



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118453851 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 09

---

(21) 申请号 202410406230.1 *C07K 16/28* (2006.01)  
(22) 申请日 2020.06.19 *C07K 16/30* (2006.01)  
(30) 优先权数据 *A61P 35/00* (2006.01)  
62/864,960 2019.06.21 US *A61K 51/04* (2006.01)  
*A61K 51/10* (2006.01)  
(62) 分案原申请数据 *A61K 103/00* (2006.01)  
202080045426.2 2020.06.19  
(71) 申请人 瑞泽恩制药公司  
地址 美国纽约州  
(72) 发明人 杰西卡·R·克什纳  
阿利森·克劳福德 丹妮卡·邱  
(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所  
11517  
专利代理师 吴瑜 汪焯君  
(51) Int. Cl.  
*A61K 39/395* (2006.01)

---

权利要求书3页 说明书43页  
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

结合MUC16和CD3的双特异性抗原结合分子  
与4-1BB共刺激组合的用途

(57) 摘要

本文提供了使用结合至粘蛋白16(MUC16)和CD3的双特异性抗原结合分子来治疗癌症的方法。根据某些实施方案,本文所用的抗体以高亲和力和力结合人MUC16并且结合CD3,以诱导人T细胞增殖。根据某些实施方案,本文特别使用双特异性抗原结合分子,所述双特异性抗原结合分子包含特异性结合人CD3的第一抗原结合结构域以及特异性结合人MUC16的第二抗原结合分子。在某些实施方案中,所述双特异性抗原结合分子与抗4-1BB激动剂组合能够抑制表达MUC16的肿瘤例如卵巢肿瘤的生长。所述双特异性抗原结合分子与抗4-1BB激动剂组合可用于治疗其中上调或诱导的靶向免疫应答是所期望的和/或治疗有利的疾病和障碍,例如,用于治疗各种癌症。

1. 一种治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括将治疗有效量的下列中的每一者施用于有需要的受试者:(a) 抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子;和(b) 抗4-1BB激动剂。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述癌症选自由以下各项组成的组:乳腺癌、卵巢癌、角膜癌、胰腺癌、子宫内膜癌、输卵管癌、间皮瘤、非小细胞肺癌、肿块形成型肝内胆管癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌或结直肠癌。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述癌症是卵巢癌。

4. 如权利要求2所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。

5. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗CD3/抗MUC16双特异性抗体和所述抗4-1BB激动剂分开施用。

6. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗CD3/抗MUC16双特异性抗体和所述抗4-1BB激动剂共施用。

7. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗CD3/抗MUC16双特异性抗体在所述抗4-1BB激动剂之前、与其同时或在其之后施用。

8. 如权利要求7所述的方法,其中所述抗CD3/抗MUC16双特异性抗体在所述抗4-1BB激动剂之前施用。

9. 如权利要求7所述的方法,其中所述抗CD3/抗MUC16双特异性抗体与所述抗4-1BB激动剂在同一天施用。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述抗CD3/抗MUC16双特异性抗体与所述抗4-1BB激动剂组合施用。

11. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗4-1BB激动剂选自小分子或抗体。

12. 如权利要求11所述的方法,其中所述抗4-1BB激动剂是选自由以下各项组成的组的抗体:乌瑞鲁单抗和乌托鲁单抗。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述双特异性抗原结合分子包含第一抗原结合结构域,并且所述第一抗原结合结构域特异性结合人CD3并且包含SEQ ID NO:2的重链可变区(HCVR-1)氨基酸序列。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述双特异性抗原结合分子包含第二抗原结合结构域,并且所述第二抗原结合结构域特异性结合人MUC16并且包含SEQ ID NO:1的HCVR-2氨基酸序列。

15. 如权利要求13或14所述的方法,其中所述双特异性抗原结合分子包含特异性结合CD3并且包含SEQ ID NO:2的HCVR-1氨基酸序列的第一抗原结合结构域,以及特异性结合MUC16并且包含SEQ ID NO:1的HCVR-2氨基酸序列的第二抗原结合结构域。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述双特异性抗原结合分子包含SEQ ID NO:3的共同轻链可变区(LCVR)氨基酸序列。

17. 如权利要求1所述的方法,其中肿瘤体积相对于在不存在抗4-1BB激动剂的情况下已施用所述抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子的受试者的肿瘤体积有所减小。

18. 如权利要求1所述的方法,其中所述受试者的无肿瘤存活时间相对于在不存在抗4-1BB激动剂的情况下已施用所述抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子的受试者的无肿瘤存活时间有所增加。

19. 如权利要求18所述的方法,其中无肿瘤存活时间的所述增加在所述受试者无体重减轻的情况下出现。

20. 如权利要求1所述的方法,其中在存在抗4-1BB激动剂的情况下,随后暴露于肿瘤细胞在用所述抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子治疗的所述受试者中引发记忆应答。

21. 一种药物组合物,所述药物组合物包含:

(a) 双特异性抗原结合分子,其包含:(i) 特异性结合人CD3并且包含SEQ ID NO:2的HCVR-1氨基酸序列的第一抗原结合结构域,以及(ii) 特异性结合人MUC16并且包含SEQ ID NO:1的HCVR-2氨基酸序列的第二抗原结合结构域;

(b) 抗4-1BB激动剂;和

(c) 药学上可接受的载剂或稀释剂。

22. 如权利要求21所述的药物组合物,其中部分(a)的所述双特异性抗原结合分子包含SEQ ID NO:3的共同LCVR氨基酸。

23. 一种放射性标记的抗体缀合物,所述缀合物包含结合MUC16和CD3的双特异性抗原结合分子、螯合部分和正电子发射体。

24. 如权利要求23所述的缀合物,其中所述双特异性抗原结合分子共价键合至具有式(A)的螯合部分L:



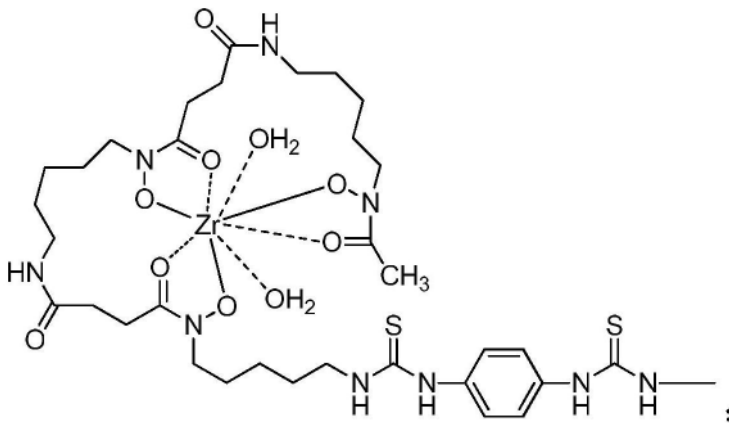
(A)

其中M是所述正电子发射体;并且z在每次出现时独立地是0或1;并且其中z中的至少一个是1。

25. 如权利要求23或24所述的缀合物,其中所述螯合部分包含去铁敏。

26. 如权利要求23至25中任一项所述的缀合物,其中所述正电子发射体是<sup>89</sup>Zr。

27. 如权利要求23至26中任一项所述的缀合物,其中-L-M是



并且其中所述正电子发射体Zr

是<sup>89</sup>Zr。

28. 如权利要求23至27中任一项所述的缀合物,其中所述双特异性抗原结合分子共价键合至一个、两个或三个式(A)的部分。

29. 如权利要求23至28中任一项所述的缀合物,其中所述双特异性抗原结合分子包含特异性结合CD3并且包含SEQ ID NO:2的HCVR-1氨基酸序列的第一抗原结合结构域,以及特异性结合MUC16并且包含SEQ ID NO:1的HCVR-2氨基酸序列的第二抗原结合结构域。

30. 一种对表达MUC16的组织进行成像的方法,所述方法包括将如权利要求23至29中任

一项所述的放射性标记的双特异性抗体缀合物施用于所述组织；以及通过正电子发射断层扫描 (PET) 成像来使MUC16表达可视化。

## 结合MUC16和CD3的双特异性抗原结合分子与4-1BB共刺激组合的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及结合粘蛋白16 (MUC16) 和CD3的双特异性抗原结合分子与4-1BB共刺激组合以及它们的使用方法。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请是申请号为202080045426.2、申请日为2020年6月19日、发明名称为“结合MUC16和CD3的双特异性抗原结合分子与4-1BB共刺激组合的用途”的中国发明专利申请的分案申请,原申请为国际申请号为PCT/US2020/038669的国家阶段申请,该国际申请要求于2019年6月21日提交的美国临时申请号62/864,960的优先权,所述美国临时申请的内容以引用的方式整体并入本文。

[0004] 对序列表的提及

[0005] 序列表的正式副本以ASCII格式的序列表与说明书同时通过EFS-Web以电子方式提交,文件名为10604W001\_SEQ\_LIST\_ST25,创建日期为2020年6月19日,大小为约16,384字节。这个ASCII格式化文件中所含的序列表是说明书的一部分并且以全文引用的方式并入本文中。

### 背景技术

[0006] 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,是一种在卵巢癌中高度表达的单跨膜结构域高度糖基化的整合膜糖蛋白。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的大量胞外部分脱落到血流中。MUC16在癌症 (包括卵巢癌、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 (包括炎症肠病、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,FASEB J.,28:4183-4199)。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的抗体来治疗卵巢癌的方法。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, supra, Das, S. and Batra, S.K. 2015, Cancer Res. 75:4660-4674.)。

[0007] 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。

[0008] 在T细胞活化中,经由TNF受体超家族的共刺激是生存、获得效应子功能和记忆分化的关键。4-1BB (Tnfrsf9),也称为CD137,是TNF受体超家族的成员。受体表达由TCR介导的

初免后的淋巴细胞活化诱导,但是其水平可以通过CD28共刺激来增加。向CD8<sup>+</sup>T细胞上的配体或激动性单克隆抗体(mAb)的暴露对4-1BB产生共刺激,这有助于T细胞的克隆扩增、存活和发育、外周单核细胞的诱导增殖、NF- $\kappa$ B的活化、TCR/CD3触发的活化诱导的T细胞凋亡增强、以及记忆生成。

### 发明内容

[0009] 本文提供了用于治疗受试者的癌症的方法。在一些方面,所述方法包括将包含抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子和药学上可接受的载剂或稀释剂的药物组合物施用于所述受试者,以及将抗4-1BB激动剂另外施用于所述受试者。在一些方面,所述方法包括将包含抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子、抗4-1BB激动剂和药学上可接受的载剂或稀释剂的药物组合物施用于所述受试者。在一些实施方案中,所述癌症选自由以下各项组成的组:卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、输卵管癌、间皮瘤、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。在一些情况下,所述癌症是卵巢癌。在一些情况下,所述癌症是乳腺癌。

[0010] 本文还提供了治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法。在一些方面,所述方法包括将治疗有效量的下列中的每一者施用于有需要的受试者:(a)抗MUC16抗体或其抗原结合片段或者抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子;和(b)抗4-1BB激动剂。

[0011] 本文还提供了靶向/杀死表达MUC16的肿瘤细胞的治疗方法。在一些方面,所述治疗方法包括将治疗有效量的抗MUC16抗体或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子和治疗有效量的抗4-1BB激动剂施用于有需要的受试者。在一些方面,所述抗MUC16抗体或所述抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子和所述抗4-1BB激动剂单独配制。在一些方面,所述抗MUC16抗体或所述抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子和所述抗4-1BB激动剂配制在相同的药物组合物中。

[0012] 本文还提供了抗MUC16抗体或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子与抗4-1BB激动剂一起在制造用于治疗涉及表达MUC16的细胞或由表达MUC16的细胞引起的疾病或障碍的药物中的用途。

[0013] 相对于在不存在抗4-1BB激动剂的情况下已施用抗MUC16抗体或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子的受试者的肿瘤体积,在存在抗4-1BB激动剂的情况下,抗MUC16抗体或其抗原结合片段或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子的施用可以减少肿瘤体积。

[0014] 相对于在不存在抗4-1BB激动剂的情况下已施用抗MUC16抗体或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子的受试者的无肿瘤存活时间,在存在抗4-1BB激动剂的情况下,抗MUC16抗体或其抗原结合片段或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子的施用可以增加无肿瘤存活时间。在一些方面,无肿瘤存活时间的增加在所述受试者无体重减轻的情况下出现。

[0015] 在随后暴露于肿瘤细胞时,在存在抗4-1BB激动剂的情况下用抗MUC16抗体或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子治疗的受试者中,在存在抗4-1BB激动剂的情况下,抗MUC16抗体或其抗原结合片段或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子的施用可以引发记忆应答。

[0016] 抗4-1BB激动剂可以是4-1BB的小分子或生物激动剂,并且在一些方面是抗体。示

例性抗4-1BB激动剂包括可商购获得的抗体(例如抗小鼠4-1BB激动剂)和治疗性抗体(诸如乌瑞鲁单抗和乌托鲁单抗)。

[0017] 根据本文提供的方法使用结合人MUC16和人CD3的抗MUC16抗体或其抗原结合片段和双特异性抗体及其抗原结合片段。所述双特异性抗体尤其可用于靶向表达CD3的T细胞,以及用于刺激T细胞活化,例如在其中T细胞介导的表达MUC16的细胞的杀死是有利的或所期望的情况下。例如,所述双特异性抗体可以将CD3介导的T细胞活化引导至特定的表达MUC16的细胞,诸如卵巢肿瘤细胞。

[0018] 结合MUC16的抗MUC16抗体或其抗原结合片段可以与抗4-1BB激动剂组合用于治疗涉及表达MUC16的肿瘤(尤其是更大的和/或更难治疗的肿瘤)或由表达MUC16的肿瘤引起的疾病和障碍。U.S.2018/0112001中详细描述了示例性抗MUC16抗体及其抗原结合片段。在一些方面,所述抗MUC16抗体包含SEQ ID NO:18的HCVR和U.S.2018/0112001中提及的SEQ ID NO:26的LCVR。在一些方面,所述抗MUC16抗体是U.S.2018/0112001中提及的H1H8767P抗体。

[0019] 此外,结合MUC16和CD3的示例性双特异性抗原结合分子在美国公开号2018/0112001中有所描述,该公开以引用的方式并入本文。

[0020] 结合MUC16和CD3的双特异性抗原结合分子(例如,抗体)在本文中也称为“抗MUC16/抗CD3双特异性分子”、“抗CD3/抗MUC16双特异性分子”、“MUC16xCD3 bsAbs”,或简称为“MUC16xCD3”。所述抗MUC16/抗CD3双特异性分子的抗MUC16部分可用于靶向表达MUC16的细胞(例如,肿瘤细胞)(例如,卵巢肿瘤),并且所述双特异性分子的抗CD3部分可用于活化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)。因此,抗MUC16/抗CD3双特异性分子尤其可用于治疗涉及表达MUC16的肿瘤或由表达MUC16的肿瘤引起的疾病和障碍(例如,卵巢肿瘤)。所述抗MUC16/抗CD3双特异性分子还可以与抗4-1BB激动剂组合用于治疗涉及表达MUC16的肿瘤或由表达MUC16的肿瘤引起的疾病和障碍,以及用于影响记忆应答和/或表位扩散。在一些方面,所述抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与抗4-1BB激动剂组合用于产生不依赖于MUC16抗原的存在或对MUC16抗原的反应的抗肿瘤反应,尤其是在抑制继发性肿瘤挑战方面。

[0021] 所述双特异性抗原结合分子包含特异性结合人CD3的第一抗原结合结构域和特异性结合MUC16的第二抗原结合结构域。

[0022] 根据本文提供的方法使用的示例性双特异性抗体是抗CD3/抗MUC16双特异性分子,其中所述特异性结合CD3的第一抗原结合结构域包含重链可变区(HCVR)氨基酸序列中的任一者、轻链可变区(LCVR)氨基酸序列中的任一者、HCVR/LCVR氨基酸序列对中的任一者、重链CDR1-CDR2-CDR3氨基酸序列中的任一者或轻链CDR1-CDR2-CDR3氨基酸序列中的任一者,如美国公开号2018/0112001中所示。

[0023] 根据本文提供的方法使用抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子,其中所述特异性结合CD3的第一抗原结合结构域包含所述HCVR氨基酸序列中的任一者和/或所述LCVR氨基酸序列中的任一者或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的它们的基本上相似的序列,如美国公开号2018/0112001的表16、18、19、22和24中所示。在一些方面,所述特异性结合CD3的第一抗原结合结构域包含SEQ ID NO:2的HCVR-1氨基酸序列。在一些方面,所述特异性结合CD3的第一抗原结合结构域包含SEQ ID NO:5的全长重链氨基酸序列。

[0024] 根据本文提供的方法使用抗CD3/抗MUC16双特异性分子,其中所述特异性结合MUC16的第二抗原结合结构域包含HCVR氨基酸序列中的任一者和/或LCVR氨基酸序列中的任一者或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的它们基本上相似的序列,如美国公开号2018/0112001的表1中所示。在一些方面,所述特异性结合MUC16的第二抗原结合结构域包含SEQ ID NO:1的HCVR-2氨基酸序列。在一些方面,所述特异性结合MUC16的第二抗原结合结构域包含SEQ ID NO:4的全长重链氨基酸序列。

[0025] 根据本文提供的方法使用抗CD3/抗MUC16双特异性分子,所述双特异性分子包含如美国公开号2018/0112001的表4中所示的序列中的任一者,或具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的它们基本上相似的序列。

[0026] 根据本文提供的方法使用抗CD3/抗MUC16双特异性分子,其中所述特异性结合CD3的第一抗原结合结构域包含SEQ ID NO:2的HCVR-1氨基酸序列,并且其中所述特异性结合MUC16的第二抗原结合结构域包含SEQ ID NO:1的HCVR-2氨基酸序列。在一些方面,所述抗CD3/抗MUC16双特异性分子包含SEQ ID NO:3的共同LCVR氨基酸序列。

[0027] 根据本文提供的方法使用抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子,其中所述特异性结合CD3的第一抗原结合结构域包含SEQ ID NO:5的全长重链氨基酸序列,并且其中所述特异性结合MUC16的第二抗原结合结构域包含SEQ ID NO:4的全长重链氨基酸序列。在一些方面,所述抗CD3/抗MUC16双特异性分子包含SEQ ID NO:6的全长轻链氨基酸序列。

[0028] 在一个方面,本文提供了包含抗MUC16抗原结合分子或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子和药学上可接受的载剂或稀释剂的药物组合物。在一些方面,所述药物组合物还包含抗4-1BB激动剂。

[0029] 根据本公开的方法使用抗MUC16抗体及其抗原结合片段以及具有经修饰的糖基化模式的抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子。在一些应用中,去除不希望的糖基化位点的修饰可能是有用的,或缺乏岩藻糖部分的抗体存在于寡糖链上,例如,以增加抗体依赖性细胞毒性(ADCC)功能(参见Shield等人(2002)JBC 277:26733)。在其他应用中,可以进行半乳糖基化的修饰,以便修改补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0030] 在一个方面,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文公开的抗MUC16抗体或其抗原结合片段或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子、抗4-1BB激动剂和药学上可接受的载剂。在相关方面,本公开的特征在于一种组合物,所述组合物是抗MUC16抗体或其抗原结合片段或者抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子、抗4-1BB激动剂和第三治疗剂的组合。在一个实施方案中,所述第三治疗剂是利地与抗MUC16抗体或其抗原结合片段或者抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子组合的任何药剂。可以利地与抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子组合的示例性药剂在本文别处有所详细讨论。

[0031] 在另一个方面,本文提供了用于免疫PET成像的放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子缀合物。所述缀合物包含抗MUC16抗体或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子、螯合部分和正电子发射体。

[0032] 本文提供了用于合成所述缀合物的方法和适用于其的合成中间体。

[0033] 本文提供了对表达MUC16的组织进行成像的方法,所述方法包括将本文所述的放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子缀合物施用于所述组织;以及通过正电子发射断层扫描(PET)成像来使MUC16表达可视化。



