(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119451985 A
(43)申请公布日 2025.02.14

(21)申请号 202380046555.7

(22)申请日 2023.05.12

(30)优先权数据
63/341,397 2022.05.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/062793 2023.05.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/218046 EN 2023.11.16

(71)申请人 健玛保
地址 丹麦哥本哈根瓦尔比
申请人 生物技术公司

(72)发明人 E·C·W·布雷伊 U·沙辛 I·阿尔廷塔斯 P·加里多卡斯特罗 J·布卢姆 A·沃伊图什凯维奇 L·盖伦 J·J·尼杰森 A·伊万 F·贝尔肯斯 R·N·德琼 J·舒尔曼 P·L·德戈耶 D·萨蒂恩 P·博罗斯 B-J·德克鲁克 R·希伯特 A·F·拉布里杰恩 K·纽伯格 S·费勒梅尔-科普夫 F·吉斯克 A·缪克 K·贝克曼 C·保尔曼 I·库兹马诺夫

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 邹宗亮

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

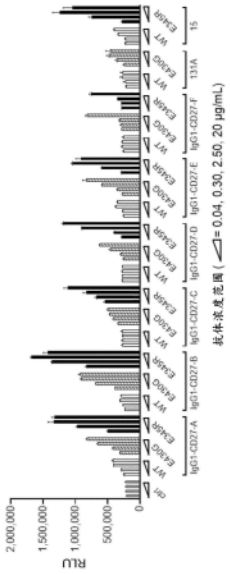
权利要求书12页 说明书151页
序列表（电子公布） 附图64页

(54)发明名称

在组合疗法中能够结合CD27的结合剂

(57)摘要

本发明提供了使用包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂与PD1/PD-L1抑制剂组合以减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的组合疗法。



CN 119451985 A

1.在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂;和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

2.权利要求1所述的方法,其中所述结合剂包含分别包含SEQ ID NO:5、6和7所示序列的重链可变(VH)区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别包含SEQ ID NO:9、10和11所示序列的轻链可变(VL)区CDR1、CDR2和CDR3。

3.权利要求1或2所述的方法,其中所述结合剂包含两个能够结合人CD27的结合区,其中所述抗体包含分别包含SEQ ID NO:5、6和7所示序列的重链可变(VH)区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别包含SEQ ID NO:9、10和11所示序列的轻链可变(VL)区CDR1、CDR2和CDR3。

4.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含含有SEQ ID NO:4所示序列的VH区。

5.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含含有SEQ ID NO:8所示序列的VL区。

6.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含分别包含SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8所示序列的VH区和VL区。

7.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂是抗体,优选人抗体或人源化抗体。

8.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体是进一步包含轻链恒定区(CL)和重链恒定区(CH)的全长抗体。

9.权利要求8所述的方法,其中所述轻链恒定区是人κ。

10.权利要求8所述的方法,其中所述轻链恒定区是人λ。

11.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂进一步包含重链恒定区,其是人IgG同种型,任选地是修饰的人IgG。

12.权利要求11所述的方法,其中所述人IgG或修饰的人IgG选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,例如人IgG1。

13.权利要求11或12所述的方法,其中所述IgG是包含一个或多个氨基酸取代的修饰的人IgG。

14.权利要求11至13中任一项所述的方法,其中所述修饰的人IgG是包含一个或多个氨基酸取代,例如两个或更多个氨基酸取代的修饰的人IgG1。

15.权利要求11至14中任一项所述的方法,其中所述修饰的人IgG重链恒定区包含至多10个氨基酸取代,例如至多9个、例如至多8个、例如至多7个、例如至多6个、例如至多5个、例如至多4个、例如至多3个、例如至多2个氨基酸取代。

16.权利要求11至15中任一项所述的方法,其中与除了包含野生型IgG1抗体重链恒定区之外相同的抗体相比,所述重链恒定区中的所述取代诱导增加的CD27激动作用。

17.权利要求11至16中任一项所述的方法,其中在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E345或E430的位置处的氨基酸残基选自下组:A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W和Y。

18.权利要求11至17中任一项所述的方法,其中在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E345的位置处的氨基酸残基是R。

19.权利要求11至18中任一项所述的方法,其中在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中

位置E430的位置处的氨基酸残基是G。

20.权利要求11至19中任一项所述的方法,其中在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置P329的位置处的氨基酸残基是R。

21.权利要求11至20中任一项所述的方法,其中在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E345和P329的位置处的氨基酸残基均是R。

22.权利要求11至21中任一项所述的方法,其中所述结合剂具有作为包含野生型IgG1重链恒定区的亲本抗体的药代动力学概况。

23.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含重链恒定区,所述重链恒定区包含选自下组的序列:SEQ ID No:12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、27、28、29、30、31、32、33、34和36。

24.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含含有SEQ ID NO:15所示序列的重链恒定区。

25.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含重链恒定区,其被修饰使得所述结合剂相对于亲本抗体以较小的程度诱导一种或多种Fc介导的效应子功能。

26.权利要求25所述的方法,其中所述一种或多种Fc介导的效应子功能降低至少20%,例如至少30%或至少40%,或至少50%或至少60%或至少70%,或至少80%或至少90%。

27.权利要求25或26所述的方法,其中所述结合剂不诱导一种或多种Fc介导的效应子功能。

28.权利要求25至27中任一项所述的方法,其中所述一种或多种Fc介导的效应子功能选自下组:补体依赖性细胞毒性(CDC)、补体依赖性细胞介导的细胞毒性(CDCC)、补体激活、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)、C1q结合和Fc γ R结合。

29.权利要求25至28中任一项所述的方法,其中当通过实施例8的方法测量时,所述结合剂不诱导C1q结合。

30.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂是单价抗体。

31.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂是二价抗体。

32.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂是单特异性抗体。

33.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂是双特异性抗体,所述双特异性抗体包含根据前述权利要求中任一项的能够结合人CD27的第一抗原结合区,并且包含能够结合人CD27上的不同表位或能够结合不同靶标的第二抗原结合区。

34.前述权利要求中任一项所述的方法,其中CD27是人CD27,特别是所述人CD27包含如SEQ ID NO:1所示的序列或如SEQ ID NO:2所示的人CD27变体。

35.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含:

e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;

f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

g.CH区,其包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列;和

h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

36.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。

37.前述权利要求中任一项所述的方法,其中PD-L1是人PD-L1,特别是包含SEQ ID NO:98所示的序列的人PD-L1。

38.前述权利要求中任一项所述的方法,其中PD1是人PD1,优选地,所述PD1具有或包含如SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列,或者所述PD1的氨基酸序列与如SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的同一性,或者是其免疫原性片段。

39.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1或PD-L1的抗体,优选是作为PD1/PD-L1相互作用的拮抗剂的抗体和/或PD1或PD-L1阻断抗体。

40.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的同种型的抗体,例如IgG1同种型的抗体。

41.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是全长抗体或抗体片段,例如全长IgG1抗体。

42.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是单特异性抗体。

43.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1的抗体,所述结合PD1的抗体包含分别包含SEQ ID NO:99、100和101所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变(VH)区,以及分别包含SEQ ID NO:102、LAS和SEQ ID NO:103所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变(VL)区。

44.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1的抗体,所述结合PD1的抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列,并且所述VL区包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列。

45.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1的抗体,所述结合PD1的抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列。

46.前述权利要求中任一项所述的方法,其中

a)所述结合剂是抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的轻链。

b)所述PD1/PD-L1抑制剂是派姆单抗或其生物仿制药。

47.权利要求1-42中任一项所述的方法,其中

a)所述结合剂是抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的轻链。

b)所述PD1/PD-L1抑制剂是纳武单抗或其生物仿制药。

48.权利要求1-42中任一项所述的方法,其中

a)所述结合剂是抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的轻链。

b)所述PD1/PD-L1抑制剂是阿替利珠单抗或其生物仿制药。

49.权利要求1-42中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1的抗体,或其抗原结合片段,其中所述结合PD1的抗体包含分别包含SEQ ID NO:49、46和45所示序列的VH区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别包含SEQ ID NO:52、QAS和SEQ ID NO:50所示序列的VL区CDR1、CDR2和CDR3。

50.权利要求49所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与如SEQ ID NO:56所示的VH序列的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

51.权利要求50所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含重链可变区(VH),其中所述VH包含如SEQ ID NO:56所示的序列。

52.权利要求49-51中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含与如SEQ ID NO:57所示的VL序列的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

53.权利要求52所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含轻链可变区(VL),其中所述VL包含如SEQ ID NO:57所示的序列。

54.权利要求49-53中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含或具有如SEQ ID NO:56所示的序列,并且所述VL包含或具有如SEQ ID NO:57所示的序列。

55.权利要求49-54中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含重链恒定区,其中所述重链恒定区在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234的位置处包含芳香族或非极性氨基酸,以及在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置236的位置处包含除甘氨酸以外的氨基酸。

56.权利要求55所述的方法,其中在对应于位置236的位置处的氨基酸是碱性氨基酸。

57.权利要求56所述的方法,其中所述碱性氨基酸选自由赖氨酸、精氨酸和组氨酸组成的组。

58.权利要求56或57所述的方法,其中所述碱性氨基酸是精氨酸(G236R)。

59.权利要求55-58中任一项所述的方法,其中在对应于位置234的位置处的氨基酸是芳香族氨基酸。

60.权利要求59所述的方法,其中所述芳香族氨基酸选自由苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸组成的组。

61.权利要求55-58中任一项所述的方法,其中在对应于位置234的位置处的氨基酸是非极性氨基酸。

62.权利要求61所述的方法,其中所述非极性氨基酸选自由丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸组成的组。

63.权利要求61或62所述的方法,其中所述非极性氨基酸选自由异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸组成的组。

64.权利要求55-63中任一项所述的方法,其中在对应于位置234处的氨基酸是苯丙氨酸(L234F)。

65.权利要求55-64中任一项所述的方法,其中在与PD1结合的抗体的所述重链恒定区中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置235的位置处的氨基酸是酸性氨基酸。

66.权利要求65所述的方法,其中所述酸性氨基酸是天冬氨酸或谷氨酸。

67.权利要求55-66中任一项所述的方法,其中在与PD1结合的抗体的所述重链恒定区中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置235的位置处的氨基酸是谷氨酸(L235E)。

68.权利要求55-67中任一项所述的方法,其中在与PD1结合的抗体的所述重链恒定区中,在对应于位置234、235和236的位置处的氨基酸是位置234处的非极性或芳香族氨基酸、位置235处的酸性氨基酸和位置236处的碱性氨基酸。

69.权利要求55-68中任一项所述的方法,其中在与PD1结合的抗体的所述重链恒定区中,对应于位置234的氨基酸是苯丙氨酸,对应于位置235的氨基酸是谷氨酸,并且对应于位置236的氨基酸是精氨酸(L234F/L235E/G236R)。

70.权利要求49-69中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体的重链恒定区包含与如SEQ ID NO:38所示的HC序列的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

71.权利要求49-70中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体的重链恒定区包含如SEQ ID NO:38所示的序列。

72.权利要求49-71中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体的重链恒定区的同种型是IgG1。

73.权利要求49-72中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含重链和轻链,所述重链具有如SEQ ID NO:139所示的序列,所述轻链具有如SEQ ID NO:140所示的序列。

74.权利要求49-73中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体是单克隆、嵌合或人源化抗体或此类抗体的片段。

75.权利要求49-74中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体具有降低的或耗竭的Fc介导的效应子功能。

76.权利要求49-75中任一项所述的方法,其中与野生型抗体相比,补体蛋白C1q与所述结合PD1的抗体的恒定区的结合降低,优选降低至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%。

77.权利要求49-76中任一项所述的方法,其中与野生型抗体相比,一种或多种IgG Fc-γ受体与所述结合PD1的抗体的结合降低,优选降低至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%。

78.权利要求77所述的方法,其中所述一种或多种IgG Fc-γ受体选自Fc-γRI、Fc-γRII和Fc-γRIII中的至少一种。

79.权利要求77或78所述的方法,其中所述IgG Fc-γ受体是Fc-γRI。

80.权利要求49-79中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体不能诱导Fc-γRI介导的效应子功能,或者其中与野生型抗体相比,所述诱导的Fc-γRI介导的效应子功能降低,优选降低至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%。

81.权利要求49-80中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体不能诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、细胞凋亡、同型粘附和/或吞噬作用中的至少一种,或者其中补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、细胞凋亡、同型粘附和/或吞噬作用中的至少一种以降低的程度被诱导,优选降低至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%。

82.权利要求49-81中任一项所述的方法,其中与野生型抗体相比,新生儿Fc受体(FcRn)与所述结合PD1的抗体的结合不受影响。

83.权利要求49-82中任一项所述的方法,所述结合PD1的抗体结合存在于活细胞表面

上的PD1的天然表位。

84.权利要求49-83中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体是包含结合PD1的第一抗原结合区和至少一个结合另一抗原的另外的抗原结合区的多特异性抗体。

85.权利要求84所述的方法,其中所述结合PD1的抗体是双特异性抗体,所述双特异性抗体包含结合PD1的第一抗原结合区和结合另一抗原的第二抗原结合区。

86.权利要求84或85所述的方法,其中所述结合PD1的第一抗原结合区包含如权利要求50至54中任一项所示的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)。

87.权利要求49-86中任一项所述的方法,其中

a)所述结合剂包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

b)所述结合PD1的抗体包含VH区和VL区,其中所述VH包含或具有如SEQ ID NO:56所示的序列,所述VL包含或具有如SEQ ID NO:57所示的序列。

88.权利要求49-87中任一项所述的方法,其中

a)所述结合剂是包含VH区、VL区、CH区和CL区的抗体,所述VH区包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,所述CH区包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,所述CL区包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

b)所述结合PD1的抗体包含VH区、VL区、CH区和CL区,所述VH区包含SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列,所述CH区包含SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列,所述CL区包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列。

89.权利要求1-41中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

90.权利要求89所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是PD-L1抑制剂,其包含结合CD137的第一结合区和结合PD-L1的第二结合区。

91.权利要求90所述的方法,其中CD137是人CD137,特别是包含SEQ ID NO:97所示的序列的人CD137。

92.权利要求90或91所述的方法,其中

a)所述PD-L1抑制剂的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:79的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:83的CDR1、CDR2和CDR3序列;

和

b)所述PD-L1抑制剂的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:86的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:90的CDR1、CDR2和CDR3序列。

93.权利要求90-92中任一项所述的方法,其中a)所述PD-L1抑制剂的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含分别在SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含分别在SEQ ID NO:84、GAS和SEQ ID NO:85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列;并且b)所述PD-L1抑制剂的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含分别在SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含分别在SEQ ID NO:91、DDN和

SEQ ID NO:92中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

94.权利要求90-93中任一项所述的方法,其中

a)所述PD-L1抑制剂的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列;

和

b)所述PD-L1抑制剂的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列。

95.权利要求90-94中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,其中所述第一结合臂包含

i)包含所述第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,和

ii)包含所述第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽;

并且所述第二结合臂包含

iii)包含所述第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,和

iv)包含所述第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽。

96.权利要求90-95中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂包含

i)第一重链和第一轻链,其包含能够结合CD137的所述抗原结合区,所述第一重链包含第一重链恒定区,并且所述第一轻链包含第一轻链恒定区;和

ii)第二重链和第二轻链,其包含能够结合PD-L1的所述抗原结合区,所述第二重链包含第二重链恒定区,并且所述第二轻链包含第二轻链恒定区。

97.权利要求95或96所述的方法,其中(i)在所述第一重链恒定区(CH)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,或(ii)在所述第一重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,并且在所述第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L。

98.权利要求95-97中任一项所述的方法,其中在所述第一重链和第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234和L235的位置分别是F和E。

99.权利要求95-98中任一项所述的方法,其中在所述第一和第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A。

100.权利要求95-99中任一项所述的方法,其中所述第一和第二重链恒定区两者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234和L235的位置分别是F和E,并且其中(i)所述第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,并且所述第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,或(ii)所述第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,并且所述第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L。

101.权利要求95-100中任一项所述的方法,其中所述第一和第二重链恒定区两者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且其中(i)所述第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,并且所述第二

重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,或(ii)所述第一重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,并且所述第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L。

102.权利要求95-101中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二重链(例如第二重链)的恒定区包含选自下组的氨基酸序列,或基本上由选自下组的氨基酸序列组成或由选自下组的氨基酸序列组成:

a)SEQ ID NO:94或96所示的序列[IgG1-Fc_FEAL];

b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多6个取代,例如至多5个取代、至多4个取代、至多3个、至多2个取代或至多1个取代的序列。

103.权利要求95-102中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二重链(例如第一重链)的恒定区包含选自下组的氨基酸序列,或基本上由选自下组的氨基酸序列组成或由选自下组的氨基酸序列组成:

a)SEQ ID NO:93或95所示的序列[IgG1-Fc_FEAR];

b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多6个取代,例如至多5个取代、至多4个取代、至多3个、至多2个取代或至多1个取代的序列。

104.权利要求95-103中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂包含kappa(κ)轻链恒定区。

105.权利要求95-104中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂包含lambda(λ)轻链恒定区。

106.权利要求95-105中任一项所述的方法,其中所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

107.权利要求95-106中任一项所述的方法,其中所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区或kappa(κ)轻链恒定区。

108.权利要求95-107中任一项所述的方法,其中所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,或者所述第一轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区。

109.权利要求104-108中任一项所述的方法,其中所述kappa(κ)轻链包含选自下组的氨基酸序列:

a)SEQ ID NO:16所示的序列,

b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,例如至多9个取代、至多8个、至多7个、至多6个、至多5个、至多4个取代、至多3个、至多2个取代或至多1个取代的序列。

110.权利要求105-109中任一项所述的方法,其中所述lambda(λ)轻链包含选自下组的

氨基酸序列:a)SEQ ID NO:17所示的序列,

b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,例如至多9个取代、至多8个、至多7个、至多6个、至多5个、至多4个取代、至多3个、至多2个取代或至多1个取代的序列。

111.权利要求90-110中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂是IgG1m(f)同种异型的抗体。

112.权利要求90-111中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂是结合CD137和PD-L1的双特异性抗体,所述双特异性抗体具有i)包含SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的第一轻链,和ii)包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的第二轻链。

113.权利要求90-112中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂是阿卡顺利单抗或其生物仿制药。

114.权利要求90-113中任一项所述的方法,其中

a)所述结合剂包含重链可变(VH)区CDR1、CDR2和CDR3和轻链可变(VL)区CDR1、CDR2和CDR3,所述重链可变(VH)区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:5、6和7所示的序列,所述轻链可变(VL)区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:9、10和11所示的序列;

b)所述PD-L1抑制剂的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含分别在SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含分别在SEQ ID NO:84、GAS和SEQ ID NO:85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列;和

c)所述PD-L1抑制剂的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含分别在SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含分别在SEQ ID NO:91、DDN和SEQ ID NO:92中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

115.权利要求90-114中任一项所述的方法,其中

a)所述结合剂包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

b)所述PD-L1抑制剂的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列;和

c)所述PD-L1抑制剂的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列。

116.权利要求90-115中任一项所述的方法,其中

a)所述结合剂是包含VH区、VL区、CH区和CL区的抗体,所述VH区包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,所述CH区包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,所述CL区包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

b)所述PD-L1抑制剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含所

述第一结合区,并且第二结合臂包含所述第二结合区;

c)所述PD-L1抑制剂的第一结合臂包含VH区、VL区、CH区和CL区,所述VH区包含SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列,所述CH区包含SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列,所述CL区包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列;和

d)所述PD-L1抑制剂的第二结合臂包含VH区、VL区、CH区和CL区,所述VH区包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列,所述CH区包含SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列,所述CL区包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。

117.权利要求90-116中任一项所述的方法,其中

a)所述结合剂包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列;

d)所述PD-L1抑制剂是结合CD137和PD-L1的双特异性抗体,所述双特异性抗体具有i)包含SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的第一轻链,和ii)包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的第二轻链。

118.权利要求90-117中任一项所述的方法,其中

a)所述结合剂包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列;

d)所述PD-L1抑制剂是阿卡顺利单抗或其生物仿制药。

119.权利要求1-38中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是选自以下的PD1抑制剂:派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、多塔利单抗、JTX-4014、Spartalizumab、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、特瑞普利单抗、INCMGA00012(MGA012)、AMP-224、AMP-514或其各自的生物仿制药。

120.权利要求1-38中任一项所述的方法,其中所述PD1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、多塔利单抗、JTX-4014、Spartalizumab、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、特瑞普利单抗、INCMGA00012(MGA012)、AMP-514或其各自的生物仿制药。

121.权利要求1-38中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是选自以下的PD-L1抑制剂:阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、KN035、CK-301、阿卡顺利单抗、AUNP12、CA-170、BMS-986189或其各自的生物仿制药。

122.权利要求1-38中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、KN035、CK-301、阿卡顺利单抗或其各自的生物仿制药。

123.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者是人受试者。

124.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述肿瘤或癌症是实体肿瘤。

125.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是PD-L1阳性肿瘤。

126.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述肿瘤或癌症是头颈部鳞状细胞癌(HNSCC),例如口腔、咽或喉的HNSCC。

127.权利要求126所述的方法,其中所述HNSCC是复发性的、不可切除的或转移性的。

128.权利要求1-125中任一项所述的方法,其中所述肿瘤或癌症是非小细胞肺癌(NSCLC),例如鳞状或非鳞状NSCLC。

129.权利要求128所述的方法,其中所述NSCLC是复发性的、不可切除的或转移性的。

130.权利要求128或129所述的方法,其中所述NSCLC不具有表皮生长因子(EGFR)致敏突变和/或间变性淋巴瘤(ALK)易位和/或ROS1重排。

131.权利要求128-130中任一项所述的方法,其中所述NSCLC是NTRK1/2/3(神经营养受体酪氨酸激酶1/2/3)融合阳性的,和/或在KRAS(KRAS原癌基因,GTP酶)、BRAF(B-Raf原癌基因,丝氨酸/苏氨酸激酶)或MET(MET原癌基因,受体酪氨酸激酶)基因中具有突变,和/或具有RET(ret原癌基因)基因重排,并且所述受试者先前已经接受了相应的靶向疗法的治疗。

132.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已接受PD1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体),优选至少两个剂量的所述PD1抑制剂或所述PD-L1抑制剂的治疗。

133.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已经接受了基于铂的疗法或如果铂不合格的情况下的替代化疗,例如含吉西他滨的方案的治疗。

134.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述肿瘤或癌症在治疗(例如用检查点抑制剂进行全身治疗)后复发和/或进展。

135.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者已经接受了至少一种先前线的全身疗法,例如包含PD1抑制剂或PD-L1抑制剂,例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体的全身疗法。

136.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症或肿瘤已经复发和/或是难治性的,或者所述受试者在用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体)治疗后已经进展,所述PD1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。

137.前述权利要求中任一项所述的方法,其中最后一次先前治疗是用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂,例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体,所述PD1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。

138.前述权利要求中任一项所述的方法,其中从最后一次用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体)治疗发生进展的时间是6个月或更少。

139.前述权利要求中任一项所述的方法,其中从作为最后一次先前治疗的一部分的最后一次给药PD1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体)的时间是6个月或更少。

140.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症或肿瘤已经复发和/或是难治性的,或者所述受试者在以下期间或之后已经进展

i)用抗PD1抗体或抗PD-L1抗体治疗后的铂双重化疗,或

ii)铂双重化疗后用抗PD1抗体或抗PD-L1抗体治疗。

141.试剂盒,其包含

i)结合剂,其包含至少一个结合CD27的结合区,和

ii)PD1/PD-L1抑制剂。

142.根据权利要求141所述的试剂盒,其中所述结合剂如权利要求1-140中任一项所定义和/或所述PD1/PD-L1抑制剂如权利要求1-140中任一项所定义。

143.根据权利要求141或142所述的试剂盒,其中所述结合剂、所述PD1/PD-L1抑制剂和(如果存在的话)一种或多种另外的治疗剂用于全身施用,特别是用于注射或输注,例如静脉注射或输注。

