ala (соединение 5, фиг. 19, 0,464 г, 0,555 ммоль) растворяли в смеси ацетонитрил/вода/трифторуксусная кислота 3:1:1 (7 мл), колбу герметично закрывали крышкой с резиновой мембраной, продували аргоном и реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 24 ч, затем закрывали и хранили при -20°C в течение 3 дней. Неочищенную реакционную смесь нагревали до температуры окружающей среды в течение 2 ч, в течение непродолжительного времени концентрировали в вакууме, очищали на 100 г колонке C18 RediSep Gold (20-80% ацетонитрил в воде в течение 25 мин, 0,1% TFA в обоих растворителях) и объединенные чистые фракции частично выпаривали при температуре окружающей среды, замораживали на бане с сухим льдом и лиофилизировали с получением титульного соединения в виде бледно-желтого твердого вещества (0,295 г, 63%). MS (ESI, пол.): рассчитано для  $C_{36}H_{51}ClN_4O_{10}$ , 734,3; найдено 735,7 (M+H), 1471,3 (2M+H).

Способ В: майтанзин-N-Ме-L-Ala-Fмос-бета-Ala (соединение 3, фиг. 19, 0,422 г, 0,441 ммоль) растворяли в 5% пиперидине в DMF (6,00 мл, 3,04 ммоль), реакционную колбу герметично закрывали крышкой с резиновой мембраной, продували аргоном и смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 3 ч реакцию завершали с помощью LCMS, поэтому реакционную смесь концентрировали в вакууме, герметично накрывали и хранили при -20°C в течение ночи. Неочищенный продукт нагревали до температуры окружающей среды, обрабатывали ацетонитрилом и 10% водн. уксусной кислотой (3 мл каждого) и очищали с помощью флэш-хроматографии на 275 г колонке C18 с силикагелем (10-90% ацетонитрил в воде в течение 20 мин, 0,05% уксусная кислота в обоих растворителях). С помощью лиофилизации фракций продукта получали титульное соединение в виде белого твердого вещества. Твердое вещество трижды растирали в порошок с сухим диэтиловым эфиром, фильтровали, твердые вещества вымывали с фритты с помощью DCM и фильтрат выпаривали и сушили в вакууме с получением титульного соединения в виде белого твердого вещества (0,311 г, 89%). MS (ESI, пол.): рассчитано для  $C_{36}H_{51}ClN_4O_{10}$ , 734,3; найдено 735,0 (M+H).

Майтанзин-3-N-метил-L-аланин-N-Ме-бета-аланин-карбамил-(п-амино)бензил-цитруллин-валин-Fмос (соединение 7, фиг. 20).

Стадия 1: продукт из предшествующей стадии (соединение 6, фиг. 19, 0,310 г, 0,390 ммоль), 1-гид-

рокси-7-азабензотриазол (НОАТ, 0,164 г, 1,20 ммоль), бикарбонат натрия (0,138 г, 1,64 ммоль) и Fmoc-валин-цитруллин-(п-амино)бензил-(п-нитрофенил)карбонат (0,595 г, 0,776 ммоль, полученный с помощью способа, известного в данной области, ср. Gangwar et al., патент США 7714016 B2) растворяли в безводном DMF (10 мл), реакционную колбу герметично закрывали крышкой с резиновой мембраной, продували аргоном и смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 24 ч реакционную смесь частично выпаривали в вакууме до объема приблизительно 2-3 мл, обрабатывали 10% водн. уксусной кислотой и водой (приблизительно 1 мл каждого), растворяли в ацетонитриле (приблизительно 6 мл) и очищали с помощью флэш-хроматографии на 275 г колонке C18 с силикагелем (30-90% ацетонитрил в воде в течение 20 мин, 0,05% уксусная кислота в обоих растворителях). С помощью частичного выпаривания, замораживания и лиофилизации получали титульное соединение в виде белого твердого вещества (0,362 г, 68%). MS (ESI, пол.): рассчитано для  $C_{70}H_{88}ClN_9O_{17}$ , 1361,6; найдено 1362,1 (M+H), 1384,1 (M+Na), 1344,1 (M-H<sub>2</sub>O+H).

Стадия 2: продукт из предшествующей стадии (0,360 г, 0,264 ммоль) растворяли в 5% пиперидине в DMF (7 мл), реакционную колбу герметично закрывали крышкой с резиновой мембраной, продували аргоном и смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 3 ч реакционную смесь выпаривали в вакууме, остаток обрабатывали 10% водн. уксусной кислотой (2 мл), растворяли в ацетонитриле (4 мл) и очищали с помощью флэш-хроматографии на 275 г колонке C18 с силикагелем (10-70% ацетонитрил в воде в течение 20 мин, 0,05% уксусная кислота в обоих растворителях). Чистые фракции объединяли, хранили при -20°C в течение ночи, частично выпаривали в вакууме при 25-30°C, замораживали на сухом льду и лиофилизировали в течение 6 дней с получением титульного соединения в виде бледно-желтого твердого вещества (0,303 г, 95%). MS (ESI, пол.): рассчитано для  $C_{15}H_{78}ClN_9O_{15}$ , 1139,5; найдено 1140,1 (M+H), 1162,0 (M+Na).

Майтанзин-3-N-метил-L-аланин-N-Ме-бета-аланин-карбамил-(п-амино)бензил-цитруллин-валин-адипиновая кислота (соединение 8, фиг. 20). Продукт из предшествующей стадии (соединение 7, фиг. 20, 0,205 г, 0,171 ммоль), адипиновую кислоту (0,258 г, 1,77 ммоль) и 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин (EEDQ, 0,215 г, 0,869 ммоль) растворяли в сухом DCM (10 мл) и безводном метаноле (5 мл), реакционную колбу герметично закрывали крышкой с резиновой мембраной, продували аргоном и смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 21 ч реакционную смесь выпаривали в вакууме, остаток растворяли в нескольких миллилитрах смеси ацетонитрил/вода и очищали с помощью флэш-хроматографии на 150 г колонке C18 с силикагелем (20-80% ацетонитрил в воде в течение 17 мин, 0,05% уксусная кислота в обоих растворителях). С помощью частичного выпаривания, замораживания и лиофилизации чистых фракций в течение 18 ч получали титульное соединение в виде белого твердого вещества (0,140 г, 65%). MS (ESI, пол.): рассчитано для  $C_{61}H_{86}ClN_9O_{18}$ , 1267,6; найдено 1268,9 (M+H), 1290,9 (M+Na).

Майтанзин-3-N-метил-L-аланин-N-Ме-бета-аланин-карбамил-(п-амино)бензил-цитруллин-валин-адипоил-сукцинат (соединение 1, фиг. 20). Продукт из предшествующей стадии (соединение 8, фиг. 20, 0,061 г, 0,048 ммоль), N-гидроксисукцинимид (0,063 г, 0,55 ммоль) и N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид (EDC-HCl, 0,071 г, 0,37 ммоль) растворяли в сухом DCM (7 мл), реакционную колбу герметично закрывали крышкой с резиновой мембраной, продували аргоном и смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 5 дней реакционную смесь выпаривали в вакууме, остаток растворяли в нескольких мл смеси ацетонитрил/вода и очищали с помощью флэш-хроматографии на 100 г колонке C18 с силикагелем (30-90% ацетонитрил в воде в течение 15 мин, 0,05% уксусная кислота в обоих растворителях). С помощью частичного выпаривания, замораживания и лиофилизации наиболее чистых фракций продукта в течение 18 часов получали титульное соединение в виде белого твердого вещества (0,044 г, 67%). MS (ESI, пол.): рассчитано для  $C_{65}H_{89}ClN_{10}O_{20}$ , 1364,6; найдено 1365,7 (M+H), 1387,7 (M+Na), 1347,7 (M-H<sub>2</sub>O+H). <sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц; CDCl<sub>3</sub>): δ 7,56 (d, J=8,3 Гц, 2H), 7,20 (d, J=8,7 Гц, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,71 (m, 1H), 6,62 (d, J=10,0 Гц, 1H), 6,39 (dd, J=15,1, 11,3 Гц, 1H), 5,68 (dd, J=15,3, 9,1 Гц, 1H), 5,38-5,32 (m, 1H), 5,03 (t, J=15,1 Гц, 1H), 4,88 (d, J=12,3 Гц, 1H), 4,73 (d, J=11,3 Гц, 1H), 4,61 (dd, J=9,1, 3,6 Гц, 1H), 4,26 (d, J=7,0 Гц, 1H), 4,17 (t, J=7,1 Гц, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,61 (d, J=11,7 Гц, 1H), 3,57 (d, J=12,4 Гц, 1H), 3,46 (d, J=9,1 Гц, 2H), 3,33 (s, 3H), 3,27 (t, J=6,9 Гц, 1H), 3,17-3,07 (m, 5H), 2,97 (dd, J=16,6, 9,9 Гц, 1H), 2,88 (d, J=11,7 Гц, 3H), 2,84 (s, 4H), 2,77 (s, 2H), 2,66 (s, 2H), 2,62 (t, J=4,8 Гц, 2H), 2,56 (d, J=13,1 Гц, 1H), 2,32 (t, J=6,6 Гц, 2H), 2,15 (d, J=14,0 Гц, 1H), 2,10 (q, J=6,8 Гц, 1H), 1,92 (s, 4H), 1,75 (m, 5H), 1,61 (s, 3H), 1,52 (s, 3H), 1,27 (d, J=6,3 Гц, 3H), 1,22 (dt, J=12,7, 6,3 Гц, 6H), 0,95 (t, J=5,9 Гц, 7H), 0,78 (s, 3H).

DM1 синтезировали в виде одного диастереоизомера на основе процедур, описанных в WO 2015/031396 (например, пример 2, абзац [00106]), включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Пример 22. Конъюгация антител и определение характеристик конъюгатов.

Конъюгация антител.

Антитела (H4N14639D, H4N13312P, H4N14635D и изотопический контроль; 10-20 мг/мл) в 50 мм HEPES, 150 мм NaCl, pH 8,0 и 10-15% об./об. DMA подвергали конъюгации с 5-6 кратным избытком

SMCC-диастереоизомер DM1, полученным, как описано в примере 21 (майтаниноид А) или мйтанин-3-N-метил-L-аланин-N-Ме-бета-аланин-карбамил-(п-амино)бензил-цитруллин-валин-адипоил-сукцинатом (соединение 1, фиг. 20) (майтаниноид В) в течение 2 ч при температуре окружающей среды. Конъюгаты очищали с помощью эксклюзионной хроматографии или экстенсивной ультрафильтрации и подвергали стерилизующей фильтрации. Концентрации белка определяли с помощью УФ-спектрального анализа. С помощью эксклюзионной HPLC было установлено, что все применяемые конъюгаты были >90% мономерными, и с помощью RP-HPLC было установлено, что имело место <1% неконъюгированной нагрузки с линкером. Все конъюгированные антитела анализировали с помощью УФ-анализа в отношении значений загрузки линкера нагрузкой в соответствии с Hamblett et al. (American Association for Cancer Research. 2004 Oct 15;10(20):7063-70) и/или по разности масс, исходных по сравнению с таковыми после конъюгации. Соотношения антитела и нагрузки представлены в табл. 24.

