



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113454116 A

(43) 申请公布日 2021.09.28

(21) 申请号 201980091415.5

(22) 申请日 2019.12.05

(30) 优先权数据

62/775,803 2018.12.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.08.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2019/051330 2019.12.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/113274 EN 2020.06.11

(71) 申请人 昆士兰医学研究所理事会

地址 澳大利亚昆士兰州

(72) 发明人 B·杜加尔 E·艾伦

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 张晨 郑霞

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

权利要求书9页 说明书83页 附图5页

(54) 发明名称

RANK拮抗剂及其用途

(57) 摘要

公开了拮抗NF- κ B受体活化因子(RANK)的一种或更多种功能的抗原结合分子及其制备方法和用途。还公开了以下应用,其中这些拮抗性抗原结合分子在用于治疗或抑制与RANK配体(RANKL)/RANK信号传递途径的活化相关的状况的发展,用于刺激或增强免疫,用于抑制免疫抑制或对肿瘤的耐受性的发展或进展,以及用于抑制癌症的发展、进展或复发的组合物和方法中使用。

1. 一种RANK拮抗性抗原结合分子,所述RANK拮抗性抗原结合分子包含:

(1) 包含SEQ ID NO:3中列出的VHCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:4中列出的VHCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:5中列出的VHCDR3氨基酸序列的重链可变区(V_H);以及包含SEQ ID NO:6中列出的VLCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:7中列出的VLCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:8中列出的VLCDR3氨基酸序列的轻链可变区(V_L);

(2) 包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的 V_L ;

(3) 与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90% (包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比) 序列同一性的 V_H 和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90% (包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比) 序列同一性的 V_L ;

(4) 与SEQ ID NO:1的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的氨基酸序列具有至少90% (包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比) 序列同一性的 V_H ,以及与SEQ ID NO:2的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的氨基酸序列具有至少90% (包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比) 序列同一性的 V_L ;或

(5) 包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的序列中包含一个或更多个(例如,1个、2个、3个、4个或5个) 氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列的 V_H ,和包含在SEQ ID NO:2的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的序列中包含一个或更多个(例如,1个、2个、3个、4个或5个) 氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列的 V_L 。

2. 根据权利要求1所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子为分离的、纯化的、合成的或重组的形式。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子是单价的(例如,Fab、scFab、Fab'、scFv、单臂抗体等)。

4. 根据权利要求1至3中任一项或更多项所述的抗原结合分子,所述抗原结合分子具有以下活性中的任一种或更多种:(a) 抑制RANKL与RANK的结合;(b) 抑制RANK活化;(c) 抑制下游RANK介导的分子信号传递(例如,RANK募集TRAF蛋白);(d) 抑制RANK多聚化;(e) 减少破骨细胞分化;(f) 减少破骨细胞活化;(g) 减少破骨细胞存活;(h) 抑制骨质流失并增加骨密度;(i) 抑制肿瘤微环境(TME)中骨髓细胞或其他免疫细胞的免疫抑制活性;和(j) 抑制肿瘤细胞(例如,乳腺癌细胞,包括三阴性乳腺癌(TNBC)细胞和BRCA-1突变阳性乳腺癌细胞,非小细胞肺癌(NSCLC)细胞和肾细胞癌(RCC)细胞)的增殖、迁移、存活和/或形态发生。

5. 根据权利要求1至3中任一项或更多项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含在递送媒介物(例如,脂质体、纳米颗粒、微米颗粒、树枝状聚合物或环糊精)中。

6. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子的核酸序列。

7. 一种构建体,所述构建体包含与一个或更多个控制序列可操作地连接的编码根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子的核酸序列。

8. 根据权利要求7所述的构建体,所述构建体为表达构建体(例如,质粒、黏粒、噬菌体或病毒)的形式。

9. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求8所述的构建体。

10. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮

抗性抗原结合分子以及药学上可接受的载体。

11. 根据权利要求10所述的组合物,所述组合物还包含至少一种选自以下的辅助剂:骨抗再吸收剂(例如,合成代谢增强剂,特别是选自由甲状旁腺激素、BMP2、维生素D、抗炎剂组成的组;和分解代谢抑制剂,特别是选自由双膦酸盐、组织蛋白酶K抑制剂、p38抑制剂、JNK抑制剂、IKK抑制剂、NF- κ B抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、NFAT抑制剂、PI3K抑制剂组成的组)和化学治疗剂(例如,抗增殖/抗肿瘤药物、细胞生长抑制剂、抑制癌细胞侵袭的剂、生长因子功能抑制剂、抗血管生成剂、血管损伤剂等)或免疫治疗剂(例如,细胞因子、表达细胞因子的细胞、抗体等)。

12. 一种用于抑制RANKL与表达RANK的细胞结合的方法,所述方法包括使所述表达RANK的细胞与根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制RANKL与所述表达RANK的细胞的结合。

13. 一种用于抑制表达RANK的细胞上RANK的活化的方法,所述方法包括使所述表达RANK的细胞与根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制所述表达RANK的细胞上RANK的活化。

14. 一种用于抑制表达RANK的细胞中RANK介导的分子信号传递(例如,RANK募集TRAF蛋白)的方法,所述方法包括使所述表达RANK的细胞与根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制所述表达RANK的细胞中RANK介导的分子信号传递。

15. 一种用于抑制表达RANK的细胞中的RANK多聚化的方法,所述方法包括使所述表达RANK的细胞与本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制所述表达RANK的细胞中的RANK多聚化。

16. 根据权利要求12至15中任一项所述的方法,其中所述表达RANK的细胞选自破骨细胞、免疫细胞诸如抗原呈递细胞(例如,单核细胞和树突细胞)和效应免疫细胞(例如,T细胞)、造血前体细胞和肿瘤细胞诸如乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、NSCLC细胞和RCC细胞。

17. 一种用于抑制破骨细胞的分化、活化和/或存活的方法,所述方法包括使所述破骨细胞与根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制所述破骨细胞的分化、活化和/或存活。

18. 一种用于抑制免疫细胞(例如,骨髓细胞或Treg)的免疫抑制活性的方法,所述方法包括使所述免疫细胞与根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制所述免疫细胞的免疫抑制活性。

19. 一种用于抑制肿瘤细胞的增殖、存活或迁移的方法,所述方法包括使所述肿瘤细胞与根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制所述肿瘤细胞的增殖、存活或迁移。

20. 一种用于治疗或抑制受试者中与RANKL/RANK信号传递途径的活化相关的状况的发展的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子,从而治疗或抑制所述状况的发展。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中与RANKL/RANK信号传递途径活化相关的所述状况选自骨质减少性紊乱、肌病和癌症。

22. 一种治疗剂组合,所述治疗剂组合包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:根

据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子。

23. 根据权利要求22所述的治疗剂组合,其中所述RANK拮抗性抗原结合分子和所述至少一种抗ICM抗原结合分子为单一组合物(例如,混合物)的形式。

24. 根据权利要求22所述的治疗剂组合,其中所述RANK拮抗性抗原结合分子和所述至少一种抗ICM抗原结合分子为单独组合物中的独立组分的形式。

25. 根据权利要求22至24中任一项所述的治疗剂组合,其中所述至少一种抗ICM抗原结合分子拮抗选自以下组成的组的ICM:程序性死亡1受体(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)、程序性死亡配体2(PD-L2)、细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)、A2A腺苷受体(A2AR)、A2B腺苷受体(A2BR)、B7-H3(CD276)、含V-set结构域的T细胞活化抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞弱化因子(BTLA)、吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、淋巴细胞活化基因3(LAG3)、T细胞免疫球蛋白结构域和黏蛋白结构域3(TIM-3)、T细胞活化的V结构域Ig抑制因子(VISTA)、5'-核苷酸酶(CD73)、tactile(CD96)、脊髓灰质炎病毒受体(CD155)、DNAX辅助分子-1(DNAM-1)、脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白2(CD112)、细胞毒性和调节性T细胞分子(CRTAM)、肿瘤坏死因子受体超家族成员4(TNFRSF4; OX40; CD134)、肿瘤坏死因子(配体)超家族成员4(TNFSF4; OX40配体(OX40L))、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、CD160、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白配体(GITRL)、诱导型共刺激因子(ICOS)、半乳凝素9(GAL-9)、4-1BB配体(4-1BBL; CD137L)、4-1BB(4-1BB; CD137)、CD70(CD27配体(CD27L))、CD28、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、信号调节蛋白(SIRP-1)、整合素相关蛋白(IAP; CD47)、B淋巴细胞活化标志物(BLAST-1; CD48)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、CD40、CD40配体(CD40L)、疱疹病毒进入介质(HVEM)、跨膜和含免疫球蛋白结构域蛋白2(TMIGD2)、HERV-HLTR-相关蛋白2(HHLA2)、血管内皮生长抑制因子(VEGI)、肿瘤坏死因子受体超家族成员25(TNFRSF25)、诱导型T细胞共刺激因子配体(ICLG; B7RP1)和具有Ig和ITIM(免疫受体酪氨酸基抑制基序)结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)。

26. 根据权利要求25所述的治疗剂组合,其中所述至少一种抗ICM抗原结合分子选自PD-1拮抗性抗原结合分子、PD-L1拮抗性抗原结合分子和CTLA4拮抗性抗原结合分子。

27. 根据权利要求25所述的治疗剂组合,其中所述至少一种抗ICM抗原结合分子包括PD-1拮抗性抗原结合分子。

28. 根据权利要求25所述的治疗剂组合,其中所述至少一种抗ICM抗原结合分子包括PD-L1拮抗性抗原结合分子。

29. 根据权利要求25所述的治疗剂组合,其中所述至少一种抗ICM抗原结合分子包括CTLA4拮抗性抗原结合分子。

30. 根据权利要求25所述的治疗剂组合,其中所述至少一种抗ICM抗原结合分子包括PD-1拮抗性抗原结合分子和PD-L1拮抗性抗原结合分子。

31. 根据权利要求25所述的治疗剂组合,其中所述至少一种抗ICM抗原结合分子包括PD-1拮抗性抗原结合分子和CTLA4拮抗性抗原结合分子。

32. 根据权利要求25所述的治疗剂组合,其中所述至少一种抗ICM抗原结合分子包括PD-L1拮抗性抗原结合分子和CTLA4拮抗性抗原结合分子。

33. 根据权利要求25所述的治疗剂组合,其中所述抗ICM抗原结合分子拮抗Treg细胞缺乏表达或以低水平表达的ICM。

34. 根据权利要求25所述的治疗剂组合,其中所述抗ICM抗原结合分子拮抗在Treg上以比CTLA4低的水平表达的ICM(例如,PD-1或PD-L1)。

35. 根据权利要求25所述的治疗剂组合,其中所述抗ICM抗原结合分子拮抗在免疫效应细胞(例如,效应T细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞等)上以比Treg上高的水平表达的ICM(例如,PD-1或PD-L1)。

36. 根据权利要求27所述的治疗剂组合,其中所述抗PD-1抗原结合分子是MAb,所述MAb的非限制性实例包括纳武单抗、派姆单抗、pidilizumab和MEDI-0680 (AMP-514)、AMP-224、JS001-PD-1、SHR-1210、Gendor PD-1、PDR001、CT-011、REGN2810、BGB-317或其抗原结合片段,或者所述抗PD-1抗原结合分子是与纳武单抗、派姆单抗、pidilizumab或MEDI-0680竞争结合PD-1的分子。

37. 根据权利要求27或权利要求36所述的治疗剂组合,其中所述抗PD-1抗原结合分子特异性地结合SEQ ID NO:9(即,SEQ ID NO:10中列出的天然PD-1序列的残基62至86)、SEQ ID NO:11(即,SEQ ID NO:10中列出的天然PD-1序列的残基118至138)和SEQ ID NO:12(即,对应于SEQ ID NO:10中列出的天然PD-1序列的残基66至97)中列出的氨基酸序列的一个或更多个氨基酸。

38. 根据权利要求28所述的治疗剂组合,其中所述抗PD-L1抗原结合分子是MAb或其抗原结合片段,所述MAb的非限制性实例包括德瓦鲁单抗(MEDI4736)、阿特朱单抗(Tecentriq)、阿维鲁单抗、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480和MPDL3280A。

39. 根据权利要求28或权利要求38所述的治疗剂组合,其中所述抗PD-L1抗原结合分子特异性地结合SEQ ID NO:13(即,SEQ ID NO:14中列出的全长天然PD-L1氨基酸序列的残基279至290)中列出的氨基酸序列中的一个或更多个氨基酸,所述抗PD-L1抗原结合分子是与德瓦鲁单抗(MEDI4736)、阿特朱单抗(Tecentriq)、阿维鲁单抗、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480和MPDL3280A中的任一种竞争结合PD-L1的分子。

40. 根据权利要求29所述的治疗剂组合,其中所述抗CTLA4抗原结合分子是MAb或其抗原结合片段,所述MAb的代表性实例包括伊匹单抗和tremelimumab,或者所述抗CTLA4抗原结合分子是与伊匹单抗或tremelimumab竞争结合CTLA4的分子。

41. 根据权利要求29或权利要求40所述的治疗剂组合,其中所述抗CTLA4抗原结合分子特异性地结合选自SEQ ID NO:15(即,SEQ ID NO:16中列出的全长天然CTLA4氨基酸序列的残基25至42)、SEQ ID NO:17(即,SEQ ID NO:16中列出的天然CTLA4序列的残基43至65)和SEQ ID NO:18(即,SEQ ID NO:16中列出的天然CTLA4序列的残基96至109)中任一种中列出的序列的氨基酸序列中的一个或更多个氨基酸。

42. 根据权利要求22至41中任一项所述的治疗剂组合,其中所述RANK抗原结合分子或所述ICM抗原结合分子连接到免疫球蛋白恒定链(例如,IgG1恒定链、IgG2a恒定链、IgG2b恒定链、IgG3恒定链或IgG4恒定链)。

43. 根据权利要求42所述的治疗剂组合,其中所述免疫球蛋白恒定链可以包括选自κ轻

链或 λ 轻链的轻链;以及选自 γ 1重链、 γ 2重链、 γ 3重链和 γ 4重链的重链。

44. 根据权利要求22至43中任一项所述的治疗剂组合,其中所述治疗剂组合包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子和两种或更多种不同的抗ICM抗原结合分子。

45. 根据权利要求44所述的治疗剂组合,其中所述治疗剂组合包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子以及抗CTLA4抗原结合分子、抗PD-1抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子中的至少两种。

46. 根据权利要求22至45中任一项所述的治疗剂组合,其中所述治疗剂组合的个体抗原结合分子为独立组分的形式。

47. 根据权利要求22至45中任一项所述的治疗剂组合,其中所述治疗剂组合的个体抗原结合分子彼此融合或以其他方式缀合(直接地或间接地)。

48. 根据权利要求47所述的治疗剂组合,其中所述治疗剂组合为多特异性拮抗剂的形式,所述多特异性拮抗剂包含根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子和所述至少一种抗ICM抗原结合分子。

49. 根据权利要求48所述的治疗剂组合,其中所述多特异性剂是两种或更多种多肽的复合物。

50. 根据权利要求48所述的治疗剂组合,其中所述多特异性剂是单链多肽。

51. 根据权利要求50所述的治疗剂组合,其中所述RANK拮抗性抗原结合分子被缀合到个体抗ICM抗原结合分子的N末端或C末端。

52. 根据权利要求50或权利要求51所述的治疗剂组合,其中RANK拮抗性抗原结合分子和抗ICM抗原结合分子直接连接或通过中间接头(例如,多肽接头)连接。

53. 根据权利要求22至52中任一项所述的治疗剂组合,其中所述治疗剂组合包含在递送媒介物(例如,脂质体、纳米颗粒、微米颗粒、树枝状聚合物或环糊精)中。

54. 一种用于共拮抗RANK和至少一种ICM的多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子。

55. 根据权利要求54所述的多特异性抗原结合分子,其中所述RANK拮抗性抗原结合分子是特异性地结合并拮抗RANK的抗体或其抗原结合片段。

56. 根据权利要求54或权利要求55所述的多特异性抗原结合分子,其中个体抗ICM抗原结合分子选自特异性地结合并拮抗对应ICM的抗体或抗原结合片段。

57. 根据权利要求55或权利要求56所述的多特异性抗原结合分子,其中所述抗体和/或抗原结合片段直接连接或通过中间接头(例如,化学接头或多肽接头)连接。

58. 根据权利要求54至57中任一项所述的多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子为单链多肽的形式,其中所述RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子可操作地连接。

59. 根据权利要求54至57中任一项所述的多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原结合分子为独立多肽链的形式,其中所述RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子彼此连接或以其他方式彼此缔合以形成复合物。

60. 根据权利要求54至59中任一项所述的多特异性抗原结合分子,所述多特异性抗原

结合分子为二价、三价或四价。

61. 根据权利要求54至60中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述RANK拮抗性抗原结合分子和所述至少一种抗ICM抗原结合分子选自Fab、Fab'、F(ab')₂以及Fv分子和互补决定区(CDR)。

62. 根据权利要求54至61中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 其中个体抗原结合分子包含独立地选自由IgG、IgM、IgD、IgA和IgE组成的组的恒定结构域。

63. 根据权利要求54至62中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 所述多特异性抗原结合分子包括串联scFv(taFv或scFv₂)、双抗体、dAb₂/VHH₂、knobs-in-holes衍生物、Seedcod-IgG、异Fc-scFv、Fab-scFv、scFv-Jun/Fos、Fab'-Jun/Fos、三抗体、DNL-F(ab)₃、scFv₃-C_H1/C_L、Fab-scFv₂、IgG-scFab、IgG-scFv、scFv-IgG、scFv₂-Fc、F(ab')₂-scFv₂、scDB-Fc、scDb-C_H3、Db-Fc、scFv₂-H/L、DVD-Ig、tandAb、scFv-dhlx-scFv、dAb₂-IgG、dAb-IgG、dAb-Fc-dAb、tandab、DART、BiKE、TriKE、mFc-V_H、交联MAb、Cross MAb、MAb₂、FIT-Ig、静电匹配的抗体、对称IgG样抗体、LUZ-Y、Fab交换抗体或其组合。

64. 根据权利要求54至63中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 其中个体抗原结合分子连接到免疫球蛋白恒定链(例如, IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4)。

65. 根据权利要求64所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述免疫球蛋白恒定链包括选自κ轻链和λ轻链的轻链, 和/或选自γ1重链、γ2重链、γ3重链和γ4重链的重链。

66. 根据权利要求54至65中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述多特异性抗原结合分子拮抗PD-1, 并且所述抗PD-1抗原结合分子(例如, 抗体或其抗原结合片段)特异性地结合选自SEQ ID NO:9(即, SEQ ID NO:10中列出的天然人类PD-1序列的残基62至86)、SEQ ID NO:11(即, SEQ ID NO:10中列出的天然人类PD-1序列的残基118至136)和SEQ ID NO:12(即, 对应于SEQ ID NO:10中列出的天然人类PD-1序列的残基66至97)的氨基酸序列的一个或更多个氨基酸。

67. 根据权利要求66所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述抗PD-1抗原结合分子(例如, 抗体或其抗原结合片段)包含选自纳武单抗、派姆单抗、pidilizumab和MEDI-0680(AMP-514)、AMP-224、JS001-PD-1、SHR-1210、Gendor PD-1、PDR001、CT-011、REGN2810、BGB-317的MAb或其抗原结合片段的重链和轻链。

68. 根据权利要求54至67中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述多特异性抗原结合分子拮抗PD-L1, 并且所述抗PD-L1抗原结合分子(例如, 抗体或其抗原结合片段)特异性地结合SEQ ID NO:13(即, SEQ ID NO:14中列出的天然人类PD-L1氨基酸序列的残基279至290)中列出的氨基酸序列的一个或更多个氨基酸。

69. 根据权利要求68所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述抗PD-L1抗原结合分子(例如, 抗体或其抗原结合片段)包含选自德瓦鲁单抗(MEDI4736)、阿特朱单抗(Tecentriq)、阿维鲁单抗、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480和MPDL3280A的MAb或其抗原结合片段的重链和轻链。

70. 根据权利要求54至69中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述多特异性抗原结合分子拮抗CTLA4, 并且所述抗CTLA4抗原结合分子(例如, 抗体或其抗原结合片段)特异性地结合选自SEQ ID NO:15(即, SEQ ID NO:16中列出的全长天然PD-CTLA4氨基酸序列的残基25至42)、SEQ ID NO:17(即, SEQ ID NO:16中列出的天然CTLA4序列的残基43至

65) 和SEQ ID NO:18 (即, SEQ ID NO:16中列出的天然CTLA4序列的残基96至109) 的氨基酸序列的一个或更多个氨基酸。

71. 根据权利要求70所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述抗CTLA4抗原结合分子 (例如, 抗体或其抗原结合片段) 包含选自伊匹单抗和tremelimumab的MAb或其抗原结合片段的重链和轻链。

72. 根据权利要求54至71中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述多特异性抗原结合分子包含以下、由以下组成或基本上由以下组成: 根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子和抗PD-1抗原结合分子。

73. 根据权利要求54至71中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述多特异性抗原结合分子包含以下、由以下组成或基本上由以下组成: 根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子。

74. 根据权利要求54至71中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述多特异性抗原结合分子包含以下、由以下组成或基本上由以下组成: 根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子、抗PD-1抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子。

75. 根据权利要求54至71中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述多特异性抗原结合分子包含以下、由以下组成或基本上由以下组成: 根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子、抗PD-1抗原结合分子和抗CTLA4抗原结合分子。

76. 根据权利要求54至71中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 其中所述多特异性抗原结合分子包含以下、由以下组成或基本上由以下组成: 根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子。

77. 一种产生根据权利要求54至76中任一项所述的治疗剂组合的方法, 所述方法包括将根据权利要求1至4中任一项所述的RANK拮抗性抗原结合分子与至少一种抗ICM抗原结合分子组合, 从而产生所述治疗剂组合。

78. 根据权利要求77所述的方法, 所述方法还包括产生所述治疗剂组合的特异性地结合并拮抗靶多肽 (例如, RANK或ICM) 的抗原结合分子 (例如, 通过用免疫多肽免疫动物, 所述免疫多肽包含对应于所述靶多肽的氨基酸序列; 以及从所述动物鉴定和/或分离特异性地结合所述靶多肽或其至少一个区域的B细胞; 并且产生由该B细胞表达的所述抗原结合分子)。

79. 根据权利要求77或权利要求78所述的方法, 所述方法还包括将如此产生的抗原结合分子进行衍生, 以产生与所述抗原结合分子具有相同的表位结合特异性的衍生抗原结合分子。

80. 根据权利要求79所述的方法, 其中所述衍生抗原结合分子选自抗体片段, 所述抗体片段的说明性实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链Fv (scFv)、单臂和结构域抗体 (包括例如鲨鱼抗体和骆驼抗体)、和包含抗体的融合蛋白、以及包含抗原结合/识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰配置。

81. 一种构建体, 所述构建体包含与一个或更多个控制序列可操作地连接的编码根据权利要求54至76中任一项所述的多特异性抗原结合分子的核酸序列。

82. 根据权利要求81所述的构建体, 所述构建体为表达构建体的形式, 所述表达构建体的代表性实例包括质粒、黏粒、噬菌体和病毒。

83. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含根据权利要求81或权利要求82所述的构建体。

84. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含根据权利要求22至53中任一项所述的治疗剂组合, 或根据权利要求54至76中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 以及药学上可接受的载体。

85. 根据权利要求84所述的组合物, 所述组合物还包含至少一种选自以下的辅助剂: 化学治疗剂(例如, 选自抗增殖/抗肿瘤药物、细胞生长抑制剂、抑制癌细胞侵袭的剂、生长因子功能抑制剂、抗血管生成剂、血管损伤剂等) 或免疫治疗剂(例如, 细胞因子、表达细胞因子的细胞、抗体等)。

86. 一种用于刺激或增强受试者的免疫的方法, 所述方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成: 向所述受试者施用有效量的根据权利要求22至53中任一项所述的治疗剂组合或根据权利要求54至76中任一项所述的多特异性抗原结合分子, 从而刺激或增强所述受试者的免疫。

87. 根据权利要求86所述的方法, 其中所述治疗剂组合的所述RANK拮抗性抗原结合分子和所述至少一种抗ICM抗原结合分子作为独立组分提供, 并且所述组分被并行施用至所述受试者。

88. 根据权利要求87所述的方法, 其中所述RANK拮抗性抗原结合分子与所述至少一种抗ICM抗原结合分子同时施用。

89. 根据权利要求87所述的方法, 其中所述RANK拮抗性抗原结合分子和所述至少一种抗ICM抗原结合分子被顺序施用。

90. 根据权利要求89所述的方法, 其中在施用所述至少一种抗ICM抗原结合分子之前施用所述RANK拮抗性抗原结合分子。

91. 根据权利要求89所述的方法, 其中在施用所述至少一种抗ICM抗原结合分子之后施用所述RANK拮抗性抗原结合分子。

92. 根据权利要求86至91中任一项所述的方法, 其中刺激或增强的免疫包括有益的宿主免疫应答, 有益的宿主免疫应答的说明性实例包括以下中的任一种或更多种: 肿瘤尺寸的减少; 肿瘤负荷的减少; 疾病的稳定; 产生针对内源性抗原或外源性抗原的抗体; 免疫系统的诱导; 免疫系统的一种或更多种组成部分的诱导; 细胞介导的免疫及参与其产生的分子; 体液免疫及参与其产生的分子; 抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 免疫及参与其产生的分子; 补体介导的细胞毒性 (CDC) 免疫及参与其产生的分子; 自然杀伤细胞; 细胞因子和趋化因子及参与其产生的分子和细胞; 抗体依赖性细胞毒性; 补体依赖性细胞毒性; 自然杀伤细胞活性和抗原增强的细胞毒性。

93. 根据权利要求92所述的方法, 其中所述刺激或增强的免疫包括促炎性免疫应答。

94. 一种用于抑制受试者中免疫抑制或对肿瘤的耐受性的发展或进展的方法, 所述方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成: 使所述肿瘤与根据权利要求22至53中任一项所述的治疗剂组合或根据权利要求54至76中任一项所述的多特异性抗原结合分子接触, 从而抑制所述受试者中所述免疫抑制或对肿瘤的耐受性的发展或进展。

95. 根据权利要求94所述的方法, 其中所述治疗剂组合或所述多特异性抗原结合分子还接触向免疫系统呈递肿瘤抗原的抗原呈递细胞(例如, 树突细胞)。

96. 一种用于抑制受试者的癌症的发展、进展或复发的方法, 所述方法包括以下、由以

下组成或基本上由以下组成:向所述受试者施用有效量的根据权利要求22至53中任一项所述的治疗剂组合或根据权利要求54至76中任一项所述的多特异性抗原结合分子,从而抑制所述受试者的所述癌症的发展、进展或复发。

97.一种用于治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向所述受试者施用有效量的根据权利要求22至53中任一项所述的治疗剂组合或根据权利要求54至76中任一项所述的多特异性抗原结合分子,从而治疗所述癌症。

98.根据权利要求97所述的方法,其中所述癌症选自黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌和子宫癌、胃癌或胃部癌、胰腺癌、前列腺癌、唾液腺癌、肺癌、肝细胞癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、直肠癌、结肠直肠癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、肝肿瘤、肛门癌、阴茎癌、睾丸癌、食道癌、胆道肿瘤、头颈癌和鳞状细胞癌,在一些特定实施方案中,所述癌症是转移癌。

99.根据权利要求86至98中任一项所述的方法,其中所述受试者对免疫调节剂具有降低或受损的响应性,例如受试者对ICM分子拮抗剂(例如,抗PD-1或抗PD-L1免疫疗法)具有降低或受损的响应性。

100.根据权利要求86至99中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述受试者并行施用有效量的辅助抗癌剂。

101.根据权利要求100所述的方法,其中所述辅助抗癌剂包括化学治疗剂、外照射、靶向放射性同位素和信号转导抑制剂。

102.一种用于刺激或增强受试者的免疫、用于抑制受试者中免疫抑制或对肿瘤的耐受性的发展或进展或用于治疗受试者的癌症的试剂盒,所述试剂盒包括根据权利要求22至53中任一项所述的治疗剂组合或根据权利要求54至76中任一项所述的多特异性抗原结合分子中的任一种或更多种。

RANK拮抗剂及其用途

发明领域

[0001] 本申请要求2018年12月5日提交的题为“Antagonists and uses therefor”的美国临时申请第62/775,803号的优先权,该美国临时申请的内容通过引用以其整体并入本文。

[0002] 本发明总体上涉及拮抗性抗原结合分子(antagonist antigen-binding molecules)。更特别地,本发明涉及拮抗NF- κ B受体活化因子(RANK)的一种或更多种功能的抗原结合分子以及其制备方法和用途。在特定实施方案中,拮抗性抗原结合分子被单独使用或与其他剂组合使用,用于治疗或抑制与RANK配体(RANKL)/RANK信号传递途径的活化相关的状况的发展,用于刺激或增强免疫,用于抑制免疫抑制或对肿瘤的耐受性的发展或进展,或用于抑制癌症的发展、进展或复发。

[0003] 发明背景

[0004] RANK和RANKL分别是肿瘤坏死因子受体和配体超家族的成员,与CD40和CD40L具有最接近的同源性。RANK(TNFRSF11a)和RANKL(TNFSF11)目前在临床实践中因其在骨稳态中的作用而闻名,因为破骨细胞从单核细胞-巨噬细胞谱系的分化需要RANKL与在骨髓破骨细胞前体上表达的RANK的相互作用(Dougall等人,1999.Genes Dev.13(18):2412-2424;Kong等人,1999.Nature 397(6717):315-323)。然而,RANKL最初被鉴定为树突细胞特异性存活因子,其由活化的T细胞上调并且与成熟树突细胞(DC)表面上的RANK相互作用以防止凋亡(Anderson等人,1997.Nature 390:175-179;Wong等人,1997.J.Exp.Med.186(12):2075-2080)。完全人类IgG2抗RANKL抗体(地舒单抗(denosumab))在临床实践中被广泛用作有效且良好耐受的抗再吸收剂,用于预防由骨转移引起的骨相关事件以及管理骨巨细胞瘤和骨质疏松症(Branstetter等人,2012.Clin.Cancer Research 18(16):4415-4424;Fizazi等人,2011.Lancet (London,England) 377(9768):813-822)。

[0005] RANK蛋白通过与多种TNF受体相关因子(TRAF)相互作用来启动细胞内事件(Galibert等人,1998J Biol Chem 273(51):34120-27)。RANK的触发,诸如通过其与RANKL的相互作用,导致RANK的多聚化,RANK的多聚化将TRAF募集至RANK的细胞质结构域并活化TRAF介导的细胞内事件,导致包括NF- κ B在内的转录因子的上调(Anderson等人,1997,同上)。由RANK/RANKL相互作用介导的信号参与刺激破骨细胞的分化和功能,破骨细胞是负责骨再吸收的细胞(参见,例如Lacey等人,1998.Cell 93:165-7;Yasuda等人,1998.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:3597-3602)。

[0006] RANKL是在骨转移、多发性骨髓瘤、类风湿性关节炎、磨屑诱导的骨溶解(wear debris-induced osteolysis)、糖皮质激素诱导的骨质疏松症、由于激素剥夺治疗(hormone-deprivation therapy)引起的骨质减少、骨巨细胞瘤(GCTB)和绝经后骨质疏松症(PMO)中经由刺激破骨细胞分化、活化和存活的病理性骨破坏的关键介质(Lacey等人,1998.Cell 93,165-176;Boyce和Xing,2008.Arch.Biochem.Biophys.473:139-146)。对骨稳态受RANKL-RANK信号传递严格调节的认识促进了地舒单抗的开发,地舒单抗是一种完全人类IgG2单克隆抗体(MAb),与其他RANKL抑制剂相比,其具有有效的RANKL中和活性和优越

的药理学特性 (Lacey等人, 2012. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11:401-419)。地舒单抗的功效随后在这些疾病背景中被展示, 并且与RANKL在属于髓系的表达RANK的前体细胞 (precursor) 向骨再吸收性破骨细胞的分化和功能刺激中的专性作用 (obligate role) 相关 (Dougall等人, 1999, 同上)。

[0007] 最近, 发现RANK/RANKL系统在某些癌症的起源和进展中是功能重要的, 所述癌症诸如乳腺癌, 包括BRCA1突变相关乳腺癌和激素受体阴性和三阴性 (ER-、PR-、HER2-) 乳腺癌 (Gonzalez-Suarez等人, 2010. *Nature* 468 (7320):103-107; Nolan等人, 2016. *Nat Med* 22 (8):933-939; Widschwendter等人, 2015, *EBioMedicine* 2 (10):1331-1339; Pfitzner等人, 2014, *Breast Cancer Res Treat.* 145 (2):307-315; Palafox等人, 2012. *Cancer Res.* 72 (11):2879-2888; Reyes等人, 2017, *Breast Cancer Res Treat.* 164 (1):57-67; Blake等人, 2014. *Clin Exp Metastasis* 31 (2):233-245; Yoldi等人, 2016, *Cancer Res.* 76 (19):5857-5869)、前列腺癌 (Ohtaka等人, 2017. *Int J Surg Case Rep.* 30:106-107; Li等人, 2014. *Oncol Rep.* 32 (6):2605-2611)、非小细胞肺癌 (NSCLC), 包括KRAS突变或KRAS和LKB1突变亚型 (Branstetter等人, 2013, Abstract World Conference on Lung Cancer; Rao等人, 2017. *Genes Dev.* 31, 2099-2112; Faget等人, 2017, *J. Thorac. Oncol.* 13, 387-398) 和肾细胞癌 (RCC), 包括透明细胞RCC (ccRCC) (Steven等人, 2018. *Urol Oncol.* 36, 502.e15-502)。因此, 已经提出了阻断RANK/RANKL活性的治疗策略用于治疗这些癌症。

[0008] 已经使用各种策略来开发RANKL/RANK拮抗剂作为治疗性治疗。例如, 如Lacey等人 (2012, 同上) 中评述的, 开发了若干不同的诱饵受体, 它们显示出作为RANKL/RANK拮抗剂的不同效力和不稳定性 (liability) 或副作用谱。一种类型的诱饵受体包括包含与人类IgG Fc融合的RANK细胞外结构域 (ECD) 的嵌合蛋白 (RANK-Fc)。虽然该分子在临床前模型中显示出有前景的功效, 但在非人类灵长类动物中重复给药人类RANK-Fc后, 检测到活化的针对RANK的自身抗体滴度, 其导致高钙血症 (Lacey等人2012, 同上)。虽然天然全长骨保护素 (OPG) 被展示是有效的RANKL结合剂和抑制剂, 但是治疗剂的开发需要测试数百种重组变体, 以改进这些分子在动物中的药代动力学和生物活性。在1期临床试验中测试了含有在氨基末端与人类免疫球蛋白G1 (IgG1) Fc区融合的人类OPG的氨基酸残基22-194的重组蛋白 (Fc-OPG), 并且展示出骨转换标志物的快速、剂量相关的下降, 表明Fc-OPG是人类中的RANKL/RANK拮抗剂。为了改进RANKL/RANK拮抗剂, 其中人类OPG的残基22-194在羧基末端与哺乳动物细胞宿主 (中国仓鼠卵巢细胞) 中表达的人类IgG1 Fc融合的替代性OPG-Fc (AMGN-0007) 被展示与Fc-OPG相比具有约10倍长的半衰期和3倍至10倍高的效力 (Lacey等人, 2012, 同上)。

[0009] 然而, 地舒单抗作为疗法的应用仍然存在重要的局限性, 包括副作用的风险, 诸如颌骨坏死 (ONJ)、皮疹、低钙血症或肾毒性 (Prolia包装插页; Xgeva包装插页)。此外, 严重感染、皮肤不良反应或非典型骨折 (后者可能是由于‘骨停止 (frozen bone)’引起的, 在这一过程中, 破骨细胞性骨重塑的完全抑制导致微骨折和脆性骨的积聚) 均是使用地舒单抗进行RANKL抑制的毒性后果 (Schwarz和Ritchlin, 2007. *Res Ther.* 9Suppl 1:S7; Prolia包装插页; Xgeva包装插页)。RANKL/RANK拮抗剂的功效和/或安全性可以通过将其选择性地靶向到适当的组织/细胞区室来提高。例如, RANK/RANKL拮抗剂向骨、乳腺、肿瘤或肿瘤微环境的增加的分布可以实现更高的功效, 并且同时减少全身暴露和相关毒性。因此, RANKL/RANK拮

抗剂开发的替代策略可以提供提高的功效和安全性。

[0010] 用人类RANKL免疫IgG2 XenoMouse品系导致AMG 162(也称为地舒单抗)的鉴定, AMG 162具有高亲和力,并且重要的是,在平衡结合中与RANKL的缓慢的结合解离速率(Lacey等人,2012,同上)。关键地,AMG162/地舒单抗对RANKL活性的抑制在基于细胞的破骨细胞形成测定中被展示。虽然与重组OPG形式相比,地舒单抗对人类RANKL具有稍微较低的亲和力,但亲和力的这种差异被地舒单抗在体内的显著更长的循环半衰期所补偿,从而提供显著的功效。

[0011] 已被开发的其他抗RANKL抗体包括源自Camillidae的仅重链(VHH)抗体形式,被命名为ALX-0141(Van de Wetering de Rooij等人,2011.*Ann.Rheum.Dis.*70(3):136;并且在WO2012163887中描述)。该抗RANKL抗体已经在绝经后患者的1期试验中被评估,其示出对骨再吸收标志物的强烈且持续的抑制作用。此外,ALX-0141耐受良好并且可以在宽范围的剂量内安全施用。

[0012] 其他抗RANKL抗体或抗体衍生物包括源自人类Fab噬菌体文库(EP1257648)的Fab“AT”、“Y”、“P”和“S”。使用基于细胞的破骨细胞测定展示出抗RANKL Fab“AT”、“Y”、“P”拮抗RANKL/RANK。其他抗RANKL抗体包括16E1、2D8、2E11、18B2、22B3或9H7,它们通过用源自大肠杆菌(*Escherichia coli*)或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的纯化重组RANKL作为抗原免疫HuMab转基因小鼠品系HCo7、HCo12和HCo7+HCo12产生(美国专利第8,455,629号)。另外的抗RANKL抗体包括XPA12.004、XPA12.020、XPA12.039、XPA12.041和XPA12.042,使用基于细胞的破骨细胞测定展示出它们拮抗RANKL/RANK(WO2011017294)。

[0013] RANKL/RANK拮抗剂的其他策略包括配制的靶向RANKL的siRNA,其在治疗肿瘤相关的骨溶解中展示出有前景的结果(Rousseau等人,2011.*JBone Miner Res.*26(10):2452-2462)。

[0014] 另一种治疗选择是使用抑制性的肽、蛋白-蛋白相互作用的肽模拟物或抗体,它们将阻断RANKL与RANK的相互作用或改变RANK的构象以降低其活性和随后的生化信号转导。例如,合理设计的OPG(“受体”)或RANKL(“配体”)的小分子模拟物在体外破骨细胞生成测定中被测试(Cheng等人,2004.*J Biol Chem.*2004;279(9):8269-8277)。感兴趣的是,与根据RANKL设计的肽相比,根据OPG设计的肽显示出更大的抑制作用,表明受体衍生的模拟物阻断配体与其受体的结合不同于配体模拟物。一种OPG模拟物(OP3-4)被显示出结合RANKL和RANK,降低RANKL与RANK的结合并且在体外和体内抑制破骨细胞形成,从而发挥RANKL/RANK拮抗剂的作用。这种拮抗作用的一种潜在机制是经由RANK/RANKL受体复合物的改变,OP3-4可以通过改变受体取向或作为“间隔物”来防止细胞质结构域相互作用,以介导有缺陷的复合物,导致减少的下游信号传递。

[0015] 筛选可变长度的随机肽的文库的针对RANK的受体结合,以便鉴定RANKL/RANK拮抗剂(Téletchéa等人,2014.*J Bone Miner Res.*29(6):1466-1477)。这些实验展示,两种肽,Pep501和Pep8,在基于细胞的破骨细胞生成测定中表现出强活性。Aoki等人(2006,*J Clin Invest.*116(6):1525-1534)报道了一种被设计成模拟与TNF结合的TNFR的CRD3配体接触表面的环肽;他们展示出这种WP9QY肽也抑制RANKL诱导的信号传递。虽然肽WP9QY抑制RANKL诱导的信号传递,但它未阻断RANKL与RANK的结合。为了解释这种明显的差异,分子建模预测定位于RANK CRD3的结合位点的肽WP9QY将可能干扰所提出的配体诱导的受体细胞质结