144.根据权利要求141-143中任一项所述的试剂盒,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中。

145.根据权利要求144所述使用的试剂盒,其中所述肿瘤或癌症如权利要求1-140中任一项所定义,和/或所述受试者如权利要求1-140中任一项所定义,和/或所述方法如权利要求1-140中任一项所定义。

146.药物组合物,其包含

i)结合剂,其包含至少一个结合CD27的结合区;

ii)PD1/PD-L1抑制剂;和

iii)任选的药物可接受的载剂。

147.根据权利要求146所述的试剂盒,其中所述结合剂如权利要求1-140中任一项所定义和/或所述PD1/PD-L1抑制剂如权利要求1-140中任一项所定义。

148.根据权利要求146或147所述的药物组合物,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中。

149.根据权利要求148所述使用的药物组合物,其中所述肿瘤或癌症如权利要求1-140中任一项所定义,和/或所述受试者如权利要求1-140中任一项所定义,和/或所述方法如权利要求1-140中任一项所定义。

150.结合剂,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述方法包括向所述受试者施用i)包含至少一个结合CD27的结合区的所述结合剂;和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

151.根据权利要求150所述使用的试剂盒,其中所述方法如权利要求1-140中任一项所定义,和/或所述结合剂如权利要求1-140中任一项所定义,和/或所述PD1/PD-L1抑制剂如权利要求1-140中任一项所定义。

152.PD1/PD-L1抑制剂,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述方法包括向所述受试者施用i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂;和ii)所述PD1/PD-L1抑制剂。

153.根据权利要求152所述使用的PD1/PD-L1抑制剂,其中所述方法如权利要求1-140中任一项所定义,和/或所述结合剂如权利要求1-140中任一项所定义,和/或所述PD1/PD-L1抑制剂如权利要求1-140中任一项所定义。

在组合疗法中能够结合CD27的结合剂

技术领域

[0001] 本发明涉及使用包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂与PD1/PD-L1抑制剂组合以减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的组合疗法。

背景技术

[0002] 分化簇(CD)27(TNFRSF7)是肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族(TNFRSF)的55kDa I型跨膜蛋白成员,其在与其配体CD70结合后共刺激T细胞活化。它在人中表达在T、B、自然杀伤(NK)细胞及其直接前体的细胞膜上,所有这些细胞都是淋巴谱系的一部分。在人T细胞上,CD27在静息αβ$CD4^+$(Treg和常规T细胞)、$CD8^+$T细胞、干细胞记忆细胞和中枢记忆样细胞上表达。在人B细胞上,CD27是记忆B细胞标志物,并且CD27信号传导促进B细胞分化为浆细胞。

[0003] CD27的唯一已知配体是II型跨膜蛋白CD70(肿瘤坏死因子超家族成员7,TNFSF7;CD27配体,CD27L),其在活化的免疫细胞(包括T细胞、B细胞、NK细胞和树突状细胞(DC))上表达非常有限,并且仅是瞬时表达的。

[0004] CD27在初级免疫应答的早期生成中起作用,并且是T细胞免疫的生成和长期维持所必需的。CD27-CD70结合导致活化的B细胞的核因子κ轻链增强子(NF-κB)和丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)8/Jun N-端激酶(JNK)通路的激活。衔接蛋白TNF受体相关蛋白(TRAF)2和TRAF5已被证明可以介导由CD27接合产生的信号传导。

[0005] 为了解锁其效应子功能,T细胞需要T细胞抗原受体介导,在抗原呈递细胞(APC)表面上的主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景下识别其同源抗原,并激活共刺激受体。CD27和CD28被认为是T细胞上表达的最重要的共刺激受体。

[0006] 在小鼠中,已经发现在T细胞激活的引发期期间的CD27刺激通过白细胞介素(IL)-2非依赖性存活信号传导促进抗原特异性$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞的克隆扩增(Carr JM et al,Proc Natl Acad Sci USA 2006Dec 19;130(51):19454-9)。CD27还在连续分裂中抵消活化的T细胞的凋亡,并且还被证明在小鼠$CD8^+$T细胞的记忆分化中起重要作用。(Van de Ven K,Borst J.Immunotherapy2015;7(6):655-67)。因此,CD27刺激促进淋巴器官中效应T细胞的生成并拓宽响应T细胞库。在人幼稚T细胞中,CD27刺激促进$CD4^+$ T细胞向T辅助1型细胞(Th1)的分化,并且支持细胞毒性T淋巴细胞的效应分化(Oosterwijk et al,Int Immunol.2007Jun;19(6):713-8)。

[0007] 与CD27在一些血液恶性肿瘤的肿瘤细胞上的存在相反,在实体恶性肿瘤的肿瘤细胞上未检测到CD27表达。然而,表达CD27的淋巴细胞已经在血液恶性肿瘤和实体癌的肿瘤微环境(TME)中进行了描述。

[0008] 在癌症的治疗中,免疫应答的参与和刺激已被证明可以诱导和/或增强抗肿瘤免疫,从而导致临床应答,如免疫检查点抑制剂(CPI)的临床成功所示例的。通过提供共刺激信号传导,例如CD27共刺激信号传导,可以增加主动免疫应答和/或现有的抗肿瘤免疫。

[0009] 在小鼠肿瘤模型中,激动性CD27抗体可增强T细胞功能并因此增强抗肿瘤免疫。在人CD27(hCD27)转基因淋巴瘤小鼠模型中,使用激动性抗体的CD27激活显示出有效的抗肿

瘤活性和诱导保护性免疫,其依赖于$CD4^+$和$CD8^+$T细胞(He LZ et al.,J Immunol.2013Oct 15;191(8):4174-83)。此外,使用单克隆抗体的CD27激活防止小鼠异种移植物的肿瘤生长,包括衍生自白血病(Vitale et al,Keler T.Clin Cancer Res.2012Jul 15;18(14):3812-21)、黑色素瘤(Roberts DJ,et al.,J Immunother.2010Oct;33(8):769-79)、结肠癌和胸腺瘤(He LZ,et al.,J Immunol.2013Oct 15;191(8):4174-83)等的模型。

[0010] 针对人CD27的单克隆免疫球蛋白G(IgG)1激动性抗体已在现有技术中公开。

[0011] 在WO2012/004367中,描述了人源化抗人CD27激动性抗体(命名为hCD27.15)。据报道,hCD27.15不需要通过表达可结晶片段(Fc)γ受体(FcγR)的细胞交联来激活CD27介导的免疫应答共刺激。然而,该抗体不结合hCD27中常见的单核苷酸多态性(SNP)(A59T),并且不结合食蟹猴CD27。

[0012] WO2011/130434公开了命名为1F5的人激动性抗人CD27抗体,其在通过表达FcγR的细胞交联时激活CD27,并且进一步阻断可溶性CD70(sCD70)配体结合的结合。据报道,1F5具有Fc介导的效应子功能活性,包括靶细胞上的补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC),并增强免疫应答,并且在小鼠模型中具有抗肿瘤活性。

[0013] WO2018/058022公开了激动性鼠抗人CD27抗体131A及其人源化形式。公开了131A结合常见的hCD27 SNP A59T并结合食蟹猴CD27。WO2018/058022进一步公开了在小鼠肿瘤模型中,与抗体1F5相比,抗体131A具有更强的抗肿瘤应答。

[0014] WO2019/195452公开了命名为BMS-986215的非配体阻断激动性抗人CD27抗体,据报道,其对人和食蟹猴CD27具有比上述CD27抗体1F5更高的亲和力。公开了在BMS-986215存在下,T细胞的CD27共刺激通过与其配体CD70结合而发生。进一步公开了BMS-986215通过调节性T细胞(Treg)降低$CD4^+$应答T细胞的抑制,并且BMS-986215结合C1q并诱导CDC、适度的ADCC和低水平的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。进一步公开了BMS-986215在不存在FcγR和不存在sCD70的情况下仅具有弱激动剂活性。

[0015] 癌细胞可以通过上调抑制性免疫检查点蛋白(例如T细胞上的程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4),或肿瘤细胞、肿瘤基质或TME内的其他细胞上的程序性细胞死亡1配体1(PD-L1)和/或程序性细胞死亡1配体2(PD-L2))来避免和抑制免疫应答。已知CTLA-4和PD-1传递抑制T细胞活化的信号。用单克隆抗体阻断这些蛋白质的活性,从而恢复T细胞功能,已经递送了针对癌症的突破性疗法。

[0016] PD-1(也称为CD279)是在活化的T细胞、B细胞和单核细胞表面表达的免疫调节受体。蛋白质PD-1具有两种天然存在的配体,其称为PD-L1(也称为CD274)和PD-L2(也称为CD273)。多种癌症表达PD-L1,包括黑色素瘤、肺癌、肾癌、膀胱癌、食道癌、胃癌和其他癌症。因此,在癌症中PD-L1与PD-1相互作用时,PD-1/PD-L1系统可以抑制T淋巴细胞的增殖、细胞因子的释放和细胞毒性,从而为癌细胞提供避免T细胞介导的免疫应答的机会。

[0017] 适于调节PD-1/PD-L1轴活性的单克隆抗体是已知的。PD-1/PD-L1相互作用可以被靶向PD-1的抗体(例如派姆单抗(pembrolizumab)(也称为MK-3475、兰布利珠单抗(lambrolizumab)或Keytruda)和纳武单抗(nivolumab)(也称为ONO-4538、BMS-936558或Opdivo))或经开发以结合PD-L1的单克隆抗体(例如阿替利珠单抗(atezolizumab)(也称为MPDL3280A、RG7446或Tecentriq))抑制。

[0018] 抗CD27抗体必须诱导CD27在质膜上聚集以诱导CD27激动作用。在野生型IgG1抗体

的情况下,CD27的聚集可以通过膜结合的CD27抗体与携带Fc γ R的细胞(例如单核细胞、巨噬细胞、B细胞和其他免疫细胞)的相互作用来实现。因此,当表达Fc γ R的细胞的数量有限时,抗CD27 IgG1分子的效率可能较低。通过修饰抗体的Fc区优化效应子功能可以提高治疗性抗体治疗癌症或其他疾病的功效,例如,提高抗体引发对表达抗原的细胞的免疫应答的能力。此类尝试描述于例如,WO 2013/004842 A2;WO 2014/108198A1;WO2018/146317;WO2018/083126;WO 2018/031258 A1;Dall'Acqua,Cook et al.J Immunol 2006,177(2):1129-1138;Moore,Chen et al.MAbs 20102(2):181-189;Desjarlais and Lazar,Exp Cell Res 2011,317(9):1278-1285;Kaneko and Niwa,BioDrugs 2011,25(1):1-11;Song,Myojo et al.,Antiviral Res2014,111:60-68;Brezski and Georgiou,Curr Opin Immunol 2016,40:62-69;Sondermann and Szymkowski,Curr Opin Immunol 2016,40:78-87;Zhang,Armstrong et al.MAbs 2017,9(7):1129-1142.;Wang,Mathieu et al.Protein&Cell 2018,9(1):63-73;Diebolder FJ et al.,Science.2014Mar 14;343(6176):1260-3)。

[0019] 通过激活免疫系统,免疫CPI也可能在一些患者中引起自身免疫副作用。另外,Fc结构域与Fc受体或补体系统的组分的接合也可能导致不期望的效应子功能,例如ADCC、ADCP和CDC的激活,这可能引起CD27阳性T细胞的不期望的耗竭。因此,Fc介导的效应子功能的激活在阻断PD-1/PD-L1相互作用的单克隆抗体的背景下是不被期望的。已经开发了多种含有不接合Fc受体和/或补体系统的Fc结构域的IgG抗体形式,其中氨基酸取代及其组合(即,非激活突变)已被引入IgG1同种型抗体的恒定重链区中以消除Fc介导的效应子功能(例如,Chiu et al.,Antibodies 2019Dec;8(4):55;Liu et al.,Antibodies,2020Nov 17;9(4):64;29(10):457-66)。此类取代的实例包括引入L234A-L235A-P329G非激活突变(Schlothauer et al.,Protein Eng.Design and Selection 2016;29(10):457-66)或L234F-L235E-D265A非激活突变(在本文中也称为FEA或FEA形式,Engelberts et al.,EBioMedicine 2020;52:102625;US10590206B2)。使用人IgG4(具有降低的效应子功能的人IgG亚类之一)与抗体的恒定重链区中的氨基酸取代组合开发了其他非活化形式,以进一步消除Fc介导的效应子功能(例如,WO2015/143079中描述的E233P-F234V-L235A-G236del非激活突变的引入,或Vafa et al.Methods 2014;65:114-126描述的F234A-L235A非激活突变的引入)。

[0020] 除其他之外,Garber等人讨论了联合疗法的机会,联合疗法由靶向T细胞共刺激受体的激动性抗体,例如,靶向4-1BB(CD137)、OX40、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关受体(GITR)和独立共刺激(ICOS)的激动性抗体,和阻断PD-1/PD-L1轴的单克隆抗体(Garber et al.Nat Rev Drug Discov.2020Jan;19(1):3-5)组成。Azpilikueta等人(J Thorac Oncol 2016;11:524-36)发表了小鼠肺癌模型中包含PD-1阻断抗体和4-1BB靶向抗体的联合疗法的临床前数据,表明联合疗法优于单药治疗。

[0021] WO2008/051424A2提供了包括单独施用靶向CD27的激动性抗体或与其他免疫调节剂(例如靶向CD40、OX40、4-1BB或CTLA-4的抗体)组合施用的方法。

[0022] US10668152B2提供了使用组合疗法治疗癌症的方法,该组合疗法包括施用抗PD-1抗体和抗CD27抗体。

[0023] CDX-527是PD-L1xCD27双特异性IgG1抗体(Vitale et al.,Cancer Immunol

Immunother 2020)。

[0024] WO2018/127916提供了基于MIRP技术(多功能免疫募集蛋白)的PD1-CD70双信号融合蛋白(DSP-106)。

[0025] WO2015/016718A1提供了已知或预期通过刺激$CD27^+$免疫细胞或通过抑制一种或多种免疫检查点蛋白减轻的任何病况的治疗,例如通过施用与阻断PD1/PD-L1相互作用的抗体组合的抗CD27抗体。

[0026] 然而,尽管本领域进行了这些和其他尝试,但仍需要改进的基于抗体的免疫疗法,其具有增加的激动作用和/或增加的接合CD27的效力,作为与其他免疫调节抗体或阻断免疫检查点的抗体的组合疗法一起提供。

[0027] 发明概述

[0028] 本发明涉及在组合疗法中能够结合CD27的结合剂。

[0029] 在第一方面,本公开提供了用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用i)结合剂,其包含至少一个结合CD27的结合区;和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0030] 在第二方面,本公开提供了试剂盒,其包含i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0031] 在第三方面,本公开提供了试剂盒,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述试剂盒包含i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0032] 在第四方面,本公开提供了药物组合物,其包含i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂;ii)PD1/PD-L1抑制剂;和ii)任选地药物可接受的载剂。

[0033] 在第五方面,本公开提供了药物组合物,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述药物组合物包含i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0034] 在第六方面,本公开提供了结合剂,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述方法包括向所述受试者施用i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂;和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0035] 在第七方面,本公开提供了PD1/PD-L1抑制剂,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述方法包括向所述受试者施用i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂;和ii)所述PD1/PD-L1抑制剂。

[0036] 发明详述

[0037] 定义

[0038] 在本发明的上下文中,术语“抗体”(Ab)是指能够特异性结合抗原的免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的片段或它们的衍生物。本发明的抗体包含免疫球蛋白的Fc结构域和抗原结合区。抗体通常含有两个CH2-CH3区和连接区,例如铰链区,例如至少Fc结构域。因此,本发明的抗体可以包含Fc区和抗原结合区。免疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区或“Fc”区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,该宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和补体系统的组分,例如C1q,补体激活的经典通路中的第一组分。如本文所用,除非与上下文相矛盾,免

疫球蛋白的Fc区通常至少含有免疫球蛋白CH的CH2结构域和CH3结构域,并且可以包含连接区,例如铰链区。Fc区通常经由例如连接两个铰链区的二硫键和/或两个CH3区之间的非共价相互作用呈二聚化形式。二聚体可以是同源二聚体(其中两个Fc区单体氨基酸序列相同)或异源二聚体(其中两个Fc区单体氨基酸序列在一个或多个氨基酸上不同)。全长抗体的Fc区片段可以例如通过用木瓜蛋白酶消化全长抗体来生成,如本领域熟知的。除了Fc区和抗原结合区之外,如本文所定义的抗体还包含免疫球蛋白CH1区和CL区中的一个或两个。抗体也可以是多特异性抗体,例如双特异性抗体或类似分子。术语"双特异性抗体"是指对至少两个不同的、通常不重叠的表位具有特异性的抗体。此类表位可以在相同或不同的靶标上。如果表位在不同靶标上,则此类靶标可以在相同细胞或不同细胞或细胞类型上。如上所述,除非另有说明或与上下文明显矛盾,本文中的术语抗体包括包含Fc区的至少一部分并保留特异性结合抗原的能力的抗体片段。此类片段可以通过任何已知技术提供,例如酶促切割、肽合成和重组表达技术。已经显示,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段进行。术语"Ab"或"抗体"中涵盖的结合片段的实例包括但不限于单价抗体(描述于Genmab的WO2007059782中);重链抗体,仅由两条重链组成并且天然存在于例如骆驼科动物中(例如,Hamers-Casterman(1993)Nature 363:446);ThioMabs,Roche,WO2011069104);链交换工程化结构域(SEED或Seed-body),其是不对称和双特异性抗体样分子(Merck,WO2007110205);Triomab(Pharma/Fresenius Biotech,Lindhofer et al.1995J Immunol 155:219;WO2002020039);Fc ΔADP(Regeneron,WO2010151792);不对称支架(Zymeworks/Merck,WO2012/058768);mAb-Fv(Xencor,WO2011/028952);Xmab(Xencor);双可变结构域免疫球蛋白(Abbott,DVD-Ig,美国专利号7,612,181);双结构域双头抗体(Unilever;Sanofi Aventis,WO20100226923);双-双体抗体(Di-diabody)(ImClone/Eli Lilly);杵臼抗体形式(Genentech,WO9850431);DuoBody(Genmab,WO 2011/131746);双特异性IgG1和IgG2(Pfizer/Rinat,WO11143545);DuetMab(MedImmune,US2014/0348839);静电转向抗体形式(Amgen,EP1870459和WO 2009089004;Chugai,US201000155133;Oncomed,WO2010129304A2);双特异性IgG1和IgG2(Rinat neurosciences Corporation,WO11143545);CrossMAb(Roche,WO2011117329);LUZ-Y(Genentech);双克隆(Merus,WO2013157953);双靶向结构域抗体(GSK/Domantis);识别两个靶标的二合一抗体或双重作用Fab(Genentech、NovImmune、Adimab);交联Mab(Karmanos癌症中心);共价融合mAb(AIMM);CovX-body(CovX/Pfizer);FynomAb(Covagen/Janssen ilag);DutaMab(Dutalys/Roche);iMab(MedImmune);IgG样双特异性(ImClone/Eli Lilly,Shen,J.,et al.J Immunol Methods,2007.318(1-2):p.65-74);TIG-body、DIG-body和PIG-body(Pharmabcine);双亲和力重靶向分子(Fc-DART或Ig-DART,Macrogenics,WO/2008/157379,WO/2010/080538);BEAT(Glenmark);Zybody(Zyngenia);具有共同轻链(Crucell/Merus,US7262028)或共同重链(NovImmune的κλBody,WO2012023053)的方法,以及包含与含有Fc区的抗体片段融合的多肽序列的融合物,如scFv-融合物,如ZymoGenetics/BMS的BsAb,Biogen Idec的HERCULES(US007951918);SCORPIONS(Emergent BioSolutions/Trubion和Zymogenetics/BMS);Ts2Ab(MedImmune/AZ(Dimasi,N.,et al.J Mol Biol,2009.393(3):p.672-92);scFv融合物(Genentech/Roche);scFv融合物(Novartis);scFv融合物(Immunomedics);scFv融合物(Changzhou Adam Biotech Inc,CN 102250246);TvAb

(Roche,WO 2012025525,WO 2012025530);mAb2(f-Star,WO2008/003116);和双重scFv-融合物。应当理解,除非另有说明,术语抗体包括单克隆抗体(例如人单克隆抗体)、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、单特异性抗体(例如二价单特异性抗体)、双特异性抗体、任何同种型和/或同种异型的抗体;例如通过Symphogen和Merus(Oligoclonics)开发的技术生成的抗体混合物(重组多克隆),如WO2015/158867中所述的多聚体Fc蛋白,和如WO2014/031646中所述的融合蛋白。虽然这些不同的抗体片段和形式通常包括在抗体的含义内,但它们共同且各自独立地是本发明的独特特征,表现出不同的生物学特性和效用。

[0039] 天然受体的"激动性抗体"是与受体结合以形成受体-抗体复合物并激活所述受体,从而启动通路信号传导和进一步的生物学过程的化合物。

[0040] 术语"激动作用"和"激动性"在本文中可互换使用,并且是指或描述能够直接或间接地基本上诱导、促进或增强CD27生物活性或活化的抗体。任选地,"激动性CD27抗体"是能够通过与称为CD70(肿瘤坏死因子超家族成员7,TNFSF7;CD27配体,CD27L)的CD27配体相似的机制激活CD27受体的抗体,其导致一种或多种细胞内信号传导通路的激活,其可以包括NF-KB和MAPK8/JNK通路的激活。如本文所定义的"激动作用"可根据本文实施例2确定。

[0041] 如本文所述的"CD27抗体"或"抗CD27抗体"是特异性结合蛋白CD27,特别是人CD27的抗体。

[0042] 如本文所用,"变体"是指在一个或多个氨基酸残基上不同于亲本或参考序列的蛋白质或多肽序列。变体可以例如与亲本或参考序列具有至少80%,如90%,或95%,或97%,或98%,或99%的序列同一性。此外,或可替代地,变体可以与亲本或参考序列相差12个或更少,例如11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个突变,例如氨基酸残基的取代、插入或缺失。因此,本文可互换使用的"变体抗体"或"抗体变体"是指与亲本或参考抗体相比在一个或多个氨基酸残基上不同的抗体,例如在抗原结合区、Fc区或两者上不同。同样,"变体Fc区"或"Fc区变体"是指与亲本或参考Fc区相比在一个或多个氨基酸残基上不同的Fc区,任选地与亲本或参考Fc区氨基酸序列相差12个或更少,例如11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个突变,例如氨基酸残基的取代、插入或缺失。亲本或参考Fc区通常是人野生型抗体的Fc区,根据上下文,该人野生型抗体可以是特定的同种型。二聚化形式的变体Fc区可以是同源二聚体或异源二聚体,例如,其中二聚化Fc区的氨基酸序列之一包含突变,而另一个与亲本或参考野生型氨基酸序列相同。表3中列出了包含Fc区氨基酸序列的野生型(通常是亲本或参考序列)IgG CH和变体IgG恒定区氨基酸序列的实例。