[0034] 本文提供了对包含表达MUC16的细胞的组织进行成像的方法,所述方法包括将本文所述的放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子缀合物施用于所述组织,以及通过PET成像来使MUC16表达可视化。

[0035] 本文提供了用于检测组织中的MUC16的方法,所述方法包括将本文所述的放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子缀合物施用于所述组织,以及通过PET成像来使MUC16表达可视化。在一个实施方案中,所述组织存在于人类受试者中。在某些实施方案中,所述受试者是非人类哺乳动物。在某些实施方案中,所述受试者患有疾病或障碍,诸如癌症、炎性疾病或感染。

[0036] 本文提供了用于检测组织中的MUC16的方法,所述方法包括使所述组织与缀合至本文所述的荧光分子的抗MUC16抗体或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子接触;以及通过荧光成像来使MUC16表达可视化。

[0037] 本文提供了用于鉴定适合于抗肿瘤疗法的受试者的方法,所述方法包括选择患有实体瘤的受试者,施用本文所述的放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子缀合物,以及通过PET成像来使所述肿瘤中所施用的放射性标记的抗体缀合物可视化,其中所述放射性标记的抗体缀合物存在于所述肿瘤中将所述受试者鉴定为适合于抗肿瘤疗法。

[0038] 本文提供了治疗肿瘤的方法,所述方法包括选择患有肿瘤的受试者;确定所述肿瘤是MUC16阳性的;以及将抗肿瘤疗法施用于所述有需要的受试者。在某些实施方案中,所述抗肿瘤疗法包含PD-1/PD-L1信号传导轴的抑制剂(例如,抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体),所述抑制剂是检查点抑制剂疗法的实例。在某些实施方案中,给所述受试者施用本文所述的放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子缀合物,以及经由正电子发射断层扫描(PET)成像对所述放射性标记的抗体缀合物的定位进行成像,以确定肿瘤是否为MUC16阳性的。在某些实施方案中,给所述受试者另外施用放射性标记的抗PD-1抗体缀合物,以及经由正电子发射断层扫描(PET)成像对所述放射性标记的抗体缀合物的定位进行成像,以确定肿瘤是否为PD-1阳性的。

[0039] 本文提供了用于监测抗肿瘤疗法在受试者中的功效的方法,其中所述方法包括选择患有实体瘤的受试者,其中所述受试者经抗肿瘤疗法治疗;将本文所述的放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子缀合物施用于所述受试者;通过PET成像对肿瘤中所施用的放射性标记的缀合物的定位进行成像;以及确定肿瘤生长,其中所述缀合物或放射性标记的信号摄取从基线的降低表示所述抗肿瘤疗法的功效。

[0040] 在某些实施方案中,所述抗肿瘤疗法包括PD-1抑制剂(例如,REGN2810、BGB-A317、纳武单抗(nivolumab)、皮地利珠单抗(pidilizumab)和帕博利珠单抗(pembrolizumab))、PD-L1抑制剂(例如,阿特珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、德瓦鲁单抗(durvalumab)、MDX-1105和REGN3504,以及专利公开号US2015-0203580中公开的那些)、CTLA-4抑制剂(例如,伊匹单抗(ipilimumab))、TIM3抑制剂、BTLA抑制剂、TIGIT抑制剂、CD47抑制剂、GITR抑制剂、另一种T细胞共抑制剂或配体的拮抗剂(例如,LAG3、CD-28、2B4、LY108、LAIR1、ICOS、CD160或VISTA的抗体)、吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂、血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂[例如,“VEGF-陷阱”,诸如阿柏西普或如US 7,087,411中所示的其他VEGF抑制性融合蛋白,或抗VEGF抗体或其抗原结合片段(例如,贝伐单抗(bevacizumab))

或兰尼单抗 (ranibizumab) 或 VEGF 受体的小分子激酶抑制剂 (例如, 舒尼替尼 (sunitinib)、索拉非尼 (sorafenib)、或帕唑帕尼 (pazopanib))、Ang2 抑制剂 (例如, 奈斯伐单抗 (nesvacumab))、转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) 抑制剂、表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂 (例如, 厄洛替尼、西妥昔单抗 (cetuximab))、CD20 抑制剂 (例如, 抗 CD20 抗体, 诸如利妥昔单抗 (rituximab))、肿瘤特异性抗原 [例如, CA9、CA125、黑素瘤相关抗原 3 (MAGE3)、癌胚抗原 (CEA)、波形蛋白、肿瘤-M2-PK、前列腺特异性抗原 (PSA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA) (也称为叶酸水解酶 1 (FOLH1))、粘蛋白-1、MART-1 和 CA19-9] 的抗体、疫苗 (例如, 卡介苗、癌症疫苗)、增加抗原呈递的佐剂 (例如, 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、双特异性抗体 (例如, CD3xCD20 双特异性抗体或 PSMAxCD3 双特异性抗体)、细胞毒素、聚 ADP-核糖聚合酶 (PARP) 抑制剂、化学治疗剂 (例如, 达卡巴嗪、替莫唑胺、环磷酰胺、多西他赛、多柔比星、柔红霉素、顺铂、卡铂、吉西他滨、氨甲蝶呤、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、和长春新碱)、环磷酰胺、放射疗法、IL-6R 抑制剂 (例如, 沙利鲁单抗 (sarilumab))、IL-4R 抑制剂 (例如, 度普利尤单抗 (dupilumab))、IL-10 抑制剂、细胞因子 (诸如 IL-2、IL-7、IL-21 和 IL-15) 以及抗体-药物缀合物 (ADC) (例如, 抗 CD19-DM4 ADC 和抗 DS6-DM4 ADC)。

[0041] 通过参阅接下来的详细说明, 其他实施方案将变得显而易见。

#### 附图说明

[0042] 图 1 显示了 OVCAR-3 模型研究 1 的结果 (第 4 天的平均辐射 [ $p/s/cm^2/sr$ ])。在给药开始前, 所有组的肿瘤负荷与 BLI 评估的相似。显示的数据是在肿瘤移植后第 4 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。在给药开始前, 各组之间的肿瘤负荷无显著差异。

[0043] 图 2 显示了 OVCAR-3 模型研究 1 的结果 (第 25 天的平均辐射 [ $p/s/cm^2/sr$ ])。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 4-1BB 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。在肿瘤移植后第 5 天和第 8 天, 用 BSMUC16/CD3-001 (12.5 $\mu$ g 静脉内) 或 CD3 结合对照 (12.5 $\mu$ g 静脉内) 单独或与抗 4-1BB 激动剂 (100 $\mu$ g 静脉内) 组合治疗小鼠。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。将各组与 CD3 结合对照进行比较 (对于 BSMUC16/CD3-001, \* $p=0.0159$ , 对于 BSMUC16/CD3-001 和抗 4-1BB 组合, \*\* $p<0.0079$ )。还将 BSMUC16/CD3-001 和抗 4-1BB 组合与单独的 BSMUC16/CD3-001 进行比较 (# $p=0.0159$ )。

[0044] 图 3 显示了用 BSMUC16/CD3-001+抗 4-1BB 组合治疗的 ID8-VEGF/huMUC16 小鼠模型的结果。BSMUC16/CD3-001 治疗显著增加了 ID8-VEGF/huMUC16 腹水模型中的中位数存活时间, 并且 4-1BB 共刺激的添加可使若干小鼠存活。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、6 和 10 天给小鼠施用 BSMUC16/CD3-001 (1mg/kg 静脉内) 或 CD3 结合对照 (1mg/kg 静脉内) 与同种型对照, 或者在移植后第 3 天给小鼠施用抗 4-1BB (克隆 LOB12.3, 2.5mg/kg 静脉内), 然后在第 6 天和第 10 天施用另外两个剂量的 BSMUC16/CD3-001 (1mg/kg 静脉内)。当小鼠因腹水引起腹胀而体重增加超过 30% 时处死。使用 Gehan-Breslow-Wilcoxon 方法来确定统计显著性。对于统计分析, 将各组与 CD3 结合对照进行比较 (对于 BSMUC16/CD3-001,

[0045]  $**p=0.0026$ ,对于BSMUC16/CD3-001与抗4-1BB,  $****p<0.0001$ )。此外,为了确定抗4-1BB的添加是否比单独的BSMUC16/CD3-001具有任何有益结果,将抗4-1BB与单独的BSMUC16/CD3-001进行比较( $\#p=0.0168$ )。BSMUC16/CD3-001增加了CD3结合对照组的中位数存活时间以及存活小鼠的百分比(0至27%)。无法确定BSMUC16/CD3-001+抗4-1BB组合组的中位数存活时间,因为超过50%的小鼠存活。组合治疗组的总存活率为55%。

[0046] 图4描绘了体重随时间推移的变化。如图3所示,使用BSMUC16/CD3-001+抗4-1BB组合的治疗在给药期间未引起任何显著的体重减轻,这被用作毒性的读出。

[0047] 图5提供了ID8-VEGF/huMUC16小鼠模型的第二项研究数据,该模型用3种不同的BSMUC16/CD3-001+抗4-1BB组合给药方案进行治疗:A)在移植后第3、7和10天,BSMUC16/CD3-001(1mg/kg静脉内)或CD3结合对照(1mg/kg静脉内)与同种型对照(2.5mg/kg静脉内)或抗4-1BB(2.5mg/kg静脉内)的组合;B)在移植后第3天,一剂BSMUC16/CD3-001(1mg/kg静脉内)加上抗4-1BB(2.5mg/kg静脉内)的组合,然后在移植后第7天和第10天,多剂BSMUC16/CD3-001(1mg/kg静脉内);C)在移植后第3天,一剂BSMUC16/CD3-001(1mg/kg静脉内)或CD3结合对照(1mg/kg静脉内)加上抗4-1BB(2.5mg/kg静脉内)的组合,无需进一步治疗。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30%时处死。使用Gehan-Breslow-Wilcoxon方法来确定统计显著性。对于统计分析,将各组与CD3结合对照进行比较(对于BSMUC16/CD3-001,  $**p=0.002$ ,对于由BSMUC16/CD3-001和抗4-1BB组合组成的全部三个组,

[0048]  $****p<0.0001$ )。此外,为了确定与抗4-1BB的组合是否比单独的BSMUC16/CD3-001具有任何有益结果,将所有组与该组进行比较(对于Gp4,  $\#p=0.011$ (3剂CD3双特异性+3剂抗4-1BB),对于Gp5,  $\#p=0.027$ (3剂CD3双特异性+仅1剂抗4-1BB),对于Gp7,  $\#p=0.011$ (一剂CD3双特异性+抗4-1BB)。

[0049] 图6描绘了体重随时间推移的变化。如图5所示,使用不同给药方案的BSMUC16/CD3-001+抗4-1BB组合的治疗在给药期间未引起任何显著的体重减轻,这被用作毒性的读出。

### 具体实施方式

[0050] 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,而不旨在进行限制,因为本公开的范围将仅由所附权利要求限定。

[0051] 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)。

[0052] 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公开的实践或检验,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。

[0053] 如实施例中所示,MUC16xCD3双特异性抗体在若干小鼠模型中能够有效治疗卵巢肿瘤。然而,本发明人试图通过使用抗4-1BB激动剂提供共刺激信号来增强和延长

MUC16xCD3诱导的T细胞活性。4-1BB信号传导通路可以通过促进T细胞存活来增强T细胞应答的幅度和持续时间,逆转T细胞无反应性,并随后产生记忆T细胞以促进有效的抗肿瘤活性和表位扩展。

[0054] 如本文所示,MUC16xCD3双特异性抗体与抗4-1BB共刺激组合在卵巢肿瘤中产生了惊人的抗肿瘤功效。在体重不减轻的情况下观察到抗肿瘤作用。该组合还显示出诱导肿瘤特异性T细胞记忆并且促使表位扩展。该组合还显示出产生不依赖于MUC16抗原的存在或对MUC16抗原的反应的抗肿瘤反应,尤其是在抑制继发性肿瘤挑战方面。

[0055] 本文展示了抗MUC16抗体和MUC16xCD3双特异性抗体与4-1BB共刺激组合增强T细胞应答的幅度和持续时间从而产生显著的抗肿瘤功效的能力。抗MUC16抗体或MUC16xCD3双特异性抗体与4-1BB共刺激组合可用于治疗肿瘤以实现更好的总体存活率的方法。

[0056] 抗原结合分子的治疗用途

[0057] 本公开包括这样的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用抗MUC16抗体或其抗原结合片段、或特异性结合CD3和MUC16的双特异性抗原结合分子以及抗4-1BB激动剂。根据本文的方法使用的治疗组合物可以包含抗MUC16抗体或MUC16xCD3双特异性抗原结合分子和药学上可接受的载剂或稀释剂。如本文所用,表述“有需要的受试者”是指表现出一种或多种癌症症状或标志的人类或非人类动物(例如,表达肿瘤或患有本文下文提及的任何癌症的受试者),或否则将受益于MUC16活性的抑制或降低或MUC16+细胞(例如,卵巢癌细胞)的消耗。

[0058] 本文公开的抗体和双特异性抗原结合分子(以及包含它们的治疗组合物)尤其可以与抗4-1BB激动剂组合用于治疗其中刺激、活化和/或靶向免疫应答将是有益的任何疾病或障碍。具体而言,抗MUC16抗体和抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子与抗4-1BB激动剂组合可用于治疗、预防和/或改善涉及或由MUC16表达或活性或MUC16+细胞的增殖介导的任何疾病或障碍。实现本文公开的治疗方法的作用机制包括在效应细胞存在下杀死表达MUC16的细胞,例如通过CDC、细胞凋亡、ADCC、吞噬作用,或通过这些机制中的两种或更多种的组合。可以使用抗体或双特异性抗原结合分子抑制或杀死的表达MUC16的细胞包括例如卵巢肿瘤细胞。通过4-1BB共刺激实现另外的治疗效果,包括促进T细胞的克隆扩增、存活和发育,诱导外周单核细胞增殖,活化NF- $\kappa$ B,增强由TCR/CD3触发的活化诱导的T细胞凋亡和记忆生成。

[0059] 抗原结合分子(包括抗MUC16抗体和抗MUC16/抗CD3双特异性抗体)与抗4-1BB激动剂组合可以用于治疗例如原发性和/或转移性肿瘤(诸如卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、输卵管癌、间皮瘤、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)。在某些实施方案中,抗体或双特异性抗原结合分子用于治疗以下癌症中的一者或多者:卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、输卵管癌、间皮瘤、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。根据本公开的某些实施方案,抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗体与抗4-1BB激动剂组合可用于治疗患有卵巢癌或乳腺癌的患者。根据本文公开的其他相关实施方案,提供的方法包括将抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子与抗4-1BB激动剂组合施用于患有卵巢癌或乳腺癌的患者。

[0060] 本公开还包括用于启动记忆应答和/或表位扩展的方法。本公开还包括用于产生

不依赖于MUC16抗原的存在或对MUC16抗原的反应的抗肿瘤反应的方法,例如,在抑制继发性肿瘤挑战方面。

[0061] 本公开还包括用于治疗受试者中的残留癌症的方法。如本文所用,术语“残留癌症”是指在用抗癌疗法治疗后受试者中的一种或多种癌细胞的存在或持续存在。

[0062] 根据某些方面,本公开提供了治疗与MUC16表达相关的疾病或障碍(例如,卵巢癌)的方法,所述方法包括在已确定受试者患有卵巢癌之后,将一种或多种在别处描述的双特异性抗原结合分子与抗4-1BB激动剂组合施用于受试者。例如,本公开包括用于治疗卵巢癌的方法,所述方法包括在受试者接受激素疗法(例如,抗雄激素疗法)后1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周、2个月、4个月、6个月、8个月、1年或更长时间,向患者施用抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子。

[0063] 定义

[0064] 如本文所用,表述“CD3”是指作为多分子T细胞受体(TCR)的一部分在T细胞上表达并且由四个受体链中的两个结合形成的同源二聚体或异源二聚体组成的抗原:CD3- $\epsilon$ 、CD3- $\delta$ 、CD3- $\zeta$ 和CD3- $\gamma$ 。除非明确指出是来自非人物种,否则本文对蛋白质、多肽和蛋白质片段的所有提及均旨在指相应的蛋白质、多肽或蛋白质片段的人型式。因此,除非指出是来自非人类物种,例如,“小鼠CD3”、“猴CD3”等,否则表述“CD3”意指人类CD3。

[0065] 如本文所用,“结合CD3的抗体”或“抗CD3抗体”包括特异性识别单个CD3亚基(例如, $\epsilon$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 或 $\zeta$ )的抗体及其抗原结合片段,以及特异性识别两个CD3亚基的二聚体复合物(例如, $\gamma/\epsilon$ 、 $\delta/\epsilon$ 和 $\zeta/\zeta$ CD3二聚体)的抗体及其抗原结合片段。本文所用的抗体和抗原结合片段可结合可溶性CD3和/或细胞表面表达的CD3。可溶性CD3包括天然CD3蛋白以及重组CD3蛋白变体,例如单体和二聚体CD3构建体,它们缺乏跨膜结构域或者与细胞膜无关。

[0066] 如本文所用,表述“细胞表面表达的CD3”意指在体外或体内细胞表面上表达,以使得CD3蛋白的至少一部分暴露于细胞膜的胞外侧,并且可接近抗体的抗原结合部分的一种或多种CD3蛋白。“细胞表面表达的CD3”包括含有在细胞膜中功能性T细胞受体范围内的CD3蛋白。表述“细胞表面表达的CD3”包括作为细胞表面上的同源二聚体或异源二聚体的一部分表达的CD3蛋白(例如, $\gamma/\epsilon$ 、 $\delta/\epsilon$ 和 $\zeta/\zeta$ CD3二聚体)。表述“细胞表面表达的CD3”还包括在细胞表面上自身表达的CD3链(例如,CD3- $\epsilon$ 、CD3- $\delta$ 或CD3- $\gamma$ ),不存在其他CD3链类型。“细胞表面表达的CD3”可以包括在通常表达CD3蛋白的细胞表面上表达的CD3蛋白或由这种CD3蛋白组成。或者,“细胞表面表达的CD3”可以包括在通常在表面上不表达人CD3、但是已经被人工工程化为在表面上表达CD3的细胞表面上表达的CD3蛋白或由这种CD3蛋白组成。

[0067] 如本文所用,表述“MUC16”是指粘蛋白16,也称为癌抗原125(CA125)。MUC16是一种具有单个跨膜结构域的大型膜相关粘蛋白。这种细胞表面糖蛋白在卵巢癌中高度表达,并且在促进癌细胞生长方面发挥作用。如本文所用,“结合MUC16的抗体”或“抗MUC16抗体”包括特异性地识别MUC16的抗体及其抗原结合片段。

[0068] 如本文所用的表述“4-1BB”,也称为CD137,是指活化诱导的共刺激分子。4-1BB是免疫应答的重要调节因子,是TNF受体超家族的成员。表述“抗4-1BB激动剂”是结合4-1BB并活化受体的任何配体。示例性抗4-1BB激动剂包括乌瑞鲁单抗(BMS-663513)和乌托鲁单抗(PF-05082566),以及商购获得的抗小鼠4-1BB抗体。此外,术语“4-1BB激动剂”是指部分或完全促进、诱导、增加和/或活化4-1BB生物学活性的任何分子。合适的激动剂分子具体包括

