



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118453852 A

(43) 申请公布日 2024.08.09

(21) 申请号 202410572835.8

(22) 申请日 2018.04.13

(30) 优先权数据

17305445.3 2017.04.14 EP

(62) 分案原申请数据

201880040178.5 2018.04.13

(71) 申请人 埃克塞里艾克西斯公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 居里研究所

(72) 发明人 J·M·巴雷 J·F·普罗斯特

M·拉马尔 S·德戈夫

O·迪布勒伊 A·尼古拉斯

D·梅瑟尔

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 王玉桂 张奎燕

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

权利要求书1页 说明书46页  
序列表(电子公布) 附图14页

(54) 发明名称

用于预防或治疗癌症的AMHR II结合化合物

(57) 摘要

本发明涉及人AMHR II结合剂用于预防或治疗选自包括以下的癌症组的癌症的用途:结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌和白血病。

1. 人AMHR II结合剂用于制备用于预防或治疗非妇科癌症的药剂中的用途,其中所述非妇科癌症是肝癌,并且其中所述非妇科癌症在癌细胞表面表达人AMHR II;所述人AMHR II结合剂选自由以下组成的组:单克隆抗AMHR II抗体及其AMHR II结合片段;其中所述单克隆抗AMHR II抗体包含由以下序列组成的CDR:

- CDRL-1:RASSSVRYIA (SEQ ID NO.75);
- CDRL-2:PTSSLES (SEQ ID NO.79);和
- CDRL-3:LQWSSYPWT (SEQ ID NO.67);
- CDRH-1:KASGYTFTSYHIH (SEQ ID NO.77);
- CDRH-2:WIYPGDDSTKYSQKFQG (SEQ ID NO.78)和
- CDRH-3:GDRFAY (SEQ ID NO.70)。

2. 人AMHR II结合剂在制备用于预防或治疗非妇科癌症的药物中的用途,其中所述非妇科癌症为结肠癌,并且其中所述非妇科癌症在癌细胞表面表达人AMHR II;其中所述人AMHR II结合剂选自由单克隆抗AMHR II抗体及其AMHR II结合片段组成的组;其中所述单克隆抗AMHR II抗体包含含有以下序列的CDR:

- CDRL-1:RASSSVRYIA (SEQ ID NO.75);
- CDRL-2:PTSSLES (SEQ ID NO.79);和
- CDRL-3:LQWSSYPWT (SEQ ID NO.67);
- CDRH-1:KASGYTFTSYHIH (SEQ ID NO.77);
- CDRH-2:WIYPGDDSTKYSQKFQG (SEQ ID NO.78);和
- CDRH-3:GDRFAY (SEQ ID NO.70)。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中,所述人AMHR II结合剂与另一种抗癌治疗组合。

## 用于预防或治疗癌症的AMHR II 结合化合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及癌症治疗领域。

### 背景技术

[0002] 世界人口的主要死亡原因之一是癌症或恶性肿瘤,其中,死亡率排序是肺癌、胃癌、肝癌、结肠直肠癌、乳腺癌和子宫颈癌。仅在美国,所有个人中的三分之一会患上癌症。尽管由于早期诊断和疗法的进步,五年存活率已显著提高了近百分之五十,但在美国,癌症仍然是仅次于心血管疾病的死因。百分之二十的美国人死于癌症,一半是由于肺癌、乳腺癌和结肠直肠癌。此外,皮肤癌仍然对健康有害。

[0003] 为癌症患者设计有效的治疗代表一项重大挑战。手术切除、外部束放射疗法和/或全身性化疗的当前方案在某些类型的恶性肿瘤中已部分成功,但在其他类型的恶性肿瘤中却未取得令人满意的结果。此外,这些方法通常具有不可接受的毒性。

[0004] 放射和手术都遭受相同的理论缺陷。已经认识到,考虑到单个克隆源性的恶性细胞可以产生足够的后代来杀死宿主,必须消灭整个瘤细胞群。通常参见Goodman和Gilman的*The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Pergamon Press,第8版) (第1202-1204页)。“彻底杀死细胞”这一概念意味着,如果要实现治愈,则对于手术方法必须将肿瘤完全切除,并且在放射方法中需要彻底摧毁所有癌细胞。实际上,这几乎是不可能的;实际上,在有转移的情况下,这是不可能的。

[0005] 此外,传统的化学治疗性癌症治疗也很少导致肿瘤完全缓解,并且产生甚至中等响应所需的显著剂量水平通常伴随着不可接受的毒性。抗癌剂通常具有血液学副作用(例如,停止有丝分裂和分解骨髓和淋巴组织中的有形成分)和免疫抑制作用(例如,细胞计数降低),以及对上皮组织(例如,肠粘膜)、生殖组织(例如,精子发生受损)和神经系统的严重影响。P. Calabresi和B. A. Chabner, In: Goodman和Gilman的*The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Pergamon Press,第8版) (第1209-1216页)。高剂量水平和所得的毒性在很大程度上是由抗癌剂本身的靶特异性缺乏所引起的。该药物需要区分癌性的宿主细胞和非癌性的宿主细胞。在这个水平上,绝大多数的抗癌药物都是不加区别的,并且具有明显的固有毒性。抗癌医疗设备最近被称为检查点抑制剂的免疫疗法所丰富。那些产品(抗-PD1、抗-PDL1、抗-CTLA4)能够通过抵消癌细胞逃避免疫监视和杀死细胞的机制来解锁免疫系统。尽管事实是这些产品在多种癌症(如黑素瘤和肺癌)中产生了显著的长期效果,但响应者的比例仍处于中低水平,并且适应症的这个范围仍然相对受限(DM. Pardoll, *Nature Review* 2012)。

[0006] 仍需要对常规手术疗法、放射疗法和化学疗法的可替代疗法或补充抗癌疗法。此类有前途的替代疗法或补充疗法之一在于由通过治疗剂对肿瘤细胞表达的抗原的识别来特异性地靶向癌细胞。在2017年,此类肿瘤细胞特异性的治疗策略主要通过基于抗体的疗法双特异性抗体和基于CAR-T细胞的疗法为例证,其可以经工程化来增加免疫细胞参与,诸如NK和巨噬细胞(如糖-工程化的抗体)或诸如杀灭T-淋巴细胞(如CD3双特异性形式)。抗体

也可以通过处于抗体药物缀合物(ADC)形式的各种细胞毒性剂武装。最后,T细胞本身可以经遗传工程化以直接识别肿瘤细胞并活化TCR信号传导(CAR-T细胞)。那些试剂越有效,对肿瘤选择性靶标的需求增加越多。

[0007] 在过去的15年中,已经建立癌症的基于抗体的疗法,并且该疗法现在是在用于治疗患有血液病学恶性肿瘤和实体瘤的患者的最成功和重要的策略之一。关键的挑战是识别适合于基于抗体的治疗剂的抗原。此类治疗剂可以通过以下起作用:介导抗原或受体功能(诸如激动剂或拮抗剂功能)的改变,调节免疫系统(例如,改变Fc功能和T细胞活化)或递送缀合至靶向特异性抗原的抗体的特异性药物(Van den Eynde, B. J. & Scott, A. M. Encyclopedia of Immunology (编辑Roitt, D. P. J. & Roitt, I. M.) 2424-2431 (Academic Press, 伦敦, 1998), Scott, A. M. 等人 A Phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptor. Proc. Natl Acad. Sci. USA 104, 4071-4076 (2007), Hughes, B. Antibody-drug conjugates for cancer: poised to deliver? Nature Rev. Drug Discov. 9, 665-667 (2010)., Weiner, L. M., Surana, R. & Wang, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Nature Rev. Immunol. 10, 317-327 (2010))。可以改变抗体药代动力学、效应物功能、尺寸和免疫原性的分子技术已成为开发新的基于抗体的疗法的关键要素。来自癌症患者中的抗体的临床试验的证据表明,迭代方法对于选择抗原靶标和最佳抗体(包括抗体的亲和力(affinity)和亲合力(avidity)、抗体构建体的选择、治疗方法(诸如信号传导消除或免疫效应物功能)的重要性以及在早期临床试验中严格检查抗体的药代动力学和药效动力学性质的需要。这篇综述总结了将单克隆抗体(mAb)转化为供人使用的试剂所必需的步骤、抗体在治疗癌症患者中的成功、靶标和构建体选择的挑战、以及免疫系统在抗体疗法中的关键作用。自1986年首次将治疗性单克隆抗体商业化以来,该类生物制药产品已显著增长,因此,截至2014年底,已有47种单克隆抗体在美国或欧洲获得批准,特别是用于治疗癌症。预计到2020年在市场上将有约70种单克隆抗体。

[0008] CAR-T细胞疗法基于制造嵌合性抗原T细胞受体(CAR)。嵌合性抗原受体是经遗传工程化的受体,其将新的特异性移植至免疫效应细胞上。这些通常用于将单克隆抗体的特异性移植至T细胞上。正在研究CAR-T细胞作为癌症的疗法。通常,CAR-T疗法涉及在其细胞膜上表达嵌合性抗原受体的经工程化的T细胞的输注。该受体包括经设计以识别特异性肿瘤抗原的外部靶标结合结构域和当CAR-T结合抗原靶标时负责活化T细胞的内部活化结构域。用于治疗癌症的CAR-T临床试验显示出在严重的癌症形式中高达94%的很大缓解率,这尤其令人印象深刻,考虑到大多数试验招募的患者均未对其癌症形式的所有其他可用治疗做出响应。到2017年为止,已进行了约300项CAR-T临床试验。

[0009] 在本领域中仍然需要用于癌症疗法的其他工具,所述工具可以替代或补充用于治疗特定种类的癌症的现有疗法。

## 发明内容

[0010] 本发明涉及人AMHR II结合剂在用于预防或治疗非妇科癌症的方法中的用途。

[0011] 特别地,本发明涉及人AMHR II结合剂在用于预防或治疗选自包括以下的癌症组的非妇科癌症的方法中的用途:结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀

膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病。结肠癌涵盖结肠直肠癌。肾癌涵盖肾细胞癌。

[0012] 在一些实施方式中,所述人AMHR II结合剂由抗AMHR II单克隆抗体构成。

[0013] 在一些实施方式中,所述人AMHR II结合剂由抗体药物缀合物(ADC)构成。

[0014] 在一些实施方式中,所述人AMHR II结合剂由AMHR II结合工程化受体构成。

[0015] 在一些实施方式中,所述人AMHR II结合剂由表达AMHR II结合工程化受体的细胞构成,该细胞诸如表达AMHR II结合工程化受体的CAR T细胞或NK T细胞。

[0016] 本发明还涉及用于确定个体是否适合于如上限定的使用AMHR II结合剂的癌症治疗(即,个体是否对如上限定的使用AMHR II结合剂的癌症治疗有响应)的方法,其中,所述方法包括确定先前从所述个体获得的肿瘤组织样品是否在细胞表面处表达AMHR II蛋白的步骤。

[0017] 因此,本发明还涉及用于确定个体是否对如上限定的使用AMHR II结合剂的癌症治疗有响应的方法,其中,所述方法包括确定先前从所述个体获得的肿瘤组织样品是否在细胞表面处表达AMHR II蛋白的步骤。

## 附图说明

[0018] 图1示出3C23单克隆抗体的多个变体的VH结构域和VL结构域的氨基酸序列。图1A示出每种抗体变体的VH结构域。图1B示出每种抗体变体的VL结构域。

[0019] 图2示出各种癌细胞系的AMHR II表达。

[0020] 图2A示出癌细胞系的AMHR II mRNA表达。横坐标:从图2A的左至右:HCT116(结肠直肠癌)、COV434-WT(人卵巢粒层细胞肿瘤)、K562(人骨髓性白血病)和OV90(人恶性乳头状浆液性腺癌)。纵坐标:如通过RT-qPCR测定的AMHR II mRNA表达水平,以任意单位(RQ)表示。

[0021] 图2B至图2F:通过与图2A相同的癌细胞系的AMHR II蛋白膜表达:HCT116(图2B), COV434-WT(图2C), K562(图2D), NCI-H295R(图2E)和OV90(图2F)。横坐标:以任意单位表示的荧光信号强度(FL2-A染料)。纵坐标:细胞计数。

[0022] 图3示出在各种人肿瘤原发性组织样品中的AMHR II表面表达。横坐标:癌症类型;图3的左至右:结肠癌、肝癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌。纵坐标:AMHR II阳性指数由AMHR II总体评分 $\geq 1.5$ 定义。通过细胞质评分+膜评分的平均值确定该总组织学评分。这些评分中的每一个都使用频率 $\times$ 强度评分的平均值(0至3)。频率定义为表达AMHR II的细胞的百分比,并且强度通过以下评分系统分类为肿瘤细胞膜或细胞质的明确棕色标记:标记强度定义为0(对于阴性),1(对于弱),2(对于中等)和3(对于强,如COV434阳性对照中所示);位于每个条上方的数字:经测试的人群中相应癌症的AMHR II表达频率。

[0023] 图4示出通过各种人肿瘤异种移植物的AMHR II表面表达。横坐标,图4的左至右:白血病、骨肉瘤、胃肠癌、脑癌、肉瘤、黑素瘤、胸膜间皮瘤、脂肪肉瘤、睾丸癌、结肠癌、肾癌。纵坐标:如以任意单位表示的AMHR II总评分。

[0024] 图5示出3C23K抗体针对PDX模型人肝癌(HCC)的体内抗肿瘤活性。横坐标:如以天表示的治疗开始后的时间段。纵坐标:如以 $\text{mm}^3$ 表示的肿瘤体积。●:媒介物;▲:剂量为20mg/kg的3C23K抗体;■:剂量为50mg/kg的3C23K抗体;▼:使用剂量为50mg/kg的索拉非尼的

对比治疗。纵坐标:如以 $\text{mm}^3$ 表达的肿瘤体积。横坐标:●:媒介物;▲:剂量为20mg/kg的3C23K抗体;■:剂量为50mg/kg的3C23K抗体;▼:剂量为50mg/kg的索拉非尼。

[0025] 图6示出由如PCT申请No.WO 2017/025458中公开的3C23K抗体细胞毒性缀合物(称为GM103)构成的抗体药物缀合物(ADC)针对PDX模型人肝癌(HCC)的体内抗肿瘤活性。横坐标:如以天表示的治疗开始后的时间段。纵坐标:如以 $\text{mm}^3$ 表示的肿瘤体积。●:媒介物;▼:剂量为1mg/kg的GM103ADC;▲:剂量为5mg/kg的GM103 ADC;■:剂量为10mg/kg的GM103 ADC;

[0026] 图7示出如由流式细胞术(FACS)测量的源自患有结肠直肠癌的四名患者的肿瘤样品的肿瘤细胞(图7A;图7B,图7C,图7D)的AMHR II膜表达。横坐标:以任意单位表示的荧光信号强度(FL2-A染料)。纵坐标:细胞计数。在图7A、图7B、图7C、图7D中:(i)左侧峰:用无关的同种型抗体孵育的细胞;(ii)右侧峰:用3C23K抗AMHR II抗体孵育的细胞。

[0027] 图8:示出如通过流式细胞术(FACS)测量的小鼠中四种不同的结肠直肠癌人异种移植物(图8A、图8B、图8C、图8D)的AMHR II膜表达。横坐标:如以任意单位表示的荧光信号强度(FL2-A染料)。纵坐标:细胞计数。在图8A、图8B、图8C、图8D中:(i)左侧峰:用无关的同种型抗体孵育的细胞;(ii)右侧峰:用3C23K抗AMHR II抗体孵育的细胞。

[0028] 图9:示出如通过流式细胞术(FACS)测量的源自患有肾细胞癌的两名患者的肿瘤样品的肿瘤细胞(图9A;图9B)的AMHR II膜表达。横坐标:如以任意单位表示的荧光信号强度(FL2-A染料)。纵坐标:细胞计数。在图9A、图9B中:(i)左侧峰:用无关的同种型抗体孵育的细胞;(ii)右侧峰:用3C23K抗AMHR II抗体孵育的细胞。

[0029] 图10示出抗AMHR II抗体GM102针对人结肠直肠癌(CRC)的PDX模型的体内抗肿瘤活性。横坐标:如以天表示的治疗开始后的时间段。纵坐标:如以 $\text{mm}^3$ 表示的肿瘤体积。•:媒介物;■:剂量为20mg/kg的GM102;▲:剂量为100mg/kg的伊立替康。

## 具体实施方式

[0030] 本发明人出乎意料地表明,AMHR II (AMH受体)在多种非妇科癌症组织的细胞膜处表达。

[0031] 术语“AMHR-II”表示人抗苗勒激素II型受体。人AMHR-II的序列在本文中描述为SEQ ID NO.18(缺少信号肽MLGSLGLWALLPTAVEA(SEQ ID NO:17))。

[0032] 如本文所用,“非妇科”癌症涵盖术语“妇科”癌症未涵盖的任何癌症。

[0033] 如本文所用,“妇科”癌症选自由以下组成的组:卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、妊娠滋养层细胞疾病癌(绒毛膜癌)、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌和输卵管癌。

[0034] 那么,如本文所用,“非妇科”癌症由以下癌症组成:该癌症不由选自由卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、妊娠滋养层细胞疾病癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌和输卵管癌组成的组的癌症组成。

[0035] 如本文所用,术语“PDX”为表述“患者来源的异种移植物”的首字母缩写。患者来源的异种移植物是高度使用的癌症体内模型,尤其是人癌症的体内模型,其中将来自患者肿瘤的组织或细胞植入(即“移植”)到免疫缺陷的非人哺乳动物(例如免疫缺陷小鼠)体内。

[0036] 如本文的示例所示,本发明人发现AMHR II在非妇科癌症组织的细胞膜处表达,可变频率取决于所考虑的非妇科癌症类型。说明性地,如本文的示例中所示,与来源于源自患有头颈癌的患者肿瘤组织的癌细胞相比,AMHR II更频繁地由来源于源自患有肾上腺皮质

癌的患者肿瘤组织的癌细胞表达。这意味着这两种类型的癌症都适合于靶向AMHR11的抗癌治疗,但是此类抗癌治疗对于治疗患有头颈癌的患者是较不频繁地相关的。

[0037] 如本文的示例所示,任何非妇科癌症(例如肝癌、结肠直肠癌或肾癌)都可以通过AMHR11结合剂治疗,前提是来自所述非妇科肿瘤的肿瘤细胞在其膜处表达AMHR11,因此前提是可以根据任何方法检测或确定肿瘤细胞膜处AMHR11蛋白的存在。

[0038] 因此,本文的示例中提供的实验数据表明,相同的AMHR11结合剂(此处为抗AMHR11单克隆抗体)对于治疗多种不同种类的癌症都是有效的,前提是AMHR11靶蛋白在肿瘤细胞膜处表达。

[0039] 顺便提及,在由靶结合分子(例如靶结合抗体)构成的抗癌活性成分的领域中,其中相同活性成分对治疗多种不同癌症有效的情况并非前所未有。说明性地,名为派姆单抗的抗PD1抗体已被美国食品和药品管理局(FDA)授权为可用于治疗多种不同种类的癌症的活性成分,前提是所述癌症共有相同的生理特征。

[0040] 因此,当检测到或以其他形式通过适当的方法确定先前从患有非妇科癌症的个体收集的肿瘤细胞的AMHR11膜表达时,可以用如本文所述的AMHR11结合剂治疗所述个体的所述癌症。

[0041] 在一些实施方式中,在癌细胞的细胞膜处表达AMHR11涵盖了所述癌细胞以给定的可定量水平或以高于所述可定量水平的水平表达AMHR11。

[0042] 因此,根据一些实施方式,通过确定来自先前从患有非妇科癌症的个体收集的样品的非妇科癌细胞是否在其膜处表达AMHR11,可以评估所述个体对AMHR11结合分子治疗的响应性。

[0043] 根据一些实施方式,通过确定来自先前从患有非妇科癌症的个体收集的样品的非妇科癌细胞是否在其膜处高于确定的阈值表达AMHR11,可以评估所述个体对AMHR11结合分子治疗的响应性。

[0044] 可以在一些实施方式中用于确定患有非妇科癌症的患者对AMHR11结合剂(例如抗AMHR11抗体)治疗的响应性的AMHR11膜表达水平可以用多种技术评估,所述多种技术包括(i)在其膜处表达AMHR11的肿瘤样品中包含的肿瘤细胞的百分比,(ii)肿瘤细胞膜处的AMHR11蛋白的平均数量和(iii)经测试的肿瘤细胞样品中包含的肿瘤细胞的FACS AMHR11信号图。

[0045] 根据一些实施方式,当在先前从患有非妇科癌症的个体收集的肿瘤样品中包含的5%或更多的肿瘤细胞中检测到膜AMHR11时,包含在所述肿瘤样品中的癌细胞可以评估为表达膜AMHR11。

[0046] 因此,在一些实施方式中,当在先前从患有非妇科癌症的个体收集的肿瘤样品中包含的5%或更多的肿瘤细胞在其膜处表达AMHR11时,所述个体被确定为对AMHR11结合剂治疗有响应。

[0047] 用于确定表达膜AMHR11蛋白的肿瘤细胞的频率(例如百分比)的方法在本说明书的其他地方公开,包括在本文的示例中。

[0048] 根据一些实施方式,通过确定先前从患有非妇科癌症的患者收集的肿瘤样品中包含的肿瘤细胞膜处存在的AMHR11蛋白的平均数量,可以评估所述患者对AMHR11结合剂(例如抗AMHR11抗体)的癌症治疗的响应性。

[0049] 在一些实施方式中,当先前从患有非妇科癌症的患者收集的肿瘤样品中包含的肿瘤细胞表达的膜AMHR II蛋白的平均数量具有10000个AMHR II蛋白或更多时,所述患者可以归类为对AMHR II结合剂治疗有响应,例如对抗AMHR II抗体治疗有响应。

