



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102018000009282
Data Deposito	09/10/2018
Data Pubblicazione	09/04/2020

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	16	28

Titolo

NUOVO AGENTE TERAPEUTICO PER IL TRATTAMENTO DI UN TUMORE E/O METASTASI

Descrizione dell'invenzione industriale con titolo:

"Nuovo agente terapeutico per il trattamento di un tumore e/o metastasi"

Di: Metis Precision Medicine SB S.r.l., nazionalità italiana, Via Magenta, 35 - 10128 Torino

Inventori Designati: Elisa VIGNA, Cristina BASILICO, Tiziana CREPALDI, Paolo Maria COMOGLIO

Depositata il: 9 Ottobre 2018

TESTO DELLA DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente descrizione riguarda un nuovo agente terapeutico derivato da anticorpi per il trattamento di un tumore e/o metastasi.

Sfondo

Il cancro è una malattia genetica in cui geni somatici endogeni subiscono mutazioni. Solo un piccolo gruppo di geni, noti come oncogeni e geni oncosoppressori, sono alterati nelle cellule cancerose e inducono la tumorigenesi. Gli oncogeni attivati sono acceleratori e i geni oncosoppressori inattivati mancano dei freni per la crescita delle cellule cancerose. In seguito alla scoperta di geni mutati cancerogeni, è emerso un nuovo concetto per gli oncogeni: la "dipendenza da oncogene", che indica che una cellula cancerosa, nonostante la sua abbondanza di alterazioni genetiche, dipende ancora da una singola proteina oncogena per la sua prolungata proliferazione o sopravvivenza. Pertanto, sono state intraprese nuove incursioni terapeutiche per sviluppare una "terapia mirata" per curare il cancro. Negli ultimi 20 anni, il targeting

farmacologico di proteine codificate da geni mutati cancerogeni - attraverso farmaci chimici o anticorpi - ha rappresentato l'armamentario all'avanguardia per eliminare le cellule mutate e combattere una malattia cancerosa. Le terapie mirate promettono di essere più efficaci delle chemioterapie citotossiche convenzionali, spesso con minori effetti collaterali. Tuttavia, è credibile che solo i pazienti portatori nei loro tumori del gene bersaglio specifico alterato beneficino della terapia mirata. Pertanto, è necessaria una medicina personalizzata in parallelo per valutare le lesioni genetiche bersagliabili da un farmaco attraverso un profilo genomico completo del tumore del paziente.

L'oncogene MET codifica per una tirosina chinasi recettoriale unica dotata di funzioni pleiotropiche. Quando è geneticamente alterato (per effetto di mutazioni puntiformi, fusione genica, traslocazione e/o amplificazione), MET avvia la trasformazione delle cellule in virtù della sua capacità di attivare il programma di crescita invasiva. Pertanto, le lesioni genetiche di MET che portano alla iperattivazione di Met chinasi costitutiva iniziano e mantengono il fenotipo trasformato ("dipendenza da MET").

Lesioni genetiche di MET sono presenti nella maggior parte dei tumori solidi con una frequenza complessiva dell'1-4% e sono in grado di sovraregolare la sua attività di chinasi¹. Mutazioni puntiformi sono concentrate in domini critici per il legame con il ligando Fattore di Crescita degli Epatociti (HGF) o per la segnalazione del recettore (dominio SEMA, dominio juxtamembrana e dominio

catalitico). Più di recente, il sequenziamento di prossima generazione ha rivelato mutazioni nel sito di splicing dell'esone 14 nel 3% dei cancri del polmone non a piccole cellule², che portano al salto di esone e alla delezione della regione juxtamembrana del trascritto di MET, dove un residuo di serina (Ser985) regola negativamente l'attività di Met chinasi³ e un residuo di tirosina (Tyr1003) è richiesto per l'internalizzazione e la degradazione di Met⁴.

Nel programma di "crescita invasiva" provocato da MET, la risposta proliferativa è accoppiata con migrazione, sopravvivenza, degradazione della matrice extracellulare e induzione della polarità cellulare⁵. Queste risposte biologiche sono escogitate dalle cellule per adattarsi alle condizioni avverse e/o fuggire per trovare un ambiente più conveniente. In un contesto ostile, Met è sovraespresso - tramite sovraregolazione trascrizionale - per effetto di una varietà di stimoli quali ipossia, citochine infiammatorie, fattori pro-angiogenici, mitogeni e persino l'HGF stesso. Infine, Met è sovraespresso in condizioni di danno al DNA indotto da radiazioni e questo contribuisce alla resistenza alla radioterapia promuovendo l'attivazione della riparazione del DNA e l'espedito della morte cellulare programmata delle cellule cancerose.

Diverse molecole aventi Met come bersaglio sono state sviluppate per cancellare la segnalazione di Met iperattivo in modo selettivo, energetico ed altamente efficace. Questi farmaci comprendono: antagonisti dell'HGF (esche o anticorpi bloccanti), mAb aventi come bersaglio il recettore Met, e inibitori chimici della tirosina chinasi

(TKI). mAb anti-Met rappresentano potenzialmente un passo importante nella battaglia contro i cancro attivati da MET. Attualmente, quattro mAb anti-Met sono entrati in studi clinici iniziali: MetMab (Onartuzumab, Roche), LY2875358 (Emibetuzumab, Eli Lilly & Company), ARGX-111 (Argenx), SAIT301 (Samsung) e Sym015 (Symphogen A/S), una miscela di due anticorpi. Essi agiscono bloccando il legame di HGF con MET in modo competitivo (Onartuzumab, ARGX-111) e/o sottoregolando MET (Emibetuzumab, SAIT301, Sym015).

mAb DN30 murino (descritto in WO 2007/090807) è una IgG2A che lega il dominio extracellulare del recettore Met umano e induce solo alcuni degli effetti biologici innescati da Met⁶. Esso attiva parzialmente la fosforilazione del recettore per la sua natura bivalente che consente il legame simultaneo con due distinte molecole di antigene, con conseguente stabilizzazione dei complessi recettoriali analogamente a quanto si ottiene con ligandi naturali. Questa attività agonista parziale indesiderata su Met non è stata osservata nel frammento Fab DN30 monovalente (MvDN30)⁷.

Sintesi dell'invenzione

Lo scopo della presente descrizione è quello di fornire un nuovo agente antitumorale derivato da un anticorpo monoclonale utile nel trattamento di pazienti oncologici, vale a dire l'anticorpo monoclonale DN30.

Secondo l'invenzione, il suddetto scopo viene raggiunto grazie all'oggetto richiamato specificamente nelle rivendicazioni che seguono, intese come parte integrante della presente descrizione.

La presente invenzione riguarda un frammento anticorpale anti-Met comprendente un singolo braccio legante l'antigene e una regione Fc, in cui la regione Fc comprende un complesso di un primo e un secondo polipeptide Fc. Il frammento anticorpale comprende:

(i) un primo polipeptide comprendente un dominio variabile della catena leggera (VL) umanizzata, e un dominio costante della catena leggera (CL) umana, in cui il dominio variabile della catena leggera (VL) umanizzata è fuso al dominio costante della catena leggera (CL) umana nella direzione dal terminale N al terminale C, e in cui il dominio variabile della catena leggera (VL) umanizzata contiene tre regioni determinanti la complementarità (CDR) aventi le sequenze amminoacidiche riportate in SEQ ID No.: 1, 2 e 3;

(ii) un secondo polipeptide comprendente un dominio variabile della catena pesante (VH) umanizzata, un dominio costante CH1 della catena pesante umana e il primo polipeptide Fc, in cui il primo polipeptide Fc comprende una regione cerniera umana, un dominio costante CH2 umano e un dominio costante CH3 umano, in cui il dominio variabile della catena pesante (VH) umanizzata è fuso al dominio costante CH1 della catena pesante umana, che è fuso alla regione cerniera umana, che è fusa al dominio costante CH2 umano, che è fuso al dominio costante CH3 umano nella direzione dal terminale N al terminale C, e in cui il dominio variabile della catena pesante (VH) umanizzata contiene tre regioni determinanti la complementarità (CDR) aventi le sequenze amminoacidiche riportate in SEQ ID No.: 4, 5 e 6;

(iii) un terzo polipeptide comprendente il secondo polipeptide Fc umano, in cui il secondo polipeptide Fc umano comprende una regione cerniera, un dominio costante CH2 umano e un dominio costante CH3 umano, in cui la regione cerniera è fusa al dominio costante CH2 umano che è fuso al dominio costante CH3 umano nella direzione dal terminale N al terminale C, in cui la regione cerniera è troncata al terminale N.

La presente invenzione riguarda anche un prodotto comprendente, in un singolo flacone o in due flaconi, (a) il frammento anticorpale anti-Met come sopra definito, e un veicolo farmaceuticamente accettabile, e (b) una porzione extracellulare di Met umano e un veicolo farmaceuticamente accettabile, in cui la porzione extracellulare di Met umano è in grado di legarsi al Fattore di Crescita degli Epatociti (HGF) in modo stabile e contiene almeno una mutazione amminoacidica all'interno dell'epitopo riconosciuto dal frammento anticorpale anti-Met per impedire il legame del frammento anticorpale anti-Met con esso.

Breve descrizione dei disegni

L'invenzione verrà ora descritta dettagliatamente, a puro titolo di esempio illustrativo e non limitativo e con riferimento ai disegni allegati, in cui:

- **FIGURA 1: Rappresentazione schematica dell'anticorpo DN30 e dei suoi derivati monovalenti.** (A) mAb bivalente murino originale; (B) MvDN30, Fab chimerico; (C) chOA-DN30, anticorpo monovalente chimerico 'a Un Unico Braccio'; (D) hOA-DN30, anticorpo monovalente umanizzato 'a Un Unico Braccio'; (E) hOA-DN30 è stato sottoposto a SDS-PAGE in

condizioni riducenti e non riducenti. Il gel è stato colorato con il colorante Gel Code blue. La molecola mostra bande con il peso molecolare previsto.

- **FIGURA 2: Legame con Met delle molecole monovalenti derivate da DN30.** (A) Analisi di legame ELISA di MvDN30, chOA-DN30, hOA-DN30 (fase liquida) con una chimera Met umano-Fc (fase solida). (B) Analisi di legame ELISA di hOA-DN30 (fase liquida) con la chimera Met-Fc (fase solida); Met derivati da uomo, topo, ratto, scimmia sono stati inclusi nel saggio. Il legame è stato rivelato usando anticorpi anti-catena α umana. O.D.: Densità Ottica; AU: unità arbitrarie. Ogni punto è la media di valori in triplicato; le barre rappresentano le deviazioni standard. Le tabelle al disotto dei grafici riportano i valori di K_d , i valori massimi di legame (B_{max}) e il punteggio aggiustato (R^2). (C) Analisi citofluorimetrica del legame di hOA-DN30 con Met espresso sulla superficie di un gruppo di linee cellulari derivate da diverse specie (cancro polmonare umano EBC-1; mioblasti di muscolo di topo C2C12; mioblasti cardiaci di ratto H9C2; cellule renali di cane MDCK; cellule renali di scimmia Cos-7). Le nuove molecole si legano a Met umano-Fc con alta affinità; si verifica una reazione crociata tra l'anticorpo e Met di uomo, ratto, cane e scimmia.

- **FIGURA 3: Attività agonista delle molecole monovalenti derivate da DN30.** Saggio di diffusione. Cellule HPAF-II sono state incubate per 24 h con la concentrazione indicata di HGF (ligando di Met), mAb DN30 (agonista parziale), MvDN30 (antagonista completo) e le molecole chimeriche o umanizzate a Un Unico Braccio. Tutte le

molecole monovalenti derivate da DN30 non inducono la diffusione cellulare, una risposta biologica mediata da Met.

- **FIGURA 4: Scissione e sottoregolazione di Met in cellule trattate con le molecole monovalenti derivate da DN30.** Cellule A549 sono state incubate per 48 h in terreno privo di siero con la concentrazione crescente indicata di MvDN30, chOA-DN30 o hOA-DN30. I livelli di Met totale sono stati determinati mediante analisi Western blot degli estratti cellulari utilizzando anticorpi anti-Met. Le bande rilevate corrispondono alla forma matura del recettore (p145 Met). Come controllo del caricamento, il filtro è stato sondato con una proteina non correlata (vinculina). La scissione di Met è stata determinata mediante analisi Western blot del terreno condizionato utilizzando anticorpi anti-Met. Le bande rivelate corrispondono al dominio extracellulare scisso del recettore (ectodominio di Met p80). La tabella riporta la quantificazione dell'intensità dei pixel di ciascuna banda di western blot normalizzata sul corrispondente segnale di vinculina, con misurazione eseguita mediante densitometria con il software ImageJ. Le molecole monovalenti a Un Unico Braccio sottoregolano efficacemente Met e inducono la scissione di Met.

- **FIGURA 5: Inibizione dell'attivazione di Met mediante le molecole monovalenti derivate da DN30.** GTL-16 (cellule dipendenti da MET che presentano un Met costitutivamente attivo per la sovraespressione del recettore sostenuta dall'amplificazione del gene MET) sono state incubate per 24 h in terreno privo di siero più MvDN30, chOA-DN30 o hOA-DN30 (1000 o 250 nM). L'attivazione

di Met è stata determinata in lisati cellulari totali mediante Western blot con anticorpi anti-Met specifici per i residui di Met Tyr^{1234/1235} fosforilati, il principale sito di fosforilazione. Lo stesso blot è stato risondato con anticorpi anti-Met. Per controllare il caricamento di proteine, il filtro è stato inoltre sondato con anticorpi anti-actina. La tabella riporta la quantificazione dell'intensità dei pixel di ciascuna banda P-Met normalizzata sul corrispondente segnale di actina, con misurazione eseguita mediante densitometria con il software ImageJ. Le molecole a Un Unico Braccio inibiscono fortemente la fosforilazione di Met.

- **FIGURA 6: Vitalità delle cellule dipendenti da MET trattate con le molecole monovalenti derivate da DN30.** Cellule di carcinoma gastrico umano GTL-16 sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti in terreno FCS al 10%. Dopo 24 h, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di MvDN30, chOA-DN30 o hOA-DN30 per ulteriori 72 h. Il numero di cellule è stato valutato mediante Cell titer-glo. Il grafico rappresenta la percentuale di cellule vive rispetto al controllo non trattato. Ogni punto è la media di valori in triplicato. La tabella riporta i valori IC₅₀ calcolati e il punteggio aggiustato (R²). Le molecole ad Un Unico Braccio inibiscono efficacemente la crescita cellulare delle cellule dipendenti da MET.

- **FIGURA 7: Proliferazione e morte di cellule dipendenti da MET indotte dal trattamento con le molecole monovalenti derivate da DN30.** (A) Saggio di proliferazione: cellule di carcinoma gastrico umano GTL-16 sono state

piastrate in piastre da 6 pozzetti in terreno FCS al 10%. Dopo 24 h, le cellule sono state trattate con una concentrazione fissa (1 μM) di MvDN30, chOA-DN30 o hOA-DN30 per ulteriori 48 h. EdU 10 μM è stato quindi aggiunto al terreno di coltura per altre 2 h. La % di cellule in fase S è stata determinata mediante analisi citofluorimetrica seguendo la procedura del saggio di citometria a flusso con EdU Click-iT. I grafici rappresentano le cellule negative e positive per la colorazione di APC (EdU+, cellule in fase S). La tabella riporta la % di cellule in fase S. (B) Saggio di Citotossicità: cellule di carcinoma gastrico umano GTL-16 sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti in terreno FCS al 10%. Dopo 24 h, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di MvDN30, chOA-DN30 o hOA-DN30 per ulteriori 48 h. La citotossicità cellulare è stata valutata mediante saggio con colorante verde Cell-Tox. I grafici rappresentano l'incremento di citotossicità rispetto al controllo non trattato. Ogni punto è la media di valori in triplicato. La tabella riporta i valori EC_{50} calcolati, e il punteggio aggiustato (R^2). Le molecole a Unico Braccio bloccano efficacemente la proliferazione e inducono citotossicità in cellule dipendenti da MET.

- **FIGURA 8: Motilità cellulare indotta da HGF in cellule trattate con hOA-DN30.** Cellule HPAF-II sono state pre-trattate per 18 h con le concentrazioni indicate di hOA-DN30 da solo o in combinazione con DecoyMet^{K842E} (stessa quantità di hOA-DN30) e quindi incubate per 24 h con HGF (6,25 ng/ml). hOA-DN30 inibisce la motilità cellulare indotta da HGF; la combinazione con DecoyMet^{K842E} ostacola in modo più efficiente la risposta cellulare.

- **FIGURA 9: *Invasione di cellule trattate con hOA-DN30.*** Cellule HPAF-II sono state piastrate nella camera superiore di filtri Transwell rivestiti con matrigel in terreno privo di siero con hOA-DN30 (0,5 μ M) da solo o in combinazione con DecoyMet^{K842E} (1 μ M). Terreno con HGF (25 ng/ml) è stato aggiunto nella camera inferiore. Dopo 24 h, le cellule che sono migrate nella parte inferiore del filtro sono state valutate mediante colorazione e osservazione al microscopio. hOA-DN30 inibisce l'invasione cellulare indotta da HGF; la combinazione con DecoyMet^{K842E} blocca la risposta.

- **FIGURA 10: *Modulazione dell'espressione di PD-L1 mediante hOA-DN30.*** Cellule GTL-16 sono state trattate con IFN-gamma da solo (50 ng/ml) o in combinazione con hOA-DN30 (250 nM). Dopo 48 h, le cellule sono state lisate; espressione di PD-L1 e attivazione di Met su estratti di proteine totali sono state valutate mediante Western blot. Come controllo del caricamento, i filtri sono stati sondati con anticorpi anti-GAPDH.

- **FIGURA 11: *Profilo farmacocinetico in vivo di MvDN30, mAb DN30 e hOA-DN30.*** A topi immunodeficienti è stata praticata un'iniezione per via endovenosa con una singola dose (100 μ g) di MvDN30, mAb DN30 o hOA-DN30. Sangue periferico è stato raccolto in diversi punti temporali. Le concentrazioni sieriche delle molecole terapeutiche sono state misurate mediante ELISA. Il grafico rappresenta la quantità di molecole circolanti in funzione del tempo. I campioni sono in triplicato; le barre rappresentano le deviazioni standard. La tabella riporta i parametri farmacocinetici calcolati. t_{1/2} elim: emivita;

CL: clearance; AUC_{tot}: Area Sotto la Curva; k_{elim}: costante di eliminazione.

- **FIGURA 12: Inibizione della crescita tumorale dipendente da MET in vivo mediante trattamento con i derivati monovalenti di DN30.** 1×10^6 cellule di carcinoma gastrico GTL-16 dipendenti da MET sono state inoculate nel fianco di topi NOD-SCID immunodeficienti. Quando i tumori hanno raggiunto un volume medio di $68,4 \pm 5,4 \text{ mm}^3$, i topi sono stati randomizzati in 4 gruppi omogenei e trattati con 30 mg/kg di MvDN30, chOA-DN30 o hOA-DN30 mediante iniezione endovenosa 2 volte a settimana. Come controllo, un gruppo è stato trattato con lo stesso volume di PBS (Veicolo). La crescita tumorale è stata monitorata periodicamente con un calibro. Dopo 15 giorni, i topi sono stati sacrificati. (A) Cinetica della crescita tumorale; (B) Volumi tumorali alla fine dell'esperimento riportati come % del gruppo non trattato. hOA-DN30 inibisce la crescita tumorale dipendente da MET in modo più efficiente rispetto a chOA-DN30.

- **FIGURA 13: Inibizione dose-risposta della crescita tumorale dipendente da MET in vivo mediante trattamento con hOA-DN30.** 1×10^6 cellule di carcinoma gastrico GTL-16 dipendenti da MET sono state inoculate nel fianco di topi NOD-SCID immunodeficienti. Dopo 8 giorni, i tumori hanno raggiunto un volume medio di $80,7 \pm 2 \text{ mm}^3$ e i topi sono stati randomizzati in 5 gruppi omogenei e trattati con concentrazioni crescenti di hOA-DN30 mediante iniezione endovenosa. Come controllo, un gruppo è stato trattato con lo stesso volume di PBS (Veicolo). La crescita tumorale è stata monitorata periodicamente con un calibro. Dopo 17 giorni, i topi sono stati sacrificati e i tumori sono stati

asportati e pesati. (A) Cinetica della crescita tumorale; (B) Pesi del tumore. hOA-DN30 inibisce la crescita tumorale dipendente da MET con un profilo dose-risposta.