激动剂抗体或抗体片段,包括双特异性抗体,例如包含结合免疫细胞上的4-1BB的一个臂以及结合例如肿瘤靶标上的抗原的另一个臂的双特异性抗体。该术语还包括天然多肽、肽、反义寡核苷酸、有机小分子等的片段或氨基酸序列变体。在一些实施方案中,以剂量依赖性方式观察到激动剂存在下的活化。在一些实施方案中,测量的信号(例如,生物学活性)比在类似条件下用阴性对照测得的信号高至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约100%。激动剂的功效也可以使用功能测定法来确定,诸如激动剂活化或促进多肽功能的能力。例如,功能测定法可以包括将多肽与候选激动剂分子接触并测量通常与多肽相关的一种或多种生物学活性的可检测变化。激动剂的效力通常由其 $EC_{50}$ 值(活化50%的激动剂反应所需的浓度)定义。 $EC_{50}$ 值越低,激动剂的效力越大,活化最大生物学反应所需的浓度越低。4-1BB激动剂还可以包括含有4-1BB配体的分子或4-1BB配体的片段,例如包含含有4-1BBL或其片段的一个臂和结合至例如肿瘤上的抗原的另一个臂的双特异性分子。这些片段可以包括Fc区。

[0069] 术语“抗原结合分子”包括抗体和抗体的抗原结合片段,包括例如双特异性抗体。

[0070] 如本文所用,术语“抗体”意指包含与特定抗原(例如,MUC16或CD3)特异性结合或相互作用的至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包括包含四条多肽链(即通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链)的免疫球蛋白分子,以及它们的多聚体(例如,IgM)。每条重链包含重链可变区(在本文中缩写为 $HC_{VH}$ 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 $LC_{VL}$ 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 $V_L$ 区可以进一步再划分为高变区,称为互补性决定区(CDR),其间插有更保守的区域,称为框架区(FR)。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。在本文公开的不同实施方案中,抗MUC16抗体或抗CD3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的并行分析来定义氨基酸共有序列。

[0071] 如本文所用,术语“抗体”还包括全抗体分子的抗原结合片段。如本文所用,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、合成性或基因工程化的多肽或糖蛋白。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。这种DNA是已知的和/或可从例如商业来源、DNA文库(包括例如噬菌体-抗体文库)容易地获得,或者可以是合成的。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。

[0072] 抗原结合片段的非限制性例子包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>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,分离的互补性决定区(CDR)诸如CDR3肽)或受限制的FR3-CDR3-FR4肽。如本文所用,其他经工程化的分子(诸如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结

构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双体、三体、四体、微体、纳米体(例如,单价纳米体、二价纳米体等)、小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域)也被涵盖在表述“抗原结合片段”内。

[0073] 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含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。

[0074] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可以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。可以存在于本文所用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、示例性构型包括:(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,包括上文所列的任何例示性构型中,可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或可以由完整或部分的铰链区或接头区连接。铰链区可以由在单个多肽分子中邻近的可变结构域和/或恒定结构域之间产生柔性或半柔性连接的至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成。此外,本文所用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的彼此和/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)。

[0075] 正如全抗体分子那样,抗原结合片段可以是单特异性的或多特异性的(例如,双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段通常将包含至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域都能够特异性结合至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,可以使任何多特异性抗体形式,包括本文公开的示例性双特异性抗体形式,适用于本文所用的抗体的抗原结合片段的语境中。

[0076] 本文所用的抗体可以通过补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)起作用。“互补依赖性细胞毒性”(CDC)是指在补体的存在下通过本文公开的抗体裂解表达抗原的细胞。“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”(ADCC)是指其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如,天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体并由此导致靶细胞的裂解的细胞介导的反应。可以使用本领域熟知且可获得的测定来测量CDC和ADCC。(参见例如,美国专利号5,500,362和5,821,337,以及Clynes等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)95:652-656)。抗体的恒定区对于抗体固定补体和介导细胞依赖性细胞毒性的能力很重要。因此,可以根据抗体介导细胞毒性是否需要抗体来选择抗体的同种型。

[0077] 在某些实施方案中,本文所用的抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗体是人抗体。如本文所用,术语“人抗体”意图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。人抗体可以包括例如在CDR中以及特别是在CDR3中,不由人种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体细胞突变引入的突变)。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。

[0078] 在一些实施方案中,根据本文公开的方法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。此类重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。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。

[0079] 人抗体能够以与铰链异质性相关的两种形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子包含大约150-160kDa的稳定四链构建体,其中二聚体通过链间重链二硫键保持在一起。在第二种形式中,二聚体不经由链间二硫键连接,并且约75-80kDa的分子由共价偶联的轻链和重链(半抗体)构成。即使在亲和纯化之后,这些形式也极难分离。

[0080] 第二种形式在各种完整IgG同种型中的出现频率是由于但不限于与抗体的铰链区同种型相关的结构差异。人IgG4铰链的铰链区中的单个氨基酸置换可以显著减少第二种形式的出现(Angal等人(1993)Molecular Immunology30:105)至通常使用人IgG1铰链观察到的水平。本公开涵盖在铰链、 $C_H2$ 或 $C_H3$ 区中具有一个或多个突变的抗体,这例如在产生中可以是所需的,以提高所需的抗体形式的产率。

[0081] 本文所用的抗体可以是分离的抗体。如本文所用,“分离的抗体”意指已经从天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。例如,出于本公开的目的,已经从生物体的至少一种组分中、或者从抗体天然存在或天然产生的组织或细胞中分离或移除的抗体是“分离的抗体”。分离的抗体还包括重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是已经经历至少一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施方案,分离的抗体可以基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0082] 与衍生出抗体的对应种系序列相比,根据本文公开的方法使用的抗MUC16抗体和抗MUC16/抗CD3抗体可以在重链和轻链可变结构域的框架区和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸置换、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本公开包括来源于本文所公开的氨基酸序列中的任一个的抗体和其抗原结合片段,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变成得到所述抗体的种系序列的对应残基,或另一人类种系序列的对应残基,或对应种系残基的保守氨基酸置换(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。本领域的普通技术人员从本文所公开的重链和轻链可变区序列开始,可以容易地产生多种抗体和抗原结合片段,其包含一个或多个个别种系突变或其组合。在某些实施方案中, $V_H$ 和/或 $V_L$ 结构域内的所有框架和/或CDR残基突变回衍生出抗体的原始种系序列中的残基。在其他实施方案中,仅某些残基被突变回原始种系序列,例如,仅存在于FR1的前8个氨基酸内或FR4的后8个氨基酸内的突变残基,或仅存在于CDR1、CDR2或CDR3内的突变残基。在其他实施方案中,框架和/或一个或多个CDR残基中的一个或多个被突变为不同的种系序列(即,与最



初衍生出所述抗体的种系序列不同的种系序列)的一个或多个对应残基。此外,本文所用的抗体可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个别残基突变为特定种系序列的对应残基,而不同于原始种系序列的某些其他残基得以保持或突变为不同种系序列的对应残基。在获得含有一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段后,可以容易地测试所述抗体和抗原结合片段的一种或多种所需特性,如结合特异性的改善、结合亲和力的增加、拮抗性或激动性生物特性(视具体情况而定)的改善或增强、免疫原性降低等。以这种通用方式获得的抗体和抗原结合片段涵盖在本公开内。

[0083] 根据本文提供的方法使用抗MUC16抗体和抗MUC16/抗CD3抗体,所述抗MUC16抗体和抗MUC16/抗CD3抗体包含具有一个或多个保守置换的本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一者的变体。例如,本公开包括具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗MUC16抗体和抗MUC16/抗CD3抗体,相对于本文的表1所示的重链或轻链氨基酸序列中的任一者,所述HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等等的保守氨基酸置换。

[0084] 术语“表位”是指与抗体分子的可变区中的特定抗原结合位点(称为互补位)发生相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有超过一个表位。因此,不同抗体可以与抗原上的不同区域结合并且可以具有不同的生物效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位由来自线性多肽链的不同区段的氨基酸在空间上并列而产生。线性表位由多肽链中的邻近氨基酸残基来产生。在某些情况下,表位可以包括抗原上的糖、磷酸基基团或磺酰基基团部分。

[0085] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本相同”指示当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一核酸(或其互补链)最佳对齐时,如通过下文所论述的任何众所周知的序列同一性算法如FASTA、BLAST或GAP所测量,至少约95%,并且更优选地至少约96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基存在核苷酸序列同一性。在某些情况下,与参考研酸分子具有大体一致性的核酸分子可以编码与参考研酸分子所编码的多肽具有相同或大体上类似的氨基酸序列的多肽。

[0086] 当应用于多肽时,术语“基本上相似性”或“基本上相似”意指当两个肽序列诸如通过程序GAP或BESTFIT使用默认空位权重进行最佳比对时,共有至少95%序列同一性,甚至更优选地至少98%或99%序列同一性。优选地,不相同的残基位置的差异在于保守氨基酸置换。“保守氨基酸置换”是氨基酸残基被含有具有类似的化学特性(例如,电荷或疏水性)的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸置换。通常,保守氨基酸置换大体上不会改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列的保守置换彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度以校正置换的保守性质。用于进行该调整的手段是本领域的技术人员熟知的。参见例如,Pearson(1994)Methods Mol.Biol.24:307-331,该文献以引用的方式并入本文。含有具有相似的化学性质的侧链的氨基酸组的实例包括:(1)脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,以及(7)含硫侧链,即半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸置换组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守替代是在以下文献中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化:

Gonnet等人(1992)Science 256:1443-1445,该文献以引用的方式并入本文。“适度保守”替换是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0087] 通常使用序列分析软件来测量多肽的序列相似性,所述序列相似性也称为序列同一性。蛋白质分析软件使用关于指定到各种置换、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸置换)的相似性度量来匹配相似序列。例如,GCG软件含有诸如Gap和Bestfit的程序,这些程序可以以默认参数使用,以确定紧密相关的多肽(诸如来自不同物种的生物体的同源多肽)之间,或野生型蛋白及其突变型蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如,GCG 6.1版。还可以使用FASTA(GCG 6.1版中的程序)使用默认或推荐参数对多肽序列进行比较。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供查询与搜索序列之间的最佳重叠区域的比对和序列一致性百分比(Pearson(2000)同上)。当将本文公开的序列与含有来自不同生物体的大量序列的数据库进行比较时,另一优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-410和Altschul等人(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-402,每个文献均以引用的方式并入本文。

[0088] 序列变体

[0089] 与衍生出抗体的对应种系序列相比,本文所用的抗体和双特异性抗体在重链可变结构域的框架和/或CDR区域中包含一个或多个氨基酸置换、插入和/或缺失。

[0090] 本文还使用来源于本文所公开的氨基酸序列中的任一个的抗体及其抗原结合片段,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变成得到所述抗体的种系序列的对应残基,或另一人类种系序列的对应残基,或对应种系残基的保守氨基酸置换(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”),并且具有弱的或不可检测的抗原结合。

[0091] 此外,本文所用的抗体可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个别残基突变为特定种系序列的对应残基,而不同于原始种系序列的某些其他残基得以保持或突变为不同种系序列的对应残基。在获得含有一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段后,可以测试一个或多个所期望的性质,诸如改善的结合特异性、减弱或减少的结合亲和力、改善或增强的药代动力学性质、降低的免疫原性等。以本公开的指导给出的这种通用方式获得的抗体和抗原结合片段涵盖在本发明内。

[0092] 根据本公开使用包含本文提供的具有一个或多个保守置换的重链或轻链氨基酸序列中的任一者的变体的抗体和双特异性抗体。与衍生单独抗原结合结构域的相应的种系序列相比,本文使用的抗体和双特异性抗原结合分子在重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸置换、插入和/或缺失,同时维持或改善所期望的抗原结合特征。“保守氨基酸置换”是氨基酸残基被含有具有类似的化学特性(例如,电荷或疏水性)的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸置换。通常,保守氨基酸置换大体上不会改变蛋白质的功能特性。含有具有相似的化学性质的侧链的氨基酸组的实例包括:(1)脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,以及(7)含硫侧链,即半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸置换组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守性替代是在以下文献中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化:

Gonnet等人(1992)《科学(Science)》256:1443-1445。“适度保守”替换是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0093] 本公开还包括包含抗原结合结构域的抗原结合分子,所述抗原结合结构域具有与本文所公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中的任一个基本上相同的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列,同时维持或改善所期望的抗原亲和力。当应用于氨基酸序列时,术语“基本同一性”或“基本上相同”意指当两个氨基酸序列,诸如通过程序GAP或BESTFIT使用默认空位权重进行最佳比对时,共有至少95%序列同一性,甚至更优选地至少98%或99%序列同一性。优选地,不相同的残基位置的差异在于保守氨基酸置换。在两个或更多个氨基酸序列的保守置换彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度以校正置换的保守性质。用于进行该调整的手段是本领域的技术人员熟知的。参见例如,Pearson (1994)Methods Mol.Biol.24:307-331,该文献以引用的方式并入本文。

[0094] 通常使用序列分析软件来测量多肽的序列相似性,所述序列相似性也称为序列同一性。蛋白质分析软件使用关于指定到各种置换、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸置换)的相似性度量来匹配相似序列。例如,GCG软件含有诸如Gap和Bestfit的程序,这些程序可以以默认参数使用,以确定紧密相关的多肽(诸如来自不同物种的生物体的同源多肽)之间,或野生型蛋白及其突变型蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如,GCG 6.1版。还可以使用FASTA(GCG 6.1版中的程序)使用默认或推荐参数对多肽序列进行比较。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供查询与搜索序列之间的最佳重叠区域的比对和序列一致性百分比(Pearson(2000)同上)。当将本文公开的序列与含有来自不同生物体的大量序列的数据库进行比较时,另一优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-410和Altschul等人(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-402。

[0095] 在获得后,使用一种或多种体外测定法来测试含有一个或多个种系突变的抗原结合结构域的结合亲和力降低。虽然通常通过测试对抗原的高(即强)结合亲和力来筛选识别特定抗原的抗体,但是本文使用的抗体表现出弱结合或不可检测的结合。包含以这种一般方式获得的一个或多个抗原结合结构域的双特异性抗原结合分子也涵盖在本公开内并且被发现作为亲合力驱动的肿瘤疗法是有利的。

[0096] 意想不到的好处,例如,改善的药代动力学特性和对患者的低毒性可以从本文所述的方法中实现。

[0097] 抗体的结合特性

[0098] 如本文所用,术语“结合”在抗体、免疫球蛋白、抗体结合片段或含Fc蛋白与例如预定抗原(诸如细胞表面蛋白)或其片段结合的上下文中,通常是指最小的两个实体或分子结构之间的相互作用或关联,诸如抗体-抗原相互作用。

[0099] 例如,当通过例如表面等离子体共振(SPR)技术在BIAcore 3000仪器中使用抗原作为配体,抗体、Ig、抗体结合片段或含Fc蛋白作为分析物(或抗配体)测定时,结合亲和力通常对应的 $K_D$ 值为约 $10^{-7}$ M或更小,诸如约 $10^{-8}$ M或更小,诸如约 $10^{-9}$ M或更小。基于细胞的结合策略,诸如荧光活化细胞分选(FACS)结合测定法也经常使用,并且FACS数据与其他方法(诸如放射性配体竞争结合和SPR)很好地关联(Benedict,CA,J Immunol Methods.1997,201(2):223-31;Geuijen,CA等人,J Immunol Methods.2005,302(1-2):68-77)。

[0100] 因此,本文公开的抗体或抗原结合蛋白与预定的抗原或细胞表面分子(受体)结合,其亲和力对应于 $K_D$ 值比其结合至非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)的亲和力低至少十倍。根据本公开,对应于 $K_D$ 值等于或小于非特异性抗原十倍的抗体的亲和力可以被认为是不可检测的结合,然而这样的抗体可以与用于产生本文公开的双特异性抗体的第二抗原结合臂配对。

[0101] 术语“ $K_D$ ”(M)是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数,或抗体或抗体结合片段与抗原结合的解离平衡常数。 $K_D$ 与结合亲和力之间存在反比关系,因此 $K_D$ 值越小,亲和力越高,即越强。因此,术语“较高亲和力”或“较强亲和力”涉及较高的形成相互作用的能力,因此 $K_D$ 值较小,相反,术语“较低亲和力”或“较弱亲和力”涉及较低的形成相互作用的能力,因此 $K_D$ 值更大。在某些情况下,与分子(例如抗体)与另一个相互作用配偶体分子(例如抗原Y)的结合亲和力相比,特定分子(例如抗体)与其相互作用配偶体分子(例如抗原X)的更高的结合亲和力(或KD)可以表示为通过将较大的 $K_D$ 值(较低或较弱的亲和力)除以较小的 $K_D$ (较高或较强的亲和力)而确定的结合比率,例如表示为结合亲和力大5倍或10倍,视情况而定。

[0102] 术语“ $k_d$ ”(秒<sup>-1</sup>或1/s)是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数,或抗体或抗体结合片段的解离速率常数。所述值也称为 $k_{off}$ 值。

[0103] 术语“ $k_a$ ”(M<sup>-1</sup>·秒<sup>-1</sup>或1/M)是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率常数,或抗体或抗体结合片段的结合速率常数。

[0104] 术语“ $K_A$ ”(M<sup>-1</sup>或1/M)是指特定抗体-抗原相互作用的结合平衡常数,或抗体或抗体结合片段的结合平衡常数。结合平衡常数通过将 $k_a$ 除以 $k_d$ 来获得。

[0105] 术语“EC50”或“EC<sub>50</sub>”是指半最大有效浓度,其包括在特定暴露时间后诱导在基线和最大值之间的反应一半的抗体浓度。EC<sub>50</sub>基本上代表了观察到最大作用的50%时的抗体浓度。在某些实施方案中,EC<sub>50</sub>值等于本文公开的抗体对表达CD3或肿瘤相关抗原的细胞产生半最大结合的浓度,如通过例如FACS结合测定法所测定。因此,随着EC<sub>50</sub>或半最大效应浓度值的增加,观察到结合减少或减弱。

[0106] 在一个实施方案中,结合降低可定义为能够结合至半数最大量的靶细胞的EC<sub>50</sub>抗体浓度增加。

[0107] 在另一个实施方案中,EC<sub>50</sub>值代表通过T细胞毒活性引起靶细胞半数最大消耗的抗体浓度。因此,随着EC50或半最大效应浓度值降低,观察到细胞毒性活性增加(例如,T细胞介导的肿瘤细胞杀死)。

[0108] 双特异性抗原结合分子

[0109] 本文所用的抗体可以是单特异性的、双特异性的或多特异性的。多特异性抗体可以对一种靶多肽的不同表位具有特异性,或者可以含有对多于一种靶多肽具有特异性的抗原结合结构域。参见例如,Tutt等人,1991,J. Immunol. 147:60-69;Kufer等人.,2004,Trends Biotechnol. 22:238-244。本文所用的抗MUC16/抗CD3双特异性抗体可以连接至另一个功能分子(例如另一个肽或蛋白质)或者与另一个功能分子共表达。例如,抗体或其片段可以功能性连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或其他方式)至一个或多个其他分子实体(诸如另一个抗体或抗体片段),以产生具有第二或另外的结合特异性的双特异性或多特异性抗体。

[0110] 本文使用的表述“抗CD3抗体”或“抗MUC16抗体”旨在包括单特异性抗CD3或抗

MUC16抗体以及包含CD3结合臂和MUC16结合臂的双特异性抗体。因此,本公开包括结合MUC16的单特异性抗体,例如U.S.2018/0112001中描述的那些抗MUC16抗体。示例性抗MUC16抗体包括H1H8767P抗体和在H1H8767P抗体内包含CDR的抗体,如U.S.2018/0112001中所公开。此外,本公开包括这样的双特异性抗体,其中免疫球蛋白的一个臂结合人CD3,而免疫球蛋白的另一个臂对人MUC16具有特异性。根据本文提供的方法使用的双特异性抗体的示例性序列显示于表1中。

[0111] 在某些实施方案中,CD3结合臂结合至人CD3并诱导人T细胞活化。在某些实施方案中,CD3结合臂与人CD3弱结合并诱导人T细胞活化。在其他实施方案中,CD3结合臂与人CD3弱结合并在双特异性或多特异性抗体的情况下诱导肿瘤相关抗原表达细胞杀死。在其他实施方案中,CD3结合臂与人和食蟹猕猴(猴)CD3结合或弱结合,但结合相互作用不能通过本领域已知的体外测定法来检测。

