



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119677534 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 21

(21) 申请号 202380034697.1

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

(22) 申请日 2023.03.16

专利代理师 高飞 黄革生

(30) 优先权数据

63/320,961 2022.03.17 US

63/350,503 2022.06.09 US

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/015347 2023.03.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/177772 EN 2023.09.21

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国

(72) 发明人 P·赫尔蒙特巴塞洛斯贡萨尔维斯

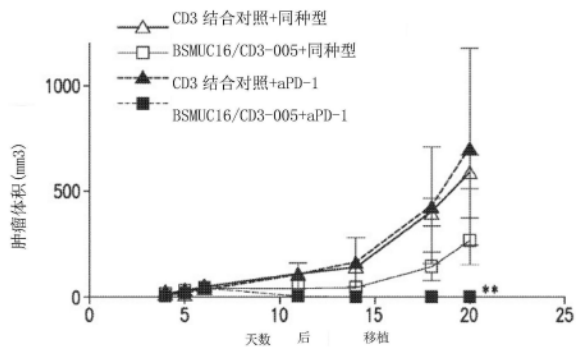
权利要求书3页 说明书34页  
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

使用双特异性抗MUC16×抗CD3抗体单独或与抗PD-1抗体组合来治疗复发性上皮样肉瘤的方法

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗癌症(例如,复发性上皮样肉瘤)、降低其严重性或抑制其生长的方法。本发明的方法包括向有需要的受试者单独施用或与治疗有效量的特异性结合至程序性死亡1(PD-1)受体的抗体或其抗原结合片段组合施用治疗有效量的特异性结合粘蛋白16(MUC16)和CD3的双特异性抗体。



1. 一种治疗有需要的受试者的表达MUC16的上皮样肉瘤的方法,所述方法包括向所述受试者施用双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性结合靶肿瘤细胞上的粘蛋白16 (MUC16)的第一抗原结合结构域,和特异性结合T细胞上的人CD3的第二抗原结合结构域。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述受试者患有转移性上皮样肉瘤。

3. 一种治疗有需要的受试者的表达MUC16的肉瘤的方法,所述方法包括向所述受试者施用双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性结合靶肿瘤细胞上的粘蛋白16 (MUC16)的第一抗原结合结构域,和特异性结合T细胞上的人CD3的第二抗原结合结构域。

4. 如权利要求3所述的方法,其中所述表达MUC16的肉瘤是上皮样肉瘤、肾和软组织的横纹肌样肿瘤、横纹肌肉瘤、尤因氏肉瘤或软组织肉瘤。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述表达MUC16的肉瘤是肾和软组织的上皮样肉瘤或横纹肌样肿瘤。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述表达MUC16的肉瘤是功能性整合酶相互作用物1的表达缺陷型。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已接受抗癌疗法治疗。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述受试者对先前疗法具有抗性或对先前疗法应答不足或在先前疗法后复发。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域包含:

(a) 三个重链互补决定区 (HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述三个重链互补决定区包含在具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR)内;和

(b) 三个轻链互补决定区 (LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述三个轻链互补决定区包含在具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR)内。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCDR3。

11. 如权利要求9或权利要求10所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LCDR3。

12. 如权利要求9至11中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的LCVR。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述第二抗原结合结构域包含:

(a) 三个重链互补决定区 (HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述三个重链互补决定区包含在具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR)内;和

(b) 三个轻链互补决定区 (LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述三个轻链互补决定区包含在具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR)内。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述第二抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HCDR3。

15. 如权利要求13或权利要求14所述的方法,其中所述第二抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ

ID NO:13的氨基酸序列的LCDR3。

16. 如权利要求13至15中任一项所述的方法,其中所述第二抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的LCVR。

17. 如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述双特异性抗体包含人IgG重链恒定区。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述人IgG重链恒定区是同种型IgG1。

19. 如权利要求17所述的方法,其中所述人IgG重链恒定区是同种型IgG4。

20. 如权利要求18或权利要求19所述的方法,其中所述双特异性抗体包含嵌合铰链,与相同同种型的野生型铰链相比,所述嵌合铰链减少Fc  $\gamma$  受体结合。

21. 如权利要求17至20中任一项所述的方法,其中所述第一重链或所述第二重链,但不是两者都,包含含有H435R(EU编号)修饰和Y436F(EU编号)修饰的CH3结构域。

22. 如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述双特异性抗体包含第一重链,所述第一重链具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

23. 如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述双特异性抗体包含第二重链,所述第二重链具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列。

24. 如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述双特异性抗体包含具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的第一重链、具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的第二重链和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的共同轻链。

25. 如权利要求1至24中任一项所述的方法,其中所述受试者具有的血清CA-125水平大于92U/ml。

26. 如权利要求1至25中任一项所述的方法,还包括施用第二治疗剂或治疗方案。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述第二治疗剂或治疗方案包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

28. 如权利要求27所述的方法,其中所述抗PD-1抗体或抗原结合片段包含:

(a) 三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述三个重链互补决定区包含在具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内;和

(b) 三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述三个轻链互补决定区包含在具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述抗PD-1抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HCDR3。

30. 如权利要求28或权利要求29所述的方法,其中所述抗PD-1抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的LCDR3。

31. 如权利要求28至30中任一项所述的方法,其中所述抗PD-1抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的LCVR。

32. 如权利要求31所述的方法,其中所述抗PD-1抗体或抗原结合片段是包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链的抗PD-1抗体。

33. 如权利要求1至32中任一项所述的方法,其中所述双特异性抗体以包括分次初始剂

量的给药方案施用。

34. 如权利要求1至33中任一项所述的方法,其中所述双特异性抗体以每周1mg至1000mg的剂量向所述受试者施用。

35. 如权利要求34的方法,其中所述双特异性抗体以每周250mg的剂量向所述受试者施用。

36. 如权利要求27至35中任一项所述的方法,其中所述抗PD-1抗体在所述双特异性抗体之前、与其同时或在其之后向所述受试者施用。

37. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已接受化学治疗药物、放射疗法、手术或免疫治疗药物治疗。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述化学治疗药物是他泽司他。

39. 如权利要求37所述的方法,其中所述免疫治疗药物是PD1抑制剂或CTLA4抑制剂。

40. 如权利要求37所述的方法,其中所述免疫治疗药物是帕博利珠单抗、纳武单抗或伊匹单抗。

41. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中在以1-250mg的剂量施用所述双特异性抗体至少一周之后,所述受试者的病情稳定、部分缓解或完全缓解。

42. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中在以1-250mg的剂量施用所述双特异性抗体至少一周后,所述受试者的乳腺组织的所述上皮样肉瘤的大小减小。

43. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中所述抗体通过静脉内或皮下施用于所述受试者。

44. 如权利要求1至43中任一项所述的方法,其中所述双特异性抗体以如下给药方案施用,所述给药方案包括:在所述给药方案的第1周施用1mg的初始剂量的所述双特异性抗体;在所述给药方案的第2周施用20mg的过渡剂量的所述双特异性抗体;以及在所述给药方案的第3周施用250mg的完全剂量的所述双特异性抗体。

45. 如权利要求44的方法,其中所述初始剂量被分成在连续日施用的两个相等的部分。

46. 如权利要求44或权利要求45的方法,其中所述过渡剂量被分成在连续日施用的两个相等的部分。

47. 如权利要求44至46中任一项所述的方法,其中所述完全剂量被分成在连续日施用的两个部分。

48. 如权利要求47的方法,其中所述完全剂量的所述两个部分包括50mg部分和250mg部分。

49. 如权利要求44至48中任一项所述的方法,其中所述给药方案还包括在所述给药方案的第4周期间施用250mg的维持剂量的所述双特异性抗体。

50. 如权利要求49的方法,其中所述维持剂量在所述给药方案的后续几周期间每周施用。

## 使用双特异性抗MUC16×抗CD3抗体单独或与抗PD-1抗体组合 来治疗复发性上皮样肉瘤的方法

[0001] 对序列列表的提及

[0002] 本申请以引用的方式并入ST.26XML格式的计算机可读序列列表,其名称为11138W001\_Sequence,创建于2023年3月16日,并且包含54,705字节。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于使用结合至粘蛋白16 (MUC16) 和CD3的双特异性抗体单独或与抗PD-1抗体组合来治疗癌症的方法。

### 背景技术

[0004] 粘蛋白16 (MUC16),也称为癌抗原125、癌症抗原125、碳水化合物抗原125或CA-125,是一种在上皮样肉瘤中高度表达的单跨膜结构域高度糖基化的整合膜糖蛋白(Hoshino,M.等人,2010,J Cancer Res Clin Oncol.,136(3):457-64)。MUC16由三个主要结构域组成:胞外N-末端结构域、散布有海胆精子的大串联重复结构域、肠激酶和集聚蛋白(SEA)结构域以及包含跨膜区和短胞质尾区的区段的羧基末端结构域。蛋白水解切割导致MUC16的胞外部分脱落到血流中。MUC16在癌症(包括上皮样肉瘤、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、肿块形成型肝内胆管癌、子宫颈腺癌和胃道腺癌)以及疾病和病症(包括炎性肠病、肝硬化、心力衰竭、腹膜感染和腹部手术)中过表达。(Haridas,D.等人,2014,FASEBJ.,28:4183-4199;Hoshino,M.等人,2010,Cancer Res Clin Oncol.,136(3):457-64)。已经显示,癌细胞上的表达可以保护肿瘤细胞免受免疫系统的伤害。(Felder,M.等人,2014,Molecular Cancer,13:129)已经研究了使用MUC16的抗体来治疗癌症的方法。奥戈伏单抗(oregovomab)和阿戈伏单抗(abgovomab)是抗MUC16抗体,但成功率有限。(Felder,同上, Das,S.和Batra,S.K.2015,Cancer Res.75:4660-4674.)

[0005] CD3是与T细胞受体复合物(TCR)相关的在T细胞上表达的同源二聚体或异源二聚体抗原,是T细胞活化所必需的。功能性CD3由四种不同的链中的两种的二聚体缔合形成: $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\delta$ 和 $\gamma$ 。CD3二聚体排列方式包括 $\gamma/\epsilon$ 、 $\delta/\epsilon$ 和 $\zeta/\zeta$ 。已经显示出针对CD3的抗体使CD3聚集在T细胞上,从而以类似于负载有肽的MHC分子接合TCR的方式引起T细胞活化。因此,已经提出抗CD3抗体用于涉及T细胞活化的治疗目的。此外,已经提出能够结合CD3和靶抗原的双特异性抗体用于涉及使T细胞免疫应答靶向表达靶抗原的组织和细胞的治疗用途。

[0006] 肿瘤微环境中的程序性死亡-1 (PD-1) 受体信号传递在允许肿瘤细胞逃避宿主免疫系统的免疫监视方面起着关键作用。PD-1信号传导通路的阻断已在患有多种肿瘤类型的患者中显示出临床活性,阻断PD-1的抗体疗法(例如,纳武单抗(nivolumab)和帕博利珠单抗(pembrolizumab))已被批准用于治疗转移性黑色素瘤和转移性鳞状非小细胞肺癌。最近的数据证明了PD-1阻断在患有侵袭性NHL和霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)的患者中的临床活性(Lesokhin,等人2014,Abstract 291,56th ASH Annual Meeting and Exposition,San Francisco,Calif.;Ansell等人2015,N.Engl.J.Med.372(4):311-9)。

[0007] 上皮样肉瘤是一种罕见的高级别软组织肿瘤,具有局部复发、区域淋巴结受累和远处转移的已知倾向。(Sobanko等人,J Clin Aesthet Dermatol.2(5):49-54,2009)。大多数病例开始于手指、手、前臂、小腿或足的皮肤下的软组织,但是肿瘤也可以在身体其他部位开始生长。由于上皮样肉瘤看似无害,但是其恶性程度本身就预示着预后不良。这种肿瘤的误诊可能导致延误和不当治疗,对患者的存活产生不利影响。上皮样肉瘤的目前治疗方式包括根治性肿瘤切除、辅助性化学疗法、前哨淋巴结活检法和放射疗法。(Casanova等人,Cancer.106(3):708-17,2006;Sobanko等人,J Clin Aesthet Dermatol.2(5):49-54,2009)。虽然大多数患者对初始治疗作出应答,但大多数患者会经历疾病的复发,导致反复手术和额外多轮化学疗法的循环。尽管复发性上皮样肉瘤可能对进一步治疗作出应答,但几乎所有的上皮样肉瘤最终都会对目前可用的疗法产生抗性。虽然疗法最近取得了进展,但是复发性转移性上皮样肉瘤仍然是一种需求尚未得到满足的疾病。

[0008] 有证据表明,上皮样肉瘤可能适合某些形式的免疫疗法。例如,上皮样肉瘤患者的肿瘤标本先前曾被检测到具有高水平的PD-L1表达和CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞浸润(Gong等人,Front Oncol.,11:728437,2021)。阻断PD-1/PD-L1检查点通路可以对上皮样肉瘤有利。然而,仅仅阻断这条通路可能还不够。

[0009] 因此,鉴于这种未满足的需要很高,需要靶向上皮样肉瘤的附加疗法。

## 发明内容

[0010] 在一个方面,本公开包括一种治疗有需要的受试者的表达MUC16的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性结合靶肿瘤细胞上的粘蛋白16(MUC16)的第一抗原结合结构域,和特异性结合T细胞上的人CD3的第二抗原结合结构域。在一些实施方案中,双特异性抗体以至少1mg(例如,每周)的剂量向受试者施用。

[0011] 在一些实施方案中,表达MUC16的癌症是上皮样肉瘤。在一些情况下,受试者患有转移性上皮样肉瘤。

[0012] 在一些实施方案中,表达MUC16的癌症是表达MUC16的肉瘤。在一些情况下,肉瘤是上皮样肉瘤、肾和软组织的横纹肌样肿瘤、横纹肌肉瘤、尤因氏(Ewing)肉瘤或软组织肉瘤。在一些情况下,表达MUC16的肉瘤是肾和软组织的上皮样肉瘤或横纹肌样肿瘤。

[0013] 在一些实施方案中,表达MUC16的癌症(例如,肉瘤)是功能性整合酶相互作用物1蛋白的表达缺陷型。

[0014] 在一些实施方案中,受试者先前曾接受抗癌疗法治疗。在一些情况下,受试者对先前疗法具有抗性、对先前疗法应答不足或在先前疗法后复发。在一些情况下,受试者先前曾接受化学治疗药物、放射疗法、手术或免疫治疗药物治疗。在一些情况下,化学治疗药物是他泽司他(tazemetostat)。在一些情况下,免疫治疗药物是PD1抑制剂或CTLA4抑制剂。在一些情况下,免疫治疗药物是帕博利珠单抗(pembrolizumab)、纳武单抗(nivolumab)或伊匹单抗(ipilimumab)。在一些情况下,表达MUC16的癌症对先前疗法具有抗性或对先前疗法应答不足,或在先前疗法后复发。

[0015] 在一些实施方案中,所述双特异性抗体包含第一抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域包含:(a)三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述三个重链互补决定

区包含在具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内;和(b)三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述三个轻链互补决定区包含在具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内。在一些情况下,第一抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCDR3。在一些情况下,第一抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LCDR3。在一些情况下,第一抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的LCVR。

[0016] 在一些实施方案中,所述双特异性抗体,包括其中第一抗原结合结构域上文所讨论的那些在内,包含第二抗原结合结构域,所述第二抗原结合结构域包含:(a)三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述三个重链互补决定区包含在具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内;和(b)三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述三个轻链互补决定区包含在具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内。在一些情况下,第二抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HCDR3。在一些情况下,第二抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LCDR3。在一些情况下,第二抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的LCVR。

[0017] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含人IgG重链恒定区。在一些情况下,人IgG重链恒定区是同种型IgG1。在一些情况下,人IgG重链恒定区是同种型IgG4。

[0018] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含嵌合铰链,与相同同种型的野生型铰链相比,所述嵌合铰链减少Fc $\gamma$ 受体结合。

[0019] 在一些实施方案中,双特异性抗体的第一重链或第二重链(但不是两者都)包含含有H435R(EU编号)修饰和Y436F(EU编号)修饰的CH3结构域。

[0020] 在一些实施方案中,双特异性抗体包含第一重链,所述第一重链包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在一些实施方案中,双特异性抗体包含第二重链,所述第二重链包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。在一些实施方案中,双特异性抗体包含具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的第一重链、具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的第二重链和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的共同轻链。

[0021] 在一些实施方案中,受试者具有升高的血清CA-125水平。在一些实施方案中,受试者具有的血清CA-125水平是正常上限的至少两倍。在一些实施方案中,受试者具有的血清CA-125水平大于92U/ml。

[0022] 在一些实施方案中,所述方法还包括施用第二治疗剂或治疗方案。在一些情况下,第二治疗剂或治疗方案包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是西米普利单抗(cemiplimab)。

[0023] 在一些实施方案中,抗PD-1抗体或抗原结合片段包含:(a)三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述三个重链互补决定区包含在具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)内;和(b)三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述三个轻链

