

抗 c-Met 抗体药物偶联物及其应用

技术领域

5 [01] 本发明涉及抗体药物偶联物领域，具体涉及一种靶向 c-Met 的抗体药物偶联物及其应用。

背景技术

[02] c-Met (tyrosine-protein kinase Met) 是一个原癌基因 (文献 1: Edakuni G, Sasatomi E, Satoh T, et al. Expression of the hepatocyte growth factor/c-Met pathway is increased at the cancer front in breast carcinoma.[J]. Pathology International, 2010, 51(3):172-178)，转录翻译后产物为肝细胞生长因子受体，同 HGF (hepatocyte growth factor receptor) 一致，其前体为一条单链，经各种修饰后断裂成 α 链和 β 链，由二硫键连接。c-Met 在细胞上主要分为胞内和胞外两部分，关于 β 链的胞外区包括 SD (Sema domain) 区、PSID (plexin-semaphorin-integrin) 区以及 IPTD (immunoglobulin-like regions in plexins and transcription factors) 区，胞内区主要包括 JD (juxtamembrane domain) 和 TKCD (a tyrosine kinase domain (TK domain) and a c-terminal docking site) (文献 2: Sattler M, Reddy M M, Hasina R, et al. The role of the c-Met pathway in lung cancer and the potential for targeted therapy[J]. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2011, 3(4):171-84.)。c-Met 是 HGF 的受体，当 HGF 与 c-Met 结合后导致 c-Met 的结构发生改变，激活胞内的蛋白酪氨酸激酶，从而导致自身结构的磷酸化，主要磷酸化 Try1235 以及 Try1234 位点，c-Met 激活后，导致位于 β 链末端的 Try1349 和 Try1256 的磷酸化 (文献 3: Peruzzi B, Bottaro D P. Targeting the c-Met Signaling Pathway in Cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2006, 12(12):3657-3660)。当 HGF 与 c-Met 结合后引发多条信号通路的发生：其一，Ras-Rac 信号通路导致细胞骨架的运动；其二，Ras-MAPK 级联反应促进细胞的分裂与分化；其三，PI3K-FAK 信号通路促进细胞的迁移以及侵袭；其四，PI3K-AKT 信号通路促进细胞的存活。HGF/c-Met 信号通路促进了肿瘤细胞的生长以及迁移。

30 [03] c-Met 在许多肿瘤细胞上过表达，其中以头颈鳞癌和下咽癌为首，在

肾细胞癌、结直肠癌、肺腺癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、膀胱癌、非小细胞癌和胃癌中均有表达，c-Met 在肿瘤细胞中的高表达和在正常细胞中的低表达，使得 c-Met 成为靶向治疗的优良靶标。

[04] 抗体药物偶联物(antibody-drug conjugate, ADC)是一种通过化学连接子(Linker)将具有生物活性的药物(Drug)和抗体(Antibody)连接起来的一类生物药。近些年，多个抗体药物偶联物在治疗恶性肿瘤方面取得了突破性的进展，使其成为了继手术、化疗、放疗后的一大新兴治疗方法。但截止到 2021 年 3 月，全球仅批准了 11 种抗体偶联药物(美国 FDA 批准了 10 种，日本 PMDA 批准了一种)，且获批适应症种类较少，远不能满足目前恶性肿瘤患者的临床需求。

表 1 已上市抗体药物偶联物

药品通用名	公司	靶点	上市时间
Brentuximab vedotin	Seattle、武田	CD30	上市/2011 年
Ado-trastuzumab emtansine	基因泰克	Her2	上市/2013 年
Inotuzumab ozogamicin	辉瑞	CD22	上市/2017 年
Gemtuzumab ozogamicin	辉瑞	CD33	上市/2017 年
Moxetumomab pasudotox-tdfk	阿斯利康	CD22	上市/2018 年
Enfortumab vedotin-ejfv	西雅图/阿斯泰来	Nectin-4	上市/2019 年
Polatuzumab vedotin-piiq	基因泰克	CD79b	上市/2019 年
Fam-trastuzumab deruxtecan-nxki	阿斯利康/日本第一三共	Her2	上市/2019 年
Sacituzumab govitecan-hziy	Immunomedics	Trop2	上市/2020 年
Belantamab mafodotin	Glaxosmithkline (Ireland) Ltd	BCMA	上市/2020 年
Cetuximab sarotalocan	Rakuten Medical	EGFR	上市/2020 年

注：Mylotarg 于 2000 年获批上市后在 2010 年撤市，后于 2017 年重新获批上市。

[05] 目前处于研究或临床阶段的靶向 c-Met 的生物药以单克隆抗体为主，抗体药物偶联物 (Antibody Drug conjugate, ADC) 类药物较少 (文献 4: LILIANE GOETSCH, A. J. Anti-CMET antibody and its use for the

detection and the diagnosis of cancer. WO2011020925 A1, 2012)。其中恒瑞医药研发中的注射用 SHR-A1403 为一种人源化抗 c-Met 单克隆抗体与微管抑制剂通过化学偶联之后形成的一种 ADC，可通过与肿瘤细胞表面的 c-Met 结合，将抗体药物偶联物内吞进入肿瘤细胞后，在溶酶体发生降解后释放小分子毒素，起到杀伤肿瘤细胞的作用(文献 5: Ki-Hyun Kim Progress of antibody-based inhibitors of the HGF - cMET axis in cancer therapy , Experimental & Molecular Medicine (2017) 49, e307)。SHR-A1403 于 2017 年 1 月被 FDA 批准在美国开展临床试验，根据 FDA (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03856541?term=SHR-A1403&rank=1>) 官网显示，该 I 期临床试验目前处于招募患者阶段。

[06]ABBVie 公司研发管线 ABBV-399 在美国也处于 I 期临床研究阶段，其为 ABT-700 抗体与 MMAE 的偶联物，DAR (Drug-to-antibody ratio) 值为 3.1，用于治疗 c-Met 过度表达的非小细胞肺癌。c-Met 早期临床试验研究结果显示，ABBV-399 能对 c-Met 呈阳性的癌细胞产生细胞毒性作用。I 期临床试验 (NCT02099058) 以 29 名 c-Met 呈阳性的 NSCLC 患者为对象，初步考察了 ABBV-399 单独给药或联合厄洛替尼给药的安全性及有效性。单独给药的队列中， $\geq 10\%$ 的患者发生了不良反应，以疲劳、恶心、神经痛与恶心为主(分别 43.8%、37.5%、25%与 18.8%)。单独给药组内，3/16 名患者出现部分缓解，持续时间在 3.1~11.1 月之间。给药 12 周后，单独给药组内 56.3% 的患者病情得以控制。联合给药组内亦有 $\geq 10\%$ 的患者发生不良反应，以神经痛与恶心为主(分别为 46.2 与 23.1%)，该组内 4/13 名患者出现部分缓解，其中 1 名有待确认，其持续时间从 2.8~9.1 个月。治疗 12 周后，联合给药组内 76.9% 的患者病情得以控制。单独给药组与联合给药组内均未出现与治疗相关的死亡病例。试验结果证实，ABBV-399 在 2.7mg/kg 剂量下具有良好的耐受性，且对 HGF 呈阳性的 NSCLC 患者表现出良好的抗肿瘤活性(文献 6: Wang J , Anderson M G , Oleksijew A , et al. ABBV-399, a c-Met Antibody Drug Conjugate that Targets Both MET Amplified and c-Met Overexpressing Tumors, Irrespective of MET Pathway Dependence[J]. Clinical Cancer Research, 2016, 23(4):992-1000.)。在 2016 年 ABBVie 发布的最新资料显示，H-score ≥ 150 的 NSCLC 患者使用 ABBV-399 治疗后，约 19% 出现部分缓解，ABBV-399 的耐受剂量为每三周给药 2.7mg/kg，最常发生的毒性反应是疲劳 (25%)、恶心 (23%)、神经痛 (15%)、食欲降低 (13%)、呕吐 (13%) 和腹泻 (10%) (文献 7: Angevin E , Kelly K , Heist R , et al.

First-in-human phase 1, dose-escalation and -expansion study of ABBV-399, an antibody-drug conjugate (ADC) targeting c-Met, in patients (pts) with advanced solid tumors[J]. Annals of Oncology, 2016, 27(suppl_6).

5 [07] 尽管目前靶向 c-Met 的抗体处于临床阶段的有数十个, 但肿瘤治愈效果不尽如人意。ADC 药物可以将这些靶向性很好的单抗和细胞毒素进行有效的组合, 保持靶向性的同时增强对细胞的杀伤作用。目前靶向 c-Met 的 ADC 研发进展相对缓慢处于临床阶段的较少, 且处于临床早期, 如 ABBVie 的 ABBV-399 和恒瑞医药的 SHR-A1403, 这两种 ADC 均处于临床
10 床试验 I 期, 药品的安全性及有效地针对性适应症还处于探索中。因此, 目前临床上亟需开发药效和安全性更好的抗 c-Met 的抗体药物偶联物, 从而能够拓展更多的针对性适应症进行有效治疗。

发明内容

15 [08] 本发明提供了一种靶向 c-Met 的抗体或抗原结合片段及其在治疗癌症中的用途。本发明还提供了包含上述抗体的抗体药物偶联物 (ADC) 编码上述 c-Met 抗体的核苷酸、多核苷酸组合、表达载体及宿主细胞、包含上述 c-Met 的抗体、抗体药物偶联物的药物组合物以及它们在制备治疗或预防癌症药物中的应用。

20 [09] 具体的, 本发明提供了一种靶向 c-Met 的人源化抗体或其抗原结合片段, 所述的人源化抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区, 其中:

[10] (1) 重链可变区的序列如 SEQ ID NO:7 所示, 或与 SEQ ID NO:7 具有相同的 CDR 1-3 且与 SEQ ID NO:7 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列; 和/或

25 [11] (2) 轻链可变区的序列如 SEQ ID NO:8 所示, 或与 SEQ ID NO:8 具有相同的 CDR 1-3 且与 SEQ ID NO:8 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列。