[0112] 根据某些示例性实施方案,本公开包括特异性地结合CD3和MUC16的双特异性抗原结合分子。此类分子在本文中可称为例如“抗CD3/抗MUC16”或“抗CD3xMUC16”或“CD3xMUC16”双特异性分子,或其他类似术语(例如,抗MUC16/抗CD3)。

[0113] 如本文所用,术语“MUC16”是指人MUC16蛋白,除非指定为来自非人类物种(例如,“小鼠MUC16”、“猴MUC16”等)。

[0114] 上述特异性结合CD3和MUC16的双特异性抗原结合分子可以包括以弱结合亲和力结合至CD3的抗CD3抗原结合分子,诸如表现出 $K_D$ 大于约40nM,如通过体外亲和结合测定法所测量。

[0115] 如本文所用,表述“抗原结合分子”意指包含或由与特定抗原特异性地结合的单或一个或多个另外的CDR和/或框架区(FR)组合的至少一个互补决定区(CDR)组成的蛋白质、多肽或分子复合物。在某些实施方案中,抗原结合分子是抗体或抗体片段,如本文别处定义的那些术语。

[0116] 如本文所用,表述“双特异性抗原结合分子”是指至少包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的蛋白质、多肽或分子复合物。双特异性抗原结合分子内的每个抗原结合结构域包含至少一个特异性结合特定抗原的单或一个或多个另外的CDR和/或FR组合的CDR。在本公开的上下文中,第一抗原结合结构域特异性结合第一抗原(例如,CD3),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,MUC16)。

[0117] 在某些示例性实施方案中,双特异性抗原结合分子是双特异性抗体。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)。在包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的双特异性抗原结合分子(例如,双特异性抗体)的情况下,第一抗原结合结构域的CDR可以用前缀“A1”表示,并且第二抗原结合结构域的CDR可以用前缀“A2”表示。因此,第一抗原结合结构域的CDR在本文中可称为A1-HCDR1、A1-HCDR2和A1-HCDR3;并且第二抗原结合结构域的CDR在本文中可称为A2-HCDR1、A2-HCDR2和A2-HCDR3。

[0118] 第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以彼此直接或间接连接,以形成本文所用的双特异性抗原结合分子。可替代地,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以各自连接至分开多聚结构域。一个多聚结构域与另一个多聚结构域的结合促进两个抗原结合结构域之间的结合,从而形成双特异性抗原结合分子。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。例如,多聚结构域可以是包含免疫球蛋白C<sub>H</sub>3结构域的多肽。多聚组分的非限制性实例是免疫球蛋白的Fc部分(包含C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3结构域),例如选自同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4以及每个同种型组内的任何同种异型的IgG的Fc结构域。

[0119] 本文所用的双特异性抗原结合分子通常包含两个多聚结构域,例如两个Fc结构域,其各自个别地是分开的抗体重链的部分。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。

[0120] 在某些实施方案中,多聚结构域是Fc片段或长度为1至约200个氨基酸的氨基酸序列,其包含至少一个半胱氨酸残基。在其他实施方案中,多聚结构域是半胱氨酸残基或含半胱氨酸的短肽。其他多聚化结构域包括:包含亮氨酸拉链、螺旋-环基序、或卷曲螺旋基序的肽或多肽,或者由亮氨酸拉链、螺旋-环基序、或卷曲螺旋基序组成的肽或多肽。

[0121] 任何双特异性抗体形式或技术都可以用于制备本文所用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。可以在本公开的语境中使用的特定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</sup>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)。

[0122] 在本文所用的双特异性抗原结合分子的背景下,与野生型、天然存在的形式的Fc结构域相比,多聚化结构域(例如,Fc结构域)可以包含一个或多个氨基酸改变(例如,插入、缺失或取代)。例如,本公开包括在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>H</sub>2或C<sub>H</sub>3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。此类Fc修饰的非限制性实例包括例如,位置250(例如,E或Q);250和428(例如,L或F);252(例如,L/Y/F/W或T)、254(例如,S或T)和256(例如,S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或位置428和/或433(例如,L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如,H/F或Y)处的修饰;或位置250和/或428处的修饰;或位置307或308(例如,308F、V308F)和434处的修饰。在一个实施方案中,修饰包括428L(例如M428L)和434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)和308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)和434(例如434Y)修饰;252、254和256(例如252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如308F或308P)。

[0123] 本公开还包括包含第一Ig C<sub>H</sub>3结构域和第二Ig C<sub>H</sub>3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>H</sub>3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>H</sub>3结构域结合蛋白A,并且第二Ig C<sub>H</sub>3结构域含有减少或消除蛋白A结合的突变,诸如H95R修饰(按照IMGT外显子编号;按照EU编号为H435R)。第二C<sub>H</sub>3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>H</sub>3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)。

[0124] 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 CH2区的CH2序列的部分或全部,以及来源于人IgG1、人IgG2或人IgG4的CH3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>H</sub>1]-[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>H</sub>1]-[IgG1上铰链]-[IgG2下铰链]-[IgG4 CH2]-[IgG1 CH3]。可包含在本文所用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描述于2014年8月28日公开的美国公开2014/0243504中,该公开整体并入本文。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。

#### [0125] pH依赖性结合

[0126] 本公开包括具有pH依赖性结合特征的抗MUC16抗体和抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子。例如,与中性pH相比,本文所用的双特异性抗原结合分子的抗MUC16臂在酸性pH下可表现出与MUC16的结合降低。或者,与中性pH相比,本文所用的抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子在酸性pH下可表现出与MUC16的结合增强。表述“酸性pH”包括小于约6.2,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或更小的pH值。如本文所用,表述“中性pH”意指约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。

[0127] 在某些情况下,“与中性pH相比在酸性pH下结合减少”以在酸性pH下抗体与其抗原结合的K<sub>D</sub>值与在中性pH下抗体与其抗原结合的K<sub>D</sub>值的比率来表述(反之亦然)。例如,出于本公开的目的,如果抗体或其抗原结合片段表现出酸性/中性K<sub>D</sub>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MUC16减少”。在某些示例性实施方案中,抗体或抗原结合片段的酸性/中性K<sub>D</sub>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。

[0128] 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。

#### [0129] 包含Fc变体的抗体

[0130] 根据本文所用的某些实施方案,提供这样的抗MUC16抗体和抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子:它们包含Fc结构域,所述Fc结构域包含例如在酸性pH下与中性pH相比,增强或减弱与FcRn受体的抗体结合的一个或多个突变。例如,本公开包括这样的抗体:所述抗体在Fc结构域的C<sub>H</sub>2或C<sub>H</sub>3区中包含突变,其中一个或多个突变在酸性环境下(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。当向动物施用,此类突变可以导致抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性实例包括例如,位置250(例如,E或Q);250和428(例如,L或F);252(例如,L/Y/F/W或T)、254(例如,S或T)和256(例如,S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或位置428和/或433(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如,H/F或Y)处的修饰;或位置250和/或428处的修饰;或位置307或308(例如,308F、V308F)和434处的修饰。在一个实施方案中,修饰包括428L(例如M428L)和434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)和308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)和434(例如434Y)修饰;252、254和256(例如252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如308F或308P)。

[0131] 例如,本公开包括包含Fc结构域的抗MUC16抗体和抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子,所述Fc结构域包含一对或多对或一组或多组选自以下组成的组的突变:250Q和248L(例如,T250Q和M248L);252Y、254T和256E(例如,M252Y、S254T和T256E);428L和434S(例如,M428L和N434S);以及433K和434F(例如,H433K和N434F)。前述Fc结构域突变的所有可能组合和本文公开的抗体可变结构域内的其他突变都涵盖在本公开的范围之内。

[0132] 双特异性抗原结合分子的生物学特征

[0133] 根据本公开使用以高亲和力(例如,亚纳摩尔K<sub>d</sub>值)结合表达CD3的人T细胞和/或人MUC16的单特异性和双特异性抗体及其抗原结合片段。此类抗体及其特性在美国公开号2018/0112001中有所公开,该公开以引用的方式并入本文。这种双特异性抗体与抗4-1BB激动剂组合治疗肿瘤特别有用。

[0134] 本文使用抗MUC16抗体和抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子,它们表现出一个或多个选自以下各项组成的组的特征:(a)抑制携带人卵巢癌异种移植物的免疫受损小鼠的肿瘤生长;以及(b)抑制携带人卵巢癌异种移植物的免疫受损小鼠中已建立的肿瘤的肿瘤生长(参见,例如,美国公开号2018/0112001,实施例8)。

[0135] 本文使用抗体及其抗原结合片段,它们以中等或低亲和力结合人CD3,这取决于治疗背景和所需的特定靶向特性。例如,在双特异性抗原结合分子的情况下,其中一个臂结合CD3,另一臂结合靶抗原(例如,MUC16),可以需要靶抗原结合臂以高亲和力结合靶抗原,而抗CD3臂仅以中等或低亲和力结合CD3。以这种方式,可以实现抗原结合分子对表达靶抗原的细胞的优先靶向,同时避免一般/非靶向CD3结合以及随之而来的与之相关的不良副作用。

[0136] 本文所用的双特异性抗原结合分子(例如,双特异性抗体)能够同时结合至人CD3和人MUC16。与表达CD3的细胞相互作用的结合臂在合适的体外结合测定法中可以具有弱的或不可检测的结合。双特异性抗原结合分子结合表达CD3和/或MUC16细胞的程度可以通过荧光活化细胞分选(FACS)来评估,如U.S.2018/0112001实施例5中所示。

[0137] 例如,本文使用特异性结合表达CD3但不表达MUC16的人T细胞系(例如,Jurkat和/或灵长类T细胞(例如,食蟹猕猴外周血单个核细胞[PBMC]))的双特异性抗体。本文还使用



结合至表达MUC16的细胞和细胞系的双特异性抗体,它们的 $EC_{50}$ 值小于或等于7nM ( $7 \times 10^{-9}$ ),如使用美国公开号2018/0112001实施例5所述的FACS结合测定法,或基本上相似的测定法所测定。

[0138] 在一些方面,双特异性抗体以弱(即低)或甚至不可检测的亲和力结合人CD3。根据某些实施方案,本公开包括以大于约11nM的KD结合人CD3(例如,在37°C下)的抗体和抗体的抗原结合片段,如通过表面等离子体共振所测量。

[0139] 在一些方面,双特异性抗体以弱(即低)或甚至不可检测的亲和力结合猴(即食蟹猕猴)CD3。

[0140] 在一些方面,双特异性抗体结合人CD3并诱导T细胞活化。例如,某些抗CD3抗体以小于约113pM的 $EC_{50}$ 值诱导人T细胞活化,如通过体外T细胞活化测定法所测量。

[0141] 本文所用的双特异性抗体可以结合人CD3并诱导T细胞介导的肿瘤抗原表达细胞的杀死。例如,本公开包括诱导T细胞介导的肿瘤细胞杀死的双特异性抗体,其 $EC_{50}$ 小于约1.3nM,如体外T细胞介导的肿瘤细胞杀死测定法所测量。

[0142] 如在25°C或37°C下通过表面等离子共振所测量,本文所用的双特异性抗体可以以小于约10分钟的解离半衰期( $t_{1/2}$ )结合CD3。

[0143] 本文所用的抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子可以另外表现出一个或多个选自由以下各项组成的组的特征:(a) 体外诱导PBMC增殖;(b) 通过诱导人全血中的IFN- $\gamma$ 释放和CD25上调来活化T细胞;以及(c) 诱导表达MUC16的肿瘤细胞的T细胞介导的细胞毒性。

[0144] 本公开包括能够消耗受试者中的表达肿瘤抗原的细胞的抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子(参见例如,美国公开号2018/0112001,实施例8)。例如,根据某些实施方案,提供了抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子,其中双特异性抗原结合分子向受试者的单次施用(例如,剂量为约5.0mg/kg、约0.1mg/kg、约0.08mg/kg、约0.06mg/kg、约0.04mg/kg、约0.02mg/kg、约0.01mg/kg或更少)导致受试者中表达MUC16的细胞的数量降低至(例如,受试者中的肿瘤生长受到抑制或压制)低于可检测的水平。除非另外指明,否则生物发光辐射值是指[p/s/cm<sup>2</sup>/sr]。

[0145] 在某些实施方案中,以约0.4mg/kg的剂量单次施用抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子导致受试者的肿瘤生长在将双特异性抗原结合分子施用于受试者后约第7天、约第6天、约第5天、约第4天、约第3天、约第2天或约第1天降低至低于可检测的水平。根据某些实施方案,以至少约0.01mg/kg,例如,至少约85 $\mu$ g/kg、或至少约100 $\mu$ g/kg的剂量单次施用本文公开的抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子,导致表达MUC16的肿瘤细胞的数量保持低于可检测的水平直到施用后至少约7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天或更长时间。如本文所用,表述“低于可检测的水平”是指使用标准卡尺测量方法,不能直接或间接检测到在受试者皮下生长的肿瘤细胞,例如如美国公开号2018/0112001实施例8所述。

[0146] 还根据本文提供的方法使用抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子,它们表现出一个或多个选自由以下各项组成的组的特征:(a) 抑制携带人卵巢癌异种移植物的免疫受损小鼠的肿瘤生长;(b) 抑制带人卵巢癌异种移植物的免疫健全小鼠的肿瘤生长;(c) 抑制携带人卵巢癌异种移植物的免疫受损小鼠中的已建立的肿瘤的肿瘤生长;以及(d) 减少携带人卵巢癌异种移植物的免疫健全小鼠中已建立的肿瘤的肿瘤生长(参见,例如,美国公开

号2018/0112001, 实施例8)。示例性抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子可以另外表现出一个或多个选自以下各项组成的组的特征: (a) 诱导循环细胞因子的瞬时剂量依赖性增加, (b) 诱导循环T细胞的瞬时增加, 以及 (c) 不消耗效应T细胞 (例如CD4+T细胞、CD8+T细胞和调节T细胞即Treg)。

[0147] 还根据本文提供的方法使用抗MUC16抗体药物缀合物, 包括抗MUC16x抗CD3双特异性抗原结合分子药物缀合物, 所述抗MUC16抗体药物缀合物在体内MUC16阳性卵巢癌异种移植模型中抑制肿瘤生长 (参见, 例如, U.S. 2018/0112001, 实施例10, 在生物发光成像测定法或基本上类似的测定法中)。

[0148] 表位作图和相关技术

[0149] 本文所用的抗原结合分子结合的CD3和/或MUC16上的表位可以由3个或更多个 (例如, 3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个) CD3或MUC16蛋白的氨基酸的单个邻接序列组成。或者, 表位可以由多个CD3或MUC16的非邻接氨基酸 (或氨基酸序列) 组成。根据本文公开的方法使用的抗体可以与包含在单个CD3链内的氨基酸 (例如, CD3- $\epsilon$ 、CD3- $\delta$ 或CD3- $\gamma$ ) 相互作用, 或可以与两个或更多个不同的CD3链上的氨基酸相互作用。如本文所用, 术语“表位”是指与抗体分子的可变区中的特定抗原结合位点 (称为互补位) 发生相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有超过一个表位。因此, 不同抗体可以与抗原上的不同区域结合并且可以具有不同的生物效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位由来自线性多肽链的不同区段的氨基酸在空间上并列而产生。线性表位由多肽链中的邻近氨基酸残基来产生。在某些情况下, 表位可以包括抗原上的糖、磷酸基基团或磺酰基基团部分。

[0150] 本领域普通技术人员已知的各种技术可以用于确定抗体的抗原结合结构域是否是多肽或蛋白质内“与一个或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包括例如常规交叉阻断测定法 (诸如Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY) 所述)、丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析 (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248: 443-463) 和肽切割分析。此外, 可以采用诸如抗原的表位切除、表位提取和化学修饰的方法 (Tomer, 2000, Protein Science 9: 487-496)。可以用于鉴定与抗体的抗原结合结构域相互作用的多肽内的氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测的氢/氘交换。一般来说, 氢/氘交换法涉及所关注的蛋白质的氘标记, 接着是抗体与氘标记的蛋白质的结合。然后, 将蛋白质/抗体复合物转移至水中, 以允许氢-氘交换在除抗体保护的残基 (仍然是氘标记的) 之外的所有残基处发生。在抗体解离后, 对靶蛋白进行蛋白酶裂解和质谱分析, 从而揭示氘标记的残基, 这些残基对应于与抗体相互作用的特定氨基酸。参见例如, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267 (2): 252-259; Engen和Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A。抗原/抗体复合物的X射线晶体学也可用于表位作图目的。

[0151] 本文所用的示例性双特异性抗原结合分子可以包含以低的或可检测的结合亲和力特异性结合人CD3和/或食蟹猕猴CD3的第一抗原结合结构域, 和特异性结合人MUC16的第二抗原结合结构域, 其中所述第一抗原结合结构域结合与本文所述的任何特定示例性CD3特异性抗原结合结构域相同的CD3上的表位, 和/或其中所述第二抗原结合结构域结合与本文所述的任何特定示例性MUC16特异性抗原结合结构域相同的MUC16上的表位。

[0152] 同样, 本文所用的双特异性抗原结合分子可以包含特异性结合人CD3的第一抗原

结合结构域和特异性结合人MUC16的第二抗原结合结构域,其中所述第一抗原结合结构域与表1中的本文所述的任何特定示例性CD3特异性抗原结合结构域竞争CD3的结合,和/或其中所述第二抗原结合结构域与表1中的本文所述的任何特定示例性MUC16特异性抗原结合结构域竞争MUC16的结合。

[0153] 通过使用本领域已知的常规方法,可以容易地确定特定抗原结合分子(例如,抗体)或其抗原结合结构域是否结合至与本公开的参考抗原结合分子相同的表位或与本公开的参考抗原结合分子竞争结合。例如,为了确定测试抗体是否结合至与本公开的参考双特异性抗原结合分子相同的MUC16(或CD3)上的表位,首先允许参考双特异性分子结合至MUC16蛋白(或CD3蛋白)。然后,评估测试抗体结合至MUC16(或CD3)分子的能力。如果测试抗体在与参考双特异性抗原结合分子饱和结合后能够结合至MUC16(或CD3),则可以得出以下结论:测试抗体结合至与参考双特异性抗原结合分子不同的MUC16(或CD3)的表位。在另一个方面,如果测试抗体在与参考双特异性抗原结合分子饱和结合后不能结合至MUC16(或CD3)分子,则测试抗体可以结合至与参考双特异性抗原结合分子所结合的表位相同的MUC16(或CD3)的表位。然后可以进行另外的常规实验(例如,肽突变和结合分析),以确认所观察到的测试抗体结合的缺乏事实上是否是由于结合至与参考双特异性抗原结合分子相同的表位,或者空间阻断(或另一个现象)是否是造成所观察的结合缺乏的原因。可以使用ELISA、RIA、Biacore、流式细胞术或者本领域可用的任何其他定量或定性抗体结合测定法来进行这类实验。根据本公开的某些实施方案,如果例如1倍、5倍、10倍、20倍或100倍过量的一种抗原结合蛋白抑制另一种抗体的结合至少50%,但优选地75%、90%或甚至99%,如在竞争性结合测定法中所测量,则两种抗原结合蛋白结合至相同的(或重叠)表位(参见例如,Junghans等人,Cancer Res.1990:50:1495-1502)。或者,如果抗原中的减少或消除一种抗原结合蛋白的结合的基本上所有氨基酸突变都减少或消除另一种抗原结合蛋白的结合,则认为两种抗原结合蛋白结合至相同的表位。如果只有减少或消除一种抗原结合蛋白的结合的氨基酸突变的子集减少或消除另一种抗原结合蛋白的结合,则认为两种抗原结合蛋白具有“重叠表位”。