Таблица 24. Процентный выход и соотношения нагрузки и антитела для каждого из конъюгатов антитела и лекарственного средства

| Антитело                                         | Выход (%) | DAR (MS) | DAR (УФ) |
|--------------------------------------------------|-----------|----------|----------|
| H4H14639D-майтаниноид А                          | 60        | 3,8      | 3,7      |
| H4H14639D-майтаниноид В                          | 50        | 2,4      | 2,4      |
| H4H13312P-майтаниноид А                          | 60        | 4,1      | 4,1      |
| H4H13312P-майтаниноид В                          | 50        | 2,3      | 2,5      |
| Изотипический контроль<br>REGN1945-майтаниноид В | 70        | 2,3      | 2,5      |
| Изотипический контроль<br>REGN1945-майтаниноид А | 80        | 3,7      | 3,7      |

Определение характеристик конъюгатов с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией.

Для определения загрузки линкер-нагрузки на антителе конъюгаты подвергали дегликозилированию и анализировали с помощью LC-MS.

Для проведения анализа 50 мкг конъюгата разбавляли водой milli-Q до конечной концентрации 1 мг/мл. 10 мкл раствора PNGазы F [раствор PNGазы F получали путем добавления 150 мкл исходного раствора PNGазы F (New England Biolabs, номер по каталогу P0704L) и 850 мкл воды milli-Q и тщательного перемешивания] добавляли к разбавленному раствору конъюгата, а затем инкубировали при 37°C в течение ночи. В LC-MS (Waters Synat G2-Si) вводили 5 мкл каждого образца, и элюировали градиентом 20-40% со скоростью подвижной фазы 0,1 мл/минуту в течение 25 мин (подвижная фаза А: 0,1% об./об. FA в H<sub>2</sub>O; подвижная фаза В: 0,1% об./об. FA в ацетонитриле). LC-разделение осуществляли на колонке Acquity BEH C4 от Waters (1,0 × 50 мм, 1,7 мкм) при 80°C.

Масс-спектрометрические спектры подвергали деконволюции с применением программного обеспечения Masslynx, и соотношение лекарственного средства и антитела (DAR) рассчитывали с применением следующих уравнений.

1. Относительная процентная доля (%) лекарственного средства (Dn) по распределению интенсивности пиков (PI)

$$Dn\% = PIn / \Sigma(Pi0 + Pi1 + Pi2 + \dots + PIn) \times 100$$

(n=0, 1, 2, 3, ..., i).

2. Расчет среднего DAR

$$DAR = \Sigma(1 \times D1\% + 2 \times D2\% + 3 \times D3\% + \dots + i \times Di\%)$$

Пример 23. Полученные на основе метода поверхностного плазменного резонанса показатели аффинности связывания и кинетические константы конъюгированных моноклональных (моноспецифических и биспецифических) антител человека к MET.

Равновесные константы диссоциации (значения K<sub>D</sub>) для связывания MET с антителами к MET, конъюгированными либо с MCC-диастереоизомером DM1 (майтаниноид А), либо с мйтанин-3-N-метил-L-аланин-N-Ме-бета-аланин-карбамил-(п-амино)бензил-цитруллин-валин-адипоил-сукцинатом (соединение 1, фиг. 20) (майтаниноид В), определяли с применением анализа на основе явления поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени с использованием биосенсора на приборе Biacore 2000. Поверхность сенсора Biacore дериватизировали посредством связывания по аминокислотной группе с моноклональным антителом мыши к Fc человека (GE Healthcare, №BR-1008-39) для захвата ADC на ос-

новые антитела к MET и исходных немодифицированных антител, экспрессируемых с константными областями человека. Исследования связывания Biotin осуществляют в HEPES-буферном солевом растворе (HBS)-подвижном буфере EP (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активное вещество P20). MET человека получали в собственной лаборатории, с экспрессией C-концевой тус-тус-гексагистидиновой метки (hMET-mmh). Путем впрыскивания разных концентраций (3-кратное разведение) hMET-mmh (в диапазоне от 30 до 1,1 nM), приготовленных в подвижном буфере HBS-EP, покрывали поверхность с захваченными ADC на основе антител к MET или антителом при скорости потока 40 мкл/мин. Связывание hMET-mmh с каждым из захваченных ADC и моноклональных антител отслеживали в течение 4 мин. Затем в течение 6 мин в подвижном буфере HBS-EP отслеживали диссоциацию hMET-mmh. Поверхность с антителами к Fc человека восстанавливали путем кратковременного впрыскивания 20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Все эксперименты по кинетике связывания осуществляли при 25°C.

Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем аппроксимации кривых сенсограмм, записываемых в режиме реального времени, к модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0c. Все сенсограммы были дважды приведены к референтным значениям путем вычитания сигнала сенсограммы введения буфера из сенсограммы соответствующего анализируемого вещества, с устранением тем самым артефактов, связанных с диссоциацией антитела с поверхности захвата. Константы диссоциации ( $K_D$ ) для равновесного связывания и полупериоды диссоциации ( $t_{1/2}$ ) рассчитывали исходя из кинетических констант скорости как

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a} \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Параметры кинетики связывания для конъюгированных с майтанзиноидом А или майтанзиноидом В моноспецифических и биспецифических антител к Met показаны ниже в табл. 25, при этом некоторые эксперименты проводили в двух повторях.

Таблица 25. Показатели аффинности связывания в анализе Biotin для конъюгированных моно- и биспецифических моноклональных антител к MET при 25°C

| Антитело                  | Захваченные mAb (OE) | Связанный антиген (OE) | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | $K_D$ (M) | $t_{1/2}$ (мин) |
|---------------------------|----------------------|------------------------|--------------|-------------|-----------|-----------------|
| H4N13312P2                | 148,1±1,2            | 12,3                   | 2,59E+05     | 5,35E-03    | 2,07E-08  | 2,2             |
| H4N13312P2                | 142,7±0,3            | 12,1                   | 1,87E+05     | 4,85E-03    | 2,59E-08  | 2,4             |
| H4N13312P2-майтанзиноид А | 232,6±0,5            | 11,9                   | 1,82E+05     | 7,18E-03    | 3,94E-08  | 1,6             |
| H4N13312P2-майтанзиноид В | 263,0±2,6            | 10,9                   | 1,80E+05     | 6,32E-03    | 3,51E-08  | 1,8             |
| H4N14639D                 | 283,6±4,4            | 82,8                   | 5,90E+05     | 1,56E-03    | 2,64E-09  | 7,4             |
| H4N14639D-майтанзиноид А  | 207,7±0,8            | 55,8                   | 4,95E+05     | 1,81E-03    | 3,65E-09  | 6,4             |
| H4N14639D-майтанзиноид В  | 227,5±0,4            | 55,4                   | 4,83E+05     | 1,87E-03    | 3,86E-09  | 6,2             |
| H4N14639D-майтанзиноид А  | 284,0±1,1            | 62,8                   | 4,70E+05     | 1,76E-03    | 3,74E-09  | 6,6             |
| H4N14639D-майтанзиноид В  | 268,7±0,7            | 72,8                   | 4,91E+05     | 1,45E-03    | 2,95E-09  | 8,0             |

Пример 24. Показатели активности конъюгатов антитела к MET и лекарственного средства (ADC) in vitro.

Для определения относительной активности в отношении уничтожения клеток конъюгатов антитела к MET и лекарственного средства (ADC), описанных в настоящем документе, проводили анализы уничтожения клеток с использованием нескольких линий клеток, экспрессирующих различные уровни эндогенного MET. Линии клеток EBC-1 (Riken Cell Bank; № RBRC-RCB1965), MKN-45 (JCRB; № JCRB0254), NCI-H1993 (ATCC; № CRL-5909) и J.RT3 (ATCC; № TIB-153) поддерживали в RPMI + 10% FBS + 1X пенициллин/стрептомицин/L-глутамин (P/S/G), SNU-5 (ATCC; № CRL-5973) поддерживали в среде Искова + 10% FBS + 1X P/S/G, Hs746t (ATCC; № HTB-135) и HEK293 (ATCC; № 003041) поддерживали в DME + 10% FBS + 1X P/S/G, MDA-MB-231 (ATCC; № HTB-26) поддерживали в среде Лейбо-вица L-15 + 10% FBS + 1X P/S/G + 1X заменимые аминокислоты (NEAA) без CO<sub>2</sub>, U87MG (ATCC; № HTB-14) поддерживали в MEM с солями Эрла + 15% FBS + 1X P/S/G + 1X NEAA, T47D (ATCC; № HTB-133) поддерживали в RPMI 1640 + 10% FBS + 1X P/S/G + 10 mM HEPES + 1 mM пируват натрия + 10

мкг/мл бычьего инсулина и A549 (ATCC; №CCL-185) поддерживали в питательной среде F-12 в модификации Kaighn (HAM's F-12K) + 10% FBS + 1X P/S/G.

Изначально относительное связывание антител к MET оценивали с использованием неконъюгированных антител H4N14635D, H4N14639D и H4N13312P2 во всей панели линий клеток посредством проточной цитометрии. Вкратце,  $1 \times 10^6$  клеток инкубировали с 10 мкг/мл H4N14635D, H4N14639D, H4N13312P2 или изотипическим контрольным антителом (REGN1945) в течение 30 мин на льду в PBS + 2% FBS (буфер для FACS). После одной промывки буфером для FACS клетки инкубировали с 10 мкг/мл конъюгированного с Alexa647 вторичным антителом к Ig человека (Jackson ImmunoResearch, № 109-606-170) в течение 30 мин на льду. После одной дополнительной промывки буфером для FACS образцы фиксировали с помощью Cytofix (BD Biosciences, № 554655), фильтровали с буфером для FACS и исследовали на проточном цитометре iQue (Intellicyte). Данные по средней интенсивности флуоресценции (MFI) определяли с применением программного обеспечения FlowJo (FlowJo LLC). Связывание в FACS выражали в виде кратности связывания по MFI по сравнению с уровнями для изотипического контроля, и результаты приведены в табл. 26. Относительное связывание для трех антител к MET было сопоставимым в каждой линии клеток, и находилось в диапазоне от 447-кратного до 7-кратного по сравнению с изотипическими контролями. Какое-либо выявляемое связывание любого из 3 тестируемых антител к MET в случае клеток T47D, HEK293 или J.RT3 не наблюдали.

Для измерения *in vitro* цитотоксичности ADC на основе антител к MET оценивали количество ядер через 3 или 6 дней после обработки ADC. Вкратце, клетки высевали в 96-луночные покрытые коллагеном планшеты (Greiner, VWR; № 82050-812) в концентрации 750-3000 клеток/луночку в полной среде для выращивания, и выращивали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Для получения кривых жизнеспособности клеток серийно разведенные ADC, неконъюгированные антитела или свободные нагрузки добавляли к клеткам в конечных концентрациях в диапазоне от 100 до 0,01 нМ (исходя из концентрации токсина) и инкубировали в течение 3 или 6 дней при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки обрабатывали 3 мкг/мл красителя для ядер Hoechst 33342 (Invitrogen, №H3570), с фиксацией при этом 4% формальдегидом. Изображения получали на ImageXpress micro XL (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния), и количества ядер определяли с помощью программного обеспечения для анализа изображений MetaXpress (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Фоновое количество ядер у клеток, обработанных 40 нМ дигитонина, вычитали из всех лунок, и жизнеспособность выражали в процентах относительно необработанных контролей. Значения EC<sub>50</sub> определяли на основе уравнения четырехпараметрической логистической модели по кривой ответа из 10 точек (GraphPad Prism). Условие отсутствия обработки для каждой кривой зависимости "доза-эффект" также включено в анализ, и представлено как наиболее низкая доза. Значения EC<sub>50</sub> и уничтожение клеток в процентах показаны в табл. 27 и 28.