30 [12] 在一些优选的实施例中, 所述的人源化抗体或其抗原结合片段选自单克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、包含所述抗原结合片段的重组蛋白或 Fab 片段、F(ab') 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、dAb、Fd、单链抗体(scFv)。

[13] 在一些优选的实施例中, 所述的抗体或抗原结合片段还包含免疫球蛋

白的恒定区，其中所述的免疫球蛋白选自 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4。

[14] 在一些具体的实施例中，所述的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示；和/或所述的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示。

5 [15] 所述的 SEQ ID NO:7 涉及的氨基酸序列如下：

```
QVQLEQSGPE VVKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMHWVRQA PGQGLEWMGM IDPSDSESRL 60
NQKFKDRVMT TVDTPSTSTVY MELSSPRSED TAVYYCARGG YHGTSYWFYD VWGQGTLVTV 120
SS 122
```

[16] 所述的 SEQ ID NO:8 涉及的氨基酸序列如下：

```
DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSL L HSDGITYLYW YLQKPGQSPQ LLIYQMSNLA 60
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP PTFGGGKVE IKRTV 115
```

[17] 在另一些具体的实施例中，所述的抗体或其抗原结合片段的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示；和/或所述的抗体或其抗原结合片段的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示。

10 [18] 所述的 SEQ ID NO:9 涉及的氨基酸序列如下：

```
QVQLEQSGPE VVKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMHWVRQA PGQGLEWMGM IDPSDSESRL 60
NQKFKDRVMT TVDTPSTSTVY MELSSPRSED TAVYYCARGG YHGTSYWFYD VWGQGTLVTV 120
SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ 180
SSGLYSLSLV VTPVSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKVV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL 240
GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ 300
YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR 360
EEMTKNQVSL TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS 420
RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK 452
```

[19] 所述的 SEQ ID NO:10 涉及的氨基酸序列如下：

```
DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSL L HSDGITYLYW YLQKPGQSPQ LLIYQMSNLA 60
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP PTFGGGKVE IKRTVAAPSV 120
FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKSTYSL 180
SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC 219
```

[20] 本发明还涉及一种分离的多核苷酸，其编码上述任一项所述的抗体或

其抗原结合片段。

[21] 本发明还涉及一种核酸构建体，其包含上述所述的多核苷酸。

[22] 如上所述的核酸构建体优选为表达载体，如上所述的多核苷酸与允许其所编码的多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达的调节序列有效连接。

[23] 本发明还涉及一种宿主细胞，其包含上述所述的多核苷酸或者表达载体，并且所述的宿主细胞优选自原核细胞、真核细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、大肠杆菌细胞；进一步的，所述的宿主细胞优选为 CHO 细胞、NS0 细胞、Sp2/0 细胞或 BHK 细胞。

[24] 本发明还提供了上述任一项所述的抗体或其抗原结合片段的生产方法，该方法包括：在允许上述核酸构建体表达的条件下培养上述所述的宿主细胞，并从培养物中回收产生的表达蛋白。

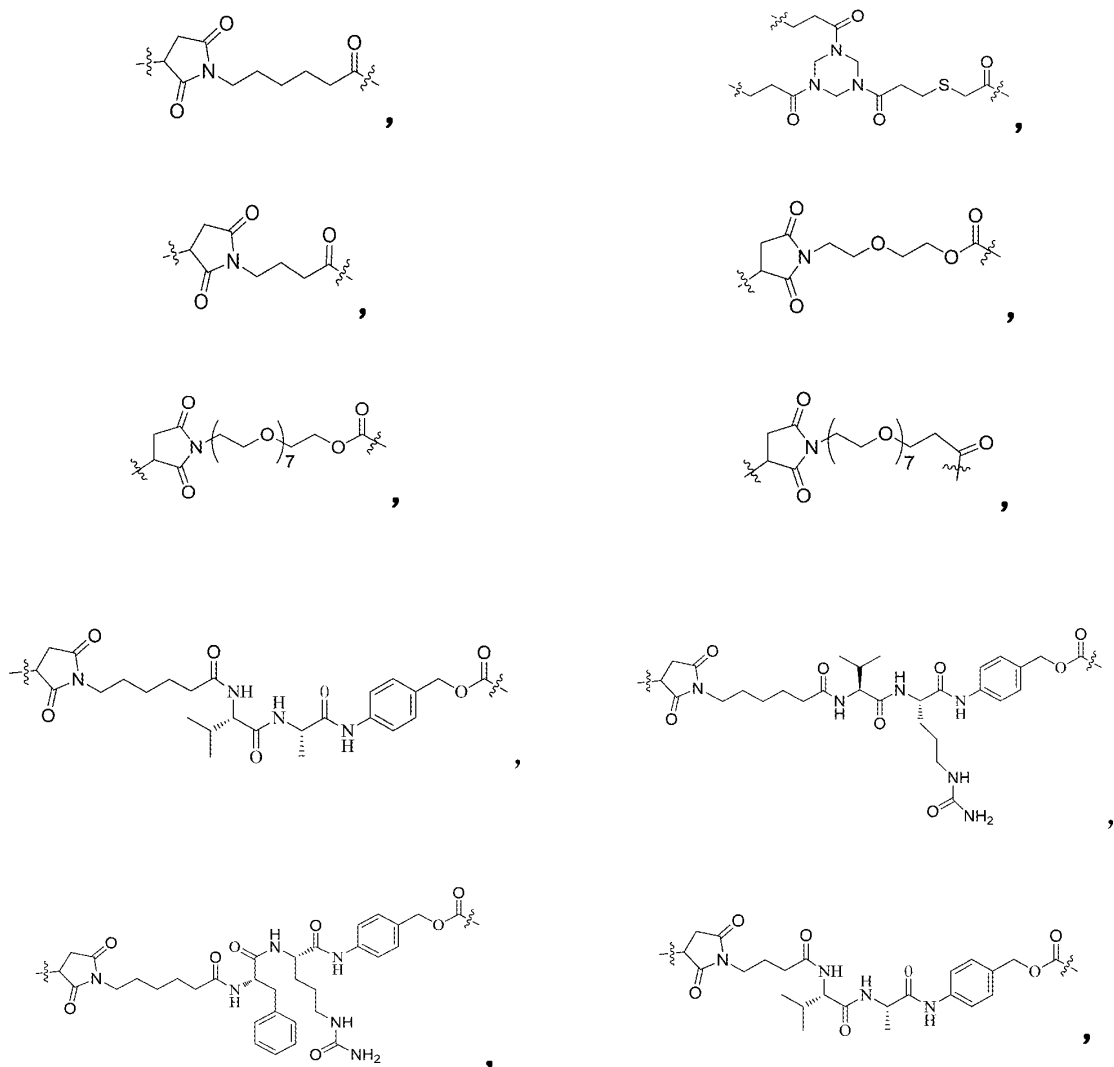
[25] 本发明还提供了一种靶向 c-Met 的抗体药物偶联物，其为上述任意一项所述的抗体或其抗原结合片段与一个或多个治疗剂的偶联物。

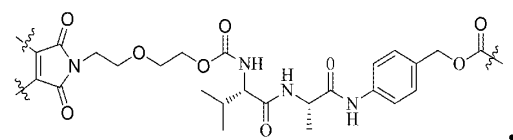
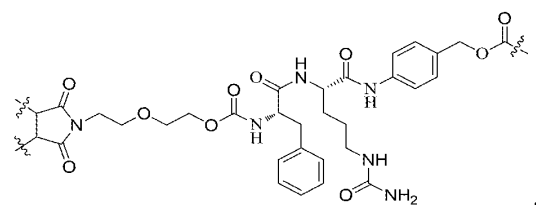
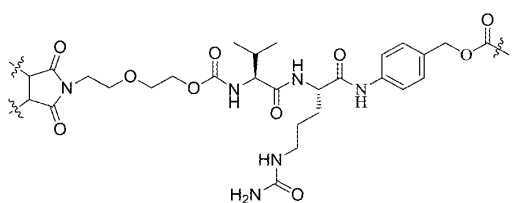
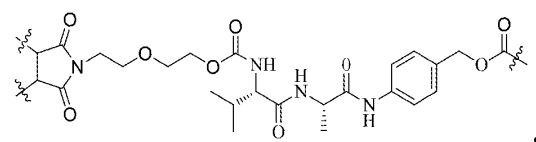
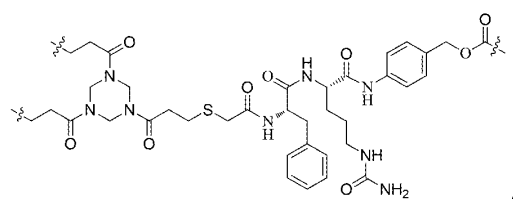
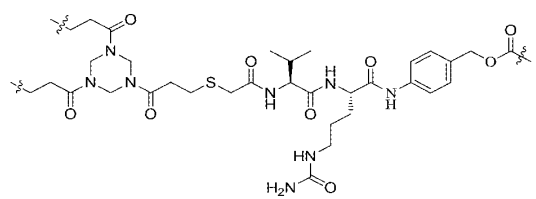
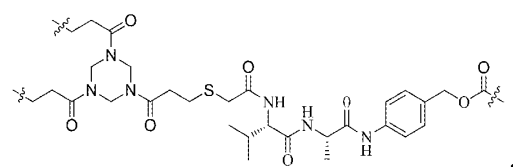
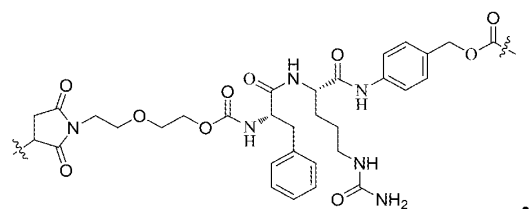
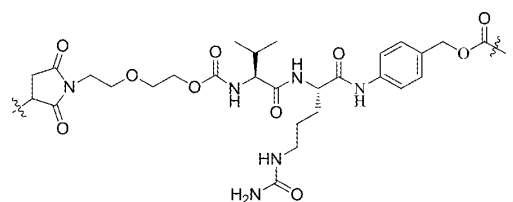
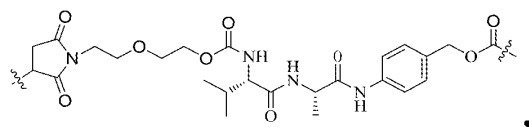
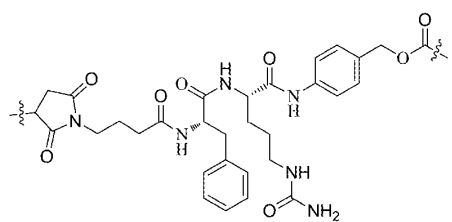
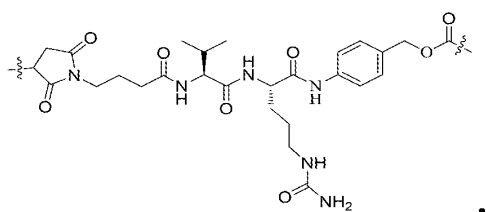
[26] 在一些实施例中，所述治疗剂选自细胞毒性分子、免疫增强剂和放射性同位素，所述细胞毒性分子包括但不限于微管蛋白抑制剂或 DNA 损伤剂；进一步优选的，所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素（dolastatin）及奥瑞他汀（auristatin）类细胞毒分子，美登素（maytansine）类细胞毒分子；所述 DNA 损伤剂包括但不限于卡奇霉素（calicheamicin）类、倍癌霉素（duocarmycin）类、安曲霉素类衍生物 PBD、喜树碱（camptothecins）及喜树碱类衍生物、SN-38、Dxd；进一步优选的，所述奥瑞他汀（auristatin）类细胞毒分子包括但不限于 MMAE 或 MMAF 或它们的衍生物，所述美登素类细胞毒分子包括但不限于 DM1、DM4 或它们的衍生物。