[0043] 如本文所用,术语"免疫球蛋白重链"或"免疫球蛋白的重链"旨在指免疫球蛋白的重链之一。重链通常包含重链可变区(本文缩写为VH)和定义免疫球蛋白同种型的重链恒定区(本文缩写为CH)。重链恒定区通常包含三个结构域,CH1、CH2和CH3。如本文所用,术语"免疫球蛋白"旨在指一类结构相关的糖蛋白,其由两对多肽链组成,一对轻(L)低分子量链和一对重(H)链,所有四条链可能通过二硫键相互连接。免疫球蛋白的结构已被很好地表征(参见例如Fundamental Immunology Ch.7Paul,W.,2nd ed.Raven Press,N.Y.1989)。在免疫球蛋白的结构内,两条重链经由所谓的"铰链区"中的二硫键相互连接。与重链相同,每条轻链通常包含几个区域;轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区通常包含一个结构域,CL。此外,VH和VL区可以进一步细分为高变区(或在序列和/或结构上确定的环的形式上可以是高变的高变区),也称为互补决定区(CDR),散布在称为框架区(FR)的更保

守的区域中。每个VH和VL通常包含三个CDR和四个FR,按照以下顺序从氨基端至羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。除非另有说明或与上下文相矛盾,本文中的CDR序列是根据IMGT定义的(参见Lefranc MP.et al.,Nucleic Acids Research,27,209-212,1999]和Brochet X.Nucl.Acids Res.36,W503-508(2008))。

[0044] 如本文所用,术语“半分子”、“Fab-臂”和“臂”是指一个重链-轻链对。当双特异性抗体被描述为包含“衍生自”第一抗体的半分子抗体和“衍生自”第二抗体的半分子抗体时,术语“衍生自”表示双特异性抗体通过任何已知方法将来自所述第一抗体和第二抗体中的每一个的所述半分子重组成所得的双特异性抗体而生成。在此上下文中,“重组”不旨在受任何特定重组方法的限制,并且因此包括下文所述的用于产生双特异性抗体的所有方法,包括例如通过在本领域中也描述为“Fab臂交换”的“半分子交换”和DuoBody®方法进行重组,以及在核酸水平和/或通过在相同细胞中共表达两个半分子进行重组。

[0045] 如本文所用,术语“抗原结合区”或“结合区”或抗原结合结构域是指抗体的能够结合抗原的区域。该结合区通常由抗体的VH和VL结构域定义,VH和VL结构域可以进一步细分为高变区(或在序列和/或结构上确定的环的形式上可以是高变的高变区),也称为互补决定区(CDR),散布在称为框架区(FR)的更保守的区域中。抗原可以是任何分子,例如多肽,例如存在于细胞、细菌或病毒体上的多肽。除非与上下文相矛盾,术语“抗原结合区”和“抗原结合位点”和“抗原结合结构域”在本发明的上下文中可互换使用。

[0046] 除非与上下文相矛盾,否则术语“抗原”和“靶标”在本发明的上下文中可互换使用。

[0047] 如本文所用,当通过使用抗体作为配体和抗原作为分析物的生物层干涉测定法进行确定时,术语“结合”是指抗体与预定抗原或靶标的结合,通常具有对应于$1E^{6}$ M或更小,例如$5E^{7}$ M或更小,$1E^{7}$ M或更小,例如$5E^{8}$ M或更小,例如$1E^{8}$ M或更小,例如$5E^{9}$ M或更小,或例如$1E^{9}$ M或更小的K_D的结合亲和力,并且以对应于例如比与预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)结合的亲和力低至少10倍,例如至少100倍,例如至少1000倍,例如至少10000倍,例如至少100000倍的K_D的亲和力结合预定抗原。

[0048] 如本文所用,术语“K_D“(M)是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数,并且通过k_d除以k_a得到。

[0049] 如本文所用,术语“K_d“(sec^{-1})是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值也称为k_{off}值或解离速率。

[0050] 如本文所用,术语“k_a”(M^{-1}x sec^{-1})是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率常数。所述值也称为k_{on}值或结合速率。

[0051] 如本文所用,术语“CD27”是指名为CD27的人蛋白质,也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员7(TNFRSF7)。在SEQ ID NO:1(Uniprot ID P26842)所示的氨基酸序列中,氨基酸残基1-19是信号肽,并且氨基酸残基20-240是成熟多肽。除非与上下文相矛盾,CD27还可以指CD27的变体、其同工型和直系同源物。包含A59T突变的人CD27的天然存在的变体在SEQ ID NO:2中显示。

[0052] 在食蟹猴(Macaca fascicularis)中,CD27蛋白具有SEQ ID NO:3(Genbank XP_005569963)中所示的氨基酸序列。在SEQ ID NO:3所示的240个氨基酸序列中,未定义信号肽。

[0053] 术语“抗体结合区”是指抗原的区域,其包含抗体结合的表位。抗体结合区可以通过使用生物层干涉法的表位结合、通过丙氨酸扫描或通过洗牌试验(使用其中抗原的区域与另一物种的区域交换的抗原构建体并确定抗体是否仍然结合抗原)来确定。抗体结合区内参与与抗体相互作用的氨基酸可以通过氢/氘交换质谱法和通过与其抗原结合的抗体的晶体学确定。

[0054] 术语“表位”意指被抗体特异性结合的抗原决定簇。表位通常由分子的表面基团如氨基酸、糖侧链或其组合组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于,在变性溶剂存在下,与前者而不是后者的结合丧失。表位可以包含直接参与结合的氨基酸残基和不直接参与结合的其他氨基酸残基,例如当抗体与抗原结合时,被抗体有效阻断或覆盖的氨基酸残基(换句话说,该氨基酸残基在特定抗体的足迹内或紧邻其足迹)。

[0055] 如本文所用,术语“单克隆抗体”、“单克隆Ab”、“单克隆抗体组合物”、“mAb”等是指单分子组合物的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示对特定表位的单一结合特异性和亲和力。因此,术语“人单克隆抗体”是指显示单一结合特异性的抗体,其具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。人单克隆抗体可以由杂交瘤产生,该杂交瘤包括从转基因或转染色体非人动物(例如,转基因小鼠或大鼠)获得的B细胞,所述杂交瘤具有与永生化细胞融合的包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。单克隆抗体也可以由重组修饰的宿主细胞或使用支持编码抗体的核酸序列的体外转录和/或翻译的细胞提取物的系统产生。

[0056] 如本文所用,术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋白类别(例如IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM)或其任何同种异型,例如IgG1m(za)和IgG1m(f))。此外,每种重链同种型可以与κ或λ轻链组合。

[0057] 当在本文中使用时,术语“全长抗体”表示该抗体不是片段,而是含有在自然界中通常针对该同种型发现的特定同种型的所有结构域,例如IgG1抗体的VH、CH1、CH2、CH3、铰链、VL和CL结构域。在全长变体抗体中,当与全长亲本或野生型抗体相比时,重链和轻链恒定结构域和可变结构域可以特别地含有改善抗体功能特性的氨基酸取代。根据本发明的全长抗体可以通过包括以下步骤的方法产生:(i)将CDR序列克隆到包含完整重链序列和完整轻链序列的合适载体中,和(ii)在合适的表达系统中表达完整重链和轻链序列。对于技术人员来说,从CDR序列或完整的可变区域序列出发生产全长抗体是众所周知的。因此,技术人员将知道如何生成根据本发明的全长抗体。

[0058] 如本文所用,术语“人抗体”旨在包括包含衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和框架区以及人免疫球蛋白恒定结构域的抗体。本发明的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变、插入或缺失)。然而,如本文所用,术语“人抗体”不旨在包括其中衍生自另一非人物种(例如小鼠)的种系的CDR序列已被移植到人框架序列上的抗体。

[0059] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指遗传工程化的非人抗体,其含有人抗体恒定结构域和经修饰以含有与人可变结构域高水平序列同源性的非人可变结构域。这可以通过将一起形成抗原结合位点的六个非人抗体互补决定区(CDR)移植到同源人受体框架区(FR)上来实现(参见WO92/22653和EP0629240)。为了完全重建亲本抗体的结合亲和力和特异性,

可能需要将亲本抗体(即非人抗体)的框架残基替换到人框架区(回复突变)。结构同源建模可以帮助鉴定框架区中对抗体的结合特性重要的氨基酸残基。因此,人源化抗体可以包含非人CDR序列,主要是人框架区任选地包含非人氨基酸序列的一个或多个氨基酸回复突变,和全人恒定区。任选地,可以应用不一定是回复突变的另外的氨基酸修饰以获得具有优选特征如亲和力和生化特性的人源化抗体。

[0060] 如本文所用,术语“Fc区”或“Fc结构域”可以互换使用,并且是指重链恒定区的区域,该重链恒定区在从抗体的N-端至C-端的方向上至少包含铰链区、CH2区和CH3区。抗体的Fc区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,该宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和补体系统的组分。

[0061] 除非另有说明或与上下文明显矛盾,术语“亲本多肽”或“亲本抗体”应理解为与根据本发明的多肽或抗体相同,但其中亲本多肽或亲本抗体没有突变的多肽或抗体。例如,本发明的抗体IgG1-CD27-A是IgG1-CD27-A-P329R-E345R的亲本抗体。

[0062] 如本文所用,术语“铰链区”是指免疫球蛋白重链的铰链区。因此,例如人IgG1抗体的铰链区对应于根据Kabat,E.A.et al.,Sequences of proteins of immunological interest.5th Edition-USDepartment of Health and Human Services,NIH publication No.91-3242,pp 662,680,689(1991)中所述的Eu编号(Eu-索引)的氨基酸216-230。然而,铰链区也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0063] 如本文所用,术语“CH1区”或“CH1结构域”是指免疫球蛋白重链的CH1区。因此,例如人IgG1抗体的CH1区对应于根据Kabat(ibid)中所述的Eu编号的氨基酸118-215。然而,CH1区也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0064] 如本文所用,术语“CH2区”或“CH2结构域”是指免疫球蛋白重链的CH2区。因此,例如人IgG1抗体的CH2区对应于根据Kabat(ibid)中所述的Eu编号的氨基酸231-340。然而,CH2区也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0065] 如本文所用,术语“CH3区”或“CH3结构域”是指免疫球蛋白重链的CH3区。因此,例如人IgG1抗体的CH3区对应于根据Kabat(ibid)中所述的Eu编号的氨基酸341-447。然而,CH3区也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0066] 如本文所用,术语“Fc介导的效应子功能”或“Fc效应子功能”可互换使用,并且旨在指多肽或抗体与其细胞膜上的靶标或抗原结合的结果的功能,其中Fc介导的效应子功能可归因于多肽或抗体的Fc区。Fc介导的效应子功能的实例包括(i)C1q结合,(ii)补体激活,(iii)补体依赖性细胞毒性(CDC),(iv)抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),(v)Fc-γ受体(FcγR)结合,(vi)抗体依赖性、FcγR介导的抗原交联,(vii)抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP),(viii)补体依赖性细胞毒性(CDCC),(ix)补体增强的细胞毒性,(x)由抗体介导的调理抗体的补体受体结合,(xi)调理作用,和(xii)(i)至(xi)中任一项的组合。

[0067] 如本文所用,术语“降低的Fc效应子功能”或“降低的Fc介导的效应子功能”可互换使用,并且旨在指当在相同测定中与亲本多肽或抗体的Fc效应子功能直接比较时,所述抗体的Fc效应子功能降低。

[0068] 如本文所用,术语“惰性”、“惰性的”或“非激活”是指至少不能结合任何FcγR、不能诱导FcγR的Fc介导的交联或不能经由单个抗体的两个Fc区诱导靶抗原的FcγR介导的交联或不能结合C1q的Fc区。因此,在本发明的某些实施方案中,Fc区是惰性的。因此,在某

些实施方案中,Fc介导的效应子功能中的一些或全部减弱或完全不存在。

[0069] 如本文所用,术语“寡聚化”旨在指将单体转化为有限聚合度的过程。根据本发明的抗体可以在靶标结合后,例如在细胞表面处,经由Fc区的非共价缔合形成寡聚体,例如六聚体。抗CD27抗体通过Fc:Fc相互作用在细胞表面结合后的寡聚化可以增加CD27聚集,导致CD27细胞内信号传导的激活。包含E345R或E430G突变的抗体在细胞表面结合后形成寡聚体(例如六聚体)的能力可以如de Jong RN et al,PLoS Biol.2016Jan 6;14(1):e1002344中所述进行评估。抗体的Fc-Fc介导的寡聚化是在靶向结合到(细胞)表面后通过邻近抗体之间的Fc区的分子间缔合而发生的,这种寡聚化可以通过引入E345R或E430G突变(根据Eu-索引进行编号)来增强。

[0070] 如本文所用,术语“聚集”是指抗体通过非共价相互作用的寡聚化。

[0071] 如本文所用,术语“Fc-Fc增强”旨在指增加两个含有Fc区的抗体的Fc区之间的结合强度或稳定它们之间的相互作用,使得抗体在细胞表面上形成寡聚体,例如六聚体。这种增强可以通过抗体Fc区中的某些氨基酸突变获得,例如E345R或E430G。在本发明的上下文中,术语“单价抗体”是指可以与抗原上的特定表位相互作用的抗体分子,仅具有一个抗原结合结构域(例如一个Fab臂)。在双特异性抗体的上下文中,“单价抗体结合”是指双特异性抗体与抗原上的一个特异性表位的结合,仅具有一个抗原结合结构域(例如一个Fab臂)。

[0072] 在本发明的上下文中,术语“单特异性抗体”是指仅对一个表位具有结合特异性的抗体。抗体可以是单特异性单价抗体(即仅携带一个抗原结合区)或单特异性二价抗体(即具有两个相同抗原结合区的抗体)。

[0073] 术语“双特异性抗体”是指包含两个不同抗原结合结构域的抗体,例如两个不同Fab臂或两个具有不同CDR区的Fab臂。在本发明的上下文中,双特异性抗体对至少两个不同表位具有特异性。此类表位可以在相同或不同的抗原或靶标上。如果表位在不同抗原上,则此类抗原可以在相同细胞或不同细胞、细胞类型或结构上,例如细胞外基质或囊泡和可溶性蛋白。因此,双特异性抗体可以能够交联多种抗原,例如两种不同的细胞。本发明的特定双特异性抗体能够结合CD27和第二靶标。

[0074] 术语“二价抗体”是指具有两个抗原结合区的抗体,其结合一个或两个靶标或抗原上的表位或结合同一抗原上的一个或两个表位。因此,二价抗体可以是单特异性二价抗体或双特异性二价抗体。

[0075] 术语“氨基酸”和“氨基酸残基”在本文中可以互换使用,并且不应理解为限制性的。氨基酸是含有胺($-NH_2$)和羧基(-COOH)官能团,以及对每个氨基酸特异的侧链(R基团)的有机化合物。在本发明的上下文中,氨基酸可以基于结构和化学特性分类。因此,氨基酸的类别可以反映在下表中的一个或两个中:

[0076] 表20.基于R基团的结构和一般化学特征的主要分类

[0077]

类别	氨基酸
酸性残基	D和E
碱性残基	K、R和H
亲水性不带电残基	S、T、N和Q
脂肪族不带电残基	G、A、V、L和I
非极性不带电残基	C、M和P

芳香族残基	F、Y和W

[0078] 表21.氨基酸残基的可选的物理和功能分类

[0079]

类别	氨基酸
含羟基的残基	S和T
脂肪族残基	I、L、V和M
环烯基相关残基	F、H、W和Y
疏水性残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W和Y
带负电荷的残基	D和E
极性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S和T
带正电荷的残基	H、K和R
小的残基	A、C、D、G、N、P、S、T和V
非常小的残基	A、G和S
参与转角形成的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P和T
柔性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E和R

[0080]

[0081] 一个氨基酸对另一个氨基酸的取代可以分类为保守或非保守取代。在本发明的上下文中,“保守取代”是一个氨基酸被具有相似结构和/或化学特征的另一个氨基酸取代,此类一个氨基酸残基被上面两个表中任一个中定义的相同类别的另一个氨基酸残基取代:例如,亮氨酸可以被异亮氨酸取代,因为它们都是脂肪族、支链疏水的。类似地,天冬氨酸可以被谷氨酸取代,因为它们都是小的带负电荷的残基。

[0082] 在本发明的上下文中,抗体中的取代表示为:

[0083] 原始的氨基酸-位置-取代的氨基酸;

[0084] 参考公认的氨基酸命名法,使用三字母代码或一字母代码,包括代码“Xaa”或“X”以表示任何氨基酸残基。因此,Xaa或X通常可以表示20种天然存在的氨基酸中的任一种。如本文所用,术语“天然存在的”是指以下氨基酸残基中的任一个:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸和半胱氨酸。因此,符号“K409R”或“Lys409Arg”意指抗体在氨基酸位置409中包含赖氨酸到精氨酸的取代。

[0085] 给定位置处的氨基酸至任何其他氨基酸的取代称为:

[0086] 原始的氨基酸-位置;或例如“K409”

[0087] 对于其中原始氨基酸和/或取代的氨基酸可以包含多于一个但不是全部氨基酸的修饰,多于一个氨基酸可以用“、”或“/”分隔。例如,在位置409用精氨酸、丙氨酸或苯丙氨酸取代赖氨酸是:

[0088] “Lys409Arg、Ala、Phe”或“Lys409Arg/Ala/Phe”或“K409R、A、F”或“K409R/A/F”或“K409至R、A或F”。

[0089] 这些名称在本发明的上下文中可以互换使用,但具有相同的含义和目的。

[0090] 此外,术语“取代”包括取代成19个天然氨基酸中的任一个或其他氨基酸,或取代成其他氨基酸如非天然氨基酸。例如,位置409中氨基酸K的取代包括以下取代中的每一个:409A、409C、409D、409E、409F、409G、409H、409I、409L、409M、409N、409Q、409R、409S、409T、409V、409W、409P和409Y。顺便说明,这等同于名称409X,其中X表示除原始氨基酸以外的任何氨基酸。这些取代也可以表示为K409A、K409C等或K409A、C等或K409A/C/等。这同样类比地应用于本文提及的每一个和每个位置,以在本文中具体地包括任何一个这样的取代。

[0091] 根据本发明的抗体还可以包含氨基酸残基的缺失。这种缺失可以表示为“del”,并且包括例如书写为K409del。因此,在此类实施方案中,位置409中的赖氨酸已从氨基酸序列中缺失。

[0092] 如本文所用,术语“宿主细胞”旨在指其中已引入表达载体的细胞。应当理解,此类术语旨在不仅指特定的受试者细胞,而且指此类细胞的后代。因为某些修饰可能由于突变或环境影响而在随后的世代中发生,所以这样的后代实际上可能与亲本细胞不相同,但仍包括在如本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。重组宿主细胞包括,例如,转染瘤,如CHO细胞、HEK-293细胞、Expi293F细胞、PER.C6细胞、NS0细胞和淋巴细胞,以及原核细胞如大肠杆菌和其它真核宿主如植物细胞和真菌。

[0093] 如本文所用,术语“转染瘤”包括表达抗体或靶抗原的重组真核宿主细胞,如CHO细胞、PER.C6细胞、NS0细胞、HEK-293细胞、Expi293F细胞、植物细胞或真菌,包括酵母细胞。

[0094] 出于本发明的目的,使用Needleman-Wunsch算法(Needleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)确定两个氨基酸序列之间的序列同一性,如在EMBOSS软件包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice et al.,2000,Trends Genet.16:276-277)的Needle程序中实施的,优选5.0.0版本或更高版本。使用的参数是:缺口开放罚分为10、缺口延伸罚分为0.5和EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。将标记为“最长同一性”的Needle的输出(使用-nobrief选项获得)用作同一性百分比,并按以下方式计算:

[0095] (相同残基×100)/(比对长度-比对中的缺口总数)。

[0096] 相似残基的保留也可以或替代地通过相似性得分来测量,如通过使用BLAST程序(例如,通过NCBI获得的BLAST 2.2.8,使用标准设置BLOSUM62,开放缺口=11和延伸缺口=1)来确定的。合适的变体通常表现出与亲本序列至少约45%,例如至少约55%、至少约65%、至少约75%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或更高(例如约99%)的相似性。

[0097] 如本文所用,术语“内化的”或“内化”是指其中分子如根据本发明的抗体被细胞膜吞噬并被吸入细胞内部的生物过程。内化也可称为“内吞作用”。

[0098] 如本文所用,术语“效应细胞”是指参与免疫应答的效应期的免疫细胞。示例性免疫细胞包括髓系或淋巴系起源的细胞,例如淋巴细胞(例如B细胞和T细胞,包括溶细胞性T细胞(CTL))、杀伤细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、多形核细胞(例如中性粒细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞)。一些效应细胞表达Fc受体(FcgR)或补体受体并执行特定的免疫功能。在一些实施方案中,效应细胞如例如自然杀伤细胞能够诱导ADCC。例如,表达FcgR的单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞和库普弗(Kupffer)细胞参与靶细胞的特异性杀伤和/或向免疫系统的其他组分呈递抗原,或与呈递抗原的细胞结合。在一些实施方案中,ADCC可以通过抗体驱动的经典补体激活进一步增强,导致激活的C3片段沉积在靶细胞上。C3切割产物是在髓系细胞上表达的补体受体(CR)如CR3的配体。效应细胞上CR对补体片段的识别可以促进增强的Fc受体介导的ADCC。在一些实施方案中,抗体驱动的经典补体激活导致靶细胞上的C3片段。这些C3切割产物可以促进直接补体依赖性细胞毒性(CDCC)。在一些实施方案中,效应细胞可以吞噬靶抗原、靶颗粒或靶细胞,其可以依赖于抗体结合并由效应细胞表达的Fcγ R介导。效应细胞上特定FcR或补体受体的表达可由体液因子如细胞因子调节。例如,已经发现Fcγ RI的表达被干扰素γ(IFNγ)和/或G-CSF上调。这种增强的表达增加了携带Fcγ RI的细胞对靶标的细胞毒性活性。效应细胞可以吞噬靶抗原或吞噬或裂解靶细胞。在一些实施方案中,抗体驱动的经典补体激活导致靶细胞上的C3片段。这些C3切割产物可以促进效应细胞的直接吞噬作用或通过增强抗体介导的吞噬作用间接促进。在其中抗体具有惰性Fc区的本文的某些实施方案中,抗体不诱导Fc介导的效应子功能。

[0099] 如本文所用,“效应T细胞”或“Teff”是指执行免疫应答功能(例如杀伤肿瘤细胞和/或激活抗肿瘤免疫应答)的T淋巴细胞,其可以导致肿瘤细胞从体内清除。Teff表型的实例包括$CD3^+CD4^+$和$CD3^+CD8^+$。Teff可以分泌、含有或表达标志物,例如IFNγ、颗粒酶B和ICOS。应当理解,Teff可能不完全限于这些表型。

[0100] 如本文所用,“记忆T细胞”是指在去除感染后长时间留在体内的T淋巴细胞。记忆T细胞的实例包括中央记忆T细胞(CD45RA-CCR7+)和效应记忆T细胞(CD45RA-CCR7-)。应当理解,记忆T细胞可能不完全限于这些表型。

[0101] 如本文所用,“调节性T细胞”或“Treg”是指通常通过抑制其它T细胞和/或其它免疫细胞的活性来调节它们的活性的T淋巴细胞。Treg表型的实例是$CD3^+CD4^+CD25^+CD127dim$。Treg可以进一步表达Foxp3。应当理解,Treg可能不完全限于这种表型。

[0102] 如本文所用,术语“补体激活”是指经典补体通路的激活,其由称为C1的大的大分子复合物与表面上的抗体-抗原复合物结合而引发。C1是复合物,由6种识别蛋白C1q和丝氨酸蛋白酶的异四聚体C1r2C1s2组成。C1是经典补体级联的早期事件中的第一个蛋白质复合物,其涉及一系列切割反应,该切割反应始于C4切割成C4a和C4b以及C2切割成C2a和C2b。C4b沉积并与C2a一起形成称为C3转化酶的酶促活性转化酶,其将补体成分C3切割成C3b和C3a,其形成C5转化酶。该C5转化酶将C5切割成C5a和C5b,并且最后一种成分沉积在膜上,进而触发补体激活的晚期事件,其中末端补体成分C5b、C6、C7、C8和C9组装成膜攻击复合物(MAC)。补体级联导致细胞膜中孔的产生,这导致细胞裂解,也称为补体依赖性细胞毒性(CDC)。在其中抗体具有惰性Fc区的本文的某些实施方案中,抗体不诱导补体激活。