Как представлено в табл. 27, конъюгат антитела к MET и лекарственного средства H4N14639D-майтаниноид А специфическим образом уменьшает жизнеспособность клеток в случае клеток EBC-1, SNU-5, MKN-45, NCI-H1993 и Hs746t с амплифицированным Met со значениями EC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,35 нМ до 0,96 нМ. Процентная доля уничтоженных клеток (макс. % уничтожения) находилась в диапазоне от 73% до 100%. H4N14639D-майтаниноид А также обеспечивал специфическое уничтожение 84% клеток A549 со значением EC<sub>50</sub> 13,91 нМ. Значения EC<sub>50</sub> для H4N14639D-майтаниноид А превышали 37 нМ в случае линий клеток с низким уровнем экспрессии (MDA-MB-231 и U87MG) и без экспрессии (T47D, HEK293 и J.RT3). Аналогично, конъюгированное изотипическое контрольное антитело обеспечивало уничтожение всех линий клеток со значениями EC<sub>50</sub> более 35 нМ. Версия DM1 с диметилдисульфидом (MeS-DM1) обеспечивала уничтожение всех тестируемых линий со значениями EC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,07 до 2,86 нМ.

В отдельном эксперименте три антитела к MET (H4N14639D, H4N14635D и H4N13312P2) конъюгировали с нагрузками в виде мйтаниноида А или мйтаниноида В, и оценивали *in vitro* цитотоксичность среди клеток EBC-1, Hs746t, A549 и T47D через 6 дней после обработки. Как представлено в табл. 28, все конъюгаты антитела к MET и лекарственного средства обеспечивали сильное и специфическое уменьшение жизнеспособности клеток среди Met-положительных клеток, со значениями EC<sub>50</sub> менее 10 пМ в случае клеток EBC-1, 0,82 нМ в случае клеток Hs746T и 3,5 нМ в случае клеток A549. Процентная доля уничтоженных клеток превышала 95% в случае клеток EBC-1, превышала 86% в случае клеток Hs746T и превышала 72% в случае клеток A549. Клетки T47D (Met-отрицательные) не подвергались специфическому уничтожению ADC на основе антител к MET. Аналогично, конъюгированные изотипические контрольные антитела обеспечивали уменьшение жизнеспособности клеток среди всех тестируемых линий клеток со значениями EC<sub>50</sub> более 5 нМ в случае клеток EBC-1, более 33 нМ в случае клеток Hs746T и более 90 нМ в случае клеток A549 и T47D. Неконъюгированное H4N14639D обеспечивало уменьшение жизнеспособности клеток среди клеток EBC-1, Hs746t и A549, однако с меньшей процентной долей, по сравнению с конъюгированными антителами. Неконъюгированные H4N14635D и H4N13312P2 практически не влияли на жизнеспособность ни в одной из тестируемых линий клеток. Версия DM1 с диметилдисульфидом (MeS-DM1) обеспечивала уничтожение всех тестируемых линий со значениями EC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,12 до 1,39 нМ. В отличие от этого M24 (нагрузка, высвобождаемая из

майтанзиноид В), обеспечивала уничтожение клеток со значениями  $IC_{50} > 100$  нМ.

Таблица 26. Связывание в FACS неконъюгированных антител к MET с линиями опухолевых клеток

| Линия клеток | Связывание в FACS (кратность MFI по сравнению с изотипическим контролем) |                  |                                      |           |           |            |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|------------|
|              | Неокрашенные                                                             | Только вторичные | REGN1945<br>(Изотипический контроль) | H4H14635D | H4H14639D | H4H13312P2 |
| EBC-1        | 0,7                                                                      | 0,6              | 1                                    | 263       | 252       | 147        |
| SNU-5        | 1                                                                        | 1,2              | 1                                    | 477       | 454       | 235        |
| MKN-45       | 1                                                                        | 0,8              | 1                                    | 183       | 156       | 94         |
| NCI-H1993*   | 1                                                                        | 2                | ND                                   | ND        | 188       | 188        |
| Hs746t       | 0,8                                                                      | 1,1              | 1                                    | 39        | 34        | 27         |
| MDA-MB-231   | 3                                                                        | 5,6              | 1                                    | 11        | 12        | 7          |
| U87MG        | 1,6                                                                      | 1,7              | 1                                    | 18        | 18        | 10         |
| T47D         | 1                                                                        | 0,9              | 1                                    | 1,3       | 1         | 1,4        |
| A549         | 0,7                                                                      | 0,5              | 1                                    | 12        | 10        | 7          |
| HEK293       | 0,2                                                                      | 0,2              | 1                                    | 1,8       | 1,8       | 1,2        |
| J.RT3        | 0,8                                                                      | 1                | 1                                    | 1,6       | 1,4       | 1,1        |

\*Выражено в виде кратности по сравнению с неокрашенными для NCI-H1993.

Таблица 27.  $IC_{50}$  и макс. % уничтожения ADC на основе антител к MET в 3-дневном in vitro анализе цитотоксичности

| Конъюгат антитела и лекарственного средства | EBC-1          |                     | SNU-5          |                     | MKN-45         |                     | NCI-H1993      |                     |
|---------------------------------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
|                                             | $IC_{50}$ (нМ) | Макс. % уничтожения | $IC_{50}$ (нМ) | Макс. % уничтожения | $IC_{50}$ (нМ) | Макс. % уничтожения | $IC_{50}$ (нМ) | Макс. % уничтожения |
| DM1 (MeS-DM1)                               | 2,22           | 90                  | 1,22           | 99                  | 2,73           | 85                  | 2,86           | 81                  |
| H4H14639D                                   | 0,82           | 37                  | 0,30           | 40                  | ND             | 0                   | ND             | 0                   |
| H4H14639D-майтанзиноид А                    | 0,96           | 89                  | 0,40           | 100                 | 0,35           | 86                  | 0,41           | 94                  |
| REGN1945-майтанзиноид А                     | 35,06          | 65                  | >100           | 14                  | >100           | 39                  | 49,42          | 68                  |

| Конъюгат антитела и лекарственного средства | Hs746t         |                     | MDA-MB-231     |                     | U87MG          |                     |
|---------------------------------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
|                                             | $IC_{50}$ (нМ) | Макс. % уничтожения | $IC_{50}$ (нМ) | Макс. % уничтожения | $IC_{50}$ (нМ) | Макс. % уничтожения |
| DM1 (свободное лекарственное средство)      | 1,46           | 81                  | 1,53           | 89                  | 0,61           | 89                  |
| H4H14639D                                   | 0,42           | 7                   | >100           | 6                   | >100           | 6                   |
| H4H14639D-майтанзиноид А                    | 0,56           | 73                  | >100           | 48                  | 100            | 58                  |
| REGN1945-майтанзиноид А                     | 33,22          | 44                  | >100           | 42                  | 94,71          | 58                  |

| Конъюгат антитела и лекарственного средства | T47D                  |                     | A549                  |                     | HEK293                |                     | J.RT3                 |                     |
|---------------------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
|                                             | IC <sub>50</sub> (нМ) | Макс. % уничтожения | IC <sub>50</sub> (нМ) | Макс. % уничтожения | IC <sub>50</sub> (нМ) | Макс. % уничтожения | IC <sub>50</sub> (нМ) | Макс. % уничтожения |
| DM1 (свободное лекарственное средство)      | 1,33                  | 91                  | 2,56                  | 97                  | 0,15                  | 95                  | 0,07                  | 100                 |
| H4H14639D                                   | >100                  | 0                   | >100                  | 37                  | ND                    | 0                   | >100                  | 5                   |
| H4H14639D-майтаниноид А                     | >100                  | 6                   | 13,91                 | 84                  | 40,90                 | 65                  | 37,82                 | 59                  |
| REGN1945-майтаниноид А                      | >100                  | 1                   | >100                  | 63                  | >100                  | 44                  | 39,79                 | 70                  |

Таблица 28. IC<sub>50</sub> и макс. % уничтожения ADC на основе антител к MET в 6-дневном *in vitro* анализе цитотоксичности

| Конъюгат антитела и лекарственного средства     | EBC-1                 |                     | Hs746t                |                     | T47D                  |                     | A549                  |                     |
|-------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
|                                                 | IC <sub>50</sub> (нМ) | Макс. % уничтожения | IC <sub>50</sub> (нМ) | Макс. % уничтожения | IC <sub>50</sub> (нМ) | Макс. % уничтожения | IC <sub>50</sub> (нМ) | Макс. % уничтожения |
| DM1 (MeS-DM1)                                   | 0,12                  | 62                  | 1,39                  | 88                  | 0,24                  | 96                  | 0,49                  | 90                  |
| M24 (высвобождаемая из мایتаниноида В нагрузка) | >100                  | 32                  | >100                  | 10                  | >100                  | 0                   | >100                  | 10                  |
| H4H14639D                                       | 0,37                  | 66                  | 0,44                  | 35                  | >100                  | 0                   | 0,17                  | 29                  |
| H4H14639D-майтаниноид А                         | 0,27                  | 97                  | 0,82                  | 87                  | >100                  | 3                   | 6,01                  | 86                  |
| H4H14639D-майтаниноид В                         | 0,01                  | 96                  | 0,86                  | 90                  | >100                  | 0                   | 3,54                  | 80                  |
| H4H13312P2                                      | >100                  | 30                  | >100                  | 0                   | >100                  | 0                   | >100                  | 7                   |
| H4H13312P2-майтаниноид А                        | 0,39                  | 95                  | 1,59                  | 87                  | >100                  | 6                   | 18,30                 | 89                  |
| H4H13312P2-майтаниноид В                        | 0,07                  | 95                  | 0,89                  | 90                  | >100                  | 3                   | 27,10                 | 85                  |
| H4H14635D                                       | >100                  | 11                  | >100                  | 7                   | >100                  | 7                   | >100                  | 0                   |
| H4H14635D-майтаниноид А                         | 0,76                  | 96                  | 1,76                  | 86                  | >100                  | 92                  | 6,78                  | 91                  |
| H4H14635D-майтаниноид В                         | 0,26                  | 96                  | 2,32                  | 89                  | >100                  | 2                   | 21,40                 | 72                  |
| REGN1945                                        | >100                  | 0                   | >100                  | 0                   | >100                  | 0                   | >100                  | 1                   |
| REGN1945-майтаниноид А                          | 28,08                 | 93                  | 33,06                 | 76                  | >100                  | 14                  | 93,40                 | 49                  |
| REGN1945-майтаниноид В                          | 5,01                  | 97                  | >100                  | 0                   | >100                  | 1                   | >100                  | 15                  |

Пример 25. Эффективность в отношении клеток рака желудка *in vivo*.

Мышам C.B.-17 SCID в бок подкожно имплантировали 3 миллиона клеток рака желудка Hs746T. После того как показатели объема опухоли достигали примерно 150 мм<sup>3</sup>, мышей рандомизировали в группы по 6 и обрабатывали контрольными антителами REGN1945-майтаниноидом В или REGN1945-майтаниноидом А при 10 мг/кг или H4H14639D-майтаниноидом А или H4H14639D-майтаниноидом В при 3 или 10 мг/кг. Все антитела вводили три раза с частотой один раз в неделю. Рост опухоли отслеживали в течение 37 дней после имплантации.