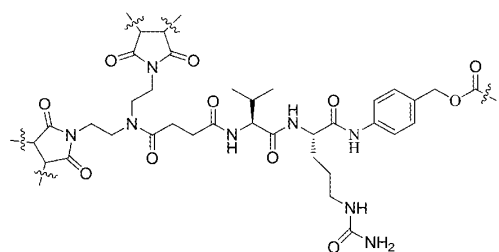
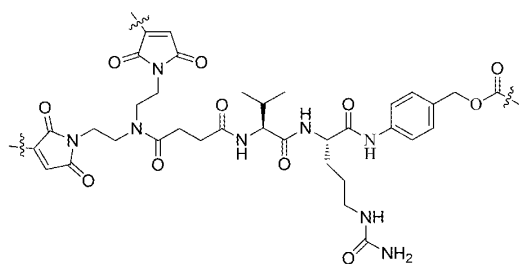
[27] 本发明所提供抗体药物偶联物优选的结构通式为 A-(L-U)_n，其中：所述 A 表示上述任一项所述的抗体或其抗原结合片段；所述 U 为活性药物单元；所述 L 为任一连接基团，其分别与抗体或其抗原结合片段 A 及活性药物单元 U 共价连接；n 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8；所述 A 可通过一个或多个连接基团 L 连接 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个活性药物单元 U。

[28] 所述的连接基团 L 与所述的靶向 c-Met 的抗体或抗原结合片段 A 上的氨基残基或巯基残基共价连接；优选的，所述的连接基团 L 与所述的靶

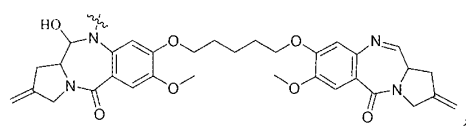
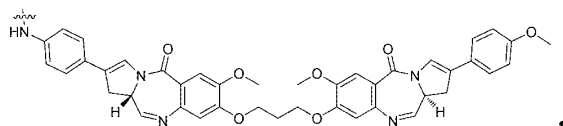
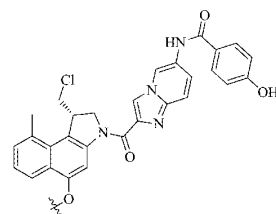
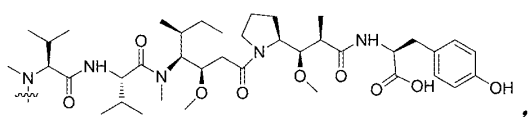
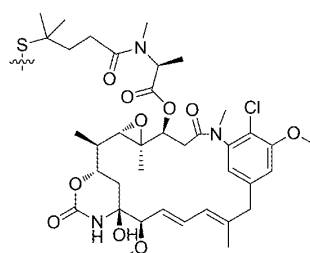
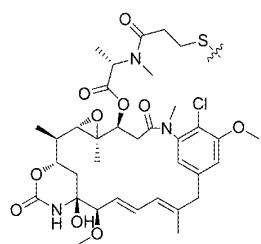
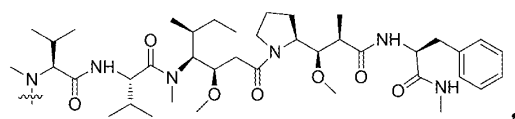
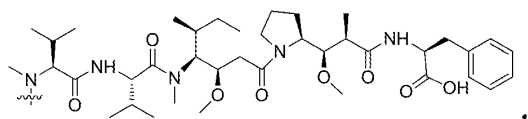
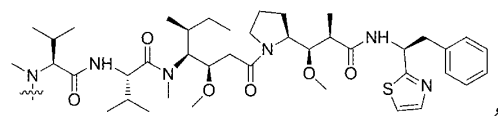
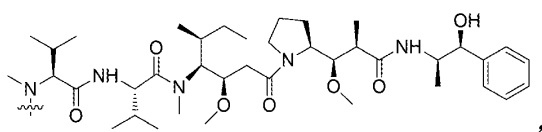
- 向 c-Met 的抗体或抗原结合片段 A 上的巯基残基共价连接；更优选的，所述的连接基团 L 与所述的靶向 c-Met 的抗体或抗原结合片段 A 上的链间二硫键打开后形成的巯基残基共价连接。所述的连接基团 L 包括可裂解连接子和不可裂解连接子。所述的可裂解连接子包含肽单元，所述的肽单元包含 2-20 个氨基酸，优选的所述的肽单元选自自由-缬氨酸-瓜氨酸-(-Val-Cit-)、-甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-(-Gly-Gly-Phe-Gly-)、-缬氨酸-丙氨酸-(-Val-Ala-)、-缬氨酸-赖氨酸-(-Val-Lys-)、-缬氨酸-精氨酸-(-Val-Arg-)、-苯丙氨酸-瓜氨酸-(-Phe-Cit-)、-苯丙氨酸-赖氨酸-(-Phe-Lys-)、-苯丙氨酸-精氨酸-(-Phe-Arg-)及它们的组合。
- [29] 在一些优选的实施例中，所述的 L 包括以下结构：