构域的聚集,从而发挥RANKL/RANK拮抗剂的作用。

[0016] 鉴于使用拮抗性抗RANK抗体的非预期的受体激动的可能性,靶向RANKL的抗体是优选的(Lacey等人,2012,同上)。然而,使用噬菌体展示技术鉴定出针对RANK ECD的单链Fv(scFv)抗体(Newa等人,2014.Mol Pharm.11(1):81-89)。此外,在(小鼠)RAW264.7测定中,抗RANK scFv阻断RANKL依赖性破骨细胞形成活性。然而,抗RANK scFv是影响RANKL与RANK的结合还是替代地改变RANK受体复合物和下游信号转导尚不清楚。随后,Chypre等人(2016,Immunol Lett.171:5-14)通过在Kabat位置82处插入缺失密码子(missing codon)并在人类IgG1重链和轻链骨架上表达将抗RANK scFv工程化(现更名为RANK-02),并且比较结合特性以及体外和体内测定以解决激动特性与拮抗特性。RANK-02阻断RANKL的能力在ELISA中被证实,但是当在Jurkat huRANK:Fas测定中测试抗体的活性时,RANK-02令人失望地展示出激动活性。体内测试表明,在破骨细胞TRAP形成中,RANK-02既不阻断也不增强RANKL依赖性增加。这些数据表明,抗体与RANK ECD的结合或在体外阻断RANKL的能力都不能预测在基于细胞的测定或体内测定中的拮抗活性。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明部分地基于结合RANK并拮抗RANKL/RANK信号传递途径的抗原结合分子的开发。这些拮抗性抗原结合分子可单独使用或与其他剂组合使用,用于治疗或抑制与RANKL/RANK信号传递途径的活化相关的状况的发展,用于刺激或增强免疫,用于抑制免疫抑制或对肿瘤的耐受性的发展或进展,或用于抑制癌症的发展、进展或复发,如下文描述的。

[0019] 因此,在一方面,本发明提供了合适地结合RANK并拮抗RANKL/RANK信号传递途径的抗原结合分子。这些抗原结合分子通常包含:

[0020] (1) 包含SEQ ID NO:3中列出的VHCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:4中列出的VHCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:5中列出的VHCDR3氨基酸序列的重链可变区(V_H);以及包含SEQ ID NO:6中列出的VLCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:7中列出的VLCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:8中列出的VLCDR3氨基酸序列的轻链可变区(V_L);

[0021] (2) 包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的 V_L ;

[0022] (3) 与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%(包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比)序列同一性的 V_H 和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%(包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比)序列同一性的 V_L ;

[0023] (4) 与SEQ ID NO:1的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的氨基酸序列具有至少90%(包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比)序列同一性的 V_H ,以及与SEQ ID NO:2的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的氨基酸序列具有至少90%(包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比)序列同一性的 V_L ;或

[0024] (5) 包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的序列中包含一个或更多个(例如,1个、2个、3个、4个或5个)氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列的 V_H ,和包含在SEQ ID NO:2的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的序列中包含一个或更多个(例如,1个、2个、3个、4个或5个)氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列的 V_L 。

[0025] 抗原结合分子可以为分离的、纯化的、合成的或重组的形式。在特定实施方案中,

抗原结合分子是单价抗原结合分子(例如,Fab、scFab、Fab'、scFv、单臂抗体等)。

[0026] 抗原结合分子合适地包括以下活性中的任一种或更多种:(a)抑制RANKL与RANK的结合;(b)抑制RANK活化;(c)抑制下游RANK介导的分子信号传递(例如,RANK募集TRAF蛋白);(d)抑制RANK多聚化;(e)减少破骨细胞分化;(f)降低破骨细胞活化;(g)减少破骨细胞存活;(h)抑制骨质流失并增加骨密度;(i)抑制肿瘤微环境(TME)中骨髓细胞或其他免疫细胞的免疫抑制活性;和(j)抑制肿瘤细胞(例如,乳腺癌细胞,包括激素受体阴性(例如,ER-;PR-;HER2-;ER-,PR-;ER-,HER2-;PR-,HER2-;和ER-,PR-,HER2-)乳腺癌细胞、包括三阴性乳腺癌(TNBC)细胞和/或BRCA-1突变阳性乳腺癌细胞;前列腺癌细胞;NSCLC细胞,包括KRAS突变或KRAS和LKB1突变NSCLC肿瘤亚型;和RCC细胞、包括ccRCC细胞)的增殖、迁移、存活和/或形态发生。

[0027] 在一些实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子被包含在递送媒介物(例如,脂质体、纳米颗粒、微米颗粒、树枝状聚合物或环糊精)中。

[0028] 本发明的另一方面提供了分离的多核苷酸,该分离的多核苷酸包含编码本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子的核酸序列。

[0029] 本发明的又一方面提供了构建体,该构建体包含与一个或更多个控制序列可操作地连接的编码本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子的核酸序列。合适的构建体优选地为表达构建体(其代表性实例包括质粒、黏粒、噬菌体和病毒)的形式。

[0030] 在另一方面,本发明提供了包含构建体的宿主细胞,所述构建体包含与一个或更多个控制序列可操作地连接的编码本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子的核酸序列。

[0031] 本发明的又一方面提供了药物组合物,该药物组合物包含本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和药学上可接受的载体。在一些实施方案中,组合物还包含至少一种选自以下的辅助剂:骨抗再吸收剂(例如,合成代谢增强剂,特别是选自由甲状旁腺激素、BMP2、维生素D、抗炎剂组成的组;和分解代谢抑制剂,特别是选自由双膦酸盐(bisphosphonates)、组织蛋白酶K抑制剂、p38抑制剂、JNK抑制剂、IKK抑制剂、NF- κ B抑制剂、钙调磷酸酶抑制剂、NFAT抑制剂、PI3K抑制剂组成的组)和化学治疗剂(例如,抗增殖/抗肿瘤药物、细胞生长抑制剂、抑制癌细胞侵袭的剂、生长因子功能抑制剂、抗血管生成剂、血管损伤剂等)或免疫治疗剂(例如,细胞因子、表达细胞因子的细胞、抗体等)。

[0032] 本发明的另外的方面提供了用于抑制RANKL与表达RANK的细胞结合的方法。这些方法通常包括使表达RANK的细胞与本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制RANKL与表达RANK的细胞的结合。

[0033] 在相关方面,本发明提供了用于抑制表达RANK的细胞上RANK的活化的方法。这些方法通常包括使表达RANK的细胞与本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制表达RANK的细胞上RANK的活化。

[0034] 在另一相关方面,本发明提供了用于抑制表达RANK的细胞中的RANK介导的分子信号传递(例如,RANK募集TRAF蛋白)的方法。这些方法通常包括使表达RANK的细胞与本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制表达RANK的细胞中的RANK介导的分子信号传递。

[0035] 在又一相关方面,本发明提供了用于抑制表达RANK的细胞中的RANK多聚化的方法。这些方法通常包括使表达RANK的细胞与本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从

而抑制表达RANK的细胞中的RANK多聚化。

[0036] 代表性的表达RANK的细胞包括破骨细胞、免疫细胞诸如抗原呈递细胞(例如,单核细胞和树突细胞)和效应免疫细胞(例如,T细胞)、造血前体细胞和肿瘤细胞(例如,乳腺癌细胞,包括激素受体(HR)阴性(例如,ER⁻;PR⁻;HER2⁻;ER⁻,PR⁻;ER⁻,HER2⁻;PR⁻,HER2⁻;和ER⁻,PR⁻,HER2⁻)乳腺癌细胞,包括三阴性乳腺癌(TNBC)细胞和/或BRCA-1突变阳性乳腺癌细胞;前列腺癌细胞;NSCLC细胞,包括KRAS突变或KRAS和LKB1突变NSCLC肿瘤亚型;以及RCC细胞,包括ccRCC细胞)。

[0037] 在又一相关方面,本发明提供了用于抑制破骨细胞的分化、活化和/或存活的方法。这些方法通常包括使破骨细胞与本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制破骨细胞的分化、活化和/或存活。

[0038] 在另一相关方面,本发明提供了用于抑制免疫细胞(例如,骨髓细胞或Treg)的免疫抑制活性的方法。这些方法通常包括使免疫细胞与本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制免疫细胞的免疫抑制活性。

[0039] 在还另一相关方面,本发明提供了用于抑制肿瘤细胞的增殖、存活或迁移的方法。这些方法通常包括使肿瘤细胞与本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子接触,从而抑制肿瘤细胞的增殖、存活或迁移。

[0040] 本发明的还另一方面提供了用于治疗或抑制受试者中与RANKL/RANK信号传递途径的活化相关的状况的发展的方法。这些方法通常包括向受试者施用有效量的本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,从而治疗或抑制状况的发展。在特定实施方案中,与RANKL/RANK信号传递途径活化相关的状况选自骨质减少性紊乱、肌病和癌症。

[0041] 在相关方面,本发明提供了用于治疗或抑制受试者中的骨质流失的发展的方法。这些方法通常包括向受试者施用有效量的本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,从而治疗或抑制骨质流失的发展。

[0042] 在另一相关方面,本发明提供了用于治疗或抑制受试者中的癌症的发展的方法,其中所述癌症与RANKL/RANK信号传递途径的活化相关。这些方法通常包括向受试者施用有效量的本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,从而治疗或抑制癌症的发展。在特定实施方案中,癌症选自乳腺癌,包括HR阴性(例如,ER⁻;PR⁻;HER2⁻;ER⁻,PR⁻;ER⁻,HER2⁻;PR⁻,HER2⁻;和ER⁻,PR⁻,HER2⁻)乳腺癌、BRCA-1突变阳性乳腺癌、HR阴性(例如,ER⁻;PR⁻;HER2⁻;ER⁻,PR⁻;ER⁻,HER2⁻;PR⁻,HER2⁻;和ER⁻,PR⁻,HER2⁻)且BRCA-1突变阳性乳腺癌;前列腺癌;NSCLC,包括KRAS突变或KRAS和LKB1突变NSCLC;和RCC细胞,包括ccRCC。

[0043] 本发明人在2018年6月5日提交的共同未决的国际申请第PCT/AU2018/050557号中公开了共拮抗RANKL/RANK和免疫检查点分子(ICM)导致对癌症的免疫应答的协同增强,该国际申请的内容通过引用以其整体并入本文。

[0044] 因此,在另一方面,本发明提供了一种治疗剂组合,该治疗剂组合包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子。治疗剂组合可以是单一组合物(例如,混合物)的形式,其包含RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子中的每一种。可选地,RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子可以作为单独组合物中的独立组分提供。

[0045] 至少一种抗ICM抗原结合分子合适地拮抗选自以下组成的组的ICM:程序性死亡

1受体(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)、程序性死亡配体2(PD-L2)、细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)、A2A腺苷受体(A2AR)、A2B腺苷受体(A2BR)、B7-H3(CD276)、含V-set结构域的T细胞活化抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞弱化因子(BTLA)、吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、淋巴细胞活化基因3(LAG3)、T细胞免疫球蛋白结构域和黏蛋白结构域3(TIM-3)、T细胞活化的V结构域Ig抑制因子(VISTA)、5'-核苷酸酶(CD73)、tactile(CD96)、脊髓灰质炎病毒受体(CD155)、DNAX辅助分子-1(DNAM-1)、脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白2(CD112)、细胞毒性和调节性T细胞分子(CRTAM)、肿瘤坏死因子受体超家族成员4(TNFRSF4;OX40;CD134)、肿瘤坏死因子(配体)超家族成员4(TNFRSF4;OX40配体(OX40L))、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、CD160、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白配体(GITRL)、诱导型共刺激因子(ICOS)、半乳糖素9(GAL-9)、4-1BB配体(4-1BBL;CD137L)、4-1BB(4-1BB;CD137)、CD70(CD27配体(CD27L))、CD28、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、信号调节蛋白(SIRP-1)、整合素相关蛋白(IAP;CD47)、B淋巴细胞活化标志物(BLAST-1;CD48)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、CD40、CD40配体(CD40L)、疱疹病毒进入介质(HVEM)、跨膜和含免疫球蛋白结构域蛋白2(TMIGD2)、HERV-H LTR-相关蛋白2(HHLA2)、血管内皮生长抑制因子(VEGI)、肿瘤坏死因子受体超家族成员25(TNFRSF25)、诱导型T细胞共刺激因子配体(ICLG;B7RP1)和具有Ig和ITIM(免疫受体酪氨酸基抑制基序)结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)。在一些实施方案中,至少一种抗ICM抗原结合分子选自PD-1拮抗性抗原结合分子、PD-L1拮抗性抗原结合分子和CTLA4拮抗性抗原结合分子。在一些实施方案中,至少一种抗ICM抗原结合分子包括PD-1拮抗性抗原结合分子。在一些实施方案中,至少一种抗ICM抗原结合分子包括PD-L1拮抗性抗原结合分子。在某些实施方案中,至少一种抗ICM抗原结合分子包括PD-1拮抗性抗原结合分子和PD-L1拮抗性抗原结合分子。在一些实施方案中,至少一种抗ICM抗原结合分子包括CTLA4拮抗性抗原结合分子。在其他实施方案中,至少一种抗ICM抗原结合分子包括PD-1拮抗性抗原结合分子和CTLA4拮抗性抗原结合分子。在其他实施方案中,至少一种抗ICM抗原结合分子包括PD-L1拮抗性抗原结合分子和CTLA4拮抗性抗原结合分子。在特定实施方案中,抗ICM抗原结合分子拮抗Treg细胞缺乏表达或以低水平表达的ICM。在一些相同和其他的实施方案中,抗ICM抗原结合分子拮抗在Treg上以比CTLA4低的水平表达的ICM(例如,PD-1或PD-L1)。在一些相同和其他的实施方案中,抗ICM抗原结合分子拮抗在免疫效应细胞(例如,效应T细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞等)上以比Treg上高的水平表达的ICM(例如,PD-1或PD-L1)。在这些实施方案的代表性实例中,至少一种抗ICM抗原结合分子拮抗选自PD-1和PD-L1中的一种或两种的ICM。许多抗ICM抗原结合分子是本领域已知的,它们中的任一种都可以用于本发明的实践。

[0046] 在特定实施方案中,抗ICM抗原结合分子选自抗PD-1抗原结合分子、抗PD-L1抗原结合分子和抗CTLA4抗原结合分子。

[0047] 抗PD-1抗原结合分子可以是MAb,该MAb的非限制性实例包括纳武单抗、派姆单抗、pidilizumab和MEDI-0680(AMP-514)、AMP-224、JS001-PD-1、SHR-1210、Gendor PD-1、PDR001、CT-011、REGN2810、BGB-317或其抗原结合片段。可选地,抗PD-1抗原结合分子可以是与纳武单抗、派姆单抗、pidilizumab或MEDI-0680竞争结合PD-1的分子。

[0048] 在一些实施方案中,抗PD-1抗原结合分子特异性地结合SEQ ID NO:9(即,SEQ ID

NO:10中列出的天然PD-1序列的残基62至86)中列出的氨基酸序列的一个或更多个氨基酸和/或SEQ ID NO:11(即,SEQ ID NO:10中列出的天然PD-1序列的残基118至136)中列出的氨基酸序列的一个或更多个氨基酸。在一些相同实施方案和其他实施方案中,抗PD-1抗原结合分子特异性地结合SEQ ID NO:12(即,对应于SEQ ID NO:10中列出的天然PD-1序列的残基66至97)中列出的氨基酸序列的一个或更多个氨基酸。

[0049] 在一些实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子是MAb,所述MAb的非限制性实例包括德瓦鲁单抗(MEDI4736)、阿特朱单抗(Tecentriq)、阿维鲁单抗、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480和MPDL3280A或其抗原结合片段。在这种类型的说明性实例中,抗PD-L1抗原结合分子特异性地结合SEQ ID NO:13(即,SEQ ID NO:14中列出的全长天然PD-L1氨基酸序列的残基279至290)中列出的氨基酸序列的一个或更多个氨基酸。可选地,抗PD-L1抗原结合分子可以是与德瓦鲁单抗(MEDI4736)、阿特朱单抗(Tecentriq)、阿维鲁单抗、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480和MPDL3280A中的任一种竞争结合PD-L1的分子。

[0050] 在一些实施方案中,抗CTLA4抗原结合分子是MAb,所述MAb的代表性实例包括伊匹单抗和tremelimumab或其抗原结合片段。可选地,抗CTLA4抗原结合分子可以是与伊匹单抗或tremelimumab竞争结合CTLA4的分子。在这种类型的说明性实例中,抗CTLA4抗原结合分子特异性地结合选自SEQ ID NO:15(即,SEQ ID NO:16中列出的全长天然CTLA4氨基酸序列的残基25至42)、SEQ ID NO:17(即,SEQ ID NO:16中列出的天然CTLA4序列的残基43至65)和SEQ ID NO:18(即,SEQ ID NO:16中列出的天然CTLA4序列的残基96至109)中任一种中列出的序列的氨基酸序列中的一个或更多个氨基酸。

[0051] 在一些实施方案中,治疗剂组合包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和抗PD-1抗原结合分子。在其他实施方案中,治疗剂组合包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子。在还其他实施方案中,治疗剂组合包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子、抗PD-1抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子。在还其他实施方案中,治疗剂组合包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子、抗PD-1抗原结合分子和抗CTLA4抗原结合分子。在其他实施方案中,治疗剂组合包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子。

[0052] 在一些实施方案中,其中RANK抗原结合分子或ICM抗原结合分子连接到免疫球蛋白恒定链(例如,IgG1恒定链、IgG2a恒定链、IgG2b恒定链、IgG3恒定链或IgG4恒定链)。免疫球蛋白恒定链可以包括选自 κ 轻链或 λ 轻链的轻链;以及选自 γ 1重链、 γ 2重链、 γ 3重链和 γ 4重链的重链。

[0053] 在某些实施方案中,治疗剂组合包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和两种或更多种不同的抗ICM抗原结合分子。在这种类型的代表性实例中,治疗剂组合包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子以及抗CTLA4抗原结合分子、抗PD-1抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子中的至少两种。

[0054] 治疗剂组合的组分可以为独立组分的形式。可选地,它们可以彼此融合或以其他

方式缀合(直接地或间接地)。

[0055] 在特定实施方案中,治疗剂组合为多特异性拮抗剂的形式,包含本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子。多特异性剂可以是两种或更多种多肽的复合物。可选地,多特异性剂可以是单链多肽。RANK拮抗性抗原结合分子可以被缀合到个体抗ICM抗原结合分子的N末端或C末端。RANK拮抗性抗原结合分子和抗ICM抗原结合分子可以直接连接或通过中间接头(例如,多肽接头)连接。在有利的实施方案中,多特异性拮抗剂包含至少两种抗原结合分子。合适地,多特异性抗原结合分子的个体组成部分是重组分子的形式,包括嵌合、人源化的和人类抗原结合分子。

[0056] 在相关方面,本发明提供了用于共拮抗RANK和至少一种ICM的多特异性抗原结合分子。这些多特异性抗原结合分子通常包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子。RANK拮抗性抗原结合分子合适地是特异性地结合并拮抗RANK的抗体或其抗原结合片段。个体抗ICM抗原结合分子合适地选自特异性地结合并拮抗对应ICM的抗体或抗原结合片段。抗体和/或抗原结合片段可以直接连接或通过中间接头(例如,化学接头或多肽接头)连接。个体多特异性抗原结合分子可以是单链多肽的形式,其中抗体或抗原结合片段可操作地连接。可选地,它可以包含多于一个相互连接或以其他方式缔合形成复合物的独立多肽链。在一些相同和其他的实施方案中,多特异性抗原结合分子是二价、三价或四价的。

[0057] 设想用于多特异性抗原结合分子的抗原结合片段可以选自Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv分子以及互补决定区(CDR)。在一些实施方案中,个体抗体或其抗原结合片段包含独立地选自IgG、IgM、IgD、IgA和IgE组成的组的恒定结构域。多特异性抗原结合分子的非限制性实例合适地包括串联scFv(taFv或scFv₂)、双抗体(diabody)、dAb₂/VHH₂、knobs-in-holes衍生物、Seedcod-IgG、异Fc-scFv、Fab-scFv、scFv-Jun/Fos、Fab'-Jun/Fos、三抗体(tribody)、DNL-F(ab)₃、scFv₃-C_H1/C_L、Fab-scFv₂、IgG-scFab、IgG-scFv、scFv-IgG、scFv₂-Fc、F(ab')₂-scFv₂、scDB-Fc、scDb-C_H3、Db-Fc、scFv₂-H/L、DVD-Ig、tandAb、scFv-dhlx-scFv、dAb₂-IgG、dAb-IgG、dAb-Fc-dAb、tandab、DART、BiKE、TriKE、mFc-V_H、交联MAb、CrossMAb、MAb₂、FIT-Ig、静电匹配的抗体、对称IgG样抗体、LUZ-Y、Fab交换抗体或它们的组合。

[0058] 合适的抗原结合片段可以连接到免疫球蛋白恒定链(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4)。在这种类型的代表性实例中,免疫球蛋白恒定链可以包括选自κ轻链或λ轻链的轻链;和/或选自γ1重链、γ2重链、γ3重链和γ4重链的重链。

[0059] 在其中多特异性抗原结合分子拮抗PD-1的一些实施方案中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段特异性地结合选自SEQ ID NO:9(即,SEQ ID NO:10中列出的天然人类PD-1序列的残基62至86)、SEQ ID NO:11(即,SEQ ID NO:10中列出的天然人类PD-1序列的残基118至136)和SEQ ID NO:12(即,对应于SEQ ID NO:10中列出的天然人类PD-1序列的残基66至97)的氨基酸序列的一个或更多个氨基酸。

[0060] 在一些相同和其他的实施方案中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段包含选自纳武单抗、派姆单抗、pidilizumab和MEDI-0680(AMP-514)、AMP-224、JS001-PD-1、SHR-1210、Gendor PD-1、PDR001、CT-011、REGN2810、BGB-317的MAb或其抗原结合片段的重链和轻链。

[0061] 在其中多特异性抗原结合分子拮抗PD-L1的一些实施方案中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段特异性地结合SEQ ID NO:13(即,SEQ ID NO:14中列出的天然人类PD-L1氨基酸

序列的残基279至290)中列出的氨基酸序列的一个或多个氨基酸。这种类型的说明性抗体和抗原结合片段包括包含选自德瓦鲁单抗(MEDI4736)、阿特朱单抗(Tecentriq)、阿维鲁单抗、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480和MPDL3280A的MAb或其抗原结合片段的重链和轻链的那些。

[0062] 在其中多特异性抗原结合分子拮抗CTLA4的一些实施方案中,抗CTLA4抗体或其抗原结合片段特异性地结合选自SEQ ID NO:15(即,SEQ ID NO:16中列出的全长天然PD-CTLA4氨基酸序列的残基25至42)、SEQ ID NO:17(即,SEQ ID NO:16中列出的天然CTLA4序列的残基43至65)和SEQ ID NO:18(即,SEQ ID NO:16中列出的天然CTLA4序列的残基96至109)的氨基酸序列的一个或多个氨基酸。这种类型的说明性抗体和抗原结合片段包括包含选自伊匹单抗和tremelimumab的MAb或其抗原结合片段的重链和轻链的那些。

[0063] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和抗PD-1抗原结合分子。在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和抗PD-1抗原结合分子。在还其他实施方案中,多特异性抗原结合分子包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子、抗PD-1抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子。在还其他实施方案中,多特异性抗原结合分子包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子、抗PD-1抗原结合分子和抗CTLA4抗原结合分子。在其他实施方案中,多特异性抗原结合分子包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子。

[0064] 在另一方面,本发明提供了产生如上文和本文其他地方广泛描述的治疗剂组合的方法。这些方法通常包括组合本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子,从而产生治疗剂组合。在一些实施方案中,该方法包括包括产生治疗剂组合的特异性地结合并拮抗靶多肽(例如,RANK或ICM)的抗原结合分子(例如,通过用免疫多肽免疫动物,所述免疫多肽包含对应于靶多肽的氨基酸序列;以及从动物鉴定和/或分离特异性地结合靶多肽或其至少一个区域的B细胞;并且产生由该B细胞表达的抗原结合分子)。在非限制性实例中,该方法还包括将如此产生的抗原结合分子进行衍生,以产生与抗原结合分子具有相同的表位结合特异性的衍生抗原结合分子。衍生抗原结合分子可以选自抗体片段,所述抗体片段的说明性实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链Fv(scFv)、单臂和结构域抗体(包括例如鲨鱼抗体和骆驼抗体)、和包含抗体的融合蛋白、以及包含抗原结合/识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰配置。

[0065] 在一些实施方案中,治疗剂组合或多特异性抗原结合分子被包含在递送媒介物(例如,脂质体、纳米颗粒、微米颗粒、树枝状聚合物或环糊精)中。

[0066] 在还另一方面,本发明提供了构建体,该构建体包含与一个或多个控制序列可操作地连接的编码如本文描述的多特异性抗原结合分子的核酸序列。合适的构建体优选地为表达构建体(其代表性实例包括质粒、黏粒、噬菌体和病毒)的形式。

[0067] 本发明的还另一方面提供了包含构建体的宿主细胞,所述构建体包含与一个或多个控制序列可操作地连接的编码如本文描述的多特异性抗原结合分子的核酸序列。

[0068] 在另一方面,本发明提供了药物组合物,该药物组合物包含如上文广泛描述的治

疗剂组合或多特异性抗原结合分子以及药学上可接受的载体。在一些实施方案中,组合物还包含至少一种选自以下的辅助剂:化学治疗剂(例如,选自抗增殖/抗肿瘤药物、细胞生长抑制剂、抑制癌细胞侵袭的剂、生长因子功能抑制剂、抗血管生成剂、血管损伤剂等)或免疫治疗剂(例如,细胞因子、表达细胞因子的细胞、抗体等)。

[0069] 本发明的还另一方面提供了用于刺激或增强受试者的免疫的方法。这些方法通常包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向受试者施用有效量的如本文描述的治疗剂组合或多特异性抗原结合分子,从而刺激或增强受试者的免疫。在实施方案中,其中治疗剂组合的RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子作为独立组分提供,该组分合适地被并行施用至受试者。在这种类型的说明性实例中,RANK拮抗性抗原结合分子与至少一种抗ICM抗原结合分子同时施用。在其他说明性实例中,RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子被顺序施用。例如,可以在施用至少一种抗ICM抗原结合分子之前施用RANK拮抗性抗原结合分子。合适地,在施用至少一种抗ICM抗原结合分子之后施用RANK拮抗性抗原结合分子。

[0070] 通常,刺激或增强的免疫包括有益的宿主免疫应答,有益的宿主免疫应答的说明性实例包括以下中的任一种或更多种:肿瘤尺寸的减少;肿瘤负荷的减少;疾病的稳定;产生针对内源性抗原或外源性抗原的抗体;免疫系统的诱导;免疫系统的一种或更多种组成部分的诱导;细胞介导的免疫及参与其产生的分子;体液免疫及参与其产生的分子;抗体依赖性细胞毒性(ADCC)免疫及参与其产生的分子;补体介导的细胞毒性(CDC)免疫及参与其产生的分子;自然杀伤细胞;细胞因子和趋化因子及参与其产生的分子和细胞;抗体依赖性细胞毒性;补体依赖性细胞毒性;自然杀伤细胞活性和抗原增强的细胞毒性。在这种类型的代表性实例中,刺激或增强的免疫包括促炎性免疫应答。

[0071] 本发明的又一方面提供了用于抑制受试者中免疫抑制或对肿瘤的耐受性的发展或进展的方法。这些方法通常包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:使肿瘤与本文描述的治疗剂组合或多特异性抗原结合分子接触,从而抑制受试者中免疫抑制或对肿瘤的耐受性的发展或进展。合适地,治疗剂组合或多特异性抗原结合分子还接触向免疫系统呈递肿瘤抗原的抗原呈递细胞(例如,树突细胞)。

[0072] 本发明的另外的方面提供了用于抑制受试者的癌症的发展、进展或复发的方法。这些方法通常包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向受试者施用有效量的本文描述的治疗剂组合或多特异性抗原结合分子,从而抑制受试者的癌症的发展、进展或复发。

[0073] 在相关方面,本发明提供了用于治疗受试者的癌症的方法。这些方法通常包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向受试者施用有效量的本文描述的治疗剂组合或多特异性抗原结合分子,从而治疗癌症。

[0074] 可以根据本发明治疗的癌症的非限制性实例包括黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌和子宫癌、胃癌或胃部癌(gastric or stomach cancer)、胰腺癌、前列腺癌、唾液腺癌、肺癌、肝细胞癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤(hepatoma)、直肠癌、结肠直肠癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、肝肿瘤(hepatic carcinoma)、肛门癌、阴茎癌、睾丸癌、食道癌、胆道肿瘤、头颈癌和鳞状细胞癌。在一些特定实施方案中,癌症是转移癌。

[0075] 在涉及向受试者施用治疗剂组合或多特异性抗原结合分子的任何以上方面,受试

者对免疫调节剂具有合适地降低或受损的响应性,例如受试者对ICM分子拮抗剂(例如,抗PD-1或抗PD-L1免疫疗法)具有降低或受损的响应性。

[0076] 在本发明的一些方法中,有效量的辅助抗癌剂被并行施用至受试者。一些合适的辅助抗癌剂包括化学治疗剂、外照射(external beam radiation)、靶向放射性同位素和信号转导抑制剂。然而,任何其他已知的抗癌剂同样适用于本发明的方法。

[0077] 在另外的方面,本发明提供了用于刺激或增强受试者的免疫、用于抑制受试者中免疫抑制或对肿瘤的耐受性的发展或进展或用于治疗受试者的癌症的试剂盒。这些试剂盒包括如上文和本文其他地方广泛描述的治疗剂组合、药物组合物和多特异性抗原结合分子中的任一种或更多种。

[0078] 附图简述

[0079] 图1是示出抗RANK噬菌粒克隆对人类RANK-Fc[RANK AA序列30-212]或小鼠RANK-Fc[RANK AA序列31-214]的反应性的ELISA的图形表示。在ELISA中,使用100 μ L/孔的噬菌体溶液进行单点分析(ELISA方法根据Panousis等人,2016,同下)。Y轴是O.D.A450 nm。通过ELISA测试噬菌粒-Fab克隆的靶结合。将MTPBS pH 7.3中的2 μ g/mL的纯化的RANK-Fc或不相关的人类IgG抗体在4 $^{\circ}$ C过夜包被到96孔MaxiSorpTM ELISA(Thermo Fischer Scientific 439454)板上。将板在37 $^{\circ}$ C用200 μ L/孔的5%脱脂牛奶/PBST封闭2h,用PBST洗涤两次,然后在室温用噬菌体上清液(100 μ L/孔)孵育90min。将噬菌体上清液用脱脂牛奶/PBST以1:2稀释。将板用PBST洗涤5次,然后用PBST中1:10,000稀释的抗M13-HRP抗体(Sino biological/Jomar 11973-MM05-100)孵育。将板用PBST洗涤6次,并且用100 μ L TMB/E底物(Merck Millipore ES001-500ML)进行信号显影。用2M磷酸(50 μ L/孔)停止反应,并在450nm处测量。

[0080] 图2是示出RANKL对抗RANK噬菌粒R03A03结合人类RANK-Fc的抑制的图形表示。添加重组可溶性人类RANKL至1 μ M的最终孔浓度。如先前描述的进行竞争噬菌体ELISA,除了在添加50 μ L/孔的噬菌体上清液之前,每孔添加相等体积的4%脱脂牛奶/PBST中的2 μ M的竞争RANKL蛋白。值是一式两份确定的平均值。

[0081] 图3是示出抗RANK 3A3抗体对人类RANKL诱导的体外破骨细胞生成的抑制作用的图形表示。在存在或不存在1000ng/mL至7.8ng/mL的浓度的作为阳性对照的RANK-Fc、IgG2a同种型(isotype)对照、非阻断性抗RANK 3B10 mAb或阻断性抗RANK 3A3抗体的情况下,培养鼠BM细胞。BM细胞的培养在补充有CSF-1和人类RANKL的DMEM中进行。7天后,对TRAP+多核(多于三核)细胞进行计数。数据以一式三份的培养物的平均值 $\pm$ SEM进行分析。

[0082] 图4是示出抗RANK 3A3抗体对小鼠RANKL诱导的体外破骨细胞生成的抑制作用的图形表示。在存在或不存在1000ng/mL至7.8ng/mL的浓度的作为阳性对照的抗 μ RANKL IK22-5 mAb、IgG2a同种型对照、非阻断性抗RANK 3B10 mAb或阻断性抗RANK 3A3抗体的情况下,培养鼠BM细胞。BM细胞的培养在补充有CSF-1和小鼠RANKL的DMEM中进行。7天后,对TRAP+多核(多于三核)细胞进行计数。数据以一式三份的培养物的平均值 $\pm$ SEM进行分析。

[0083] 图5是示出抗PD-L1 mAb和抗RANK (3A3) mAb的组合限制肿瘤皮下生长的图形表示。C57BL/6WT小鼠组在第0天被皮下注射MCA1956(1×10^6 个细胞)。然后在第10天、第14天、第18天和第22天用指示的cIg(2A3 200 μ g i.p.(腹膜内));单独的抗PD-L1抗体(10F9G2大鼠IgG2b,50 μ gi.p.);单独的抗RANK抗体(3A3小鼠IgG1D265A,200 μ g i.p.)或它们的组合对小鼠进行i.p.处理。使用数显卡尺测量肿瘤生长,并且肿瘤尺寸以每组5-6只小鼠的平均值 $\pm$

SEM表示。

[0084] 图6是示出抗PD-L1 mAb和抗RANK (3A3) mAb的组合限制肿瘤皮下生长的图形表示。C57BL/6WT小鼠组在第0天被皮下注射MC38-ova^{dim} (1×10^6 个细胞)。然后在第12天、第16天、第20天和第24天用指示的cIg (2A3 200 μ g i.p.);单独的抗PD-L1抗体 (10F9G2大鼠IgG2b, 50 μ g i.p.);单独的抗RANK抗体 (3A3小鼠IgG1D265A, 200 μ g i.p.)或它们的组合对小鼠进行i.p.处理。使用数显卡尺测量肿瘤生长,并且肿瘤尺寸以每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM表示。

[0085] 一些图和文本包含颜色表示或实体。彩色图可在提出要求后从本申请人或从合适的专利局获得。如果从专利局获得,可能会收取费用。

[0086] 发明详述

[0087] 1. 定义

[0088] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。尽管与本文描述的方法和材料相似或等效的任何方法和材料都可以用于实践或测试本发明,但描述了优选的方法和材料。为了本发明的目的,在下文中定义了以下术语。

[0089] 冠词“一(a)”和“一(an)”在本文中用于指一个/一种或多于一个/多于一种(即至少一个/至少一种)的该冠词的语法对象。举例来说,“要素(an element)”意指一个要素或多于一个要素。

[0090] “约”意指对于参照数量、水平、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度,变化最多15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数量、水平、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度。

[0091] 术语“并行施用(administration concurrently)”或“并行施用(administering concurrently)”或“共施用(co-administering)”等是指含有两种或更多种活性物质的单一组合物的施用,或各活性物质同期地(contemporaneously)或同时地(simultaneously)或在足够短的时间段内顺序地作为单独组合物和/或通过各自的途径递送而施用,有效结果等同于当所有这些活性物质作为单一组合物施用时获得的结果。“同时地(simultaneously)”意指活性剂基本上在同一时间被施用并且合意地在同一制剂中一起被施用。“同期地”意指,活性剂在时间上紧密地被施用,例如,一种剂在另一种之前或之后约1分钟内至约1天内被施用。任何同时期的时间都是可用的。然而,通常情况将是,当不同时施用时,剂将在约1分钟内至约8小时内并且合适地在小于约1小时至约4小时内被施用。当同期地施用时,剂合适地被施用在受试者的同一部位。术语“同一部位”包括精确的位置,但可以在约0.5厘米至约15厘米以内,优选地在约0.5厘米至约5厘米以内。如本文使用的术语“分别地(separately)”意指,剂以间隔被施用,例如以约一天至若干周或若干月的间隔被施用。活性剂可以以任何顺序施用。如本文使用的术语“顺序地(sequentially)”意指,剂按顺序被施用,例如以数分钟、数小时、数天或数周的一个或更多个间隔被施用。如果合适,活性剂可以有规律的重复周期被施用。

[0092] 如本文使用的,“和/或”是指并涵盖一个或更多个相关列出的项目的任何和所有可能的组合,以及当以可选的(或)解释时缺少组合。

[0093] 术语“拮抗剂”以最广泛的意义使用,并且包括在包括体外、原位或体内的任何情

况中部分或完全地阻断、抑制、停止、减弱、减少、阻碍、削弱或中和RANK或ICM的一种或更多种生物活性或功能(诸如但不限于结合、信号传递、复合物的形成、增殖、迁移、侵入、存活或存活力)的任何分子。同样地,术语“拮抗(antagonize)”、“拮抗(antagonizing)”等在本文中可互换地使用,以指阻断、抑制、停止、减弱、减少、阻碍、削弱或中和如例如上文和本文其他地方描述的活性或功能。举例来说,“拮抗”可以指活性或功能降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0094] 如本文使用的术语“抗体”意指任何抗原结合分子或分子复合物,其包含至少一个特异性地结合特定抗原(例如,RANK或ICM)或与特定抗原(例如,RANK或ICM)相互作用的互补决定区(CDR)。术语“抗体”包括免疫球蛋白分子,其包含四条多肽链(通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链)以及它们的多聚体(例如,IgM)。每条重链包含重链可变区(其可以缩写为HCVR或 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域, C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链包含轻链可变区(其可以缩写为LCVR或 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(C_{L1})。 V_H 区和 V_L 区可以被进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的高变区,其中散布着被称为框架区(FR)的较保守的区域。每个 V_H 和 V_L 包含3个CDR和4个FR,按以下顺序从氨基末端向羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施方案中,本发明的抗体的FR(或其抗原结合部分)可以与人类种系序列相同或者可以被天然修饰或人工修饰。氨基酸共有序列可以基于两个或更多个CDR的并列分析来定义。

[0095] 抗体包括任何类别的抗体,诸如IgG、IgA或IgM(或其亚类),并且抗体不必属于任何特定类别。取决于抗体重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以被分为不同的类别。存在五大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的若干种可以被进一步分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定区分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。

[0096] 如本文使用的,术语“抗原”及其语法等同表述(例如,“抗原性”)是指可以被特定体液免疫或细胞免疫的产物(诸如抗体分子或T细胞受体)特异性结合的化合物、组合物或物质。抗原可以是任何类型的分子,包括例如半抗原、简单中间代谢物、糖(例如,低聚糖)、脂质和激素以及大分子,诸如复合碳水化合物(例如,多糖)、磷脂和蛋白。常见的抗原类别包括但不限于病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物和其他寄生物抗原,肿瘤抗原,参与自身免疫性疾病、过敏和移植排斥的抗原,毒素和其他混杂抗原。

[0097] 术语“抗原结合片段”、“抗原结合部分”、“抗原结合结构域”和“抗原结合位点”在本文中可互换地使用,以指抗原结合分子参与抗原结合的部分。这些术语包括任何特异性地结合抗原以形成复合物的天然存在的、可酶促获得的、合成的或遗传工程化的多肽或糖蛋白。抗体的抗原结合片段可以使用任何合适的标准技术(诸如蛋白水解消化或重组遗传工程技术,包括操纵和表达编码抗体可变结构域和任选的恒定结构域的DNA)例如从完整抗体分子中衍生出。这样的DNA是已知的和/或容易从例如商业来源、DNA文库(包括,例如噬菌体抗体文库)获得或者可以合成。DNA可以被测序和化学地操纵或通过使用分子生物学技术进行操纵,例如,以将一个或更多个可变结构域和/或恒定结构域排列成合适的配置,或引入密码子,产生半胱氨酸残基,修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0098] 抗原结合片段的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段;(iii) Fd片

段；(iv) Fv片段；(v) 单链Fv (scFv) 分子；(vi) dAb片段；和(vii) 由模拟抗体高变区(例如，分离的互补决定区(CDR) 诸如CDR3肽) 的氨基酸残基或有限的FR3-CDR3-FR4肽组成的最小识别单元。其他工程化分子，诸如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR接枝抗体、单臂抗体、双抗体、三抗体、四抗体(tetrabody)、微型抗体、纳米抗体(nanobody) (例如，单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块免疫药物(SMIP) 和鲨鱼可变IgNAR结构域，也被包含在如本文使用的表述“抗原结合片段”中。