[0154] 为了确定抗体或其抗原结合结构域是否与参考抗原结合分子竞争结合,在两个方向上进行上述结合方法:在第一方向上,使参考抗原结合分子在饱和条件下结合至MUC16蛋白(或CD3蛋白),然后评估测试抗体与MUC16(或CD3)分子的结合。在第二方向上,使测试抗体在饱和条件下结合至MUC16(或CD3),然后评估参考抗原结合分子与MUC16(或CD3)分子的结合。如果在两个方向上只有第一(饱和)抗原结合分子能够结合至MUC16(或CD3)分子,则可以得出以下结论:测试抗体和参考抗原结合分子竞争MUC16(或CD3)的结合。如本领域的普通技术人员所理解,竞争与参考抗原结合分子的结合的抗体可能未必结合至与参考抗体相同的表位,但是可能通过重叠或邻近表位的结合来在空间上阻断参考抗体的结合。

[0155] 抗原结合结构域的制备和双特异性分子的构建

[0156] 可以通过本领域已知的任何抗体产生技术制备对特定抗原具有特异性的抗原结合结构域。一旦获得,对两种不同抗原(例如,CD3和MUC16)具有特异性的两种不同的抗原结合结构域可以彼此相对适当地排列以使用常规方法产生双特异性抗原结合分子。(可用于构建本公开的双特异性抗原结合分子的示例性双特异性抗体形式的讨论在本文别处提供)。在某些实施方案中,多特异性抗原结合分子的一种或多种单独组件(例如,重链和轻

链)来源于嵌合、人源化或完全人抗体。制备此类抗体的方法是本领域熟知的。例如,可以使用VELOCIMMUNE™技术来制备本文所用的双特异性抗原结合分子的重链和/或轻链中的一者或多者。使用VELOCIMMUNE™技术(参见,例如,US 6,596,541,Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®,或产生任何其他抗体技术),最初分离出具有人可变区和小鼠恒定区的针对特定抗原(例如,CD3或MUC16)的高亲和力嵌合抗体。针对期望特征,包括亲和力、选择性、表位等表征并且选择抗体。小鼠恒定区被所需的人恒定区替换以产生可掺入本文所用的双特异性抗原结合分子中的完全人重链和/或轻链。

[0157] 基因工程动物可用于制备人双特异性抗原结合分子。例如,可以使用不能重排和表达内源性小鼠免疫球蛋白轻链可变序列的经遗传修饰的小鼠,其中所述小鼠仅表达一个或两个由人免疫球蛋白序列编码的人轻链可变结构域,所述人免疫球蛋白序列可操作地连接至内源性小鼠κ基因座处的小鼠κ恒定基因。此类经遗传修饰的小鼠可用于产生包含两条不同重链的完全人双特异性抗原结合分子,所述重链与包含来源于两个不同的人轻链可变区基因区段之一的可变结构域的相同轻链相关联。(参见,例如,US10,143,186对此类工程化小鼠及其用于产生双特异性抗原结合分子的用途的详细讨论)。

[0158] 生物等效物

[0159] 本公开的方法考虑使用具有与本文公开的示例性分子的氨基酸序列不同但保留结合CD3和/或MUC16的能力的氨基酸序列的抗原结合分子。当与亲本序列相比时,此类变体分子可以包含一个或多个氨基酸添加、缺失或置换,但是表现出基本上相当于所描述的双特异性抗原结合分子的生物学活性。

[0160] 本文使用与表1所述的示例性抗原结合分子中的任一者生物等效的抗原结合分子。如果两种抗原结合蛋白或抗体是药物等效物或药物替代物,并且当在相似的实验条件下以相同的摩尔剂量的单剂量和多剂量给药时,所述药物等效物或药物替代物未显示出吸收速率和程度的显著差异,则它们被视为生物等效物。如果一些抗原结合蛋白在吸收程度上是等效的,但是在吸收速率上不是等效的,则它们将被视为等效物或药物替代物,但是因为吸收速率的这种差异是有意的并且反映在标记中,所以可以被视为生物等效物,这些抗体对于例如在长期使用中达到有效体内药物浓度不是必需的,并且被认为对于所研究的特定药品不具有临床意义。

[0161] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白在安全性、纯度和效力方面不存在有临床意义的差异,则它们是生物等效物。

[0162] 在一个实施方案中,如果与不进行参考产品和生物产品之间的切换的连续疗法相比,患者可以进行此类切换一次或多次,而没有预期的不良反应风险的增加,包括免疫原性的临床上显著的变化、或减少的有效性,则两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0163] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白都通过针对一个或多个使用条件的一种或多种共同作用机制来发挥作用,以达到此类机制是已知的程度,则所述两种抗原结合蛋白是生物等效的。

[0164] 生物等效性可以通过体内和体外方法来展示。生物等效性度量包括,例如,(a)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中测量了随时间推移的血液、血浆、血清或其他生物流体中的抗体或其代谢物的浓度;(b)与人体内生物利用率数据相关联并且可以合理地预测人体内生物利用率数据的体外试验;(c)在人或其他哺乳动物中的体内试验,其中测量了随

时间推移的抗体(或其靶标)的适当急性药理作用;以及(d)建立抗原结合蛋白的安全性、功效、或者生物利用率或生物等效性的良好对照的临床试验。

[0165] 可以通过例如进行残基或序列的各种置换或使生物学活性不需要的末端或内部残基或序列缺失来构建本文所阐述的抗原结合分子的示例性双特异性抗原结合分子的生物等效变体。举例来说,可以缺失不是生物学活性必需的半胱氨酸残基或用其他氨基酸替换,以防止在复性时形成不必要的或不正确的分子内二硫桥键。在其他语境中,生物等效抗原结合蛋白可以包括本文所阐述的示例性双特异性抗原结合分子的包含修改所述分子的糖基化特征的氨基酸变化(例如消除或去除糖基化的突变)的变体。

[0166] 物种选择性和物种交叉反应性

[0167] 根据某些实施方案,本文所用的双特异性抗原结合分子结合至人CD3但不结合至来自其他物种的CD3。本文还使用结合至人MUC16但不结合至来自其他物种的MUC16的抗原结合分子。本公开的方法还考虑使用结合人CD3和来自一种或多种非人类物种的CD3的双特异性抗原结合分子;和/或与人MUC16和来自一种或多种非人类物种的MUC16结合的双特异性抗原结合分子。

[0168] 根据某些示例性实施方案,本文所用的抗原结合分子结合至人CD3和/或人MUC16并且可以结合或不结合(视情况而定)至小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔、山羊、绵羊、奶牛、马、骆驼、食蟹猕猴、狨猴、恒河猴或黑猩猩CD3和/或MUC16中的一者或多者。例如,在本公开的特定示例性实施方案中,提供了这样的双特异性抗原结合分子:所述双特异性抗原结合分子包含结合人CD3和食蟹猕猴CD3的第一抗原结合结构域和特异性结合人MUC16的第二抗原结合结构域。

[0169] 用于免疫PET成像的抗MUC16/抗CD3抗原结合分子的放射性标记的免疫缀合物

[0170] 本文提供了结合MUC16和/或CD3的放射性标记的抗原结合蛋白。在一些实施方案中,放射性标记的抗原结合蛋白包含共价键合至正电子发射体的抗原结合蛋白。在一些实施方案中,放射性标记的抗原结合蛋白包含共价键合至一种或多种螯合部分的抗原结合蛋白,所述螯合部分是能够螯合正电子发射体的化学部分。

[0171] 合适的放射性标记的抗原结合蛋白,例如放射性标记的抗体,包括在暴露于放射性标记的抗原结合蛋白后不损害或基本上不损害T细胞功能的那些。在一些实施方案中,结合抗MUC16/抗CD3抗原结合分子的放射性标记的抗原结合蛋白是CD3 T细胞功能的弱阻断剂,即在暴露于放射性标记的抗体后,T细胞功能不受损或基本上不受损。根据本文提供的方法使用对CD3介导的T细胞功能具有最小影响的放射性标记的抗CD3结合蛋白,确保用所述分子治疗的受试者不因其T细胞无法清除感染而不利。

[0172] 在一些实施方案中,提供了抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3抗原结合分子,例如双特异性抗体,其中所述抗原结合蛋白共价键至一个或多个具有以下结构的部分:

[0173]  $-L-M_z$

[0174] 其中L是螯合部分;M是正电子发射体;并且z在每次出现时独立地是0或1;并且其中z中的至少一个是1。

[0175] 在一些实施方案中,放射性标记的抗原结合蛋白是式(I)化合物:

[0176]  $M-L-A-[L-M_z]_k$

[0177] (I)

[0178] A是抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3抗原结合分子;L是螯合部分;M是正电子发射体;z为0或1;并且k为0-30的整数。在一些实施方案中,k是1。在一些实施方案中,k是2。

[0179] 在某些实施方案中,放射性标记的抗原结合蛋白是式(II)化合物:

[0180]  $A-[L-M]_k$

[0181] II.

[0182] 其中A是抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3抗原结合分子;L是螯合部分;M是正电子发射体;并且k为1-30的整数。

[0183] 在一些实施方案中,本文提供了包含具有以下结构的缀合物的组合物:

[0184]  $A-L_k$

[0185] 其中A是抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3抗原结合分子;L是螯合部分;并且k为1-30的整数;其中所述缀合物与正电子发射体足以提供适用于临床PET成像的比活度的量螯合。

[0186] 下文提供了合适的螯合部分和正电子发射体。

[0187] 正电子发射体和螯合部分

[0188] 合适的正电子发射体包括但不限于与螯合部分形成稳定复合物,并且具有适于免疫PET成像目的的物理半衰期的正电子发射体。示例性正电子发射体包括但不限于<sup>89</sup>Zr、<sup>68</sup>Ga、<sup>64</sup>Cu、<sup>44</sup>Sc和<sup>86</sup>Y。合适的正电子发射体还包括与抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子直接键合的那些正电子发射体,包括但不限于<sup>76</sup>Br和<sup>124</sup>I,以及通过辅基引入的那些正电子发射体,例如<sup>18</sup>F。

[0189] 本文所述的螯合部分是与抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3抗原结合分子共价连接的化学部分,并且包含能够螯合正电子发射体(即,能够与正电子发射体反应以形成配位螯合复合物)的部分。合适部分包括允许高效负载特定金属,并且形成对于诊断用途(例如,免疫PET成像)来说在体内足够稳定的金属-螯合剂复合物的部分。说明性螯合部分包括使正电子发射体的解离和在矿物骨、血浆蛋白和/或骨髓沉积中的累积减到最少,直到适于诊断用途的程度的螯合部分。

[0190] 螯合部分的实例包括但不限于与正电子发射体<sup>89</sup>Zr、<sup>68</sup>Ga、<sup>64</sup>Cu、<sup>44</sup>Sc和/或<sup>86</sup>Y形成稳定复合物的那些螯合部分。说明性螯合部分包括但不限于以下中所描述的螯合部分: Nature Protocols, 5 (4) : 739, 2010; Bioconjugate Chem., 26 (12) : 2579 (2015); Chem Commun (Camb), 51 (12) : 2301 (2015); Mol. Pharmaceutics, 12: 2142 (2015); Mol. Imaging Biol., 18: 344 (2015); Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 37: 250 (2010); Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging (2016). doi:10.1007/s00259-016-3499-x; Bioconjugate Chem., 26 (12) : 2579 (2015); WO 2015/140212A1; 以及US 5,639,879,所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0191] 示例性螯合部分还包括但不限于包含以下部分的那些: 去铁敏 (DF0)、1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦酸)酸 (DOTP), 1R,4R,7R,10R) - $\alpha'$  $\alpha''$  $\alpha'''$ -四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTMA)、1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四乙酸 (DOTA)、H<sub>4</sub>octapa、H<sub>6</sub>phospa、H<sub>2</sub>dedpa、H<sub>5</sub>decapa、H<sub>2</sub>azapa、HOPO、DO2A、1,4,7,10-四(氨基甲酰基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷 (DOTAM)、1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N',N''-三乙酸

(NOTA)、1,4,7,10-四(氨基甲酰基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(DOTAM)、1,4,8,11-四氮杂双环[6.6.2]十六烷-4,11-二乙酸(CB-TE2A)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷(Cyclen)、1,4,8,11-四氮杂环十四烷(Cyclam)、八齿螯合剂、八齿双官能螯合剂(例如,DF0\*)、六齿螯合剂、基于磷酸盐的螯合剂、大环螯合剂、包含大环对苯二甲酰胺配体的螯合剂、双官能螯合剂、镰刀霉氨酸C和镰刀霉氨酸C衍生物螯合剂、三乙酰镰刀霉氨酸C(TAFC)、铁草铵E(FOX E)、铁草铵B(FOX B)、铁色素A(FCHA)等等。

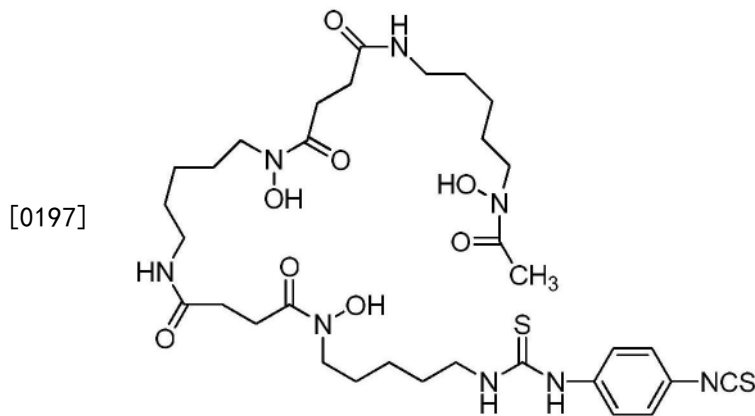
[0192] 在一些实施方案中,螯合部分通过接头部分共价键合至抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子,所述接头部分将螯合部分的螯合部与结合蛋白共价连接。在一些实施方案中,这些接头部分由以下反应部分之间的反应形成:双特异性抗原结合分子的反应部分(例如,抗体的半胱氨酸或赖氨酸)和连接至螯合剂的反应部分(包括例如对异硫氰酸根合苯甲基和下文缀合方法中提供的反应部分)。此外,此类接头部分任选地包含用于调节极性、溶解度、空间相互作用、刚性和/或螯合部分与抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子之间的长度的目的化学基团。

[0193] 放射性标记的抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子缀合物的制备

[0194] 放射性标记的抗MUC16抗体缀合物和抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子缀合物可以通过(1)使抗原结合分子与包含正电子发射体螯合剂和对双特异性结合蛋白的所期望的缀合位点具有反应性的部分的分子反应,以及(2)负载上所期望正电子发射体来制备。

[0195] 合适的缀合位点包括但不限于赖氨酸和半胱氨酸,其两者可以是例如天然或工程化的,并且可以例如存在于抗体的重链或轻链上。半胱氨酸缀合位点包括但不限于从抗体二硫键突变、插入或减少获得的位点。用于制造半胱氨酸工程化抗体的方法包括但不限于W02011/056983中所公开的方法。位点特异性缀合方法也可以用于将缀合反应引导到抗体的特定位置、达成期望的化学计量和/或达成期望的螯合剂与抗体的比率。此类缀合方法是本领域普通技术人员已知的,并且包括但不限于半胱氨酸工程化和酶促和化学酶促方法,包括但不限于谷氨酰胺缀合、Q295缀合和谷氨酰胺转氨酶介导的缀合,以及描述于J.Clin.Immunol.,36:100(2016)中的方法,所述文献以全文引用的方式并入本文中。对所期望的缀合位点具有反应性的合适的部分一般能够实现抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子(例如,双特异性抗体)与正电子发射体螯合剂的高效和便捷偶联。对赖氨酸和半胱氨酸位点具有反应性的部分包括普通技术人员已知的亲电子基团。在某些方面,当所需的缀合位点是赖氨酸时,反应性部分是异硫氰酸酯,例如对异硫氰酸根合苯甲基或反应性酯。在某些方面,当所需缀合位点是半胱氨酸时,反应部分是马来酰亚胺。

[0196] 当螯合剂是去铁敏(DF0)时,合适的反应部分包括但不限于对异硫氰酸根合苯甲基、正羟基琥珀酰亚胺酯、2,3,5,6四氟苯酚酯、正琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯,以及描述于BioMed Research International,第2014卷,文章编号203601中的部分,所述文献以全文引用的方式并入本文中。在某些实施方案中,包含正电子发射体螯合剂和对缀合位点具有反应性的部分的分子是对异硫氰酸根合苯甲基-去铁敏(p-SCN-Bn-DF0):



[0198] 正电子发射体负载通过以下步骤实现：将抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子螯合剂缀合物与正电子发射体一起温育，持续足以允许所述正电子发射体与螯合剂配位的时间，例如通过进行本文提供的实例中所描述的方法或基本上类似的方法。

[0199] 缀合物的示例性实施方案

[0200] 本公开包括放射性标记的抗体缀合物，其包含抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子和正电子发射体。本公开还包括放射性标记的抗体缀合物，其包含抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子、螯合部分和正电子发射体。(Tavare等人Cancer Res. 2016, 76(1):73-82;和Azad等人Oncotarget. 2016, 7(11):12344-58.)