[0050] 可以通过使用常规方法进行在肿瘤细胞膜处表达的AMHR II蛋白的数量的评估,所述常规方法包括:(a)将含有来自先前从患者收集的肿瘤组织样品的细胞的样品与特异性结合AMHR II蛋白的可检测化合物(诸如荧光标记的抗AMHR II抗体)孵育的步骤,和另外的(b)确定与来自所述样品的每个测试细胞结合的所述可检测化合物的数量(例如,荧光标记的抗AMHR II抗体的数量)的步骤。如在本文的示例中显示的,评估肿瘤细胞膜处表达的AMHR II蛋白的数量可以例如通过使用众所周知的荧光激活细胞分选(FACS)技术来进行。

[0051] 在另外的其他实施方式中,通过分析先前从患有非妇科癌症的患者收集的肿瘤样品中包含的肿瘤细胞的AMHR II FACS曲线,可以将所述患者归类为对AMHR II结合剂治疗有响应,例如归类为对抗AMHR II抗体治疗有响应。

[0052] 根据这些其他实施方式,在荧光激活细胞分选(FACS)的方法中,当(i)用抗AMHR II荧光标记的抗体孵育的肿瘤细胞的平均荧光强度与(ii)用同种型荧光标记的抗体孵育的肿瘤细胞获得的平均荧光强度(MFI)值的比率为1.5或更大时,可以将患有非妇科癌症的患者归类为对AMHR II结合剂治疗有响应,例如归类为对抗AMHR II抗体治疗有响应。

[0053] 为了确定所述平均荧光强度比率,同种型抗体和抗AMHR II抗体都用相同的荧光剂(诸如赛默飞世尔科学公司(Company ThermoFisher Scientific)出售的Alexa Fluor 488染料)标记,如本文的示例所示。

[0054] 在一些另外的实施方式中,通过计算允许区分(i)来源于可以用AMHR II结合剂治疗的癌症的表达膜AMHR II的癌细胞和(ii)来源于不可以用AMHR II结合剂治疗的癌症的表达膜AMHR II的癌细胞的AMHR II表达评分,可以确定非妇科癌症个体对AMHR II结合剂治疗的响应性。

[0055] 因此,本发明人已经确定特别适合于使用本文所述的AMHR II结合剂的癌症治疗的患有本文所述的非妇科癌症的患者(即,特别是对使用本文所述的AMHR II结合剂的癌症治疗有响应的患者)涵盖了具有在细胞膜处以足够用于组成待破坏的相关细胞靶标的高水平表达AMHR II的癌症肿瘤的那些患者。

[0056] 然后,根据这些进一步的实施方式,本发明人已经确定在来自非妇科癌症患者的癌细胞样品中测量的最小AMHR II表达水平可以证实所述患者对使用AMHR II结合剂的治疗有响应,因此可以通过本文所述的AMHR II结合剂治疗所述患者。

[0057] 因此,当通过测定(i)表达膜AMHR II的肿瘤细胞的频率(例如在其膜处表达AMHR II的肿瘤细胞的百分比)和(ii)所述肿瘤细胞的AMHR II膜表达的水平(例如每细胞的膜AMHR II蛋白的平均数量)来评估先前从患有非妇科癌症的个体收集的样品中包含的癌细胞的AMHR II表达水平时,还可以确定所述个体对使用AMHR II结合剂的治疗的响应性。

[0058] 因此,在这些另外的实施方式的一些实施方式中,在先前从患有非妇科癌症的患者收集的肿瘤细胞的样品中,所述患者对人AMHR II结合剂(例如对抗人AMHR II抗体)的响应性可以通过测定以下来评估:(i)所述样品中包含的肿瘤细胞在其膜处具有最少平均数量的人AMHR II蛋白以及(ii)在其膜处表达人AMHR II的细胞的频率(例如在其膜处表达人AMHR II的细胞的百分比)如果至少为阈值。

[0059] 因此,本文还描述了另一种方法,该方法也可以用于确定特定的AMHR II表达评分值,以允许区分(i)不适合使用AMHR II结合剂的癌症治疗的非妇科癌症患者(即,对用AMHR II结合剂的癌症治疗无响应的非妇科癌症患者)和(ii)适合使用AMHR II结合剂的癌症治疗的非妇科癌症患者(即,对用AMHR II结合剂的癌症治疗有响应的非妇科癌症患者)。

[0060] 更精确地,根据上述方法的实施方式,患有本文所述的非妇科癌症并且可以针对癌症用如本说明书所述的AMHR II结合剂来治疗的患者优选为已确定AMHR II表达评分为1.0或更大的那些患者,这包括已确定AMHR II表达评分为1.5或更大的那些患者。

[0061] 膜AMHR II表达评分可以基于所测试的癌细胞的AMHR II表达的免疫组织化学评价,并且其中,(i)如果未检测到AMHR II表达,则给定癌细胞样品的个体膜AMHR II评分被指定为0,(ii)如果检测到显著的AMHR II表达,则给定癌细胞样品的个体膜AMHR II评分被指定为1,(iii)如果检测到高的AMHR II表达,则给定癌细胞样品的个体膜AMHR II评分被指定为2,和(iv)如果检测到AMHR II的过表达,则给定癌细胞样品的个体膜AMHR II评分被指定为3。

[0062] 实际上,在(i)通过上述免疫组织化学评价指定给膜AMHR II表达水平的评分与(ii)每个癌细胞表达的AMHR II蛋白的平均数量之间存在关系。在本文的示例中显示,从先前从患有非妇科癌症的患者收集的肿瘤细胞的样品开始,通过确定每个细胞的膜AMHR II蛋白的平均数量,也可以评估使得能够指定个体膜AMHR II评分的膜AMHR II表达水平。

[0063] 根据确定患有非妇科癌症的个体对用AMHR II结合剂的治疗(即,对用抗AMHR II抗体的治疗)的响应性的以上实施方式,对于给定的癌细胞样品,通过考虑以下两者测定膜AMHR II表达评分:(i)所述癌细胞样品中AMHR II表达细胞的频率和(ii)所述AMHR II表达细胞的AMHR II表达的水平。通常,给定的癌细胞样品的AMHR II表达评分由下式(I)确定:

[0064]  $E\text{评分} = \text{频率} \times \text{AMHR II\_水平}$ ,其中

[0065] -E评分意指给定的癌细胞样品的AMHR II表达评分值,

[0066] -频率意指针对检测到膜AMHR II表达的所述癌细胞样品中包含的细胞的频率,和

[0067] -AMHR II-水平意指所述给定的癌细胞样品中包含的AMHR II表达细胞的AMHR II表达的水平。

[0068] 说明性地,给定的癌细胞样品的E评分确定为1.0,其中(i)50%的细胞表达AMHR II(频率值为0.5),并且(ii)AMHR II表达水平(AMHR II\_水平)为2。

[0069] 在优选的实施方式中,AMHR II表达评分(或E评分)通过如本文的示例所示的免疫组织学方法确定。根据这些优选的实施方式,通过使用对AMHR II有特异性的可检测抗体并通过(i)确定结合有所述抗AMHR II抗体的细胞的频率和(ii)确定由所述可检测的抗AMHR II抗体在结合至膜表达的AMHR II之后产生的信号的强度来评估AMHR II膜表达。

[0070] 尽管,如本文的示例所示,对于各种癌症已经确定了具有1.5或更大的AMHR II表达评分的AMHR II表达癌细胞,尽管频率不同。说明性地,本发明人已在本文中显示将来源于结肠肿瘤的癌细胞归类为AMHR II阳性(即,AMHR II评分为1.5或更大),其频率高于来源于头颈癌的癌细胞。

[0071] 为了确定AMHR II膜表达的水平,检测在细胞膜处的AMHR II应该最优选通过使用对AMHR II具有高亲和力和高特异性的抗AMHR II单克隆抗体来进行,该抗AMHR II单克隆抗体在示例中由3C23K抗AMHR II单克隆抗体来说明。

[0072] 此外,考虑到确定AMHR II评分,通过免疫组织化学方法确定AMHR II表达最优选涉

及在使组织样品与适当的检测试剂(例如高亲和力抗AMHR II单克隆抗体,诸如单克隆3C23K抗体,对于结合至AMHR II具有55.3pM的Kd值)接触之前仔细的预处理所述样品。样品预处理应允许增加在细胞表面处表达的AMHR II分子的检测试剂的利用率。说明性地,如本文的示例中所示,染色方法可以包括诸如以下的特定步骤的适当组合:(i)通过暴露于微波源的高温脱蜡和(ii)用于放大由可以随后与链霉亲和素缀合的可检测试剂复合的AMHR II结合试剂(诸如生物素化的抗AMHR II抗体)的结合产生的信号的系统。由于先前的组织固定步骤,预处理脱蜡步骤对于逆转检测信号消光效应似乎很重要。本发明人已经表明,AMHR II可检测性对用于组织固定步骤的福尔马林的作用是特别灵敏的。

[0073] 在本发明的上下文中,这意味着AMHR II结合剂(诸如抗AMHR II抗体)将是有用的治疗剂,其用于治疗患有结肠癌的患者频率高于用于治疗患有头颈癌的患者频率。这也意味着,尽管AMHR II结合剂可能是用于治疗患有头颈癌的患者相关治疗剂,但优选是先测试肿瘤来源的癌细胞的AMHR II表达,以决定特定的患者将施用如本文所述的AMHR II结合剂。

[0074] 此外,本发明人已经表明抗AMHR II抗体可以有利地用于治疗那些非妇科癌症。

[0075] 因此,本发明人在本文中已经表明,靶向AMHR II的药剂可用作预防或治疗非妇科癌症的新型治疗工具。

[0076] 根据本发明,诸如在“包括以下步骤”中的表述“包括”也理解为“由以下组成”,诸如“由以下步骤组成”也理解为“由以下组成”,诸如“由以下步骤组成”。

[0077] AMH受体(AMHR或AMHR2或AMHR II)是具有单个跨膜结构域的丝氨酸/苏氨酸激酶,属于TGF- $\beta$ -相关蛋白的II型受体家族。II型受体本身结合配体,但需要存在I型受体才能用于信号转导。Imbeaud等人(1995,Nature Genet,第11卷:382-388)克隆了人AMH II型受体基因。人AMH受体蛋白由573个氨基酸构成:这573个氨基酸中的17个氨基酸、127个氨基酸、26个氨基酸和403个氨基酸分别形成信号序列、胞外结构域(ECD)、跨膜结构域和胞内结构域(含有丝氨酸/苏氨酸激酶结构域)。

[0078] 如本文所用,术语“AMHR II”是指具有SEQ ID NO.17的氨基酸序列的人抗苗勒激素II型受体。

[0079] 抗苗勒激素受体(AMHR II)的表达已在本领域中描述于妇科癌症(即,大部分被免疫髓样细胞浸润的肿瘤)中。AMHR II已被鉴定为用于治疗妇科癌症的靶分子。针对AMHR II的抗体已作为用于治疗这些癌症的治疗性工具产生。可以特别引用在PCT申请No.WO 2008/053330和No.WO 2011/141653中描述的用于治疗卵巢癌的12G4抗AMHR II抗体及其变体,以及PCT申请中描述的3C23K抗AMHR II抗体。还可以提及PCT申请No.WO 2017/025458,其公开了通过使用抗AMHR II抗体药物缀合物来针对卵巢癌的具体治疗策略。

[0080] 本发明人现已出乎意料地发现,AMHR II在各种人癌细胞的表面处表达,该癌细胞包括结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病。本发明人还发现(i)癌细胞的AMHR II基因表达和(ii)相同癌细胞的细胞膜AMHR II蛋白表达之间没有关系。

[0081] 本发明人关于人癌细胞的AMHR II表面表达的发现尤其来自使用抗AMHR II抗体的免疫组织化学测试,所述免疫组织化学测试通过使用先前从癌症患者获得的人实体瘤组织

样品进行。本发明人关于人癌细胞的AMHR II表面表达的发现也是从用抗AMHR II抗体的免疫组织化学测试获得的,所述免疫组织化学测试在小鼠中对源自人原代癌细胞异种移植物的肿瘤组织样品进行。

[0082] 本发明人还显示抗AMHR II抗体可用于治疗在肿瘤细胞表面处表达AMHR II的非妇科人癌症,尤其是本说明书中公开的那些表达AMHR II的癌症。值得注意的是,包含与细胞毒性分子缀合的抗AMHR II抗体的免疫缀合物已显示出良好的抗癌活性。

[0083] 本发明人已经表明,在本领域中已经证明对表达AMHR II的妇科癌症具有抗肿瘤功效的抗AMHR II抗体也可用于预防或治疗表达AMHR II的非妇科癌症,尤其是本说明书中公开的那些表达AMHR II的癌症。

[0084] 更精确地,在本文的示例中显示,称为3C23K的抗AMHR II抗体在体内发挥针对人肝癌的抗肿瘤活性。重要的是,抗AMHR II 3C23K抗体针对人肝癌的体内抗肿瘤活性与索拉非尼的数量级相同,索拉非尼是用于治疗肝癌、尤其是肝细胞癌的众所周知的抗癌剂。

[0085] 更进一步,本文的示例还显示抗AMHR II 3C23K抗体在体内不诱导可检测到的毒性事件,而在相同体内条件下用索拉非尼治疗引起显著的体重减轻。

[0086] 更进一步,如本文所公开的,抗AMHR II 3C23K抗体的毒性免疫缀合物衍生物(ADC表示抗体药物缀合物)针对在细胞表面处表达AMHR II蛋白的癌症发挥良好的抗癌活性。

[0087] 因此,本发明涉及人AMHR II结合剂用于预防或治疗选自包括结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病的癌症组的癌症的用途。

[0088] 本发明还涉及人AMHR II结合剂用于制备用于预防或治疗选自包括结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病的癌症组的癌症的药剂的用途。

[0089] 本发明还涉及用于预防或治疗选自包括结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病的癌症组的癌症的方法,其中,所述方法包括向有需要的个体施用如本说明书中公开的AMHR II结合剂的步骤。

[0090] 可以根据本发明使用的AMHR II结合剂不需要模拟MIS天然配体活性。因此,可以根据本发明使用的AMHR II结合剂在结合至AMHR II之后不需要活化任何细胞信号传导途径。相反,仅需要所述试剂具有与AMHR II结合的能力,因为所述试剂专门用于靶向诱导细胞毒性的活性(诸如细胞毒性诱导实体),其涵盖抗AMHR II细胞毒性免疫缀合物、ADCC诱导的抗AMHR II抗体或ADC诱导的抗AMHR II抗体或表达AMHR II结合工程化受体的CAR T细胞。

[0091] AMHR II结合剂

[0092] 如本文所用,AMHR II结合剂涵盖特异性结合至AMHR II并且当以适当的方式呈递时将引起在试剂结合细胞膜表达的AMHR II之后在其表面处表达AMHR II的靶细胞死亡的任何所述试剂。

[0093] 如本文所述的用于治疗癌症的AMHR II结合剂在本文中也可以称为“治疗性AMHR II结合剂”。

[0094] 通常,AMHR II结合剂涵盖特异性结合至AMHR II的蛋白或核酸。

[0095] AMHR II结合蛋白主要涵盖包括来源于抗AMHR II抗体或抗AMHR II抗体的AMHR II结合片段的一个或多个互补决定区(CDR)的蛋白,应理解所述AMHR II结合蛋白可以由工程化细胞(诸如CAR-T细胞、CAR NK T细胞或CAR巨噬细胞)表达为嵌合性抗原受体(CAR)。

[0096] AMHR II结合核酸主要涵盖针对其与AMHR II的特异性结合性质而特别选择的核酸适体。

[0097] 在一些优选的实施方式中,AMHR II结合剂是抗AMHR II抗体或其AMHR II结合片段。

[0098] 在最优选的实施方式中,AMHR II结合剂是抗AMHR II单克隆抗体或其AMHR II结合片段。

[0099] 根据这些优选的实施方式,抗AMHR II单克隆抗体涵盖嵌合性抗AMHR II抗体、人源化抗AMHR II抗体和人AMHR II抗体,以及其AMHR II结合片段和AMHR II结合衍生物。

[0100] 各种AMHR II抗体是本领域已知的,并且可以根据本发明用作AMHR II结合剂。出于实施本发明的目的,本领域技术人员可以使用用于示例的由Creative Biolabs出售的编号为No.MHH-57的重组人抗AMHR II。

[0101] 在一些实施方式中,可以根据本发明使用的抗AMHR II抗体是PCT申请No.WO 2008/053330中公开的人源化12G4抗体。

[0102] 在一些其他实施方式中,所述抗AMHR II抗体是PCT申请No.WO 2011/141653中描述的人源化抗体,所述人源化抗体涵盖3C23抗体及其变体,所述其变体包括3C23K人源化抗体。

[0103] 在更进一步的实施方式中,所述抗AMHR II抗体是PCT申请No.WO 2017/025458中描述的那些。根据这些另外的实施方式,PCT申请No.WO 2017/025458公开了抗体药物缀合物(ADC)形式的AMHR II结合剂,其中,所述抗AMHR II抗体连接至细胞毒性剂。

[0104] 在本领域中已经开发了针对苗勒激素II型受体(及其人源化衍生物)的单克隆抗体用于治疗卵巢癌(参见EP 2097453B1和美国专利No.8,278,423,其在此通过引用整体并入)。

[0105] 在可以根据本发明使用的AMHR II结合剂中,本领域技术人员可以使用单克隆抗体12G4(mAb 12G4)或其嵌合性变体或人源化变体,包括用药物或可检测标记衍生而来以形成ADC的抗体。产生mAb 12G4的杂交瘤根据2006年9月26日的布达佩斯条约条款保藏在国家微生物菌种保藏中心(CNCM,巴斯德研究所,法国75724巴黎第15区克鲁斯博士大街25号),并且CNCM保藏号为1-3673。已经将mAb 12G4的轻链和重链的可变结构域测序为mAb 12G4的互补决定区(CDR)(参见EP 2097453B1和美国专利No.8,278,423,其在此通过引用整体并入)。mAb 12G4及其嵌合性变体或人源化变体可以用于产生如本文公开的ADC。

[0106] PCT申请No.PCT/FR2011/050745(国际公开No.WO/2011/141653)和美国专利No.9,012,607(其各自在此通过引用整体并入)公开了来源于鼠12G4抗体的新型人源化抗体。出于本发明的目的,这些人源化抗体可以用作AMHR II结合剂。在PCT申请No.WO/2011/141653中公开的具体实施方式中,抗体是鉴定为3C23和3C23K的那些抗体。这些抗体的核酸序列和多肽序列在本文中SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:16提供。在本发明的一些方面,感兴趣的抗AMHR II抗体可以称为“包括包含SEQ ID NO:的轻链和包含SEQ ID NO:的重链”。因此,在各种实施方式中,特别优选的抗体(包括用于产生ADC的抗体)包括:

[0107] a) 包含SEQ ID NO:2的轻链和包含SEQ ID NO:4的重链(无先导序列(leader)的

3C23VL序列和3C23 VH序列)；

[0108] b) 包含SEQ ID NO:6的轻链和包含SEQ ID NO:8的重链(无先导序列的3C23K VL序列和3C23K VH序列)；

[0109] c) 包含SEQ ID NO:10的轻链和包含SEQ ID NO:12的重链(无先导序列的3C23轻链和3C23重链)；

[0110] d) 包含SEQ ID NO:14的轻链和包含SEQ ID NO:16的重链(无先导序列的3C23K轻链和3C23K重链)。

[0111] 其他抗体(例如,人源化抗体或嵌合性抗体)可以基于图1A和图1B中提供的重链序列和轻链序列(例如,抗体,诸如含有所述图内公开的人源化抗体或嵌合性抗体)可以用作感兴趣的抗AMHR II结合剂,包括用于形成ADC的抗体。因此,本发明还涉及包括包含/含有以下序列(或由以下序列组成)的CDR的抗AMHR II抗体的用途:

[0112] -CDRL-1:RASX1X2VX3X4X5A(SEQ ID NO.65),其中X1和X2独立地是S或P、X3是R或W或G、X4是T或D、并且X5是I或T;

[0113] -CDRL-2是PTSSLX6S(SEQ ID NO.66),其中X6是K或E;和

[0114] -CDRL-3是LQWSSYPWT(SEQ ID NO.67);

[0115] -CDRH-1是KASGYX7FTX8X9HIH(SEQ ID NO.68),其中X7是S或T、X8是S或G、并且X9是Y或N;

[0116] -CDRH-2是WIYPX10DDSTKYSQKFQG(SEQ ID NO.69),其中X10是G或E;和

[0117] -CDRH-3是GDRFAY(SEQ ID NO.70)。

[0118] 本发明还涉及使用此类抗AMHR II抗体产生的ADC用于治疗本文指定的非妇科癌症的用途。

[0119] 在本申请的范围内的抗体(例如,嵌合性抗体或人源化抗体)包括下表中公开的那些:替选地,特异性结合至AMHR-II的人单克隆抗体可以用于制备ADC。3C23K抗体由以下限定:

[0120] -对于VH氨基酸序列的SEQ ID NO:19,

[0121] -对于VL氨基酸序列的SEQ ID NO:36。

[0122] 下表1列出了可以根据本发明使用的抗AMHR II人源化抗体。

[0123] 表1:抗AMHR II抗体

[0124]

抗体	突变			
	VH 突变	序列表 中的 SEQ ID	VL 突变	序列表 中的 SEQ ID
3C23K		19		36
3C23		19	L-K55E	37
3C23KR	H-R3Q	20		36
6B78	H-R3Q	20	L-T48I, L-P50S	38
5B42	H-R3Q, H-T73A	21	L-T48I, L-K55E	39
K4D-24	H-Q1R	22		36
6C59	H-Q1R	22	L-S27P, L-S28P	40
K4D-20	H-Y32N	23		36
K4A-12	H-A16T	24		36
K5D-05	H-S31G	25		36
K5D-14	H-T28S	26		36
K4D-123	H-R44S	27		36
K4D-127	H-I69T	28		36

[0125]