[0103] 补体激活可以通过使用C1q结合功效、CDC动力学CDC测定(如WO2013/004842、

WO2014/108198中所述)或通过Beurskens et al.,J Immunol April 1,2012vol.188no.7,3532-3541中所述的C3b和C4b的细胞沉积方法来评估。

[0104] 如本文所用,术语“C1q结合”指的是在C1q与结合至其抗原的抗体结合的情况下,C1q的结合。与其抗原结合的抗体应理解为在本文所述的上下文中体内和体外均发生。C1q结合可以例如通过使用固定在人工表面上的抗体或通过使用与细胞或病毒粒子表面上的预定抗原结合的抗体来评估,如本文实施例8中所述。C1q与抗体寡聚体的结合在本文中应理解为导致高亲合力结合的多价相互作用。例如,由在本发明的抗体中引入突变而引起的C1q结合的降低可以通过比较突变抗体的C1q结合与其亲本抗体(在相同测定中没有突变的本发明的抗体)的C1q结合来测量。

[0105] 术语“治疗”是指为了缓解、改善、阻止或根除(治愈)症状或疾病状态的目的而施用有效量的本发明的治疗活性抗体。

[0106] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指以必要的剂量并在必要的时间段内有效实现期望治疗结果的量。抗体的治疗有效量可以根据例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量也是其中抗体变体的任何毒性或有害作用被治疗有益作用超过的量。

[0107] 如本文所用的术语“药代动力学概况”可以如本文实施例12中所述的随时间变化的血浆IgG水平来确定。

[0108] 如本文所用,术语“CD137”是指CD137(4-1BB),也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员9(TNFRSF9),其是配体TNFSF9/4-1BBL的受体。CD137(4-1BB)被认为参与T细胞活化。CD137的其他同义词包括但不限于4-1BB配体受体、CD137、T细胞抗原4-1BB同源物和T细胞抗原ILA。在一个实施方案中,CD137(4-1BB)是人CD137(4-1BB),具有UniProt登录号Q07011。人CD137的序列也显示在SEQ ID NO:130中。SEQ ID NO:130的氨基酸1-23对应于人CD137的信号肽;而SEQ ID NO:130的氨基酸24-186对应于人CD137的细胞外结构域;并且蛋白质的其余部分,即来自SEQ ID NO:130的氨基酸187-213和214-255,分别是跨膜结构域和细胞质结构域。

[0109] “程序性死亡-1(PD-1)”受体是指属于CD28家族的免疫抑制性受体。

[0110] 如本文所用,术语“PD-L1”包括人PD-L1(hPD-L1)、hPD-L1的变体、同工型和物种同源物,例如猕猴(食蟹猴)、非洲象、野猪和小鼠PD-L1(cf.,例如分别为Genbank登录号NP_054862.1、XP_005581836、XP_003413533、XP_005665023和NP_068693),以及与hPD-L1具有至少一个共同表位的类似物。人PD-L1的序列也显示在SEQ ID NO:98(成熟序列)和SEQ ID NO:129中,其中氨基酸1-18被预测为信号肽。如本文所用,术语“PD-L2”包括人PD-L2(hPD-L2)、hPD-L2的变体、同工型和物种同源物以及与hPD-L2具有至少一个共同表位的类似物。PD-1的配体(PD-L1和PD-L2)在抗原呈递细胞(如树突状细胞或巨噬细胞)和其他免疫细胞的表面表达。PD-1与PD-L1或PD-L2的结合导致T细胞活化的下调。表达PD-L1和/或PD-L2的癌细胞能够关闭表达PD-1的T细胞,这导致抗癌免疫应答的抑制。PD-1与其配体之间的相互作用导致肿瘤浸润淋巴细胞的减少、T细胞受体介导的增殖的减少和癌细胞的免疫逃逸。免疫抑制可以通过抑制PD-1与PD-L1的局部相互作用来逆转,并且当PD-1与PD-L2的相互作用也被阻断时,效果是累加的。

[0111] 术语“PD-1”涉及程序性细胞死亡-1,并且包括PD-1的任何变体、构象、同工型和物

种同源物,其由细胞天然表达或由用PD-1基因转染的细胞表达。优选地,“PD-1”涉及人PD-1,特别是涉及具有如序列表的SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列(NCBI参考序列:NP_005009.2)的蛋白质,或优选由如序列表的SEQ ID NO:60所示的核酸序列(NCBI参考序列:NM_005018.2)编码的蛋白质。“PD-1”的替代名称包括CD279和SLEB2。

[0112] 术语“PD-1”包括人PD-1的翻译后修饰的变体、同工型和物种同源物,其由细胞天然表达或在用PD-1基因转染的细胞中/细胞上表达。

[0113] 术语“PD-1变体”应涵盖(i)PD-1剪接变体,(ii)PD-1翻译后修饰的变体,特别包括具有不同N-糖基化状态的变体,(iii)PD-1构象变体。此类变体可以包括PD-1的可溶性形式。

[0114] PD-1是属于免疫球蛋白超家族的I型膜蛋白(The EMBO Journal(1992),vol.11,issue 11,p.3887-3895)。人PD-1蛋白包含含有如序列表的SEQ ID NO:58所示的序列的位置24至170处的氨基酸的胞外结构域、跨膜结构域(如SEQ ID NO:58所示的序列的位置171位至191处的氨基酸)和胞质结构域(如SEQ ID NO:58所示的序列的位置192至288处的氨基酸)。如本文所用,术语“PD-1片段”应涵盖PD-1蛋白的任何片段,优选免疫原性片段。该术语还涵盖,例如,全长蛋白的上述结构域或这些结构域的任何片段,特别是免疫原性片段。人PD-1蛋白的优选胞外结构域的氨基酸序列在序列表的SEQ ID NO:59中列出。

[0115] Fc区可以在其C端具有赖氨酸。该赖氨酸的来源是在人中发现的天然存在的序列,这些Fc区衍生自该序列。在重组抗体的细胞培养生产过程中,该末端赖氨酸可以通过内源性羧肽酶的蛋白水解而被切割掉,从而产生具有相同序列但缺乏C端赖氨酸的恒定区。出于制备抗体的目的,编码该末端赖氨酸的DNA可以从序列中省略,使得在没有赖氨酸的情况下产生抗体。由编码或不编码末端赖氨酸的核酸序列产生的抗体在序列和功能上基本上相同,因为当例如使用在基于CHO的生产系统中产生的抗体时,末端赖氨酸的加工程度通常很高(Dick,L.W.et al.Biotechnol.Bioeng.2008;100:1132-1143)。因此,应当理解,根据本发明的蛋白质,例如抗体,可以在编码或不编码或具有末端赖氨酸的情况下生成。根据本发明还应理解,具有末端赖氨酸的序列,例如具有末端赖氨酸的恒定区序列,可以理解为不具有末端赖氨酸的相应序列,并且不具有末端赖氨酸的序列也可以理解为具有末端赖氨酸的相应序列。

[0116] 本公开的方面和实施方案

[0117] 在第一方面,本公开提供了用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用i)结合剂,其包含至少一个结合CD27的结合区;和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0118] 与CD27结合的结合剂

[0119] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含至少一个能够结合人CD27的抗原结合区,其中所述结合剂包含分别包含如SEQ ID NO:5、6和7所示序列的重链可变(VH)区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别包含如SEQ ID NO:9、10和11所示序列的轻链可变(VL)区CDR1、CDR2和CDR3。

[0120] 在本发明的进一步的实施方案中,结合剂包含两个所述抗原结合区,该抗原结合区包含分别包含如SEQ ID NO:5、6和7所示的序列的VH区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别包含如SEQ ID NO:9、10和11所示的序列的VL区CDR1、CDR2和CDR3。本文提供了能够结合人CD27

并且进一步结合包含A59T突变的人CD27变体的抗CD27抗体。

[0121] 在本发明的一个实施方案中,结合剂结合例如T细胞上的CD27,并且在与其靶标结合时具有激动性。本文提供了刺激T细胞激活和增殖的结合剂。结合剂可以进一步刺激T细胞的记忆形成和存活。这种结合剂可用于例如治疗癌症。结合剂进一步能够结合食蟹猴CD27,这对于结合剂的毒理学研究是有用的。

[0122] 在一个实施方案中,结合剂是分离的抗体。

[0123] 在一个实施方案中,结合剂是抗体。在另一个实施方案中,结合剂是人抗体。在另一个实施方案中,结合剂是人源化抗体。在另一个实施方案中,结合剂是嵌合抗体。

[0124] 在优选的实施方案中,结合剂是全长抗体。因此,本发明的结合剂可进一步包含轻链恒定区(CL)和重链恒定区(CH)。CH优选包含CH1区、铰链区、CH2区和CH3区。

[0125] 本领域公知的是,可以在抗体的VH和VL中进行突变以例如增加抗体对其靶抗原的亲和力、降低其潜在免疫原性和/或增加由宿主细胞表达的抗体的产量。因此,在一些实施方案中,还考虑了包含根据本发明的结合剂的CDR、VH和/或VL序列的变体的结合剂,特别是分别如SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8所示的VH和/或VL区的功能变体。与亲本VH和/或VL序列相比,功能变体可以在一个或多个氨基酸上不同,例如在一个或多个CDR上不同,但仍允许抗原结合区至少保留亲本抗体的大部分(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)或甚至全部亲和力和/或特异性。通常,此类功能变体保留与亲本序列的显著序列同一性。示例性变体包括其与各自的亲本VH或VL区相差12个或更少,例如11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个突变,例如氨基酸残基的取代、插入或缺失的那些变体。示例性变体包括主要通过保守氨基酸取代与亲本序列的VH和/或VL和/或CDR区不同的那些变体;例如,变体中的12个,如11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代可以是保守的。在本发明的进一步的实施方案中,结合剂可分别在VH CDR区和/或VL CDR区中包含至多1、2或3个突变。这样的突变可以是取代。优选的是,这样的取代不会显著改变本发明结合剂的结合亲和力和/或结合特异性。因此,本发明涵盖本发明结合剂的变体,该变体具有与包含如SEQ ID NO:5、6和7所示的VH区CDR序列和如SEQ ID NO:9、10和11所示的VL区CDR序列的结合剂相同的功能特征。

[0126] 在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:4所示的VH区至少80%相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:4所示的VH区至少85%相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:4所示的VH区至少90%相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:4所示的VH区至少95%相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:4所示的VH区至少96%相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:4所示的VH区至少97%相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:4所示的VH区至少98%相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:4所示的VH区至少99%相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含如SEQ ID NO:4所示的序列。

[0127] 在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:8所示的VH区至少80%相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包

含与如SEQ ID NO:8所示的VH区至少85％相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:8所示的VH区至少90％相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:8所示的VH区至少95％相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:8所示的VH区至少96％相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:8所示的VH区至少97％相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:8所示的VH区至少98％相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含与如SEQ ID NO:8所示的VH区至少99％相同的序列。在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含VH区,该VH区包含如SEQ ID NO:8所示的序列。

[0128] 在本发明的另一个实施方案中,结合剂包含分别包含如SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8所示的序列的VH和VL区。

[0129] 在根据本发明的方法中使用的结合剂可以包含轻链恒定区,其是人κ轻链。在另一个实施方案中,其可以包含人λ轻链恒定区。

[0130] 结合剂可以优选进一步包含重链恒定区,其为人IgG同种型。它可以任选地包含修饰的人IgG恒定区。此类人IgG包含Fc区,其包含CH2和CH3区。通过修饰Fc区中的IgG恒定区,例如可以调节抗体的Fc效应子功能或增加Fc-Fc相互作用,从而增加抗体形成簇如六聚体的倾向。在本发明的一个实施方案中,人IgG或修饰的人IgG选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一个实施方案中,它是IgG1。在另一个实施方案中,它是IgG2。在又一个实施方案中,它是IgG3。在进一步的实施方案中,它是IgG4。在一个具体实施方案中,IgG是在Fc区中包含一个或多个氨基酸取代的修饰的人IgG。在一个实施方案中,其可以是在Fc区中包含一个或多个氨基酸取代的人IgG1。在本发明的进一步的实施方案中,IgG1在Fc区中包含两个或更多个氨基酸取代。在一个实施方案中,IgG1 Fc区具有两个氨基酸取代。

[0131] 在本发明的进一步的实施方案中,修饰的人IgG重链恒定区在Fc区中包含至多10个氨基酸取代。在另一个实施方案中,其包含至多9个氨基酸取代。在另一个实施方案中,其包含至多8个氨基酸取代。在另一个实施方案中,其包含至多7个氨基酸取代。在另一个实施方案中,其包含至多6个氨基酸取代。在另一个实施方案中,其包含至多5个氨基酸取代。在另一个实施方案中,其包含至多4个氨基酸取代。在另一个实施方案中,其包含至多3个氨基酸取代。在另一个实施方案中,其在Fc区中包含至多2个氨基酸取代。

[0132] 在对应于人IgG1重链中E430、E345和S440的位置处的氨基酸残基中的突变,其中氨基酸残基根据EU索引进行编号,可以改善抗体诱导CDC的能力。不受理论束缚,认为通过在这些位置取代一个或多个氨基酸,可以刺激抗体的寡聚化,从而调节Fc介导的效应子功能,以便例如增加C1q结合、补体激活、CDC、ADCP、内化或可提供体内功效的其他相关功能。

[0133] 在本发明的进一步的实施方案中,结合剂是包含抗原结合区和变体Fc区的变体抗体。

[0134] 在某些实施方案中,结合人CD27的抗体变体包含:

[0135] (a)重链,其包含VH区和含有E430、E345和S440中的一个或多个中的突变的人IgG1 CH区,VH区包含含有如SEQ ID NO:5所示的序列的VH CDR1,含有如SEQ ID NO:6所示的序列的VH CDR2,含有如SEQ ID NO:7所示的序列的VH CDR3,氨基酸残基根据EU索引进行编号;

[0136] (b)轻链,其包含VL区,该VL区包含含有如SEQ ID NO:9所示的序列的VL CDR1、含有如SEQ ID NO:10所示的序列的VL CDR2和含有如SEQ ID NO:11所示的序列的VL CDR3。

[0137] 在其它某些实施方案中,结合人CD27的抗体变体包含:

[0138] (a)重链,其包含含有SEQ ID NO:4的VH区和含有E430、E345和S440中的一个或多个中的突变的人IgG1 CH区,氨基酸残基根据EU索引进行编号,和

[0139] (b)轻链,其包含含有SEQ ID NO:8的VL区。

[0140] 结合人CD27的本发明的变体抗体包含变体Fc区或变体人IgG1 CH区,其在P329、E430和E345中的一个或多个中包含突变。在下文中,对Fc区中的突变的提及可以相似地应用于人IgG1 CH区中的突变,反之亦然。

[0141] 如本文所述,当根据Eu索引进行编号时,Fc区中待突变的氨基酸的位置可以相对于(即“对应于”)其在天然存在的(野生型)人IgG1重链中的位置给出。因此,如果亲本Fc区已经含有一个或多个突变和/或如果亲本Fc区是例如IgG2、IgG3或IgG4 Fc区,则对应于根据Eu索引编号的氨基酸残基(例如E430)的氨基酸在人IgG1重链中的位置可以通过比对来确定。具体地,将亲本Fc区与野生型人IgG1重链序列比对,以鉴定对应于人IgG1重链序列中E430的位置的残基。任何野生型人IgG1恒定区氨基酸序列可以用于此目的,包括表3中列出的任何一种不同的人IgG1同种异型。

[0142] 在本发明的一个实施方案中,与相同抗体但包含相同同种型的野生型IgG Fc区例如IgG1相比,IgG Fc区中的修饰诱导增加的CD27激动作用。这可以例如通过在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E345和/或E430的氨基酸位置处引入除E之外的氨基酸来获得。在本发明的一个实施方案中,在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E345的位置处的氨基酸残基选自下组:A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、P、R、S、T、V、W和Y。在本发明的另一个实施方案中,在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E430的位置处的氨基酸残基选自下组:A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、P、R、S、T、V、W。

[0143] 在优选的实施方案中,在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E345的位置处的氨基酸残基是R。因此,本发明的结合剂可以在Fc区中包含E345R取代。在本发明的另一个实施方案中,在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E430的位置处的氨基酸残基是G。因此,本发明的结合剂可以在Fc区中包含E430G取代。在另一个实施方案中,结合剂包含选自下组的氨基酸取代:E430G、E345K、E430S、E430F、E430T、E345Q、E345R、E345Y。

[0144] 因此,提供一种抗体或多种抗体形式的结合剂,其具有增强的Fc-Fc相互作用,该相互作用可在抗体结合时导致CD27在细胞表面上的抗体依赖性聚集,从而增加本发明结合剂的激动作用。

[0145] 在根据本发明使用的结合剂的另一个实施方案中,在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置P329的位置处的氨基酸残基被选自下组的氨基酸取代:A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W和Y。因此,根据本发明使用的结合剂可以进一步在位置329中包含突变。

[0146] 在本发明的进一步的实施方案中,结合剂在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置P329的位置处具有氨基酸残基R。因此,本发明的结合剂可以在Fc区中具有P329R取代。不受理论束缚,认为在Fc区中包含E345R突变的结合剂(如例如SEQ ID NO:13所示)具有增加的血清清除率。本发明人发现,在位置329处进一步引入突变,例如P329R(如例如SEQ ID NO:15所示),将结合剂的清除率恢复到包含例如SEQ ID NO:12所示的wt IgG1的结合剂的

水平。

[0147] 在另一个优选的实施方案中,在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置P329和E345的位置处的氨基酸残基都是R。由此提供了结合剂,当与包含相同VH和VL区并且包含相同IgG1重链恒定区(除了在位置329处包含野生型氨基酸P和在位置345处包含野生型氨基酸E)的结合剂相比时,该结合剂具有增加的CD27受体激动作用和相当的药代动力学特性,如例如血清清除率。

[0148] 因此,在实施方案中,当与包含相同VH和VL区但包含野生型IgG1重链恒定区(如例如SEQ ID NO:12所示)的结合剂的药代动力学特性相比时,结合剂在与CD27结合时具有增加的受体激动作用,并且进一步具有相当的药代动力学特性,例如相似或甚至相同的药代动力学特性。换句话说,结合剂可以具有与相同结合剂(除了包含野生型IgG1重链恒定区)的药代动力学特性没有显著不同的药代动力学特性。

[0149] 在本发明的其他实施方案中,结合剂包含根据前述部分中任一项的变体Fc区,该变体Fc区是选自下组的人IgG Fc区的变体:人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4 Fc区。也就是说,对应于E430和E345和P329的一个或多个氨基酸残基中的突变是在选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4 Fc区组成的组的人IgG Fc区的亲本Fc区中产生的。优选地,亲本Fc区是天然存在的(野生型)人IgG Fc区,例如人野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区,或其混合同种型。因此,除了所述突变(在选自E430和E345和P329的一个或多个氨基酸残基中)之外,变体Fc区可以是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型,或其混合同种型。

[0150] 在一个实施方案中,亲本Fc区和/或人IgG1 CH区是野生型人IgG1同种型。

[0151] 因此,除了所述突变(在E430或E345或P329中)之外,变体Fc区可以是人IgG1 Fc区。

[0152] 在具体的实施方案中,亲本Fc区和/或人IgG1 CH区是人野生型IgG1m(f)同种型。

[0153] 在具体的实施方案中,亲本Fc区和/或人IgG1 CH区是人野生型IgG1m(z)同种型。

[0154] 在具体的实施方案中,亲本Fc区和/或人IgG1 CH区是人野生型IgG1m(a)同种型。

[0155] 在具体的实施方案中,亲本Fc区和/或人IgG1 CH区是人野生型IgG1m(x)同种型。

[0156] 在具体的实施方案中,亲本Fc区和/或人IgG1 CH区是混合同种型的人野生型IgG1,例如,IgG1m(za)、IgG1m(zax)、IgG1m(fa)等。

[0157] 因此,除了所述突变(在E430或E345或P329中)之外,变体Fc区和/或人IgG1 CH区可以是人IgG1m(f)、IgG1m(a)、IgG1m(x)、IgG1m(z)同种异型或其任何两种或更多种的混合同种异型。

[0158] 在具体的实施方案中,亲本Fc区和/或人IgG1 CH区是人野生型IgG1m(za)同种型。

[0159] 在具体的实施方案中,亲本Fc区是人野生型IgG2同种型。

[0160] 在具体的实施方案中,亲本Fc区是人野生型IgG3同种型。

[0161] 在具体的实施方案中,亲本Fc区是人野生型IgG4同种型。

[0162] 野生型人IgG同种型和IgG1同种异型的具体实例的CH区氨基酸序列在表3中列出。

[0163] 在另一个实施方案中,结合剂包含重链恒定区,该重链恒定区包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID No:12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、27、28、29、30、31、32、33、34和36。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:

14的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一个实施方案中,重链恒定区具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

[0164] 在实施方案中,结合剂包含:

[0165] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0166] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0167] c.CH区,其包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列和

[0168] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0169] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0170] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0171] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0172] c.CH区,其包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列和

[0173] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0174] 在另一个实施方案中,第一结合包含:

[0175] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0176] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0177] c.CH区,其包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列和

[0178] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0179] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0180] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0181] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0182] c.CH区,其包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列和

[0183] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0184] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0185] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0186] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0187] c.CH区,其包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列和

[0188] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0189] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0190] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0191] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0192] c.CH区,其包含SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列和

[0193] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0194] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0195] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0196] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0197] c.CH区,其包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列和

[0198] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0199] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0200] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0201] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0202] c.CH区,其包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列和

[0203] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0204] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0205] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0206] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0207] c.CH区,其包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列和

[0208] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0209] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0210] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0211] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0212] c.CH区,其包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列和

[0213] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0214] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0215] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0216] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0217] c.CH区,其包含SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列和

[0218] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0219] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0220] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0221] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0222] c.CH区,其包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列和

[0223] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0224] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0225] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0226] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0227] c.CH区,其包含SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列和

[0228] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0229] 在另一个实施方案中,根据本发明的结合剂包含:

[0230] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0231] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0232] c.CH区,其包含SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列和

[0233] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0234] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0235] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0236] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0237] c.CH区,其包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列和

[0238] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0239] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0240] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0241] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0242] c.CH区,其包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列和

[0243] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0244] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0245] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0246] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0247] c.CH区,其包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列和

[0248] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0249] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0250] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0251] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0252] c.CH区,其包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列和

[0253] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0254] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0255] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0256] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0257] c.CH区,其包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列和

[0258] d.CL区,其包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0259] 在替代的实施方案中,CL区可以是SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。

[0260] 在实施方案中,结合剂包含:

[0261] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0262] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0263] g.CH区,其包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列和

[0264] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0265] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0266] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0267] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0268] g.CH区,其包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列和

[0269] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0270] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0271] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0272] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0273] g.CH区,其包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列和

[0274] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0275] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0276] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0277] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0278] g.CH区,其包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列和

[0279] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0280] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0281] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0282] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0283] g.CH区,其包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列和

[0284] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0285] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0286] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0287] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0288] g.CH区,其包含SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列和

[0289] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0290] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0291] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0292] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0293] g.CH区,其包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列和

[0294] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0295] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0296] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0297] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0298] g.CH区,其包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列和

[0299] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0300] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0301] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0302] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0303] g.CH区,其包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列和