[0099] 抗体的抗原结合片段通常将包含至少一个可变结构域。可变结构域可以是任何尺寸或氨基酸组成，并且通常将包含至少一个CDR，所述CDR与一个或更多个框架序列相邻或在一个或更多个框架序列的框架内。在具有与 V_L 结构域缔合的 V_H 结构域的抗原结合片段中， V_H 和 V_L 结构域可以以任何合适的排列相对于彼此定位。例如，可变区可以是二聚体的，并且包含 V_H - V_H 、 V_H - V_L 或 V_L - V_L 二聚体。可选地，抗体的抗原结合片段可以包含单体的 V_H 或 V_L 结构域。

[0100] 在某些实施方案中，抗体的抗原结合片段可以包含与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。可存在于本发明的抗体的抗原结合片段中的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性配置包括：(i) V_H - C_{H1} ；(ii) V_H - C_{H2} ；(iii) V_H - C_{H3} ；(iv) V_H - C_{H1} - C_{H2} ；(v) V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ；(vi) V_H - C_{H2} - C_{H3} ；(vii) V_H - C_L ；(viii) V_L - C_{H1} ；(ix) V_L - C_{H2} ；(x) V_L - C_{H3} ；(xi) V_L - C_{H1} - C_{H2} ；(xii) V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ；(xiii) V_L - C_{H2} - C_{H3} ；和(xiv) V_L - C_L 。在可变结构域和恒定结构域的任何配置中，包括上文列出的任何示例性配置，可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接，或者可以通过完整或部分的铰链区或接头区域连接。铰链区可以由至少2个(例如，5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个) 氨基酸组成，其形成单个多肽分子中相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外，本发明的抗体的抗原结合片段可以包含上文列出的任何可变结构域和恒定结构域配置的彼此非共价缔合和/或一个或更多个 V_H 或 V_L 结构域缔合(例如，通过二硫键) 的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体)。多特异性抗原结合分子通常将包含至少两个不同的可变结构域，其中每个可变结构域能够特异性地结合单独抗原或同一抗原上的不同表位。任何多特异性抗原结合分子形式，包括本文公开的示例性的双特异性抗原结合分子形式，可以使用本领域可用的常规技术改变用于本发明的抗体的抗原结合片段的情况。

[0101] “抗原结合分子”意指对靶抗原具有结合亲和力的分子。应理解，该术语延伸至表现出抗原结合活性的免疫球蛋白、免疫球蛋白片段和非免疫球蛋白衍生的蛋白框架。在本发明的实践中可用的代表性抗原结合分子包括抗体及其抗原结合片段。术语“抗原结合分子”包括抗体和抗体的抗原结合片段。

[0102] 术语“双特异性抗原结合分子”是指具有结合同一抗原或两种不同抗原上的两种不同表位的能力的多特异性抗原结合分子。双特异性抗原结合分子可以是二价、三价或四价的。如本文使用的，“价(valent)”、“价(valence)”、“价(valency)”或其其他语法变化形式意指抗原结合分子中抗原结合位点的数目。这些抗原识别位点可以识别相同的表位或不同的表位。二价和双特异性分子在例如Kostelny等人J Immunol 148(1992):1547;Pack和Plückthun Biochemistry 31(1992)1579;Gruber等人J Immunol(1994)5368;Zhu等人Protein Sci 6(1997):781;Hu等人Cancer Res.56(1996):3055;Adams等人Cancer Res.53(1993):4026和McCartney等人Protein Eng.8(1995):301中描述。三价双特异性抗原结合

分子和四价双特异性抗原结合分子也是本领域已知的。参见,例如,Kontermann RE(编著), Springer Heidelberg Dordrecht London New York,第199-216页(2011)。双特异性抗原结合分子也可以具有高于4的价,并且也在本发明的范围内。这样的抗原结合分子可以通过例如对接和锁定缀合方法(dock and lock conjugation method)产生。(Chang,C.-H.等人在:Bispecific Antibodies.Kontermann RE(2011)中,同上)。

[0103] 相比之下,术语“单价抗原结合分子”是指与单个抗原表位结合的抗原结合分子。单价抗原结合分子通常不能进行抗原交联。

[0104] “抗原结合位点”是指抗原结合分子的提供与抗原相互作用的位点,即一个或更多个氨基酸残基。例如,抗体的抗原结合位点包含来自互补决定区(CDR)的氨基酸残基。天然免疫球蛋白分子通常具有两个抗原结合位点,Fab分子通常具有单个抗原结合位点。本文描述的抗原结合分子的抗原结合位点通常特异性地结合抗原,并且更特别地,结合抗原的表位。

[0105] 措辞“特异性地结合”或“特异性的结合”是指在生理条件下,两个分子之间的结合反应至少是背景的两倍,并且更典型地超过背景分子缔合的10倍至100倍。当使用一种或更多种可检测的结合剂(其为蛋白)时,特异性结合确定蛋白在异质性蛋白群体和其他生物制品中的存在。因此,在指定的免疫测定条件下,特定的抗原结合分子与特定的抗原决定簇结合,从而鉴定其存在。在这样的条件下,与抗原决定簇的特异性结合需要针对对该决定簇的特异性选择的抗原结合分子。这种选择可以通过减去与其他分子交叉反应的抗原结合分子来实现。各种免疫测定形式可以用于选择抗原结合分子,诸如免疫球蛋白,使得它们与特定抗原特异性地免疫反应。例如,固相ELISA免疫测定通常用于选择与蛋白特异性地免疫反应的抗体(参见,例如,Harlow&Lane,Antibodies,A Laboratory Manual(1988)关于可用于确定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述)。确定结合亲和力和特异性的方法也是本领域熟知的(参见,例如Harlow和Lane,同上;Friefelder,“Physical Biochemistry: Applications to biochemistry and molecular biology”(W.H.Freeman and Co.1976))。

[0106] 术语“嵌合”当提及分子使用时,意指该分子包含源自、获得自或分离自两种或更多种不同来源(origin)或源(source),或基于两种或更多种不同来源或源的部分。因此,当多肽包含两个或更多个不同来源的氨基酸序列并且包含(1)在自然界中并非存在于一起的多肽序列(即,至少一个氨基酸序列相对于其至少一个其他氨基酸序列是异源的),或者(2)并非天然邻接的氨基酸序列时,则该多肽是嵌合的。

[0107] “分化簇38”(CD38)(也被称为环ADP核糖水解酶、ADPRC1和ADPRC 1)是存在于许多免疫细胞(白细胞,包括CD4⁺、CD8⁺、B淋巴细胞、骨髓细胞和自然杀伤细胞)的表面上的糖蛋白。CD38也在细胞粘附、信号转导和钙信号传递中发挥作用。CD38是一种多功能胞外酶,其除了催化从NADP⁺合成NAADP外,还催化从NAD⁺合成环ADP-核糖(cADPR)以及催化环ADP-核糖水解为ADP-核糖。术语“CD38”包括CD38的片段以及相关多肽,包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在某些实施方案中,CD38多肽包含末端残基,诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。在优选的实施方案中,如本文使用的“CD38”包括人类CD38(hCD38),hCD38的变体、亚型(isoform)和物种同源物,以及与

hCD38具有至少一个共同表位的类似物。完整的hCD38序列可见于UniProt登录号P28907下。

[0108] “分化簇103”(CD103)(也被称为整合素、 α E (ITGAE)、HUMINAE,整合素亚单位 α E)是在人类中由ITGAE基因编码的整合素蛋白。CD103结合整合素 β 7(β 7-ITGB7)以形成完整的异二聚体整合素分子 α E β 7。术语“CD103”包括CD103的片段以及相关多肽,包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在某些实施方案中,CD103多肽包含末端残基,诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。在优选的实施方案中,如本文使用的“CD103”包括人类CD103(hCD103),hCD103的变体、亚型和物种同源物,以及与hCD103具有至少一个共同表位的类似物。完整的hCD103序列可见于UniProt登录号P3850下。

[0109] “分化簇163”(CD163)(也被称为M130、MM130、SCAR11)是血红蛋白-触珠蛋白复合物的亲和力清道夫受体,并且在不存在触珠蛋白的情况下,对单独的血红蛋白具有较低的亲和力。它也是来自单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞的标志物,并且特别是M2样免疫抑制性骨髓细胞的标志物。CD163发挥革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌的先天免疫感受器的功能。术语“CD163”包括CD163的片段以及相关多肽,包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在某些实施方案中,CD163多肽包含末端残基,诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。在优选的实施方案中,如本文使用的“CD163”包括人类CD163(hCD163),hCD163的变体、亚型和物种同源物,以及与hCD163具有至少一个共同表位的类似物。完整的hCD163序列可见于UniProt登录号Q86VB7下。

[0110] “分化簇200”(CD200)(也被称为OX-2膜糖蛋白、MOX1、MOX2、MRC、OX-2)是由CD200基因编码的人类蛋白。由该基因编码的蛋白是一种1型膜糖蛋白,其含有两个免疫球蛋白结构域,并且因此属于免疫球蛋白超家族。该基因调节骨髓细胞活性,并在不同组织中为巨噬细胞谱系递送抑制信号。术语“CD200”包括CD200的片段以及相关多肽,包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在某些实施方案中,CD200多肽包含末端残基,诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。在优选的实施方案中,如本文使用的“CD200”包括人类CD200(hCD200),hCD200的变体、亚型和物种同源物,以及与hCD200具有至少一个共同表位的类似物。完整的hCD200序列可见于UniProt登录号P41217下。

[0111] “分化簇206”(CD206)(也被称为甘露糖受体)是主要存在于骨髓细胞(包括巨噬细胞和未成熟树突细胞)的表面的C型凝集素。该受体识别衔接至一些微生物的表面上存在的蛋白的聚糖上的末端甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺和岩藻糖残基,在先天免疫系统和适应性免疫系统中发挥作用。另外的功能包括从循环中清除糖蛋白,包括硫酸化糖蛋白激素和响应于病理事件释放的糖蛋白。该甘露糖受体以网格蛋白依赖性的方式在质膜和内吞体区室之间连续再循环。术语“CD206”包括CD206的片段以及相关多肽,包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在某些实施方案中,CD206多肽包含末端残基,诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。在优选的实施方案中,如本文使

用的“CD206”包括人类CD206 (hCD206), hCD206的变体、亚型和物种同源物, 以及与hCD206具有至少一个共同表位的类似物。完整的hCD206序列可见于UniProt登录号P22897下。

[0112] “编码序列”意指对基因的多肽产物或基因的最终mRNA产物(例如, 剪接后的基因mRNA产物)的编码有贡献的任何核酸序列。相比之下, 术语“非编码序列”是指对基因的多肽产物或基因的最终mRNA产物的编码无贡献的任何核酸序列。

[0113] 如本文使用的, 术语“互补决定区”(CDR; 即CDR1、CDR2和CDR3)是指抗体可变结构域的氨基酸残基, 其存在对于抗原结合是必需的。每个可变结构域通常具有三个CDR区, 标识为CDR1、CDR2和CDR3。每个互补决定区可以包含来自如例如由Kabat定义的“互补决定区”的氨基酸残基(即, 轻链可变结构域中的约残基24-34 (L1)、50-56 (L2) 和89-97 (L3) 以及重链可变结构域中的31-35 (H1)、50-65 (H2) 和95-102 (H3); Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 和/或来自“高变环(hypervariable loop)”的那些残基(即, 轻链可变结构域中的约残基26-32 (L1)、50-52 (L2) 和91-96 (L3) 以及重链可变结构域中的26-32 (H1)、53-55 (H2) 和96-101 (H3); Chothia和Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987))。在一些情况下, 互补决定区可以包括来自根据Kabat定义的CDR区和高变环两者的氨基酸。

[0114] 如本文使用的, 术语“复合物”是指彼此直接和/或间接接触的分子(例如, 肽、多肽等)的集合或聚集体。在特定实施方案中, “接触”, 或更特别地, “直接接触”意指两个或更多个分子足够接近, 使得吸引力非共价相互作用(诸如范德华力、氢键键合、离子和疏水性相互作用等)主导分子的相互作用。在这样的实施方案中, 分子(例如, 肽和多肽)的复合物在这样的条件下形成, 使得该复合物是热力学有利的(例如, 与其组分分子的非聚集或非复合状态相比)。如本文使用的术语“多肽复合物”或“蛋白复合物”是指三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体、十聚体、十一聚体、十二聚体或更高级寡聚体。

[0115] 在整个本说明书中, 除非上下文另有要求, 否则词语“包含/包括(comprise)”、“包含/包括(comprises)”和“包含/包括(comprising)”将被理解为暗示包含陈述的步骤或要素, 或者步骤或要素的组, 但不排除任何其他步骤或要素, 或者步骤或要素的组。因此, 使用术语“包含/包括”等指示列出的要素是必需的或要求的, 但其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在。“由……组成(consisting of)”意指包括并且限于措辞“由……组成”之后的任何事物。因此, 措辞“由……组成”指示列出的要素是必需的或要求的, 并且不可以存在其他要素。“基本上由……组成(consisting essentially of)”意指包括该措辞之后列出的任何要素, 并且限于不干扰或有助于列出的要素在本公开内容中指定的活性或作用的其他要素。因此, 措辞“基本上由……组成”指示列出的要素是必需的或要求的, 但其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在, 这取决于它们是否影响列出的要素的活性或作用。在一些实施方案中, 在所叙述的亚基序列(例如, 氨基酸序列)的上下文中, 措辞“基本上由……组成”指示该序列可以包含至少一个另外的上游亚基(例如, 1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个或更多个上游亚基; 例如, 氨基酸) 和/或至少一个另外的下游亚基(例如, 1个、2个、3个、4个、5个、6个、7

个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个或更多个下游亚基；例如，氨基酸），其中上游亚基的数目和下游亚基的数目是可独立选择的。

[0116] 如本文使用的，在通过包括化学缀合或重组方式（例如，通过基因融合）的任何方式将两个或更多个元件或组成部分或结构域连接在一起的上下文中，术语“缀合”、“连接”、“融合(fused)”或“融合(fusion)”及其语法等同物可互换地使用。化学缀合的方法（例如，使用异双功能交联剂）是本领域已知的。

[0117] 如本申请中使用的术语“恒定结构域”或“恒定区”表示抗体的除可变区之外的结构域的总和。恒定区不直接参与抗原的结合，但表现出多种免疫效应物功能。

[0118] 术语“构建体”是指包含来自不同来源的一个或更多个分离的核酸序列的重组遗传分子。因此，构建体是其中两个或更多个不同来源的核酸序列被组装成单个核酸分子的嵌合分子，并且包括包含以下的任何构建体：(1) 核酸序列，包括自然界中并非存在于一一起的调控序列和编码序列（即，至少一个核苷酸序列相对于其至少一个其他核苷酸序列是异源的），或(2) 编码并非天然邻接的功能性RNA分子或蛋白的部分的序列，或(3) 并非天然邻接的启动子的部分。代表性构建体包括任何重组核酸分子，诸如质粒、黏粒、病毒、自主复制多核苷酸分子、噬菌体、或线性或环状单链或双链DNA或RNA核酸分子，它们源自任何来源，能够基因组整合或自主复制，包含其中一个或更多个核酸分子已被可操作地连接的核酸分子。本发明的构建体通常将包括指导也包含在构建体中的感兴趣的核酸序列的表达所必需的元件，诸如例如靶核酸序列或调节核酸序列。这样的元件可以包括控制元件，诸如启动子，其可操作地连接到感兴趣的核酸序列（以便指导核酸序列的转录），并且通常还包括聚腺苷酸化序列。在本发明的某些实施方案中，构建体可以被包含在载体中。除了构建体的组成部分之外，载体可以包括，例如，一个或更多个选择性标志物、一个或更多个复制起点，诸如原核和真核起点，至少一个多重克隆位点和/或促进构建体稳定整合到宿主细胞的基因组中的元件。两个或更多个构建体可以被包含在单个核酸分子内，诸如单个载体内，或者可以被包含在两个或更多个单独的核酸分子内，诸如两个或更多个单独的载体内。“表达构建体”通常包含至少一个与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的控制序列。以这种方式，例如，在表达构建体中提供与待表达的核苷酸序列可操作地连接的启动子，用于在生物体或其部分（包括宿主细胞）中表达。为了本发明的实践，用于制备和使用构建体和宿主细胞的常规组合物和方法是本领域技术人员熟知的，参见例如，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版第1、2和3卷.J.F.Sambrook,D.W.Russell和N.Irwin,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2000。

[0119] “控制元件”或“控制序列”意指在特定宿主细胞中表达可操作地连接的编码序列所必需的核酸序列（例如，DNA）。例如，适用于原核细胞的控制序列，例如，包括启动子以及任选地顺式作用序列，诸如操纵子序列和核糖体结合位点。适用于真核细胞的控制序列包括转录控制序列，诸如启动子、聚腺苷酸化信号、转录增强子，翻译控制序列诸如翻译增强子和内部核糖体结合位点(IRES)，调节mRNA稳定性的核酸序列，以及将转录的多核苷酸编码的产物靶向到细胞内的细胞内区室或细胞外环境的靶向序列。

[0120] “对应于(corresponds to)”或“对应于(corresponding to)”意指展示出与参考

核酸序列实质的序列同一性(例如,与参考核酸序列的全部或一部分至少约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至高达100%的序列同一性)的核酸序列或展示出与参考氨基酸序列实质的序列相似性或序列同一性(例如,与参考氨基酸序列的全部或一部分至少50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至高达100%的序列相似性或序列同一性)的氨基酸序列。

[0121] “细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA4)” (也被称为ALPS5、CD、CD152、CELIAC3、CTLA-4、GRD4、GSE、IDDM12),是指发挥免疫检查点的功能、下调免疫应答的蛋白受体。CTLA4在T调节细胞(Treg)中组成型表达,但仅在活化后的常规T细胞中上调。当与抗原呈递细胞表面的CD80或CD86结合时,CTLA4用作“关闭”开关。如本文使用的术语“CTLA4”包括人类CTLA4 (hCTLA4)、hCTLA4的变体、亚型和物种同源物,以及与hCTLA4具有至少一个共同表位的类似物。完整的hCTLA4序列可见于UniProt登录号P16410下。

[0122] 术语“DART”(双亲和重靶向试剂)是指包含至少两条多肽链的免疫球蛋白分子,所述多肽链缔合(特别是通过共价相互作用)形成至少两个表位结合位点,所述表位结合位点可以识别相同或不同的表位。DART的每条多肽链包含免疫球蛋白轻链可变区和免疫球蛋白重链可变区,但这些区不相互作用形成表位结合位点。相反,一条(例如,第一)DART多肽链的免疫球蛋白重链可变区与不同的(例如,第二)DART多肽链的免疫球蛋白轻链可变区相互作用,以形成表位结合位点。类似地,一条(例如,第一)DART多肽链的免疫球蛋白轻链可变区与不同的(例如,第二)DART多肽链的免疫球蛋白重链可变区相互作用,以形成表位结合位点。DART可以是单特异性、双特异性、三特异性的,等等,因此能够同时结合一种、两种、三种或更多种不同的表位(它们可以属于同一抗原或不同的抗原)。DART还可以是一价、二价、三价、四价、五价、六价的,等等,因此能够同时结合一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个分子。DART的这两个属性(即,特异性程度和价)可以组合,例如以便产生四价(即,能够结合四组表位)的双特异性抗体(即,能够结合两种表位)等。DART分子在国际PCT公布第WO 2006/113665号、第WO 2008/157379号和第WO 2010/080538号中更详细地公开。

[0123] 在治疗或预防疾病或状况(例如,癌症)的上下文中,“有效量”意指将一定量的活性剂以单剂量或者系列或缓慢释放系统的一部分施用至受试者,其治疗或预防该疾病或状况有效。有效量将根据受试者的健康和身体状况以及待治疗个体的分类群体、组合物的制剂、医疗情况的评估和其他相关因素而变化。

[0124] 如本文使用的,术语“编码(encode)”、“编码(encoding)”等是指核酸提供另一种核酸或多肽的能力。例如,如果核酸序列可以被转录和/或翻译以产生多肽,或者如果核酸序列可以被加工成可被转录和/或翻译以产生多肽的形式,则该核酸序列被称为“编码”多肽。这样的核酸序列可以包括编码序列或编码序列和非编码序列两者。因此,术语“编码(encode)”、“编码(encoding)”等包括由DNA分子转录产生的RNA产物、由RNA分子翻译产生的蛋白、由DNA分子转录以形成RNA产物和随后RNA产物翻译产生的蛋白、或由DNA分子转录

以提供RNA产物、RNA产物加工以提供加工的RNA产物(例如,mRNA)和随后加工的RNA产物翻译产生的蛋白。

[0125] 术语“表位”和“抗原决定簇”在本文中可互换地使用,以指抗原结合分子或其抗原结合片段结合的抗原区域。表位可以由连续氨基酸形成(线性表位)或由通过蛋白的三级折叠并列的非连续氨基酸形成(构象表位)。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丧失。表位通常包含呈独特空间构象的至少3个,以及更通常地至少5个或8-10个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括,例如,x射线晶体学和2维核磁共振(参见,例如Morris G.E.,*Epitope Mapping Protocols*, Meth Mol Biol, 66 (1996))。用于表位作图的优选方法是表面等离子体共振。双特异性抗体可以是二价、三价或四价的。当在本文中的双特异性抗体的上下文中使用时,术语“价(valent)”、“价(valence)”、“价(valency)”或其其他语法变化形式意指抗体分子中抗原结合位点的数目。这些抗原识别位点可以识别相同的表位或不同的表位。二价和双特异性分子在例如以下中描述:Kostelny等人,(1992) *J Immunol* 148:1547;Pack和Plückthun (1992) *Biochemistry* 31:1579;Hollinger等人,1993,同上;Gruber等人,(1994) *J Immunol* 5368;Zhu等人,(1997) *Protein Sci* 6:781;Hu等人,(1996) *Cancer Res* 56:3055;Adams等人,(1993) *Cancer Res* 53:4026;和McCartney等人,(1995) *Protein Eng* 8:301。三价双特异性抗体和四价双特异性抗体也是本领域已知的(参见,例如Kontermann R E(编著), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 199-216 (2011))。双特异性抗体也可以具有高于4的价,并且也在本发明的范围内。这样的抗体可以通过例如对接和锁定缀合方法(参见,Chang, C.-H. 等人在: *Bispecific Antibodies* 中, Kontermann R E(编著), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 第199-216页 (2011))产生。

[0126] 如本文使用的,术语“功能”、“功能性”等是指配体结合、多聚化、活化、信号传递、生物、病理或治疗功能。

[0127] “框架区”(FR)是除CDR残基之外的那些可变结构域残基。每个可变结构域通常具有四个FR,被标识为FR1、FR2、FR3和FR4。如果CDR根据Kabat定义,则轻链FR残基位于约残基1-23(LCFR1)、残基35-49(LCFR2)、残基57-88(LCFR3)和残基98-107(LCFR4)处,并且重链FR残基位于重链残基中的约残基1-30(HCFR1)、残基36-49(HCFR2)、残基66-94(HCFR3)和残基103-113(HCFR4)处。如果CDR包含来自高变环的氨基酸残基,则轻链FR残基位于轻链中的约残基1-25(LCFR1)、残基33-49(LCFR2)、残基53-90(LCFR3)和残基97-107(LCFR4)处,并且重链FR残基位于重链残基中的约残基1-25(HCFR1)、残基33-52(HCFR2)、残基56-95(HCFR3)和残基102-113(HCFR4)处。在一些情况下,当CDR包含来自Kabat定义的CDR的氨基酸和高变环的氨基酸两者时,FR残基应被相应地调整。例如,当CDRH1包括氨基酸H26-H35时,重链FR1残基位于位置1-25处,并且FR2残基位于位置36-49处。

[0128] “半乳凝素-9”(Gal9)(也被称为LGALS9、HUAT、LGALS9A)是具有两个碳水化合物识别结构域的串联重复型半乳凝素,其调节多种生物功能,包括细胞聚集和粘附以及肿瘤细胞的凋亡。半乳凝素-9对癌细胞也具有抗增殖作用,并且与T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(Tim-3)相互作用,以通过促进CD8⁺T细胞耗竭和诱导骨髓来源的抑制细胞的扩增来负调节T细胞应答。这些机制涉及肿瘤生长和免疫逃逸。在许多实体瘤中,半乳凝素-9表达的丧失与转移性进展密切相关,并且在多种临床前癌症模型中,用重组半乳凝素-9治疗防止转移

扩散。术语“Gal9”包括Gal9的片段以及相关多肽,包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在某些实施方案中,Gal9多肽包含末端残基,诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。在优选的实施方案中,如本文使用的“Gal9”包括人类Gal9(hGal9),hGal9的变体、亚型和物种同源物,以及与hGal9具有至少一个共同表位的类似物。完整的hGal9序列可见于UniProt登录号000182下。

[0129] “疱疹病毒进入介质”(HVEM)(也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员14(TNFRSF14)、ATAR、CD270、HVEA、HVEM、LIGHTR、TR2,肿瘤坏死因子受体超家族成员14,TNF受体超家族成员14)是TNF受体超家族的人类细胞表面受体。该受体被鉴定为单纯疱疹病毒(HSV)进入的细胞介质。HSV病毒包膜糖蛋白D(gD)与该受体蛋白的结合已被显示是病毒进入机制的一部分。发现该受体的胞质区与几个TRAF家族成员结合,这可以介导活化免疫应答的信号转导途径。术语“HVEM”包括HVEM的片段以及相关多肽,包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在某些实施方案中,HVEM多肽包含末端残基,诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。在优选的实施方案中,如本文使用的“HVEM”包括人类HVEM(hHVEM)、hHVEM的变体、亚型和物种同源物,以及与hHVEM具有至少一个共同表位的类似物。完整的hHVEM序列可见于UniProt登录号Q92956下。

[0130] 如本文在提及细胞标志物或生物标志物的测量时使用的术语“较高/更高(higher)”是指其中生物标志物测量值大于参考水平的生物标志物测量值的水平与参考水平相比的统计学显著且可测量的差异。该差异合适地为至少约10%、或至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%或至少约90%。

[0131] 术语“免疫检查点分子”包括发挥免疫检查点功能的受体和配体两者。免疫检查点是防止免疫系统攻击其自身的免疫逃逸机制。免疫检查点受体存在于T细胞上,并且与在抗原呈递细胞上表达的免疫检查点配体相互作用。T细胞识别在MHC分子上呈递的抗原并被活化以产生免疫反应,而与上述同时发生的免疫检查点受体和配体之间的相互作用控制T细胞的活化。示例性的免疫检查点分子包括但不限于PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、A2AR、A2BR、B7-H3、CD276、VTCN1、BTLA、IDO、KIR、LAG3、TIM-3、VISTA、CD73、CD96、CD155、DNAM-1、CD112、CRTAM、TNFRSF4(OX40、CD134)、TNFSF4(OX40L)、CD244、CD160、GITR、GITRL、ICOS、GAL-9、4-1BBL(CD137L)、4-1BB(CD137)、CD70、CD27L、CD28、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、SIRP-1、IAP(CD47)、BLAST-1(CD48)、CD244、CD40、CD40L、HVEM、TMIGD2、HHLA2、VEGI、TNFRSF25、ICOLG(B7RP1)和TIGIT。在特定实施方案中,免疫检查点分子是PD-1、PD-L1或CTLA-4。

[0132] 在本发明的上下文中的术语“免疫效应细胞”涉及在免疫反应期间发挥效应物功能的细胞。例如,这样的细胞分泌细胞因子和/或趋化因子,杀死微生物,分泌抗体,识别感染的细胞或癌性细胞并且任选地消除这样的细胞。例如,免疫效应细胞包括T细胞(细胞毒性T细胞、辅助性T细胞、肿瘤浸润性T细胞)、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、淋巴因子激活杀伤(LAK)细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突细胞。

[0133] 在本发明的上下文中的术语“免疫效应物功能”包括由免疫系统的组成部分介导的任何功能,所述功能导致例如杀死病毒感染的细胞或肿瘤细胞,或抑制肿瘤生长和/或抑

制肿瘤发展,包括抑制肿瘤扩散和转移。优选地,在本发明的上下文中的免疫效应物功能是T细胞介导的效应物功能。这样的功能包括在辅助性T细胞(CD4⁺T细胞)的情况下由T细胞受体识别MHC II类分子背景下的抗原或衍生自抗原的抗原肽,释放细胞因子和/或活化CD8⁺淋巴细胞(CTL)和/或B细胞,以及在CTL的情况下由T细胞受体识别MHC I类分子背景下的抗原或衍生自抗原的抗原肽,消除在MHC I类分子背景下呈递的细胞,即特征为用I类MHC呈递抗原的细胞,所述消除例如经由凋亡或穿孔素介导的细胞裂解、细胞因子诸如IFN- γ 和TNF- α 的产生以及对表达抗原的靶细胞的特异性的细胞溶解性杀伤。

[0134] 术语“免疫系统”是指提供针对损害和侵害以及物质(后者包括抗原分子,包括但不限于肿瘤、病原体 and 自身反应性细胞)的防御的细胞、分子组分和机制,分别包括抗原特异性和非特异性类别的适应性免疫系统和先天免疫系统。“适应性免疫系统”是指在若干天内出现并与特定抗原反应且去除该特定抗原的抗原特异性的细胞、分子组分和机制。适应性免疫系统在整个宿主的一生中发展。适应性免疫系统基于白细胞,并且被分成两个主要部分:体液免疫系统和细胞介导的免疫系统,体液免疫系统主要经由B细胞产生的免疫球蛋白发挥作用,细胞介导的免疫系统主要经由T细胞发挥功能。

[0135] “接头”意指连接两个分子并且通常用于将两个分子以所需配置放置的分子或一组分子(诸如单体或多聚体)。在特定实施方案中,“肽接头”是指这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列连接两个蛋白、多肽、肽、结构域、区域或基序,并且可以提供与抗原结合片段的空间相容的间隔功能,使得抗原结合片段可以特异性地结合它们的同源表位(cognate epitope)。在某些实施方案中,接头包含约2个至约35个氨基酸,例如,或约4个至约20个氨基酸、或约8个至约15个氨基酸或约15个至约25个氨基酸。

[0136] 如本文在提及细胞标志物或生物标志物的测量时使用的术语“较低/更低(lower)”是指其中生物标志物测量值小于参考水平的生物标志物测量值的水平与参考水平相比的统计学显著且可测量的差异。该差异合适地为至少约10%、或至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%或至少约90%。

[0137] “阴性”、“阳性”和“低”表达水平在其应用于标志物时定义如下。具有阴性表达(即,“-”)或“缺乏表达”的细胞在本文中被定义为在另外的荧光发射通道中对于其他感兴趣的蛋白存在完全抗体染色混合物标记的情况下,表达小于或等于荧光通道中用同种型对照抗体观察到的表达的第95百分位数的那些细胞。本领域技术人员将理解,用于定义阴性事件的该程序被称为“荧光减一”或“FM0”染色。表达大于使用上文描述的FM0染色程序用同种型对照抗体观察到的表达的第95百分位数的细胞在本文中被定义为“阳性”(即,“+”)。存在多种被宽泛定义为“阳性”的细胞群体。例如,具有低表达(即,“低(low)”或“低(lo)”)的细胞通常被定义为那些观察到的表达高于使用FM0染色用同种型对照抗体的确定的第95百分位数并且在使用上文描述的FM0染色程序用同种型对照抗体观察到的表达的第95百分位数的一个标准偏差以内的细胞。提及ICM(例如,PD-1、PD-L1等)的术语“低(low)”或“低(lo)”是指以低于一种或更多种其他不同的细胞或细胞群体(例如,免疫效应细胞诸如T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、NK T(NKT)细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞(DC);以及肿瘤细胞)的水平表达该ICM的细胞或细胞群体(例如,Treg细胞,包括肿瘤微环境中的T细胞)。例如,已知在肿瘤微环境中,CTLA4在Treg上以比PD-1显著更高的水平表达,并且PD-1

在包括效应T细胞在内的免疫效应细胞上以比Treg上显著更高的水平表达 (Jacobs等人, 2009.Neuro-Oncology 11 (4) :394-402)。

[0138] “具有胶原结构的巨噬细胞受体” (MARCO) (也被称为SCARA2和SR-A6) 是存在于在巨噬细胞的特定亚群上的A类清道夫受体。清道夫受体是模式识别受体 (PRR) 并且最常见于免疫细胞上。它们的限定性特征是它们结合聚阴离子和被称为低密度脂蛋白 (LDL) 的修饰形式的胆固醇类型。MARCO能够结合和吞噬这些配体和病原体相关分子模式 (PAMP), 导致病原体的清除以及在细胞中引起导致炎症的下游效应。作为先天免疫系统的一部分, MARCO清洁或清除病原体并导致炎症反应。在MARCO的细胞外侧的一端处的富含半胱氨酸清道夫受体 (SRCR) 结构域负责配体结合和随后的免疫应答。巨噬细胞上的MARCO表达也与疾病相关, 因为阿尔茨海默病与当配体结合MARCO时细胞内减少的反应相关。术语“MARCO”包括MARCO的片段以及相关多肽, 包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在某些实施方案中, MARCO多肽包含末端残基, 诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。在优选的实施方案中, 如本文使用的“MARCO”包括人类MARCO (hMARCO)、hMARCO的变体、亚型和物种同源物, 以及与hMARCO具有至少一个共同表位的类似物。完整的hMARCO序列可见于UniProt登录号Q9UEW3下。

[0139] 如本文使用的, 术语“微环境”是指生物细胞、组织或器官的结缔性支持框架。如本文使用的, 术语“肿瘤微环境”或“TME”是指为恶性过程的存活和/或扩展和/或扩散创建结构性和/或功能性环境的肿瘤环境的任何和所有要素。通常, 术语“肿瘤微环境”或“TME”是指肿瘤存在于其中的细胞环境, 包括紧密围绕成纤维细胞、白细胞和内皮细胞以及细胞外基质 (ECM) 的区域。因此, 肿瘤微环境的细胞包括恶性细胞以及支持其生长和存活的非恶性细胞。所述非恶性细胞 (也被称为基质细胞) 占据或聚集在与恶性细胞相同的细胞空间或与恶性细胞相邻或接近的细胞空间中, 调节肿瘤细胞生长或存活。术语“基质细胞”包括成纤维细胞、白细胞和血管细胞。肿瘤微环境的非恶性细胞包括成纤维细胞、上皮细胞、血管细胞 (包括血管和淋巴管内皮细胞和周细胞)、驻留和/或募集的炎性细胞和免疫细胞 (例如, 巨噬细胞、树突细胞、粒细胞、淋巴细胞等)。这些细胞以及特别是活化的成纤维细胞积极参与转移发展。

[0140] 如本文使用的术语“单克隆抗体” (Mab) 是指从基本上均匀的抗体群体中获得的抗体, 即, 构成该群体的个体抗体是相同的, 除了可能少量存在的可能天然发生的突变。单克隆抗体是针对单一抗原表位高度特异性的。修饰词“单克隆”指示从基本上均匀的抗体群体中获得的抗体的特征, 并且不应被解释为需要通过任何特定的方法产生该抗体。例如, 根据本发明使用的单克隆抗体可以通过由Kohler等人, Nature 256:495 (1975) 首次描述且通过如上文阐述的体细胞杂交方法修改的杂交瘤方法制备; 或者可以通过其他重组DNA方法 (诸如在美国专利第4,816,567号中描述的方法) 制备。

[0141] 术语“多特异性抗原结合分子”以其最广泛的含义使用, 并且特别地涵盖对至少两种 (例如, 2种、3种、4种等) 不同的表位具有特异性的抗原结合分子 (即, 能够特异性地结合一种抗原上的两种或更多种不同的表位, 或者能够特异性地结合两种或更多种不同抗原上的表位)。

[0142] 如本文使用的术语“骨髓细胞”是指髓系的细胞或由其衍生的细胞。髓系包括许多

形态、表型和功能不同的细胞类型,包括不同亚群的粒细胞(中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)、单核细胞、巨噬细胞、红细胞、巨核细胞和肥大细胞。在某些实施方案中,骨髓细胞是源自髓系细胞系的细胞。

[0143] 如本文使用的,术语“肌病”是指其中肌肉纤维不能正常起作用的肌肉疾病,通常导致肌无力。肌病包括本质上为神经肌肉性或肌肉骨骼性的肌肉疾病。在一些实施方案中,肌病是遗传性肌病。遗传性肌病包括但不限于营养不良、肌强直、先天性肌病(例如,杆状体肌病、多轴空/微轴空肌病(multi/minicore myopathy)和中央核肌病)、线粒体肌病、家族周期性肌病、炎性肌病和代谢性肌病(例如,糖原贮积病和脂质贮积紊乱)。在一些实施方案中,肌病是获得性肌病。获得性肌病包括但不限于外部物质诱导的肌病(例如,药物诱导的肌病和糖皮质激素肌病、酒精性肌病和由于其他毒性剂引起的肌病)、肌炎(例如、皮肌炎、多肌炎和包涵体肌炎)、骨化性肌炎、横纹肌溶解症和肌红蛋白尿症以及废用性萎缩。在一些实施方案中,肌病是废用性萎缩,其可由骨折(例如,髌骨折)或神经损伤(例如,脊髓损伤(SCI))引起。在一些实施方案中,肌病涉及诸如肌萎缩性侧索硬化(ALS)、脊髓性肌萎缩(SMA),由于肾衰竭、AIDS、心脏状况和/或癌症引起的恶病质综合征的疾病或紊乱。在一些实施方案中,肌病与衰老相关。

[0144] 如本文使用的术语“可操作地连接(operably connected)”或“可操作地连接(operably linked)”是指其中所描述的组分处于允许它们以其预期的方式发挥功能的关系的并置(juxtaposition)。例如,调控序列(例如,启动子)“可操作地连接”到感兴趣的核苷酸序列(例如,编码序列和/或非编码序列)是指控制序列相对于感兴趣的核苷酸序列的定位和/或取向允许该序列在与控制序列相容的条件下表达。控制序列不需要与感兴趣的核苷酸序列相邻,只要它们发挥指导其表达的功能。因此,例如,间插非编码序列(例如,不翻译但转录的序列)可以存在于启动子序列和编码序列之间,并且启动子序列仍可以被认为是“可操作地连接”到编码序列。同样,将第一抗原结合片段“可操作地连接”到第二抗原结合片段包括抗原结合片段以允许每个抗原结合片段与其同源表位结合的方式的定位和/或取向。

[0145] 术语“骨质减少性紊乱”是指具有降低的钙化和/或骨密度的状况,并且用于指其中注意到该状况的所有骨骼系统。代表性的骨质减少性紊乱包括骨质疏松症、骨质减少症、佩吉特病、溶解性骨转移、牙周炎、类风湿性关节炎和由于活动受限引起的骨质流失。除了这些骨紊乱之外,已知某些癌症增加破骨细胞活性并诱导骨再吸收,诸如乳腺癌、前列腺癌和多发性骨髓瘤。现在已知这些癌症产生导致骨中RANKL过表达并导致破骨细胞数目和活性增加的因子。

[0146] “药学上可接受的载体”意指包含并非生物学上不合意或以其他方式不合意的材料的药物媒介物,即该材料可以与所选的活性剂一起施用至受试者,而不引起任何或实质性的不良反应。载体可以包括赋形剂和其他添加剂,诸如稀释剂、去污剂、着色剂、润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、防腐剂等。

[0147] “程序性死亡-1(PD-1)”(也被称为CD279、PD1、SLEB2、hPD-1、hPD-I和hSLE1)是指属于CD28家族的免疫抑制受体。PD-1在体内主要表达于先前活化的T细胞上,并结合两种配体,PD-L1和PD-L2。术语“PD-1”包括PD-1的片段以及相关多肽,包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在

某些实施方案中,PD-1多肽包含末端残基,诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。在优选的实施方案中,“PD-1”包括人类PD-1(hPD-1)、hPD-1的变体、亚型和物种同源物,以及与hPD-1具有至少一个共同表位的类似物。完整的hPD-1序列可见于UniProt登录号U64863下。