抗体	突变			
	VH 突变	序列表 中的 SEQ ID	VL 突变	序列表 中的 SEQ ID
6C07	H-I69T	28	L-M4L, L-T20A	41
5C14	H-I69F	29		36
5C26	H-V67M	30	L-S27P	42
5C27	H-L45P	31		36
5C60	H-E10K, H- K12R	32		36
6C13	H-G53E	33		36
6C18	H-T93A	34		36
6C54	H-S84P	35	L-M4L, L-S9P, L- R31W	43
K4D-25		19	L-M4L	44
K4A-03		19	L-I33T	45
K4A-08		19	L-M4L, L-K39E	46
K5D-26		19	L-T22P	47
5C08		19	L-Y32D	48
5C10		19	L-S27P	42
5C18		19	L-Q37H	49
5C42		19	L-G97S	50
5C44		19	L-S12P	51
5C52		19	L-19A	52
5C56		19	L-T72A	53
6C03		19	L-R31W	54
6C05		19	L-M4L, L-M39K	55
6C16		19	L-I2N	56

抗体	突变			
	VH 突变	序列表 中的 SEQ ID	VL 突变	序列表 中的 SEQ ID
6C17		19	L-G63C, L-W91C	57
6C28		19	L-R31G	58
725C02		19	L-I75F	59
[0126] 725C17		19	L-I2T	60
725C21		19	L-I2T, L-K42R	61
725C33		19	L-Y49H	62
725C42		19	L-M4L, L-T20S, L- K39E	63
725C44		19	L-S27P	42
725C57		19	L-T69P	64

[0127] 抗AMHRH抗体、抗AMHRH抗体的AMHRH结合片段或AMHRH结合衍生物术语“抗体”以最广泛的意义使用,并且包括单克隆抗体(包括全长或完整单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段(见下文),只要它们表现出所期望的生物活性。

[0128] 因此,如本文所用,术语“抗体”统称指代免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子,以举例的方式包括但不限于IgA、IgD、IgE、IgG、以及IgM、其组合以及在任何脊椎动物(例如,哺乳动物,诸如人、山羊、兔和小鼠,以及非哺乳动物物种)中免疫应答期间产生的类似分子(诸如鲨鱼免疫球蛋白)。除非另有特别说明,否则术语“抗体”包括完整的免疫球蛋白和“抗体片段”或“抗原结合片段”,其特异性结合至AMHRH,基本上排除了与其他分子(即与AMHRH不相关的分子)的结合。术语“抗体”还包括经遗传工程化的形式,诸如嵌合性抗体(例如,人源化鼠抗体)、异源缀合物抗体(诸如,双特异性抗体)。还参见Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,111.);Kuby,J.,Immunology,第7版,W.H.Freeman&Co.,纽约,2013。

[0129] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上均质的抗体群体获得的抗体,即包括所述群体的各个抗体除了可能少量存在的天然存在的突变之外是相同的。单克隆抗体针对单个抗原是高度特异性的。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”不应解

释为要求通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明待使用的单克隆抗体可以通过首先由Kohler等人,Nature 256:495 (1975)描述的杂交瘤方法制备,或可以由重组DNA方法制备(参见,例如美国专利No.4,816,567)。“单克隆抗体”还可以从噬菌体抗体文库使用例如Clackson等人,Nature 352:624-628 (1991)或Marks等人,J.Mol Biol.222:581-597 (1991)描述的技术分离。

[0130] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分并且是指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段和Fv片段,直链抗体,scFv抗体,以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0131] 如本文所用的“抗体重链”是指以其天然存在的构象的所有抗体分子中存在的两种类型的多肽链中的较大者。

[0132] 如本文所用的“抗体轻链”是指以其天然存在的构象的所有抗体分子中存在的两种类型的多肽链中的较小者, $\kappa$ 轻链和 $\lambda$ 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0133] 如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”是指识别和结合至特定抗原的抗体的两条可变链(重链和轻链)的部分。CDR是可变链的最可变部分,并为抗体提供其特异性。可变重(VH)链和可变轻(VL)链的每个上都有三个CDR,因此每个抗体分子总共有六个CDR。CDR主要负责与抗原的表位结合。每条链的CDR通常称为从N末端开始依次编号的CDR1、CDR2和CDR3,并且通常还由特定CDR所在的链来鉴定。因此,VHCDR3位于发现它的抗体重链的可变结构域中,而VLCDR1是来自发现它的抗体轻链的可变结构域的CDR1。结合LHR的抗体将具有特定的VH区序列和VL区序列,因此具有特定的CDR序列。具有不同特异性(即针对不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的CDR。尽管CDR随抗体的不同而不同,但CDR中只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。CDR中的这些位置称为特异性决定残基(SDR)。

[0134] “框架区”(以下称为FR)是不同于CDR残基的那些可变结构域残基。每个可变结构域通常具有被鉴定为FR1、FR2、FR3和FR4的四个FR。如果CDR是根据Kabat定义的,则轻链FR残基大约位于残基1-23(LCFR1)、残基35-49(LCFR2)、残基57-88(LCFR3)和残基98-107(LCFR4),重链FR残基大约位于重链残基中的残基1-30(HCFR1)、残基36-49(HCFR2)、残基66-94(HCFR3)和残基103-113(HCFR4)。

[0135] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包括抗体的VH结构域和VL结构域,其中,这些结构域存在于单个多肽链中。通常,Fv多肽还包括在VH结构域和VL结构域之间的多肽接头,这使得scFv可以形成所期望的抗原结合结构。有关scFv的综述,请参见Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编辑Springer-Verlag,纽约,第269-315页(1994)。

[0136] 术语“双链抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包括与同一多肽链(VH和VL)中的轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用太短而无法在同一条链上的两个结构域之间配对的接头,结构域被迫与另一条链的互补结构域配对,并形成两个抗原结合位点。双链抗体在例如EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)中更详细地描述。

[0137] 双链抗体或双特异性抗体可以大致分为两类:免疫球蛋白G(IgG)样分子和非IgG样分子。IgG样bsAb保留了Fc介导的效应子功能,诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)(Spiess等人,2015,Mol

Immunol.,第67(2)卷:95-106)。bsAb的Fc区有助于纯化并改善溶解度和稳定性。IgG样形式的双特异性抗体通常具有更长的血清半衰期,这是因为其尺寸较大以及FcRn介导的再循环(Kontermann等人,2015,Bispecific antibodies.Drug Discov Today,第20(7)卷:838-47)。非IgG样bsAb的尺寸较小,导致组织渗透性增强(Kontermann等人,2015,Bispecific antibodies.Drug Discov Today第20(7)卷:838-47)。

[0138] 根据一些优选的实施方式,根据本发明的双特异性抗体包括:(i)结合至AMHR II的第一抗原结合位点,和(ii)结合至不同于AMHR II的靶抗原、特别是可以由肿瘤环境的癌细胞或免疫细胞(诸如T细胞、NK或巨噬细胞)表达的靶抗原的第二抗原结合位点。在一些实施方式中,在此类双特异性抗体中,所述第二抗原结合位点结合至靶抗原(其是CD3)并且使T细胞接合。该靶抗原还可以是PDL1以解锁T细胞、或是CD16以活化NK或巨噬细胞。

[0139] 本文指定的单克隆抗体特别包括“嵌合性”抗AMHR II抗体(免疫球蛋白),其中一部分的重链和/或轻链与来源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与来源于另一物种或属于另一种抗体类别或亚类的抗体以及此类抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要它们展现出所期望的生物活性(美国专利No.4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。

[0140] 本文指定的单克隆抗体也涵盖人源化抗AMHR II抗体。“人源化”形式的非人(例如,鼠)抗体是含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合性抗体。在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(接受者抗体),其中来自接受者高变区的残基被具有所期望的特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体,诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物)的高变区的残基所取代。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可能包含在接受者抗体或供体抗体中找不到的残基。这些修饰是为了进一步完善抗体性能进行的。通常,人源化抗体将包含至少一个、通常是两个可变结构域中的基本上所有,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,并且所有或基本上所有的FR区都是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的至少一部分。对于另外的细节,请参见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。

[0141] 本文指定的单克隆抗AMHR II抗体还涵盖抗AMHR II人抗体。“人抗体”是具有与由人产生的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列和/或使用如本文公开的任何一种用于制备人抗体的技术制成的人抗体。人抗体的该定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可以使用本领域已知的各种技术来生产。在一个实施方式中,人抗体选自噬菌体文库,其中噬菌体文库表达人抗体(Vaughan等人,Nature Biotechnology 14:309-314(1996);Sheets等人,Proc.Natl.Acad.Sci.95:6157-6162(1998));Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol,222:581(1991))。人抗体也可以通过将人免疫球蛋白基因座引入内源性免疫球蛋白基因已部分或完全失活的转基因动物(例如,小鼠)中制成。激发后,观察到人抗体产生,在各个方面都与在人中所见非常相似,包括基因重排、组装和抗体谱。该方法描述于例如美国专利No.5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016和以下科学出版物中:Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:

812-13 (1994); Fishwild等人, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); Lonberg和Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)。替选地, 人抗体可以经由产生针对靶抗原的抗体的人B淋巴细胞的永生化来制备 (此类B淋巴细胞可以从个体回收或可以在体外免疫)。参见, 例如Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77页 (1985); Boerner等人, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991); 和美国专利No. 5,750,373。

[0142] 如本文所用, “抗体突变体”或“抗体变体”是指物种依赖性抗体的氨基酸序列变体, 其中, 物种依赖性抗体的氨基酸残基中的一个或多个已经被修饰。此类突变体必须与物种依赖性抗体具有小于100%的序列同一性或类似性。在一个实施方式中, 抗体突变体将具有与物种依赖性抗体的重链可变结构域或轻链可变结构域的氨基酸序列具有至少75%、更优选至少80%、更优选至少85%、更优选至少90%和最优选至少95%的氨基酸序列同一性或类似性的氨基酸序列。关于该序列的同一性或类似性在本文中定义为在比对序列和引入空位 (如有必要) 以达到最大序列同一性百分比之后, 候选序列中与物种依赖性抗体残基相同 (即相同残基) 或相似 (即来自相同基团的氨基酸残基, 基于共同的侧链性质, 参见下文) 的氨基酸残基的百分比。N末端、C末端或内部延长、缺失或插入可变结构域外部的抗体序列均不得解释为影响序列同一性或类似性。

[0143] 人源化抗体可以通过获得编码CDR结构域的核酸序列并根据本领域已知技术构建人源化抗体来产生。用于基于常规重组DNA和基因转染技术产生人源化抗体的方法是本领域众所周知的 (参见, 例如Riechmann L.等人, 1988; Neuberger M S.等人, 1985)。抗体可以使用本领域已知的多种技术人源化, 所述技术包括例如CDR-移植 (EP 239,400; PCT公开W091/09967; 美国专利No. 5,225,539; 5,530,101; 和5,585,089)、镶饰 (veneering) 或表面重塑 (resurfacing) (EP 592,106; EP 519,596; Padlan E A (1991); Studnicka G M等人 (1994); Roguska MA.等人, (1994)) 和链更替 (shuffling) (美国专利No. 5,565,332)。用于制备此类抗体的通用重组DNA技术也是已知的 (参见欧洲专利申请EP 125023和国际专利申请WO 96/02576)。

[0144] 可能期望修饰本文关于效应子功能指定的抗AMHR II抗体, 例如以增强抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。这可以通过在抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸取代基来实现。替选地或另外地, 可以在Fc区中引入半胱氨酸残基, 从而使该区域内链间二硫键形成。由此产生的同二聚体抗体可以具有改善的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。参见Caron等人, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) 和Shopes, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992)。还可以使用异双功能性交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体, 如Wolff等人, *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993) 中描述的。替选地, 抗体可以是经工程化的, 其具有双Fc区并因此可以具有增强的补体裂解和ADCC能力。参见Stevenson等人, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。W000/42072 (Presta, L.) 描述了在人效应细胞存在下具有改善的ADCC功能的抗体, 其中该抗体包含在其Fc区中的氨基酸取代。优选地, 具有改善的ADCC的抗体包括在Fc区的位置298、333和/或334 (残基的Eu编号) 处的取代。优选地, 改变的Fc区是包含在这些位置的一个、两个或三个处的取代或由在这些位置的一个、两个或三个处的取代构成的人IgG1 Fc区。此类取代任选地与增加CIq结合和/或CDC的取代组合。

[0145] 具有改变的CIq结合和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的抗体描述于W099/51642、美国专利No.6,194,551B1、美国专利No.6,242,195B1、美国专利No.6,528,624B1和美国专利No.6,538,124 (Idusogie等人)中。抗体包含在其Fc区的氨基酸位置270、322、326、327、329、313、333和/或334(残基的Eu编号)中的一个或多个处的氨基酸取代。

[0146] 在一些实施方式中,AMHR II结合剂涵盖糖工程化的抗AMHR II抗体。

[0147] 如本文所用,术语“糖工程化”是指用于改变结合蛋白组合物的糖型谱(glycoform profile)的任何本领域公认的方法。这样的方法包括在经遗传工程化以表达异源糖基转移酶或糖苷酶的经遗传工程化的宿主细胞(例如,CHO细胞)中表达结合蛋白组合物。在其他实施方式中,糖工程化方法包括在偏向特定糖型谱的条件下培养宿主细胞。

[0148] 如本文所用,“糖工程化的抗体”涵盖(i)包含高半乳糖基化的Fc片段的抗体,(ii)包含低甘露糖基化的Fc片段(其涵盖甘露糖基化的Fc片段)的抗体,和(iii)包含低岩藻糖基化的Fc片段(其涵盖岩藻糖基化的Fc片段)的抗体。如本文所用,糖工程化的片段涵盖具有改变的糖基化的Fc片段,其选自包括以下改变的糖基化中的一个或多个的组:(i)高半乳糖基化,(ii)低甘露糖基化和(iii)低岩藻糖基化。结果,来自如根据本发明使用的抗AMHR II抗体的糖工程化的Fc片段涵盖高半乳糖基化的Fc片段、低甘露糖基化的Fc片段和低岩藻糖基化的Fc片段的说明性实例。

[0149] 本领域技术人员可以参考用于获得包含已知以比非修饰的Fc片段更高的亲和力结合至Fc受体的高半乳糖基化的Fc片段、低甘露糖基化的Fc片段和低岩藻糖基化的Fc片段的抗AMHR II抗体的公知技术。

[0150] 糖工程化的抗AMHR II抗体涵盖包含低岩藻糖基化的Fc片段(也可以称为“低岩藻糖”Fc片段)的抗AMHR II抗体。

[0151] 免疫缀合物,特别是抗体药物缀合物(ADC)

[0152] 可以用于本发明目的的AMHR II结合剂涵盖缀合至细胞毒性剂(诸如化学治疗剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射性缀合物))的本文指定的抗体。此类抗体缀合物涵盖PCT申请No.WO 2017/025458中描述的那些。PCT申请No.WO 2017/025458尤其公开了抗AMHR II 3C23K抗体,以及3C23K ADC缀合物,本文显示了其针对非妇科人癌症的体内抗癌活性。

[0153] 细胞毒性剂涵盖酶促活性毒素。可以使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、莫迪素A链、 $\alpha$ -八叠球菌素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素、米托菌素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯。

[0154] 多种放射性核素可用于产生放射缀合物抗体。

[0155] 抗体和细胞毒性剂的缀合物使用多种双官能团蛋白偶联剂(诸如PCT申请No.WO 2017/025458中公开的那些)制备。

[0156] 抗AMHR II ADC抗体缀合物的优选免疫缀合物是PCT申请No.WO 2017/025458中描述的那些。

[0157] CAR细胞,包括CAR T细胞、CAR NK细胞和CAR巨噬细胞

[0158] 在一些实施方式中,人AMHR II结合剂是AMHR II结合受体或AMHR II结合受体表达细胞,并且特别是AMHR II结合受体表达CAR T细胞、AMHR II结合受体CAR NK细胞或AMHR II结合受体表达CAR巨噬细胞。

[0159] 因此,在一些实施方式中,人AMHR II结合剂是AMHR II结合工程化受体,最优选是其AMHR II结合区来源于本说明书中公开的单克隆抗AMHR II抗体的AMHR II结合工程化受体。

[0160] 通常,AMHR II结合工程化受体由包括以下的嵌合性抗原受体(CAR)构成:(i)胞外结构域,(ii)跨膜结构域和(iii)胞内结构域,并且其中,胞外结构域是来源于本说明书中公开的抗AMHR II单克隆抗体的AMHR II结合部分。在一些实施方式中,所述AMHR II结合工程化受体的胞外结构域包含(i)包含来源于本文公开的抗AMHR II单克隆抗体的CDR的抗体VH链和(ii)包含来源于本文公开的抗AMHR II单克隆抗体的CDR的抗体VL链。在一些实施方式中,所述AMHR II结合工程化受体的胞外结构域包含本文公开的抗AMHR II单克隆抗体的VH链和VL链。在一些实施方式中,所述AMHR II结合工程化受体的胞外结构域是包含分别来源于来自本说明书中公开的抗AMHR II单克隆抗体的VH链和CH链的CDR的ScFv。在一些实施方式中,所述AMHR II结合工程化受体的胞外结构域是包含分别来自本说明书中公开的抗AMHR II单克隆抗体的VH链和CH链的ScFv。

[0161] 本文还涵盖了由表达此类AMHR II结合受体的细胞、尤其是表达此类AMHR II结合受体的CAR T细胞、CARNK细胞或CAR巨噬细胞构成的AMHR II结合剂。

[0162] 如本文所用的术语“嵌合性抗原受体”(CAR)是指融合蛋白,其包括能够与抗原结合的胞外结构域、来源于与胞外结构域所来源的多肽不同的多肽的跨膜结构域、以及至少一个胞内结构域。“嵌合性抗原受体(CAR)”有时也称为“嵌合性受体”、“T体”或“嵌合性免疫受体(CIR)”。“能够结合至AMHR II的胞外结构域”意指可以结合至AMHR II的任何寡肽或多肽。“胞内结构域”意指在细胞中已知用作传递信号以引起生物过程活化或抑制的结构域的任何寡肽或多肽。“跨膜结构域”意指已知跨细胞膜并且可以用于连接胞外结构域和信号传导结构域的任何寡肽或多肽。嵌合性抗原受体可以任选地包含用作胞外结构域和跨膜结构域之间的接头的“铰链结构域”。

[0163] CAR T细胞是经遗传工程化的自体T细胞,其中单链抗体片段(scFv)或配体附接至能够促进T细胞活化的T细胞信号传导结构域(Maher, J. (2012) *ISRN Oncol.* 2012:278093; Curran, K. J. 等人(2012) *J. Gene Med.* 14:405-415; Fedorov, V. D. 等人(2014) *Cancer J.* 20:160-165; Barrett, D. M. 等人(2014) *Annu. Rev. Med.* 65:333-347)。

[0164] “胞内信号传导结构域”意指CAR的在T细胞内部发现或经工程化以待发现的部分。“胞内信号传导结构域”可以还包含或可以还不包含将CAR锚定在T细胞的质膜中的“跨膜结构域”。在一个实施方式中,“跨膜结构域”和“胞内信号传导结构域”来源于相同蛋白(例如CD3 $\zeta$ );在其他实施方式中,胞内信号传导结构域和跨膜结构域来源于不同蛋白(例如CD3 $\zeta$ 的跨膜结构域和CD28分子的胞内信号传导结构域,反之亦然)。

[0165] “共刺激内域(endodomain)”意指来源于T细胞共刺激分子的胞内信号传导结构域或其片段。T细胞共刺激分子的非限制性列表包括CD3、CD28、OX-40、4-1BB、CD27、CD270、CD30和ICOS。共刺激内域可以包括或可以不包括来自相同或不同的共刺激内域的跨膜结构域。

[0166] “胞外抗原结合结构域”意指CAR的特异性识别AMHR II并结合至AMHR II的部分。

[0167] 在优选的实施方式中，“胞外结合结构域”来源于抗AMHR II单克隆抗体。例如，“胞外结合结构域”可以包括来自单克隆抗体的Fab结构域的全部或部分。在某些实施方式中，“胞外结合结构域”包括特定的抗AMHR II单克隆抗体的互补决定区。在又一个实施方式中，“胞外结合结构域”是获自本文指定的抗AMHR II单克隆抗体的单链可变片段(scFv)。

[0168] 在优选的实施方式中，胞外结合结构域来源于本说明书中所述的抗AMHR II单克隆抗体中的任一个、特别来自3C23K抗AMHR II单克隆抗体。

[0169] I. 胞外抗原结合结构域

[0170] 在一个实施方式中，本发明的CAR包括来自本文所述的抗AMHR II单克隆抗体中的一者的胞外抗原结合结构域。

[0171] 在一个实施方式中，胞外结合结构域包含以下CDR序列：

[0172] -CDRL-1: RASX1X2VX3X4X5A (SEQ ID NO.65), 其中X1和X2独立是S或P、X3是R或W或G、X4是T或D、以及X5是I或T；

[0173] -CDRL-2是PTSSLX6S (SEQ ID NO.66), 其中X6是K或E；和

[0174] -CDRL-3是LQWSSYPWT (SEQ ID NO.67)；

[0175] -CDRH-1是KASGYX7FTX8X9HIH (SEQ ID NO.68), 其中X7是S或T、X8是S或G、以及X9是Y或N；

[0176] -CDRH-2是WIYPX10DDSTKYSQKFQG (SEQ ID NO.69), 其中X10是G或E, 和

[0177] -CDRH-3是GDRFAY (SEQ ID NO.70)。

[0178] II.  $\kappa$ Mab scFv的VL结构域和VH结构域之间的接头

[0179] 在另一个实施方式中，抗AMHR II VL经由柔性接头连接至抗AMHR II VH。具体地，柔性接头是约10个至约30个氨基酸(例如30个、25个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个或5个氨基酸)的甘氨酸/丝氨酸接头，并包含结构(Gly4Ser)<sup>3</sup>。

[0180] III. 胞外抗原结合结构域和胞内信号传导结构域之间的间隔子

[0181] 胞外抗原结合结构域通过使用“间隔子”与胞内信号传导结构域相连。间隔子经设计要足够柔性，以允许抗原结合结构域以有助于抗原识别和结合的方式取向。间隔子可以源自抗AMHR II免疫球蛋白本身，并且可以包括IgG1铰链区或IgG的CH2区和/或CH3区。