[0304] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0305] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0306] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0307] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0308] g.CH区,其包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列和

[0309] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0310] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0311] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0312] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0313] g.CH区,其包含SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列和

[0314] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0315] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0316] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0317] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0318] g.CH区,其包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列和

[0319] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0320] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0321] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0322] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0323] g.CH区,其包含SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列和

[0324] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0325] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0326] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0327] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0328] g.CH区,其包含SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列和

[0329] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0330] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0331] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0332] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0333] g.CH区,其包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列和

[0334] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0335] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0336] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0337] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0338] g.CH区,其包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列和

[0339] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0340] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0341] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0342] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0343] g.CH区,其包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列和

[0344] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0345] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0346] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0347] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0348] g.CH区,其包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列和

[0349] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0350] 在另一个实施方案中,结合剂包含:

[0351] e.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列

[0352] f.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列

[0353] g.CH区,其包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列和

[0354] h.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0355] 在另一个实施方案中,结合剂包含重链和轻链,重链包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,轻链包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。

[0356] 在另一个实施方案中,结合剂包含重链和轻链,重链包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,轻链包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。

[0357] 在又一个实施方案中,结合剂包含经修饰的重链恒定区,使得该结合剂相对于除修饰之外的相同结合剂以较小的程度诱导Fc介导的效应子功能。本文的实例是包含P329R和E345R取代的本发明的CD27结合抗体。与包含相同序列但不包含P329R取代的抗体相比,并且还与包含相同序列但不包含P329R和E345R取代(例如野生型IgG1重链)的相同抗体相比,此类抗体以较小的程度诱导一种或多种Fc介导的效应子功能。在一个实施方案中,Fc介导的效应子功能降低至少20%。在另一个实施方案中,Fc介导的效应子功能降低至少30%。在另一个实施方案中,Fc介导的效应子功能降低至少40%。在另一个实施方案中,Fc介导的效应子功能降低至少50%。在另一个实施方案中,Fc介导的效应子功能降低至少60%。在另一个实施方案中,Fc介导的效应子功能降低至少70%。在另一个实施方案中,Fc介导的效应子功能降低至少80%。在另一个实施方案中,Fc介导的效应子功能降低至少90%。在另一个实施方案中,结合剂不诱导一种或多种Fc介导的效应子功能。减少或完全不诱导的一种或多种Fc效应子功能可以选自下组:补体依赖性细胞毒性(CDC)、补体依赖性细胞介导的细胞毒性(CDCC)、补体激活、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)、C1q结合和Fc γ R结合。因此,在一个实施方案中,结合剂以相对于相同但具有野生型IgG1 HC恒定区的结合剂降低至少20%,例如至少30%,或至少40%,或至少50%,或至少60%,或至少70%,或至少80%,或降低至少90%的程度诱导CDC。在另一个实施方案中,结合剂不诱导CDC。

[0358] 在另一个实施方案中,结合剂以相对于相同但具有野生型IgG1 HC恒定区的结合剂降低至少20%,例如至少30%,或至少40%,或至少50%,或至少60%,或至少70%,或至少80%,或降低至少90%的程度诱导CDCC。在另一个实施方案中,结合剂不诱导CDCC。

[0359] 在另一个实施方案中,结合剂以相对于相同但具有野生型IgG1 HC恒定区的结合剂降低至少20%,例如至少30%,或至少40%,或至少50%,或至少60%,或至少70%,或至少80%,或降低至少90%的程度诱导ADCC。在另一个实施方案中,结合剂不诱导ADCC。

[0360] 在另一个实施方案中,结合剂以相对于相同但具有野生型IgG1 HC恒定区的结合剂降低至少20%,例如至少30%,或至少40%,或至少50%,或至少60%,或至少70%,或至少80%,或降低至少90%的程度诱导ADCP。在另一个实施方案中,结合剂不诱导ADCP。

[0361] 在另一个实施方案中,结合剂以相对于相同但具有野生型IgG1 HC恒定区的结合

剂降低至少20％,例如至少30％,或至少40％,或至少50％,或至少60％,或至少70％,或至少80％,或降低至少90％的程度诱导C1q结合。在另一个实施方案中,结合剂不诱导C1q结合。优选地,C1q结合如实施例8中进行确定。

[0362] 在另一个实施方案中,结合剂以相对于相同但具有野生型IgG1 HC恒定区的结合剂降低至少20％,例如至少30％,或至少40％,或至少50％,或至少60％,或至少70％,或至少80％,或降低至少90％的程度诱导Fcγ R结合。在另一个实施方案中,结合剂不诱导Fcγ R结合。优选地,Fcγ R结合如实施例9中进行确定。

[0363] 在一个实施方案中,与包含相同氨基酸序列但不包含P329R取代的结合剂相比,结合剂具有降低的C1q结合和降低的Fcγ R结合。

[0364] 在一个实施方案中,除了所列举的突变之外,本文任何方面或实施方案中使用的结合剂是人抗体。

[0365] 在本发明的实施方案中,结合剂是单价抗体。

[0366] 在另一个实施方案中,结合剂是二价抗体。

[0367] 此外,本发明的结合剂可以是单特异性抗体。

[0368] 在一个实施方案中,本文任何方面或实施方案中使用的结合剂是单克隆抗体,例如人单克隆抗体,例如人二价单克隆抗体,例如人二价全长单克隆抗体。

[0369] 在优选的实施方案中,除了Fc区中任选列举的突变之外,本文任何方面或实施方案中使用的结合剂是IgG1抗体,例如全长IgG1抗体,例如人全长IgG1抗体,任选地人单克隆全长二价IgG1,κ抗体,例如人单克隆全长二价IgG1m(f),κ抗体。

[0370] 与本发明相关的使用的结合剂有利地以二价单特异性形式存在,其包含两个与相同表位结合的抗原结合区。然而,也考虑了其中一个抗原结合区结合不同表位的双特异性形式。因此,除非与上下文相矛盾,根据本文任何方面或实施方案使用的结合剂可以是单特异性抗体或双特异性抗体。

[0371] 因此,在另一个实施方案中,结合剂是双特异性抗体,其包含能够结合如本文所述的人CD27的第一抗原结合区,并且包含能够结合人CD27上的不同表位的第二抗原结合区。在另一个实施方案中,结合剂是双特异性抗体,其包含能够结合如本文所述的人CD27的第一抗原结合区,并且包含能够结合不同靶标的第二抗原结合区。此类靶标可以在不同的细胞上或在与CD27相同的细胞上。

[0372] 在本发明的实施方案中,结合剂能够结合具有如SEQ ID NO:1所示的序列的人CD27。然而,人CD27可以在一些个体中表达为其变体。因此,在另一个实施方案中,结合剂能够进一步结合人CD27变体,例如如SEQ ID NO:2所示的人CD27变体。在另一个实施方案中,结合剂如果能够进一步结合食蟹猴CD27,例如如SEQ ID NO:3所示。

[0373] 在本发明的进一步的实施方案中,结合剂能够结合表达CD27的人T细胞。

[0374] 在本发明的另一个实施方案中,结合剂能够结合表达CD27的食蟹猴T细胞。

[0375] 在本发明的一个实施方案中,全长IgG1抗体已经将HC的C端赖氨酸切割掉。此类抗体也被认为是“全长抗体”。

[0376] 在本发明的另一个实施方案中,结合剂能够诱导人T细胞如$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞,例如T辅助细胞和细胞毒性T细胞的增殖。此类活性可如本文实施例6或7中所述进行测定。

[0377] 在本发明的另一个实施方案中,结合剂能够诱导表达人CD27的Jurkat报告T细胞

的激活,例如本文实施例2中所述。

[0378] 在本发明的另一个实施方案中,在没有Fc γ受体IIb交联的情况下,结合剂能够诱导表达人CD27的Jurkat报告T细胞的激活,例如本文实施例11中所述。

[0379] 在本发明的另一个实施方案中,结合剂能够诱导具有中央记忆T细胞表型的$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞的增殖。

[0380] 在本发明的另一个实施方案中,结合剂能够诱导IFN γ产生。

[0381] 在本发明的另一个实施方案中,结合剂在包含乙酸盐、山梨醇、聚山梨醇酯80,并且具有5至6的pH,优选5.5的pH的组合物或制剂中。

[0382] PD1/PD-L1抑制剂

[0383] 在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂阻止与PD-1相关的抑制性信号。在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是破坏或抑制与PD-1相关的抑制性信号传导的抗体或其片段。在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是破坏或抑制抑制性信号传导的小分子抑制剂。在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是破坏或抑制抑制性信号传导的基于肽的抑制剂。在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是破坏或抑制抑制性信号传导的抑制性核酸分子。

[0384] 如本文所述的抑制或阻断PD-1信号传导导致预防或逆转免疫抑制并建立或增强针对癌细胞的T细胞免疫。在一个实施方案中,如本文所述的PD-1信号传导的抑制减少或抑制免疫系统的功能障碍。在一个实施方案中,如本文所述的PD-1信号传导的抑制使得功能障碍的免疫细胞功能障碍较少。在一个实施方案中,如本文所述的PD-1信号传导的抑制使得功能障碍的T细胞功能障碍较少。

[0385] 在一个实施方案中,PD-L1是人PD-L1,特别是包含SEQ ID NO:98所示的序列的人PD-L1。

[0386] 在一个实施方案中,PD1是人PD1。优选地,PD1具有或包含如SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列,或者PD1的氨基酸序列与如SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的同一性,或者是其免疫原性片段。

[0387] 在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂阻止PD-1和PD-L1之间的相互作用。

[0388] PD1/PD-L1抑制剂可以是抗体、其抗原结合片段或其包含具有期望的特异性的抗原结合片段的抗体部分的构建体。抗体或其抗原结合片段如本文所述。作为PD1/PD-L1抑制剂的抗体或其抗原结合片段特别包括结合PD-1的抗体或其抗原结合片段,以及结合PD-L1的抗体或其抗原结合片段。如本文所述,抗体或抗原结合片段也可以与其他部分缀合。特别地,抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的或人抗体。

[0389] 在一个实施方案中,作为PD1/PD-L1抑制剂的抗体是分离的抗体。

[0390] 在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是阻止PD-1和PD-L1之间相互作用的抗体、片段或其构建体。

[0391] PD1/PD-L1抑制剂可以是抑制性核酸分子,例如寡核苷酸、siRNA、shRNA、反义DNA或RNA分子和适体(例如,DNA或RNA适体),特别是反义寡核苷酸。在一个实施方案中,作为siRNA的PD1/PD-L1抑制剂干扰mRNA,因此阻断翻译,例如PD-1蛋白的翻译。

[0392] 在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是破坏或抑制PD-1受体与其配体PD-L1和/或PD-L2中的一种或多种之间的相互作用的抗体、其抗原结合部分或其构建体。结合PD-1或

PD-L1并破坏或抑制PD-1与其一种或多种配体之间的相互作用的抗体是本领域已知的。在某些实施方案中,抗体、其抗原结合部分或其构建体特异性结合PD-1。在某些实施方案中,抗体、其抗原结合部分或其构建体特异性结合PD-L1。

[0393] 在某些优选的实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是结合PD-1的抗体,例如PD-1阻断抗体。在某些优选的实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是结合PD-L1的抗体,例如PD-L1阻断抗体。

[0394] 示例性PD1/PD-L1抑制剂包括但不限于抗PD-1抗体,例如BGB-A317(BeiGene;参见US 8,735,553、WO 2015/35606和US2015/0079109)、兰布利珠单抗(例如,在WO2008/156712中公开为hPD109A及其人源化衍生物h409A1、h409A16和h409A17)、AB137132(Abcam)、EH12.2H7和RMP1-14(#BE0146;BioXcell Lifesciences Pvt.LTD.)、MIH4(Affymetrix eBioscience)、纳武单抗(OPDIVO,BMS-936558;Bristol Myers Squibb;参见美国专利号8,008,449;WO 2013/173223;WO 2006/121168)、派姆单抗(KEYTRUDA;MK-3475;Merck;参见WO 2008/156712)、匹迪利珠单抗(pidilizumab)(CT-011;CureTech;参见Hardy et al.,1994,Cancer Res.,54(22):5793-6和WO 2009/101611)、PDR001(Novartis;参见WO 2015/112900)、MEDI0680(AMP-514;AstraZeneca;参见WO 2012/145493)、TSR-042(参见WO 2014/179664)、西米普利单抗(cemiplimab)(REGN-2810;Regeneron;H4H7798N;cf.US2015/0203579和WO 2015/112800)、JS001(TAIZHOU JUNSHIPHARMA;参见Si-Yang Liu et al.,2007,J.Hematol.Oncol.70:136)、AMP-224(GSK-2661380;cf.Li et al.,2016,Int J Mol Sci 17(7):1151和WO 2010/027827和WO 2011/066342)、PF-06801591(Pfizer)、替雷利珠单抗(tislelizumab)(BGB-A317;BeiGene;参见WO 2015/35606,美国专利号9,834,606和US2015/0079109)、BI 754091、SHR-1210(参见WO2015/085847)和WO 2006/121168中描述的抗体17D8、2D3、4H1、4A11、7D3和5F4,INCSHR1210(江苏恒瑞医药;也称为SHR-1210;参见WO 2015/085847)、TSR-042(Tesaro Biopharmaceutical;也称为ANB011;参见WO2014/179664)、GLS-010(Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals;也称为WBP3055;参见Si-Yang et al.,2017,J.Hematol.Oncol.70:136)、STI-1110(Sorrento Therapeutics;参见WO 2014/194302)、AGEN2034(Agenus;参见WO 2017/040790)、MGA012(Macrogenics;参见WO 2017/19846)、IBI308(Innovent;参见WO 2017/024465、WO 2017/025016、WO 2017/132825和WO 2017/133540)、cetrelimab(JNJ-63723283;JNJ-3283;参见Calvo et al.,J.Clin.Oncol.36,no.5_suppl(2018)58)、genolimzumab(CBT-501;参见Patel et al.,J.ImmunoTher.Cancer,2017,5(Suppl 2):P242)、sasanlimab(PF-06801591;参见Youssef et al.,Proc.Am.Assoc.Cancer Res.Ann.Meeting2017;Cancer Res 2017;77(13Suppl):Abstract)、特瑞普利单抗(toripalimab)(JS-001;参见US2016/0272708)、卡瑞利珠单抗(camrelizumab)(SHR-1210;INCSHR-1210;参见US2016/376367;Huang et al.,Clin.Cancer Res.2018;24(6):1296-1304)、spartalizumab(PDR001;参见WO 2017/106656;Naing et al.,J.Clin.Oncol.34,no.15_suppl(2016)3060-3060)、BCD-100(JSC BIOCAD,Russia;参见WO 2018/103017)、巴替利单抗(balstilimab)(AGEN2034;参见WO 2017/040790)、信迪利单抗(sintilimab)(IBI-308;参见WO 2017/024465和WO 2017/133540)、埃本利单抗(ezabenlimab)(BI-754091;参见US 2017/334995;Johnson et al.,J.Clin.Oncol.36,no.5_suppl(2018)212-212)、赛帕利单抗(zimberelimab)(GLS-010;参见WO 2017/025051)、LZM-009(参见US2017/210806)、AK-103(参见WO 2017/071625、WO

2017/166804和WO 2018/036472)、瑞弗利单抗(retifanlimab)(MGA-012;参见WO 2017/019846)、Sym-021(参见WO 2017/055547)、CS1003(参见CN107840887)、抗PD-1抗体,如例如在以下中描述的:US 7,488,802、US 8,008,449、US 8,168,757、WO 03/042402、WO 2010/089411(进一步公开抗PD-L1抗体)、WO 2010/036959、WO 2011/159877(进一步公开针对TIM-3的抗体)、WO 2011/082400、WO 2011/161699、WO 2009/014708、WO 03/099196、WO 2009/114335、WO 2012/145493(进一步公开针对PD-L1的抗体)、WO 2015/035606、WO 2014/055648(进一步公开抗KIR抗体)、US2018/0185482(进一步公开抗PD-L1和抗TIGIT抗体)、US 8,008,449、US 8,779,105、US 6,808,710、US 8,168,757、US2016/0272708和US 8,354,509,如例如Shaabani et al.,2018,Expert Op Ther Pat.,28(9):665-678和Sasikumar and Ramachandra,2018,BioDrugs,32(5):481-497中公开的PD-1信号通路的小分子拮抗剂,如例如WO 2019/000146和WO 2018/103501中公开的针对PD-1的siRNA,如WO 2018/222711中公开的可溶性PD-1蛋白和如例如WO 2018/022831中公开的包含可溶形式的PD-1的溶瘤病毒。

[0395] 在某些实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是纳武单抗(OPDIVO;BMS-936558)或其生物仿制药、派姆单抗(KEYTRUDA;MK-3475)或其生物仿制药、匹迪利珠单抗(CT-011)、PDR001、MEDI0680(AMP-514)或其生物仿制药、TSR-042、REGN2810、JS001、AMP-224(GSK-2661380)、PF-06801591、BGB-A317、BI 754091或SHR-1210。

[0396] 在某些实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是抗PD1或抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其包含本文所述的抗PD1或抗PD-L1抗体或抗原结合片段之一的互补决定区(CDR),例如选自下组的一种抗PD1或抗PD-L1抗体或抗原结合片段的CDR:纳武单抗、Amp-514、替雷利珠单抗、西米普利单抗、TSR-042、JNJ-63723283、CBT-501、PF-06801591、JS-001、卡瑞利珠单抗、PDR001、BCD-100、AGEN2034、IBI-308、BI-754091、GLS-010、LZM-009、AK-103、MGA-012、Sym-021和CS1003。

[0397] 在某些实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是抗PD1或抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其包含上述抗PD1或抗PD-L1抗体或抗原结合片段之一的重链可变区和轻链可变区,例如选自下组的一种抗PD1或抗PD-L1抗体或抗原结合片段的重链可变区和轻链可变区:纳武单抗、Amp-514、替雷利珠单抗、西米普利单抗、TSR-042、JNJ-63723283、CBT-501、PF-06801591、JS-001、卡瑞利珠单抗、PDR001、BCD-100、AGEN2034、IBI-308、BI-754091、GLS-010、LZM-009、AK-103、MGA-012、Sym-021和CS1003。

[0398] 在某些实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是选自下组的抗PD-1或抗PD-L1抗体或其抗原结合片段:纳武单抗、Amp-514、替雷利珠单抗、西米普利单抗、TSR-042、JNJ-63723283、CBT-501、PF-06801591、JS-001、卡瑞利珠单抗、PDR001、BCD-100、AGEN2034、IBI-308、BI-754091、GLS-010、LZM-009、AK-103、MGA-012、Sym-021和CS1003。

[0399] 在某些优选的实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是结合PD-L1或PD-L1的抗体。在一些优选的实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是抗体,其是PD1/PD-L1相互作用的拮抗剂。在某些优选的实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是PD1阻断抗体或PD-L1阻断抗体。

[0400] 在某些实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的同种型的抗体,例如IgG1同种型的抗体。在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是IgG1同种型的抗体。在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是IgG2同种型的抗体。在一个实施方案

中,PD1/PD-L1抑制剂是IgG3同种型的抗体。在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是IgG4同种型的抗体。

[0401] 在某些实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是全长抗体或抗体片段,例如全长IgG1抗体。

[0402] 在某些实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是单特异性抗体。

[0403] 在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1的抗体,其包含分别包含SEQ ID NO:99、100和101所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区(VH),以及分别包含SEQ ID NO:102、LAS和SEQ ID NO:103所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区(VL)。

[0404] 在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1的抗体,其包含含有SEQ ID NO:104的氨基酸序列的VH区和含有SEQ ID NO:105的氨基酸序列的VL区。

[0405] 在一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1的抗体,其包含含有SEQ ID NO:106的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:107的氨基酸序列的轻链。

[0406] 在优选的实施方案,PD1/PD-L1抑制剂是派姆单抗或其生物仿制药。

[0407] 在优选的实施方案,PD1/PD-L1抑制剂是纳武单抗或其生物仿制药。

[0408] 在优选的实施方案,PD1/PD-L1抑制剂是阿替利珠单抗或其生物仿制药。

[0409] 在一些实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是PD1抑制剂,例如PD1阻断抗体。在一些实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是PD-L1抑制剂,例如PD-L1阻断抗体。

[0410] 在某些实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是选自以下的PD1抑制剂:派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、多塔利单抗、JTX-4014、Spartalizumab、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、特瑞普利单抗、INCMGA00012(MGA012)、AMP-224、AMP-514或其各自的生物仿制药。

[0411] 在某些实施方案中,PD1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、多塔利单抗、JTX-4014、Spartalizumab、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、特瑞普利单抗、INCMGA00012(MGA012)、AMP-514或其各自的生物仿制药。

[0412] 在某些实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是选自以下的PD-L1抑制剂:阿替利珠单抗、阿维鲁单抗(Avelumab)、度伐利尤单抗(Durvalumab)、KN035、CK-301、阿卡顺利单抗(Acasunlimab)、AUNP12、CA-170、BMS-986189或其各自的生物仿制药。

[0413] 在某些实施方案中,PD-L1抑制剂选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、KN035、CK-301、阿卡顺利单抗或其各自的生物仿制药。

[0414] 在进一步优选的实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是结合PD-1的抗体。结合PD-1的抗体可以包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH)和含有LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含或具有如SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:45所示的序列,并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含或具有如SEQ ID NO:52、QAS和SEQ ID NO:50所示的序列。此类抗体的具体但非限制性实例是MAB-19-0202。

[0415] 术语“重链可变区”(也称为“VH”)和“轻链可变区”(也称为“VL”)在此以其最普遍的含义使用,并且包含能够含有散布在其他区域(也称为框架区(FR))中的互补决定区(CDR)的任何序列。除其他外,框架区将CDR间隔开,使得它们能够形成抗原结合位点,特别是在VH和VL折叠和配对之后。优选每个VH和VL包含三个CDR和四个FR,按照以下顺序从氨基

端至羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。即,术语“重链可变区”和“轻链可变区”不应被解释为限于可以在天然抗体中或在如本文所例示的VH和VL序列中发现的序列(序列表的SEQ ID NO:54至57)。这些术语包括能够包含和适当定位CDR的任何序列,例如衍生自天然抗体的VL和VH区的序列或衍生自如序列表的SEQ ID NO:54至57所示的序列的序列。本领域技术人员将理解,特别是框架区的序列可以被修饰(包括关于氨基酸取代的变体和关于序列长度的变体,即,插入或缺失变体),而不会分别丧失VH和VL的特征。在优选的实施方案中,任何修饰都限于框架区。但是,本领域技术人员也将充分意识到CDR、高变区和可变区也可以被修饰而不丧失结合PD-1的能力。例如,CDR区将与本文指定的区相同或高度同源。通过“高度同源”,预期可以在CDR中产生1至5个,优选1至4个,例如1至3个或1或2个取代。此外,可以修饰高变区和可变区,使得它们显示出与本文具体公开的区域基本同源。

[0416] 在结合PD-1的抗体中,如本文指定的CDR已经通过使用两种不同的CDR鉴定方法来鉴定。本文使用的第一个编号方案是根据Kabat(Wu and Kabat,1970;Kabat et al.,1991),第二个方案是IMGT编号(Lefranc,1997;Lefranc et al.,2005)。在第三种方法中,使用了两种鉴定方案的交集。

[0417] 结合PD-1的抗体可以包含如本文所述的一个或多个CDR、CDR组或CDR组的组合,包含所述CDR以及它们的中间框架区(在本文中也称为框架区或FR)或所述框架区的部分。优选地,该部分将包括至少约50%的第一和第四框架区之一或两者,所述50%是第一框架区的C端50%和第四框架区的N端50%。通过重组DNA技术制备的抗体的构建可以导致将N端或C端残基引入到由所引入的接头编码的可变区,以促进克隆或其他操作步骤,包括引入接头以将本公开的可变区连接到另外的蛋白质序列,包括免疫球蛋白重链、其他可变结构域(例如在双体抗体的产生中)或蛋白质标记。

