



- (21)申請案號：110127252 (22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 07 月 23 日
- (51)Int. Cl. : *A61K39/00 (2006.01)* *C07K16/30 (2006.01)*  
*C07K16/46 (2006.01)* *A61P35/00 (2006.01)*
- (30)優先權：2020/07/27 美國 63/057,054  
 2021/04/20 美國 63/177,036  
 2021/07/07 美國 63/219,066
- (71)申請人：美商宏觀基因股份有限公司 (美國) MACROGENICS, INC. (US)  
 美國
- (72)發明人：蘇姆羅 布萊德利 詹姆士 SUMROW, BRADLEY JAMES (US)；波維尼 愛利歐  
 BONVINI, EZIO (US)；夏馬 沙拉德 SHARMA, SHARAD (US)；微吉頓 強瑪  
 克 WIGGINTON, JON MARC (US)；貝列日諾 A Y BEREZHNOY, ALEXEY  
 YEVGENYEVICH (RU)
- (74)代理人：李文賢；盧建川
- 申請實體審查：無 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：7 共 127 頁

## (54)名稱

用於使用 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的方法

## (57)摘要

本發明部分涉及用於施用 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子以治療癌症和其他病症的給藥方案。本發明部分涉及這種分子的用途，和含有這種分子且促進這種給藥方案在治療癌症中或刺激免疫細胞中的使用的藥物組合物和藥物試劑盒的用途。

The present invention is directed in part to dosing regimens for administering a PD-1 x CTLA-4 bispecific molecule for the treatment of cancer, and other conditions. The invention is directed in part to the use of such molecules, and to the use of pharmaceutical compositions and pharmaceutical kits that contain such molecules and that facilitate the use of such dosing regimens in the treatment of cancer or to stimulate immune cells.

指定代表圖：

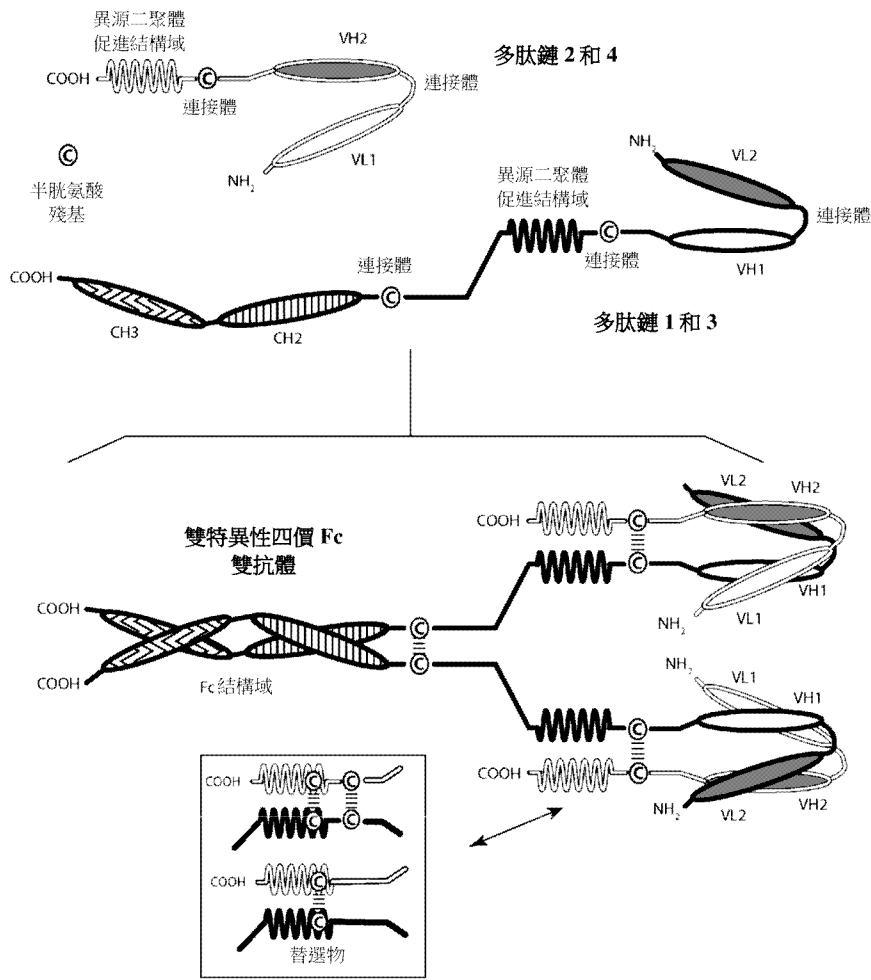


圖 1

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 用於使用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的方法

【英文發明名稱】 METHODS FOR THE USE OF A PD-1 x CTLA-4 BISPECIFIC

MOLECULE

【中文】

本發明部分涉及用於施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以治療癌症和其他病症的給藥方案。本發明部分涉及這種分子的用途，和含有這種分子且促進這種給藥方案在治療癌症中或刺激免疫細胞中的使用的藥物組合物和藥物試劑盒的用途。

【英文】

The present invention is directed in part to dosing regimens for administering a PD-1 x CTLA-4 bispecific molecule for the treatment of cancer, and other conditions. The invention is directed in part to the use of such molecules, and to the use of pharmaceutical compositions and pharmaceutical kits that contain such molecules and that facilitate the use of such dosing regimens in the treatment of cancer or to stimulate immune cells.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於使用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的方法

【英文發明名稱】 METHODS FOR THE USE OF A PD-1 x CTLA-4 BISPECIFIC MOLECULE

### 【技術領域】

[相關申請的交叉引用]

【0001】 本申請案主張美國專利申請號63/057,054 (在2020年7月27日提交；未決)、美國專利申請號63/177,036 (2021年4月20日提交；未決)、和美國專利申請號63/219,066 (2021年7月7日提交，未決)的優先權，出於所有目的，其每一篇通過引用以其整體併入本文。

[序列表的引用]

【0002】 按照37 C.F.R. 1.821條款，本申請包括序列表，該序列表已經以ASCII格式電子提交，並且出於所有目的，通過引用以其整體併入本文。序列表的ASCII副本創建於2021年7月15日，命名為MAC-0115-PC\_SL.txt，並且大小為30,796位元組。

【0003】 本發明部分涉及用於施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以治療癌症以及其他疾病和病症的給藥方案。本發明還部分關於使用這種PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以刺激免疫細胞的方法。本發明部分關注施用包括PD-1的兩個結合位點和CTLA-4的兩個結合位點的四價PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體的這種方案的用途。本發明部分涉及這種雙特異性分子的用途。本發明還部分涉及含

有這種分子的藥物組合物和藥學試劑盒的用途，所述藥物組合物和藥學試劑盒促進這種給藥方案在治療癌症或刺激免疫細胞中的使用。

## 【先前技術】

### I. CTLA-4

【0004】 細胞毒素T-淋巴細胞相關的蛋白質-4 (CTLA-4; CD152)是單通路 (single pass) I型膜蛋白質，其形成二硫鍵連接的同源二聚體 (Schwartz J.C., 等 (2001) “*Structural Basis For Co-Stimulation By The Human CTLA-4/B7-2 Complex*,” *Nature* 410:604-608)。CTLA-4主要是細胞內抗原，其表面表達受到限制運輸至細胞表面和快速內化的嚴格調節。CTLA-4充當減弱效應子功能且指示T-細胞應答的效力和持續時間的T效應細胞啟動的負調節因數 (Linsley, P.S. 等 (1996) “*Intracellular Trafficking Of CTLA-4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement*,” *Immunity* 4:535-543)。據報導，阻斷CTLA-4以增強體外T-細胞應答且也增加抗腫瘤免疫力。因此，已經提出使用抗CTLA-4抗體阻斷CTLA-4以為疾病，尤其是免疫刺激可能有益的人疾病提供了新的治療，比如用於癌症和傳染病的治療 (see, Leach, D.R., 等 (1996) “*Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade*,” *Science*. 271:1734-1736; WO 01/14424; WO 00/37504)。CTLA-4功能阻斷劑的開發集中在單克隆抗體比如伊匹單抗 (參見，例如，Hodi, F.S., 等 (2003) “*Biologic Activity Of Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Antibody Blockade In Previously Vaccinated Metastatic Melanoma And Ovarian Carcinoma Patients*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 100:4717-4717) 和曲美木單抗 (Ribas, A. 等 (2005) “*Antitumor Activity In Melanoma And Anti-Self Responses In A Phase I Trial*

*With The Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Monoclonal Antibody CP-675,206,*” *Oncologist* 12: 873-883)的使用上。

## II. PD-1

【0005】 程式性死亡-1 (“PD-1”，也稱為“CD279”)是T細胞調節劑的擴增CD28/CTLA-4家族的近似31 kD I型膜蛋白質成員，其廣泛地負調節免疫應答(Ishida, Y.等(1992) “*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,*” *EMBO J.* 11:3887-3895。PD-1通過結合至跨膜蛋白質配體：程式性死亡-配體1 (“PD-L1”，也稱為“B7-H1”)和程式性死亡-配體2 (“PD-L2”，也稱為“B7-DC”)介導其免疫系統的抑制(Flies, D.B.等(2007) “*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,*” *J. Immunother.* 30(3):251-260)。

【0006】 PD-1配體相互作用在抑制T細胞啟動和增殖中的作用已經表明，這些生物分子可用作治療炎症和癌症的治療性靶標。已經提出使用抗PD-1抗體以治療腫瘤和上調適應性免疫應答，並且已經報導能夠特異性結合至PD-1的抗體(參見，例如，Patnaik A.等(2015) “Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors,” *Clin Cancer Res*; 21(19):4286-4293；US 7,488,802、US 7,521,051、US 7,595,048、US 8,008,449、US 8,354,509、US 8,735,553、US 8,779,105、US 8,900,587、US 9,084,776、US 9,815,897和US 10,577,422；和WO 2014/194302、和WO 2015/035606、WO 2004/056875、WO 2006/121168、WO 2008/156712、WO 2012/135408、WO 2012/145493、WO 2013/014668、WO 2014/179664、WO 2014/194302、WO 2015/112800和WO 2019/246110)。

**【0007】** 使用單獨靜脈內劑量的抗CTLA-4抗體伊匹單抗和抗PD-1抗體納武單抗與化療的聯合療法最近已被批准用於治療某些具有轉移性或復發性非小細胞肺癌(NSCLC)的患者。然而，聯合療法伴隨著治療相關不良事件(TRAЕ)的頻率和嚴重程度的增加。接受伊匹單抗和納武單抗的組合的患者的55%經歷了嚴重的TRAЕ，與單獨納武單抗的16%和單獨的伊匹單抗的27%相比顯著增加(Larkin, J., 等 2015. "Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma," N. Engl. J. Med.)。除了癌症患者的嚴重TRAЕ的潛在醫學後果之外，TRAЕ通常需要中止治療，從而限制了這些群體的治療性益處。

**【0008】** 結合PD-1和CTLA-4二者的雙特異性分子允許在各種應用中的設計和工程化中有極大的靈活性，提供了對多聚體抗原的增強的親合力、不同抗原的交聯和依賴於兩種靶抗原的存在的對特定細胞類型的定向靶向。已經提出了PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在治療癌症中的用途並且PD-1 x CTLA-4雙特異性分子已經在例如WO 2014/209804；WO 2017/218707；WO 2017/193032；WO 2019/094637和US 2019/0185569中進行了描述。特別地，WO 2017/106061中描述了具有示例性活性的四價PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體和三價PD-1 x CTLA-4結合分子。

#### **【發明內容】**

**【0009】** 提供了用於施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以治療癌症和其他疾病和病症的給藥方案，其可最小化非期望的副作用。本發明還部分關於使用這種PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以刺激免疫細胞的方法。本發明部分涉及用於施用包括PD-1的兩個結合位點和CTLA-4的兩個結合位點的四價PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體的這種方案的用途。本發明部分涉及這種雙特異性分子的用

途。本發明還部分涉及含有這種分子的藥物組合物和藥學試劑盒的用途，所述藥物組合物和藥學試劑盒促進在治療癌症或刺激免疫細胞中使用這種給藥方案。

**【0010】** 詳細地，本發明提供了包括向需要其的受試者施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的治療癌症的方法，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括至少一個PD-1結合結構域和至少一個CTLA-4結合結構域，和其中方法包括以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每3週一次向受試者施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在誘導期期間以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每3週一次向受試者施用。

**【0011】** 本發明進一步提供了包括向需要其的受試者施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的刺激免疫細胞的方法，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括至少一個PD-1結合結構域和至少一個CTLA-4結合結構域，和其中方法包括以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每3週一次向受試者施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在誘導期期間以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每3週一次向受試者施用。本發明特別地提供了這種方法的實施方式，其中免疫細胞是T細胞。

**【0012】** 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中：

- (I) PD-1結合結構域包括包含**SEQ ID NO:1**的CDRL1、CDRL2和CDRL3的輕鏈可變結構域(VL<sub>PD-1</sub>)，和包含**SEQ ID NO:5**的PD-1-特異性的CDRH1、CDRH2和CDRH3的重鏈可變結構域(VH<sub>PD-1</sub>)；和

(II) CTLA-4結合結構域包括包含**SEQ ID NO:9**的CDRL1、CDRL2和CDRL3的輕鏈可變結構域(VL<sub>CTLA-4</sub>)，和包含**SEQ ID NO:13**的CTLA-4-特異性的CDRH1、CDRH2和CDRH3的重鏈可變結構域(VH<sub>CTLA-4</sub>)。

**【0013】** 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括：

- (I) 兩個PD-1結合結構域；和
- (II) 兩個CTLA-4結合結構域。

**【0014】** 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1結合結構域包括**SEQ ID NO:1**的VL結構域和**SEQ ID NO:5**的VH結構域。

**【0015】** 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中CTLA-4結合結構域包括**SEQ ID NO:9**的VL結構域和**SEQ ID NO:13**的VH結構域。

**【0016】** 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括Fc區。本發明特別地提供了這種方法的實施方式，其中Fc區是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同種型的。

**【0017】** 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子進一步包括鉸鏈結構域。

**【0018】** 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中Fc區和鉸鏈結構域都是IgG4同種型的，和其中鉸鏈結構域包括穩定突變。

**【0019】** 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中Fc區是變體Fc區，其包括：

- (a) 降低變體Fc區對FcγR親和力的一個或多個氨基酸修飾；和/或
- (b) 增強變體Fc區的血清半衰期的一個或多個氨基酸修飾。

【0020】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中降低變體Fc區對FcγR親和力的修飾包括L234A；L235A；或L234A和L235A的置換，其中編號是Kabat中的EU索引的編號。

【0021】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中增強變體Fc區的血清半衰期的修飾包括M252Y；M252Y和S254T；M252Y和T256E；M252Y，S254T和T256E；或K288D和H435K的置換，其中編號是Kabat中的EU索引的編號。

【0022】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子是包括包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的一條多肽鏈和包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第二多肽鏈的雙抗體。

【0023】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子是包括各自包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的兩條多肽鏈和各自包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的兩條多肽鏈的雙抗體。

【0024】 還提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約3 mg/kg和8 mg/kg之間的劑量施用。

【0025】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約6 mg/kg和10 mg/kg之間的劑量施用。

【0026】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約6 mg/kg的劑量施用。

【0027】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子以約7 mg/kg的劑量施用。

【0028】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子以約8 mg/kg的劑量施用。

【0029】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子以約9 mg/kg的劑量施用。

【0030】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，進一步包括在維持期間以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每6週一次向受試者施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子，其中維持期跟隨誘導期。

【0031】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中誘導期具有至多約24周的持續時間。

【0032】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中維持期具有至少6周的持續時間。本發明特別地提供了這種方法的實施方式，其中維持期具有至少84周的持續時間。

【0033】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約3 mg/kg和約8 mg/kg之間的劑量施用。

【0034】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約6 mg/kg和10 mg/kg之間的劑量施用。

【0035】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約3 mg/kg的劑量施用。

【0036】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約4 mg/kg的劑量施用。

【0037】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約5 mg/kg的劑量施用。

【0038】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約6 mg/kg的劑量施用。

【0039】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約6.5 mg/kg的劑量施用。

【0040】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約7 mg/kg的劑量施用。

【0041】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間約7.5 mg/kg的劑量施用。

【0042】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約8 mg/kg的劑量施用。

【0043】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約8.5 mg/kg的劑量施用。

【0044】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約9 mg/kg的劑量施用。

【0045】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約9.5 mg/kg的劑量施用。

【0046】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在誘導期期間以約10 mg/kg的劑量施用。

【0047】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在維持期期間以約3 mg/kg和8 mg/kg之間的劑量施用。

【0048】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在維持期期間以約6 mg/kg和10 mg/kg之間的劑量施用 在維持期期間。

【0049】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在維持期期間以約3 mg/kg的劑量施用。

【0050】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在維持期期間以約4 mg/kg的劑量施用。

【0051】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在維持期期間以約5 mg/kg的劑量施用。

【0052】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在維持期期間以約6 mg/kg的劑量施用。

【0053】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在維持期期間以約6.5 mg/kg的劑量施用。

【0054】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在維持期期間以約7 mg/kg的劑量施用。

【0055】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在維持期期間以約7.5 mg/kg的劑量施用。

【0056】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在維持期期間以約8 mg/kg的劑量施用。

【0057】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子在維持期期間以約8.5 mg/kg的劑量施用。

【0058】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在維持期期間以約9 mg/kg的劑量施用。

【0059】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在維持期期間以約9.5 mg/kg的劑量施用。

【0060】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在維持期期間以約10 mg/kg的劑量施用。

【0061】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中維持期中施用的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的劑量與誘導期中施用的劑量相同。

【0062】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中維持期中施用的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的劑量與誘導期中施用的劑量不同。

【0063】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子通過靜脈內(IV)輸注施用。

【0064】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中IV輸注在約30分鐘至約60分鐘之間的時間段內。

【0065】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中癌症選自由以下組成的組中：腎上腺癌、AIDS相關的癌、肺泡狀軟組織肉瘤、星形細胞腫瘤、肛門癌、膽管癌、膀胱癌、骨癌、腦癌、腦和脊髓癌、乳腺癌、HER2+乳腺癌、三陰性乳腺癌(TNBC)、頸動脈體瘤、宮頸癌、HPV相關的宮頸癌、宮頸鱗狀細胞癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌(CRC)、微衛星高度不穩定性結直腸癌(MSI-H CRC)、微衛星穩定性結直腸癌(非微衛星高度不穩定性結直腸癌，非MSI-H CRC)、促結締組織增生性小圓細胞腫瘤、子宮內膜癌、室管膜細胞瘤、尤因氏腫瘤、骨骼外黏液樣軟骨肉瘤、輸卵管癌、骨纖維發育

不全、骨骼的纖維發育異常、膽囊或膽管癌、胃癌、妊娠滋養細胞疾病、生殖細胞瘤、膠質母細胞瘤、頭頸癌、HPV相關的頭頸癌、血液系統惡性腫瘤、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪肉瘤/惡性脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、Merkel細胞癌、間皮咽癌、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓發育不良綜合症、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳頭狀甲狀腺癌、甲狀旁腺腫瘤、兒科癌症、周圍神經鞘腫瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體腫瘤、前列腺癌、轉移性去勢抵抗性前列腺癌(mCRPC)、後部葡萄膜黑素瘤、腎癌、腎細胞癌(RCC)、橫紋肌樣腫瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、童年期的小圓形藍細胞瘤(包括成神經細胞瘤和橫紋肌肉瘤)、軟組織肉瘤、多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤、黏液纖維肉瘤、鱗狀細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)、胃癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺癌、甲狀腺轉移癌症和子宮癌。

**【0066】** 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中癌症選自由以下組成的組中：宮頸癌、HPV相關的宮頸癌、宮頸鱗狀細胞癌、CRC、MSI-H CRC、非MSI-H CRC、頭頸癌、HPV相關的頭頸癌、肺癌、黑素瘤、NSCLC、前列腺癌、腎癌、RCC、軟組織肉瘤、多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤、黏液纖維肉瘤、鱗狀細胞癌和SCCHN。

**【0067】** 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中癌症是宮頸癌。本發明特別地提供了這種方法的實施方式，其中宮頸癌是宮頸鱗狀細胞癌。

【0068】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中癌症是CRC。本發明特別地提供了這種方法的實施方式，其中CRC是非MSI-H CRC或是MSI-H CRC。