[0182] IV. 胞内信号传导结构域

[0183] 胞内信号传导结构域包含CD3链中的全部或部分。CD也被称为CD247，连同CD4 T细胞共受体或CD8 T细胞共受体一起负责偶联胞外抗原识别至胞内信号传导级联。

[0184] 除了包括CD3 $\zeta$ 信号传导结构域之外，共刺激分子的纳入已显示增强了鼠科模型和临床试验中的CAR T细胞活性。已经研究了几种，包括CD28、4-1BB、ICOS、CD27、CD270、CD30和OX-40。

[0185] 在某些实施方式中，公开了产生CAR表达细胞的方法，该方法包括以下或替代地基本上由以下组成：(i) 用编码CAR的核酸序列转导经分离的细胞群，以及(ii) 选择已用步骤(i)的所述核酸序列成功转导的细胞亚群。在一些实施方式中，经分离的细胞是T细胞、动物T细胞、哺乳动物T细胞、猫科动物T细胞、犬科动物T细胞或人T细胞，从而产生CART细胞。在某些实施方式中，经分离的细胞是NK细胞，例如，动物NK细胞、哺乳动物NK细胞、猫科动物NK细胞、犬科动物NK细胞或人NK细胞，从而产生CARNK细胞。

[0186] CAR T细胞、CAR N细胞和CAR巨噬细胞的治疗性应用

[0187] 包括本文所述的CAR T细胞、CAR NK细胞和CAR巨噬细胞的CAR细胞可以用于治疗表达的AMHR II非妇科肿瘤。本发明的CAR细胞优选用于治疗患有本文所述的一种癌症的患者中的表达AMHR II的肿瘤。在优选的实施方式中,本发明的CAR细胞优选用于治疗选自包括结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病的组的癌症。

[0188] 本发明的CAR细胞可以单独施用或与稀释剂、已知的抗癌治疗剂和/或其他组分(诸如细胞因子)或具有免疫刺激性的其他细胞群联合施用。

[0189] 本发明的方法方面涉及用于抑制有需要的对象中的肿瘤生长和/或用于治疗有需要的患者中的癌症的方法。在一些实施方式中,肿瘤是实体瘤。在一些实施方式中,肿瘤/癌症是甲状腺、乳腺、卵巢或前列腺肿瘤/癌症。

[0190] 如本文所公开的CAR细胞可以单独施用或与稀释剂、已知的抗癌治疗剂和/或其他组分(诸如细胞因子)或具有免疫刺激性的其他细胞群联合施用。它们可以是一线疗法、二线疗法、三线疗法、四线疗法或另外疗法。它们可以与其他疗法联合。这样的非限制性实例包括化学疗法或生物制剂。适当的治疗方案将由主治医师或兽医确定。

[0191] 包含本发明的CAR的药物组合物可以以适合于待治疗或预防的疾病的方式施用。尽管可以通过临床试验确定适当的剂量,但施用的量和频率将由诸如患者的状况以及患者疾病的类型和严重性等因素决定。

[0192] 治疗性应用

[0193] 如本说明书其他地方已经公开的那样,本文公开的AMHR II结合剂涵盖(i)本文公开的抗AMHR II抗体、(ii)本文公开的抗体药物缀合物和(iii)本文公开的CAR细胞(包括CAR T细胞、CAR NK细胞和CAR巨噬细胞),该AMHR II结合剂由可以用于预防或治疗表达AMHR II的非妇科癌症、特别是选自包括以下的组的癌症的活性成分构成:结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病。

[0194] 利用抗肿瘤抗原抗体或抗肿瘤抗原CAR细胞的癌症治疗方法是本领域技术人员众所周知的。

[0195] 在一些实施方式中,测试癌症患者以确定在用AMHR II结合剂(诸如抗AMHR II抗体、抗AMHR II ADC、抗AMHR II CAR T细胞、抗AMHR II CAR NL细胞或抗AMHR II CAR巨噬细胞)进行治疗之前,他们的肿瘤细胞是否在其表面处表达AMHR II。

[0196] 用于检测AMHR II的膜表达的此类初步测试优选用于治疗低频表达AMHR II的癌症。相反,对于治疗高频表达AMHR II的癌症,可能不进行用于检测AMHR II的膜表达的此类初步测试。

[0197] 因此,在一些实施方式中,本发明涉及如本文指定的AMHR II结合剂用于预防或治疗患有选自包括以下的组的AMHR II阳性癌症的个体的用途:结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病。

[0198] 本发明涉及AMHR II结合剂用于制备预防或治疗患有选自包括以下的组的AMHR II

阳性癌症的个体的药剂的用途:结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病。

[0199] 本发明还涉及用于预防或治疗患有选自包括以下的组的AMHR II阳性癌症的个体的方法:结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病,其中,所述方法包括向所述个体施用抗AMHR II结合剂的步骤。

[0200] 通过进行检测先前从个体获得的癌症组织样品上的细胞表面AMHR II蛋白表达的方法,可以将个体指定为所述患有AMHR II阳性癌症的个体。细胞表面AMHR II蛋白表达的检测可以根据本领域技术人员众所周知的多种方法进行。细胞表面AMHR II蛋白表达检测方法特别涵盖免疫组织化学方法以及荧光激活细胞分选方法,如本文的示例所示。

[0201] 本发明还涉及用于确定个体是否适合于(即,响应于)用AMHR II结合剂的癌症治疗的方法,其中,所述方法包括确定先前从所述个体获得的肿瘤组织样品是否在细胞表面处表达AMHR II蛋白的步骤。

[0202] 因此,本发明还涉及用于确定患有选自包括以下的组的癌症的个体是否适合于用AMHR II结合剂的癌症治疗、即,是否对用AMHR II结合剂的癌症治疗有响应:结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病,其中,所述方法包括以下步骤:

[0203] a) 确定来自所述患者的癌细胞是否在其膜处表达AMHR II,和

[0204] b) 推断:如果在步骤a)中确定了所述癌细胞的AMHR II的膜表达,则所述患者适合于用AMHR II结合剂的癌症治疗、即,对用AMHR II结合剂的癌症治疗有响应。

[0205] 在所述方法的优选的实施方式中,在步骤b),当(i)在步骤a)确定AMHR II表达评分值时并且当(ii)所述AMHR II表达评分值是阈值评分值或更高时,推断所述患者适合于(即,响应于)用AMHR II结合剂的癌症治疗。AMHR II评分值最优选通过使用本说明书其他地方所述的式(I)计算。

[0206] 因此,根据优选的实施方式,该方法的步骤a)通过免疫组织化学方法进行,诸如本文的示例所示。

[0207] 在步骤a)使用的癌细胞通常源自先前从所述癌症患者收集的活检组织样品。

[0208] 优选地,步骤a)通过使用选自本说明书中具体描述的那些抗体的抗AMHR II抗体、特别是3C23K抗体来进行,该抗体的AMHR II结合可以根据公知的抗体检测技术、诸如本文的示例中公开的那些技术,通过使用经标记的二级抗体来检测。

[0209] 优选地,当根据下式(I)进行允许测定E评分值的评分方法时,当在来源于患有以上列出的癌症组中包括的癌症的癌症患者的癌细胞样品中确定AMHR II表达评分值为1.0或更大、最优选AMHR II表达评分值为1.5或更大时,确定所述患者适合于用AMHR II结合剂的癌症治疗、即确定为对用AMHR II结合剂的癌症治疗有响应:

[0210]  $E\text{评分} = \text{频率} \times \text{AMHR II\_水平}$ ,其中

[0211] -E评分意指给定癌细胞样品的AMHR II表达评分值,

[0212] -频率意指检测到膜AMHR II表达的所述癌细胞样品中所含细胞的频率,并且

[0213] -AMHR II\_水平意指在所述给定癌细胞样品中包含的表达AMHR II的细胞的AMHR II表达的水平。

[0214] 本发明还涉及用于治疗患有选自包括以下的组的癌症的患者的方法：结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病，其中，所述方法包括以下步骤：

[0215] a) 确定先前从所述个体获得的肿瘤组织样品是否在细胞表面处表达AMHR II蛋白，和

[0216] b) 如果已经在步骤a) 确定了AMHR II的细胞表面表达，则用AMHR II结合剂治疗所述个体。

[0217] 在一些优选的实施方式中，在步骤a)，当所述肿瘤样品具有根据上述式(I) 计算的1.0或更大的AMHR II表达评分值“E评分”（涵盖1.5或更大的E-评分值）时，在步骤a) 确定AMHR II表达。

[0218] 在上述方法的最优选实施方式中，所述AMHR II结合剂由如本文所指定的抗AMHR II抗体或其片段构成、或者由如本文所指定的CAR细胞（例如CAR T细胞或CAR NK细胞）构成。

[0219] 在一些实施方式中，所述AMHR II结合剂用作唯一的抗癌活性成分。

[0220] 在一些其他实施方式中，用所述AMHR II结合剂的抗癌治疗还包括使所述个体经受一种或多种另外的抗癌治疗，其包括放射疗法治疗和化学治疗剂治疗。

[0221] 因此，根据此类其他实施方式，用所述AMHR II结合剂的抗癌治疗还包括向所述个体施用一种或多种另外的抗癌活性成分。

[0222] 因此，根据如本文所述的AMHR II结合剂的用途的一些实施方式，所述AMHR II结合剂与另一种抗癌治疗组合，诸如与一种或多种其他抗癌活性剂组合。

[0223] “抗癌剂”定义为可以干扰大分子（DNA、RNA、蛋白质等）的生物合成或抑制细胞增殖或导致细胞死亡（例如通过凋亡或细胞毒性）的任何分子。在抗癌剂中，可以提及的是烷基化剂、拓扑异构酶抑制剂和嵌入剂、抗代谢物、裂解剂、干扰微管蛋白的试剂、单克隆抗体。

[0224] 根据特定的方面，本发明涉及药物组合物，其包含与药学上可接受的媒介物组合的作为活性成分的抗癌剂和与AMHR - II结合的抗体、特别是本文所述的抗AMHR II抗体。

[0225] “药学上可接受的媒介物”是指与生物系统（诸如细胞、细胞培养物、组织或生物体）相容的无毒物质。

[0226] 在一些实施方式中，本发明涉及药物组合物，其包含与药学上可接受的媒介物组合的作为活性成分的抗癌剂和与AMHR - II结合的抗体、特别是本文所述的抗AMHR II抗体。

[0227] 在一些实施方式中，本发明涉及药物组合物，其包含与药学上可接受的媒介物组合的作为活性成分的抗癌剂和结合AMHR - II的抗体，其中，抗癌剂选自包括以下的组：多西他赛、顺铂、吉西他滨、以及顺铂和吉西他滨的组合。

[0228] 可以与抗AMHR II抗体组合使用的其他抗癌剂涵盖紫杉醇或铂盐（诸如奥沙利铂、顺铂和卡铂）。

[0229] 抗癌剂还可以选自除铂盐、小分子、单克隆抗体或其他抗血管形成肽体以外的化学治疗剂。

[0230] 除铂盐以外的化学治疗剂包括嵌入剂(阻断DNA复制和转录),诸如蒽环类药物(多柔比星、聚乙二醇化的脂质体多柔比星),拓扑异构酶抑制剂(喜树碱和衍生物: Karenitecin、拓扑替康、伊立替康),或者SJG-136,组蛋白脱乙酰酶的抑制剂(伏立诺他、贝利司他、丙戊酸),烷基化剂(苯达莫司汀、葡磷酰胺、替莫唑胺),抗有丝分裂植物生物碱(诸如紫杉烷(多西他赛、紫杉醇)),长春花生物碱(长春瑞滨),埃博霉素(ZK-埃博霉素、伊沙匹隆),抗代谢物(吉西他滨、艾西拉滨、卡培他滨),纺锤体驱动蛋白(KSP)抑制剂(伊斯平斯),曲贝替定或者奥瑞布林(康普瑞汀A-4衍生物)。

[0231] 在小分子中有聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂:奥拉帕尼,艾尼帕利,维利帕尼,卢卡帕尼,CEP-9722, MK-4827, BMN-673, 激酶抑制剂(诸如酪氨酸激酶抑制剂(TKI)),其中可以提及的是抗-VEGFR分子(索拉非尼,舒尼替尼,西地尼布,凡德他尼,帕唑帕尼, BIBF 1120, 瑟玛沙尼,卡博替尼,莫特沙尼),抗-HER2/EGFR分子(厄洛替尼,吉非替尼,拉帕替尼),抗PDGFR分子(伊马替尼, BIBF 1120),抗FGFR分子(BIBF 1120),极光激酶/酪氨酸激酶抑制剂(ENMD-2076), Src/Ab1激酶抑制剂(塞卡替尼),或还有哌立福辛,特罗莫司(mTOR抑制剂),阿沃西地(细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂),沃拉舍替(PLK1(保罗样激酶1)蛋白的抑制剂), LY2606368(检查点激酶1(chk 1)的抑制剂), GDC-0449(Hedgehog途径抑制剂), 齐波腾坦(ETA-受体的拮抗剂), 硼替佐米,卡非佐米(蛋白酶体抑制剂), 细胞因子(诸如IL-12、IL-18、IL-21、INF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ )。

[0232] 在抗体中,可以提及的是抗VEGF:贝伐单抗,抗VEGFR:雷莫芦单抗,抗HER2/EGFR:曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗、MGAH22、马妥珠单抗,抗PDGFR $\alpha$ : IMC-3G3, 抗叶酸受体:法拉图组单抗,抗CD27:CDX-1127,抗CD56:BB-10901,抗CD105:TRC105,抗CD276:MGA271,抗AGS-8:AGS-8M4,抗DRS:TRA-8,抗HB-EGF:KHK2866,抗间皮素:阿玛妥昔单抗、BAY 94-9343(免疫毒素)、卡妥索单抗(EpCAM/CD3双特异性抗体),抗IL2R:达克珠单抗,抗IGF-1R:加尼妥单抗,抗CTLA-4:易普利姆玛,抗PD1:纳武单抗和派姆单抗,抗CD47: Weissman B6H12和Hu5F9, Novimmune 5A3M3, INHIBRX 2A1, Frazier VxP037-01LC1抗体,抗刘易斯Y:Hu3S193, SGN-15(免疫毒素),抗CA125:奥戈伏单抗,抗HGF:瑞洛妥木单抗,抗IL6:司妥昔单抗,抗TR2:替加妥珠单抗,抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素:沃洛赛昔单抗,抗HB-EGF:KHK2866。抗血管形成肽抗体选自AMG 386和CVX-241。

[0233] 更具体地,本文描述了药物组合物,其包含与药学上可接受的媒介物组合的作为活性成分的抗癌剂和结合AMHR-II的抗体,其中,所述抗癌剂选自包括以下的组:多西他赛、顺铂、吉西他滨、以及顺铂和吉西他滨的组合。

[0234] 甚至更具体地,本文描述了药物组合物,其包含与药学上可接受的媒介物组合的作为活性成分的抗癌剂和结合AMHR-II的抗体,其中,在本文中称为3C23K的经突变的人源化单克隆抗体和抗癌剂选自包括以下的组:多西他赛、顺铂、吉西他滨、以及顺铂和吉西他滨的组合。

[0235] 如本文公开的AMHR II结合剂、尤其是本文公开的抗AMHR II抗体可以以多种方式施用,包括经口施用、皮下施用和静脉内施用。

[0236] 术语“治疗有效量”是指有效治疗哺乳动物的疾病或病症的药物的量。在癌症的情况下,药物的治疗有效量可以减少癌细胞的数量;减小肿瘤的大小;抑制(即在一定程度上减慢、优选停止)癌细胞浸润到周围器官中;抑制(即在一定程度上减慢、优选停止)肿瘤转

移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上减轻与病症有关的一种或多种症状。在一定程度上,该药物可以阻止生长和/或杀灭现有的癌细胞,它可以抑制细胞生长和/或具有细胞毒性。对于癌症疗法,可以通过例如评估存活的持续时间、无进展存活(PFS)的持续时间、响应率(RR)、响应的持续时间和/或生活质量来测量体内功效。

[0237] 通过将具有期望纯度的抗体与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合,来制备用于储存的、冻干制剂或水溶液形式的根据本发明使用的试剂(例如,抗体)的治疗性制剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980))。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵,苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐的反离子,诸如钠;金属复合物(例如,Zn-蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。

[0238] 活性成分也可以被包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合来制备的微胶囊(例如分别羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中、或在大乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980)中。

[0239] 用于体内施用的制剂可以是无菌的。这容易借由通过无菌过滤膜过滤实现。

[0240] 在另一个特定的方面,本发明涉及组合物在预防或治疗本文所述的非妇科癌症中作为药用产品的用途,该组合物包含抗癌剂和结合AMHR-II的抗体,旨在通过静脉内途径或腹膜内途径施用的制剂中。

[0241] 在另一个特定的方面,本发明涉及组合物在预防或治疗本文所述的非妇科癌症中作为药用产品的用途,该组合物包含抗癌剂和结合AMHR-II的抗体,单克隆抗体和抗癌剂旨在用于分开、同时或依次施用。

[0242] 抗体和抗癌剂可以在同一药物组合物内组合,或者可以以同时或依次施用的分开的药物组合物的形式使用。特别地,产品可以分开施用,即同时或独立地(例如有时间间隔)施用。

[0243] 更具体地,本发明涉及组合物在预防或治疗本文所述的非妇科癌症中作为药用产品的用途,该组合物包含抗癌剂和结合AMHR-II的抗体,其中,抗体和抗癌剂组合在同-药物组合物内。

[0244] 根据另一个特定的方面,本发明涉及组合物在预防或治疗本文所述的非妇科癌症中作为药用产品的用途,该组合物包含抗癌剂和结合AMHR-II的抗体,其中,施用给患者的抗AMHR-II抗体的治疗有效量的范围为约0.07mg至约35 000mg、优选约0.7mg至约7000mg、优选约0.7mg至约1400mg、优选约0.7mg至约700mg、更优选约0.7mg至约70mg。

[0245] 根据另一个特定的方面,本发明涉及组合物在预防或治疗本文所述的非妇科癌症

中作为药用产品的用途,该组合物包含抗癌剂和结合AMHR-II的抗体,其中,施用给患者的抗癌剂的治疗有效量的范围为约10mg至约700mg,优选范围为约20mg至约350mg、优选约110mg。

[0246] 根据另一个特定的方面,本发明涉及组合物在预防或治疗本文所述的非妇科癌症中作为药用产品的用途,该组合物包含抗癌剂和结合AMHR-II的抗体,其中,施用给患者的抗体的治疗有效量为约70mg,施用给患者的抗癌剂的剂量为约110mg。

[0247] 通过以下实施例、但不以任何方式限于以下实施例,进一步说明本发明。

[0248] 实施例

[0249] 实施例1:差异的AMHR II基因表达和AMHR II蛋白表达

[0250] A. 材料和方法

[0251] A.1. 细胞系和培养物

[0252] 将COV434 WT细胞系(ECACC No.07071909)维持在补充有10%FBS、青霉素100U/ml和链霉素100 $\mu$ g/ml的DMEM/GlutaMax (Gibco)中。以400 $\mu$ g/ml添加遗传霉素(Gibco)用于COV434 MISRII转染的细胞系。将红白血病K562细胞系(ATCC<sup>®</sup> CCL-243<sup>™</sup>)悬浮培养在补充有10%FBS和青霉素/链霉素的IMDM培养基(西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich))中,并以1 x 10<sup>5</sup>至1 x 10<sup>6</sup>个细胞/ml的密度维持在T75烧瓶中。将OV90细胞系(ATCC<sup>®</sup> CRL-11732<sup>™</sup>,卵巢浆液性腺癌)培养在含终浓度为1.5g/l碳酸氢钠的MCDB 105培养基(西格玛奥德里奇)和含终浓度为2.2g/l碳酸氢钠的培养基199(西格玛奥德里奇)(补充有15%FBS和青霉素/链霉素)的1:1混合物中。将NCI-H295R细胞系(肾上腺皮质癌,ATCC<sup>®</sup> CRL-2128<sup>™</sup>)维持于补充有iTS<sup>+</sup>Premix(康宁(Corning))、2.5%Nu-Serum(Falcon)和青霉素/链霉素的DMEM:F12培养基(西格玛奥德里奇)中。将细胞在37°C在具有8%CO<sub>2</sub>的潮湿气氛中生长,并取决于细胞系,每周更换培养基一次或两次。

[0253] A.2. 通过RT-qPCR的AMHR2 mRNA的相对定量

[0254] 提取RNA。根据制造商的使用说明,使用Trizol<sup>®</sup>Plus RNA纯化试剂盒(Ambion)制备来自1x10<sup>6</sup>至5x10<sup>6</sup>个细胞团块的总RNA。简而言之,在苯酚/氯仿提取后,裂解细胞的RNA吸附在二氧化硅基质上,用DNA酶处理,然后用30 $\mu$ l无RNA酶的水洗涤并洗脱。用分光光度计(NanoDrop,赛默飞世尔科学(ThermoFisher Scientific))评估RNA浓度和质量。

[0255] cDNA合成。使用Maxima H Minus第一链cDNA合成试剂盒(Ambion)和寡-dT引物通过以下步骤将RNA(1 $\mu$ g)逆转录:在25°C下孵育10min用于引发并在50°C下孵育15min用于逆转录,然后在85°C下孵育5min用于逆转录酶失活。