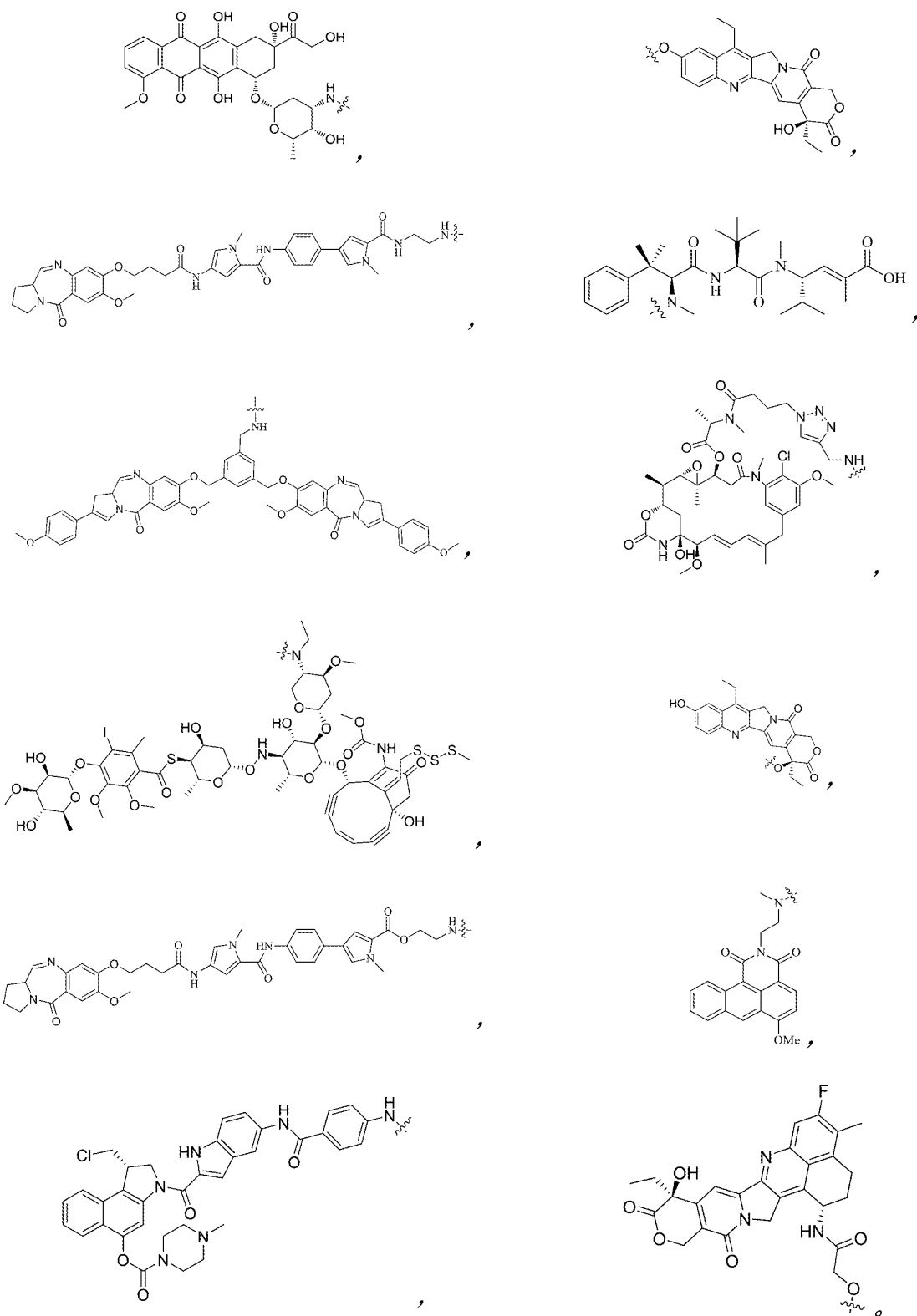




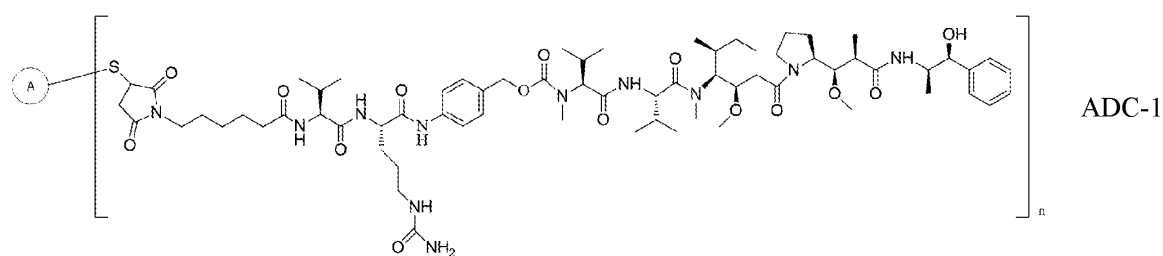


[30] 在一些优选的实施例中，所述的活性药物单元 U 选自以下结构：

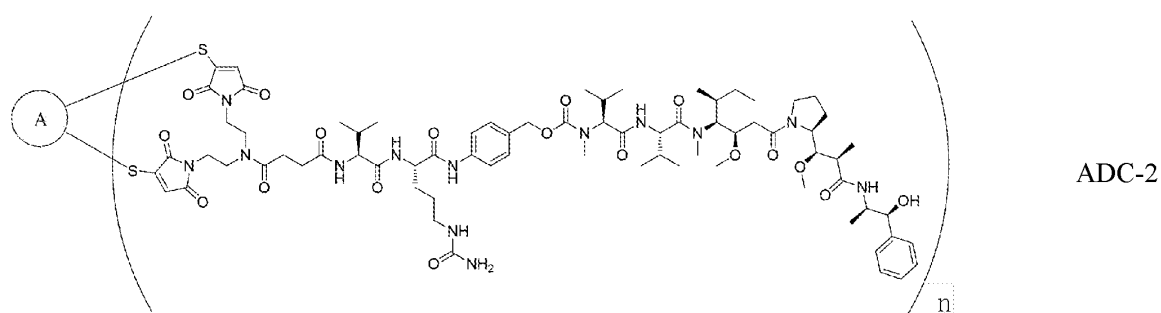




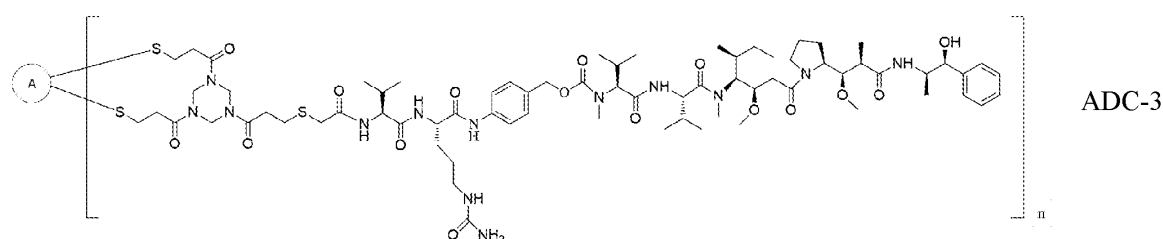
[31] 在一些优选的实施例中，所述抗体药物偶联物选自如下结构：



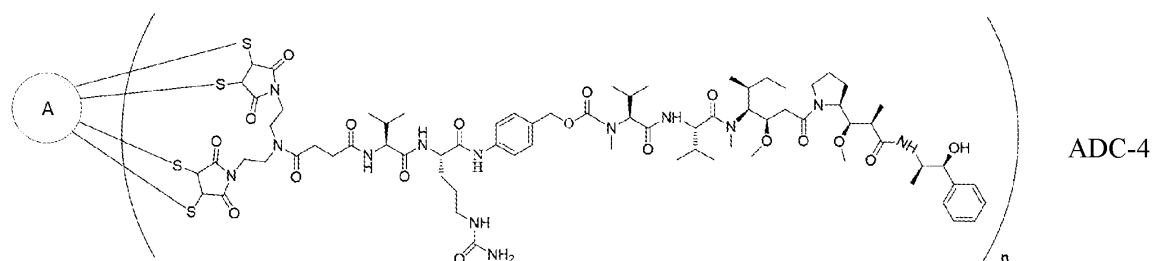
其中，ADC-1 中所述的 n 为选自 1、2、3、4、5、6、7、8 中的整数；或者



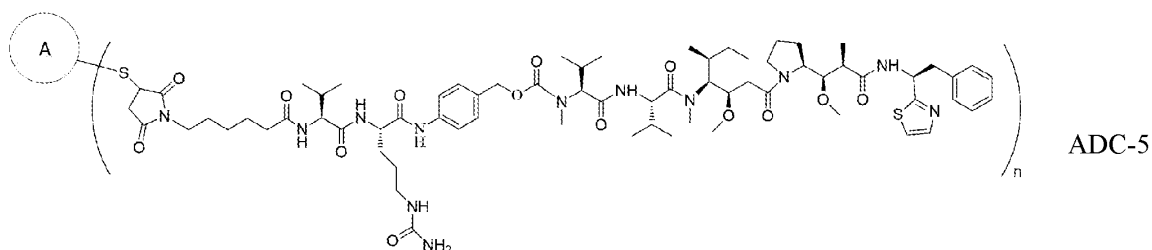
其中，ADC-2 中所述的 n 为选自 1、2、3、4 中的整数；或者



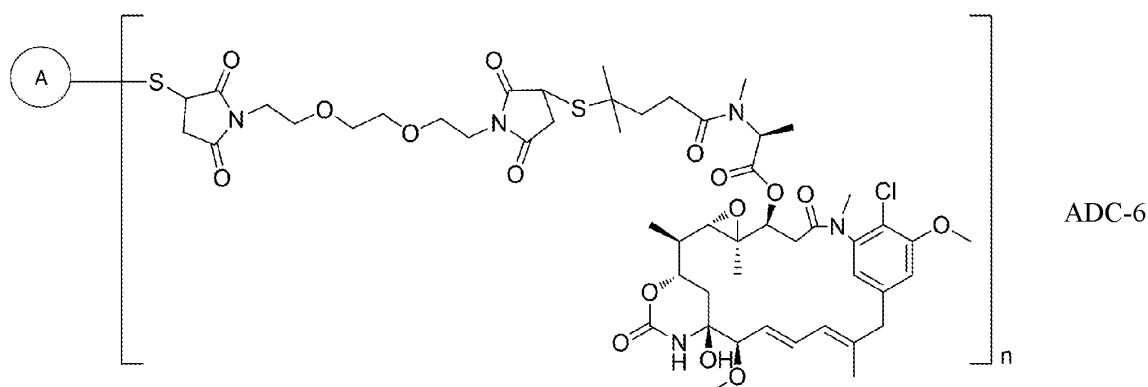
其中，ADC-3 中所述的 n 为选自 1、2、3、4 中的整数；或者



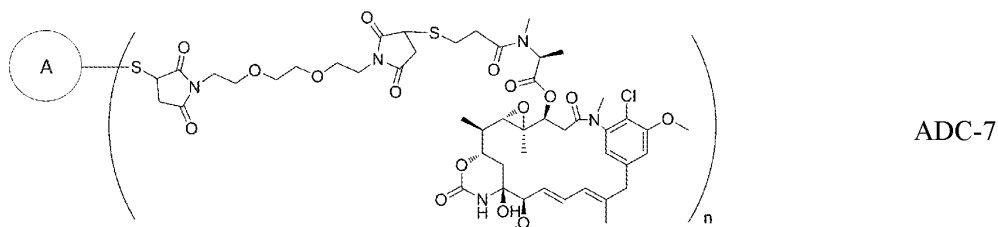
其中，ADC-4 中所述的 n 为选自 1、2 中的整数；或者



其中，ADC-5 中所述的 n 为选自 1、2、3、4、5、6、7、8 中的整数；或者



其中，ADC-6 中所述的 n 为选自 1、2、3、4、5、6、7、8 中的整数；或者



其中，ADC-7 中所述的 n 为选自 1、2、3、4、5、6、7、8 中的整数。

[32] 本发明还提供了一种药物组合物，其包含上述任一项的抗体或其抗原结合片段和/或抗体药物偶联物，以及可药用载体。

[33] 本发明还提供了上述任一项的抗体或其抗原结合片段、多核苷酸、核酸构建体、表达载体、抗体药物偶联物或药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[34] 在一些优选的实施例中，所述的癌症为 c-Met 阳性癌症。

[35] 在一些具体的实施例中，所述 c-Met 阳性癌症为肺癌和胃癌。

[36] 本发明还提供了一种疾病的治疗方法，该方法包括向有需要的患者施

用治疗有效量的上述任一项所述的抗体药物偶联物或药物组合物；其中，所述疾病为 c-Met 阳性癌症，优选为肺癌和胃癌。

[37] 本发明还提供了一种试剂盒，其包括容器、置于所述容器中的制剂和任选的说明书；其中所述制剂包含上述任一项所述的抗体、抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂合物以及药物组合物。

