

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046291**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.02.22**

(21) Номер заявки  
**202190088**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.06.20**

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)

---

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ  
БИСПЕЦИФИЧЕСКИМИ АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ CD3/MUC16 И АНТИТЕЛАМИ  
ПРОТИВ PD-1**

---

(31) **62/688,251**

(32) **2018.06.21**

(33) **US**

(43) **2021.03.22**

(86) **PCT/US2019/038163**

(87) **WO 2019/246356 2019.12.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Кроуфорд Элисон (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-2017053856  
WO-A1-2017197259**

ALISON CRAWFORD ET AL: "A Mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 11, no. 497, 19 June 2019 (2019-06-19), page eaau7534, XP055626521, US ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aau7534 Discloses combination of inhibitory anti-PD1 antibody with MUC16/CD3 BsAb REGN4018 in the experiments

---

(57) Изобретение обеспечивает способы лечения, уменьшения степени тяжести или подавления роста злокачественного новообразования (например, рака яичников или рака поджелудочной железы). Способы по изобретению включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с рецептором запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1), в комбинации с терапевтически эффективным количеством биспецифического антитела, которое специфически связывает муцин 16 (MUC16) и CD3.

---

**B1**

**046291**

**046291**

**B1**

### Ссылка на перечень последовательностей

В данную заявку посредством ссылки включен Перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10469WO01-Sequence.txt, созданного 12 июня 2019 года и имеющего размер 33567 байт.

### Область техники

Данное изобретение относится к способам лечения злокачественного новообразования, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела, которое специфически связывается с рецептором запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1), в комбинации с биспецифическим антителом, которое связывается с муцином 16 (MUC16) и CD3.

### Уровень техники

Муцин 16 (MUC16), также известный как раковый антиген 125, карциномный антиген 125, углеводный антиген 125 или CA-125, представляет собой единый трансмембранный домен, высокогликозилированный интегральный мембранный гликопротеин, который высоко экспрессируется при раке яичников. MUC16 состоит из трех основных доменов: внеклеточного N-концевого домена, большого тандемного повторяющегося домена, перемежающегося с доменами белка спермы морского ежа, энтерокиназы и агрина (SEA-домен), и C-концевого домена, который содержит сегмент трансмембранной области и короткий цитоплазматический хвост. Протеолитическое расщепление приводит к попаданию внеклеточной части MUC16 в кровотоки. MUC16 сверхэкспрессируется при злокачественных новообразованиях, включая рак яичников, рак груди, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого, внутривеночную холангиокарциному, массивную форму, аденокарциному шейки матки и аденокарциному желудочного тракта, а также при заболеваниях и патологических состояниях, включая воспалительные заболевания кишечника, цирроз печени, сердечную недостаточность, перитонеальную инфекцию и хирургию органов брюшной полости. (Haridas, D. et al., 2014, FASEB J., 28:4183-4199). Показано, что экспрессия на раковых клетках защищает опухолевые клетки от иммунной системы. (Felder, M. et al., 2014, Molecular Cancer, 13:129) Были исследованы способы лечения рака яичников с использованием антител к MUC16. Ореговомаб и абговомаб представляют собой антитела против MUC16, которые имеют ограниченную эффективность. (Felder, supra, Das, S. and Batra, S.K. 2015, Cancer Res. 75:4660-4674.)

CD3 представляет собой гомодимерный или гетеродимерный антиген, экспрессируемый на Т-клетках в ассоциации с Т-клеточным рецепторным комплексом (TCR), и необходим для активации Т-клеток. Функциональный CD3 образуется в результате димерной ассоциации двух из четырех различных цепей: эпсилон, дзета, дельта и гамма. Димерные структуры CD3 включают гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета. Было показано, что антитела против CD3 образуют кластеры CD3 на Т-клетках, тем самым вызывая активацию Т-клеток аналогично вовлечению TCR нагруженными пептидами молекулами ГКГС. Таким образом, антитела против CD3 были предложены для терапевтических целей, включая активацию Т-клеток. Кроме того, биспецифические антитела, которые способны связывать CD3 и целевой антиген, были предложены для применения в терапевтических целях, включая нацеливание Т-клеточного иммунного ответа на ткани и клетки, экспрессирующие целевой антиген.

Сигнальный рецептор запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1) в микроокружении опухоли играет ключевую роль, позволяя опухолевым клеткам избежать иммунного надзора со стороны иммунной системы хозяина. Блокада сигнального пути PD-1 продемонстрировала клиническую активность у пациентов с множественными типами опухолей, и терапевтические антитела, которые блокируют PD-1 (например, ниволумаб и пембролизумаб), были одобрены для лечения метастатической меланомы и метастатического плоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого. Последние данные продемонстрировали клиническую активность блокады PD-1 у пациентов с агрессивной НХЛ и лимфомой Ходжкина (Lesokhin, et al. 2014, Abstract 291, 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, Calif.; Ansell et al. 2015, N. Engl. J. Med. 372(4):311-9).

Рак яичников представляет собой самое смертельное из гинекологических злокачественных новообразований; несмотря на то что оценочное число новых случаев рака яичников среди американских женщин намного ниже, чем некоторых других злокачественных новообразований, соотношение смертей к заболеваемости раком яичников значительно выше (Siegal et al., CA Cancer J Clin 66:7-30, 2016). Рак яичников часто диагностируется на поздней стадии, что способствует его летальности. В настоящее время стандартом лечения рака яичников является хирургическое вмешательство с последующей химиотерапией, а именно сочетание препаратов платины и таксанов. В то время как большинство пациентов отвечают на первоначальное лечение, у большинства наблюдается рецидив заболевания, что приводит к циклу повторных операций и дополнительных курсов химиотерапии. Хотя рецидивирующий рак яичников может поддаваться дальнейшему лечению, практически все его виды в конечном итоге станут устойчивыми к доступным в настоящее время способам лечения. Несмотря на недавние достижения в терапии, такие как использование ингибиторов PARP для пациентов, несущих BRCA или другие мутации гомологичной рекомбинации (HRD), распространенный рак яичников остается болезнью с высокой неудовлетворенной потребностью.

Данные свидетельствуют о том, что рак яичников поддается некоторым формам иммунотерапии (Kandalaft et al., J. Clin. Oncol., 29:925-933, 2011). Например, пациенты с раком яичников, опухоли кото-

рых были положительными по интраэпителиальной инфильтрации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, имели значительно лучшую общую выживаемость и выживаемость без прогрессирования, чем пациенты без интраэпителиальной инфильтрации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Hamanishi et al., PNAS, 104:3360-65, 2007; и Zhang et al., N. Engl. J. Med., 348:203-213, 2003). Более того, у некоторых пациентов проявляется спонтанный иммунный ответ на опухоли, что подтверждается обнаружением опухолерективных Т-клеток и антител в крови, опухоли или асците у пациентов с запущенным заболеванием (Schliengar et al., Clin Cancer Res, 9:1517-1527, 2003). Блокада пути контрольных точек PD-1/PD-L1 продемонстрировала некоторые преимущества при раке яичников; блокада PD-1 в монотерапии привела к частоте общего ответа (ЧОО) примерно 10-15% в клинических исследованиях ранних фаз (Hamanishi et al., выше). Однако одной только блокады этого пути явно недостаточно.

Ввиду высокой неудовлетворенной потребности в эффективных способах лечения рака яичников, может быть полезно, как показано в данном документе, комбинировать лечение с агентом для усиления функции Т-клеток (например, ингибитором PD-1, таким как антитело против PD-1) вместе с агентом против целевого антигена (биспецифическое антитело против MUC16/CD3).

#### **Краткое описание сущности изобретения**

В соответствии с определенными вариантами осуществления в настоящем изобретении предложены способы лечения, снижения проявления по меньшей мере одного симптома или показания или ингибирования роста злокачественного новообразования у субъекта. Способы согласно этому аспекту изобретения включают введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с белком запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1), в комбинации с терапевтически эффективным количеством биспецифического антитела, которое специфически связывается с MUC16 и CD3, субъекту, нуждающемуся в этом.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы лечения, снижения проявления по меньшей мере одного симптома или показания или ингибирования роста злокачественного новообразования у субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы задержки роста опухоли или предотвращения рецидива опухоли. Способы в соответствии с этим и другими аспектами изобретения включают последовательное введение одной или более доз терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с PD-1, в комбинации с одной или более дозами терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, которое специфически связывается с MUC16 и CD3, у субъекта, нуждающегося в этом. В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения или ингибирования роста опухоли, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, (а) терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1); и (b) терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, содержащего первое антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает MUC16, и второе антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает CD3. В некоторых случаях антитело против PD-1 вводят до, одновременно или после биспецифического антитела. В некоторых случаях антитело против PD-1 вводят перед биспецифическим антителом. В некоторых случаях антитело против PD-1 вводят за по меньшей мере 1 неделю до биспецифического антитела. В некоторых случаях одну или более доз антитела против PD-1 вводят в комбинации с одной или более дозами биспецифического антитела. В некоторых случаях антитело против PD-1 вводят в дозе от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых случаях каждая доза антитела против PD-1 составляет от 10 до 8000 мкг. В некоторых случаях биспецифическое антитело вводят в дозе от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых случаях каждая доза биспецифического антитела составляет от 10 до 8000 мкг. В некоторых случаях каждая доза антитела против PD-1 вводится через 0,5-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В некоторых случаях каждую дозу биспецифического антитела вводят через 0,5-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В различных вариантах осуществления антитела вводят внутривенно, подкожно или внутривнутрино.

В некоторых вариантах осуществления опухоль включает рак яичников. В некоторых вариантах осуществления субъект является резистентным, имеет недостаточный ответ на предшествующую терапию или имеет рецидив после нее.

В некоторых случаях способ дополнительно включает введение субъекту третьего терапевтического агента или терапии. В некоторых вариантах осуществления третий терапевтический агент или терапия выбраны из группы, состоящей из лучевой терапии, хирургического вмешательства, химиотерапевтического агента, противораковой вакцины, ингибитора PD-L1, ингибитора LAG-3, ингибитора CTLA-4, ингибитора TLM3, ингибитора BTLA, ингибитора TIGIT, ингибитора CD47, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ингибитора ангиопоэтина-2 (Ang2), ингибитора трансформирующего фактора роста бета (ТФР-β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР), антитела к опухолеспецифическому антигену, вакцины бацилл Кальметта-Герена, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, цитотоксина, ингибитора рецептора интерлейкина-6 (ИЛ-6R), ингибитора рецептора интерлейкина-4 (ИЛ-4R), ингибитора ИЛ-10, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-21, ИЛ-15, конъюгата антитело-лекарственное средство, противовоспалительно-



В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1, биспецифическое антитело, или оба содержат константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 или IgG4.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения или ингибирования роста опухоли, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, (а) терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1); и (b) терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, содержащего первое антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает MUC16, и второе антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает CD3, при этом: (а) антитело против PD-1 его или антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) вариательной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) вариательной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; (b) первое антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три CDR тяжелой цепи (A-HCDR1, A-HCDR2 и A-HCDR3) вариательной области тяжелой цепи (A-HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и три CDR легкой цепи (A-LCDR1, A-LCDR2 и A-LCDR3) вариательной области легкой цепи (A-LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и (c) второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три CDR тяжелой цепи (B-HCDR1, B-HCDR2 и B-HCDR3) вариательной области тяжелой цепи (B-HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и три CDR легкой цепи (B-LCDR1, B-LCDR2 и B-LCDR3) вариательной области легкой цепи (B-LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления способа антитело против PD-1 и биспецифическое антитело, соответственно, содержат следующее: (а) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; (b) A-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; A-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; A-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; A-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; A-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и A-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и (c) B-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; B-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; B-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; B-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; B-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и B-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления способа данное антитело против PD-1 и биспецифическое антитело, соответственно, содержат следующее: (а) HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; (b) A-HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и A-LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и (c) B-HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и B-LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления способа антитело против PD-1 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; первое антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления способа опухоль представляет собой рак яичника.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения или ингибирования роста опухоли, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, (а) терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1); и (b) терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, содержащего первое антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает MUC16, и второе антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает CD3, при этом: (а) антитело против PD-1 его или антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) вариательной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и три определяющие комплементар-

ность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; (b) первое антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три CDR тяжелой цепи (A-HCDR1, A-HCDR2 и A-HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи (A-HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и три CDR легкой цепи (A-LCDR1, A-LCDR2 и A-LCDR3) вариабельной области легкой цепи (A-LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и (c) второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три CDR тяжелой цепи (B-HCDR1, B-HCDR2 и B-HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи (B-HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и три CDR легкой цепи (B-LCDR1, B-LCDR2 и B-LCDR3) вариабельной области легкой цепи (B-LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления способа антитело против PD-1 и биспецифическое антитело, соответственно, содержат следующее: (a) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; (b) A-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; A-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; A-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; A-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; A-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и A-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и (c) B-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; B-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; B-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; B-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; B-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и B-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления способа антитело против PD-1 и биспецифическое антитело, соответственно, содержат следующее: (a) HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; (b) A-HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и A-LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и (c) B-HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и B-LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления способа антитело против PD-1 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; первое антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления способа опухоль представляет собой рак яичника.

В различных вариантах осуществления любого из способов, обсуждаемых выше или в данном документе, циркулирующий СА-125 в концентрации до 10 кЕд/мл не препятствует в значительной степени противоопухолевой активности биспецифического антитела. В различных вариантах осуществления любого из способов, обсуждаемых выше или в данном документе, у субъекта диагностирован рак яичников, и у субъекта уровни СА-125 в кровотоке составляют до 10 кЕд/мл. В некоторых вариантах осуществления способов, обсуждаемых выше или в данном документе, субъект имеет повышенный уровень СА-125 в сыворотке перед началом лечения. В некоторых вариантах осуществления способов, обсуждаемых выше или в данном документе, у субъекта перед началом лечения уровень СА-125 в сыворотке больше или равен 2-кратному верхнему пределу нормальных уровней СА-125 в сыворотке. Некоторые варианты способов, обсуждаемых выше или в данном документе, включают мониторинг уровней СА-125 в сыворотке, например, для оценки эффективности лечения путем сравнения уровней СА-125 в сыворотке в различные моменты во время или после лечения с исходным уровнем СА-125 в сыворотке у конкретного пациента или с исходным уровнем СА-125 в сыворотке в совокупной популяции пациентов.