[0256] 定量PCR。使用最终体积为20 $\mu$ l的Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Ambion)在96孔微孔板中的Light Cycler 480(罗氏(Roche))中进行定量PCR。使用以下引物:对于AMHR2,正向5' -TCTGGATGGCACTGGTGCTG-3' (SEQ ID NO.71)和反向5' -AGCAGGGCCAAGATGATGCT-3' (SEQ ID NO.72);对于TBP,正向5' -TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3' (SEQ ID NO.73)和反向5' -CACATCACAGCTCCCCACCA-3' (SEQ ID NO.74)。使用cDNA模板(100ng当量RNA)和以下方案进行扩增:在50°C下UDG预处理2min,在95°C下变性10min,然后在95°C下15s/在60°C下30s/在70°C下30s进行40个循环。在每个实验结束时进行融化曲线分析,以控制没有基因组DNA和二聚体引物。一式两份测试每个cDNA样品和对照(“无模板样品”和“无逆转录物RNA”)。计算循环阈值(Ct)的平均值,并将AMHR2相对定量(RQ)表示为2

$^{-\Delta\Delta Ct}$ , 其中  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{样品}} - \Delta Ct_{\text{校准品}}$  和  $\Delta Ct = Ct_{\text{AMHR2}} - Ct_{\text{TBP}}$ 。HCT116样品用作校准品, 并且TBP作为管家基因用于归一化。

[0257] 下表2描绘了使用上述Q-PCR方法在测试的细胞系中的AMHR2表达水平。

[0258] 表2

细胞系	平均 Ct amhr2	平均 Ct TBP	RQ
HCT116	34.27	22.25	1
COV434 WT	31.34	22.82	11.3
K562	25.31	21.36	268.7
NCI-H295R	26.16	22.83	413.0
OV90	25.65	22.67	526.4

[0259]

[0260] A.3. 通过流式细胞术分析评价膜AMHR2表达

[0261] 为了荧光激活细胞分选 (FACS) 分析, 将  $4 \times 10^5$  个细胞用  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  的3C23K在  $4^\circ\text{C}$  下孵育30min。用PBS-BSA 2%洗涤后, 通过缀合至荧光团的抗物种二级抗体检测一级抗体。通过缀合至藻红素 (1:1000, Beckman-Coulter, IM0550) 的抗人  $F(ab')_2$  检测3C23K。用PBS洗涤后, 在BD Accuri™ C6流式细胞仪 (BD生物科学 (BD Bioscience)) 的FL2通道中实现了重悬细胞的FACS分析。

[0262] B. 结果

[0263] 结果描绘于图2中。结果表明, 尽管COV434-WT细胞系具有人AMHR2蛋白的显著膜表达水平, 但重组细胞系COV434-WT (对于细胞系NCI-H295R测得的AMHR2基因表达水平约为3%)。

[0264] 这些结果表明AMHR2基因表达与膜AMHR2蛋白表达之间完全没有相关性。

[0265] 实施例2: 非妇科癌症 (人肿瘤样品) 中的AMHR2表达

[0266] A. 材料和方法

[0267] A.1. 目标

[0268] 用于使用生物素化的3C23K单克隆抗体检测抗苗勒激素2型受体 (AMHR2) 表达的小鼠中人癌细胞异种移植物 (PDX) 的免疫组织化学研究。

[0269] A.2. 方案和方法

[0270] -细胞系: 固定在甲醛乙酸醇 (AFA) 中, 具有细胞块构造。

[0271] -人肿瘤: 外部样品固定在福尔马林中, 并且来自居里研究所的载玻片固定在AFA中。

[0272] -在将样品脱蜡并在pH9下暴露 (在  $90^\circ\text{C}$  下微波EZ Retriever 15', 然后在20' 内冷却) 后, 免疫组织化学 (IHC) 技术是可能的。

[0273] -通过免疫过氧化物酶技术和DAB生色底物揭示的抗苗勒激素II型受体检测。

[0274] -在封闭内源性过氧化物酶活性后, 将载玻片用稀释的生物素化的一级抗体 (1/800,  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 在室温下孵育90分钟。然后将组织切片用PBS洗涤, 并用亲和素/生物素ABC [载

体]复合物孵育30分钟。使用DAB底物溶液(DAB+底物缓冲液/液体DAB+色原体,10分钟孵育)检测免疫反应信号。最后,用梅尔氏苏木精(里利氏改良)将切片轻轻地复染。

[0275] -阴性对照是通过在免疫组织化学染色程序中用同种型对照免疫球蛋白(R565)或单独的抗体稀释剂(阴性缓冲液对照)替代一级抗体获得的。

[0276] -通过使用AMHR2转染的COV434细胞和人粒层细胞肿瘤样品获得阳性对照。

[0277] -处理后,经由Philips IMS通过数字化观察切片。所有样本均由2位病理学家独立评分。

[0278] -详细描述了标记的定位:细胞质和/或膜。

[0279] -通过以下评分系统将强度分类为肿瘤细胞膜和/或细胞质的明确棕色标记:将标记的强度定义为:0(阴性),1(弱),2(中度),以及3(强,如COV434阳性对照所示)。

[0280] -频率定义为表达AMHR2的细胞的百分比。从分析中排除了坏死区域。通过使用频率x强度评分平均值(0至3)累积膜表达和细胞质表达来建立总组织学评分。

[0281] -将所有载玻片妥善保存。

[0282] B. 结果

[0283] 图3还描绘了各种原代人癌细胞的AMHR2膜表达的结果,其中,AMHR2表达评分代表一组不同的癌细胞类型。

[0284] 结果描绘于图3。结果表明,AMHR2在多种非妇科人癌症的细胞表面处表达,这些非妇科人癌症包括结肠癌、肝癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、以及头颈癌。

[0285] 实施例3:非妇科癌症(人肿瘤异种移植)中的AMHR2表达

[0286] A. 材料和方法

[0287] A.1. 目标

[0288] 用于使用生物素化的3C23K单克隆抗体检测抗苗勒激素2型受体(AMHR2)表达的小鼠中人癌细胞异种移植(PDX)的免疫组织化学研究。

[0289] A.2. 方案和方法

[0290] -细胞系:固定在甲醛乙酸醇(AFA)中,具有细胞块构造。

[0291] -人肿瘤:外部样品固定在福尔马林中,并且来自居里研究所的载玻片固定在AFA中。

[0292] -在将样品脱蜡并在pH9下暴露(在90°C下微波EZ Retriever 15',然后在20'内冷却)后,免疫组织化学(IHC)技术是可能的。

[0293] -通过免疫过氧化物酶技术和DAB生色底物揭示的抗苗勒激素II型受体检测。

[0294] -在封闭内源性过氧化物酶活性后,将载玻片用稀释的生物素化的一级抗体(1/800,8µg/mL)在室温下孵育90分钟。然后将组织切片用PBS洗涤,并用亲和素/生物素ABC[载体]复合物孵育30分钟。使用DAB底物溶液(DAB+底物缓冲液/液体DAB+色原体,10分钟孵育)检测免疫反应信号。最后,用梅尔氏苏木精(里利氏改良)将切片轻轻地复染。

[0295] -阴性对照是通过在免疫组织化学染色程序中用同种型对照免疫球蛋白(R565)或单独的抗体稀释剂(阴性缓冲液对照)替代一级抗体获得的。

[0296] -通过使用AMHR2转染的COV434细胞和人粒层细胞肿瘤样品获得阳性对照。

[0297] -处理后,经由Philips IMS通过数字化观察切片。所有样本均由2位病理学家独立评分。

[0298] -详细描述了标记的定位:细胞质和/或膜。

[0299] -通过以下评分系统将强度分类为肿瘤细胞膜和/或细胞质的明确棕色标记:将标记的强度定义为:0(阴性),1(弱),2(中度),以及3(强,如COV434阳性对照所示)。

[0300] -频率定义为AMHR2表达细胞的百分比。从分析中排除了坏死区域。通过使用频率x强度评分平均值(0至3)累积膜表达和细胞质表达来建立总组织学评分。

[0301] -将所有载玻片妥善保存。

[0302] B. 结果

[0303] a) 对照

[0304] -阴性对照和同种型对照对肿瘤细胞没有反应性。

[0305] -阳性对照样品(经扩增的COV434 AMHR2)显示了细胞的弥散性免疫染色(强度评分:3)。标记是均匀的(频率评分:100%),具有细胞质定位和膜定位。

[0306] -阳性粒层细胞对照样品显示出肿瘤细胞的强免疫染色(强度评分3)。标记是均匀的(频率评分:100%),具有细胞质定位和膜定位。

[0307] b) 筛选患者来源的异种移植物(PDX)样品。

[0308] 重要的是要注意,当将样品固定在福尔马林中与样品在AFA中处理相比时,AMHR2的膜表达似乎被低估了。

[0309] 小鼠内异种移植的各种人肿瘤的AMHR2膜表达的结果描绘于图4中,其中,AMHR2表达评分代表一组不同的癌细胞类型。

[0310] 下表3总结了人肿瘤异种移植物的AMHR2表达的部分结果。

[0311] 表3:人肿瘤异种移植物中的AMHR2表达

肿瘤类型	肿瘤的阳性(阳性PDX的百分比)	测试的PDX的数量
结肠	35%	6
肝	44%	3
肾	84%	13

[0312] c) 结论

[0314] 在对AMHR2转录呈阳性的6个PDX模型的4个中,确认了AMHR2蛋白表达。这些PDX取自神经胶质瘤(ODA14-RAV)和结肠(TC306-BAU)癌。表达水平中等但显著,特征在于总评分为1至1.5。这些数据表明,除妇科癌症以外,均可以表达AMHR2。

[0315] 这些模型将来可以用于表征抗AMHR2疗法。

[0316] 实施例4:抗AMHR2抗体针对表达AMHR2的非妇科癌症的体内功效

[0317] A. 材料和方法

[0318] A.1. 缩写

[0319] 表4和表5中都显示了该方案中的常用缩写。

[0320] 表4. 给药相关的缩写

[0321]

<b>给药时间表</b>	
Bid	每日两次
Qd	每天
Q2d	每隔一天 (也称为 Qod)
Q3d	每三天 (一天给药和 2 天停药)
Q4d	每四天 (一天给药和 3 天停药)
BIW	每周两次
QW	每周
Q3W	每三周
<b>施用途径 (ROA)</b>	
i.p.	腹膜内的 (腹膜内地)
i.v.	静脉内的 (静脉内地)
p.o.	经口的 (经口地)
s.c.	皮下的 (皮下地)

[0322] 表5. 该实施例中使用的其他常见缩写

缩写	全文和描述
ANOVA	变量分析
BW	体重
BWL	体重减轻
GLP	良好实验室规范
MTD	最大耐受剂量
MTV	平均肿瘤体积
TV	肿瘤体积
TGI	肿瘤生长抑制, %TGI= $(1-(T_i-T_0)/(V_i-V_0))*100$ ; $T_i$ 为治疗组在测量日的平均肿瘤体积; $T_0$ 为治疗组在 D1 的平均肿瘤体积; $V_i$ 为对照组在测量日的平均肿瘤体积; $V_0$ 为对照组在 D1 的肿瘤体积。
T-C	T-C 是以 T 作为治疗组的平均肿瘤大小达到预定大小 (例如 $1000\text{mm}^3$ ) 所需的时间 (以天计)、并且 C 作为对照组的平均肿瘤大小达到相同大小所需的时间 (以天计) 来计算的。
T/C	T/C 值 (%) 是肿瘤对治疗响应的指标, 并且是常用的抗肿瘤活性终点中的一者; T 和 C 分别是治疗组和对照组在给定日的平均肿瘤体积。
REG	使用下式计算 REG (%) 值: $\%REG = [(VTr_{第0天} - VTr_{第X天}) / VTr_{第0天}] \times 100\%$ 。
SOC	特定疾病的临床背景所用的护理标准
FFPE	福尔马林固定的石蜡包埋的

[0324] A.2. 研究目标

[0325] 为了临床前评价加马玛布斯 (GamaMabs) 的抗AMHR2单克隆抗体 (称为GM102) 在 Balb/C裸小鼠中治疗 Huprime<sup>®</sup> HCC异种移植物模型LI1097的体内功效。模型LI1097是在筛选由中美冠科 (CrownBio) 使用RNAseq (转录组测序) 对AMHR2转录后选择的。此外, 该模型的AMHR2膜蛋白表达已由法国居里研究所使用IHC证实。

[0326] A.3. 实验设计

[0327] 表6. 功效研究的研究设计

组	N	治疗	剂量水平 (mg/kg)	给药 途径	给药频率
[0328] 1	8	媒介物 (溶剂对照)	-	<i>i.v.</i>	BIW x 4 周
2	8	加马玛布斯的抗体	20mg/kg	<i>i.v.</i>	BIW x 4 周
3	8	加马玛布斯的抗体	50mg/kg	<i>i.v.</i>	BIW x 4 周
4	8	索拉非尼	50mg/kg	<i>p.o.</i>	QD x 4 周

[0329] 注释:N:每组动物数量

[0330] A.4. 动物

[0331] -品系: BALB/c裸

[0332] -年龄: 7周至8周(治疗开始时)

[0333] -性别: 雌性

[0334] -总数#: 32只小鼠+备用

[0335] A.5. 动物圈养

[0336] 将小鼠圈养在以下条件下的单独通风笼中(每笼4只):

[0337] ➤ 温度: 20°C至26°C

[0338] ➤ 湿度: 30%至70%

[0339] ➤ 光周期: 光照12小时, 黑暗12小时

[0340] ➤ 尺寸为325mm × 210mm × 180mm的聚砜笼

[0341] ➤ 垫底材料为玉米芯, 并且每周更换

[0342] ➤ 饮食: 在整个研究期间, 动物将自由获得经辐射灭菌的干颗粒食品。

[0343] ➤ 水: 动物将自由获得无菌饮用水

[0344] ➤ 笼识别标签: 动物数量, 性别, 品系, 接收日期, 治疗, 研究号, 组号和治疗开始日期

[0345] ➤ 动物识别: 将动物用耳标签标记

[0346] A.6. **HuPrime®**模型特性

[0347] 选择来源于雄性HCC患者的 **HuPrime®**肝癌模型LI1097用于该功效研究。该模型在接种后20天至25天内达到1000mm<sup>3</sup>。

[0348] A.7. 测试品和阳性对照品

[0349] 产品鉴定: 加马玛布斯的抗体 (3C23K)

[0350] 制造商: 加马玛布斯制药公司

[0351] 批号: R18H2-LP01

[0352] 批次: 04GAM140513API

[0353] 需要的量: 基于25g的动物体重为255mg, 50%备用

[0354] 包装和储存条件: [30ml/管], 30ml, [2°C至8°C]

- [0355] 浓度:10.1g/L
- [0356] 产品鉴定:索拉非尼
- [0357] 制造商:美伦医药(Melonepharma)
- [0358] 批号:D1111A
- [0359] 需要的量:基于25g的动物体重为300mg,50%备用
- [0360] 包装和储存条件:400mg,[RT]
- [0361] A.8.实验方法和程序
- [0362] A.8.1.肿瘤接种和组分布
- [0363] 收获来自接种有选定的原代人癌组织的原代(stock)小鼠的肿瘤片段,并将其用于接种至BALB/c裸小鼠中。在2015年6月9日将每只小鼠右侧腹皮下接种原代人HCC模型LI1097片段(R12P4,直径2mm至4mm)用于肿瘤发展。亲本小鼠编号为#80150、#80151和#80153。在2015年6月24日,当平均肿瘤大小达到约145mm<sup>3</sup>时将小鼠分组。根据小鼠的肿瘤大小将其随机分配至4个实验组。每组由8只小鼠组成,每笼4只小鼠。将这天表示为第0天。根据第1.1节实验设计中所示的预定方案,从第0天(2015年6月24日)至第27天(2015年7月21日),将测试品施用给带瘤小鼠。
- [0364] A.8.2.停止给药方案
- [0365] 当个体小鼠的体重减轻 $\geq 20\%$ 时,将给予小鼠给药暂缓(holiday),直到其体重恢复到基线为止。在这项研究中,没有停止给药。
- [0366] A.8.3.观察
- [0367] 本研究与动物处置、护理和治疗有关的所有程序均按照中美冠科机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准的指导原则遵循实验室动物护理评估与鉴定协会(AAALAC)的指导进行。在常规监测时,检查动物受到肿瘤生长对正常行为的任何影响,诸如活动性、食物和水的消耗(仅通过看)、体重增加/减少、眼睛/头发无光泽以及任何其他异常影响。根据每个子集中的动物数量记录死亡和观察到的临床体征。
- [0368] A.8.4.肿瘤测量和终点
- [0369] 使用卡尺每周两次在二维上测量肿瘤大小,并使用下式以mm<sup>3</sup>表示体积:TV=0.5a $\times$ b<sup>2</sup>,其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。然后根据表2中缩写的描述,将肿瘤大小用于计算TGI值、T/C值和T-C值。
- [0370] A.8.5.终止
- [0371] 治疗28天后研究终止,并处死小鼠。
- [0372] 在以下条件下,在死亡之前或达到昏迷状态之前,通过人道安乐死终止个体动物或整组的活体动物(in-life)实验。
- [0373]  $\checkmark$  在持续恶化的情况下,有严重的痛苦和/或疼痛的严重临床体征,无法获得足够的食物或水;
- [0374]  $\checkmark$  显著体重(消瘦)( $>20\%$ );
- [0375]  $\checkmark$  肿瘤大小超过3000mm<sup>3</sup>或MTV $>2000\text{mm}^3$ 的单个小鼠。
- [0376] A.8.6.统计分析
- [0377] 在每个时间点为每个组的肿瘤体积提供概括统计量,包括平均值和平均值标准误差(SEM)。使用单向方差分析(ANOVA),然后使用Games-Howell的多重比较,评价各组肿瘤体

积差异的统计分析。使用SPSS16.0分析所有数据。认为 $P < 0.05$ 具有统计学显著性。

[0378] B. 结果

[0379] B.1. 体重

[0380] 已经测量了带瘤小鼠的体重和体重变化的结果。所有的小鼠都完成了其治疗,且没有给药暂缓。在加马玛布斯的抗体治疗的小鼠中未观察到动物死亡或显著的体重减轻,但在索拉非尼治疗的小鼠中观察到7%的体重减轻。

[0381] B.2. 肿瘤体积

[0382] 表7显示了不同组在不同时间点的肿瘤尺寸。

[0383] 表7不同治疗组中的肿瘤尺寸

天	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )			
	媒介物, BIW x 2 周	加马玛布斯的抗体, 20mg/kg, BIW x 4 周	加马玛布斯的抗体, 50mg/kg, BIW x 4 周	索拉非尼, 50mg/kg, QD x 4 周
0	145.08 ± 17.70	145.15 ± 16.79	145.24 ± 16.38	145.18 ± 16.97
2	439.23 ± 54.14	358.57 ± 51.86	297.78 ± 46.32	321.35 ± 45.66
[0384] 6	937.83 ± 99.91	665.09 ± 85.00	532.71 ± 104.17	493.84 ± 65.13
9	1556.55 ± 248.13	952.12 ± 171.45	751.81 ± 176.15	695.20 ± 66.81
13	2269.46 ± 356.55	1179.90 ± 232.26	1117.12 ± 302.85	891.50 ± 103.33
16		1479.51 ± 292.49	1476.74 ± 407.93	1135.40 ± 133.62
20		1973.13 ± 372.07	1602.61 ± 481.85	1478.84 ± 189.62
23		1814.59 ± 231.17	1148.22 ± 381.49	1627.4 ± 202.91
27		2081.67 ± 213.28	1454.47 ± 479.27	1829.66 ± 256.4

[0385] 注释:表达为平均值 ± SEM的数据。

[0386] B.2. 肿瘤生长抑制

[0387] 表8总结了肿瘤生长抑制。

[0388] 表8 **HuPrime**<sup>®</sup>肝脏异种移植物模型LI1097中测试化合物加马玛布斯的抗体和索拉非尼治疗的抗肿瘤活性

治疗	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )		TGI (%)	T/C (%)	1000mm <sup>3</sup> 时 T-C (天)	P 值 <sup>b</sup>
	<sup>a</sup> 第 0 天	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> 第 13 天				
[0389] G1 媒介物	145.08 ± 17.70	2269.46 ± 356.55	-	-	-	-
G2 加马玛布斯的抗体, 20mg/kg	145.15 ± 16.79	1179.90 ± 232.26	51.3%	48.7%	3	0.100
G3 加马玛布斯的抗体, 50mg/kg	145.24 ± 16.38	1117.12 ± 302.85	54.3%	45.7%	5	0.111
G4 索拉非尼, 50mg/kg	145.18 ± 16.97	891.50 ± 103.33	64.9%	35.1%	8	0.024*

[0390] 注释:a. 平均值 ± SEM

[0391] b. 使用Games-Howell通过多重比较与媒介物比较

[0392] \* $P < 0.05$ ,与G1媒介物相比

[0393] B.3. 肿瘤生长曲线

[0394] 图5显示了不同组的肿瘤生长曲线。

[0395] 图5表示在 HuPrime® 肝脏异种移植模型LI1097中测试化合物加马玛布斯的抗体和索拉非尼治疗期间不同组中小鼠的肿瘤体积。

[0396] B.4. 结果概述和讨论

[0397] 在这项研究中,评价了测试化合物加马玛布斯的抗体和阳性对照药物索拉非尼在治疗雌性BALB/c裸小鼠中的HuPrime® HCC异种移植模型LI1097中的功效。

[0398] 在第1组(媒介物,BIW x 2周,i.v)、第2组(加马玛布斯的抗体,20mg/kg,BIW x 4周,i.v)、第3组(加马玛布斯的抗体,50mg/kg,BIW x 4周,i.v)和第4组(索拉非尼,50mg/kg,QD x 4周,p.o)中,研究终止时的体重变化分别为0.67%、2.68%、-0.38%和-7.63%。在带LI1097瘤小鼠中,20mg/kg和50mg/kg的测试化合物加马玛布斯的抗体耐受性良好。索拉非尼50mg/kg治疗组中的小鼠在治疗第27天展现出的平均最大体重减轻为7.63%。