互补决定区包含在具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)内。在一些情况下,抗PD-1抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HCDR3。在一些情况下,抗PD-1抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的LCDR3。在一些情况下,抗PD-1抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的LCVR。在一些情况下,抗PD-1抗体或抗原结合片段是包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链的抗PD-1抗体。

[0024] 在一些实施方案中,双特异性抗体以包括分次初始剂量的给药方案施用(例如,1mg的初始剂量被分成在两个连续日施用的两个相等的0.5mg部分,)。在一些实施方案中,双特异性抗体以每周1mg至1000mg的剂量向受试者施用。在一些情况下,双特异性抗体以每周250mg的剂量向受试者施用。在一些情况下,双特异性抗体以每3周一频率向受试者施用。在一些情况下,双特异性抗体通过静脉内施用来向受试者施用。在一些情况下,双特异性抗体通过皮下施用来向受试者施用。在一些情况下,抗PD-1抗体在双特异性抗体之前、与其同时或在其之后向受试者施用。

[0025] 在所述方法的一些实施方案中,在以1-250mg的剂量施用双特异性抗体至少一周之后,受试者的病情稳定、部分缓解或完全缓解。在一些情况下,在以1-250mg的剂量施用双特异性抗体至少一周后,受试者的乳腺组织的上皮样肉瘤的大小减小。

[0026] 在所述方法的一些实施方案中,双特异性抗体以如下给药方案施用,所述给药方案包括:在给药方案的第1周施用1mg的初始剂量的双特异性抗体;在给药方案的第2周施用20mg的过渡剂量的双特异性抗体;以及在给药方案的第3周施用250mg的完全剂量的双特异性抗体。在一些情况下,初始剂量被分成在连续日施用的两个相等的部分。在一些情况下,过渡剂量被分成在连续日施用的两个相等的部分。在一些情况下,完全剂量被分成在连续日施用的两个相等的部分。在一些实施方案中,完全剂量的两个部分包括50mg部分和250mg部分。在一些实施方案中,给药方案还包括在给药方案的第4周期间施用250mg的维持剂量的双特异性抗体。在一些情况下,维持剂量在给药方案的后续几周期间每周施用。在一些情况下,维持剂量在给药方案的后续几周期间每隔一周(Q2W)施用。

[0027] 通过阅读随后的详细描述,本发明的其他实施方案将变得显而易见。

## 附图说明

[0028] 图1示出了通过ELISA确定的不同浓度的抗MUC16克隆3A5和BSMUC16/CD3-001与CA125的结合(如本文的实施例2中所述)。与结合至MUC16的重复区的抗MUC16克隆3A5相比,BSMUC16/CD3-001及其MUC16亲本抗体在所有测试浓度处均显示出显著减少的结合信号。

[0029] 图2示出了用CD3结合对照+同种型对照( $\Delta$ )、BSMUC16/CD3-005+同种型对照( $\square$ )、CD3结合对照+抗PD-1( $\blacktriangle$ )和BSMUC16/CD3-005+抗PD-1( $\blacksquare$ )治疗的小鼠组(每组5只)的平均肿瘤生长曲线(如本文的实施例3中所述)。抗PD-1抗体和抗CD3 $\times$ MUC16双特异性抗体的组合协同抑制肿瘤生长。

[0030] 图3示出了T细胞与BSMUC16/CD3-001一起温育对PD-1阳性T细胞的百分比的影响。

## 具体实施方式

[0031] 在描述本发明前,应当理解,本发明不限于所述的特定方法和实验条件,因为这类方法和条件可以变化。还应当理解,本文所用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,而无意进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。任何实施方案或实施方案的特征可以彼此组合,并且此类组合明确涵盖在本发明的范围内。上文或本文讨论的任何指定值可以与上文或本文中讨论的另一相关值组合,以列举一个范围,所述值代表所述范围的上限和下限,并且此类范围涵盖在本公开的范围之内。

[0032] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。如本文所用,在提到具体列举的数值中使用术语“约”意指所述值可以从列举的值变动不大于1%。举例来说,如本文所用,表述“约100”包括99和101以及它们之间的全部值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0033] 尽管与本文中描述的那些方法和材料类似或等效的任何方法和材料均可用于本发明的实践或检验,但现在描述优选的方法和材料。本说明书中提及的所有专利、申请和非专利出版物全文以引用的方式并入本文中。

[0034] 用于治疗或抑制癌症生长的方法

[0035] 本发明包括用于治疗、改善或降低受试者的至少一种症状或适应症的严重性,或者抑制癌症(例如,复发性上皮样肉瘤)的生长的方法。根据本发明的这个方面的方法包括向有需要的受试者施用单独或与治疗有效量的特异性结合PD-1的抗体或其抗原结合片段组合的治疗有效量的针对MUC16和CD3的双特异性抗体。本文中使用的术语“治疗”等意指减轻症状,暂时地或永久地消除症状的原因,延迟或抑制肿瘤生长,减少肿瘤细胞负载或肿瘤负荷,促进肿瘤消退,造成肿瘤收缩、坏死和/或消失,防止肿瘤复发,和/或增加受试者的存活持续时间。

[0036] 如本文所用,表述“有需要的受试者”意指展现癌症的一种或多种症状或指征,和/或已诊断患有癌症(包括上皮样肉瘤)以及需要对所述癌症进行治疗的人类或非人类哺乳动物。在许多实施方案中,术语“受试者”可以与术语“患者”互换使用。例如,人受试者可能被诊断出原发性或转移性肿瘤和/或一种或多种症状或指征,包括、但不限于,扩大的淋巴结、腹部肿胀、胸痛/胸闷、不明原因的体重减轻、发热、盗汗、持续疲劳、食欲不振、脾肿大、瘙痒。所述表述包括患有原发性上皮样肉瘤或确定的上皮样肉瘤的受试者。在具体实施方案中,所述表述包括患有上皮样肉瘤或表达MUC16的另一种肿瘤并需要治疗的人受试者。在其他具体实施方案中,所述表述包括患有MUC16+肿瘤的受试者(例如,通过流式细胞术测定的具有MUC16表达的肿瘤)。在某些实施方案中,表述“有需要的受试者”包括患有上皮样肉瘤的患者,所述上皮样肉瘤对先前疗法(例如,用常规抗癌剂进行的治疗)具有抗性或难以用先前疗法治疗,或不能由先前疗法充分控制。例如,所述表述包括已经用化学疗法治疗的受试者,所述化学疗法诸如化疗剂(例如,他泽司他(tazemetostat))或紫杉醇化合物(例如,多西他赛(docetaxel))。所述表述还包括患有上皮样肉瘤的受试者,对于这些受试者,常规抗癌疗法是不可取的,例如,由于毒副作用。例如,所述表述包括已经接受一个或多个周期的具有毒副作用的化学疗法的患者。在某些实施方案中,表述“有需要的受试者”包括患有上皮样肉瘤的患者,所述患者已经接受治疗但随后复发或转移。例如,可能已经接受用一种或多种抗癌剂治疗导致肿瘤消退的患有上皮样肉瘤的患者;然而,随后用本发明的方

法治疗对一种或多种抗癌剂具有抗性的癌症(例如,化学疗法抗性癌症)。表述“有需要的受试者”还包括处于患上上皮样肉瘤的风险下的受试者,例如具有上皮样肉瘤家族史的人、具有与上皮样肉瘤相关的感染既往史的人、具有SMARCB1基因突变的人或由于HIV感染或免疫抑制药物而免疫系统受损的人。

[0037] 在某些实施方案中,本发明的方法可以用于治疗显示出一种或多种癌症相关生物标志物(例如,程序性死亡配体1(PD-L1)、CA125、人附睾蛋白4(HE4)和/或癌胚抗原(CEA))的水平升高的患者。例如,本发明的方法包括向PD-L1和/或CA125的水平升高的患者施用治疗有效量的抗PD-1抗体与双特异性抗MUC16/抗CD3抗体的组合。

[0038] 在某些实施方案中,本发明的方法用于患有上皮样肉瘤的患者。术语“肿瘤”、“癌症”和“恶性肿瘤”在本文中可互换地使用。如本文所用,术语“上皮样肉瘤”是指软组织(例如,在手指、手、前臂、小腿或足的皮肤下)的肿瘤;但是肿瘤也可以在身体其他部位开始生长。

[0039] 根据某些实施方案,本发明包括用于治疗或延迟或抑制肿瘤生长的方法。在某些实施方案中,本发明包括促进肿瘤消退的方法。在某些实施方案中,本发明包括降低肿瘤细胞负荷或降低肿瘤负荷的方法。在某些实施方案中,本发明包括预防肿瘤复发的方法。根据本发明的这个方面,所述方法包括向有需要的受试者施用单独或与抗PD-1抗体组合的治疗有效量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体,其中每种抗体以多剂量形式,例如,作为特定治疗性给药方案的一部分向受试者施用。例如,治疗性给药方案可以包括以约每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次或更低频率的频率向受试者施用一个或多个剂量的抗MUC16×CD3抗体。在某些实施方案中,将一个或多个剂量的抗PD-1抗体与一个或多个剂量的治疗有效量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体联合施用,其中以约每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次或更低频率的频率向受试者施用一个或多个剂量的抗PD-1抗体。

[0040] 在某些实施方案中,在给定的给药周期内,每个剂量的抗MUC16/抗CD3抗体以多于1个部分施用,例如以2-5个部分施用(“分次给药”)。抗MUC16/抗CD3双特异性抗体可以分次剂量施用,以减少或消除响应抗体施用而诱导的细胞因子“尖峰”。细胞因子尖峰是指细胞因子释放综合征(“细胞因子风暴”)和输液相关反应的临床症状。在某些实施方案中,本发明的方法包括将一个或多个剂量的抗PD-1抗体与一个或多个剂量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体联合施用于有需要的受试者,其中在给定的给药期内,一定剂量的双特异性抗体以分次剂量施用,或以多于1个部分施用,例如作为2个部分、作为3个部分、作为4个部分或作为5个部分施用。在某些实施方案中,将一定剂量的双特异性抗体分成2个或更多个部分,其中每个部分包含的抗体量与其他部分相等。例如,包含1000微克的抗MUC16/抗CD3抗体的剂量可每周一次施用,其中所述剂量在一周内以2个部分施用,每个部分500微克。在某些实施方案中,将一定剂量的双特异性抗体分成2个或更多个部分施用,其中所述部分包含不等量的抗体,例如比第一部分多或少。例如,包含1000微克的抗MUC16/抗CD3抗体的剂量可每周一次施用,其中所述剂量在一周内以2个部分施用,其中第一个部分包含700微克,并且第二个部分包含300微克。作为另一个示例,包含1000微克的抗MUC16/抗CD3抗体的剂量可以在2

周内一次施用,其中所述剂量在2周内以3个部分施用,其中第一个部分包含400微克,第二个部分包含300微克,并且第三个部分包含300微克。

[0041] 在某些实施方案中,本发明包括抑制、延缓或停止肿瘤转移或肿瘤浸润至外周器官的方法。根据这个方面,所述方法包括向有需要的受试者施用单独或与抗PD-1抗体组合的治疗有效量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体。

[0042] 在具体实施方案中,本发明提供了用于增加抗肿瘤功效或增加肿瘤抑制的方法。根据本发明的这个方面,所述方法包括在施用治疗有效量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体之前,向患有上皮样肉瘤的受试者施用治疗有效量的抗PD-1抗体,其中所述抗PD-1抗体可以在所述双特异性抗体之前约1天、1天以上、2天以上、3天以上、4天以上、5天以上、6天以上、7天以上或8天以上施用。在某些实施方案中,与在施用抗PD-1抗体之前施用双特异性抗体的受试者相比,所述方法提供了增加的肿瘤抑制,例如增加约20%、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上或80%以上。

[0043] 在某些实施方案中,本发明的方法包括向患有上皮样肉瘤的受试者施用单独或与抗PD-1抗体组合的治疗有效量的双特异性抗CD3×MUC16抗体。在另外的实施方案中,上皮样肉瘤是惰性的或侵袭性的。在某些实施方案中,所述受试者对先前疗法没有应答或在先前疗法后复发。在一些实施方案中,受试者具有的CA-125水平等于或大于正常上限(ULN)的2倍(例如,大于约92U/ml)。在多个实施方案中,受试者的血清CA-125水平(在治疗之前)等于或大于92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200U/ml。在某些实施方案中,本发明的方法还包括向受试者施用另外的治疗剂。

[0044] 在某些实施方案中,本发明的方法包括向患有MUC16+癌症的受试者施用治疗有效量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体。在具体实施方案中,癌症是上皮样肉瘤。在另外的实施方案中,上皮样肉瘤是惰性的或侵袭性的。在一些实施方案中,上皮样肉瘤存在于患者的胸壁、肺和/或乳腺组织中。在一些实施方案中,上皮样肉瘤患者的具有的血清CA-125水平升高(例如,至少2×ULN)。在一些实施方案中,癌症对化学治疗药物具有抗性。在某些实施方案中,所述受试者对先前疗法没有应答或在先前疗法(例如,化学疗法)后复发。

[0045] 在某些实施方案中,本发明的方法包括将抗PD-1抗体与双特异性抗MUC16/抗CD3抗体联合施用于有需要的受试者作为“一线”治疗(例如,初始治疗)。在其他实施方案中,将抗PD-1抗体与双特异性抗MUC16/抗CD3抗体联合作为“二线”治疗施用(例如,在先前疗法后)。例如,将抗PD-1抗体与双特异性抗MUC16/抗CD3抗体联合作为“二线”治疗施用于使用例如化学疗法的先前疗法后复发的受试者。

[0046] 在某些实施方案中,本发明的方法用于治疗患有MRD阳性疾病的患者。最小残留疾病(MRD)表示在治疗期间或治疗后在患者体内残留的少量癌细胞,其中所述患者可能表现出或不表现出疾病的症状或征象。这样的残留癌细胞如果不消除,往往导致疾病的复发。本发明包括在MRD测试时抑制和/或消除患者体内残留癌细胞的方法。MRD可以根据本领域已知的方法进行测定(例如,MRD流式细胞术)。根据本发明的这个方面,所述方法包括向有需要的受试者施用单独或与抗PD-1抗体组合的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体。

[0047] 根据某些实施方案,本发明的方法包括向受试者施用单独或与抗PD-1抗体以及任选地第三治疗剂组合的治疗有效量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体。第三治疗剂可以是选自自由例如以下组成的组的药剂:放射、化学疗法、手术、癌症疫苗、PD-L1抑制剂(例如,抗PD-

L1抗体)、LAG3抑制剂(例如,抗LAG3抗体)、CTLA-4抑制剂(例如,抗CTLA-4抗体)、TIM3抑制剂、BTLA抑制剂、TIGIT抑制剂、CD47抑制剂、吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂、血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂、Ang2抑制剂、转化生长因子 $\beta$ (TGF. $\beta$ .)抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂、肿瘤特异性抗原(例如,CA9、CA125、黑色素瘤相关抗原3(MAGE3)、癌胚抗原(CEA)、波形蛋白、肿瘤-M2-PK、前列腺特异性抗原(PSA)、粘蛋白-1、MART-1和CA19-9)的抗体、疫苗(例如,卡介苗(*Bacillus Calmette-Guerin*))、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、细胞毒素、化疗剂、IL-6R抑制剂、IL-4R抑制剂、IL-10抑制剂、细胞因子(诸如IL-2、IL-7、IL-21和IL-15)、抗炎药(诸如皮质类固醇和非甾体抗炎药)和膳食补充剂(诸如抗氧化剂)。在某些实施方案中,抗体可以与包括化疗剂(例如,他泽司他、紫杉醇、卡铂(carboplatin)、阿霉素、环磷酰胺、顺铂、吉西他滨(gemcitabine)或多西他赛)、放射和手术的疗法联合施用。本文中使用的短语“与……联合”是指,在施用第三治疗剂的同时、恰好之前或恰好之后将所述抗体施用给受试者。在某些实施方案中,第三治疗剂作为与抗体的共同制剂施用。