- **FIGURA 14: Sequenze amminoacidiche dei domini VL, VH, CL e CH1 di hOA-DN30.** Le sequenze di Regioni Determinanti la Complementarità sono evidenziate con un carattere in grassetto sottolineato.

- **FIGURA 15: Sequenze amminoacidiche del primo e del secondo polipeptide Fc di hOA-DN30.** Le mutazioni amminoacidiche all'interno dei domini CH3 del primo e del secondo polipeptide Fc - necessarie per generare il nodo e il foro, rispettivamente - sono evidenziate con un carattere in grassetto sottolineato.

- **FIGURA 16: Sequenza amminoacidica della forma mutata di DecoyMet.** La mutazione amminoacidica K842E è evidenziata con un carattere in grassetto sottolineato.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Nella seguente descrizione, vengono forniti numerosi dettagli specifici per permettere una comprensione completa delle forme di realizzazione. Le forme di realizzazione possono essere messe in pratica senza uno o più dettagli specifici, o con altri procedimenti, componenti, materiali, ecc. In altri casi, strutture, materiali od operazioni ben noti non sono mostrati o descritti in dettaglio per evitare di confondere aspetti delle forme di realizzazione.

Il riferimento in tutta la presente descrizione a "una (aggettivo numerale) forma di realizzazione" o "una (articolo indeterminativo) forma di realizzazione" indica che un/una particolare aspetto, struttura o caratteristica descritto/descritta in relazione alla forma di

realizzazione è incluso/inclusa in almeno una forma di realizzazione. Pertanto, le forme delle espressioni "in una (aggettivo numerale) forma di realizzazione" o "in una (articolo indeterminativo) forma di realizzazione" in vari punti in tutta la presente descrizione non sono necessariamente tutte riferite alla stessa forma di realizzazione. Inoltre, i/le particolari aspetti, strutture o caratteristiche possono essere combinati/combinati in qualsiasi modo adatto in una o più forme di realizzazione.

Le intestazioni qui fornite sono solo per comodità e non interpretano l'ambito o il significato delle forme di realizzazione.

La presente descrizione riguarda un nuovo agente terapeutico per il trattamento di un tumore e/o metastasi.

Si stima che oltre 200.000 pazienti all'anno siano "dipendenti da MET" e che l'inibizione di Met possa potenzialmente causare la remissione della malattia. Considerando che le mutazioni si accumulano con l'invecchiamento e nei prossimi 20 anni l'invecchiamento della popolazione aumenterà, il peso del cancro dovrebbe aumentare e avere un impatto elevato sulle risorse sanitarie globali per la gestione dei pazienti. Alterazioni genetiche responsabili della "dipendenza da MET" sono state riscontrate nel carcinoma gastrico, esofageo, coloretale e polmonare, nel melanoma e in tumori cerebrali (consultare il database COSMIC: www.sanger.ac.uk). Inoltre, la selezione di lesioni genetiche di MET è stata riscontrata come meccanismo acquisito di resistenza a una serie di altre terapie mirate nel cancro coloretale e polmonare non a piccole cellule (NSCLC).

Il ruolo di Met nelle metastasi è anche associato alla capacità di Met di aiutare le cellule ad adattarsi ad un ambiente difficile. Le capacità metastatiche attivate da Met non dipendono solo da alterazioni genetiche ed epigenetiche, ma anche dalla secrezione paracrina di HGF da parte del tessuto stromale tumorale che è composto da una grande varietà di tipi di cellule, tra cui fibroblasti, cellule epiteliali residenti, periciti, miofibroblasti, cellule endoteliali vascolari e linfovaskolari, e cellule infiltranti del sistema immunitario.

Met è attualmente riconosciuto come bersaglio cancro-specifico per: (i) il trattamento personalizzato di tumori con mutazioni/amplificazioni di MET ('dipendenti da MET'); (ii) per la prevenzione/reversione della resistenza primaria e secondaria attivata da Met ad altre terapie anticancro mirate; e (iii) per la prevenzione/reversione del fenotipo invasivo/metastatico attivato da Met¹.

L'attività inibitoria di DN30 risiede nella sua capacità di promuovere l'attività fisiologica della metalloproteasi ADAM-10 che agisce sulla superficie cellulare⁸, che rilascia dalla membrana plasmatica la porzione extracellulare intatta del recettore (scissione di Met), con successiva rapida degradazione del dominio di chinasi intracellulare di Met⁹. Come conseguenza di questi processi, Met viene rimosso fisicamente dalla superficie cellulare e il dominio extracellulare agisce come 'esca' solubile, impedendo il legame del ligando sequestrando HGF. Pertanto, il vantaggio di DN30 è quello di inibire sia l'attivazione di Met dipendente da HGF sia l'attivazione di Met indipendente da HGF¹⁰.

Rispetto ad altri anticorpi anti-Met, DN30 blocca le funzioni del recettore mediante un meccanismo unico che dà origine ad attività differenti e sinergiche: (i) rimozione di Met dalla superficie cellulare mediante 'scissione' dell'ectodominio; (ii) sequestro del ligando HGF; (iii) inibizione dell'omo- o etero-dimerizzazione del recettore di Met in corrispondenza della membrana; (iv) stimolazione della degradazione del recettore. Pertanto, DN30 offre l'opportunità di prendere due piccioni con una fava, consentendo il blocco ottimale del percorso di Met in quanto può potenzialmente agire non solo sulle cellule cancerose ma anche sul microambiente tumorale (risposte biologiche attivate da HGF di cellule endoteliali, fibroblasti e macrofagi).

La presente invenzione si basa sull'idea che, per raggiungere il massimo potenziale terapeutico contro un tumore mediante un anticorpo anti-Met, è obbligatorio applicare una molecola che: i) sia in una forma monovalente, che non provochi, anche in parte, risposte intracellulari evocate con l'attivazione di Met, cioè non sia un agonista o un agonista parziale; ii) pregiudichi l'attivazione di Met attraverso un meccanismo di azione diverso dallo spostamento del ligando (HGF); iii) abbia un profilo farmacocinetico favorevole, cioè abbia un'emivita plasmatica più lunga di quella del frammento Fab corrispondente; iv) non eserciti ragionevolmente una risposta immunitaria nell'uomo. Per soddisfare tutte le considerazioni di cui sopra, gli inventori hanno convertito l'anticorpo DN30 murino - che blocca l'attivazione di Met mediante un meccanismo di scissione - in una molecola

completamente umanizzata, monovalente e altamente stabile, formattandola nella forma "a Un Unico Braccio", denominata in quanto segue "hOA-DN30".

In una forma di realizzazione, la presente invenzione riguarda un frammento anticorpale anti-Met comprendente un singolo braccio legante l'antigene e una regione Fc, in cui la regione Fc comprende un complesso di un primo e un secondo polipeptide Fc. Il frammento anticorpale comprende, preferibilmente è costituito da:

(i) un primo polipeptide comprendente, preferibilmente costituito da, un dominio variabile della catena leggera (VL) umanizzata e un dominio costante della catena leggera (CL) umana, in cui il dominio variabile della catena leggera (VL) umanizzata è fuso al dominio costante della catena leggera (CL) umana nella direzione dal terminale N al terminale C, e in cui il dominio variabile della catena leggera (VL) umanizzata contiene tre regioni determinanti la complementarità (CDR) aventi le sequenze amminoacidiche riportate in SEQ ID No.: 1, 2 e 3;

(ii) un secondo polipeptide comprendente un dominio variabile della catena pesante (VH) umanizzata, un dominio costante CH1 della catena pesante umana e il primo polipeptide Fc, in cui il primo polipeptide Fc comprende una regione cerniera umana, un dominio costante CH2 umano e un dominio costante CH3 umano, in cui il dominio variabile della catena pesante (VH) umanizzata è fuso al dominio costante CH1 della catena pesante umana, che è fuso alla regione cerniera umana, che è fusa al dominio costante CH2 umano, che è fuso al dominio costante CH3 umano nella direzione dal terminale N al terminale C, e in cui il

dominio variabile della catena pesante (VH) umanizzata contiene tre regioni determinanti la complementarità (CDR) aventi le sequenze amminoacidiche riportate in SEQ ID No.: 4, 5 e 6;

(iii) un terzo polipeptide comprendente, preferibilmente costituito da, il secondo polipeptide Fc umano, in cui il secondo polipeptide Fc umano comprende, preferibilmente è costituito da, una regione cerniera umana, un dominio costante CH2 umano e un dominio costante CH3 umano, in cui la regione cerniera è fusa al dominio costante CH2 umano, che è fuso al dominio costante CH3 umano nella direzione dal terminale N al terminale C, in cui la regione cerniera è troncata al terminale N.

In una forma di realizzazione, il dominio costante della catena leggera (CL) umana è un dominio della catena leggera di tipo kappa umana.

In una forma di realizzazione, la regione cerniera umana e i domini costanti umani CH1, CH2 e CH3 provengono da una IgG1 umana.

In una forma di realizzazione, i due polipeptidi Fc sono collegati attraverso legami disolfuro intermolecolari nella regione cerniera.

In una forma di realizzazione, il primo polipeptide Fc e il secondo polipeptide Fc si incontrano all'interfaccia, e uno tra il primo e il secondo polipeptide Fc comprende una protuberanza all'interfaccia, e l'altro tra il primo e il secondo polipeptide Fc comprende un foro all'interfaccia, in cui la protuberanza è posizionabile nel foro.

In una forma di realizzazione preferita, uno tra il primo e il secondo polipeptide Fc comprende un dominio costante CH3 mutato, in cui il dominio costante CH3 mutato presenta una mutazione amminoacidica in posizione 389, in cui l'amminoacido originale in posizione 389 è stato mutato importando un amminoacido avente un volume della catena laterale più grande rispetto all'amminoacido originale, in modo da creare una protuberanza all'interfaccia tra i polipeptidi Fc; e in cui l'altro tra il primo e il secondo polipeptide Fc comprende un dominio costante CH3 mutato, in cui il dominio costante CH3 mutato presenta tre mutazioni amminoacidiche nelle posizioni 389, 391 e 438, in cui gli amminoacidi originali sono stati mutati importando amminoacidi aventi volumi della catena laterale più piccoli rispetto agli amminoacidi originali, in modo da creare un foro all'interfaccia tra i polipeptidi Fc, in cui la protuberanza è posizionabile nel foro, e in cui la numerazione degli amminoacidi è secondo lo schema di numerazione EU di Kabat (pp. 688-696 in Sequences of proteins of immunological interest, 5^a ed., Vol. 1, 1991; NIH, Bethesda, MD).

In ancora una forma di realizzazione preferita, gli amminoacidi originali nelle posizioni 389, 391 e 438 sono rispettivamente treonina, leucina e tirosina; e in cui in uno tra il primo e il secondo polipeptide Fc la treonina in posizione 389 è stata mutata in triptofano; e in cui nell'altro tra il primo e il secondo polipeptide Fc la treonina in posizione 389 è stata mutata in serina, la leucina in posizione 391 è stata mutata in alanina e la tirosina in posizione 438 è stata mutata in valina.

In una forma di realizzazione preferita, il dominio variabile della catena leggera umanizzata ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 7.

In una forma di realizzazione preferita, il dominio variabile della catena pesante umanizzata ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 8.

In una forma di realizzazione preferita, il dominio costante della catena leggera (CL) umana ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 9 e il dominio costante CH1 della catena pesante umana ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 10.

In una forma di realizzazione preferita, il primo polipeptide Fc umano ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 11, e il secondo polipeptide Fc umano ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 12.

In una forma di realizzazione, la presente invenzione riguarda un acido nucleico isolato che codifica per il frammento anticorpale anti-Met come sopra descritto.

In una forma di realizzazione, la presente invenzione riguarda una composizione comprendente due o più acidi nucleici ricombinanti che codificano collettivamente per il frammento anticorpale anti-Met come sopra descritto.

Il frammento anticorpale anti-Met qui descritto quando è legato a Met induce la scissione di un dominio extracellulare di Met. Il frammento anticorpale anti-Met quando è legato a Met non esercita un'attività agonista nei confronti di Met. Il frammento anticorpale anti-Met quando è legato a Met inibisce la fosforilazione di Met. Il frammento anticorpale anti-Met quando è legato a Met blocca

inoltre la proliferazione e induce la citotossicità nelle cellule dipendenti da MET. Il frammento anticorpale anti-Met quando è legato a Met inibisce inoltre la motilità cellulare e l'invasione cellulare indotte dal Fattore di Crescita degli Epatociti (HGF). Le proprietà summenzionate del frammento anticorpale anti-Met oggetto della presente descrizione dotano detto frammento anticorpale di attività antitumorale e/o antimetastatica.

L'espressione "braccio legante l'antigene", come qui usata, si riferisce ad una parte componente di un frammento anticorpale dell'invenzione che ha la capacità di legarsi specificamente a una molecola bersaglio di interesse. Il braccio legante l'antigene è un complesso di sequenze di domini variabili (VL e VH), includenti le CDR e le Regioni Framework (di Sostegno) di una catena leggera e pesante di una immunoglobulina, e sequenze di domini costanti (CL e CH) di una catena leggera e pesante di una immunoglobulina.

Le forme "umanizzate" di anticorpi non umani (per es. murini) sono anticorpi chimerici che contengono residui amminoacidici minimi derivati da una immunoglobulina non umana. Per la maggior parte, gli anticorpi umanizzati sono immunoglobuline umane (anticorpo ricevente) in cui residui da una regione ipervariabile del ricevente (cioè le Regioni Determinanti la Complementarità - CDR) sono sostituiti con residui di una regione ipervariabile di una specie non umana (anticorpo donatore) avente la specificità, l'affinità e la capacità desiderate. In alcuni casi, residui della regione framework (FR) dell'immunoglobulina umana possono essere sostituiti con corrispondenti residui non umani.

Inoltre, gli anticorpi umanizzati possono comprendere residui che non si trovano nell'anticorpo ricevente o nell'anticorpo donatore. Queste modifiche vengono apportate per perfezionare ulteriormente le prestazioni di un anticorpo. In generale, l'anticorpo umanizzato comprenderà due domini variabili, in cui tutte o sostanzialmente tutte le anse ipervariabili corrispondono a quelle di un'immunoglobulina non umana e tutti o sostanzialmente tutti i residui Framework (FR) sono quelli di una sequenza di immunoglobulina umana. L'anticorpo umanizzato comprende anche una porzione di una regione costante (Fc) di una immunoglobulina, tipicamente quella di un'immunoglobulina umana. Per ulteriori dettagli, vedere ¹¹⁻¹³. Vedere anche i seguenti articoli di rivista e riferimenti ivi citati: ¹⁴⁻¹⁶.

L'espressione "regione Fc", come qui usata, si riferisce in generale ad un complesso dimerico comprendente le sequenze polipeptidiche C-terminali di una catena pesante di immunoglobulina, in cui una sequenza polipeptidica C-terminale è quella che è ottenibile mediante digestione con papaina di un anticorpo intatto. La regione Fc può comprendere sequenze Fc native o varianti. Sebbene i limiti della sequenza Fc di una catena pesante di una immunoglobulina possano variare, l'estensione della sequenza Fc della catena pesante di IgG1 umana è definita partendo da un residuo amminoacidico incluso tra Asp 234 e Thr 238, arrivando al terminale carbossilico della sequenza Fc secondo il sistema di numerazione EU di Kabat. La sequenza Fc di un'immunoglobulina generalmente comprende una regione cerniera, due domini costanti, un dominio CH2 e

un dominio CH3, e opzionalmente comprende un dominio CH4. Per "polipeptide Fc" qui si intende uno dei polipeptidi che costituiscono una regione Fc. La regione Fc aumenta la stabilità del frammento anticorpale rispetto a una molecola Fab comprendente un braccio legante l'antigene.

La "regione cerniera", la "sequenza cerniera" e loro varianti, come qui usate, includono il significato noto nella tecnica, che è illustrato, per esempio, in Janeway et al., *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4^a ed., 1999) e in 17,18.

La frase "regione cerniera troncata", come qui usata, si riferisce ad un polipeptide comprendente parti, ma non tutte, di una sequenza cerniera. La regione cerniera troncata è in grado di legarsi al "primo" polipeptide Fc. Se la sequenza cerniera di tipo selvatico non è presente, la sequenza rimanente nel "secondo" polipeptide Fc comprenderà un componente che è in grado di legarsi al "primo" polipeptide Fc. Per esempio, detto componente può essere un residuo modificato o un residuo di cisteina aggiunto in grado di formare un legame disolfuro.

Una "protuberanza" si riferisce ad almeno una catena laterale amminoacidica che sporge dall'interfaccia di un primo polipeptide Fc ed è quindi posizionabile in un foro compensatorio nell'interfaccia adiacente (cioè l'interfaccia di un secondo polipeptide Fc) in modo da stabilizzare l'eteromultimero, e favorire quindi, per esempio, la formazione di eteromultimeri rispetto alla formazione di omomultimeri. La protuberanza può esistere nell'interfaccia originale o può essere introdotta

sinteticamente (per es. modificando l'acido nucleico che codifica per l'interfaccia). Normalmente, un acido nucleico che codifica per l'interfaccia del primo polipeptide viene modificato per codificare la protuberanza. Per ottenere ciò, l'acido nucleico che codifica per almeno un residuo amminoacidico "originale" nell'interfaccia del primo polipeptide viene sostituito con un acido nucleico che codifica per almeno un residuo amminoacidico "di importazione" che ha un volume della catena laterale più grande rispetto al residuo amminoacidico originale. Si comprenderà che possono esserci più di un residuo originale e corrispondente residuo di importazione. Il limite superiore per il numero di residui originali che vengono sostituiti è il numero totale di residui nell'interfaccia del primo polipeptide.

Un "foro" si riferisce ad almeno una catena laterale amminoacidica che ha una rientranza dall'interfaccia di un secondo polipeptide Fc e pertanto accoglie una corrispondente protuberanza sull'interfaccia adiacente di un primo polipeptide Fc. Il foro può esistere nell'interfaccia originale o può essere introdotto sinteticamente (per es. modificando l'acido nucleico che codifica per l'interfaccia). Normalmente, l'acido nucleico che codifica per l'interfaccia del secondo polipeptide viene modificato per codificare per il foro. Per ottenere ciò, l'acido nucleico che codifica per almeno un residuo amminoacidico "originale" nell'interfaccia del secondo polipeptide viene sostituito con acido nucleico che codifica per almeno un residuo amminoacidico "di importazione" che ha un volume della catena laterale più

piccolo rispetto al residuo amminoacidico originale. Si comprenderà che possono esserci più di un residuo originale e corrispondente residuo di importazione. Il limite superiore per il numero di residui originali che vengono sostituiti è il numero totale di residui nell'interfaccia del secondo polipeptide.

La protuberanza è "posizionabile" nel foro, il che significa che la posizione spaziale della protuberanza e del foro sull'interfaccia rispettivamente di un primo polipeptide Fc e un secondo polipeptide Fc e le dimensioni della protuberanza e del foro sono tali che la protuberanza può essere posizionata nel foro senza perturbare significativamente la normale associazione del primo e del secondo polipeptide all'interfaccia. Poiché le protuberanze non si estendono tipicamente perpendicolarmente dall'asse dell'interfaccia e hanno conformazioni preferite, l'allineamento di una protuberanza con un foro corrispondente si basa sulla modellazione della coppia protuberanza/foro basata su una struttura tridimensionale come quella ottenuta mediante cristallografia ai raggi X o risonanza magnetica nucleare (NMR). Questo può essere ottenuto usando tecniche ampiamente riconosciute nel settore.