[38] 本发明还提供了上述任一项所述的抗体或其抗原结合片段、抗体药物偶联物、多核苷酸、核酸构建体、表达载体、或药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。其中，所述的癌症为实体瘤；所述实体瘤进一步的包括肺癌和胃癌。

[39] 本发明还提供了一种重组蛋白，其包括上述任一项的抗体或抗原结合片段。

[40] 上述所述的重组蛋白优选的为双特异性抗体或多特异性抗体，所述的多特异性抗体优选的如三特异性抗体、四特异性抗体、五特异性抗体等。

[41] 本发明还提供了上述任一项的抗体或抗原结合片段在制备重组蛋白中的应用。

附图说明

[42] 图 1 为人源化抗体 AAJ8D6 和嵌合抗体 cAAJ8D8 的亲和力对比图；

[43] 图 2 为人源化抗体 AAJ8D6 与 ABT-700 的结合力比较图；

[44] 图 3 为人源化抗体 AAJ8D6 与 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE、AAJ8D6-PY-Val-Cit-MMAE、AAJ8D6-D07-Val-Cit-MMAE 的内吞效果图；

[45] 图 4A、图 4B、图 4C、图 4D 为人源化抗体 AAJ8D6 及其抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 以及对照组的细胞毒活性对比图，其中图 4A 中的代表细胞株为 MKN-45、图 4B 的代表细胞株为 SNU-620、图 4C 的代表细胞株为 HT29、图 4D 的代表细胞株为 BXP-3；

[46] 图 5 为抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 及抗体药物偶联物 ABT-700-Mc-Val-Cit-MMAE 最大抑制率对比图；

[47] 图 6 为抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 及对照组对 MKN-45 荷瘤裸小鼠移植瘤疗效对比图；

[48] 图 7 为抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 及对照组对小鼠

(胃癌 GA0046) PDX 模型的疗效对比图;

[49] 图 8 为抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 及对照组对小鼠 (肺癌 LU2503) PDX 模型的疗效对比图。

具体实施方式

5 [定义]

[50] 除非另有定义, 本文使用的所有科技术语具有本领域普通技术人员所理解的含义。关于本领域的定义及术语, 专业人员具体可参考 Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。

10 [51] 定义

[52] 尽管本发明的广义范围所示的数字范围和参数近似值, 但是具体实施例中所示的数值尽可能准确的进行记载。然而, 任何数值本来就必然含有一定的误差, 其是由它们各自的测量中存在的标准偏差所致。另外, 本文公开的所有范围应理解为涵盖其中包含的任何和所有子范围。例如记载的
15 “1 至 10” 的范围应认为包含最小值 1 和最大值 10 之间(包含端点)的任何和所有子范围; 也就是说, 所有以最小值 1 或更大起始的子范围, 例如 1 至 6.1, 以及以最大值 10 或更小终止的子范围, 例如 5.5 至 10。另外, 任何称为“并入本文”的参考文献应理解为以其整体并入。

[53] 另外应注意, 如本说明书中所使用的, 单数形式包括其所指对象的复数形式, 除非清楚且明确的限于一个所指对象。术语“或”可与术语“和
20 /或”互换使用, 除非上下文另有清楚指明。

[54] 本文使用的术语“药物组合物”、“组合药物”和“药物组合”可互换地使用, 其表示组合在一起以实现某种特定目的的至少一种药物以及任
25 选地可药用载体或辅料的组合。在某些实施方案中, 所述药物组合物包括在时间和/或空间上分开的组合, 只要其能够共同作用以实现本发明的目的。例如, 所述药物组合物中所含的成分(例如根据本发明的抗体、核酸分子、核酸分子组合和/或抗体药物偶联物)可以以整体施用于对象, 或者分开施用于对象。当所述药物组合物中所含的成分分开地施用于对象时, 所述成分可以同时或依次施用于对象。优选地, 所述可药用载体是水、缓冲水溶液、等渗盐溶液如 PBS(磷酸盐缓冲液)、葡萄糖、甘露醇、右旋葡萄糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、纤维素、碳酸镁、0.3%甘油、透明质酸、
30 乙醇或聚亚烷基二醇如聚丙二醇、甘油三酯等。所用可药用载体的类型尤

其依赖于根据本发明的组合物是否配制为用于口服、鼻、皮内、皮下、肌内或静脉施用。根据本发明的组合物可包含润湿剂、乳化剂或缓冲液物质作为添加剂。

[55] 根据本发明的药物组合物、疫苗或者药物制剂可通过任何适宜的途径施用，例如可口服、鼻、皮内、皮下、肌内或静脉内施用。

[56] 本文使用的术语“治疗剂”表示能够起到治疗作用(例如治疗、预防、缓解或抑制任何疾病和/或病症)的任何物质或实体(entity)，其包括但不限于：化学治疗剂、放射治疗剂、免疫治疗剂、热治疗剂(thermally therapeutic agent)等。

[57] 本文使用的“CDR 区”或“CDR”是指免疫球蛋白的重链和轻链的高变区，如 Kabat et al. 所定义(Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, 以及以后版本)。存在三个重链 CDR 和三个轻链 CDR。根据情况，本文所用术语 CDR 或 CDRs 是为了指示这些区域之一、或者这些区域的几个或者甚至全部，所述区域包含通过抗体对抗原或其识别表位的亲和力而负责结合的大部分氨基酸残基。

[58] 对本发明来说，两种核酸或者氨基酸序列间的“一致性”、“同一性”或“相似性”是指，在最佳比对(最优比对)后所获得的、待比较的两序列之间相同核苷酸或相同氨基酸残基的百分数，该百分数是纯粹统计学的并且两种序列间的差异随机分布并覆盖其全长。两种核酸或者氨基酸序列之间的序列比较通常是在以最优方式使它们匹配以后，通过比较这些序列而进行，所述比较能够通过区段或者通过“比较窗”实施。除了能够手工实施外，用于比较序列的最优比对，还能够通过 Smith 和 Waterman(1981)[Ad.App.Math.2:482] 的局部同源性算法、通过 Needleman 和 Wunsch 的(1970)[J.Mol.Biol.48:443] 局部同源性算法、通过 Pearson 和 Lipman 的(1988)[Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444] 相似性搜索方法、通过使用这些算法的计算机软件实施(GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, 或者通过 BLAST N or BLAST P 比较软件)。

[59] 本文使用的“治疗有效量”或“有效量”是指足以显示其对于所施用对象益处的剂量。施用的实际量，以及施用的速率和时间过程会取决于所治疗者的自身情况和严重程度。治疗的处方(例如对剂量的决定等)最终是

全科医生及其它医生的责任并依赖其做决定，通常考虑所治疗的疾病、患者个体的情况、递送部位、施用方法以及对于医生来说已知的其它因素。

[60] 本文所使用的术语“对象”是指哺乳动物，如人类，但也可以是其它动物，如野生动物(如苍鹭、鸛、鹤等)，家畜(如鸭、鹅等)或实验动物(如猩猩、猴子、大鼠、小鼠、兔子、豚鼠、土拨鼠、地松鼠等)。

[61] 术语“抗体”包括单克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或包含抗原结合片段的重组蛋白；术语“抗原结合片段”包括 Fab 片段、F(ab') 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、dAb、Fd、单链抗体(scFv)、scFv-Fc 片段或者双抗体(diabody)、或者通过化学修饰或通过掺入脂质体中应能够增加半寿期的任何片段，所述化学修饰例如添加聚(亚烷基)二醇如聚乙二醇(“聚乙二醇化，PEG 化”)(被称为 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG 或 Fab'-PEG 的聚乙二醇化片段)(“PEG”为聚乙二醇)，所述片段具有 EGFR 结合活性。优选地，所述功能片段将由其来源抗体的重或轻可变链的部分序列构成或者包含它们，所述部分序列足以保留与其来源抗体相同的结合特异性和充分的亲和力，对于 EGFR，优选至少等于其来源抗体亲和力的 1/100，在更优选方式中至少等于 1/10。这种功能片段将包含最少 5 个氨基酸，优选其来源的抗体序列的 10、15、25、50 和 100 个连续氨基酸。

[62] 术语“人源化抗体”是指一种抗体，其包含来源于非人源抗体的 CDR 区、并且该抗体分子的其他部分来源于一种(或几种)人抗体。而且，为了保留结合亲和力，可以修饰骨架(称为 FR)区段的一些残基(Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986 ; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988 ; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988)。通过本领域技术人员已知的技术可以制备根据本发明的人源化抗体或其片段；

[63] 术语“嵌合抗体”系指以下抗体，其中的可变区序列来自一物种而恒定区序列来自另一物种，例如可变区序列来自小鼠抗体而恒定区序列来自人抗体的抗体。通过使用基因重组技术可以制备根据本发明的嵌合抗体或其片段。例如，所述嵌合抗体可以通过克隆重组 DNA 来生产，所述重组 DNA 包含启动子和编码根据本发明的非人尤其是鼠单克隆抗体可变区的序列、以及编码人抗体恒定区的序列。由这种重组基因编码的本发明嵌合抗体将是，例如，鼠-人嵌合体，该抗体的特异性由来源于鼠 DNA 的可变区确定，并且其同种型由来源于人 DNA 的恒定区来确定。对于制备嵌合

抗体的方法，例如，可以参考文件 Verhoeyn et al.(BioEssays,8:74,1988)。

[64] 术语“单克隆抗体”系指具有单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和性。

[65] 本文中所使用的术语“AAJ8D6 抗体”，除另有说明外，均指本发
5 人所得到的靶向 c-Met 的人源化单克隆抗体 AAJ8D6。

[66] 本文中所指 cAAJ8D6 抗体，指人-鼠嵌合抗体，包含鼠源可变区和人源恒定区。cAAJ8D6 抗体与 AAJ8D6 抗体的区别只在于可变区中框架区的不同，cAAJ8D6 的框架区为鼠源的，AAJ8D6 的框架区为人源的。