[0048] 在某些实施方案中,本发明的方法包括向有需要的受试者施用单独或与抗PD-1抗体组合的治疗有效量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体。当施用组合时,抗体的施用使肿瘤生长的抑制增加。在某些实施方案中,与未治疗的受试者或施用任一种抗体作为单一疗法的受试者相比,肿瘤生长被抑制至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。在某些实施方案中,施用抗PD-1抗体和双特异性抗MUC16/抗CD3抗体导致肿瘤消退、肿瘤缩小和/或消失增加。在某些实施方案中,施用抗PD-1抗体和双特异性抗MUC16/抗CD3抗体导致肿瘤生长和发展延迟,例如,与未经治疗的受试者或用任一抗体作为单一疗法治疗的受试者相比,肿瘤生长可延迟约3天、3天以上、约7天、7天以上、15天以上、1个月以上、3个月以上、6个月以上、1年以上、2年以上或3年以上。在某些实施方案中,将抗PD-1抗体与双特异性抗MUC16/抗CD3抗体联合施用预防肿瘤复发和/或延长受试者的存活持续时间,例如,与未经治疗的受试者或施用任一抗体作为单一疗法的受试者相比,将存活持续时间延长15天以上、1个月以上、3个月以上、6个月以上、12个月以上、18个月以上、24个月以上、36个月以上或48个月以上。在某些实施方案中,联合的抗体的施用会增加无进展存活期或总存活期。在某些实施方案中,与未治疗的受试者或接受任一抗体作为单一疗法的受试者相比,将抗PD-1抗体与双特异性抗MUC16/抗CD3抗体联合施用将受试者的应答和应答持续时间增加了例如2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上或50%以上。在某些实施方案中,向患有上皮样肉瘤的受试者施用抗PD-1抗体和双特异性抗MUC16/抗CD3抗体导致肿瘤细胞的所有迹象完全消失(“完全应答”)。在某些实施方案中,向患有上皮样肉瘤的受试者施用抗PD-1抗体和双特异性抗MUC16/抗CD3抗体导致肿瘤细胞或肿瘤大小减少至少30%或更多(“部分应答”)。在某些实施方案中,向患有上皮样肉瘤的受试者施用抗PD-1抗体和双特异性抗MUC16/抗CD3抗体导致肿瘤细胞/病变(包括新的可测量病变)完全或部分消失。肿瘤减少可以通过本领域已知的任何方法来测量,例如X射线、正电子发射断层扫描(PET)、计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、细胞学、组织学或分子遗传分析。在某些实施方案中,施用抗PD-1抗体和双特异性抗MUC16/抗CD3抗体产生协同抗肿瘤作用,所述作用超过两种药物单独施用时的联合作用。

[0049] 在某些实施方案中,所施用的抗体的组合是安全的,并且被患者良好耐受,其中与

以双特异性抗体作为单一疗法施用的患者相比,不良副作用(例如,细胞因子释放增加(“细胞因子风暴”)或T细胞活化增加)没有增加。

[0050] 在某些情况下,受试者对疗法的缓解被归类为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病进展(PD)或病情稳定(SD)。CR被定义为所有目标病变的消失,并且任何病理性淋巴结(无论是目标还是非目标)的短轴减小至 $<10\text{mm}$ ( $<1\text{cm}$ )。PR被定义为以基线总和直径作为参考,目标病变的直径总和减少至少30%。PD被定义为以研究的最小总和作为参考,目标病变的直径总和增加至少20%(如果基线总和是研究的最小值,则包括基线总和)。除相对增加20%之外,总和还必须还显示出绝对增加至少 $5\text{mm}$ ( $0.5\text{cm}$ )。(注:一个或多个新病变的出现也视为进展)。SD被定义为以研究期间的最小总和直径作为参考,缩小不足以符合PR的要求,增加也不足以符合PD的要求。

[0051] 抗PD-1抗体及其抗原结合片段

[0052] 根据本发明的某些示例性实施方案,所述方法包括施用治疗有效量的抗PD-1抗体或其抗原结合片段。如本文中所示,术语“抗体”包括包含通过二硫键相互连接的四个多肽链(两个重(H)链和两个轻(L)链)的免疫球蛋白分子及其多聚体(例如,IgM)。在典型抗体中,每个重链包含重链可变区(在本文中缩写为HCVR或 $V_H$ )和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域: $C_H1$ 、 $C_H2$ 和 $C_H3$ 。每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或 $V_L$ )和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域( $C_L1$ )。 $V_H$ 区和 $V_L$ 区可以进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的高变区,其散布有更保守的被称为框架区(FR)的区。每个 $V_H$ 和 $V_L$ 由从氨基末端到羧基末端按照以下次序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施方案中,抗IL-4R抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人种系序列相同,或者可以是经天然或人工修饰的。可以基于两个或更多个CDR的并排(side-by-side)分析来定义氨基酸共有序列。

[0053] 本文中使用的术语“抗体”也包括完整抗体分子的抗原结合片段。本文中使用的术语“抗体的抗原结合部分”、“抗体的抗原结合片段”等包括特异性地结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、酶促可获得的、合成的或遗传工程改造的多肽或糖蛋白。可以例如使用任何合适的标准技术(诸如蛋白水解消化或涉及编码抗体可变结构域和任选地抗体恒定结构域的DNA的操作和表达的重组基因工程技术)从全抗体分子衍生出抗体的抗原结合片段。这样的DNA是已知的,和/或可以容易地从例如商业来源、DNA文库(包括,例如噬菌体-抗体文库)获得,或者可以被合成。可以对DNA测序,并化学地或通过使用分子生物学技术进行操作,例如,将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列为合适的构型,或导入密码子,产生半胱氨酸残基,修饰、添加或删除氨基酸等。

[0054] 抗原结合片段的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii)  $F(ab')$  2片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;和(vii) 由模拟抗体的高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如,分离的互补决定区(CDR),诸如CDR3肽),或约束性FR3-CDR3-FR4肽。在本文中使用的表述“抗原结合片段”内还涵盖其他经工程改造的分子,诸如结构域-特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失的抗体、嵌合抗体、CDR-移植抗体、双体、三体、四体、微体、纳米抗体(例如,单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域。

[0055] 抗体的抗原结合片段通常包括至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何尺

寸或氨基酸组成并且通常将包括与一个或多个框架序列毗邻或符合读框的至少一个CDR。在具有 $V_H$ 结构域与 $V_L$ 结构域缔合的抗原结合片段中, $V_H$ 和 $V_L$ 结构域可相对于彼此以任何合适的布置定位。例如,可变区可以是二聚体并且含有 $V_H$ - $V_H$ 、 $V_H$ - $V_L$ 或 $V_L$ - $V_L$ 二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可含有单体 $V_H$ 或 $V_L$ 结构域。

[0056] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可含有与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。可见于本发明的抗体的抗原结合片段内的可变结构域和恒定结构域的非限制性例示性构型包括:(i)  $V_H$ - $C_H1$ ; (ii)  $V_H$ - $C_H2$ ; (iii)  $V_H$ - $C_H3$ ; (iv)  $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ ; (v)  $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; (vi)  $V_H$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; (vii)  $V_H$ - $C_L$ ; (viii)  $V_L$ - $C_H1$ ; (ix)  $V_L$ - $C_H2$ ; (x)  $V_L$ - $C_H3$ ; (xi)  $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ ; (xii)  $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ ; (xiii)  $V_L$ - $C_H2$ - $C_H3$ ;和(xiv)  $V_L$ - $C_L$ 。在可变结构域和恒定结构域的任何构型(包括上面列出的任何示例性构型)中,可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或者可以通过全长或部分铰链或接头区相连。铰链区可以由至少2个(例如5、10、15、20、40、60或更多个)氨基酸组成,其导致在单个多肽分子中的相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性的或半柔性的连接。此外,本发明的抗体的抗原结合片段可以包含具有上文所列的可变结构域和恒定结构域构型中的任一个彼此和/或与一个或多个单体 $V_H$ 或 $V_L$ 结构域(例如,通过二硫键)呈非共价缔合的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体)。

[0057] 本文中使用的术语“抗体”也包含多特异性的(例如,双特异性的)抗体。多特异性抗体或抗体的抗原结合片段通常包括至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域能够特异性地结合单独的抗原或相同抗原上的不同表位。使用本领域可用的常规技术,任何多特异性抗体形式都可以适用于本发明的抗体或抗体的抗原结合片段的语境。例如,本发明包括包含使用双特异性抗体的方法,其中免疫球蛋白的一个臂对PD-1或其片段具有特异性,并且免疫球蛋白的另一个臂对第二治疗靶标具有特异性或与治疗部分缀合。可以在本发明的上下文中使用的示例性双特异性形式包括但不限于例如基于scFv的或双体双特异性形式、IgG-scFv融合体、双可变结构域(DVD)-Ig、四源杂交瘤、钮入孔、共同轻链(例如,具有钮入孔的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)体、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双重作用Fab(DAF)-IgG和Mab.sup.2双特异性形式(关于前述形式的综述,参见例如,Klein等人,2012,mAbs 4:6,1-11,以及其中引用的参考文献)。还可以使用肽/核酸缀合构建双特异性抗体,例如,其中使用具有正交化学反应性的非天然氨基酸来产生位点特异性抗体-寡核苷酸缀合物,然后将其自组装成具有确定组成、价数和几何形状的多聚体复合物。(参见,例如,Kazane等人,J.Am.Chem.Soc.[电子版:2012年12月4日])。

[0058] 本发明方法中使用的抗体可以是人抗体。如本文所用,术语“人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。然而,本发明的人抗体可以包含不由人生殖系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或定点诱变或通过体内细胞突变引入的突变),例如在CDR特别是CDR3中。然而,如本文所用,术语“人抗体”不旨在包括已经将衍生自另一个哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列植入到人框架序列上的抗体。

[0059] 本发明方法中使用的抗体可以是重组人抗体。如本文所用,术语“重组人抗体”意在包括通过重组手段所制备、表达、产生或分离的全部人抗体,如使用转染至宿主细胞(在下文进一步描述)中的重组表达载体表达的抗体、从重组人抗体组合文库(在下文进一步描述)分离的抗体、从相对于人免疫球蛋白基因而言转基因的动物(例如,小鼠)分离的抗体

(参见例如, Taylor等人, (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) 或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他手段所制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有从人种系免疫球蛋白序列衍生出的可变区和恒定区。然而, 在某些实施方案中, 此类重组人抗体经历体外诱变(或, 使用就人Ig序列而言为转基因的动物时, 经历体内体细胞诱变) 并且因此重组抗体的 $V_H$ 和 $V_L$ 区的氨基酸序列是尽管源自人种系 $V_H$ 和 $V_L$ 序列并且与之相关, 但可能在体内人抗体种系库内部不天然存在的序列。

[0060] 根据某些实施方案, 本发明方法中使用的抗体特异性结合PD-1。术语“特异性地结合”等是指, 抗体或其抗原结合片段与抗原形成在生理条件下相对稳定的复合物。用于确定抗体是否特异性地结合抗原的方法是本领域众所周知的, 且包括, 例如, 平衡透析、表面等离子体共振等。例如, 本发明上下文中使用的“特异性结合”PD-1的抗体包括结合PD-1或其部分的抗体, 其 $K_D$ 小于约500nM、小于约300nM、小于约200nM、小于约100nM、小于约90nM、小于约80nM、小于约70nM、小于约60nM、小于约50nM、小于约40nM、小于约30nM、小于约20nM、小于约10nM、小于约5nM、小于约4nM、小于约3nM、小于约2nM、小于约1nM或小于约0.5nM, 如在表面等离子体共振分析中所测量的。但是, 分离的特异性地结合人PD-1的抗体可能与其它抗原(诸如来自其它(非人)物种的PD-1分子)具有交叉反应性。

[0061] 根据本发明的某些示例性实施方案, 抗PD-1抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(HCVR)、轻链可变区(LCVR)和/或互补决定区(CDR), 其包含美国专利公开号20150203579中列出的抗PD-1抗体的任何氨基酸序列。在某些示例性实施方案中, 可用于本发明方法的上下文中的抗PD-1抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)的重链互补决定区(HCDR)和具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)的轻链互补决定区(LCDR)。根据某些实施方案, 抗PD-1抗体或其抗原结合片段包含三个HCDR(HCDR1、HCDR2和HCDR3)和三个LCDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3), 其中HCDR1包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列; HCDR2包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列; HCDR3包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列; LCDR1包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列; LCDR2包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列; 并且LCDR3包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在其他实施方案中, 抗PD-1抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:33的HCVR和具有SEQ ID NO:34的LCVR。在某些实施方案中, 本发明的方法包括使用抗PD-1抗体, 其中抗体包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中, 抗PD-1抗体包含轻链, 其包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链的示例性抗体是称为REGN2810(也称为西米普利单抗)的完全人抗PD-1抗体。根据某些示例性实施方案, 本发明的方法包括使用REGN2810或其生物等效物。本文中使用的术语“生物等效物”表示抗-PD-1抗体或PD-1结合蛋白或其作为药物等效物或药物替代物的片段, 当在类似实验条件下以相同摩尔剂量施用(无论单剂量还是多剂量)时, 其吸收速率和/或程度没有表现出与REGN2810的吸收速率和/或程度的显著差异。在本发明的上下文中, 该术语是指结合至PD-1的抗原结合蛋白, 它们的安全性、纯度和/或效力与REGN2810相比没有临床意义上的差异。

[0062] 可用于本发明的方法的上下文的其他抗PD-1抗体包括, 例如, 本领域提及和已知的抗体, 如纳武单抗(nivolumab)(美国专利8,008,449)、帕博利珠单抗(pembrolizumab)(美国专利8,354,509)、MEDI0608(美国专利8,609,089)、匹地利珠单抗(pidilizumab)(美

国专利8,686,119)或美国专利6,808,710、7,488,802、8,168,757、8,354,509、8,779,105或8,900,587中列出的任何抗PD-1抗体。

[0063] 本发明方法的上下文中使用的抗PD-1抗体可能具有pH依赖性结合特征。例如,与中性pH相比,用于本发明方法中的抗PD-1抗体在酸性pH下可表现出减少的与PD-1的结合。可替代地,与中性pH相比,本发明的抗PD-1抗体在酸性pH下可表现出增强的与其抗原的结合。表述“酸性pH”包括小于约6.2的pH值,例如,约6.0、5.95、5.9、5.85、5.8、5.75、5.7、5.65、5.6、5.55、5.5、5.45、5.4、5.35、5.3、5.25、5.2、5.15、5.1、5.05、5.0或更少。本文中使用的表述“中性pH”是指约7.0至约7.4的pH。表述“中性pH”包括约7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35和7.4的pH值。

[0064] 在某些情况下,“与中性pH相比在酸性pH下减少的与PD-1结合”以在酸性pH下抗体与PD-1结合的 $K_D$ 值与在中性pH下抗体与PD-1结合的 $K_D$ 值的比率来表述(反之亦然)。例如,出于本发明的目的,如果抗体或其抗原结合片段表现出酸性/中性 $K_D$ 比率为约3.0或更大,则抗体或其抗原结合片段可被视为表现出“与中性pH相比在酸性pH下结合至PD-1减少”。在某些示例性实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段的酸性/中性 $K_D$ 比率可以为约3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、100.0或更高。

[0065] 可以例如通过就与中性pH相比在酸性pH与特定抗原结合减少(或增强)而筛选抗体群体,来获得具有pH依赖性结合特征的抗体。另外,在氨基酸水平修饰抗原结合结构域可以产生具有pH依赖性特征的抗体。例如,通过将抗原结合结构域的一个或多个氨基酸(例如,在CDR内部)置换为组氨酸残基,可以获得相对于中性pH在酸性pH时抗原结合作用减少的抗体。本文中使用的表述“酸性pH”是指6.0或更小的pH。

[0066] 双特异性抗MUC16/抗CD3抗体

[0067] 根据本发明的某些示例性实施方案,所述方法包括施用治疗有效量的特异性结合CD3和MUC16的双特异性抗体。此类抗体在本文中可称为例如“抗MUC16/抗CD3”或“抗MUC16×CD3”或“MUC16×CD3”双特异性抗体或其他类似术语。

[0068] 如本文所用,表述“双特异性抗体”指包含至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的免疫球蛋白。在本发明的上下文中,第一抗原结合结构域特异性结合第一抗原(例如,MUC16),并且第二抗原结合结构域特异性结合第二不同的抗原(例如,CD3)。双特异性抗体的每个抗原结合结构域包含重链可变结构域(HCVR)和轻链可变结构域(LCVR),每个结构域包含三个CDR。在双特异性抗体的语境下,第一抗原结合结构域的CDR可以用前缀“A”表示,第二抗原结合结构域的CDR可以用前缀“B”表示。因此,第一抗原结合结构域的CDR在本文中可以称为A-HCDR1、A-HCDR2和A-HCDR3;并且第二抗原结合结构域的CDR在本文中可以称为B-HCDR1、B-HCDR2和B-HCDR3。

[0069] 第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域各自连接到单独的多聚化结构域。如本文使用的,“多聚结构域”是任何大分子、蛋白质、多肽、肽或氨基酸,其具有与相同或相似结构或构造的第二多聚结构域结合的能力。在本发明的上下文中,多聚化组分是免疫球蛋白的Fc部分(包含 $C_{H2}$ - $C_{H3}$ 结构域),例如选自同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4以及每个同种型组内任何同种异型的IgG的Fc结构域。

[0070] 本发明的双特异性抗体通常包含两个多聚化结构域,例如两个Fc结构域,它们分

别是单独抗体重链的部分。第一多聚结构域和第二多聚结构域可以具有相同的IgG同种型,例如IgG1/IgG1、IgG2/IgG2、IgG4/IgG4。可替代地,第一多聚结构域和第二多聚结构域可以具有不同的IgG同种型,例如IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4等。

[0071] 任何双特异性抗体形式或技术都可以用于制备本发明的双特异性抗原结合分子。例如,具有第一抗原结合特异性的抗体或其片段可以与一种或多种其他分子实体,例如具有第二抗原结合特异性的另一种抗体或抗体片段功能性连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式),以产生双特异性抗原结合分子。可以在本发明的上下文中使用的具体示例性双特异性形式包括但不限于例如基于scFv的或双体双特异性形式、IgG-scFv融合体、双可变结构域(DVD)-Ig、四源杂交瘤、钮入孔、共同轻链(例如,具有钮入孔的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)体、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双重作用Fab(DAF)-IgG和Mab<sub>2</sub>双特异性形式(关于前述形式的综述,参见例如,Klein等人,2012,mAbs 4:6,1-11,以及其中引用的参考文献)。