[0418] 结合PD-1的抗体可以包含重链可变区(VH),其包含与如SEQ ID NO:56中任一个所示的VH序列的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。在一个实施方案中,抗体包含重链可变区(VH),其中VH包含如SEQ ID NO:56中任一个所示的序列。在一个实施方案中,抗体包含轻链可变区(VL),其包含与如SEQ ID NO:57中任一个所示的VL序列的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。在一个实施方案中,抗体包含轻链可变区(VL),其中VL包含如SEQ ID NO:57中任一个所示的序列。

[0419] 结合PD-1的抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含或具有如SEQ ID NO:56所示的序列,并且VL包含或具有如SEQ ID NO:57所示的序列,或者这些序列各自的变体。结合PD-1的抗体的另一实例可以包含含有或具有如SEQ ID NO:56所示的序列或其变体的VH,和含有或具有如SEQ ID NO:57所示的序列或其变体的VL。此类抗体的具体但非限制性实例是MAB-19-0618。抗体MAB-19-0618衍生自MAB-19-0202。本公开还涵盖所述重链可变区(VH)和所述轻链可变区(VL)的变体以及这些变体VH和VL的各自的组合。

[0420] 结合PD-1的抗体可以包含重链和轻链,其重链包含含有或具有如SEQ ID NO:38或128所示的序列的重链恒定区和含有或具有如SEQ ID NO:56所示的序列的重链可变区(VH),并且其轻链包含含有或具有如SEQ ID NO:42所示的序列的轻链恒定区和含有或具有如SEQ ID NO:57所示的序列的轻链可变区(VL)。

[0421] 结合PD-1的抗体可以包含重链和轻链,其重链包含含有或具有如SEQ ID NO:38或128所示的序列的重链恒定区和含有如SEQ ID NO:56所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区(VH),并且其轻链包含含有或具有如SEQ ID NO:42所示的序列的轻链恒定区和含有如SEQ ID NO:57所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区。例如,CDR1、CDR2和CDR3序列如本文所指定。

[0422] 结合PD-1的抗体可以是单克隆、嵌合的或单克隆、人源化抗体或此类抗体的片段。抗体可以是完整抗体或其抗原结合片段,包括例如双特异性抗体。

[0423] 在结合PD-1的抗体中,一个或多个,优选两个重链恒定区可以被修饰,使得与野生型抗体相比,C1q与所述抗体的结合降低,优选降低至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%。在一个实施方案中,C1q结合可通过ELISA确定。

[0424] 本文中的"野生型"或"WT"或"天然"是指在自然界中发现的氨基酸序列,包括等位基因变异。野生型氨基酸序列、肽或蛋白质具有未经有意修饰的氨基酸序列。

[0425] 在结合PD-1的抗体中,一个或多个,优选两个重链恒定区可以被修饰,使得与野生型抗体相比,一种或多种IgG Fc-γ受体与抗体的结合降低,优选降低至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%。在一个实施方案中,一种或多种IgG Fc-γ受体选自Fc-γRI、Fc-γRII和Fc-γRIII中的至少一种。在一个实施方案中,IgG Fc-γ受体是Fc-γRI。

[0426] 在一个实施方案中,结合PD-1的抗体不能诱导Fc-γRI介导的效应子功能,或者其中与野生型抗体相比,诱导的Fc-γRI介导的效应子功能降低,优选降低至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%。

[0427] 在一个实施方案中,结合PD-1的抗体不能诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、细胞凋亡、同型粘附和/或吞噬作用中的至少一种,或者其中补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、细胞凋亡、同型粘附和/或吞噬作用中的至少一种以降低的程度被诱导,优选降低至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%。

[0428] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性在本文中也称为"ADCC"。ADCC描述了如本文所述的效应细胞,特别是淋巴细胞的细胞杀伤能力,其优选地需要靶细胞被抗体标记。

[0429] ADCC优选地在当抗体结合肿瘤细胞上的抗原并且抗体Fc结构域接合免疫效应细胞表面上的Fc受体(FcR)时发生。已经鉴定了几个Fc受体家族,并且特定的细胞群特征性地表达确定的Fc受体。ADCC可以被视为直接诱导不同程度的即时肿瘤破坏的机制,其导致抗原呈递并诱导针对肿瘤的T细胞应答。优选地,体内ADCC的诱导将导致针对肿瘤的T细胞应答和宿主衍生的抗体应答。

[0430] 补体依赖性细胞毒性在本文中也称为"CDC"。CDC是另一种可以由抗体指导的细胞杀伤方法。IgM是补体激活最有效的同种型。IgG1和IgG3在经由经典补体激活通路指导CDC方面也都非常有效。优选地,在该级联反应中,抗原-抗体复合物的形成导致多个C1q结合位点在参与的抗体分子(如IgG分子)的C_H2结构域附近暴露出来(C1q是补体C1的三个亚组分之一)。优选地,这些未暴露的C1q结合位点将先前低亲和力的C1q-IgG相互作用转化为高亲合力的相互作用之一,这触发了涉及一系列其他补体蛋白的级联事件,并导致效应细胞趋化/激活剂C3a和C5a的蛋白水解释放。优选地,补体级联终止于膜攻击复合物的形成,该膜

攻击复合物在细胞膜中产生孔,促进水和溶质自由进出细胞并可导致细胞凋亡。

[0431] 在一个实施方案中,结合PD-1的抗体具有降低或耗竭的效应子功能。在一个实施方案中,抗体不介导ADCC或CDC或两者。

[0432] 在一个实施方案中,一个或多个,优选两个结合PD-1的抗体的重链恒定区已经被修饰,使得与野生型抗体相比,新生儿Fc受体(FcRn)与抗体的结合不受影响。

[0433] 在一个实施方案中,抗体能够结合的PD-1是人PD-1。在一个实施方案中,PD-1具有或包含如SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列,或者PD-1的氨基酸序列与如SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的同一性,或者是其免疫原性片段。在一个实施方案中,抗体具有结合存在于活细胞表面上的PD-1的天然表位的能力。

[0434] 在一个实施方案中,结合PD-1的抗体包含重链恒定区,其中所述重链恒定区在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234的位置处包含芳香族或非极性氨基酸,并且在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置236的位置处包含除甘氨酸以外的氨基酸。

[0435] 如本文所用,术语“对应于位置…的氨基酸”和相似表达是指人IgG1重链中的氨基酸位置编号。通过与人IgG1比对,可以发现其它免疫球蛋白中的相应的氨基酸位置。因此,一个序列中的氨基酸或片段“对应于”另一个序列中的氨基酸或片段是使用标准序列比对程序(例如ALIGN、ClustalW或类似程序,通常在默认设置下)与另一个氨基酸或片段进行比对,并且与人IgG1重链具有至少50%、至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸或片段。如何比对序列或序列中的片段并由此确定序列中与根据本公开的氨基酸位置对应的位置是本领域熟知的。

[0436] 对于例如根据本公开的序列表的SEQ ID NO:38的氨基酸序列,对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234至236的氨基酸位置是SEQ ID NO:38的氨基酸位置117至119,其中F位于位置117(对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置234),E位于位置118(对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置235)并且R位于位置119(对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置236)。在如下所示的序列中,FER氨基酸序列加下划线并以粗体字母示出。

[0437]