В некоторых вариантах осуществления обсуждаемые в данном документе антитела применяются в производстве лекарственного средства для применения в любом из способов, обсуждаемых выше или в данном документе. В некоторых вариантах осуществления обсуждаемые в данном документе антитела предназначены для применения в медицине или для лечения злокачественного новообразования, как обсуждается выше или в данном документе. Например, настоящее описание включает:

(А) Применение биспецифического антитела, содержащего первое антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает MUC16, и второе антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает CD3, в производстве лекарственного средства для лечения или ингибирования роста опухоли у





аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

(К) Биспецифическое антитело, содержащее первое антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает MUC16, и второе антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает CD3, для применения в лечении или ингибировании роста опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, в комбинации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое специфически связывает белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1), при этом: (i) антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; (ii) первое антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три CDR тяжелой цепи (A-HCDR1, A-HCDR2 и A-HCDR3) варибельной области тяжелой цепи (A-HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и три CDR легкой цепи (A-LCDR1, A-LCDR2 и A-LCDR3) варибельной области легкой цепи (A-LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и (iii) второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три CDR тяжелой цепи (B-HCDR1, B-HCDR2 и B-HCDR3) варибельной области тяжелой цепи (B-HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и три CDR легкой цепи (B-LCDR1, B-LCDR2 и B-LCDR3) варибельной области легкой цепи (B-LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

(L) Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1), для применения в лечении или ингибировании роста опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, в комбинации с биспецифическим антителом, содержащим первое антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает MUC16, и второе антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает CD3, при этом: (i) антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; (ii) первое антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три CDR тяжелой цепи (A-HCDR1, A-HCDR2 и A-HCDR3) варибельной области тяжелой цепи (A-HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и три CDR легкой цепи (A-LCDR1, A-LCDR2 и A-LCDR3) варибельной области легкой цепи (A-LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и (iii) второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три CDR тяжелой цепи (B-HCDR1, B-HCDR2 и B-HCDR3) варибельной области тяжелой цепи (B-HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и три CDR легкой цепи (B-LCDR1, B-LCDR2 и B-LCDR3) варибельной области легкой цепи (B-LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Другие варианты осуществления настоящего изобретения станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

#### **Краткое описание графических материалов**

На Фиг. 1 показано связывание различных концентраций анти-MUC 16 клона 3A5 и BSMUC16/CD3-001 с CA125 по данным измерения ИФА (описанного в Примере 2 в данном документе). BSMUC16/CD3-001 и его исходное антитело MUC16 демонстрируют заметно сниженный сигнал связывания при всех протестированных концентрациях по сравнению с клоном 3A5 анти-MUC 16, который связывается с повторяющейся областью MUC16.

На Фиг. 2 показаны кривые среднего роста опухоли для групп мышей (по 5 на группу), получавших CD3-связывающий контроль+изотипический контроль ( $\Delta$ ), BSMUC16/CD3-005+изотипический контроль ( $\square$ ), CD3 -связывающий контроль+анти-PD-1 ( $\blacktriangle$ ) и BSMUC16/CD3-005+анти-PD-1 ( $\blacksquare$ ) (как описано в Примере 3 в данном документе). Комбинация антитела против PD-1 и биспецифического антитела против CD3xMUC16 синергетически ингибировала рост опухоли.

На фиг. 3 показано влияние инкубации Т-клеток с BSMUC16/CD3-001 на процент PD-1-положительных Т-клеток.

#### **Подробное описание сущности изобретения**

Перед описанием настоящего изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты осуществления или признаки вариантов осуществления могут быть объединены друг с другом, и такие комбинации явно входят в объем настоящего изобретения. Любое конкретное значение, описанное выше или в данном документе, может быть объединено с другим связанным значением, описанным выше или в данном документе, чтобы указать диапазон со значениями,

представляющими верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны входят в объем настоящего раскрытия.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой принадлежит это изобретение. Используемый в данном документе термин "около" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, как используется в данном документе, выражение "около 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. д.).

Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения, далее будут описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в этом описании, полностью включены в данное описание посредством ссылки.

Способы лечения или подавления роста злокачественных новообразований

Настоящее изобретение включает способы лечения, снижения проявления или уменьшения степени тяжести по меньшей мере одного симптома или показателя или ингибирования роста злокачественного новообразования у субъекта. Способы согласно этому аспекту изобретения включают введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD-1, в комбинации с терапевтически эффективным количеством биспецифического антитела против MUC16 и CD3 субъекту, нуждающемуся в этом. Используемые в данном документе термины "лечить", "лечение" и т.п. означают облегчение симптомов, устранение причин симптомов на временной или постоянной основе, задержку или подавление роста опухоли, уменьшение массы опухолевых клеток или опухолевой нагрузки, чтобы способствовать регрессии опухоли, вызвать уменьшение, некроз и/или исчезновение опухоли, предотвратить рецидив опухоли и/или увеличить продолжительность выживаемости субъекта.

Используемое в данном документе выражение "субъект, нуждающийся в этом" означает человека или млекопитающее, отличное от человека, у которого проявляется один или более симптомов или признаков злокачественного новообразования, и/или у которого было диагностировано злокачественное новообразование, включая рак яичников, и которому необходимо лечение от него. Во многих вариантах осуществления термин "субъект" может использоваться взаимозаменяемо с термином "пациент". Например, у субъекта-человека может быть диагностирована первичная или метастатическая опухоль и/или один или более симптомов или показаний, включая, помимо прочего, увеличение лимфатических узлов, вздутие живота, боль/давление в груди, необъяснимую потерю массы, лихорадку, ночную потливость, стойкую утомляемость, потерю аппетита, увеличение селезенки, зуд. Выражение включает субъектов с первичными или развившимися опухолями яичников. В конкретных вариантах осуществления экспрессия включает людей, которые страдают и нуждаются в лечении рака яичников или другой опухоли, экспрессирующей MUC16. В других конкретных вариантах осуществления экспрессия включает субъектов с MUC16+ опухолями (например, опухоль с экспрессией MUC16, определенной с помощью проточной цитометрии). В некоторых вариантах осуществления выражение "субъект, нуждающийся в этом" включает пациентов с раком яичников, который является резистентным, или не поддается лечению, или не контролируется должным образом предшествующей терапией (например, к лечению обычным противораковым агентом). Например, выражение включает субъектов, которых лечили химиотерапией, такой как химиотерапевтический агент на основе платины (например, цисплатин) или соединение таксола (например, доцетаксел). Выражение также включает субъектов с опухолью яичников, для которых стандартная противораковая терапия нецелесообразна, например, из-за токсических побочных эффектов. Например, выражение включает пациентов, которые прошли один или более циклов химиотерапии с токсическими побочными эффектами. В некоторых вариантах осуществления выражение "субъект, нуждающийся в этом" включает пациентов с опухолью яичника, которая подвергалась лечению, но впоследствии возник рецидив или метастазирование. Например, пациенты с опухолью яичников, которые могли получать лечение одним или более противораковыми агентами, ведущими к регрессии опухоли; однако приводящему впоследствии к рецидиву злокачественного новообразования, резистентного к одному или более противораковым агентам (например, резистентного к химиотерапии злокачественного новообразования), лечат способами по настоящему изобретению.

Выражение "субъект, который в этом нуждается" также включает субъектов, которые подвержены риску развития рака яичников, например, лиц с семейным анамнезом рака яичников, лиц, имевших в анамнезе инфекции, связанные с раком яичников, лиц с мутациями в генах BRCA1/2, или лиц с ослабленной иммунной системой из-за ВИЧ-инфекции или из-за иммунодепрессантов.

В определенных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению можно использовать для лечения пациента, у которых обнаруживаются повышенные уровни одного или более биомаркеров, связанных со злокачественным новообразованием (например, лиганда запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-L1), CA125, белка 4 придатка яичка человека (HE4) и/или карциноэмбрионального антигена (CEA)). Например, способы по настоящему изобретению включают введение терапевтически эффективного количества антитела против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против

MUC16/CD3 пациенту с повышенным уровнем PD-L1 и/или CA125.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению используются у субъекта с раком яичников. Термины "опухоль", "рак" и "злокачественное новообразование" используются в данном документе взаимозаменяемо. Используемый в данном документе термин "рак яичников" относится к опухолям яичника и маточной трубы и включает серозный рак, эндометриоидную карциному, светлоклеточную карциному и муцинозную карциному.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение включает способы лечения, задержки или ингибирования роста опухоли. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение включает способы стимулирования регрессии опухоли. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способы уменьшения массы опухолевых клеток или уменьшения опухолевой нагрузки. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение включает способы предотвращения рецидива опухоли. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение терапевтически эффективного количества антитела против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 субъекту, нуждающемуся в этом, при этом каждое антитело вводят субъекту в нескольких дозах, например, как часть конкретной терапевтической схемы введения доз. Например, терапевтическая схема введения доз может включать введение субъекту множества доз антитела против PD-1 с частотой около один раз в день, один раз каждые два дня, один раз каждые три дня, один раз каждые четыре дня, один раз каждые пять дней, один раз каждые шесть дней, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в три месяца, один раз в четыре месяца или реже. В определенных вариантах осуществления одна или более доз антитела против PD-1 вводятся в комбинации с одной или более дозами терапевтически эффективного количества биспецифического антитела против MUC16/CD3, при этом одну или более доз биспецифического антитела вводят субъекту с частотой около один раз в день, один раз в два дня, один раз в три дня, один раз в четыре дня, один раз в пять дней, один раз в шесть дней, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в три месяца, один раз в четыре месяца или реже.

В некоторых вариантах осуществления каждую дозу антитела против MUC16/CD3 вводят более чем в 1 фракции, например, в 2-5 фракциях ("введение дробных доз") в течение данного периода введения доз. Биспецифическое антитело против MUC16/CD3 можно вводить дробными дозами для уменьшения или устранения "всплесков" цитокинов, индуцированных в ответ на введение антитела. Всплески цитокинов относятся к клиническим симптомам синдрома высвобождения цитокинов ("цитокиновый шторм") и реакциям, связанным с инфузией. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение одной или более доз антитела против PD-1 в комбинации с одной или более дозами биспецифического антитела против MUC16/CD3 субъекту, нуждающемуся в этом, при этом: доза биспецифического антитела вводится в виде дробных доз или более чем в 1 фракции, например, в виде 2 фракций, 3 фракций, 4 фракций или 5 фракций в течение данного периода введения доз. В некоторых вариантах осуществления доза биспецифического антитела разделяется на 2 или более фракций, при этом каждая фракция содержит количество антитела, равное количеству других фракций. Например, дозу антитела против MUC16/CD3, составляющую 1000 микрограммов, можно вводить один раз в неделю, при этом дозу вводят 2 фракциями в течение недели, каждая фракция составляет 500 микрограммов. В некоторых вариантах осуществления дозу биспецифического антитела вводят разделенной на 2 или более фракций, при этом фракции содержат неравные количества антитела, например, больше или меньше первой фракции. Например, дозу антитела против MUC16/CD3, составляющую 1000 микрограммов, можно вводить один раз в неделю, при этом дозу вводят 2 фракциями в течение недели, при этом первая фракция составляет 700 микрограммов, а вторая фракция составляет 300 микрограммов. В качестве другого примера, доза антитела против MUC16/CD3, составляющая 1000 микрограммов, может вводиться один раз в 2 недели, при этом дозу вводят 3 фракциями в течение 2-недельного периода, при этом первая фракция составляет 400 микрограмм, вторая фракция составляет 300 мкг, а третья фракция составляет 300 мкг.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способы ингибирования, замедления или остановки метастазирования опухоли или инфильтрации опухоли в периферические органы. Способы в соответствии с этим аспектом включают введение терапевтически эффективного количества антитела против PD-1 субъекту, нуждающемуся в этом, в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3. В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам повышения противоопухолевой эффективности или усиленного ингибирования опухоли. Способы в соответствии с этим аспектом изобретения включают введение субъекту с раком яичников терапевтически эффективного количества антитела против PD-1 перед введением терапевтически эффективного количества биспецифического антитела против MUC16/CD3, при этом антитело против PD-1 можно вводить за около 1 день, более 1 дня, более 2 дней, более 3 дней, более 4 дней, более 5 дней, более 6 дней, более 7 дней или более чем за 8 дней до биспецифического антитела. В определенных вариантах осуществления способы обеспечивают повышенное ингибирование опухоли, например, на около 20%, на более чем 20%, более чем 30%, более чем 40%, более чем 50%, более чем 60%, более чем 70% или более

чем 80% по сравнению с субъектом, которому биспецифическое антитело вводили перед антителом против PD-1.

В определенных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение терапевтически эффективного количества антитела против PD-1 и терапевтически эффективного количества биспецифического антитела против CD3xMUC16 субъекту с раком яичников. В конкретных вариантах осуществления рак яичников представляет собой серозный рак. В дополнительных вариантах осуществления рак яичников является медленно растущей или агрессивной. В определенных вариантах осуществления субъект не отвечает на предшествующую терапию или у него рецидив после предшествующей терапии. В определенных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического агента.

В определенных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела против MUC16/CD3 субъекту с MUC16+ злокачественным новообразованием. В конкретных вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак яичника. В дополнительных вариантах осуществления рак яичников является медленно развивающимся или агрессивным. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой резистентный к платине рак яичников. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой резистентный к таксолу рак яичников. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак маточной трубы. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой первичный рак брюшины, при котором у пациента могут быть повышенные уровни СА-125 в сыворотке. В конкретных вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак поджелудочной железы (например, аденокарциному поджелудочной железы). В некоторых вариантах осуществления субъект не отвечает на предшествующую терапию или у него рецидив после предшествующей терапии (например, химиотерапии).

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение антитела против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 субъекту, нуждающемуся в этом, в качестве терапии "первой линии" (например, начальной терапии). В других вариантах осуществления антитело против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 вводят в качестве терапии "второй линии" (например, после предшествующей терапии). Например, антитело против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 вводят в качестве терапии "второй линии" субъекту, у которого возник рецидив после предшествующей терапии, например, химиотерапии.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению используются для лечения пациента с MRD-положительным заболеванием. Минимальная остаточная болезнь (МОБ) относится к небольшому количеству раковых клеток, которые остаются у пациента во время или после лечения, при этом у пациента могут проявляться или не проявляться симптомы или признаки заболевания. Такие остаточные раковые клетки, если их не удалить, часто приводят к рецидивам заболевания. Настоящее изобретение включает способы ингибирования и/или устранения остаточных раковых клеток у пациента после тестирования МОБ. МОБ можно анализировать в соответствии со способами, известными в данной области техники (например, при помощи проточной цитометрии МОБ). Способы согласно этому аспекту изобретения включают введение антитела против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 субъекту, нуждающемуся в этом.