[0072] 在本发明的双特异性抗体的语境下,与野生型、天然存在的Fc结构域相比,Fc结构域可以包含一个或多个氨基酸变化(例如,插入、缺失或取代)。例如,本发明包括在Fc结构域中包含一个或多个修饰的双特异性抗原结合分子,其导致经修饰的Fc结构域在Fc和FcRn之间具有经修饰的结合相互作用(例如,增强或减弱)。在一个实施方案中,双特异性抗原结合分子在C<sub>H2</sub>或C<sub>H3</sub>区中包含修饰,其中所述修饰在酸性环境下(例如,在pH范围为从约5.5至约6.0的胞内体中)增加了Fc结构域与FcRn的亲合力。这种Fc修饰的非限制性实例公开于美国专利公开号20150266966中,其全文并入本文。

[0073] 本公开还包括包含第一C<sub>H3</sub>结构域和第二Ig C<sub>H3</sub>结构域的双特异性抗原结合分子,其中所述第一和第二Ig C<sub>H3</sub>结构域的至少一个氨基酸彼此不同,并且其中至少一个氨基酸差异与缺乏氨基酸差异的双特异性抗体相比减少了双特异性抗体与蛋白A的结合。在一个实施方案中,第一Ig C<sub>H3</sub>结构域结合蛋白A并且第二Ig C<sub>H3</sub>结构域含有降低或消除蛋白A结合的突变,例如H95R修饰(根据IMGT外显子编号;根据EU编号的H435R)。第二C<sub>H3</sub>还可以包含Y96F修饰(按照IMGT;按照EU的Y436F)。参见,例如,美国专利号8,586,713。可以存在于第二C<sub>H3</sub>内的其他修饰包括:在IgG1抗体的情况下,D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(按照IMGT;按照EU的D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I);在IgG2抗体的情况下,N44S、K52N和V82I(IMGT;按照EU的N384S、K392N和V422I);以及在IgG4抗体的情况下,Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(按照IMGT;按照EU的Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I)。

[0074] 在某些实施方案中,Fc结构域可以是嵌合的,其组合了源自多于一种免疫球蛋白同种型的Fc序列。例如,嵌合Fc结构域可以包含来源于人IgG1、人IgG2或人IgG4 C<sub>H2</sub>区的C<sub>H2</sub>序列的部分或全部,以及来源于人IgG1、人IgG2或人IgG4的C<sub>H3</sub>序列的部分或全部。嵌合Fc结构域也可以含有嵌合铰链区。例如,嵌合铰链可以包含源自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“上铰链”序列,其与源自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“下铰链”序列组合。可以包括在本文所述的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的特定例子从N末端到C末端包含:[IgG4 C<sub>H1</sub>]-[IgG4上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4 CH2]-[IgG4 CH3]。可以包括在本文所述的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的另一例子从N末端到C末端包含:[IgG1 C<sub>H1</sub>]-[IgG1上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4 CH2]-[IgG1 CH3]。在美国专利公开号20140243504中

描述了可以包含在本发明的任何抗原结合分子中的嵌合Fc结构域的这些和其他实例,所述专利公开号全文并入本文。具有这些一般结构安排的嵌合Fc结构域及其变体可以具有改变的Fc受体结合,其依次又影响Fc效应子功能。

[0075] 根据本发明的某些示例性实施方案,双特异性抗MUC16/抗CD3抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(A-HCVR和B-HCVR)、轻链可变区(A-LCVR和B-LCVR)和/或互补决定区(CDR),其包含美国专利公开号20180112001中列出的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体的任何氨基酸序列。在某些示例性实施方案中,可用于本发明方法的上下文中的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体或其抗原结合片段包含:(a)第一抗原结合臂,其包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区(A-HCVR)的重链互补决定区(A-HCDR1、A-HCDR2和A-HCDR3)和含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链互补决定区(A-LCDR1、A-LCDR2和A-LCDR3);以及(b)第二抗原结合臂,其包含含有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCVR(B-HCVR)的重链CDR(B-HCDR1、B-HCDR2和B-HCDR3)和含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的LCVR(B-LCVR)的轻链CDR(B-LCDR1、B-LCDR2和B-LCDR3)。根据某些实施方案,A-HCDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;A-HCDR2包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;A-HCDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;A-LCDR1包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;A-LCDR2包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;A-LCDR3包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;B-HCDR1包含SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:26的氨基酸序列;B-HCDR2包含SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:27的氨基酸序列;并且B-HCDR3包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:28的氨基酸序列;并且B-LCDR1包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;B-LCDR2包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;B-LCDR3包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在其他实施方案中,双特异性抗MUC16/抗CD3抗体或其抗原结合片段包含:(a)第一抗原结合臂,其包含含有SEQ ID NO:1的HCVR(A-HCVR)和含有SEQ ID NO:2的LCVR(A-LCVR);以及(b)第二抗原结合臂,其包含含有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的HCVR(B-HCVR)和含有SEQ ID NO:2的LCVR(B-LCVR)。在某些示例性实施方案中,双特异性抗CD3×MUC16抗体包含:MUC16结合臂,其包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链;CD3结合臂,其包含含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链。在某些示例性实施方案中,双特异性抗CD3×MUC16抗体包含:MUC16结合臂其包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链;CD3结合臂,其包含含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链。

[0076] 在某些实施方案中,本发明的双特异性抗CD3×MUC16抗体的抗肿瘤活性不会因高水平(例如,高达10,000U/ml)的循环CA125的存在而受到实质性阻碍。大多数卵巢癌患者的血清中的CA125的血清水平升高(公布中位数水平为约656U/ml)。如下文实施例2所示,血清或腹水中高水平的CA125不会显著干扰本发明的双特异性抗体的抗肿瘤谱。

[0077] 可用于本发明方法的上下文中的其他双特异性抗MUC16/抗CD3抗体包括例如美国专利公开号WO 20180112001中所述的任何抗体。

[0078] 联合疗法

[0079] 根据某些实施方案,本发明的方法包括将抗MUC16/抗CD3双特异性抗体与抗PD-1

抗体联合施用于受试者。在某些实施方案中,本发明的方法包括施用具有附加或协同活性的抗体来治疗癌症,优选上皮样肉瘤。如本文所用,表述“与……联合”是指在施用抗PD-1抗体之前、之后或同时施用抗MUC16/抗CD3双特异性抗体。术语“与……联合”还包括依次或伴随施用抗PD-1抗体和双特异性抗MUC16/抗CD3抗体。例如,当在双特异性抗MUC16/抗CD3抗体“之前”施用时,抗PD-1抗体可在施用双特异性抗MUC16/抗CD3抗体之前超过150小时、约150小时、约100小时、约72小时、约60小时、约48小时、约36小时、约24小时、约12小时、约10小时、约8小时、约6小时、约4小时、约2小时、约1小时、约30分钟、约15分钟或约10分钟施用。当在双特异性抗MUC16/抗CD3抗体“之后”施用时,抗PD-1抗体可在施用双特异性抗MUC16/抗CD3抗体之后约10分钟、约15分钟、约30分钟、约1小时、约2小时、约4小时、约6小时、约8小时、约10小时、约12小时、约24小时、约36小时、约48小时、约60小时、约72小时或超过72小时施用。与双特异性抗MUC16/抗CD3抗体“同时”施用是指在双特异性抗MUC16/抗CD3抗体施用后少于5分钟内(之前、之后或同时)将抗PD-1抗体以单独的剂型施用于受试者,或以包含抗PD-1抗体和双特异性抗MUC16/抗CD3抗体两者的单一联合剂型施用于受试者。

[0080] 在某些实施方案中,本发明的方法包括施用第三治疗剂,其中第三治疗剂是抗癌药物。在某些实施方案中,本发明的方法包括联合放射疗法施用抗PD-1抗体和抗MUC16/抗CD3双特异性抗体,以产生长期持久的抗肿瘤应答和/或增加患有癌症的患者的存活期。

[0081] 在一些实施方案中,本发明的方法包括在向患有癌症的患者施用抗PD-1抗体和双特异性抗MUC16/抗CD3抗体之前、同时或之后施用放射疗法。例如,可以在施用一个或多个剂量的抗体以后在一个或多个剂量中对肿瘤病灶施用放射疗法。在一些实施方案中,在全身施用抗PD-1抗体和/或双特异性抗MUC16/抗CD3抗体之后,可对肿瘤病灶局部施用放射疗法以增强患者肿瘤的局部免疫原性(辅助放射)和/或杀死肿瘤细胞(消融放射)。

[0082] 药物组合物和施用

[0083] 本发明包括这样的方法:所述方法包括向受试者施用单独或与抗PD-1抗体组合的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体,其中一种或多种抗体包含在单独或组合(单一)的药物组合物中。本发明的药物组合物可以用合适的载剂、赋形剂、和提供合适的转移、递送、耐受性等或其他药剂来配制。众多的适当配制物可以见于所有医药化学家已知的处方集中: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa. 这些配制物包括例如散剂、糊剂、软膏、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子脂质)的囊泡(诸如LIPOFECTIN<sup>TM</sup>)、DNA结合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、乳液卡波蜡(carbowax)(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有卡波蜡的半固体混合物。还参见Powell等人“Compendium of excipients for parenteral formulations”PDA(1998) J PharmSci Technol 52:238-311。

[0084] 各种递送系统是已知的,并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如包封在脂质体、微粒、微胶囊、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的内吞体中(参见例如Wu等人,1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432)。施用方法包括但不限于真皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。所述组合物可以通过任何便利的途径,例如通过输注或团注、通过经上皮或粘膜皮肤内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收施用,并且可以与其他生物活性剂一起施用。

[0085] 本发明的药物组合物可以用标准针头和注射器皮下或静脉内递送。另外,对于皮

下递送,笔式递送装置易于应用于递送本发明的药物组合物。这种笔式递送装置可以重复使用或是一次性的。可重复使用的笔式递送装置一般利用含有药物组合物的可更换的筒。一旦筒内的所有药物组合物都已施用并且筒变空时,就可以容易地丢弃空筒并且更换为含有药物组合物的新筒。然后可以再使用笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中,没有可更换的筒。实际上,一次性笔式递送装置在装置内的储集器中预填充有药物组合物。一旦清空储集器中的药物组合物,就丢弃整个装置。

[0086] 多种可重复使用的笔式递送装置和自动注射器递送装置应用于皮下递送本发明的药物组合物。实例包括但不限于AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC™笔 (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔 (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN™ I、II和III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD™笔 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™和OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany) 等等。可用于本发明的药物组合物的皮下递送的一次性笔递送装置的实例包括但不限于SOLOSTAR™笔 (sanofi-aventis)、FLEXPEN™ (Novo Nordisk)、和KWIKPEN™ (Eli Lilly)、SURECLICK™自动注射器 (Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN (Dey, L.P.)、和HUMIRA™笔 (Abbott Labs, Abbott Park IL) 等等。

[0087] 在某些情形下,可以在控释系统中递送药物组合物。在一个实施方案中,可以使用泵。在另一个实施方案中,可以使用聚合材料;参见, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer和Wise (编), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Fla. 在又一个实施方案中,可以将控释系统放置于组合物靶标附近,因此只需要全身剂量的一小部分 (参见例如, Goodson, 1984, 载于 *Medical Applications of Controlled Release*, 同上, 第2卷, 第115-138页)。在Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533的综述中讨论了其他控释系统。

[0088] 所述可注射制剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌肉内注射、点滴输注等的剂型。这些可注射制剂可以通过已知方法制备。举例来说,可注射制剂可以例如将上文所描述的抗体或其盐溶解、悬浮或乳化于常规地用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备。作为用于注射的水性介质,有例如生理盐水、含有葡萄糖和其他辅助剂的等渗溶液等,它们可以与适当的增溶剂 (诸如醇 (例如,乙醇)、多元醇 (例如,丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂 [例如,聚山梨醇酯80、HCO-50 (氢化蓖麻油的聚氧乙烯 (50mol) 加合物)] 等) 组合使用。作为油性介质,采用例如芝麻油、大豆油等,其可以与增溶剂,如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等组合使用。由此制备的注射剂优选地填充于适当安瓿中。

[0089] 有利地,将用于上文所描述的口服或不经肠使用的药物组合物制备成适合于符合活性成分剂量的单位剂量的剂型。此类呈单位剂量的剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射液 (安瓿)、栓剂等。

[0090] 施用方案

[0091] 本发明包括这样的方法:所述方法包括以约每周四次、每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每八周一次、每十二周一次或更低频率的给药频率向受试者施用双特异性抗MUC16×CD3抗体和/或抗PD-1抗体,只要达

到治疗应答即可。

[0092] 根据本发明的某些实施方案,可以在规定的时间过程中向受试者施用单独或与抗PD-1抗体组合的多剂量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体。根据本发明的这个方面的方法包括向受试者依次施用单独或与一个或多个剂量的抗PD-1抗体组合的一个或多个剂量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体。如本文所用,“依次施用”是指将每个剂量的抗体在不同的时间点,例如由预定间隔(例如,数小时、数天、数周或数月)隔开的不同天施用给受试者。本发明包括这样的方法:所述方法包括将单一初始剂量的抗体,然后是一个或多个第二剂量的抗体,以及任选地随后是一个或多个第三剂量的抗体按顺序施用于患者。

[0093] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”表示施用的时间顺序。因而,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也被称作“基线剂量”);“第二剂量”是在初始剂量之后施用的剂量;且“第三剂量”是在第二剂量之后施用的剂量。初始剂量、第二剂量和第三剂量可以都含有相同量的抗体(抗PD-1抗体或双特异性抗体)。然而,在某些实施方案中,在初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中所含的量在治疗过程中彼此不同(例如,在适当时向上或向下调整)。在某些实施方案中,在治疗开始时施用一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个或5个)剂量作为“负荷剂量”,然后是以更低的频率施用的后续剂量(例如,“维持剂量”)。例如,可将抗PD-1抗体以约1-3mg/kg的负荷剂量,然后是约0.1至约20mg/kg患者体重的一个或多个维持剂量施用于患有上皮样肉瘤的患者。

[0094] 在本发明的一个示例性实施方案中,每个第二和/或第三剂量在紧接前一剂量后1/2至14周(例如,1/2、1、11/2、2、21/2、3、31/2、4、41/2、5、51/2、6、61/2、7、71/2、8、81/2、9、91/2、10、101/2、11、111/2、12、121/2、13、131/2、14、141/2或更长)施用如本文所用,短语“紧接前一剂量”是指在多次施用的顺序中,双特异性抗MUC16/抗CD3(和/或抗PD-1抗体)的剂量在顺序中紧接着的下一剂量施用之前向患者施用,而没有中间剂量。

[0095] 根据本发明的这个方面的方法可以包括向将任意数量的第二和/或第三剂量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体(和/或抗PD-1抗体)向患者施用。举例来说,在某些实施方案中,仅向患者施用单次第二剂量。在其他实施方案中,向患者施用两次或更多次(例如,2次、3次、4次、5次、6次、7次、8或更多次)第二剂量。同样,在某些实施方案中,仅向患者施用单个第三剂量。在其他实施方案中,向患者施用两次或更多次(例如,2、3、4、5、6、7、8或更多次)三级剂量。

[0096] 在涉及多个第二剂量的实施方案中,每个第二剂量可以与其他第二剂量相同的频率施用。例如,可以在紧接前一剂量之后1至2周向患者施用每个第二剂量。类似地,在涉及多个第三剂量的实施方案中,每个第三剂量可以与其他第三剂量相同的频率施用。例如,可以在紧接前一剂量之后2至4周向患者施用每个第三剂量。或者,在治疗方案的过程中,向患者施用的第二和/或第三剂量的频率可以变化。医师也可以在治疗过程中调节施用频率,取决于在临床检查以后各个患者的需要。

[0097] 在某些实施方案中,在治疗开始时更频繁地(每周两次、每周一次或每2周一次)施用一个或多个剂量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体(例如,抗PD-1抗体)作为“诱导剂量”,随后不太频繁地(例如,每4-12周一次)施用后续剂量(“巩固剂量”或“维持剂量”)。

[0098] 本发明包括这样的方法:所述方法包括向患者依次施用单独或与抗PD-1抗体组合的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体,以治疗上皮样肉瘤。在一些实施方案中,本发明的方法包

括施用一个或多个剂量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体,任选地随后施用一个或多个剂量的抗PD-1抗体。在某些实施方案中,本方法包括施用单个剂量的抗PD-1抗体,然后施用一个或多个剂量的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体。在一些实施方案中,可以施用一个或多个剂量的约0.1mg/kg至约20mg/kg的抗PD-1抗体,然后施用一个或多个剂量的约0.1mg/kg至约20mg/kg的双特异性抗体,以抑制患有上皮样肉瘤的患者的肿瘤生长和/或预防肿瘤复发。在一些实施方案中,以一个或多个剂量施用抗PD-1抗体,随后施用一个或多个剂量的双特异性抗体,导致抗肿瘤功效增加(例如,与未经治疗的受试者或施用任一抗体作为单一疗法的受试者相比,更大程度地抑制肿瘤生长,增加对肿瘤复发的预防)。本发明的替代实施方案涉及抗PD-1抗体和双特异性抗体的伴随施用,所述双特异性抗体以与抗PD-1抗体相似或不同的频率以单独剂量施用。在一些实施方案中,双特异性抗体在抗PD-1抗体之前、之后或同时施用。在某些实施方案中,双特异性抗体作为单剂量制剂与抗PD-1抗体一起施用。