【0069】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中癌症是肺癌。本發明特別地提供了這種方法的實施方式，其中肺癌是NSCLC。

【0070】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中癌症是黑素瘤。本發明特別地提供了這種方法的實施方式，其中黑素瘤是皮膚黑素瘤。

【0071】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中癌症是前列腺癌。本發明特別地提供了這種方法的實施方式，其中前列腺癌是轉移性去勢抵抗性前列腺癌(mCRPC)。

【0072】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中癌症是腎癌。本發明特別地提供了這種方法的實施方式，其中腎癌是RCC。

【0073】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中癌症是軟組織肉瘤。本發明特別地提供了這種方法的實施方式，其中癌症是多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤或黏液纖維肉瘤。

【0074】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中癌症是鱗狀細胞癌。

【0075】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中癌症是頭頸癌。

【0076】 本發明特別地提供了這種方法的實施方式，其中鱗狀細胞癌或頭頸癌是SCCHN。

【0077】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，進一步包括施用治療或預防有效量的一種或多種另外治療劑或化療劑。

【0078】 本發明進一步提供了這種方法的實施方式，其中需要其的受試者是人。

【0079】 本發明提供了藥物試劑盒，其包括：

- (a) 包含PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的容器；和
- (b) 指導材料，

其中指導材料指示所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子根據任何以上實施方式的方法使用。

【0080】 本發明提供了根據用於治療癌症的這種方法使用這種藥物試劑盒的實施方式。

【0081】 本發明提供了根據用於刺激免疫細胞的這種方法使用這種藥物試劑盒的實施方式。

【0082】 本發明提供了根據用於治療癌症的這種方法使用這種PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的實施方式。

【0083】 本發明提供了根據用於刺激免疫細胞的這種方法使用這種PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的實施方式。

#### 【圖式簡單說明】

【0084】 **【圖1】**提供了顯示包括兩對多肽鏈(即，總共四條多肽鏈)的具有四個表位結合位點的代表性共價結合的四價雙抗體，比如PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體的示意圖。每對的一條多肽鏈具有E-螺旋異源二聚體促進結構域和每對的另一多肽鏈具有K-螺旋異源二聚體促進結構域。如顯示，半胱氨酸殘基可存在於連接體和/或異源二聚體促進結構域中。每對的一條多肽鏈具有包括半胱氨酸的連接體(其連接體可包括全部或部分鉸鏈區)和CH2和/或CH3結構域，使得締

合的鏈形成全部或部分Fc區。識別相同表位元的VL和VH結構域使用相同陰影或填充圖案顯示。VL和VH結構域識別不同表位元並且所得分子具有四個表位結合位點且相對於每個結合表位是雙特異性和二價的。

**【0085】** **[圖2A-2C]**顯示了PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的體外活性。顯示了由3個或更多個獨立重複(repeat)中的代表性實驗。**圖2A**顯示了在PathHunter® PD-1<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>測定中，DART-D在PD-1和CTLA-4共同參與後重新啟動β-gal。**圖2B**顯示了與其親本mAb、它們的組合或同種型對照相比，增強的DART-D抑制Jurkat PD-1<sup>+</sup>/CTLA-4<sup>+</sup>細胞的表面上B7-1與CTLA-4結合(CTLA-4阻斷)的能力。**圖2C**顯示了DART-D或CTLA-2 mAb單獨或在10倍濃度的競爭性PD-1 mAb存在的情況下對B7-1與Jurkat-PD-1<sup>+</sup>/CTLA-4<sup>+</sup>結合的阻斷，表明在過量的競爭性PD-1 mAb存在的情況下，DART-D的組合由於減少了親合力效果而降低了對DART-D的CTLA-4阻斷強度。

**【0086】** **[圖3A-3C]**顯示了PD-1 x CTLA-4雙特異性抑制劑增強了T細胞的信號傳導和啟動。顯示了從3個獨立重複中的代表性實驗。**圖3A**顯示了代表性報告試驗的結果，雙重報告細胞和人工APC(分別是Jurkat-PD-1<sup>+</sup>/CTLA-4<sup>+</sup>和Raji-PD-L1<sup>+</sup>/B7<sup>+</sup>細胞)在DART-D、其親本PD-1或CTLA-4 mAb、它們的組合、納武單抗的複製品、伊匹單抗的複製品或它們的組合以及同種型對照存在的情況下共培養，顯示DART-D拯救了T細胞信號傳導。**圖3B-3C**顯示了在SEB試驗中IL-2濃度相對於對照IgG的平均倍數變化，表明DART-D增強了T-細胞啟動，供體PBMC (N=39)在10 ug/mL的DART-D、mAb或對照mAb存在的情況下用指定濃度的SEB處理。IL-2濃度被歸一化為在同種型對照處理的樣品中觀察到的水準。

**圖3C**顯示了對PD-1阻斷(IL-2 f.c.<2)具有減弱作用的供體的子集(N=9/39)，表明對DART-D的應答增強(顯示了25 ng SEB的劑量)。

**【0087】** **[圖4A-4G]**顯示了PD-1 x CTLA-4雙特異性分子提供了體內雙重檢查點阻斷。在第1、8、15和22天，用媒介物(●)、10 mg/kg/劑量(■)、40 mg/kg/劑量(▲)或100 mg/kg/劑量(X)的DART-D輸注食蟹猴(5F/5M)。通過ELISA測量的DART-D血清濃度(**圖4A**)顯示了DART-D展示出線性PK，~7天的抗體樣半衰期。通過流式細胞術測量的受體佔有率(**圖4B**)顯示，與PD-1的結合與它在迴圈中的存在相關。誤差條描述了SEM，垂直虛線指示劑量施用，和水準虛線標誌著100%細胞表面結合。最後輸注後3天獲得的脾細胞被染色用於ICOS (**圖4C**)，顯示了ICOS在CD4<sup>+</sup> T細胞上劑量依賴性上調。通過流式細胞術還分析了脾細胞的CD4<sup>+</sup> T細胞中CD28/CD95 (共)表達，以及CD8<sup>+</sup> T細胞中CD25或Ki67的表達。繪製了表達CD28與低的CD95 (幼稚型，**圖4D**)、CD28和CD95(記憶型，**圖4E**)、CD25<sup>+</sup> (活化型，**圖4F**)或Ki67<sup>+</sup> (增殖型，**圖4G**)的細胞的分數。

**【0088】** **[圖5A-5B]**展示了研究的治療方案。由填充的星指示DART-D的施用。空的星指示繼續Q3W給藥。

**【0089】** **[圖6A-6E]**顯示了患者中DART-D的藥物動力學和藥效學。**圖6A**顯示了3、6和10 mg/kg Q3W方案的類比多劑量PK曲線，觀察到劑量前(開圓(open circles))和劑量後(閉圓(closed circles))資料疊加在一起，潛在的目標濃度以虛線形式重疊。**圖6B**顯示了第二次輸注後43天收集的CD4<sup>+</sup> T細胞的DART-D受體佔有率(劑量3輸注前，用“p”表示)與第三次輸注後立即測量的DART-D受體佔有率劑量3輸注結束(EOI)，用“E”表示)比較。描繪了平均值和SD。**圖6C**顯示了在第一劑量之前、8天和22天後(第一條(●)、第二條(▲)和第三條(■))，分別在每個劑

量水準)，用DART-D治療的患者中DART-D競爭性FACS mAb與迴圈T細胞的結合(N=28)。條指示最小到最大的間隔。圖6D顯示了在第一次輸注指定劑量的DART-D之前(●)和之後8天(■)測量的外周血CD4<sup>+</sup> T細胞上ICOS表達的上調(N=28)。圖6E顯示了通過最佳總體應答(PD-進行性疾病；SD-穩定疾病；PR-部分應答；CR-完全應答；未知-仍未評估)分組的用DART-D治療的患者中迴圈CD4<sup>+</sup> T細胞對ICOS表達(第1天和第8天之間)的上調。

【0090】 [圖7]通過腫瘤類型和通過劑量呈現了用以劑量 $\geq 3$  mg/kg的DART-D治療的13名可評估應答的佇列遞增(cohort escalation)患者之中靶病灶變化百分比的瀑布圖(繪製為從基線的%改變)。虛線指示從20%或-30%基線的改變。縮寫：CRC=結直腸癌；EOC=上皮卵巢癌。“#”指示之前用檢查點抑制劑治療並且“+”指示在資料匯總的時間處仍在研究的患者。

#### 【實施方式】

【0091】 本發明部分涉及用於施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以治療癌症以及其他疾病和病症的給藥方案。本發明還部分涉及使用這種PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以刺激免疫細胞的方法。本發明部分關注施用包括PD-1的兩個結合位點和CTLA-4的兩個結合位點的四價PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體的這種方案的使用。本發明部分涉及這種雙特異性分子的用途。本發明還部分涉及含有這種分子的藥物組合物和藥物試劑盒的使用，所述藥物組合物和藥物試劑盒促進這種給藥方案在治療癌症或刺激免疫細胞中的用途。

#### I. PD-1 x CTLA-4雙特異性分子

【0092】 已經開發了各種重組雙特異性抗體形式(參見，例如，WO 2008/003116、WO 2009/132876、WO 2008/003103、WO 2007/146968、WO

2009/018386、WO 2012/009544和WO 2013/070565)，其中大部分使用連接體肽以將另外的表位-結合片段(例如，scFv、VL、VH等)融合至抗體核(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)或抗體核(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)內，或將多個表位-結合片段(例如，兩個Fab片段或scFvs)融合。可替選的形式使用連接體肽以將表位-結合片段(例如，scFv、VL、VH等)融合至二聚化結構域比如CH2-CH3結構域或可替選的多肽(WO 2005/070966、WO 2006/107786A、WO 2006/107617A和WO 2007/046893)。WO 2013/174873、WO 2011/133886和WO 2010/136172公開了三特異性抗體，其中CL和CH1結構域從它們各自天然位置轉換並且VL和VH結構域已經被多樣化(WO 2008/027236；WO 2010/108127)以允許它們來結合不只一種抗原。WO 2013/163427和WO 2013/119903公開了修飾CH2結構域以含有包括結合結構域的融合蛋白質加合物。WO 2010/028797、WO2010028796和WO 2010/028795公開了重組抗體，它的Fc區已經用另外VL和VH結構域取代，以便形成三價結合分子。WO 2003/025018和WO2003012069公開了重組雙抗體，它的單個鏈含有scFv結構域。WO 2013/006544公開了多價Fab分子，其被合成作為單個多肽鏈並且然後進行蛋白水解以產生異源二聚化結構。WO 2014/022540，WO 2013/003652、WO 2012/162583、WO 2012/156430、WO 2011/086091、WO 2008/024188、WO 2007/024715、WO 2007/075270、WO 1998/002463、WO 1992/022583和WO 1991/003493公開了將另外結合結構域或官能團添加至抗體或抗體部分(例如，將雙抗體添加至抗體的輕鏈，或將另外VL和VH結構域添加至抗體的輕鏈和重鏈，或將異源融合蛋白質添加至彼此或將多個Fab結構域連接至彼此)。WO 2015/184207、WO 2015/184203、WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538和WO 2006/113665中描述了且本文提供了包括雙

抗體樣結構域的共價結合雙抗體和三價分子。相應地，特別地考慮了本發明的PD-1 xCTLA-4雙特異性分子可具有任何以上描述的形式結構和可被任何以上描述的方法產生。

#### A. PD-1和CTLA-4結合結構域的非限制性示例

【0093】 在某些實施方式中，本發明的PD-1 xCTLA-4雙特異性分子包括：

- (I) 包括包含PD-1-特異性的CDR<sub>L</sub>1、CDR<sub>L</sub>2和CDR<sub>L</sub>3結構域的VL結構域(VL<sub>PD-1</sub>)，和包含PD-1-特異性的CDR<sub>H</sub>1、CDR<sub>H</sub>2和CDR<sub>H</sub>3結構域的VH結構域(VH<sub>PD-1</sub>)的PD-1-結合結構域；和
- (II) 包括包含CTLA-4-特異性的CDR<sub>L</sub>1、CDR<sub>L</sub>2和CDR<sub>L</sub>3結構域的VL結構域(VL<sub>CTLA-4</sub>)，和包含CTLA-4-特異性的CDR<sub>H</sub>1、CDR<sub>H</sub>2和CDR<sub>H</sub>3結構域的VH結構域(VH<sub>CTLA-4</sub>)的CTLA-4-結合結構域。

【0094】 人源化VL<sub>PD-1</sub>結構域的非限制性示例的氨基酸序列是(SEQ ID

NO:1)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDEFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI K

【0095】 VL<sub>PD-1</sub>的抗原結合結構域包括：

CDR<sub>L</sub>1 SEQ ID NO:2: RASESVDNYGMSFMN；

CDR<sub>L</sub>2 SEQ ID NO:3: AASNQGS；和

CDR<sub>L</sub>3 SEQ ID NO:4: QQSKEVPYT。

**【0096】** 人源化VH<sub>PD-1</sub>結構域的非限制性示例的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:5**) :

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREEH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

**【0097】** 這種VH<sub>PD-1</sub>結構域的抗原結合結構域包括：

CDR<sub>H1</sub> **SEQ ID NO:6**: SYWMN ;

CDR<sub>H2</sub> **SEQ ID NO:7**: VIHPDSETWLDQKFKD ; 和

CDR<sub>H3</sub> **SEQ ID NO:8**: EHYGTSPFAY 。

**【0098】** 人源化VL<sub>CTLA-4</sub>結構域的非限制性示例的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:9**) :

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY  
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG  
 QGTKVEIK

**【0099】** 這種VL<sub>CTLA-4</sub>結構域的抗原結合結構域包括：

CDR<sub>L1</sub> **SEQ ID NO:10**: RASQSVSSSFLA ;

CDR<sub>L2</sub> **SEQ ID NO:11**: GASSRAT ; 和

CDR<sub>L3</sub> **SEQ ID NO:12**: QQYGSSPWT 。

**【0100】** 人源化VH<sub>CTLA-4</sub>結構域的非限制性示例的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:13**) :

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF  
ISYDGSNKHY ADSVKGRRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG  
WLGPFDYWGQ GTLVTVSS

**【0101】** 這種VH<sub>CTLA-4</sub>結構域的抗原結合結構域包括：

**CDR<sub>H</sub>1 SEQ ID NO:14:** SYTMH；

**CDR<sub>H</sub>2 SEQ ID NO:15:** FISYDGSNKHYADSVKG；和

**CDR<sub>H</sub>3 SEQ ID NO:16:** TGWLGPFDY。

**【0102】** 可以使用可替選的PD-1結合結構域並且已經描述了許多這種結構域(參見，例如，以下的氨基酸序列：納武單抗(WHO藥物資訊，2013，推薦的INN：列表69，27(1):68-69，INN編號9623)、培布利珠單抗(WHO藥物資訊，2014，推薦的INN：列表75，28(3):407，INN編號9798)、西米普利單抗(WHO藥物資訊，2018，提出的INN：列表119，32(2):299，INN編號10691)、多塔利單抗(WHO藥物資訊2018，提出的INN：列表119，32(2):307-308，INN編號10787)和坎利珠單抗(WHO藥物資訊，2014，推薦的INN：列表77，31(1):74，INN編號10400))。

**【0103】** 可以使用可替選的CTLA-4結合結構域並且已經描述了許多這種結構域(參見，例如，以下的氨基酸序列：伊匹單抗(WHO藥物資訊，2006，推薦的INN：列表56，20(3):216，INN編號8568；CAS編號477202-00-9)、曲美木單抗(WHO藥物資訊2008，推薦的INN：列表59，22(1):71，INN編號8716；CAS編號745013-59-6)、諾瑞利單抗(WHO藥物資訊2019，推薦的INN：列表121，33(2):302-303，INN編號11141；CAS編號2168561-20-2)。

【0104】 來自免疫球蛋白的成熟重鏈和輕鏈的可變結構域的氨基酸是通過鏈中氨基酸的位置命名。Kabat描述了抗體的許多氨基酸序列、鑒定了每個亞組的氨基酸共有序列並且為每個氨基酸指定了殘基編號，並且如通過Kabat(Kabat 等人，SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 第五版，Public Health Service, NH1, MD (1991)；Martin, A.C.R. (1996) “Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer,” PROTEINS: Structure, Function and Genetics 25:130-133)定義的鑒定了CDR (應當理解，由Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987) “Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins,” J. Mol. Biol. 196:901-917定義的CDR<sub>H1</sub>提前五個殘基開始)。Kabat的編號方案通過參考保守氨基酸將考慮的抗體與Kabat中的共有序列之一比對而可擴增至不包括在其綱要中的抗體。用於指定殘基編號的該方法在本領域中已經變成了標準，並且易於鑒定在不同抗體(包括嵌合或人源化變體)中在等同位置處的氨基酸(參見，例如，Martin, A.C.R. (2010). “Chapter 3: Protein Sequence And Structure Analysis Of Antibody Variable Domains,” In: ANTIBODY ENGINEERING LAB MANUAL VOLUME 2 (第二版) Duebel, S.和Kontermann, R. (Eds.) Springer-Verlag, Heidelberg)。例如，在人抗體輕鏈的位置50處的氨基酸佔據與小鼠抗體輕鏈的位置50處的氨基酸等同的位置。

## B. Fc受體結合結構域

【0105】 在某些實施方式中，本發明的PD-1 xCTLA-4雙特異性分子擁有能夠複合在一起以形成IgG Fc受體結合區(“Fc區”)的IgG CH2-CH3結構域。以下呈現了野生型IgG1(SEQ ID NO:24)、IgG2 (SEQ ID NO:25)、IgG3(SEQ ID

**NO:26)**和IgG4 (**SEQ ID NO:27)**的CH2-CH3結構域的非限制性示例的氨基酸序列。

**【0106】** 人IgG1的CH2-CH3結構域的非限制性示例的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:24)** :

231	240	250	260	270	280
APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	
	290	300	310	320	330
GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	
	340	350	360	370	380
PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	
	390	400	410	420	430
WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	
	440	447			
ALHNHYTQKS	LSLSPG	<u>X</u>			

其中，X是賴氨酸(K)或不存在。

**【0107】** 人IgG2的非限制性示例的CH2-CH3結構域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:25)** :

231	240	250	260	270	280
APPVA-GPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFNWYVD	
	290	300	310	320	330
GVEVHNAKTK	PREEQFNSTF	RVVSVLTVVH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPA	
	340	350	360	370	380
PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDISVE	

390 400 410 420 430  
 WESNGQPENN YKTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

440 447  
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

其中，**X**是賴氨酸(K)或不存在。

**【0108】** 人IgG3的非限制性示例的CH2-CH3結構域的氨基酸序列是(**SEQ**

**ID NO:26)** :

231 240 250 260 270 280  
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

290 300 310 320 330  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

340 350 360 370 380  
 PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

390 400 410 420 430  
 WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

440 447  
 ALHNRFTQKS LSLSPGX

其中，**X**是賴氨酸(K)或不存在。

**【0109】** 人IgG4的非限制性示例的CH2-CH3結構域的氨基酸序列是(**SEQ**

**ID NO:27)** :

231 240 250 260 270 280  
 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

290 300 310 320 330

GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
 340 350 360 370 380  
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 390 400 410 420 430  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE  
 440 447  
 ALHNHYTQKS LSLSLGX

其中，X是賴氨酸(K)或不存在。

**【0110】** IgG重鏈的恆定區中的殘基的編號是按照Kabat等的SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 第五版, Public Health Service, NH1, MD (1991)中EU索引的編號, 其通過引用明確地併入本文。“如Kabat中的EU索引”指人IgG1 EU抗體的編號。在抗體恆定區內在許多不同位置(例如, CH1位置, 包括但不限於位置192, 193, 和214; Fc位置, 包括但不限於位置270、272、312、315、356和358, 如通過Kabat中所示的EU索引所編號的)已經觀察到多態性, 並且因此在所呈現的序列和現有技術中的序列之間可存在輕微差異。已經很好地表徵了人免疫球蛋白的多態形式。目前, 18 Gm同種異型是已知的: G1m (1、2、3、17)或G1m (a、x、f、z)、G2m (23)或G2m (n)、G3m (5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28)或G3m (b1、c3、b3、b0、b3、b4、s、t、g1、c5、u、v、g5) (Lefranc等, “*The Human IgG Subclasses : Molecular Analysis Of Structure , Function And Regulation.*” Pergamon , Oxford , pp. 43-78 (1990) ; Lefranc , G.等 1979 , Hum. Genet. : 50 , 199-211)。具體地考慮本發明的雙特異性分子可併入任何免疫球蛋白基因的任何同種異型 (allotype)、異種型 (isoallotype) 或單體型