L'espressione "attività non agonista" del frammento anticorpale anti-Met, come qui usata, si riferisce al frammento anticorpale anti-Met che non esercita alcuna attività che suscita, anche in parte, risposte cellulari provocate a seguito dell'attivazione di Met. L'attività non agonista del frammento anticorpale anti-Met può essere misurata mediante valutazione del livello di fosforilazione

di Met con tecniche convenzionali quali western blot, immunofluorescenza, immunoistochimica, ELISA, analisi citofluorimetrica o qualsiasi altro procedimento che include l'uso di un anticorpo che riconosce specificamente Met, o i residui di Met Tyr¹²³⁴⁻¹²³⁵ se fosforilati (cioè il sito di fosforilazione maggiore di Met¹⁹, o i residui di Met Tyr^{1349/1356} se fosforilati, cioè il sito di ancoraggio di Met²⁰).

La presente invenzione riguarda inoltre un prodotto comprendente, in un singolo flacone o in due flaconi, (a) il frammento anticorpale anti-Met come qui descritto, e un veicolo farmaceuticamente accettabile, e (b) una porzione extracellulare di Met umano e un veicolo farmaceuticamente accettabile, in cui la porzione extracellulare di Met umano è in grado di legarsi al Fattore di Crescita degli Epatociti (HGF) in modo stabile e contiene almeno una mutazione amminoacidica all'interno dell'epitopo riconosciuto dal frammento anticorpale anti-Met per impedire il legame del frammento anticorpale anti-Met con esso.

In una forma di realizzazione, la porzione extracellulare di Met umano contiene domini SEMA, PSI, IPT-1, IPT-2, IPT-3 e IPT-4.

In una forma di realizzazione preferita, la porzione extracellulare di Met umano ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 13, in cui almeno uno degli amminoacidi tra la posizione 797 e la posizione 875 di SEQ ID No.: 13 è mutato per impedire il legame del frammento anticorpale anti-Met con esso.

In una forma di realizzazione più preferita, la porzione extracellulare di Met umano ha la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No: 14.

La presente descrizione riguarda anche una molecola di acido nucleico che codifica per la porzione extracellulare di Met umano capace di legarsi al Fattore di Crescita degli Epatociti (HGF) in modo stabile e contenente almeno una mutazione amminoacidica all'interno dell'epitopo riconosciuto dal frammento anticorpale anti-Met per impedire il legame del frammento anticorpale anti-Met con esso, preferibilmente la porzione extracellulare di Met umano avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 14.

Come qui usata, l'espressione "la porzione extracellulare di Met umano è capace di legarsi all'HGF umano in modo stabile" significa che la porzione extracellulare di Met umano si lega a HGF con una Kd calcolata non superiore a 100 nM.

L'espressione "la porzione extracellulare di Met umano contiene almeno una mutazione amminoacidica nell'epitopo riconosciuto dal frammento anticorpale anti-Met", come qui usata, indica la presenza di una o più mutazioni (cioè sostituzioni e/o delezioni e/o inserzioni di amminoacidi) all'interno della porzione extracellulare di Met, in grado di indurre una modifica all'interno della porzione extracellulare di Met che impedisce l'impegno della regione di cui sopra con i domini variabili dell'anticorpo anti-Met. L'esperto, data la sua ordinaria conoscenza generale (rappresentata tra l'altro dalla possibilità di generare un cDNA che include una variazione da singolo nucleotide in

una data sequenza di DNA utilizzando primer specifici durante la duplicazione del DNA; vedere Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) non ha bisogno di ulteriori dettagli sulla realizzazione di una forma mutata della porzione extracellulare di Met umano che mantiene la capacità di legarsi all'HGF umano ma non al frammento anticorpale anti-Met. La presente invenzione non deve pertanto essere interpretata come comprendente solo la porzione extracellulare mutata di Met umano come qui descritta (cioè SEQ ID No.: 14), poiché l'esperto, data la sua ordinaria conoscenza generale, può produrre ulteriori versioni mutate della porzione extracellulare di Met umano con SEQ ID No.: 13 che impediscono il legame dell'anticorpo anti-Met con esso.

I termini "SEMA", "PSI", "IPT-1", "IPT-2", "IPT-3" e "IPT-4" si riferiscono ai domini di Met che costituiscono la regione extracellulare di Met. Tali nomi di dominio appartengono alla conoscenza generale ordinaria di un esperto come rappresentata tra l'altro da ^{21,22}. Il dominio SEMA è un modulo di interazione con proteine in comune con semaforine e plexine che include la regione compresa tra gli amminoacidi 25-516 di Met (SEQ ID No.: 13); PSI è un dominio in comune con Plexine, Semaforine e Integrine che include la regione compresa tra gli amminoacidi 519-561 di Met (SEQ ID No.: 13); il dominio IPT - ripetuto quattro volte - è una regione immunoglobulina-simile in comune con Plexine e fattori di Trascrizione, che include la regione compresa tra gli amminoacidi 563-934 di MET (SEQ ID No.: 13). In dettaglio, la ripetizione 1 di IPT copre le

posizioni amminoacidiche 563-656 di SEQ ID No.: 13, la ripetizione 2 di IPT copre le posizioni amminoacidiche 657-740 di SEQ ID No.: 13, la ripetizione 3 di IPT copre le posizioni amminoacidiche 741 -837 di SEQ ID No.: 13, la ripetizione 4 di IPT copre le posizioni amminoacidiche 838-934 di SEQ ID No.: 13.

La presente invenzione riguarda inoltre l'uso terapeutico del frammento anticorpale anti-Met come qui descritto, opzionalmente in combinazione con una porzione extracellulare di Met umano come qui descritto, per l'uso nel trattamento di un paziente affetto da un tumore e/o metastasi, in cui il paziente porta alterazioni genetiche del gene MET.

La presente invenzione riguarda inoltre l'uso terapeutico del frammento anticorpale anti-Met come qui descritto in combinazione con una porzione extracellulare di Met umano come qui descritto per l'uso nel trattamento di un paziente affetto da un tumore e/o metastasi, in cui il paziente è portatore di un gene MET di tipo selvatico.

In un aspetto, l'invenzione fornisce un procedimento per trattare un tumore e/o metastasi in un soggetto, detto procedimento comprendendo la somministrazione al soggetto di una quantità efficace del frammento anticorpale anti-Met, opzionalmente in combinazione con una porzione extracellulare di Met umano, per cui detta condizione viene trattata.

In un aspetto, l'invenzione fornisce un procedimento per inibire la crescita di una cellula che esprime Met, detto procedimento comprendendo il portare a contatto detta cellula con il frammento anticorpale anti-Met qui

descritto, opzionalmente in combinazione con una porzione extracellulare di Met umano dell'invenzione, determinando così un'inibizione della crescita di detta cellula.

In un aspetto, l'invenzione fornisce un procedimento per trattare terapeuticamente un mammifero avente un tumore canceroso e/o metastasi cancerose, detto procedimento comprendendo la somministrazione a detto mammifero di una quantità efficace del frammento anticorpale anti-Met qui descritto, opzionalmente in combinazione con una porzione extracellulare di Met umano, trattando quindi efficacemente detto mammifero.

In un aspetto, l'invenzione fornisce un procedimento per trattare un disturbo proliferativo cellulare, detto procedimento comprendendo la somministrazione a un soggetto che necessita di tale trattamento di una quantità efficace del frammento anticorpale anti-Met oggetto della presente descrizione, opzionalmente in combinazione con un porzione extracellulare di Met umano, trattando quindi efficacemente o impedendo detto disturbo proliferativo cellulare.

In un aspetto, l'invenzione fornisce un procedimento per trattare terapeuticamente un tumore e/o metastasi in un mammifero, in cui la crescita di detto tumore dipende almeno in parte da un effetto di potenziamento della crescita del sistema Met/HGF, come conseguenza di un aumento della proliferazione cellulare, una protezione dall'apoptosi o entrambi. Detto procedimento comprende il portare a contatto una cellula tumorale con una quantità efficace del frammento anticorpale anti-Met, opzionalmente in combinazione con una quantità efficace di una porzione

extracellulare di Met umano dell'invenzione, trattando quindi efficacemente detti tumore e/o metastasi.

Il tumore, che può essere efficacemente trattato con l'anticorpo anti-Met, opzionalmente in combinazione con una porzione extracellulare di Met umano, è selezionato tra tumore della mammella, coloretta, del polmone, del colon, del pancreas, della prostata, ovarico, cervicale, del sistema nervoso centrale, renale, epatocellulare, della vescica, gastrico, cellule tumorali nella regione testa-collo, carcinoma papillare (per es. ghiandola tiroidea), melanoma, linfoma, mieloma, glioma/glioblastoma (per es. astrocitoma anaplastico, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma anaplastico, oligodendroastrocitoma anaplastico), cellule leucemiche, sarcoma, rabdomiosarcoma o tumore da un Cancro di origine Primaria Sconosciuta (CUP).

In una forma di realizzazione, una cellula che è terapeuticamente bersagliata in un procedimento dell'invenzione è una cellula iperproliferativa e/o iperplastica. In una forma di realizzazione, una cellula che è bersagliata in un procedimento dell'invenzione è una cellula displastica. In ancora un'altra forma di realizzazione, una cellula che è bersagliata in un procedimento dell'invenzione è una cellula metastatica. In un'ulteriore forma di realizzazione, una cellula che è bersagliata in un procedimento dell'invenzione è una cellula che esprime Met che appartiene al microambiente che sostiene il tumore e/o la metastasi.

I presenti inventori hanno scoperto che la struttura a Un Unico Braccio, ottenuta mediante mutazioni puntiformi

selezionate del dominio CH3 con conseguente efficiente eterodimerizzazione di Fc, dà origine a un anticorpo in una forma monovalente che mantiene le proprietà di legame dell'anticorpo di origine e le funzioni mediate da Fc.

La monovalenza è essenziale per evitare l'eventuale attività agonista dovuta alla struttura nativa bivalente dell'anticorpo.

Inoltre, poiché la riduzione del peso molecolare rispetto all'anticorpo di origine è limitata, l'anticorpo a Un Unico Braccio è soggetto a ridotte velocità di clearance, mostrando un profilo farmacocinetico favorevole, adatto per l'uso clinico.

Sorprendentemente, il formato a Un Unico Braccio umanizzato del DN30 suscita attività inibitorie *in vivo* più forti rispetto agli altri derivati monovalenti di DN30 (cioè MvDN30 e chOA-DN30). Si prevede questo se si fa il confronto con MvDN30, una molecola che, per il suo basso peso molecolare, è soggetta ad elevata clearance renale: le scarse proprietà farmacocinetiche influenzano notevolmente le prestazioni della molecola negli animali da esperimento.

Al contrario, l'attività superiore di hOA-DN30 rispetto alla corrispondente forma chimerica (denominata di seguito "chOA-DN30", vedere la sezione Materiali e Procedimenti per una descrizione dettagliata di chOA-DN30), evidente sia *in vitro* che *in vivo* è inaspettata. Sorprendentemente, i dati attuali evidenziano che hOA-DN30 si lega a Met con maggiore affinità e promuove la risposta di scissione in modo più potente. Di conseguenza, l'inibizione dell'attivazione di Met, misurata come quantità di recettori di Met fosforilati, era più forte.

Queste attività si traducono in una repressione delle risposte biologiche mediate da Met. La compromissione della crescita di cellule tumorali dipendenti da MET si verifica a dosi molto basse; la IC₅₀ è 5,4 volte inferiore nel caso di hOA-DN30 rispetto a chOA-DN30. Ciò può essere dovuto a un più notevole blocco della proliferazione cellulare e ad un aumento più marcato della citotossicità.

La regione Fc, presente nei derivati a Un Unico Braccio, potrebbe generare differenze nella distribuzione in tessuti/organi dell'anticorpo per il legame con il Recettore di Fc. Inoltre, la porzione Fc potrebbe anche generare una risposta contro il tumore per effetto dell'impegno del sistema immunitario (cioè l'attivazione della Citotossicità Cellulare Dipendente da Anticorpi - ADCC). Anche se possono verificarsi questi eventi biologici, non possono essere responsabili della diversa attività tra gli anticorpi a Un Unico Braccio chimerici e umanizzati, poiché la regione Fc è identica nelle due molecole.

Ciò che gli anticorpi a Un Unico Braccio chimerici e umanizzati non condividono sono le regioni variabili, in cui si trova il sito di legame degli anticorpi. In particolare, le CDR di DN30, identiche in tutti i derivati, sono inserite nelle regioni framework. Queste parti dell'anticorpo, anche se non direttamente coinvolte nella formazione del sito di legame, includono particolari amminoacidi, chiamati residui di Vernier²³, che potrebbero influenzare la conformazione finale delle strutture CDR e quindi potrebbero determinare l'affinità finale dell'anticorpo per l'antigene. Le CDR di DN30 in

combinazione con le sequenze framework selezionate durante il processo di umanizzazione danno origine a un anticorpo anti-Met con più forte affinità. Un'interazione più robusta tra l'anticorpo e Met ha inoltre messo in atto la scissione del recettore e la conseguente compromissione delle risposte biologiche mediate da Met. Questo, coniugato con la stabilità nel plasma migliorata grazie al formato a Un Unico Braccio, dà origine ad un anticorpo con un'attività superiore inaspettata nei confronti dei cancri dipendenti/attivati da MET.

Dati riportati in Basilico et al. ²⁴ mostrano che una maggiore forza terapeutica nel trattamento di tumori e/o metastasi, può essere raggiunta con il concomitante targeting sia di HGF che di Met. I dati sperimentali qui osservati mostrano inaspettatamente che l'inibizione dell'asse MET/HGF per mezzo di hOA-DN30 in combinazione con DecoyMet^{K842E} è superiore a quella ottenuta con l'applicazione di MvDN30 in combinazione con DecoyMet^{K842E}. Infatti, confrontando i risultati ottenuti nel saggio di invasione (qui riportati in Fig. 9) con quelli pubblicati in Basilico et al. ²⁴, hOA-DN30 annulla l'invasione delle cellule cancerose attivata da HGF, mentre un'attività residua è ancora presente se MvDN30 fa parte della combinazione.

Le cellule cancerose senza alterazioni genetiche di MET sfruttano il programma 'fisiologico' innescato dall'oncogene come un 'espediente' per potenziare il fenotipo maligno e per scatenare il fenotipo metastatico invasivo in risposta a condizioni di stress quali ipossia, radiazioni ionizzanti o chemioterapia. La 'opportunità'

richiede la stimolazione di MET di tipo selvatico con il suo ligando HGF. I dati qui forniti mostrano che in condizioni di 'opportunità' di MET, un intervento concomitante che colpisce entrambi i lati dell'asse MET/HGF porta a una migliore attività inibitoria. hOA-DN30 induce la rimozione fisica di MET dalla superficie cellulare mediante 'scissione' dell'ectodominio. Quest'ultimo viene rilasciato nell'ambiente extracellulare e agisce da 'esca' per HGF. L'apporto esogeno di DecoyMet ricombinante rafforza l'attività sequestrante di HGF del DecoyMet endogeno generata da hOA-DN30. La combinazione di hOA-DN30 e DecoyMet^{K842E} agisce simultaneamente sulle cellule cancerose che esprimono Met e sullo stroma tumorale che secreta HGF. Ciò consente un blocco ottimale della segnalazione di Met attivata da HGF e rappresenta quindi un'opzione terapeutica affidabile per un'ampia coorte di pazienti portatori di tumori che esprimono MET di tipo selvatico che si basano su MET per sostenere il fenotipo invasivo/metastatico.

Le proteine qui descritte (tra cui il frammento anticorpale anti-Met umanizzato e la porzione extracellulare di Met umano) possono essere facilmente prodotte sotto forma di proteine o sotto forma di molecole di acido nucleico che codificano per le proteine da un esperto considerando l'ordinaria conoscenza generale del campo relativo alla tecnologia del DNA ricombinante, come rappresentata tra l'altro da Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory (1982). Per esempio, si può seguire la seguente procedura standard: (i) sintesi delle sequenze di cDNA corrispondenti, (ii)

inserimento dei cDNA in un plasmide adatto per l'espressione in mammifero mediante procedimenti convenzionali di DNA ricombinante, (iii) co-transfezione transitoria o stabile con i suddetti plasmidi di una linea cellulare di mammifero, (iv) raccolta del supernatante di coltura, (v) purificazione mediante cromatografia per affinità della proteina ricombinante.

Le composizioni terapeutiche comprendenti l'ingrediente attivo/gli ingredienti attivi della presente invenzione, cioè il frammento anticorpale anti-Met umanizzato da solo o in combinazione con una porzione extracellulare di Met umano, possono essere preparate con vettori, eccipienti o stabilizzanti fisiologicamente accettabili (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edizione, Osol, A. curatore, 1980), sotto forma di soluzioni acquose, formulazioni liofilizzate o altre formulazioni essiccate. I veicoli, gli eccipienti o gli stabilizzanti accettabili sono atossici per i riceventi ai dosaggi e alle concentrazioni impiegati e includono tamponi; antiossidanti; conservanti; polipeptidi a basso peso molecolare (meno di circa 10 residui); proteine, come sieralbumina, gelatina o immunoglobuline; polimeri idrofili come polivinilpirrolidone; amminoacidi; monosaccaridi, disaccaridi e altri carboidrati; agenti chelanti; zuccheri; controioni che formano sali; complessi di metallo e/o tensioattivi non ionici. Le formulazioni possono anche contenere un altro composto attivo/altri composti attivi come necessario per la particolare indicazione da trattare, preferibilmente quelli con attività complementari che non influenzano negativamente

l'attività terapeutica di hOA-DN30 da solo o in combinazione con la porzione extracellulare di Met umano. Tali molecole sono opportunamente presenti in combinazione in quantità che sono efficaci per lo scopo desiderato.

L'ingrediente attivo/gli ingredienti attivi può/possono anche essere intrappolato/intrappolati in microcapsule preparate mediante tecniche descritte tra l'altro in Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edizione, Osol, A. curatore (1980).

Possono essere preparate preparazioni a rilascio prolungato. Esempi adatti di preparazioni a rilascio prolungato comprendono matrici semipermeabili di polimeri idrofobi solidi contenenti gli ingredienti attivi dell'invenzione, le quali matrici sono sotto forma di articoli formati, per es. film, o microcapsula.

L'ingrediente attivo/gli ingredienti attivi dell'invenzione può essere usato/possono essere usati da solo/soli o in combinazione con un altro anticorpo, inibitori di tirosina chinasi a piccola molecola, agente chemioterapico/agenti chemioterapici (compresi i cocktail di agenti chemioterapici), un altro agente citotossico/altri agenti citotossici, agente antiangiogenico/agenti antiangiogenici, citochine e/o agente/agenti di inibizione della crescita. Tali terapie combinate di cui sopra includono la somministrazione combinata (dove i due o più agenti sono inclusi nelle stesse formulazioni o in formulazioni separate) e la somministrazione separata, nel qual caso la somministrazione di hOA-DN30 può avvenire prima della e/o

dopo la somministrazione della terapia aggiuntiva o delle terapie aggiuntive.

L'ingrediente attivo/gli ingredienti attivi della presente invenzione (e un agente terapeutico aggiuntivo/agenti terapeutici aggiuntivi) è somministrato/sono somministrati con qualsiasi mezzo adatto, tra cui somministrazione parenterale, sottocutanea, intraperitoneale, intrapolmonare e intranasale e, se la si desidera per il trattamento locale, somministrazione intralesionale. L'ingrediente attivo/gli ingredienti attivi della presente invenzione può/possono essere opportunamente somministrato/somministrati mediante infusione impulsata, in particolare con dosi decrescenti degli ingredienti attivi. La somministrazione può avvenire tramite qualsiasi via adatta, ad es. mediante iniezioni, come iniezioni endovenose o sottocutanee, a seconda in parte se la somministrazione è breve o cronica.