[67] 通常，为了制备单克隆抗体或其功能片段，尤其是鼠源的单克隆抗体
10 或其功能片段，可以参考尤其描述在手册“Antibodies”中的技术(Harlow and Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor NY,pp.726,1988)或者参考 Kohler 和 Milstein 描述的从杂交瘤细胞制备的技术(Nature,256:495-497,1975)。

[68] 根据本发明的单克隆抗体例如可以在亲和柱上纯化，已经预先在所述亲和柱上固定了 c-Met 抗原或其包含可被根据本发明所述单克隆抗体特异性识别的表位的片段之一。更具体而言，所述单克隆抗体可以如此纯化，通过蛋白质 A 和/或 G 色谱，接或不接目的在于消除残留蛋白质污染物以及 DNA 和 LPS 的离子交换色谱，其本身接或不接在 Sepharose 凝胶上的排阻色谱以消除由于二聚体或其他多聚体存在而潜在的聚集体。在更优选的方式中，全部这些技术可以同时或者连续使用。
20

[69] 本文使用的术语“海兔毒素肽(dolastatin)”是指分离自一种海洋生物截尾海兔(Dolabella auricularia)的多肽，其包括但不限于海兔毒素肽 10(dolastatin 10)和海兔毒素肽 15(dolastatin 15)。海兔毒素肽是有丝分裂抑制剂，其表现出强的抗癌活性，因此被作为抗癌药物的候选。研究人员进一步发现和合成了许多海兔毒素肽的衍生物，例如 MMAE 和 MMAF。
25

[70] 本文使用的术语“连接子”是指抗体药物偶联物(即 ADC)中将抗体与药物相连接的部分，其可以是可切割的或者不可切割的。可切割的连接子(即可断裂的接头或生物可降解接头)可以在靶标细胞内或其上断裂，从而释放药物。在某些实施方案中，本发明的连接子具有非常好的稳定性，大大减少了药物在递送到靶标过程中(例如在血液中)的释放，从而减少了副作用和毒性。在一些特定实施方案中，本发明的连接子选自可切割的连接子，例如基于二硫化物的连接子(其在巯基浓度更高的肿瘤细胞中选择性
30

断裂)、肽连接子(其被肿瘤细胞中的酶所切割)、腈接头。在另一些特定实施方案中,本发明的接头选自不可切割的连接子,例如硫醚连接子。优选地,本发明的接头选自可切割的 mc-vc-PAB 连接子和不可切割的 mc 连接子。

5 [具体实施例]

[71] 实施例 1 人源化的 c-Met 抗体的制备及其氨基酸序列的确定

[72] 根据 c-Met 鼠源抗体 mAAJ8D6 进一步设计了多种嵌合抗体和人源化抗体并进行亲和力比较,最终确定候选的嵌合 c-Met 抗体 cAAJ8D6 和人源化抗抗体 AAJ8D6。

10 表 2. AAJ8D6 重链可变区和轻链可变区 CDR 1-3 (Kabat 法)

重链	HCDR1	SEQ ID NO:1	SYWMH
	HCDR2	SEQ ID NO:2	MIDPSDSESRLNQKFKD
	HCDR3	SEQ ID NO:3	SGYHGTSYWYFDV
轻链	LCDR1	SEQ ID NO:4	RSSKSLLHSDGITYLY
	LCDR2	SEQ ID NO:5	QMSNLAS
	LCDR3	SEQ ID NO:6	AQNLELPPT

[73] 抗 c-Met 人源化抗体 AAJ8D6 重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:7):

QVQLEQSGPE VVKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMHWVRQA PGQGLEWMGM IDPSDSESRL 60
 NQKFKDRVTM TVDTPSTVY MELSSPRSED TAVYYCARSG YHGTSYWYFD VWGQGTILTV 120
 SS 122

[74] 抗 c-Met 人源化抗体 AAJ8D6 轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:8):

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSLL HSDGITYLYW YLQKPGQSPQ LLIYQMSNLA 60
 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP PTFGGGTKVE IKRTV 115

[75] 抗 c-Met 人源化抗体 AAJ8D6 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:9) :

QVQLEQSGPE VVKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMHWVRQA PGQGLEWMGM IDPSDSESRL 60
 NQKFKDRVTM TVDTPSTVY MELSSPRSED TAVYYCARSG YHGTSYWYFD VWGQGTILTV 120
 SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ 180
 SSGLYSLSSV VTPVSSSLGT QTYICNVNHNK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL 240
 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ 300

YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR360

EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS420

RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK452

[76]抗 c-Met 人源化抗体 AAJ8D6 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:10) :

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSLH HSDGITYLYW YLQKPGQSPQ LLIYQMSNLA60

SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVV YYCAQNLELP PTFGGGTKVE IKRTVAAPSV120

FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKSTYSL180

SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC219

[77]实施例 2 嵌合的 cAAJ8D6 和人源化抗体 AAJ8D6 亲和力比较

[78]用 ELISA 法测定嵌合的 cAAJ8D6 和人源化抗体 AAJ8D6 的亲和力，以可溶性 ED 蛋白包被 96 孔板，之后与稀释的抗体一起孵育，对于与 ED 相关的抗体用 HRP-偶联的羊 F(ab')₂ 抗-人 IgG Fc-特异性二抗进行检测。使用 GraphPaD Prism 软件，将 X 变为 logX，使用剂量反应曲线拟合作图，拟合曲线见图 1。

[79]从图 1 给出的实验结果可知：AAJ8D6 与 cAAJ8D6 相比，通过人源化改造后的抗体 AAJ8D6 相对于嵌合抗体 cAAJ8D6，不仅结合亲和力未降低，反而有了更为显著的提升，同样的结合强度下，需要的抗体量降低一半以上，具体结果见表 3：

表 3 人源化抗体与嵌合抗体的平均亲和常数比较

名称	EC50 (ng/mL)	R ²
AAJ8D6	3.529	0.9923
cAAJ8D6	7.830	0.9988

[80]实施例 3 人源化抗体 AAJ8D6 与竞品 ABT-700 的结合力比较

[81]释液配置 c-Met 蛋白至终浓度 2 μg/ml，加入酶标板，每孔 100 μl，4℃过夜；弃去孔内溶液，PBST 洗涤 3 次；加入封闭液，300 μl/孔，37℃，孵育 2h；弃去孔内溶液，PBST 洗涤 3 次；将 AAJ8D6 抗体和 ABT-700（即 telisotuzumab，也称特立妥单抗，其序列信息参见 https://extranet.who.int/soinn/mod/page/view.php?id=137&inn_n=10366，下同）稀释 9 个浓度点，加入 96 孔板，孵育 2h；弃去孔内溶液，PBST 洗涤 3 次；加入稀释液配置 HRP 检测抗体，稀释度为 1:5000，每孔 100

μl, 37℃, 孵育 1h; 弃去孔内溶液, PBST 洗涤 3 次; 加入 TMB 显色液室温孵育 2min, 随后加入 Elisa 终止液, 上机读数, 获得数据, 结果见表 4 及图 2。

[82]从表 4 和图 2 可以看出, AAJ8D6 的 EC50 值为 0.54ng/ml, ABT-700 的 EC50 值为 1.33ng/ml, 结果表明, AAJ8D6 抗体与 c-Met 抗原的结合能力明显优于 ABT-700。

表 4 AAJ8D6 和 ABT-700 与 c-Met 抗原的结合能力比较

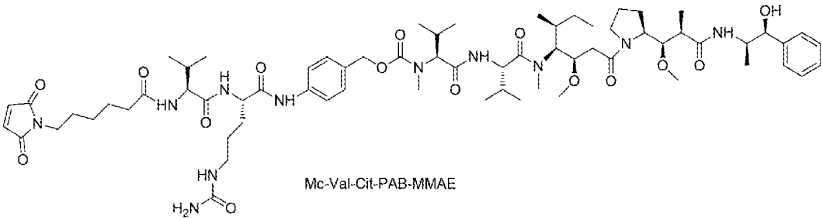
	AAJ8D6	ABT-700
EC50 (ng/ml)	0.54	1.33

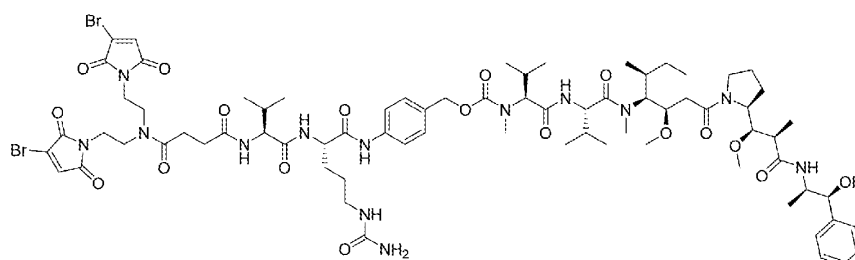
[83]实施例 4 抗体药物偶联物的制备

[84]抗体药物偶联物的制备采用通用的偶联方法: 用纯化水分别配制还原剂和保护剂如下: 1~20 mM TCEP (Tris-2-carboxyethyl-phosphine)、1~20 mM DTPA (Diethylene triamine pentacetate acid)母液, 还原剂用量根据所需偶联率不同可在一定浓度范围内添加, 与一定浓度单克隆抗体(如: 5~30 mg/mL) 按照一定体积比 (1:1) 混合, TCEP 与抗体的终浓度摩尔比 0.5~6.0:1, 于 25℃搅拌反应 1h。TCEP 还原后的抗体可直接进行偶联。