[0399] 在第13天,媒介物处理的小鼠的平均肿瘤大小达到2269.46mm<sup>3</sup>。第2组(加马玛布斯的抗体,20mg/kg)和第3组(加马玛布斯的抗体,50mg/kg)产生了50%抗肿瘤响应vs媒介物处理,TGI分别为51.3%和54.3%(P=0.100和0.111)。第4组(索拉非尼,50mg/kg)在治疗的第13天产生显著的抗肿瘤活性,TGI为64.9%(P=0.024)。表8和图5所示的治疗后不同时间点不同组中的肿瘤大小的结果表明,与索拉非尼一样,第2组和第3组(分别为20mg/kg和50mg/kg的加马玛布斯的抗体)对治疗的响应维持至少27天。然而,第2组和第3组中的肿瘤响应可能太异质而无法获得更好的统计学显著性。

[0400] 总而言之,在这项研究中,测试化合物加马玛布斯的抗体对原代 HuPrime® HCC异种移植模型LI1097产生了抗肿瘤活性,与索拉非尼(针对这种病理学的护理标准)所诱导的相似。此外,GM102的抗肿瘤活性没有伴随任何毒性事件,而索拉非尼治疗诱导高达7%的平均体重减轻。

[0401] 实施例5:抗AMHR II免疫缀合物针对表达AMHR II的非妇科癌症的体内功效

[0402] A. 材料和方法

[0403] A.1. 缩写

[0404] 该实施例中常用的缩写与实施例4的表3和表4的那些缩写相同。

[0405] A.2. 目标

[0406] 为了临床前评价加马玛布斯的化合物GM103在治疗雌性BALB/c裸小鼠中的PDX模型LI1097中的体内功效。

[0407] A.3. 实验设计

[0408] 表9. 功效研究的研究设计

组	N	治疗	剂量水平 (mg/kg)	给药体积 (ml/kg)	途径	时间表
[0409] 1	8	媒介物	-	10	IV	一个单剂量
2	8	GM103	1	10	IV	一个单剂量
3	8	GM103	5	10	IV	一个单剂量
4	8	GM103	10	10	IV	一个单剂量

- [0410] 注释:N:每组动物数量
- [0411] A.4.材料
- [0412] A.4.1.动物
- [0413] -品系:BALB/c裸
- [0414] -年龄:6周至8周
- [0415] -性别:雌性
- [0416] -总数#:32只小鼠+备用
- [0417] A.4.2.动物圈养
- [0418] 将小鼠圈养在以下条件下的单独通风笼中(每笼4只至5只小鼠):
- [0419] -温度:20°C至26°C
- [0420] -湿度:30%至70%
- [0421] -光周期:光照12小时,黑暗12小时
- [0422] -尺寸为325mm×210mm×180mm的聚砜笼
- [0423] -垫底材料为玉米芯,并且每周更换
- [0424] -饮食:在整个研究期间,动物将自由获得经辐射灭菌的干颗粒食品
- [0425] -水:动物将自由获得无菌饮用水
- [0426] -笼识别标签:动物数量,性别,品系,接收日期,治疗,-项目ID,组号,动物ID和治疗开始日期
- [0427] -动物识别:将动物用耳标签标记
- [0428] A.4.3.模型信息
- [0429] 选择HuPrime®肝癌异种移植物模型LI1097用于该功效研究。
- [0430] A.4.4.测试品和对照品
- [0431] 产品鉴定:GM103
- [0432] 制造商:加马玛布斯制药公司
- [0433] 物理描述:溶液
- [0434] 批号:GAM100-NC005-4
- [0435] 所需的量:基于25g的动物BW为4.48mg,40%备用
- [0436] 包装和储存条件:4.3mg/1.3ml/小瓶,在4°C下储存。
- [0437] A.5.实验方法
- [0438] A.5.1.肿瘤接种
- [0439] 将每只小鼠右侧腹皮下接种原代人肝癌异种移植物模型LI1097片段(直径2mm至3mm)用于肿瘤发展。
- [0440] A.5.2.组分配
- [0441] 当平均肿瘤大小达到约200mm<sup>3</sup>时,将小鼠随机分配至表3所示的4个组。每组含有8只小鼠。
- [0442] A.5.3.测试品给药溶液制备
- [0443] 体积类型:根据体重调整给药体积(给药体积=10μL/g)
- [0444] 表10.配制和储存的详细说明

化合物	剂量 (mg/ Kg)	制备	浓度 (mg/ml)	储存
[0445] GM103 (1)	1	用 2.327ml 盐水或 PBS 稀释 0.073ml GM103 原液 (3.308mg/ml) ?。	0.1	新鲜制备
GM103 (2)	5	用 2.037ml 盐水或 PBS 稀释 0.363ml GM103 原液 (3.308mg/ml) ?。	0.5	新鲜制备
GM103 (3)	10	用 1.674ml 盐水或 PBS 稀释 0.726ml GM103 原液 (3.308mg/ml) ?。	1	新鲜制备

## [0446] A.5.4. 观察

[0447] 肿瘤接种后,将每天检查动物的发病率和死亡率。在常规监测时,将检查动物受到肿瘤生长和治疗对正常行为的任何影响,诸如活动性、食物和水的消耗、体重增加/减少、眼睛/头发无光泽以及任何其他异常影响。将根据每个子集内的动物数量记录死亡和观察到的临床体征。

[0448] 每周两次用卡尺在二维上测量肿瘤大小。肿瘤体积将使用下式以 $\text{mm}^3$ 表示:  $TV = 0.5a \times b^2$  其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。

[0449] 体重将每周测量两次。

## [0450] A.5.5. 终点

[0451] 以下分析在终点时应用:TGI (肿瘤生长指数) 和TC。

## [0452] A.5.6. 终止

[0453] 在以下条件下,在死亡之前或达到昏迷状态之前,通过人道安乐死终止个体动物或整组的活体动物实验。

[0454] ➤ 在持续恶化的情况下,有严重的痛苦和/或疼痛的严重临床体征,无法获得足够的食物或水;

[0455] ➤ 显著体重减轻(消瘦) (>20%);

[0456] ➤ 肿瘤大小超过 $3000\text{mm}^3$ 的个体小鼠或 $MTV > 2000\text{mm}^3$ 的整组小鼠。

## [0457] A.5.7. 统计分析

[0458] 对于三个组或更多个组之间的比较,将进行单向ANOVA,然后进行多重比较程序。所有数据将使用SPSS16.0分析。认为 $P < 0.05$ 具有统计学显著性。

## [0459] A.6. 依从性

[0460] 本研究中涉及动物护理和使用的方案 and 任何修改或程序均由中美冠科机构动物护理和使用委员会(IACUC)在进行之前审查并批准。在研究期间,将按照实验室动物护理评估与鉴定协会(AAALAC)的规定进行动物的护理和使用。

## [0461] B. 结果

[0462] 图6的结果显示了5mg/kg或更大剂量的GM103 ADC免疫缀合物的体内抗癌活性。

[0463] 实施例6:另外的非妇科癌症中的AMHRII表达

[0464] A.材料和方法

[0465] A.1.通过流式细胞术的AMHR II膜表达分析

[0466] 制备用于分析的细胞

[0467] -将组织在手术1小时内解剖,切成1-mm<sup>2</sup>片段,并在含有青霉素(10%)、链霉素(10%)和庆大霉素(0.1mg/mL;西格玛奥德里奇)的RPMI中洗涤。

[0468] -将组织片段用胶原酶和DNA酶(2mg/mL;西格玛奥德里奇)在37°C下快速振荡下消化2小时至4小时。

[0469] -借由通过40-1m细胞粗滤器过滤去除粘液和大碎片。

[0470] -通过Ficoll梯度离心获得活细胞。

[0471] 根据制造商的使用说明,使用The Quantum<sup>TM</sup> Simply Cellular(Bangs Laboratory)对重悬的肿瘤细胞上的AMHR II结合位点进行定量:

[0472] -简而言之,将标记有不同校准量的对人IgG抗体的Fc部分有特异性的小鼠抗人IgG的四个微珠群用AlexaFluor488缀合的抗AMHR II 3C23K染色。在FACS管中,将试剂盒中的每个小瓶的一滴加到50μl的PBS1X中:

[0473] 1-珠B(空白)

[0474] 2-珠1+3C23K-AF 10μg/mL

[0475] 3-珠2+3C23K-AF 10μg/mL

[0476] 4-珠3+3C23K-AF 10μg/mL

[0477] 5-珠4+3C23K-AF 10μg/mL(如果有必要,浓度可以增加至25μg/ml)。

[0478] -每个珠群结合不同量的AlexaFluor488缀合的抗AMHR II 3C23K,产生相应的荧光强度,将所述相应的荧光强度在FACS Canto II细胞仪(BD)上分析。

[0479] -通过绘制每个珠群的平均荧光强度相对于其指定的抗体结合能力(ABC)来生成校准曲线。

[0480] 将细胞通常在1.5ml艾本德管中染色。

[0481] -所有离心步骤在4°C下进行。

[0482] -所有孵育步骤在4°C下进行以避免抗体内化。

[0483] -将350万个细胞(经胰蛋白酶化的COV434-MISR II或新鲜解离的肿瘤细胞)以200g至300g离心5分钟,并用PBS洗涤一次(每管500μl)。

[0484] -用冰冷的PBS/2%FBS洗涤(200g至300g,持续3min),并重悬于700μl的PBS1X中,并通过FACS管分配100μl,条件描述在下表11中:

[0485] 表11

	COV434-MISR II	新鲜肿瘤细胞
	无抗体	
	R565-AF (同种型对照) 10μg/mL	
[0486]	3C23K-AF 1ng/mL	
	3C23K-AF 10ng/mL	
	3C23K-AF 100ng/mL	
	3C23K-AF 1μg/mL	
	3C23K-AF 10μg/mL (必要时高达 25μg/ml)	

[0487] -用PBS/1%FBS中的抗体3C23K-AF488在4°C下孵育30min

[0488] -在PBS/2%BSA中洗涤两次(200g至300g,持续3min)

[0489] -在PBS中洗涤两次(200g至300g,持续3min)

[0490] -加入300 $\mu$ l至400 $\mu$ l的PBS,并尽快在FACS上分析

[0491] 该方案不包括用于胞外染色的任何固定步骤,以保持膜的完整性。因此,仅检测到膜AMHR11。

[0492] A.2.通过免疫荧光的AMHR11膜表达

[0493] 因此,开发了一种使用缀合至Alexa Fluor® 488的抗AMHR11 3C23K抗体的间接免疫荧光的方法。然后用缀合至Alexa Fluor® 647的兔抗AF488抗体和山羊抗兔抗体分两步进行信号放大。

[0494] 冷冻组织切片是用保持在-20°C下的低温恒温器Leica CMD1950制成的。将冷冻的组织用OCT化合物固定在金属圆盘上,并且一旦固化后将它们固定在圆盘支架上。实现了7 $\mu$ m的切片,并将其放在Superfrost Plus载玻片(MenzelGläser)上,并立即在-20°C下储存。

[0495] 将冷冻切片载玻片用PBS1X再水化,然后通过用300 $\mu$ l冷丙酮(VWRProlabo)覆盖它们在-20°C下固定10min,并用石蜡膜回收,以确保溶液完全回收所有组织。用PBS冲洗后,将载玻片在室温的湿盒中用300 $\mu$ l封闭缓冲液(PBS1X-BSA2%-山羊血清10%-Triton X100 0.1%)处理1小时,以封闭抗体与组织组分之间的非特异性相互作用。将在封闭缓冲液中稀释为10 $\mu$ g/ml的3C23K-AF488或同种型对照R565-AF488在室温的湿盒中施加30min。用PBS1X-Triton X100 0.1%洗涤3次(3x10min)后,添加在封闭缓冲液中以1/500稀释的抗AF488抗体(Invitrogen)(300 $\mu$ l)在室温下孵育30min。用PBS1X-Triton X100 0.1%洗涤3次(3x10min)后,添加在封闭缓冲液中以1/500稀释的缀合的抗兔抗体AF647(Invitrogen)(300 $\mu$ l)在室温下孵育30min。实现用PBS1X-Triton X100 0.1%洗涤(3x10min),然后施加0.5 $\mu$ g/ml的DAPI(西格玛奥德里奇)持续10min。用PBS和H<sub>2</sub>O冲洗后,将载玻片切片用-滴(50 $\mu$ l)DAKO荧光封固介质固定在盖玻片(24x50mm,Knittel Glass)下,避免气泡空气,并在黑暗中于4°C下储存直至使其成像。

[0496] 使用配备有由Metavue软件(美谷分子仪器(Molecular Devices))控制的CoolSnap EZ CCD相机的荧光显微镜Leica DM5000B进行图像采集。使用ImageJ免费软件(<http://imagej.nih.gov/ij/>)进行图像后处理。

[0497] B. 结果

[0498] B.1.新鲜人结肠直肠样品中的AMHR11表达

[0499] 图7A、图7B、图7C和图7D描绘了来自先前从四名患有结肠直肠癌的不同个体收集的肿瘤样品的AMHR11膜表达的FACS分析。结果表明,包含在肿瘤样品中的肿瘤细胞(CD3-Epcam+)在其膜处表达AMHR11。

[0500] 表12列出了先前从20名患有结肠直肠癌的不同个体收集的肿瘤样品的结果。

[0501] 在表12中,通过(i)确定存在于肿瘤细胞膜处的AMHR11蛋白的平均数量和通过(ii)确定肿瘤样品中膜AMHR11阳性细胞的百分比,评估每个肿瘤样品中的AMHR11表达。表12的左栏中显示了将相应的肿瘤样品设置为“阳性”或“阴性”的指示。指示“阳性”意指AMHR11在肿瘤细胞膜处显著表达。指示“阴性”意指未显著检测到细胞膜处的AMHR11表达。

[0502] 表12的结果显示,尽管有多种表达水平,但20个肿瘤样品中有15个表达了膜

AMHR11。

[0503] 根据肿瘤样品,每个肿瘤细胞的膜AMHR11蛋白的平均数量(表12中称为“每细胞(肿瘤)的受体数量”)从540变化到超过155000。

[0504] 根据肿瘤样品,膜AMHR11蛋白表达细胞的频率(表12中称为“AMHR11阳性细胞(Epcam+)的百分比”)从20%变化到100%。

[0505] 表12的结果未显示出每个肿瘤细胞的膜AMHR11的平均数量与表达膜AMHR11的肿瘤细胞的频率之间的相关性。

[0506] B.2. 人结肠直肠癌肿瘤异种移植(患者来源的异种移植)中的AMHR11表达

[0507] 如实施例3中公开的,获得人肿瘤异种移植样品,并使用材料和方法部分中公开的方法评估肿瘤细胞的AMHR11表达。

[0508] 图8A、图8B、图8C和图8D描绘了来自先前从四名患有结肠直肠癌的不同个体收集和然后异种移植在小鼠内的肿瘤样品的AMHR11膜表达的FACS分析。结果表明,异种移植的肿瘤样品中包含的肿瘤细胞(CD3-Epcam+)在其膜处表达AMHR11。

[0509] 表13呈现了先前从12名患有结肠直肠癌的不同个体收集和然后异种移植在小鼠内的肿瘤样品的结果。

[0510] 在表13中,通过(i)确定存在于肿瘤细胞膜处的AMHR11蛋白的平均数量以及通过(ii)确定异种移植肿瘤样品中膜AMHR11阳性细胞的百分比,评估每个异种移植肿瘤样品中的AMHR11表达。

[0511] 表13的结果显示,尽管有多种表达水平,但12个异种移植肿瘤样品中有6个表达了膜AMHR11。

[0512] 根据异种移植肿瘤样品,每个细胞的膜AMHR11蛋白的平均数量(表13中称为“每细胞(Epcam+)的受体数量”)从超过16000变化到约100000。

[0513] 根据肿瘤样品,膜AMHR11蛋白表达细胞的频率(表13中称为“AMHR11阳性细胞(Epcam+)的百分比”)从0.5%变化到87%。

[0514] 表13的结果未显示出每个肿瘤细胞的膜AMHR11的平均数量与表达膜AMHR11的肿瘤细胞的频率之间的明显相关性。

[0515] 表13的左栏中显示了将相应的肿瘤样品设置为“阳性”或“阴性”的指示。指示“阳性”意指AMHR11在肿瘤细胞膜处未显著表达。指示“阴性”意指未显著检测出肿瘤细胞的膜AMHR11表达。

[0516] B.3. 新鲜肾细胞癌样品中的AMHR11膜表达

[0517] 用材料和方法部分中公开的方法获得人肾细胞癌肿瘤样品,并通过FACS分析评估肿瘤细胞(EpCam+)的膜AMHR11表达。

[0518] 结果描绘于图9A和图9B中。

[0519] 图9A和图9B描绘了来自先前从两名患有肾细胞癌的不同个体收集的肿瘤样品的AMHR11膜表达的FACS分析。结果表明,肾细胞癌肿瘤样品中包含的肿瘤细胞(CD3-Epcam+)在其膜处表达AMHR11。

[0520] 实施例7:针对表达AMHR11的非妇科癌症的抗AMHR11抗体的体内功效

[0521] A. 材料和方法

[0522] 将原代小鼠(来自Envigo的无胸腺裸-Foxn1<sup>nu</sup>)植入来自ChampionsTumorGraft<sup>®</sup>模

型CTG-0401的肿瘤片段。肿瘤达到1000mm<sup>3</sup>至1500mm<sup>3</sup>后,将它们收获,并将肿瘤片段SC植入雌性研究小鼠的左侧腹。每只动物都植入了特定的传代批次:对于CTG-0401是第6代。使用数字卡尺每周两次监测肿瘤生长,并使用式(0.52×[长×宽<sup>2</sup>])计算肿瘤体积(TV)。肿瘤体积达到175±7mm<sup>3</sup>后,基于肿瘤尺寸选择小鼠,并将其随机分为4组,每组12只动物(第0天)。在第0天给药开始后,每周使用数字秤对动物称重两次,并且每周两次以及在研究的最后一天测量TV。当媒介物对照组中的平均肿瘤体积达到1500mm<sup>3</sup>或直至第60天时(以先发生者为准),终止研究。研究设计总结在下表13中。

[0523] 表13:人结肠直肠癌的模型CTG-0401中功效研究的设计

组	n	试剂	剂量 (mg/kg)	剂量 体积 (mL/kg )	途径	给药 时间表	剂量 总数#
[0524] 1	12	媒介物 GM102	0	10	IP	BIWx4	8
		媒介物伊立替康	0	10	IP	Q7Dx3	3
2	12	GM102	20	10	IP	BIWx4	8
3	12	伊立替康	100	10	IP	Q7Dx3	3

[0525] GM102或GM102媒介物在伊立替康或伊立替康媒介物之前施用。

[0526] B结果

[0527] 该实验的结果描绘于图10中。

[0528] 图10的结果显示,抗AMHR II抗体GM102对表达AMHR II的人结肠直肠肿瘤具有有效的体内抗肿瘤作用。

[0529] 值得注意的是,抗AMHR II抗体GM102发挥与主要使用的抗结肠癌分子伊立替康(CAS编号:100286-90-6)的抗肿瘤作用没有区别的抗肿瘤作用。

[0530] 本发明还包括以下实施方式:

[0531] 1、人AMHR II结合剂用于制备用于预防或治疗非妇科癌症的药剂中的用途。

[0532] 2、根据实施方式1所述的用途,其中,所述非妇科癌症选自包括以下的组:结肠癌、肝癌、肝细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、胃癌、胃肠癌、膀胱癌、胰腺癌、头颈癌、肾癌、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、胸膜间皮瘤、黑素瘤、肉瘤、脑癌、骨癌、乳腺癌、前列腺癌和白血病。

[0533] 3、根据实施方式1和2中任一项所述的用途,其中,所述人AMHR II结合剂选自自由以下组成的组:单克隆抗AMHR II抗体及其AMHR II结合片段。

[0534] 4、根据实施方式1至3中任一项所述的用途,其中,所述人AMHR II结合剂是选自由以下抗体组成的组的单克隆抗体:

[0535] a) 包含SEQ ID NO:2的轻链和包含SEQ ID NO:4的重链(无先导序列的3C23 VL序列和3C23 VH序列);

[0536] b) 包含SEQ ID NO:6的轻链和包含SEQ ID NO:8的重链(无先导序列的3C23K VL序列和3C23K VH序列);

[0537] c) 包含SEQ ID NO:10的轻链和包含SEQ ID NO:12的重链(无先导序列的3C23轻链和3C23重链);

[0538] d) 包含SEQ ID NO:14的轻链和包含SEQ ID NO:16的重链(无先导序列的3C23K轻

链和3C23K重链)。

[0539] 5、根据实施方式1所述的用途,其中,所述人AMHR II结合剂是包括包含以下序列的CDR的单克隆抗体:

[0540] -CDRL-1:RASX1X2VX3X4X5A (SEQ ID NO.65),其中,X1和X2独立地是S或P、X3是R或W或G、X4是T或D、并且X5是I或T;

[0541] -CDRL-2是PTSSLX6S (SEQ ID NO.66),其中,X6是K或E;和

[0542] -CDRL-3是LQWSSYPWT (SEQ ID NO.67);

[0543] -CDRH-1是KASGYX7FTX8X9HIH (SEQ ID NO.68),其中,X7是S或T、X8是S或G、并且X9是Y或N;

[0544] -CDRH-2是WIYPX10DDSTKYSQKFQG (SEQ ID NO.69),其中,X10是G或E;和

[0545] -CDRH-3是GDRFAY (SEQ ID NO.70)。

[0546] 6、根据实施方式1至5中任一项所述的用途,其中,所述AMHR II结合剂由抗体药物缀合物(ADC)构成。

[0547] 7、根据实施方式1所述的用途,其中,所述AMHR II结合剂是AMHR II结合工程化受体。

[0548] 8、根据实施方式1所述的用途,其中,所述AMHR II结合剂是表达AMHR II结合工程化受体的细胞。

[0549] 9、根据实施方式8所述的用途,其中,所述AMHR II结合剂是表达AMHR II结合工程化受体的CART细胞或NKT细胞。

[0550] 10、根据实施方式1至9中任一项所述的用途,其中,所述AMHR II结合剂与另一种抗癌治疗组合。

[0551] 11、一种用于确定个体是否对如实施方式1至10中任一项所限定的使用AMHR II结合剂的癌症治疗有响应的方法,其中,所述方法包括确定先前从所述个体获得的肿瘤组织样品是否在细胞表面处表达AMHR II蛋白的步骤。