(haplotype)，並且不限於本文提供的序列的同種異型、異種型或單體型。而且，在一些表達系統中，CH3結構域的C-末端氨基酸殘基(上文粗體)可在翻譯後去除。因此，CH3結構域的C-末端殘基是本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子中任選的氨基酸殘基。本發明具體涵蓋的是缺少CH3結構域的C-末端殘基的DART-D分子。本發明同樣具體涵蓋的是包括CH3結構域的C-末端賴氨酸殘基的這種分子。

**【0111】** 儘管Fc區可擁有結合至一種或多種Fc $\gamma$ 受體(Fc $\gamma$ R)的能力，但是優選地本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的Fc區已經被修飾為相對於由野生型Fc區展示出的具有減少的(或基本上沒有)與一種或多種Fc $\gamma$ R (例如，Fc $\gamma$ RIA (CD64)、Fc $\gamma$ RIIA (CD32A)、Fc $\gamma$ RIIB (CD32B)、Fc $\gamma$ RIIIA (CD16a)和/或Fc $\gamma$ RIIIB (CD16b))的結合和/或降低的效應子功能。減少或消除Fc $\gamma$ R結合的修飾是本領域眾所周知的並且包括位置234和235處的氨基酸置換、位置265處的置換或位置297處的置換，其中這種編號是如Kabat中的EU索引的編號(參見，例如，US 5,624,821，通過引用併入本文)。在一個實施方式中，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括變體IgG1 Fc區，其中這種變體IgG1 Fc區包括在位置234處用丙氨酸的置換和在位置235處用丙氨酸的置換(234A，235A)，其中這種編號是如Kabat中的EU索引的編號。可替選地，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的Fc區是相對於由野生型IgG1 Fc區展示出的，固有地展示出減少的(或基本上沒有的)與一種或多種Fc $\gamma$ R (特別地Fc $\gamma$ RIIIA)的結合和/或降低的效應子功能的一種Fc區，比如IgG2或IgG4 Fc區。在特別的實施方式中，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括IgG4 Fc區。

**【0112】** 另外，包括Fc區的分子的血清半衰期可通過增加Fc區對FcRn的結合親和力來增加。如本文使用的術語“半衰期”意味著分子的藥物代謝動力學性質，其是分子在它們施用後平均存活時間的量度。半衰期可以表示為從受試者的身體(例如，人患者或其他哺乳動物)或其特定隔室中消除百分之五十(50%)已知量的分子所需的時間，例如，如在血清中測量的，即迴圈半衰期，或在其他組織中。一般而言，半衰期的增加導致施用的分子在迴圈中的平均停留時間(MRT)增加。能夠增加含有Fc區的分子的半衰期的修飾是本領域已知的，並且包括，例如氨基酸置換M252Y、S254T、T256E和其組合。例如，參見US6,277,375，US7,083,784；US7,217,797，和US8,088,376；US2002/0147311和US2007/0148164；和WO 98/23289；WO 2009/058492；和WO 2010/033279中描述的修飾。在特別的實施方式中，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括變體Fc區，其中這種變體Fc區包括至少一種相對於野生型Fc區的氨基酸修飾，使得這種分子具有增加的半衰期(相對於這種具有野生型Fc區的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子)。在一個實施方式中，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括變體Fc區，其中這種變體Fc區包括在位置252處用酪氨酸、在位置254處用蘇氨酸和在位置256處用谷氨酸置換(252Y、254T和256E)，其中這種編號是如Kabat中的EU索引的編號。

**【0113】** 特別地，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括變體Fc區，其中這種Fc區包括：

- (A) 一種或多種改變效應子功能和/或Fc $\gamma$ R的突變；和/或
- (B) 一種或多種延長血清半衰期的突變。

**【0114】** 本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的CH2和CH3結構域的IgG1序列的非限制性示例將包括置換L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:28**) :

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

其中，X是賴氨酸(K)或不存在。

**【0115】** 本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的CH2和CH3結構域的IgG4序列的非限制性示例將包括M252Y/S254T/T256E置換(**SEQ ID NO:29**) :

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE  
 ALHNHYTQKS LSLSLGX

其中，X是賴氨酸(K)或不存在。

### C. PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體

**【0116】** 在某些實施方式中，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子是PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體，優選地四條鏈，含有Fc區的雙抗體，其具有對PD-1特異性的兩個結合位點、對CTLA-4特異性的兩個結合位點、Fc區和含有半胱氨酸的E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。圖1中提供了這種PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體的一般結構。優選地，這種分子包括結合至PD-1的人源化抗體的

第 28 頁，共 75 頁(發明說明書)

VL和VH結構域(分別是VL<sub>PD-1</sub>和VH<sub>PD-1</sub>)和還結合至CTLA-4的人源化抗體的VL和VH結構域(分別是VL<sub>CTLA-4</sub>和VH<sub>CTLA-4</sub>)。因此，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體能夠特異性結合至PD-1的表位和CTLA-4的表位。

【0117】 本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體被工程化以便這種第一和第二多肽沿著其長度經半胱氨酸殘基共價連接至彼此。這種半胱氨酸殘基可引入至將多肽的VL和VH結構域分開的間插連接體(連接體1；例如，GGSGGGG (SEQ ID NO:17))中。可替選地，將包括半胱氨酸殘基的第二肽(連接體2)引入每條多肽鏈中，例如，在這種多肽鏈的位置N-末端至VL結構域或C-末端至VH結構域處。這種連接體2的序列的非限制性示例是SEQ ID NO:18：GGCGGG。另外地或任選地，半胱氨酸殘基可引入其他結構域，以下提供了其的示例。

【0118】 異源二聚體的形成可由將這種多肽鏈工程化為含有異源二聚體促進結構域，比如相反電荷的多肽螺旋被進一步驅動。因此，在一個實施方式中，多肽鏈的一條將被工程化為含有“E-螺旋”結構域(SEQ ID NO:19：EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK)，它的殘基將在pH 7形成負電荷，而兩條多肽鏈的另一條將被工程化為含有“K-螺旋”結構域(SEQ ID NO:20：KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE)，它的殘基將在pH 7形成正電荷。這種帶電結構域的存在促進第一和第二多肽之間的締合，並且因此促進異源二聚化。

【0119】 可替選地，可以採用異源二聚體促進結構域，其中SEQ ID NO:19的四個串聯“E-螺旋”螺旋結構域之一已經修飾為含有半胱氨酸殘基(例如，EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:21))，和/或其中SEQ ID NO:20的四個串聯“K-螺旋”螺旋結構域之一已經修飾為含有半胱氨酸殘基(例

如，KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:22)。有利地組合這種實施方式以便採用SEQ ID NO:21的異源二聚體促進結構域和SEQ ID NO:22的異源二聚體促進結構域。一個替選的，缺少半胱氨酸殘基的**連接體2**序列是SEQ ID NO:23：ASTKG，其可與含有半胱氨酸殘基的異源二聚體促進結構域一起採用。

【0120】 向第一或第二多肽鏈提供哪個螺旋並不重要。本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體的非限制性示例，**DART-D**，具有具備E-螺旋序列(例如，SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:21)的第一多肽鏈和具備K-螺旋序列(SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22)的第二多肽鏈。

【0121】 本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體可被工程化使得它們具有能夠複合在一起以形成Fc區的IgG CH2-CH3結構域。在本發明的某些實施方式中，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體包括人IgG CH2-CH3結構域。以上提供了人IgG CH2-CH3結構域的非限制性示例並且本發明的雙特異性雙抗體可包括已經被工程化以調節效應子功能和/或血清半衰期的CH2-CH3結構域。

【0122】 在某些實施方式中，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體用將CH2和CH3結構域連接至異源二聚體促進結構域の間插連接體肽(**連接體3**)工程化。優選地，**連接體3**在位置C-末端至異源二聚體促進結構域處。可以在本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體中採用的**連接體3**的非限制性示例包括：GGGS (SEQ ID NO:30)、LGGGSG (SEQ ID NO:31)、ASTKG (SEQ ID NO:23)、LEPKSS (SEQ ID NO:32)、APSSS (SEQ ID NO:33)和APSSSPME (SEQ ID NO:34)、GGC和GGG。**連接體3**可包括單獨的IgG鉸鏈區的一部分或除了其他連接體序列以外包括IgG鉸鏈區的一部分。鉸鏈區的非限制性示例包括：來自IgG1的

DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:35)或EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:36)、來自IgG2的ERKCCVECP (SEQ ID NO:37)、來自IgG4的ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:38)和ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:39)，一種包括穩定S228P置換以減少鏈交換的IgG4鉸接變體((Lu等，(2008) “*The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of IgG4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation,*” J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969)以減少鏈交換的發生率)。在某些實施方式中，**連接體3**可進一步包括GGG，例如GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:42)。

#### D. DART-D

【0123】 “DART-D” (也稱為“MGD019”)是本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的非限制示例。DART-D是雙特異性、四鏈的含有Fc區的雙抗體，其具有對PD-1特異性的兩個結合位點、對CTLA-4特異性的兩個結合位點、為延長半衰期工程化的變體IgG4 Fc區和含有半胱氨酸的E/K-螺旋異源二聚體促進結構域。包括DART-D的四條多肽鏈總結在**表1**中。以下進一步詳細地描述了氨基酸序列。

表1	
DART-D	取代的多肽(在N-末端至C-末端方向上)

<p>第一和第三多肽鏈 (SEQ ID NO:40)</p>	<p>SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:17 SEQ ID NO:13 SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:39 SEQ ID NO:29</p>
<p>第二和第四多肽鏈 (SEQ ID NO:41)</p>	<p>SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:17 SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:22</p>

【0124】 DART-D的第一和第三多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合至PD-1的單克隆抗體的VL結構域(VL<sub>PD-1</sub>) (SEQ ID NO:1)；間插連接體肽(連接體1:GGGSGGGG (SEQ ID NO:17))；能夠結合至CTLA-4的單克隆抗體的VH結構域(VH<sub>CTLA-4</sub>) (SEQ ID NO:13)；含有半胱氨酸的間插連接體肽(連接體2:GGCGGG (SEQ ID NO:18))；含有半胱氨酸的異源二聚體促進(E-螺旋)結構域(EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:21))；包括穩定的IgG4 鉸鏈區の間插連接體肽(連接體3)(SEQ ID NO:39)；包括置換M252Y/S254T/T256E和缺少C-末端殘基的變體IgG4 CH2-CH3結構域(SEQ ID NO:29)；和C-末端。

【0125】 DART-D的第一和第三多肽鏈的氨基酸序列是(SEQ ID NO:40)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS  
 YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL  
 QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFDYWGQG TLVTVSSGGC GGGEVAACEK  
 EVAALEKEVA ALEKEVAALE KESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP  
 KDTLYITREP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN  
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ  
 VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV  
 LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLG

**【0126】** DART-D的第二和第四多肽鏈在N-末端至C-末端方向上包括：N-末端、能夠結合至CTLA-4的單克隆抗體的VL結構域(VL<sub>CTLA-4</sub>) (**SEQ ID NO:9**)；間插連接體肽(連接體**1**:GGGSGGGG (**SEQ ID NO:17**))；能夠結合至PD-1的單克隆抗體的VH結構域(VH<sub>PD-1</sub>) (**SEQ ID NO:5**)；含有半胱氨酸的間插連接體肽(連接體**2**:GGCGGG (**SEQ ID NO:18**))；含有半胱氨酸的異源二聚體促進(K-螺旋)結構域(KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:22**))；和C-末端。

**【0127】** DART-D的第二和第四多肽鏈的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:41**)：

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY  
 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG  
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCKA SGYSFTSYWM  
 NWRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVTITVDK STSTAYMELS  
 SLRSEDVAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTL VTVSSGGCGG GKVAACKEKV  
 AALKEKVAAL KEKVAALKE

**【0128】** DART-D的變體可容易地通過併入可替選的VH/VL結構域、間插連接體、Fc區，和/或通過引入一個或多個氨基酸置換、添加或刪除產生。例如，被工程化以減少/消除FcγR結合和/或ADCC活性和為延長半衰期的變體IgG1 Fc區容易地通過併入包括置換L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E的CH2和CH3結構域(**SEQ ID NO:28**)，而不是**SEQ ID NO:29**產生。這種變體的連接體3可包括IgG1鉸鏈(**SEQ ID NO:35**、**SEQ ID NO:36**或**SEQ ID NO:42**)。可在本發明的方法中使用的另外PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體在WO 2017/019846 (參見，具體的“DART-B”、“DART-C”、“DART-E”和“DART-F”，其的序列在表9中那裡描述，並且通過引用併入本文)中公開。

#### **E. 另外的PD-1 xCTLA-4雙特異性分子**

**【0129】** 可在本發明的方法中使用的其他PD-1 x CTLA-4 雙特異性結合分子，例如，在WO2014/209804、WO 2017/218707、WO 2017/193032、WO 2019/094637和US 2019/0185569中公開。

**【0130】** 這種PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的變體可容易地，例如通過併入可替選的VH/VL結構域比如本文提供的那些產生。

## **II. 生產方法**

**【0131】** 本發明的結合分子(例如，PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體)可使用本領域已知的用於產生重組蛋白質的任何方法重組製備和表達。例如，編碼這種結合分子的多肽鏈的核酸可被構建，引入至表達載體，並且在合適的宿主細胞中表達。結合分子可在細菌細胞(例如，大腸桿菌細胞)或真核細胞(例如，CHO、293E、COS、NS0細胞)中重組產生。另外，結合分子可在酵母細胞比如畢赤酵母屬或酵母菌屬中表達。

【0132】 為了產生結合分子(例如，PD-1 x CTLA-4雙特異性雙抗體)，編碼分子的一種或多種多核苷酸可被構建，引入至表達載體，並且然後在合適的宿主細胞中表達。使用標準分子生物學技術以製備重組表達載體、轉染宿主細胞、對轉化株進行選擇、培養宿主細胞和恢復分子(參見，例如，Green, M.R. 等(2012), MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 第四版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 和 Ausubel 等 eds., 1998, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY 中描述的技術)。表達載體應具有允許載體在宿主細胞中複製的特徵。載體還應具有對在宿主細胞中表達必要的啟動子和信號序列。這種序列是本領域眾所周知的。除了編碼這種結合分子的核酸序列以外，重組表達載體可攜帶另外的序列，比如調節載體在宿主細胞中的複製(例如，複製的起始)和可選擇的標誌物基因的序列。可採用的另一方法是在植物(例如，煙草)或轉基因動物中表達基因序列。已經公開了用於在植物或牛奶中重組地表達這種結合分子的合適的方法(參見，例如，Peeters等(2001) “*Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants,*” Vaccine 19:2756；US 5,849,992；和Pollock等(1999) “*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies,*” J. Immunol Methods 231:147-157)。

【0133】 在結合分子已被重組表達後，其可通過本領域已知的用於純化多肽或多蛋白的任何方法從宿主細胞的內部或外部(比如從培養基)純化。通常用於抗體純化的分離和純化方法(例如，基於抗原選擇性的抗體純化方案)可用於這種分子的分離和純化並且不限於任何特定方法。例如，可以使用以下方法中的一種或多種：柱層析、過濾、超濾、鹽析、溶劑沉澱、溶劑提取、蒸餾、免疫沉

澱、SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳、等電聚焦、透析和重結晶。層析包括例如離子交換、親和力，特別是通過對特定抗原的親和力(任選地在Protein A選擇後，其中PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括Fc區)、分級柱色譜法(sizing column chromatography)、疏水性、凝膠過濾、反向和吸附(Marshak等(1996) STRATEGIES FOR PROTEIN PURIFICATION AND CHARACTERIZATION: A Laboratory Course Manual. (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。

### III. 本發明的PD-1 xCTLA-4雙特異性分子的用途

【0134】 本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子通常具有抑制PD-1和CTLA-4功能的能力並且因此通過阻斷由PD-1和CTLA-4介導的免疫系統抑制加強了免疫系統。本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子還通常允許用於PD-1和CTLA-4二者的完全阻斷，以及當與PD-1共表達時偏向於CTLA-4的阻斷。因此，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子通常用於緩解T-細胞耗竭和/或增加受試者的免疫應答(例如，T-細胞和/或NK-細胞介導的免疫應答)。特別地，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子可用於治療與不期望的抑制免疫系統相關的任何疾病或病症，包括癌症。如本文使用的，術語“受試者”指人(即，人患者)或其他哺乳動物。本文提供了用於向需要其的受試者施用這種療法的給藥方案的非限制性示例。

【0135】 可用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子治療的癌症包括：腎上腺癌、AIDS相關的癌、肺泡狀軟組織肉瘤、星形細胞腫瘤、肛門癌、膽管癌、膀胱癌、骨癌、腦癌、腦和脊髓癌、乳腺癌、HER2+乳腺癌、三陰性乳腺癌(TNBC)、頸動脈體瘤、宮頸癌、HPV相關的宮頸癌、宮頸鱗狀細胞癌、軟骨肉瘤、脊索

瘤、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌(CRC)、微衛星高度不穩定性結直腸癌(MSI-H CRC)、微衛星穩定結直腸癌(非微衛星高度不穩定性結直腸癌，非MSI-H CRC)、促結締組織增生性小圓細胞腫瘤、子宮內膜癌、室管膜細胞瘤、尤因氏腫瘤、骨骼外黏液樣軟骨肉瘤、輸卵管癌、骨纖維發育不全、骨骼的纖維發育異常、膽囊或膽管癌、胃癌、妊娠滋養細胞疾病、生殖細胞瘤、膠質母細胞瘤、頭頸癌、HPV相關的頭頸癌、血液系統惡性腫瘤、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪肉瘤/惡性脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、Merkel細胞癌、間皮咽癌、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓發育不良綜合症、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳頭狀甲狀腺癌、甲狀旁腺腫瘤、兒科癌症、周圍神經鞘腫瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體腫瘤、前列腺癌、轉移性去勢抵抗性前列腺癌(mCRPC)、後部葡萄膜黑素瘤、腎癌、腎細胞癌(RCC)、橫紋肌樣腫瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、童年期的小圓形藍細胞瘤(包括成神經細胞瘤和橫紋肌肉瘤)、軟組織肉瘤、多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤、黏液纖維肉瘤、鱗狀細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)、胃癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺癌、甲狀腺轉移癌症和子宮癌。

**【0136】** 特別地，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子可在以下的治療中使用：宮頸癌、HPV相關的宮頸癌、宮頸鱗狀細胞癌、CRC、MSI-H CRC、非MSI-H CRC、頭頸癌、HPV相關的頭頸癌、肺癌、黑素瘤、NSCLC、前列腺癌、腎癌、RCC、軟組織肉瘤、多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤、黏液纖維肉瘤、鱗狀細胞癌和SCCHN。

【0137】 在某些實施方式中，本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子被施用作為治療癌症的一線療法(first-line therapy)。在某些實施方式中，在一種或多種先前的療法之後施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。在某些實施方式中，在外科去除腫瘤時或之後採用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子作為輔助療法，以便延遲、抑制或預防轉移的發展。在外科手術之前，還可施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子(例如，作為新輔助療法)，以便減少腫瘤的大小，因此能夠進行或簡化這種外科手術，在這種外科手術期間使組織不受傷害，和/或減少任何所造成的外形毀損(disfigurement)。

【0138】 本發明具體地涵蓋施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子與對本領域技術人員已知的用於治療或預防癌症的治療或預防有效量的一種或多種其他試劑或療法組合，包括但不限於當前標準和實驗化療劑或化療、激素試劑或療法、生物試劑或療法、免疫試劑或免疫療法、輻射試劑或療法、其他治療劑或外科手術。

【0139】 如本文使用的，術語“組合”指使用大於一種治療劑。術語“組合”的使用不限制向具有紊亂的受試者(例如，人患者或其他哺乳動物)施用治療劑的順序，也不意味著在完全相同的時間施用試劑。術語組合意味著本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子和任何其他治療或化療試劑向人患者或其他哺乳動物依次和在一定時間間隔內施用，使得PD-1 x CTLA-4雙特異性分子和其他試劑的組合比如果它們以其他方式施用提供增加的益處。例如，每種治療性療法(例如，化療、輻射療法、激素療法或生物療法)可以在同時或在時間的不同點以任何順序依次施用；然而，如果不是同時施用，它們應在足夠近的時間施用，以便提