[0148] “程序性死亡配体-1(PD-L1)”(也被称为CD274、B7-H、B7H1、PDCD1L1、PDCD1LG1、PDL1和CD274分子)是PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体中的一种(另一种是PD-L2),PD-L1在与PD-1结合后下调T细胞活化和细胞因子分泌。术语“PD-L1”包括PD-L1的片段以及相关多肽,包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在某些实施方案中,PD-L1多肽包含末端残基,诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。在优选的实施方案中,如本文使用的“PD-L1”包括人类PD-L1(hPD-L1)、hPD-L1的变体、亚型和物种同源物,以及与hPD-L1具有至少一个共同表位的类似物。完整的hPD-L1序列可见于UniProt登录号Q9NZQ7下。

[0149] “多肽”、“蛋白质分子”、“肽”和“蛋白”在本文中可互换地使用,以指氨基酸残基的聚合物及其变体和合成类似物。因此,这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是合成的非天然存在的氨基酸(诸如对应的天然存在的氨基酸的化学类似物)的氨基酸聚合物以及天然存在的氨基酸聚合物。这些术语不排除修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等。本主题的蛋白质分子的可溶形式特别有用。定义中包括,例如,含有一个或多个氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸)的多肽或具有取代键(substituted linkage)的多肽。

[0150] “NF- κ B受体活化因子配体(RANKL)”(也被称为肿瘤坏死因子配体超家族成员11(TNFSF11)、TNF相关活化诱导细胞因子(TRANCE)、骨保护素配体(OPGL)和破骨细胞分化因子(ODF))是指尤其通过与NF- κ B受体活化因子(RANK)结合而促进破骨细胞形成的多肽。术语“RANKL”包括RANKL的片段以及相关多肽,包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在某些实施方案中,RANKL多肽包含末端残基,诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。术语RANKL包括人类RANKL(hRANKL),hRANKL的变体、亚型和物种同源物,以及与hRANKL具有至少一个共同表位的类似物。完整的hRANKL序列可见于UniProt登录号014788下。

[0151] “NF- κ B受体活化因子(RANK)”(也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员11a、NF- κ B活化因子、CD265、FE0、LOH18CR1、ODFR、OFE、OPTB7、OSTS、PDB2和TRANCER)是指为RANK-配体(RANKL)的受体并且是调节破骨细胞分化和活化的RANK/RANKL/骨保护素(OPG)信号传递途径的一部分的多肽。RANK与骨重塑和修复、免疫细胞功能、淋巴结发育、热调节和乳腺发育相关。术语“RANK”包括RANK的片段以及相关多肽,包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、取代变体、缺失变体和/或插入变体、融合多肽和物种间同源物。在某些实施方案中,RANK多肽包含末端残基,诸如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。术语RANK包括人类RANK(hRANK),hRANK的变体、亚型和物种同源物,以及与hRANK具有至少一个共同表位的类似物。完整的hRANK序列可见于UniProt登录号Q9Y6Q6下。

[0152] 如本文使用的,“重组”抗原结合分子意指其产生涉及在生物体中表达编码所需抗

体结构的非天然DNA序列的任何抗原结合分子,其非限制性实例包括串联scFv (taFv或scFv₂)、双抗体、dAb₂/VHH₂、knob-into-holes衍生物、SEED-IgG、异Fc-scFv、Fab-scFv、scFv-Jun/Fos、Fab'-Jun/Fos、三抗体、DNL-F(ab)₃、scFv₃-CH1/CL、Fab-scFv₂、IgG-scFab、IgG-scFv、scFv-IgG、scFv₂-Fc、F(ab')₂-scFv₂、scDB-Fc、scDB-C_{H3}、Db-Fc、scFv₂-H/L、DVD-Ig、tandAb、scFv-dhlx-scFv、dAb₂-IgG、dAb-IgG、dAb-Fc-dAb、CrossMabs、MAb₂、FIT-Ig及其组合。

[0153] 如本文使用的,术语“调节性T细胞”或“Treg”是指负调节其他T细胞(包括效应T细胞以及先天免疫系统细胞)的活化的T细胞。Treg细胞的特征为持续抑制效应T细胞应答。在一些方面,Treg是CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞。

[0154] 术语“受试者”、“患者”、“宿主”或“个体”在本文中可互换地使用,是指需要治疗或预防的任何受试者,特别是脊椎动物受试者,并且甚至更特别是哺乳动物受试者。落在本发明的范围内的合适的脊椎动物包括但不限于,脊索动物亚门(subphylum Chordata)的任何成员,包括灵长类动物(例如,人类、猴和猿,并且包括猴类物种诸如猕猴属(genus *Macaca*) (例如,食蟹猴(*cynomolgus monkey*) 诸如食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*) 和/或恒河猴(*Macaca mulatta*)) 和狒狒(豚尾狒狒(*Papio ursinus*)) 以及狨猴(来自狨属(genus *Callithrix*)的物种)、松鼠猴(来自松鼠猴属(genus *Saimiri*)的物种)和绢毛猴(来自怪柳猴属(genus *Saguinus*)的物种)以及猿的物种诸如黑猩猩(*Pan troglodytes*))、啮齿类动物(例如,小鼠、大鼠、豚鼠)、兔类动物(例如,兔、野兔)、牛科动物(例如,家牛),绵羊类(例如,绵羊)、山羊类(例如,山羊)、猪类(例如,猪)、马类(例如,马)、犬科动物(例如,狗)、猫科动物(例如,猫)、鸟类(例如,鸡、火鸡、鸭、鹅、伴侣鸟类,诸如金丝雀、虎皮鹦鹉等)、海洋哺乳动物(例如,海豚、鲸)、爬行动物(蛇、青蛙、蜥蜴等)和鱼。优选的受试者是需要引发对癌症的免疫应答的人类。然而,应理解上述术语并不意味着存在症状。

[0155] 提及本发明的剂(例如,RANK拮抗性抗原结合分子、抗ICM抗原结合分子、抗AMA抗原结合分子等)的术语“治疗剂组合”、“组合”等包括任何组合,包括这样的组合,其中剂被物理连接(例如,共价连接在单个多肽中或非共价连接在复合物中),或者作为单一组合物中的独立组分存在,或者在作为方案的一部分同时、一起或单独或在不同时间分别施用的不同组合物中。通常,本发明的治疗剂组合中的每种这样的剂将存在于包含药学上可接受的载体的药物组合物中。本发明的治疗剂组合中的剂以使得受试者在期望的时间实现每种剂的有益效果的剂型提供。

[0156] “治疗(treatment)”、“治疗(treat)”、“治疗(treated)”等意图包括预防性和治疗性治疗,包括但不限于预防、缓解、改变、逆转、影响、抑制以下的发展或进展:(1)与靶抗原的存在或异常表达相关的疾病或状况、或(2)疾病或状况的症状、或(3)对疾病或状况的易感性,改善或治愈(1)与靶抗原的存在或异常表达相关的疾病或状况、或(2)疾病或状况的症状、或(3)对疾病或状况的易感性,包括赋予受试者保护性免疫。

[0157] 如本文使用的,术语“三特异性抗体”是指至少包含对第一表位具有特异性的第一抗原结合结构域、对第二表位具有特异性的第二抗原结合结构域和对第三表位具有特异性的第三抗原结合结构域的抗体,例如,RANK以及CTLA4、PD-1和PD-L1中的任何两种。第一表位、第二表位和第三表位不是相同的(即,是不同的靶(例如,蛋白)),但是可以全都存在(例如,共表达)于单个细胞或至少两个细胞上。

[0158] 如本文使用的“肿瘤”是指任何赘生性细胞生长和增殖,不论恶性或良性,以及所有的癌前和癌性细胞和组织。术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常部分地以不受调控的细胞生长为特征的生理状况。如本文使用的,术语“癌症”是指非转移性癌症和转移性癌症,包括早期和晚期癌症。术语“癌前”是指通常在癌症之前或发展成癌症的状况或生长。“非转移性”意指良性的或者保留在原发部位并且未渗入淋巴或血管系统或原发部位以外的组织的癌症。通常,非转移性癌症是为0期、I期或II期癌症并且偶尔是为III期癌症的任何癌症。“早期癌症”意指非侵袭性或转移性的癌症,或者被分类为0期、I期或II期癌症。术语“晚期癌症”通常是指III期或IV期癌症,但也可以指II期癌症或II期癌症的亚期。本领域技术人员将理解,将II期癌症分类为早期癌症或晚期癌症取决于癌症的特定类型。癌症的说明性实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、肝细胞癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、甲状腺癌、肾癌、癌、黑素瘤、脑癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、直肠癌和食道癌。在示例性实施例中,癌症选自前列腺癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌和骨癌。

[0159] “载体”意指源自例如核酸序列可被插入或克隆进其中的质粒、噬菌体或植物病毒的核酸分子,优选地DNA分子。载体优选地含有一个或更多个独特的限制性位点,并且可以能够在包括靶细胞或组织或其祖细胞或组织的限定的宿主细胞中自主复制,或是可与限定的宿主的基因组整合,使得克隆的序列可繁殖。因此,载体可以是自主复制性载体,即,作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如,线性质粒或闭合环状质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可以包含用于确保自我复制的任何工具(means)。可选地,载体可以是当被引入宿主细胞时被整合进基因组中并与其整合的染色体一起复制的载体。载体系统可以包含单个载体或质粒、共同包含待引入宿主细胞的基因组中的总DNA或转座子的两个或更多个载体或质粒。载体的选择通常将取决于载体与待引入载体的宿主细胞的相容性。载体还可以包含选择标志物,诸如可用于选择合适的转化体的抗生素抗性基因。此类抗性基因的实例是本领域技术人员熟知的。

[0160] 除非另外具体说明,否则本文描述的每种实施方案加上必要的变更将被应用于每种和每一种实施方案。

[0161] 2. 缩写

[0162] 在整个申请中使用以下缩写:

[0163]	aa =	氨基酸
	CDR =	互补决定区
	CD38 =	分化簇 38

[0164]

CD103 =	分化簇 103
CD163 =	分化簇 163
CD200 =	分化簇 200
CD206 =	分化簇 206
CTLA4 =	细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4
DC =	树突细胞
Fc =	恒定区
FR =	框架
Gal9 =	半乳凝素-9
h =	小时
HVEM =	疱疹病毒进入介质
ICM =	免疫检查点分子
Ig =	免疫球蛋白
MAb =	单克隆抗体
MARCO =	具有胶原结构的巨噬细胞受体
OPG =	骨保护素
PD-1 =	程序性死亡 1
PD-L1 =	程序性死亡配体 1
RANK =	NF-κB 受体活化因子
RANKL =	NF-κB 受体活化因子配体
s =	秒
TME =	肿瘤微环境
V _H =	重链可变结构域
V _L =	轻链可变结构域

[0165] 3. RANK拮抗性抗原结合分子

[0166] 本发明公开了结合并拮抗RANK功能,包括拮抗RANKL/RANK信号传递途径的抗原结合分子。这些拮抗性抗原结合分子可以单独或与其他剂组合地用于一系列应用,包括治疗或预防骨质减少性紊乱、肌病和癌症。

[0167] 在特定实施方案中,本文公开的抗原结合分子包含:

[0168] (1) 包含VHCDR1氨基酸序列GFTFSSYAMH[SEQ ID NO:3]、VHCDR2氨基酸序列VVSYDGSTKS[SEQ ID NO:4]和VHCDR3氨基酸序列DPALRYFDWGYFQH[SEQ ID NO:5]的重链可变区(VH),以及包含VLCDR1氨基酸序列SGDKLGDKYVC[SEQ ID NO:6]、VLCDR2氨基酸序列GDSERPS[SEQ ID NO:7]和VLCDR3氨基酸序列QAWDSTTPL[SEQ ID NO:8]的轻链可变区(VL);

[0169] (2) 包含氨基酸序列

EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAWVSVDGSTKSYADS
MKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGTLTVSS

[SEQ ID NO:1]的VH和包含氨基酸序列

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVLVIYGDSEPSGIPERFSGSN
SGNTATLTISGTRAVDEADYYCAWDSTTPLFGGGTNTLV [SEQ ID NO:2]的VL;

[0170] (3) 与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90% (包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比) 序列同一性的VH和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90% (包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比) 序列同一性的VL;

[0171] (4) 与SEQ ID NO:1的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的氨基酸序列具有至少90% (包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比) 序列同一性的VH, 以及与SEQ ID NO:2的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的氨基酸序列具有至少90% (包括至少91%至99%和其间的的所有整数百分比) 序列同一性的VL;或

[0172] (5) 包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的序列中包含一个或更多个 (例如, 1个、2个、3个、4个或5个) 氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列的VH, 和包含在SEQ ID NO:2的氨基酸序列中除各CDR之外的框架区的序列中包含一个或更多个 (例如, 1个、2个、3个、4个或5个) 氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列的VL。

[0173] TNFR超家族 (TNFRSF) 成员 (RANK是它的成员) 通常通过与其各自的配体结合而被活化, 这些配体使TNFRSF寡聚化, 导致活化。配体和受体之间的这种结构相互作用对于治疗性抗体是有挑战性的, 因为抗体的二价性质可以二聚化, 所以激动而不是拮抗其预期的靶。事实上, TNFR超家族 (TNFRSF) (RANK是它的成员) 的寡聚化可以导致激动活性 (Wajant, H., 2015, Cell Death Differ. 22 (11): 1727-1741), 并且这包括抗体介导的RANK寡聚化导致激动活化的实例 (Chypre, 2016, 同上)。因此, 在一些实施方案中, 抗原结合分子是单价的, 并且不能够交联RANK或使RANK多聚化。单价抗原结合分子具有仅结合一个抗原分子的能力, 从而避免或减少受体交联和活化的风险。如本文使用的术语, 单价抗原结合分子也可以包含多于一个抗原结合位点, 例如两个抗原结合位点, 但是结合位点必须针对不同的抗原, 使得抗原结合分子一次仅能结合一个RANK分子。单价抗原结合分子的抗原结合结构域可以包含V_H和V_L结构域, 但是在一些实施方案中可以仅包含单个免疫球蛋白可变结构域, 即V_H或V_L结构域, 所述V_H或V_L结构域各自具有结合RANK的能力而不需要相应的V_L或V_H结构域。

[0174] 非限制性单价抗原结合分子包括: 由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域组成的Fab片段; 由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域以及一部分的C_{H2}结构域组成的Fab'片段; 由V_H和C_{H1}结构域组成的Fd片段; 由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段; 单链抗体分子 (例如, scFab和scFv); 由V_H结构域组成的单结构域抗体 (dAb) 片段 (Ward等人, 1989 Nature 341: 544-546); 以及诸如在US20080063641 (Genentech) 中描述的单臂抗体, 或诸如例如在W02007048037 (Amgen) 中描述的其他单价抗体。

[0175] 在特定实施方案中, 拮抗性抗原结合分子包含Fv片段。Fv片段是具有抗原结合活性的免疫球蛋白分子的最小单位。scFv (单链片段可变) 形式的抗原结合分子由重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 组成, 它们通过柔性肽接头连接在一起, 该柔性肽接头可以在表

达宿主诸如大肠杆菌和哺乳动物细胞中以功能性形式容易地表达,允许蛋白工程化以改进 scFv 的特性,诸如增加亲和力和改变特异性 (Ahmed 等人,2012.Clin Dev Immunol.2012: 980250)。在 scFv 构建中,结构域的顺序可以是 V_H -接头- V_L 或 V_L -接头- V_H ,并且可以应用两种取向。

[0176] scFv 中使用的大部分接头序列是五肽多聚体 GGGGS (或 G4S 或 Gly4Ser)。这些包括 15-mer (G4S) 3 (Huston 等人,1988.Proc Natl Acad Sci US A.85 (16),5879-83)、18-mer GGSSRSSSSGGGGSGGGG (Andris-Widhopf 等人,“Generation of human scFv antibody libraries:PCR amplification and assembly of light-and heavy-chain coding sequences.”Cold Spring Harbor Protocols,2011 (9)) 和 20-mer (G4S) 4 (Schaefer 等人,“Construction of scFv Fragments from Hybridoma or Spleen Cells by PCR Assembly.”在:Antibody Engineering,R.Kontermann and S.Dübel,Springer Verlag,Heidelberg,Germany (2010) 第 21-44 页中)。已经提出了许多其他序列,包括具有附加功能的序列,例如表位标签或含有 Cre-Lox 重组位点的编码序列,或改进 scFv 特性的序列,通常在特定抗体序列的背景中。

[0177] scFv 的克隆通常通过两步重叠 PCR (也被称为重叠延伸剪接或 SOE-PCR) 进行,如 (Schaefer 等人,2010,同上) 描述的。 V_H 和 V_L 结构域首先被扩增和凝胶纯化,并且其次以单步组装 PCR 被组装。接头通过两个内部引物的重叠或通过添加其序列覆盖整个接头或更多的接头引物来产生 (三片段组装 PCR)。

[0178] 在一些实施方案中,RANK 拮抗剂 scFv 分子包含源自本文描述的抗 RANK 噬菌粒克隆 3A3 的 V_H 和 V_L 序列的 CDR 序列,如表 1 中列出的。

[0179] 表 1

重链		轻链	
CDR1	GFTFSSYAMH [SEQ ID NO:3]	CDR1	SGDKLGDKYVC [SEQ ID NO:6]
CDR2	VVSVDGSTKS [SEQ ID NO:4]	CDR2	GDSEPS [SEQ ID NO:7]
CDR3	DPALRYFDWGYFQH [SEQ ID NO:5]	CDR3	QAWDSTTPL [SEQ ID NO:8]

[0181] 在这种类型的代表性实例中,RANK 拮抗性抗原结合分子包含序列:

EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSYDGSTKSYAD
 SMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGT LTVSSG
 GGGSGGGSGGGGSsyeltqppsvsvspgqtasitcsgdklgdkyvcwyqqkpgqspvlviygdserpsgip
 erfsgsnsgntatltisgtravdeadyycqawdsttplfgggtntlvi [SEQ ID NO:17],

[0183] 其中:

[0184] • 大写常规文本对应于抗 RANK MAb 3A3 的可变重链氨基酸序列,

[0185] • **GGGSGGGSGGGGS** [SEQ ID NO:18] 是柔性接头

[0186] • 小写文本对应于抗 RANK MAb 3A3 的可变轻链氨基酸序列。

[0187] ScFv 可以例如在大肠杆菌或哺乳动物宿主中通过将 scFv 的蛋白编码序列克隆在具有适当翻译、转录起始位点 (并且在哺乳动物表达的情况下,信号肽序列) 的适当表达载体的背景中来重组产生。

[0188] 在其他实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子由单个抗原结合片段(Fab)和Fc区组成或者基本上由单个抗原结合片段(Fab)和Fc区组成,其中Fc区包含第一Fc多肽和第二Fc多肽,并且其中第一Fc多肽和第二Fc多肽以复合物存在。该策略已经成功地应用于抗c-MET抗体,抗c-MET抗体展示出与c-MET的单价结合并且避免c-MET激动,如例如由Merchant等人(2013.Proc Natl Acad Sci U S A.110(32):E2987-96)描述的。

[0189] 含Fc的单价抗原结合分子的重组表达通常可导致不期望的二价同二聚体污染物。抑制同二聚体形成的策略是已知的,包括将突变引入免疫球蛋白恒定区以产生改变的结构的方法,该改变的结构支持多肽链之间不利的相互作用并抑制不需要的Fc同二聚体形成。这种促进异二聚化的策略的非限制性实例包括将knobs-into-holes(KIH)结构引入两种多肽中并且利用C_L和C_{H1}结构域的天然存在的异二聚化(参见,Kontermann,同上,第1-28页(2011);Ridgway等人,1996.Protein Eng.9(7):617-21;Atwell等人,1997.J Mol Biol.270(1):26-35;如在W0 2005/063816中描述的)。这些KIH突变促进含有knob的Fc和含有hole重链的异二聚化,改进了单价抗体的组装并降低了不期望的二价抗体的水平。

[0190] 如上文描述的拮抗性抗RANK人类抗体的Fc结构域的修饰将降低Fc受体结合,并且从而降低RANK的激动性交联的可能性。针对CD40蛋白(另一个与RANK具有高度同源性的TNFR超家族(TNFRSF)成员)的不同抗体具有不同的功能性拮抗与激动特性,并且表明TNFRS的激动可以通过Fc介导的交联由抗TNFR抗体赋予。例如,CD40上精确的TNFR CRD表位与同种型结合显示出决定抗CD40 mAb活性,使得CRD1结合性mAb与IgG2或FcγRIIB交联一样是激动性的(Yu等人,2018,Cancer Cell 33:664-675)。人类IgG(包括IgG1)中所谓的‘LALA’双突变(Leu234Ala和Leu235Ala一起)将显著削弱Fc受体结合和效应物功能(Lund等人,1991,J.Immunol.147,2657-2662;Lund等人,1992,Mol.Immunol.29:53-59)。对于人类IgG4,工程化突变S228P/L235E变体(SPLE)先前已经展示了最小的FcγR结合(Newman等人,2001,Clin.Immunol.98,164-174)。IgG1或IgG4 Fc结构域的突变可以组合,例如将人类IgG1中的LALA突变与P329G突变组合,或者将人类IgG4中的SPLE突变与P329G突变组合,将完全消除FcγR和C1q的相互作用(Schlothauer等人,2016,Protein Eng Des.Sel.29,457-466)。

[0191] 在一些实施方案中,RANK拮抗剂是抗RANK抗原结合分子(例如,mAb或其抗原结合片段),其中抗体的每条IgG1 Fc链携带P329G、L235A、L234A(P329G LALA)突变或每条IgG4 Fc链携带P329G、S228P、L235E突变,以消除抗体的任何不期望的交联或免疫效应物功能,例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用(ADCP)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0192] 因此,在一些实施方案中,本发明设想了通过共表达轻链、重链和截短的Fc结构域产生的单价RANK拮抗性抗原结合分子。合适地,重链掺入了hole突变和P329G LALA突变,而截短的Fc结构域掺入了knob突变和P329G LALA突变。在一些实施方案中,抗RANK抗体包含(a)含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列(3A3 V_H序列)、C_{H1}序列和第一Fc多肽的第一多肽;和(b)含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列(3A3 V_L序列)和C_{L1}序列的第二多肽。在一些实施方案中,抗RANK抗体还包含(c)含有第二Fc多肽的第三多肽。

[0193] 包含抗RANK臂的RANK拮抗性抗原结合分子的激动活性的体外筛选可以在RANK-Fas Jurkat测定中使用RANK拮抗性抗原结合分子的二价或单价抗体形式来进行,如(Schneider等人,2014,同上;Chypre等人,2016,同上)描述的。

[0194] 在构建单价RANK拮抗性抗原结合分子的一种实施方案中制备了三种构建体。首

先, 3A3的重链(V_H)结构域在 NH_2 末端与人类IgG1分子(例如, 阿特朱单抗)的截短的重链($C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$)直接串联融合, 其中重链 CH_3 结构域在位置407处被改变(Y407A), 称为“hole”, 以促进重链的KiH异二聚化。第二构建体是与人类IgG1分子(例如, 阿特朱单抗)的 C_L 直接串联融合的3A3的 V_L , 并且第三构建体是人类IgG1分子(例如, 阿特朱单抗)的截短的重链($C_{H2}-C_{H3}$), 其中重链 C_{H3} 结构域中的一个在位置366处被改变(T366W), 称为“knob”, 以促进重链的KiH异二聚化。两种重链构建体均包含用于降低Fc γ R和C1q相互作用的L234A、L235A、P329G取代。

[0195] 在非限制性实例中:

[0196] 第一构建体由与阿特朱单抗的截短的重链($C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$)直接串联融合的3A3的重链(V_H)结构域组成, 其中重链 C_{H3} 结构域在位置407处被改变(Y407A), 称为“hole”, 以促进重链的KiH异二聚化, 具有以下氨基酸序列:

EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSVDGSTKSYAD
SMKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGTLTVSSas
tkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyppevtvswngaltsgvhtfpavlgssglyssvvtvpssslgtqtyicn
[0197] vnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcape**AA**ggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnw
yvdgvevhnaktkpreeqyastyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkal**G**apiektiskakgqprepqvylppsr
eemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffl**A**skltvdkswqqgnvfscsvmhleah
nhytqkslslspgk [SEQ ID NO:19],

[0198] 其中:

[0199] • 抗RANK抗体(3A3) V_H 序列的成熟氨基酸序列以大写字母示出,

[0200] • 阿特朱单抗的恒定区($C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$)以小写字母示出,

[0201] • 用于降低Fc γ R和C1q相互作用的L234A、L235A、P329G取代和Y407A“hole”取代是粗体大写字母。

[0202] 第二构建体是与阿特朱单抗的 C_L 直接串联融合的3A3的 V_L , 具有以下氨基酸序列:

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVLVIYGDSEPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTRAVDEADYYCQAWDSTTFLFGGGTNLTVLrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcil
[0203] nnfyepreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqsdskdstyslsltliskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
[SEQ ID NO:20],

[0204] 其中:

[0205] • 抗RANK抗体(3A3) V_L 序列的成熟氨基酸序列以大写字母示出,

[0206] • 阿特朱单抗轻链的恒定区(C_L)以小写字母示出。

[0207] 第三构建体是阿特朱单抗的截短的重链($C_{H2}-C_{H3}$), 其中重链 C_{H3} 结构域在位置366处被改变(T366W), 称为“knob”, 以促进重链的KiH异二聚化, 具有以下氨基酸序列:

CPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**G**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
[0208] SREEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHLEAHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ ID NO:21],

[0209] 其中:

[0210] • 阿特朱单抗的恒定区($C_{H2}-C_{H3}$)的成熟氨基酸序列以大写字母示出,

[0211] • 用于降低Fc γ R和C1q相互作用的L234A、L235A、P329G取代和T366W“knob”取代是粗体大写文本。

[0212] 结合并拮抗RANK的这种单价分子的表达可以例如在大肠杆菌或哺乳动物宿主中通过将构建体的蛋白编码序列克隆在具有适当翻译、转录起始位点(并且在哺乳动物表达的情况下,信号肽序列)的适当表达载体的背景中来实现。描述了此类构建体的表达和纯化(Merchant等人,2013,同上)。

[0213] 另一种避免单价结合相互作用交联的策略包括在Fc/scFv-Fc剂的背景中产生Fc变体。具有单价抗原结合的基于异二聚体Fc的单特异性抗体(mAb)通过将scFv融合到仅一条Fc链的N末端来产生(Fc/scFv-Fc)(Moore等人,2011.MAbs.3(6):546-557;Ha等人,2016.Front Immunol.7:394)。为了产生异二聚体、单价Fc/scFv-Fc剂,设计了编码以下两种不同免疫球蛋白多肽的DNA构建体:(i)Fc(铰链-C_{H2}-C_{H3})和(ii)scFv-Fc(VH-接头-VL-铰链-C_{H2}-C_{H3})。此处两个不同的C_{H3}结构域,C_{H3}和C_{H3},代表产生“Knobs-into-holes”结构的不对称变化,其通过将大氨基酸(knob)引入所需异二聚体的一条链和将小氨基酸(hole)引入所需异二聚体的另一条链来促进多肽链的异二聚化。两种构建体均包含用于降低Fc γ R和C1q相互作用的L234A、L235A、P329G取代。

[0214] 在产生单价异二聚体Fc/scFv-Fc抗RANK拮抗剂的一种实施方案中,设计了编码以下两种不同免疫球蛋白多肽的两种构建体:

[0215] 第一构建体由人类IgG1(例如,阿特朱单抗)的截短的重链(铰链-C_{H2}-C_{H3})组成,其中重链C_{H3}结构域在位置407处被改变(Y407A),称为“hole”,以促进重链的KiH异二聚化,并且包括L234A、L235A、P329G取代,具有以下氨基酸序列:

EPKSCDKTHTastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvv
tvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcpape**AA**ggpsvflfpkpkdltmisrtpevtcvvv
[0216] **dvshedpevkfnwvydgvevhnaktkpreeqyastyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalG**apiektiskakg
qprepqvyltppsreemtknqvsitclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsffl**Ask**ltvdksrwqq
gnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg [SEQ ID NO:22],

[0217] 其中:

[0218] • 阿特朱单抗的C_{H2}-C_{H3}序列以小写字母示出,

[0219] • 阿特朱单抗的铰链区AA序列以加下划线的大写字母示出,

[0220] • 用于降低Fc γ R和C1q相互作用的L234A、L235A、P329G取代和Y407A“hole”取代是粗体大写文本。

[0221] 第二构建体由scFv部分(V_H-接头-V_L)组成,该scFv部分源自与人类IgG1(例如,阿特朱单抗)的截短的重链(铰链-C_{H2}-C_{H3})序列直接串联融合的抗RANK 3A3的V_H和V_L序列,其中重链C_{H3}结构域在位置366处被改变(T366W),称为“knob”,以促进重链的KiH异聚化,并且包括L234A、L235A、P329G取代,具有以下氨基酸序列:

EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSVDGSTKS
YADSMKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGTL
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSsyeltqppsvsvspgqtasitcsgdklgdkyvcwyqqkpgqspvlviy
gdserpsgiperfsgnsngntatltisgtravdeadyycawdsttplfgggtnltvIEPKSCDKTHTASTKGP
[0222] SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
WCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ ID NO:23],

[0223] 其中:

[0224] • 大写常规文本对应于抗RANK MA b 3A3的可变重链氨基酸序列,

[0225] • **GGGGSGGGGSGGGGS** [SEQ ID NO:18]是柔性接头

[0226] • 小写文本对应于抗RANK MA b 3A3的可变轻链氨基酸序列,

[0227] • 阿特朱单抗的铰链区和恒定区(C_{H2}-C_{H3})的氨基酸序列以加下划线的大写字母示出,

[0228] • 用于降低Fc γ R和C1q相互作用的L234A、L235A、P329G取代和T366W“knob”取代是粗体大写文本。

[0229] 单价异二聚体Fc/scFv-Fc抗RANK拮抗剂的表达和纯化可以通过将编码以上构建体的cDNA亚克隆到适当的哺乳动物表达载体(包括适当的信号肽编码序列)中来实现,并在哺乳动物细胞诸如HEK-293细胞中产生,如(Moore等人,2011.,MAbs 3,546-557)描述的。

[0230] 4. 治疗剂组合

[0231] 本发明人在2018年6月5日提交的共同未决的国际申请第PCT/AU2018/050557号中公开了共拮抗RANKL/RANK和免疫检查点分子(ICM)导致对癌症的免疫应答的协同增强。因此,设想本文公开的RANK拮抗性抗原结合分子和抗ICM抗原结合分子在用于刺激或增强受试者中对癌症的免疫应答的组合物中使用。该组合物通常使用(1)本文公开的RANK拮抗性抗原结合分子,和(2)至少一种抗ICM抗原结合分子。该组合物利用RANKL/RANK和ICM途径之间的新鉴定的协同作用,这导致CD8⁺T细胞在肿瘤或癌症部位的定位增加。有利地,协同组合物合适地刺激效应细胞功能的增强,包括例如增强的效应T细胞功能(包括Th1型细胞因子(例如,IFN-γ和/或IL-2)的产生)和多功能T细胞的比例增加。

[0232] 本发明人还在PCT/AU2018/050557中示出,在缺乏BatF3的小鼠中,抗RANKL mAb IK22/5的抗肿瘤功效被消除,表明CD103⁺DC介导的交叉呈递的重要作用。此外,来自肿瘤的CD11c⁺/MHCII⁺DC的流式细胞术分析揭示出,100%的RANK阳性DC也表达PDL-1和CD103。类似的分析表明,RANK阳性的肿瘤浸润性巨噬细胞上CD206表达的显著富集。这些数据与阻断RANK/RANKL破坏TME中表达RANK的骨髓细胞(例如,DC或巨噬细胞)和表达RANKL的细胞(诸如肿瘤细胞、淋巴细胞、淋巴结细胞或其他基质组分)之间的免疫抑制性或致耐受性(tolerogenic)轴的作用机制一致。

[0233] 人类癌症中骨髓细胞中的RANK信号传递的致耐受性性质已被实验观察所展示。与源自生殖道鳞状细胞癌(SCC)的表达RANKL的癌细胞系一起培养的人类DC具有更不成熟和

更致耐受的表型 (Demoulin等人, 2015. *Oncoimmunology* 4, e1008334)。这些DC的特征在于免疫球蛋白样转录物3和免疫调节性细胞因子IL-10的水平高于与正常角质形成细胞一起培养的DC。RANKL-RANK相互作用是诱导这种表型的部分原因, 因为通过向共培养物中添加可溶性RANKL诱饵受体OPG, 这种表型是部分可逆的。在人类乳腺外佩吉特病 (EMPD) (一种罕见的上皮内腺癌) 中, 肿瘤内的RANK表达主要与巨噬细胞标志物CD163 (也被称为富含半胱氨酸清道夫受体1型蛋白M130)、精氨酸酶-1 (Arg1) 和CD206 (巨噬细胞甘露糖受体1) 共定位, 表明表达RANK的细胞是免疫抑制性M2型肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) (Kambayashi等人, 2015. *J. Invest. Dermatol.* 135, 2547-2550)。因此, 本发明人还提出了包含以下的治疗剂组合: (1) 本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子和 (2) 至少一种抗原结合分子, 其特异性地结合骨髓细胞表面上与RANK共表达的抗原 (参见, 例如An等人, 2016. *Blood* 128 (12): 1590-603; Fujimura等人, 2015. *J. Invest. Dermatol.* 135: 2884-2887; Matsushita等人, 2010. *Cancer Immunol Immunother* 59: 875; Georgoudaki等人, 2016. *Cell Rep.* 15 (9): 2000-2011), 其代表性实例包括PD-L1、CD206、CD103、CD200、Gal9、HVEM、CD38、CD163和MARCO (在本文中也可互换地称为“辅助性髓样抗原” (AMA))。因此, 还设想本文公开的RANK拮抗性抗原结合分子与一种或更多种抗AMA抗原结合分子组合用于组合物和方法中, 用于刺激或增强 (例如, 对癌症的) 免疫, 用于抑制免疫抑制或 (例如, 对肿瘤的) 耐受性的发展或进展, 或用于抑制癌症的发展、进展或复发。这些方法合适地包括使骨髓细胞与治疗剂组合接触, 该治疗剂组合包含与一种或更多种抗AMA抗原结合分子组合的本文公开的RANK拮抗性抗原结合分子。

[0234] 治疗剂组合可以是单一组合物 (例如, 混合物) 的形式, 其包含RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子或抗AMA抗原结合分子中的每一种。可选地, RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM抗原结合分子可以作为单独组合物中的独立组分提供。

[0235] 合适的抗ICM抗原结合分子或抗AMA抗原结合分子可以选自抗体及其抗原结合片段, 包括重组抗体、单克隆抗体 (MAb)、嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体以及此类抗体的抗原结合片段。

[0236] 对于在人类中的应用, 通常期望降低最初源自其他物种 (如小鼠) 的抗体的免疫原性。这可以通过构建嵌合抗体或通过称为“人源化”的方法来完成。在本上下文中, “嵌合抗体”应理解为包含源自一个物种 (例如, 小鼠) 的结构域 (例如, 可变结构域) 融合至源自不同物种 (例如, 人类) 的结构域 (例如, 恒定结构域) 的抗体。

[0237] “人源化抗体”是指包含来自非人类 (例如, 鼠) 抗体以及人类抗体的序列的抗体形式。此类抗体是含有源自非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。通常, 人源化抗体将包含至少一种并且通常两种可变结构域的基本上全部, 其中全部或基本上全部的高变环对应于非人类免疫球蛋白的高变环, 并且全部或基本上全部的框架区 (FR) 是人类免疫球蛋白序列的框架区。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分, 通常是人类免疫球蛋白的恒定区的至少一部分 (参见, Jones等人, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature* 332: 323-329 (1988); 和Presta, *Curr Op Struct Biol* 2: 593-596 (1992))。人源化基本上可以按照Winter等人 (参见Jones等人, 同上; Riechmann等人, 同上; 和Verhoeyen等人, *Science* 239: 1534-1536 (1988)) 的方法通过将啮齿动物CDR或CDR序列取

代为人抗体相应序列来进行。此外,已经开发了基于源自人类基因组的序列产生抗体的技术,例如通过噬菌体展示或使用转基因动物(参见,国际专利公布第W0 90/05144号;Marks等人,(1991)By-passing immunization.Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage,J Mol Biol,222,581-597;Knappik等人,J Mol Biol 296:57-86,2000;Carmen和Jermutus,Concepts in antibody phage display,Briefings in Functional Genomics and Proteomics2002 1(2):189-203;Lonberg和Huszar,Human antibodies from transgenic mice.Int Rev Immunol 1995;13(1):65-93;Bruggemann和Taussig,Production of human antibody repertoires in transgenic mice,Curr Opin Biotechnol 19978(4):455-8)。在本发明的上下文中,此类抗体是“人类抗体”。

[0238] 设想可以在疗法中使用的任何合适的抗ICM抗原结合分子用于本发明的实践。受本发明的治疗剂组合拮抗的ICM包括选自以下的抑制性ICM中的任一种或更多种:PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、A2AR、A2BR、CD276、VTCN1、BTLA、IDO、KIR、LAG3、TIM-3、VISTA、CD73、CD96、CD155、DNAM-1、CD112、CRTAM、OX40、OX40L、CD244、CD160、GITR、GITRL、ICOS、GAL-9、4-1BBL、4-1BB、CD27L、CD28、CD80、CD86、SIRP-1、CD47、CD48、CD244、CD40、CD40L、HVEM、TMIGD2、HLA2、VEGI、TNFRS25和ICOLG。合适地,在治疗剂组合包含RANKL拮抗剂和单一ICM拮抗剂的实施方案中,ICM不是CTLA-4。

[0239] 在一些优选的实施方案中,治疗剂组合中包含的抗ICM抗原结合分子是抗PD-1抗原结合分子。在这方面,“抗PD-1抗原结合分子”包括阻断PD-L1(例如,在癌细胞的表面上表达的PD-L1)与在免疫细胞(例如,T细胞、B细胞或NKT细胞)上表达的PD-1结合的任何抗原结合分子。PD-1的替代名称或同义词包括PDCD1、PD1、CD279和SLEB2。人类PD-1(UniProt登录号Q15116)的代表性成熟氨基酸序列在以下列出:

```
PGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFP
EDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAE
[0240] VPTAHPSPSPRAGQFQTLVGVGVGGLLSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPV
FSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCS
WPL [SEQ ID NO:10].
```

[0241] 结合人类PD-1并因此用于本发明的MAb的实例在美国专利公布第US2003/0039653号、第US2004/0213795号、第US2006/0110383号、第US2007/0065427号、第US2007/0122378号、第US2012/237522号和国际PCT公布第W02004/072286号、第W02006/121168号、第W02006/133396号、第W02007/005874号、第W02008/083174号、第W02008/156712号、第W02009/024531号、第W02009/014708号、第W02009/114335号、第W02010/027828号、第W02010/027423号、第W02010/036959号、第W02010/029435号、第W02010/029434号、第W02010/063011号、第W02010/089411号、第W02011/066342号、第W02011/110604号、第W02011/110621号和第W02012/145493号中描述(这些公布的全部内容通过引用并入本文)。可用于本发明目的的特异性MAb包括抗PD-1MAb纳武单抗、派姆单抗和pidilizumab,以及在国际专利公布第W02008/156712号中描述的人源化抗PD-1抗体h409A11、h409A16和h409A17。

[0242] 本发明的抗PD-1抗原结合分子优选地结合PD-1的细胞外结构域的区域。举例来说,抗PD-1抗原结合分子可以特异性地结合人类PD-1的细胞外结构域的区域,该区域包含

氨基酸序列 **SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDR [SEQ ID NO:9]** (即, SEQ ID NO:10 中列出的天然PD-1序列的残基62至86) 和 **SGTYLCGAISLAPKAQIKE [SEQ ID NO:11]** (即, SEQ ID NO:10 中列出的天然PD-1序列的残基118至136) 中的一个或两个。在另一种实例中, 抗PD-1抗原结合分子结合人类PD-1的细胞外结构域的区域, 该区域包含氨基酸序列 **NWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCFRV [SEQ ID NO:12]** (即, 对应于 SEQ ID NO:10 中列出的天然人类PD-1序列的残基66至97)。

[0243] 在某些实施方案中, 抗PD-1抗原结合分子包含完全人源化的IgG4MAb纳武单抗 (如在美国专利第8,008,449号中详细描述 (被称为“5C4”), 该专利通过引用以其整体并入本文) 或其抗原结合片段。在这种类型的代表性实例中, 抗PD-1抗原结合分子包含如表2中列出的CDR序列。

[0244] 表2

重链		轻链	
CDR1	NSGMH [SEQ ID NO:24]	CDR1	RASQSVSSYLA [SEQ ID NO:27]
CDR2	VIWYDGSKRYADSVKG [SEQ ID NO:25]	CDR2	DASNRAT [SEQ ID NO:28]
CDR3	NDDYW [SEQ ID NO:26]	CDR3	QQSSNWPRT [SEQ ID NO:29]

[0246] 在其他特定实施方案中, 抗PD-1抗原结合分子包含如例如以下列出的纳武单抗的重链氨基酸序列:

QVQLVESGGGVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSKRYYA
DSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPCS
RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTPSSSLGTKYTC
[0247] NVDHKPSNTKVKDRVESKYGPCCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHLEAHNHYTQKSLSLSLGK [SEQ ID NO:30];

[0248] 或其抗原结合片段, 所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

QVQLVESGGGVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSKRYYA
[0249] DSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVSS [SEQ ID NO:31].