[0099] 剂量根据本发明的方法向受试者施用的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体,以及任选地抗PD-1抗体的量通常是治疗有效量。如本文所用,短语“治疗有效量”是指导致以下中的一者或多者的抗体(抗PD-1抗体或双特异性抗MUC16/抗CD3抗体)的量:(a)降低癌症(例如,上皮样肉瘤)症状的严重性或持续时间;(b)抑制肿瘤生长,或增加肿瘤坏死、肿瘤缩小和/或肿瘤消失;(c)延缓肿瘤生长和发展;(d)抑制或延缓或停止肿瘤转移;(e)预防肿瘤复发;(f)增加患有癌症(例如,上皮样肉瘤)的受试者的存活期;和/或(g)与未经治疗的受试者或施用任一抗体作为单一疗法的受试者相比,减少常规抗癌疗法的使用或需要(例如,减少或消除化疗剂或细胞毒性剂的使用)。

[0100] 在双特异性抗MUC16/抗CD3抗体的情况下,治疗有效量可以为约0.1毫克(mg)至约1000mg,例如约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.5mg、约1mg、约3mg、约5mg、约10mg、约20mg、约40mg、约60mg、约100mg、约120mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg或约1000mg的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体。

[0101] 在抗PD-1抗体的情况下,治疗有效量可以为约0.05mg至约600mg,例如,约0.05mg、约0.1mg、约1.0mg、约1.5mg、约2.0mg、约10mg、约20mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约110mg、约120mg、约130mg、约140mg、约150mg、约160mg、约170mg、约180mg、约190mg、约200mg、约210mg、约220mg、约230mg、约240mg、约250mg、约260mg、约270mg、约280mg、约290mg、约300mg、约310mg、约320mg、约330mg、约340mg、约350mg、约360mg、约370mg、约380mg、约390mg、约400mg、约410mg、约420mg、约430mg、约440mg、约450mg、约460mg、约470mg、约480mg、约490mg、约500mg、约510mg、约520mg、约530mg、约540mg、约550mg、约560mg、约570mg、约580mg、约590mg或约600mg抗PD-1抗体。在某些实施方案中,施用350mg的抗PD-1抗体。

[0102] 单个剂量中所含的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体以及任选地抗PD-1抗体的量可以以每千克受试者体重的抗体的毫克数(即,mg/kg)表示。在某些实施方案中,本发明的方法中使用的双特异性抗MUC16/抗CD3抗体,以及任选地抗PD-1抗体可以以约0.0001至约100mg/kg受试者体重的剂量向受试者施用。例如,双特异性抗MUC16/抗CD3抗体可以以约0.1mg/kg至约20mg/kg患者体重的剂量施用,并且任选地抗PD-1抗体可以以约0.1mg/kg至约20mg/kg患者体重的剂量施用。

[0103] 本文引用的序列和相应的SEQ ID NO的汇总显示在下表1中。

[0104] 表1:序列汇总

[0105]

SEQ ID NO:	描述
1	抗 MUC16 重链可变区
2	抗 MUC16 和抗 CD3 轻链可变区
3	抗 CD3-G 重链可变区
4	抗 CD3-G5 重链可变区
5	抗 CD3-G9 重链可变区
6	抗 CD3-G10 重链可变区
7	抗 CD3-G20 重链可变区
8	抗 MUC16 HCDR1
9	抗 MUC16 HCDR2
10	抗 MUC16 HCDR3
11	抗 MUC16 和抗 CD3 LCDR1
12	抗 MUC16 和抗 CD3 LCDR2
13	抗 MUC16 和抗 CD3 LCDR3
14	抗 CD3-G HCDR1
15	抗 CD3-G HCDR2
16	抗 CD3-G HCDR3

[0106]	17	抗 CD3-G5 HCDR1
	18	抗 CD3-G5 HCDR2
	19	抗 CD3-G5 HCDR3
	20	抗 CD3-G9 HCDR1
	21	抗 CD3-G9 HCDR2
	22	抗 CD3-G9 HCDR3
	23	抗 CD3-G10 HCDR1
	24	抗 CD3-G10 HCDR2
	25	抗 CD3-G10 HCDR3
	26	抗 CD3-G20 HCDR1
	27	抗 CD3-G20 HCDR2
	28	抗 CD3-G20 HCDR3
	29	抗 MUC16 重链
	30	抗 MUC16 和抗 CD3 轻链
	31	抗 CD3-G 重链
	32	抗 CD3-G20 重链
	33	抗 PD-1 重链可变区
	34	抗 PD-1 轻链可变区
	35	抗 PD-1 HCDR1
	36	抗 PD-1 HCDR2
	37	抗 PD-1 HCDR3
	38	抗 PD-1 LCDR1
	39	抗 PD-1 LCDR2
	40	抗 PD-1 LCDR3
	41	抗 PD-1 重链
	42	抗 PD-1 轻链

[0107] 实施例

[0108] 提供以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,而非旨在限制发明人认为是其发明的范围。已努力确保有关所用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但应考虑某些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是按摄氏度计并且压力是大气压或接近大气压。

[0109] 实施例1:结合卵巢细胞特异性(MUC16)和CD3的双特异性抗体的产生

[0110] 本发明提供结合CD3和MUC16的双特异性抗原结合分子;这种双特异性抗原结合分子在本文中也称为“抗MUC16/抗CD3或抗MUC16×CD3双特异性分子”。抗MUC16/抗CD3双特异性分子的抗MUC16部分用于靶向表达MUC16(也称为CA-125)的肿瘤细胞,并且双特异性分子的抗CD3部分用于活化T细胞。MUC16结合在肿瘤细胞上和CD3结合在T细胞上促进了活化的T细胞对被靶向的肿瘤细胞的定向杀死(细胞裂解)。

[0111] 使用标准方法构建包含抗MUC16特异性结合结构域和抗CD3特异性结合结构域的双特异性抗体,其中抗MUC16抗原结合结构域和抗CD3抗原结合结构域各自包含不同的、独特的HCVR对与共同LCVR。在示例性双特异性抗体中,分子利用来自抗CD3抗体的重链、来自抗MUC16抗体的重链和来自抗MUC16抗体的共同轻链来构建。在其他情况下,双特异性抗体可以利用来自抗CD3抗体的重链、来自抗MUC16抗体的重链和来自抗CD3抗体的轻链、或者已知是混杂的或与许多重链臂有效配对的抗体轻链来构建。

[0112] 如2014年8月28日公布的美国专利申请公开号US20140243504A1中所述,制造了具有IgG1 Fc结构域(BSMUC16/CD3-001、-002、-003和-004)或修饰的(嵌合的)IgG4 Fc结构域(BSMUC16/CD3-005)的示例性双特异性抗体。

[0113] 所构建的各种抗MUC16×CD3双特异性抗体的抗原结合结构域的组成部分的汇总显示在表2中。

[0114] 表2:抗MUC16×CD3双特异性抗体的组成部分的汇总

双特异性抗体标识符	抗 MUC16	抗 CD3	共 同 轻链可变区
	抗原结合结构域	抗原结合结构域	
	重链可变区	重链可变区	
BSMUC16/CD3-001 (也称为 REGN4018)	(SEQ ID NO: 1)	CD3-VH-G (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 2)
[0115] BSMUC16/CD3-002	(SEQ ID NO: 1)	CD3-VH-G5 (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 2)
BSMUC16/CD3-003	(SEQ ID NO: 1)	CD3-VH-G9 (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 2)
BSMUC16/CD3-004	(SEQ ID NO: 1)	CD3-VH-G10 (SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 2)
BSMUC16/CD3-005	(SEQ ID NO: 1)	CD3-VH-G20 (SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 2)

[0116] 实施例2:CA-125不会在体外干扰抗MUC16×CD3抗体活性

[0117] 在存在高水平的从卵巢癌患者的腹水中纯化的CA-125的情况下,使用FACS结合和细胞毒性测定来评估可溶性CA-125(MUC16的脱落形式)对BSMUC16/CD3-001的活性的影响。大多数卵巢癌患者血清中的CA-125水平都会升高,并且其循环水平可通过充当抗原沉默物来影响任何靶向MUC16的疗法。在测定中使用的CA-125水平(10,000U/ml)大大超过卵巢癌患者的公布中位数水平656.6U/mL。BSMUC16/CD3-001杀死表达MUC16的OVCAR-3细胞的能力,在存在从人腹水富集的可溶性CA-125(creative Biomart,NY,USA)或表达五个羧基末端SEA结构域和MUC16的近膜区(MUC16 $\Delta$ )的膜近侧构建体的情况下,以如下条件进行评估:4:1的效/靶比,和固定浓度的BSMUC16/CD3-001或CD3结合对照抗体(100pM),以及在37°C处进行MUC16-1H或MUC16 $\Delta$ 的连续稀释72小时。为了监测携带MUC16的靶细胞的特异性杀伤,用1 $\mu$ M紫色细胞示踪剂来标记OVCAR-3细胞。在标记后,将细胞在37°C处铺板过夜。另外,将人PBMC以1×10<sup>6</sup>个细胞/mL铺板于补充RPMI培养基中,并在37°C处温育过夜,以通过剔除贴壁细胞来富集淋巴细胞。第二天,将靶细胞与贴壁细胞剔除的初始PBMC(效/靶细胞比4:1)和连续稀释的BSMUC16/CD3-001或CD3结合对照一起在37°C处共温育72小时。使用胰蛋白酶

从细胞培养板移除细胞,通过FACS进行分析。对于FACS分析,细胞用死/活远红细胞示踪物(Invitrogen)染色。为了评估杀死的特异性,在紫色细胞示踪物标记的群体上对细胞进行门控。用于计算调整存活率的活靶细胞百分比报告如下:调整存活率 =  $(R1/R2) * 100$ ,其中  $R1 =$  存在抗体时的%活靶细胞, $R2 =$  不存在测试抗体时的%活靶细胞。通过将细胞与CD2、CD69和CD25的直接缀合抗体一起温育,并且报告活化的(CD69+) T细胞或(CD25+) T细胞占总T细胞(CD2+)的百分比来评估T细胞活化。

[0118] 通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来测定BSMUC16/CD3-001和抗体(已知能结合CA-125(克隆3A5))与从人腹水获得的CA125的结合。简而言之,将以4000个单位/mL的浓度溶于PBS的可溶性CA-125(creative Biomart, NY, USA)在4°C处被动吸附至96孔微量滴定板上过夜。然后用PBST洗涤板,并用溶于PBS的0.5% BSA封闭1小时。在1小时内,将生物素酰化的BSMUC16/CD3-001、MUC16亲本抗体、 $\alpha$ -MUC16 3A5和非结合对照(BSMUC16/CD3-001同种型对照和 $\alpha$ -MUC16 3A5同种型对照)以10、1、0.3或0.1nM的浓度在溶于PBS的0.5% BSA中的溶液添加至板中,然后用PBST洗涤。将与辣根过氧化物酶缀合的链霉亲和素(SA-HRP)(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)在1.0mg/mL储液中以1:10000稀释度添加至孔中,并温育1小时,以检测板结合的生物素酰化抗体。根据制造商的说明,用3-3',5-5'-四甲基联苯胺(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)底物对板进行洗涤和显色。使用Victor多标记读板器(Perkin Elmer; Melville, NY)来记录每个孔在450nm处的吸光度。使用GraphPad Prism软件进行数据分析。

[0119] 过量的CA-125对BSMUC16/CD3-001与OVCAR-3细胞的结合的影响最小,这表明与CA-125的结合最小(图1)。相比之下,CA-125极大地抑制了可能结合至MUC16的重复区的比较抗体的能力(抗体克隆3A的内部形式)(图1)。此外,含有膜近侧区直到MUC16的第5SEA结构域(MUC16  $\Delta$ )的可溶性MUC16构建体显著抑制BSMUC16/CD3-001的结合,这表明BSMUC16/CD3-001结合膜近侧区,如WO 2018/067331中更详细地讨论,该专利以引用的方式并入本文。与结合研究一致的是,在存在CA-125的情况下BSMUC16/CD3-001也能诱导T细胞介导的杀伤,但是在存在高浓度的MUC16  $\Delta$ 的情况下则不能诱导这种杀伤(数据未示出)。因此,即使在存在高浓度的CA-125的情况下,BSMUC16/CD3-001也可以结合至MUC16并诱导T细胞重定向杀伤。

[0120] 实施例3:PD-1阻断增强异种和同种肿瘤模型中的抗MUC16  $\times$  CD3双特异性抗体的抗肿瘤活性

[0121] 在异种和同种肿瘤模型中评价抗MUC16/抗CD3双特异性抗体与PD-1组合的阻断的体内功效。

[0122] A. 异种模型-OVCAR-3/Luc

[0123] 对于异种模型,在植入人PBMC后十三天,给免疫缺陷型NSG小鼠腹膜内(IP)注射先前在体内传代(第0天)的OVCAR-3/Luc细胞。用12.5 $\mu$ g/只小鼠BSMUC16/CD3-001对小鼠进行腹膜内治疗,或者在第5天和第8天施用单独的或与100 $\mu$ g REGN2810组合的12.5 $\mu$ g CD3结合对照。在肿瘤移植后第4、8、12、15、20和25天通过BLI来评估肿瘤负荷。如通过第25天的BLI测量所确定,用12.5 $\mu$ g BSMUC16/CD3-001治疗可产生BLI测量确定的显著抗肿瘤功效,并且与REGN2810(抗PD-1)的结合可进一步增强抗肿瘤功效。在给药开始前,所有组的肿瘤负荷与BLI评估的相似。各组之间的肿瘤负荷无显著差异。

[0124] BSMUC16/CD3-001在12.5 $\mu$ g时显著减少肿瘤负荷,并且与单独的BSMUC16/CD3-001相比,抗PD-1的添加增强了抗肿瘤功效。给移植有人T细胞的NSG小鼠移植人OVCAR-3/Luc细胞。在第5天和第8天,用静脉内施用的12.5 $\mu$ g BSMUC16/CD3-001来治疗小鼠,或者用CD3结合对照或非结合对照(12.5 $\mu$ g IV)来治疗小鼠。下表3显示的数据是在肿瘤移植后第25天通过BLI评估的肿瘤负荷。使用非配对非参数Mann-Whitney t检验来确定统计显著性。将BSMUC16/CD3-001+/-REGN2810的治疗与CD3结合对照进行比较(对于BSMUC16/CD3-001,\* $p$ <0.05,对于BSMUC16/CD3-001和REGN2810,\*\* $p$ <0.01),并且将单独BSMUC16/CD3-001的治疗与REGN2810的组合进行比较(# $p$ <0.05)。

[0125] 表3:肿瘤移植后第25天的生物发光

抗体( $\mu$ g)	在移植后 25 天的平均辐射值 [p/s/cm <sup>2</sup> /sr] (中位数 $\pm$ SEM)
hIgG4P-PVA CD3 结合对照(12)	7.71e+06 $\pm$ 1.07e+06
BSMUC16/CD3-001 (12)	7.44e+03 $\pm$ 3.11e+03
hIgG4P-PVA CD3 结合对照(12) + REGN2810 (100)	9.29e+06 $\pm$ 1.82e+06
BSMUC16/CD3-001 (12) + REGN2810 (100)	1.76e+03 $\pm$ 9.38e+01

[0127] B. 同种模型-ID8-VEGF/huMUC16

[0128] 为了检查免疫健全模型的功效,将鼠CD3基因替换为人CD3,并且将小鼠MUC16基因的一部分替换为人序列。这种替换产生了T细胞表达人CD3且表达含有BSMUC16/CD3-001和BSMUC16/CD3-005双特异性抗体结合的人MUC16的一部分的嵌合MUC16分子的小鼠。

[0129] 对于该第一同种肿瘤模型,使用经工程改造为表达人MUC16的一部分的ID8-VEGF细胞系。向小鼠腹膜内移植ID8-VEGF/huMUC16细胞,并在移植后三天用5mg/kg BSMUC16/CD3-001或CD3结合对照与同种型对照或者与抗PD-1(5mg/kg IV)的组合来治疗小鼠。与接受CD3结合对照的组相比,BSMUC16/CD3-001的治疗延长了中位数存活期,但是抗PD-1阻断的添加也可使50%的小鼠存活。