L'ingrediente attivo/gli ingredienti attivi dell'invenzione sarà/saranno formulato/formulati, dosato/dosati e somministrato/somministrati in un modo coerente con una buona pratica medica. Fattori da considerare in questo contesto includono il particolare disturbo da trattare, il particolare mammifero da trattare, le condizioni cliniche del singolo paziente, la causa del disturbo, il sito di rilascio dell'agente, il procedimento di somministrazione, il piano di somministrazione e altri fattori noti ai medici. Non è necessario, ma opzionalmente è possibile, che l'ingrediente attivo/gli ingredienti attivi dell'invenzione sia formulato/siano formulati con uno o più agenti attualmente usati per prevenire o trattare il

disturbo in questione. La quantità efficace di tali altri agenti dipende dalla quantità di ingrediente attivo/ingredienti attivi dell'invenzione presente/presenti nella formulazione, dal tipo di disturbo o trattamento e da altri fattori sopra esaminati. Questi sono generalmente impiegati agli stessi dosaggi usati e con vie di somministrazione usate, di cui sopra, o circa dall'1 al 99% dei dosaggi finora impiegati.

Per il trattamento di una malattia, il dosaggio appropriato dell'ingrediente attivo/degli ingredienti attivi dell'invenzione (quando usato/usati da solo/soli o in combinazione con un altro agente/altri agenti come un agente chemioterapico/agente chemioterapici) dipenderà dal tipo di malattia da trattare, dalla gravità e dal decorso della malattia, se gli ingredienti attivi sono somministrati a scopo preventivo o terapeutico, dall'anamnesi clinica del paziente e dalla risposta agli ingredienti attivi dell'invenzione che sono debitamente presi in considerazione, e a discrezione del medico curante.

hOA-DN30 è opportunamente somministrato al paziente in una volta o con una serie di trattamenti. A seconda del tipo e della gravità della malattia, da 1 mg/kg a 30 mg/kg circa di anticorpo è un dosaggio candidato iniziale per la somministrazione al paziente, per esempio, mediante una o più somministrazioni separate, o mediante infusione continua. Una dose giornaliera tipica può variare da circa 1 µg/kg a 100 mg/kg o più, a seconda dei fattori sopra menzionati. Per somministrazioni ripetute nell'arco di diversi giorni o più, a seconda delle condizioni, il

trattamento viene prolungato fino a quando non si verifica una soppressione desiderata dei sintomi della malattia. Un dosaggio di esempio del frammento anticorpale sarebbe nel range da circa 0,05 mg/kg a circa 20 mg/kg. Pertanto, al paziente possono essere somministrate una o più dosi di circa 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o qualsiasi loro combinazione). Tali dosi possono essere somministrate in modo intermittente, per es. ogni settimana o ogni tre settimane (per es. in modo tale che il paziente riceva da circa due a circa venti, per es. circa sei dosi dell'anticorpo). Può essere somministrata una dose iniziale di carico più elevata, seguita da una o più dosi più basse. Un regime posologico di esempio comprende la somministrazione di una dose di carico iniziale di circa 4 mg/kg, seguita da una dose di mantenimento settimanale di circa 2 mg/kg dell'anticorpo. Tuttavia, altri regimi posologici possono essere utili. La progressione di questa terapia viene facilmente monitorata con tecniche e saggi convenzionali. Per quanto riguarda la terapia in associazione, la porzione extracellulare di Met umano viene preferibilmente somministrata contemporaneamente a hOA-DN30 e dosata in proporzione a hOA-DN30, essendo preferibile senza limitazioni, il rapporto molare 1:1 di hOA-DN30:DecoyMet^{K842E}, a seconda del tipo e della gravità della malattia.

RISULTATI

Generazione della forma a Un Unico Braccio umanizzata e chimerica dell'anticorpo DN30.

Attraverso le tecniche classiche di biologia molecolare, i presenti inventori hanno sostituito i domini

costanti delle catene pesanti e leggere di mAb DN30 con domini costanti derivati da immunoglobuline umane. Il dominio costante della catena leggera è stato sostituito con il dominio della catena di tipo kappa umana (quello più rappresentato negli anticorpi umani naturali), mentre i domini costanti della catena pesante sono stati sostituiti con i domini omologhi derivati dall'IgG1 umana (quella che può indurre ADCC/CDC).

L'umanizzazione dell'anticorpo murino DN30 è stata effettuata da Fair Journey Biologics utilizzando un approccio basato su una libreria di phage display. Sono partiti dall'identificazione di residui FR (framework) devianti e dall'analisi della linea germinale V umana più vicina, scelta da linee germinali con identico coefficiente di combinazione canonico per CDR1-CDR2, utilizzando strumenti e database disponibili: abYsistool del Dr. Andrew Martin presso UCL plus, <http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/> e <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>. Dopo la generazione di librerie di phage display - in cui è stata eseguita la randomizzazione della regione VH e VL - sono stati eseguiti quattro cicli di selezione mediante phage display per affinità. Alla fine del procedimento, è stata selezionata la variante umanizzata DN30 con la più alta identità umana e omologia umana, e con la più alta affinità per Met. Le regioni variabili sono state collegate mediante tecniche classiche di biologia molecolare alle sequenze di domini costanti derivate da immunoglobuline umane, cioè domini costanti della catena pesante di IgG1 e della catena leggera kappa umane.

Per formattare gli anticorpi chimerici e umanizzati nella forma a catena singola a Un Unico Braccio, è necessario inserire modificazioni amminoacidiche specifiche nella regione CH3 per produrre la struttura 'protuberanza nel foro'^{25,26}; un dominio CH3 porta la mutazione della protuberanza: ³⁸⁹T→W, l'altro dominio CH3 porta le mutazioni del foro: ³⁸⁹T→S; ³⁹¹L→A; ⁴³⁸Y→V. I cDNA che codificano per la catena leggera chimerica o umanizzata, la catena pesante chimerica o umanizzata (mutata nel dominio CH3) e il dominio Fc umano (mutato nel dominio CH3) sono stati clonati in plasmidi di espressione e quindi espressi in cellule eucariotiche. Gli anticorpi a Un Unico Braccio assemblati sono stati purificati da supernatanti di colture cellulari mediante cromatografia per affinità e filtrazione su gel. La Figura 1 mostra un disegno schematico dei derivati di DN30 e della separazione mediante SDS-Page in condizioni riducenti e non riducenti dell'hOA-DN30 ricombinante purificato avente la giusta dimensione del peso molecolare.

Gli anticorpi DN30 a Un Unico Braccio riconoscono Met con alta affinità.

Sono state analizzate forme purificate a Un Unico Braccio del DN30 chimerico o umanizzato per il legame con il recettore di Met mediante un saggio ELISA. Come riferimento, il Fab chimerico di DN30 (MvDN30)¹⁰ è stato incluso nell'analisi. Il saggio è stato assemblato per includere Met-Fc in fase solida e i derivati di DN30 in fase liquida. Il legame è stato rivelato usando anticorpi anti-catena k umana. I dati hanno mostrato che sia gli

anticorpi chimerici che quelli umanizzati si legano a Met, hOA-DN30 mostrando la più alta affinità (Fig. 2A).

Analisi della reattività incrociata di hOA-DN30 con recettori di Met non umano.

I presenti inventori hanno analizzato la reattività incrociata di hOA-DN30 con specie eseguendo: (i) un saggio ELISA con domini extracellulari di Met purificati di uomo, topo, ratto e scimmia (Figura 2B); (ii) un'analisi citofluorimetrica del legame dell'anticorpo a Met superficiale espresso dalle cellule di uomo, topo, ratto, cane e scimmia (Fig. 2C). I risultati degli esperimenti hanno mostrato che hOA-DN30 si lega a Met di uomo, ratto, cane, scimmia, mentre l'interazione con Met di topo era molto debole.

Gli anticorpi DN30 a Un Unico Braccio non esercitano proprietà agoniste.

I presenti inventori hanno testato se i nuovi derivati di DN30 potessero mostrare attività agonista di Met in un saggio altamente sensibile, il saggio di diffusione. Cellule di carcinoma pancreatico umano HPAF-II, che rappresentano un sistema standard per determinare la motilità cellulare in risposta alla stimolazione di HGF, sono state stimulate per 24 h con concentrazioni crescenti dell'anticorpo. Come controllo positivo, HGF e mAb DN30 bivalente sono stati inclusi nel saggio. Mentre le cellule stimulate con i controlli positivi erano chiaramente diffuse, il fenotipo di tutte le cellule trattate con i derivati monovalenti di DN30 (MvDN30, chOA-DN30 e hOA-DN30) era indistinguibile da quelle non trattate (Fig. 3).

hOA-DN30 induce potentemente la 'scissione' di Met

I presenti inventori hanno anche studiato se hOA-DN30 mantenesse la capacità di promuovere la scissione e la sottoregolazione del recettore. Cellule A549 sono state incubate con concentrazioni crescenti di chOA-DN30 e hOA-DN30. Come riferimento, MvDN30 è stato incluso nel saggio. Dopo 48 h, gli ectodomini di Met rilasciati nel mezzo condizionato sono stati valutati mediante immunoblotting utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la porzione extracellulare di Met. I livelli cellulari totali di Met sono stati anche determinati sui lisati cellulari utilizzando lo stesso anticorpo. Questa analisi ha rivelato che hOA-DN30 ha indotto in modo efficiente la scissione di Met, con conseguente rilascio di ectodomini di Met solubili nello spazio extracellulare e rimozione fisica di Met dalla superficie cellulare (Fig. 4). Inaspettatamente, l'attività di hOA-DN30 è stata superiore rispetto agli altri due derivati di DN30 inclusi nella prova (vedere la tabella in Fig. 4).

hOA-DN30 inibisce fortemente la fosforilazione di Met.

I presenti inventori hanno studiato se chOA-DN30 e hOA-DN30 inibissero la fosforilazione di Met in cellule derivate da carcinomi umani, cioè GTL-16. Queste cellule hanno un Met attivo costitutivo come conseguenza della sovraespressione del recettore dovuta ad amplificazione genica. L'attivazione di Met è stata determinata mediante immunoblotting con anticorpi anti-fosfoMet. Come mostrato in Fig. 5, entrambe le molecole hanno fortemente compromesso la fosforilazione/attivazione di Met. hOA-DN30, che ha indotto la più forte compromissione dei livelli di Met nelle cellule (confermando i dati ottenuti nelle

cellule A549) si è rivelato il derivato di DN30 più attivo (vedere la tabella in Fig. 5).

hOA-DN30 inibisce potentemente la crescita cellulare dipendente da MET.

La crescita cellulare (vitalità) può essere compromessa da un inibitore di Met solo in cellule dipendenti da MET, che si basano sulla segnalazione di Met per la proliferazione/sopravvivenza. Per testare l'attività dei derivati di DN30, cellule GTL-16 a crescita esponenziale (cellule di carcinoma gastrico dipendenti da MET) sono state incubate con concentrazioni crescenti di chOA-DN30 o hOA-DN30. MvDN30 è stato incluso nella prova come controllo positivo. Dopo 72 h, la vitalità cellulare è stata determinata utilizzando un saggio dell'ATP basato sulla luminescenza. Tutti i derivati di DN30 hanno inibito la crescita delle cellule dipendenti da MET in modo dose-dipendente (Fig. 6). hOA-DN30 ha mostrato la più alta inibizione, essendo la IC_{50} 2,5 e 5,4 volte inferiore rispetto a MvDN30 e chOA-DN30, rispettivamente.

hOA-DN30 è altamente efficace nel bloccare la proliferazione e nell'indurre la citotossicità nelle cellule dipendenti da MET.

Per analizzare ulteriormente i meccanismi alla base dell'inibizione della crescita cellulare dipendente da MET esercitata dai derivati di DN30, gli inventori hanno valutato la proliferazione cellulare e la citotossicità cellulare. Cellule GTL-16 sono state incubate con una dose singola (1 μ M) dei derivati di DN30 (chOA-DN30 o hOA-DN30) e la proliferazione cellulare è stata valutata misurando l'incorporazione di EdU - un analogo della timidina - da

parte delle cellule durante la fase S del ciclo cellulare, con il saggio di citometria a flusso con Edu ClickIT. MvDN30 è stato incluso nel saggio come controllo positivo. Questa analisi ha rivelato che i derivati di DN30 influenzavano la proliferazione, poiché la percentuale di cellule trattate in fase S era drasticamente ridotta rispetto al controllo. In particolare, la molecola più efficace si è rivelata hOA-DN30, dove solo il 4,9% delle cellule stava ancora proliferando (riduzione dell'84,2% rispetto al controllo). Le cellule proliferanti nella popolazione trattata con chOA-DN30 erano il 14,97% (riduzione del 52% rispetto al controllo) (Fig. 7A).

Per verificare se i derivati di DN30 inducessero solo un blocco della proliferazione o se causassero anche citotossicità, cellule GTL-16 dipendenti da MET in crescita esponenziale sono state incubate con concentrazioni crescenti di chOA-DN30 o hOA-DN30. MvDN30 è stato incluso nel saggio come controllo positivo. Dopo 72 h, la citotossicità è stata determinata aggiungendo colorante verde CellTox™ alle cellule e misurando la fluorescenza delle cellule che è direttamente proporzionale al numero di cellule morte. Tutti i derivati di DN30 hanno indotto la citotossicità in cellule GTL-16 in modo dose-dipendente (Fig. 7B). hOA-DN30 ha mostrato la più alta induzione, essendo la EC₅₀ 1,3 e 6,1 volte inferiore rispetto a MvDN30 e chOA-DN30, rispettivamente.

hOA-DN30 inibisce la motilità cellulare indotta da HGF, da solo e in combinazione con DecoyMet.

I presenti inventori hanno testato la capacità di hOA-DN30 di inibire la motilità cellulare dipendente da HGF

delle cellule di carcinoma pancreatico umano HPAF-II. Le cellule sono state incubate con HGF o meno e trattate con una dose crescente di hOA-DN30. Dopo 24 h, le colonie di cellule sono state colorate e analizzate. In questo saggio, hOA-DN30 ha ridotto fortemente la diffusione cellulare dipendente da HGF (Fig. 8).

È stato riportato che nel suddetto sistema cellulare è possibile ottenere un'inibizione più efficace della risposta biologica indotta da HGF bloccando contemporaneamente il ligando (HGF) e il recettore (Met)²⁴. I presenti inventori hanno quindi testato se hOA-DN30 in combinazione con DecoyMet^{K842E} inducesse una risposta terapeutica più elevata. DecoyMet^{K842E} è un recettore solubile ricombinante che comprende l'intera regione extracellulare di Met che presenta una mutazione che annulla l'interazione con DN30; si lega con HGF con alta affinità e inibisce le attività biologiche attivate dal ligando eliminando e neutralizzando l'HGF e formando eterodimeri con recettori di Met intatti ancora presenti sulla superficie cellulare, rendendoli inattivi. Con la quantità equimolare delle due molecole in combinazione, la dose efficace in grado di ripristinare completamente il fenotipo diffuso era 4 volte inferiore alla dose di hOA-DN30 da solo in grado di stimolare un fenotipo cellulare simile (Fig. 8).

hOA-DN30 inibisce l'invasione cellulare indotta da HGF, da solo e in combinazione con DecoyMet.

I presenti inventori hanno testato la capacità di hOA-DN30 di inibire l'invasione cellulare dipendente da HGF di cellule HPAF-II. Le cellule sono state inseminate nelle

camere superiori di filtri transwell rivestiti con matrigel in terreno privo di siero con hOA-DN30 (0,5 μM) da solo o in combinazione con DecoyMet^{K842E} (1 μM). Le camere inferiori sono state riempite con terreno contenente HGF (25 ng/ml). Dopo 24 h, le cellule che erano migrate nella parte inferiore del filtro sono state valutate mediante colorazione e osservazione al microscopio. In questo saggio, hOA-DN30 ha fortemente ridotto l'invasione delle cellule dipendenti da HGF; la risposta cellulare è stata quasi annullata dalla combinazione di hOA-DN30 e DecoyMet^{K842E} (Fig. 9).

hOA-DN30 revoca l'induzione da parte dell'interferone-gamma dell'espressione di PD-L1.

Il ligando 1 della morte cellulare programmata (PD-L1) e il recettore 1 della morte cellulare programmata (PD-1) sono molecole modulatrici chiave, note come checkpoint immunitari, che svolgono un ruolo centrale all'interfaccia tra risposta immunitaria e microambiente tumorale²⁷. Possono compromettere significativamente la capacità del sistema immunitario di controllare la progressione del tumore. L'espressione di PD-L1 da parte delle cellule tumorali è inducibile e l'interferone gamma (IFN γ) è l'induttore più potente²⁸.

I presenti inventori hanno analizzato se l'inibizione di Met da parte di hOA-DN30 potesse modulare la via dell'IFN γ e conseguentemente la regolazione di PD-L1 (Fig. 10). Cellule GTL-16 dipendenti da MET sono state trattate con IFN γ per 48 h e sono state analizzate per l'espressione di PD-L1 inducibile da IFN γ . In una condizione non stimolata, PD-L1 non era rilevabile, mentre

dopo l'esposizione a IFN γ , era costantemente sovraregolato. Il trattamento con hOA-DN30 per 48 h ha significativamente compromesso la sovraregolazione di PD-L1 indotta da IFN γ .

hOA-DN30 mostra un profilo farmacocinetico favorevole *in vivo*.

I presenti inventori hanno studiato le proprietà farmacocinetiche di hOA-DN30, rispetto a MvDN30 e a mAb DN30 chimerico. Una singola dose delle suddette molecole è stata somministrata mediante iniezione endovenosa a topi immunodeficienti. Il sangue periferico dai topi trattati è stato raccolto in diversi punti temporali dopo la somministrazione. Le concentrazioni in circolazione delle molecole studiate sono state determinate mediante ELISA su campioni di siero. I livelli in circolazione di hOA-DN30 erano paragonabili a quelli misurati per mAb, e sempre superiori a MvDN30 (Fig. 11). Inoltre, hOA-DN30 ha mostrato emivita, clearance, AUC e Costante di eliminazione paragonabili all'anticorpo di origine (vedere la tabella in Fig.11).

hOA-DN30 compromette la crescita di tumori dipendenti da MET *in vivo*

La capacità di derivati di DN30 di inibire la crescita tumorale *in vivo* è stata testata su un modello dipendente da MET. 1×10^6 cellule GTL-16 sono state iniettate per via sottocutanea nel fianco di topi NOD-SCID. Dopo 1 settimana, i topi portatori di tumori palpabili sono stati randomizzati in 4 gruppi di trattamento omogenei: Veicolo ($n=6$), MvDN30 ($n=6$), hOA-DN30 ($n=5$), chOA-DN30 ($n=5$). Gli anticorpi sono stati somministrati per iniezione endovenosa

due volte/settimana a 30 mg/kg; per somministrare la stessa quantità di molecole, MvDN30 è stato somministrato seguendo lo stesso programma a 15 mg/kg, poiché il peso molecolare degli anticorpi a Un Unico Braccio è doppio rispetto a MvDN30 (cioè circa 100 KDa per OA-DN30 e circa 50 KDa per MvDN30). MvDN30 non è risultato efficace, come previsto dalla sua breve emivita plasmatica, mentre entrambi i derivati a Un Unico Braccio hanno inibito la crescita tumorale (Fig. 12A) ($P = 0,0007$ e $0,05$ per hOA-DN30 e per chOA-DN30 vs veicolo). Sorprendentemente, hOA-DN30 era estremamente più efficace di chOA-DN30: le masse trattate erano, nel caso di hOA-DN30, l'87,8% e, nel caso di chOA-DN30, il 52,9% più piccole dei controlli (Fig. 12B) ($P = 0,009$ per hOA-DN30 vs chOA-DN30). I presenti inventori hanno inoltre analizzato l'attività inibitoria di hOA-DN30 eseguendo un esperimento di dose-risposta. Mantenendo le condizioni sperimentali sopra descritte, i topi sono stati randomizzati in 5 gruppi omogenei e trattati mediante iniezione i.v. tre volte/settimana con diverse dosi di hOA-DN30. Dosi di 10, 30 e 60 mg/kg erano altamente efficaci nel bloccare la crescita tumorale, mentre il trattamento con 3,3 mg/kg non è risultato statisticamente differente dai controlli (Fig. 13).