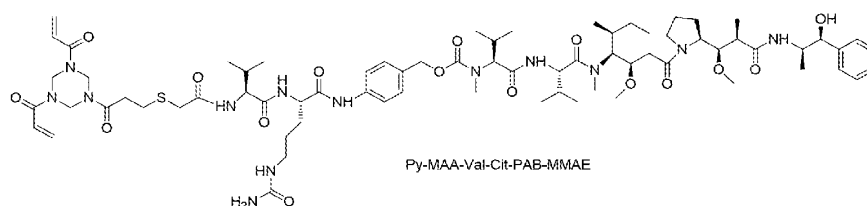
[85]配制一定浓度(5mM)连接子-活性药物单元化合物溶于 25%的 DMSO (dimethyl sulfoxide, 二甲亚砜), 按照药物与巯基的摩尔比 0.3~2.8:1 缓慢加药, 于 25℃搅拌反应 1-4h。反应结束后, 用 PBS 缓冲液离心超滤 3 次, 纯化去除残余未反应药物以及 DMSO 等游离小分子, 并且利用 SDS-PAGE 电泳和疏水高效液相 (HIC-HPLC) 法检测偶联情况。

[86]本实施例采用的连接子 - 活性药物单元化合物为 Mc-Val-Cit-PAB-MMAE 、 D07-Val-Cit-PAB-MMAE 和 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE, 其结构式分别如下所示(合成方法分别参见专利申请 CN108853514A (说明书第 14 页), CN111433188A (说明书第 53 页), WO2019223579A1 (说明书第 25-27 页))。





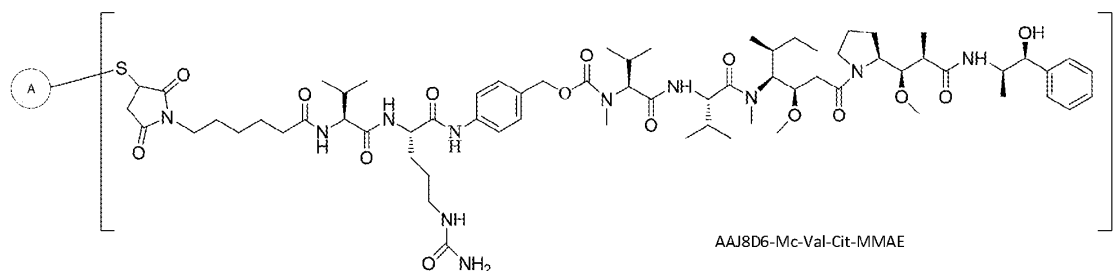
D07-Val-Cit-PAB-MMAE



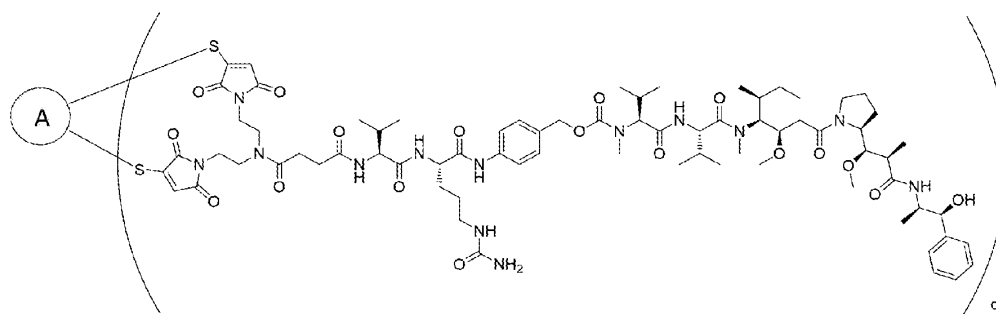
Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE

[87]利用上述方法制备了如下 ADC (p 为选自 1、2、3、4、5、6、7、8 的整数, q 为选自 1、2、3、4 的整数, Ab 为本发明提供的 AAJ8D6 抗体), 这些 ADC 的平均 DAR 为 4。

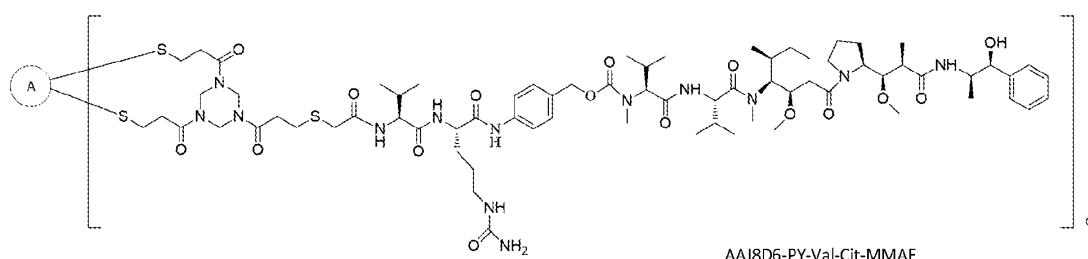
5



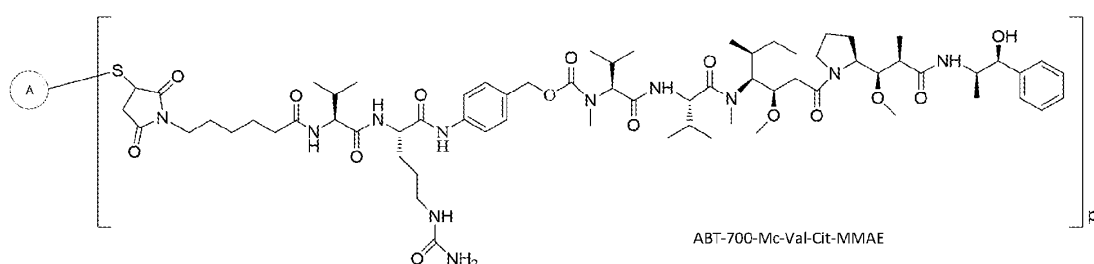
AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE



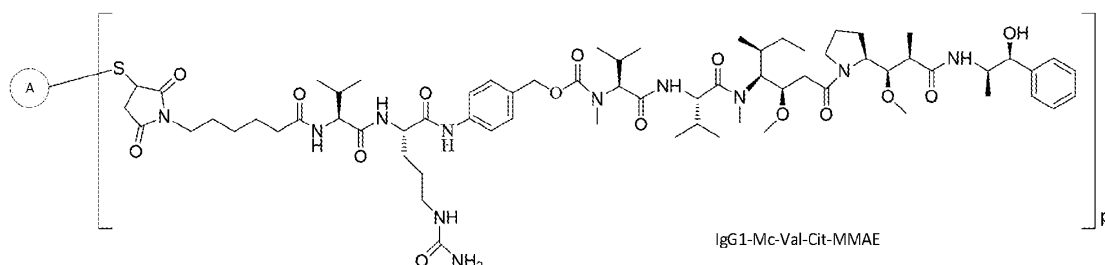
AAJ8D6-D07-Val-Cit-PAB-MMAE



[88] 除此之外，本实施例还制备了抗体部分为 ABT-700 抗体，连接基团为 Mc-Val-Cit-PAB，活性药物单元为 MMAE 的抗体药物偶联物，p 为选自 1、2、3、4、5、6、7、8 的整数，其平均 DAR 为 4。



[89] 除此之外，本实施例还制备了人免疫球蛋白 IgG1 和 Mc-Val-Cit-PAB 以及 MMAE 的抗体药物偶联物 (即 IgG1-Mc-Val-Cit-PAB)，p 为选自 1、2、3、4、5、6、7、8 的整数，其平均 DAR 为 4。



[90] 实施例 5 细胞内吞实验

[91] 将 HT29 细胞以每孔约 1×10^5 个细胞重悬于 6 孔板中。将 AAJ8D6 抗体、AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE、AAJ8D6-PY-Val-Cit-MMAE、AAJ8D6-D07-Val-Cit-MMAE 分别与 pHAb 胺反应性染料缀合，然后用细胞培养基稀释至 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。将 $100 \mu\text{l}$ AAJ8D6 抗体、AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE、AAJ8D6-PY-Val-Cit-MMAE、AAJ8D6-D07-Val-Cit-MMAE 的染料复合物加入到细胞中，在指示时间 (0 小时、1 小时、3 小时、5 小时、21 小时和 24 小时) 下于 37°C 温育。通过流式细胞仪测量 AAJ8D6 抗体、AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE、

AAJ8D6-PY-Val-Cit-MMAE、AAJ8D6-D07-Val-Cit-MMAE 的内吞效果。24 小时后,样品在 HT29 细胞中内吞明显;3 小时后,内吞效果均在 90% 左右,可见本发明提供的人源化抗体和制备的 ADC 均具有良好的内吞效果,将能够将药物高效传递到靶细胞中。结果如图 3 所示。

5 [92] 实施例 6 人源化抗体 AAJ8D6 及其抗体药物偶联物 (AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE) 的细胞毒活性

[93] 将指数倍增期的不同 c-Met 表达水平的细胞 MKN-45、SNU-620、HT29、BXP-3 分别接种于 96 孔板。37°C、5% CO₂ 培养箱孵育过夜。将 AAJ8D6、AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE、IgG1-Mc-Val-Cit-PAB 用完全培养基配制为浓度 1.25~2000 ng/mL, MMAE 用完全培养基配制为浓度 0.0021~80 ng/mL, 100 μL 加入孔中, 每个浓度设立 3 个复孔, 同时设置空白对照组。药物作用 72±2 h 后, 加 CCK-8 试剂, 37°C、5% CO₂ 培养箱孵育 1~4 h, 于酶标仪 450 nm 处检测各孔的 OD 值。计算抑制率 $IR\% = (OD_{\text{空白}} - OD_{\text{药物}}) \times 100 / OD_{\text{空白}}$ 。将抑制率和药物浓度进行四参数拟合, 计算 IC₅₀。

[94] 结果及结论: 如图 4A、图 4B、图 4C、图 4D 所示, AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 的细胞毒性活性与细胞株 c-Met 表达量正相关, AAJ8D6 对靶细胞不具备细胞毒作用, AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 的细胞毒性主要来源于 MMAE, 与 IgG1-Mc-Val-Cit-PAB 相比, 具有明显的靶向性。