Оценивали эффект H4H14639D-майтаниноида А или H4H14639D-майтаниноида В в отношении роста ксенотрансплантатов опухолей человека у иммунодефицитных мышей, и результаты показаны в табл. 29. Опухоли, обработанные контрольными антителами, REGN1945-майтаниноидом В или REGN1945-майтаниноидом А, вырастали до достижения предельных согласно протоколу размеров за 20 дней. Опухоли, обработанные H4H14639D-майтаниноидом А при 3 мг/кг, вырастали до достижения предельных согласно протоколу размеров за 27 дней. Рост опухолей, обработанных H4H14639D-майтаниноидом В при 3 мг/кг, ингибировался на протяжении всего эксперимента. Обработка опухолей H4H14639D-майтаниноидом А или H4H14639D-майтаниноидом В при 10 мг/кг приводила к индукции регрессии размера опухоли по сравнению с началом обработки.

Таблица 29. Рост опухоли у мышей SCID, обработанных конъюгатами на основе антител к Met-C

| Антитело (мг/кг)                    | Рост опухоли (мм <sup>3</sup> ) с момента начала обработки (среднее $\pm$ SD) |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| REGN1945-майтаниноид А<br>10 мг/кг  | 1244 $\pm$ 199                                                                |
| REGN1945-майтаниноид В<br>10 мг/кг  | 1345 $\pm$ 121                                                                |
| H4N14639D-майтаниноид А<br>3 мг/кг  | 832 $\pm$ 15                                                                  |
| H4N14639D-майтаниноид А<br>10 мг/кг | -148 $\pm$ 0,17                                                               |
| H4N14639D-майтаниноид В<br>3 мг/кг  | 19 $\pm$ 147                                                                  |
| H4N14639D-майтаниноид В<br>10 мг/кг | -137 $\pm$ 0                                                                  |

Пример 26. Эффективность в отношении клеток рака легкого *in vivo*.

Мышам С.В.-17 SCID в бок подкожно имплантировали 5 миллионов клеток рака легкого EBC1. После того как показатели объема опухоли достигали примерно 170 мм<sup>3</sup>, мышей рандомизировали в группы по 6 и обрабатывали контрольным антителом REGN1945-майтаниноидом В при 15 мг/кг или H4N14639D-майтаниноидом В при 2,5, 5, 10 или 15 мг/кг. Антитела вводили два раза с частотой один раз в неделю. Рост опухоли отслеживали в течение 73 дней после имплантации.

Оценивали эффект H4N14639D в отношении роста ксенотрансплантатов опухолей человека у иммунодефицитных мышей. Опухоли, обработанные контрольным антителом, REGN1945-майтаниноидом В, вырастали до достижения предельных согласно протоколу размеров за 24 дня (согласно протоколам IACUC требовалось умерщвлять животных с опухолями, диаметр которых превышал 2 см, примерно 1500 мм<sup>3</sup>). Обработка опухолей H4N14639D-майтаниноидом В при 2,5, 5, 10 или 15 мг/кг приводила к индукции регрессии размера опухоли по сравнению с началом обработки. Результаты показаны в табл. 30.

Таблица 30. Рост опухоли у мышей SCID, обработанных конъюгатами на основе антител к Met-C

| Антитело (мг/кг)                     | Рост опухоли (мм <sup>3</sup> ) с момента начала обработки (среднее $\pm$ SD) |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| REGN1945-майтаниноид В<br>15 мг/кг   | 1106 $\pm$ 165                                                                |
| H4N14639D-майтаниноид В<br>2,5 мг/кг | -142 $\pm$ 24                                                                 |
| H4N14639D-майтаниноид В<br>5 мг/кг   | -163 $\pm$ 0                                                                  |
| H4N14639D-майтаниноид В<br>10 мг/кг  | -173 $\pm$ 0                                                                  |
| H4N14639D-майтаниноид В<br>15 мг/кг  | -179 $\pm$ 0                                                                  |

Пример 26. Эффективность в отношении опухолей NSCLC от пациентов *in vivo*.

Голым мышам nu/nu в бок подкожно имплантировали Met-экспрессирующие опухоли NSCLC CTG-0165 от пациента. После того как показатели объема опухоли достигали примерно 150 мм<sup>3</sup>, мышей рандомизировали в группы по 6 и обрабатывали контрольными антителами REGN1945-майтаниноидом В или REGN1945-майтаниноидом А при 10 мг/кг или H4N14639D-майтаниноидом А или H4N14639D-майтаниноидом В при 3 или 10 мг/кг. Все антитела вводили три раза с частотой один раз в неделю. Рост опухоли отслеживали в течение 61 дней после имплантации.

Оценивали эффект H4N14639D-майтаниноида А или H4N14639D-майтаниноида В в отношении роста ксенотрансплантатов опухолей человека у иммунодефицитных мышей. Опухоли, обработанные контрольными антителами, REGN1945-майтаниноидом А или REGN1945-майтаниноидом В, вырастали до достижения предельных согласно протоколу размеров за 27 дней. Рост опухолей, обработанных H4N14639D-майтаниноидом А или H4N14639D-майтаниноидом В при 3 мг/кг, ингибировался в течение 27 дней. Обработка опухолей H4N14639D-майтаниноидом А или H4N14639D-майтаниноидом В при 10 мг/кг приводила к индукции регрессии размера опухоли по сравнению с началом обработки. Данные представлены в табл. 31.

Таблица 31. Рост опухоли у голых мышей, обработанных конъюгатами на основе антител к Met-C

| Антитело (мг/кг)                    | Рост опухоли (мм <sup>3</sup> ) с момента начала обработки (среднее $\pm$ SD) |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| REGN1945-майтаниноид А<br>10 мг/кг  | 967 $\pm$ 136                                                                 |
| REGN1945-майтаниноид В<br>10 мг/кг  | 1537 $\pm$ 373                                                                |
| H4N14639D-майтаниноид А<br>3 мг/кг  | 154 $\pm$ 227                                                                 |
| H4N14639D-майтаниноид А<br>10 мг/кг | -141 $\pm$ 2,3                                                                |
| H4N14639D-майтаниноид В<br>3 мг/кг  | 517 $\pm$ 362                                                                 |
| H4N14639D-майтаниноид В<br>10 мг/кг | -145 $\pm$ 2                                                                  |

Пример 27. Картирование эпитопов на основе водородно-дейтериевого обмена (H/D) для антител к MET H4N13312P2, H4N13306P2 и H4N14639D, связывающихся с MET человека.

Проводили эксперименты для определения конкретных областей эктодомена рецептора фактора роста гепатоцитов человека (SEQ ID NO: 155: изоформа 1 MET человека (Uniprot ID: P08581), экспрессируемая с тус-тус-гексагистиридиновой (.mmh) меткой, далее называемая hMet), с которым взаимодействуют антитела к MET H4N13312P2, H4N13306P2 и H4N14639D. H4N13312P2 и H4N13306P2 представляют собой бивалентные моноспецифические антитела к MET; H4N14639D представляет собой биспецифическое антитело, содержащее две тяжелые цепи, связывающиеся с обособленными эпитопами на Met, каждая из H4N13312P2 и H4N13306P2 соответственно, и универсальную легкую цепь. (См. пример 5).

Картирование эпитопов на основе водородно-дейтериевого обмена (H/D) с масс-спектрометрией (HDX-MS) использовали для определения эпитопов, связываемых упоминаемыми выше антителами. Общее описание способа HDX изложено, например, в Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; и Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Процедура эксперимента.

Для картирования с помощью HDX эпитопа(ов) на hMET, связываемого(ых) антителами к MET H4N13312P2, H4N13306P2 и H4N14639D, отдельные антитела раздельно ковалентно связывали на гранулах NHS-активированной сефарозы (NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow beads) (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания). Для подтверждения эпитопов, связываемых антителами к MET, использовали два способа "свободный антиген" и "в составе комплекса", описанные ниже.

В случае экспериментального условия "свободный антиген" hMET дейтерировали в течение 5,0 мин или 10,0 мин в буфере PBS, приготовленном с D<sub>2</sub>O. Дейтерированный антиген связывали на гранулах с антителом H4N13312P2 или H4N13306P2 посредством кратковременной инкубации, а затем элюировали из гранул с использованием охлажденного на льду буфера для остановки реакции с низким pH. Образец после элюции вручную загружали в систему Waters H/DX-MS, состоящую из интегрированного расщепления на пептиды с возможностью отслеживания в режиме реального времени, захвата, 9,0-минутного разделения с помощью жидкостной хроматографии (LC) и сбора MS-данных с помощью системы Synapt G2-SL.

В случае экспериментального условия "в составе комплекса" hMET сперва связывали на гранулах с H4N13312P2 или H4N13306P2, а затем дейтерировали в течение 5,0 мин или 10,0 мин посредством инкубации в буфере PBS, приготовленном с D<sub>2</sub>O. Дейтерированный hMET элюировали и анализировали с помощью системы Waters H/DX-MS, упоминаемой выше.

Для идентификации пептидов hMET после расщепления пепсином данные LC-MS<sup>E</sup> для недейтерированного образца обрабатывали и проводили поиск в отношении MET человека с применением программного обеспечения ProteinLynx Global Server (PLGS) от Waters. Идентифицированные пептиды импортировали в программу DynamX 3.0 и фильтровали по следующим двум критериям: 1) минимальное количество продуктов на аминокислоту равняется 0,3; 2) граничное число повторений в файле равняется 3,0. Затем с помощью программного обеспечения DynamX 3.0 автоматически рассчитывали разницу в поглощении дейтерия для каждого идентифицированного пептида между условиями "свободный антиген" и "в составе комплекса" для обоих промежутков времени дейтерирования 5 и 10 мин. Отдельный соответствующий изотопам пик для каждого пептида, полученный с помощью программного обеспечения DynamX для расчета значений центроидов, также изучали вручную для обеспечения точности расчета поглощения дейтерия.

В целом, дельты значений для дейтерирования выше 0,2 применяли в качестве точки отсечки для определения конкретного эпитопа связывания.

Результаты.

С применением расщепления пепсином с возможностью отслеживания в режиме реального времени

с использованием колонки с пепсином Enzymate™ ВЕН (2,1 × 30 мм, 5 мкм) от Waters, в сочетании со сбором данных 9,0-минутной LC-MS<sup>E</sup>, в общей сложности были воспроизводимо идентифицированы 162 расщепленных пепсином пептида MET человека с отслеживаемым поглощением дейтерия для экспериментов с обоими условиями "свободный антиген" и "в составе комплекса" при применении гранул с антителом H4N13312P2. Эти пептиды характеризуются 55,7% перекрытием последовательностей. Было обнаружено, что среди всех этих пептидов только пять характеризуются значительно сниженной степенью поглощения дейтерия после связывания H4N13312P2 ("в составе комплекса") по сравнению с дейтерированием антигена отдельно ("свободный антиген"). Значения центроидов этих пяти пептидов в обоих условиях эксперимента проиллюстрированы в табл. 32. Область, соответствующая остаткам 192-204, перекрывающаяся для этих пяти пептидов, исходя из данных HDX была определена как эпитоп связывания для антитела H4N13312P2.