供期望的治療或預防效果。每種治療劑可獨立地以任何合適的形式且獨立地通過任何合適的途徑，例如，一種通過口服途徑和一種通過腸胃外等分開施用。

#### IV. 施用的方法和劑量

**【0140】** 本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子可通過各種方法向受試者，例如，需要其的受試者，例如人患者施用。對於許多應用，施用的途徑是以下之一：靜脈內注射或輸注(IV)、皮下注射(SC)、腹膜內注射(IP)或肌內注射。也可能使用關節內遞送。也可使用腸胃外施用的其他模式。這種模式的非限制性示例包括：動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、經氣管的、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊柱內和硬膜外和胸骨內注射。

**【0141】** PD-1 x CTLA-4雙特異性分子可使用基於體重的劑量施用。還可選擇劑量以減少或避免針對施用分子的抗體的產生。調整用藥方案以提供期望的應答，例如，治療應答或組合治療效果。一般而言，可使用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子(和任選地其他試劑)的劑量，以便提供受試者以生物可利用量的試劑。如本文使用的，術語“劑量”(“dose”)指一次採用的藥物的指定量。術語“用藥”(“dosage”)指在指定時間段內劑量的具體量、數量和頻率的施用；因此，術語用藥包括時序特徵(chronological feature)，比如持續時間和週期性(periodicity)。

**【0142】** 如本文使用的術語“基於體重的劑量”指每單位重量的患者施用的分子的離散量，例如每千克受試者的體重的毫克藥物(mg/kg體重，本文縮寫為“mg/kg”)。計算的劑量將基於基線處受試者的體重施用。典型地，從基線或確定的穩定狀態(plateau)重量的體重的顯著性( $\geq 10\%$ )變化將通常促進重新計算劑量。可以給予單個或多個劑量。包括PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的組合物可經輸注向需要其的受試者施用。

【0143】 在某些實施方式中，PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約3 mg/kg至約10 mg/kg、約3 mg/kg至約8 mg/kg、約3 mg/kg至約6 mg/kg、約6 mg/kg至約10 mg/kg、約6 mg/kg至約9 mg/kg、約6 mg/kg至約8 mg/kg、約6 mg/kg至約7 mg/kg、約7 mg/kg至約8 mg/kg、約8 mg/kg至約9 mg/kg或約9 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量向需要其的受試者施用。在特別的實施方式中，PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg的基於體重的劑量向需要其的受試者施用。在某些實施方式中，PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在治療期間以約每3週一次至約每6週一次(例如，約每4週一次、約每5週一次)的用藥以任何前述劑量之一施用。在某些實施方式中，PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以第一用藥一次或多次以第一劑量和以第二用藥一次或多次以第二劑量施用，其中第一劑量和第二劑量是相同的或不同的並且第一用藥和第二用藥是相同的或不同的。在一些實施方式中，第一劑量和第二劑量是相同的(例如，約6 mg/kg)並且第一用藥和第二用藥是相同的(例如，約每3週一次)。在一些實施方式中，第一劑量和第二劑量是相同的(例如，約6 mg/kg)並且第一用藥和第二用藥是不同的(例如，第一用藥是約每3週一次且第二用藥是約每6週一次)。在一些實施方式中，第一劑量和第二劑量是不同的(例如，第一劑量以約6 mg/kg和第二劑量以約3 mg/kg)並且第一用藥和第二用藥是相同的(例如，約每3週一次)。在一些實施方式中，第一劑量和第二劑量是不同的(例如，第一劑量以約6 mg/kg和第二劑量以約3 mg/kg)並且第一用藥和第二用藥是不同的(例如，第一用藥是約每3週一次且第二用藥是約每6週一次)。

【0144】 關於基於體重的劑量，術語“約”旨在表示大於所述劑量10%或小於所述劑量10%的範圍，使得例如，約10 mg/kg的劑量將在9 mg/kg和11 mg/kg之間。

【0145】 如本文使用的術語“給藥間隔(dosing interval)”指的是可以是規則的或間歇的劑量之間的時間間隔。PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的用藥可以在足以涵蓋例如至少2個劑量、至少4個劑量、至少6個劑量、至少12個劑量或至少22個劑量(治療的過程)的一段時間內以週期的給藥間隔施用。例如，用藥可以以例如，每天一次或兩次或每週約一次至四次，或特別地每週一次(“Q1W”)、每兩週一次(“Q2W”)、每三週一次(“Q3W”)、每四周一次(“Q4W”)、每六週一次(“Q6W”)等施用。這種週期施用可持續一段時間，例如，約1至52周之間、24周、大於52周、84周或大於84周。這種治療過程可分為數個增量(increment)，每個本文稱為“週期”，例如，2周至12周之間、約3周至12周之間，特別地約4周、或約6周、或約12周，在此期間施用固定數量的劑量。這種週期施用可持續一段時間，例如，約7天至364天之間、168天、大於364天或588天。這種治療過程可分為數個增量，每個本文稱為“週期”，例如，14天至84天之間、約21天至84天之間，特別地約28天、或約42天、或約84天，在此期間施用固定數量的劑量。在每個週期期間，施用的劑量和/或頻率可以是相同的或不同的。可影響有效治療受試者所需的用藥和時機的因素包括，例如，疾病或紊亂的嚴重程度、製劑、遞送的途徑、先前的治療、受試者的總體健康和/或年齡和受試者中其他疾病的存在。而且，用治療有效量化合物治療受試者可包括單個治療或可包括一系列治療。治療可包括一個或多個週期，在所述週期期間施用的劑量和/或這種施用的頻率可以是相同的或不同。

【0146】 在一個實施方式中，PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在誘導期期間以指定劑量和給藥間隔施用，和PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在隨後的維持期期間以指定劑量和給藥間隔施用。在某些實施方式中，在維持期期間施用的劑量與在誘導期期間施用的劑量相同。在某些實施方式中，在維持期期間施用的劑量與在誘導期期間施用的劑量不同。在某些實施方式中，在維持期期間的給藥間隔與在誘導期期間的給藥間隔不同。在某些實施方式中，在維持期期間的給藥間隔與在誘導期期間的給藥間隔相同。在特別的實施方式中，在維持期期間施用的劑量與在誘導期期間施用的劑量相同，和在維持期期間的給藥間隔與在誘導期期間的給藥間隔不同。在特別的實施方式中，在維持期期間施用的劑量與在誘導期期間施用的劑量相同，和在維持期期間的給藥間隔與在誘導期期間的給藥間隔相同(即，在治療過程期間未改變施用的劑量和給藥間隔)。在某些實施方式中，誘導期是約24周。在某些實施方式中，誘導期是約168天。在某些實施方式中，在誘導期期間施用約8個劑量的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。在某些實施方式中，維持期在約6周至約84周之間。在某些實施方式中，維持期在7天和588天之間。在某些實施方式中，治療期是至少約24周、至少約36周、至少約48周、至少約60周、至少約72周、至少約84周或大於84周。在某些實施方式中，在維持期期間施用至少一個劑量的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子，並且可以施用另外劑量直到疾病緩解或觀察到無法控制的毒性。在某些實施方式中，在疾病緩解後治療繼續一段時間。在特別的實施方式中，在維持期期間施用至少一個劑量的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子，並且可以施用另外劑量直到已經施用約14個劑量。在特別的實施方式中，在維持期期間施用至少一個劑量的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子，並且可以施用另外劑量直到已經施用約28個劑量。

【0147】 “給藥方案”是用藥施用，其中以預定的頻率(或一組這種頻率)向患者施用預定的劑量(或一組這種預定的劑量)預定的週期數(或多個週期數)。給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約3 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約3 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約3 mg/kg至約6 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6 mg/kg至約9 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6 mg/kg至約7 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約7 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約8 mg/kg至約9 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約9 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約3 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期

間以約4 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6.5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約7 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約7.5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約8.5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約9 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約9.5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。

【0148】 給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約3 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約3 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約3 mg/kg至約6 mg/kg的基於體重

的劑量每6週一次施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約6 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約6 mg/kg至約9 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約6 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約6 mg/kg至約7 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約7 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約8 mg/kg至約9 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約9 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約3 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約4 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約5 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約6 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約6.5 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約7 mg/kg的基於體重

的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約7.5 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約8 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約8.5 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約9 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約9.5 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在維持期期間以約10 mg/kg的基於體重的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。

**【0149】** 給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約3 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約3 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約3 mg/kg至約6 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6 mg/kg至約9 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，

和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6 mg/kg至約7 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約7 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約8 mg/kg至約9 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約9 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約3 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約4 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約6.5 mg/kg的基於體重的劑量每3

週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約7 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約7.5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約8.5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約9 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約9.5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括在誘導期期間以約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次，和在維持期期間以相同的劑量每6週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。

**【0150】** 如以上提供的，在某些實施方式中，在治療過程期間未改變施用的劑量和給藥間隔。這種給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約3 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約3 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用本發明的PD-1 x

CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約3 mg/kg至約6 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用本發明的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約6 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約6 mg/kg至約9 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約6 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約6 mg/kg至約7 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約7 mg/kg至約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約8 mg/kg至約9 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約9 mg/kg至約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約3 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約4 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約6 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另

一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約6.5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約7 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約7.5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約8 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約8.5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約9 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約9.5 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。另一給藥方案的非限制性示例包括對於治療持續的時間以約10 mg/kg的基於體重的劑量每3週一次施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。

**【0151】** 一般而言，在以上實施方式中，以預定的頻率或週期數，或這種計畫的間隔的1-3天內進行施用，使得施用發生在計畫的劑量的那天之前的1-3天、之後的1-3天或當天，例如，每3周(±3天)一次。

**【0152】** 在以上實施方式中，PD-1 xCTLA-4雙特異性分子通過IV輸注施用。在這種實施方式中，將PD-1 xCTLA-4雙特異性分子通常稀釋入包括合適的稀釋劑，例如鹽水的輸注袋中。因為可能發生輸注或過敏反應，預防這種輸注反應的術前用藥是推薦的並且在抗體施用期間應觀察過敏性反應的預防措施。在某些實施方式中，IV輸注可在約30分鐘和約4小時之間的期間內向受試者施

用。在某些實施方式中，IV輸注在約30-240分鐘、約30-180分鐘、約30-120分鐘或約30-90分鐘的時期內，或約30-60分鐘的時期內，或約45-60分鐘的時期內，或更小時期內遞送，如果受試者不展示出不利的輸注反應的跡象或症狀。在特別的實施方式中，IV輸注在約45-60分鐘的時期內遞送。

## V. 藥物組合物

**【0153】** 本發明的PD-1 xCTLA-4雙特異性分子(例如，DART-D)可被配製為組合物。本發明的組合物包括可用於製造非藥物組合物的原料藥組合物(例如，不純的或非滅菌的組合物)和可用於製備單位劑型的藥物組合物(即，適合於施用至受試者或患者的組合物)。這種組合物包括預防或治療有效量的本發明的PD-1 xCTLA-4雙特異性分子和一種或多種藥學上可接受的載體和可任選地另外包括一種或多種另外的治療劑。藥物組合物可以例如，作為水溶液或特別地適合於用這種藥學上可接受的載體重配(reconstitution)或用這種載體重構(reconstituted)的乾燥凍乾粉或無水濃縮物供應。

**【0154】** 如本文使用的，術語“藥學上可接受的載體”意味著被聯邦政府或州政府管理機構批准的或列於美國藥典或其他通常認可的藥典的適於施用至動物，更特別是用於人的稀釋劑、溶劑、分散介質、抗細菌劑和抗真菌劑、賦形劑或媒介物。這種藥學載體可以是無菌液體，比如水和油，包括石油、動物、植物或合成來源的那些。也可採用生理鹽水(saline)溶液和葡聚糖水溶液和甘油溶液作為液體載體，特別地用於可注射溶液。組合物，如果期望，也可含有少量的濕潤劑或乳化劑，或pH緩衝劑。這些組合物可採用溶液、懸浮液、乳液、片劑、丸劑、膠囊、粉末、緩釋製劑等的形式。

【0155】 一般而言，組合物的成分被單獨供應或以劑量形式混合在一起，例如作為乾燥凍乾粉或無水濃縮物，或作為在標明活性劑的量的氣密密封容器比如瓶子、小瓶、安瓿或小袋(sachet)中的水溶液。當通過輸注施用組合物時，其可以用含有無菌藥物級水或生理鹽水的輸注瓶分配。當通過注射施用組合物時，則可提供注射用無菌水、生理鹽水或其他稀釋劑的安瓿，以便可以在施用前混合成分。

## VI. 藥物試劑盒

【0156】 本發明還提供包括一個或多個含有藥物組合物或藥物組合和指導材料(例如，通知、包裝插頁、說明書等)的容器的藥物包裝或試劑盒。另外地，用於疾病治療的一種或多種其他預防或治療劑也可以包括在藥物試劑盒中。這種藥物試劑盒的容器可，例如，包括一個或多個氣密密封瓶子、小瓶、安瓿、小袋等，其標明其中含有的活性劑的量。當通過輸注施用組合物時，容器可以是輸注瓶子、袋等，其含有無菌藥學級溶液(例如，水、生理鹽水、緩衝液等)。當通過注射施用組合物時，藥物試劑盒可含有注射用無菌水、生理鹽水或其他稀釋劑的安瓿，以便促進向受試者(例如，人患者或其他哺乳動物)施用的藥物試劑盒的組分混合。在某些實施方式中，藥物包裝或試劑盒包括含有PD-1 xCTLA-4雙特異性分子的藥物組合物和指導材料。

【0157】 在一個實施方式中，這種試劑盒的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子(例如，DART-D)在氣密密封容器中作為乾燥滅菌凍乾粉或無水濃縮物供應並且可以，例如，用水、生理鹽水或其他稀釋劑重構至用於施用給受試者的合適的濃度。在某些實施方式中，這種試劑盒的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子(例如，DART-D)在氣密密封容器中以水溶液供應並且可以，例如，用水、生理鹽水或

其他稀釋劑稀釋至施用給受試者的合適的濃度。試劑盒可進一步在一個或多個容器中包括對治療癌症有用的一種或多種其他預防劑和/或治療劑；和/或試劑盒可進一步包括結合一種或多種與癌症相關的癌症抗原的一種或多種細胞毒素抗體。在某些實施方式中，其他預防劑或治療劑是化療劑。在其他實施方式中，預防劑或治療劑是生物試劑或激素治療劑。

**【0158】** 試劑盒有時包括用於進行本文所述的過程的說明和/或描述，其在本文被稱為“指導材料”，並且在一些實施方式中，指導材料以有形形式或電子形式提供。在某些實施方式中，指導材料作為合適的電腦可讀存儲介質，例如，可攜式快閃記憶體驅動器、DVD、CD-ROM、磁片等上存在的電子存儲資料檔案提供。在某些實施方式中，試劑盒包括以電子形式提供指導材料的網際網路位置的書面描述。藥物試劑盒包括的指導材料可以是，例如，具有由管理藥物或生物產品的製造、使用或銷售的政府機關規定的內容和格式，並且可指示由用於人施用和/或用於人療法的藥物組合物的製造、銷售或使用的機關的批准。指導材料可，例如提供關於藥物組合物的所含有的劑量、如何施用其的方式等的資訊。這種指導可進一步提供關於試劑盒中未提供的一種或多種藥物組合物的劑量和施用的資訊。

**【0159】** 因此，例如，藥物試劑盒所包括的指導材料可指導所提供的藥物組合物與另外的試劑組合被施用，所述另外的試劑可在相同的藥物試劑盒或在單獨的藥物試劑盒中提供。這種指導材料可指導所提供的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子藥物組合物包括或被重構以施用約3 mg/kg至約10 mg/kg、約3 mg/kg至約8 mg/kg、約3 mg/kg至約6 mg/kg、約6 mg/kg至約10 mg/kg、約6 mg/kg至約9 mg/kg、約6 mg/kg至約8 mg/kg、約6 mg/kg至約7 mg/kg、約7 mg/kg至約8 mg/kg、約8 mg/kg

至約9 mg/kg或 約9 mg/kg至約10 mg/kg的劑量。這種指導材料可指導所提供的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子藥物組合物包括或被重構以施用約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或 約10 mg/kg的劑量。這種指導材料可指導所提供的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子藥物組合物約每3週一次、每6週一次或其組合施用。這種指導材料可指導在誘導期期間以指定劑量和間隔施用提供的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子藥物組合物。這種指導材料可進一步指導在隨後的維持期期間以指定劑量和間隔施用提供的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子藥物組合物。在某些實施方式中，這種指導材料指導在維持期期間施用的劑量與在誘導期期間施用的劑量相同。在某些實施方式中，這種指導材料指導在維持期期間施用的劑量與在誘導期期間施用的劑量不同。在某些實施方式中，這種指導材料指導在維持期期間的給藥間隔與在誘導期期間的給藥間隔不同。在某些實施方式中，這種指導材料指導在維持期期間的給藥間隔與在誘導期期間的給藥間隔相同。在某些實施方式中，這種指導材料指導在治療的過程期間未改變施用的劑量和給藥間隔。這種指導材料可指導關於所包括的藥物組合物的施用模式，例如其通過靜脈內(IV)輸注施用。藥物試劑盒所包括的指導材料可指導關於這種施用的持續時間或時機，例如所包括的藥物組合物是在約30分鐘、約45分鐘、約60分鐘、約30-240分鐘的一段時間內、約30-90分鐘的一段時間等通過靜脈內(IV)輸注施用的組合物。

**【0160】** 藥物試劑盒所包括的指導材料可指導關於所包括的藥物組合物的合適的或期望的用途，例如指導施用這種藥物組合物用於治療癌症。這種癌症可以是腎上腺癌、AIDS相關的癌、肺泡狀軟組織肉瘤、星形細胞腫瘤、肛門

癌、膽管癌、膀胱癌、骨癌、腦癌、腦和脊髓癌、乳腺癌、HER2+乳腺癌、三陰性乳腺癌(TNBC)、頸動脈體瘤、宮頸癌、HPV相關的宮頸癌、宮頸鱗狀細胞癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌(CRC)、微衛星高度不穩定性結直腸癌(MSI-H CRC)、微衛星穩定結直腸癌(非微衛星高度不穩定性結直腸癌，非MSI-H CRC)、促結締組織增生性小圓細胞腫瘤、子宮內膜癌、室管膜細胞瘤、尤因氏腫瘤、骨骼外黏液樣軟骨肉瘤、輸卵管癌、骨纖維發育不全、骨骼的纖維發育異常、膽囊或膽管癌、胃癌、妊娠滋養細胞疾病、生殖細胞瘤、膠質母細胞瘤、頭頸癌、HPV相關的頭頸癌、血液系統惡性腫瘤、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪肉瘤/惡性脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、Merkel細胞癌、間皮咽癌、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓發育不良綜合症、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳頭狀甲狀腺癌、甲狀旁腺腫瘤、兒科癌症、周圍神經鞘腫瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體腫瘤、前列腺癌、轉移性去勢抵抗性前列腺癌(mCRPC)、後部葡萄膜黑素瘤、腎癌、腎細胞癌(RCC)、橫紋肌樣腫瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、童年期的小圓形藍細胞瘤(包括成神經細胞瘤和橫紋肌肉瘤)、軟組織肉瘤、多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤、黏液纖維肉瘤、鱗狀細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)、胃癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺癌、甲狀腺轉移癌症和子宮癌。

## VII. 本發明的實施方式

**【0161】** 本發明部分關注以下非限制性實施方式(E1-E92)：

- E1.** 一種治療癌症的方法，其包括向需要其的受試者施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括PD-1結合結構域和CTLA-4結合結構域，和其中所述方法包括以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每3週一次向受試者施用所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。
- E2.** 一種刺激免疫細胞的方法，其包括向需要其的受試者施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括PD-1結合結構域和CTLA-4結合結構域，和其中所述方法包括以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每3週一次向受試者施用所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。
- E3.** 根據**E1**或**E2**的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在誘導期期間以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每3週一次向所述受試者施用。
- E4.** 根據**E2**或**E3**的方法，其中所述免疫細胞是T細胞。
- E5.** 根據**E1-E4**的任一項的方法，其中：
- (I) 所述PD-1結合結構域包括包含**SEQ ID NO:1**的CDR<sub>L1</sub>、CDR<sub>L2</sub>和CDR<sub>L3</sub>的輕鏈可變結構域(VL<sub>PD-1</sub>)，和包含**SEQ ID NO:5**的PD-1-特異性CDR<sub>H1</sub>、CDR<sub>H2</sub>和CDR<sub>H3</sub>的重鏈可變結構域(VH<sub>PD-1</sub>)；和
  - (II) 所述CTLA-4結合結構域包括包含**SEQ ID NO:9**的CDR<sub>L1</sub>、CDR<sub>L2</sub>和CDR<sub>L3</sub>的輕鏈可變結構域(VL<sub>CTLA-4</sub>)，和包含**SEQ ID NO:13**的CTLA-4-特異性CDR<sub>H1</sub>、CDR<sub>H2</sub>和CDR<sub>H3</sub>的重鏈可變結構域(VH<sub>CTLA-4</sub>)。
- E6.** 根據**E1-E5**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括：
- (I) 兩個所述PD-1結合結構域；和