Способы по настоящему изобретению, согласно определенным вариантам осуществления, включают введение субъекту терапевтически эффективного количества каждого из антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3 в комбинации с третьим терапевтическим агентом. Третий терапевтический агент может быть агентом, выбранным из группы, состоящей, например, из лучевой терапии, химиотерапии, хирургического вмешательства, противораковой вакцины, ингибитора PD-L1 (например, антитела против PD-L1), ингибитора LAG3 (например, антитела против LAG3), ингибитора CTLA-4 (например, антитела против CTLA-4), ингибитора TIM3, ингибитора BTLA, ингибитора TIGIT, ингибитора CD47, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ингибитора Ang2, ингибитора трансформирующего фактора роста бета (ТФР-β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР), антитела к опухолеспецифическому антигену (например, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, M2-PK опухоли, простатоспецифическому антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9), вакцины (например, бактерия Кальметта-Герена), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, цитотоксина, химиотерапевтического агента, ингибитора ИЛ-6R, ингибитора ИЛ-4R, ингибитора ИЛ-10, или цитокина, такого как ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-21 и ИЛ-15, противовоспалительного лекарственного средства, например, кортикостероидов, и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств, и биологически активной добавки к пище, например, антиоксидантов. В некоторых вариантах осуществления антитела можно применять в комбинации с терапией, включающей химиотерапевтический агент (например, паклитаксел, карбоплатин, доксорубицин, циклофосфамид, цисплатин, гемцитабин или доцетаксел), лучевую терапию и хирургическое вмешательство. Используются

мая в данном документе фраза "в комбинации с" означает, что антитела вводят субъекту одновременно с, непосредственно перед или сразу после введения третьего терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления третий терапевтический агент вводят в виде совместного состава с антителами. В родственном варианте осуществления настоящее изобретение включает способы, включающие введение терапевтически эффективного количества антитела против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 субъекту, который получает фоновую противораковую терапию по схеме. Схема основной противораковой терапии может включать курс применения, например, химиотерапевтического агента или лучевой терапии. Антитело против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 может быть добавлено в дополнение к схеме фоновой противораковой терапии. В некоторых вариантах осуществления антитела добавляют как часть схемы "фоновой ступенчатой терапии", при которой фоновую противораковую терапию постепенно отменяют у субъекта с течением времени (например, поэтапно), в то время как антитела вводят субъекту в постоянной дозе, или в увеличивающейся, или в уменьшающейся дозе с течением времени.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела против PD-1 в комбинации с терапевтически эффективным количеством биспецифического антитела против MUC16/CD3, при этом введение антител приводит к усиленному подавлению роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления рост опухоли подавляется на по меньшей мере около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70% или около 80% по сравнению с не получавшим лечение субъектом или субъектом, которому вводят одно из двух антител в качестве монотерапии. В некоторых вариантах осуществления введение антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3 приводит к усилению регрессии опухоли, ее уменьшению и/или исчезновению. В некоторых вариантах осуществления введение антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3 приводит к задержке роста и развития опухоли, например, рост опухоли может быть задержан на около 3 дня, более чем 3 дня, около 7 дней, более чем 7 дней, более чем 15 дней, более чем 1 месяц, более чем 3 месяца, более чем 6 месяцев, более чем 1 год, более чем 2 года или более чем 3 года по сравнению с не получавшим лечение субъектом или субъектом, которому вводят одно из двух антител в качестве монотерапии. В некоторых вариантах осуществления введение антитела против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 предотвращает рецидив опухоли и/или увеличивает продолжительность выживаемости субъекта, например, увеличивает продолжительность выживания на более чем 15 дней, более чем 1 месяц, более чем 3 месяца, более чем 6 месяцев, более чем 12 месяцев, более чем 18 месяцев, более чем 24 месяца, более чем 36 месяцев или более чем 48 месяцев по сравнению с не получавшим лечение субъектом или субъектом, которому вводят одно из двух антител в качестве монотерапии. В определенных вариантах осуществления введение антител в комбинации увеличивает выживаемость без прогрессирования заболевания или общую выживаемость. В некоторых вариантах осуществления введение антитела против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 увеличивает ответ и продолжительность ответа у субъекта, например, на более чем 2%, более чем 3%, и более чем 4%, более чем 5%, более чем 6%, более чем 7%, более чем 8%, более чем 9%, более чем 10%, более чем 20%, более чем 30%, более чем 40% или на более чем 50% по сравнению с не получавшим лечение субъектом или субъектом, который получал одно из двух антител в качестве монотерапии. В некоторых вариантах осуществления введение антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3 субъекту с раком яичников приводит к полному исчезновению всех признаков опухолевых клеток ("полный ответ"). В некоторых вариантах осуществления введение антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3 субъекту с раком яичников приводит к по меньшей мере 30% или более уменьшению количества опухолевых клеток или размера опухоли ("частичный ответ"). В некоторых вариантах осуществления введение антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3 субъекту с раком яичников приводит к полному или частичному исчезновению опухолевых клеток/поражений, включая новые поддающиеся измерению поражения. Уменьшение опухоли можно измерить любым из способов, известных в данной области техники, например, при помощи рентгенографии, позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), компьютерной томографии (КТ), магнитно-резонансной томографии (МРТ), цитологии, гистологии или молекулярно-генетического анализа. В некоторых вариантах осуществления введение антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3 дает синергетический противоопухолевый эффект, который превышает комбинированные эффекты двух агентов при введении отдельно.

В некоторых вариантах осуществления комбинация вводимых антител является безопасной и хорошо переносимой пациентом, при этом не наблюдается увеличения побочного эффекта (например, повышенного высвобождения цитокинов ("цитокиновый шторм") или повышенной активации Т-клеток) по сравнению с пациентом, которому вводили биспецифическое антитело в качестве монотерапии.

Антитела против PD-1 и их антигенсвязывающие фрагменты

Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления настоящего изобретения способы включают введение терапевтически эффективного количества антитела против PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента. Используемый в данном документе термин "антитело" включает молекулы

иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). В типичном антителе каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или  $V_H$ ) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или  $V_L$ ) и константную область легкой цепи. Константную область легкой цепи содержит один домен ( $C_{L1}$ ). Области  $V_H$  и  $V_L$  могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR антитела против ИЛ-4R (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Используемый в данном документе термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полного антитела. Термины "антигенсвязывающая часть антитела", "антигенсвязывающий фрагмент антитела" и тому подобное, используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной ДНК и геной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, библиотеки фаговых антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с применением методик молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')<sub>2</sub>; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, наноантитела (например, моновалентные наноантитела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемый в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, может содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен  $V_H$ , связанный с доменом  $V_L$ , домены  $V_H$  и  $V_L$  могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем взаиморасположении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры  $V_H$ - $V_H$ ,  $V_H$ - $V_L$  или  $V_L$ - $V_L$ . В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен  $V_H$  или  $V_L$ .

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (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)  $V_L$ - $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ; и (xiv)  $V_L$ - $C_L$ . В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любой из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть или непосредственно связаны друг с другом, или могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или

гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами VH или VL (например, с помощью дисульфидной (дисульфидных) связи (связей)).

Используемый в данном документе термин "антитело" также включает мультиспецифические (например, биспецифические) антитела. Мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет в типичном случае содержать по меньшей мере два различных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же самом антигене. Любой формат мультиспецифического антитела может быть адаптирован для применения в контексте антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием стандартных способов, доступных в данной области техники. Например, настоящее изобретение включает способы, включающие применение биспецифических антител, в которых одно плечо иммуноглобулина специфично для PD-1 или его фрагмента, а другое плечо иммуноглобулина специфично для второй терапевтической мишени или конъюгировано с терапевтическим фрагментом. Иллюстративные биспецифические форматы, которые могут быть применены в контексте настоящего изобретения, включают в себя, но не ограничиваясь ими, например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, гибридные белки IgG-scFv, Ig с двойным переменным доменом (DVD), квадрому, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступами-во-впадины и т.п.), CrossMab, CrossFab, антителоподобный белок, содержащий домен, сконструированный посредством замены цепей, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, IgG с Fab двойного действия (DAF) и биспецифические форматы Mab<sub>2</sub> (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и ссылки, цитируемые в них, для обзора вышеупомянутых форматов). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с помощью конъюгации пептидов и нуклеиновых кислот, например, при этом не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реактивностью используются для создания сайтспецифических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем подвергаются самосборке в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Антитела, используемые в способах по настоящему изобретению, могут быть человеческими антителами. Термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, предполагает включение в себя антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. При этом человеческие антитела согласно данному изобретению могут содержать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако, используемый в данном документе термин "человеческое антитело" не предполагает включение антител, последовательности CDR которых получены из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были привиты к каркасным последовательностям человека.

Антитела, используемые в способах по настоящему изобретению, могут быть рекомбинантными человеческими антителами. Используемый в данном документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" предназначен для включения всех человеческих антител, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, например, антител, экспрессируемых с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антител, выделенных из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (описано дополнительно ниже), антител, выделенных из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным для генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает в себя сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела, имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. При этом в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают *in vitro* мутагенезу (или, в случае использования животного, трансгенного в отношении последовательностей человеческого Ig, *in vivo* соматическому мутагенезу) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VL и VH рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей VL и VH человеческой зародышевой линии и родственны им, в природе могут не существовать в рамках репертуара антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела, используемые в способах по настоящему изобретению, специфически связывают PD-1. Термин "специфически связывает" или т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно устойчивым в физиологических условиях. Способы определения того, связывается ли антитело специфически с антигеном, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Например, антитело, которое "специ-

фически связывает" PD-1, используемое в контексте настоящего изобретения, включает антитела, которые связывают PD-1 или его часть с  $K_D$  менее около 500 нМ, менее около 300 нМ, менее около 200 нМ, менее около 100 нМ, менее около 90 нМ, менее около 80 нМ, менее около 70 нМ, менее около 60 нМ, менее около 50 нМ, менее около 40 нМ, менее около 30 нМ, менее около 20 нМ, менее около 10 нМ, менее около 5 нМ, менее около 4 нМ, менее около 3 нМ, менее около 2 нМ, менее около 1 нМ или менее около 0,5 нМ, как измерено в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса. Однако выделенное антитело, которое специфически связывает PD-1 человека, может обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы PD-1 от других (отличных от человека) видов.

Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления настоящего изобретения антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), вариабельную область легкой цепи (LCVR) и/или определяющие комплементарность области (CDR), содержащие любую из аминокислотных последовательностей антител против PD-1, как изложено в публикации патента США № 20150203579. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое можно применять в контексте способов по настоящему изобретению, содержат определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три HCDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три LCDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В еще других вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую SEQ ID NO: 33, и LCVR, содержащую SEQ ID NO: 34. В определенных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают применение антитела против PD-1, при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42. Иллюстративное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, представляет собой полностью человеческое антитело против PD-1, известное как REGN2810 (также известное как цемиплимаб). Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления способы по настоящему изобретению включают применение REGN2810 или его биоэквивалента. Используемый в данном документе термин "биоэквивалент" относится к антителам против PD-1 или PD-1-связывающим белкам или их фрагментам, которые являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и/или степень абсорбции которых не демонстрируют значимой разницы с таковыми у REGN2810 при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, как в однократной дозе, так и многократных дозах. В контексте изобретения термин относится к антигенсвязывающим белкам, которые связываются с PD-1, которые не имеют клинически значимых различий с REGN2810 в их безопасности, чистоте и/или активности.

Другие антитела против PD-1, которые можно использовать в контексте способов по настоящему изобретению, включают, например, антитела, называемые и известные в данной области техники как ниволумаб (патент США № 8008449), пембролизумаб (патент США № 8354509), MEDI0608 (патент США № 8609089), пидилизумаб (патент США № 8686119) или любое из антител против PD-1, как изложено в патентах США. №№ 6808710, 7488802, 8168757, 8354509, 8779105 или 8900587.

Антитела против PD-1, используемые в контексте способов по настоящему изобретению, могут иметь зависимые от pH характеристики связывания. Например, антитело против PD-1 для применения в способах по настоящему изобретению может демонстрировать пониженное связывание с PD-1 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Альтернативно, антитело против PD-1 согласно изобретению может проявлять повышенное связывание со своим антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение "кислый pH" включает значения pH менее около 6,2, например, около 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 или менее. Используемое в контексте данного документа выражение "нейтральный pH" означает pH от около 7,0 до около 7,4. Выражение "нейтральный pH" включает значения pH около 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В определенных случаях "пониженное связывание с PD-1 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" выражается в виде соотношения значения  $K_D$  связывания антитела с PD-1 при кислом pH к значению  $K_D$  для связывания антител с PD-1 при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как демонстрирующее "пониженное связывание с PD-1 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" для целей настоящего изобретения, если

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет соотношение  $K_D$  при кислом pH к  $K_D$  при нейтральном pH составляет около 3,0 или более. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления соотношение  $K_D$  при кислом pH к  $K_D$  при нейтральном pH для антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может составлять около 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 или более.

Антитела с зависимыми от pH характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител на предмет пониженного (или усиленного) связывания с конкретным антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут давать антитела с зависимыми от pH характеристиками. Например, путем замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) на остаток гистидина можно получить антитело с пониженным связыванием антигена при кислом pH относительно нейтрального pH. Используемое в данном документе выражение "кислый pH" означает pH 6,0 или менее.

Биспецифические антитела против MUC16/CD3

Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления настоящего изобретения способы включают введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела, которое специфически связывает CD3 и MUC16. Такие антитела могут называться в данном документе, например, "анти-MUC16/анти-CD3", или "антитела против MUC16xCD3" или биспецифическими антителами "MUC16xCD3", или другой подобной терминологией.

В данном контексте выражение "биспецифическое антитело" относится к белку иммуноглобулина, содержащему по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. В контексте настоящего изобретения первый антигенсвязывающий домен специфически связывает первый антиген (например, MUC16), а второй антигенсвязывающий домен специфически связывает второй, другой антиген (например, CD3). Каждый антигенсвязывающий домен биспецифического антитела содержит переменный домен тяжелой цепи (HCVR) и переменный домен легкой цепи (LCVR), каждый из которых содержит три CDR. В контексте биспецифического антитела CDR первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом "A", а CDR второго антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом "B". Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут называться в данном документе A-HCDR1, A-HCDR2 и A-HCDR3; и CDR второго антигенсвязывающего домена могут называться в данном документе B-HCDR1, B-HCDR2 и B-HCDR3.

Каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена связан с отдельным мультимеризующим доменом. Используемый в данном документе термин "мультимеризующий домен" означает любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которая имеет способность связываться со вторым мультимеризующим доменом такой же или подобной структуры или строения. В контексте настоящего изобретения мультимеризующий компонент представляет собой Fc-часть иммуноглобулина (содержащую домен  $C_{H2}$ - $C_{H3}$ ), например, домен Fc IgG, выбранный из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в каждой группе изоформ.

Биспецифические антитела по настоящему изобретению, как правило, содержат два мультимеризующих домена, например, два домена Fc, каждый из которых по отдельности является частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризующие домены могут иметь один и тот же изотип IgG, такой как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Альтернативно, первый и второй мультимеризующие домены могут иметь разные изоформы IgG, такие как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т. д.

Для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению можно использовать любой формат или технологию биспецифических антител. Например, антитело или его фрагмент, имеющее первую антигенсвязывающую специфичность, может быть функционально связано (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными соединениями, такими как другое антитело или фрагмент антитела, имеющее вторую антигенсвязывающую специфичность для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы. Конкретные иллюстративные биспецифические форматы, которые могут быть применены в контексте настоящего изобретения, включают в себя, но не ограничиваясь ими, например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, гибридные белки IgG-scFv, Ig с двойным переменным доменом (DVD), квадрому, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступами-во-впадины и т.п.), CrossMab, CrossFab, антителоподобный белок, содержащий домен, сконструированный посредством замены цепей, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, IgG с Fab двойного действия (DAF) и биспецифические форматы Mab<sub>2</sub> (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и ссылки, цитируемые в них, для обзора вышеупомянутых форматов).