[0250] 在一些相同和其他的实施方案中, 抗PD-1抗原结合分子可以包含如例如以下列出的纳武单抗的轻链氨基酸序列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
[0251] GSGTDFLTISLLEPEDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:32];

[0252] 或其抗原结合片段, 所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
[0253] GSGTDFLTISLLEPEDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO:33].

[0254] 在可选的实施方案中,抗PD-1抗原结合分子包含人源化IgG4 MAb派姆单抗或其抗原结合片段。在这种类型的非限制性实例中,抗PD-1抗原结合分子包含如表3中列出的CDR序列。

[0255] 表3

重链		轻链	
CDR1	NYMY [SEQ ID NO:34]	CDR1	RASKGVSTSGYSYLH [SEQ ID NO:37]
CDR2	GINPSNGGTNFNEKFKN [SEQ ID NO:35]	CDR2	LASYLES [SEQ ID NO:38]
CDR3	RDYRFDMGFDY [SEQ ID NO:36]	CDR3	QHSRDLPLT [SEQ ID NO:39]

[0257] 在一些实施方案中,抗PD-1抗原结合分子与MAb派姆单抗竞争结合PD-1。

[0258] 在另外的实施方案中,抗PD-1抗原结合分子包含如例如以下列出的派姆单抗的重链氨基酸序列:

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFN
EKFKNRVLTITDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSV
FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
[0259] GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK [SEQ ID NO:40];

[0260] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFN
[0261] EKFKNRVLTITDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSS [SEQ ID NO:41].

[0262] 类似地,抗PD-1抗原结合分子可以包含如例如以下列出的派姆单抗的轻链氨基酸序列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYASYLESGVPAR
[0263] FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:42];

[0264] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYASYLESGVPAR
[0265] FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:43].

[0266] 在这种类型的又其他的实施方案中,抗PD-1抗原结合分子包含MAb pidilizumab或其抗原结合片段。在一些相关的实施方案中,抗PD-1抗原结合分子包含如表4中列出的CDR序列。

[0267] 表4

重链		轻链	
[0268] CDR1	NYGMN [SEQ ID NO:44]	CDR1	SARSSVSYMH [SEQ ID NO:47]
CDR2	WINTDSGESTYAEFKG [SEQ ID NO:45]	CDR2	RTSNLAS [SEQ ID NO:48]
CDR3	VGYDALDY [SEQ ID NO:46]	CDR3	QQRSSFPLT [SEQ ID NO:49]

[0269] 在更特别的实施方案中,抗PD-1抗原结合分子包含如以下列出的pidilizumab的重链氨基酸序列:

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYA
EEFKGRFVFSLDTSVNTAYLQITSLTAEDTGMVFCVRVGYDALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
[0270] YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ ID NO:50];

[0271] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYA
[0272] EEFKGRFVFSLDTSVNTAYLQITSLTAEDTGMVFCVRVGYDALDYWGQGLTVTVSS [SEQ ID
NO:51].

[0273] 在一些相同和其他的实施方案中,抗PD-1抗原结合分子包含如以下示出的pidilizumab的轻链氨基酸序列:

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSARSSVSYMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSRFSGS
[0274] GSGTSYCLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:52],

[0275] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSARSSVSYMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSRFSGS
[0276] GSGTSYCLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:53].

[0277] 其他合适的MAb在国际专利公布第W02015/026634号中被描述,该国际专利公布通过引用以其整体并入本文。这些包括MAb或其抗原结合片段,其包含:(a)具有以下氨基酸序列的轻链CDR:RASKSVSTSGFSYLH[SEQ ID NO:54]、LASNLES[SEQ ID NO:55]和QHSWELPLT[SEQ ID NO:56] (分别为CDR1、CDR2和CDR3)和具有以下氨基酸序列的重链CDR:SYLY[SEQ ID NO:57]、GVNPSNGGTNFSEKFKS[SEQ ID NO:58]和RDSNYDGGFDY[SEQ ID NO:59] (分别为CDR1、CDR2和CDR3);或(b)具有以下氨基酸序列的轻链CDR:RASKGVSTSGYSYLH[SEQ ID NO:60]、LASYLES[SEQ ID NO:61]和QHSRDLP[SEQ ID NO:62] (分别为CDR1、CDR2和CDR3)和具有以下氨基酸序列的重链CDR:NYMY[SEQ ID NO:63]、GINPSNGGTNFNEKFKN[SEQ ID NO:64]和RDYRFDMGFDY[SEQ ID NO:65] (分别为CDR1、CDR2和CDR3)。

[0278] 通过说明的方式,此类MAb可以包含重链可变区,其包含:

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFN
[0279] EKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVTVSS

[SEQ ID NO:66]或其变体或抗原结合片段;和

[0280] 轻链可变区,其包含选自以下的氨基酸序列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESVGPARG
[0281] FSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPFTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:67],

IVLTQSPLSLPVTGPGEASISCRASKGVSTSGYSYLHWYLQKPGQSPQLLIYLASYLESVGPDRFS
[0282] GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSRDLPFTFGQGTKLEIK [SEQ ID NO:68]或

DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRASKGVSTSGYSYLHWYLQKPGQSPQLLIYLASYLESVGPDR
[0283] FSGSGSGTAFTLKISRVEAEDVGLYYCQHSRDLPFTFGQGTKLEIK [SEQ ID NO:69]或其变体或抗原
结合片段。

[0284] 在又另外的示例性实施方案中,抗PD-1MAb可以包含IgG1重链,其包含:

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFN
EKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSV
FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSL
[0285] GTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK [SEQ ID NO:70] ,

或其变体或抗原结合片段;

[0286] 和轻链,其包含以下任一种:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESVGPARG
FSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:71],

EIVLTQSPLSLPVTGPGEASISCRASKGVSTSGYSYLHWYLQKPGQSPQLLIYLASYLESVGPDRF
[0287] SSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSRDLPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:72]

DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRASKGVSTSGYSYLHWYLQKPGQSPQLLIYLASYLESVGPDR
FSGSGSGTAFTLKISRVEAEDVGLYYCQHSRDLPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:73] ,或其变体或抗原结合片段。

[0288] 在其他实施方案中,ICM拮抗剂是PD-L1拮抗剂。PD-L1的替代名称或同义词包括PDCD1L1、PDL1、B7H1、B7-4、CD274和B7-H。通常,PD-L1拮抗剂特异性地结合如以下列出的人类PD-L1 (UniProt登录号Q9NZQ7)的天然氨基酸序列:

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNII
 QFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNA
 [0289] PYNKINQRILVDPVTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINT
 TTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKC
 GIQDTNSKKQSDTHLEET [SEQ ID NO:14].

[0290] 合适地,PD-L1拮抗剂是抗PD-L1抗原结合分子。举例来说,适用于本发明的抗PD-L1抗原结合分子包括抗PD-L1 MAb德瓦鲁单抗 (MEDI4736)、阿特朱单抗 (Tecentriq)、BMS-936559/MDX-1105、MSB0010718C、LY3300054、CA-170、GNS-1480、MPDL3280A和阿维鲁单抗。这些和其他抗PD-L1抗体在国际公布第W02007/005874号和第W02010/077634号以及美国专利第8,217,149号和第8,779,108号中被描述,这些文献中每一个的全部内容通过引用并入本文。另外的抗PD-L1 MAb在国际PCT专利公布第W02016/007,235号中描述,该专利的全部内容也通过引用并入本文。

[0291] 抗PD-L1抗原结合分子合适地结合PD-L1的细胞外结构域的区域。通过说明的方式,抗PD-L1抗原结合分子可以特异性地结合人类PD-L1的细胞外结构域的区域,该区域包含氨基酸序列SKKQSDTHLEET [SEQ ID NO:13] (即,在SEQ ID NO:14中列出的天然PD-L1序列的残基279至290)。在某些实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子包含完全人源化IgG1 MAb德瓦鲁单抗 (如参考国际PCT公布第W02011/066389号和美国专利公布第2013/034559号中的“MEDI4736”所描述的,这些专利通过引用以其整体并入本文) 或其抗原结合片段。在这种类型的代表性实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子包含如表5中列出的CDR序列。

[0292] 表5

重链		轻链	
CDR1	RYWMS [SEQ ID NO:74]	CDR1	RASQRVSSSYLA [SEQ ID NO:77]
CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVK [SEQ ID NO:75]	CDR2	DASSRATGIPD [SEQ ID NO:78]
CDR3	EGGWFGELAFDY [SEQ ID NO:76]	CDR3	QQYGSLPWT [SEQ ID NO:79]

[0294] 在更特别的实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子包含如例如以下列出的德瓦鲁单抗的重链氨基酸序列:

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVD
 SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 [0295] LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
 VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG [SEQ ID NO:80],

[0296] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVD
 [0297] SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSS [SEQ ID NO:81].

[0298] 在一些相同和其他的实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子可以包含轻链氨基酸序列:

[0299] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSG
SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:82],

[0300] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

[0301] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSG
SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO:83].

[0302] 可选地,抗PD-L1抗原结合分子与MAb德瓦鲁单抗竞争结合PD-L1。

[0303] 在其他实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子包含完全人源化IgG1MAb阿特朱单抗(如在美国专利第8,217,148号中描述的,该专利的全部内容通过引用并入本文)或其抗原结合片段。在这种类型的代表性实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子包含如表6中列出的CDR序列。

[0304] 表6

重链		轻链	
CDR1	GFTFSX ₁ SWIH [SEQ ID NO:84]	CDR1	RASQX ₄ X ₅ X ₆ TX ₇ X ₈ A [SEQ ID NO:87]
CDR2	AWIX ₂ PYGGSX ₃ YYADSVKG [SEQ ID NO:85]	CDR2	SASX ₉ LX ₁₀ S [SEQ ID NO:88]
CDR3	RHWPGGFDY [SEQ ID NO:86]	CDR3	QQX ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ PX ₁₅ T [SEQ ID NO:89]
其中 X ₁ 是 D 或 G; X ₂ 是 S 或 L; X ₃ 是 T 或 S; X ₄ 是 D 或 V; X ₅ 是 V 或 I; X ₆ 是 S 或 N; X ₇ 是 A 或 F; X ₈ 是 V 或 L; X ₉ 是 F 或 T; X ₁₀ 是 Y 或 A; X ₁₁ 是 Y、G 或 F; X ₁₂ 是 L、Y 或 F; X ₁₃ 是 Y、N、T、G、F 或 I; X ₁₄ 是 H、V、P、T 或 I; 并且 X ₁₅ 是 A、W、R、P 或 T。			

[0306] 在更特别的实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子包含如例如以下列出的阿特朱单抗的重链氨基酸序列:

[0307] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYAD
SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVW
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ ID NO:90],

[0308] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

[0309] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYAD
SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS [SEQ ID
NO:91].

[0310] 在一些相同和其他的实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子包含如例如以下提供的

阿特朱单抗的轻链氨基酸序列:

[0311] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:92],

[0312] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

[0313] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK [SEQ ID NO:93].

[0314] 可选地,抗PD-L1抗原结合分子与MAb阿特朱单抗竞争结合PD-L1。

[0315] 在其他实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子包含完全人源化IgG1MAb阿维鲁单抗(如在美国专利第8,217,148号中描述的,该专利的全部内容通过引用并入本文)或其抗原结合片段。在这种类型的代表性实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子包含如表7中列出的CDR序列。

[0316] 表7

重链		轻链	
CDR1	X ₁ YX ₂ MX ₃ [SEQ ID NO:94]	CDR1	TGTX ₇ X ₈ DVGX ₉ YNYVS [SEQ ID NO:97]
CDR2	SIYPSGGX ₄ TFYADX ₅ VKG [SEQ ID NO:95]	CDR2	X ₁₀ VX ₁₁ X ₁₂ RPS [SEQ ID NO:98]
CDR3	IKLGTVTTVX ₆ Y [SEQ ID NO:96]	CDR3	SSX ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ RV [SEQ ID NO:99]
其中 X ₁ 是 M、I 或 S; X ₂ 是 R、K、L、M 或 I; X ₃ 是 F 或 M; X ₄ 是 F 或 I; X ₅ 是 S 或 T; X ₆ 是 E 或 D; X ₇ 是 N 或 S; X ₈ 是 T、R 或 S; X ₉ 是 A 或 G; X ₁₀ 是 E 或 D; X ₁₁ 是 I、N 或 S; X ₁₂ 是 D、H 或 N; X ₁₃ 是 F 或 Y; X ₁₄ 是 N 或 S; X ₁₅ 是 R、T 或 S; X ₁₆ 是 G 或 S, 并且 X ₁₇ 是 I 或 T。			

[0318] 在特定实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子包含如例如以下提供的阿维鲁单抗的重链氨基酸序列:

[0319] EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADT
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARIKLTGTVTTVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ ID NO:100],

[0320] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

[0321] EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADT
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARIKLTGTVTTVDYWGQGLTVTVSS [SEQ ID
NO:101].

[0322] 在一些相同和其他实施方案中,抗PD-L1抗原结合分子包含如例如以下列出的阿维鲁单抗的轻链氨基酸序列:

[0323] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNR
FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQA
NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ
VTHEGSTVEKTVAPTECS [SEQ ID NO:102],

[0324] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

[0325] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNR
FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL [SEQ ID NO:103].

[0326] 可选地,抗PD-L1抗原结合分子与MAb阿维鲁单抗竞争结合PD-L1。

[0327] 在一些实施方案中,ICM拮抗剂是CTLA4的拮抗剂。CTLA4的替代名称或同义词包括ALPS5、CD、CD152、CELIAC3、CTLA-4、GRD4、GSE、IDDM12。通常,CTLA4拮抗剂特异性地结合如例如以下列出的人类CTLA4 (UniProt登录号P16410) 的成熟氨基酸序列:

[0328] KAMHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYM
MGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDS
FLLWILAAVSSGLFFYSFLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN [SEQ ID
NO:16].

[0329] 合适地,CTLA4拮抗剂是抗CTLA4抗原结合分子。举例来说,适用于本发明的抗CTLA4抗原结合分子包括抗CTLA4 MAb伊匹单抗 (BMS-734016、MDX-010、MDX-101) 和 tremelimumab (ticilimumab、CP-675,206)。

[0330] 抗CTLA4抗原结合分子合适地结合CTLA4的细胞外结构域的区域。通过说明的方式,抗CTLA4抗原结合分子可以特异性地结合人类CTLA4的细胞外结构域的区域,该区域包含氨基酸序列YASPGKATEVRVTVLRQA [SEQ ID NO:15] (即,SEQ ID NO:16中列出的天然CTLA4序列的残基26至42)、氨基酸序列DSQVTEVCAATYMMGNETLFLDD [SEQ ID NO:17] (即,SEQ ID NO:16中列出的天然CTLA4序列的残基43至65) 和氨基酸序列VELMYPPPYLGIG [SEQ ID NO:18] (即,SEQ ID NO:16中列出的天然CTLA4序列的残基96至109) 中的任一个或更多个。可选地或另外地,抗CTLA4抗原结合分子可以特异性地结合人类CTLA4的细胞外结构域的区域,该区域包含CTLA4成熟形式的以下残基中的任一个或更多个以及优选地所有:K1、A2、M3、E33、R35、Q41、S44、Q45、V46、E48、L91、I93、K95、E97、M99、P102、P103、Y104、Y105、L106、I108、N110。

[0331] 在某些实施方案中,抗CTLA4抗原结合分子包括人类IgG1 MAb伊匹单抗 (如例如在国际公布W02014/209804和美国专利公布第2015/0283234号中描述的,它们的全部内容通过引用并入本文) 或其抗原结合片段。在这种类型的代表性实施方案中,抗CTA4抗原结合分子包含如表8中列出的CDR序列。

[0332] 表8

重链		轻链	
CDR1	SYTMH [SEQ ID NO:104]	CDR1	RASQSVGSSYLA [SEQ ID NO:107]
CDR2	FISYDGNNKYYADSVKG [SEQ ID NO:105]	CDR2	GAFSRAT [SEQ ID NO:108]
CDR3	TGWLGPFDY [SEQ ID NO:106]	CDR3	QQYGSSPWT [SEQ ID NO:109]

[0334] 在更特别的实施方案中,抗CTLA4抗原结合分子包含如例如以下列出的伊匹单抗的重链氨基酸序列:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
[0335] QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ ID NO:110],

[0336] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段的非限制性实例包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYAD
[0337] SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSS [SEQ ID
NO:111].

[0338] 在一些相同和其他的实施方案中,抗CTLA4抗原结合分子包含如例如以下列出的伊匹单抗的轻链氨基酸序列:

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSG
SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
[0339] VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:112],

[0340] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段的代表性实例包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRA
[0341] TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO:113].

[0342] 抗CTLA4抗原结合分子包括人类IgG2 MAb tremelimumab (如例如在美国专利公布第2009/0074787号中描述的,该专利公布的全部内容通过引用并入本文) 或其抗原结合片段。在这种类型的代表性实施方案中,抗CTLA4抗原结合分子包含如表9中列出的CDR序列。

[0343] 表9

重链		轻链	
CDR1	GFTFSSYGMH [SEQ ID NO:114]	CDR1	RASQSINSYLD [SEQ ID NO:117]
CDR2	VIWYDGSNKYYADSV [SEQ ID NO:115]	CDR2	AASSLQS [SEQ ID NO:118]
CDR3	DPRGATLYYYYGMDV [SEQ ID NO:116]	CDR3	QQYYSTPFT [SEQ ID NO:119]

[0345] 在更特别的实施方案中,抗CTLA4抗原结合分子包含如例如以下列出的tremelimumab的重链氨基酸序列:

[0346] QVQLVESGGGVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSNKYYA
DSVKGRFTISRDN SKNTLYIQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYGMDVWGQGTITVTVSSAST
KGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCVECP PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT VVH QDWLNGKEYKCKVSN
KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ ID
NO:120],

[0347] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段的非限制性实例包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

[0348] QVQLVESGGGVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGN NKYYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTITVTVSS [SEQ ID
NO:121].

[0349] 在一些相同和其他的实施方案中,抗CTLA4抗原结合分子包含如例如以下列出的 tremelimumab 的轻链氨基酸序列:

[0350] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:122],

[0351] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段的代表性实例包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

[0352] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPFTFGPGTKVEIK [SEQ ID NO:123].

[0353] 在其他实施方案中,抗ICM抗原结合分子是抗B7-H3抗原结合分子。通常,抗B7-H3抗原结合分子特异性地结合如例如以下列出的人类B7-H3 (UniProt登录号Q5ZPR3) 的天然氨基酸序列:

[0354] MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPGFSLAQL
NLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFG
SAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGGQVPLTGNVTTSQMA
NEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTD
ATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLQRVR
VADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQD
GQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPP
EALWVTVGLSVCLIALVALAFVCWRKIKQSCEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHSDSKEDDG
QEIA [SEQ ID NO:124].

[0355] 适合地,适用于本发明的抗B7-H3抗原结合分子是MAb enoblituzumab或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗B7-H3抗原结合分子包含如表10中列出的CDR序列。

[0356] 表10

[0357]

重链		轻链	
CDR1	FGMH [SEQ ID NO:125]	CDR1	KASQNVDTNVA [SEQ ID NO:128]
CDR2	YISSDSSAIYYADTVK [SEQ ID NO:126]	CDR2	SASYRYS [SEQ ID NO:129]
CDR3	GRENIYYGSRLDY [SEQ ID NO:127]	CDR3	QQYNNYPFT [SEQ ID NO:130]

[0358] 在更特别的实施方案中,抗B7-H3抗原结合分子包含如例如以下列出的 enoblituzumab 的重链氨基酸序列:

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTV
KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRENIYYGSRLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
[0359] TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELVGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTLRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ ID NO:131],

[0360] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段的代表性实例包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTV
[0361] KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRENIYYGSRLDYWGQGTTVTVSS [SEQ ID
NO:132].

[0362] 在一些相同和其他的实施方案中,抗B7-H3抗原结合分子包含如例如以下提供的 enoblituzumab 的轻链氨基酸序列:

DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRSGVPSRFSG
[0363] SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:133],

[0364] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段的代表性实例包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRSGVPSRFSG
[0365] SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLEIK [SEQ ID NO:134].

[0366] 在一些可选的实施方案中,抗B7-H3抗原结合分子与MAb enoblituzumab竞争结合 B7-H3。

[0367] 在一些实施方案中,抗ICM抗原结合分子是抗KIR抗原结合分子。在这种类型的优选实施方案中,抗KIR抗原结合分子阻断KIR2-DL-1、KIR2-DL-2和KIR2-DL-3与其配体之间的相互作用。人类KIR,即KIR2-DL1 (UniProt登录号P43626) 的成熟氨基酸序列例如在以下提供:

[0368] HEGVHRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQCWSDVMFEHLLHREGMFNDTLRLIGEHHDGVSANF
SISRMTQDLAGTYRCYGSVTHSPYQVSAPSDPLDIVIIGLYEKPSLSAQPGPTVLAGEVNTLSCSSRSS
YDMYHLSREGEAHERRLPAGPKVNGTFQADFLPGPATHGGTYRCFGSFHDSPYEWSSDPLLVSVT
GNPSNSWSPTEPSSKTGNPRHLHILIGTSVVIILFILLFLLHRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANS
EDSDEQDPQEVYTYQLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSCP [SEQ ID
NO:135].

[0369] 适用于本发明的抗KIR抗原结合分子可以使用本领域熟知的方法产生。可选地，可以使用本领域公知的抗KIR抗原结合分子。例如，抗KIR抗原结合分子包含完全人源化的MAB
lirilumab或其抗原结合片段，如例如在W02014/066532中描述的，该专利的全部内容在此
以其整体并入本文。合适地，抗KIR抗原结合分子包含如表11中列出的CDR区。

[0370] 表11

重链		轻链	
CDR1	FYAIS [SEQ ID NO:136]	CDR1	RASQSVSSYLA [SEQ ID NO:139]
CDR2	GFIPIFGAANYAQKFQ [SEQ ID NO:137]	CDR2	DASNRAT [SEQ ID NO:140]
CDR3	IPSGSYYYDYMDV [SEQ ID NO:138]	CDR3	QQRSNWMT [SEQ ID NO:141]

[0372] 在这种类型的代表性实施方案中，抗KIR抗原结合分子可以包含如例如以下列出的
lirilumab的重链可变结构域氨基酸序列：

[0373] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFIPIFGAANYAQ
KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYMDVWGQGTITVTVSSASTKGP
SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSS
SLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK [SEQ ID NO:142],

[0374] 或其抗原结合片段，所述抗原结合片段的代表性实例包含以下氨基酸序列、由以
下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成：

[0375] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFIPIFGAANYAQ
KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYMDVWGQGTITVTVSS [SEQ
ID NO:143].

[0376] 在一些相同和其他的实施方案中，抗KIR抗原结合分子可以包含如例如以下列出的
lirilumab的轻链可变结构域氨基酸序列：

[0377] EIVLTQSPVTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
GSGDTFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWMTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:144],

[0378] 或其抗原结合片段，所述抗原结合片段的代表性实例包含以下氨基酸序列、由以
下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成：

[0379] EIVLTQSPVTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGS
GSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWMTFGQGTEIKRT [SEQ ID NO:145].

[0380] 在可选的实施方案中,抗ICM抗原结合分子是抗LAG-3抗原结合分子。LAG-3是具有四个细胞外Ig样结构域的503个氨基酸的I型跨膜蛋白。LAG-3表达于活化的T细胞、NK细胞、B细胞和浆细胞样DC上。人类LAG-3 (UniProt登录号P18627) 的代表性成熟氨基酸序列在以下列出:

[0381] LQPGAEPVWVWAQEGAPALPCSPITPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPH
PAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAV
HLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESP
HHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLP
AGVGTRSFLLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSAQAQAGTYTCHIHLQEQQLNATVTLAIITV
TPKSFGSPGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGER
LLGAAVYFTLSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLILGVLSLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQ
GIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEQL [SEQ ID NO:146].

[0382] 在一些实施方案中,抗LAG-3抗原结合分子合适地是抗LAG3人源化MAb, BMS-986016。其他抗LAG-3抗体在美国专利公布第2011/0150892号和国际PCT公布第W02010/019570号和第W02014/008218号中被描述,这些专利公布中的每一项通过引用以其整体并入本文。

[0383] 在一些实施方案中,抗LAG-3抗原结合分子包含表12中列出的CDR序列。

[0384] 表12

重链		轻链	
CDR1	DYYWN [SEQ ID NO:147]	CDR1	RASQSISSYLA [SEQ ID NO:150]
CDR2	EINHRGSTNSNP SLKS [SEQ ID NO:148]	CDR2	DASNRAT [SEQ ID NO:151]
CDR3	GYSDYEYNWFDP [SEQ ID NO:149]	CDR3	QQRSNWPLT [SEQ ID NO:152]

[0386] 抗LAG-3抗原结合分子合适地包含MAb BMS-986016或其抗原结合片段。更特别地,在一些实施方案中,抗LAG-3抗原结合分子具有如例如以下列出的BMS-986016的重链氨基酸序列:

[0387] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGSTNSNP
LKSRVTLSDTSKNQFSLKLRVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDPWGQGTLTVTSSASTKGPSVF
PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
TKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK [SEQ ID NO:153],

[0388] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段的代表性实例包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGSTNSNPS

[0389] LKSRVTLSDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDEYNWFDPWGQGTLLTVSS [SEQ ID NO:154].

[0390] 类似地,抗LAG-3抗原结合分子可以包含如下文提供的BMS-986016的轻链氨基酸序列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
[0391] GSGDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:156]

[0392] 或其抗原结合片段,所述抗原结合片段的代表性实例包含以下氨基酸序列、由以下氨基酸序列组成或基本上由以下氨基酸序列组成:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
[0393] GSGDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIK [SEQ ID NO:157].

[0394] 还设想可以在疗法中使用的任何合适的抗AMA抗原结合分子与本发明的RANK拮抗性抗原结合分子组合使用。

[0395] 5. 多特异性抗原结合分子

[0396] 在RANK拮抗性抗原结合分子和抗ICM或抗AMA抗原结合分子被提供在同一组合物中的一些实施方案中,它们以多特异性抗原结合分子的形式缀合在一起。

[0397] 多特异性抗原结合分子的代表性实例包括串联scFv (taFv或scFv₂)、双抗体、dAb₂/V_HH₂-knobs-into-holes衍生物、SEED-IgG、异Fc-scFv、Fab-scFv、scFv-Jun/Fos、Fab'-Jun/Fos、三抗体、DNL-F(ab)₃、scFv₃-C_H1/CL、Fab-scFv₂、IgG-scFab、IgG-scFv、scFv-IgG、scFv₂-Fc、F(ab')₂-scFv₂、scDB-Fc、scDb-C_H3、Db-Fc、scFv₂-H/L、DVD-Ig、tandAb、scFv-dhlx-scFv、dAb₂-IgG、dAb-IgG、dAb-Fc-dAb和它们的组合。在特定实施方案中,合成或重组抗原结合分子选自IgG样抗体(例如,triomab/四源杂交瘤(quadroma),Trion Pharma/Fresenius Biotech;knobs-into-holes,Genentech,CrossMAbs,Roche,静电匹配的抗体,AMGEN;LUZ-Y,Genentech;链交换工程化结构域(SEED)抗体,EMD Serono;biolonic,Merus;和Fab-交换抗体,Genmab)、对称的IgG样抗体(例如,双重靶向(DT)-Ig,GSK/Domantis;二合一抗体,Genentech;交联Mab,karmanos cancer center;Mab₂,F-star;和Coy X-体,Coy X/Pfizer)、IgG融合物(例如,双重可变结构域(DVD)-Ig,Abbott;IgG样双特异性抗体,Eli Lilly;Ts2Ab,Medimmune/AZ;BsAb,ZymoGenetics;HERCULES,Biogen Idec;TvAb,Roche)、Fc融合物(例如,ScFv/Fc融合物,Academic Institution;SCORPION,Emergent BioSolutions/Trubion,ZymoGenetics/BMS;双亲和重靶向技术(Fc-DART),MacroGenics;双(ScFv)₂-Fab,National Research Center for Antibody Medicine)、Fab融合物(例如,F(ab)₂,Medarex/AMGEN;双重作用或Bis-Fab,Genentech;对接和锁定(DNL),ImmunoMedics;二价双特异性,Biotechnol;和Fab-Fv,UCB-Celltech)、基于ScFv和双抗体的抗体(例如,双特异性T细胞衔接器(BiTEs),Micromet;串联双抗体(Tandab),Affimed;DART,MacroGenics;单链双抗体,Academic;TCR样抗体,AIT,Receptor Logics;人类血清白蛋白ScFv融合物,Merrimack;和COMBODIES,Epigen Biotech)、IgG/非IgG融合物(例如,免疫细胞因子,EMDSerono,Philogen,ImmunGene,ImmunoMedics;超抗原融合蛋白,Active

Biotech;和针对癌症的免疫固定mTCR, ImmTAC)和寡克隆抗体(例如, Symphogen和Merus)。

[0398] 多特异性抗原结合分子的其他非限制性实例包括Fab串联免疫球蛋白(FIT-Ig)(Gong等人, 2017. MAbs. 9 (7): 1118-1128. doi: 10.1080/19420862.2017.1345401. Epub 2017 Jul 10. PubMed PMID: 28692328; PubMed Central PMCID: PMC5627593), 并且能够结合两种或更多种抗原。在FIT-Ig分子的设计中, 来自亲本mAb的两种Fab结构域以交叉取向直接串联融合。当这三种片段在哺乳动物细胞中共表达时, 组装形成四价多特异性FIT-Ig分子。例如, 双特异性结合蛋白可以使用两种亲本单克隆抗体(mAb A(其结合抗原A)和mAb B(其结合抗原B))构建为FIT-Ig。在FIT-Ig分子的设计中, 来自亲本mAb的两种Fab结构域以交叉取向直接串联融合。当这三种片段在哺乳动物细胞中共表达时, 组装形成四价多特异性FIT-Ig分子。在代表性实施方案中, FIT-Ig提供了用于拮抗RANK和至少一种ICM或至少一种AMA的多特异性抗原结合分子。这些多特异性抗原结合分子通常包含以下、由以下组成或基本上由以下组成: 特异性地结合并拮抗RANK的被构建为FIT-Ig分子的抗体或其抗原结合片段, 以及对于各自的ICM或AMA, 特异性地结合该ICM或AMA的抗体或其抗原结合片段。至少一种抗ICM抗体或抗原结合片段合适地选自抗PD-1抗体或抗原结合片段、抗PD-L1抗体或抗原结合片段、或抗CTLA-4抗体或抗原结合片段, 并且被掺入FIT-Ig分子中。在多特异性抗原结合分子拮抗PD-1的一些实施方案中, 多特异性抗原结合分子包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。在多特异性抗原结合分子拮抗PD-L1的一些实施方案中, 多特异性抗原结合分子包含抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。在多特异性抗原结合分子拮抗CTLA4的一些实施方案中, 多特异性抗原结合分子包含抗CTLA4抗体或其抗原结合片段。

[0399] 另外, 至少一种抗AMA抗体或抗原结合片段合适地选自抗PD-L1抗体或抗原结合片段、抗CD206抗体或抗原结合片段、抗CD103抗体或抗原结合片段、抗CD200抗体或抗原结合片段、抗Ga19抗体或抗原结合片段、抗HVEM抗体或抗原结合片段、抗CD38抗体或抗原结合片段、抗CD163抗体或抗原结合片段、或抗MARCO抗体或抗原结合片段, 并且被掺入FIT-Ig分子中。因此, 在多特异性抗原结合分子拮抗CD206的一些实施方案中, 多特异性抗原结合分子包含抗CD206抗体或其抗原结合片段。在多特异性抗原结合分子拮抗PD-L1的一些实施方案中, 多特异性抗原结合分子包含抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。在多特异性抗原结合分子拮抗CD103的一些实施方案中, 多特异性抗原结合分子包含抗CD103抗体或其抗原结合片段。在多特异性抗原结合分子拮抗CD200的一些实施方案中, 多特异性抗原结合分子包含抗CD200抗体或其抗原结合片段。在多特异性抗原结合分子拮抗HVEM的一些实施方案中, 多特异性抗原结合分子包含抗HVEM抗体或其抗原结合片段。在多特异性抗原结合分子拮抗CD38的一些实施方案中, 多特异性抗原结合分子包含抗CD38抗体或其抗原结合片段。在多特异性抗原结合分子拮抗CD163的一些实施方案中, 多特异性抗原结合分子包含抗CD163抗体或其抗原结合片段。在多特异性抗原结合分子拮抗MARCO的一些实施方案中, 多特异性抗原结合分子包含抗MARCO抗体或其抗原结合片段。

[0400] 在某些实施方案中, 具有第一抗原结合特异性的抗原结合分子可以功能性连接(例如, 通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其他方式)到一个或更多个其他分子实体, 诸如具有第二抗原结合特异性的另一种抗原结合分子, 以产生双特异性抗原结合分子。可以用于本发明的上下文的特定的示例性多特异性形式包括但不限于单链双抗体(scDb)、串联scDb(Tandab)、线性二聚体scDb(LD-scDb)、环状二聚体scDb(CD-scDb)、双特异性T细胞

衔接器(BiTE;串联di-scFv)、二硫键稳定的Fv片段(Brinkmann等人,Proc Natl Acad Sci USA.1993;90:7538-7542)、串联tri-scFv,三抗体、双特异性Fab₂、双微型抗体、四抗体、scFv-Fc-scFv融合物、二-双抗体、DVD-Ig、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv2-Fc、IgG-scFv融合物,诸如bsAb(连接到轻链的C末端的scFv)、Bs1Ab(连接到轻链的N末端的scFv)、Bs2Ab(连接到重链的N末端的scFv)、Bs3Ab(连接到重链的C末端的scFv)、Ts1Ab(连接到重链和轻链两者的N末端的scFv)、Ts2Ab(连接到重链的C末端的dsscFv)和Knob-into-Holes(KiH)(通过KiH技术制备的双特异性IgG),SEED技术(SEED-IgG)和DuoBodies(通过DuoBody技术制备的双特异性IgG),VH和VL结构域,每个结构域融合到KiH或DuoBody的两个不同重链的一个C末端,使得形成一个功能性Fv结构域。特别适合用于本文的是单链双抗体(scDb),特别是双特异性单体scDb。关于讨论和介绍各种多特异性构建体的综述,参见,例如,Chan Carter,Nature Reviews Immunology 10(2010)301-316;Klein等人,MAbs 4(2012)1-11;Schubert等人,Antibodies 1(2012)2-18;Byrne等人,Trends in Biotechnology 31(2013)621;Metz等人,Protein Engineering Design&Selection 25(2012)571-580),以及其中引用的参考文献。

[0401] 在特定实施方案中,本发明提供了双特异性抗原结合分子,其包含特异性地结合并拮抗RANK的第一抗原结合分子(例如,抗体或抗原结合片段)和特异性地结合ICM的第二抗原结合分子(例如,抗体或抗原结合片段)。双特异性抗原结合分子合适地包含上文和本文其他地方详细描述的任何抗原结合分子。

[0402] 通过说明的方式,第一抗原结合分子是本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,并且第二抗原结合分子可以特异性地结合人类PD-1的区域,并且优选地结合人类PD-1的细胞外结构域的区域。

[0403] 这些实施方案的非限制性实例包括包含如表1中列出的CDR序列的第一抗原结合分子。第二抗原结合分子合适地包含如表2-表4中任一个表中列出的CDR序列。在这种类型的特定实例中,第二抗原结合分子至少可以包含选自纳武单抗、派姆单抗和pidilizumab的任一种MAb的抗原结合片段。

[0404] 在其他实施方案中,第二抗原结合分子特异性地结合人类PD-L1的区域,并且优选地结合人类PD-L1的细胞外结构域的区域。因此,在一些实施方案中,第二抗原结合分子特异性地结合PD-L1的区域,并且包含表5-表7中任一个表中列出的CDR序列。在这种类型的特定实例中,第二抗原结合分子至少可以包含选自德瓦鲁单抗、阿特朱单抗和阿维鲁单抗的任一种MAb的抗原结合片段。

[0405] 在还其他实施方案中,第二抗原结合分子特异性地结合人类CTLA4的区域。因此,在一些实施方案中,第二抗原结合分子特异性地结合人类CTLA4,并且包含表8-表9中任一个表中列出的CDR序列。在这种类型的特定实例中,第二抗原结合分子至少可以包含选自伊匹单抗和tremelimumab的任一种MAb的抗原结合片段。

[0406] 在特定实施方案中,本发明提供了双特异性抗原结合分子,其包含特异性地结合并拮抗RANK的第一抗原结合分子(例如,抗体或抗原结合片段)和特异性地结合AMA的第二抗原结合分子(例如,抗体或抗原结合片段)。

[0407] 在这些实施方案的代表性实例中,第一抗原结合分子是本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,并且第二抗原结合分子可以特异性地结合人类PD-L1的区域,并且优选地结合

人类PD-L1的细胞外结构域的区域。

[0408] 在其他代表性实例中,第一抗原结合分子是本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,并且第二抗原结合分子可以特异性地结合人类CD206的区域,并且优选地结合人类CD206的细胞外结构域的区域。

[0409] 在其他代表性实例中,第一抗原结合分子是本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,并且第二抗原结合分子可以特异性地结合人类CD103的区域,并且优选地结合人类CD103的细胞外结构域的区域。

[0410] 在还其他的代表性实例中,第一抗原结合分子是本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,并且第二抗原结合分子可以特异性地结合人类CD200的区域,并且优选地结合人类CD200的细胞外结构域的区域。

[0411] 在其他代表性实例中,第一抗原结合分子是本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,并且第二抗原结合分子可以特异性地结合人类Ga19的区域,并且优选地结合人类Ga19的细胞外结构域的区域。

[0412] 在其他代表性实例中,第一抗原结合分子是本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,并且第二抗原结合分子可以特异性地结合人类HVEM的区域,并且优选地结合人类HVEM的细胞外结构域的区域。

[0413] 在另外的代表性实例中,第一抗原结合分子是本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,并且第二抗原结合分子可以特异性地结合人类CD38的区域,并且优选地结合人类CD38的细胞外结构域的区域。

[0414] 在其他代表性实例中,第一抗原结合分子是本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,并且第二抗原结合分子可以特异性地结合人类CD163的区域,并且优选地结合人类CD163的细胞外结构域的区域。

[0415] 在还其他的代表性实例中,第一抗原结合分子是本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,并且第二抗原结合分子可以特异性地结合人类MARCO的区域,并且优选地结合人类MARCO的细胞外结构域的区域。

[0416] 本发明还提供了多特异性构建体,其包含RANK拮抗性抗原结合分子和对两种或更多种ICM具有特异性的多于一个ICM拮抗性抗原结合分子。在非限制性实例中,多于一个ICM拮抗性抗原结合分子对选自以下的ICM组合具有特异性:(1) PD-1和PD-L1,(2) PD-1和CTLA4,(3) PD-L1和CTLA4,和(4) PD-1、PD-L1和CTLA4。多特异性构建体可以包含对特定的ICM组合具有特异性的任何合适的抗体或抗原结合片段,包括本文公开的抗体或抗原结合片段。