Таблица 32. Пептиды hMET после расщепления пепсином со сниженной степенью поглощения дейтерия после связывания с H4N13312P2

| Остатки hMET | 5 мин дейтерирования           |                                |       | 10 мин дейтерирования          |                                |       |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|--------------------------------|--------------------------------|-------|
|              | «В составе комплекса»          | «Свободный антиген»            | Δ     | «В составе комплекса»          | «Свободный антиген»            | Δ     |
|              | Центроид массы MH <sup>+</sup> | Центроид массы MH <sup>+</sup> |       | Центроид массы MH <sup>+</sup> | Центроид массы MH <sup>+</sup> |       |
| 192-202      | 1351,25                        | 1351,83                        | -0,58 | 1351,39                        | 1352,27                        | -0,88 |
| 192-203      | 1482,34                        | 1482,94                        | -0,60 | 1482,50                        | 1483,40                        | -0,90 |
| 192-204      | 1629,84                        | 1630,71                        | -0,87 | 1630,01                        | 1631,10                        | -1,09 |
| 193-202      | 1252,07                        | 1252,79                        | -0,72 | 1252,25                        | 1253,08                        | -0,83 |
| 193-203      | 1383,22                        | 1383,79                        | -0,57 | 1383,40                        | 1384,17                        | -0,77 |

Для эксперимента HDX, осуществляемого с применением гранул с антителом H4N13306P2, в общей сложности были воспроизводимо идентифицированы 98 расщепленных пепсином пептидов hMET с отслеживаемым поглощением дейтерия в ходе экспериментов с обоими условиями "свободный антиген" и "в составе комплекса". Эти 98 пептидов характеризуются 52,1% перекрытием последовательностей. Было обнаружено, что среди всех этих пептидов двенадцать характеризуются значительно сниженной степенью поглощения дейтерия после связывания H4N13306P2 ("в составе комплекса") по сравнению с дейтерированием антигена отдельно ("свободный антиген").

Значения центроидов этих двенадцати пептидов в обоих условиях эксперимента проиллюстрированы в табл. 33. Области, соответствующие остаткам 305-315 и остаткам 421-455, перекрывающиеся для этих пептидов, исходя из данных HDX были определены как эпитоп связывания для антитела H4N13306P2.

Таблица 33. Пептиды hMET после расщепления пепсином со сниженной степенью поглощения дейтерия после связывания с H4N13306P2

| Остатки hMET | 5 мин дейтерирования           |                                |       | 10 мин дейтерирования          |                                |       |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|--------------------------------|--------------------------------|-------|
|              | «В составе комплекса»          | «Свободный антиген»            | Δ     | «В составе комплекса»          | «Свободный антиген»            | Δ     |
|              | Центроид массы MH <sup>+</sup> | Центроид массы MH <sup>+</sup> |       | Центроид массы MH <sup>+</sup> | Центроид массы MH <sup>+</sup> |       |
| 305-312      | 818,20                         | 818,83                         | -0,63 | 818,31                         | 819,13                         | -0,82 |
| 305-315      | 1161,50                        | 1162,58                        | -1,08 | 1161,80                        | 1162,95                        | -1,15 |
| 306-313      | 818,48                         | 818,97                         | -0,49 | 818,71                         | 819,28                         | -0,57 |
| 421-431      | 1206,24                        | 1206,75                        | -0,51 | 1206,28                        | 1206,95                        | -0,67 |
| 421-435      | 1581,28                        | 1581,84                        | -0,56 | 1581,41                        | 1582,09                        | -0,68 |
| 421-438      | 1941,58                        | 1942,15                        | -0,57 | 1941,71                        | 1942,39                        | -0,68 |
| 422-438      | 1794,58                        | 1795,04                        | -0,46 | 1794,72                        | 1795,34                        | -0,62 |
| 439-447      | 963,90                         | 964,83                         | -0,93 | 963,97                         | 965,24                         | -1,27 |
| 439-455      | 1846,58                        | 1847,79                        | -1,21 | 1847,24                        | 1847,85                        | -0,61 |
| 439-456      | 1960,24                        | 1961,32                        | -1,08 | 1960,83                        | 1961,42                        | -0,59 |
| 441-455      | 1586,30                        | 1587,71                        | -1,41 | 1587,33                        | 1587,79                        | -0,46 |
| 442-455      | 1487,50                        | 1488,50                        | -1,00 | 1487,92                        | 1488,54                        | -0,62 |

Для определения эпитопов связывания для биспецифического антитела к MET H4N14639D применяли тот же метод, что описан выше. Эпитопы связывания на hMET для H4N14639D, определенные с помощью этого метода, соответствуют эпитопам, определенным для исходных антител.

Эпитоп связывания антитела к MET H4N13312P2: AA 192-204: VRRLKETKDGMF (SEQ ID NO: 156) SEQ ID NO: 155.

Эпитоп связывания антитела к MET H4N13306P2: AA 305-315: LARQIGASLND (SEQ ID NO: 157) SEQ ID NO: 155 и AA 421-455: FIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNF (SEQ ID NO: 158) SEQ ID NO: 155.

Объем изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Фактически, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к тем, которые описаны в настоящем документе, будут очевидны для специалистов в данной области из предшествующего описания и прилагаемых чертежей. Предполагается, что такие модификации охвачены объемом прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен (D1); и второй антигенсвязывающий домен (D2), где D1 специфически связывает первый эпитоп MET человека; и где D2 специфически связывает второй эпитоп MET человека; и где D1 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138; и где D2 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.
2. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, где D1 содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144.
3. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, где D1 содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична ей; и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична ей.
4. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, где D1 содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.
5. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, где D2 содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144.
6. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, где D2 содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична ей; и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична ей.
7. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, где D2 содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.
8. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен (D1); и второй антигенсвязывающий домен (D2), где D1 специфически связывает первый эпитоп MET человека; и где D2 специфически связывает второй эпитоп MET человека; и где D1 содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144; и D2 содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 140; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144.

9. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, где

(a) первый эпитоп MET человека содержит аминокислоты 192-204 SEQ ID NO: 155;

(b) второй эпитоп MET человека содержит аминокислоты 305-315 и 421-455 SEQ ID NO: 155; или

(c) первый эпитоп MET человека содержит аминокислоты 192-204 SEQ ID NO: 155; и второй эпитоп MET человека содержит аминокислоты 305-315 и 421-455 SEQ ID NO: 155.

10. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-9, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула конъюгирована с цитотоксином.

11. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.10, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из токсинов биологического происхождения, химиотерапевтических средств и радиоизотопов.

12. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.10, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из майтанзиноидов, ауристатинов, дуокармицинов,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{227}\text{Th}$  и любых их производных.

13. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-12, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула конъюгирована с цитотоксическим средством посредством линкера.

14. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.13, где цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид.

15. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен (D1), где D1 специфически связывает первый эпитоп MET человека; и

второй антигенсвязывающий домен (D2), где D2 специфически связывает второй эпитоп MET человека, и

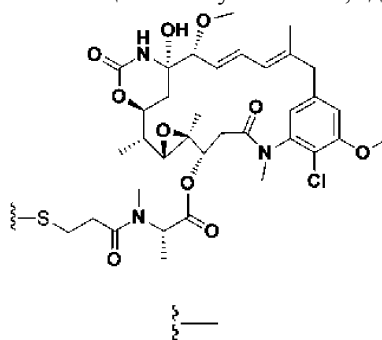
где биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит:

(i) CDR в пределах D1-HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или 58 и CDR в пределах D1-LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, и

(ii) CDR в пределах D2-HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 и CDR в пределах D2-LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, и

где биспецифическая антигенсвязывающая молекула конъюгирована с майтанзиноидом посредством линкера.

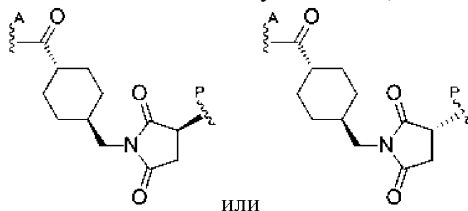
16. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.15, где майтанзиноид представляет собой



где

является связью с линкером.

17. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.16, где линкер представляет собой



или

где связь, обозначенная

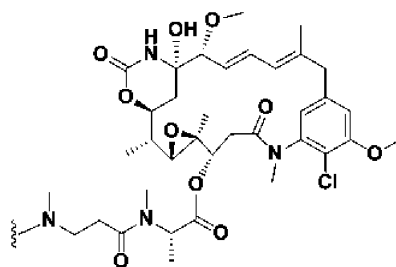


представляет собой связь с биспецифической антигенсвязывающей молекулой, а связь, обозначенная



представляет собой связь с майтанзиноидом.

18. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.15, где майтанзиноид представляет собой

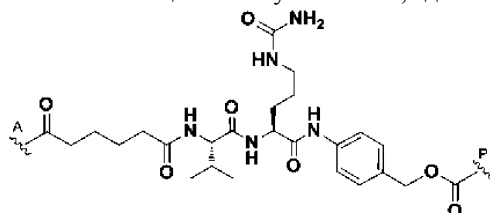


где



является связью с линкером.

19. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.18, где линкер представляет собой



где связь, обозначенная



представляет собой связь с биспецифической антигенсвязывающей молекулой, а связь, обозначенная



представляет собой связь с майтанзиноидом.

20. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп.15-19, где:

(i) D1 содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 набор аминокислотных последовательностей SEQ ID NOs: 60-62-64-140-142-144; и

(ii) D2 содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 набор аминокислотных последовательностей SEQ ID NOs: 84-86-88-140-142-144.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-20 и фармацевтически приемлемый носитель.

22. Способ лечения рака у субъекта, страдающего от опухоли с генетическим изменением в отношении MET и/или опухоли, рост которой находится под контролем аутокринной передачи сигнала с участием HGF, причем способ предусматривает введение субъекту биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей:

(i) CDR в пределах D1-HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или 58 и CDR в пределах D1-LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, и

(ii) CDR в пределах D2-HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 и CDR в пределах D2-LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.

23. Применение биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-20 в получении лекарственного средства для лечения рака у субъекта, страдающего от опухоли с генетическим изменением в отношении MET и/или опухоли, рост которой находится под контролем аутокринной передачи сигнала с участием HGF.

24. Способ по п.22 или применение по п.23, в которых рак выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака желудка, рака толстой и прямой кишки и рака головы и шеи.

25. Способ по п.22 или применение по п.23, дополнительно предусматривающие введение субъекту второго противоракового терапевтического средства.

26. Способ лечения рака, подавления роста опухоли и/или вызова регрессии опухоли у субъекта, причем способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту конъюгата антитела и лекарственного средства (ADC), содержащего биспецифическую антигенсвязывающую молекулу и цитотоксин, причем биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит

первый антигенсвязывающий домен (D1); и

второй антигенсвязывающий домен (D2);

где D1 специфически связывает первый эпитоп MET человека;

где D2 специфически связывает второй эпитоп MET человека; и

где D1 содержит три CDR в пределах HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и три CDR в пределах LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 138; и

где D2 содержит три CDRs в пределах HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, и три CDRs в пределах LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.