В контексте биспецифических антител по настоящему изобретению домены Fc могут содержать одну или более аминокислотных замен (например, вставки, делеции или замены) по сравнению с природной версией домена Fc дикого типа. Например, изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в домене Fc, которые приводят к моди-

фицированному домену Fc, имеющему модифицированное связывающее взаимодействие (например, усиленное или уменьшенное) между Fc и FcRn. В одном варианте осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C<sub>H2</sub> или C<sub>H3</sub>, при этом модификация увеличивает аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от около 5,5 до около 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc раскрыты в публикации патента США № 20150266966, включенной в данный документ в полном объеме.

Настоящее изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый домен C<sub>H3</sub> и второй домен C<sub>H3</sub> Ig, при этом первый и второй домены C<sub>H3</sub> Ig отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и при этом по меньшей мере одно отличие в аминокислотах снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом без отличия в аминокислотах. В одном варианте осуществления первый домен C<sub>H3</sub> Ig связывается с белком А, а второй домен C<sub>H3</sub> Ig содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание с белком А, такую как модификация H95R (нумерация экзонов согласно IMGT, H435R согласно нумерации EU). Второй C<sub>H3</sub> может дополнительно содержать модификацию Y96F (IMGT; Y436F по EU). См., например, патент США № 8586713. Другие модификации, которые могут быть найдены во втором C<sub>H3</sub>, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4.

В некоторых вариантах осуществления домен Fc может быть химерным, путем комбинирования последовательностей Fc, полученных из более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, химерный домен Fc может содержать часть или всю последовательность C<sub>H2</sub>, полученную из области C<sub>H2</sub> человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, и часть или всю последовательность C<sub>H3</sub>, полученную из человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Химерный домен Fc может также содержать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать последовательность "верхнего шарнира", полученную из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в комбинации с последовательностью "нижнего шарнира", полученной из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Конкретный пример химерного домена Fc, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, приведенных в данном документе, содержит от N- до C-конца: [C<sub>H1</sub> IgG4]-[верхний шарнир IgG4]-[нижний шарнир IgG2]-[C<sub>H2</sub> IgG4]-[C<sub>H3</sub> IgG4]. Другой пример химерного домена Fc, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, содержит от N- до C-конца: [C<sub>H1</sub> IgG1]-[верхний шарнир IgG1]-[нижний шарнир IgG2]-[C<sub>H2</sub> IgG4]-[C<sub>H3</sub> IgG1]. Эти и другие примеры химерных доменов Fc, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, описаны в публикации патента США № 20140243504, которая полностью включена в данный документ. Химерные домены Fc, имеющие эти общие структурные расположения, и их варианты могут иметь измененное связывание Fc-рецептора, что, в свою очередь, влияет на эффекторную функцию Fc.

Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело против MUC16/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменные области тяжелой цепи (A-HCVR и B-HCVR), переменные области легкой цепи (A-LCVR и B-LCVR), и/или определяющие комплементарность области (CDR), содержащие любую из аминокислотных последовательностей биспецифических антител против MUC16/CD3, как изложено в публикации патента США № 20180112001. В определенных иллюстративных вариантах осуществления биспецифическое антитело против MUC16/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые можно использовать в контексте способов по настоящему изобретению, содержит: (а) первое антигенсвязывающее плечо, содержащее определяющие комплементарность области тяжелой цепи (A-HCDR1, A-HCDR2 и A-HCDR3) переменной области тяжелой цепи (A-HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и определяющие комплементарность области легкой цепи (A-LCDR1, A-LCDR2 и A-LCDR3) переменной области легкой цепи (A-LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и (b) второе антигенсвязывающее плечо, содержащее CDR тяжелой цепи (B-HCDR1, B-HCDR2 и B-HCDR3) HCVR (B-HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6 или SEQ ID NO 7, и CDR легкой цепи (B-LCDR1, B-LCDR2 и B-LCDR3) LCVR (B-LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 2. Согласно некоторым вариантам осуществления A-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 8; A-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 9; A-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 10; A-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 11; A-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 12; A-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 13; B-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 26; B-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 27; и B-HCDR3 содержит аминокислот-

ную последовательность SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 28; и B-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; B-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 12; B-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO 13. В других вариантах реализации биспецифическое антитело против MUC16/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) первое антигенсвязывающее плечо, содержащее HCVR (A-HCVR), содержащую SEQ ID NO 1, и LCVR (A-LCVR), содержащую SEQ ID NO: 2; и (b) второе антигенсвязывающее плечо, содержащее HCVR (B-HCVR), содержащую SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7, и LCVR (B-LCVR), содержащую SEQ ID NO: 2. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления биспецифическое антитело против CD3xMUC16 содержит MUC16-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 29, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 30, и CD3-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 31, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 30. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления биспецифическое антитело против CD3xMUC16 содержит MUC16-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 29, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 30, и CD3-связывающее плечо, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 32, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления противоопухолевой активности биспецифических антител против CD3xMUC16 по настоящему изобретению существенно не препятствует присутствие высоких уровней (например, до 10000 Ед/мл) циркулирующего CA125. Уровни CA125 в сыворотке повышены у большинства пациентов с раком яичников (опубликованные медианные уровни составляют около 656 Ед/мл). Как показано в Примере 2 ниже, высокие уровни CA125 в сыворотке или при асците не будут существенно влиять на противоопухолевый профиль биспецифических антител по настоящему изобретению.

Другие биспецифические антитела против MUC16/CD3, которые можно использовать в контексте способов по настоящему изобретению, включают, например, любые из антител, изложенных в публикации патента США № 20180112001.

#### Варианты комбинированной терапии

Способы по настоящему изобретению, согласно определенным вариантам осуществления, включают введение субъекту биспецифического антитела против MUC16/ CD3 в комбинации с антителом против PD-1. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение антител с дополнительной или синергической активностью для лечения злокачественного новообразования, предпочтительно рака яичников. Используемое в данном документе выражение "в комбинации с" означает, что биспецифическое антитело против MUC16/CD3 вводят до, после или одновременно с антителом против PD-1. Термин "в комбинации с" также включает последовательное или одновременное введение антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3. Например, при введении "до" биспецифического антитела против MUC16/CD3, антитело против PD-1 можно вводить за более чем 150 часов, за около 150 часов, около 100 часов, около 72 часа, около 60 часов, около 48 часов, около 36 часов, около 24 часов, около 12 часов, около 10 часов, около 8 часов, около 6 часов, около 4 часа, около 2 часа, около 1 час, около 30 минут, около 15 минут или за около 10 минут до введения биспецифического антитела против MUC16/CD3. При введении "после" биспецифического антитела против MUC16/CD3, антитело против PD-1 можно вводить через около 10 минут, около 15 минут, около 30 минут, около 1 час, около 2 часа, около 4 часа, около 6 часов, около 8 часов, около 10 часов, около 12 часов, около 24 часов, около 36 часов, около 48 часов, около 60 часов, около 72 часа или через более чем 72 часа после введения биспецифического антитела против MUC16/CD3. Введение "одновременно" с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 антителом означает, что антитело против PD-1 вводят субъекту в отдельной дозированной форме менее чем за 5 минут (до, после или одновременно) введения биспецифического антитела против MUC16/-CD3, или вводят субъекту в виде единичной комбинированной дозированной лекарственной формы, содержащей как антитело против PD-1, так и биспецифическое антитело против MUC16/CD3.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение третьего терапевтического агента, при этом третий терапевтический агент представляет собой противораковое лекарственное средство. Используемый в данном документе термин "противораковое лекарственное средство" означает любой агент, применимый для лечения злокачественного новообразования, включая, помимо прочего, цитотоксины и агент, такие как антимиетоболиты, алкилирующие средства, антрациклины, антибиотики, антимиетотические средства, прокарбазин, гидроксимочевину, аспарагиназу, кортикостероиды, митотан (О, Р<sup>1</sup>-(DDD)), биологические препараты (например, антитела и интерфероны) и радиоактивные агенты. Используемый в данном документе термин "цитотоксин или цитотоксический агент" также относится к химиотерапевтическому агенту и означает любой агент, который вреден для клеток. Примеры включают Таксол® (паклитаксел), темозоломид, цитохалазин В, грамицидин D, бромид

этидия, эметин, цисплатин, митомин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацинон, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пурамицин и их аналоги или гомологи.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение третьего терапевтического агента, выбранного из группы, состоящей из лучевой терапии, хирургического вмешательства, противораковой вакцины, ингибитора PD-L1 (например, антитела против PD-L1), ингибитора LAG-3, ингибитора CTLA-4 (например, ипилимумаба), ингибитора TIM3, ингибитора BTLA, ингибитора TIGIT, ингибитора CD47, антагониста другого коингибитора T-клеток или лиганда (например, антитела к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) [например, "ловушки ФРЭС", такой как афлиберцепт или другого слитого белка, ингибирующего ФРЭС, как указано в патенте США № 7087411, или антитела против ФРЭС, или его антигенсвязывающего фрагмента (например, бевацизумаба или ранибизумаба), или низкомолекулярного ингибитора киназы рецептора ФРЭС (например, сунитиниба, сорафениба или пазопаниба)], ингибитора Ang2 (например, несвакумаба), ингибитора трансформирующего фактора роста бета (ТФР-β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР) (например, эрлотиниба, цетуксимаба), агониста костимулирующего рецептора (например, агониста глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственный белок), антитела к опухолеспецифическому антигену (например, CA9, CA125, ассоциированному с меланомой антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухоль M2-ПК, простатоспецифическому антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9), вакцины (например, бациллы Кальмета-Герена, противораковой вакцины), адьюванта для увеличения презентации антигена (например, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора), цитотоксина, химиотерапевтического средства (например, дакарбазина, темозоломида, циклофосамида, доцетаксела, доксорубина, даунорубина, цисплатина, карбоплатина, гемцитабина, метотрексата, митоксантрона, оксалиплатина, паклитаксела и винкристина), лучевой терапии, ингибитора ИЛ-6R (например, сарилумаба), ингибитора ИЛ-4R (например, дупилумаба), ингибитора ИЛ-10, цитокина, такого как ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-21 и ИЛ-15, конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) (например, ADC против CD19-DM4 и ADC против DS6-DM4), T-клеток с химерным антигенным рецептором (например, T-клетки, нацеленные на CD19), противовоспалительного лекарственного средства (например, кортикостероидов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств) и пищевой добавки, такой как антиоксиданты.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3 в комбинации с лучевой терапией для получения долгосрочных устойчивых противоопухолевых ответов и/или увеличения выживаемости пациентов со злокачественным новообразованием.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают применение лучевой терапии до, одновременно или после введения антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3 пациентам со злокачественным новообразованием. Например, лучевая терапия может применяться в одной или более дозах к опухолевым поражениям после введения одной или более доз антител. В некоторых вариантах осуществления лучевая терапия может применяться локально к опухолевому поражению для усиления местной иммуногенности опухоли пациента (вспомогательное ионизирующее излучение) и/или для уничтожения опухолевых клеток (разрушающее ионизирующее излучение) после системного введения антитела против PD-1 и/или биспецифического антитела против MUC16/CD3. В некоторых вариантах осуществления антитела можно применять в комбинации с лучевой терапией и химиотерапевтическим агентом (например, карбоплатином и/или паклитакселом) или антагонистом ФРЭС (например, афлиберцептом).

#### Фармацевтические композиции и введение

Настоящее изобретение включает способы, которые включают введение антитела против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 субъекту, при этом антитела содержатся в отдельной или комбинированной (единой) фармацевтической композиции. Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть составлены с подходящими носителями, эксципиентами и другими агентами, которые обеспечивают подходящий перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Известны различные системы доставки, и их можно использовать для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например, инкапсуляцию в липосомы, микрочастицы, микро-

капсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Способы введения включают в себя, но не ограничиваясь ими, внутрикожные, внутримышечные, интраперитонеальные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути введения. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные покровы (например, слизистой оболочки полости рта, слизистой оболочки прямой кишки и кишечника и т. д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в случае подкожной доставки шприц-ручка легко находит применения при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такая шприц-ручка может быть многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприце-ручке для доставки, как правило, используется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция из картриджа введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручку для доставки можно использовать повторно. В одноразовой шприце-ручке для доставки сменный картридж отсутствует. Предпочтительно одноразовая шприц-ручка поставляется заполненной фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Непосредственно после того, как резервуар освобождают от фармацевтической композиции, устройство выбрасывают целиком.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе контролируемого высвобождения. В одном варианте осуществления изобретения может быть использован насос. В другом варианте осуществления изобретения, могут быть использованы полимерные материалы; см. *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Fla. В еще одном варианте осуществления изобретения, система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, что требует только доли системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533.

Препараты для инъекций могут включать в себя дозированные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.п. Эти препараты для инъекций могут быть получены известными способами. Например, препараты для инъекций могут быть приготовлены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антигена или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций имеются, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т. д. Которые могут использоваться в сочетании с подходящим солюбилизирующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, НСО-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т. д. В качестве масляной среды используются, например, кунжутное масло, соевое масло и т. д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизирующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т. д. Инъекцию, полученную таким образом, предпочтительно заполняют в соответствующую ампулу.

Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде дозированных форм в стандартной дозе, подходящей для дозы активного ингредиента. Такие дозированные формы в разовой дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т. д.

#### Схемы введения

Настоящее изобретение включает способы, включающие введение субъекту антигена против PD-1 с частотой введения доз примерно четыре раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в пять недель, один раз в шесть недель, один раз в восемь недель, один раз в двенадцать недель или реже, пока не достигается терапевтический ответ. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение включает способы, включающие введение субъекту биспецифического антигена против MUC16/CD3 с частотой введения доз примерно четыре раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз каждые три недели, один раз в четыре недели, один раз в пять недель, один раз в шесть недель, один раз в восемь недель, один раз в двенадцать недель или реже, пока не достигается терапевтический ответ. В определенных вариантах осуществления способы включают введение антигена против PD-1 в комбинации с биспецифическим антигеном против MUC16/CD3 с частотой введения доз примерно четыре раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в пять недель, один раз в шесть недель, один раз в восемь недель, один раз в девять недель, один раз в двенадцать недель или реже, пока не достигается терапевтический ответ.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения многократные дозы антитела против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту одной или более доз антитела против PD-1 в комбинации с одной или более дозами биспецифического антитела против MUC16/CD3. Используемый в данном документе термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела вводят субъекту в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные заранее заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антитела против PD-1 с последующим введением одной или более вторичных доз антитела против PD-1 и, необязательно, с последующим введением одной или более третичных доз антитела против PD-1. В определенных вариантах осуществления способы дополнительно включают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы биспецифического антитела против MUC16/CD3 с последующей одной или более вторичными дозами биспецифического антитела и, необязательно, с последующим введением одной или более третичных доз биспецифического антитела.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения субъекту можно вводить несколько доз антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3 в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту многократных доз антитела против PD-1 и биспецифического антитела против MUC16/CD3. Используемый в данном документе термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом вводят субъекту в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные заранее заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы).