[0417] 本发明还提供了多特异性构建体,其包含RANK拮抗性抗原结合分子和对两种或更多种AMA具有特异性的多于一个AMA拮抗性抗原结合分子。在非限制性实例中,多于一个AMA拮抗性抗原结合分子对选自以下的AMA组合具有特异性:(1) PD-L1和CD206、(2) PD-L1和CD103、(3) PD-L1和CD200、(4) PD-L1和Ga19、(5) PD-L1和HVEM、(6) PD-L1和CD38、(7) PD-L1和CD163、(8) PD-L1和MARCO、(9) CD206和CD103、(10) CD206和CD200、(11) CD206和Ga19、(12) CD206和HVEM、(13) CD206和CD38、(14) CD206和CD163、(15) CD206和MARCO、(16) CD103和CD200、(17) CD103和Ga19、(18) CD103和HVEM、(19) CD103和CD38、(20) CD103和CD163、(21) CD103和MARCO、(22) CD200和Ga19、(23) CD200和HVEM、(24) CD200和CD38、(25) CD200和

CD163、(26) CD200和MARCO、(27) Ga19和HVEM、(28) Ga19和CD38、(29) Ga19和CD163、(30) Ga19和MARCO、(31) HVEM和CD38、(32) HVEM和CD163、(33) HVEM和MARCO、(34) CD38和CD163、(35) CD38和MARCO、(36) CD163和MARCO、(37) PD-L1、CD206和CD103、(38) PD-L1、CD206和CD200、(39) PD-L1、CD206和Ga19、(40) PD-L1、CD206和HVEM、(41) PD-L1、CD206和CD38、(42) PD-L1、CD206和CD163、(43) PD-L1、CD206和MARCO、(44) CD206、CD103和CD200、(45) CD206、CD103和Ga19、(46) CD206、CD103和HVEM、(47) CD206、CD103和CD38、(48) CD206、CD103和CD163、(49) CD206、CD103和MARCO、(50) CD103、CD200和Ga19、(51) CD103、CD200和HVEM、(52) CD103、CD200和CD38、(53) CD103、CD200和CD163、(54) CD103、CD200和MARCO、(55) CD200、Ga19和HVEM、(56) CD200、Ga19和CD38、(57) CD200、Ga19和CD163、(58) CD200、Ga19和MARCO、(59) Ga19、HVEM和CD38、(60) Ga19、HVEM和CD163、(61) Ga19、HVEM和MARCO、(62) HVEM、CD38和CD163、(63) HVEM、CD38和MARCO、(64) CD38、CD163和MARCO。多特异性构建体可以包含对特定的ICM组合具有特异性的任何合适的抗体或抗原结合片段,包括本文公开的抗体或抗原结合片段。

[0418] 本发明的多特异性抗原结合分子可以通过本领域熟知的许多方法产生。合适的方法包括生物学方法(例如,体细胞杂交)、遗传学方法(例如,在生物体中表达编码所需抗体结构的非天然DNA序列)、化学方法(例如,两种抗体的化学缀合)或它们的组合(参见,Kontermann R E(编著),*Bispecific Antibodies*,Springer Heidelberg Dordrecht London New York,1-28(2011))。

[0419] 5.1产生双特异性抗原结合分子的化学方法。

[0420] 化学缀合的双特异性抗原结合分子由两种现有抗体或抗体片段(诸如上文和本文其他地方描述的抗体或抗体片段)的化学偶联产生。典型的偶联包括使两种不同的全长抗体交联,使两种不同的Fab'片段交联以产生双特异性F(ab')₂,以及使F(ab')₂片段与不同的Fab'片段交联以产生双特异性F(ab')₃。对于化学缀合,可以使用氧化再缔合策略。目前的方法包括使用同双功能性交联试剂或异双功能性交联试剂(同上)。

[0421] 异双功能性交联试剂对例如抗体分子上的两个不同反应基团具有反应性。异双功能性交联试剂的实例包括SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SATA(琥珀酰亚胺基乙酰硫代乙酸酯)、SMCC(反式-4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯)、EDAC(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺)、PEAS(N-((2-吡啶基二硫代)乙基)-4-叠氮基水杨酰胺)、ATFB-SE(4-叠氮基-2,3,5,6-四氟苯甲酸琥珀酰亚胺酯)、二苯甲酮-4-马来酰亚胺、二苯甲酮-4-异硫氰酸酯、4-苯甲酰基苯甲酸琥珀酰亚胺酯、碘乙酰胺叠氮化物、碘乙酰胺炔烃、Click-iT马来酰亚胺DIBO炔烃、叠氮基(PEO)4丙酸琥珀酰亚胺酯、炔烃、琥珀酰亚胺酯、Click-iT琥珀酰亚胺酯DIBO炔烃、磺基-SBED(磺基-N-羟基琥珀酰亚胺基-2-(6-[生物素酰胺基]-2-(对-叠氮基苯甲酰胺基)-己酰胺基)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯)、光反应性氨基酸(例如,L-光反应-亮氨酸(L-Photo-Leucine)和L-光反应-甲硫氨酸(L-Photo-Methionine))、NHS-卤代乙酰基交联剂(例如,磺基-SIAB)、SIAB、SBAP、SIA、NHS-马来酰亚胺交联剂(例如,磺基-SMCC)、SM(PEG)_n系列交联剂、SMCC、LC-SMCC、磺基-EMCS、EMCS、磺基-GMBS、GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、MBS、磺基-SMPB、SMPB、AMAS、BMPS、SMPH、PEG12-SPDP、PEG4-SPDP、磺基-LC-SPDP、LC-SPDP、SMPT、DCC(N,N'-二环己基碳二亚胺)、EDC(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺)、NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)、磺基-NHS(N-羟基磺基

琥珀酰亚胺)、BMPH、EMCH、KMUH、MPBH、PDPH和PMPI。

[0422] 同双功能性交联试剂对例如抗体的分子上的相同反应基团具有反应性。同双功能性交联试剂的实例包括DTNB (5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)、o-PDM (邻亚苯基二马来酰亚胺)、DMA (己二亚氨酸二甲酯(dimethyl adipimidate))、DMP (庚二亚氨酸二甲酯)、DMS (辛二亚氨酸二甲酯)、DTBP (二硫代二丙亚氨酸)、BS (PEG)₅、BS (PEG)₉、BS³、BSOCOES、DSG、DSP、DSS、DST、DTSSP、EGS、磺基-EGS、TSAT、DFDNB、BM (PEG)_n交联剂、BMB、BMDB、BMH、BMOE、DTME和TMEA。

[0423] 5.2产生双特异性抗原结合分子的生物学方法

[0424] 体细胞杂交是两种不同杂交瘤(产生特定抗体的B细胞和骨髓瘤细胞的融合)细胞系的融合,产生能够产生两条不同的抗体重链(即,V_HA和V_HB)和轻链(即,V_LA和V_LB)的四源杂交瘤。(Kontermann,同上)。这些重链和轻链在细胞内随机组合,产生双特异性抗原结合分子(例如,V_HA链与V_LA链组合和V_HB链与V_LB链组合)以及一些非功能性的(例如,两条V_HA链与两条V_LB链组合)和单特异性的(例如,两条V_HA链与两条V_HA链组合)抗原结合分子。双特异性抗原结合分子然后可以使用成熟的方法,例如使用两个不同的亲和色谱柱纯化。

[0425] 与单特异性抗原结合分子类似,双特异性抗原结合分子也可以包含Fc区,该Fc区在抗原结合的下流引发Fc介导的效应。这些效应可以通过例如胃蛋白酶消化从双特异性抗体蛋白水解裂解Fc区,产生双特异性F(ab')₂分子来降低(同上)。

[0426] 5.3产生多特异性抗原结合分子的遗传学方法

[0427] 多特异性抗原结合分子也可以通过本领域成熟的遗传学手段产生,例如含有对应于所需抗体结构的DNA序列的质粒的体外表达(参见,例如Kontermann,同上)。

[0428] 5.4双抗体

[0429] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合分子是双抗体。双抗体包含来自例如结合并拮抗RANK和ICM的抗体的两条单独的多肽链,每条链带有两个可变结构域(V_HA-V_LB和V_HB-V_LA或V_LA-V_HB和V_LB-V_HA)。通常,连接可变结构域的多肽接头是短的(即,约2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸残基)。短的多肽接头阻止同一链上的V_H结构域和V_L结构域的缔合,并从而促进不同链上的V_H结构域和V_L结构域的缔合。形成的异二聚体针对两种靶抗原都有功能(例如,V_HA-V_LB与V_HB-V_LA或V_LA-V_HB与V_LB-V_HA)。然而,同二聚体也可以形成(例如,V_HA-V_LB与V_HA-V_LB,V_HB-V_LA与V_HB-V_LA等),导致非功能性分子。本领域已知用于防止同二聚化的几种策略,包括引入二硫键以共价连接两条多肽链,修饰多肽链以在一条链上包含大氨基酸且在另一条链上包含小氨基酸(knobs-into-holes结构,如上文和本文其他地方讨论的),以及在C末端延伸处添加半胱氨酸残基。另一种策略是通过多肽接头序列连接两条多肽链,产生单链双抗体分子(scDb),其表现出比taFv更紧凑的结构。ScDb或双抗体也可以融合到IgG1 C_{H3}结构域或Fc区,产生二-双抗体。二-双抗体的实例包括但不限于scDb-Fc、Db-Fc、scDb-C_{H3}和Db-C_{H3}。此外,scDb可以用于制备四价双特异性分子。通过将scDb的多肽接头序列从约15个氨基酸缩短到约5个氨基酸,产生了二聚体单链双抗体分子,被称为TandAb(如在Muller和Kontermann在Bispecific Antibodies Kontermann R E(编著),Springer Heidelberg Dordrecht London New York,83-100(2011)中描述的)。

[0430] 5.5用于抗原结合分子产生的其他缀合技术

[0431] 用于产生根据本发明的多特异性抗原结合分子的另一种合适的策略包括将异二

聚化肽缀合或以其他方式连接到抗体分子(例如,scFv或Fab)的C末端。

[0432] 这种策略的非限制性实例是使用与jun-fos亮氨酸拉链连接的抗体片段(例如,scFv-Jun/Fos和Fab'-Jun/Fos)。

[0433] 用于产生双特异性抗原结合分子的另外的方法包括用生物素衍生具有不同抗原结合片段的两种抗体,并且然后经由链霉亲和素连接这两种抗体,随后纯化并分离所得到的双特异性抗体。

[0434] 根据本发明的另外类型的双特异性抗原结合分子包括对于每种抗原含有多于一个抗原结合位点的双特异性抗原结合分子。例如,另外的 V_H 和 V_L 结构域可以融合到现有抗体的 V_H 和 V_L 结构域的N末端,有效地串联排列抗原结合位点。这些类型的抗体被称为双重可变结构域抗体(DVD-Ig)(参见,Tarcsa,E.等人,在Bispecific Antibodies中。Kontermann,同上,第171-185页)。用于产生对于抗原含有多于一个抗原结合位点的抗体的另一种方法是将scFv片段融合到重链的N末端或轻链的C末端(在下文更详细地讨论)。

[0435] 多特异性抗原结合分子复合物或构建体的抗体或抗原结合片段独立地选自IgM、IgG、IgD、IgA、IgE或其片段组成的组,它们通过其重链恒定区的氨基酸序列相互区分。这些Ig类别中的若干种被进一步分为亚类,诸如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的抗体的重链恒定区分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。可存在于所有五种抗体类别中的轻链恒定区(C_L)选自 κ (kappa)和 λ (lambda)。保留抗原识别和结合能力的抗体片段为Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。此外,第一抗原结合片段和第二抗原结合片段直接或通过接头(例如,多肽接头)连接。

[0436] 5.6使用IgG支架产生双特异性抗原结合分子。

[0437] 恒定免疫球蛋白结构域可以合适地用于促进两条多肽链的异二聚化(例如,IgG样抗体)。用于产生双特异性抗体的这种策略的非限制性实例包括将knobs-into-holes结构引入两种多肽,以及利用 C_L 和 C_H1 结构域的天然存在的异二聚化(参见,Kontermann,同上,第1-28页(2011);Ridgway等人,Protein Eng.1996Jul;9(7):617-21;Atwell等人,J Mol Biol.1997Jul4;270(1):26-35)。

[0438] 根据本发明的大部分重组抗原结合分子可以被工程化为IgG样,这意味着它们也包含Fc结构域。与需要工程化多肽链的异二聚化的双抗体类似,IgG样抗原结合分子也需要异二聚化以防止来自两种不同特异性的抗体的重链样链(like heavy chain)或重链和轻链的相互作用(Jin,P.和Zhu,Z.在:Bispecific Antibodies中。Kontermann RE(编著),Springer Heidelberg Dordrecht London New York,第151-169页(2011))。

[0439] Knobs-into-holes结构通过将大氨基酸(knobs)引入所需异二聚体的一条链中并将小氨基酸(holes)引入所需异二聚体的另一条链中来促进多肽链的异二聚化。空间相互作用将有利于knobs与holes的相互作用,而不是knobs与knobs或holes与holes的相互作用。在双特异性IgG样抗体的情况下,可以通过将knobs-into-holes(KiH)结构引入Fc区的CH3结构域来防止重链样链的同二聚化。类似地,促进对同一抗原特异的重链和轻链的相互作用可以通过在VH-VL界面处工程化KiH结构来实现。特别地,在KiH方法中,将大氨基酸侧链引入一条重链的CH3结构域,该侧链适合进入另一条重链的CH3结构域中适当设计的空腔(参见,例如Ridgway等人,Protein Eng.9(1996),617-621和Atwell等人,J.Mol.Biol.270(1997),677-681,该文献在此通过引用并入本文)。因此,重链的异二聚体往往比任一同二

聚体更稳定,并且形成更大比例的表达多肽。此外,所需轻链/重链对的缔合可以通过修饰双特异性抗体的一个Fab (Fab区) 来“交换”轻链和重链之间的恒定区或恒定区和可变区来诱导。因此,在修饰的Fab结构域中,分别地,重链将包含例如CL-V_H或CL-V_L结构域,并且轻链将包含CH₁-V_L或CH₁-V_H结构域。这防止修饰链(即,修饰的轻链或重链)的重链/轻链Fab部分与标准/非修饰臂的重链/轻链Fab部分的相互作用。通过解释的方式,包含CL结构域的修饰臂的Fab结构域中的重链不优先与也包含CL结构域的非修饰臂/Fab结构域的轻链相互作用(防止重链/轻链的“不适当”或不期望的配对)。这种用于防止“不适当的”轻链/重链缔合的技术被称为“CrossMAb”技术,并且当与KiH技术组合时,导致所需双特异性分子的表达显著增强(参见,例如Schaefer等人Proc Natl Acad Sci U S A.2011;108(27):11187-92;和美国专利公布第2010/0159587号,这些文献在此通过引用以其整体并入本文)。存在KiH结构的其他实例,并且上文讨论的实例不应被解释为限制性的。促进Fc区的异二聚化的其他方法包括将电荷极性工程化到Fc结构域中(参见,Gunasekaran等人,2010)和SEED技术(SEED-IgG) (Davis等人,Protein Eng Des Sel.2010 Apr;23(4):195-202,2010)。

[0440] 在特定实施方案中,多特异性抗原结合分子是源自独立的亲本抗体的CrossMAb,其中抗体结构域交换基于KiH方法。轻链错配使用结构域交叉来克服,并且重链使用KiH方法来异二聚化。对于结构域交叉,在轻链和重链之间交换可变结构域或恒定结构域,以产生两个不对称的Fab臂,以避免轻链错配,而“交叉”保持抗原结合亲和力。与天然抗体相比,CrossMAb显示出较高的稳定性。存在若干种不同的CrossMAb形式,诸如在不同区域交换的Fab-V_H-V_L和C_{H1}-C_L。在优选的实施方案中,多特异性抗原结合分子基于CrossMAb^{CH1-CL}形式,其交换双特异性抗体的C_{H1}和C_L区域。

[0441] 另外的异二聚化的IgG样抗原结合分子包括但不限于异Fc-scFv、Fab-scFv、IgG-scFv和scFv-IgG。异Fc-scFv将两个不同的scFv连接到可异二聚化的Fc结构域,而Fab-scFv包含与对不同表位特异的scFv连接的对一种表位特异的Fab结构域。IgG-scFv和scFv-IgG是Ig样抗体,其具有分别连接到其C末端和N末端的scFv(参见,Kontermann R E(编著),同上,第151-169页)。

[0442] 代表性的CrossMAb实施方案包括其中通过替换第一IgG样多肽的CH3结构域内该多肽的至少一个接触残基而在该多肽的界面中产生工程化突起的实施方案。特别地,第一多肽上待被替换的接触残基对应于位置366处的IgG残基(残基编号根据Fc晶体结构(Deisenhofer,Biochem.20:2361),并且其中工程化突起包括将编码原始残基的核酸替换为编码进入残基的核酸,该进入残基比原始残基具有更大的侧链体积。特别地,将位置366处的苏氨酸(T)残基突变为色氨酸(W)。在第二步骤中,通过替换第二多肽的C_{H3}结构域内多肽的至少一个接触残基,在第二多肽的界面中产生工程化空腔,其中工程化空腔包括将编码原始残基的核酸替换为编码进入残基的核酸,该进入残基比原始残基具有更小的侧链体积。特别地,第二多肽上待被替换的接触残基对应于位置407处的IgG残基。特别地,将位置407处的酪氨酸(Y)残基突变为丙氨酸(A)。该程序可以对选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4组成的组的不同IgG亚型进行工程化。

[0443] 在CrossMAb技术的另一个说明性实例中,多特异性抗原结合分子可以基于duobody平台/cFAE (GenMAb),如例如在W02008119353和W02011131746(其中每一个在此通过引用以其整体并入本文)中描述的,其中双特异性抗体通过以下产生:在两种不同的宿主

细胞中分别表达组分抗体,然后纯化并通过两种单特异性抗体之间受控的Fab臂交换来组装成双特异性异二聚体抗体。通过在两种单特异性起始蛋白的CH3区中引入不对称的、匹配的突变(例如,F405L和K409R,根据EU编号索引),类似于Fab臂交换,可以被迫使变为定向的,从而在还原条件下产生稳定的异二聚体对(如例如由Labrijn等人,Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110(13):5145-5150;Gramer等人MAbs 2013;5(6):962-973;Labrijn等人Nature Protocols 2014;9(10):2450-63描述的,这些文献在此通过引用以其整体并入本文)。在实践中,双特异性人类IgG1 Ab可以由两种纯化的二价亲本抗体产生,每种抗体具有相应的单一互补突变:K409R或F405L。这种相同的策略可以在人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4骨架上进行(Labrijn 2013,同上)。

[0444] 多特异性抗原结合分子的仍其他的非限制性实例包括多特异性的,例如双特异性的抗体分子,其包括 λ 链多肽和 κ 轻链多肽(如在WO 2018/057955中描述的),并且能够结合两种或更多种抗原。该方法的基础是通过使用一个 κ 轻链多肽和一个 λ 轻链多肽,在多特异性抗体分子的情况下防止轻链与不正确重链的错配。在包括 λ 链多肽和 κ 轻链多肽并结合两种抗原(包括RANK和ICM)的多特异性抗体分子的设计中,产生了四种构建体。在两个不同的 C_{H3} 结构域中产生“Knobs-into-holes”结构的另外的不对称变化,通过将大氨基酸(knobs)引入所需异二聚体的一条链中并将小氨基酸(holes)引入所需异二聚体的另一条链中来促进多肽链的异二聚化。当这四种片段在哺乳动物细胞中共表达时,组装形成多特异性抗体分子。

[0445] 5.7静电引导(Electrostatic steering)

[0446] 在其他实施方案中,多特异性抗原结合分子基于静电引导,其中通过选择的突变改变CH3结构域处的电荷互补性,导致通过静电引导效应增强抗体Fc异二聚体形成(Gunasekaran等人,2010.J Biol Chem 285(25):19637-46;WO 2009089004 A1)。这种相同的策略可以在人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4骨架上进行(WO 2009089004 A1)。

[0447] 5.8接头。

[0448] 接头可以用于共价连接不同的抗原结合分子,以形成包含至少两种抗原结合分子的嵌合分子。抗原结合分子之间的连接可以提供空间关系,以允许个体抗原结合分子与其对应的同源表位结合。在该情况下,单独的接头用于连接两个不同的功能性抗原结合分子。接头的类型包括但不限于化学接头和多肽接头。

[0449] 接头可以是化学的,并且包括例如亚烃基链、聚乙二醇(PEG)链、聚琥珀酸酐、聚-L-谷氨酸、聚(乙烯亚胺)、寡糖、氨基酸链或任何其他合适的连接。在某些实施方案中,接头本身可以是在生理条件下稳定的(诸如亚烃基链),或者接头可以是在生理条件下可裂解的,诸如通过酶(例如,该连接含有为肽酶底物的肽序列)或通过水解(例如,该连接含有可水解基团,诸如酯或硫酯)。接头可以是生物学上无活性的,诸如PEG、聚乙醇酸或聚乳酸链,或者可以是生物学上有活性的,诸如寡肽或多肽,当从部分裂解时,接头结合受体,使酶失活,等等。接头可以通过任何合适的键或官能团被附接到第一抗体和第二抗体或抗原结合片段,所述键或官能团包括碳-碳键、酯、醚、酰胺、胺、碳酸酯、氨基甲酸酯、磺酰胺等。

[0450] 在某些实施方案中,接头代表至少一个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个)衍生的或非衍生的氨基酸。在这种类型的说明性实例中,接头优选地是非免疫原性和柔性的,诸如那些包含丝氨酸和甘氨酸序列或Ala-Ala-Ala的重复序列

的接头。取决于特定的构建体,接头可以是长的(例如,长度大于12个氨基酸)或短的(例如,长度为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个氨基酸)。例如,为了制备单链双抗体,第一接头和第三接头的长度优选地为约3个至约12个氨基酸(并且更优选地长度为约5个氨基酸),并且第二接头的长度优选地长于12个氨基酸(并且更优选地长度为约15个氨基酸)。将接头长度减少到低于三个残基可以迫使单链抗体片段成为本发明,允许双特异性抗体根据需要变成二价、三价或四价。

[0451] 代表性的肽接头可以选自: $[AAA]_n$ 、 $[SGGGG]_n$ 、 $[GGGGS]_n$ 、 $[GGGGG]_n$ 、 $[GGGKGGGG]_n$ 、 $[GGGNGGGG]_n$ 、 $[GGGCGGGG]_n$,其中n是1至10的整数,合适地为1至5,更合适地为1至3。

[0452] 6. 多特异性抗原结合构建体

[0453] 本发明的一方面涉及嵌合构建体,其包含多于一个具有不同特异性的抗原结合分子,这些抗原结合分子直接或经由接头融合或以其他方式缀合在一起。下文提供了说明性构建体。

[0454] 6.1 抗RANK-抗PD-1双抗体

[0455] 开发多特异性抗体的可选的方法是基于单链双抗体(scdiobody)形式。在此处,来自两种抗体的可变结构域,A和B,以多肽链 V_{HA} - V_{LB} -接头- V_{HB} - V_{LA} 表达。本发明设想了为双特异性的并且包含RANK拮抗性抗原结合分子和抗PD-1抗原结合分子的多特异性构建体,其代表性实例包含选自以下的序列、由选自以下的序列组成或基本上由选自以下的序列组成:

[0456] EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSYDGS
TKSYADSMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGTLTVT
VSS[SGGGG]_n eivltqspatlsipgeratls crasqsvssylawyqqkpggqaprlliydasnratgiparfsgsgsgtd
ftltisslepedfavyyccqssnwprrtfgggtkveik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGI
TFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAED
TAVYYCATNDDYWGQGTLLTVSS [SGGGG]_n syeltqppsvsvspgqtasitcsgdklgdkyvcwyqqkp
gqspvlviygdserpsgipperfsgnsngntatitistgravdeadyycqawdsttplfgggtnltvl [SEQ ID NO:158],

[0457] 其中:

[0458] • 大写常规文本对应于抗RANK MA b 3A3的可变重链氨基酸序列,

[0459] • 小写加下划线的文本对应于抗PD-1MA b纳武单抗的可变轻链氨基酸序列,

[0460] • 大写加下划线的文本对应于抗PD-1MA b纳武单抗的可变重链氨基酸序列,

[0461] • 小写常规文本对应于抗RANK MA b 3A3的可变轻链氨基酸序列,

[0462] • 每个出现的[SGGGG]_n是柔性接头,其中n=1、2、3或4,对于柔性接头的第一实例和第三实例,优选地n=1,并且对于柔性接头的第二实例,n=3。

[0463] 6.2 抗RANK-抗PD-L1双抗体

[0464] 可选地,双特异性构建体包含抗RANK抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子,其代表性实例包含选自以下的序列、由选自以下的序列组成或基本上由选自以下的序列组成:

[0465] EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSYDGS
TKSYADSMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGT
VSS[SGGGG]_n eivltqspgtlsispgeratlsrasqrvssylawyqqkpgqaprllydassratqipdrfsgsgsqt
dftltisrlepedfavyyccqyqslpwtfgaagtkeik [SGGGG]_n VOLVESGGGLVQPGGSLRLS
CAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKODGSEKYYVDSVKGRFTISRDN
AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGT
LVTVSS [SGGGG]_n syeltqppsvsvspgqtasitcsgdklgdky
vcwyqqkpgqspvlviygdserpsgiperfsgsngntatltisgtravdeadyycqawdsttpifgggtnltvl [SEQ ID
NO:159],

[0466] 其中:

- [0467] • 大写常规文本对应于抗RANK MA b 3A3的可变重链氨基酸序列,
- [0468] • 小写加下划线的文本对应于抗PD-L1 MA b德瓦鲁单抗的可变轻链氨基酸序列,
- [0469] • 大写加下划线的文本对应于抗PD-L1 MA b德瓦鲁单抗的可变重链氨基酸序列,
- [0470] • 小写常规文本对应于抗RANK MA b 3A3的可变轻链氨基酸序列,
- [0471] • 每个出现的[SGGGG]_n是柔性接头,其中n=1、2、3或4,对于柔性接头的第一实例和第三实例,优选地n=1,并且对于柔性接头的第二实例,n=3。

[0472] 可选地,双特异性构建体包含抗RANK抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子,其代表性实例包含选自以下的序列、由选自以下的序列组成或基本上由选自以下的序列组成:

[0473] EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSYDGS
TKSYADSMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGT
VSS[SGGGG]_n digmqtspsslsasvqdrvtitcrasqdvstavawyqqkpgkapklliysasflysqvpsrfsgsgs
qtdftltisslqpedfatvyccqylyhpatfgaagtkeik [SGGGG]_n EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE
DTAVYYCARRHWPGGFDYWQGT
LVTVSS [SGGGG]_n syeltqppsvsvspgqtasitcsgdklgdkyv
cwyqqkpgqspvlviygdserpsgiperfsgsngntatltisgtravdeadyycqawdsttpifgggtnltvl [SEQ ID
NO:160],

[0474] 其中:

- [0475] • 大写常规文本对应于抗RANK MA b 3A3的可变重链氨基酸序列,
- [0476] • 小写加下划线的文本对应于抗PD-L1 MA b阿特朱单抗的可变轻链氨基酸序列,
- [0477] • 大写加下划线的文本对应于抗PD-L1 MA b阿特朱单抗的可变重链氨基酸序列,
- [0478] • 小写常规文本对应于抗RANK MA b 3A3的可变轻链氨基酸序列,
- [0479] • 每个出现的[SGGGG]_n是柔性接头,其中n=1、2、3或4,对于柔性接头的第一实例和第三实例,优选地n=1,并且对于柔性接头的第二实例,n=3。

[0480] 6.3抗RANK-抗CTLA4双抗体

[0481] 可选地,双特异性构建体包含抗RANK抗原结合分子和抗CTLA4抗原结合分子,其代表性实例包含选自以下的序列、由选自以下的序列组成或基本上由选自以下的序列组成:

[0482] EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSYDGS
TKSYADSMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGTLVT
VSS[SGGGG]_n eivltqspgtlsispgeratlsrscsqsvqssylawyqqkpgqaprllygafratqipdrfsgsgsgt
dftltisrlepedfavyycaqygsspwtfgaatkveik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG
FTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAIYYCARTGWLGPFDYWGQGT LVT VSS [SGGGG]_n syeltqppsvsvspgqtasitcsgdklgdkyvcw
yqqkpgqspvlviygdserpsgiperfsgnsngntatltisgtravdeadyycawdsttpifgggtnitvi [SEQ ID
NO:161],

[0483] 其中:

- [0484] • 大写常规文本对应于抗RANK MAb 3A3的可变重链氨基酸序列,
- [0485] • 小写加下划线的文本对应于抗CTLA4 MAb伊匹单抗的可变轻链氨基酸序列,
- [0486] • 大写加下划线的文本对应于抗CTLA4 MAb伊匹单抗的可变重链氨基酸序列,
- [0487] • 小写常规文本对应于抗RANK MAb 3A3的可变轻链氨基酸序列,
- [0488] • 每个出现的[SGGGG]_n是柔性接头,其中n=1、2、3或4,对于柔性接头的第一实例和第三实例,优选地n=1,并且对于柔性接头的第二实例,n=3。

[0489] 可选地,双特异性构建体包含抗RANK抗原结合分子和抗CTLA4抗原结合分子,其代表性实例包含选自以下的序列、由选自以下的序列组成或基本上由选自以下的序列组成:

[0490] EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSYDGS
TKSYADSMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGTLVT
VSS[SGGGG]_n diamtqspsslsasvqdrvtitcrasqsinsyldwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsg
tdftltisslqpedfatyycaqyvstpfqatgkveik [SGGGG]_n QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG
FTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAIYYCARTGWLGPFDYWGQGT LVT VSS [SGGGG]_n syeltqppsvsvspgqtasitcsgdklgdkyvcw
yqqkpgqspvlviygdserpsgiperfsgnsngntatltisgtravdeadyycawdsttpifgggtnitvi [SEQ ID
NO:162],

[0492] 其中:

- [0493] • 大写常规文本对应于抗RANK MAb 3A3的可变重链氨基酸序列,
- [0494] • 小写加下划线的文本对应于抗CTLA4 MAb tremelimumab的可变轻链氨基酸序列,
- [0495] • 大写加下划线的文本对应于抗CTLA4 MAb tremelimumab的可变重链氨基酸序列,
- [0496] • 小写常规文本对应于抗RANK MAb 3A3的可变轻链氨基酸序列,
- [0497] • 每个出现的[SGGGG]_n是柔性接头,其中n=1、2、3或4,对于柔性接头的第一实例和第三实例,优选地n=1,并且对于柔性接头的第二实例,n=3。

[0498] 6.4抗RANK-抗PD-L1 CrossMAb构建体

[0499] 本发明还设想了CrossMAb多特异性抗原结合分子。在CrossMAb构建的第一步骤中,通过替换第一IgG样多肽的CH3结构域内该多肽的至少一个接触残基而在该多肽的界面中产生工程化突起。特别地,第一多肽上待被替换的接触残基对应于位置366处的IgG残基

(残基编号根据Fc晶体结构(Deisenhofer, Biochem. 20:2361), 并且其中工程化突起包括将编码原始残基的核酸替换为编码进入残基的核酸, 该进入残基比原始残基具有更大的侧链体积。特别地, 将位置366处的苏氨酸(T)残基突变为色氨酸(W)。在第二步骤中, 通过替换第二多肽的 C_{H3} 结构域内多肽的至少一个接触残基, 在第二多肽的界面中产生工程化空腔, 其中工程化空腔包括将编码原始残基的核酸替换为编码进入残基的核酸, 该进入残基比原始残基具有更小的侧链体积。特别地, 第二多肽上待被替换的接触残基对应于位置407处的IgG残基。特别地, 将位置407处的酪氨酸(Y)残基突变为丙氨酸(A)。该程序可以对选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4组成的组的不同IgG亚型进行工程化。

[0500] 在随后的步骤中, 为了促进异二聚体双特异性IgG中可能的两个轻链/重链相互作用之间的区别, 所需轻链/重链配对的缔合可以通过修饰双特异性抗体的一个Fab (Fab区) 以“交换”轻链和重链之间的恒定区或恒定区和可变区来诱导(参见, 例如Schaefer等人, 2011, 同上)。因此, 在修饰的Fab结构域中, 重链将包含例如 C_L-V_H 或 C_L-V_L 结构域, 并且轻链将分别包含 $C_{H1}-V_L$ 或 $C_{H1}-V_H$ 结构域。这防止修饰链(即, 修饰的轻链或重链)的重链/轻链Fab部分与标准/非修饰臂的重链/轻链Fab部分的相互作用。通过解释的方式, 包含 C_L 结构域的修饰臂的Fab结构域中的重链不优先与也包含 C_L 结构域的非修饰臂/Fab结构域的轻链相互作用(防止重链/轻链的“不适当”或不期望的配对)。这种用于防止“不适当的”轻链/重链缔合的技术被称为“CrossMAb”技术, 并且当与KiH技术组合时, 导致所需双特异性分子的表达显著增强(参见, 例如Schaefer等人, 2011, 同上)。

[0501] 异二聚体双特异性IgG抗体的产生通过首先将编码双特异性IgG的4条链的每个抗体基因克隆到哺乳动物表达载体中以便能够在哺乳动物细胞(诸如HEK293)中分泌表达来实现。使用293fectin或类似技术将每条抗体链cDNA以等摩尔比一起转染到HEK293细胞中, 并且收获含有抗体的细胞培养物上清液, 并使用蛋白A琼脂糖凝胶从上清液中纯化抗体。

[0502] 在一些实施方案中, 包含抗RANK抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子两者的双特异性异二聚体IgG可以使用2个重链和2个轻链构建体来构建, 其中一个重链 C_{H3} 结构域在位置366处被改变(T366W), 称为“knob”, 并且另一个重链 C_{H3} 结构域在位置407处被改变(Y407A), 称为“hole”, 以促进重链的KiH异二聚化。

[0503] 在一些实施方案中, 包含抗RANK抗原结合分子和抗PD-L1抗原结合分子两者的双特异性异二聚体IgG可以使用2个重链和2个轻链构建体来构建, 其中每个重链 C_{H3} 结构域在位置234(L234A)、235(L235A)、329(P329G)处被改变, 用于降低Fc γ R和C1q相互作用。

[0504] 6.4.1结合RANK和PD-L1两者的使用 $C_{H1}-C_L$ 互换的多特异性CrossMAb的构建体

[0505] 说明性的多特异性CrossMAb分子可以包含源自抗RANK 3A3抗体和阿特朱单抗IgG₁的重链和轻链序列, 并且所需的轻链/重链配对可以通过修饰抗RANK抗原结合分子的Fab结构域使得 C_{H1} 和 C_L 结构域在Ig链之间互换来诱导。

[0506] 为了该构建的目的, 将抗RANK 3A3 V_{H1} 结构域与源自阿特朱单抗(或另一种合适的人类IgG1)的人类IgG1 C_{H1} 结构域串联融合, 并且具有以下AA序列:

[0507] EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSYDGS
TKSYADSMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGTLVT
VSSastk g_{psv} fplapsskstsggtaalgclvkdyfepv t_{vsw} ns g_{alt} sgvhtfpav l_{qss} glyslssvvt
vpssslgtq t_{yic} nvnhkpsntkvdkkv [SEQ ID NO:163],

[0508] 其中:

[0509] • 抗RANK 3A3 V_H 是以常规大写文本;并且

[0510] • 阿特朱单抗 C_H 结构域是以粗体小写文本。

[0511] 为了该构建的目的,将抗RANK 3A3 V_L 结构域与源自 λ -1轻链Uniprot序列P0D0X8 (或另一种合适的人类 λ 或 κC_L 序列)的人类 λC_L 结构域串联融合,并且具有以下AA序列:

[0512] SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVLVIYGDSEPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTRAVDEADYYCQAWDSTTPLFGGGTNTVLgqpk $anptvtl$ fppsseel
qank $tlvclisdfypgavtvawkadgspvkagvettkpskqsnkyaassylstpeqwkshrsyscq$ v
thegstvektvapt ecs [SEQ ID NO:164],

[0513] 其中:

[0514] • 抗RANK 3A3 V_L 是以常规大写文本;并且

[0515] • P0D0X8 C_L 结构域是以粗体小写文本。

[0516] 为了使用CH1-CL互换产生结合RANK和PD-L1两者的多特异性CrossMAb,以下四种构建体被用于该构建。

[0517] 构建体1

[0518] 抗RANK 3A3 CrossMAb CH1-CL huIgG1 KNOB突变,重链

[0519] EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSYDGS
TKSYADSMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGTLVT
VSSgqpk $anptvtl$ fppsseelqank $tlvclisdfypgavtvawkadgspvkagvettkpskqsnkya$
assylstpeqwkshrsyscq $vthegstvektvapt$ ecsepkscdktht $c_{ppcpape}$ AAggpsvflfppkpkdtl
misrtpevtcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqyastyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk alG
apiektiskakgqprepqvylppsreemtqnqvsIWclvkgyfypsdiavewesngqpenn $yktppvldsdgsfflys$
kltdksrwqqgnvfscsvmh $eahnhytqkslslspgk$ [SEQ ID NO:165],

[0520] 其中:

[0521] • 抗RANK 3A3 V_H [来自SEQ ID NO:163]是以常规大写文本;

[0522] • C_L 结构域[来自SEQ ID NO:164]是以粗体小写文本;

[0523] • 人类IgG1铰链区是以加下划线的小写文本;

[0524] • 阿特朱单抗 C_{H2} - C_{H3} 结构域是以常规小写文本;并且

[0525] • T366W“knob”取代和L234A、L235A、P329G取代是以粗体大写文本。

[0526] 构建体2

[0527] 抗RANK 3A3 CrossMAb C_{H1} - C_L 轻链

[0528] SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVLVIYGDSEPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTRAVDEADYYCQAWDSTTPLFGGGTNLTV**Lastkgpsvfplapssksts**
aataalacldyfppeptvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
kvdkkv [SEQ ID NO:166],

[0529] 其中:

[0530] • 抗RANK 3A3 V_L是以常规大写文本;并且

[0531] • C_{H1}结构域[来自SEQ ID NO:163]是以粗体小写文本。

[0532] 构建体3

[0533] 阿特朱单抗IgG1 Hole突变,重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG
STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS**as**
tkgpsvfplapssksts**ggtaalgldyfppeptvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpsssl**
[0534] **gtqtyicnvnhkpsntkvdkkv****epkscdkthtccppc****papeAA**ggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshe
dpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqyastyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnka**G**apiektiskakgpprepq
vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffl**A**skltvdksrwqqgnvfscsv
mhealhnhytqkslsispk [SEQ ID NO:167],

[0535] 其中:

[0536] • 阿特朱单抗VH是以常规大写文本;

[0537] • 阿特朱单抗CH1结构域是以粗体小写文本;

[0538] • HuIgG1铰链区是以加下划线的小写文本;

[0539] • 阿特朱单抗HuIgG1 CH2-CH3结构域是以常规小写文本;并且 • Y407A“hole”和
L234A、L235A、P329G取代是以粗体大写文本。

[0540] 构建体4

[0541] 阿特朱单抗轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
[0542] KSGTASVCLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:168],

[0543] 本文描述的Cross-Mab方法可以用于取代上文描述的PD-L1抗原结合分子序列的
其他抗PD-L1和抗PD-1或抗CTLA4抗原结合分子序列。此外,一种实施方案使用其他IgG支
架,特别是IgG4。

[0544] 在一些实施方案中,包含RANK拮抗性抗原结合分子和抗PD-1抗原结合分子两者的
双特异性异二聚体IgG可以使用2个重链和2个轻链构建体来构建,在CrossMab多特异性抗
原结合分子的情况下,其中一个重链C_{H3}结构域在位置366处被改变(T366W),称为“knob”,并
且另一个重链C_{H3}结构域在位置407处被改变(Y407A),称为“hole”,以促进重链的KiH异二聚
化。

[0545] 6.4.2结合RANK和PD-1两者的多特异性CrossMab—C_{H1}-C_L互换-IgG₄的构建体

[0546] 说明性的多特异性CrossMab分子可以包含源自抗RANK 3A3抗体和纳武单抗IgG4

的重链和轻链序列,并且所需的轻链/重链配对可以通过修饰抗RANK抗原结合分子的Fab结构域使得CH1和CL结构域在Ig链之间互换来诱导。以下四种构建体被用于该构建:

[0547] 构建体1

[0548] 抗RANK 3A3 CrossMAb C_{H1}-C_L huIgG4 KNOB突变,重链

EVQLVESGGGVVQPGLTSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSYDGS
TKSYADSMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPALRYFDWGYFQHWGQGTLVT
VSS**gqpkantvltfppsseelqankatlvc**lisdfypgavtvawkadgspvkagvettkpskqsnnkya
[0549] **assylsltpewkshrsyscqvt**hegstvektvapt**ecseskygppcp**scpapeflggpsvflfppkpkdtlmisr
tpevtcvvvdvsqedpevfqnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwingkeykckvsnkglpssiek
tiskakgqprepvytlppsqeemtknqvs**W**clvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflysrltvd
srwqegnvfscsvmhleahnhytqkslsislgk [SEQ ID NO:169],

[0550] 其中:

- [0551] • 抗RANK 3A3 V_H[来自SEQ ID NO:163]是以常规大写文本;
- [0552] • C_L结构域[来自SEQ ID NO:154]是以粗体小写文本;
- [0553] • IgG4铰链区是以加下划线的小写文本;
- [0554] • IgG4 CH2-CH3结构域是以常规小写文本;并且
- [0555] • T366W“knob”取代是以粗体大写文本。

[0556] 构建体2

[0557] 抗RANK 3A3 CrossMAb C_{H1}-C_L轻链

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVLVIYGDSEPSGIP
ERFSGSNSGNTATLTISGTRAVDEADYYCQAWDSTTFLFGGTNLTVL**astkgpsvf**lapssksts
[0558] **ggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpav**lqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsnt
kvdkkv [SEQ ID NO:166]

[0559] 其中:

- [0560] • 抗RANK 3A3 VL是以常规大写文本;并且
- [0561] • CH1结构域[来自SEQ ID NO:AAA]是以粗体小写文本。

[0562] 构建体3

[0563] 纳武单抗IgG₄ Hole突变,重链

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG
SKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGTLVTVSS**astkgps**
vflapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpav**lqssglyslssvvtvpssslgtktyt**
[0564] **cnvdhkpsntkvdkr**veskygppcp**pcp**apeflggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevfqnwy
vdgvevhnaktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwingkeykckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlpps
qeemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsffl**As**rltvdksrwqegnvfscsvmhleahnh
ytqkslsislgk [SEQ ID NO:170],

[0565] 其中:

- [0566] • 纳武单抗V_H是以常规大写文本;

- [0567] • 纳武单抗 C_{H1} 结构域是以粗体小写文本；
[0568] • IgG₄铰链区是以加下划线的小写文本；
[0569] • IgG₄ C_{H2} - C_{H3} 结构域是以常规小写文本；并且
[0570] • Y407A“hole”取代是以粗体大写文本。
[0571] 构建体4
[0572] 纳武单抗轻链

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
ARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
[0573] KSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
[SEQ ID NO:171]。

[0574] 对于人类IgG4,工程化突变S228P/L235E变体 (SPLE) 先前已经展示了最小的Fc γ R结合 (Newman等人,2001,Clin.Immunol.98,164-174)。IgG1或IgG4 Fc结构域的突变可以组合,例如将人类IgG1中的LALA突变与P329G突变组合,或者将人类IgG4中的SPLE突变与P329G突变组合,将完全消除Fc γ R和C1q的相互作用 (Schlothauer等人,2016,Protein Eng Des.Sel.29,457-466)。

[0575] 在一些实施方案中,包含抗RANK抗原结合分子和抗PD-1抗原结合分子两者的双特异性异二聚体IgG4可以使用2个重链和2个轻链构建体来构建,其中每个重链 C_{H3} 结构域在位置228 (S228P)、235 (L235E)、329 (P329G) 处被改变,用于降低Fc γ R和C1q相互作用。

[0576] 7. 药物组合物

[0577] 本发明的药物组合物通常包含与一种或更多种药学上可接受的载体一起配制的如本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合。任选地,药物组合物包含一种或更多种其他化合物、药物、成分和/或材料。无论选择的施用途径如何,通过本领域技术人员已知的常规方法将本发明的RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合配制成药学上可接受的剂型 (参见,例如Remington,The Science and Practice of Pharmacy (第21版,Lippincott Williams and Wilkins,Philadelphia,Pa.))。

[0578] 药学上可接受的载体包括生理学上相容的任何和所有溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。载体可以适于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、直肠、脊柱或表皮施用 (例如,通过注射或输注)。

[0579] 药物组合物可以呈各种形式。这些包括,例如,液体、半固体和固体剂型,诸如液体溶液 (例如,可注射和可输注的溶液)、分散体或悬浮液、脂质体和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗应用。典型的优选组合物呈可注射或可输注的溶液形式。优选的施用模式是肠胃外 (例如,静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)。在优选的实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合通过静脉内输注或注射施用。在另一种优选的实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合通过肌肉内或皮下注射施用。

[0580] 如本文使用的措辞“肠胃外施用”和“肠胃外地施用”意指不同于肠内和局部施用,通常通过注射的施用模式,并且包括但不限于,静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0581] 药物组合物在制备和储存条件下通常应该是无菌和稳定的。组合物可以被配制成溶液、微乳液、分散体、脂质体或其他适于高抗原结合分子浓度的有序结构。无菌可注射溶液可以通过以下来制备：将所需量的活性化合物（即，RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合）根据需要将以上列举的成分中的一种或组合一起掺入合适的溶剂中，然后过滤灭菌。通常，通过将活性化合物掺入到包含基础分散介质和来自以上列举的那些的所需其他成分的无菌媒介物中来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，其产生活性成分加上来自其先前无菌过滤的溶液的任何另外的所需成分的粉末。溶液的适当的流动性可以例如，通过使用包衣诸如卵磷脂、在分散剂的情况下通过保持要求的粒径和通过使用表面活性剂保持。可注射组合物的延长吸收可以由在组合物中包括延迟吸收的剂例如单硬脂酸盐和明胶引起。

[0582] 在特定实施方案中，如本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合可以与用于细胞递送的媒介物缀合。在这些实施方案中，通常将本公开内容的抗体（其可以与或不与可检测标记和/或辅助治疗剂缀合）包封在合适的媒介物中，以帮助将抗原结合分子或治疗剂组合递送至靶细胞，以增加抗原结合分子或治疗剂组合的稳定性，或使抗原结合分子或治疗剂组合的潜在毒性最小化。如技术人员将理解的，多种媒介物适于递送本公开内容的抗体。合适的结构化流体递送系统的非限制性实例可以包括纳米颗粒、脂质体、微乳液、胶束、树枝状聚合物和其他含磷脂的系统。将抗体掺入递送媒介物的方法是本领域已知的。尽管下文给出了多种实施方案，但是应理解，设想了将本公开内容的抗原结合分子或治疗剂组合掺入递送媒介物的本领域已知的其他方法。

[0583] 在一些实施方案中，可以使用脂质体递送媒介物。一般来说，脂质体是具有磷脂双层膜的球形囊泡。脂质体的脂质双层可以与其他双层（例如细胞膜）融合，从而将脂质体的内容物递送至细胞。以这种方式，本发明的抗原结合分子或治疗剂组合可以通过包封在与靶细胞的膜融合的脂质体中来选择性地递送至细胞。

[0584] 脂质体可以包含具有不同烃链长度的各种不同类型的磷脂。磷脂通常包含两种脂肪酸，它们通过甘油磷酸酯连接至多个极性基团中的一个。合适的磷脂包括磷脂酸（PA）、磷脂酰丝氨酸（PS）、磷脂酰肌醇（PI）、磷脂酰甘油（PG）、二磷脂酰甘油（DPG）、磷脂酰胆碱（PC）和磷脂酰乙醇胺（PE）。包含磷脂的脂肪酸链的长度可以在约6个至约26个碳原子的范围内，并且脂质链可以是饱和的或不饱和的。合适的脂肪酸链包括（括号中呈现通用名称）正十二烷酸酯（月桂酸酯）、正十四烷酸酯（肉豆蔻酸酯）、正十六烷酸酯（棕榈酸酯）、正十八烷酸酯（硬脂酸酯）、正二十烷酸酯（花生酸酯）、正二十二烷酸酯（山嵛酸酯）、正二十四烷酸酯（木蜡酸酯）、顺式-9-十六烷酸酯（棕榈油酸酯）、顺式-9-十八烷酸酯（油酸酯）、顺式，顺式-9,12-十八碳二烯酸酯（亚油酸酯），全顺式-9,12,15-十八碳三烯酸酯（亚麻酸酯）和全顺式-5,8,11,14-二十碳四烯酸酯（花生四烯酸酯）。磷脂的两条脂肪酸链可以相同或不同。可接受的磷脂包括二油酰基PS、二油酰基PC、二硬脂酰基PS、二硬脂酰基PC、二肉豆蔻酰基PS、二肉豆蔻酰基PC、二棕榈酰基PG、硬脂酰基，油酰基PS（stearoyl,oleoyl PS）、棕榈酰基，亚麻酰基PS（palmitoyl,linolenyl PS）等。

[0585] 磷脂可以来自任何天然来源，并且因此可以包含磷脂的混合物。例如蛋黄富含PC、PG和PE，大豆含有PC、PE、PI和PA，并且动物脑或脊髓富含PS。磷脂也可以来自合成来源。可以使用具有各种比率的单独磷脂的磷脂混合物。不同磷脂的混合物可以导致脂质体组合物

具有有利的活性或活性特性的稳定性。上文提及的磷脂可以以最佳比率与阳离子脂质混合,阳离子脂质诸如N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵、1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吡啶碳菁高氯酸盐、3,3'-二庚基氧杂碳菁碘化物(3,3'-diheptyloxacarbocyanine iodide)、1,1'-双十二烷基-3,3,3',3'-四甲基吡啶碳菁高氯酸盐、1,1'-二油烯基-3,3,3',3'-四甲基吡啶碳菁甲磺酸盐、N-4-(二亚油酰氨基苯乙烯基)-N-甲基吡啶鎓碘化物或1,1'-二亚油酰基-3,3,3',3'-四甲基吡啶碳菁高氯酸盐。

[0586] 脂质体可以任选地包括鞘脂,其中鞘氨醇是磷酸甘油酯中的甘油和一个脂肪酸的结构对应物或者是胆固醇(动物细胞膜的一种主要组分)的结构对应物。脂质体可以任选地包括聚乙二醇化脂质,聚乙二醇化脂质是共价连接至聚乙二醇(PEG)的聚合物的脂质。PEG的大小可以在约500道尔顿至约10,000道尔顿的范围内。

[0587] 脂质体还可以包含合适的溶剂。溶剂可以是有机溶剂或无机溶剂。合适的溶剂包括但不限于二甲基亚砷(DMSO)、甲基吡咯烷酮、N-甲基吡咯烷酮、乙腈、醇、二甲基甲酰胺、四氢呋喃或其组合。

[0588] 携带本公开内容的抗体(即,具有至少一种甲硫氨酸化合物)的脂质体可以通过任何已知的制备用于药物递送的脂质体的方法来制备,所述方法诸如,例如在美国专利第4,241,046号、第4,394,448号、第4,529,561号、第4,755,388号、第4,828,837号、第4,925,661号、第4,954,345号、第4,957,735号、第5,043,164号、第5,064,655号、第5,077,211号和第5,264,618号中详述的。例如,脂质体可以通过在水溶液中声处理脂质、溶剂注射、脂质水合、反向蒸发或通过重复冷冻和解冻的冷冻干燥来制备。在优选的实施方案中,脂质体通过声处理形成。脂质体可以是多层的,其像洋葱一样具有许多层,或者是单层的。脂质体可以是大的或小的。持续的高剪切声处理倾向于形成较小的单层脂质体。

[0589] 如对普通技术人员将明显的是,控制脂质体形成的所有参数都可以变化。这些参数包括但不限于温度、pH、甲硫氨酸化合物的浓度、脂质的浓度和组成、多价阳离子的浓度、混合速率、溶剂的存在和浓度。

[0590] 在其他实施方案中,本公开内容的抗原结合分子或治疗剂组合可以以微乳液递送至细胞。微乳液通常是澄清的、热力学稳定的溶液,包含水溶液、表面活性剂和“油”。在这种情况下,“油”是超临界流体相。表面活性剂停留在油水界面处。各种表面活性剂中的任一种适合用于微乳液制剂,包括本文描述的或本领域已知的那些微乳液制剂。适合用于本公开内容的水性微区(aqueous microdomain)通常将具有从5nm至约100nm的特征结构尺寸。这种尺寸的聚集体是可见光的不良散射体,并且因此,这些溶液是光学澄清的。如技术人员将理解的,微乳液可以并且将具有许多不同的显微结构,包括球形、杆状或盘状聚集体。在一种实施方案中,结构可以是胶束,胶束是最简单的微乳液结构,通常是球形或圆柱形物体。胶束就像水中的油滴,并且反胶束就像油中的水滴。在可选的实施方案中,微乳液结构是片层。片层包括由表面活性剂的层隔开的水和油的连续层。微乳液的“油”最佳地包含磷脂。上文详述的用于脂质体的任何磷脂适用于涉及微乳液的实施方案。本公开内容的抗体可以通过本领域通常已知的任何方法包封在微乳液中。

[0591] 在又其他实施方案中,本发明的抗原结合分子或治疗剂组合可以以树枝状大分子或树枝状聚合物递送。一般来说,树枝状聚合物是一种支化的树状分子,其中每个支是相互连接的分子链,在一定长度后分成两个新的支(分子)。这种支化一直持续到支(分子)变得

如此密集堆积,以至于冠形成球体。通常,树枝状聚合物的特性由其表面的官能团决定。例如,亲水端基,诸如羧基基团,通常将形成水溶性树枝状聚合物。可选地,磷脂可以掺入树枝状聚合物的表面以促进跨皮肤的吸收。详述的用于脂质体实施方案的任何磷脂适用于树枝状聚合物实施方案。本领域通常已知的任何方法可以用于制备树枝状聚合物并将本公开内容的抗体封装在其中。例如,树枝状聚合物可以通过反应步骤的迭代顺序来产生,其中每个另外的迭代导致更高级的树枝状聚合物。因此,它们具有规则的、高度支化的3D结构,具有几乎一致的尺寸和形状。此外,树枝状聚合物的最终尺寸通常由合成期间使用的迭代步骤的数目来控制。多种树枝状聚合物的尺寸适用于本公开内容。通常,树枝状聚合物的尺寸可以在约1nm至约100nm的范围内。

[0592] 本公开内容的RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合可以通过本领域已知的各种方法施用,尽管对于许多治疗应用,优选的施用途径/模式是静脉内注射或输注。在一种实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合通过静脉内输注以大于20mg/min,例如20-40mg/min,并且优选地大于或等于40mg/min的速率施用,以达到约35mg/m²至440mg/m²、优选地约70mg/m²至310mg/m²、并且更优选地约110mg/m²至130mg/m²的剂量。在另一种实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合通过静脉内输注以小于10mg/min,优选地小于或等于5mg/min的速率施用,以达到约1mg/m²至100mg/m²、优选地约5mg/m²至50mg/m²、约7mg/m²至25mg/m²、并且更优选地约10mg/m²的剂量。如技术人员将理解的,施用途径和/或模式将取决于期望的结果而变化。在某些实施方案中,活性化合物可以与载体一起制备,载体将保护化合物免于快速释放,诸如受控释放制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊递送系统。可以使用生物可降解的生物相容性聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这样的制剂的许多方法已获专利或是本领域技术人员通常已知的。参见,例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.Robinson,编著,Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0593] 在某些实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合可以例如与惰性稀释剂或可吸收的可食用载体一起口服施用。化合物(以及其他成分,如果需要的话)也可以被封闭在硬壳或软壳明胶胶囊中,压制为片剂或直接掺入受试者的饮食中。对于口服治疗施用,化合物可以与赋形剂掺合并以可摄入片剂、含服片剂、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆剂、薄片(wafer)等形式使用。为了通过除了肠胃外施用以外的方式施用本发明的化合物,可能需要将化合物用材料包衣或将化合物与材料共施用,以防止其失活。药物组合物也可以用本领域已知的医疗装置施用。

[0594] 调整剂量方案以提供最佳的期望响应(例如,治疗响应)。例如,可以施用单次团注(single bolus),可以随时间施用若干分次剂量并且剂量可以根据治疗情况的迫切性指示的按比例减少或增加。为了容易施用和剂量的一致性,以剂量单位形式配制肠胃外组合物是特别有利的。如本文使用的剂量单位形式是指适于作为用于待被治疗的受试者的单一剂量的物理上的分散单元;每个单元含有被计算以产生期望的治疗效果的预定量的活性化合物与要求的药物载体的组合。本发明的剂量单位形式的规格由以下决定并且直接依赖于以下:(a) 活性化合物的独特特性和待实现的特定治疗效果,和(b) 复合用于个体的敏感性治疗的这样的活性化合物的技术中固有限制。

[0595] RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合的有效量的示例性非限制性范围为

0.1mg/kg-30mg/kg,更优选地1mg/kg-25mg/kg。RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合的剂量和治疗方案可以由技术人员确定。在某些实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合通过注射(例如,皮下或静脉内注射)以约1mg/kg至40mg/kg,例如1mg/kg至30mg/kg,例如约5mg/kg至25mg/kg、约10mg/kg至20mg/kg、约1mg/kg至5mg/kg、1mg/kg至10mg/kg、5mg/kg至15mg/kg、10mg/kg至20mg/kg、15mg/kg至25mg/kg或约3mg/kg的剂量施用。剂量方案可以从例如每周一次至每2周一次、每3周一次或每4周一次变化。在一种实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合每隔一周以约10mg/kg至20mg/kg的剂量施用。

[0596] RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合可以通过静脉内输注以大于20mg/min,例如,20-40mg/min,并且优选地大于或等于40mg/min的速率施用,以达到约35mg/m²至440mg/m²、优选地约70mg/m²至310mg/m²、并且更优选地约110mg/m²至130mg/m²的剂量。在实施方案中,约110mg/m²至130mg/m²的输注速率实现约3mg/kg的水平。在一种实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合以约3mg至800mg,例如约3mg、20mg、80mg、240mg或800mg的剂量施用(例如,静脉内施用)。在某些实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合以约20mg至800mg,例如约3mg、20mg、80mg、240mg或800mg的剂量单独施用。在其他实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合以约3mg至240mg,例如约3mg、20mg、80mg或240mg的剂量与第二剂或治疗模式(例如本文描述的辅助剂或治疗模式)组合施用。在一种实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合在每8周周期期间每2周(例如,在第1周、第3周、第5周、第7周期间)施用一次,例如,直至96周。

[0597] RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合可以通过静脉内输注以大于20mg/min,例如,20-40mg/min,并且优选地大于或等于40mg/min的速率施用,以达到约35mg/m²至440mg/m²、优选地约70mg/m²至310mg/m²、并且更优选地约110mg/m²至130mg/m²的剂量。在实施方案中,约110mg/m²至130mg/m²的输注速率实现约3mg/kg的水平。在其他实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合通过静脉内输注以小于10mg/min,例如小于或等于5mg/min的速率施用,以达到约1mg/m²至100mg/m²,例如约5mg/m²至50mg/m²、约7mg/m²至25mg/m²,并且更优选地约10mg/m²的剂量。在一些实施方案中,RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合在约30min的时间段内输注。

[0598] 应注意,剂量值可以随着待被缓解的状况的类型和严重性而变化。还应理解,对于任何特定受试者,应根据个体需要和施用或监督组合物的施用的人员的专业判断随时间调整具体剂量方案,并且本文列出的剂量范围仅是示例性的而非意图限制所要求保护的组合物的范围或实践。

[0599] 本发明的药物组合物可以包含有效量的RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合。有效量可以是本发明的RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合的“治疗有效量”或“预防有效量”。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效达到期望的治疗结果的量。RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合的治疗有效量可以根据以下因素而变化:诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合在个体中引发期望响应的能力。治疗有效量也是其中RANK拮抗性抗原结合分子或治疗剂组合的任何毒性或有害作用被治疗有益效果超过的量。相对于未治疗的受试者,“治疗有效剂量”优选地抑制可测量的参数,例如,抑制破骨细胞增殖或肿瘤生长速率至少约20%,更优选地至少约40%,甚至更优选地至少约60%,以及还更优选地至少约80%。化合物抑制可测量的参数(例如骨质

减少性紊乱、肌病或癌症)的能力可以在预测在人类骨质减少性紊乱、肌病或癌症方面的功效的动物模型系统中被评价。可选地,组合物的这种特性可以通过例如在技术人员已知的体外测定中检查化合物的抑制能力来评价。

[0600] 相比之下,“预防有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效达到期望的预防结果的量。通常,由于在疾病之前或疾病的早期在受试者中使用预防剂量,所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0601] 8. 辅助治疗

[0602] 本文公开的RANK拮抗性抗原结合分子、治疗剂组合和药物组合物可以与一种或更多种另外的治疗剂(例如,骨抗再吸收剂、抗癌剂、细胞毒性剂或细胞生长抑制剂、激素治疗剂、疫苗和/或其他免疫疗法)共施用。可选地或另外地,RANK拮抗性抗原结合分子、治疗剂组合和药物组合物与其他治疗性治疗模式(包括手术、放射、冷冻手术和/或热疗)组合施用。这样的组合疗法可以有利地使用较低剂量的所施用的治疗剂,从而避免可能的毒性或并发症。

[0603] 设想与本发明的RANK拮抗性抗原结合分子一起使用的组合疗法包括骨抗再吸收剂,诸如但不限于:骨形态发生因子,命名为BMP-1至BMP-12;转化生长因子- β 和TGF- β 家族成员;成纤维细胞生长因子FGF-1至FGF-10;白细胞介素-1抑制剂(包括IL-1ra、针对IL-1的抗体和针对IL-1受体的抗体);TNF α 抑制剂(包括依那西普、阿达木单抗和英夫利昔);RANK配体抑制剂(包括可溶性RANK、骨保护素和特异性结合RANK配体的拮抗性抗体)、Dkk-1抑制剂(例如,抗Dkk-1抗体)、甲状旁腺激素、E系列前列腺素、双膦酸盐和骨增强性矿物质诸如氟化物和钙。可以与RANK拮抗性抗原结合分子组合使用的同化剂包括甲状旁腺激素和胰岛素样生长因子(IGF),其中后一剂优选地与IGF结合蛋白复合。在W089/11540中描述了适合于这样的组合治疗的IL-1受体拮抗剂,并且在W098/01555中描述了合适的可溶性TNF受体-1。例如,在W0 03/086289、W0 03/002713、美国专利第6,740,511号和第6,479,635号中公开了示例性的RANK配体拮抗剂。所包含的用于与本发明的RANK拮抗性抗原结合分子一起使用的可选的组合疗法包括肌病治疗剂,其说明性实例包括硝咪齐特、酮洛芬、柳氮磺吡啶、5,15-二苯基卟啉、盐酸帕吉林、美托拉宗、双盐酸齐美利定一水合物(zimelidine dihydrochloride monohydrate)、咪康唑、盐酸噻氯匹定、碘海醇、盐酸丁氧普鲁卡因、尼莫地平、盐酸反苯环丙胺和AG490。

[0604] 在其他实例中,本文公开的治疗剂组合可以与标准癌症治疗组合,标准癌症治疗包括任一种或更多种抗体分子、化疗、其他抗癌疗法(例如,靶向抗癌疗法或溶瘤药物)、细胞毒性剂、基于免疫的疗法(例如,细胞因子)、手术和/或放射程序。可以组合施用的示例性细胞毒性剂包括抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、烷化剂、蒽环类药物、长春花生物碱、嵌入剂、能够干扰信号转导途径的剂、促进凋亡的剂、蛋白酶体抑制剂和放射(例如,局部或全身辐射)。

[0605] 在一些实施方案中,治疗剂组合与已经常规用作受试者的治疗中的标准的化疗剂组合使用。合适的化疗剂包括但不限于阿那曲唑(ARIMIDEX)、比卡鲁胺(CASODEX)、硫酸博来霉素(BLENOXANE)、白消安(MYLERAN)、白消安注射液(BUSULFEX)、卡培他滨(XELODA)、N4-五氧羰基-5-脱氧-5-氟胞苷、卡铂(PARAPLATIN)、卡莫司汀(BICNU)、苯丁酸氮芥(LEUKERAN)、顺铂(PLATINOL)、克拉屈滨(LEUSTATIN)、环磷酰胺(CYTOXAN或NEOSAR)、阿糖

胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷 (CYTOSAR-U)、阿糖胞苷脂质体注射液 (DEPOCYT)、达卡巴嗪 (DTIC-DOME)、更生霉素 (放线菌素D, Cosmegen)、盐酸柔红霉素 (CERUBIDINE)、柠檬酸柔红霉素脂质体注射液 (DAUNOXOME)、地塞米松、多西他赛 (TAXOTERE)、盐酸多柔比星 (ADRIAMYCIN, RUBEX)、依托泊苷 (VEPESID)、磷酸氟达拉滨 (FLUDARA)、5-氟尿嘧啶 (ADRUCIL, EFUDEX)、氟他胺 (EULEXIN)、替扎他滨 (tezacitibine)、吉西他滨 (GEMZAR)、羟基脲 (HYDREA)、伊达比星 (IDAMYCIN)、异环磷酰胺 (IFEX)、伊立替康 (CAMPTOSAR)、L-天冬酰胺酶 (ELSPAR)、甲酰四氢叶酸钙、美法仑 (ALKERAN)、6-巯基嘌呤 (PURINETHOL)、氨甲蝶呤 (FOLEX)、米托蒽醌 (NOVANTRONE)、麦罗塔 (mylotarg)、紫杉醇 (TAXOL)、nab-紫杉醇 (ABRAXANE)、phoenix (Yttrium90/MX-DTPA)、喷司他丁、具有卡莫司汀植入物的聚苯丙生20 (GLIADEL wafer)、柠檬酸他莫昔芬 (NOLVADEX)、替尼泊苷 (VUMON)、6-硫代鸟嘌呤、噻替派、替拉扎明 (TIRAZONE)、注射用盐酸拓扑替康 (HYCAMPTIN)、长春碱 (VELBAN)、长春新碱 (ONCOVIN) 和长春瑞滨 (NAVELBINE)。

[0606] 示例性的烷化剂包括氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯类：尿嘧啶氮芥 (AMINOURACIL MUSTARD、CHLORETHAMINACIL、DEMETHYLDOPAN、DESMETHYLDOPAN、HAEMANTHAMINE、NORDOPAN、URACIL NITROGEN MUSTARD、URACILLOST、URACILMOSTAZA、URAMUSTIN、URAMUSTINE)、盐酸氮芥 (MUSTARGEN)、环磷酰胺 (CYTOXAN、NEOSAR、CLAFEN、ENDOXAN、PROCYTOX、REVIMMUNE)、达卡巴嗪 (DTIC-DOME)、异环磷酰胺 (MITOXANA)、美法仑 (ALKERAN)、苯丁酸氮芥 (LEUKERAN)、哌泊溴烷 (AMEDEL、VERCYTE)、三亚乙基蜜胺 (HEMEL、HEXALEN、HEXASTAT)、三亚乙基硫代磷酰胺、替莫唑胺 (TEMODAR和TEMODAL)、噻替派 (THIOPLEX)、白消安 (BUSILVEX、MYLERAN)、卡莫司汀 (BICNU)、洛莫司汀 (CCNUCEENU)、链佐星 (ZANOSAR)、奥沙利铂 (ELOXATIN)；更生霉素 (也被称为放线菌素-D, COSMEGEN)、美法仑 (L-PAM、L-霉法兰、苯丙氨酸氮芥、ALKERAN)、六甲蜜胺 (altretamine) (六甲蜜胺 (hexamethylmelamine, HMM)、HEXALEN)、苯达莫司汀 (TREANDA)、白消安 (BUSULFEX和MYLERAN)、卡铂 (PARAPLATIN)、顺铂 (CDDP、PLATINOL和PLATINOL-AQ)、苯丁酸氮芥 (LEUKERAN)、达卡巴嗪 (DTIC、DIC和咪唑甲酰胺、DTIC-DOME)、六甲蜜胺 (六甲蜜胺 (HMM)、HEXALEN)、异环磷酰胺 (IFEX)、泼尼莫司汀、丙卡巴肼 (MATULANE) 以及噻替派 (硫代磷酰胺、TESPA和TSPA、THIOPLEX)。

[0607] 示例性的蒽环类药物包括，例如，多柔比星 (ADRIAMYCIN和RUBEX)、博来霉素 (LENOXANE)、柔红霉素 (盐酸柔红霉素、道诺霉素、盐酸红比霉素和CERUBIDINE)、柔红霉素脂质体 (柠檬酸柔红霉素脂质体和DAUNOXOME)、米托蒽醌 (DHAD和NOVANTRONE)、表柔比星 (ELLENCE)、伊达比星 (IDAMYCIN和IDAMYCIN PFS)、丝裂霉素C (MUTAMYCIN)、格尔德霉素、除莠霉素、拉维霉素和去乙酰基拉维霉素 (desacetylravidomycin)。

[0608] 可以与上文和本文其他地方公开的剂、抗体和方法组合使用的示例性长春花生物碱包括但不限于酒石酸长春瑞滨 (NAVELBINE)、长春新碱 (ONCOVIN)、长春地辛 (ELDISINE) 和长春碱 (硫酸长春碱、长春花碱、VLB、ALKABAN-AQ和VELBAN)。

[0609] 可以用于本发明的示例性蛋白酶体抑制剂包括，但不限于，硼替佐米 (VELCADE)、卡非佐米 (PX-171-007)、marizomib (NPI-0052)、柠檬酸伊沙佐米 (MLN-9708)、delanzomib (CEP-18770)、O-甲基-N-[(2-甲基-5-噻唑基)羰基]-L-丝氨酰基-O-甲基-N-[(1S)-2-[(2R)-2-甲基-2-环氧乙烷基]-2-氧代-1-(苯甲基)乙基]-L-丝氨酰胺 (ONX-0912)、丹诺普

韦(RG7227,CAS850876-88-9)、伊沙佐米(MLN2238,CAS 1072833-77-2)、和(S)-N-[(苯基甲氧基)羰基]-L-亮氨酸基-N-(1-甲酰基-3-甲基丁基)-L-亮氨酸胺(MG-132,CAS 133407-82-6)。

[0610] 在一些实施方案中,治疗剂组合可以与酪氨酸激酶抑制剂(例如,受体酪氨酸激酶(RTK)抑制剂)组合使用。示例性酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于表皮生长因子(EGF)通路抑制剂(例如,表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂)、血管内皮生长因子(VEGF)通路抑制剂(例如,血管内皮生长因子受体(VEGFR)抑制剂(例如,VEGFR-1抑制剂、VEGFR-2抑制剂、VEGFR-3抑制剂))、血小板衍生生长因子(PDGF)通路抑制剂(例如,血小板衍生生长因子受体(PDGFR)抑制剂(例如,PDGFR- β 抑制剂))、RAF-1抑制剂、KIT抑制剂和RET抑制剂。

[0611] 在一些实施方案中,治疗剂组合与刺猬因子通路抑制剂(hedgehog pathway inhibitor)组合使用。已知在癌症治疗中有效的合适的刺猬因子抑制剂包括但不限于阿昔替尼(AG013736)、博舒替尼(SKI-606)、西地尼布(RECENTIN、AZD2171)、达沙替尼(SPRYCEL、BMS-354825)、埃罗替尼(TARCEVA)、吉非替尼(IRESSA)、伊马替尼(GLEEVEC、CGP57148B、STI-571)、拉帕替尼(TYKERB、TYVERB)、来他替尼(CEP-701)、来那替尼(HKI-272)、尼罗替尼(TASIGNA)、司马沙尼(semaxinib、SU5416)、舒尼替尼(SUTENT、SU11248)、toceranib(PALLADIA)、凡德他尼(ZACTIMA、ZD6474)、瓦他拉尼(PTK787、PTK/ZK)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN)、贝伐单抗(AVASTIN)、利妥昔单抗(RITUXAN)、西妥昔单抗(ERBITUX)、帕尼单抗(VECTIBIX)、兰尼单抗(Lucentis)、尼罗替尼(TASIGNA)、索拉非尼(NEXAVAR)、阿仑单抗(CAMPATH)、吉妥单抗奥佐米星(MYLOTARG)、ENMD-2076、PCI-32765、AC220、乳酸多韦替尼(TKI258、CHIR-258)、BIBW 2992(TOVOKTM)、SGX523、PF-04217903、PF-02341066、PF-299804、BMS-777607、ABT-869、MP470、BIBF 1120(VARGATEF®)、AP24534、JNJ-26483327、MGCD265、DCC-2036、BMS-690154、CEP-11981、tivozanib (AV-951)、OSI-930、MM-121、XL-184、XL-647、XL228、AEE788、AG-490、AST-6、BMS-599626、CUDC-101、PD153035、培利替尼(EKB-569)、凡德他尼(zactima)、WZ3146、WZ4002、WZ8040、ABT-869(linifanib)、AEE788、AP24534(帕纳替尼)、AV-951(tivozanib)、阿昔替尼、BAY 73-4506(瑞戈非尼)、丙氨酸布立尼布(BMS-582664)、布立尼布(BMS-540215)、西地尼布(AZD2171)、CHIR-258(多韦替尼)、CP 673451、CYC116、E7080、Ki8751、马西替尼(AB1010)、MGCD-265、二磷酸莫替沙尼(AMG-706)、MP-470、OSI-930、盐酸帕唑帕尼、PD173074、甲苯磺酸索拉非尼(Bay 43-9006)、SU 5402、TSU-68(SU6668)、瓦他拉尼、XL880(GSK1363089、EXEL-2880)、维莫德吉(2-氯-N-[4-氯-3-(2-吡啶基)苯基]-4-(甲基磺酰基)-苯甲酰胺、GDC-0449(如PCT公布第W0 06/028958号中公开的)、1-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-3-((3-(4-氟苯基)-3,4-二氢-4-氧代-2-喹啉啉基)甲基)-脲(CAS330796-24-2)、N-[(2S,3R,3'R,3aS,4'aR,6S,6'aR,6'bS,7aR,12'aS,12'bS)-2',3',3a,4,4',4'a,5,5',6,6',6'a,6'b,7,7',7a,8',10',12',12'a,12'b-二十氢-3,6,11',12'b-四甲基螺[呋喃并[3,2-b]吡啶-2(3H),9'(1'H)-萘[2,1-a]萸]-3'-基]-甲磺酰胺(IPI926,CAS 1037210-93-7)、4-氟-N-甲基-N-[1-[4-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-1-酞嗪基]-4-哌啶基]-2-(三氟甲基)-苯甲酰胺(LY2940680,CAS 1258861-20-9)、erismodegib(LDE225)。

[0612] 在某些实施方案中,治疗剂组合与血管内皮生长因子(VEGF)受体抑制剂组合使用,血管内皮生长因子(VEGF)受体抑制剂包括但不限于贝伐单抗(AVASTIN)、阿昔替尼

(INLYTA)、丙氨酸布立尼布(BMS-582664, (S)-(R)-1-(4-(4-氟-2-甲基-1H-吡啶-5-基氧基)-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基氧基)丙-2-基)2-氨基丙酸酯)、索拉非尼(NEXAVAR)、帕唑帕尼(VOTRIENT)、苹果酸舒尼替尼(SUTENT)、西地尼布(AZD2171, CAS 288383-20-1)、尼达尼布(BIBF1120, CAS 928326-83-4)、foretinib(GSK1363089)、替拉替尼(BAY57-9352, CAS 332012-40-5)、阿帕替尼(YN968D1, CAS 811803-05-1)、伊马替尼(GLEEVEC)、帕纳替尼(AP24534, CAS 943319-70-8)、tivozanib(AV951, CAS 475108-18-0)、瑞戈非尼(BAY73-4506, CAS 755037-03-7)、二盐酸瓦他拉尼(PTK787, CAS 212141-51-0)、布立尼布(BMS-540215, CAS 649735-46-6)、凡德他尼(CAPRELSA或AZD6474)、二磷酸莫替沙尼(AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-二氢-3,3-二甲基-1H-吡啶-6-基)-2-[(4-吡啶基甲基)氨基]-3-吡啶甲酰胺, 在国际PCT公布第W0 02/066470号中描述)、二乳酸多韦替尼(TKI258, CAS 852433-84-2)、linfanib(ABT869, CAS 796967-16-3)、卡博替尼(XL184, CAS 849217-68-1)、来他替尼(CAS 111358-88-4)、N-[5-[[[5-(1,1-二甲基乙基)-2-噁唑基]甲基]硫代]-2-噁唑基]-4-哌啶甲酰胺(BMS38703, CAS 345627-80-7)、(3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS690514)、N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[3 α ,5 β ,6 α]-八氢-2-甲基环戊[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647, CAS 781613-23-8)、4-甲基-3-[[1-甲基-6-(3-吡啶基)-1H-吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]-N-[3-(三氟甲基)苯基]-苯甲酰胺(BHG712, CAS 940310-85-0)和阿柏西普(EYLEA)。

[0613] 在一些实施方案中,治疗剂组合与PI3K抑制剂组合使用。在一种实施方案中,PI3K抑制剂是PI3K的 δ 亚型和 γ 亚型的抑制剂。可以组合使用的示例性PI3K抑制剂在例如W02010/036380、W02010/006086、W009/114870、W005/113556中描述,它们的内容通过引用并入本文。合适地,PI3K抑制剂包括4-[2-(1H-吡啶-4-基)-6-[[4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基]甲基]噁吩并[3,2-d]嘧啶-4-基]吗啉(也被称为GDC-0941(如国际PCT公布第W0 09/036082号和第W0 09/055730号中描述的)、2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-氧代-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氢咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]苯基]丙腈(BEZ235或NVP-BEZ 235,如国际PCT公布第W006/122806号中描述的)、4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉基嘧啶-4-基)吡啶-2-胺(BKM120或NVP-BKM120,在国际PCT公布第W02007/084786号中描述)、tozasertib(VX680或MK-0457, CAS 639089-54-6);(5Z)-5-[[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基]亚甲基]-2,4-噻唑烷二酮(GSK1059615, CAS 958852-01-2);(1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(乙酰氧基)-1-[(二-2-丙烯基氨基)亚甲基]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-八氢-11-羟基-4-(甲氧基甲基)-4a,6a-二甲基-环戊[5,6]萘并[1,2-c]吡喃-2,7,10(1H)-三酮(PX866, CAS 502632-66-8);8-苯基-2-(吗啉-4-基)-色烯-4-酮(LY294002, CAS 154447-36-6)、2-氨基-8-乙基-4-甲基-6-(1H-吡啶-5-基)吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(SAR 245409或XL 765)、1,3-二氢-8-(6-甲氧基-3-吡啶基)-3-甲基-1-[4-(1-哌嗪基)-3-(三氟甲基)苯基]-2H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮、(2Z)-2-丁烯二酸酯(1:1)(BGT 226)、5-氟-3-苯基-2-[(1S)-1-(9H-嘌呤-6-基氨基)乙基]-4(3H)-喹唑啉酮(CAL101)、2-氨基-N-[3-[N-[3-[(2-氯-5-甲氧基苯基)氨基]喹喔啉-2-基]氨磺酰基]苯基]-2-甲基丙酰胺(SAR 245408或XL 147),和(S)-吡咯烷-1,2-二羧酸2-酰胺1-({4-甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-酰胺)(BYL719)。

[0614] 在一些实施方案中,治疗组合与mTOR抑制剂组合使用,例如,一种或更多种mTOR抑制剂选自以下中的一种或更多种:雷帕霉素、替西罗莫司(TORISEL)、AZD8055、BEZ235、BGT226、XL765、PF-4691502、GDC0980、SF1126、OSI-027、GSK1059615、KU-0063794、WYE-354、Palomid 529 (P529)、PF-04691502或PKI-587、地磷莫司(先前被称为deferolimus, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五氧代-11,36-二氧杂-4-氮杂三环[30.3.1.0^{4,9}]三十六烷-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基环己基二甲基亚膦酸酯,也被称为AP23573和MK8669,以及在PCT公布第W003/064383号中描述的那些)、依维莫司(ARINITOR或RAD001)、雷帕霉素(AZD8055,SIROLIMUS)、simapimod (CAS 164301-51-3)、emsirolimus、(5-{2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055)、2-氨基-8-[反式-4-(2-羟基乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502, CAS 1013101-36-4)和N²-[1,4-二氧代-4-[[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基)吗啉鎓-4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酸基甘氨酸基-L-α-天冬氨酸基-L-丝氨酸-,内盐(SF1126, CAS 936487-67-1)、(1r,4r)-4-(4-氨基-5-(7-甲氧基-1H-吡啶-2-基)咪唑并[1,5-f][1,2,4]三嗪-7-基)环己烷甲酸(OSI-027)以及XL765。