[0552]

表12: 新鲜人结肠肿瘤样品中的AMHR II表达

样品	Id	组织学类型	每细胞(肿瘤)的受体数量	AMHR II阳性细胞(Epcam+)的百分比	阳性/阴性
# 1	C1	AdenoK	15.600	100%	+
# 2	I1	AdenoK	155.954	20%	+
# 3	E1	AdenoK	23.548	100%	+
# 4	A2	AdenoK	12.680	26%	+
# 5	N1	AdenoK (左结肠)	116.704	50%	+
# 6	N2	AdenoK (左结肠)	7.578		-
# 7	N3	AdenoK (右结肠)	34.677	100%	+
# 8	N4	AdenoK (左结肠) MSI	1.605		-
# 9	A1	MucinousAdenoK(乙状结肠)	540		-
# 10	E2	AdenoK	57.209	100%	+
# 11	I2	AdenoK	155.473	27%	+
# 12	I3	AdenoK	102.275	68%	+
# 13	N6	AdenoK (左结肠)	47.464	100%	+

[0553]

样品	Id	组织学类型	每细胞 (肿瘤) 的受体数量	AMHR II 阳性细胞 (Epcam+) 的百分比	阳性/阴性
# 14	N7	AdenoK (左结肠)	61.870	100%	+
# 15	E3	AdenoK	4.090		-
# 16	E4	AdenoK	32.153	75%	+
# 17	A3	AdenoK (乙状结肠)	6.400		-
# 18	E5	AdenoK	13.152	37%	+
# 19	E6	AdenoK	21.962	25%	+
# 20	A4	AdenoK	42.596	56%	+

[0554]

表13: 来自异种移植的人肿瘤的肿瘤细胞中的AMHRII

编号	序号	组织学类型	每细胞 (Epcam+) 的受体数量	AMHRII阳性细胞 (Epcam+) 的百分比	阳性/阴性
CO14452B	#1	Muc adenoK	63.181	16%	+
CO14744C	#2	AdenoK	25.269	1,5%	-
CO13196D	#3	AdenoK	21.313	4%	-
CO11291	#4	AdenoK	20.629	0,5%	-
CO10619	#5	AdenoK	16.327	0,5%	-
CO11690	#6	AdenoK	17.802	1%	-
CO10069	#7	AdenoK	44.511	2%	-
CO14592	#8	AdenoK	83.762	87%	+
CO10708	#9	AdenoK	43.109	7%	+

[0555]

编号	序号	组织学类型	每细胞 (Epcam+) 的受体数量	AMHR II 阳性细胞 (Epcam+) 的百分比	阳性/阴性
CO7935	#10	AdenoK	99.959	73%	+
CO11101	#11	AdenoK	28.951	44%	+
CO10748	#12	AdenoK	29.821	56%	+