(II) 兩個所述CTLA-4結合結構域。

- E7.** 根據**E1-E6**的任一項的方法，其中所述PD-1結合結構域包括**SEQ ID NO:1**的VL結構域和**SEQ ID NO:5**的VH結構域。
- E8.** 根據**E1-E7**的任一項的方法，其中所述CTLA-4結合結構域包括**SEQ ID NO:9**的VL結構域和**SEQ ID NO:13**的VH結構域。
- E9.** 根據**E1-E8**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括Fc區。
- E10.** 根據**E9**的方法，其中所述Fc區是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同種型的。
- E11.** 根據**E9**或**E10**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子進一步包括鉸鏈結構域。
- E12.** 根據**E11**的方法，其中所述Fc區和所述鉸鏈結構域是IgG4同種型的，和其中所述鉸鏈結構域包括穩定突變。
- E13.** 根據**E9-E12**的任一項的方法，其中所述Fc區是變體Fc區，其包括：
- (a) 降低變體Fc區對Fc $\gamma$ R親和力的一個或多個氨基酸修飾；和/或
  - (b) 增強變體Fc區的血清半衰期的一個或多個氨基酸修飾。
- E14.** 根據**E13**的方法，其中所述降低變體Fc區對Fc $\gamma$ R親和力的一個或多個氨基酸修飾包括L234A或L235A，或L234A和L235A的置換，其中所述編號是Kabat中的EU索引的編號。
- E15.** 根據**E13**或**E14**的任一項的方法，其中所述增強變體Fc區的血清半衰期的一個或多個氨基酸修飾包括M252Y；或M252Y和S254T；或M252Y和T256E；或M252Y，S254T和T256E；或K288D和H435K的置換，其中所述編號是Kabat中的EU索引的編號。

- E16.** 根據**E1-E15**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子是包括包含**SEQ ID NO:40**的氨基酸序列的一條多肽鏈和包含**SEQ ID NO:41**的氨基酸序列的第二多肽鏈的雙抗體。
- E17.** 根據**E1-E16**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子是包括各自包含**SEQ ID NO:40**的氨基酸序列的兩條多肽鏈和各自包含**SEQ ID NO:41**的氨基酸序列的兩條多肽鏈的雙抗體。
- E18.** 根據**E1-E17**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約3 mg/kg和8 mg/kg之間的劑量施用。
- E19.** 根據**E1-E18**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約6 mg/kg和10 mg/kg之間的劑量施用。
- E20.** 根據**E1-E18**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約3 mg/kg的劑量施用。
- E21.** 根據**E1-E18**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約4 mg/kg的劑量施用。
- E22.** 根據**E1-E18**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約5 mg/kg的劑量施用。
- E23.** 根據**E1-E19**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約6 mg/kg的劑量施用。
- E24.** 根據**E1-E19**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約6.5 mg/kg的劑量施用。
- E25.** 根據**E1-E19**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約7 mg/kg的劑量施用。

- E26.** 根據**E1-E19**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約7.5 mg/kg的劑量施用。
- E27.** 根據**E1-E19**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約8 mg/kg的劑量施用。
- E28.** 根據**E1-E17**或**E19**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約8.5 mg/kg的劑量施用。
- E29.** 根據**E1-E17**或**E19**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約9 mg/kg的劑量施用。
- E30.** 根據**E1-E17**或**E19**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約9.5 mg/kg的劑量施用。
- E31.** 根據**E3-E16**的任一項的方法，進一步包括在維持期期間以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每6週一次向受試者施用所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子，其中所述維持期跟隨所述誘導期。
- E32.** 根據**E3-E17**或**E31**的任一項的方法，其中所述誘導期具有至多約24周的持續時間。
- E33.** 根據**E3-E17**或**E31-E32**的任一項的方法，其中所述維持期具有至多約84周的持續時間。
- E34.** 根據**E3-E17**或**E31-E33**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以在所述誘導期期間約3 mg/kg和8 mg/kg之間的劑量施用。
- E35.** 根據**E3-E17**或**E31-E33**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約6 mg/kg和10 mg/kg之間的劑量施用。

- E36.** 根據**E3-E17**或**E31-E34**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約3 mg/kg的劑量施用。
- E37.** 根據**E3-E17**或**E31-E34**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約4 mg/kg的劑量施用。
- E38.** 根據**E3-E17**或**E31-E34**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約5 mg/kg的劑量施用。
- E39.** 根據**E3-E17**或**E31-E35**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約6 mg/kg的劑量施用。
- E40.** 根據**E3-E17**或**E31-E35**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約6.5 mg/kg的劑量施用。
- E41.** 根據**E3-E17**或**E31-E35**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約7 mg/kg的劑量施用。
- E42.** 根據**E3-E17**或**E31-E35**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約7.5 mg/kg的劑量施用。
- E43.** 根據**E3-E17**或**E31-E35**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約8 mg/kg的劑量施用。
- E44.** 根據**E3-E17**、**E31-E33**或**E35**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約8.5 mg/kg的劑量施用。
- E45.** 根據**E3-E17**、**E31-E33**或**E35**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約9 mg/kg的劑量施用。
- E46.** 根據**E3-E17**、**E31-E33**或**E35**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約9.5 mg/kg的劑量施用。

- E47.** 根據**E3-E17**、**E31-E33**或**E35**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約10 mg/kg的劑量施用。
- E48.** 根據**E31-E47**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約3 mg/kg和8 mg/kg之間的劑量施用。
- E49.** 根據**E31-E47**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約6 mg/kg和10 mg/kg之間的劑量施用。
- E50.** 根據**E31-E48**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約3 mg/kg的劑量施用。
- E51.** 根據**E31-E48**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約4 mg/kg的劑量施用。
- E52.** 根據**E31-E48**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約5 mg/kg的劑量施用。
- E53.** 根據**E31-E49**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約6 mg/kg的劑量施用。
- E54.** 根據**E31-E49**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約6.5 mg/kg的劑量施用。
- E55.** 根據**E31-E49**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約7 mg/kg的劑量施用。
- E56.** 根據**E31-E49**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約7.5 mg/kg的劑量施用。
- E57.** 根據**E31-E49**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約8 mg/kg的劑量施用。

- E58.** 根據**E31-E47**或**E49**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約8.5 mg/kg的劑量施用。
- E59.** 根據**E31-E47**或**E49**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約9 mg/kg的劑量施用。
- E60.** 根據**E31-E47**或**E49**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約9.5 mg/kg的劑量施用。
- E61.** 根據**E31-E47**或**E49**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約10 mg/kg的劑量施用。
- E62.** 根據**E31-E61**的任一項的方法，其中所述維持期中施用的所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的所述劑量與所述誘導期中施用的所述劑量相同。
- E63.** 根據**E31-E61**的任一項的方法，其中所述維持期中施用的所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的所述劑量與所述誘導期中施用的所述劑量不同。
- E64.** 根據**E1-E63**的任一項的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子通過靜脈內(IV)輸注施用。
- E65.** 根據**E64**的方法，其中所述IV輸注在約30分鐘至約60分鐘之間的時間段內。
- E66.** 根據**E1-E65**的任一項的方法，其中所述癌症選自由以下組成的組中：腎上腺癌、AIDS相關的癌、肺泡狀軟組織肉瘤、星形細胞腫瘤、肛門癌、膽管癌、膀胱癌、骨癌、腦癌、腦和脊髓癌、乳腺癌、HER2+乳腺癌、三陰性乳腺癌(TNBC)、頸動脈體瘤、宮頸癌、HPV相關的宮頸癌、宮頸鱗狀細胞癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌(CRC)、微衛星高度不穩定性結直腸癌(MSI-H CRC)、微衛星穩定結直腸癌(非微衛星高度不穩定性結直腸癌，非MSI-H CRC)、促結締組織增生性小圓細胞腫瘤、

子宮內膜癌、室管膜細胞瘤、尤因氏腫瘤、骨骼外黏液樣軟骨肉瘤、輸卵管癌、骨纖維發育不全、骨骼的纖維發育異常、膽囊或膽管癌、胃癌、妊娠滋養細胞疾病、生殖細胞瘤、膠質母細胞瘤、頭頸癌、HPV相關的頭頸癌、血液系統惡性腫瘤、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪肉瘤/惡性脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、Merkel細胞癌、間皮咽癌、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓發育不良綜合症、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳頭狀甲狀腺癌、甲狀旁腺腫瘤、兒科癌症、周圍神經鞘腫瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體腫瘤、前列腺癌、轉移性去勢抵抗性前列腺癌(mCRPC)、後部葡萄膜黑素瘤、腎癌、腎細胞癌(RCC)、橫紋肌樣腫瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、童年期的小圓形藍細胞瘤(包括成神經細胞瘤和橫紋肌肉瘤)、軟組織肉瘤、多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤、黏液纖維肉瘤、鱗狀細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)、胃癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺癌、甲狀腺轉移癌症和子宮癌。

**E67.** 根據**E66**的方法，其中所述癌症選自由以下組成的組中：宮頸癌、HPV相關的宮頸癌、宮頸鱗狀細胞癌、CRC、MSI-H CRC、非MSI-H CRC、頭頸癌、HPV相關的頭頸癌、肺癌、黑素瘤、NSCLC、前列腺癌、腎癌、RCC、軟組織肉瘤、多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤、黏液纖維肉瘤、鱗狀細胞癌和SCCHN。

**E68.** 根據**E66**或**E67**的任一項的方法，其中所述癌症是宮頸癌。

**E69.** 根據**E66**或**E67**的任一項的方法，其中所述癌症是宮頸鱗狀細胞癌。

- E70.** 根據**E66**或**E67**的任一項的方法，其中所述癌症是CRC。
- E71.** 根據**E66-E67**或**E70**的任一項的方法，其中所述CRC是非MSI-H CRC。
- E72.** 根據**E66-E67**或**E70**的任一項的方法，其中所述CRC是MSI-H CRC。
- E73.** 根據**E66**或**E67**的任一項的方法，其中所述癌症是肺癌。
- E74.** 根據**E66-E67**或**E73**的任一項的方法，其中所述肺癌是NSCLC。
- E75.** 根據**E66**或**E67**的任一項的方法，其中所述癌症是黑素瘤。
- E76.** 根據**E66-E67**或**E75**的任一項的方法，其中所述黑素瘤是皮膚黑素瘤。
- E77.** 根據**E66**或**E67**的任一項的方法，其中所述癌症是前列腺癌。
- E78.** 根據**E66-E67**或**E77**的任一項的方法，其中前列腺癌是轉移性去勢抵抗性前列腺癌(mCRPC)。
- E79.** 根據**E66**或**E67**的任一項的方法，其中所述癌症是腎癌。
- E80.** 根據**E66-E67**或**E79**的任一項的方法，其中所述腎癌是RCC。
- E81.** 根據**E66**或**E67**的任一項的方法，其中所述癌症是軟組織肉瘤。
- E82.** 根據**E66-E67**或**E81**的任一項的方法，其中所述癌症是多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤或黏液纖維肉瘤。
- E83.** 根據**E66**或**E67**的任一項的方法，其中所述癌症是鱗狀細胞癌。
- E84.** 根據**E66**或**E67**的任一項的方法，其中所述癌症是頭頸癌。
- E85.** 根據**E66-E67**或**E84**的任一項的方法，其中所述鱗狀細胞癌或所述頭頸癌是SCCHN。
- E86.** 根據**E1-E85**的任一項的方法，進一步包括施用治療或預防有效量的一種或多種另外治療劑或化療劑。
- E87.** 根據**E1-E86**的任一項的方法，其中所述需要其的受試者是人。

**E88.** 一種藥物試劑盒，其包括：

- (a) 包含PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的容器；和
- (b) 指導材料，

其中指導材料指示所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子根據**E1-E87**的任一項的方法使用。

**E89.** 根據**E88**的藥物試劑盒用於治療癌症的用途。

**E90.** 根據**E88**的藥物試劑盒用於刺激免疫細胞的用途。

**E91.** 根據**E1**或**E3-E87**的任一項的方法PD-1 x CTLA-4雙特異性分子用於治療癌症的用途。

**E92.** 根據**E2-E87**的任一項的方法PD-1 x CTLA-4雙特異性分子用於刺激免疫細胞的用途。

## 實施例

**【0162】** 現在已經大致地描述了本發明，本發明通過參考以下實施例將更容易理解。以下實施例闡釋了在本發明的診斷或治療方法中組合物的各種方法。實施例旨在闡釋，但不是限制，本發明的範圍。

### 實施例1

**PD-1 x CTLA-4雙特異性分子DART-D提供了體外最佳的雙重PD-1和CTLA-4檢查點阻斷**

**【0163】** 使用DART平臺(Huang, L等(2020) “*Multispecific, Multivalent Antibody-Based Molecules Engineered on the DART(R) and TRIDENT(TM) Platforms.*” *Curr Protoc Immunol.* 2020;129(1):e95)，四價(2 x 2形式)的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子由兩個高親和力、配體阻斷的單克隆抗體(mAb)的結構域

和IgG4骨架創建，以限制Fc依賴性效應器功能，在**圖1**中顯示了一般結構，並且以上提供了每條多肽鏈的氨基酸序列(參見，例如，**表1**)。DART-D能夠與相同細胞上的PD-1和CTLA-4受體二者順式相互作用。如**圖2A**中顯示的，在模型細胞表面上表達的PD-1和CTLA-4的DART-D介導的共連接後，觀察到酶互補(使用PathHunter® PD-1<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>測定)，這表明單個分子的DART-D能夠同時在單個細胞上接合PD-1和CTLA-4。相反地，使用PD-1和CTLA-4 mAb的組合沒有觀察到酶互補。如**圖2B**中顯示的，由順式模式結合至兩種抗原的貢獻的親合力導致大大增強了CTLA-4活性對雙重表達細胞的DART-D介導的阻斷，其中IC<sub>50</sub>比其親本mAb改善了~100倍。在10倍過量的親本抗PD-1 mAb存在的情況下，DART-D表現出CTLA-4阻斷活性的近似10倍的降低(**圖2C**)，指示對雙重表達細胞增強的CTLA-4阻斷是由於DART-D經其PD-1臂的“錨定”所介導的親合力效果。這些研究表明，DART-D能夠獨立地接合PD-1和CTLA-4，以及在共表達它們的細胞表面共接合這兩個檢查點，導致不同程度的CTLA-4阻斷。

**【0164】** 為了確定克服T細胞中雙重PD-1/CTLA-4檢查點抑制的能力，DART-D與PD-1和CTLA-4 mAb組合在工程化報告試驗(**圖3A**)和原生SEB T-細胞啟動試驗(**圖3B**)中進行了並列(side-by-side)評估。在這兩個試驗系統中，DART-D支援雙重檢查點途徑逆轉至與mAb組合相同的水準，包括伊匹單抗和納武單抗的複製品。在近似四分之一的健康供體中，其中用單獨的阻斷mAbs阻斷PD-1或CTLA-4基本上不影響SEB驅動的T-細胞啟動，但DART-D，但不是兩種mAbs的組合，始終增強了IL-2釋放(**圖3C**)。

## 實施例2

### 評估非人靈長類動物中的PD-1 x CTLA-4雙特異性分子DART-D

第 66 頁，共 75 頁(發明說明書)

【0165】 為了確定藥代動力學(PK)/藥效(PD)和毒性情況，DART-D在食蟹猴(一種相關的交叉反應物種)中進行了評估。DART-D在10-100mg/kg的測試劑量範圍內表現出線性PK(半衰期~77天)(圖4A)。各個劑量組的所有動物在第一劑量間隔期間實現了對DART-D相當的暴露；然而，由於抗藥性抗體(ADA)的出現，在第四劑量期間一些動物的暴露下降。DART-D的重複靜脈內施用(每週4劑量)在10、40和100 mg/kg的劑量水準耐受良好。生活中的影響限於 $\geq 40$  mg/kg/劑量時增加的軟/水樣糞便發生率和輕微的血液學變化。對體重、食物消耗、獸醫體檢或肉眼屍檢觀察沒有DART-D相關影響。雄性的脾臟重量參數在劑量 $\geq 40$  mg/kg時增加並且雌性的脾臟重量參數在劑量 $\geq 10$  mg/kg時增加，這在顯微鏡下與普遍的淋巴樣增生相關。所有的影響在10周恢復期後是可逆的，並且不被認為是不利的。在測試的最高劑量100 mg/kg時，宣佈了未觀察到副作用水準。相反地，以前的研究報告，伊匹單抗+納武單抗的組合，在低至3mg/kg (伊匹單抗)和10mg/kg (納武單抗)的劑量下，導致腹瀉和消化道炎症，並且10 (伊匹單抗)和50mg/kg (納武單抗)的劑量超過了最高的非嚴重毒性劑量(Selby, M. J.等，2016. "Preclinical Development of Ipilimumab and Nivolumab Combination Immunotherapy: Mouse Tumor Models, In Vitro Functional Studies, and Cynomolgus Macaque Toxicology." PLoS One, 11: e0161779)。

【0166】 DART-D結合至表達PD-1的迴圈T細胞的水準與血清濃度相關(圖4B)。觀察到表達ICOS的脾臟CD4<sup>+</sup>T細胞的部分中的劑量依賴性增加(圖4C)。此外，在動物中觀察到具有幼稚表型(圖4D)的迴圈T-細胞的相對比例轉變為記憶樣表型(圖4E)，而組織駐留或迴圈T<sub>reg</sub>群體沒有變化。這些PD變化與以前報導的體內CTLA-4阻斷的效果一致(Ng Tang, D.等，2013. "Increased frequency of ICOS+

*CD4 T cells as a pharmacodynamic biomarker for anti-CTLA-4 therapy.*" *Cancer Immunol Res*, 1: 229-34; Hokey, D. A.等，2008. "*CLTA-4 blockade in vivo promotes the generation of short-lived effector CD8 T cells and a more persistent central memory CD4 T cell response.*" *J Med Primatol*, 37 Suppl 2: 62-8)。DART-D治療還與增強的T細胞啟動(圖4F)和增殖(圖4G)相關，這指示PD-1 x CTLA-4雙特異性分子對CTLA-4阻斷的影響。總之，PD變化與雙重PD-1和CTLA-4阻斷一致，並且在食蟹猴中沒有觀察到過量的毒性。

### 實施例3

#### I階段劑量研究

【0167】 為了確定患者對PD-1 x CTLA-4雙特異性分子DART-D的耐受性，進行了I階段臨床研究。研究包括劑量遞增階段和佇列擴展階段。研究由每個臨床地點的機構審查委員會批准，並且所有患者簽署了書面知情同意書。該臨床研究由IntegReview IRB批准，並在www.clinicaltrials.gov(識別字：NCT03761017)上註冊。

【0168】 對於初始劑量遞增和劑量擴展佇列，DART-D在24周誘導期期間每三週一次(Q3W)施用。為了研究的目的，使用12周(84-天±3天)週期。在24周或2週期的療法後，不具有需要中止的毒性或確認的進展性疾病(PD)的臨床上穩定的患者則進入維持期。在維持期期間，DART-D每6周(Q6W)施用。患者接受至多14次另外的DART-D輸注(七(7)次另外的12周Q6W治療週期)，這取決於對研究治療的耐受性和應答，總共至多9個84天週期(即，總共22次輸注)。DART-D通過超過30分鐘(至多45分鐘)IV輸注施用。治療方案在圖5中呈現。