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемой "базовой дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество антитела (антитела против PD-1 или биспецифического антитела). Однако в некоторых вариантах осуществления количество, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, регулируется в большую или меньшую сторону) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления одну или более (например, 1, 2, 3, 4 или 5) дозы вводятся в начале схемы лечения в виде "нагрузочных доз", за которыми следуют последующие дозы, которые вводятся реже (например, "поддерживающие дозы"). Например, антитело против PD-1 можно вводить пациенту с раком яичников в нагрузочной дозе около 1-3 мг/кг с последующим введением одной или более поддерживающих доз от около 0,1 до около 20 мг/кг массы тела пациента.

В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят от 1/2 до 14 (например, 1/2, 1, 11/2, 2, 21/2, 3, 31/2, 4, 41/2, 5, 51/2, 6, 61/2, 7, 71/2, 8, 81/2, 9, 91/2, 10, 101/2, 11, 111/2, 12, 121/2, 13, 131/2, 14, 141/2, или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Используемая в данном документе фраза "непосредственно предшествующая доза" означает, в последовательности многократных введений, дозу антитела против PD-1 (и/или биспецифического антитела против MUC16/CD3), которое вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы согласно этому аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антитела против PD-1 (и/или биспецифического антитела против MUC16/CD3). Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациент вводит две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах осуществления, включающих множественные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели после непосредственно предыдущей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих множественные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может изменяться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

В некоторых вариантах осуществления одна или более доз антитела против PD-1 и/или биспецифического антитела против MUC16/CD3 вводят в начале схемы лечения в виде "индукционных доз" более часто (дважды в неделю, один раз в неделю или один раз в 2 недели) с последующими дозами ("консоли-

дирующими дозами" или "поддерживающими дозами"), которые вводятся реже (например, один раз в 4-12 недель).

Настоящее изобретение включает способы, включающие последовательное введение антитела против PD-1 в комбинации с биспецифическим антителом против MUC16/CD3 пациенту для лечения рака яичников (например, серозного рака). В некоторых вариантах осуществления данные способы включают введение одной или более доз антитела против PD-1 с последующим введением одной или более доз биспецифического антитела против MUC16/CD3. В определенных вариантах осуществления данные способы включают введение однократной дозы антитела против PD-1 с последующим введением одной или более доз биспецифического антитела против MUC16/CD3. В некоторых вариантах осуществления можно вводить одну или более доз от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг антитела против PD-1 с последующим введением одной или более доз от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг биспецифического антитела для ингибирования роста опухоли и/или предотвращения рецидива опухоли у субъекта с раком яичников. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 вводят в одной или более дозах с последующими одной или более дозами биспецифического антитела, что приводит к повышенной противоопухолевой эффективности (например, большему ингибированию роста опухоли, усилению предотвращения рецидива опухоли, поскольку по сравнению с неполучавшим лечение субъектом или субъектом, которому вводили одно из антител в качестве монотерапии). Альтернативные варианты осуществления изобретения относятся к одновременному введению антитела против PD-1 и биспецифического антитела, которое вводят в отдельной дозе с одинаковой или другой частотой по сравнению с антителом против PD-1. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело вводят до, после или одновременно с антителом против PD-1. В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело вводят в виде единичной лекарственной формы с антителом против PD-1.

#### Дозировка

Количество антитела против PD-1 и/или биспецифического антитела против MUC16/CD3, вводимого субъекту в соответствии со способами по настоящему изобретению, как правило, является терапевтически эффективным количеством. В данном контексте фраза "терапевтически эффективное количество" означает количество антитела (антитело против PD-1 или биспецифическое антитело против MUC16/CD3), которое приводит к одному или более из следующего: (a) снижение тяжести или продолжительности симптома злокачественного новообразования (например, рака яичников); (b) ингибирование роста опухоли или увеличение некроза опухоли, уменьшение опухоли и/или исчезновение опухоли; (c) задержка роста и развития опухоли; (d) ингибирование, замедление или остановка метастазирования опухоли; (e) предотвращение рецидива роста опухоли; (f) увеличение выживаемости субъекта со злокачественным новообразованием (например, раком яичников); и/или (g) уменьшение применения или потребности в традиционной противораковой терапии (например, уменьшение или исключение применения химиотерапевтических или цитотоксических агентов) по сравнению с неполучавшим лечение субъектом или субъектом, которому вводят одно из двух антител в качестве монотерапии.

В случае антитела против PD-1 терапевтически эффективное количество может составлять от около 0,05 мг до около 600 мг, например, около 0,05 мг, около 0,1 мг, около 1,0 мг, около 1,5 мг, около 2,0 мг, около 10 мг, около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 90 мг, около 100 мг, около 110 мг, около 120 мг, около 130 мг, около 140 мг, около 150 мг, около 160 мг, около 170 мг, около 180 мг, около 190 мг, около 200 мг, около 210 мг, около 220 мг, около 230 мг, около 240 мг, около 250 мг, около 260 мг, около 270 мг, около 280 мг, около 290 мг, около 300 мг, около 310 мг, около 320 мг, около 330 мг, около 340 мг, около 350 мг, около 360 мг, около 370 мг, около 380 мг, около 390 мг, около 400 мг, около 410 мг, около 420 мг, около 430 мг, около 440 мг, около 450 мг, около 460 мг, около 470 мг, около 480 мг, около 490 мг, около 500 мг, около 510 мг, около 520 мг, около 530 мг, около 540 мг, около 550 мг, около 560 мг, около 570 мг, около 580 мг, около 590 мг или около 600 мг антитела против PD-1. В некоторых вариантах осуществления вводят 250 мг антитела против PD-1.

В случае биспецифического антитела против MUC16/CD3 терапевтически эффективное количество может составлять от около 10 мкг (мкг) до около 8000 мкг, например, около 10 мкг, около 20 мкг, около 50 мкг, около 70 мкг, около 100 мкг, около 120 мкг, около 150 мкг, около 200 мкг, около 250 мкг, около 300 мкг, около 350 мкг, около 400 мкг, около 450 мкг, около 500 мкг, около 550 мкг, около 600 мкг, около 700 мкг, около 800 мкг, около 900 мкг, около 1000 мкг, около 1050 мкг, около 1100 мкг, около 1500 мкг, около 1700 мкг, около 2000 мкг, около 2050 мкг, около 2100 мкг, около 2200 мкг, около 2500 мкг, около 2700 мкг, около 2800 мкг, около 2900 мкг, около 3000 мкг, около 4000 мкг, около 5000 мкг, около 6000 мкг, около 7000 мкг или около 8000 мкг биспецифического антитела против MUC16/CD3.

Количество или антитела против PD-1, или биспецифического антитела против MUC16/CD3, содержащегося в отдельных дозах, может быть выражено в миллиграммах антитела на килограмм массы тела субъекта (т.е. мг/кг). В некоторых вариантах осуществления или антитело против PD-1, или биспецифическое антитело против MUC16/CD3, используемое в способах по настоящему изобретению, можно вводить субъекту в дозе от около 0,0001 до около 100 мг/кг массы тела субъекта. Например, антитело против PD-1 можно вводить в дозе от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг массы тела пациента. Биспецифическое антитело против MUC16/CD3 антитело можно вводить в дозе от около 0,1 мг/кг до около 20

мг/кг массы тела пациента.

Сводка последовательностей и соответствующих SEQ ID NO, упомянутых в данном документе, показана в табл. 1 ниже.

Таблица 1  
Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO:	Описание
1	Вариабельная область тяжелой цепи анти-MUC16
2	Вариабельная область легкой цепи анти-MUC16 и анти-CD3
3	Вариабельная область тяжелой цепи анти-CD3-G
4	Вариабельная область тяжелой цепи анти-CD3-G5
5	Вариабельная область тяжелой цепи анти-CD3-G9
6	Вариабельная область тяжелой цепи анти-CD3-G10
7	Вариабельная область тяжелой цепи анти-CD3-G20
8	HCDR1 анти-MUC16
9	HCDR2 анти-MUC16
10	HCDR3 анти-MUC16
11	LCDR1 анти-MUC16 и анти-CD3
12	LCDR2 анти-MUC16 и анти-CD3
13	LCDR3 анти-MUC16 и анти-CD3
14	HCDR1 анти-CD3-G
15	HCDR2 анти-CD3-G
16	HCDR3 анти-CD3-G
17	HCDR1 анти-CD3-G5
18	HCDR2 анти-CD3-G5
19	HCDR3 анти-CD3-G5
20	HCDR1 анти-CD3-G9
21	HCDR2 анти-CD3-G9
22	HCDR3 анти-CD3-G9
23	HCDR1 анти-CD3-G10
24	HCDR2 анти-CD3-G10
25	HCDR3 анти-CD3-G10
26	HCDR1 анти-CD3-G20
27	HCDR2 анти-CD3-G20
28	HCDR3 анти-CD3-G20
29	Тяжелая цепь анти-MUC16
30	Легкая цепь анти-MUC16 и анти-CD3
31	Тяжелая цепь анти-CD3-G
32	Тяжелая цепь анти-CD3-G20
33	Вариабельная область тяжелой цепи анти-PD-1
34	Вариабельная область легкой цепи анти-PD-1
35	HCDR1 анти-PD-1
36	HCDR2 анти-PD-1
37	HCDR3 анти-PD-1
38	LCDR1 анти-PD-1
39	LCDR2 анти-PD-1
40	LCDR3 анти-PD-1
41	Тяжелая цепь анти-PD-1
42	Легкая цепь анти-PD-1

### Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как разрабатывать и применять способы и композиции по изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, и давление находится на уровне или около атмосферного.

Пример 1. Получение биспецифических антител, которые связывают специфические для клеток яичников (MUC16) и CD3

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые связывают CD3 и MUC16; такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы также упоминаются в данном документе как "биспецифические молекулы против MUC16/CD3 или против MUC16xCD3". Анти-MUC16 часть биспецифической молекулы против MUC16/CD3 полезна для нацеливания на опухолевые клетки, которые экспрессируют MUC16 (также известный как CA-125), а анти-CD3 часть биспецифической молекулы полезна для активации Т-клетки. Одновременное связывание MUC16 с опухолевой клеткой и CD3 с Т-клеткой способствует направленному уничтожению (клеточному лизису) опухолевой клетки-мишени активированной Т-клеткой.

Биспецифические антитела, содержащие анти-MUC16-специфический связывающий домен и анти-CD3-специфический связывающий домен, были сконструированы с использованием стандартных методологий, в которых антигенсвязывающий домен анти-MUC16 и антигенсвязывающий домен анти-CD3 каждый содержат разные, отдельные HCVR в паре с общей LCVR. В приведенных в качестве примеров биспецифических антител молекулы были сконструированы с использованием тяжелой цепи из антитела против CD3, тяжелой цепи из антитела против MUC16 и общей легкой цепи из антитела против MUC16. В других случаях биспецифические антитела могут быть сконструированы с использованием тяжелой цепи из антитела против CD3, тяжелой цепи из антитела против MUC16 и легкой цепи из антитела против CD3 или легкой цепи антитела, о которой известно, что она неизбирательно или эффективно соединяется с множеством плеч тяжелой цепи.

Примеры биспецифических антител были произведены с доменом Fc IgG1 (BSMUC16/CD3-001, -002, -003 и -004) или модифицированный (химерный) домен Fc IgG4 (BSMUC16/CD3-005) как указано в публикации заявки на патент США № US20140243504A1, опубликованной 28 августа 2014 г.

Краткое описание составных частей антигенсвязывающих доменов различных сконструированных биспецифических антител против MUC16xCD3 представлено в табл. 2.

Таблица 2

Краткое описание составных частей биспецифических антител против MUC16xCD3

Идентификатор биспецифических антител	Анти-MUC16	Анти-CD3	Общая вариабельная область легкой цепи
	антигенсвязывающий домен	антигенсвязывающий домен	
	<i>Вариабельная область тяжелой цепи</i>	<i>Вариабельная область тяжелой цепи</i>	
BSMUC16/CD3-001	(SEQ ID NO:1)	CD3-VH-G (SEQ ID NO:3)	(SEQ ID NO:2)
BSMUC16/CD3-002	(SEQ ID NO:1)	CD3-VH-G5 (SEQ ID NO:4)	(SEQ ID NO:2)
BSMUC16/CD3-003	(SEQ ID NO:1)	CD3-VH-G9 (SEQ ID NO:5)	(SEQ ID NO:2)
BSMUC16/CD3-004	(SEQ ID NO:1)	CD3-VH-G10 (SEQ ID NO:6)	(SEQ ID NO:2)
BSMUC16/CD3-005	(SEQ ID NO:1)	CD3-VH-G20 (SEQ ID NO:7)	(SEQ ID NO:2)

Пример 2. CA-125 не влияет на активность антител против MUC16xCD3 in vitro

Влияние растворимого CA-125 (слушывающаяся форма MUC16) на активность BSMUC16/CD3-001 оценивали с использованием анализа связывания методом FACS и анализа цитотоксичности в присутствии высоких уровней CA-125, очищенного от асцитической жидкости у пациентов с раком яичников.

Уровни CA-125 повышены в сыворотке большинства пациентов с раком яичников, а циркулирующие уровни могут влиять на любую терапию, нацеленную на MUC16, в виде антиген-зависимого клиренса. Уровни CA-125, используемые в анализе (10 000 Ед/мл), значительно превышают опубликованные медицинские уровни 656,6 Ед/мл у пациентов с раком яичников. Способность BSMUC16/CD3-001 уничтожать клетки OVCAR-3, экспрессирующие MUC16, в присутствии растворимого CA-125, обогащенного из асцитической жидкости человека (Creative Biomart, Нью-Йорк, США), или с помощью мембранно-проксимального конструкта, экспрессирующего пять С-концевых SEA-доменов и околосмембранную область MUC16 (MUC16Δ), определяли при соотношении эффектор/мишень 4: 1 с фиксированной концентрацией BSMUC16/CD3-001 или CD3-связывающего контрольного антитела (100 мкМ) и серийным разведением или MUC16-1Н или MUC16Δ в течение 72 часов при 37°C. Для отслеживания специфического уничтожения клеток-мишеней, несущих MUC16, клетки OVCAR-3 метили 1 мкМ Violet Cell Tracker. После мечения клетки инкубировали в течение ночи при 37°C. Отдельно человеческие МКПК помещали в среду с добавлением RPMI в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C для обогащения лимфоцитами за счет истощения адгезивных клеток. На следующий день клетки-мишени совместно инкубировали с наивными МКПК при истощенных адгезивных клетках (соотношение эффекторные клетки/целевые клетки 4:1) и серийным разведением или BSMUC16/CD3-001, либо CD3-связывающего контроля в течение 72 часов при 37°C. Клетки удаляли из планшетов для культивирования клеток с использованием трипсина и анализировали с помощью FACS. Для анализа методом FACS клетки окрашивали Live/Dead Far Red Cell Tracker (Invitrogen). Для оценки специфичности уничтожения клетки гейтировали по популяциям, меченным CellTracker Violet. Процент живых клеток-мишеней был указан для расчета скорректированной выживаемости следующим образом: скорректированная выживаемость =  $(R1/R2) \times 100$ , где R1 = % живых клеток-мишеней в присутствии антитела, а R2 = % живых клеток-мишеней в отсутствие исследуемого антитела. Активацию Т-клеток оценивали путем инкубации клеток с непосредственно конъюгированными антителами к CD2, CD69 и CD25 и путем регистрации процента активированных (CD69+) Т-клеток или (CD25+) Т-клеток от общего количества Т-клеток (CD2+).