MATERIALE E PROCEDIMENTI

Coltura cellulare

Cellule di adenocarcinoma polmonare umano A549, cellule di adenocarcinoma pancreatico umano HPAF-II, mioblasti di muscolo di topo C2C12, mioblasti cardiaci di ratto H9C2 (2-1), cellule renali di cane MDCK e cellule renali di scimmia Cos-7 sono stati ottenuti da ATCC/LGC

Standards S.r.l. (Sesto San Giovanni, Italia); la linea cellulare GTL-16 è un clone derivato da cellule MKN-45 (cellule di carcinoma gastrico umano disponibili presso la Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka, Giappone) che differisce nel numero di copie del gene MET dalla linea cellulare parentale²⁹. La linea cellulare GTL-16 è disponibile presso l'Advanced Biotechnology Center (ABC), Interlab Cell Line Collection (ICLC) Italia, con numero di accesso ICLC PD 08003. Le cellule di carcinoma polmonare umano EBC-1 provenivano dalla Japanese Collection of Research Bioresources. L'ibridoma DN30 è disponibile presso Advanced Biotechnology Center (ABC), Interlab Cell Line Collection (ICLC) Italia, con numero di accesso ICLC PD 05006.

Tutte le cellule sono state coltivate come suggerito dal fornitore. Tutte le colture cellulari sono state testate per la contaminazione da micoplasmi.

Generazione della forma a Un Unico Braccio chimerica e umana dell'anticorpo DN30.

Per l'anticorpo DN30 chimerico: tre cDNA separati che codificano rispettivamente per la catena leggera (VL-CL), la catena pesante (VH-CH1-CH2-CH3) e il dominio Fc (CH2-CH3) sono stati generati mediante sintesi genica. Le regioni variabili (sequenze murine) provenivano dall'anticorpo DN30 (SEQ ID: 15 e 16); le regioni costanti di origine umana derivavano da immunoglobuline umane. Il dominio costante murino della catena leggera è stato sostituito con il dominio della catena di tipo kappa umana (GenBank, sequenza ID#: DI165992), e i domini costanti della catena pesante murina sono stati sostituiti con i

domini omologhi derivati dall'IgG1 umana (GenBank, sequenza ID#: DJ392898).

Per l'anticorpo DN30 umanizzato: L'umanizzazione mediante screening della linea germinale dell'anticorpo murino DN30 è stata effettuata da Fair Journey Biologics utilizzando un approccio basato su una libreria di phage display. Sono partiti dall'identificazione di residui FR (framework) devianti e dall'analisi della linea germinale V umana più vicina, scelta da linee germinali con identico coefficiente di combinazione canonico per CDR1-CDR2, utilizzando strumenti e database disponibili: abYsistool del Dr. Andrew Martin presso UCL plus, <http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/> e <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>. Dopo la generazione di librerie di phage display - in cui è stata eseguita la randomizzazione della regione VH e VL - sono stati eseguiti quattro cicli di selezione mediante phage display per affinità. Alla fine del procedimento, è stata selezionata la variante umanizzata DN30 con la più alta identità umana e omologia umana, e con la più alta affinità per Met. Le regioni variabili sono state collegate mediante tecniche classiche di biologia molecolare alle sequenze di domini costanti derivate da immunoglobuline umane, cioè domini costanti della catena pesante di IgG1 e della catena leggera kappa umane.

Per la formattazione degli anticorpi chimerici e umanizzati nella forma a Un Unico Braccio (chOA-DN30 e hOA-DN30): sono state inserite modificazioni amminoacidiche specifiche nella regione CH3 per produrre la struttura a 'protuberanza nel foro'^{25,26}. È stato dimostrato che le

'protuberanze nei fori' rappresentano una strategia di progettazione efficace per potenziare la formazione di eterodimeri rispetto agli omodimeri. La strategia si basa sul rimodellamento dell'interfaccia del dominio introducendo mutazioni stericamente complementari nella regione CH3 del frammento anticorpale Fc, il sito più esteso di interazione proteina-proteina tra le catene H delle molecole di IgG umane. Una catena, il polipeptide VH-CH1-CH2-CH3, include 389T→W (mutazione del Nodo), in cui un piccolo amminoacido è sostituito con uno più grande; al contrario, l'altra catena, il polipeptide CH2-CH3, include la sostituzione di residui grandi con quelli più piccoli: 389T→S; 391L→A; 438 Y→V (mutazioni del Foro). Queste mutazioni sono state selezionate in base all'ottimizzazione mediante la tecnologia del phage display³⁰, in cui i residui 389, 391 e 438, che sono in prossimità della protuberanza sul dominio CH3 partner, sono stati sostituiti casualmente. L'ingegneria delle protuberanze nei fori facilita l'assemblaggio di un eterodimero, includente le tre diverse catene di amminoacidi (VL-CL + VH-CH1-CH2-CH3 + CH2-CH3) al posto degli omodimeri, cioè l'anticorpo autentico (VL-CL + VH-CH1-CH2-CH3)₂ o solo il dominio Fc (CH2-CH3)₂.

Al terminale N, il polipeptide CH2-CH3 include una sequenza corrispondente a una regione cerniera umana troncata. La delezione è necessaria per escludere la cisteina nella posizione 233 secondo lo schema di numerazione EU di Kabat che è coinvolta nella formazione di un legame disolfuro inter-catena con la cisteina alla posizione C-terminale del dominio costante della catena

leggera (CL). Inoltre, per consentire al polipeptide CH2-CH3 di entrare nel percorso RER/Golgi della sintesi proteica - come fanno la catena leggera (VL-CL) e pesante (VH-CH1-CH2-CH3) dell'anticorpo - nel terminale N, prima della regione cerniera troncata, è inclusa una sequenza corrispondente al peptide segnale della catena Pesante di DN30.

Il frammento anticorpale anti-Met chimerico (chOA-DN30) qui descritto è costituito da:

(i) un dominio variabile della catena leggera avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 15;

(ii) un dominio variabile della catena pesante avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 16;

(iii) un dominio costante della catena leggera (CL) umana avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 9;

(iv) un dominio costante della catena pesante CH1 umana avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 10;

(v) un primo polipeptide Fc umano avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 11; e

(vi) un secondo polipeptide Fc umano avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 12.

Il frammento anticorpale anti-Met umanizzato (hOA-DN30) oggetto della presente descrizione è costituito da:

(i) un dominio variabile della catena leggera umanizzata avente la sequenza amminoacidica riportata in SEQ ID No.: 7;

(ii) un dominio variabile della catena pesante umanizzata avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 8;

(iii) un dominio costante della catena leggera (CL) umana avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 9;

(iv) un dominio costante della catena pesante CH1 umana avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 10;

(v) un primo polipeptide Fc umano avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 11; e

(vi) un secondo polipeptide Fc umano avente la sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 12.

Espressione e purificazione di anticorpi chimerici e umani a un unico braccio

I cDNA che codificano per le catene leggere (sequenza nucleotidica riportata in SEQ ID No.: 17 per la catena leggera umanizzata o SEQ ID No.: 18 per la catena leggera chimerica), catene pesanti (sequenza nucleotidica riportata in SEQ ID No.: 19 per la catena pesante umanizzata o SEQ ID No.: 20 per la catena pesante chimerica) e Fc (sequenza nucleotidica riportata in SEQ ID No.: 21) di cui sopra sono stati clonati in vettori di espressione comunemente disponibili (per es. plasmidi pcDNA3.1 cat.# V79020 Invitrogen Corporation, Camarillo, CA) e utilizzati per transfettare cellule ExpiCHO-S (cat.#: A29127, ThermoFisher Scientific). Il rapporto rispetto al vettore è stato ottimizzato per massimizzare l'output dell'eterodimero desiderato di 97,5 kDa (OA-Ab) e per minimizzare la presenza di qualsiasi omodimero bivalente di 150 kDa (Mab

autentico). Il rapporto ottimale era: 1:1:2 rispettivamente per catena Leggera, catena Pesante a dimensione intera (vettore della "protuberanza") e Fc (vettore del "foro"). Questa condizione ha portato alla minore quantità di omodimero presente, con l'eterodimero che rappresentava circa l'85% della proteina totale. L'espressione transitoria è stata potenziata mediante il reagente di transfezione di CHO ExpiFectamine™ (cat.# A29130, ThermoFisher Scientific). I supernatanti sono stati raccolti dopo 9 giorni di produzione. Gli anticorpi OA-DN30 sono stati purificati utilizzando una colonna Hitrap MabSelect Sure (cat.# GE29-0491-04, Sigma Aldrich) su un sistema di cromatografia ÄKTA Pure 25. Gli anticorpi OA-DN30 sono stati successivamente eluiti usando tampone citrato 0,1 M a pH 3,0. Le frazioni eluite sono state raccolte e neutralizzate con Tris-HCl 1 M pH 9,0 (in un rapporto di 0,15 ml per ml di proteina eluita). Gli anticorpi OA-DN30 sono stati ulteriormente purificati su una colonna ad esclusione dimensionale 26/600 Superdex 200 equilibrata con 1x PBS (pH 7,4) (cat.# GE28-9893-36, Sigma Aldrich) su un sistema di cromatografia liquida GE AKTA Prime Liquid Chromatography System (GE Healthcare Life Science), in cui le frazioni contenenti OA-Ab sono state separate dalle frazioni omodimeriche (mAb o Fc). Le frazioni SEC preparative contenenti gli anticorpi OA-DN30 sono state raggruppate e analizzate mediante SDS-PAGE per accertare la purezza. Le frazioni raggruppate sono state anche testate per i livelli di endotossina. Le frazioni raggruppate finali dalle purificazioni SEC preparative, hanno mostrato assenza di qualsiasi omodimero bivalente, e

presenza di una piccola quantità (<5%) di una più piccola banda di ≈ 70 kDa, che corrisponde all'omodimero Fc Protuberanza-Protuberanza.

Generazione, espressione e purificazione dell'ectodominio di Met mutato

La sequenza di cDNA di ectodominio di MET umano (DecoyMet) che presentava una singola sostituzione amminoacidica è stata sinteticamente generata partendo dalla sequenza di ectodominio di Met umano come divulgata in GenBank al numero di deposito X54559, e usando il kit di mutagenesi sito-diretta QuickChange II (cat.# 200524 Agilent Technologies, Santa Clara, CA), seguendo le istruzioni del produttore. La procedura richiede la progettazione di oligonucleotidi senso e antisenso, che includono la mutazione puntiforme desiderata. Sono stati impiegati i seguenti oligonucleotidi:

- mutazione K842E:

sn. 5'-gtacataatcctgtggtttgagccttttgaaaagccagtg-3' (SEQ ID No.: 22)

as. 5'-cactggccttttcaaaaggctcaaacacaggattatgtac-3' (SEQ ID No.: 23)

Il recettore solubile ingegnerizzato è stato prodotto mediante transfezione transitoria di cellule HEK-293T con plasmidi pcDNA3.1 (cat.# V79020 Invitrogen Corporation, Camarillo, CA) che esprimevano cDNA codificante per il mutante DecoyMet. Le cellule transfettate sono state tenute senza nutrienti per tre giorni e sono stati raccolti i supernatanti delle colture cellulari contenenti il recettore solubile. La purificazione delle proteine ricombinanti è stata effettuata mediante cromatografia per

affinità utilizzando colonne HisTrap HP (cat.# 17524701 GE Healthcare, Freiburg, Germania) secondo le istruzioni del produttore. La produzione e la purificazione di proteine su larga scala sono state eseguite mediante U-Protein Express BV (Utrecht, Paesi Bassi).

La variante di DecoyMet umano (DecoyMET^{K842E}) ha le sequenze amminoacidiche riportate in SEQ ID No.: 14.

Analisi delle proteine purificate mediante SDS-PAGE + blu di Coomassie

1 µg di hOA-DN30 umano purificato è stato separato in un gel a gradiente di acrilammide al 4-12% mediante SDS-PAGE in presenza o in assenza di β-mercaptoetanololo seguendo procedimenti standard. Marcatori di peso molecolare (cat.# 1610374, Bio-Rad) sono stati inclusi nell'analisi. I polipeptidi separati nel gel sono stati rivelati con il reagente/colorante blu Gel Code Blue Stain Reagent (cat.# 24590, Thermo Fisher Scientific).

Saggi di Legame ELISA

Per l'analisi dell'interazione tra Met e i derivati di DN30, chimere Met-Fc purificate (cat.# 358-MT-100 R&D Systems, 100 ng/pozzetto) sono state immobilizzate su piastre ELISA. Dopo la saturazione con BSA allo 0,5% incubato 1 h a 37°C, concentrazioni crescenti degli anticorpi (MvDN30, chOA-DN30 o hOA-DN30, 0-500 nM preparate in PBS-BSA 0,5% - Tween 0,1%) sono state aggiunte nella fase liquida. Il legame è stato rivelato usando anticorpo anti-catena k umana coniugato con HRP (cat.# A7164, Sigma-Aldrich) facendo seguire l'incubazione con TMB (cat.# T8665, Sigma Aldrich). Il saggio colorimetrico è stato quantificato mediante lettore di piastre multifunzionale

VICTOR-X4 (Perkin Elmer Instruments INC., Whaltman, MA). I dati sono stati analizzati e interpolati utilizzando il software Prism (GraphPad).

Per l'analisi di legame ELISA di hOA-DN30 (fase liquida) con la chimera Met-Fc (fase solida) derivata da specie differenti, Met ottenuto da uomo (cat.# 358-MT-100 R&D Systems), topo (cat.# 50622-M02H, Sino Biological), ratto (cat.# 80004-R02H, Sino Biological), e scimmia (cat.# 90304-C02H, Sino Biological) è stato incluso nel saggio. La procedura era uguale a quella sopra descritta.

Analisi citofluorimetrica del legame

Per il legame di hOA-DN30 con Met espresso sulla superficie delle cellule, 2×10^5 cellule EBC-1, C2C12, H9C2, MDCK o Cos-7 sono state trattate con il reagente di dissociazione cellulare StemPro™ Accutase™ (cat.# A1110501, ThermoFisher Scientific) raccolte e incubate per 1 ora a 4°C in PBS-2% FCS. La colorazione dell'anticorpo è stata effettuata incubando le cellule per 30 min a 4°C con 10 µg/ml di hOA-DN30 in PBS-2% BSA. Dopo 6 lavaggi con PBS-2% BSA, le cellule sono state incubate con IgG anti-APC umana (cat.# 109-606-088 Jackson Immuno Research) con diluizione 1:100 per 30 min a 4°C e quindi lavate per rimuovere gli anticorpi non legati. Le cellule sono state co-colorate con DAPI (3 µl di 1 µg/ml di soluzione pronta all'uso, Sigma-Aldrich, cat.# 10236276001) per 5 min a 4°C e analizzate per l'espressione di Met mediante software Summit 4.3 (Dako). Il segnale di fluorescenza derivato dall'isotipo di controllo (IgG anti-APC umana) è stato fissato come soglia ($0 < \text{MFI} < 10^1$). Le cellule sono state considerate positive per l'espressione di Met se

l'Intensità di Fluorescenza Media (MFI) era superiore alla soglia ($MFI > 10^1$).

Analisi della scissione di Met

Monostrati di A549 sub-confluenti sono stati lavati due volte con PBS e poi incubati in terreno privo di siero con concentrazioni crescenti (37, 111, 333, 1000 nM) di derivati di DN-30. Dopo 48 h, il terreno condizionato è stato raccolto e le cellule sono state lisate con Tampone Laemmli. I livelli di proteina Met sono stati determinati in 15 µg di proteine cellulari totali mediante Western blot usando anticorpi anti-Met (3D4, cat.# 08-1366 Invitrogen Corporation); come controllo del caricamento, i filtri sono stati inoltre sondati con anticorpi anti-vinculina (clone hVIN-1, cat.# V9131 Sigma Life Science). I livelli di ectodominio di Met sono stati determinati in 15 µl di supernatante di coltura cellulare mediante Western blot utilizzando un anticorpo anti-HGFR/Met umani diretto contro il dominio extracellulare del recettore (cat.# AF276, R&D Systems). Anticorpi secondari anti-IgG1 di topo coniugati con HRP (cat.# JI115035003, Jackson ImmunoResearch) e il sistema ECL (cat.# W1015, Promega) sono stati utilizzati per la rivelazione delle proteine. Le bande di Western Blot sono state quantificate utilizzando il software ImageJ.

Saggi di fosforilazione di MET

Cellule GTL-16 in coltura senza siero sono state incubate per 24 h con derivati di DN30 (1000 o 250 nM). I lisati cellulari totali sono stati analizzati mediante Western blot utilizzando i seguenti anticorpi primari: anti-Met phospho-Tyr^{1234/1235} (D26, cat.# 3077 Cell Signaling Technology); anti-Met (3D4, cat.# 13-1366 Invitrogen

Corporation); e anti-actina (ab5694, Abcam). Anticorpi secondari anti-IgG1 di topo e anti-IgG di coniglio (cat.# JI111035003) coniugati con HRP e il Sistema ECL sono stati utilizzati per la rivelazione delle proteine. Le bande di Western Blot sono state quantificate utilizzando il software ImageJ.

Saggi biologici in vitro

Per i saggi di diffusione cellulare, cellule HPAF-II (8000/pozzetto) sono state insemiante in piastre da 96 pozzetti in terreno di coltura completo. Per analizzare l'attività agonista degli anticorpi, dopo 24 h, HGF (8 ng/ml, controllo positivo, cat.# 294-HG-025, R&D Systems) o gli anticorpi (mAb DN30, MvDN30, chOA-DN30, hOA-DN30, tutti alla concentrazione di 200 nM), sono stati aggiunti al terreno di coltura. Per analizzare l'attività inibitoria, sono state aggiunte concentrazioni crescenti (0-4 μ M) di hOA-DN30, da solo o in combinazione 1:1 con DecoyMet^{K842E}. Dopo un ulteriore tempo di 24 h, le cellule sono state stimulate con 6,25 ng/ml di HGF per 24 h. Le cellule sono state quindi fissate con glutaraldeide all'11% (cat.# 340855 Sigma-Aldrich), colorate con cristalvioletto allo 0,1% (cat.# C3886 Sigma-Aldrich) e analizzate mediante osservazione al microscopio (Microscopio Leica DM2000). Le immagini sono state acquisite con la fotocamera digitale a colori QICAM Fast 1394 (QImaging).

Per i saggi di invasione cellulare, cellule HPAF-II ($1,5 \times 10^5$ /pozzetto) sono state sospese in terreno di coltura privo di siero in presenza di hOA-DN30 0,5 μ M da solo o in combinazione con DecoyMet^{K842E} 1 μ M, e insemiante sul compartimento superiore di camere transwell pre-rivestite

con 30 µg/pozzetto di Matrigel Matrix (cat.# 354234, Corning Inc.). Terreno di coltura integrato con FBS al 2% e 6,25 ng/ml di HGF è stato aggiunto al compartimento inferiore delle camere. Dopo 24 h, le cellule sulla parte superiore dei filtri transwell sono state rimosse meccanicamente, mentre le cellule che erano migrate attraverso la membrana sono state fissate con glutaraldeide all'11% e colorate con cristalvioletto allo 0,1%. L'invasione cellulare è stata quantificata con il software Image-J.

Per il saggio di vitalità, cellule GTL-16 sono state insemiante, 2000 cellule/pozzetto, in una piastra da 96 pozzetti con FBS al 10% come terreno di coltura. Dopo 24 h, il terreno è stato sostituito con un terreno fresco con FBS al 10% più le molecole da testare (concentrazioni crescenti - da 0 a 10 µM). La vitalità cellulare è stata valutata dopo 72 h utilizzando CellTiter-Glo (cat.# G7573 Promega Corp), secondo le istruzioni del produttore. La chemiluminescenza è stata rilevata con VICTOR X4.

Per il saggio di proliferazione, 350000 cellule GTL-16 sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti in terreno FCS al 10%. Dopo 24 h, le cellule sono state trattate con una concentrazione fissa (1 µM) di derivati di DN30 per ulteriori 48 h. Quindi, EdU 10 µM (cat.# A10044, Thermo Fisher) è stato aggiunto al terreno di coltura per altre 2 h. La % di cellule nella fase S è stata determinata mediante analisi citofluorimetrica seguendo la procedura del saggio citofluorimetrico Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay (cat.# C10425, Thermo Fisher).

Per il saggio di citotossicità, 2000 cellule GTL-16 sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti in terreno FCS al 10%. Dopo 24 h, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti dei derivati di DN30 per ulteriori 48 h. La citotossicità cellulare è stata valutata mediante saggio di citotossicità Cell-Tox™ Green (cat.# G8741, Promega) seguendo le istruzioni del produttore.