【0169】 在篩選時指定靶和非靶病灶，並且然後在誘導期期間在治療開始後的12和18周進行評估。在維持期期間，每12周(±7天)進行腫瘤評估。在最後劑量的研究藥物後，所有患者都要進行生存和腫瘤評估。使用CT和/或MRI掃描獲得腫瘤評估(皮膚病灶可以使用卡尺和/或帶有刻度的照片來測量)。根據傳統的實體瘤反應評估標準(RECIST)版本1.1(Eisenhauer, E.A.等，(2009)“*New Response Evaluation Criteria In Solid Tumours: Revised RECIST Guideline (Version 1.1)*,” Eur. J. Cancer. 45(2):228-247)評估抗腫瘤活性。

【0170】 在劑量遞增階段中，將從0.3 mg/kg至多10 mg/kg的依次遞增劑量遵循常規的3+3+3設計Q3W(誘導期)施用：評估每個3至9名患者的連續佇列(表2)。在24周誘導期之後，DART-D在維持期期間每6周施用(圖5)。在各種劑量水準，評估為對劑量遞增目的不可評估的患者將被替換。還將在多個關注的劑量水準加入另外的患者，以獲得另外的臨床經驗。在劑量遞增階段中，加入具有任何組織學的實體瘤的患者。

佇列	DART-D劑量(Q3W)
佇列 1	0.03 mg/kg
佇列 2	0.1 mg/kg
佇列 3	0.3 mg/kg
佇列 4	1.0 mg/kg
佇列 5	3.0 mg/kg
佇列 6	6.0 mg/kg
佇列 7	10.0 mg/kg

【0171】 可獨立或同時探索約3 mg/kg至約10mg/kg之間的中間劑量水準和可替選的方案。具體地，特別地考慮探索約6 mg/kg和約10 mg/kg之間的劑量。

【0172】 在佇列擴展階段中，具有非小細胞肺癌(NSCLC)、頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)、腎細胞癌(RCC)、宮頸癌(特別地宮頸鱗狀細胞癌)、軟組織肉瘤(特別地，多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤和黏液纖維肉瘤)和結腸直腸癌(CRC) (特別地非MSI-H CRC)的患者以基於來自研究的劑量遞增階段的安全性、PK和抗腫瘤活性選擇的劑量接收DART-D。

#### 初始發現的總結

【0173】 DART-D表現出線性動力學，半衰期等於12.4天。類比的多劑量PK曲線指示，3 mg/kg或以上的劑量保持與伊匹單抗和納武單抗相當的DART-D的目標血清濃度(參見圖6A中的虛線)。

【0174】 結合至迴圈T細胞的DART-D(圖6B)佔據PD-1的持續時間與劑量和血清濃度成比例(圖6C)。每3周(Q3W)劑量 $\geq 1$  mg/kg時實現完全的PD-1阻斷。DART-D施用與增強的外周CD8<sup>+</sup> T細胞的增殖相關，但T<sub>reg</sub>群體沒有相關的變化。觀察到對迴圈CD4<sup>+</sup> T細胞ICOS的劑量依賴性上調(圖6D)。ICOS上調，一種CTLA-4阻斷的代替量度，在劑量 $\geq 3$  mg/kg被DART-D誘導。研究中ICOS生物標誌物與客觀臨床反應之間的關聯(圖6E)提示，CTLA-4阻斷，而不是CTLA-4<sup>+</sup>細胞耗竭，驅動了組合療法的臨床效益。

【0175】 在正在進行的劑量遞增階段，DART-D以至多10 mg/kg的最高預定劑量水準的劑量被普遍良好耐受。所有劑量水準的安全性在3+3+3劑量遞增研究設計中進行了評估。在劑量 $\geq 3$  mg/kg，DART-D證實了超過了對抗PD-1單療法的預期的抗腫瘤活性的證據。另外的患者被分配以選擇遞增佇列，從而產生

關注的劑量水準的進一步臨床資料。在治療的33名患者之中，26/33 (78.8%)名患者發生了治療相關的不良事件(TRAЕ)，最常見的是疲勞(24%)、噁心、關節痛、瘙癢和皮疹(每種18%)。≥3級TRAЕ的比率是24.2%。與治療相關的嚴重不良事件包括腸炎、小腸結腸炎、肺炎和心肌炎(各自n = 1)，發生在3至10 mg/kg之間的劑量水準；所有患者在合適的治療後恢復，沒有留下後遺症。觀察到輸注相關反應(IRR)，其嚴重程度均為輕度至中度。

**【0176】** 在25名有可評估的應答的患者之中，在4名具有照慣例對檢查點抑制無應答的腫瘤類型的患者中觀察到客觀應答。應答者包括具有微衛星穩定結腸直腸癌、轉移性AB型胸腺瘤(均確認部分應答(PR))、抗PD-L1-難治性漿液性輸卵管癌(未確認的PR，>50%減少的CA-125)和轉移性去勢抵抗性前列腺癌(mCRPC)(確認完全緩解(CR)，其中解決了升高的治療前前列腺特異性抗原)的患者。9名患者具有作為最佳應答的穩定疾病。所有應答的患者(n=4)都在劑量≥3 mg/kg治療的13名有可評估的應答的患者之中(圖7)，並且證明對迴圈CD4<sup>+</sup> T細胞ICOS上調(圖6E)。這些資料支援在約3.0 mg/kg至約10.0 mg/kg之間，特別地在約6.0 mg/kg至10 mg/kg之間的另外劑量水準。令人鼓舞的臨床資料表明，用DART-D進行安全和有效的雙重檢查點阻斷可為晚期癌症患者提供更好的臨床益處。這些初步觀察指示，所測試的根據目的設計的多特異性生物分子展示出臨床活性，方便的施用，並且表明比單個治療性mAb的組合更少的毒性。

**【0177】** 在劑量遞增階段期間，確定DART-D的最大施用的劑量(MAD)是10 mg/kg。最大耐受劑量(MTD)沒有被超過或定義。基於全部的臨床、PK和藥效學資料，選擇推薦的6 mg/kg的2階段劑量用於佇列擴展階段的評估。此外，基於DART-D安全概況，並且為了確保更一致的研究，改變了整個治療過程施用

的藥物暴露，使得DART-D在整個治療期間(108周，或直到疾病進展或導致必須中斷的毒性) Q3W施用。這項研究正在進行中，並且資料仍在不斷成熟中。

#### 實施例4

#### 材料和方法

**【0178】** 以下和附圖描述中提供了材料和方法。

**【0179】** 配體阻斷：Jurkat/PD-1、Jurkat/CTLA-4和Jurkat/PD-1+CTLA-4是通過穩定轉染親本細胞產生的。在未標記的測試分子存在的情況下，細胞與1 ug/mL生物素化的重組體B7-1或PD-L1 (BPS Bioscience, San Diego, USA)進行孵育，並且用鏈黴抗生物素/R-PE檢測。使用FACSCanto II細胞計數器(BD Biosciences, San Jose, USA)以平板形式進行流式細胞術；收集至少20,000個事件用於測試孔。

**【0180】** 二聚化試驗：PathHunter®二聚化試驗(DiscoveRx, Fremont, USA)利用了酶片段互補技術，其中兩個分裂的β gal片段，其獨立地不具有酶活性，可以重新形成功能性的β gal，以產生化學發光。U2OS細胞被工程化以穩定共表達片段標記的CTLA-4和PD-1，並且在試驗品存在的情況下進行二聚化試驗。

**【0181】** 工程化報告測試：PD-1、CTLA-4和PD-1+CTLA-4生物測定系統從Promega(Madison, USA)獲得，並且按照製造商的說明使用。在DART-D或mAb存在的情況下，將表達抗CD3和檢查點配體(PD-L1、B7-1或兩者)的基於CHO的刺激物系和基於Jurkat的報告細胞系一起培養。使用Bio Glo底物檢測在NF-AT或IL-2啟動子控制下的螢光素酶的誘導。

**【0182】** 原生SEB測試：將冷凍保存的健康供體PBMC解凍，並且將 $10^5$ 個細胞/孔接種在200 μL的完全RPMI中。以固定濃度(10 ug/mL)添加mAb和雙特

異性抑制劑，並且按指示滴定金黃色葡萄球菌腸毒素B(SEB，Toxin Technology, Inc.，Sarasota，USA)。在收集上清液和評估分泌的IL-2之前，將細胞孵育96小時。

**【0183】** Treg的抗體依賴性耗竭s：將新鮮分離的PBMC以 $10^6$ 個細胞/mL接種在完全RPMI中，並且在指定的試驗品(例如，以 $1\ \mu\text{g/mL}$ 的mAb或DART-D)存在的情況下用CD3珠(Invitrogen，Carlsbad，USA)刺激。48小時後收集細胞，並且用CD4和FoxP3 mAb進行染色。

**【0184】** 食蟹猴毒性研究：非臨床毒理學研究是按照美國農業部動物福利法(9 CFR第1、2和3部分)和實驗動物資源研究所的實驗動物護理和使用指南進行的。在食蟹猴(*Macaca fascicularis*)中進行了4周的重複劑量研究，以評估DART-D的毒性。在給藥完成後，一部分動物(2只/性別/組)經歷了10周的恢復期，以評估效果的持續性或延遲發生。40只中國來源的食蟹猴被隨機分配到4組(5只/性別/組)，以實現相似的組平均體重。動物用媒介物(5%右旋糖注射液)或DART-D經靜脈內(IV)輸注30分鐘，每週一次，總計4個劑量(第1、8、15和22天)給藥。DART-D劑量水準是10、40或100 mg/kg/劑量。定期進行動物的評估，包括心電圖、生命體徵評估、血液學、尿液分析PK、ADA和免疫分型。對所有動物進行全面的屍檢，器官稱重和收集、保存和處理組織以進行組織病理學評估。從每只動物收集脾臟樣品進行脾細胞免疫分型。

**【0185】** DART-D PK研究：通過雙特異性酶聯免疫吸附測試在指定的時間點測量完整的DART-D血清濃度。使用實際次數(times)和濃度、實際輸注次數和歸一劑量，採用開放式單室或雙室IV輸注模型來擬合PK資料。單個第一劑量資料被建模，並且對預測濃度平方進行倒數加權(-2)。對於受體佔有率研究，使

用了以下 $E_{max}$ 模型： $E = (E_{max} * C) / (EC_{50} + C)$ ；其中 $E = \% RO$ ， $E_{max} = \text{最大}\%RO$ ， $EC_{50} = \text{產生一半最大效果的濃度}$ 和 $C = \text{DART-D的濃度}$ 。對於PK類比，模型參數的最佳估計值的平均值被用於3 mg/kg至10 mg/kg和Q3W輸注的潛在的臨床劑量範圍。

**【0186】** 受體佔有率(RO)：將一百微升( $\mu\text{L}$ )體積的全血樣品(每個時間點/每名患者)與飽和濃度的DART-D進行孵育，然後通過“DART-D-加入標準的(spiked)”和對照樣品的生物素化的抗藥物mAb/Strep-PE進行DART-D的裂解和檢測。減去背景螢光(僅步驟PE)後，RO值被計算為最大結合能力的分數。 $RO = (\text{未處理的MFI (PE)} - \text{背景MFI (PE)}) / (\text{處理的MFI (PE)} - \text{背景MFI (PE)})$ 。

**【0187】** 表3展示了本文所述的研究中使用的流式細胞術試劑的列表。

表3：流式細胞術試劑		
抗原/螢光團	克隆	供應商
FoxP3/FITC	PCH101	Invitrogen
CD3/V500	SP34-2	BD Biosciences
CD4/APC-H7	SK3	BD Biosciences
CD8/FITC	RPA-T8	BD Biosciences
CD45/PerCP-Cy5.5	HI30	BD Biosciences
PD-1/APC	J105	eBiosciences
CTLA-4/Dazzle-594	BNI3	Biolegend
表3：流式細胞術試劑		
ICOS/PE-Cy7	C398.4A	Biolegend
Ki67/AlexaFluor488	B56	eBiosciences

CD25/BB515	2A3	BD Biosciences
cCD45/APC	30-F11	Invitrogen
CD28/PE	CD28.2	BD Biosciences
CD95/V450	DX2	BD Biosciences
鏈黴抗生物素/R-PE	--	Life Science

【0188】 本說明書中提及的所有出版物和專利都通過引用併入本文，就好像每個單獨的出版物或專利申請被具體地和單獨地指示整體地通過引用併入一樣。儘管已經結合本發明的具體實施方式對本發明進行了描述，但是應當理解，本發明能夠進行進一步的修改，並且本申請旨在覆蓋本發明的任何變型、用途或修改，只要其整體上遵循本發明的原理並且包括落入本發明所屬領域的已知或慣常實踐之內並且可以應用於上文闡述的基本特徵的與本公開內容的這種偏離。

#### 【符號說明】

【0189】 無

## 【序列表】

<110> 美商宏觀基因股份有限公司 MacroGenics, Inc.

<120> 用於使用 PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子的方法

<130> MAC-0115-PC

<140>

<141>

<150> 63/219,066

<151> 2021-07-07

<150> 63/177,036

<151> 2021-04-20

<150> 63/057,054

<151> 2020-07-27

<160> 42

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 1

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1                    5                    10                    15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20                    25                    30

第 1 頁，共 31 頁(序列表)

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
 85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 2

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn  
 1 5 10 15

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 3

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser  
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 4

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

第 3 頁，共 31 頁(序列表)

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 6

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述:合成肽

&lt;400&gt; 7

Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys  
 1                    5                    10                    15

Asp

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述:合成肽

&lt;400&gt; 8

Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr  
 1                    5                    10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述:合成多肽

&lt;400&gt; 9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                    5                    10                    15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
                   20                    25                    30

第 5 頁，共 31 頁(序列表)

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala  
 1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 11

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 12

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr  
1 5

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

第 7 頁，共 31 頁(序列表)

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 14

Ser Tyr Thr Met His

1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 15

Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1                    5                    10                    15

Gly

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 16

Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr  
1                    5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 17

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
1                    5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 18

Gly Gly Cys Gly Gly Gly

1 5

<210> 19

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 19

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

20 25

<210> 20

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 20

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
20 25

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 21

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
20 25

<210> 22

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 22

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val  
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
20 25

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 23

Ala Ser Thr Lys Gly

1 5

<210> 24

<211> 217

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (217)..(217)

<223> K 或不存在

<400> 24

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

第 12 頁，共 31 頁(序列表)

65					70						75					80
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				85					90					95		
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
			100					105						110		
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
		115					120					125				
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
		130					135					140				
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
145					150					155					160	
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
				165					170					175		
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
			180					185					190			
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	
		195					200					205				
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Xaa								
		210				215										

&lt;210&gt; 25

<211> 216  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (216)..(216)  
 <223> K 或不存在

<400> 25

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 1                    5                    10                    15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
                   20                    25                    30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
                   35                    40                    45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
                   50                    55                    60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln  
 65                    70                    75                    80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
                   85                    90                    95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro  
                   100                    105                    110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

第 14 頁，共 31 頁(序列表)

115

120

125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 130 135 140

Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
 210 215

<210> 26

<211> 217

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (217)..(217)

<223> K 或不存在

<400> 26

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1                    5                    10                    15  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
                          20                    25                    30  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr  
                          35                    40                    45  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
                          50                    55                    60  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 65                    70                    75                    80  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
                          85                    90                    95  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln  
                          100                    105                    110  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
                          115                    120                    125  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
                          130                    135                    140  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 145                    150                    155                    160  
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165

170

175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile  
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln  
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
 210 215

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (217).. (217)

&lt;223&gt; K 或不存在

&lt;400&gt; 27

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

第 17 頁，共 31 頁(序列表)

50

55

60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa

第 18 頁，共 31 頁(序列表)

210

215

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述:合成多肽

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (217)..(217)

&lt;223&gt; K 或不存在

&lt;400&gt; 28

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 1                    5                    10                    15

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val  
                   20                    25                    30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
                   35                    40                    45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
                   50                    55                    60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 65                    70                    75                    80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
                   85                    90                    95

第 19 頁，共 31 頁(序列表)

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
 210 215

<210> 29

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (217)..(217)

<223> K 或不存在

<400> 29

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
1                   5                   10                   15

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val  
                  20                   25                   30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
                  35                   40                   45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
                  50                   55                   60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65                   70                   75                   80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
                  85                   90                   95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
                  100                   105                   110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
                  115                   120                   125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa  
 210 215

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 30

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 31

Leu Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 32

Leu Glu Pro Lys Ser Ser

1 5

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 33

Ala Pro Ser Ser Ser

1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 34

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu  
1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 36

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10 15

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 37

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 38

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro  
1                    5                    10

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 39

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro  
1                    5                    10

<210> 40

<211> 499

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1                    5                    10                    15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
                  20                    25                    30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
 85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 145 150 155 160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn  
 165 170 175

Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp  
 180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 195 200 205

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe  
 210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys  
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu  
 245 250 255

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu  
 260 265 270

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu  
 275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 290 295 300

Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 305 310 315 320

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 325 330 335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr  
 340 345 350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 355 360 365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser  
 370 375 380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 385 390 395 400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 405 410 415

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr  
 450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 485 490 495

Ser Leu Gly

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 269

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述:合成多肽

&lt;400&gt; 41

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                    5                    10                    15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
                   20                    25                    30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
                   35                    40                    45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
                   50                    55                    60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65                    70                    75                    80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
                   85                    90                    95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser  
                   100                    105                    110

Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys  
                   115                    120                    125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser  
 130 135 140

Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly  
 145 150 155 160

Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu  
 165 170 175

Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr  
 180 185 190

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala  
 195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr  
 210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly  
 225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys  
 245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
 260 265

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 42

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1                    5                                    10

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種治療癌症的方法，其包括向需要其的受試者施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括PD-1結合結構域和CTLA-4結合結構域，和其中所述方法包括以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每3週一次向受試者施用所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。

【請求項2】 一種刺激免疫細胞的方法，其包括向需要其的受試者施用PD-1 x CTLA-4雙特異性分子，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子包括PD-1結合結構域和CTLA-4結合結構域，和其中所述方法包括以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每3週一次向受試者施用所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子。

【請求項3】 如請求項1或2所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在誘導期期間以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每3週一次向所述受試者施用。

【請求項4】 如請求項2或3所述的方法，其中所述免疫細胞是T細胞。

【請求項5】 如請求項1-4中任一項所述的方法，其中：

(I) 所述PD-1結合結構域包括包含**SEQ ID NO:1**的CDR<sub>L1</sub>、CDR<sub>L2</sub>和CDR<sub>L3</sub>的輕鏈可變結構域(VL<sub>PD-1</sub>)，和包含**SEQ ID NO:5**的PD-1-特異性CDR<sub>H1</sub>、CDR<sub>H2</sub>和CDR<sub>H3</sub>的重鏈可變結構域(VH<sub>PD-1</sub>)；和

(II) 所述CTLA-4結合結構域包括包含**SEQ ID NO:9**的CDR<sub>L1</sub>、CDR<sub>L2</sub>和CDR<sub>L3</sub>的輕鏈可變結構域(VL<sub>CTLA-4</sub>)，和包含**SEQ ID NO:13**的CTLA-4-特異性CDR<sub>H1</sub>、CDR<sub>H2</sub>和CDR<sub>H3</sub>的重鏈可變結構域(VH<sub>CTLA-4</sub>)。

【請求項6】 如請求項1-5中任一項所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子包括：

- (I) 兩個所述PD-1結合結構域；和
- (II) 兩個所述CTLA-4結合結構域。

【請求項7】 如請求項1-6中任一項所述的方法，其中：

- (a) 所述PD-1結合結構域包括SEQ ID NO:1的VL結構域和SEQ ID NO:5的VH結構域；和
- (b) 所述CTLA-4結合結構域包括SEQ ID NO:9的VL結構域和SEQ ID NO:13的VH結構域。

【請求項8】 如請求項1-7中任一項所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4 雙特異性分子包括鉸鏈結構域和IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同種型的Fc區。

【請求項9】 如請求項8所述的方法，其中所述Fc區和所述鉸鏈結構域是IgG4同種型的，和其中所述鉸鏈結構域包括穩定突變。

【請求項10】 如請求項8-9中任一項所述的方法，其中所述Fc區是變體Fc區，其包括：

- (a) 降低變體Fc區對FcγR親和力的一個或多個氨基酸修飾；和/或
- (b) 增強變體Fc區的血清半衰期的一個或多個氨基酸修飾。

【請求項11】 如請求項10所述的方法，其中：

- (a) 所述降低變體Fc區對FcγR親和力的一個或多個氨基酸修飾包括L234A或L235A、或L234A和L235A的置換；和/或

(b) 所述增強變體Fc結構域的血清半衰期的一個或多個氨基酸修飾包括M252Y；或M252Y和S254T；或M252Y和T256E；或M252Y、S254T和T256E；或K288D和H435K的置換，其中所述編號是Kabat中的EU索引的編號。