Связывание BSMUC16/CD3-001 и антитела, о котором известно, что оно связывает CA-125 (клон 3A5) с CA125, полученным из асцитической жидкости человека, измеряли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Вкратце, растворимый CA-125 (Creative Biomart, Нью-Йорк, США) в концентрации 4000 ед/мл в PBS пассивно адсорбируется на 96-луночные планшеты для микротитрования в течение ночи при 4°C. Затем планшеты промывали PBST и блокировали 0,5% BSA в PBS в течение 1 часа. Биотинилированное BSMUC16/CD3-001, исходное антитело к MUC16, анти-MUC16 3A5 и несвязывающие контроли (изотипический контроль BSMUC16/CD3-001 и изотипический контроль 3A5 анти-MUC16) добавляли в планшет в концентрациях 10, 1, 0,3, или 0,1 нМ в 0,5% BSA в PBS в течение 1 часа с последующей промывкой PBST. Стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (SA-HRP) (ThermoFisher Scientific, г. Уолтем, штат Массачусетс, США) в разведении 1: 10000 маточного раствора 1,0 мг/мл, добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 часа для обнаружения биотинилированных антител, связанных с планшетом. Планшет промывали и проявляли субстратом 3-3', 5-5'-тетраметилбензидин (BD Biosciences, г. Франклин-Лейке, штат Нью-Джерси, США) в соответствии с инструкциями производителя. Поглощение при 450 нм регистрировали для каждой лунки на планшет-ридере VICTOR Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer; г. Мелвилл, штат Нью-Йорк). Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Избыток CA-125 оказывал минимальное влияние на связывание BSMUC16/CD3-001 с клетками OVCAR-3, что указывает на минимальное связывание с CA-125 (Фиг. 1). Напротив, CA-125 сильно ингибировал способность антитела для сравнения, которое, вероятно, связывается с повторяющейся областью MUC16 (версия клона антитела 3A собственной разработки) (Фиг. 1). В дальнейшем растворимый конструкт MUC16, содержащий мембранно-проксимальную область до 5-го SEA-домена MUC16 (MUC16Δ), резко ингибировала связывание BSMUC16/CD3-001, демонстрируя, что BSMUC16/CD3-001 связывает мембранно-проксимальную область, как обсуждается более подробно в WO 2018/067331, который включен в данный документ посредством ссылки. В соответствии с исследованиями связывания, BSMUC16/CD3-001 также может индуцировать опосредованное Т-клетками уничтожение в присутствии CA-125, но не в присутствии высокой концентрации MUC16Δ (данные не показаны). Таким образом, BSMUC16/CD3-001 может связываться с MUC16 и индуцировать перенаправленное Т-клеточное уничтожение даже в присутствии высоких концентраций CA-125.

Пример 3. Блокада PD-1 усиливает противоопухолевую активность биспецифических антител против MUC16xCD3 в ксеногенных и сингенных моделях опухолей

Эффективность *in vivo* биспецифического антитела против MUC16/CD3 в комбинации с блокадой PD-1 оценивали на ксеногенных и сингенных моделях опухолей.

А. Ксеногенная модель - OVCAR-3/Luc

Для ксеногенной модели иммунодефицитным мышам NSG внутрибрюшинно (в/б) инъецировали клетки OVCAR-3/Luc, предварительно пассируемые *in vivo* (0-й день), через тринадцать дней после при-

вивания человеческих МКПК. Мышам в/б вводили 12,5 мкг/мышь BSMUC16/CD3-001 или вводили 12,5 мкг CD3-связывающего контроля отдельно или в комбинации с 100 мкг REGN2810 на 5-й и 8-й день. Опухолевую нагрузку оценивали с помощью BLI на 4-й, 8-й, 12-й, 15-й, 20-й и 25-й дни после имплантации опухоли. Как было определено измерениями BLI на 25-й день, лечение 12,5 мкг BSMUC16/CD3-001 приводило к значительной противоопухолевой эффективности, как было определено измерениями ВЛ, а комбинирование с REGN2810 (анти-PD-1) дополнительно усиливало противоопухолевую эффективность. Все группы имели одинаковую опухолевую нагрузку по оценке BLI до начала введения доз. Не было значительных различий в опухолевой нагрузке между группами.

BSMUC16/CD3-001 значительно снижает опухолевую нагрузку при 12,5 мкг, а добавление анти-PD-1 усиливает противоопухолевую эффективность по сравнению с BSMUC16/CD3-001 в монотерапии. Мышам NSG, которым прививали человеческие Т-клетки, имплантировали человеческие клетки OVCAR-3/Лус. На 5-й и 8-й дни мышей лечили 12,5 мкг BSMUC16/CD3-001 вводили внутривенно или лечили CD3-связывающим контролем или несвязывающим контролем (12,5 мкг внутривенно). Данные, представленные в табл. 3 ниже, представляют собой опухолевую нагрузку, оцененную с помощью BLI на 25-й день после имплантации опухоли. Статистическую значимость определяли с использованием непарных непараметрических t-критериев Манна-Уитни. Лечение с BSMUC16/CD3-001 +/- REGN2810 сравнивали с CD3-связывающим контролем (\*  $p < 0,05$  для BSMUC16/CD3-001, \*\*  $p < 0,01$  для BSMUC16/CD3-001 и REGN2810), а лечение BSMUC16/CD3-001 в монотерапии сравнивали с комбинацией с REGN2810 (#  $p < 0,05$ ).

Таблица 3  
Биолюминесценция на 25-й день после имплантации опухоли

Антитело (мкг)	Средняя интенсивность излучения [ф/с/см <sup>2</sup> /ср] через 25 дней после имплантации (медиана ± СОС)
CD3-связывающий контроль hIgG4P-PVA (12)	7.71e+06 ± 1.07e+06
BSMUC16/CD3-001 (12)	7.44e+03 ± 3.11e+03
CD3-связывающий контроль hIgG4P-PVA (12) + REGN2810 (100)	9.29e+06 ± 1.82e+06
BSMUC16/CD3-001 (12) + REGN2810 (100)	1.76e+03 ± 9.38e+01

#### В. Сингенная модель - ID8-VEGF/huMUC16

Для проверки эффективности на иммунокомпетентной модели ген CD3 мыши был заменен на CD3 человека, а часть гена MUC16 мыши была заменена последовательностью человека. Замены привели к получению мыши, Т-клетки которой экспрессируют CD3 человека и которая экспрессирует химерную молекулу MUC16, содержащую часть MUC16 человека, которые связываются биспецифическими антителами BSMUC16/CD3-001 и BSMUC16/CD3-005.

Для этой первой сингенной модели опухоли использовали клеточную линию ID8-VEGF, сконструированную для экспрессии части человеческого MUC16. Мышам внутрибрюшинно имплантировали клетки ID8-VEGF/huMUC16 и их лечили 5 мг/кг BSMUC16/CD3-001 или CD3-связывающего контроля с изотипическим контролем или в комбинации с анти-PD-1 (5 мг/кг в/в) через три дня после имплантации. Лечение BSMUC16/CD3-001 увеличивало среднюю выживаемость по сравнению с группой, которая получала CD3-связывающий контроль, но дополнительная блокада анти-PD-1 также приводила к 50% выживаемости мышей.

BSMUC16/CD3-001 значительно увеличивает медианное время выживания в модели асцита ID8-VEGF, а дополнительная блокада PD-1 (REGN2810) позволяет выжить нескольким мышам. Мышам, экспрессирующим CD3 человека вместо CD3 мыши и химерную молекулу MUC16, имплантировали линию опухоли яичников мыши, экспрессирующую часть MUC16 человека. Мышам вводили BSMUC16/CD3-001 (5 мг/кг в/в) или вводили CD3-связывающий контроль (5 мг/кг в/в) с изотипическим контролем или с анти-PD-1 на 3-й день после имплантации. Мыши получали лечение на 3-й, 7-й, 10-й, 14-й, 17-й дни после имплантации опухоли. Представленные данные представляют собой медианную выживаемость. Мышей умерщвляли, когда они прибавляли в весе более чем на 20% из-за вызванного асцитом вздутия живота. Статистическую значимость определяли с помощью критерия Кокса-Мантеля. Лечение BSMUC16/CD3-001 и BSMUC16/CD3-001+анти-PD-1 привело к увеличению медианного времени выживания, а комбинация BSMUC16/CD3-001+анти-PD-1 привела к 50% выживаемости, что демонстрирует синергетический эффект между биспецифическим антителом против MUC16xCD3 и антителом против PD-1. Результаты приведены в табл. 4 ниже.

Таблица 4  
Медианная выживаемость в модели ID8-VEGF/huMUC16

Антитело (мг/кг)	Медианная выживаемость (дни)
CD3-связывающий контроль (5) + изотипический контроль (5)	36
BSMUC16/CD3-001 (5) + изотипический контроль (5)	46
CD3-связывающий контроль (5) + PD-1 (5)	32
BSMUC16/CD3-001 (5) + PD-1 (5)	69,5

Подобные результаты наблюдали, когда BSMUC16/CD3-001 вводили в дозе 1 мг/кг в комбинации с антителом против PD-1.

#### С. Сингенная модель - MC38/huMUC16

Как обсуждалось выше, мыши, используемые в этом эксперименте, были модифицированы таким образом, что ген CD3 мыши был заменен на CD3 человека, а часть гена MUC16 мыши была заменена человеческой последовательностью. Замены привели к получению мыши, Т-клетки которой экспрессируют CD3 человека и которая экспрессирует химерную молекулу MUC16, содержащую часть MUC16 человека, которые связываются биспецифическими антителами BSMUC16/CD3-001 и BSMUC16/CD3-005.

Для этой второй сингенной модели опухоли использовали линию MC38, сконструированную для экспрессии части человеческого MUC16. Мышам подкожно имплантировали клетки MC38/huMUC16 и их лечили BSMUC16/CD3-005 или CD3-связывающим контролем с изотипическим контролем (1 мг/кг в/в) или в комбинации с анти-PD-1 (5 мг/кг в/в) на 7 день после имплантации опухоли. Антитело против PD-1, используемое в этом эксперименте, было коммерчески доступным мышинным антителом (клон RMP1-14, BioXCell). Комбинация BSMUC16/CD3-005 и анти-PD-1 продемонстрировала синергетический противоопухолевый эффект.

Комбинация BSMUC16/CD3-005 и блокада анти-PD-1 привела к лучшей противоопухолевой эффективности, чем BSMUC16/CD3-005 в монотерапии в подкожной модели MC38. Мышам, экспрессирующим CD3 человека вместо CD3 мыши и химерную молекулу MUC16, имплантировали мышиную линию опухоли MC38, экспрессирующую часть MUC16 человека. Мышам вводили BSMUC16/CD3-005 или вводили CD3-связывающий контроль (1 мг/кг в/в) с изотипическим контролем или с антителом против PD-1 (5 мг/кг в/в) на 7 день после имплантации. Мышей лечили на 7, 11 и 14 дни после имплантации опухоли. Результаты приведены на фиг. 2. Статистическую значимость определяли с помощью двустороннего дисперсионного анализа с поправкой Тьюки на множественные сравнения. BSMUC16/CD3-005 с анти-PD-1 значительно и синергетически ингибировали рост опухоли по сравнению с CD3-связывающим контролем.

Пример 4. Иммуно-ПЭТ визуализация у модифицированных мышей продемонстрировала локализацию биспецифического антитела против MUC16xCD3 в органах, богатых Т-клетками

Локализацию *in vivo* BSMUC16/CD3-001 и BSMUC16/CD3-005 и экспрессию белка MUC16 оценивали у мышей дикого типа и генетически гуманизированных мышей с применением ПЭТ-визуализации. Биораспределение меченого <sup>89</sup>Zr антитела против MUC16 (двухвалентного антитела против MUC16, полученного с использованием той же тяжелой и легкой цепи анти-MUC16, что и биспецифические антитела, называемых в данном документе "исходными") было сходным как у мышей дикого типа, так и у гуманизированных мышей, что указывает на низкую экспрессию гуманизированного белка MUC16 или его доступность для антитела. Напротив, когда мышам вводили терапевтически релевантные дозы меченого <sup>89</sup>Zr биспецифического антитела BSMUC16/CD3-001, распределение в селезенке и лимфатических узлах было очевидным из-за распознавания CD3-положительных Т-клеток в этих лимфоидных органах (данные не показаны). Анализ биораспределения *ex vivo* в отдельных тканях подтвердил локализацию в лимфатических узлах и селезенке (данные не показаны). Поглощение меченого <sup>89</sup>Z биспецифического антитела BSMUC16/CD3-005 в лимфоидных тканях было значительно снижено по сравнению с BSMUC16/CD3-001 из-за его более низкой аффинности к CD3. Чтобы оценить, могут ли BSMUC16/CD3-001 и BSMUC16/CD3-005 накапливаться в опухолях, экспрессирующих MUC16, мышам, несущим опухоли ID8-VEGF-huMUC16Δ, вводили меченое <sup>89</sup>Zr BSMUC16/CD3-001 и меченое <sup>89</sup>Zr BSMUC16/CD3-005. Поглощение опухолью для разных биспецифических антител существенно не различалось, несмотря на более высокое поглощение лимфоидными органами BSMUC16/CD3-001 (данные не показаны).

Приготовление иммуноконъюгата и ПЭТ мелких животных: BSMUC16/CD3-001 и контрольное антитело конъюгировали с DFO с остатками глутамина в положении 295 посредством трансамидирования при помощи микробной транслугтаминазы после дегликозилирования антител с ПНГазой F. Затем конъю-

югированные с DFO антитела хелатировали цирконием-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ). Мыши получали антитело в последней дозе 0,5 мг/кг через инъекцию в хвостовую вену. Затем была проведена ПЭТ-визуализация для оценки локализации радиоиммуноконъюгата *in vivo* на 6-й день после введения дозы до исследований биораспределения *ex vivo*. Для экспериментов в опухоли мышей, мышам имплантировали подкожно  $10 \times 10^6$  опухолевых клеток ID8-VEGF-huMUC16A. Мышам, несущим опухоль, вводили дозу радиоактивно меченного  $^{89}\text{Zr}$  антитела через 20 дней после имплантации, когда опухоли в среднем составляли 150 мм<sup>3</sup>.