[0130] BSMUC16/CD3-001显著增加了ID8-VEGF腹水模型的中位数存活时间,并且PD-1(REGN2810)阻断的添加可使若干只小鼠存活。用表达人MUC16的一部分的鼠卵巢肿瘤系移植表达人CD3而不是小鼠CD3和嵌合MUC16分子的小鼠。在移植后第3天,向小鼠施用BSMUC16/CD3-001(5mg/kg IV),或者施用CD3结合对照(5mg/kg IV)与同种型对照或抗PD-1。在肿瘤移植后第3、7、10、14、17天对小鼠进行治疗。显示的数据是中位数存活率。当小鼠因腹水引起腹胀而体重增加超过20%时处死。使用Mantel-Cox方法来确定统计学意义。BSMUC16/CD3-001和BSMUC16/CD3-001+抗PD-1治疗两者均可使中位数存活时间增加,并且BSMUC16/CD3-001+抗PD-1的组合产生50%的存活,这表明MUC16 $\times$ CD3双特异性抗体和抗PD-1抗体之间存在协同效应。结果显示于下表4中。

[0131] 表4:ID8-VEGF/huMUC16模型的中位数存活期

	抗体(mg/kg)	中位数存活期(天)
[0132]	CD3 结合对照(5)+同种型对照(5)	36
	BSMUC16/CD3-001 (5) + 同种型对照(5)	46
	CD3 结合对照(5) + PD-1 (5)	32
	BSMUC16/CD3-001 (5) + PD-1 (5)	69.5

[0133] 当BSMUC16/CD3-001以1mg/kg与抗PD-1抗体组合施用时也观察到类似的结果。

[0134] C. 同种模型-MC38/huMUC16

[0135] 如上文所讨论,对本实验中使用的小鼠进行工程改造,使得鼠CD3基因被人CD3替换,并且小鼠MUC16基因的一部分被人序列替换。这种替换产生了T细胞表达人CD3且表达含有BSMUC16/CD3-001和BSMUC16/CD3-005双特异性抗体结合的人MUC16的一部分的嵌合MUC16分子的小鼠。

[0136] 对于该第二同种肿瘤模型,使用经工程改造为表达人MUC16的一部分的MC38系。向小鼠皮下移植MC38/huMUC16细胞,并在移植后第7天用BSMUC16/CD3-005或CD3结合对照与同种型对照(1mg/kg IV)或者与抗PD-1(5mg/kg IV)的组合来治疗小鼠。本实验中使用的抗PD-1抗体是商购获得的鼠抗体(克隆RMP1-14, BioXCell)。BSMUC16/CD3-005与抗PD-1的组合显示出协同抗肿瘤作用。

[0137] 在MC38皮下模型中,BSMUC16/CD3-005和抗PD-1阻断的组合产生比单独的BSMUC16/CD3-005更好的抗肿瘤功效。用表达人MUC16的一部分的鼠肿瘤系MC38来移植表达人CD3而不是小鼠CD3和嵌合MUC16分子的小鼠。在移植后第7天,向小鼠施用BSMUC16/CD3-005,或者施用CD3结合对照(1mg/kg IV)与同种型对照或抗PD-1抗体(5mg/kg IV)。在肿瘤移植后第7、11和14天对小鼠进行治疗。结果示出于图2中。使用双因素ANOVA和Tukey多重比较检验来确定统计学意义。BSMUC16/CD3-005加抗PD-1显著且协同抑制CD3结合对照上的肿瘤生长。

[0138] 实施例4:经工程化的小鼠的免疫-PET成像显示出抗MUC16×CD3双特异性抗体向富含T细胞的器官的定位

[0139] 使用PET成像来评估野生型和遗传人源化小鼠中的BSMUC16/CD3-001和BSMUC16/CD3-005的体内定位以及MUC16蛋白的表达。<sup>89</sup>Zr标记的抗MUC16抗体(使用与双特异性抗体相同的抗MUC16重链和轻链产生的二价抗MUC16抗体,在本文中称为“亲本”)在野生型和人源化小鼠两者中的生物分布相似,这表明人源化MUC16蛋白对抗体的表达/可用性较低。相比之下,当向小鼠施用治疗相关剂量的<sup>89</sup>Zr标记的BSMUC16/CD3-001双特异性抗体时,由于这些淋巴器官中的CD3阳性T细胞的识别,该双特异性抗体明显分布到脾脏和淋巴结(数据未示出)。在单独组织中进行的离体生物分布分析确认了在淋巴结和脾脏的定位(数据未示出)。由于<sup>89</sup>Zr标记的BSMUC16/CD3-005双特异性抗体对CD3的亲和力较低,因此该双特异性抗体在淋巴组织中的吸收相对于BSMUC16/CD3-001而言大大降低。为了评估BSMUC16/CD3-001和BSMUC16/CD3-005是否可以在表达MUC16的肿瘤中积累,向携带ID8-VEGF-huMUC16肿瘤的小鼠施用<sup>89</sup>Zr标记的BSMUC16/CD3-001和<sup>89</sup>Zr标记的BSMUC16/CD3-005。Δ虽然BSMUC16/CD3-001的淋巴吸收较高,但是双特异性抗体之间的肿瘤吸收无显著差异(数据未示出)。

[0140] 免疫缀合物和小动物PET的制备:在用N-糖蛋白去糖基化酶(PNGase F)使抗体去糖基化后,通过微生物谷氨酰胺转氨酶的转酰胺基作用,通过DF0将BSMUC16/CD3-001和对照抗体缀合至位置295处的谷氨酰胺残基。然后将DF0缀合的抗体与锆-89(<sup>89</sup>Zr)螯合。小鼠通过尾静脉注射接受最终剂量为0.5mg/kg的抗体。然后进行PET成像以评估在给药后第6天放射性免疫缀合物的体内定位,然后进行离体生物分布研究。对于荷瘤小鼠的实验,向小鼠皮下移植 $10 \times 10^6$ 个ID8-VEGF-huMUC16  $\Delta$  肿瘤细胞。当肿瘤平均大小达到150mm<sup>3</sup>时,在移植后20天,荷瘤小鼠接受<sup>89</sup>Zr放射性标记的抗体。

[0141] 使用预先校准的Sofie Biosciences G8 PET/CT仪器(Sofie Biosciences (Culver city,CA)和Perkin Elmer)来获取PET和CT图像。能量窗在150到650keV的范围内,视野中心处的重建分辨率为1.4mm。在给药后第6天,小鼠使用异氟醚进行诱导麻醉,并且在10分钟静态PET采集期间保持在异氟醚的连续流下。CT图像在PET采集后获得。随后使用预配置的设定来重建PET图像。衰减校正的PET数据和CT数据使用VivoQuant软件(inviCRO Imaging Services)在色阶上处理成伪彩色配准的PET-CT最大强度投影,以表示每体积注射剂量的0至30%的信号范围(以% ID/g表示)。对于离体生物分布分析,在给药后第6天进行成像后对小鼠实施安乐死。通过心脏穿刺将血液收集到计数管中。然后切除正常组织(腹股沟和腋窝淋巴结、胸腺、脾脏、心脏、肺、胃、小肠、肝脏、肾脏、骨骼和卵巢)并将正常组织放置于计数管中。类似地,将肿瘤收集到计数管中。所有管均已预先称量,随后再次称量以确定血液和组织的重量。然后在自动伽马计数器(Wizard 2470,Perkin Elmer)上计算所有样品的 $\gamma$ -发射放射性,并且以每分钟的计数(cpm)报告结果。每个样品的% ID使用样品计数相对于从原始注射材料制备的剂量标准计数来确定。随后,通过用% ID值除以适当的血液、组织或肿瘤样品的各自重量得到单个% ID/g值。

[0142] <sup>89</sup>Zr标记的BSMUC16/CD3-001和<sup>89</sup>Zr标记的BSMUC16/CD3-005显示出MUC16+肿瘤和CD3+淋巴组织的特异性定位,淋巴分布与相对CD3亲和力相关。在存在CD3+组织的情况下,两种MUC16 $\times$ CD3双特异性抗体均显示出相同的肿瘤定位。

[0143] 实施例5:食蟹猴的毒理学研究表明,抗MUC16 $\times$ CD3双特异性抗体无明显毒性

[0144] BSMUC16/CD3-001与猴MUC16和CD3发生交叉反应。为了确定安全性和耐受性并表征双特异性抗体的药代动力学,在食蟹猴中进行多剂量毒性研究。每组每个性别中有六只猴每周接受BSMUC16/CD3-001的施用,总共接受0.01、0.1或1mg/kg的五个剂量。在给药期结束时,对每组每个性别的3只动物实施安乐死,并通过显微镜进行组织检查,同时每组每个性别的其余三只动物经受12周的无治疗恢复期,以评估任何BSMUC16/CD3-001相关作用的可逆性或持久性。BSMUC16/CD3-001的耐受性良好,所有动物均存活至预定的尸检时间。毒代动力学分析表明,各剂量组的暴露与剂量呈比例关系,且动力学呈线性,且未观察到性别差异(数据未示出)。在整个给药期观察到BSMUC16/CD3-001的连续暴露,并且分别地在0.1和1.0mg/kg组中,在所有(n=6)和50%的动物中,BSMUC16/CD3-001暴露维持到恢复期结束。在恢复期第8周后,在0.01mg/kg组中,任何动物的血清中均未检测到BSMUC16/CD3-001。BSMUC16/CD3-001的消除半衰期为大约10天。

[0145] 在给药期或恢复期期间,未发现BSMUC16/CD3-001相关的临床观察结果,尿液分析参数、外周血免疫表型分析、食物消耗或体重也没有任何变化。重要的是,BSMUC16/CD3-001施用不会导致呼吸、神经或心血管安全药理学评价的任何变化,包括ECG参数无变化。在终

未或恢复期尸检中,未发现BSMUC16/CD3-001相关的器官重量变化,也未记录到任何宏观变化。在1.0或0.1mg/kg的初始剂量后1天内观察到剂量相关的、可逆的循环炎症标志物(C-反应蛋白(CRP)和IL-6)的升高,但是这些升高在后续剂量后并不明显(数据未示出)。根据血清细胞因子的最小增加,在BSMUC16/CD3-001施用后未检测到T细胞重新分布(数据未示出),这与针对血液肿瘤的若干CD3双特异性分子的描述情况相反。

[0146] 食蟹猕猴研究根据IACUC的指南进行。每周一次通过30分钟静脉内输注向食蟹猕猴(每组每个性别6只动物)施用对照品(稀释的安慰剂)或BSMUC16/CD3-001(0.01、0.1或1mg/kg)。对照品是用0.9%注射用氯化钠,USP(无菌盐水)稀释的10mM组氨酸、10%蔗糖和0.05%聚山梨醇酯20,pH6。在不同的时间点收集血液样品或组织进行临床病理学和组织病理学研究。通过ELISA来确定BSMUC16/CD3-001浓度,并使用WinNonLin软件来进行毒代动力学分析。在Roche Modular P 800系统上分析CRP。通过MSD(Meso Scale Diagnostics, Rockville,MD)来测量细胞因子。使用流式细胞术对T细胞进行定量。简而言之,将血液收集于乙二胺四乙酸钾管中,裂解,针对CD3、CD4和CD8(BD Biosciences)进行染色,并使用FACS Canto II来确定每种表型的相对值。然后将这些值乘以绝对淋巴细胞值(通过血液学分析获得),以计算每种表型的绝对细胞计数。

[0147] MUC16的免疫组织化学染色出现在预期的组织中:胰腺(间皮、导管上皮)、心脏和卵巢(数据未示出)以及唾液腺(杯状细胞)、肝脏(间皮、胆管)、肺(间皮、细支气管/支气管上皮)、小肠(间皮)、睾丸(间皮、睾丸网/输出管)和扁桃体(上皮、粘液腺)(未显示)。通过苏木精和伊红(H&E)组织学染色评价的BSMUC16/CD3-001相关的微观变化,包括炎症(白细胞浸润)和间皮细胞大小和细胞性增加,这导致多个胸腔和腹膜器官的浆膜内层和/或间皮下结缔组织的非不良增厚。这些变化通常在本质上是局灶性或多灶性的,严重性为最小至轻微,并且被认为是BSMUC16/CD3-001的命中靶标,是浆膜上皮(间皮)细胞上表达的MUC16的接合和T细胞的活化的结果。重要的是,在恢复期结束时,浆膜变化发生逆转或趋于逆转(数据未示出)。

[0148] 食蟹猕猴的毒理学研究表明,在BSMUC16/CD3-001施用后,血清细胞因子和C-反应蛋白出现最小且短暂的增加,但是无明显毒性。

[0149] 实例6:携带肿瘤的小鼠中的血清细胞因子诱导的评估

[0150] 由于细胞因子释放综合征(CRS)是CD3双特异性和CAR T细胞疗法的常见严重副作用,因此进行研究以监测在BSMUC16/CD3-001治疗后相关模型中的血清细胞因子。在无肿瘤的遗传人源化的MUC16/CD3小鼠中,在BSMUC16/CD3-001施用后未出现血清细胞因子反应。

[0151] 为了评估通过BSMUC16/CD3-001进行的体内T细胞活化,测量了荷瘤小鼠的血清细胞因子水平。在0.5mg/kg BSMUC16/CD3-001、CD3结合对照和非结合对照组中,在首个抗体剂量后4小时收集血清样品。与非结合对照和CD3结合对照相比,BSMUC16/CD3-001的治疗使T细胞活化,如通过IFN  $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-2、IL-6、IL-8和IL-10的诱导所确定(数据未示出)。BSMUC16/CD3-001诱导的细胞因子反应需要T细胞以及OVCAR-3/Luc细胞两者的存在,因为仅携带OVCAR3/Luc细胞的小鼠在血清中不具有可检测的人IFN  $\gamma$ ,并且提供用于交联的MUC16的无肿瘤细胞的小鼠未显示出响应于BSMUC16/CD3-001的血清IFN  $\gamma$ 的增加(数据未示出)。

[0152] 血清细胞因子水平的测量:在首个0.5mg/kg剂量后四小时,通过测量干扰素  $\gamma$

(IFN  $\gamma$ )、肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、白介素-2 (IL-2)、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-13和IL-1B的血清浓度来评估响应于BSMUC16/CD3-001的治疗的T细胞活化。使用V-plex人促炎性-10Plex试剂盒根据制造商的说明来分析细胞因子水平 (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MA)。在每组4-6只小鼠的两项独立研究中测量细胞因子。

[0153] 实例7:人源化小鼠中的MUC16表达以及抗MUC16 $\times$ CD3双特异性抗体对MUC16阳性组织的影响

[0154] 为了研究BSMUC16/CD3-001在具有全完整免疫系统的小鼠中的抗肿瘤功效,对小鼠进行基因工程改造,以表达T细胞上的人CD3以及覆盖抗体结合区的MUC16区,这两者均在内源性鼠基因座中(敲入小鼠)。为了验证这些小鼠,通过RT-PCR和IHC两者来检查MUC16表达。在气管中检测到RNA表达,并且在肺、心脏、卵巢、胰腺和膀胱中也检测到了低水平的RNA表达(数据未示出),这与发表的小鼠MUC16表达数据相似。为了评估MUC16蛋白表达,使用识别MUC16的膜近侧区的抗人MUC16抗体对选定的组织进行IHC。在这些小鼠的卵巢和胃的表面上皮中确认了MUC16蛋白表达。在气管内层/上皮以及粘膜下腺中也观察到MUC16,如在人中所所述(数据未示出)。

[0155] 小鼠组织的组织学分析:收获人源化或野生型小鼠的组织,并使用Ventana Discovery XT (Ventana; Tucson, AZ) 通过IHC用结合MUC16的膜近端结构域的抗MUC16抗体对组织进行染色。将5 $\mu$ m石蜡切片切到Superfrost PLUS载玻片上,在60 $^{\circ}$ C处烘焙一小时。使用Ventana DAB Map检测试剂盒在Discovery XT自动化IHC染色系统上进行免疫组织化学染色。使用EZ Prep溶液在75 $^{\circ}$ C处进行脱蜡8分钟。使用来自Ventana的Tris-EDTA缓冲液pH 9(CC1)来进行轻度抗原修复(95 $^{\circ}$ C, 8分钟,然后100 $^{\circ}$ C, 24分钟)。然后进行多个封闭步骤。将组织切片与抗MUC16抗体(2 $\mu$ g/ml)一起在室温处温育8小时。将识别不相关的非结合抗体的同种型对照抗体用作阴性对照。人工施加一抗和阴性对照。将生物素酰化的山羊抗人IgG (Jackson ImmunoResearch) 用作二抗(1 $\mu$ g/ml),并将样品在室温处温育一小时。使用Ventana DAB MAP试剂盒来产生显色信号。载玻片用苏木精手动复染(2分钟)、脱水并盖上盖玻片。在Aperio AT 2载玻片扫描仪(Leica Biosystems; Buffalo Grove, IL)上获取图像并使用Indica HALO软件(Indica Labs; Corrales, NM)进行分析。H&E染色由Histoserv, Inc (Germantown, MD, USA) 进行。