【請求項12】 如請求項1-11中任一項所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子是包括包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的一條多肽鏈和包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第二多肽鏈的雙抗體。

【請求項13】 如請求項1-12中任一項所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子是包括各自包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的兩條多肽鏈和各自包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的兩條多肽鏈的雙抗體。

【請求項14】 如請求項1-16中任一項所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約3 mg/kg和8 mg/kg之間的劑量施用。

【請求項15】 如請求項1-14中任一項所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子以約6 mg/kg的劑量施用。

【請求項16】 如請求項3-15中任一項所述的方法，進一步包括在維持期期間以約3 mg/kg至約10 mg/kg的劑量每6週一次向所述受試者施用所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子，其中所述維持期跟隨所述誘導期。

【請求項17】 如請求項3-13或16中任一項所述的方法，其中所述誘導期具有至多約24周的持續時間。

【請求項18】 如請求項3-13或16-17中任一項所述的方法，其中所述維持期具有至多約84周的持續時間。

【請求項19】 如請求項3-13或16-18中任一項所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約3 mg/kg和8 mg/kg之間的劑量施用。

【請求項20】 如請求項3-13或16-19中任一項所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述誘導期期間以約6 mg/kg的劑量施用。

【請求項21】 如請求項16-20中任一項所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約3 mg/kg和8 mg/kg之間的劑量施用。

【請求項22】 如請求項16-21中任一項所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子在所述維持期期間以約6 mg/kg的劑量施用。

【請求項23】 如請求項16-22中任一項所述的方法，其中所述維持期中施用的所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的所述劑量與所述誘導期中施用的所述劑量相同。

【請求項24】 如請求項1-23中任一項所述的方法，其中所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子通過靜脈內(IV)輸注施用。

【請求項25】 如請求項1-24中任一項所述的方法，其中所述癌症選自由以下組成的組中：腎上腺癌、AIDS相關的癌、肺泡狀軟組織肉瘤、星形細胞腫瘤、肛門癌、膽管癌、膀胱癌、骨癌、腦癌、腦和脊髓癌、乳腺癌、HER2+乳腺癌、三陰性乳腺癌(TNBC)、頸動脈體瘤、宮頸癌、HPV相關的宮頸癌、宮頸鱗狀細胞癌、軟骨肉瘤、脊索瘤、透明細胞癌、結腸癌、結直腸癌(CRC)、微衛星高度不穩定性結直腸癌(MSI-H CRC)、微衛星穩定結直腸癌(非微衛星高度不穩定性結直腸癌，非MSI-H CRC)、促結締組織增生性小圓細胞腫瘤、子宮內膜癌、室

管膜細胞瘤、尤因氏腫瘤、骨骼外黏液樣軟骨肉瘤、輸卵管癌、骨纖維發育不全、骨骼的纖維發育異常、膽囊或膽管癌、胃癌、妊娠滋養細胞疾病、生殖細胞瘤、膠質母細胞瘤、頭頸癌、HPV相關的頭頸癌、血液系統惡性腫瘤、肝細胞癌、胰島細胞腫瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、白血病、脂肪肉瘤/惡性脂肪瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、成神經管細胞瘤、黑素瘤、腦膜瘤、Merkel細胞癌、間皮咽癌、多發性內分泌瘤、多發性骨髓瘤、骨髓發育不良綜合症、成神經細胞瘤、神經內分泌腫瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳頭狀甲狀腺癌、甲狀旁腺腫瘤、兒科癌症、周圍神經鞘腫瘤、嗜鉻細胞瘤、垂體腫瘤、前列腺癌、轉移性去勢抵抗性前列腺癌(mCRPC)、後部葡萄膜黑素瘤、腎癌、腎細胞癌(RCC)、橫紋肌樣腫瘤、橫紋肌肉瘤、肉瘤、皮膚癌、童年期的小圓形藍細胞瘤(包括成神經細胞瘤和橫紋肌肉瘤)、軟組織肉瘤、多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤、黏液纖維肉瘤、鱗狀細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)、胃癌、滑膜肉瘤、睪丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲狀腺癌、甲狀腺轉移癌症和子宮癌。

**【請求項26】** 如請求項25所述的方法，其中所述癌症選自由以下組成的組中：宮頸癌、HPV相關的宮頸癌、宮頸鱗狀細胞癌、CRC、MSI-H CRC、非MSI-H CRC、頭頸癌、HPV相關的頭頸癌、肺癌、黑素瘤、NSCLC、前列腺癌、腎癌、RCC、軟組織肉瘤、多形性未分化肉瘤、去分化脂肪肉瘤、滑膜肉瘤、黏液纖維肉瘤、鱗狀細胞癌和SCCHN。

**【請求項27】** 如請求項1-26中任一項所述的方法，進一步包括施用治療或預防有效量的一種或多種另外治療劑或化療劑。

【請求項28】 如請求項1-27中任一項所述的方法，其中所述需要其的受試者是人。

【請求項29】 一種藥物試劑盒，其包括：

- (a) 包含PD-1 x CTLA-4雙特異性分子的容器；和
- (b) 指導材料，

其中指導材料指示所述PD-1 x CTLA-4雙特異性分子如請求項1-27中任一項所述的方法使用。

【請求項30】 如請求項29所述的藥物試劑盒用於治療癌症或用於刺激免疫細胞的用途。

(發明圖式)