27. Применение конъюгата антитела и лекарственного средства (ADC), содержащего биспецифическую антигенсвязывающую молекулу и цитотоксин в получении лекарственного средства для лечения рака, подавления роста опухоли и/или вызова регрессии опухоли у субъекта, причем биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит

первый антигенсвязывающий домен (D1); и

второй антигенсвязывающий домен (D2);

где D1 специфически связывает первый эпитоп MET человека;

где D2 специфически связывает второй эпитоп MET человека; и

где D1 содержит три CDR в пределах HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или 58, и три CDR в пределах LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138; и где D2 содержит три CDRs в пределах HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, и три CDRs в пределах LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.

28. Способ по п.26 или применение по п.27, в которых D1 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.

29. Способ по п.26 или применение по п.27, в которых D1 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.

30. Способ по п.26 или применение по п.27, в которых D2 содержит HCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, и LCVR, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.

31. Способ по п.26 или применение по п.27, где:

(a) первый эпитоп MET человека содержит аминокислоты 192-204 SEQ ID NO: 155;

(b) второй эпитоп MET человека содержит аминокислоты 305-315 и 421-455 SEQ ID NO: 155; и/или

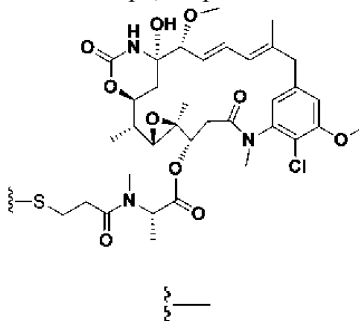
(c) первый эпитоп MET человека содержит аминокислоты 192-204 SEQ ID NO: 155; и второй эпитоп MET человека содержит аминокислоты 305-315 и 421-455 SEQ ID NO: 155.

32. Способ по п.26 или применение по п.27, в которых цитотоксин выбран из группы, состоящей из токсинов биологического происхождения, химиотерапевтических средств и радиоизотопов.

33. Способ по п.26 или применение по п.27, в которых цитотоксин выбран из группы, состоящей из майтанзиноидов, ауристатинов, томаймицинов, дуокармицинов,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{227}\text{Th}$  и любых их производных.

34. Способ по п.26 или применение по п.27, в которых биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит CDR в пределах аминокислотной последовательности D1-HCVR SEQ ID NO: 58 и CDR в пределах аминокислотной последовательности D2-HCVR SEQ ID NO: 82.

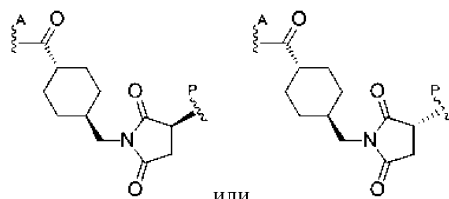
35. Способ или применение по п.33, в котором цитотоксин конъюгирован с биспецифической антигенсвязывающей молекулой посредством линкера, и причем цитотоксин представляет собой



где

является связью с линкером.

36. Способ или применение по п.35, в котором линкер представляет собой



или

где связь, обозначенная

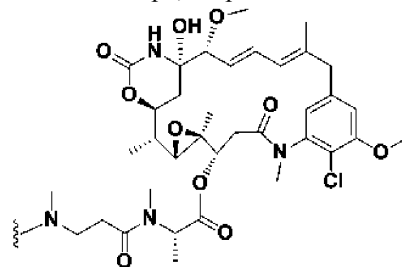


представляет собой связь с биспецифической антигенсвязывающей молекулой, а связь, обозначенная



представляет собой связь с цитотоксином.

37. Способ или применение по п.33, в котором цитотоксин конъюгирован с биспецифической антигенсвязывающей молекулой посредством линкера, и причем цитотоксин представляет собой

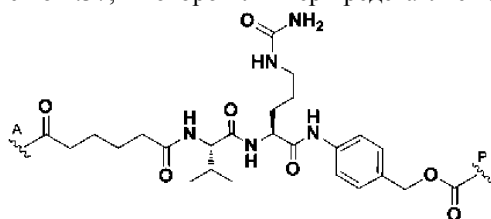


где



является связью с линкером.

38. Способ или применение по п.37, в котором линкер представляет собой



где связь, обозначенная



представляет собой связь с биспецифической антигенсвязывающей молекулой, а связь, обозначенная



представляет собой связь с цитотоксином.

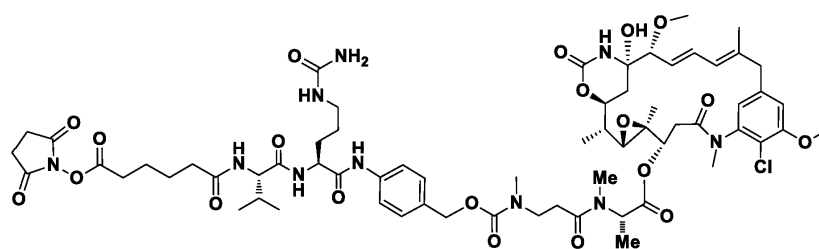
39. Способ или применение по любому из пп.27-38, где:

(i) D1 содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 набор аминокислотных последовательностей SEQ ID NOs: 60-62-64-140-142-144; и

(ii) D2 содержит HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 набор аминокислотных последовательностей SEQ ID NOs: 84-86-88-140-142-144.

40. Способ или применение по любому из пп.27-39, где рак представляет собой рак легкого или рак желудка.

41. Способ получения конъюгата антитела и лекарственного средства, предусматривающий приведение биспецифического антигенсвязывающего белка MET × MET, содержащего CDR в пределах аминокислотной последовательности D1-HCVR SEQ ID NO: 18 или 58 и CDR в пределах аминокислотной последовательности D2-HCVR SEQ ID NO: 82, в контакт с соединением, характеризующимся следующей формулой B<sup>1</sup>:

B<sup>1</sup>

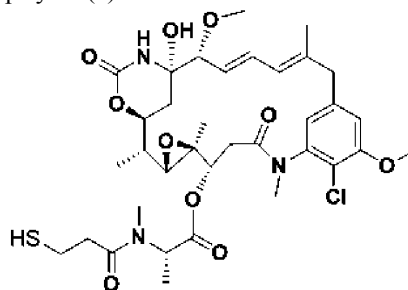
и водным разбавителем.

42. Способ по п.41, в котором биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET содержит CDR в пределах аминокислотной последовательности D1-HCVR SEQ ID NO: 58 и CDR в пределах аминокислотной последовательности D2-HCVR SEQ ID NO: 82.

43. Способ по п.41, в котором биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET содержит CDR в пределах аминокислотной последовательности D1-HCVR SEQ ID NO: 18 и CDR в пределах аминокислотной последовательности D2-HCVR SEQ ID NO: 82.

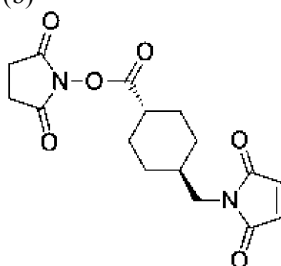
44. Конъюгат антитела и лекарственного средства, полученный с помощью следующего способа:

(i) приведение соединения формулы (a)



(a)

в контакт с соединением формулы (b)



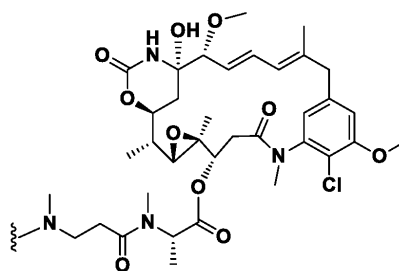
(b)

в присутствии силикагеля и разбавителя для синтеза промежуточного соединения; и (ii) приведение биспецифического антигенсвязывающего белка MET × MET в контакт с промежуточным соединением и водным разбавителем, где биспецифический антигенсвязывающий белок MET × MET содержит три CDR в пределах аминокислотной последовательности D1-HCVR SEQ ID NO: 18 или 58, три CDR в пределах D1-LCVR SEQ ID NO: 138, три CDR в пределах аминокислотной последовательности D2-HCVR SEQ ID NO: 82, и три CDR в пределах D2-LCVR SEQ ID NO: 138.

45. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен (D1), где D1 специфически связывает первый эпитоп MET человека; и

второй антигенсвязывающий домен (D2), где D2 специфически связывает второй эпитоп MET человека; где биспецифическая антигенсвязывающая молекула конъюгирована с майтанзиноидом посредством линкера, где:

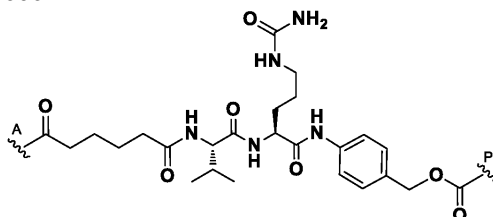
(i) майтанзиноид представляет собой



где



является связью с линкером,  
(ii) линкер представляет собой



где связь, обозначенная



представляет собой связь с биспецифической антигенсвязывающей молекулой, а связь, обозначенная

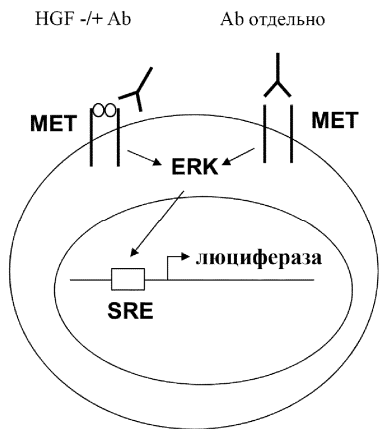


представляет собой связь с майтанзиноидом; и

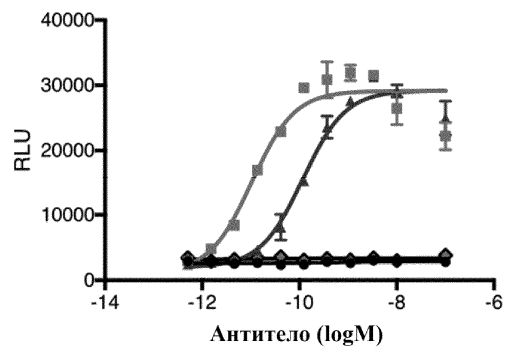
(iii) D1 содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144; и D2 содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144.