[0156] 如通过T细胞受体(TCR)  $\nu\beta$ 使用所评估,这些小鼠中的T细胞是多克隆的,这些T细胞表达人CD3,并且数量与野生型小鼠相似(数据未示出)。为了确定BSMUC16/CD3-001是否在这些动物中诱导任何T细胞活化或对正常组织产生影响,向非荷瘤小鼠注射高剂量的BSMUC16/CD3-001(10mg/kg),然后检查血液中的T细胞数量、血清细胞因子和组织病理。虽然T细胞可以通过抗人CD3抗体(OKT3)来活化,如通过T细胞从血液的边缘化和血清细胞因子水平的增加所测量(数据未示出),但是BSMUC16/CD3-001不诱导任何这种作用,这表明MUC16靶标的可及性有限(数据未示出)。为了确定BSMUC16/CD3-001是否在表达MUC16的组织中诱导任何微观变化,MUC16和CD3人源化小鼠在第0天和第3天接受两个剂量的10mg/kg的BSMUC16/CD3-001。第5天,检查若干表达MUC16的组织(气管、胃和卵巢),在BSMUC16/CD3-001施用后,这些组织中未观察到细胞浸润或坏死(数据未示出)。

[0157] 组织病理学检查显示,在检查时BSMUC16/CD3-001施用后,在小鼠中未出现炎症或向表达MUC16的组织的浸润。

[0158] 该研究的结果以及实施例5中讨论的食蟹猕猴研究,显示了BSMUC16/CD3-001的安全性谱。BSMUC16/CD3-001仅最低限度地诱导血清细胞因子,虽然在MUC16表达中存在炎症的局灶性诱导和浆膜内层增厚,这表明存在中靶活性,但是这些作用在恢复期结束时就会消失,并且与表示修复的炎症和细胞性增加一致。所观察的浆膜变化与任何临床观察结果、临床病理(除炎症反应之外)或下层实质的微观变化无关。因此,对遗传人源化小鼠和食蟹猕猴两者的研究表明BSMUC16/CD3-001的耐受性良好。

[0159] 实施例8:使用初始人效应细胞在基于FACS的细胞毒性测定中监测PD-1表达

[0160] 为了通过流式细胞术来监测对携带Muc16的靶细胞的特异性杀伤,用1 $\mu$ M紫色细胞示踪剂来标记卵巢细胞系OVCAR-3。在标记后,将细胞在37°C处铺板过夜。另外,将人PBMC以1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞/mL铺板于补充RPMI培养基中,并在37°C处温育过夜,以通过剔除贴壁的巨噬细胞、树突状细胞和一些单核细胞来富集淋巴细胞。第二天,将靶细胞与贴壁细胞剔除的初始PBMC(效/靶细胞4:1)和连续稀释的BSMUC16/CD3-001或CD3结合对照一起在37°C处共温育72小时。使用胰蛋白酶从细胞培养板移除细胞,通过FACS进行分析。对于FACS分析,细胞用死/活远红细胞示踪物(Invitrogen)染色。为了评估杀死的特异性,在紫色细胞示踪物标记的群体上对细胞进行门控。

[0161] 通过将细胞与CD2、CD4、CD8和PD-1的直接缀合抗体一起温育,通过报告PD-1/CD4阳性T细胞或PD-1/CD8阳性T细胞占总T细胞(CD2+)的百分比来评估PD-1表达。与对照相比,与BSMUC16/CD3-001一起温育使PD-1+T细胞的百分比增加超过10倍(CD4+T细胞)或超过3倍(CD8+T细胞)。结果在图3中示出。

[0162] 实施例9:使用抗MUC16 $\times$ 抗CD3双特异性抗体单独或与抗PD-1抗体组合来治疗上皮样肉瘤的方法

[0163] 一名复发性上皮样肉瘤患者已经用尽所有现有的治疗选择,接受了REGN4018(抗MUC16 $\times$ 抗CD3双特异性抗体)的治疗。

[0164] 在这项研究中,治疗评估基于肿瘤反应。肿瘤反应评估基于患有和不患有可测量疾病患者中的肿瘤标志物CA-125的水平。另外,生物标志物分析包括外周T细胞表型分析,因为预期REGN4018治疗会短暂减少外周CD3<sup>+</sup>T细胞的群体。进一步的分析将包括生物标志物,诸如蛋白质(诸如MUC16和PD-L1)的肿瘤表达,并且可以包括ctDNA、变异(这些变异影响潜在疾病的临床过程或调节治疗副作用)的肿瘤(RNA和体细胞DNA测序)遗传分析。

[0165] 目标:将对探索性目标进行探索。

[0166] 研究的探索性目标是:

[0167] 收集血液进行细胞因子谱分析、药代动力学以及肿瘤组织活检是任选的。如果可用,这些样品将用于以下探索性目标:

[0168] (1) 评估可能与作用机制、对疾病/靶标的增进了解、观察毒性和潜在抗肿瘤活性相关的生物标志物,包括但不限于:

[0169] -循环蛋白,包括细胞因子

[0170] -肿瘤的基因表达变化

[0171] -蛋白质(诸如MUC16)的肿瘤表达水平。

[0172] 患者人口统计信息:

[0173] -年龄:20岁

[0174] -性别:女

[0175] 诊断:患者患有多发性复发性转移性上皮样肉瘤伴胸壁和肺病变。免疫组织化学显示,肿瘤标本表达MUC16,而血清样品中的CA-125 (MUC16的脱落胞外部分) 升高。

[0176] 迄今为止的疾病进展史:患者被初步诊断为右侧桡骨上皮样肉瘤。她接受了右上肢放射治疗 (50.4Gy) 和局部手术,且边缘呈阴性。第一次复发伴随有中臂淋巴结复发,采用手术切除和进一步放射疗法 (54Gy) 来进行治疗。腋窝检测到PET高吸收值淋巴结疾病的再次复发,并通过手术进行治疗。右肘部的先前辐射范围内存在疾病再次复发。患者在早期试验中接受了他泽司他治疗,但是由于耐受性和顺应性问题而停止治疗。有证据表明臂部疾病进一步进展且出现肺部结节,因此用帕博利珠单抗对患者进行治疗。在由于疾病进展而停止治疗之前,她的疾病经历了一段较长的稳定期。随后,患者接受了纳武单抗/伊匹单抗治疗,并因肿瘤相关溃疡恶化而接受了右臂前肢姑息截肢术。疾病评价显示胸部疾病稳定,但是由于免疫相关肺部炎症而停止免疫检查点抑制剂疗法。再次用他泽司他对患者进行治疗,但是由于疾病进展而停止治疗。她随后接受了CLR-131 (分子靶向放射疗法) 治疗;但是疾病进一步进展。最近,患者右侧乳腺接受了放射疗法 (5次,每次20Gy),以缓解溃疡性皮肤病变。

[0177] 目前,患者双侧胸壁/乳腺组织有疾病迹象,双侧肺部有多处可测量的病变。她的临床状况稳定,卡诺夫斯基 (Karnofsky) 分数为70 (主要是由于截肢)。在这种情况下,目前没有可用的临床试验选项或者针对她的疾病的替代‘标准’疗法。

[0178] 目前研究设计和治疗程序:REGN4018是一种研究药物,目前正在进行成人1/2期研究评价,该研究针对已接受铂治疗和/或不耐受铂治疗的卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌患者。

[0179] REGN4018将每周通过静脉内输注4小时 (包括冲洗) 进行施用。治疗将持续进行 (每周一次),周期持续6周 (42天)。在第1周期期间,患者接受递增剂量的REGN4018,直到达到下表所示的完全剂量。药物的初始剂量在连续日分次给予 (参见下文)。可以在任何时间点对任何剂量进行分割以改善耐受性。

[0180] 表5:REGN4018疗法的剂量方案

	第1周期第1天	初始剂量	1 mg
	第1周期第8天, 第1周期第9天	过渡剂量	20 mg (分成 10 mg/10 mg)
[0181]	第1周期第15天, 第1周期第16天	完全剂量	250 mg (分成 50 mg/200 mg)
	第1周期第22天起	完全 (维持) 剂量	250 mg

[0182] 剂量选择的基本原理-REGN4018是一种研究药物,目前正在进行成人1/2期研究评估。该SPS的患者以比目前在1/2期研究中以单一疗法队列评价的剂量 (450mg) 低一个剂量水平的剂量 (即250mg,这是已经证明可耐受的最高剂量水平) 进行治疗。随后,可以根据新信息由医生决定对剂量进行调整,以期给患者带来临床有益效果。

[0183] REGN4018施用程序-REGN4018药物产品以5mg/小瓶和/或50mg/小瓶的冻干的一次性产品形式提供,用于静脉输注施用。REGN4018将每周通过静脉内施用。REGN4018将通过静

脉内输注4小时(包括冲洗)进行施用。必须在监控环境中观察患者至少24小时,以了解以下剂量/情况:

[0184] a) 周期1

[0185] -第1周期第1天初始剂量

[0186] -第1周期第8/9天分次过渡剂量

[0187] -第1周期第15/16天分次第一完全剂量

[0188] -第1周期第22天250mg第一剂量

[0189] b) 递增至新的最高耐受剂量水平。

[0190] c) 观察到 $\geq 2$ 级细胞因子释放综合征(CRS)不良事件之后发生的任何后续剂量的REGN4018。

[0191] d) 在长期停药期(例如停止研究药物超过21天)后重新开始使用研究药物。

[0192] 在住院观察期间,仅住院治疗不足以将不良事件归类为严重。因不良事件而延长住院时间(超过方案规定的24小时)将被视为严重情况。

[0193] 如果分次给药,则第二天的监测时间应遵循输注第一天的相同指南。对于第1周期第9天、第1周期第16天、第1周期第23天(如果适用),应为24小时监测。

[0194] 在患者耐受第一完全剂量后,患者可以随后在门诊输注单元接受研究疗法,并且研究者可以选择将REGN4018输注的持续时间(包括冲洗)缩短至3小时,然后耐受性良好的每周一次REGN4018输注各自缩短至2小时、1小时和30分钟。REGN4018将在住院或日间医院环境静脉内施用,并且可立即进入急症护理医院单元。

[0195] 不需要预先用药,并且预先用药由研究者自行决定。

[0196] 剂量递增-根据正在进行的1/2期研究的最新信息,研究者可以自行决定实施剂量递增/递减。具体而言,如果在1/2期研究中确定较高剂量是可耐受的,则可以将该较高剂量引入该SPS中。

[0197] 剂量调整-REGN4018的剂量调整/减少可以由研究者自行决定实施,并且考虑患者的最大利益。将对不良事件(AE)进行对症治疗。

[0198] 疗法的持续时间:在REGN4018疗法中,每个周期将为6周(42天)。治疗将持续直到出现不可接受的毒性、缺乏临床有益效果、患者撤回同意、医生酌情决定(例如,基于无法忍受的不良反应、生活质量、新治疗选项)或缺乏药物供应。由于疾病进展,如果患者能够耐受治疗且疾病无进展,并且根据研究者的意见,患者从持续研究治疗获得临床有益效果;则可以由医生自行决定继续进行治疗。临床有益效果将根据本方案中概述的定期间隔在结束时或在有临床征象时通过计划影像重新评估(并且与基线进行比较)来客观评估。

[0199] 如果在至少24周的治疗后出现临床或放射学反应,患者可以选择改为REGN4018的Q2W(每两周)给予方案并继续进行所有相关研究评估。当随后疾病进展时,患者可以按照研究者根据患者的临床有益效果选择的剂量水平(包括新剂量水平、更高的剂量水平)继续治疗。治疗后随访将在最后一剂的30天内进行,并且在最后一剂后90天( $\pm 10$ 天)再次进行,以完成研究结束时的安全性评估。

[0200] REGN4018疗法的可用的安全性数据:REGN4018针对卵巢癌患者的成人1/2期研究正在进行中,目前以450mg(完全剂量;8a水平)的剂量纳入患者。250mg的先前剂量水平(剂量水平7a)是本SPS中建议使用的剂量,并且已经证明是可耐受的。目前可用的安全性数据

(包括治疗出现的不良事件 (TEAE) 和治疗相关TEAE) 如下:

[0201] 治疗中出现的不良事件-最常报告的TEAE (所有级别,  $\geq 10\%$  的患者) 是: 细胞因子释放综合征 (n=20; 69%); 腹痛 (n=18; 62.1%); 恶心 (n=13; 44.8%); 背痛 (n=10; 34.5%); 贫血和疲劳 (各自n=9; 各自31%); 呕吐 (n=8; 27.6%); 腹泻和咳嗽 (各自n=7; 各自24.1%); 发热和低镁血症 (n=5; 各自17.2%); 便秘、呼吸困难、干眼症、眼部有分泌物、食欲不振、头疼、低血压、输注相关反应和消化不良、胸膜痛 (各自n=4; 各自13.8%); 乏力、腰痛、非心源性胸痛、肌肉骨骼疼痛、眼部瘙痒、眼部充血、结膜炎、窦性心动过速和发冷 (各自n=3; 各自10.3%)。TEAE的发生率在疗法的第一周期间最高, 随后几周下降。

[0202] 治疗相关TEAE-在29名患者中有二十八名 (96.6%) 在治疗期间经历至少一次由研究者评估的治疗相关TEAE。研究者评估的最常报告的治疗相关TEAE (所有级别,  $\geq 10\%$  的患者) 是: 细胞因子释放综合征 (n=20; 69%); 腹痛 (n=16; 55.2%)、恶心 (n=7; 24.1%)、背痛 (n=6; 20.7%)、疲劳和贫血 (各自n=5; 各自17.2%); 呕吐、胸膜痛、低血压、输注相关反应和发热 (各自n=4; 各自13.8%); 腹泻、消化不良、咳嗽、干眼症、结膜炎和腰痛 (各自n=3; 各自10.3%)。有十一名患者 (37.9%) 经历了总共17次3级治疗相关TEAE (表9)。最常报告的3级治疗相关不良事件是腹痛 (n=6; 20.7%, 2名患者为DL3, 4名患者为DL4)。未发生4级或5级治疗相关的TEAE。

[0203] 本SPS中考虑的患者中的REGN4018功效的潜力: 免疫组织化学证实, 该患者的癌症表达MUC16, 这是REGN4018的相关靶标。另外, 血清样品中的CA-125 (MUC16的脱落胞外部分) 升高。潜在有益效果是, 研究药物可能导致患者的癌症在一段时间内停止生长或缩小。它可以减轻癌症引起的症状 (诸如疼痛)。

[0204] 已确定的和潜在的风险: 以下是根据药物安全性谱和患者病史确定的疗法的重要风险和潜在风险:

[0205] 已确定的重要风险: 输注相关反应和细胞因子释放综合征-输注相关反应 (IRR) 和细胞因子释放综合征 (CRS) 与典型的征象和症状相关, 这些征象和症状包括但不限于潮红、心动过速、低血压、呼吸困难、支气管痉挛、背痛、发烧、荨麻疹、水肿、恶心和皮疹。

[0206] 输注相关反应是单克隆抗体常见的不良药物反应 (ADR)。症状与药物施用有时间相关性, 范围可以从症状不适到致命事件。很多报告术语被用于识别IRR, 虽然存在相当多的重叠症状, 但是每种症状的病因却非常不同。这些术语包括过敏性反应、过敏样反应、CRS和补体活化相关假性过敏 (CARPA)。尝试识别症状病因和实际诊断的主要原因是为了确保识别在随后暴露于药物时可能复发甚至恶化的反应 (例如, 过敏性反应), 而不是可能因重复暴露而改善的反应 (过敏样反应和CRS)。

[0207] IRR被定义为在输注期间和随后的2小时内发生的不良反应。在本研究的背景中, 在输注完成后超过2小时出现的IRR的征象和症状被确定为CRS。

[0208] 在临床上, CRS是包括发热、低血压、心动过速和缺氧症状的综合征。另外, 还可能出现神经系统所见, 包括谵妄、脑病、失语、嗜睡、骚动、震颤和癫痫发作, 这些反映了免疫效应细胞相关神经毒性综合征 (ICANS)。

[0209] 风险缓解措施: IRR和CRS

[0210] 1) 使用逐渐接近完全剂量水平的初始剂量和过渡剂量;

[0211] 2) 在初始剂量增加期间和另外指定的时间进行至少24小时的住院监测;

[0212] 3) 输注相关反应和细胞因子释放综合征应按照机构标准采用对症治疗和支持性护理进行管理

[0213] 药物反应的评估:患者体内的REGN4018的安全性和耐受性将通过不良事件的临床评估和临床评估的重复测量进行监测,所述不良事件包括生命体征(体温、血压、脉搏、氧饱和度 and 呼吸)、身体检查(全面和有限)、12导程心电图(ECG)、超声心动图、胸部X光检查和实验室评估(包括标准血液学、血液化学和尿液分析)。

[0214] 由于在双特异性抗体和类似的分子中观察到在初始剂量(第一剂量和/或后续剂量)后细胞因子的释放,因此本研究实施了具体措施。这些措施包括:1mg初始剂量(第1周期第1天),20mg过渡剂量(第1周期第8天),分次剂量选项,在选择剂量施用时需要监测,以及使用抗IL-6途径疗法(例如,托珠单抗(tocilizumab))和皮质类固醇来进行IRR/CRS管理。

[0215] 肿瘤评估将包括所有已知或疑似疾病部位。肿瘤评估将在第1周期开始之前(基线),然后在第2周期之前( $\pm 7$ 天),然后在每个偶数周期之前( $\pm 7$ 天)进行。可以根据临床适应症进行附加肿瘤评估。如果自上次评价以来已超过2个周期,则应在治疗结束时重复进行肿瘤评估(如果适用)。评估将按照机构标准进行,并且与开始研究疗法的28天内进行的基线测量进行比较。