Analisi dell'espressione di PD-L1

Cellule GTL-16 sub-confluenti sono state trattate con 50 ng/ml di IFN γ -1b (Miltenyi Biotec, cat.# 130-096-484) per 48 h (sostituzione eseguita ogni 24 h) in combinazione con hOA-DN30 250 nM. I monostrati sono stati quindi lisati in tampone Laemmli e 45 μ g di proteine totali sono stati sottoposti a gel SDS-PAGE all'8%. Le proteine sono state trasferite dal gel su membrane di nitrocellulosa iBlot Transfer (Life technologies, cat.# IB23001) seguendo i procedimenti standard. L'espressione di PD-L1 è stata rilevata dall'anticorpo anti-PD-L1 (E1L3N, cat.# 13684, Cell Signing Technology). I livelli di P-Met sono stati verificati mediante anticorpi anti-MET phospho-Tyr^{1234/1235} (D26). Come controllo del caricamento, i filtri sono stati sondati con anti-GAPDH (D4C6R, cat.# 97166 Cell Signaling Technology). Anticorpi secondari anti-IgG di topo (cat.# JI115035003) o anti-IgG di coniglio (cat.# JI111035144) di capra (entrambi della Jackson ImmunoResearch) e il Sistema ECL sono stati usati per la rivelazione delle proteine.

Esperimenti in vivo

Tutte le procedure sugli animali sono state eseguite secondo protocolli approvati dal Comitato Etico per la sperimentazione sugli animali della Fondazione Piemontese

per la Ricerca sul Cancro e dal Ministero della Sanità Italiano. Topi NOD-SCID sono stati acquistati dalla Charles River (Calco, Italia).

Per l'analisi farmacocinetica, a topi NOD-SCID è stata praticata un'iniezione per via endovenosa di una singola dose (100 µg) di hOA-DN30. Il sangue periferico è stato raccolto in diversi punti temporali: 10', 30', 1 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h. Le concentrazioni sieriche delle molecole terapeutiche sono state misurate mediante ELISA come sopra descritto nella sezione saggio di legame, interpolando i valori di assorbanza dei campioni sulla parte lineare di una curva standard ottenuti mediante diluizioni seriali delle differenti molecole purificate. Ogni punto temporale era il valore medio di 4 topi. I parametri farmacocinetici ($t_{1/2}$ elim; emivita; CL: clearance; AUC_{tot}: Area Sotto la Curva; K elim: costante di eliminazione) sono stati calcolati analizzando i valori di concentrazione con il software Kinetica 4.1.1 (InnaPhase Corp).

Per l'analisi della crescita tumorale sono state inoculate 1×10^6 cellule GTL-16 nel fianco dei topi NOD-SCID. La crescita tumorale è stata monitorata mediante misurazione con calibro due volte alla settimana. Il volume tumorale è stato calcolato usando la formula: $V = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{x}{2}\right) \left(\frac{y}{2}\right) \left(\frac{z}{2}\right)$, in cui x, y e z sono altezza, larghezza e profondità della massa tumorale. Quando i tumori hanno raggiunto un volume di 70-100 mm³ (circa una settimana dopo l'iniezione delle cellule) i topi sono stati randomizzati in gruppi omogenei. In un caso, sono stati generati 4 gruppi (veicolo PBS, MvDN30, chOA-DN30, hOA-DN30; tutti gli

anticorpi 30 mg/kg, 2 volte a settimana); nell'altro caso, sono stati generati 5 gruppi (veicolo PBS, hOA-DN30 60 mg/kg, hOA-DN30 30 mg/kg, hOA-DN30 10 mg/kg, hOA-DN30 3,3 mg/kg; tutte le dosi 3 volte a settimana). Le molecole sono state somministrate mediante iniezione endovenosa. Alla fine degli esperimenti (15 o 17 giorni di trattamento) i topi sono stati sacrificati, i tumori sono stati asportati e pesati.

Analisi statistica

La media e la deviazione standard (SD) sono state calcolate utilizzando il software Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation). Per calcolare i valori K_d , i dati dei saggi ELISA sono stati analizzati e interpolati secondo la regressione non lineare, curva iperbolica del legame a un solo sito, utilizzando il software GraphPad Prism (GraphPad Software). Per calcolare i valori IC_{50} ed EC_{50} , i dati sono stati analizzati e interpolati secondo la regressione non lineare, curva sigmoidale di dose-risposta, utilizzando il software GraphPad Prism. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno due volte. Le figure mostrano un esperimento rappresentativo.

RIFERIMENTI

1. Comoglio PM, Trusolino L, Boccaccio C. Known and novel roles of the MET oncogene in cancer: a coherent approach to targeted therapy. *Nat Rev Cancer* 2018; **18**(6): 341-358; doi 10.1038/s41568-018-0002-y.
2. Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, Zhu W, Bhawe K, Mendoza N et al. Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res* 2006; **66**(1): 283-289; doi 10.1158/0008-5472.CAN-05-2749.
3. Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M, Comoglio PM. Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem* 1994; **269**(3): 1815-1820.
4. Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N, Giordano S. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* 2002; **416**(6877): 187-190; doi 10.1038/416187a.
5. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**(12): 834-848; doi 10.1038/nrm3012.
6. Prat M, Crepaldi T, Pennacchietti S, Bussolino F, Comoglio PM. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *J Cell Sci* 1998; **111** (Pt 2): 237-247.
7. Pacchiana G, Chiriaco C, Stella MC, Petronzelli F, De Santis R, Galluzzo M et al. Monovalency unleashes the full therapeutic potential of the DN-30 anti-Met antibody. *J Biol Chem* 2010; **285**(46): 36149-36157; e-pub ahead of print 2010/09/10; doi 10.1074/jbc.M110.134031.
8. Schelter F, Kobuch J, Moss ML, Becherer JD, Comoglio PM, Boccaccio C et al. A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J Biol Chem* 2010; **285**(34): 26335-26340; doi 10.1074/jbc.M110.106435.
9. Foveau B, Ancot F, Leroy C, Petrelli A, Reiss K, Vingtdoux V et al. Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol Biol Cell* 2009; **20**(9): 2495-2507; doi 10.1091/mbc.E08-09-0969.
10. Vigna E, Chiriaco C, Cignetto S, Fontani L, Basilico C, Petronzelli F et al. Inhibition of ligand-independent constitutive activation of the Met oncogenic receptor by the engineered chemically-modified antibody DN30. *Mol Oncol* 2015; **9**(9): 1760-1772; doi 10.1016/j.molonc.2015.05.007.
11. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a

- human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; **321**(6069): 522-525; doi 10.1038/321522a0.
12. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; **332**(6162): 323-327; doi 10.1038/332323a0.
 13. Presta LG. Antibody engineering. *Curr Opin Biotechnol* 1992; **3**(4): 394-398.
 14. Vaswani SK, Hamilton RG. Humanized antibodies as potential therapeutic drugs. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; **81**(2): 105-115; quiz 115-106, 119; doi 10.1016/S1081-1206(10)62794-9.
 15. Hurle MR, Gross M. Protein engineering techniques for antibody humanization. *Curr Opin Biotechnol* 1994; **5**(4): 428-433.
 16. Harris WJ. Production of humanized monoclonal antibodies for in vivo imaging and therapy. *Biochem Soc Trans* 1995; **23**(4): 1035-1038.
 17. Bloom JW, Madanat MS, Marriott D, Wong T, Chan SY. Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4. *Protein Sci* 1997; **6**(2): 407-415; doi 10.1002/pro.5560060217.
 18. Humphreys DP, Chapman AP, Reeks DG, Lang V, Stephens PE. Formation of dimeric Fabs in *Escherichia coli*: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tail piece sequences and growth conditions. *J Immunol Methods* 1997; **209**(2): 193-202.
 19. Ferracini R, Longati P, Naldini L, Vigna E, Comoglio PM. Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1991; **266**(29): 19558-19564.
 20. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 1994; **77**(2): 261-271.
 21. Gherardi E, Love CA, Esnouf RM, Jones EY. The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* 2004; **14**(6): 669-678; doi 10.1016/j.sbi.2004.10.010.
 22. Bork P, Doerks T, Springer TA, Snel B. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 1999; **24**(7): 261-263.
 23. Makabe K, Nakanishi T, Tsumoto K, Tanaka Y, Kondo H, Umetsu M et al. Thermodynamic consequences of mutations in vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody, 528. *J Biol Chem* 2008; **283**(2): 1156-1166; e-pub ahead of print 2007/10/17; doi 10.1074/jbc.M706190200.
 24. Basilico C, Modica C, Maione F, Vigna E, Comoglio PM. Targeting the MET oncogene by concomitant inhibition of

- receptor and ligand via an antibody-"decoy" strategy. *Int J Cancer* 2018; e-pub ahead of print 2018/04/25; doi 10.1002/ijc.31550.
25. Ridgway JB, Presta LG, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* 1996; **9**(7): 617-621.
 26. Zhu Z, Presta LG, Zapata G, Carter P. Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation. *Protein Sci* 1997; **6**(4): 781-788; doi 10.1002/pro.5560060404.
 27. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(6): 467-477; doi 10.1038/nri2326.
 28. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* 2017; **19**(6): 1189-1201; doi 10.1016/j.celrep.2017.04.031.
 29. Rege-Cambrin G, Scaravaglio P, Carozzi F, Giordano S, Ponzetto C, Comoglio PM et al. Karyotypic analysis of gastric carcinoma cell lines carrying an amplified c-met oncogene. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **64**(2): 170-173.
 30. Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J Mol Biol* 1997; **270**(1): 26-35; doi 10.1006/jmbi.1997.1116.

RIVENDICAZIONI

1. Frammento anticorpale anti-Met comprendente un singolo braccio legante l'antigene e una regione Fc (che aumenta la stabilità di detto frammento anticorpale rispetto a una molecola Fab comprendente detto braccio legante l'antigene), in cui la regione Fc comprende un complesso di un primo ed un secondo polipeptide Fc, in cui il frammento anticorpale comprende:

(i) un primo polipeptide comprendente un dominio variabile della catena leggera (VL) umanizzata e un dominio costante della catena leggera (CL) umana, in cui il dominio VL umanizzato è fuso al dominio CL umano nella direzione dal terminale N al terminale C, e in cui il dominio VL umanizzato contiene tre regioni determinanti la complementarità (CDR) aventi sequenze amminoacidiche come riportate in SEQ ID No. 1, 2 e 3;

(ii) un secondo polipeptide comprendente un dominio variabile della catena pesante (VH) umanizzata, un dominio costante CH1 della catena pesante umana e il primo polipeptide Fc, in cui il primo polipeptide Fc comprende una regione cerniera, un dominio costante CH2 umano e un dominio costante CH3 umano, in cui il dominio VH umanizzato è fuso al dominio CH1 umano, che è fuso alla regione cerniera umana, che è fusa al dominio CH2 umano, che è fuso al dominio CH3 umano nella direzione dal terminale N al terminale C, e in cui il dominio VH umanizzato contiene tre regioni determinanti la complementarità (CDR) aventi sequenze amminoacidiche come riportate in SEQ ID No. 4, 5 e 6; e

(iii) un terzo polipeptide comprendente il secondo polipeptide Fc umano, in cui il secondo polipeptide Fc umano comprende una regione cerniera umana, un dominio costante CH2 umano e un dominio costante CH3 umano, in cui la regione cerniera umana è fusa al dominio CH2 che è fuso al dominio CH3 umano nella direzione dal terminale N al terminale C, in cui la regione cerniera umana è troncata al terminale N.

2. Frammento anticorpale anti-Met secondo la rivendicazione 1, in cui il dominio CL umano è un dominio della catena leggera di tipo kappa umana.

3. Frammento anticorpale anti-Met secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui la regione cerniera umana e i domini costanti umani CH1, CH2 e CH3 provengono da un IgG1 umana.

4. Frammento anticorpale anti-Met secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui i due polipeptidi Fc sono collegati attraverso legami disolfuro intermolecolari nella regione cerniera.

5. Frammento anticorpale anti-Met secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, in cui il primo polipeptide Fc e il secondo polipeptide Fc si incontrano all'interfaccia, e uno tra il primo e il secondo polipeptide Fc comprende una protuberanza all'interfaccia, e l'altro tra il primo e il secondo polipeptide Fc comprende un foro all'interfaccia, in cui la protuberanza è posizionabile nel foro.

6. Frammento anticorpale anti-Met secondo la rivendicazione 5, in cui uno tra il primo e il secondo polipeptide Fc comprende un dominio costante CH3 mutato, in

cui il dominio costante CH3 mutato porta una mutazione amminoacidica nella posizione 389, in cui l'amminoacido originale nella posizione 389 è stato mutato importando un amminoacido avente un volume della catena laterale più grande rispetto all'amminoacido originale; e in cui l'altro tra il primo e il secondo polipeptide Fc comprende un dominio costante CH3 mutato, in cui il dominio costante CH3 mutato porta tre mutazioni amminoacidiche nelle posizioni 389, 391 e 438, in cui gli amminoacidi originali sono stati mutati importando amminoacidi aventi un volume delle catene laterali più piccolo rispetto agli amminoacidi originali, in cui la numerazione degli amminoacidi è secondo lo schema di numerazione EU di Kabat.

7. Frammento anticorpale anti-Met secondo la rivendicazione 6, in cui gli amminoacidi originali nelle posizioni 389, 391 e 438 sono rispettivamente treonina, leucina e tirosina; e in cui in uno tra il primo e il secondo polipeptide Fc la treonina in posizione 389 è stata mutata in triptofano; e in cui nell'altro tra il primo e il secondo polipeptide Fc la treonina in posizione 389 è stata mutata in serina, la leucina in posizione 391 è stata mutata in alanina e la tirosina in posizione 438 è stata mutata in valina.

8. Frammento anticorpale anti-Met secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7, in cui il dominio VL umanizzato ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 7, e in cui il dominio VH umanizzato ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 8.

9. Frammento anti-Met secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 8, in cui il dominio CL umano ha una

sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 9 e il dominio CH1 umano ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 10.

10. Frammento anticorpale anti-Met secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 9, in cui il primo polipeptide Fc umano ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 11, e il secondo polipeptide Fc umano ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 12.

11. Frammento anticorpale anti-Met secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10, in cui il frammento anticorpale anti-Met quando si lega a Met induce la scissione di un dominio extracellulare di Met.

12. Acido nucleico isolato che codifica per il frammento anticorpale anti-Met secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 11.

13. Composizione comprendente due o più acidi nucleici ricombinanti che codificano collettivamente per il frammento anticorpale anti-Met secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 11.

14. Prodotto comprendente, in un singolo flacone o in due flaconi, (a) un frammento anticorpale anti-Met secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 11, e un veicolo farmaceuticamente accettabile, e (b) una porzione extracellulare di Met umano e un veicolo farmaceuticamente accettabile, in cui la porzione extracellulare di Met umano è in grado di legarsi al Fattore di Crescita degli Epatociti (HGF) in modo stabile e contiene almeno una mutazione amminoacidica all'interno dell'epitopo

riconosciuto dal frammento anticorpale per impedire il legame del frammento anticorpale anti-Met con esso.

15. Prodotto secondo la rivendicazione 14, in cui la porzione extracellulare di Met umano contiene domini SEMA, PSI, IPT-1, IPT-2, IPT-3 e IPT-4.

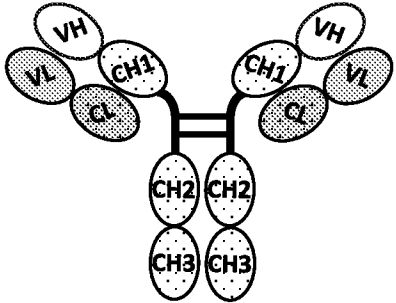
16. Prodotto secondo la rivendicazione 14 o la rivendicazione 15, in cui la porzione extracellulare di Met umano ha una sequenza amminoacidica come riportata in SEQ ID No.: 13, in cui almeno uno degli amminoacidi tra la posizione 797 e la posizione 875 di SEQ ID No.: 13 è mutato per impedire il legame del frammento anticorpale anti-Met con esso.

17. Prodotto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 14 a 16, in cui la porzione extracellulare di Met umano ha la sequenza amminoacidica riportata in SEQ ID No.: 14.

18. Frammento anticorpale anti-Met secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 11 o prodotto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 14 a 17 per l'uso nel trattamento di un paziente affetto da tumore e/o metastasi, in cui il paziente presenta alterazioni genetiche del gene MET.

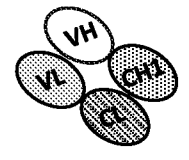
19. Prodotto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 14 a 17 per l'uso nel trattamento di un paziente affetto da tumore e/o metastasi, in cui il paziente presenta un gene MET di tipo selvatico.

A



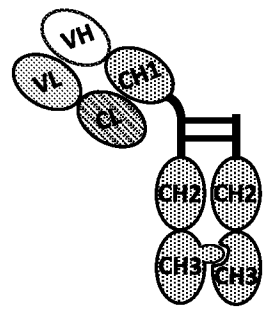
DN30 mAb

B



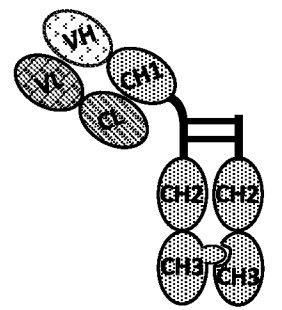
MvDN30

C



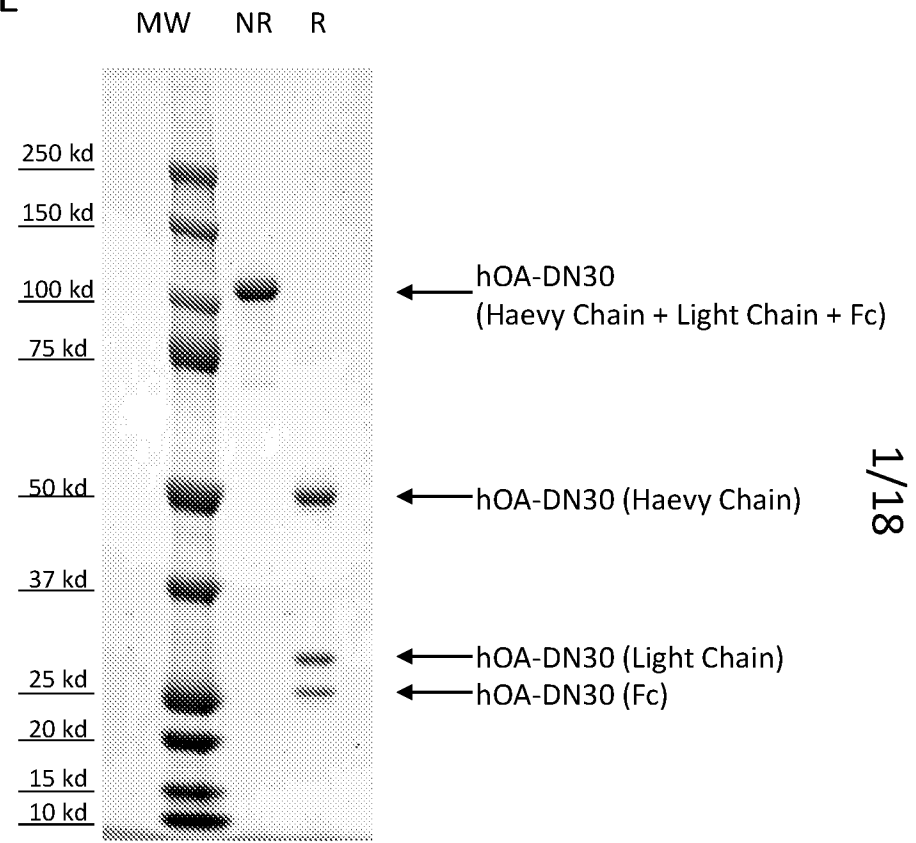
chOA-DN30

D



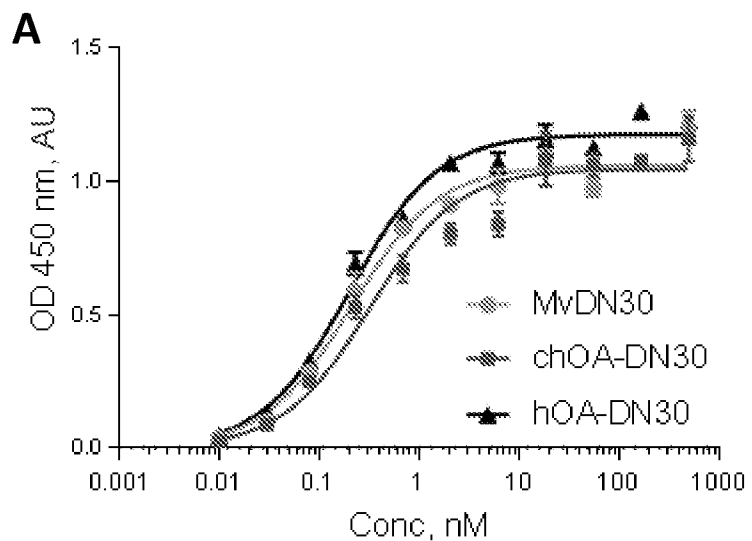
hOA-DN30

E

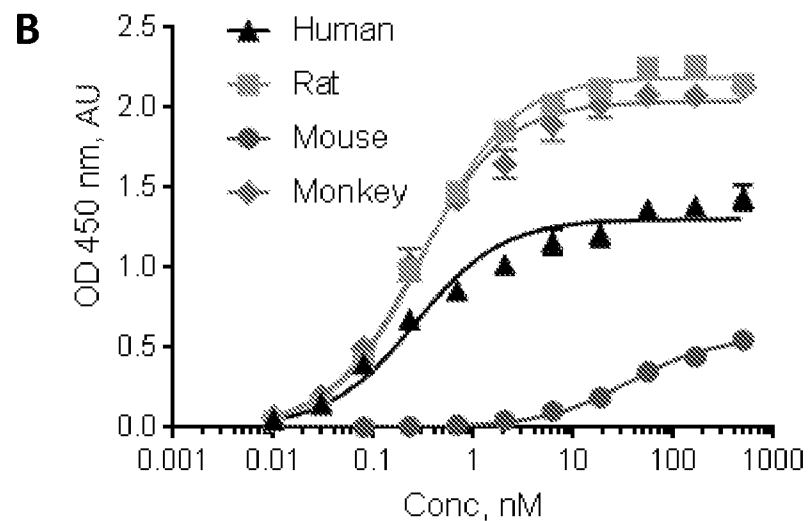


1/18

Fig. 1



	Kd (nM)	Bmax (AU)	R ²
MvDN30	0.210 ± 0.027	1.061 ± 0.022	0,98
chOA-DN30	0.319 ± 0.052	1.046 ± 0.026	0,96
hOA-DN30	0.202 ± 0.018	1.177 ± 0.016	0,99