[0201] 在一些实施方案中，螯合部分包含能够与<sup>89</sup>Zr形成复合物的螯合剂。在某些实施方案中，螯合部分包含去铁敏。在某些实施方案中，螯合部分是对异硫氰酸根合苯甲基-去铁敏。

[0202] 在一些实施方案中，正电子发射体是<sup>89</sup>Zr。在一些实施方案中，小于1.0%的抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与正电子发射体缀合，小于0.9%的抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与正电子发射体缀合，小于0.8%的抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与正电子发射体缀合，小于0.7%的抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与正电子发射体缀合，小于0.6%的抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与正电子发射体缀合，小于0.5%的抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与正电子发射体缀合，小于0.4%的抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与正电子发射体缀合，小于0.3%的抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与正电子发射体缀合，小于0.2%的抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与正电子发射体缀合，或者小于0.1%的抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与正电子发射体缀合。

[0203] 在一些实施方案中，缀合物的螯合部分与抗体的比率是1.0至2.0。如本文所用，“螯合部分与抗体的比率”是螯合剂部分与抗体的平均比率并且是每抗体螯合剂负载的量子度。这种比率类似于由本领域技术人员使用以测量抗体-药物缀合物(ADC)的每抗体药物负载的“DAR”，即药物-抗体比率；在本文针对iPET成像所述的缀合物的情形下，可以使用本文所述的方法和本领域中已知用于测定DAR的其他方法，例如Wang等人, Antibody-Drug Conjugates, The 21<sup>st</sup> Century Magic Bullets for Cancer(2015)中所述的方法确定螯合部分与抗体的比率。在一些实施方案中，螯合部分与抗体的比率是约1.7。在一些实施方案中，螯合部分与抗体的比率是1.0至2.0。在一些实施方案中，螯合部分与抗体的比率是约



1.7。

[0204] 在一个特定实施方案中,螯合部分是对异硫氰酸根合苯甲基-去铁敏,并且正电子发射体是<sup>89</sup>Zr。在另一个特定实施方案中,螯合部分是对异硫氰酸根合苯甲基-去铁敏,并且正电子发射体是<sup>89</sup>Zr,并且缀合物的螯合部分与抗体的比率是1到2。

[0205] 在一些实施方案中,本文提供了抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子,其中所述抗原结合分子共价键合至一个或多个具有以下结构的部分:

[0206] -L-M<sub>z</sub>

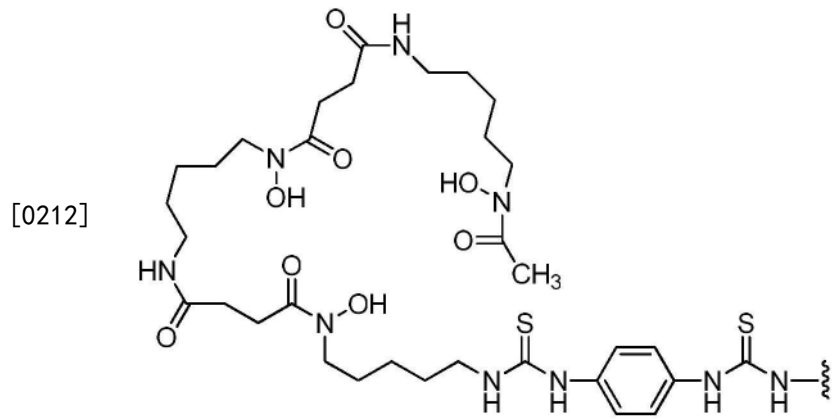
[0207] 其中L是螯合部分;M是正电子发射体;并且z在每次出现时独立地是0或1;并且其中z中的至少一个是1。在某些实施方案中,放射性标记的抗原结合蛋白是式(I)化合物:

[0208] M-L-A-[L-M<sub>z</sub>]<sub>k</sub>

[0209] (I)

[0210] A是抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子;L是螯合部分;M是正电子发射体;z为0或1;并且k为0-30的整数。在一些实施方案中,k是1。在一些实施方案中,k是2。

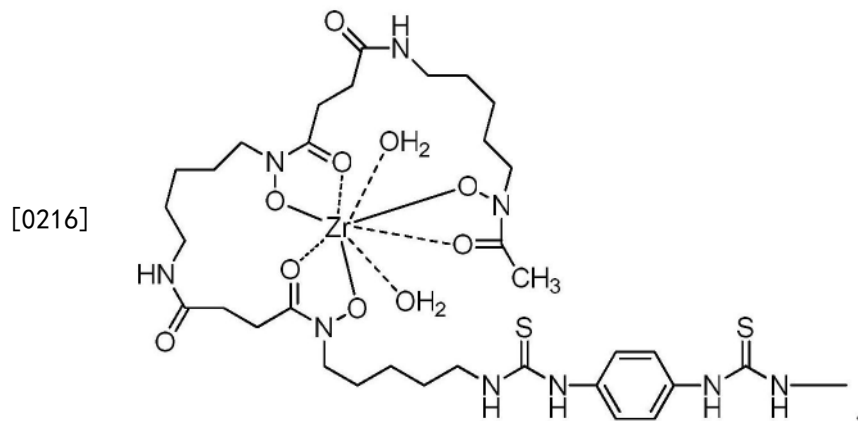
[0211] 在一些实施方案中,L是:



[0213] 在一些实施方案中,M是<sup>89</sup>Zr。

[0214] 在一些实施方案中,k是1至2的整数。在一些实施方案中,k是1。在一些实施方案中,k是2。

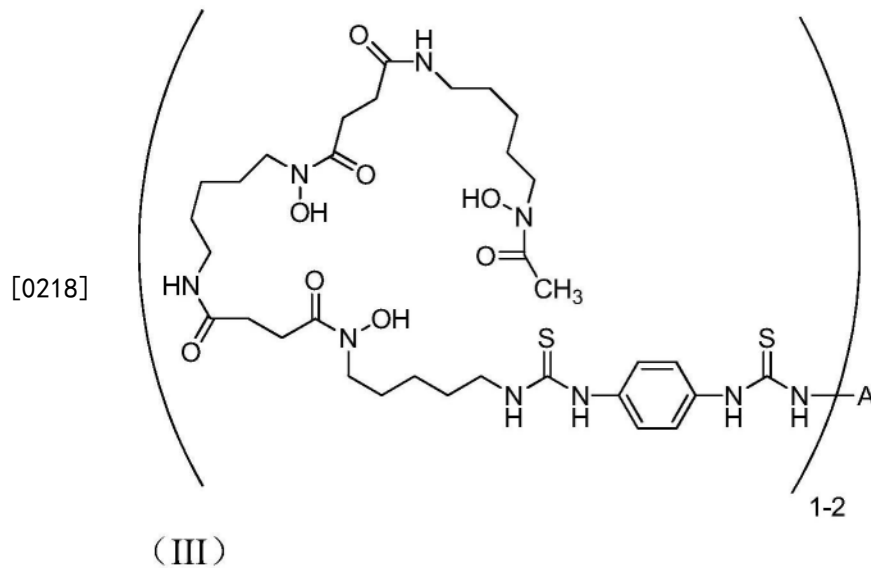
[0215] 在一些实施方案中,-L-M是



其中Zr是正电子发射体

<sup>89</sup>Zr。

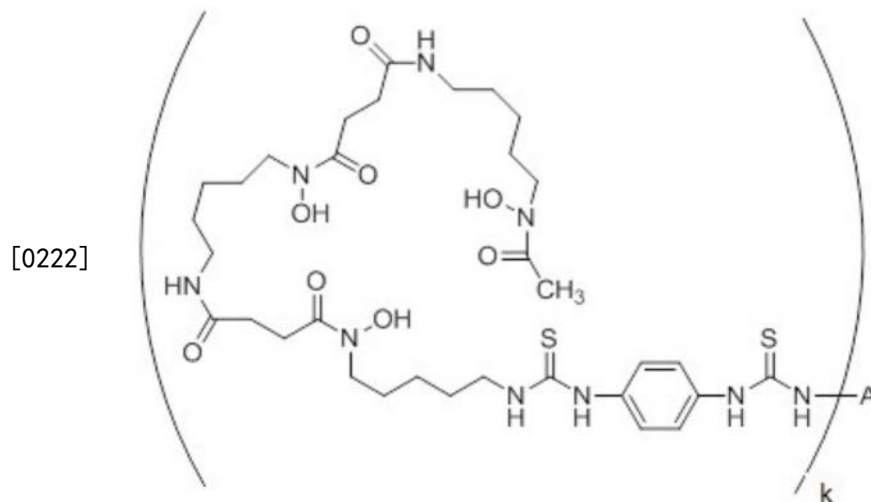
[0217] 本公开中还包括合成放射性标记的抗体缀合物的方法,所述方法包括使式(III)化合物:



[0219]  $^{89}\text{Zr}$ ,其中A是抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子。在某些实施方案中,式(III)化合物通过使抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子与p-SCN-Bn-DFO接触而合成。

[0220] 本文还提供了式(III)化合物与 $^{89}\text{Zr}$ 之间反应的产物。

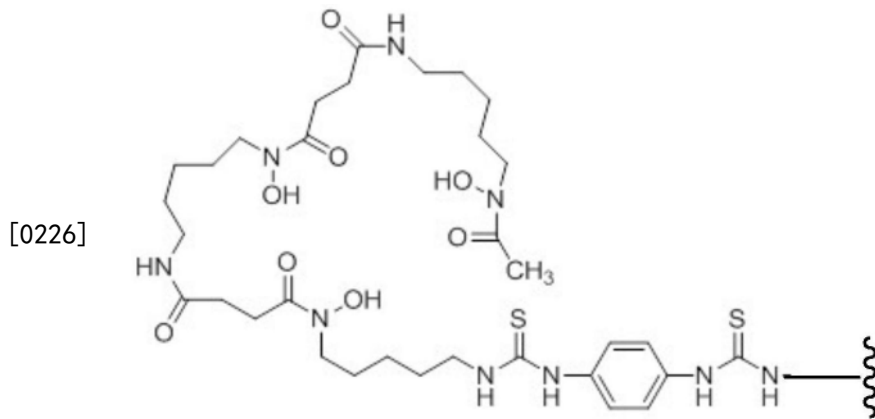
[0221] 本文提供了式(III)化合物:




[0223] 其中A是抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子,并且k是1-30的整数。在一些实施方案中,k是1或2。

[0224] 本文提供了这样的抗体缀合物,所述抗体缀合物包含(i)抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子和(ii)一个或多个螯合部分。

[0225] 在一些实施方案中,螯合部分包含:



[0227]  是与抗体或其抗原结合片段的共价键。

[0228] 在一些方面,抗体缀合物的螯合部分与抗体的比率是约1.0到约2.0。在一些方面,抗体缀合物的螯合部分与抗体的比率是约1.7。

[0229] 在一些实施方案中,本文提供了包含具有以下结构的缀合物的组合物:

[0230]  $A-L_k$

[0231] 其中A是抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子;L是螯合部分;并且k为1-30的整数;所述缀合物与正电子发射体以足以提供适用于临床PET成像的比活度的量螯合。在一些实施方案中,螯合正电子发射体的量是足以提供每1-50mg抗MUC16抗体或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子约1至约50mCi的比活度的量。

[0232] 在一些实施方案中,螯合正电子发射体的量是足以提供每1至50mg抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子至多50mCi、至多45mCi、至多40mCi、至多35mCi、至多30mCi、至多25mCi或至多10mCi,例如在约5至约50mCi、约10至约40mCi、约15至约30mCi、约7至约25mCi、约20至约50mCi或约5至约10mCi范围内的比活度的量。

[0233] 使用放射性标记的免疫缀合物的方法

[0234] 在某些方面,本公开提供了本公开的放射性标记的抗体缀合物的诊断和治疗使用方法。

[0235] 根据一个方面,本公开提供了检测组织中的MUC16的方法,所述方法包括将本文提供的放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子缀合物施用于组织;以及通过正电子发射断层扫描(PET)成像来使MUC16表达可视化。在某些实施方案中,组织包含细胞或细胞系。在某些实施方案中,组织存在于受试者中,其中受试者是哺乳动物。在某些实施方案中,受试者是人类受试者。在某些实施方案中,受试者患有选自以下各项组成的组的疾病或障碍:表达MUC16抗原的癌症,诸如卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、输卵管癌、间皮瘤、非小细胞肺癌、肿块成型肝内胆管癌、子宫颈腺癌和胃道腺癌。在一个实施方案中,受试者患有卵巢癌。

[0236] 根据一个方面,本公开提供了对表达MUC16的组织进行成像的方法,所述方法包括将本公开的放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子缀合物施用于组织;以及通过正电子发射断层扫描(PET)成像来使MUC16表达可视化。在一个实施方案中,组织包含在肿瘤中。在一个实施方案中,组织包含在肿瘤细胞培养物或肿瘤细

胞系中。在一个实施方案中,组织包含在受试者中的肿瘤病灶中。在一个实施方案中,组织是组织中的瘤内淋巴细胞。在一个实施方案中,组织包含表达MUC16的细胞。

[0237] 根据一个方面,本公开提供了用于确定患有肿瘤的受试者是否适于抗肿瘤疗法的方法,所述方法包括施用本公开的放射性标记的抗体缀合物,和通过PET成像将所施用的放射性标记的抗体缀合物在肿瘤中定位,其中肿瘤中放射性标记的抗体缀合物的存在将受试者鉴定为适于抗肿瘤疗法。

[0238] 根据一个方面,本公开提供了用于预测患有实体瘤的受试者对抗肿瘤疗法的反应的方法,所述方法包括确定肿瘤是否为MUC16阳性的,其中如果肿瘤为MUC16阳性的,则预测受试者发生阳性反应。在某些实施方案中,通过施用本公开的放射性标记的抗体缀合物并且通过PET成像确定放射性标记的抗体缀合物在肿瘤中定位来确定肿瘤为阳性,其中放射性标记的抗体缀合物在肿瘤中的存在表示肿瘤是MUC16阳性的。

[0239] 根据一个方面,本公开提供了用于检测受试者的MUC16阳性肿瘤的方法。根据这一方面,所述方法包括向受试者施用本公开的放射性标记的抗体缀合物;以及通过PET成像确定放射性标记的抗体缀合物的定位,其中放射性标记的抗体缀合物在肿瘤中的存在表示肿瘤是MUC16阳性的。

[0240] 本文提供了预测对抗肿瘤疗法的阳性反应的方法,所述方法包括:向受试者施用放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子缀合物,以确定MUC16阳性细胞在实体瘤中的存在。MUC16阳性细胞的存在预测对抗肿瘤疗法发生阳性反应。

[0241] 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(包括实体瘤)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。举例来说,人类受试者可以诊断患有原发性或转移性肿瘤和/或具有一种或多种症状或指征,包括但不限于不可解释的重量减轻、全身虚弱、持续疲劳、食欲不振、发热、盗汗、骨疼痛、呼吸急促、腹部肿胀、胸痛/胸闷、脾脏肿大以及癌症相关生物标记物(例如,CA125)水平升高。所述表述包括患有原发性肿瘤或已建立肿瘤的受试者。在具体实施方案中,所述表述包括患有和/或需要治疗实体瘤的人受试者,所述实体瘤例如卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、输卵管癌、间皮瘤、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。所述术语包括患有原发性或转移性肿瘤(晚期恶性肿瘤)的受试者。在某些实施方案中,表述“有需要的受试者”包括患有实体瘤的受试者,所述实体瘤对先前疗法(例如,用抗癌剂进行的治疗)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。举例来说,所述表述包括已用一线或多线先前疗法治疗的受试者,所述先前疗法如用利用化疗(例如,卡铂或多西他赛)的治疗。在某些实施方案中,表述“有需要的受试者”包括患有实体瘤的受试者,所述实体瘤已用一线或多线先前疗法治疗,但其随后复发或转移。

[0242] 在某些实施方案中,本公开的方法用于患有实体瘤的受试者。术语“肿瘤”、“癌症”和“恶性肿瘤”在本文中可互换使用。如本文所用,术语“实体瘤”是指通常不含囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可以是良性(非癌症)或恶性的(癌症)。出于本公开的目的,术语“实体瘤”意指恶性实体瘤。所述术语包括以形成实体瘤的细胞类型命名的不同类型的实体瘤,即肉瘤、癌瘤和淋巴瘤。

[0243] 在某些实施方案中,癌症或肿瘤选自以下各项组成的组:星形细胞瘤、肛门癌、膀胱癌、血癌、血液癌症、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、肾透明细胞癌、结直肠癌、微卫星中间型结直肠癌、皮肤鳞状细胞癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、食管癌、输卵管癌、间皮瘤、纤维肉瘤、胃癌、胶质母细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝细胞癌、肿块成型肝内胆管癌、白血病、肝癌、平滑肌肉瘤、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、鼻咽癌、非小细胞肺癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、胰管腺癌、原发性和/或复发性癌症、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、皮肤癌症、小细胞肺癌、鳞状细胞癌、胃部癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、甲状腺癌、三阴性乳腺癌、子宫癌(包括子宫颈腺癌)和维尔姆斯瘤。在一些方面,癌症是原发性癌症。在一些方面,癌症是转移性和/或复发性癌症。

[0244] 在某些实施方案中,癌症或肿瘤选自MUC16阳性肿瘤,诸如起源于卵巢、乳腺、细支气管、子宫内膜、角膜、胃上皮、胰腺或结肠直肠的肿瘤。在一些方面,癌症是乳腺癌、卵巢癌、角膜癌、胰腺癌、子宫内膜癌、输卵管癌、间皮瘤、非小细胞肺癌、肿块成型肝内胆管癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌或结直肠癌。在一些方面,所述癌症是卵巢癌。在一些方面,癌症是来源于原发性卵巢肿瘤的转移性癌症。

[0245] 如本文所用,术语“治疗(treat/treating)”等意指缓解症状;暂时或永久消除症状的起因;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;引起肿瘤收缩、坏死和/或消失;预防肿瘤复发;预防或抑制癌转移;抑制转移瘤生长;和/或延长受试者的存活持续时间。

[0246] 在某些实施方案中,向受试者静脉内、腹膜内或皮下施用放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子缀合物。在某些实施方案中,放射性标记的抗体缀合物瘤内施用。施用后,放射性标记的抗体缀合物在肿瘤中定位。通过PET成像对定位的放射性标记的抗体缀合物进行成像,并且通过本领域中已知的方法测量肿瘤对放射性标记的抗体缀合物的摄取。在某些实施方案中,在施用放射性标记的缀合物后1、2、3、4、5、6或7天进行成像。在某些实施方案中,在施用放射性标记的抗体缀合物后,在同一天进行成像。

[0247] 在某些实施方案中,放射性标记的抗MUC16抗体缀合物或抗MUC16/抗CD3双特异性抗原结合分子缀合物可以以约0.1mg/kg受试者体重至约100mg/kg受试者体重,例如约0.1mg/kg至约50mg/kg、或约0.5mg/kg至约25mg/kg、或约0.1mg/kg至约1.0mg/kg体重的剂量施用。

[0248] 治疗制剂和施用

[0249] 根据本公开使用包含本文所用的抗原结合分子的药物组合物。在一些方面,所述药物组合物还包含抗4-1BB激动剂。药物组合物用合适的载剂、赋形剂、和提供改善的转移、递送、耐受性等等的其他药剂来配制。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, 宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton, PA)。这些制剂包括例如粉末剂、糊剂、软膏剂、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)囊泡(诸如LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、乳剂碳蜡(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶剂和含有碳蜡的半固体混合物。还参见Powell等人“Compendium of excipients for parenteral formulations”PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0250] 施用于患者的抗原结合分子的剂量可以根据患者的年龄和大小、目标疾病、病症、施用途径等等而变化。优选的剂量通常根据体重或体表面积来计算。当双特异性抗原结合分子在成年患者中用于治疗目的时,通常以约0.01至约20mg/kg体重、更优选地约0.02至约7、约0.03至约5、或约0.05至约3mg/kg体重的单剂量静脉内施用双特异性抗原结合分子可以是有利的。视病症的严重程度而定,可以调整治疗的频率和持续时间。可以凭经验确定双特异性抗原结合分子施用的有效剂量和排程;例如,可以通过定期评估来监测患者进展,并且相应地调整剂量。此外,可以使用本领域熟知的方法进行剂量的物种间按比例缩放(例如Mordenti等人,1991,Pharmaceut.Res.8:1351)。

[0251] 施用于患者的抗4-1BB激动剂的剂量可以根据患者的年龄和大小、目标疾病、病症、给药途径等等而变化。优选的剂量通常根据体重或体表面积来计算。当抗4-1BB激动剂用于成年患者的治疗目的时,通常以约0.01至约20mg/kg体重、更优选地约0.02至约7、约0.03至约5、或约0.05至约3、或约2.5mg/kg体重的单剂量静脉内施用激动剂可以是有利的。

[0252] 各种递送系统是已知的,并且可以用于施用本文所用的药物组合物,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)。引入的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。施用可以是全身性或局部的。

[0253] 可以用标准针头和注射器皮下或静脉内递送本文所用的药物组合物。此外,对于皮下递送,笔式递送装置易于应用于递送本文所用的药物组合物。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。

[0254] 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文所用的药物组合物。实例包括但不限于AUTOPEN<sup>TM</sup>(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC<sup>TM</sup>笔(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25<sup>TM</sup>笔、HUMALOG<sup>TM</sup>笔、HUMALIN 70/30<sup>TM</sup>笔(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN<sup>TM</sup>I、II和III(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR<sup>TM</sup>(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD<sup>TM</sup>笔(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN<sup>TM</sup>、OPTIPEN PRO<sup>TM</sup>、OPTIPEN STARLET<sup>TM</sup>和OPTICLIK<sup>TM</sup>(sanofi-aventis, Frankfurt, Germany)等等。本文所用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<sup>TM</sup>笔(sanofi-aventis)、FLEXPEN<sup>TM</sup>(Novo Nordisk)、和KWIKPEN<sup>TM</sup>(Eli Lilly)、SURECLICK<sup>TM</sup>自动注射器(Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET<sup>TM</sup>(Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN(Dey, L.P.)、和HUMIRA<sup>TM</sup>笔(Abbott Labs, Abbott Park IL)等等。

[0255] 在某些情形下,药物组合物可以在控制释放系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵(参见Langer,同上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201)。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料;参见Medical Applications of Controlled Release,

Langer和Wise(编辑),1974,CRC Pres.,Boca Raton,Florida。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)。其他控释系统在Langer,1990,Science 249:1527-1533的综述中有所讨论。

[0256] 可注射制剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌肉内注射、滴液输注等的剂型。这些可注射制剂可以通过众所周知的方法制备。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,存在例如生理盐水、含有葡萄糖和其他助剂等的等渗溶液,其可以与适当的增溶剂组合使用,所述增溶剂如醇(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(氢化蓖麻油聚氧乙烯(50mol)加合物)]等。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。