|            |            | D2         |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|            |            | H4H13290P2 | H4H13291P2 | H4H13295P2 | H4H13300P2 | H4H13299P2 | H4H13301P2 | H4H13302P2 | H4H13306P2 | H4H13290P2 | H4H13311P2 | H4H13312P2 | H4H13312P2 | H4H13316P2 | H4H13318P2 | H4H13319P2 | H4H13325P2 | H4H13331P2 |
| D1         | H4H13290P2 |            | 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         | 11         | 12         | 13         | 14         | 15         | 16         |
|            | H4H13291P2 | 17         |            | 18         | 19         | 20         | 21         | 22         | 23         | 24         | 25         | 26         | 27         | 28         | 29         | 30         | 31         | 32         |
|            | H4H13295P2 | 33         | 34         |            | 35         | 36         | 37         | 38         | 39         | 40         | 41         | 42         | 43         | 44         | 45         | 46         | 47         | 48         |
|            | H4H13300P2 | 49         | 50         | 51         |            | 52         | 53         | 54         | 55         | 56         | 57         | 58         | 59         | 60         | 61         | 62         | 63         | 64         |
|            | H4H13299P2 | 65         | 66         | 67         | 68         |            | 69         | 70         | 71         | 72         | 73         | 74         | 75         | 76         | 77         | 78         | 79         | 80         |
|            | H4H13301P2 | 81         | 82         | 83         | 84         | 85         |            | 86         | 87         | 88         | 89         | 90         | 91         | 92         | 93         | 94         | 95         | 96         |
|            | H4H13302P2 | 97         | 98         | 99         | 100        | 101        | 102        |            | 103        | 104        | 105        | 106        | 107        | 108        | 109        | 110        | 111        | 112        |
|            | H4H13306P2 | 113        | 114        | 115        | 116        | 117        | 118        | 119        |            | 120        | 121        | 122        | 123        | 124        | 125        | 126        | 127        | 128        |
|            | H4H13309P2 | 129        | 130        | 131        | 132        | 133        | 134        | 135        | 136        |            | 137        | 138        | 139        | 140        | 141        | 142        | 143        | 144        |
|            | H4H13311P2 | 145        | 146        | 147        | 148        | 149        | 150        | 151        | 152        | 153        |            | 154        | 155        | 156        | 157        | 158        | 159        | 160        |
| H4H13312P2 | 161        | 162        | 163        | 164        | 165        | 166        | 167        | 168        | 169        | 170        |            | 171        | 172        | 173        | 174        | 175        | 176        |            |
| H4H13313P2 | 177        | 178        | 179        | 180        | 181        | 182        | 183        | 184        | 185        | 186        | 187        |            | 188        | 189        | 190        | 191        | 192        |            |
| H4H13316P2 | 193        | 194        | 195        | 196        | 197        | 198        | 199        | 200        | 201        | 202        | 203        | 204        |            | 205        | 206        | 207        | 208        |            |
| H4H13318P2 | 209        | 210        | 211        | 212        | 213        | 214        | 215        | 216        | 217        | 218        | 219        | 220        | 221        |            | 222        | 223        | 224        |            |
| H4H13319P2 | 225        | 226        | 227        | 228        | 229        | 230        | 231        | 232        | 233        | 234        | 235        | 236        | 237        | 238        |            | 239        | 240        |            |
| H4H13325P2 | 241        | 242        | 243        | 244        | 245        | 246        | 247        | 248        | 249        | 250        | 251        | 252        | 253        | 254        | 255        |            | 256        |            |
| H4H13331P2 | 257        | 258        | 259        | 260        | 261        | 262        | 263        | 264        | 265        | 266        | 267        | 268        | 269        | 270        | 271        | 272        |            |            |