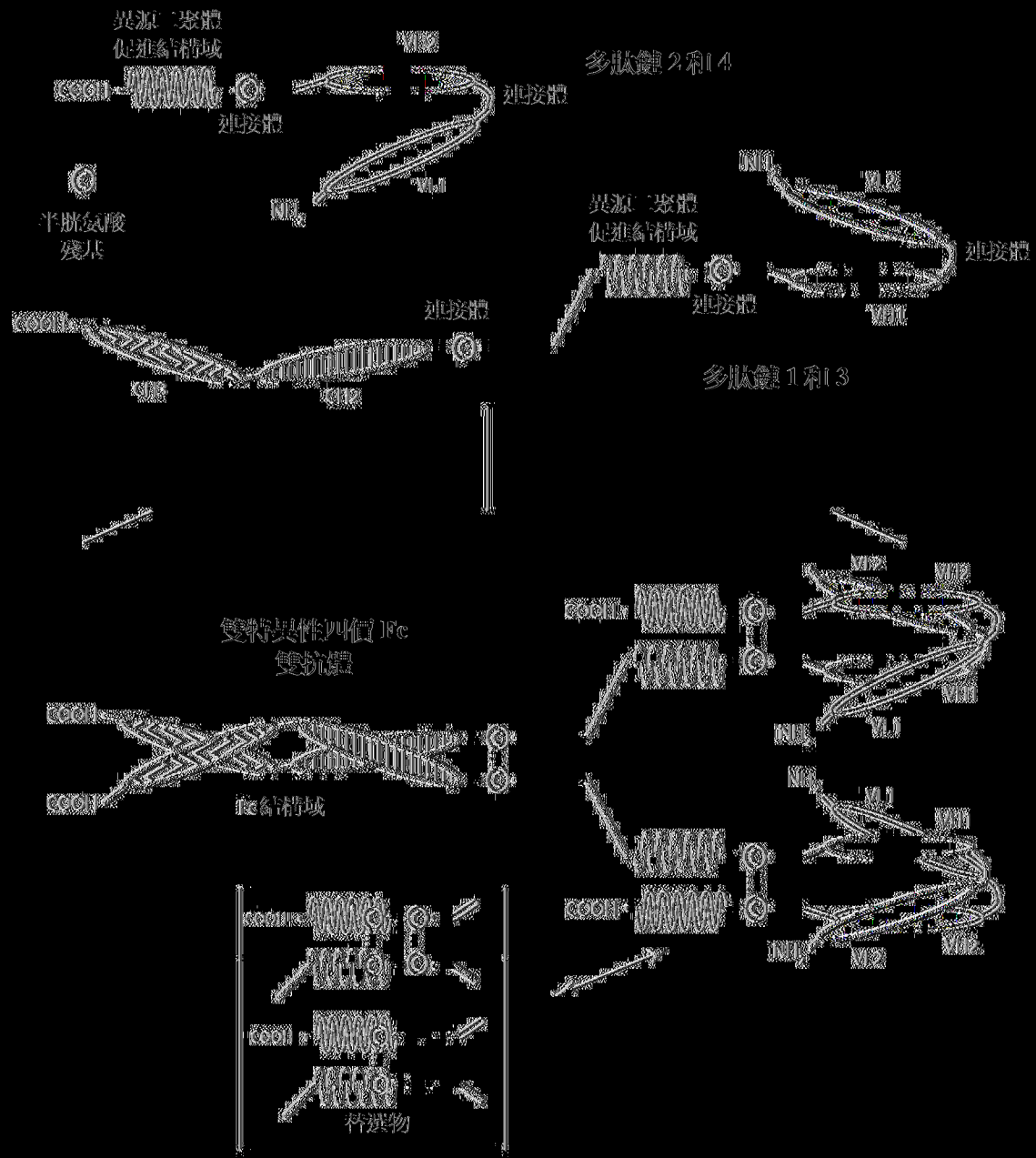


圖 1

PD-1/CtLA-4 二聚化

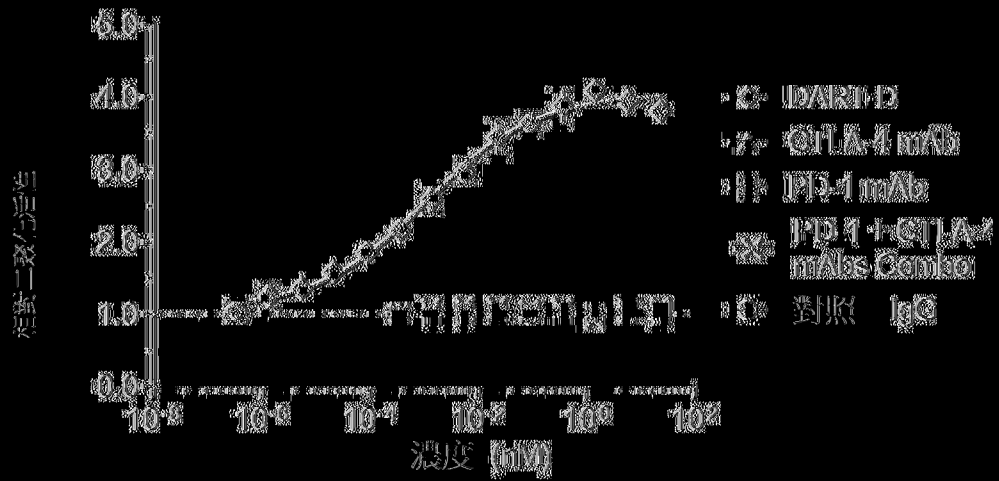


圖 2A

對 PD-1/CtLA-4 細胞的 CtLA-4 阻斷

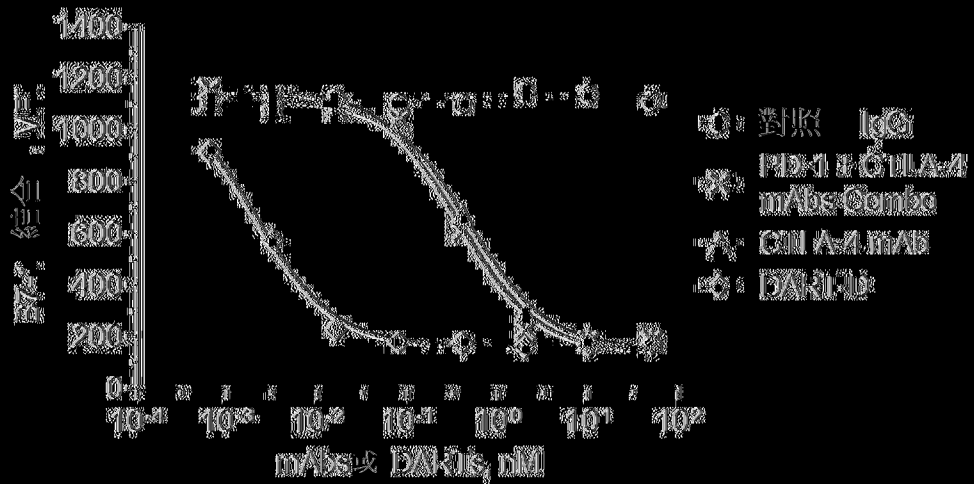


圖 2B

對 PD-1/CITLA-4 細胞的 CITLA-4 阻斷

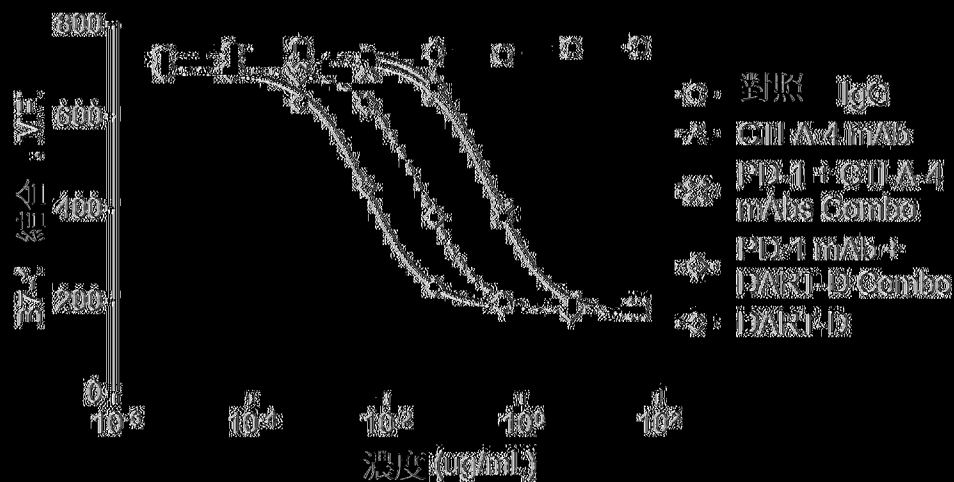


圖 2C

拯救 T 細胞存活傳導



圖 3A

增強 T 細胞反應

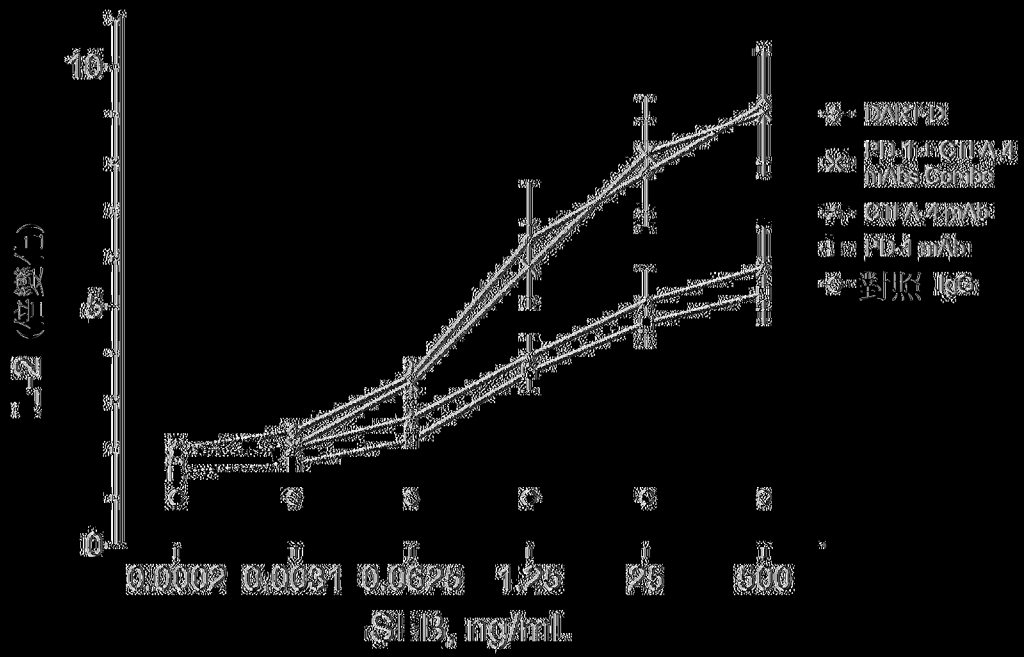


圖 3B

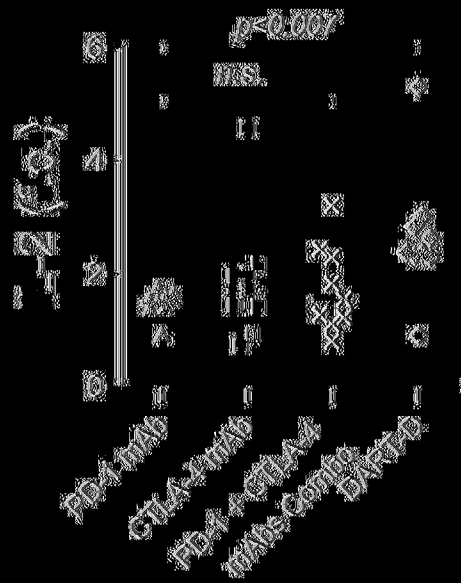


圖 3C

DART-D 血房濃度

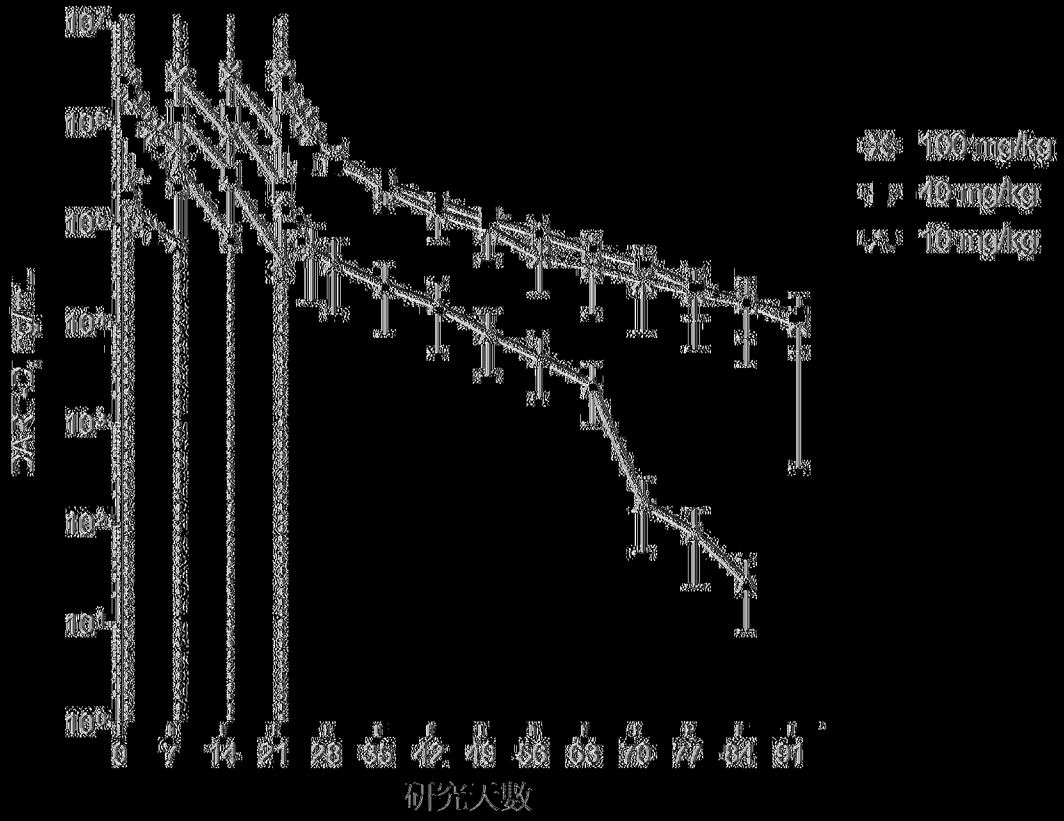


圖 4A

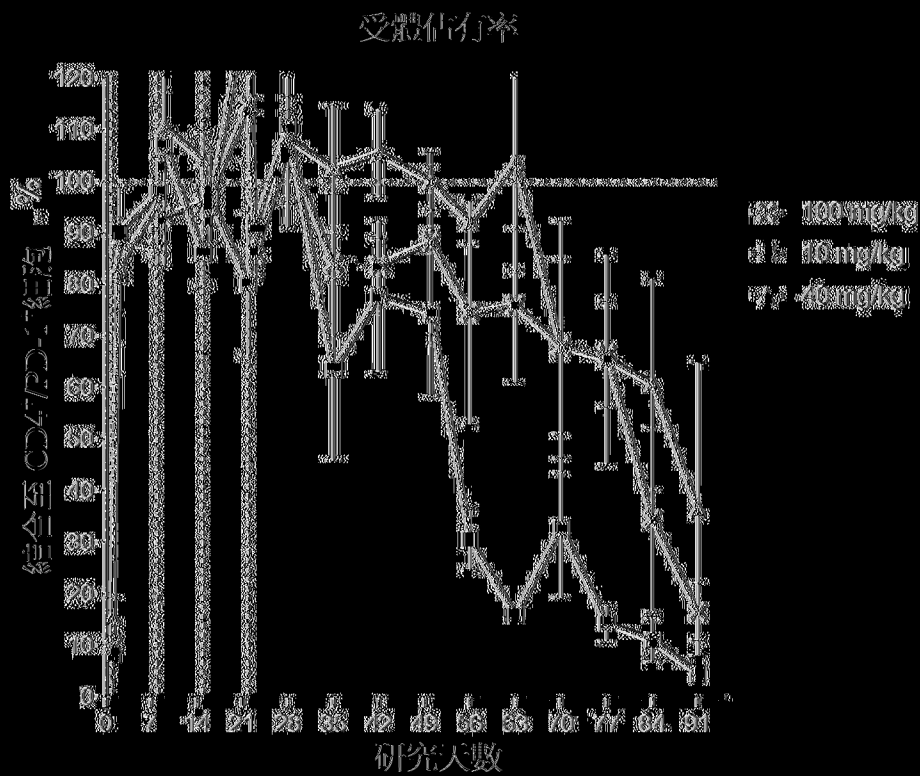


圖 4B

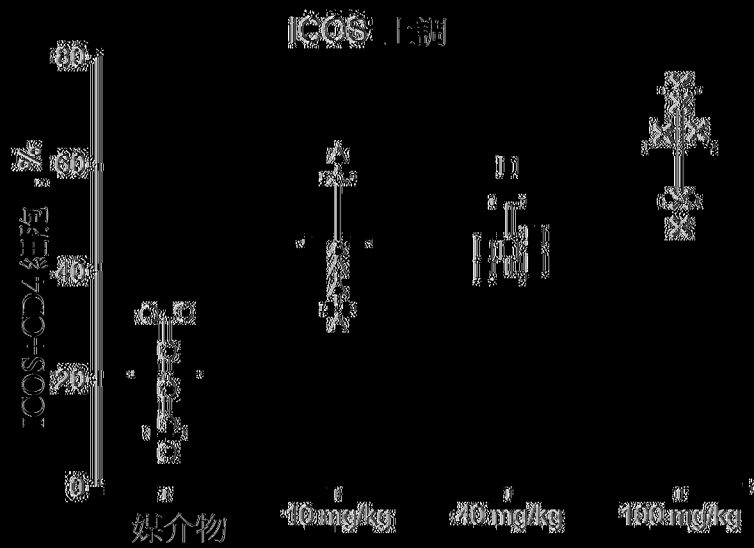


圖 4C

幼稚型

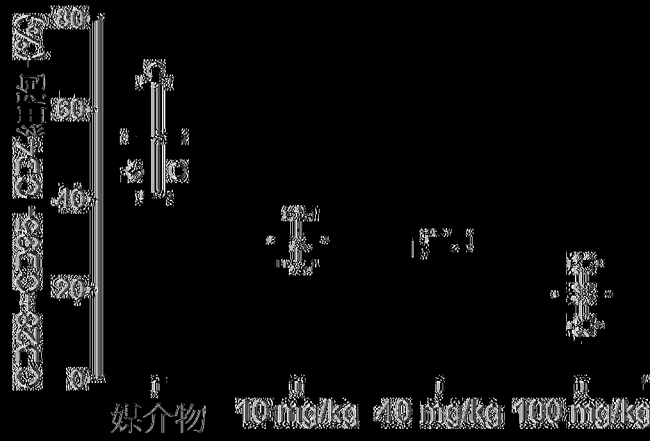


圖 4D

記憶型

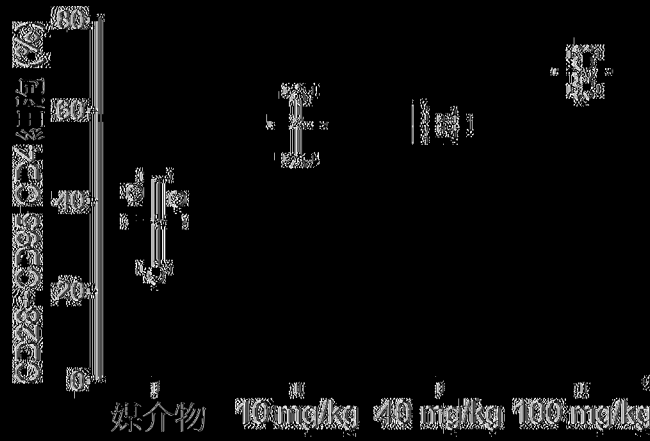


圖 4E

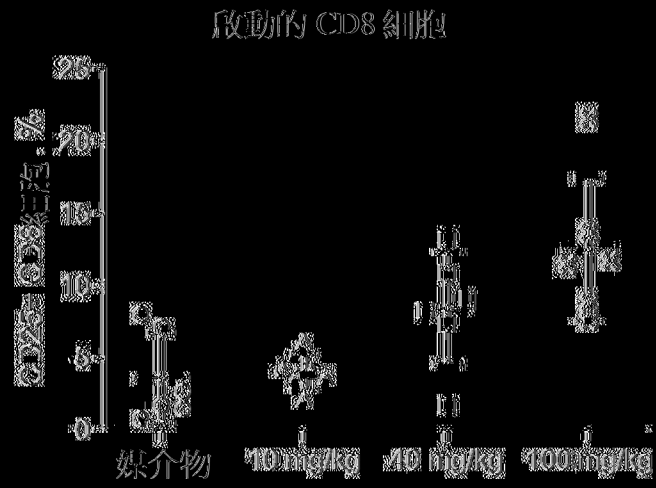


圖 4B

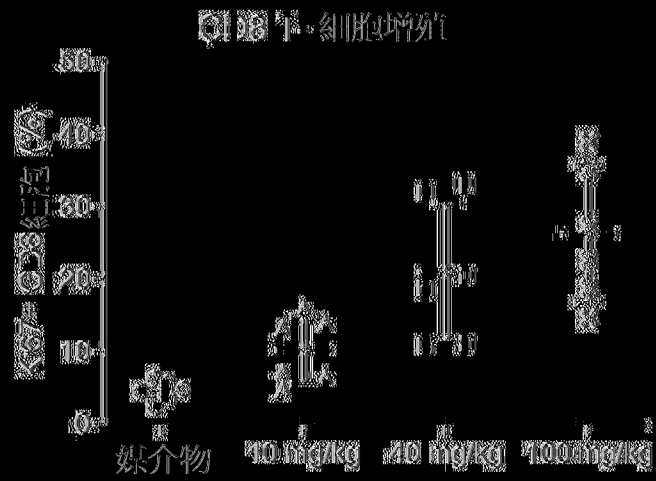


圖 4C

發明說明書

發明說明書

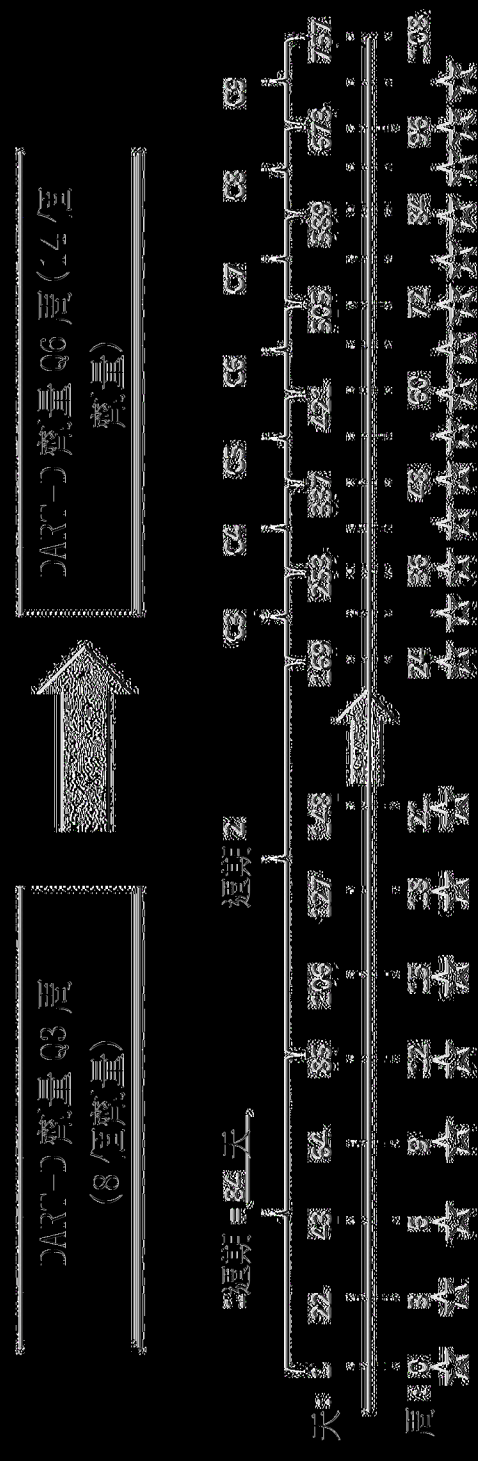
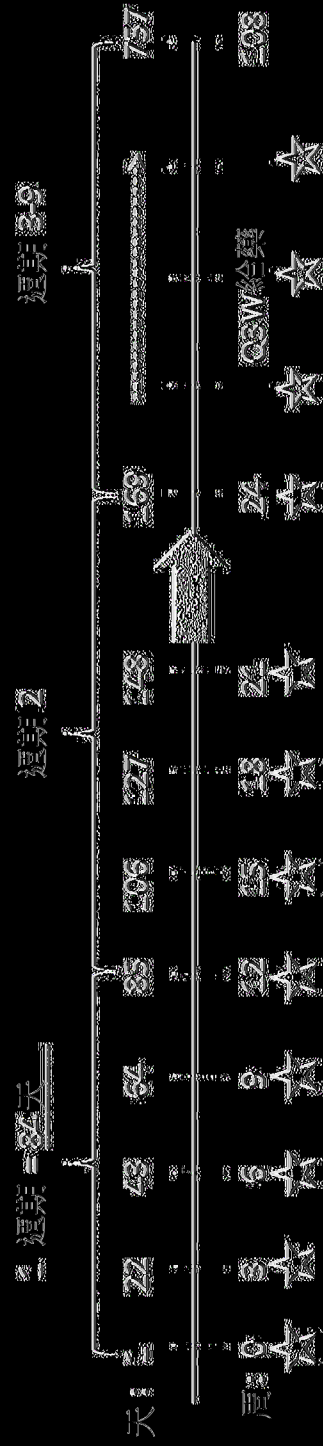


圖 5A

整恒治療劑 DAR-2 劑量 Q3 層 (36 恒劑量)



頁 53

藥物動力學

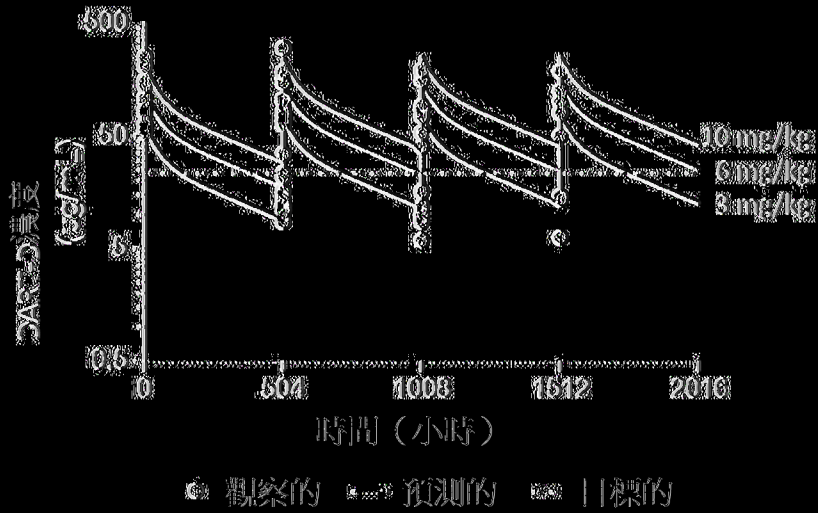


圖 6A

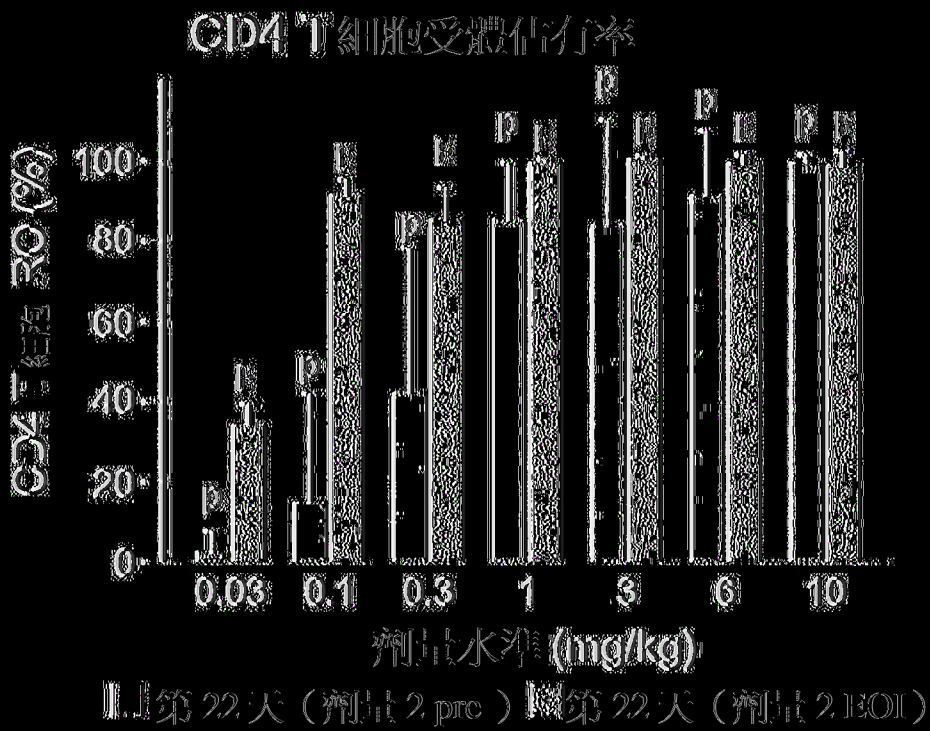


圖 6B

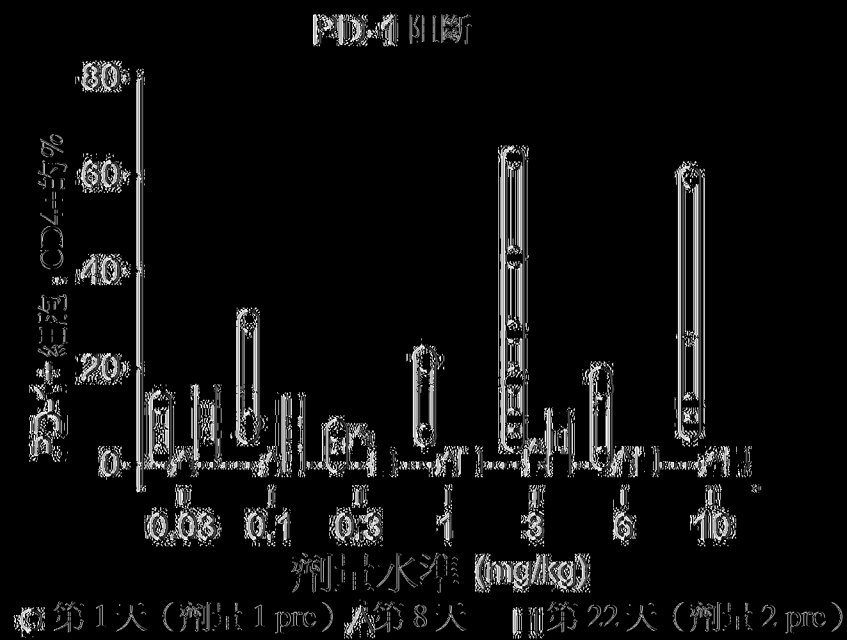


圖 6C

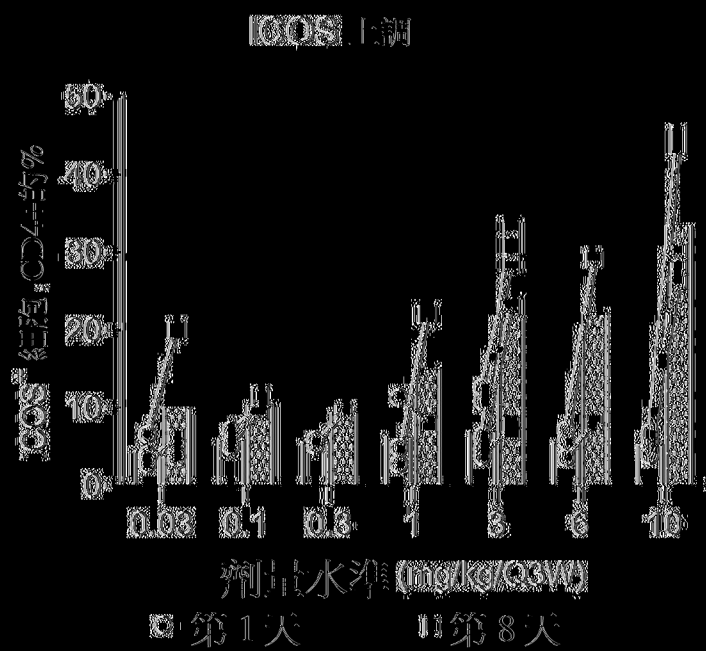


圖 6D

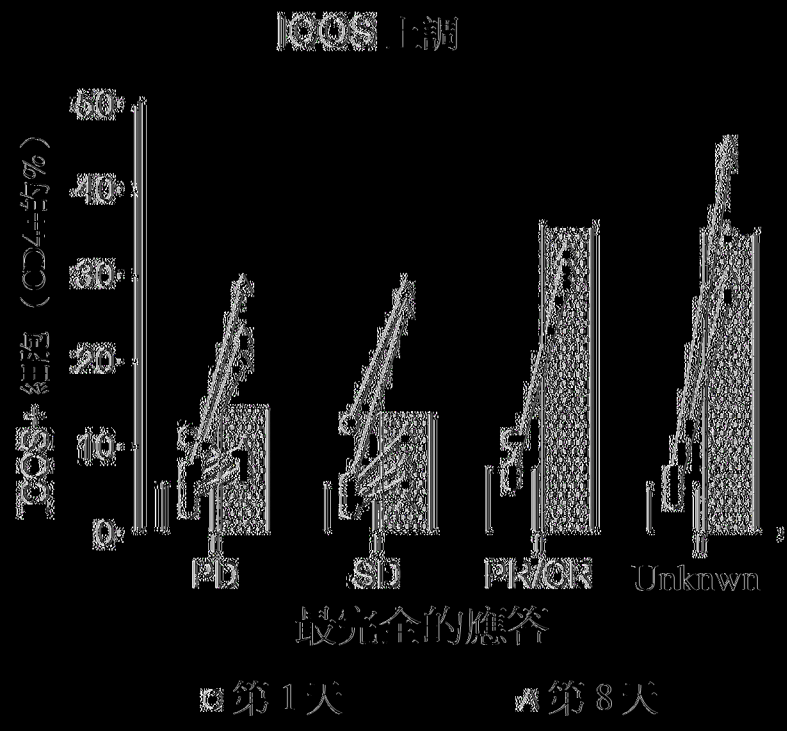


圖 6E