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS      60

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFERG     120

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN     180

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE     240

MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW     300

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                     329
```

[0438] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,在整个本公开中对抗体重链恒定区中的氨基酸位置的所有提及是指对应于根据Kabat中所述的EU编号的人IgG1重链中相应位置的位置(描述于Kabat,E.A.et al.,Sequences of proteins of immunological interest.5th Edition-USDepartment of Health and Human Services,NIH

publication No.91-3242,pp 662,680,689(1991))。

[0439] 在一个实施方案中,结合PD-1的抗体包含重链恒定区,其具有降低或耗竭的Fc介导的效应子功能,或者与另一种包含相同抗原结合区和包含人IgG1铰链、CH2和CH3区的重链恒定区(CH)的抗体相比,其以较小程度诱导Fc介导的效应子功能。

[0440] 在一个特定的实施方案中,结合PD-1的抗体中所述的重链恒定区(CH)被修饰,使得与除了包含未修饰的重链恒定区(CH)之外的相同的抗体相比,该抗体以较小程度诱导Fc介导的效应子功能。

[0441] 如本文所用,术语"Fc介导的效应子功能"是指特别选自下组的此类功能:IgG Fc受体(FcgammaR、Fcγ R)结合、C1q结合、ADCC、CDC及其任何组合。

[0442] 在本公开的上下文中,与抗体(包括多特异性抗体)相关使用的术语"具有降低或耗竭的Fc介导的效应子功能"意指抗体引起Fc介导的效应子功能的总体降低,这种功能特别选自下组:IgG Fc受体(FcgammaR、Fcγ R)结合、C1q结合、ADCC或CDC,与包含(i)与所述抗体相同的CDR序列,特别是包含与所述抗体相同的第一和第二抗原结合区,和(ii)包含人IgG1铰链、CH2和CH3区的两条重链的人IgG1抗体相比,水平优选总体降低5%或更多,10%或更多,20%或更多,更优选50%或更多,并且最优选75%或更多。"耗竭的Fc介导的效应子功能"或相似短语包括完全或基本上完全抑制,即,降低至零或基本上至零。

[0443] 在本公开的上下文中,与抗体(包括多特异性抗体)相关使用的术语"以较小程度诱导Fc介导的效应子功能"意指与包含(i)与所述抗体相同的CDR序列,特别是包含与所述抗体相同的第一和第二抗原结合区,和(ii)含有人IgG1铰链,CH2和CH3区的两条重链的人IgG1抗体相比,该抗体以较小程度诱导Fc介导的效应子功能,此类功能特别选自下组:IgG Fc受体(FcgammaR、Fcγ R)结合、C1q结合、ADCC或CDC。

[0444] Fc介导的效应子功能可以通过测量结合剂与Fcγ 受体的结合、与C1q的结合或诱导Fcγ 受体的Fc介导的交联来确定。特别地,Fc介导的效应子功能可以通过测量结合剂与C1q和/或IgG Fc-γ RI的结合来确定。

[0445] 在涉及结合PD-1的抗体的用途的一个实施方案中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置236的位置处的氨基酸是碱性氨基酸。

[0446] 术语"氨基酸"和"氨基酸残基"在本文中可以互换使用,并且不应理解为限制性的。氨基酸是含有胺($-NH_2$)和羧基(-COOH)官能团,以及对每个氨基酸特异的侧链(R基团)的有机化合物。在本公开的上下文中,氨基酸可以基于结构和化学特性分类。

[0447] 在本公开中,氨基酸残基通过使用以下缩写来表示。此外,除非另有明确说明,肽和蛋白质的氨基酸序列是从N-端至C-端(左端至右端)鉴定的,N-端被鉴定为第一残基。氨基酸由其3个字母的缩写、1个字母的缩写或全名表示,如下所示。Ala:A:丙氨酸;Asp:D:天冬氨酸;Glu:E:谷氨酸;Phe:F:苯丙氨酸;Gly:G:甘氨酸;His:H:组氨酸;Ile:I:异亮氨酸;Lys:K:赖氨酸;Leu:L:亮氨酸;Met:M:甲硫氨酸;Asn:N:天冬酰胺;Pro:P:脯氨酸;Gln:Q:谷氨酰胺;Arg:R:精氨酸;Ser:S:丝氨酸;Thr:T:苏氨酸;Val:V:缬氨酸;Trp:W:色氨酸;Tyr:Y:酪氨酸;Cys:C:半胱氨酸。

[0448] 天然存在的氨基酸通常也可以分为四个家族:酸性(天冬氨酸、谷氨酸)、碱性(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、非极性(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)和不带电荷的极性(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、

酪氨酸)氨基酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时被共同归类为芳香族氨基酸。

[0449] 在涉及结合PD-1的抗体的用途的一个实施方案中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置236的位置处的碱性氨基酸选自由赖氨酸、精氨酸和组氨酸组成的组。在一个实施方案中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置236的位置处的碱性氨基酸是精氨酸(G236R)。此类氨基酸取代在本文中也称为G236R。术语“G236R”表示在根据EU编号的人IgG1重链中的位置236处,氨基酸甘氨酸(G)被精氨酸(R)取代。在本公开中,相似的术语用于其他氨基酸位置和氨基酸。除非另有说明,这些术语中提及的氨基酸位置是根据EU编号的人IgG1重链中的氨基酸位置。

[0450] 在涉及结合PD-1的抗体的用途的一个实施方案中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234的位置处的氨基酸是芳香族氨基酸。在一个实施方案中,该位置处的芳香族氨基酸选自由苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸组成的组。

[0451] 在涉及结合PD-1的抗体的用途的一个实施方案中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234的位置处的氨基酸是非极性氨基酸。在一个实施方案中,该位置处的非极性氨基酸选自下组:丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸。在一个实施方案中,该位置处的非极性氨基酸选自下组:异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸。

[0452] 在涉及结合PD-1的抗体的用途的一个实施方案中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(L234F)。

[0453] 在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234和236的位置处的可能氨基酸的示例性组合在下表中列出:

[0454] 表22:

[0455]

氨基酸位置 234	氨基酸位置 236
苯丙氨酸(F)	精氨酸(R)
色氨酸(W)	精氨酸(R)

[0456]

酪氨酸(Y)	精氨酸(R)
丙氨酸(A)	精氨酸(R)
缬氨酸(V)	精氨酸(R)
亮氨酸(L)	精氨酸(R)
异亮氨酸(I)	精氨酸(R)
脯氨酸(P)	精氨酸(R)
甲硫氨酸(M)	精氨酸(R)
苯丙氨酸(F)	赖氨酸(K)
色氨酸(W)	赖氨酸(K)
酪氨酸(Y)	赖氨酸(K)
丙氨酸(A)	赖氨酸(K)
缬氨酸(V)	赖氨酸(K)
亮氨酸(L)	赖氨酸(K)
异亮氨酸(I)	赖氨酸(K)
脯氨酸(P)	赖氨酸(K)
甲硫氨酸(M)	赖氨酸(K)
苯丙氨酸(F)	组氨酸(H)
色氨酸(W)	组氨酸(H)
酪氨酸(Y)	组氨酸(H)
丙氨酸(A)	组氨酸(H)
缬氨酸(V)	组氨酸(H)
亮氨酸(L)	组氨酸(H)
异亮氨酸(I)	组氨酸(H)
脯氨酸(P)	组氨酸(H)
甲硫氨酸(M)	组氨酸(H)

[0457] 例如,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234和236的位置处,特别是以下氨基酸可以存在于结合PD-1的抗体的重链恒定区中:234F/236R、234W/236R、234Y/236R、

234A/236R、234L/236R、234F/236K、234W/236K、234Y/236K、234A/236K、234L/236K、234F/236H、234W/236H、234Y/236H、234A/236H或234L/236H。

[0458] 位置234和236处的前述氨基酸或氨基酸取代可以仅存在于结合PD-1的抗体的一条重链中或存在于结合PD-1的抗体的两条重链中。存在于抗体的第一重链和第二重链中的相应氨基酸可以彼此独立地选择。

[0459] 例如,结合PD-1的抗体的至少一条重链可以包含以下序列(SEQ ID NO:38):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 60

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FLR**G 120

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN 180

[0460]

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 240

MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 300

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 329

[0461] 在涉及结合PD-1的抗体的一个实施方案中,所述重链,其中对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234和236的位置处的氨基酸如上所指定,此外,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置235的位置处的氨基酸是酸性氨基酸。在一个实施方案中,该位置处的酸性氨基酸选自天冬氨酸或谷氨酸。在一个实施方案中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置235的位置处的氨基酸是谷氨酸(L235E)。

[0462] 在涉及结合PD-1的抗体的一个实施方案中,在重链恒定区中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234、235和236的位置处的氨基酸在位置234处是非极性或芳香族氨基酸,在位置235处是酸性氨基酸,并且在位置236处是碱性氨基酸。

[0463] 在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234,235和236的位置处的可能氨基酸的示例性组合在下表中列出:

[0464] 表23:

[0465]

氨基酸位置 234	氨基酸位置 235	氨基酸位置 236
苯丙氨酸(F)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	精氨酸(R)
色氨酸(W)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	精氨酸(R)
酪氨酸(Y)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	精氨酸(R)
丙氨酸(A)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	精氨酸(R)
缬氨酸(V)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	精氨酸(R)
亮氨酸(L)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	精氨酸(R)
异亮氨酸(I)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	精氨酸(R)
脯氨酸(P)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	精氨酸(R)
甲硫氨酸(M)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	精氨酸(R)
苯丙氨酸(F)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	赖氨酸(K)
色氨酸(W)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	赖氨酸(K)
酪氨酸(Y)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	赖氨酸(K)
丙氨酸(A)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	赖氨酸(K)
缬氨酸(V)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	赖氨酸(K)
亮氨酸(L)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	赖氨酸(K)
异亮氨酸(I)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	赖氨酸(K)
脯氨酸(P)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	赖氨酸(K)
甲硫氨酸(M)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	赖氨酸(K)
苯丙氨酸(F)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	组氨酸(H)
色氨酸(W)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	组氨酸(H)
酪氨酸(Y)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	组氨酸(H)
丙氨酸(A)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	组氨酸(H)
缬氨酸(V)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	组氨酸(H)
亮氨酸(L)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	组氨酸(H)

[0466]

异亮氨酸(I)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	组氨酸(H)
脯氨酸(P)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	组氨酸(H)
甲硫氨酸(M)	天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)	组氨酸(H)

[0467] 例如,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234,235和236的位置处,特别是以下氨基酸可以存在于结合PD-1的抗体的重链恒定区中:234F/235E/236R、234W/235E/236R、234Y/235E/236R、234A/235E/236R、234L/235E/236R、234F/235D/236R、234W/235D/236R、234Y/235D/236R、234A/235D/236R、234L/235D/236R、234F/235L/236R、234W/235L/236R、234Y/235L/236R、234A/235L/236R、234L/235L/236R、234F/235A/236R、234W/235A/236R、234Y/235A/236R、234A/235A/236R、234L/235A/236R、234F/235E/236K、234W/235E/236K、234Y/235E/236K、234A/235E/236K、234L/235E/236K、234F/235D/236K、234W/235D/236K、234Y/235D/236K、234A/235D/236K、234L/235D/236K、234F/235L/236K、234W/235L/236K、234Y/235L/236K、234A/235L/236K、234L/235L/236K、234F/235A/236K、234W/235A/236K、234Y/235A/236K、234A/235A/236K、234L/235A/236K、234F/235E/236H、234W/235E/236H、234Y/235E/236H、234A/235E/236H、234L/235E/236H、234F/235D/236H、234W/235D/236H、234Y/235D/236H、234A/235D/236H、234L/235D/236H、234F/235L/236H、234W/235L/236H、234Y/235L/236H、234A/235L/236H、234L/235L/236H、234F/235A/236H、234W/235A/236H、234Y/235A/236H、234A/235A/236H或234L/235A/236H。

[0468] 位置234,235和236处的前述氨基酸或氨基酸取代可以仅存在于抗体的一条重链中或存在于抗体的两条重链中。存在于抗体的第一重链和第二重链中的相应氨基酸可以彼此独立地选择。

[0469] 例如,结合PD-1的抗体的至少一条重链可以包含以下序列(SEQ ID NO:128或38):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 60

[0470]

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**G 120

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN 180

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 240

[0471]

MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 300

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 329

[0472] 除非上下文另有说明,本申请中例如如表22和23所示的位置234、236和235处的所有描述的氨基酸取代的任何排列和组合(如果适用)应被视为由本申请的描述公开。例如,在抗体的一个实施方案中,第一重链在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234至236的位置处包含氨基酸FER,或者第一重链包含SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成,并且所述抗体的第二重链包含其他氨基酸,例如,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234至236的位置处包含氨基酸AAG或LLG,或者包含,或者所述抗体的第二重链包含SEQ ID NO:37或43所示的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成。在抗体的另一个实施方案中,第一重链和第二重链在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234至236的位置处包含相同的氨基酸,即,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234的位置处包含相同的芳香族或非极性氨基酸,例如F,并且在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置236的位置处包含相同的除甘氨酸以外的氨基酸,例如R,例如FER或FLR的特定组合。

[0473] 在一个实施方案中,结合PD-1的抗体包含至少一个或两个重链恒定区,其中对应于位置234的氨基酸是苯丙氨酸,对应于位置235的氨基酸是谷氨酸,并且对应于位置236的氨基酸是精氨酸(L234F/L235E/G236R=FER)。

[0474] 在一个实施方案中,结合PD-1的抗体包含一个或多个重链恒定区(CH),其包含与如SEQ ID NO:38所示的重链恒定区序列的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0475] 在一个实施方案中,结合PD-1的抗体包含一个或多个,例如两个重链恒定区(CH),其中重链恒定区包含如SEQ ID NO:38所示的序列。

[0476] 在一个实施方案中,结合PD-1的抗体包含具有如SEQ ID NO:139所示的序列的重链和具有如SEQ ID NO:140所示的序列的轻链。

[0477] 抗体优选为IgG1同种型。

[0478] 如本文所用,术语"同种型"是指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋白类别。当本文提及IgG1同种型时,该术语不限于特定的同种型序列,例如特定的IgG1序列,而是用于表示抗体在序列上更接近该同种型,例如IgG1,而不是其他同种型。因此,例如,本文公开的IgG1抗体可以是天然存在的IgG1抗体的序列变体,包括恒定区中的变化。

[0479] IgG1抗体可以以称为同种异型的多种多态性变体存在(Jefferis and Lefranc 2009.mAbs Vol 1Issue 4 1-7中进行了综述),变体中的任何一种都适用于本文的一些实施方案。人群体中常见的同种异型变体是由字母a、f、n、z或其组合指定的那些。在本文的任何实施方案中,抗体可以包含含有人IgG Fc区的重链Fc区。在进一步的实施方案中,人IgG Fc区包含人IgG1。

[0480] 在哺乳动物中有两种类型的轻链,即,λ和κ。免疫球蛋白链包含可变区和恒定区。恒定区在免疫球蛋白的不同同种型内基本上是保守的,其中可变部分是高度多样化的并且负责抗原识别。

[0481] 例如或在实施方案中,根据本发明使用的抗体,优选单克隆抗体是IgG1,κ同种型或λ同种型,其优选包含人IgG1/κ或人IgG1/λ恒定部分,或者该抗体,优选单克隆抗体,衍生自IgG1,λ(lambda)或IgG1、κ(kappa)抗体,优选衍生自人IgG1,λ(lambda)或人IgG1,κ(kappa)抗体。

[0482] 在一个实施方案中,结合PD-1的抗体包含具有轻链恒定区(LC)的轻链,该轻链恒定区(LC)包含与如SEQ ID NO:42所示的LC序列的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。在一个实施方案中,抗体包含具有轻链恒定区(LC)的轻链,该轻链恒定区(LC)包含如SEQ ID NO:42所示的序列。

[0483] 在本发明的一个实施方案中,结合PD-1的抗体是全长IgG1抗体,例如,例如IgG1,κ。在本发明的一个实施方案中,结合剂是全长IgG1抗体,例如,IgG1,κ。

[0484] 在一个实施方案中,结合PD-1的抗体可以衍生化、连接或共表达出其他结合特异性。在另一个实施方案中,抗体可以衍生另一功能分子,连接至另一功能分子或与另一功能分子共表达,例如,另一肽或蛋白质(例如,Fab'片段)。例如,可以与一种或多种其他分子实体(例如,另一抗体)功能性连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或其他方式)(例如,以产生双特异性或多特异性抗体)。

[0485] 结合PD-1的抗体可以是人抗体。如本文所用,术语"人抗体"旨在包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。结合PD-1的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0486] 本公开包括双特异性和多特异性分子的用途,该双特异性和多特异性分子包含针对PD-1的至少一种第一结合特异性和针对第二靶表位(或针对另外的靶表位)的第二结合特异性(或另外的结合特异性)。

[0487] 在一个实施方案中,结合PD-1的多特异性抗体的第一抗原结合区包含如本文所述的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)。

[0488] 在涉及结合PD-1的多特异性抗体的用途的一个实施方案中,该抗体包含衍生自全长抗体的第一和第二结合臂,例如来自如上所述的全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在一个实施方案中,第一和第二结合臂衍生自单克隆抗体。例如或在优选的实施方案中,第一和/或第二结合臂衍生自IgG1,κ同种型或λ同种型,优选包含人IgG1/κ或人IgG1/λ恒定部分。

[0489] 根据本发明使用的多特异性或双特异性抗体的结合PD-1的所述第一抗原结合区可以包含与PD-L1和/或PD-L2竞争结合PD-1的抗体的重链和轻链可变区。在涉及多特异性或双特异性抗体的用途的一个实施方案中,结合PD-1的第一抗原结合区包含如本文所述的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)。

[0490] 如本文所用,术语"效应细胞"是指参与免疫应答的效应阶段的免疫细胞,而不是免疫反应的认知和激活阶段。示例性免疫细胞包括髓系或淋巴系起源的细胞,例如,淋巴细胞(例如,B细胞和T细胞,包括溶细胞性T细胞(CTL))、杀伤细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、多形核细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞。

[0491] "靶细胞"是指受试者(例如,人或动物)中可被抗体靶向的任何不期望的细胞。在优选的实施方案中,靶细胞是肿瘤细胞。

[0492] 在另一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

[0493] 在优选的实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂是PD-L1抑制剂,其包含结合CD137的第一抗原结合区和结合PD-L1的第二抗原结合区。

[0494] 在一个实施方案中,PD-L1是人PD-L1,特别是包含SEQ ID NO:98所示的序列的人PD-L1。在一个实施方案中,CD137是人CD137,特别是包含SEQ ID NO:97所示的序列的人CD137。

[0495] 在一个实施方案中,a)PD-L1抑制剂的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中重链可变区(VH)包含分别在SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,轻链可变区(VL)包含分别在SEQ ID NO:84、GAS和SEQ ID NO:85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列;并且b)PD-L1抑制剂的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中重链可变区(VH)包含分别在SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,轻链可变区(VL)包含分别在SEQ ID NO:91、DDN和SEQ ID NO:92中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0496] 在一个实施方案中,a)PD-L1抑制剂的第一结合区包含含有SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

和b)PD-L1抑制剂的第二结合区包含含有SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0497] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

[0498] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂为全长抗体或抗体片段的形式。

[0499] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,其中第一结合臂包含

[0500] i)包含所述第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,和

[0501] ii)包含所述第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽;

[0502] 并且第二结合臂包含

[0503] iii)包含所述第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,和

[0504] iv)包含所述第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽。

[0505] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂包含

[0506] i)第一重链和第一轻链,其包含能够结合CD137的所述抗原结合区,第一重链包含第一重链恒定区,并且第一轻链包含第一轻链恒定区;和

[0507] ii)第二重链和第二轻链,其包含能够结合PD-L1的所述抗原结合区,第二重链包含第二重链恒定区,并且第二轻链包含第二轻链恒定区。

[0508] 在一个实施方案中,(i)在所述第一重链恒定区(CH)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,或(ii)在所述第一重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,并且在所述第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L。

[0509] 在一个实施方案中,在所述第一重链和第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234和L235的位置分别是F和E。

[0510] 在一个实施方案中,在所述第一和第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A。

[0511] 在一个实施方案中,在PD-L1抑制剂中,第一和第二重链恒定区两者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234和L235的位置分别是F和E,并且(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,以及第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,或(ii)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,并且第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L。

[0512] 在一个实施方案中,在PD-L1抑制剂中,第一和第二重链恒定区两者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且其中(i)第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,以及第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,或(ii)第一重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,并且第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L。

[0513] 在一个实施方案中,在PD-L1抑制剂中所述第一和/或第二重链(例如第二重链)的恒定区包含选自下组的氨基酸序列,或基本上由选自下组的氨基酸序列组成或由选自下组的氨基酸序列组成:

[0514] a)SEQ ID NO:94或96所示的序列[IgG1-Fc_FEAL];

[0515] b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

[0516] c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多6个取代,例如至多5个取代、至多4个取代、至多3个、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0517] 在一个实施方案中,在PD-L1抑制剂中所述第一和/或第二重链(例如第一重链)的恒定区包含选自下组的氨基酸序列,或基本上由选自下组的氨基酸序列组成或由选自下组的氨基酸序列组成:

[0518] a)SEQ ID NO:93或95所示的序列[IgG1-Fc_FEAR];

[0519] b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

[0520] c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多6个取代,例如至多5个取代、至多4个取代、至多3个、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0521] 在一个实施方案中,所述PD-L1抑制剂包含kappa(κ)轻链恒定区。

[0522] 在一个实施方案中,所述PD-L1抑制剂包含lambda(λ)轻链恒定区。

[0523] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂的所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

[0524] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂的所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区或kappa(κ)轻链恒定区。

[0525] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂的所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,或者所述第一轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区。

[0526] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂的kappa(κ)轻链包含选自下组的氨基酸序列:

[0527] a)SEQ ID NO:16所示的序列,

[0528] b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

[0529] c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,例如至多9个取代、至多8个、至多7个、至多6个、至多5个、至多4个取代、至多3个、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0530] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂的lambda(λ)轻链包含选自下组的氨基酸序列:

[0531] a)SEQ ID NO:17所示的序列,

[0532] b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

[0533] c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,例如至多9个取代、至多8个、至多7个、至多6个、至多5个、至多4个取代、至多3个、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0534] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的同种型。

[0535] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是全长IgG1抗体。

[0536] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是IgG1m(f)同种异型的抗体。

[0537] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是结合CD137和PD-L1的双特异性抗体,该双特异性抗体具有i)包含SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的第一轻链,和ii)包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的第二轻链。

[0538] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是阿卡顺利单抗或其生物仿制药。

[0539] 待治疗的受试者和肿瘤或癌症

[0540] 根据本公开治疗的受试者优选为人受试者。

[0541] 在一个实施方案中,肿瘤或癌症是实体瘤。

[0542] 在一个实施方案中,所述肿瘤是PD-L1阳性肿瘤。

[0543] 在一个实施方案中,肿瘤或癌症是头颈部鳞状细胞癌(HNSCC),例如口腔、咽或喉的HNSCC。

[0544] 在一个实施方案中,HNSCC是复发性的、不可切除的或转移性的。

[0545] 在一个实施方案中,肿瘤或癌症是非小细胞肺癌(NSCLC),例如鳞状或非鳞状NSCLC。

[0546] 在一个实施方案中,NSCLC是复发性的、不可切除的或转移性的。

[0547] 在一个实施方案中,NSCLC不具有表皮生长因子(EGFR)致敏突变和/或间变性淋巴瘤(ALK)易位和/或ROS1重排。

[0548] 在一个实施方案中,NSCLC是NTRK1/2/3(神经营养受体酪氨酸激酶1/2/3)融合阳性的,和/或在KRAS(KRAS原癌基因,GTP酶)、BRAF(B-Raf原癌基因,丝氨酸/苏氨酸激酶)或MET(MET原癌基因,受体酪氨酸激酶)基因中具有突变,和/或具有RET(ret原癌基因)基因重排,并且受试者先前已经接受了相应的靶向疗法的治疗。

[0549] 在一个实施方案中,受试者先前已经接受了PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体),优选至少两个剂量的所述PD-1抑制剂或所述PD-L1抑制剂的治疗。

[0550] 在一个实施方案中,受试者先前已经接受了基于铂的疗法或如果铂不合格的情况下的替代化疗,例如含吉西他滨的方案的治疗。

[0551] 在一个实施方案中,肿瘤或癌症在治疗(例如用检查点抑制剂进行全身治疗)后复发和/或进展。

[0552] 在一个实施方案中,受试者已经接受了至少一种先前线的全身疗法,例如包含PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂,例如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的全身疗法。

[0553] 在一个实施方案中,癌症或肿瘤已经复发和/或是难治性的,或者所述受试者在用PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)治疗后已经进展,所述PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。

[0554] 在一个实施方案中,最后一次先前治疗是用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂,例如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体,所述PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。

[0555] 在一个实施方案中,从最后一次使用PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)治疗的进展的时间是6个月或更少。

[0556] 在一个实施方案中,从作为最后一次先前治疗的一部分的最后一次给药PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)的时间是6个月或更少。

[0557] 在一个实施方案中,癌症或肿瘤已复发和/或是难治性的,或受试者在i)用抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗后进行铂双重化疗,或ii)铂双重化疗之后用抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗的期间或之后已进展。

[0558] 在第二方面,本公开提供了试剂盒,其包含i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0559] 在根据第二方面的试剂盒的一个实施方案中,结合剂如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0560] 在根据第二方面的试剂盒的一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0561] 在根据第二方面的试剂盒的一个实施方案中,结合剂、PD1/PD-L1抑制剂和(如果存在的话)一种或多种另外的治疗剂用于全身施用,特别是用于注射或输注,例如静脉注射或输注。

[0562] 在第三方面,本公开提供了试剂盒,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述试剂盒包含i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0563] 在根据第三方面使用的试剂盒的一个实施方案中,试剂盒如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0564] 在根据第三方面使用的试剂盒的一个实施方案中,肿瘤或癌症如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0565] 在根据第三方面使用的试剂盒的一个实施方案中,受试者如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0566] 在根据第三方面使用的试剂盒的一个实施方案中,方法如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0567] 在第四方面,本公开提供了药物组合物,其包含i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂;ii)PD1/PD-L1抑制剂;和iii)任选地药物可接受的载剂。

[0568] 在根据第四方面的药物组合物的一个实施方案中,结合剂如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0569] 在根据第四方面的药物组合物的一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0570] 在第五方面,本公开提供了药物组合物,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述药物组合物包含i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0571] 在根据第五方面使用的药物组合物的一个实施方案中,药物组合物如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0572] 在根据第五方面使用的药物组合物的一个实施方案中,肿瘤或癌症如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0573] 在根据第五方面使用的药物组合物的一个实施方案中,受试者如本公开的任何方

面或实施方案中所定义。

[0574] 在根据第五方面使用的药物组合物的一个实施方案中,方法如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0575] 在第六方面,本公开提供了结合剂,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述方法包括向所述受试者施用i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂;和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0576] 在根据第六方面使用的结合剂的一个实施方案中,方法如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0577] 在根据第六方面使用的结合剂的一个实施方案中,结合剂如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0578] 在根据第六方面使用的结合剂的一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0579] 在第七方面,本公开提供了PD1/PD-L1抑制剂,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述方法包括向所述受试者施用i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂;和ii)所述PD1/PD-L1抑制剂。

[0580] 在根据第七方面使用的PD1/PD-L1抑制剂的一个实施方案中,方法如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0581] 在根据第七方面使用的PD1/PD-L1抑制剂的一个实施方案中,结合剂如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0582] 在根据第七方面使用的PD1/PD-L1抑制剂的一个实施方案中,PD1/PD-L1抑制剂如本公开的任何方面或实施方案中所定义。

[0583] 本文参考的文献和研究的引用并不旨在承认前述中的任何内容是相关的现有技术。关于这些文献内容的所有声明均基于申请人可获得的信息,并且不构成关于这些文献内容的正确性的任何承认。

[0584] 本说明书(包括以下实施例)被呈现以使本领域普通技术人员能够制备和使用各种实施方案。具体设备、技术和应用的描述仅作为示例提供。对本文描述的示例的各种修改对于本领域普通技术人员来说将是显而易见的,并且本文定义的一般原理可以应用于其他示例和应用而不脱离各种实施方案的精神和范围。因此,各种实施方案不旨在限于本文描述和示出的示例,而是符合与权利要求书一致的范围。

[0585] 本公开的项目

[0586] 1.在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂;和ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0587] 2.项1所述的方法,其中所述结合剂包含分别包含SEQ ID NO:5、6和7所示序列的重链可变(VH)区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别包含SEQ ID NO:9、10和11所示序列的轻链可变(VL)区CDR1、CDR2和CDR3。

[0588] 3.项1或2所述的方法,其中所述结合剂包含两个能够结合人CD27的结合区,其中所述抗体包含分别包含SEQ ID NO:5、6和7所示序列的重链可变(VH)区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别包含SEQ ID NO:9、10和11所示序列的轻链可变(VL)区CDR1、CDR2和CDR3。

[0589] 4.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含含有SEQ ID NO:4所示序列

的VH区。

[0590] 5.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含含有SEQ ID NO:8所示序列的VL区。

[0591] 6.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含分别包含SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8所示序列的VH和VL区。

[0592] 7.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂是抗体,优选人抗体或人源化抗体。

[0593] 8.前述项中任一项所述的方法,其中所述抗体是进一步包含轻链恒定区(CL)和重链恒定区(CH)的全长抗体。

[0594] 9.项8所述的方法,其中所述轻链恒定区是人κ。

[0595] 10.项8所述的方法,其中所述轻链恒定区是人λ。

[0596] 11.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂进一步包含重链恒定区,其是人IgG同种型,任选地是修饰的人IgG。

[0597] 12.项11所述的方法,其中所述人IgG或修饰的人IgG选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,例如人IgG1。

[0598] 13.项11或12所述的方法,其中所述IgG是包含一个或多个氨基酸取代的修饰的人IgG。

[0599] 14.项11至13中任一项所述的方法,其中所述修饰的人IgG是包含一个或多个氨基酸取代,例如两个或更多个氨基酸取代的修饰的人IgG1。

[0600] 15.项11至14中任一项所述的方法,其中所述修饰的人IgG重链恒定区包含至多10个氨基酸取代,例如至多9个、例如至多8个、例如至多7个、例如至多6个、例如至多5个、例如至多4个、例如至多3个、例如至多2个氨基酸取代。

[0601] 16.项11至15中任一项所述的方法,其中与除了包含野生型IgG1抗体重链恒定区之外相同的抗体相比,所述重链恒定区中的所述取代诱导增加的CD27激动作用。

[0602] 17.项11至16中任一项所述的方法,其中在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E345或E430的位置处的氨基酸残基选自下组:A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W和Y。

[0603] 18.项11至17中任一项所述的方法,其中在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E345的位置处的氨基酸残基是R。

[0604] 19.项11至18中任一项所述的方法,其中在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E430的位置处的氨基酸残基是G。

[0605] 20.项11至19中任一项所述的方法,其中在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置P329的位置处的氨基酸残基是R。

[0606] 21.项11至20中任一项所述的方法,其中在对应于根据Eu编号的人IgG1重链中位置E345和P329的位置处的氨基酸残基均是R。

[0607] 22.项11至21中任一项所述的方法,其中所述结合剂具有作为包含野生型IgG1重链恒定区的亲本抗体的药代动力学概况。

[0608] 23.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含重链恒定区,所述重链恒定区包含选自下组的序列:SEQ ID No 12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、27、28、29、30、31、

32、33、34和36。

[0609] 24.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含含有SEQ ID NO:15所示序列的重链恒定区。

[0610] 25.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含重链恒定区,所述重链恒定区被修饰使得所述结合剂相对于亲本抗体以较小的程度诱导一种或多种Fc介导的效应子功能。

[0611] 26.项25所述的方法,其中所述一种或多种Fc介导的效应子功能降低至少20%,例如至少30%或至少40%,或至少50%或至少60%或至少70%,或至少80%或至少90%。

[0612] 27.项25或26所述的方法,其中所述结合剂不诱导一种或多种Fc介导的效应子功能。

[0613] 28.项25至27中任一项所述的方法,其中所述一种或多种Fc介导的效应子功能选自下组:补体依赖性细胞毒性(CDC)、补体依赖性细胞介导的细胞毒性(CDCC)、补体激活、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)、C1q结合和Fc γR结合。

[0614] 29.项25至28中任一项所述的方法,其中当通过实施例8的方法测量时,所述结合剂不诱导C1q结合。

[0615] 30.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂是单价抗体。

[0616] 31.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂是二价抗体。

[0617] 32.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂是单特异性抗体。

[0618] 33.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂是双特异性抗体,所述双特异性抗体包含根据前述项中任一项的能够结合人CD27的第一抗原结合区,并且包含能够结合人CD27上的不同表位或能够结合不同靶标的第二抗原结合区。

[0619] 34.前述项中任一项所述的方法,其中CD27是人CD27,特别是所述人CD27包含如SEQ ID NO:1所示的序列或如SEQ ID NO:2所示的人CD27变体。

[0620] 35.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含:

[0621] a.VH区,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;

[0622] b.VL区,其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

[0623] c.CH区,其包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列;和

[0624] d.CL区,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。

[0625] 36.前述项中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含含有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的轻链。

[0626] 37.前述项中任一项所述的方法,其中PD-L1是人PD-L1,特别是包含SEQ ID NO:98所示的序列的人PD-L1。