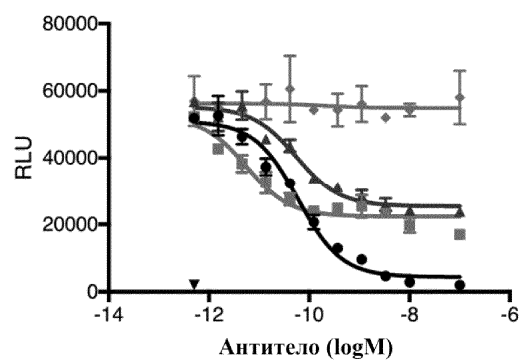
Фиг. 1



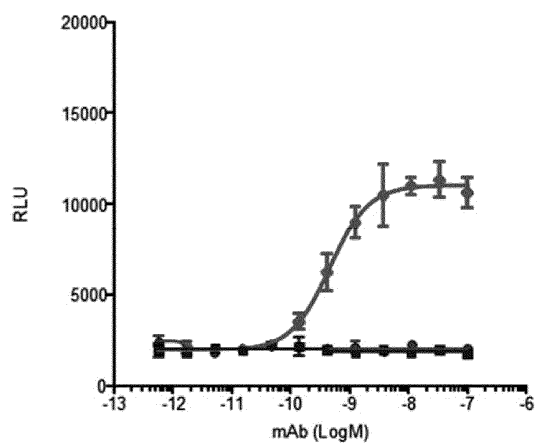
Фиг. 2



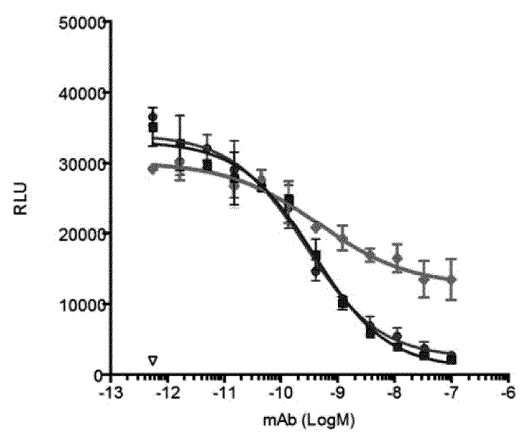
Фиг. 3А



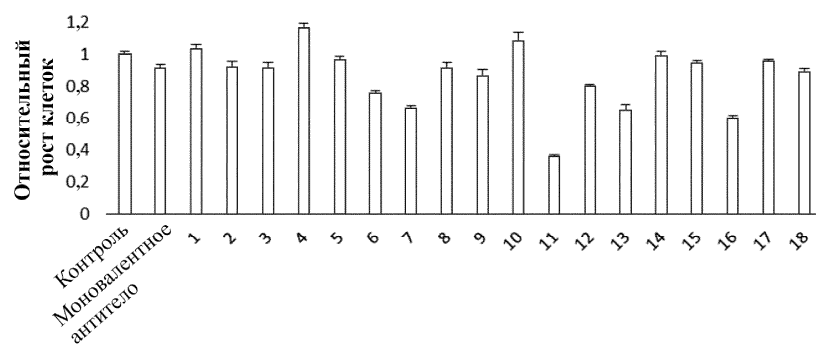
Фиг. 3В



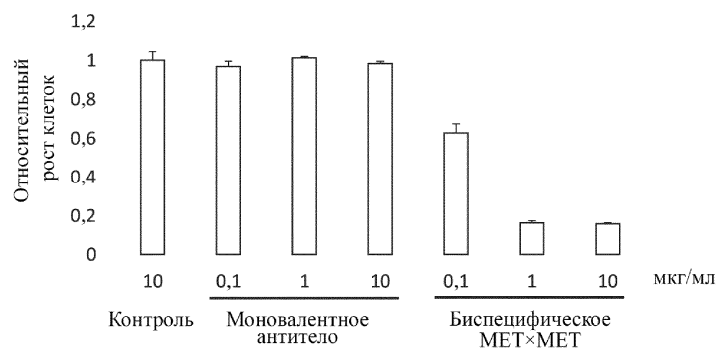
Фиг. 4А



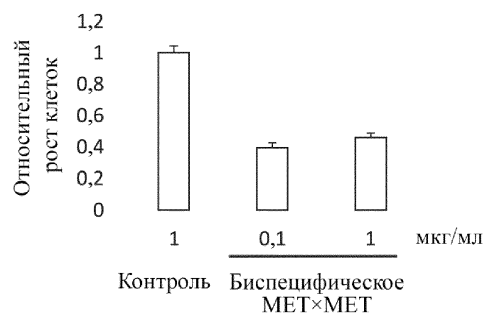
Фиг. 4В



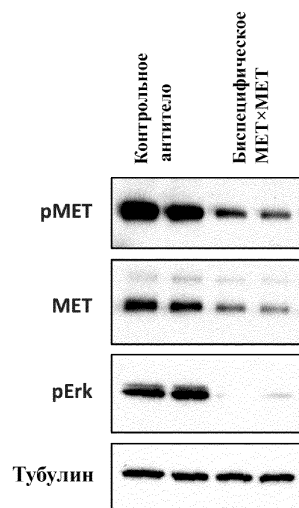
Фиг. 5



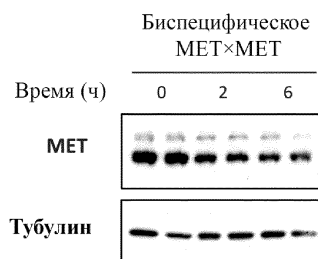
Фиг. 6А



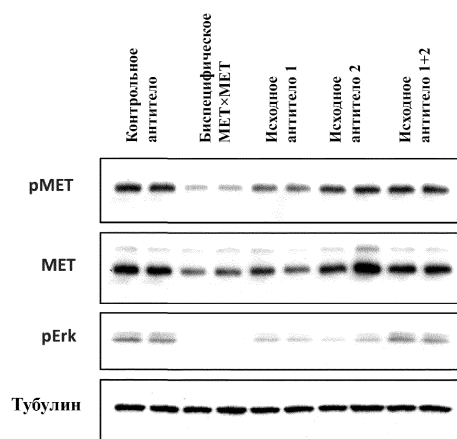
Фиг. 6В



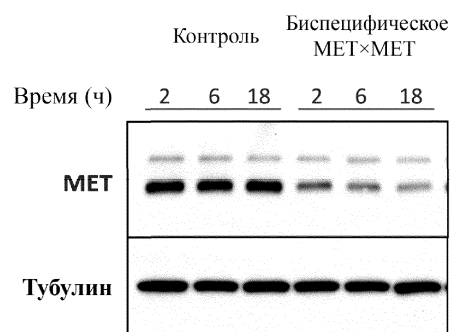
Фиг. 7А



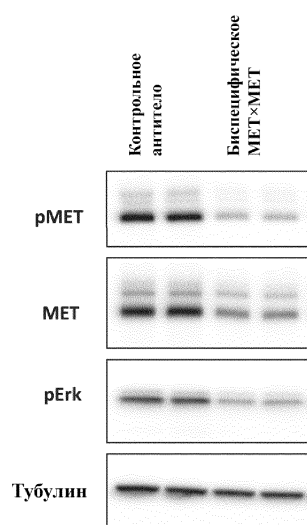
Фиг. 7В



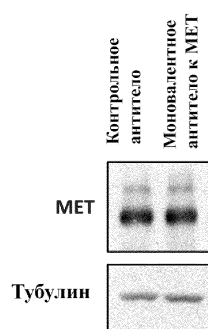
Фиг. 8



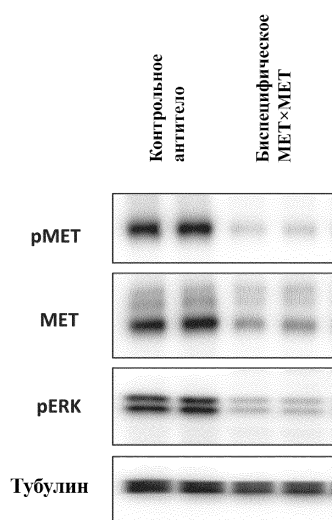
Фиг. 9



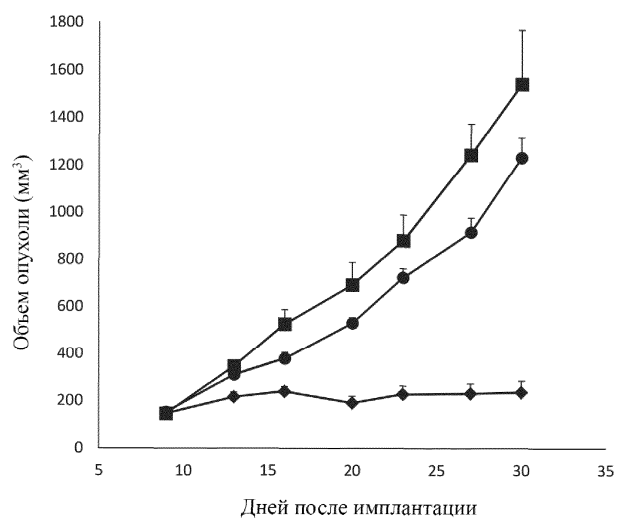
Фиг. 10А



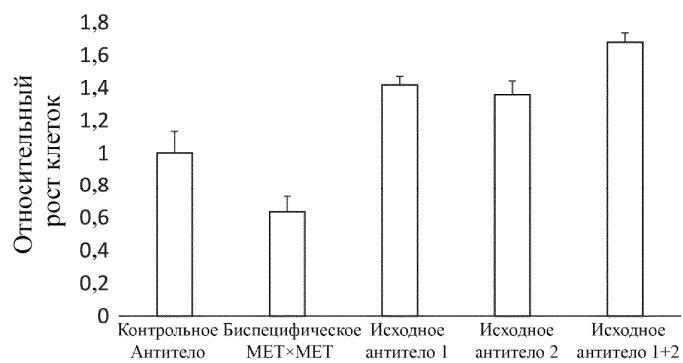
Фиг. 10В



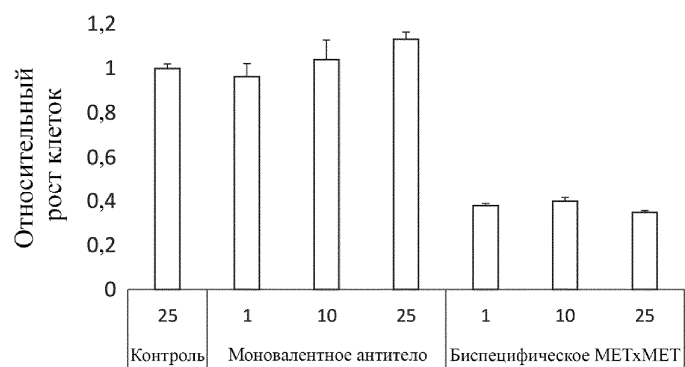
Фиг. 11



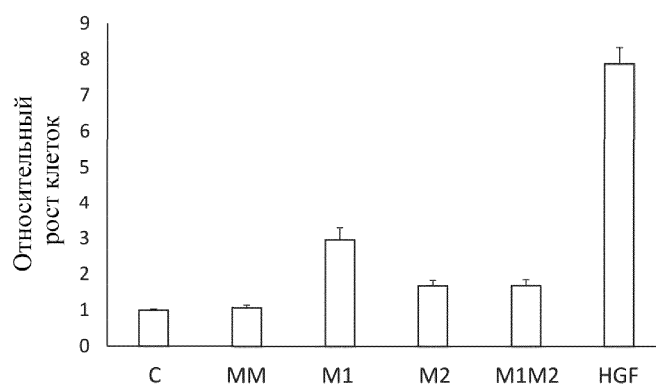
Фиг. 12



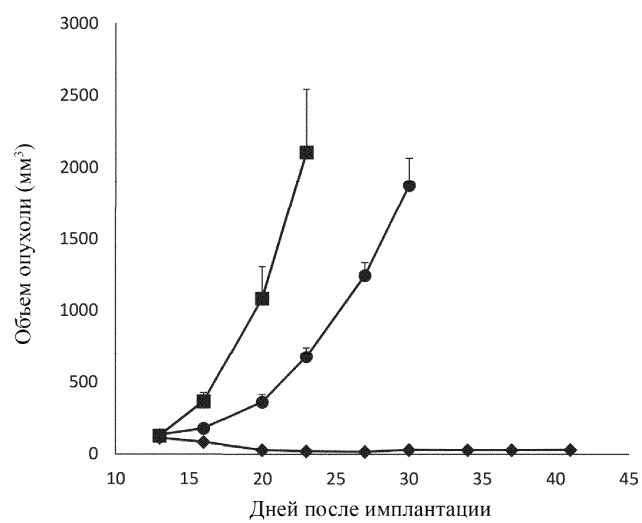
Фиг. 13А



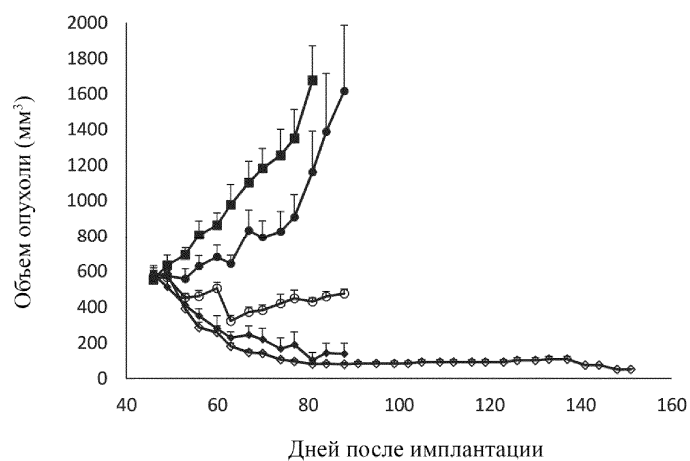
Фиг. 13В



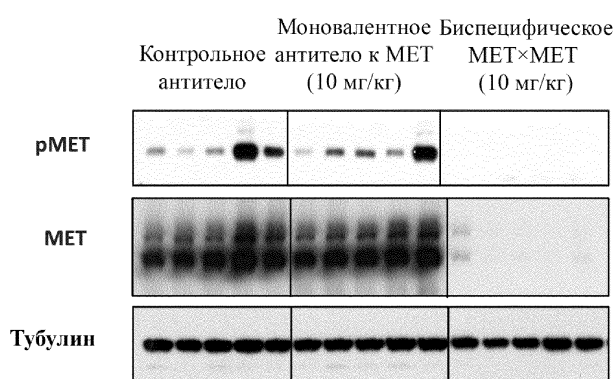
Фиг. 14



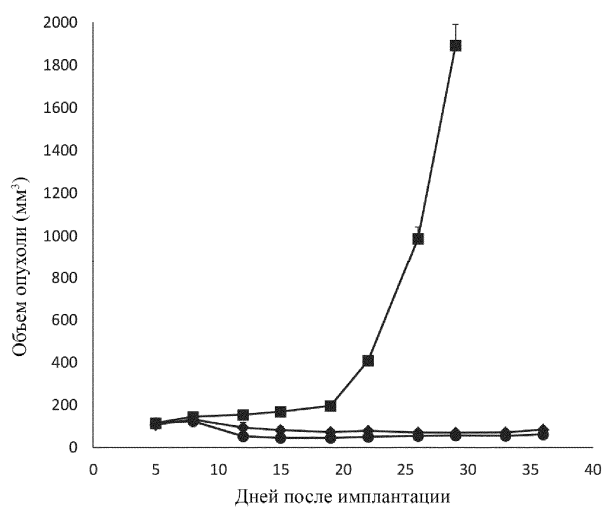
Фиг. 15



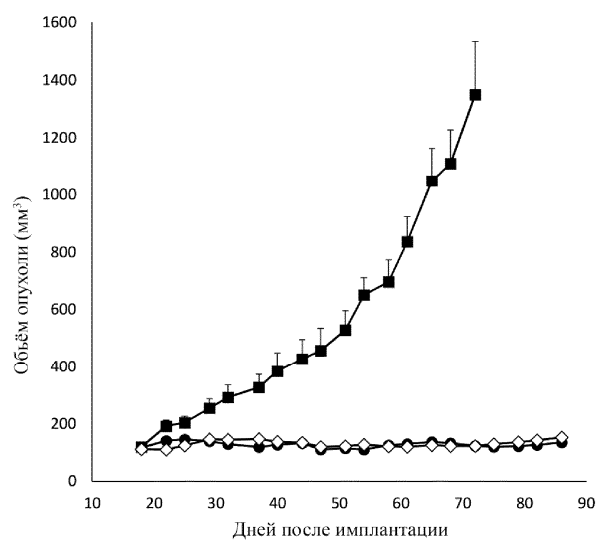
Фиг. 16А



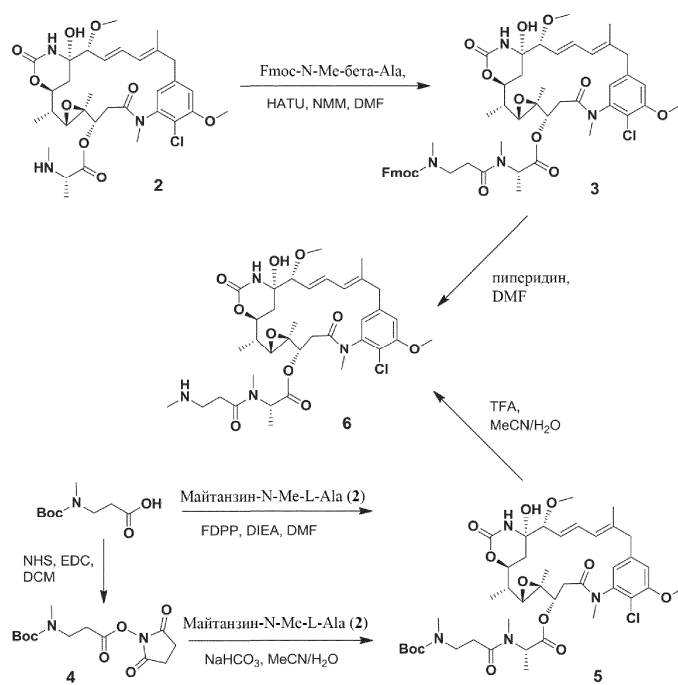
Фиг. 16В



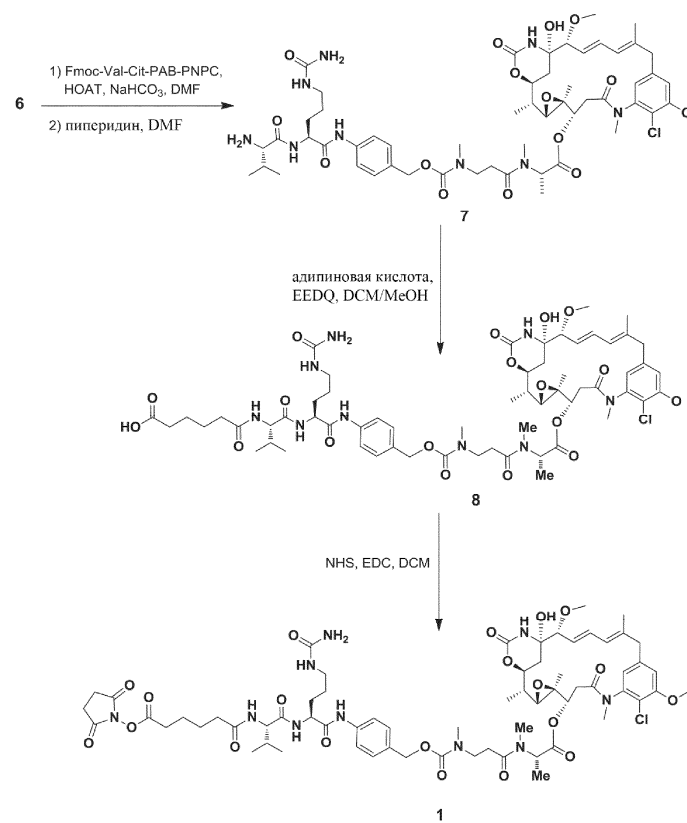
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2