	Kd (nM)	Bmax (AU)	R ²
Human	0.262 ± 0.037	1.303 ± 0.029	0,97
Rat	0.325 ± 0.016	2.189 ± 0.017	0,99
Mouse	35.99 ± 2.381	0.568 ± 0.012	0,99
Monkey	0.273 ± 0.021	2.041 ± 0.025	0,99

Fig. 2

C

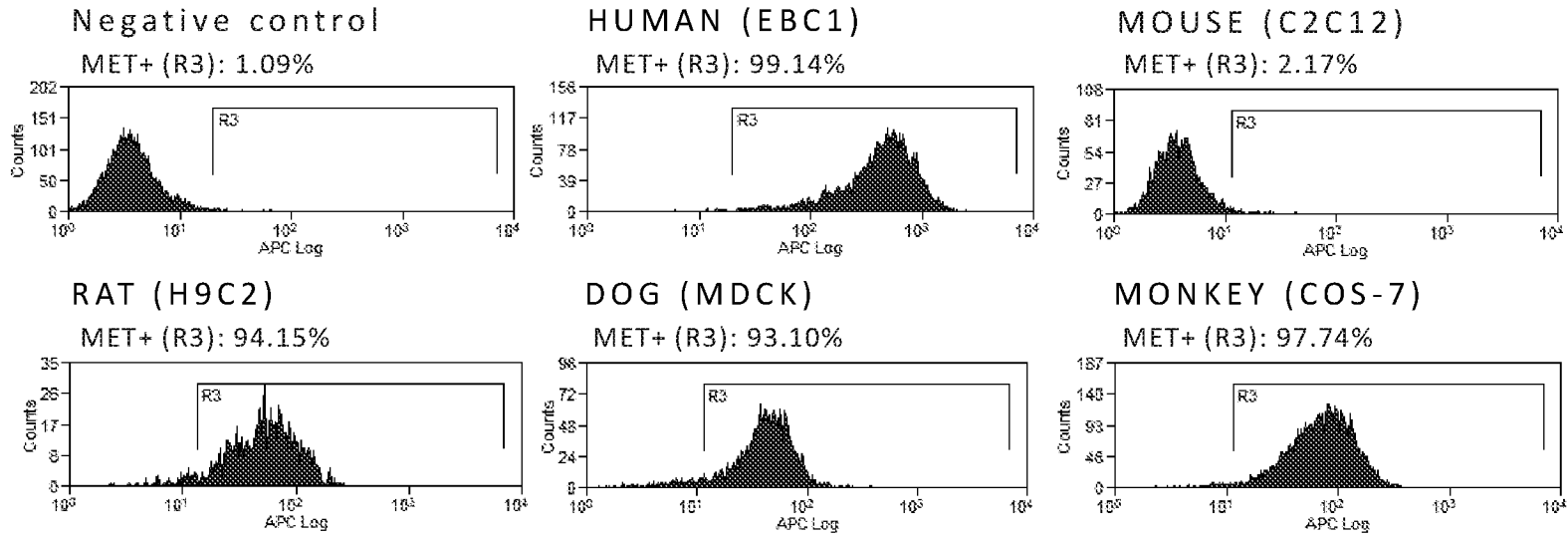


Fig. 2/cont.

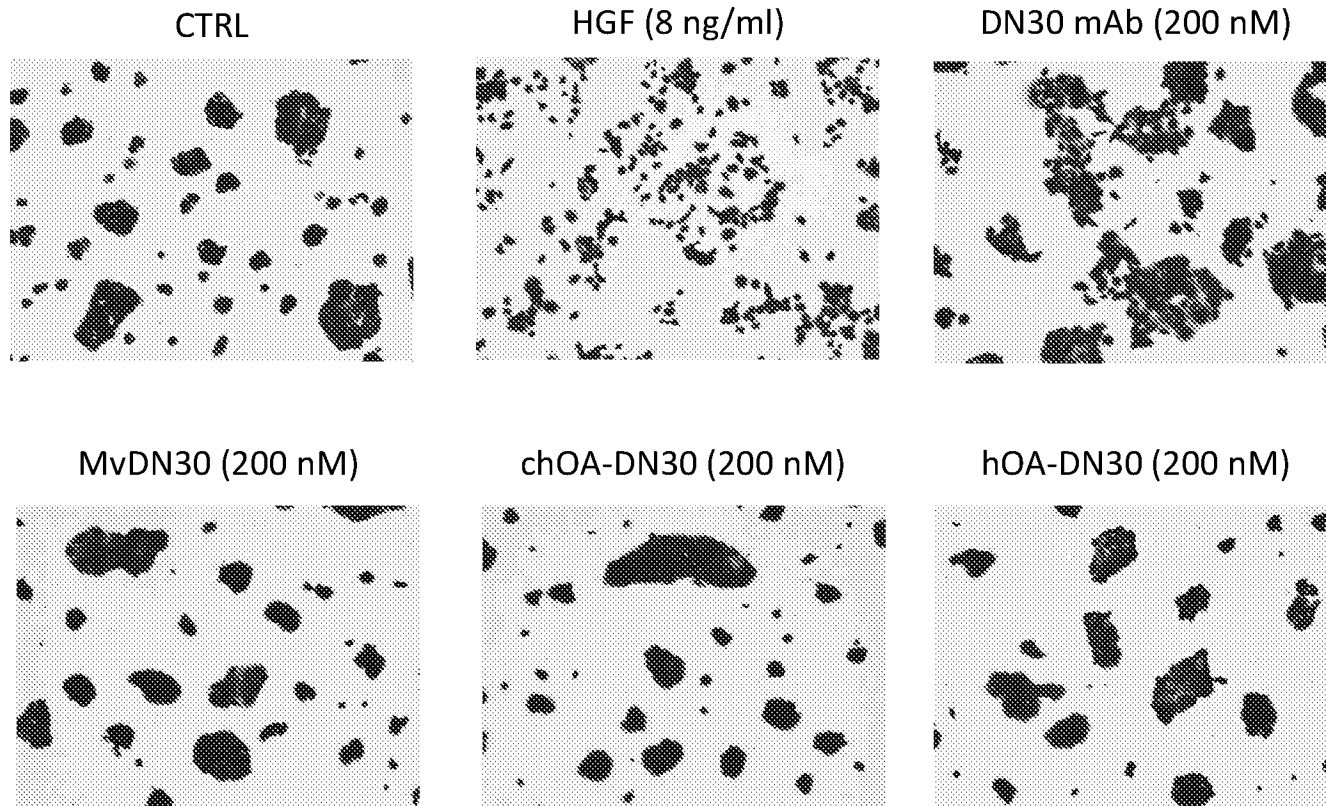
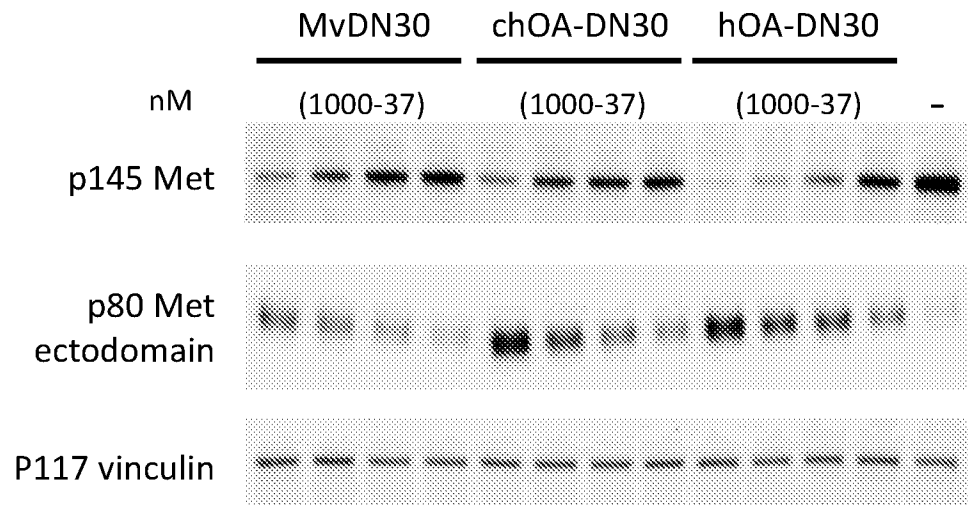


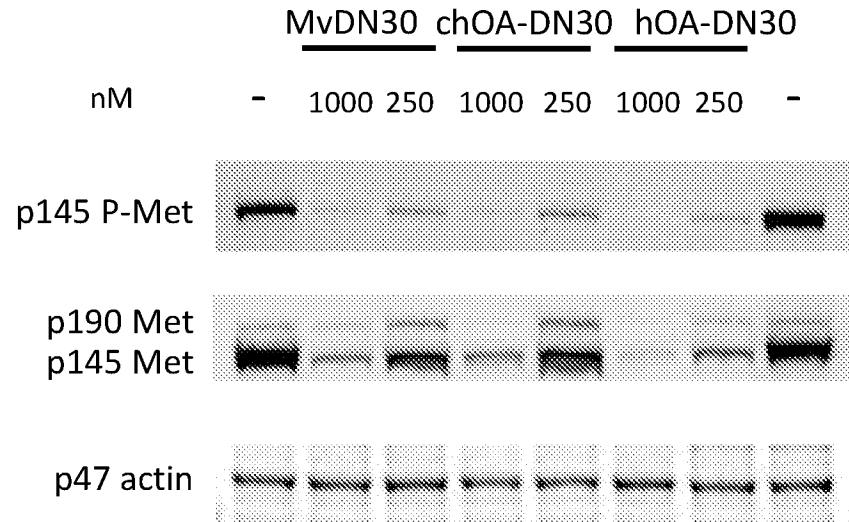
Fig. 3



A549

	MvDN30				chOA-DN30				hOA-DN30				CTRL
	1000	333	111	37	1000	333	111	37	1000	333	111	37	
p145Met	271.6	448.4	1009.6	1088.4	335.3	655.5	785.2	804.2	69.4	160.3	346.3	770.8	1315.5
p80Met ect	514.8	327.4	232.1	143.4	1040.5	563.9	349.3	224.6	925.7	576.4	522.2	290.4	53.7

Fig. 4

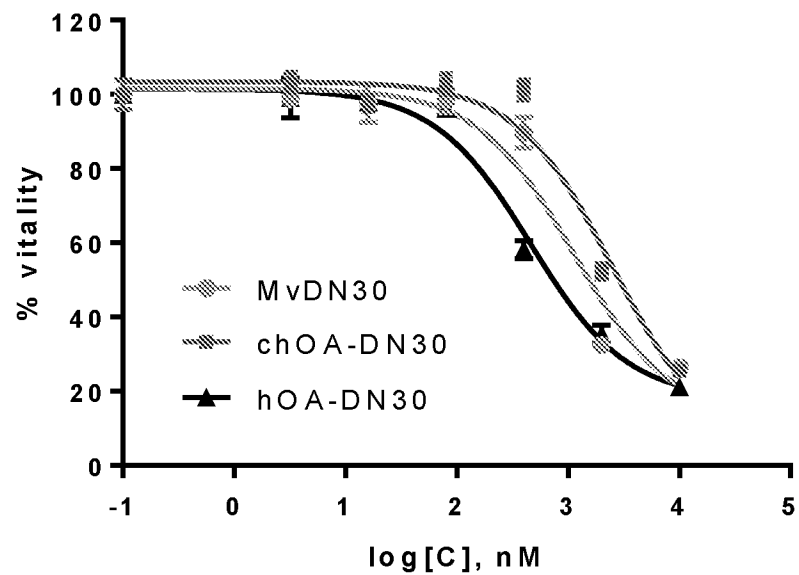


GTL-16

	CTRL	MvDN30		chOA-DN30		hOA-DN30		CTRL
		1000	250	1000	250	1000	250	
p145 P-Met	1287.0	187.1	248.8	163.3	383.3	48.7	169.9	1405.6

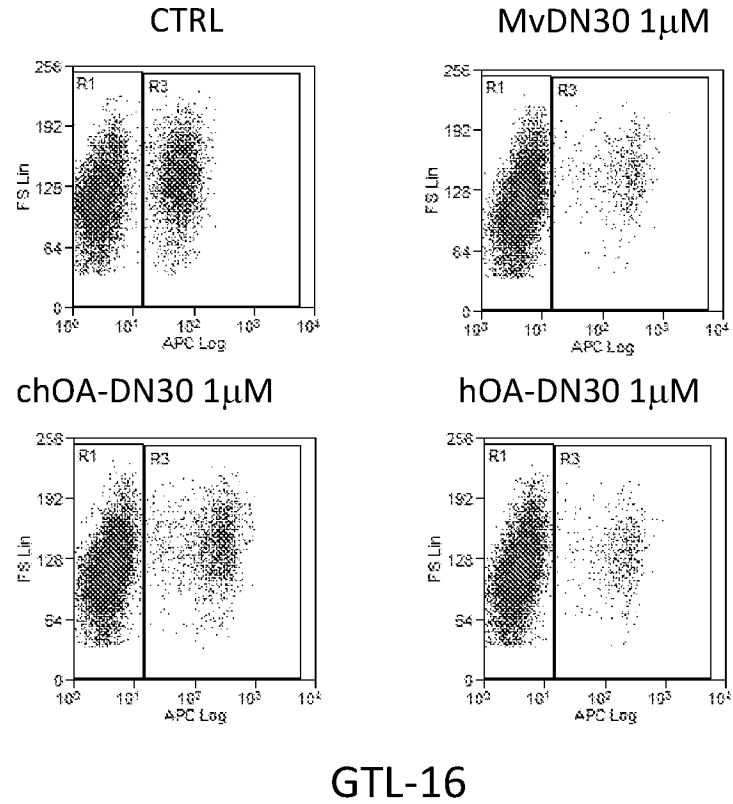
Fig. 5

GTL-16



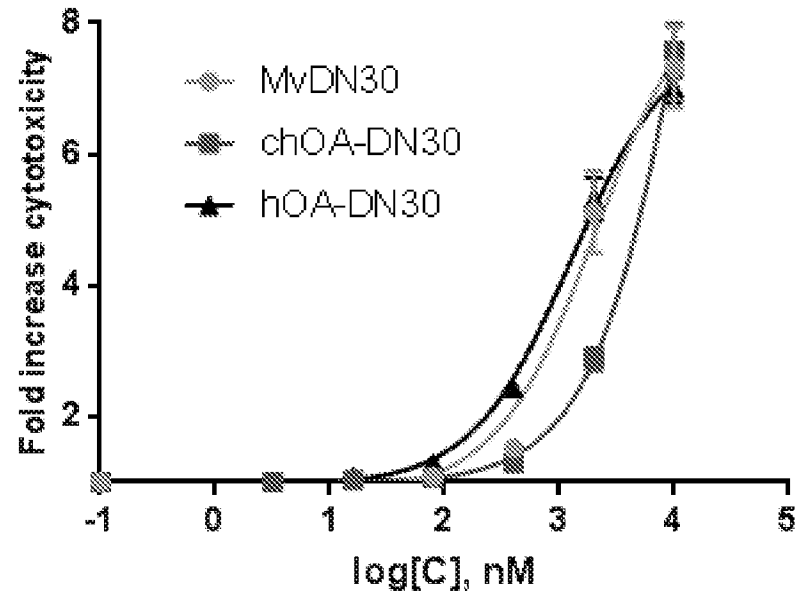
	IC ₅₀ (nM)	R ²
MvDN30	1136±1.08	0.95
chOA-DN30	2489±1.77	0.96
hOA-DN30	460±1.07	0.98

Fig. 6

A

	% EdU+ cells (R3)
CTRL	31.17 %
MvDN30	5.20 %
chOA-DN30	14.97%
hOA-DN30	4.92%

Fig. 7

B**GTL-16**

	EC ₅₀ (nM)	R ²
MvDN30	1486±1.08	0.98
chOA-DN30	6807±1.77	0.99
hOA-DN30	1116±1.07	0.99

Fig. 7/cont.