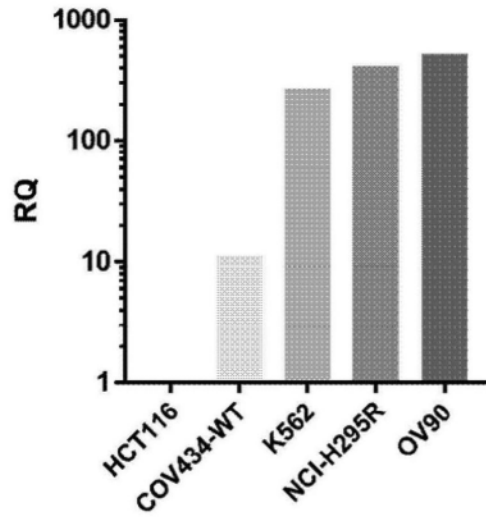


图2A

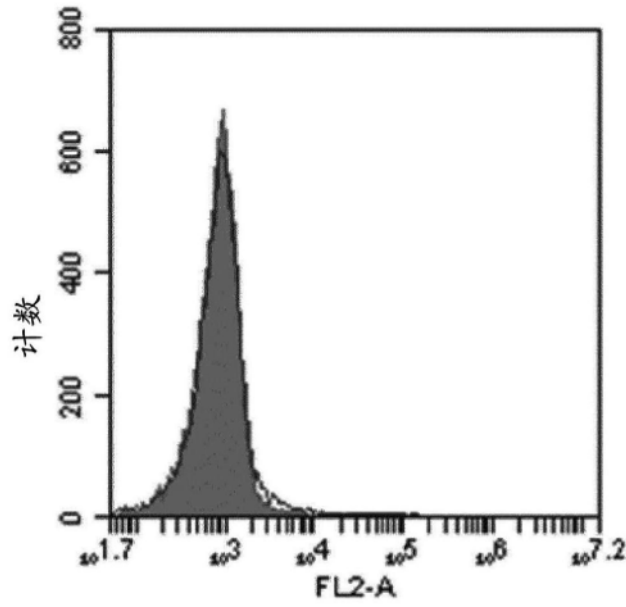


图2B

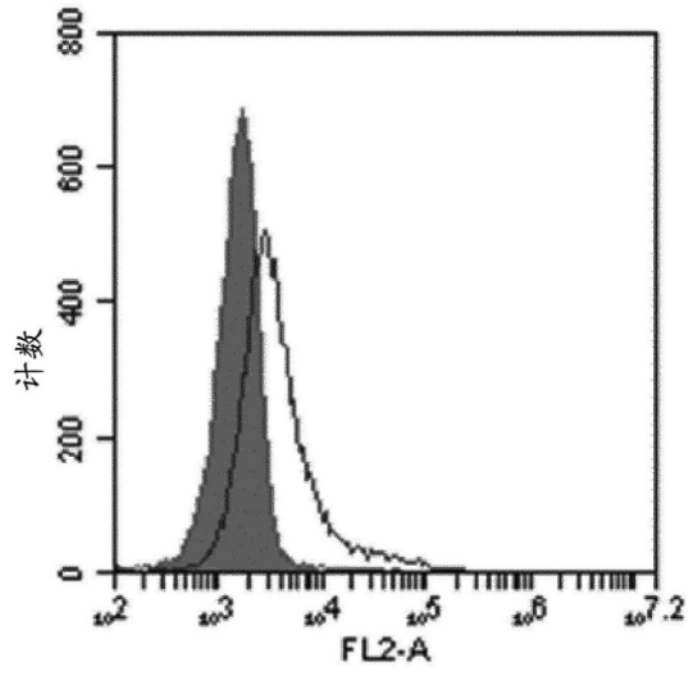


图2C

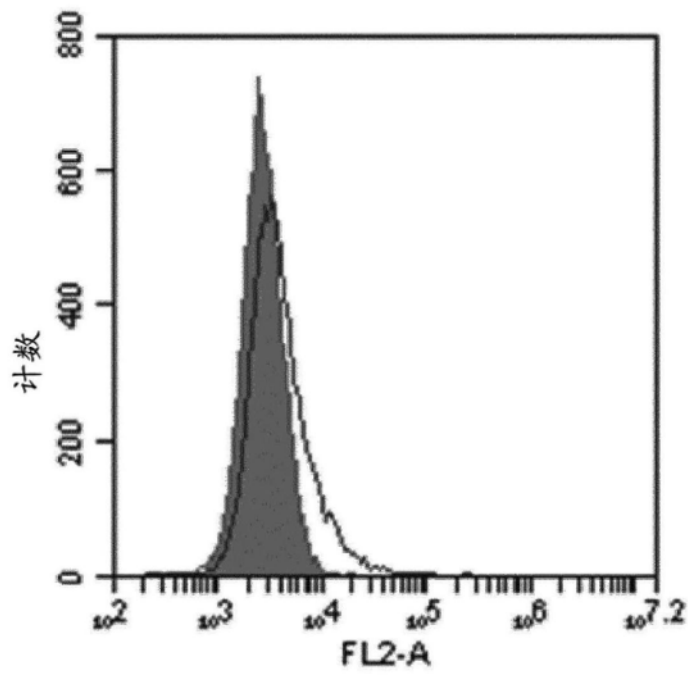


图2D

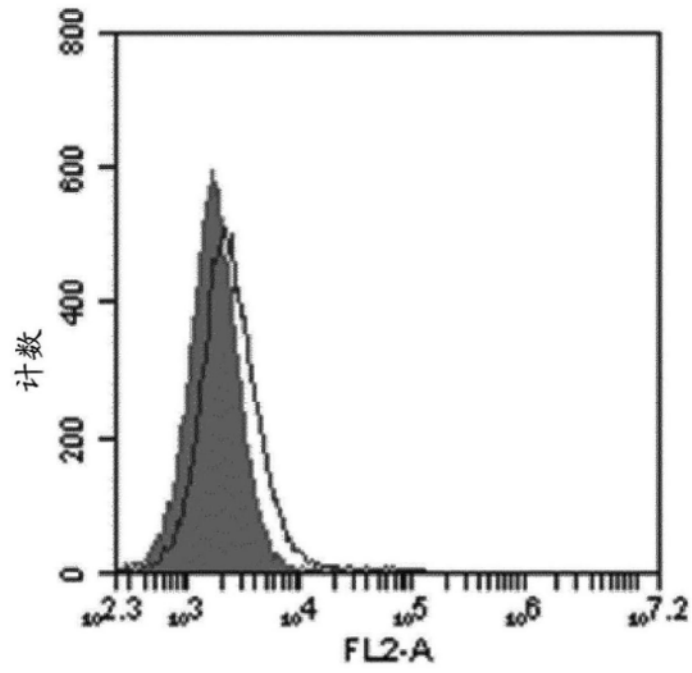


图2E

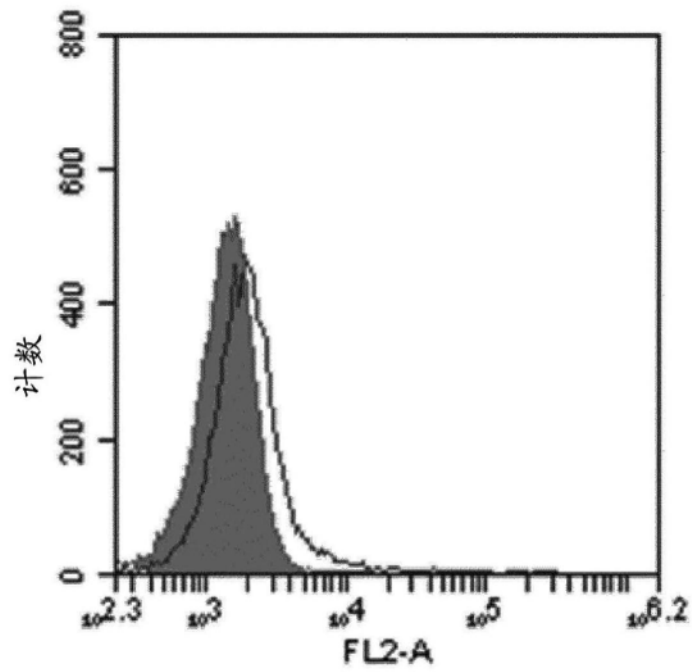


图2F

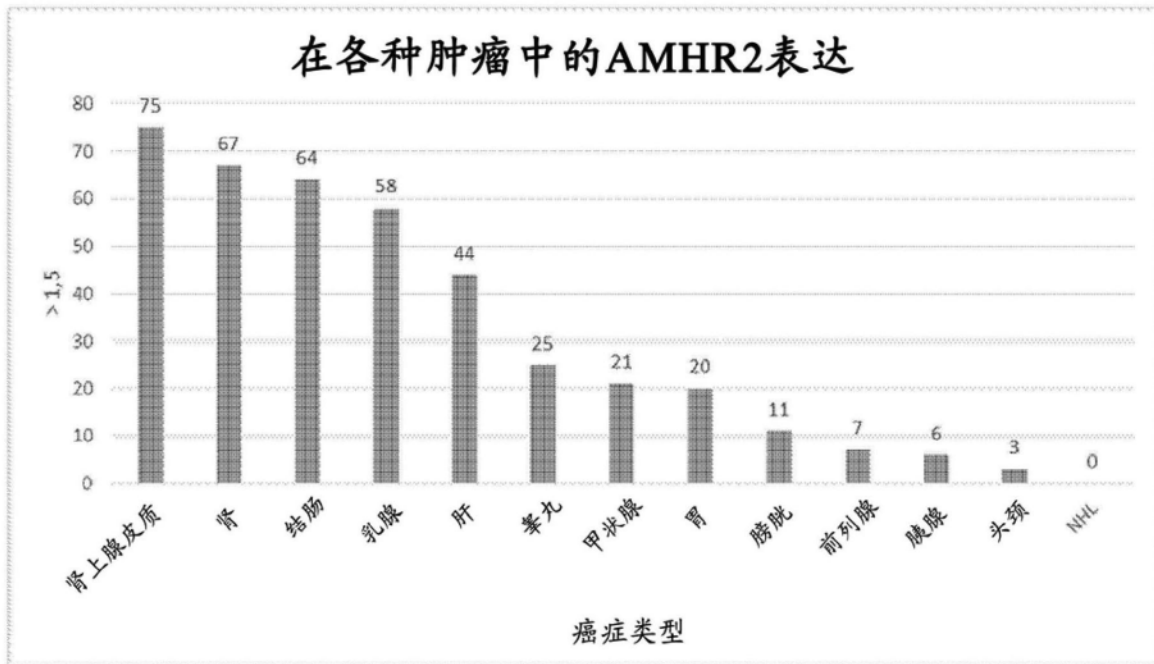


图3

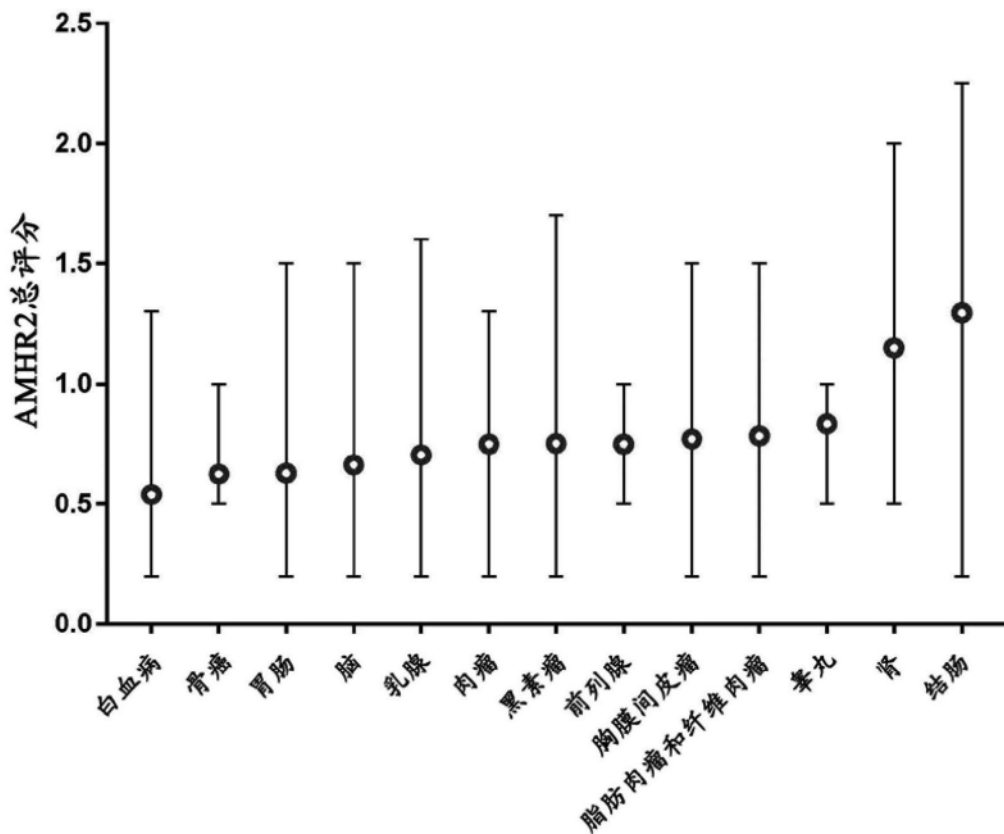


图4

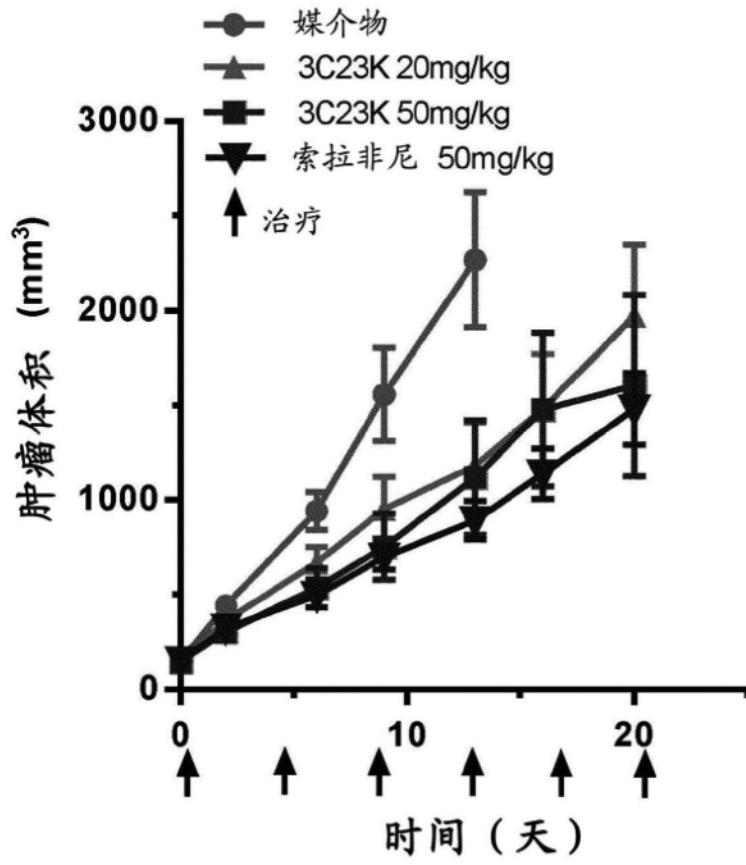


图5

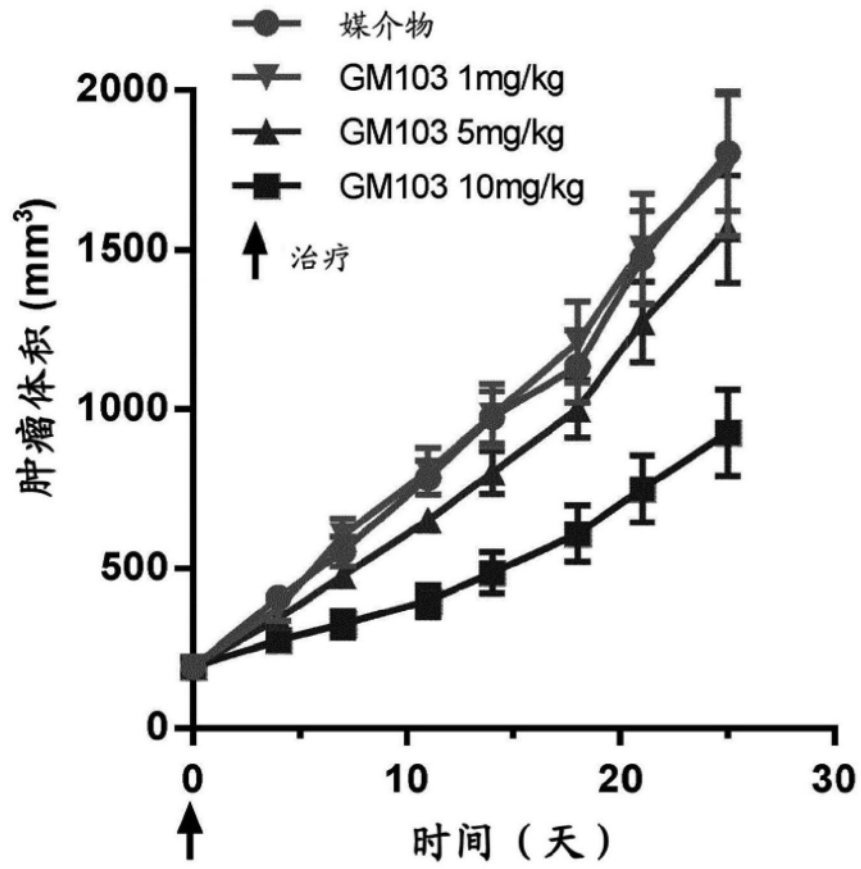


图6

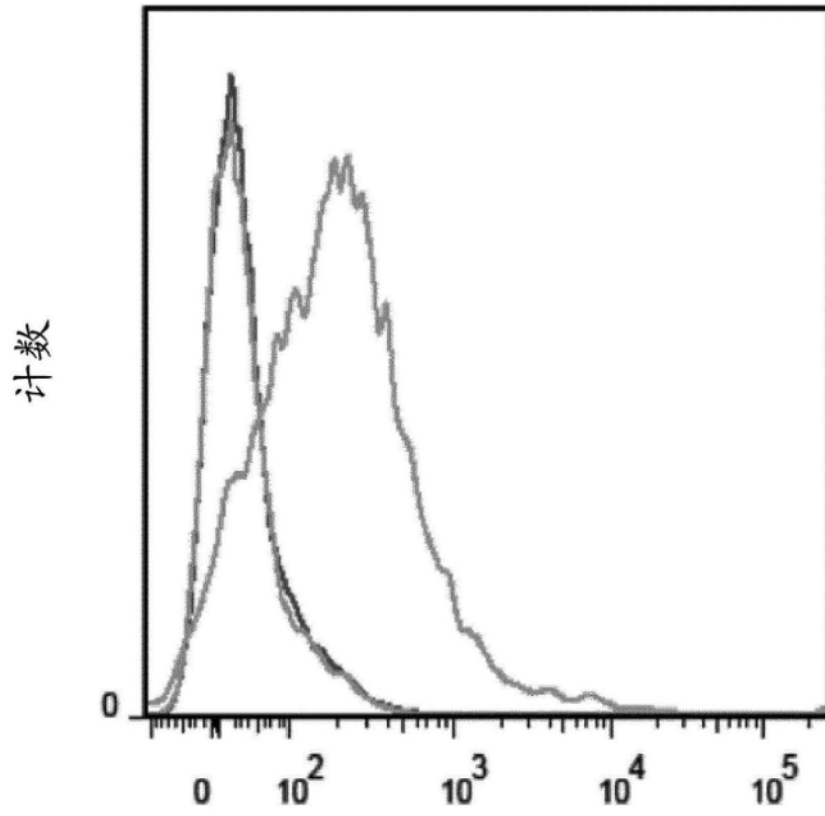


图7A

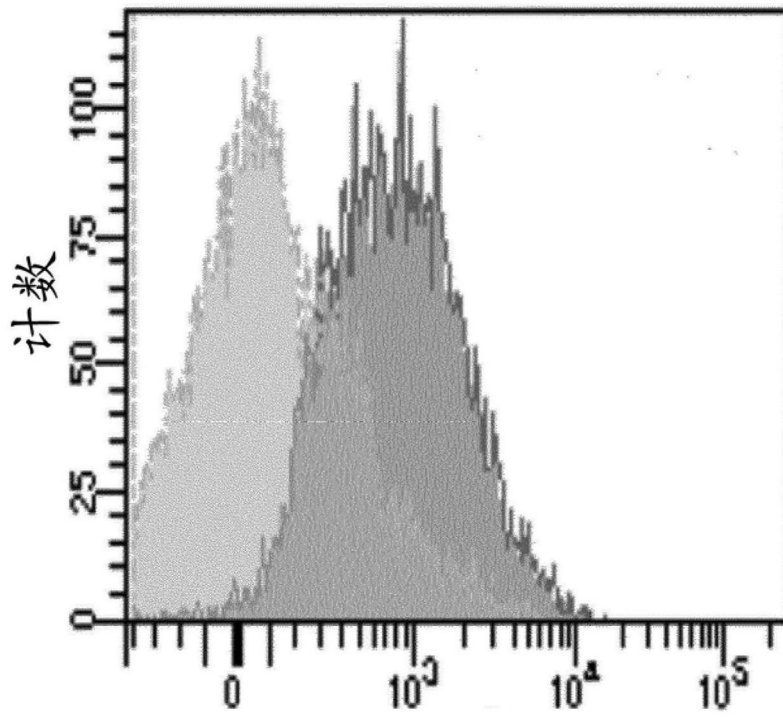


图7B

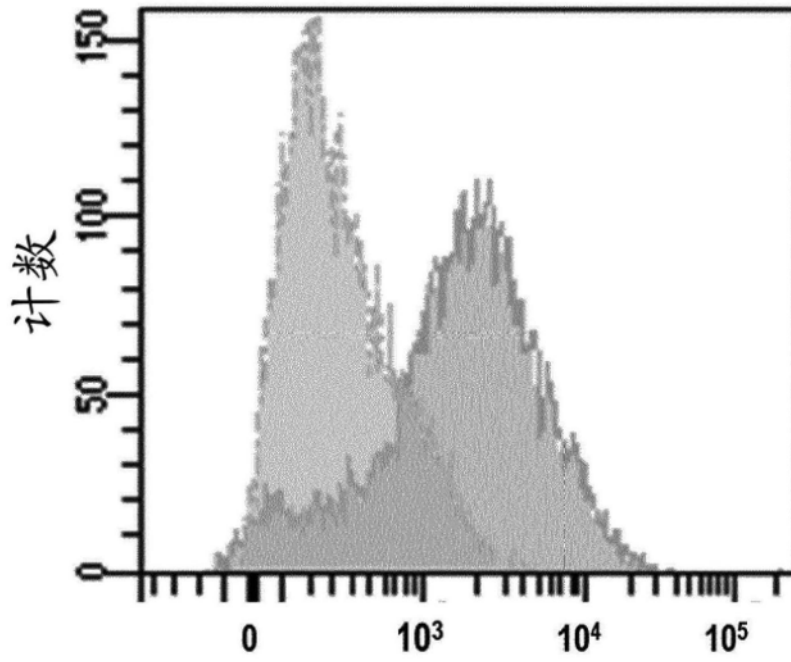


图7C

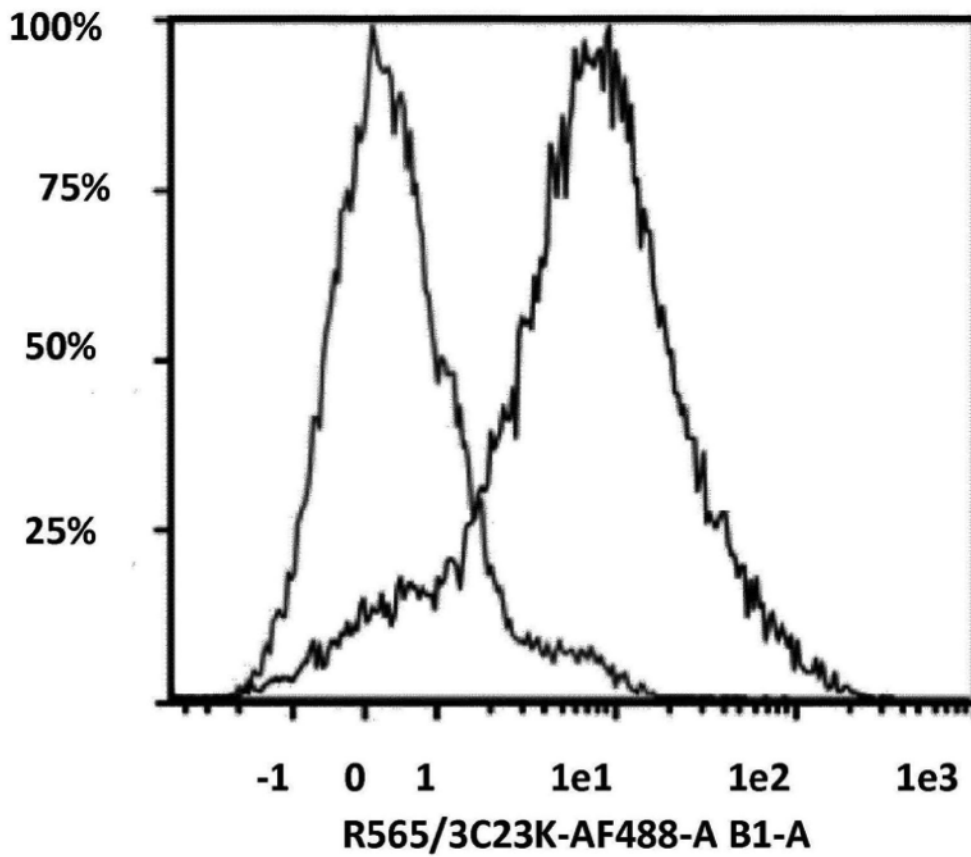


图7D

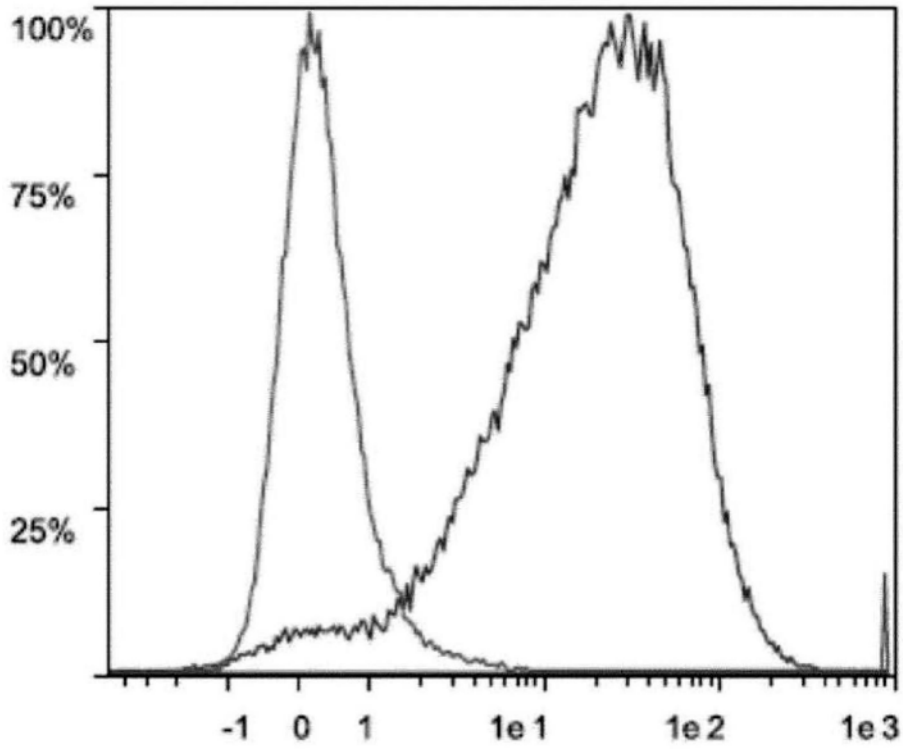


图8A

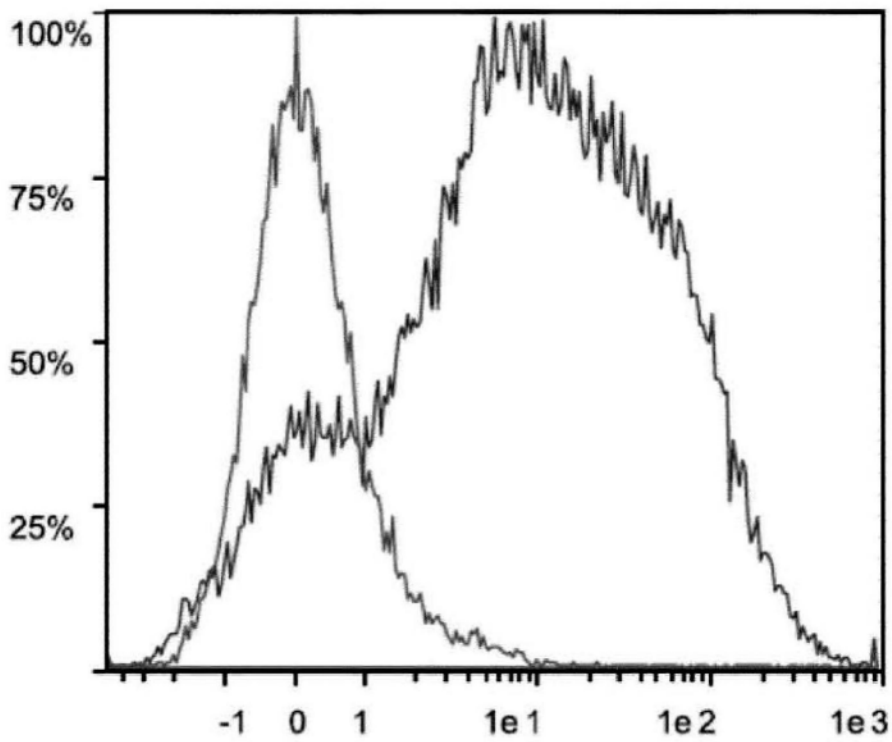


图8B

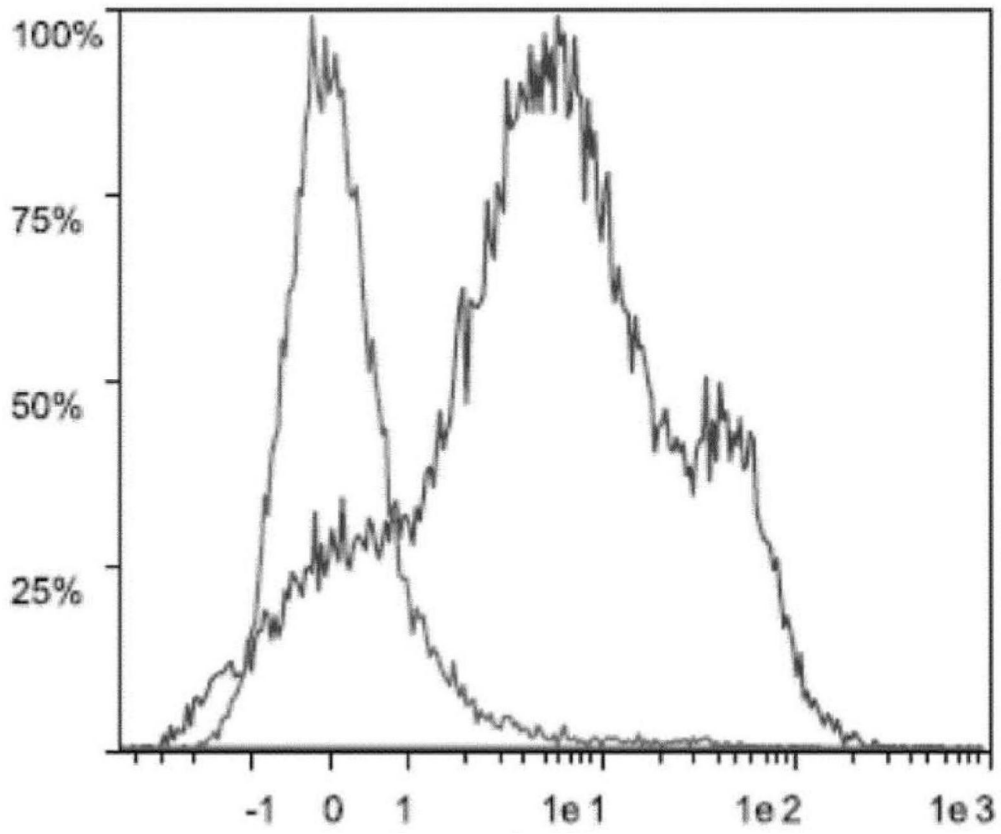


图8C

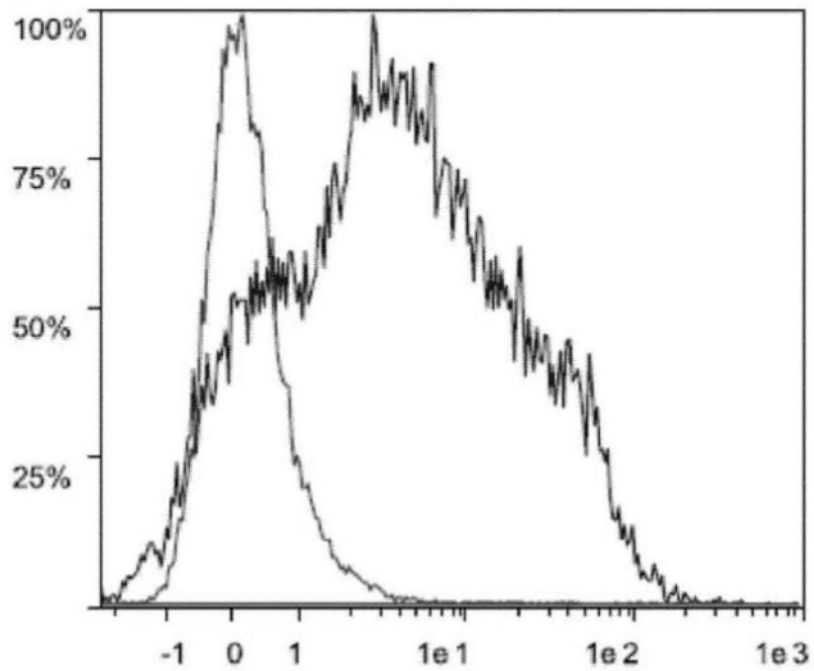


图8D

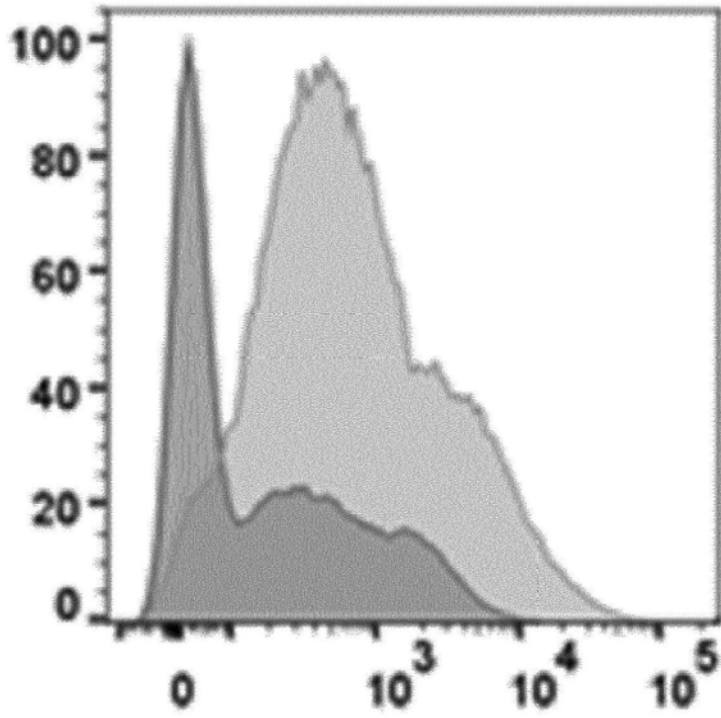


图9A

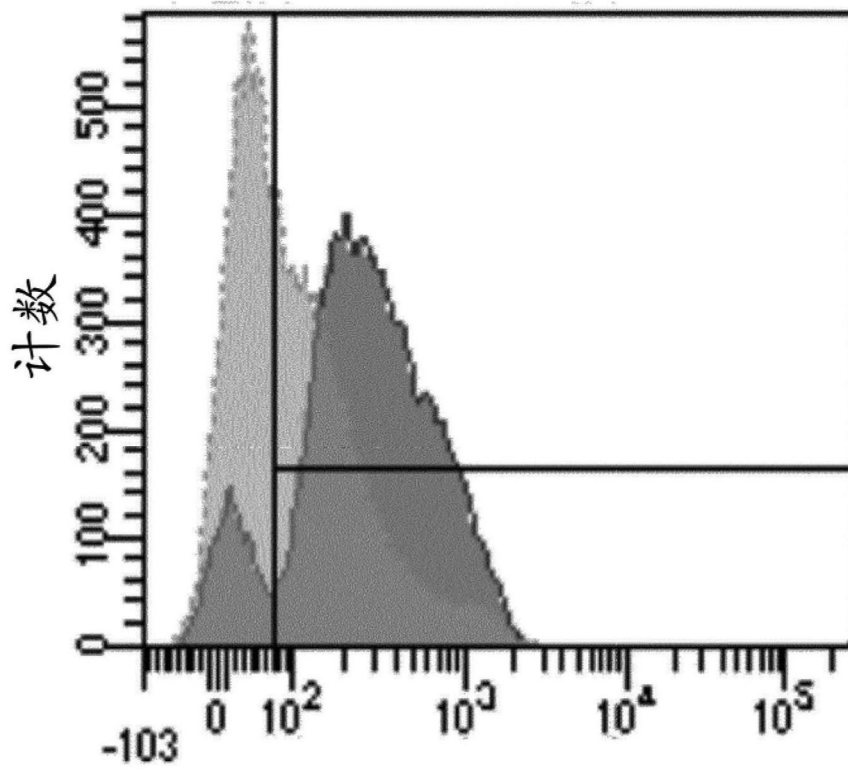


图9B

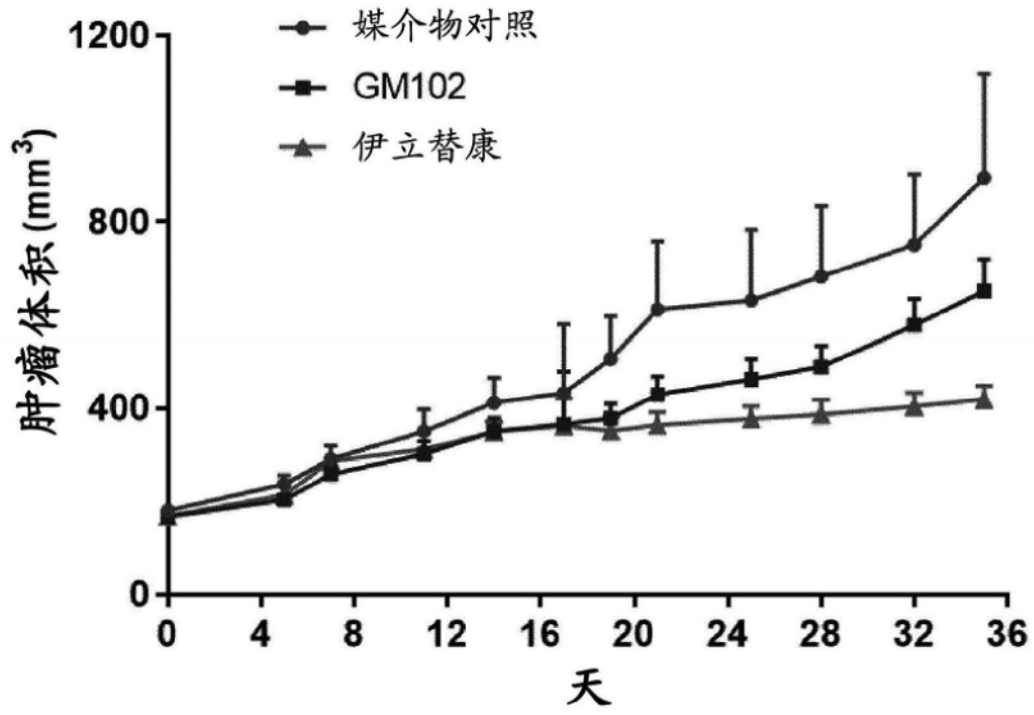


图10