[0257] 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。所含有的前述抗体的量通常为在单位剂量中每剂型约1至约500mg;尤其是在注射形式中,对于其他剂型,所含有的前述抗体的量为约1至约300mg和约10至约500mg是优选的。

#### [0258] 组合疗法和制剂

[0259] 本公开提供了方法,所述方法包括与抗4-1BB激动剂和一种或多种另外的治疗剂组合施用包含本文所述的示例性单特异性或双特异性抗原结合分子中的任一者的药物组合物。可以与抗4-1BB激动剂和本文所用的双特异性抗原结合分子组合或组合施用的示例性另外的治疗剂包括:例如,EGFR拮抗剂(例如,抗EGFR抗体[例如,西妥昔单抗或帕尼单抗]或小分子EGFR抑制剂[例如,吉非替尼或厄洛替尼])、另一个EGFR家族成员的拮抗剂诸如Her2/ErbB2、ErbB3或ErbB4(例如,抗ErbB2、抗ErbB3或抗ErbB4抗体或者ErbB2、ErbB3或ErbB4活性的小分子抑制剂)、EGFRvIII的拮抗剂(例如,特异性结合EGFRvIII的抗体)、cMET激动剂(例如,抗cMET抗体)、IGF1R拮抗剂(例如,抗IGF1R抗体)、B-raf抑制剂(例如,维罗非尼、索拉非尼、GDC-0879、PLX-4720)、PDGFR- $\alpha$ 抑制剂(例如,抗PDGFR- $\alpha$ 抗体)、PDGFR- $\beta$ 抑制剂(例如,抗PDGFR- $\beta$ 抗体)、VEGF拮抗剂(例如,VEGF-陷阱,参见,例如,US 7,087,411(本文也称为“VEGF抑制性融合蛋白”)、抗EGFR抗体(例如,贝伐单抗)、VEGF受体的小分子激酶抑制剂(例如,舒尼替尼、索拉非尼或帕唑帕尼)、DLL4拮抗剂(例如,US 2009/0142354中公开的抗DLL4抗体,诸如REGN421)、Ang2拮抗剂(例如,US2011/0027286中公开的抗Ang2抗体,诸如H1H685P)、FOLH1(PSMA)拮抗剂、PRLR拮抗剂(例如,抗PRLR抗体)、STEAP1或STEAP2拮抗剂(例如,抗STEAP1抗体或抗STEAP2抗体)、TMPRSS2拮抗剂(例如,抗TMPRSS2抗体)、MSLN拮抗剂(例如,抗MSLN抗体)、CA9拮抗剂(例如,抗CA9抗体)、尿溶蛋白拮抗剂(例如,抗尿溶蛋白抗体)等。可以与本文提供的组合物组合有利地施用的其他药剂包括细胞因子抑制剂,包括小分子细胞因子抑制剂和结合至细胞因子或它们各自的受体的抗体,所述细胞因子诸如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18。本文所用的药物组合物(例如,包含如本文公开的抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子的药物组合物)也可以作为治疗方案的一部分施用,所述治疗方案包含抗4-1BB激动剂和一个或多个

选自以下的治疗组合：“ICE”：异环磷酰胺（例如，Ifex®）、卡铂（例如，Paraplatin®）、依托泊苷（例如，Etopophos®、Toposar®、VePesid®、VP-16）；“DHAP”：地塞米松（例如，Decadron®）、阿糖胞苷（例如，Cytosar-U®、胞嘧啶阿拉伯糖苷、ara-C）、顺铂（例如，Platinol®-AQ）；和“ESHAP”：依托泊苷（例如，Etopophos®、Toposar®、VePesid®、VP-16）、甲基泼尼松龙（例如，Medrol®）、高剂量阿糖胞苷、顺铂（例如，Platinol®-AQ）。

[0260] 本公开还包括治疗组合，所述治疗组合包含本文提及的任何抗原结合分子和以下一者或多者的抑制剂：VEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRvIII、cMet、IGF1R、B-raf、PDGFR- $\alpha$ 、PDGFR- $\beta$ 、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、尿溶蛋白或任何上述细胞因子，其中所述抑制剂是适体、反义分子、核酶、siRNA、肽体、纳米抗体或抗体片段（例如，Fab片段；F(ab')<sub>2</sub>片段；Fd片段；Fv片段；scFv；dAb片段；或其他经工程化的分子，诸如双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体和最小识别单位）。本文公开的抗原结合分子还可以与抗病毒剂、抗生素、镇痛剂、皮质类固醇和/或NSAID组合施用和/或共同配制。本文公开的抗原结合分子还可以作为另外包含放射治疗和/或常规化疗的治疗方案的一部分施用。

[0261] 一种或多种另外的治疗活性组分可以在本文所用的抗原结合分子的施用之前、同步或之后立即施用；（出于本公开的目的，这种施用方案被视为抗原结合分子与另外的治疗活性组分“组合”施用）。

[0262] 本公开包括药物组合物，其中本文所用的抗原结合分子与如本文别处所述的另外的治疗活性组分一起共同配制。

[0263] 施用方案

[0264] 根据本公开的某些实施方案，可以在限定的时间段内将多剂量的抗原结合分子（例如，抗MUC16抗体或抗CD3/抗MUC16双特异性抗原结合分子）施用于受试者。此外，可以在限定的时间段内将多剂量的抗4-1BB激动剂施用于受试者。根据该方面的方法包括向受试者顺序施用一剂或多剂每种治疗剂，即一剂或多剂抗原结合分子和一剂或多剂抗4-1BB激动剂。如本文所用，“按顺序施用”意指每个剂量的治疗剂（例如，抗原结合分子）在不同的时间点，例如在以预定间隔（例如，小时、日、周或月）分开的不同日施用于受试者。本公开包括这样的方法：所述方法包括将单一初始剂量的抗原结合分子（称为负荷剂量），然后是一个或多个第二剂量的抗原结合分子，以及任选地随后是一个或多个第三剂量的抗原结合分子按顺序施用于患者。本公开包括这样的方法：所述方法包括将单一初始剂量的抗4-1BB激动剂（称为负荷剂量），然后是一个或多个第二剂量的抗4-1BB激动剂，以及任选地随后是一个或多个第三剂量的抗4-1BB激动剂按顺序施用于患者。

[0265] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指本文所用的抗原结合分子和/或抗4-1BB激动剂的施用的时间顺序。因此，“初始剂量”为在治疗方案的开始时施用的剂量（也称为“基础剂量”）；“二级剂量”为在初始剂量之后施用的剂量；并且“三级剂量”为在二级剂量之后施用的剂量。初始、第二和第三剂量都可以含有相同量的抗原结合分子（或抗4-1BB激动剂），但是通常在施用频率方面可以彼此不同。然而，在某些实施方案中，在初始、第二和/或第三剂量中含有的抗原结合分子（或抗4-1BB激动剂）的量在治疗过程中彼此不同（例如，适当上调或下调）。在某些实施方案中，在治疗方案开始时施用两个或更多个（例如，2、3、4或5个）剂量作为“负荷剂量”，接着以较低频率施用后续剂量（例如，“维持剂量”）。



[0266] 在本公开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之后1至26(例如,1、1<sup>1/2</sup>、2、2<sup>1/2</sup>、3、3<sup>1/2</sup>、4、4<sup>1/2</sup>、5、5<sup>1/2</sup>、6、6<sup>1/2</sup>、7、7<sup>1/2</sup>、8、8<sup>1/2</sup>、9、9<sup>1/2</sup>、10、10<sup>1/2</sup>、11、11<sup>1/2</sup>、12、12<sup>1/2</sup>、13、13<sup>1/2</sup>、14、14<sup>1/2</sup>、15、15<sup>1/2</sup>、16、16<sup>1/2</sup>、17、17<sup>1/2</sup>、18、18<sup>1/2</sup>、19、19<sup>1/2</sup>、20、20<sup>1/2</sup>、21、21<sup>1/2</sup>、22、22<sup>1/2</sup>、23、23<sup>1/2</sup>、24、24<sup>1/2</sup>、25、25<sup>1/2</sup>、26、26<sup>1/2</sup>或更多)周施用。如本文所用,短语“紧接前一剂量”是指在多次施用的顺序中,抗原结合分子(或抗4-1BB激动剂)的剂量在顺序中紧接着的下一剂量施用之前施用于患者,而没有中间剂量。

[0267] 根据本公开的该方面的方法可以包括向患者施用任意数量的第二和/或第三剂量的抗4-1BB激动剂、抗MUC16抗体或特异性结合MUC16和CD3的双特异性抗原结合分子。举例来说,在某些实施方案中,仅向患者施用单次二级剂量。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)二级剂量。同样,在某些实施方案中,仅向患者施用单次三级剂量。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。

[0268] 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。在治疗过程中,医生也可以根据临床检查后个别患者的需要来调整施用频率。

[0269] 抗体的诊断用途

[0270] 本公开的双特异性抗体也可以用于检测和/或测量样品中的MUC16或表达MUC16的细胞,例如用于诊断目的。例如,抗MUC16抗体或其片段可以用于诊断以MUC16的异常表达(例如,过表达、表达不足、表达缺乏等)为特征的病症或疾病。MUC16的示例性诊断测定法可以包括例如使从患者获得的样品与抗MUC16抗体或抗MUC16xCD3双特异性抗体接触,其中所述抗体用可检测标记或报告分子标记。或者,未标记的抗MUC16抗体或抗MUC16xCD3双特异性抗体可以与本身被可检测标记的二抗组合用于诊断应用。可检测标记或报告分子可以是放射性同位素,诸如<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S或<sup>125</sup>I;荧光或化学发光部分,诸如异硫氰酸荧光素或罗丹明;或者酶,诸如碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或萤光素酶。本文所用的抗MUC16xCD3双特异性抗体的另一个示例性诊断用途包括<sup>89</sup>Zr标记的(诸如<sup>89</sup>Zr-去铁敏标记的)抗体,该抗体用于非侵入性识别和跟踪受试者中的肿瘤细胞(例如,正电子发射断层扫描(PET)成像)的目的。(参见,例如,Tavare,R.等人Cancer Res.2016年1月1日;76(1):73-82;和Azad,BB.等人Oncotarget.2016年3月15日;7(11):12344-58。)可以用于检测或测量样品中的MUC16的具体示例性测定法包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)和荧光活化细胞分选(FACS)。

[0271] 可以用于根据本公开的MUC16诊断测定法的样品包括在正常或病理条件下可从患者获得的任何组织或流体样品,所述样品含有可检测数量的MUC16蛋白或其片段。通常,将对从健康患者(例如,不患有与异常MUC16水平或活性相关联的疾病或病症的患者)获得的特定样品中的MUC16水平进行测量,以初步建立基线或标准MUC16水平。然后将该MUC16的基线水平与在从怀疑患有MUC16相关疾病(例如,含有表达MUC16细胞的肿瘤)或病症的个体获得的样品中测量的MUC16水平进行比较。

## [0272] 实施例

[0273] 提供以下实施例是为了向本领域的普通技术人员提供完整公开内容和描述如何制备和使用本文所用的方法和组合物,而非旨在限制发明人所认为的其发明的范围。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。

## [0274] 实施例1:结合MUC16和CD3的双特异性抗体的产生

[0275] 本公开提供了根据本文公开的方法使用的抗MUC16抗体。根据U.S.2018/0112001中提供的公开内容产生抗体。本文所用的示例性抗体包括H1H8767P抗体,以及该抗体包含的CDR、HCVR和LCVR序列。因此,示例性抗MUC16抗体或其抗原结合片段包含如U.S.2018/0112001所公开的SEQ ID NO:18(本文的SEQ ID NO:1)的HCVR和SEQ ID NO:26(本文的SEQ ID NO:3)的LCVR。

[0276] 本公开还提供结合CD3和粘蛋白16(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双特异性分子”。抗MUC16/抗CD3双特异性分子的抗MUC16部分可用于靶向表达MUC16的肿瘤细胞,而双特异性分子的抗CD3部分可用于活化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)。

[0277] 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。

[0278] 示例性抗MUC16xCD3双特异性抗体构建体的组成部分汇总如表1所示。

[0279] 表1:抗MUC16xCD3双特异性抗原结合分子

	<b>BSMUC16/CD3-001</b>	<b>MUC16 结合臂重链</b>	<b>CD3 结合臂重链</b>	<b>共同轻链</b>
[0280]	<b>抗体</b>	H1H8767P	CD3-VH-G	H1H8767P
	<b>VR</b>	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3
	<b>全长序列</b>	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6

## [0281] 实施例2:具有表达荧光素酶的OVCAR-3细胞的异种腹水模型

[0282] 首先在异种肿瘤模型中评估抗MUC16/抗CD3双特异性抗体与4-1BB共刺激组合的体内功效。对于异种模型,在植入人PBMC后十三天将来自此前在体内传代(第0天)的OVCAR-3/Luc细胞系的腹水细胞腹膜内注射到NSG(Nod scid  $\gamma$ )小鼠中。在第5天和第8天,用单独的12.5 $\mu$ g/小鼠的MUC16XCD3或CD3结合对照或与100 $\mu$ g/小鼠的抗人4-1BB(来自BioXcell, Lebanon, NH的克隆LOB12.3)组合对每组五只小鼠进行腹膜内治疗。在肿瘤植入后第4、8、12、15、20和25天通过生物发光成像(BLI;测量发光)来评估肿瘤负荷。

[0283] 异种移植肿瘤生长和抑制的计算:BLI用于测量肿瘤负荷。给小鼠腹腔注射150mg/kg(由实验开始时的体重确定)悬浮于PBS中的荧光素酶底物D-荧光素。在给药后十分钟,使

用Xenogen IVIS系统在异氟醚麻醉下对小鼠进行BLI成像。图像采集通过在D处的视野、1.5cm的对象高度和0.5min曝光时间的中等框并水平进行。使用Living Image软件提取BLI信号。在每个肿瘤块周围绘制所关注的区域,并且光子强度以 $p/s/cm^2/sr$ 记录。使用GraphPad Prism软件(第6版)进行统计分析。使用非配对非参数Mann-Whitney t检验来确定BLI结果的统计显著性。

[0284] 显示的数据是在肿瘤移植后第4天通过BLI评估的肿瘤负荷(表2和图1)。使用非配对非参数Mann-Whitney t检验来确定统计显著性。第4天各组之间的肿瘤负荷无显著差异(显示所有组在研究开始时具有相似的肿瘤负荷)。

[0285] 表2:在OVCAR-3模型中肿瘤移植后第4天的生物发光

	抗体 ( $\mu\text{g}$ )	在移植后 4 天的平均辐射值 [ $p/s/cm^2/sr$ ] (中位数 $\pm$ SEM)
[0286]	CD3 结合对照 (12.5)	$1.51e+05 \pm 2.81e+04$
	MUC16XCD3 (12.5)	$1.5e+05 \pm 1.05e+04$
	CD3 结合对照 (12.5) +抗 4-1BB (100)	$1.03e+05 \pm 1.59e+04$
	MUC16XCD3 (12.5) +抗 4-1BB (100)	$1.02e+05 \pm 3.11e+04$

[0287] 表3显示了在肿瘤移植后第25天通过BLI评估的肿瘤负荷(另外参见图2)。使用非配对非参数Mann-Whitney t检验来确定统计显著性。将各组与CD3结合对照进行比较(对于MUC16XCD3,\* $p=0.0159$ ,对于MUC16XCD3和抗4-1BB组合,\*\* $p<0.0079$ )。还将MUC16XCD3和抗4-1BB组合与单独的MUC16XCD3进行比较(# $p=0.0159$ )。相对于在用CD3结合对照治疗后的肿瘤负荷,MUC16XCD3在12.5 $\mu\text{g}$ 时显著减少肿瘤负荷,并且与单独的MUC16XCD3相比,抗4-1BB的添加增强了抗肿瘤功效。

[0288] 表3:在OVCAR-3模型中肿瘤移植后第25天的生物发光

	抗体 ( $\mu\text{g}$ )	在移植后 25 天的平均辐射值[ $p/s/cm^2/sr$ ] (中位数 $\pm$ SEM)
[0289]	CD3 结合对照 (12)	$7.71e+06 \pm 1.07e+06$
	MUC16XCD3 (12)	$7.44e+03 \pm 3.11e+03$
	CD3 结合对照 (12) +抗 4-1BB (100)	$6.65e+06 \pm 1.06e+06$
	MUC16XCD3 (12) +抗 4-1BB (100)	$1.47e+03 \pm 1.11e+02$

[0290] 实施例3.在同种腹水模型中的MUC16xCD3+4-1BB治疗

[0291] 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。所得的小鼠具有表达人CD3的T细胞,并且小鼠表达嵌合MUC16分子,该分子含有人MUC16的一部分,其中MUC16XCD3双特异性抗体结合该部分。给小鼠腹膜内移植ID8-VEGF/huMUC16细胞(一种被工程化改造为表达人MUC16的一部分的鼠卵巢肿瘤细胞系),并且在肿瘤移植后第3天开始静脉内注射抗体治疗。在移植后第3、6和10天给小鼠施用MUC16XCD3(1mg/kg静脉内)或CD3结合对照(1mg/kg静脉内)与同种型对照,或者在移植后第3天给小鼠施用抗小鼠4-1BB(2.5mg/kg静脉内),然后在第6天和第10天施用另外两个剂量的MUC16XCD3(1mg/kg静脉内)。每组有8-12只小鼠。当小鼠因腹水引起腹胀而体重增加超过30%时处死。使用Gehan-Breslow-Wilcoxon方法来确定统计显著性。

[0292] MUC16XCD3治疗显著增加了ID8-VEGF/huMUC16腹水模型中的中位数存活时间,并且4-1BB共刺激的添加可使若干小鼠存活。对于统计分析,将各组与CD3结合对照进行比较(对于MUC16XCD3,\*\*p=0.0026,对于MUC16XCD3与抗4-1BB,\*\*\*\*p<0.0001)。此外,为了确定抗4-1BB的添加是否比单独的MUC16XCD3具有任何有益结果,将抗4-1BB与单独的MUC16XCD3进行比较(#p=0.0168)。MUC16XCD3增加了CD3结合对照组的中位数存活时间以及存活小鼠的百分比(0至27%)。无法确定MUC16XCD3+抗4-1BB组合组的中位数存活时间,因为超过50%的小鼠存活。组合治疗组的总存活率为55%(表4和图3)。在给药期间观察到这些效果而没有任何显著的体重减轻,这被用作毒性的读出(表5和图4)。

[0293] 表4:ID8-VEGF/huMUC16模型的中位数存活期

组名称	D3 抗体 (mg/kg)	D6 抗体 (mg/kg)	D10 抗体 (mg/kg)	中位数存活 期 (天)	无肿瘤小鼠 数/小鼠 总数	% 存活 率
对照	CD3 结合对照 (1)+同种型 对照(5)	CD3 结合对照 (1)+同种型对照 (5)	CD3 结合对照 (1)+同种型对照 (5)	35	0/11	0
[0294] CD3 双 特异性	MUC16XCD3 (1)+同种型 对照(5)	MUC16XC D3(1)+同 种型对照 (5)	MUC16XC D3(1)+ 同种型对照 (5)	47	3/11	27
抗 4-1BB	CD3 结合对照 (1)+抗 4- 1BB(2.5)	CD3 结合对照 (1)+同种型对照 (5)	CD3 结合对照 (1)+同种型对照 (5)	47	1/7	14
CD3 双 特异性+ 抗 4-1BB	MUC16XCD3 (1)+抗 4- 1BB(2.5)	MUC16XC D3(1)+同 种型对照 (5)	MUC16XC D3(1)+ 同种型对照 (5)	未定义	5/9	55