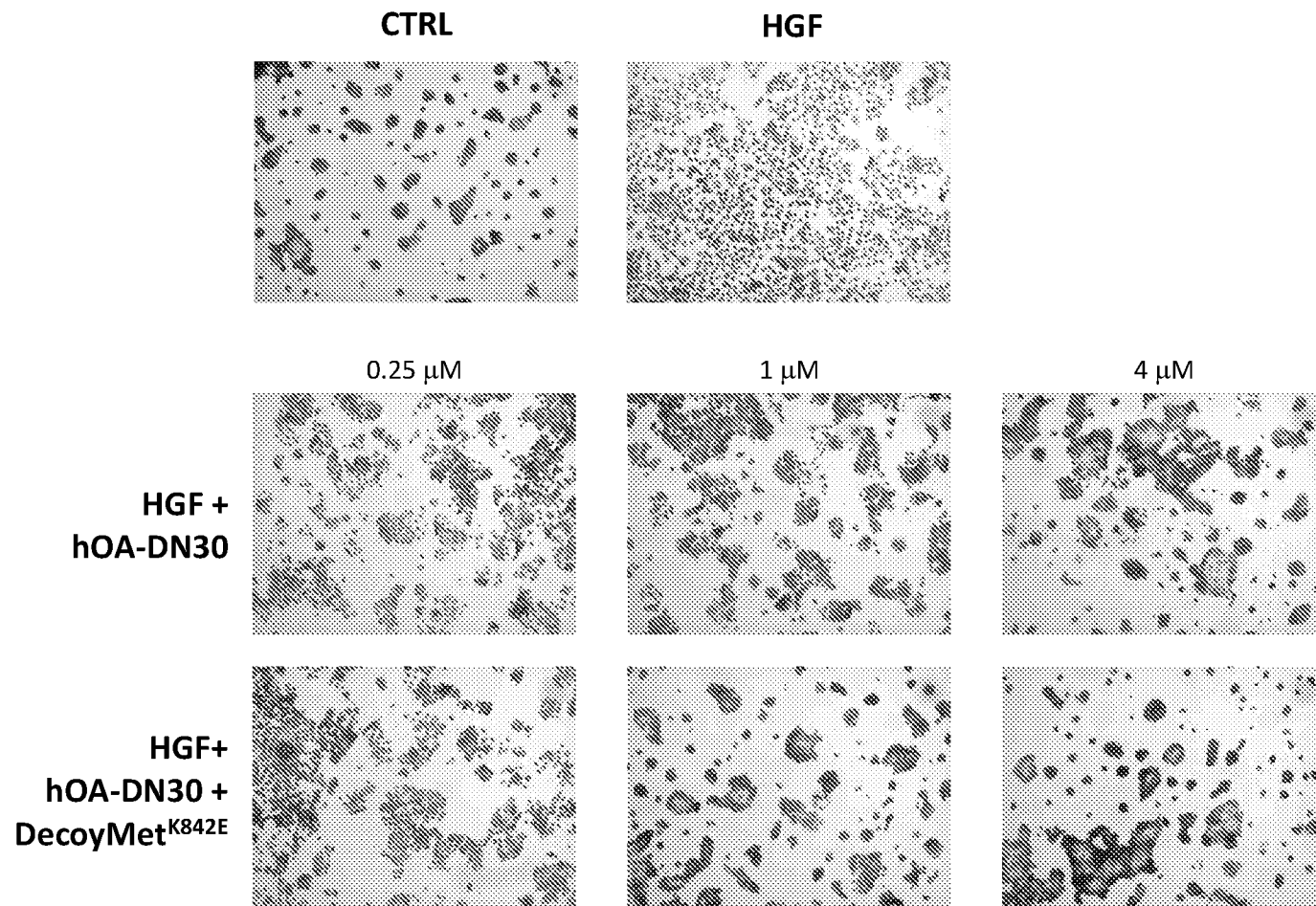
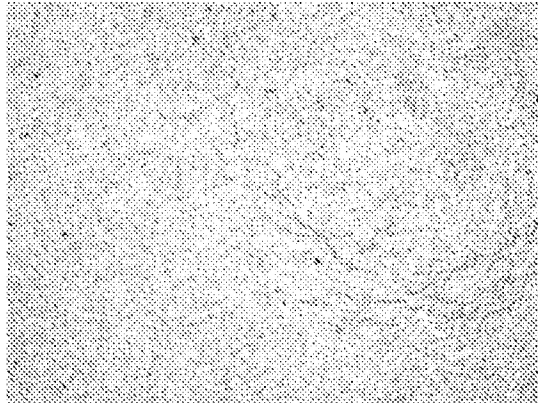
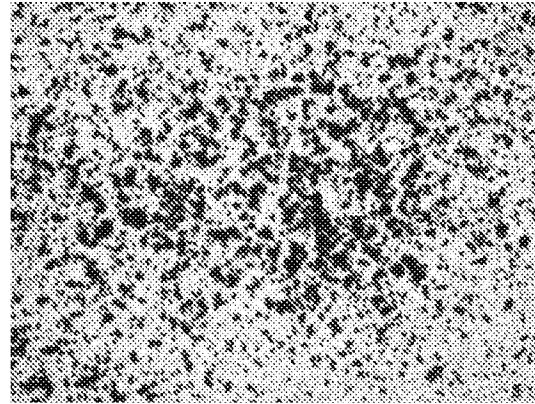


Fig. 8

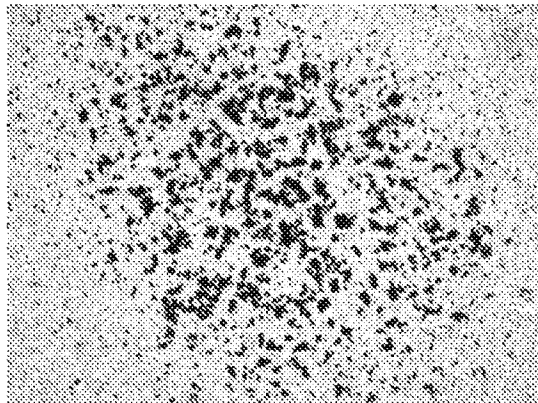
CTRL



HGF



HGF + hOA-DN30



HGF + hOA-DN30 + DecoyMet^{K842E}

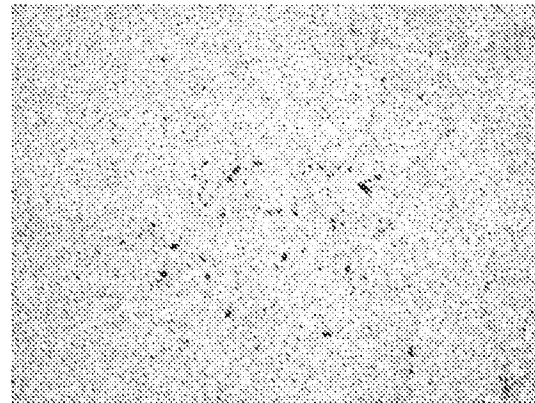
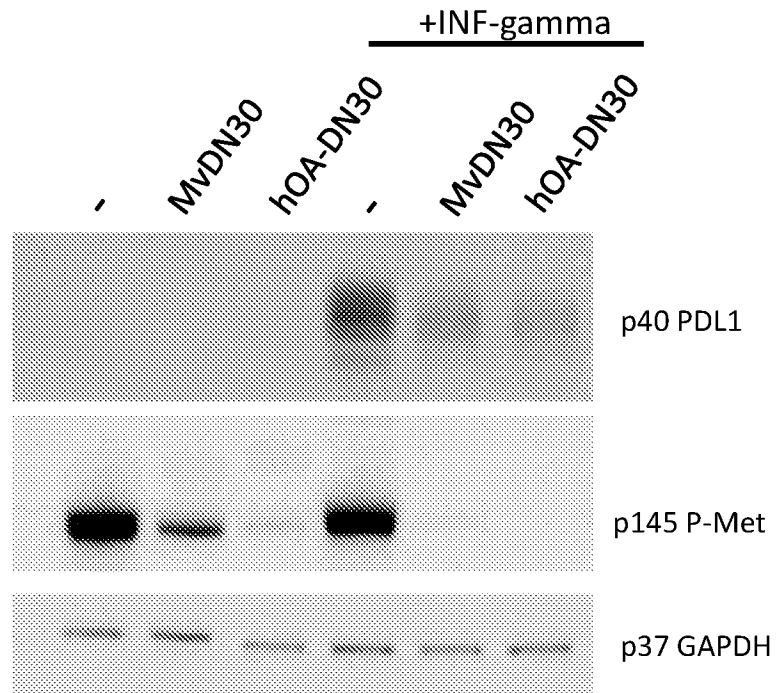
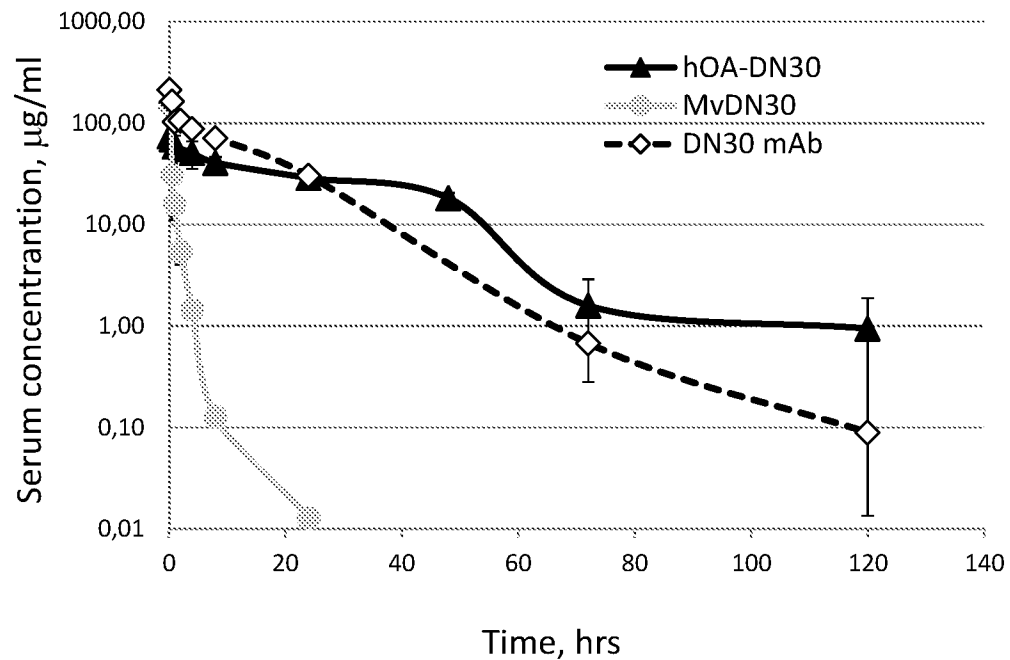


Fig. 9



GTL-16

Fig. 10



	DN30 mAb	MvDN30	hOA-DN30
t1/2 elim h	11.217	4.816	11.49
CL ml/h	0.052	1.475	0.057
tot AUC (µg/ml)*h	1918.13	67.78	1750.73
k elim 1/h	0.042	0.144	0.061

Fig. 11

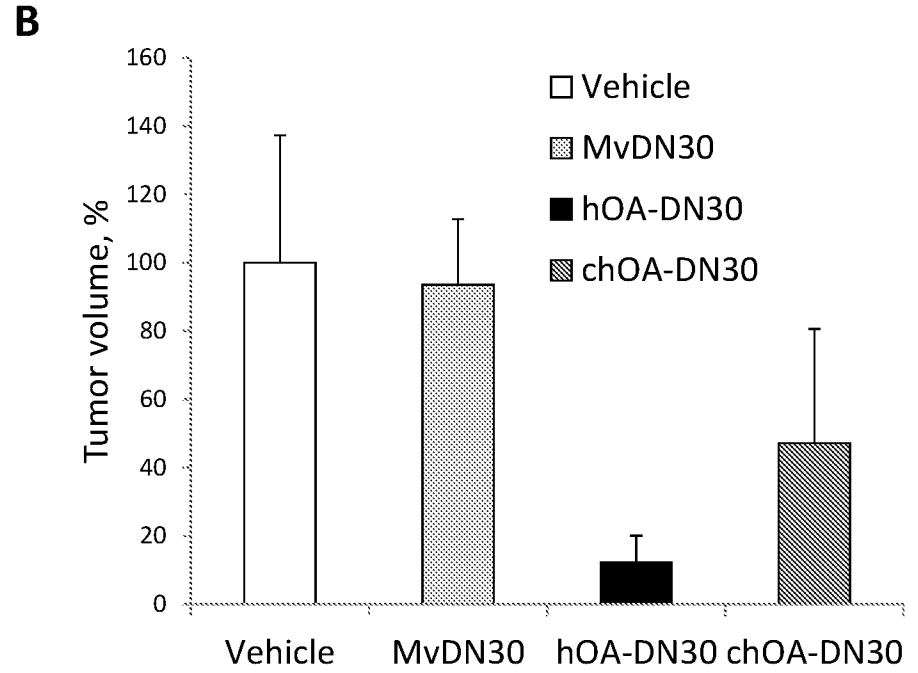
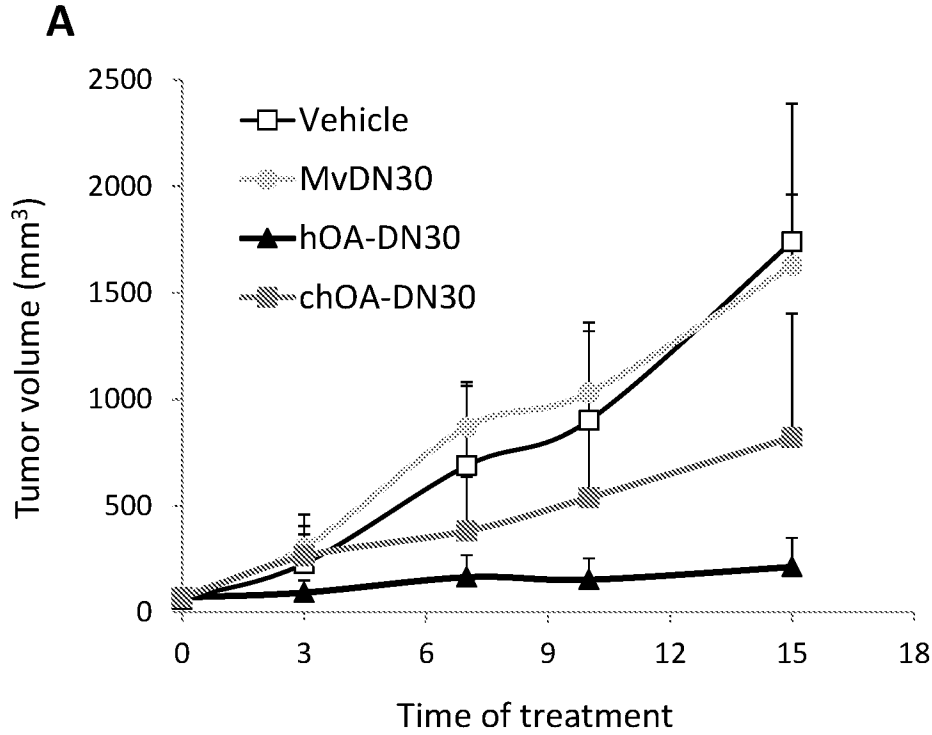


Fig. 12

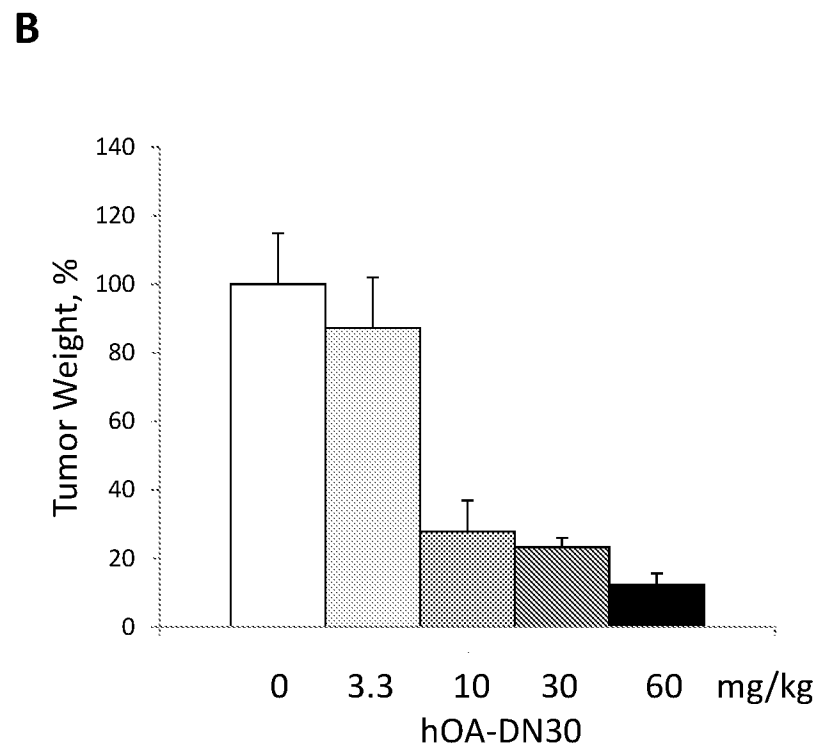
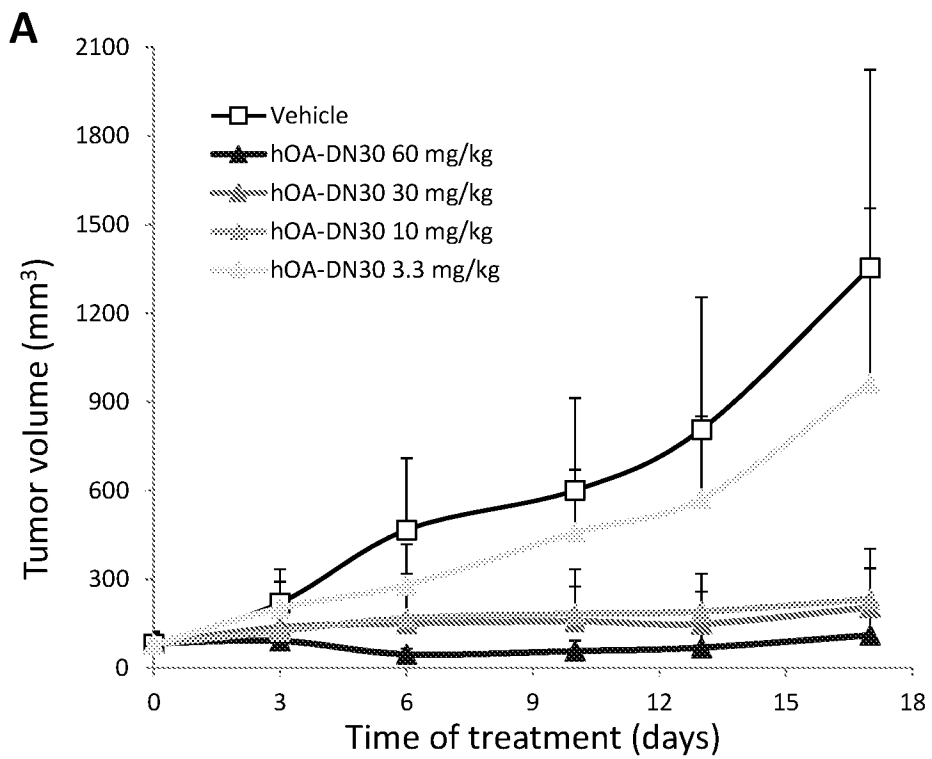


Fig. 13

Seq. ID N°7: humanized VL

METDTILLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPDSLAVSLGQRATINCKASQSVDYDGGSYMSWFQQKPGQP
PKLLIYAASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVATYYCQQSYEDPLTFGGGTKVEIK

Seq. ID N°8: humanized VH

MGWSYIILFLVATATDGHSQVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVRQAPGQGLEWI
GEINPSSGRTNYNEKFKNRVTVTVDKSTSTAYMELSSLTSEDSAVYYCASRGYWGQGTTTLTVSS

Seq. ID N°9: human CL

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Seq. ID N°10: human CH1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV

Fig. 14

Seq. ID N°11: First Fc (Knob mutation)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Seq. ID N°12: Second Fc (Hole mutations)

MGWSYIILFLVATATDGHSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 15

Seq. ID N°14: DecoyMet mutation K842E - TAGs

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVI LHEHHI FLGATN
YIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDITYYDDQLISCGSV
NRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSS
YFPDHPLHSISVRRLKETKDGMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAQ
TFHTRIIRFCSINSGLHSEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQIGASLNDD
ILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQHFYGPNEHCENRTLLRNSSG
CEARRDEYRTEFTTALQRVDLFGQFSEVLLTSISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPH
VNFLLD SHPV SPEVIVEHTLNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDK
CVRSEECLSGTWTQQICLP AIYKVFPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTL
TLSESTMNTLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLTTLTGN
YLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKL KIDLANRETSIFSYREDPIVYEIH
PTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNF TVACQHRSNSEI ICCTTPSLQQLNLQLPLK
TKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPVFEEPFKEKPVMI SMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCEN
IHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSSTVLGKVIVQPDQNFTASGAAWSHPQFEKGAAWSHP
QFEKGAAWSHPQFEKGAASHHHHH

Fig. 16