[0216] 由于角膜和结膜上皮上的MUC16表达,需要进行基线眼部检查。

[0217] 将收集血液样品以用于药物浓度测量和ADA评估。

[0218] 在研究药物施用后24小时内需要进行简要神经系统检查。

[0219] 将收集血清和血浆样品以用于附加生物标志物分析。将从收集的血清、血浆、全血、体液、存档的肿瘤组织、研究中的肿瘤活检组织、肿瘤DNA(包括循环肿瘤DNA)和肿瘤RNA样品研究与REGN4018治疗暴露、临床活动或潜在疾病相关的探索性预测和药效动力学生物标志物。

[0220] 抗肿瘤活性将通过CT或MRI或PET-CT来评估,并监测体能状态和血清CA-125水平。

[0221] 允许和禁止的伴随疗法和基本原理:

[0222] 禁止和不鼓励使用的药物-在参与目前研究期间,患者不得接受除REGN4018单一疗法之外的任何标准或研究性肿瘤治疗药物,但是允许进行局部姑息外照射放射疗法。

[0223] 建议患者在整個研究期间任何时候都不要接受全身皮质类固醇,诸如氢化可的松、泼尼松、泼尼松龙(Solu-Medrol®)或地塞米松(Decadron®),除非出现危及生命的紧急情况以及/或者治疗对抗IL-6通路疗法(例如,托珠单抗)无反应或预期无反应的IRR/CRS或严重到需要皮质类固醇的irAE。允许使用吸入性、局部用、眼用或鼻内用类固醇。

[0224] 允许的药物-可以允许局部姑息治疗(例如,放射疗法)。输注前用药由研究者自行决定,这些用药例如抗组胺药、对乙酰氨基酚、非甾体抗炎药(例如,酮咯酸或布洛芬)和/或口服类阿片(例如,氢吗啡酮)。方案未强制要求特定预先用药。

[0225] 允许使用生理性替代剂量的全身性皮质类固醇,即使 $>10\text{mg/天}$ 的泼尼松当量。允许短期使用皮质类固醇来预防(例如,对比染料变态反应)或治疗非自身免疫性疾病(例如,由接触变应原引起的迟发型超敏反应)。

[0226] 可以由研究者自行决定给予被认为对患者健康有必要且预期不会干扰研究药物评价的任何其他药物。允许进行骨转移治疗(双膦酸盐、地诺单抗(denosumab))和激素疗法。

[0227] 研究终点:

[0228] 研究的主要终点是剂量限制性毒性、治疗中出现的不良事件 (TEAE; 包括免疫相关不良事件 [irAE])、严重不良事件 (SAE)、死亡、实验室异常 (根据CTCAE确定为3级或更高) 以及疗法的药代动力学。

[0229] 研究的次要终点是基于实体瘤反应评价标准 (RECIST) 的ORR。

[0230] 初步结果: 以下提供了针对复发性上皮样肉瘤单名患者进行的REGN4018单一疗法研究的安全性和功效数据。

[0231] 向患有复发性上皮样肉瘤且癌症抗原 (CA) -125水平升高的患者每周静脉内 (IV) 施用REGN4018, 剂量范围为1-250mg。通过药物暴露的逐渐增加, 采用最初两剂的递增剂量来减轻细胞因子释放综合征 (CRS) 的风险。主要终点包括安全性和药代动力学。次要终点包括通过根据实体瘤反应评价标准 (RECIST) 1.1的客观反应率 (ORR) 确定的功效。

[0232] 患者在C1D2和C1D9经历2级细胞因子释放综合征。其他治疗中出现的不良事件包括1级咳嗽和2级间歇性缺氧、肌痛、便秘、心包和胸腔积液。

[0233] 在治疗后, 患者的CA-125水平下降且根据RECIST v1.1 CT扫描的靶标病变显示出部分反应, 持续60周, 从基线直径总和89mm减小至第4周期成像时的60mm。另外, 患者的右侧乳腺有皮肤癌溃疡, 且大小有所减小。这些病变在REGN4018治疗后得到明显改善, 从而使得伤口几乎完全愈合, 并且此类病变引起的疼痛也得到显著改善。

[0234] 在这项单一患者研究中, 患者可耐受REGN4018, 并且具有根据实体瘤反应评价标准 (RECIST) 通过ORR确定的临床活动的征象。该分析的数据支持用REGN4018 (抗MUC16×抗CD3) 双特异性抗体来治疗复发性上皮样肉瘤。

[0235] 通过REGN4018与西米普利单抗组合治疗上皮样肉瘤: 预期可以给患有复发性上皮样肉瘤的该患者施用抗PD-1抗体 (例如, 西米普利单抗) 与REGN4018双特异性抗体 (即, 抗MUC16×抗CD3抗体) 的组合以治疗肿瘤。

[0236] 实施例10: 不同亚型儿童肉瘤中的半定量MUC16免疫组织化学表达

[0237] 研究了不同亚型儿童肉瘤的半定量MUC16免疫组织化学 (IHC) 表达。在2015年和2021年间, 从儿童医院的<25岁患者采集了七十二个样品, 包括上皮样肉瘤 (n=6)、肾和软组织的横纹肌样肿瘤 (n=4)、横纹肌肉瘤 (n=23)、尤因氏肉瘤 (n=19) 和其他软组织肉瘤 (n=19)。对每个病例或样品的代表性组织块的4 $\mu$ m厚的福尔马林固定石蜡包埋的组织切片进行IHC。测定在DAKO Omnis染色平台上使用抗CA125抗体 (克隆M11, 单克隆小鼠, 即用型, DAKO, 目录号GA701) 和Envision Flex检测试剂盒 (DAKO, 目录号GV800) 来进行。使用适当的阳性和阴性对照。使用H-评分方法来评估免疫反应性。

[0238] 在被选择进行MUC16 IHC的六个上皮样肉瘤样品中, 三个显示出弥漫性强染色反应 (H-评分为300), 一个显示出异质性染色 (H-评分为110), 其余两个为阴性 (H-评分为0)。在其余肿瘤实体中, MUC16表达存在于四个肾和软组织的横纹肌样肿瘤样品中的两个中 (H评分分别为300和170), 但不存在于其余62个病例中 (H评分为0)。

[0239] MUC16表达是上皮样肉瘤的常见特征, 并且可见于其他INI-1 (SMARCB1) 缺陷型恶性肿瘤中。

[0240] 本发明的范围不受本文所述的具体实施方案限制。事实上, 除本文所述的那些之外, 本发明的各种修改根据前文描述书对于本领域技术人员将变得显而易见。此类修改旨

在落在所附权利要求书的范围内。

[0241] 表6:从ST.26格式序列表中排除的序列

[0242]

SEQ ID NO:	序列
12	TAS
39	AAS

[0243] \*\*\*\*\*

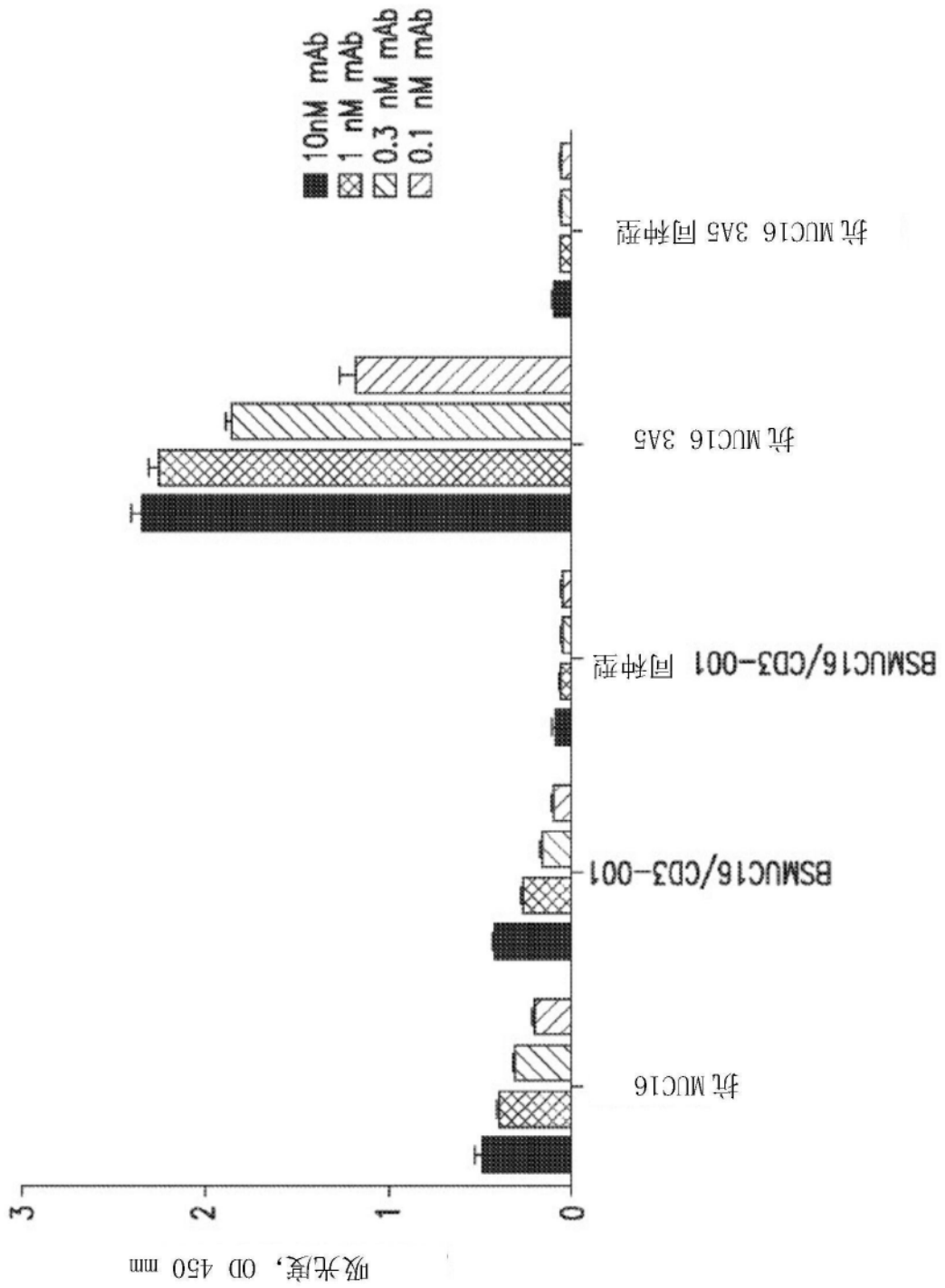


图1

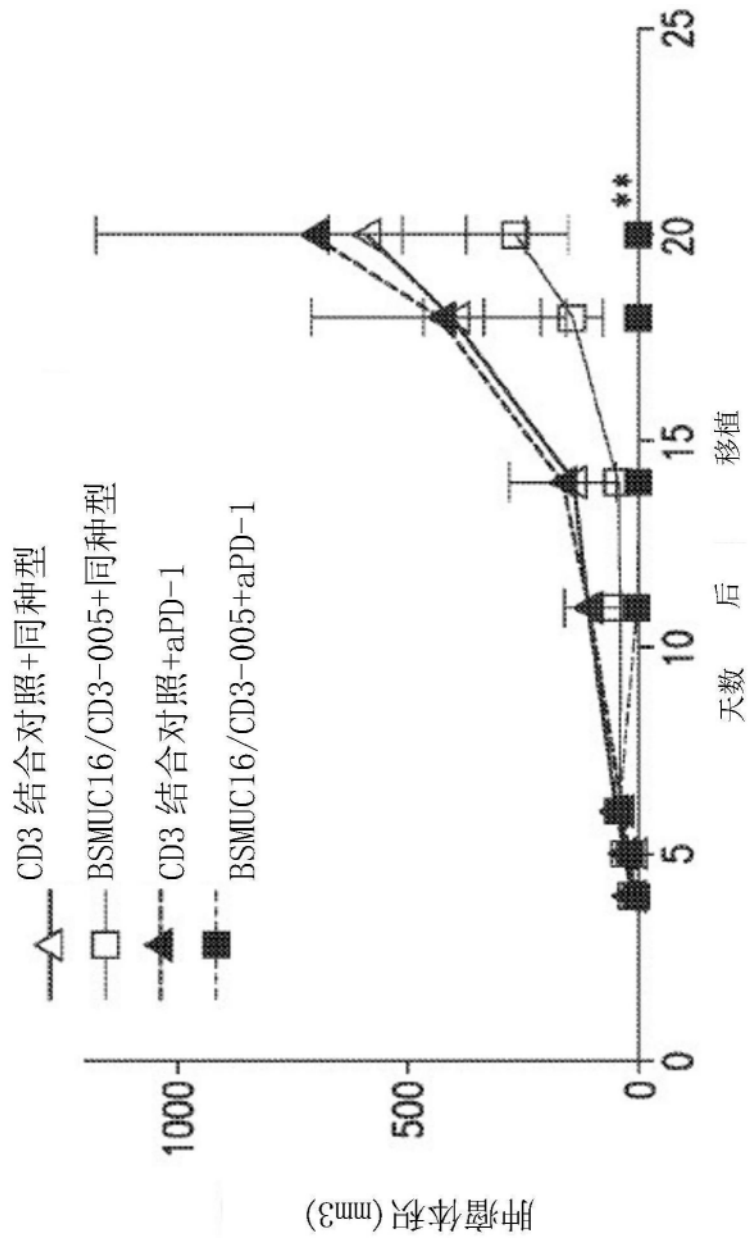


图2

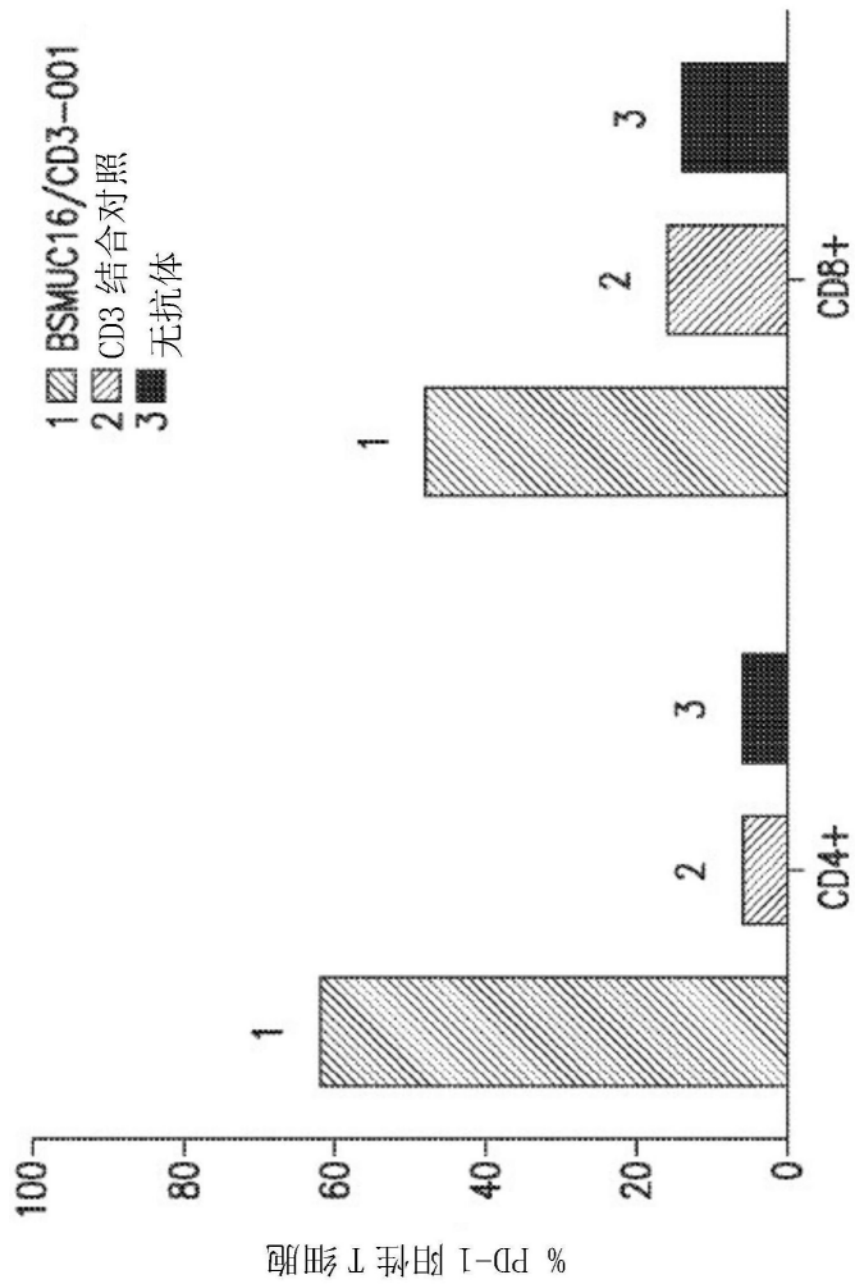


图3