[95] 实施例 7 抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 与抗体药物偶联物 ABT-700-Mc-Val-Cit-MMAE 的体外药效差异

[96] 将人结肠癌细胞 HT29 细胞株悬液以 100 μL/孔、5000 个/孔的密度加到 96 孔板中, 置于水饱和的 37°C 的 CO₂ 培养箱培养过夜。将抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 和抗体药物偶联物 ABT-700-Mc-Val-Cit-MMAE 进行梯度稀释并加到含有细胞的 96 孔板中, 100 μL/孔。继续置于 37°C 培养箱中培养 72 小时。酶标仪读取 450 nm 处 OD 值, 抑制率计算公式为: $IR\% = (OD_{\text{空白}} - OD_{\text{药物}}) \times 100 / OD_{\text{空白}}$ 。由曲线拟合软件 Softmax Pro7.0.3 Gxp 计算得 IC₅₀ 值。

[97] 结果如表 5 和图 5 所示。实验结果表明, AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 的 IC₅₀ 最大抑制率显著优于抗体药物偶联物 ABT-700-Mc-Val-Cit-MMAE。表明 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 的体外

药效优于抗体药物偶联物 ABT-700-Mc-Val-Cit-MMAE。

表 5 抗体药物偶联物的体外细胞最大抑制率结果

ADC	抑制率 (%)
AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE	93.62
ABT-700-Mc-Val-Cit-MMAE	66.28

[98] 实施例 8 抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 对人胃癌细胞 MKN-45 在 Balb/c 裸小鼠皮下移植瘤疗效

[99] 取 42 只 6-7 周龄 Balb/c 裸小鼠, 在小鼠右腋下靠背部皮下植入 0.1 mL MKN-45 细胞悬液 (2.4×10^6 cells/只), 待肿瘤生长至约 100~300mm³ 时, 按照肿瘤体积大小随机分组, 分为 Vehicle(PBS)组, IgG1-Mc-Val-Cit-PAB (3mg/kg) 组, 抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE (0.75 mg/kg) 组, 抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE (1.5 mg/kg) 组, 抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE (3 mg/kg), 人源化抗体 AAJ8D6 (3 mg/kg) 组, 每组 6 只荷瘤鼠, 各组均静脉注射给药, 每周给药 1 次, 共给药 3 次, 给药期间每周测量 2 次肿瘤长径、短径及体重。给药后第 21 天时计算肿瘤抑制率(TGI_{RTV})进行药效评价。

[100] 计算公式:

[101] 肿瘤体积: $TV = D1 \times D2^2 / 2$, 其中 D1、D2 分别表示瘤长径、瘤短径;

[102] 相对肿瘤体积: $RTV = TV_n / TV_0$, 其中 TV_0 为给药前肿瘤体积, TV_n 为每次测量时肿瘤体积;

[103] 相对肿瘤抑制率: $TGI_{RTV}(\%) = (1 - T_{RTV} / C_{RTV}) \times 100\%$, T_{RTV} 表示给药组或阳性对照组 RTV, C_{RTV} 表示阴性对照组 RTV。

表 6 各实验组和对照组作用于 MKN-45 裸小鼠皮下移植瘤体积以及抑制率

分组	剂量(mg/kg)	TV(mm ³)		TGI _{RTV} %
		D0	D21	
Vehicle(PBS)	--	201±25	1509±276	--
AAJ8D6	3	200±24	1633±77	-15
IgG1-Mc-Val-Cit-PAB	3	201±23	1314±177	11
AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE	0.75	200±22	1135±74	22
	1.5	203±23	415±50	70

	3	201±22	36±9	99
--	---	--------	------	----

[104] 结果及结论：各实验组和对照组对 MKN-45 裸小鼠皮下移植瘤抑制作用分别如表 6 和图 6 所示，其中表 6 为各实验组和对照组对 MKN-45 裸小鼠皮下移植瘤体积以及抑制率，图 6 为给药后肿瘤生长曲线。实验结果表明，抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 对 MKN-45 裸小鼠皮下移植瘤具有显著的抑瘤作用。

[105] 实施例 9 抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 对小鼠 PDX 模型（胃癌 GA0046）的疗效

[106] 小鼠胃癌 GA0046 的 PDX 模型（即人源性组织异种移植，patient-derived xenografts）是通过将人胃癌患者的肿瘤组织移植至重症免疫缺陷型小鼠体内构建，胃癌组织在小鼠体内生长，形成移植瘤。

[107] 挑取肿瘤生长状态良好的荷瘤鼠安乐死，取下肿瘤后切成小块（直径 2-3mm），然后接种于小鼠右侧肩部，建立胃癌皮下模型。定期观察肿瘤生长情况，待肿瘤生长至平均体积约 100~150 mm³ 时根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药，按照肿瘤体积大小随机分组，分为 Vehicle(PBS) 组，抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE（10 mg/kg）组，IgG1-Mc-Val-Cit-PAB（10mg/kg）组，每组 6 只荷瘤鼠，各组静脉注射给药，每周给药 1 次，共给药 2 次，共给药 21 次。给药期间每周测量 2 次肿瘤长径、短径及体重。给药后第 21 天时计算肿瘤抑制率(TGI_{RTV})进行药效评价。

[108] 计算公式：

[109] 肿瘤体积：TV=D1×D2²/2，其中 D1、D2 分别表示瘤长径、瘤短径；

[110] 相对肿瘤体积：RTV=TV_n/TV₀，其中 TV₀ 为给药前肿瘤体积，TV_n 为每次测量时肿瘤体积；

[111] 相对肿瘤抑制率：TGI_{RTV}(%)=(1-T_{RTV}/C_{RTV})×100%，T_{RTV} 表示给药组或阳性对照组 RTV，C_{RTV} 表示阴性对照组 RTV。

[112] 结果及结论：各实验组和对照组对小鼠胃癌 PDX 模型（GA0046）肿瘤抑制作用分别如表 7 和图 7 所示，其中表 7 为小鼠胃癌 PDX 模型（GA0046）肿瘤体积以及抑制率，图 7 为给药后肿瘤生长曲线。结果显示，抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 以 10mg/kg 剂量单对胃癌 GA0046PDX 肿瘤模型具有显著的抗肿瘤效果。

表 7 抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 作用于小鼠胃癌 GA0046 的 PDX 模型后肿瘤体积以及抑制率

组别	肿瘤体积 (mm ³)		抑制率 (%)
	TV _{D0}	TV _{D21}	
Vehicle(PBS)	133.90±18.34	1048.57±112.90	--
IgG1-Mc-Val-Cit-PAB	134.55±26.59	609.72±114.26	42.13
AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE	131.38±17.85	0.00±0.00	100.00

[113] 实施例 10 抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 对小鼠 PDX 模型（肺癌 LU2503）的疗效

5 [114] 小鼠肺癌 LU2503 的 PDX 模型（即人源性组织异种移植，patient-derived xenografts）是通过将人肺癌患者的肿瘤组织移植至重症免疫缺陷型小鼠体内构建，肺癌组织在小鼠体内生长，形成移植瘤。

[115] 挑取肿瘤生长状态良好的荷瘤鼠安乐死，取下肿瘤后切成小块（直径 2-3mm），然后接种于小鼠右侧肩部，建立肺癌皮下模型。定期观察肿瘤生长情况，待肿瘤生长至平均体积约 150mm³ 时根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药，分为 Vehicle(PBS)组，人源化抗体 AAJ8D6（10 mg/kg）组，抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 低、中、高（1.1、3.3、10 mg/kg）组，每组 6 只荷瘤鼠，抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 及人源化抗体 AAJ8D6 组静脉注射给药，每周给药 1 次，共给药 2 次。给药期间每周测量 2 次肿瘤长径、短径及体重。给药后第 21 天时计算肿瘤抑制率(TGI_{RTV})进行药效评价。

[116] 计算公式：

[117] 肿瘤体积：TV=D1×D2²/2，其中 D1、D2 分别表示瘤长径、瘤短径；

20 [118] 相对肿瘤体积：RTV=TV_n/TV₀，其中 TV₀ 为给药前肿瘤体积，TV_n 为每次测量时肿瘤体积；

[119] 相对肿瘤抑制率：TGI_{RTV}(%)=(1-T_{RTV}/C_{RTV})×100%，T_{RTV} 表示给药组或阳性对照组 RTV，C_{RTV} 表示阴性对照组 RTV。

25 [120] 结果及结论：各实验组和对照组对小鼠肺癌 PDX 模型（LU2503）肿瘤抑制作用分别如表 8 和图 8 所示，其中表 8 为小鼠肺癌 PDX 模型（LU2503）肿瘤体积以及抑制率，图 8 为给药后肿瘤生长曲线。结果显示，抗体药物偶联物 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 以 1.1mg/kg、3.3mg/kg、

10mg/kg 剂量单独使用对 LU2503 肿瘤模型有显著的抗肿瘤效果，尤其是 3.3mg/kg、10mg/kg 组小鼠肿瘤完全消失。

表 8 ADC 对小鼠 PDX 模型（LU2503）肿瘤体积以及抑制率

组别	剂量(mg/kg)	肿瘤体积(mm ³)		抑制率 (%)
		TV _{D0}	TV _{D21}	
Vehicle(PBS)	--	150.43±6.69	1864.30±228.19	--
AAJ8D6	10	157.05±9.21	1165.02±163.71	37.60
AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE	1.1	150.47±8.46	270.61±116.64	85.49
	3.3	150.53±8.21	0.00±0.00	100.00
	10	150.33±6.47	0.00±0.00	100.00

[121]上述实施例显示，本发明提供的抗体药物偶联物
5 AAJ8D6-Mc-Val-Cit-MMAE 具有十分显著的针对 c-Met 阳性肿瘤的治疗效果。

[122]本文中应用了具体实施例对本发明的原理及实施方式进行了阐述，以上实
施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其中心思想。应当指出，对于本
领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以对本发明进
10 行若干改进和修饰，这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护。