[0295] 表5:在ID8-VEGF/huMUC16模型中移植后第10天和第31天(研究中首次死亡前)的体重变化

	第 12 天			第 31 天		
组名称	平均体 重变化	SD	与第 1 组相 比的统计分 析(双因素 ANOVA)	平均体 重变化	SD	与第 1 组相 比的统计分 析(双因 素 ANOVA)
对照	2.7	2.6		16.4	10.0	
[0297] CD3 双特 异性	3.1	3.0	NS (1.0)	10.0	5.8	* (0.01)
抗 4-1BB	0.42	3.5	NS (0.73)	8.7	14.0	** (0.0035)
CD3 双特 异性+抗 4- 1BB	3.4	3.2	NS (0.99)	5.7	4.3	**** (<0.0001)

[0298] 除初始抗肿瘤功效之外,还评估了小鼠的任何记忆应答和表位扩散。在移植后第116天,通过皮下移植亲本ID8-VEGF来再挑战无肿瘤小鼠。九只未暴露的小鼠作为肿瘤生长的对照另外包括在内。显示的数据是再挑战后无肿瘤小鼠的数量(表6)。用MUC16XCD3治疗的三只小鼠中的两只能够清除不表达MUC16的亲本肿瘤系的二次挑战。此外,用MUC16XCD3+抗4-1BB组合治疗的全部5只小鼠都能够清除肿瘤。这表明在这两种治疗方案的存在下能够形成记忆应答。

[0299] 表6: ID8-VEGF/huMUC16模型的记忆应答

初始腹水研究的治疗组	无肿瘤小鼠/总数
此前未参与研究的未暴露的对照小鼠	0/9
此前用 MUC16XCD3 (1) +同种型对照 (5) 治疗的小鼠	2/3
此前用 MUC16XCD3 (1) +抗 4-1BB (2.5) 治疗的小鼠	5/5

[0301] 实施例4: 在ID8-VEGF/huMUC16模型中的MUC16XCD3+4-1BB治疗

[0302] 与实施例3类似,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。测试了三种给药方案,在每种给药方案中每次治疗9-10只小鼠:

[0303] A) 在移植后第3、7和10天,MUC16XCD3 (1mg/kg静脉内) 或CD3结合对照 (1mg/kg静脉内) 与同种型对照 (2.5mg/kg静脉内) 或抗小鼠4-1BB (2.5mg/kg静脉内) 的组合。

[0304] B) 在移植后第3天,一剂MUC16XCD3 (1mg/kg静脉内) 加上抗小鼠4-1BB (2.5mg/kg静脉内) 的组合,然后在移植后第7天和第10天,多剂MUC16XCD3 (1mg/kg静脉内)。

[0305] C) 在移植后第3天,一剂MUC16XCD3 (1mg/kg静脉内) 或CD3结合对照 (1mg/kg静脉内) 加上抗小鼠4-1BB (2.5mg/kg静脉内) 的组合,无需进一步治疗。

[0306] 显示的数据是至肿瘤移植后第67天的中位数存活率。参见表7和图5。如果小鼠因腹水引起腹胀而体重增加超过30%,则在第67天前处死小鼠。使用Gehan-Breslow-Wilcoxon方法来确定统计显著性。对于统计分析,将各组与CD3结合对照进行比较(对于MUC16XCD3,\*\*p=0.002,对于由MUC16XCD3和抗4-1BB组合组成的全部三个组,\*\*\*p<0.0001)。此外,为了确定与抗4-1BB的组合是否比单独的MUC16XCD3具有任何有益结果,将所有组与该组进行比较(对于Gp4,#p=0.011 (3剂CD3双特异性+3剂抗4-1BB),对于Gp5,#p=0.027 (3剂CD3双特异性+仅1剂抗4-1BB),对于Gp7,#p=0.011 (一剂CD3双特异性+抗4-1BB)。用MUC16xCD3+抗4-1BB治疗的小鼠显示出功效和长期存活。在给药期间观察到这些效果而没有任何显著的体重减轻,这被用作毒性的读出(表8和图6)。

[0307] 表7: ID8-VEGF/huMUC16模型的中位数存活期

组	组名称	第 3 天抗体 (mg/kg)	第 7 天抗体 (mg/kg)	第 10 天抗体 (mg/kg)	中位数存活 期 (天)	无肿瘤小 鼠数 / 小 鼠总数
1	3 剂 CD3 对照	CD3 结合对 照 (1) + 同 种型对照 (2.5)	CD3 结合对 照 (1) + 同 种型对照 (2.5)	CD3 结合对 照 (1) + 同 种型对照 (2.5)	41	0/9
2	3 剂双特 异性	MUC16XCD3 (1) + 同种 型对照 (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 同种 型对照 (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 同种 型对照 (2.5)	51	0/9
3	3 剂抗 4- 1BB	CD3 结合对 照 (1) + 抗 4- 1BB (2.5)	CD3 结合对 照 (1) + 抗 4- 1BB (2.5)	CD3 结合对 照 (1) + 抗 4- 1BB (2.5)	44	2/10
4	3 剂双特 异性+3 剂 抗 4-1BB	MUC16XCD3 (1) + 抗 4- 1BB (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 抗 4- 1BB (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 抗 4- 1BB (2.5)	未定义	9/10
5	3 剂双特 异性+仅 1 剂抗 4- 1BB	MUC16XCD3 (1) + 抗 4- 1BB (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 同种 型对照 (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 同种 型对照 (2.5)	未定义	8/10
6	一剂抗 4- 1BB	CD3 结合对 照 (1) + 抗 4- 1BB (2.5) 1			43.5	0/10
7	一剂双特 异性+抗 4-1BB	MUC16XCD3 (1) + 抗 4- 1BB (2.5)			未定义	9/10

[0309] 表8: 在ID8-VEGF/huMUC16模型中移植后第12天和第30天(研究中首次死亡前)的体重变化

组	组名称	第 12 天			第 30 天		
		平均体 重变化	SD	与第 1 组相比 的统计分析 (双因素 ANOVA)	平均体 重变化	SD	与第 1 组相比 的统计分析 (双因素 ANOVA)
1	CD3 对照	-2.9	2.9		3.6	5.6	
2	CD3 双特异性	-5.3	3.1	NS (0.75)	-0.8	4.9	NS (0.073)
3	3 剂抗 4-1BB	-3.1	1.9	NS (1.0)	0.8	4.4	NS (0.49)
4	3 剂 CD3 双特异 性+3 剂抗 4-1BB	-5.9	2.4	NS (0.44)	-2.5	2.0	** (0.001)
5	3 剂 CD3 双特异 性+仅 1 剂抗 4- 1BB	-4.2	2.0	NS (0.98)	-1.9	3.5	** (0.006)
6	一剂抗 4-1BB	-3.8	3.0	NS (1.0)	2.5	13. 4	NS (0.99)
7	一剂 CD3 双特异 性+抗 4-1BB	-4.2	1.9	NS (0.98)	-2.6	2.9	*** (0.001)

[0311] 结论:

[0312] 靶向肿瘤抗原MUC16(MUC16)的CD3双特异性抗体在多个小鼠模型中显示出临床前

功效。MUC16xCD3与抗4-1BB组合可以实现持久的抗肿瘤活性,从而使小鼠长期存活,这表明共刺激可以增强MUC16xCD3双特异性抗体对晚期实体瘤的效力。在小鼠体重不减轻的情况下观察到这些效果;体重减轻被用作毒性的读出。此外,在重新注射缺乏MUC16抗原的肿瘤细胞时会引发记忆应答,这表明强大的抗肿瘤反应不依赖于对MUC16抗原的反应。

[0313] 本发明在范围上不受本文所述的具体实施方案的限制。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。

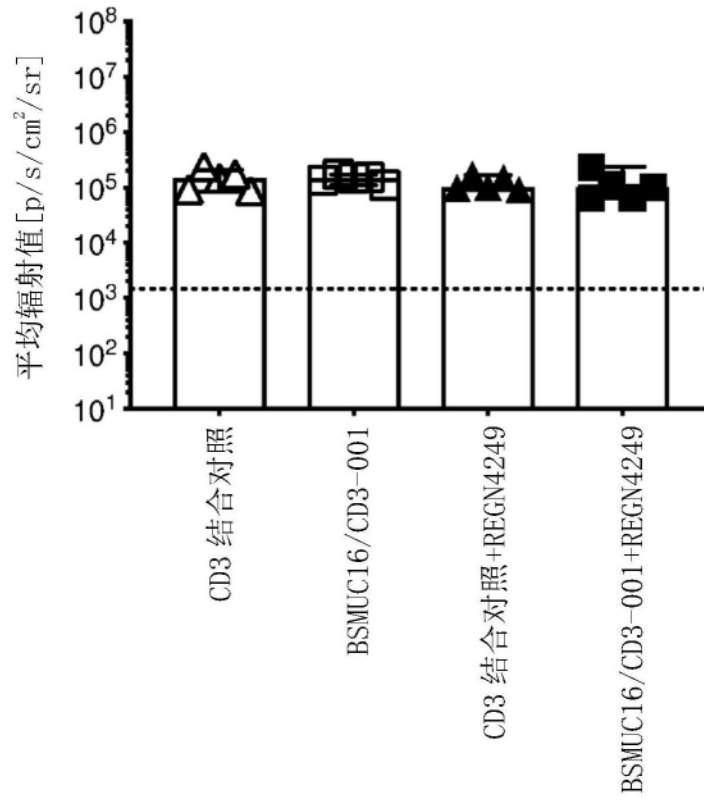


图1



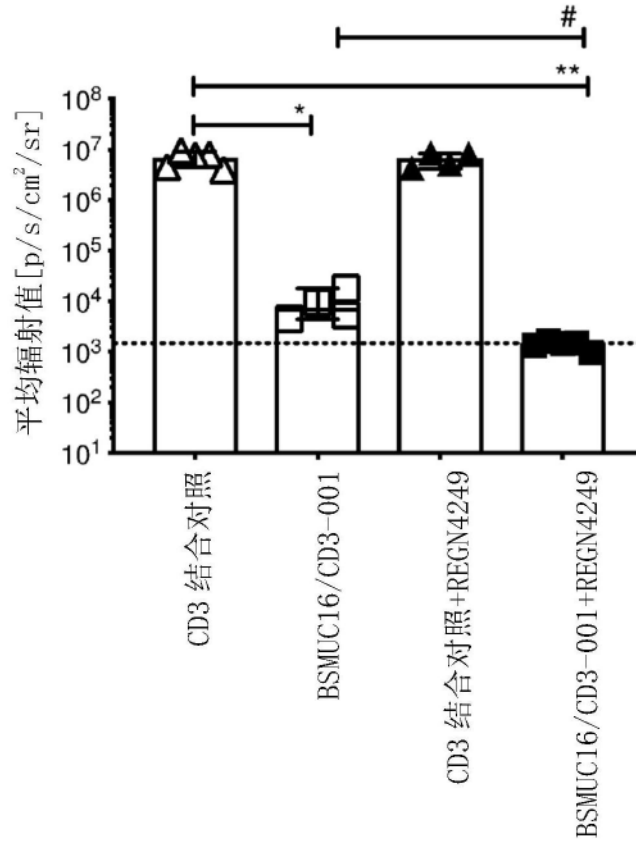


图2

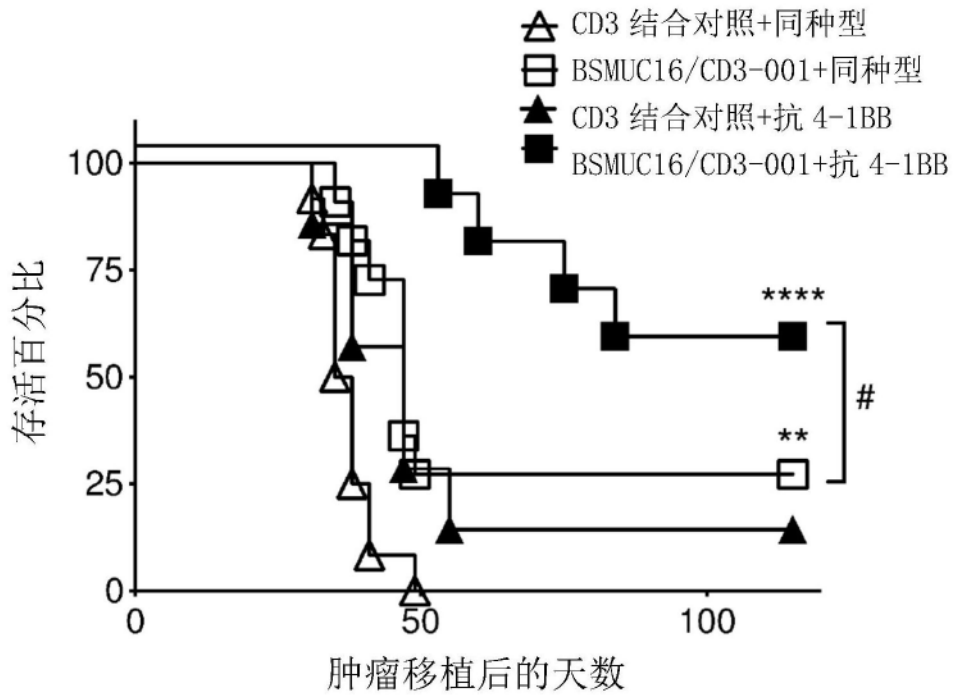


图3

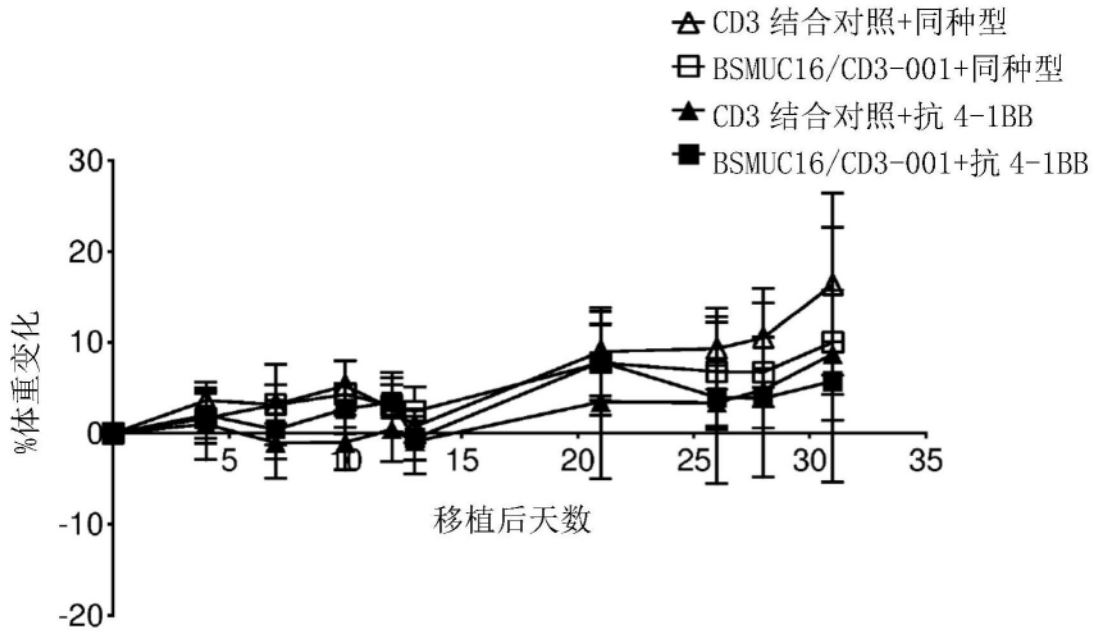


图4

- ▲ 第 1 组: CD3 结合对照 x3+同种型 x3
- 第 2 组: BSMUC16/CD3-001 x3+同种型 x3
- ▲ 第 3 组: CD3 结合对照 x3+a41BB x3
- 第 4 组: BSMUC16/CD3-001 x3+a41BB x3
- ⊠ 第 5 组: BSMUC16/CD3-001 x3+a41BB x1
- ▲ 第 6 组: CD3 结合对照 x1+a41BB x1
- ⊠ 第 7 组: BSMUC16/CD3-001 x1+a41BB x1

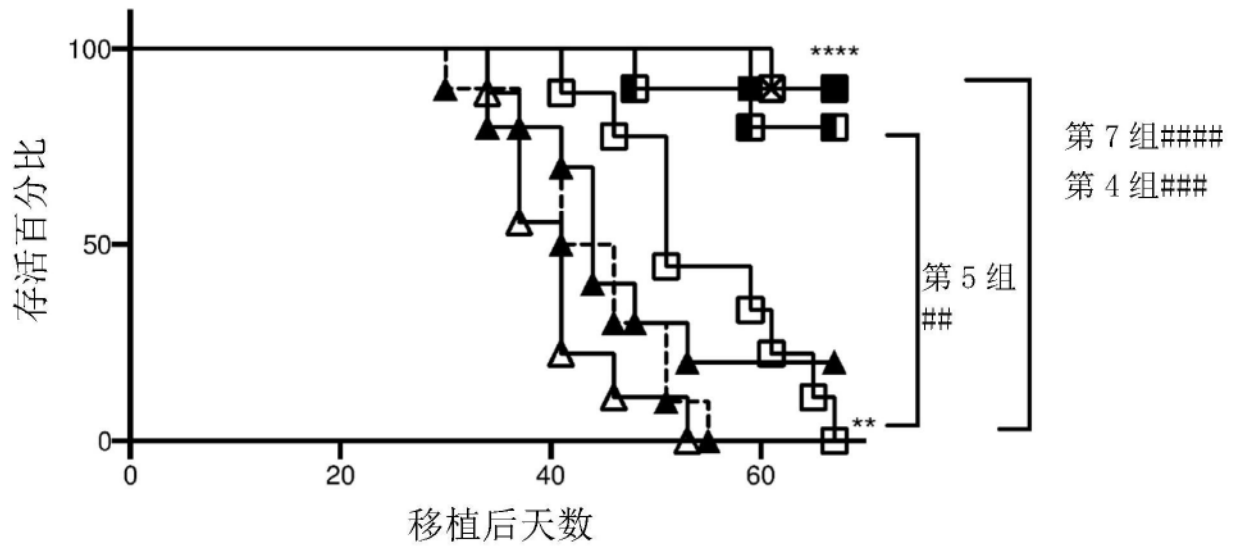


图5

- ▲ 第1组: CD3 结合对照 x3+同种型 x3
- 第2组: BSMUC16/CD3-001 x3+同种型 x3
- ▲ 第3组: CD3 结合对照 x3+a41BB x3
- 第4组: BSMUC16/CD3-001 x3+a41BB x3
- ▣ 第5组: BSMUC16/CD3-001 x3+a41BB x1
- ▲ 第6组: CD3 结合对照 x1+a41BB x1
- ▣ 第7组: BSMUC16/CD3-001 x1+a41BB x1

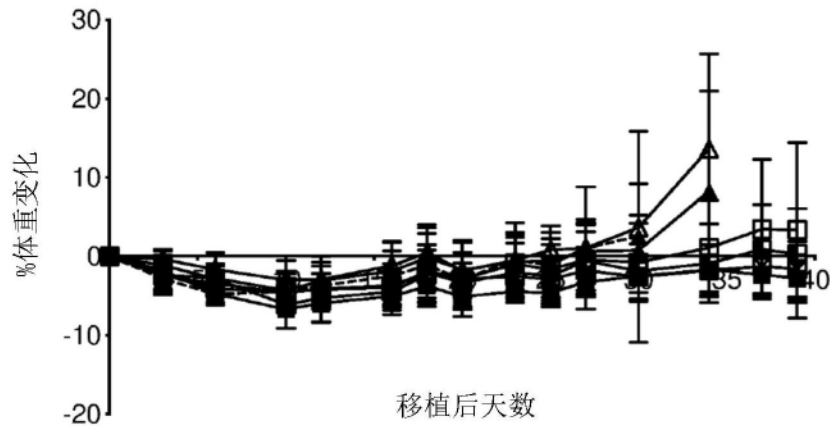


图6