[0615] 在一些实施方案中,治疗剂组合与BRAF抑制剂组合使用,BRAF抑制剂例如GSK2118436、RG7204、PLX4032、GDC-0879、PLX4720和甲苯磺酸索拉非尼(Bay 43-9006)。在另外的实施方案中,BRAF抑制剂包括,但不限于,瑞戈非尼(BAY73-4506, CAS 755037-03-7)、tuzanib(AV951, CAS 475108-18-0)、维罗非尼(ZELBORAF, PLX-4032, CAS 918504-65-1)、encorafenib(也被称为LGX818)、1-甲基-5-[[2-[5-(三氟甲基)-1H-咪唑-2-基]-4-吡啶基]氧基]-N-[4-(三氟甲基)苯基-1H-苯并咪唑-2-胺](RAF265, CAS 927880-90-8)、5-[1-(2-羟乙基)-3-(吡啶-4-基)-1H-吡唑-4-基]-2,3-二氢茛-1-酮肟(GDC-0879, CAS 905281-76)、5-[2-[4-[2-(二甲基氨基)乙氧基]苯基]-5-(4-吡啶基)-1H-咪唑-4-基]-2,3-二氢-1H-茛-1-酮肟(GSK2118436或SB590885)、(+/-)-甲基(5-(2-(5-氯-2-甲基苯基)-1-羟基-3-氧代-2,3-二氢-1H-异吡啶-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基)氨基甲酸酯(也被称为XL-281和BMS908662),和N-(3-(5-氯-1H-吡啶并[2,3-b]吡啶-3-羰基)-2,4-二氟苯基)丙烷-1-磺酰胺(也被称为PLX4720)。

[0616] 治疗剂组合也可以与MEK抑制剂组合使用。任何MEK抑制剂可以组合使用,包括但不限于司美替尼(5-[4-溴-2-氯苯基]氨基)-4-氟-N-(2-羟基乙氧基)-1-甲基-1H-苯并咪唑-6-甲酰胺(AZD6244或ARRY 142886,在PCT公布第W02003/077914号中描述)、曲美替尼二甲亚砜(GSK-1120212, CAS 1204531-25-80)、RDEA436、N-[3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-6-甲氧基苯基]-1-[(2R)-2,3-二羟基丙基]-环丙烷磺酰胺(RDEA119或BAY869766,在PCT公布第W02007/014011号中描述)、AS703026、BIX 02188、BIX 02189、2-[(2-氯-4-碘苯基)氨基]-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟-苯甲酰胺(也被称为CI-1040或PD184352,在PCT公布第W02000/035436号中描述)、N-[(2R)-2,3-二羟基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-苯甲酰胺(PD0325901,在PCT公布第W02002/006213号中描述)、2'-氨基-3'-甲氧基黄酮(PD98059)、2,3-双[氨基[(2-氨基苯基)硫代]亚甲基]-丁二腈(U0126,并且在美国专利第2,779,780号中描述)、XL-518(GDC-0973, Cas号1029872-29-4)、G-38963和

G02443714 (也被称为AS703206) 或它们的药学上可接受的盐或溶剂化物。其他MEK抑制剂在W02013/019906、W003/077914、W02005/121142、W02007/04415、W02008/024725和W02009/085983中公开,它们的内容通过引用并入本文。MEK抑制剂的另外的实例包括但不限于benimetinib(6-(4-溴-2-氟苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟乙氧基)-酰胺(MEK162,CAS 1073666-70-2,在PCT公布第W02003/077914号中描述)、2,3-双[氨基[(2-氨基苯基)硫代]亚甲基]-丁二腈(U0126,且在美国专利第2,779,780号中描述)、(3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(乙基氨基)-8,9,16-三羟基-3,4-二甲基-3,4,9,19-四氢-1H-2-苯并氧杂环十四烷-1,7(8H)-二酮(E6201,在PCT公布第W02003/076424号中描述)、维罗非尼(PLX-4032,CAS 918504-65-1)、(R)-3-(2,3-二羟基丙基)-6-氟-5-(2-氟-4-碘苯基氨基)-8-甲基吡啶并[2,3-d]嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮(TAK-733,CAS 1035555-63-5)、pimasertib(AS-703026,CAS 1204531-26-9)、2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-N-(2-羟基乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-甲酰胺(AZD 8330)和3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-N-(2-羟基乙氧基)-5-[(3-氧代-[1,2]噁嗪-2-基)甲基]苯甲酰胺(CH 4987655或Ro 4987655)。

[0617] 在一些实施方案中,治疗剂组合与JAK2抑制剂例如CEP-701、INCB18424、CP-690550(托法替尼)一起施用。示例性的JAK抑制剂包括但不限于鲁索利替尼(JAKAFI)、托法替尼(CP690550)、阿西替尼(AG013736,CAS 319460-85-0)、5-氯-N2-[(1S)-1-(5-氟-2-嘧啶基)乙基]-N4-(5-甲基-1H-吡唑-3-基)-2,4-嘧啶二胺(AZD1480,CAS 935666-88-9)、(9E)-15-[2-(1-吡咯烷基)乙氧基]-7,12,26-三氧杂-19,21,24-三氮杂四环[18.3.1.12,5.114,18]-廿六-1(24),2,4,9,14,16,18(25),20,22-壬烯(SB-1578,CAS 937273-04-6)、mometinib(CYT 387)、巴瑞替尼(INCB-028050或LY-3009104)、pacritinib(SB1518)、(16E)-14-甲基-20-氧杂-5,7,14,27-四氮杂四环[19.3.1.12,6.18,12]廿六-1(25),2,4,6(27),8,10,12(26),16,21,23-癸烯(SB 1317)、gandotinib(LY2784544)和N,N-二环丙基-4-[(1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)氨基]-6-乙基-1,6-二氢-1-甲基-咪唑并[4,5-d]吡咯并[2,3-b]吡啶-7-甲酰胺(BMS 911543)。

[0618] 在又其他实施方案中,治疗剂组合与免疫疗法组合施用。免疫治疗方法包括例如癌症疫苗,免疫调节剂(例如,共刺激分子的活化剂或抑制分子的抑制剂),增加患者肿瘤细胞的免疫原性的离体和体内方法,诸如用细胞因子(诸如白细胞介素2、白细胞介素4或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)转染,降低T细胞无反应性的方法,使用转染的免疫细胞诸如细胞因子转染的树突细胞的方法,使用细胞因子转染的肿瘤细胞系的方法和使用抗独特型抗体(anti-idiotypic antibody)的方法。这些方法通常依赖于使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。免疫效应物可以是例如对恶性细胞表面上的一些标志物特异性的抗体。单独的抗体可以用作治疗的效应物,或者单独的抗体可以募集其他细胞来实际促进细胞杀伤。抗体还可以与药物或毒素(化疗剂、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合并且仅用作靶向剂。可选地,效应物可以是携带与恶性细胞靶直接或间接相互作用的表面分子的淋巴细胞。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0619] 治疗剂组合可以与一种或更多种现有治疗癌症的模式一起施用,现有治疗癌症的模式包括但不限于:手术;放射疗法(例如,涉及三维适形放射疗法的外照射疗法,其中放射场是设计的局部放射(例如,指向预选靶或器官的放射)或聚焦放射)。聚焦放射可以选自由

立体定向放射手术、分次立体定向放射手术和强度调节放射疗法组成的组。聚焦放射可以具有选自粒子束(质子)、钴-60(光子)和直线加速器(x射线)组成的组的放射源,例如,如在W02012/177624中描述的,该专利通过引用以其整体并入本文。

[0620] 放射疗法可以通过几种方法中的一种或方法的组合来施用,所述方法包括外照射疗法、内部放射疗法、植入物放射、立体定向放射手术、全身放射疗法、放射治疗和永久性或暂时性间质近距离放射治疗。术语“近距离放射治疗”是指由空间受限的放射性材料递送的放射疗法,所述放射性材料被插入到身体中肿瘤或其他增生性组织疾病部位处或附近。该术语意图包括但不限于暴露于放射性同位素(例如,At-211、I-131、I-125、Y-90、Re-186、Re-188、Sm-153、Bi-212、P-32和Lu的放射性同位素)。用作本公开内容的细胞调节剂的合适的放射源包括固体和液体两者。通过非限制性实例的方式,放射源可以是放射性核素,诸如作为固体源的I-125、I-131、Yb-169、Ir-192,作为固体源的I-125,或发射光子、 β 粒子、 γ 辐射或其他治疗射线的其他放射性核素。放射性材料也可以是由任何放射性核素的溶液(例如I-125或I-131的溶液)制成的流体,或者放射性流体可以使用包含固体放射性核素(诸如Au-198、Y-90)的小颗粒的合适流体的浆料来制备。此外,放射性核素可以包含在凝胶或放射性微球中。

[0621] 9. 治疗或预防用途

[0622] 本发明还包括本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子以及基于这些抗原结合分子的治疗剂组合用于治疗与RANK活化相关的一系列状况的用途。

[0623] 特别地,设想了本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子用于治疗或抑制与RANKL/RANK信号传递途径的活化相关的状况的发展。这些状况包括但不限于,骨质减少性紊乱、肌病和癌症。

[0624] 在这些应用的特定实施方案中,本发明提供了用于治疗或抑制受试者中的骨质流失的发展的方法,其中该方法包括向受试者施用有效量的本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,从而治疗或抑制骨质流失的发展。

[0625] 在这些应用的其他特定实施方案中,本发明提供了用于治疗或抑制与受试者中RANKL/RANK信号传递途径的活化相关的癌症的发展的方法,其中该方法包括向受试者施用有效量的本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子,从而治疗或抑制癌症的发展。在特定实施方案中,癌症选自乳腺癌,包括HR阴性(例如,ER⁻;PR⁻;HER2⁻;ER⁻,PR⁻;ER⁻,HER2⁻;PR⁻,HER2⁻;和ER⁻,PR⁻,HER2⁻)乳腺癌、BRCA-1突变阳性乳腺癌、HR阴性(例如,ER⁻;PR⁻;HER2⁻;ER⁻,PR⁻;ER⁻,HER2⁻;PR⁻,HER2⁻;和ER⁻,PR⁻,HER2⁻)且BRCA-1突变阳性乳腺癌;前列腺癌;NSCLC,包括KRAS突变或KRAS和LKB1突变NSCLC;和RCC细胞,包括ccRCC。

[0626] 此外,本发明的治疗剂组合,采用本文描述的RANK拮抗性抗原结合分子与一种或更多种抗ICM抗原结合分子或者一种或更多种抗AMA抗原结合分子的组合,具有用于刺激或增强免疫、用于抑制免疫抑制或对肿瘤的耐受性的发展或进展、或用于抑制癌症的发展、进展或复发的特别效用。

[0627] 根据本发明,提出了本发明的剂(例如,RANK拮抗性抗原结合分子和治疗剂组合)可以在诊断出状况(例如,骨质减少性紊乱、肌病或癌症)后在治疗上使用,或者可以在受试者发展出状况(例如,骨质减少性紊乱、肌病或癌症)前预防地使用。因此,本发明提供了RANK拮抗性抗原结合分子,用于(a)治疗与RANKL/RANK信号传递途径的活化相关的状况,

(b) 延迟与RANKL/RANK信号传递途径的活化相关的状况的发作, (c) 延迟与RANKL/RANK信号传递途径的活化相关的状况的进展, 和 (d) 延长患有与RANKL/RANK信号传递途径的活化相关的状况的患者的生存期。本发明包含的骨质减少性紊乱包括但不限于骨质疏松症、牙周炎、癌症相关骨转移、多发性骨髓瘤、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、家族膨胀性骨溶解、佩吉特病(包括青少年佩吉特病)、破骨细胞瘤、与慢性病毒感染和成人及儿童白血病相关的骨质流失、和假体周围骨质流失, 以及破骨细胞活性增加并诱导骨再吸收的癌症, 诸如乳腺癌、前列腺癌和多发性骨髓瘤。代表性肌病包括遗传性肌病, 诸如营养不良、肌强直、先天性肌病(例如, 杆状体肌病、多轴空/微轴空肌病和中央核肌病)、线粒体肌病、家族周期性肌病、炎性肌病和代谢性肌病(例如, 糖原贮积病和脂质贮积紊乱), 以及获得性肌病, 诸如外部物质诱导的肌病(例如, 药物诱导的肌病和糖皮质激素肌病、酒精性肌病和由于其他毒性剂引起的肌病)、肌炎(例如, 皮肌炎、多肌炎和包涵体肌炎)、骨化性肌炎、横纹肌溶解症和肌红蛋白尿症以及废用性萎缩。

[0628] 本发明还提供了包含RANK拮抗性抗原结合分子和至少一种抗ICM拮抗剂或至少一种抗AMA拮抗剂的治疗剂组合, 用于(1) 治疗癌症, (2) 延迟癌症的进展, (3) 抑制癌症的迁移或转移, (4) 延长患有癌症的患者的生存期, 或(5) 刺激细胞介导的对癌症的免疫应答的方法。代表性癌症包括实体瘤, 例如, 黑素瘤(例如, 晚期(例如, II期-IV期) 黑素瘤或HLA-A2阳性黑素瘤)、胰腺癌(例如, 晚期胰腺癌)、实体瘤、乳腺癌(例如, 转移性乳腺癌, 不表达雌激素受体、孕酮受体或Her2/neu中的一种、两种或全部的乳腺癌, 例如三阴性乳腺癌)、肾细胞癌(例如, 晚期(例如IV期) 或转移性肾细胞癌(MRCC))、前列腺癌(例如, 激素难治性前列腺癌)、结肠癌、肺癌(例如, 非小细胞肺癌)、骨癌、皮肤癌、头颈癌(例如, HPV⁺鳞状细胞癌)、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区域的癌症、胃部癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、默克尔细胞癌、儿童实体瘤、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS) 赘生物、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌或鳞状细胞癌、或血液恶性肿瘤, 例如, 霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病, 包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病(例如, 复发或难治性慢性淋巴细胞性白血病)、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS) 赘生物、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症, 包括由石棉诱发的癌症(例如间皮瘤) 以及所述癌症的组合。在一些实施方案中, 癌症是转移性的。

[0629] 用于任何给定受试者的特定的同时和/或顺序剂量方案可以基于患者已被诊断的特定疾病或状况, 或结合患者的疾病或状况的阶段来建立。例如, 如果患者被诊断为患有较小侵袭性的癌症或处于早期的癌症, 则患者可以具有增加的实现同时施用RANK拮抗性抗原结合分子和抗ICM或抗AMA抗原结合分子的临床益处和/或免疫相关应答的可能性。可选地, 如果患者被诊断为患有更具侵袭性的癌症或处于晚期的癌症, 则患者可能具有降低的实现同时施用的临床益处和/或免疫相关应答的可能性, 并且因此可以建议应该施用较高剂量的RANK拮抗性抗原结合分子和/或抗ICM或抗AMA抗原结合分子, 或者可以保证更强

(aggressive)的剂量方案或剂或组合治疗。

[0630] 单独的或者与抗ICM或抗AMA抗原结合分子组合的治疗有效量或预防有效量的RANK拮抗性抗原结合分子将优选地被注射到受试者中。使用的实际剂量可以根据患者的需求和所治疗的状况的严重程度而变化。虽然考虑到适应症和疾病的阶段将有益于治疗方案的分配,但是对于特定情况的适当起始剂量的确定在本领域技术人员的能力之内。尽管如此,应理解,用于任何特定受试者的特定剂量水平和给药频率可以变化,并且将取决于多种因素,包括所使用的特定化合物的活性,该化合物的代谢稳定性和作用时长,患病者的物种、年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食,施用模式和时间,排泄速率,药物组合和特定状况的严重程度。对于治疗的优选的受试者包括动物,最优选地哺乳动物物种,诸如人类,以及家养动物诸如狗、猫等,癌症患者。

[0631] 10. 试剂盒

[0632] 本发明的另外的实施方案是用于治疗受试者的癌症的试剂盒。该试剂盒包括如本文公开的任何药物组合物。

[0633] 为了在本发明的试剂盒中使用,药物组合物包含合适的治疗剂组合,并且任选地具有用于癌症治疗的说明。试剂盒还可以包括用于每种药物组合物和其他包括的试剂(例如,缓冲液、平衡盐溶液等)的合适的储存容器(例如,安瓿、小瓶、管等),用于在向受试者施用药物组合物中使用。药物组合物和其他试剂可以以任何方便的形式(诸如例如以溶液或以粉末药物组合物)存在于试剂盒中。试剂盒还可以包括包装容器,包装容器任选地具有一个或多个用于容纳药物组合物和其他任选的试剂的分区。

[0634] 为了可以容易地理解并实践本发明,现在将通过以下非限制性实施例的方式来描述特定的优选实施方案。

实施例

[0635] 实施例1

[0636] 拮抗剂抗RANK抗原结合分子的分离

[0637] 基于完全人类Fab的抗体噬菌体展示文库从CSL (Parkville, Melbourne, Victoria, AUS) 获得。用于构建和筛选人类Fab文库的一般程序在de Haard等人(1998, Advanced Drug Delivery Reviews 31,5-31;1999,J.Biol.Chem.274:18218-18230)中描述。

[0638] 筛选文库中与RANK蛋白的整个重组细胞外区域结合的Fab片段,以便于鉴定靶向CDR2区和CDR3区内的表位的Fab,从而实现对RANKL的拮抗作用和与小鼠RANK的交叉反应性结合。

[0639] 使用通过生物素-抗人类Fc抗体捕获(Jackson ImmunoResearch Laboratories 109-065-098)固定在Dynabeads® M-280链霉亲和素(Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific 11205D)上的RANK-Fc蛋白来筛选噬菌粒文库中RANK的结合物。按照先前描述的方法进行选择(Hoet等人,2005.Nat Biotechnol.23(3):344-348;Panousis等人,2016.MAbs8(3):436-453)。简言之,通过在室温将链霉亲和素珠耗尽的噬菌体输入与10μg固定的RANK-Fc在2%牛奶/PBST(MTPBS,0.1%Tween-20)中一起孵育20分钟,并且然后洗涤

12次,进行三轮选择。在每轮淘选之前,通过与Dynabeads®M-280链霉亲和素和经由生物素抗人类Fc抗体捕获无关的人类IgG抗体包被的珠一起孵育,耗尽噬菌粒文库中与链霉亲和素和/或Fc的非特异性结合物。选择的噬菌体克隆在对数期大肠杆菌TG1细胞中扩增,并且通过用M13K07辅助噬菌体超感染来拯救Fab噬菌粒。

[0640] 使用可溶性人类RANKL来洗脱与固定的人类RANK-Fc蛋白结合的噬菌体,以富集具有RANK阻断潜力的克隆。

[0641] 在第三轮选择后,挑选出约1000个单个克隆,并通过Fab-噬菌体ELISA进行RANK结合筛选。对来自人类RANK-Fc噬菌粒结合物的Fab cDNA进行测序,以确定独特的克隆。基本上如(Hoet等人,2005,同上)描述的,对Fab的重链可变区和轻链进行PCR扩增和测序。所使用的ELISA方法是根据Panousis等人(2016,同上)。

[0642] 然后通过噬菌体ELISA测试从RANKL洗脱实验分离的独特阳性huRANK-Fc结合噬菌体克隆与小鼠RANK-Fc的物种交叉反应性。总之,除了通过交互的人类RANK-Fc和小鼠RANK-Fc结合鉴定的3个噬菌粒克隆之外,通过ELISA有5个噬菌粒克隆(命名为R03A03、R03A06、R03A10、R03A12、R03B12)与人类和小鼠RANK-Fc反应(图1)。

[0643] 在单点噬菌体与RANKL竞争人类RANK-Fc ELISA中,测试阳性结合人类RANK-Fc和小鼠RANK-Fc的独特噬菌体克隆,以确定噬菌粒克隆是否可以具有RANKL/RANK阻断潜力或拮抗活性。在存在人类RANKL的情况下,一个克隆(R03A03)与人类RANK-Fc的结合基本上(>75%)被阻断(图2)。其他噬菌粒克隆(R03A06、R03A10、R03A12、R03B12、R03C03、R03C04、R03C05)与人类RANK-Fc的结合在存在RANKL的情况下未被阻断。因此,噬菌粒R03A03具有不同于其他RANK结合噬菌粒克隆的特性。

[0644] 根据ELISA与人类RANK-Fc和小鼠RANK-Fc结合的独特噬菌粒克隆被重建(reformat)为全长IgG(小鼠IgG2a Fc骨架上的人类Fab)。总共24个独特抗体克隆被重建以表达全长IgG(小鼠IgG2a Fc骨架上的人类Fab)抗体。将人类Fab与小鼠IgG2aFc融合(没有任何接头序列)。

[0645] 由瞬时转染表达IgG,并且在体外功能效力测试之前,通过ELISA测试纯化蛋白的结合。根据制造商的说明并如先前描述(Spanevello等人,2013,J Neurotrauma 30:1023-1034)使用ExpiFectamine™ 293转染试剂盒(Thermo Fisher Scientific),通过瞬时转染悬浮适应的293T细胞(Expi293F细胞)来产生IgG。IgG的纯化如先前在Panousis等人(2016,同上)中描述的进行。

[0646] 实施例2

[0647] 在基于细胞的功能测定中抗RANK抗体的拮抗活性

[0648] 为了在基于细胞的功能测定中评价3A3抗体的功能抑制作用,测试了这种抗RANK抗体对体外破骨细胞生成的作用。用于体外TRAP+破骨细胞测定的方法基本上如(Simonet等人,1997.Cell 89(2):309-319)描述的。将来自正常BL/6小鼠的骨髓(BM)细胞以25000个细胞/孔的密度铺在96孔平底板中,于总体积200μL/孔的补充有50ng/mL的人类重组CSF-1(Preprotech)的完全DMEM(10%FCS+PS+Glu)中。在培养48hr后,用补充有50ng/mL的人类重组CSF-1和200ng/mL的可溶性muRANKL或可溶性huRANKL(Miltenyi)的完全DMEM替换培养基。将细胞用CSF-1和人类RANKL或小鼠RANKL培养4天(具有和没有抗体抑制剂),并且然后对TRAP+多核(超过三个核)破骨细胞进行计数。通过TRAP细胞化学染色评估产生的破骨细

胞,如先前描述的(Simonet等人,1997,同上)。

[0649] 使用重组人类RANKL评估破骨细胞形成。与阳性对照RANK-Fc的作用相似,抗RANK抗体3A3的添加而非同种型IgG2a的添加以剂量依赖性方式抑制TRAP+多核细胞的形成(图3)。值得注意的是,非阻断性抗RANK mAb 3B10的添加不影响破骨细胞形成。抗RANK抗体3A3在125ng/mL-250ng/mL之间的浓度完全阻断破骨细胞形成,而阳性对照RANK-Fc在500ng/mL-1 μ g/mL之间的浓度完全阻断破骨细胞形成。抗RANK 3A3抗体展示出阻断huRANKL诱导的破骨细胞形成的拮抗活性,具有3.5ng/mL的IC₅₀;对照RANK-Fc具有92ng/mL的IC₅₀。

[0650] 这些结果展示出,在基于细胞的RANKL/RANK拮抗测定(破骨细胞形成)中,抗RANK 3A3抗体与阳性对照RANK-Fc相比具有至少等效的活性。计算的IC₅₀表明,抗RANK 3A3抗体与阳性对照RANK-Fc相比具有约25倍高的效力。这些结果表明抗RANK 3A3抗体保持针对RANKL/RANK活性和体外破骨细胞的分化的拮抗活性。

[0651] 在接下来的测定中,使用重组小鼠RANKL评估破骨细胞形成。与阳性对照抗muRANKL IK22-5 mAb的作用相似,抗RANK抗体3A3的添加而非同种型IgG2a的添加以剂量依赖性方式抑制TRAP+多核细胞的形成(图4)。同样,非阻断性抗RANK mAb 3B10的添加不影响破骨细胞形成。抗RANK抗体3A3在33ng/mL-62.5ng/mL之间的浓度完全阻断破骨细胞形成,而阳性对照抗muRANKL IK22-5 mAb在62.5ng/mL-125ng/mL之间的浓度完全阻断破骨细胞形成。抗RANK 3A3抗体展示出阻断muRANKL诱导的破骨细胞形成的拮抗活性,具有7.4ng/mL的IC₅₀;对照抗muRANKL mAb IK22-5具有19.8ng/mL的IC₅₀。

[0652] 这些结果展示出,在基于细胞的RANKL/RANK拮抗测定(破骨细胞形成)中,抗RANK 3A3抗体与阳性对照抗muRANKL mAb IK22-5相比具有至少等效的活性。计算的IC₅₀表明,抗RANK 3A3抗体与阳性对照抗muRANKL mAb IK22-5相比具有约2倍高的效力。这些结果表明抗RANK3A3抗体保持针对RANKL/RANK活性和体外破骨细胞的分化的拮抗活性。

[0653] 实施例3

[0654] RANK和PD-L1的双重阻断显著增强纤维肉瘤肿瘤免疫

[0655] 鉴于实施例2中呈现的结果(其展示出在基于细胞的RANKL/RANK拮抗测定(体外破骨细胞形成)中,抗RANK 3A3抗体与阳性对照RANK-Fc相比具有至少等效的活性),使用拮抗性抗RANK和抗PD-L1抗体评估在携带皮下肿瘤的小鼠中RANK和PD-L1的双重阻断的功效。在抗PD-L1敏感性MCA1956纤维肉瘤模型中,拮抗性抗RANK mAb的添加显示出显著地增强抗PD-L1功效(图5,P<0.0001)。该观察结果支持拮抗性抗RANK3A3抗体可以提高抗肿瘤免疫。

[0656] 实施例4

[0657] RANK和PD-L1的双重阻断显著增强结肠肿瘤免疫

[0658] 在结肠MC38结肠癌模型中,拮抗性抗RANK mAb的添加显示出显著地增强抗PD-L1功效(图6,P<0.0001)。该观察结果证实拮抗性抗RANK3A3抗体可以提高抗肿瘤免疫。

[0659] 本文引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容在此通过引用以其整体并入本文。

[0660] 本文中任何参考文献的引用不应该被解释为承认此参考文献可用作本申请的“现有技术”。

[0661] 在整个说明书中,目的是描述本发明的优选实施方案,而不是将本发明限制于任何一种实施方案或指定的特征集合。因此,本领域技术人员将理解,根据本公开内容,可以

在所例示的特定实施方案中进行各种修改和改变,而不脱离本发明的范围。所有此类修改和改变都意图被包括在所附权利要求书的范围内。

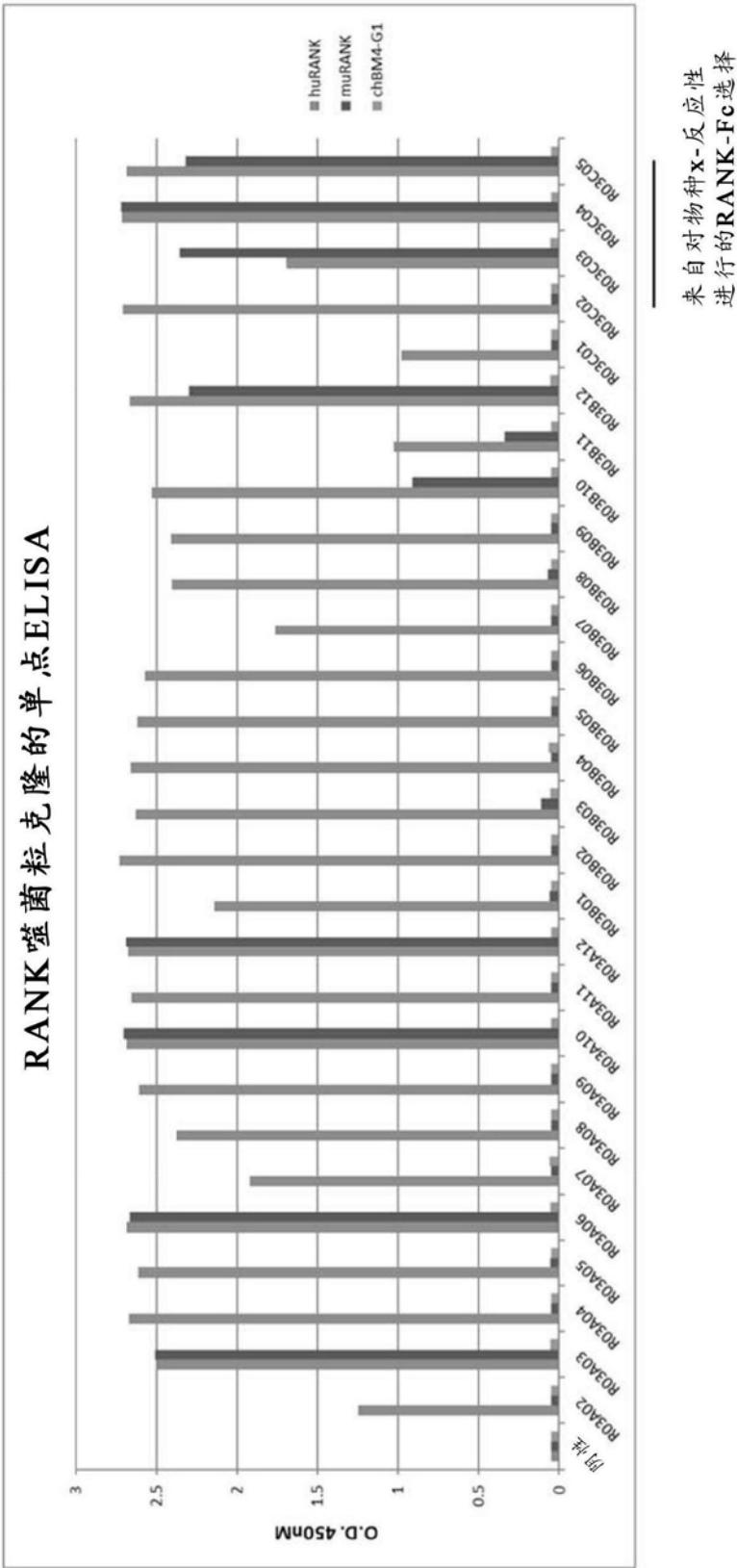


图1

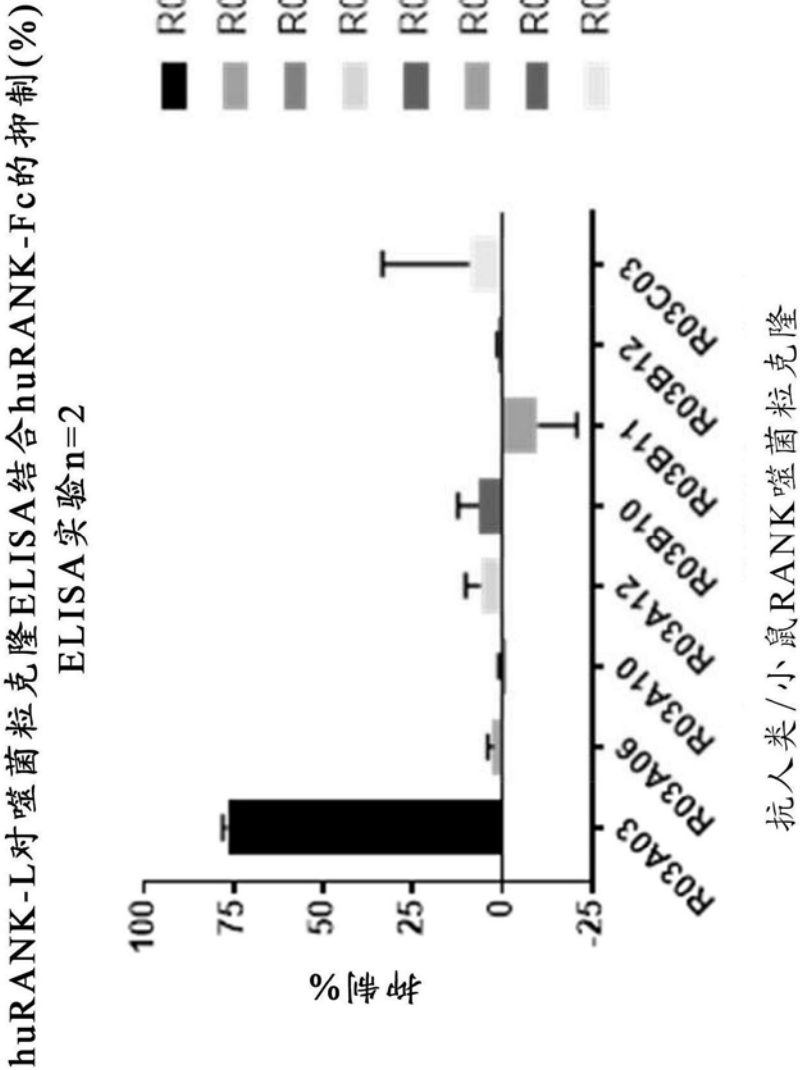


图2

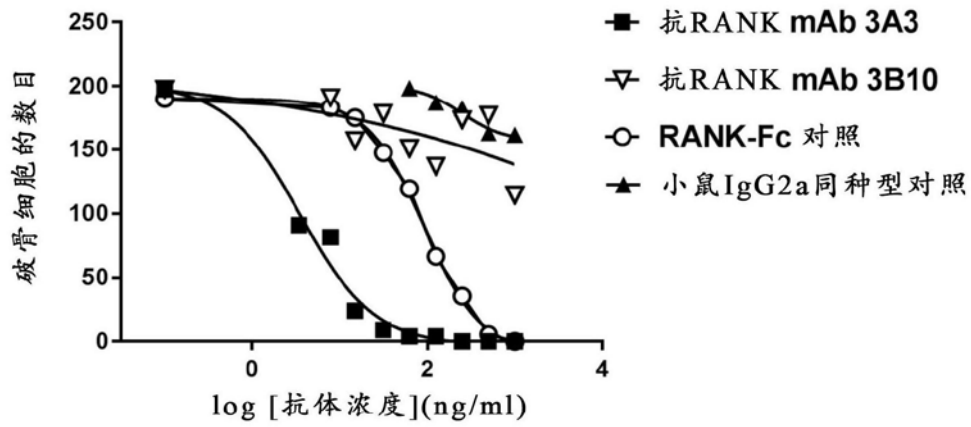


图3

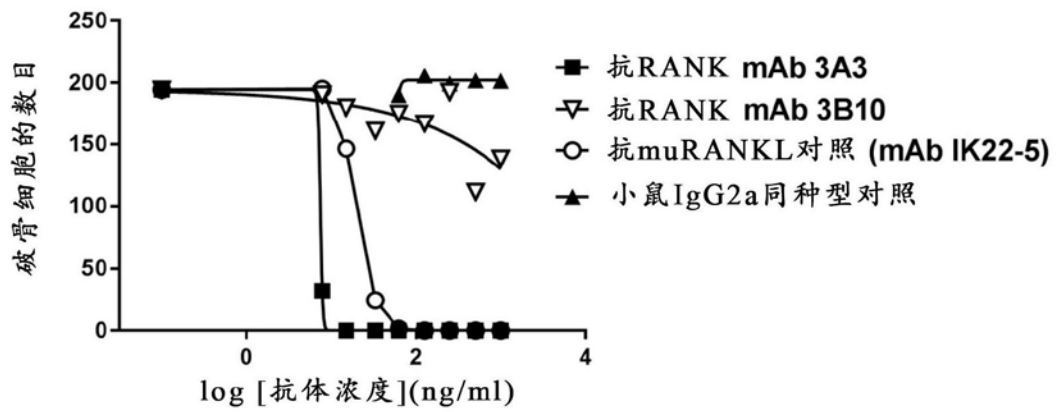
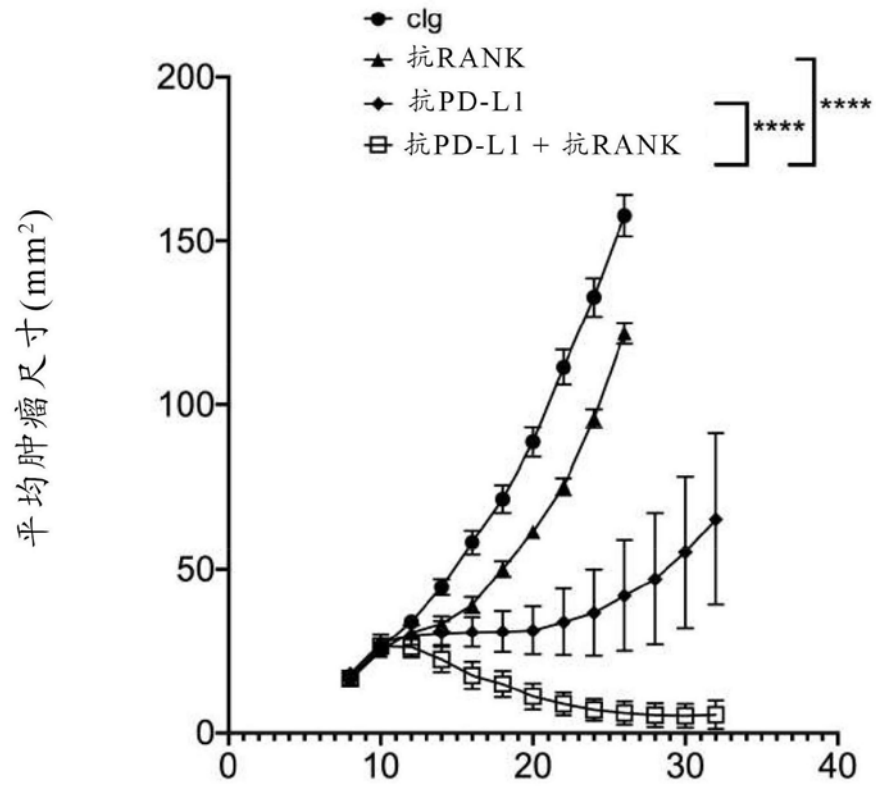
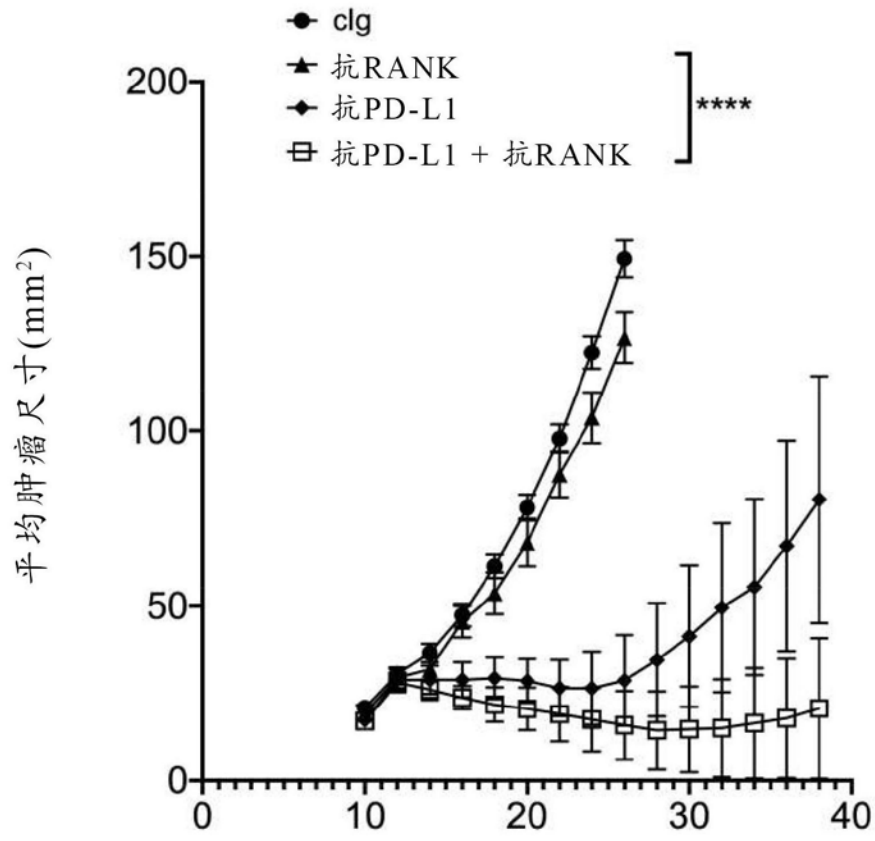


图4



在MCA1956肿瘤接种后的天数

图5



在MC38-ova^{dim}肿瘤接种后的天数

图6