Предварительно откалиброванный прибор для ПЭТ/КТ Sofie Biosciences G8 (Sofie Biosciences (г. Калвер-сити, штат Калифорния) и Perkin Elmer) использовали для получения изображений ПЭТ и КТ. Энергетическое окно находилось в диапазоне от 150 до 650 кэВ с восстановленным разрешением 1,4 мм в центре поля зрения. На 6-й день после введения дозы мышам подвергали индукции анестезии с использованием изофлурана и поддерживали в непрерывном потоке изофлурана в течение 10-минутного сбора данных ПЭТ в статистическом режиме. КТ-изображения были получены после сбора данных ПЭТ. ПЭТ-изображения были впоследствии реконструированы с использованием предварительно заданных настроек. Данные ПЭТ с поправкой на радиоактивный распад и данные КТ были обработаны с помощью программного обеспечения VivoQuant (inviCRO Imaging Services) в совместно зарегистрированные ложно окрашенные проекции максимальной интенсивности ПЭТ-КТ на цветовой шкале, откалиброванной для указания диапазона сигнала от 0 до 30% введенной дозы на объем, выраженной в % ВД/г. Для анализа биораспределения *ex vivo* мышам умерщвляли после визуализации на 6-й день после введения дозы. Кровь собирали посредством сердечной пункции в сцинтилляционные флаконы. Затем иссекали нормальные ткани (паховые и подмышечные лимфатические узлы, тимус, селезенку, сердце, легкие, желудок, тонкий кишечник, печень, почки, кости и яичники) и помещали в сцинтилляционные флаконы. Опухоли аналогичным образом собирали в сцинтилляционные флаконы. Все флаконы были предварительно взвешены, а затем повторно взвешены для определения массы крови и тканей. Радиоактивность  $\gamma$ -излучения для всех образцов затем подсчитывали на автоматическом гамма-счетчике (Wizard 2470, Perkin Elmer), и результаты записывали в виде числа импульсов в минуту (имп/мин). % ВД/г для каждого образца определяли с использованием подсчета образцов относительно количества стандартных доз, полученных из исходного вводимого материала. Впоследствии отдельные значения в % ВД/г получали путем деления значения в %ВД на соответствующую массу соответствующего образца крови, тканей или опухоли.

Меченные  $^{89}\text{Zr}$  BSMUC16/CD3-001 и меченные  $^{89}\text{Zr}$  BSMUC16/CD3-005 продемонстрировали специфическую локализацию в MUC16+ опухолях и CD3+ лимфоидных тканях, при этом распределение в лимфоидных тканях коррелировало с относительной аффинностью к CD3. Оба биспецифических антитела против MUC16xCD3 продемонстрировали эквивалентную локализацию опухоли в присутствии CD3+ тканей.

Пример 5. Токсикологические исследования на яванских макаках не выявили явной токсичности для биспецифических антител против MUC16xCD3

BSMUC16/CD3-001 перекрестно реагирует с MUC16 и CD3 обезьяны. Чтобы определить безопасность и переносимость, а также охарактеризовать фармакокинетику биспецифических антител, было проведено многодозовое исследование токсичности на яванских макаках. Шесть обезьян/пол/группа получали еженедельно BSMUC16/CD3-001 в общей сложности в пяти дозах по 0,01, 0,1 или 1 мг/кг. По завершении периода введения доз 3 животных/пол/группа умерщвляли и ткани исследовали на предмет изменений при помощи микроскопии, в то время как оставшихся трое животных/пол /группа прошли 12 недель выздоровления без лечения для оценки обратимости или устойчивости любых эффектов, связанных с BSMUC16/CD3-001. BSMUC16/CD3-001 хорошо переносился, и все животные дожили до запланированной некропсии. Токсикокинетический анализ продемонстрировал дозозависимое воздействие экспозиции и линейную кинетику в дозовых группах без каких-либо тендерных различий (данные не показаны). Непрерывное воздействие BSMUC16/CD3-001 наблюдали на протяжении фазы введения доз, а воздействие BSMUC16/CD3-001 сохранялось до конца фазы восстановления у всех (n=6) и 50% животных в группах 0,1 и 1,0 мг/кг, соответственно. BSMUC16/CD3-001 не было обнаружено в сыворотке ни у одного животного в группе 0,01 мг/кг после 8 недель восстановления. Период полувыведения BSMUC16/CD3-001 составил около 10 дней.

Не было никаких клинических наблюдений, связанных с BSMUC16/CD3-001, а также каких-либо изменений в параметрах анализа мочи, иммунофенотипировании периферической крови, потреблении пищи или массе тела во время периода введения доз или восстановления. Важно отметить, что введение BSMUC16/CD3-001 не привело к каким-либо изменениям в оценках фармакологической безопасности в отношении функции дыхательной, нервной или сердечно-CD3судистой системы, в том числе в параметрах ЭКГ. Не было обнаружено связанных с BSMUC16/CD3-001 изменений массы органа, а также не было обнаружено каких-либо макроскопических изменений ни при терминальном некропсии, ни при некропсии в период восстановления. Дозозависимое обратимое повышение циркулирующих воспалительных маркеров (С-реактивного белка (СРБ) и ИЛ-6) наблюдали в течение 1 дня после начальной дозы 1,0 или 0,1 мг/кг, но это повышение не было очевидным после последующих доз (данные не показаны). В

соответствии с минимальным увеличением сывороточных цитокинов перераспределение Т-клеток не было обнаружено после введения BSMUC16/CD3-001 (данные не показаны), в отличие от того, что было описано для нескольких биспецифических молекул к CD3 против гематологических опухолей.

Исследование на яванских макаках проводили в соответствии с рекомендациями IACUC. Яванским макакам (6 животных/пол/группа) вводили контрольный препарат (разбавленное плацебо) или BSMUC16/CD3-001 (0,01, 0,1 или 1 мг/кг) один раз в неделю посредством 30-минутной внутривенной инфузии. Контрольный препарат представлял собой 10 мМ гистидина с 10% сахарозы и 0,05% полисорбата 20, рН 6, разбавленного 0,9% натрий хлорида для инъекций, USP (стерильный физиологический раствор). Образцы крови или тканей собирали в различные моменты времени для выявления клинической патологии и гистопатологии. Концентрацию BSMUC16/CD3-001 определяли с помощью ИФА, а токсикокинетический анализ выполняли с использованием программного обеспечения WinNonLin. СРБ анализировали на системе Roche Modular P 800. Цитокины измеряли с помощью MSD (Meso Scale Diagnostics, г. Роквилл, штат Мэриленд). Количество Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии. Вкратце, кровь собирали в пробирки с калиевой ЭДТА, лизировали, окрашивали на CD3, CD4 и CD8 (BD Biosciences), и с помощью FACS Canto II для каждого фенотипа определяли относительные значения. Затем эти значения умножали на абсолютное количество лимфоцитов (с помощью гематологического анализа) для подсчета абсолютного количества клеток для каждого фенотипа.

Иммуногистохимическое окрашивание на MUC16 наблюдали в ожидаемых тканях: поджелудочной железе (мезотелий, эпителий протоков), сердце и яичниках (данные не показаны), а также слюнной железе (бокаловидные клетки), печени (мезотелий, желчный проток), легких (мезотелий, бронхиолярный/бронхиальный эпителий), тонком кишечнике (мезотелий), семенниках (мезотелий, сеть яичка/выносящий проток) и миндалинах (эпителий, слизистые железы) (не показаны). Связанные с BSMUC16/CD3-001 микроскопические изменения, оцениваемые при помощи гистологического окрашивания гематоксилином и эозином (H&E), включали воспаление (инфильтрацию лейкоцитов) и увеличение размера мезотелиальных клеток и насыщенности мезотелиальными клетками, что приводило к неблагоприятному утолщению серозной оболочки и/или субмезотелиальной соединительной ткани множества органов грудной полости и брюшины. Эти изменения, как правило, были очаговыми или многоочаговыми по своей природе и были минимальными или незначительными по степени тяжести и считались мишенью для BSMUC16/CD3-001, в результате вовлечения MUC16, экспрессируемой на серозных эпителиальных (мезотелиальных) клетках, и активации Т-клеток. Важно отметить, что серозные изменения были обращены вспять или имели тенденцию к возврату в исходное состояние в конце периода восстановления (данные не показаны).

Токсикологические исследования на яванских макаках показали минимальное и временное повышение сывороточных цитокинов и С-реактивного белка после введения BSMUC16/CD3-001 без явной токсичности.

Пример 6. Оценка индукции сывороточных цитокинов у мышей, несущих опухоль

Поскольку синдром высвобождения цитокинов (CRS) является частым серьезным побочным эффектом терапии с использованием биспецифических антител к CD3 и CAR-Т-клеток, было проведено исследование по мониторингу цитокинов сыворотки на соответствующих моделях после лечения BSMUC16/CD3-001. У генетически гуманизированных мышей MUC16/CD3 без опухолей не было очевидного ответа сывороточных цитокинов на введение BSMUC16/CD3-001.

Для оценки активации Т-клеток *in vivo* с помощью BSMUC16/CD3-001 измеряли уровни цитокинов в сыворотке мышей, несущих опухоль. Образцы сыворотки отбирали через 4 часа после первой дозы антитела в группах 0,5 мг/кг BSMUC16/CD3-001, CD3-связывающий контроль и несвязывающий контроль. Лечение активированными BSMUC16/CD3-001 Т-клетками, как определено индукцией ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10, по сравнению с несвязывающим контролем и CD3-связывающим контролем (данные не показаны). BSMUC16/CD3-001-индуцированный ответ цитокинов требовал присутствия как Т-клеток, так и клеток OVCAR-3/Luc, поскольку мыши, несущие только клетки OVCAR3/Luc, не имели детектируемого уровня человеческого ИФН- $\gamma$  в сыворотке, а мыши без опухолевых клеток, обеспечивающих MUC16 для перекрестного связывания, не продемонстрировали увеличения сывороточного ИФН- $\gamma$  в ответ на BSMUC16/CD3-001 (данные не показаны).

Измерение уровней цитокинов в сыворотке: активацию Т-клеток в ответ на лечение BSMUC16/CD3-001 оценивали путем измерения сывороточных концентраций интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкина-2 (ИЛ-2), ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12p70, ИЛ-13 и ИЛ-1 $\beta$  через четыре часа после первой дозы 0,5 мг/кг. Уровни цитокинов анализировали с использованием набора V-plex Human ProInflamsted-10 Plex в соответствии с инструкциями производителя (Meso Scale Diagnostics, г. Роквилл, штат Массачусетс). Цитокины измеряли в двух отдельных исследованиях с 4-6 мышами в группе.

Пример 7. Экспрессия MUC16 у гуманизированных мышей и влияние биспецифических антител против MUC16xCD3 на M11C16-положительные ткани

Чтобы исследовать противоопухолевую эффективность BSMUC16/CD3-001 у мышей с полностью

интактной иммунной системой, мышей генетически модифицировали для экспрессии человеческого CD3 на Т-клетках и области MUC16, покрывающей антигенсвязывающую область, оба в эндогенных мышечных локусах (мышцы с нокином). Для проверки этих мышей экспрессию MUC16 исследовали с помощью ОТ-ПЦР и ИГХ. Экспрессия РНК была обнаружена в трахее, а также на низких уровнях в легких, сердце, яичниках, поджелудочной железе и мочевом пузыре (данные не показаны), аналогично опубликованным данным по экспрессии MUC16 у мышей. Чтобы оценить экспрессию белка MUC16, ИГХ выполняли на выбранных тканях с использованием антитела против MUC16 человека, которое распознает мембранно-проксимальную область MUC16. Экспрессия белка MUC16 была подтверждена в поверхностном эпителии яичников и желудка у этих мышей. MUC16 также наблюдали в выстилке/эпителии трахеи, а также в железах в подслизистом слое, как было описано у людей (данные не показаны).

Гистология тканей мыши: Ткани от гуманизированных мышей или мышей ДТ собирали и окрашивали антителом против MUC16, связывающим мембранно-проксимальный домен MUC16, с помощью ИГХ, используя Ventana Discovery XT (Ventana; г. Тусон, штат Аризона). Парафиновые срезы размером 5 мкм нарезали на предметные стекла Superfrost PLUS и выпекали в течение часа при 60°C. Иммуногистохимическое окрашивание выполняли на системе автоматического окрашивания Discovery XT для ИГХ с использованием набора Ventana DAB Map detection. Депарафинизацию проводили с использованием раствора EZ Prep при 75°C в течение 8 минут. С использованием буфера Tris-EDTA pH 9 (CC1) от Ventana была выполнена мягкая демаскировка антигена (95°C, 8 минут, затем 100°C, 24 минуты). За этим последовало несколько стадий блокирования. Срезы тканей инкубировали с антителом против MUC16 (2 мкг/мл) в течение 8 часов при комнатной температуре. Изотипическое контрольное антитело, распознающее нерелевантное несвязывающее антитело использовали в качестве отрицательного контроля. Первичные антитела и отрицательный контроль наносили вручную. Биотинилированные козы антитела против человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch) использовали в качестве вторичных антител (1 мкг/мл), и образцы инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Хромогенный сигнал был получен с использованием набора Ventana DAB MAP. Микропрепараты вручную контрастировали гематоксилином (2 минуты), обезвоживали и закрывали покровными стеклами. Изображения были получены на сканере микропрепаратов Aperio AT 2 (Leica Biosystems; г. Буффало Гроув, штат Иллинойс) и проанализированы с использованием программного обеспечения Indica HALO (Indica Labs; г. Корралес, штат Нью-Мексико). Окрашивание гематоксилином и эозином было выполнено Histoserv, Inc (г. Джермантан, штат Мэриленд, США).

Т-клетки у этих мышей являются поликлональными, по оценке частоты использования V $\beta$  Т-клеточного рецептора (TCR), экспрессируют CD3 человека и присутствуют в количестве, аналогичном количеству у мышей дикого типа (данные не показаны). Чтобы определить, индуцирует ли BSMUC16/CD3-001 какую-либо активацию Т-клеток или воздействие на нормальные ткани у этих животных, мышам, которые не несут опухоли, вводили высокую дозу BSMUC16/CD3-001 (10 мг/кг) и количество Т-клеток в крови, были исследованы сывороточные цитокины и гистопатология. Хотя Т-клетки могут быть активированы антителом против CD3 человека (ОКТ3), что измеряется по скоплению Т-клеток в крови и повышенным уровням цитокинов в сыворотке (данные не показаны), BSMUC16/CD3-001 не индуцировал таких эффектов, что позволяет предположить ограниченную доступность мишени MUC16 (данные не показаны). Чтобы определить, индуцирует ли BSMUC16/CD3-001 какие-либо микроскопические изменения в тканях, экспрессирующих MUC16, гуманизированные по MUC16 и CD3 мыши получали две дозы BSMUC16/CD3-001 по 10 мг/кг на 0-й день и 3-й день. На 5 день исследовали несколько тканей, экспрессирующих MUC16, (трахею, желудок и яичник), и не наблюдали клеточной инфильтрации или некроза в этих тканях после введения BSMUC16/CD3-001 (данные не показаны).

Гистопатологическое исследование не выявило воспаления или инфильтрации в тканях, экспрессирующих MUC16, у мышей после введения BSMUC16/CD3-001 в исследуемое время.

Результаты этого исследования, а также исследования на яванских макаках, описанного в Примере 5, демонстрируют профиль безопасности BSMUC16/CD3-001. BSMUC16/CD3-001 индуцировало только минимальные сывороточные цитокины, и хотя наблюдали очаговую индукцию воспаления и утолщение серозной оболочки в MUC16-экспрессирующей активности, что указывает на целевую активность, эти эффекты исчезали к концу периода восстановления и соответствовали воспалению и повышенной насыщенности клетками, что свидетельствует о восстановлении. Наблюдаемые серозные изменения не коррелировали с какими-либо клиническими наблюдениями, клинической патологией (кроме воспалительной реакции) или микроскопическими изменениями в подлежащей паренхиме. Таким образом, исследования на генетически гуманизированных мышях и яванских макаках продемонстрировали, что BSMUC16/CD3-001 хорошо переносится.

Пример 8. Мониторинг экспрессии PD-1 в анализе цитотоксичности на основе FACS с использованием наивных эффекторных клеток человека

Для контроля специфического уничтожения клеток-мишеней, несущих MUC16, с помощью проточной цитометрии, линию клеток яичников OVCAR-3 метили 1 мкМ Violet Cell Tracker. После мечения клетки инкубировали в течение ночи при 37°C. Отдельно человеческие МКПК помещали в среду с до-

бавлением RPMI в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировали в течение ночи при  $37^\circ\text{C}$  для обогащения лимфоцитов за счет истощения адгезивных макрофагов, дендритных клеток и некоторых моноцитов. На следующий день клетки-мишени совместно инкубировали с наивными МКПК при истощенных адгезивных клетках (эффektorные клетки/целевые клетки 4:1) и серийным разведением или BSMUC16/CD3-001, или CD3-связывающего контроля в течение 72 часов при  $37^\circ\text{C}$ . Клетки удаляли из планшетов для культивирования клеток с использованием трипсина и анализировали с помощью FACS. Для анализа методом FACS клетки окрашивали Live/Dead Far Red Cell Tracker (Invitrogen). Для оценки специфичности уничтожения клетки гейтировали по популяциям, меченым CellTracker Violet. Экспрессию PD-1 оценивали путем инкубации клеток с непосредственно конъюгированными антителами к CD2, CD4, CD8 и PD-1, путем регистрации процента PD-1/CD4-положительных Т-клеток или PD-1/CD8-положительных Т-клеток от общего количества Т-клеток (CD2+). Инкубация с BSMUC16/CD3-001 увеличивала процент PD-1+ Т-клеток более чем в 10 раз (CD4+ Т-клетки) или более чем в 3 раза (CD8+ Т-клетки) по сравнению с контролями. Результаты приведены на фиг. 3.

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в данном документе станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания. Предполагается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или ингибирования роста экспрессирующей MUC16 опухоли у субъекта, включающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1); и введение биспецифического антитела, содержащего первое антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает MUC16, и второе антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает CD3, где

(а) антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, HCDR1, HCDR2, HCDR3, и три определяющие комплементарность области легкой цепи, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40, соответственно;

(b) первое антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, A-HCDR1, A-HCDR2 и A-HCDR3, и три определяющие комплементарность области легкой цепи, A-LCDR1, A-LCDR2 и A-LCDR3, где A-HCDR1, A-HCDR2, A-HCDR3, A-LCDR1, A-LCDR2 и A-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 и 13, соответственно; и

(c) второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, B-HCDR1, B-HCDR2 и B-HCDR3, и три определяющие комплементарность области легкой цепи, B-LCDR1, B-LCDR2 и B-LCDR3, где B-HCDR1, B-HCDR2, B-HCDR3, B-LCDR1, B-LCDR2 и B-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 11, 12 и 13, соответственно, или SEQ ID NO: 26, 27, 28, 11, 12 и 13, соответственно.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что

(а) антитело против PD-1 вводят до, одновременно или после биспецифического антитела; или

(b) одну или более доз антитела против PD-1 вводят в комбинации с одной или более дозами биспецифического антитела.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что

(а) антитело против PD-1 вводят в дозе от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела субъекта;

(b) биспецифическое антитело вводят в дозе от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела субъекта;

(c) каждую дозу антитела против PD-1 вводят через 0,5-12 недель после непосредственно предшествующей дозы;

(d) каждую дозу биспецифического антитела вводят через 0,5-12 недель после непосредственно предшествующей дозы; и/или

(e) антитела вводят внутривенно, подкожно или внутривентально.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что

(а) опухоль представляет собой рак яичника, или опухоль представляет собой рак поджелудочной железы; и/или

(b) субъект является резистентным, имеет недостаточный ответ на предшествующую терапию или имеет рецидив после нее.

5. Способ по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и биспецифическое антитело вводят в комбинации с третьим терапевтическим агентом или терапией.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что третий терапевтический агент или терапия выбраны из группы, состоящей из лучевой терапии, хирургического вмешательства, химиотерапевтического агента,

противораковой вакцины, ингибитора PD-L1, ингибитора LAG-3, ингибитора CTLA-4, ингибитора TIM3, ингибитора BTLA, ингибитора TIGIT, ингибитора CD47, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ингибитора ангиопоэтина-2 (Ang2), ингибитора трансформирующего фактора роста бета (ТФР-β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР), антитела к опухолеспецифическому антигену, вакцины бацилл Кальметта-Герена, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, цитотоксина, ингибитора рецептора интерлейкина-6 (ИЛ-6R), ингибитора рецептора интерлейкина-4 (ИЛ-4R), ингибитора ИЛ-10, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-21, ИЛ-15, конъюгата антитело-лекарственное средство, противовоспалительного лекарственного средства, и биологически активной добавки к пище.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что первое антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

8. Способ по любому из пп.1-7, где В-НСДР1, В-НСДР2, В-НСДР3, В-ЛСДР1, В-ЛСДР2 и В-ЛСДР3 второго антигенсвязывающего плеча биспецифического антитела содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 11, 12 и 13, соответственно.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

10. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что В-НСДР1, В-НСДР2, В-НСДР3, В-ЛСДР1, В-ЛСДР2 и В-ЛСДР3 второго антигенсвязывающего плеча биспецифического антитела содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26, 27, 28, 11, 12 и 13, соответственно.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

12. Способ по любому из пп.1-11, где антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

13. Способ по любому из пп.1-9 или 12, где биспецифическое антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, спаренную с легкой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, спаренную с легкой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

14. Способ по любому из пп.1-7 или 10-12, где биспецифическое антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, спаренную с легкой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, спаренную с легкой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

15. Способ по любому из пп.1-14, где антитело против PD-1 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

16. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1), в производстве лекарственного средства для лечения или ингибирования роста экспрессирующей MUC16 опухоли у субъекта в комбинации с биспецифическим антителом, содержащим первое антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает MUC16, и второе антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает CD3, где

(а) антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, HCDR1, HCDR2, HCDR3, и три определяющие комплементарность области легкой цепи, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40, соответственно;

(b) первое антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, А-НСДР1, А-НСДР2 и А-НСДР3, и три определяющие комплементарность области легкой цепи, А-ЛСДР1, А-ЛСДР2 и А-ЛСДР3, где А-НСДР1, А-НСДР2, А-НСДР3, А-ЛСДР1, А-ЛСДР2 и А-ЛСДР3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 и 13, соответственно; и

(с) второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, В-НСДР1, В-НСДР2 и В-НСДР3, и три определяющие комплементарность области легкой цепи, В-ЛСДР1, В-ЛСДР2 и В-ЛСДР3, где В-НСДР1, В-НСДР2, В-НСДР3, В-ЛСДР1, В-ЛСДР2 и В-ЛСДР3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 11, 12 и 13, соответственно, или SEQ ID NO: 26, 27, 28, 11, 12 и 13, соответственно.

17. Применение биспецифического антитела, содержащего первое антигенсвязывающее плечо, ко-

торое специфически связывает MUC16, и второе антигенсвязывающее плечо, которое специфически связывает CD3, в производстве лекарственного средства для лечения или ингибирования роста экспрессирующей MUC16 опухоли у субъекта в комбинации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое специфически связывает белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1), причем:

(а) антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и три определяющие комплементарность области легкой цепи, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 и 40, соответственно;

(б) первое антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, A-HCDR1, A-HCDR2 и A-HCDR3, и три определяющие комплементарность области легкой цепи, A-LCDR1, A-LCDR2 и A-LCDR3, где A-HCDR1, A-HCDR2, A-HCDR3, A-LCDR1, A-LCDR2 и A-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 и 13, соответственно; и

(с) второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, B-HCDR1, B-HCDR2 и B-HCDR3, и три определяющие комплементарность области легкой цепи, B-LCDR1, B-LCDR2 и B-LCDR3, где B-HCDR1, B-HCDR2, B-HCDR3, B-LCDR1, B-LCDR2 и B-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 11, 12 и 13, соответственно, или SEQ ID NO: 26, 27, 28, 11, 12 и 13, соответственно.

18. Применение по п.16 или 17, отличающееся тем, что

(а) антитело против PD-1 вводят до, одновременно или после биспецифического антитела; или

(б) одну или более доз антитела против PD-1 вводят в комбинации с одной или более дозами биспецифического антитела.

19. Применение по любому из пп.16-18, отличающееся тем, что

(а) антитело против PD-1 вводят в дозе от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела субъекта;

(б) биспецифическое антитело вводят в дозе от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела субъекта;

(с) каждую дозу антитела против PD-1 вводят через 0,5-12 недель после непосредственно предшествующей дозы;

(д) каждую дозу биспецифического антитела вводят через 0,5-12 недель после непосредственно предшествующей дозы; и/или

(е) антитела вводят внутривенно, подкожно или внутривнутрино.

20. Применение по любому из пп.16-19, отличающееся тем, что

(а) опухоль представляет собой рак яичника, или опухоль представляет собой рак поджелудочной железы; и/или

(б) субъект является резистентным, имеет недостаточный ответ на предшествующую терапию или имеет рецидив после нее.

21. Применение по любому из пп.16-20, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и биспецифическое антитело дополнительно комбинируют с третьим терапевтическим агентом или терапией.

22. Применение по п.21, отличающееся тем, что третий терапевтический агент или терапия выбраны из группы, состоящей из лучевой терапии, хирургического вмешательства, химиотерапевтического агента, противораковой вакцины, ингибитора PD-L1, ингибитора LAG-3, ингибитора CTLA-4, ингибитора TIM3, ингибитора BTLA, ингибитора TIGIT, ингибитора CD47, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ингибитора ангиопоэтина-2 (Ang2), ингибитора трансформирующего фактора роста бета (ТФР-β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР), антитела к опухолеспецифическому антигену, вакцины бацилл Кальметта-Герена, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, цитотоксина, ингибитора рецептора интерлейкина-6 (ИЛ-6R), ингибитора рецептора интерлейкина-4 (ИЛ-4R), ингибитора ИЛ-10, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-21, ИЛ-15, конъюгата антитело-лекарственное средство, противовоспалительного лекарственного средства, и биологически активной добавки к пище.

23. Применение по любому из пп.16-22, отличающееся тем, что первое антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

24. Применение по любому из пп.16-23, где B-HCDR1, B-HCDR2, B-HCDR3, B-LCDR1, B-LCDR2 и B-LCDR3 второго антигенсвязывающего плеча биспецифического антитела содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 11, 12 и 13, соответственно.

25. Применение по п.24, отличающееся тем, что второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

26. Применение по любому из пп.16-23, отличающееся тем, что B-HCDR1, B-HCDR2, B-HCDR3, B-LCDR1, B-LCDR2 и B-LCDR3 второго антигенсвязывающего плеча биспецифического антитела содер-

жат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26, 27, 28, 11, 12 и 13, соответственно.

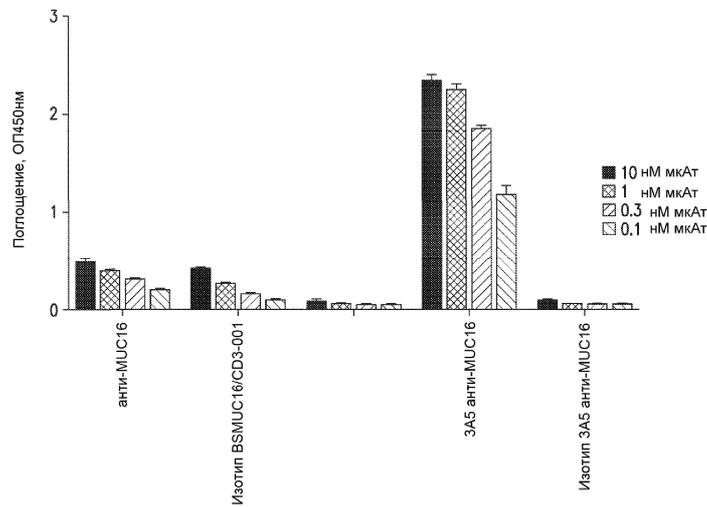
27. Применение по п.26, отличающееся тем, что второе антигенсвязывающее плечо биспецифического антитела содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

28. Применение по любому из пп.16-27, где антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

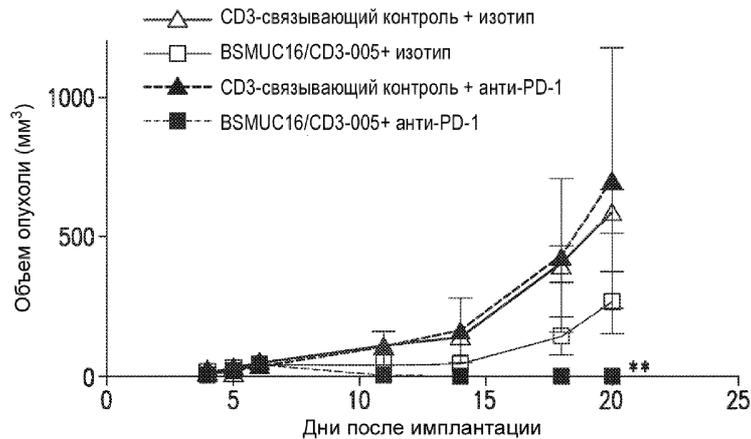
29. Применение по любому из пп.16-25 или 28, где биспецифическое антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, спаренную с легкой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, спаренную с легкой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

30. Применение по любому из пп.16-23 или 26-28, где биспецифическое антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, спаренную с легкой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, спаренную с легкой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

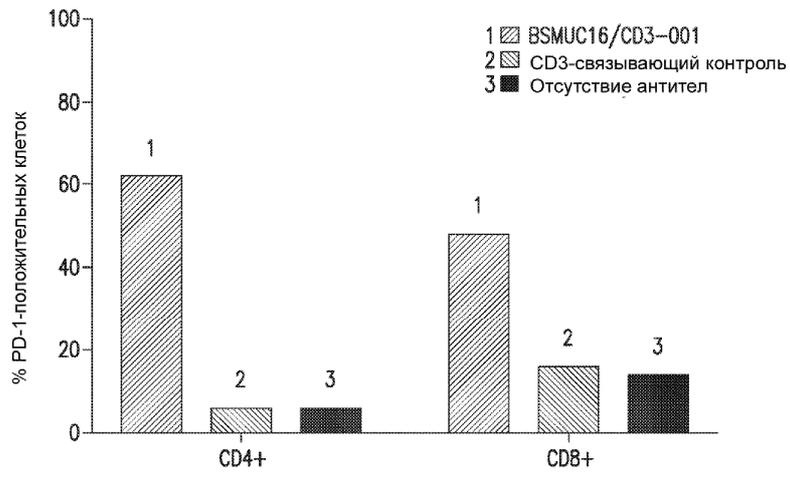
31. Применение по любому из пп.16-30, где антитело против PD-1 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