[0627] 38.前述项中任一项所述的方法,其中PD1是人PD1或者是其免疫原性片段,优选地,所述PD1具有或包含如SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列,或者PD1的氨基酸序列与如SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%的同一性。

[0628] 39.前述项中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1或PD-L1的抗体,优选是作为PD1/PD-L1相互作用的拮抗剂的抗体和/或PD1或PD-L1阻断抗体。

[0629] 40.前述项中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的同种型的抗体,例如IgG1同种型的抗体。

[0630] 41.前述项中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是全长抗体或抗体片段,例如全长IgG1抗体。

[0631] 42.前述项中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是单特异性抗体。

[0632] 43.前述项中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1的抗体,该抗体包含分别包含SEQ ID NO:99、100和101所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区(VH),以及分别包含SEQ ID NO:102、LAS和SEQ ID NO:103所示的CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区(VL)。

[0633] 44.前述项中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:104所示的氨基酸序列的VH区和含有SEQ ID NO:105所示的氨基酸序列的VL区。

[0634] 45.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:106所示的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列的轻链。

[0635] 46.前述项中任一项所述的方法,其中

[0636] a)所述结合剂是抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的轻链。

[0637] b)所述PD1/PD-L1抑制剂是派姆单抗或其生物仿制药。

[0638] 47.项1-42中任一项所述的方法,其中

[0639] a)所述结合剂是抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的轻链。

[0640] b)所述PD1/PD-L1抑制剂是纳武单抗或其生物仿制药。

[0641] 48.项1-42中任一项所述的方法,其中

[0642] a)所述结合剂是抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的轻链。

[0643] b)所述PD1/PD-L1抑制剂是阿替利珠单抗或其生物仿制药。

[0644] 49.项1-42中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是结合PD1的抗体,或其抗原结合片段,其中所述结合PD1的抗体包含分别包含SEQ ID NO:49、46和45所示序列的VH区CDR1、CDR2和CDR3,以及分别包含SEQ ID NO:52、QAS和SEQ ID NO:50所示序列的VL区CDR1、CDR2和CDR3。

[0645] 50.项49所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与如SEQ ID NO:56所示的VH序列的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序列。

[0646] 51.项50所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含重链可变区(VH),其中所述VH包含如SEQ ID NO:56所示的序列。

[0647] 52.项49-51中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含与如SEQ ID NO:57所示的VL序列的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%同一性的序

列。

[0648] 53.项52所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含轻链可变区(VL),其中所述VL包含如SEQ ID NO:57所示的序列。

[0649] 54.项49-53中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含或具有如SEQ ID NO:56所示的序列,并且所述VL包含或具有如SEQ ID NO:57所示的序列。

[0650] 55.项49-54中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含重链恒定区,其中所述重链恒定区在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置234的位置处包含芳香族或非极性氨基酸,并且在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置236的位置处包含除甘氨酸以外的氨基酸。

[0651] 56.项55所述的方法,其中在对应于位置236的位置处的氨基酸是碱性氨基酸。

[0652] 57.项56所述的方法,其中所述碱性氨基酸选自由赖氨酸、精氨酸和组氨酸组成的组。

[0653] 58.项56或57所述的方法,其中所述碱性氨基酸是精氨酸(G236R)。

[0654] 59.项55-58中任一项所述的方法,其中在对应于位置234的位置处的氨基酸是芳香族氨基酸。

[0655] 60.项59所述的方法,其中所述芳香族氨基酸选自由苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸组成的组。

[0656] 61.项55-58中任一项所述的方法,其中在对应于位置234的位置处的氨基酸是非极性氨基酸。

[0657] 62.项61所述的方法,其中所述非极性氨基酸选自由丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸组成的组。

[0658] 63.项61或62所述的方法,其中所述非极性氨基酸选自由异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸组成的组。

[0659] 64.项55-63中任一项所述的方法,其中在对应于位置234处的氨基酸是苯丙氨酸(L234F)。

[0660] 65.项55-64中任一项所述的方法,其中在与PD1结合的抗体的所述重链恒定区中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置235的位置处的氨基酸是酸性氨基酸。

[0661] 66.项65所述的方法,其中所述酸性氨基酸是天冬氨酸或谷氨酸。

[0662] 67.项55-66中任一项所述的方法,其中在与PD1结合的抗体的所述重链恒定区中,在对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置235的位置处的氨基酸是谷氨酸(L235E)。

[0663] 68.项55-67中任一项所述的方法,其中在与PD1结合的抗体的所述重链恒定区中,在对应于位置234、235和236的位置处的氨基酸在位置234是非极性或芳香族氨基酸、在位置235是酸性氨基酸,并且在位置236是碱性氨基酸。

[0664] 69.项55-68中任一项所述的方法,其中在与PD1结合的抗体的所述重链恒定区中,对应于位置234的氨基酸是苯丙氨酸,对应于位置235的氨基酸是谷氨酸,并且对应于位置236的氨基酸是精氨酸(L234F/L235E/G236R)。

[0665] 70.项49-69中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体的重链恒定区包含与如SEQ ID NO:38所示的HC序列的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少

85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％同一性的序列。

[0666] 71.项49-70中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体的重链恒定区包含如SEQ ID NO:38所示的序列。

[0667] 72.项49-71中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体的重链恒定区的同种型是IgG1。

[0668] 73.项49-72中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体包含具有如SEQ ID NO:139所示的序列的重链和具有如SEQ ID NO:140所示的序列的轻链。

[0669] 74.项49-73中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体是单克隆、嵌合或人源化抗体或此类抗体的片段。

[0670] 75.项49-74中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体具有降低的或耗竭的Fc介导的效应子功能。

[0671] 76.项49-75中任一项所述的方法,其中与野生型抗体相比,补体蛋白C1q与所述结合PD1的抗体的恒定区的结合降低,优选降低至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少97％或100％。

[0672] 77.项49-76中任一项所述的方法,其中与野生型抗体相比,一种或多种IgG Fc-γ受体与所述结合PD1的抗体的结合降低,优选降低至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少97％或100％。

[0673] 78.项77所述的方法,其中所述一种或多种IgG Fc-γ受体选自Fc-γRI、Fc-γRII和Fc-γRIII中的至少一种。

[0674] 79.项77或78所述的方法,其中所述IgG Fc-γ受体是Fc-γRI。

[0675] 80.项49-79中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体不能诱导Fc-γRI介导的效应子功能,或者其中与野生型抗体相比,所述诱导的Fc-γRI介导的效应子功能降低,优选降低至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少97％或100％。

[0676] 81.项49-80中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体不能诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、细胞凋亡、同型粘附和/或吞噬作用中的至少一种,或者其中补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的裂解、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的裂解、细胞凋亡、同型粘附和/或吞噬作用中的至少一种以降低的程度被诱导,优选降低至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少97％或100％。

[0677] 82.项49-81中任一项所述的方法,其中与野生型抗体相比,新生儿Fc受体(FcRn)与所述结合PD1的抗体的结合不受影响。

[0678] 83.项49-82中任一项所述的方法,所述结合PD1的抗体结合存在于活细胞表面上的PD1的天然表位。

[0679] 84.项49-83中任一项所述的方法,其中所述结合PD1的抗体是包含结合PD1的第一抗原结合区和至少一个结合另一抗原的另外的抗原结合区的多特异性抗体。

[0680] 85.项84所述的方法,其中所述结合PD1的抗体是双特异性抗体,所述双特异性抗体包含结合PD1的第一抗原结合区和结合另一抗原的第二抗原结合区。

[0681] 86.项84或85所述的方法,其中所述结合PD1的第一抗原结合区包含如项50至54中任一项所示的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)。

[0682] 87.项49-86中任一项所述的方法,其中

[0683] a)所述结合剂包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

[0684] b)所述结合PD1的抗体包含VH区和VL区,其中所述VH包含或具有如SEQ ID NO:56所示的序列,并且所述VL包含或具有如SEQ ID NO:57所示的序列。

[0685] 88.项49-87中任一项所述的方法,其中

[0686] a)所述结合剂是包含VH区、VL区、CH区和CL区的抗体,所述VH区包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,所述CH区包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,所述CL区包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0687] b)所述结合PD1的抗体包含VH区、VL区、CH区和CL区,所述VH区包含SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列,所述CH区包含SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列,所述CL区包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列。

[0688] 89.项1-41中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

[0689] 90.项89所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是PD-L1抑制剂,其包含结合CD137的第一抗原结合区和结合PD-L1的第二抗原结合区。

[0690] 91.项90所述的方法,其中CD137是人CD137,特别是包含SEQ ID NO:97所示的序列的人CD137。

[0691] 92.项90或91所述的方法,其中

[0692] a)所述PD-L1抑制剂的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:79的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:83的CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0693] 和

[0694] b)所述PD-L1抑制剂的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:86的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:90的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0695] 93.项90-92中任一项所述的方法,其中a)所述PD-L1抑制剂的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含分别在SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含分别在SEQ ID NO:84、GAS和SEQ ID NO:85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列;并且b)所述PD-L1抑制剂的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含分别在SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含分别在SEQ ID NO:91、DDN和SEQ ID NO:92中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0696] 94.项90-93中任一项所述的方法,其中

[0697] a)所述PD-L1抑制剂的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列;

[0698] 和

[0699] b)所述PD-L1抑制剂的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID

NO:90所示的氨基酸序列。

[0700] 95.项90-94中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,其中所述第一结合臂包含

[0701] i)包含所述第一重链可变区(VH)和第一重链恒定区(CH)的多肽,和

[0702] ii)包含所述第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL)的多肽;

[0703] 并且所述第二结合臂包含

[0704] iii)包含所述第二重链可变区(VH)和第二重链恒定区(CH)的多肽,和

[0705] iv)包含所述第二轻链可变区(VL)和第二轻链恒定区(CL)的多肽。

[0706] 96.项90-95中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂包含

[0707] i)第一重链和第一轻链,其包含能够结合CD137的所述抗原结合区,所述第一重链包含第一重链恒定区,并且所述第一轻链包含第一轻链恒定区;和

[0708] ii)第二重链和第二轻链,其包含能够结合PD-L1的所述抗原结合区,所述第二重链包含第二重链恒定区,并且所述第二轻链包含第二轻链恒定区。

[0709] 97.项95或96所述的方法,其中(i)在所述第一重链恒定区(CH)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,或(ii)在所述第一重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,并且在所述第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L。

[0710] 98.项95-97中任一项所述的方法,其中在所述第一重链和第二重链中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234和L235的位置分别是F和E。

[0711] 99.项95-98中任一项所述的方法,其中在所述第一和第二重链恒定区(HC)中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A。

[0712] 100.项95-99中任一项所述的方法,其中所述第一和第二重链恒定区两者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234和L235的位置分别是F和E,并且其中(i)所述第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,并且所述第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,或(ii)所述第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,并且所述第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L。

[0713] 101.项95-100中任一项所述的方法,其中所述第一和第二重链恒定区两者的对应于根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且其中(i)所述第一重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L,并且所述第二重链恒定区的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,或(ii)所述第一重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中K409的位置是R,并且所述第二重链的对应于根据EU编号的人IgG1重链中F405的位置是L。

[0714] 102.项95-101中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二重链(例如第二重链)的恒定区包含选自下组的氨基酸序列,或基本上由选自下组的氨基酸序列组成或由选自下组的氨基酸序列组成:

[0715] a)SEQ ID NO:94或96所示的序列[IgG1-Fc_FEAL];

[0716] b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、

4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

[0717] c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多6个取代,例如至多5个取代、至多4个取代、至多3个取代、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0718] 103.项95-102中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二重链(例如第一重链)的恒定区包含选自下组的氨基酸序列,或基本上由选自下组的氨基酸序列组成或由选自下组的氨基酸序列组成:

[0719] a)SEQ ID NO:93或95所示的序列[IgG1-Fc_FEAR];

[0720] b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

[0721] c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多6个取代,例如至多5个取代、至多4个取代、至多3个取代、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0722] 104.项95-103中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂包含kappa(κ)轻链恒定区。

[0723] 105.项95-104中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂包含lambda(λ)轻链恒定区。

[0724] 106.项95-105中任一项所述的方法,其中所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区或lambda(λ)轻链恒定区。

[0725] 107.项95-106中任一项所述的方法,其中所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区或kappa(κ)轻链恒定区。

[0726] 108.项95-107中任一项所述的方法,其中所述第一轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,或者所述第一轻链恒定区是lambda(λ)轻链恒定区,并且所述第二轻链恒定区是kappa(κ)轻链恒定区。

[0727] 109.项104-108中任一项所述的方法,其中所述kappa(κ)轻链包含选自下组的氨基酸序列:

[0728] a)SEQ ID NO:16所示的序列,

[0729] b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

[0730] c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,例如至多9个取代、至多8个、至多7个、至多6个、至多5个、至多4个取代、至多3个、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0731] 110.项105-109中任一项所述的方法,其中所述lambda(λ)轻链包含选自下组的氨基酸序列:

[0732] a)SEQ ID NO:17所示的序列,

[0733] b)a)中的序列的子序列,例如从a)中定义的序列的N-端或C-端开始,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸缺失的子序列;和

[0734] c)与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,例如至多9个取代、至多8个、至多7个、至多6个、至多5个、至多4个取代、至多3个、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0735] 111.项90-110中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂是IgG1m(f)同种异型

的抗体。

[0736] 112.项90-111中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂是结合CD137和PD-L1的双特异性抗体,所述双特异性抗体具有i)包含SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的第一轻链,和ii)包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的第二轻链。

[0737] 113.项90-112中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂是阿卡顺利单抗或其生物仿制药。

[0738] 114.项90-113中任一项所述的方法,其中

[0739] a)所述结合剂包含重链可变(VH)区CDR1、CDR2和CDR3和轻链可变(VL)区CDR1、CDR2和CDR3,所述重链可变(VH)区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:5、6和7所示的序列,所述轻链可变(VL)区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:9、10和11所示的序列;

[0740] b)所述PD-L1抑制剂的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含分别在SEQ ID NO:80、81和82中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含分别在SEQ ID NO:84、GAS和SEQ ID NO:85中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列;和

[0741] c)所述PD-L1抑制剂的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含分别在SEQ ID NO:87、88和89中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区(VL)包含分别在SEQ ID NO:91、DDN和SEQ ID NO:92中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0742] 115.项90-114中任一项所述的方法,其中

[0743] a)所述结合剂包含VH区和VL区,所述VH区包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

[0744] b)所述PD-L1抑制剂的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列;和

[0745] c)所述PD-L1抑制剂的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列。

[0746] 116.项90-115中任一项所述的方法,其中

[0747] a)所述结合剂是包含VH区、VL区、CH区和CL区的抗体,所述VH区包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,所述CH区包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,所述CL区包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列;

[0748] b)所述PD-L1抑制剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,所述第一结合臂包含第一结合区,并且第二结合臂包含第二结合区;

[0749] c)所述PD-L1抑制剂的第一结合臂包含VH区、VL区、CH区和CL区,所述VH区包含SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列,所述CH区包含SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列,所述CL区包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列;和

[0750] d)所述PD-L1抑制剂的第二结合臂包含VH区、VL区、CH区和CL区,所述VH区包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列,所述VL区包含SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列,所述CH区包

含SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列,所述CL区包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。

[0751] 117.项90-116中任一项所述的方法,其中

[0752] a)所述结合剂包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列;

[0753] b)所述PD-L1抑制剂是结合CD137和PD-L1的双特异性抗体,所述双特异性抗体具有i)包含SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列的第一重链和包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的第一轻链,和ii)包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的第二重链和包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的第二轻链。

[0754] 118.项90-117中任一项所述的方法,其中

[0755] a)所述结合剂包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列;

[0756] b)所述PD-L1抑制剂是阿卡顺利单抗或其生物仿制药。

[0757] 119.项1-38中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是选自以下的PD1抑制剂:派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、多塔利单抗、JTX-4014、Spartalizumab、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、特瑞普利单抗、INCMGA00012(MGA012)、AMP-224、AMP-514或其各自的生物仿制药。

[0758] 120.项1-38中任一项所述的方法,其中所述PD1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、多塔利单抗、JTX-4014、Spartalizumab、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、特瑞普利单抗、INCMGA00012(MGA012)、AMP-514或其各自的生物仿制药。

[0759] 121.项1-38中任一项所述的方法,其中所述PD1/PD-L1抑制剂是选自以下的PD-L1抑制剂:阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、KN035、CK-301、阿卡顺利单抗、AUNP12、CA-170、BMS-986189或其各自的生物仿制药。

[0760] 122.项1-38中任一项所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、KN035、CK-301、阿卡顺利单抗或其各自的生物仿制药。

[0761] 123.前述项中任一项所述的方法,其中所述受试者是人受试者。

[0762] 124.前述项中任一项所述的方法,其中所述肿瘤或癌症是实体肿瘤。

[0763] 125.根据前述项中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是PD-L1阳性肿瘤。

[0764] 126.前述项中任一项所述的方法,其中所述肿瘤或癌症是头颈部鳞状细胞癌(HNSCC),例如口腔、咽或喉的HNSCC。

[0765] 127.项126所述的方法,其中所述HNSCC是复发性的、不可切除的或转移性的。

[0766] 128.项1-125中任一项所述的方法,其中所述肿瘤或癌症是非小细胞肺癌(NSCLC),例如鳞状或非鳞状NSCLC。

[0767] 129.项128所述的方法,其中所述NSCLC是复发性的、不可切除的或转移性的。

[0768] 130.项128或129所述的方法,其中所述NSCLC不具有表皮生长因子(EGFR)致敏突变和/或间变性淋巴瘤(ALK)易位和/或ROS1重排。

[0769] 131.项128-130中任一项所述的方法,其中所述NSCLC是NTRK1/2/3(神经营养受体酪氨酸激酶1/2/3)融合阳性的,和/或在KRAS(KRAS原癌基因,GTP酶)、BRAF(B-Raf原癌基因,丝氨酸/苏氨酸激酶)或MET(MET原癌基因,受体酪氨酸激酶)基因中具有突变,和/或具有RET(ret原癌基因)基因重排,并且所述受试者先前已经接受了相应的靶向疗法的治疗。

[0770] 132.前述项中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已经接受了PD1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体),优选至少两个剂量的所述PD1抑制剂或所述PD-L1抑制剂的治疗。

[0771] 133.前述项中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已经接受了基于铂的疗法或如果铂不合格的情况下的替代化疗,例如含吉西他滨的方案的治疗。

[0772] 134.前述项中任一项所述的方法,其中所述肿瘤或癌症在治疗(例如用检查点抑制剂进行全身治疗)后复发和/或进展。

[0773] 135.前述项中任一项所述的方法,其中所述受试者已经接受了至少一种先前线的全身疗法,例如包含PD1抑制剂或PD-L1抑制剂,例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体的全身疗法。

[0774] 136.前述项中任一项所述的方法,其中所述癌症或肿瘤已经复发和/或是难治性的,或者所述受试者在用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体)治疗后已经进展,所述PD1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。

[0775] 137.前述项中任一项所述的方法,其中最后一次先前治疗是用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂,例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体,所述PD1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。

[0776] 138.前述项中任一项所述的方法,其中从最后一次用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体)治疗发生进展的时间是6个月或更少。

[0777] 139.前述项中任一项所述的方法,其中从作为最后一次治疗的一部分的最后一次给药PD1抑制剂或PD-L1抑制剂(例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体)的时间是6个月或更少。

[0778] 140.前述项中任一项所述的方法,其中所述癌症或肿瘤已经复发和/或是难治性的,或所述受试者在以下期间或之后已经进展:

[0779] i)用抗PD1抗体或抗PD-L1抗体治疗后进行铂双重化疗,或

[0780] ii)铂双重化疗之后用抗PD1抗体或抗PD-L1抗体治疗。

[0781] 141.试剂盒,其包含

[0782] i)结合剂,其包含至少一个结合CD27的结合区,和

[0783] ii)PD1/PD-L1抑制剂。

[0784] 142.项141所述的试剂盒,其中所述结合剂如项1-140中任一项所定义和/或所述PD1/PD-L1抑制剂如项1-140中任一项所定义。

[0785] 143.根据项141或142所述的试剂盒,其中所述结合剂、所述PD1/PD-L1抑制剂和(如果存在的话)一种或多种另外的治疗剂用于全身施用,特别是用于注射或输注,例如静脉注射或输注。

[0786] 144.根据项141-143中任一项所述的试剂盒,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中。

[0787] 145.根据项144所述使用的试剂盒,其中所述肿瘤或癌症如项1-140中任一项所定义,和/或所述受试者如项1-140中任一项所定义,和/或所述方法如项1-140中任一项所定义。

[0788] 146.药物组合物,其包含

[0789] i)结合剂,其包含至少一个结合CD27的结合区;

[0790] ii)PD1/PD-L1抑制剂;和

[0791] iii)任选的药物可接受的载剂。

[0792] 147.根据项146所述的药物组合物,其中所述结合剂如项1-140中任一项所定义和/或所述PD1/PD-L1抑制剂如项1-140中任一项所定义。

[0793] 148.根据项146或147所述的药物组合物,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中。

[0794] 149.根据项148所述使用的药物组合物,其中所述肿瘤或癌症如项1-140中任一项所定义,和/或所述受试者如项1-140中任一项所定义,和/或所述方法如项1-140中任一项所定义的。

[0795] 150.结合剂,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述方法包括向所述受试者施用i)包含至少一个结合CD27的结合区的所述结合剂;和ii)PD1/PD-L1抑制剂

[0796] 151.根据项150所述使用的结合剂,其中所述方法如项1-140中任一项所定义,和/或所述结合剂如项1-140中任一项所定义,和/或所述PD1/PD-L1抑制剂如项1-140中任一项所定义。

[0797] 152.PD1/PD-L1抑制剂,其用于在受试者中减少肿瘤进展或预防肿瘤进展或治疗癌症的方法中,所述方法包括向所述受试者施用i)包含至少一个结合CD27的结合区的结合剂;和ii)所述PD1/PD-L1抑制剂。

[0798] 153.根据项152所述使用的PD1/PD-L1抑制剂,其中所述方法如项1-140中任一项所定义,和/或所述结合剂如项1-140中任一项所定义,和/或所述PD1/PD-L1抑制剂如项1-140中任一项所定义。

[0799] 本文公开了本公开的进一步的方面。

[0800] 实施例1:DuoBody-PD-L1x4-1BB和抗人CD27抗体及其Fc变体的生成

[0801] 在Aldevron GmbH(Freiburg,Germany)进行通过免疫和杂交瘤生成生成抗人CD27抗体。将编码人CD27(全长和ECD)的cDNA克隆到Aldevron专有表达质粒中。抗CD27抗体是通过使用手持式粒子轰击装置(“基因枪”)真皮内应用人CD27 cDNA包被的金颗粒来免疫OmniRat动物(表达具有完全人独特型的多样化抗体库的转基因大鼠;Ligand Pharmaceuticals Inc.)而生成的。在一系列免疫后收集血清样品,并通过流式细胞术在用上述表达质粒瞬时转染的HEK细胞上测试全长人CD27表达。产生抗体的细胞从大鼠脾脏分离,并根据标准程序与小鼠骨髓瘤细胞(Ag8)融合。提取来自产生CD27特异性抗体的杂交瘤的RNA,用于测序。

[0802] 基于与原代T细胞的结合和体外CD27结合竞争测定中的多样性,从一组71个CD27抗体中选择6个抗体用于进一步表征。这六个抗体在本文中命名为IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C、IgG1-CD27-D、IgG1-CD27-E和IgG1-CD27-F。

[0803] 基因合成感兴趣的重链和轻链的可变区,该可变区在一些情况下具有单点突变以去除被认为不利于制备的氨基酸残基(例如,游离半胱氨酸或糖基化位点),并将其克隆到含有人抗体轻链和人IgG1重链的骨架序列的表达载体中。

[0804] 根据Eu编号,通过引入一个或多个以下氨基酸突变生成六种不同抗体的Fc变体:E345R、E430G、P329R、G237A、K326A、E333A,参见下表1和3。如下所述进行体外功能表征后,CD27特异性IgG1-CD27-A(VH SEQ ID NO:4;VL SEQ ID NO:8)被认为具有最佳的生物学特

性。本文用作基准的现有技术靶向CD27的抗体的序列获得如下:IgG1-CD27-15(WO2012004367;SEQ ID NO:3和4)、IgG1-CD27-131A(WO2018/058022;SEQ ID NO:10和15)、IgG1-CD27-CDX1127(WO2016145085;SEQ ID NO:1和2)和IgG1-CD27-BMS986215(WO2019195452A1;SEQ ID NO:8和9)。I型抗人CD20抗体的VH和VL序列先前已在WO2019/145455A1(SEQ ID NO:35和39)中描述。

[0805] DuoBody-PD-L1x4-1BB是双特异性抗体,基于DuoBody技术平台(WO2011131746A2),其用一个臂结合PD-L1,并且用另一个臂结合4-1BB(WO2021/156326A1)。使用亲本克隆IgG1-CD137-009-H7(HC SEQ ID NO:75;LC SEQ ID NO:76;HCDR1 SEQ ID NO:80、HCDR2 SEQ ID NO:81、HCDR3 SEQ ID NO:82、LCDR1 SEQ ID NO:84、LCDR2:GAS、LCDR3 SEQ ID NO:85)和IgG1-PD-L1-547(HC SEQ ID NO:77;LC SEQ ID NO:78;HCDR1 SEQ ID NO:87、HCDR2 SEQ ID NO:88、HCDR3 SEQ ID NO:89、LCDR1 SEQ ID NO:91、LCDR2:DDN、LCDR3 SEQ ID NO:91)生成DuoBody-PD-L1x4-1BB。作为对照抗体,在本申请中使用抗HIV gp120抗体IgG1-b12(Barbas et al.,J Mol Biol 1993 230:812-823;VH:SEQ ID NO:68,VL:本申请的SEQ ID NO:72)。

[0806] 表1-氨基酸序列表

[0807]

SEQ ID NO:	标识	氨基酸序列
1	人 CD27	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQ MCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESC RHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNP SLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQL PARTLSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQR RKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACS P
2	CD27-A59T 变体	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQ MCEPGTFLVKDCDQHRK**T**AQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESC RHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNP SLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQL PARTLSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQR RKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACS P
3	Cyno CD27	MARPHPWWLCFLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQ MCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCHPCIPGVSFSPDHHTRPHCESC RHCNSGLLIRNCTITANAVCACRNGWQCRDKECTECDPPPNPS LTTWPSQALGPHPQPTHLPYVNEMLEARTAGHMQTLADFRHL PARTLSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGTLFLHQQ RKYRSNKGESPMEPAEPCPYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPASS

[0808]

		P
4	CD27-A VH	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAP GQGPEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTTVTTTYLQIS SLKAEDTAVYFCAREAGSFDYWGQGTLVTVSS
5	CD27-A VH CDR1	GYTFTTYA
6	CD27-A VH CDR2	INTNTGNP
7	CD27-A VH CDR3	AREAGSFDY
8	CD27-A VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPG RAPKLVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEAD YYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVL
9	CD27-A VL CDR1	SSDVYYYNY
10	CD27-A VL CDR2	DVS
11	CD27-A VL CDR3	SSYTVNRVWV
12	恒定区人 IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	恒定区人 IgG1-E345R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[0809]

		KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	恒定区人 IgG1-P329R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**A PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	恒定区人 IgG1-delK E345R+P32 9R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**A PIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
16	人κLC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	人λLC	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
18	恒定区人 IgG1m(f)- delK	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA

[0810]

		PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
19	恒定区人 IgG1m(a)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	恒定区人 IgG1m(x)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK
21	恒定区人 IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	恒定区人 IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPP

[0811]

		KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
23	恒定区人 IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
24	具有 E345R+P32 9R 的 CD27-A IgG1 HC	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAP GQGPEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTTVTTTYLQIS SLKAEDTAVYFCAREAGSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQ PRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	CD27-A LC	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPG RAPKLVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEAD YYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS
26	小鼠 CD27	MAWPPPYWLCMLGTLVGLSATLAPNSCPDKHYWTGGGLCCR

[0812]

		MCEPGTFFVKDCEQDRTAAQCDPCIPGTSFSPDYHTRPHCESC RHCNSGFLIRNCTVTANAECSCSKNWQCRDQECTECDPPLNPA LTRQPSETPSPQPPPTHLPHGTEKPSWPLHRQLPNSTVYSQRSS HRPLCSSDCIRIFVTFSSMFLIFVLGAILFFHQRRNHGPNEDRQA VPEEPCPYSCPREEEGSAIPIQEDYRKPEPAFYP
27	人 IgG1-Fc-E345R+P329R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**A PIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	恒定区人 IgG1m(f)(不含 c 端赖氨酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	恒定区人 IgG1-E345R(不含 c 端赖氨酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	恒定区人 IgG1-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH

[0813]

	P329R(不含c端赖氨酸)	KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**A PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	恒定区人IgG1m(a)(不含c端赖氨酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	恒定区人IgG1m(x)(不含c端赖氨酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPG
33	恒定区人IgG2(不含c端赖氨酸)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
34	恒定区人	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

[0814]

	IgG3(不含 c 端赖氨酸)	GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
35	具有 E345R-P329R 的 CD27-A IgG1 HC(不含 c 端赖氨酸)	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAP GQGPEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTTVTTTYLQIS SLKAEDTAVYFCAREAGSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQ PRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
36	人 IgG1-Fc-E345R+P329R(不含 c 端赖氨酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRA PIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
37	恒定区人 HC IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[0815]

		KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	恒定区人 HC IgG1m(f)-L234F-L235E-G236R 和变体	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**$X_1X_2X_3$**GPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 其中： **X_1**=A、V、L、I、P、F、M 或 W，优选 I、P、F、M 或 W，更优选 F； **X_2**=L、D 或 E，优选 D 或 E，更优选 E； **X_3**=不是 G，优选 K、R 或 H，更优选 R； 最优选 **$X_1X_2X_3$** = FER
39	恒定区人 HC IgG1m(f)-L234F-L235E-G236R-K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**R**LTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
40	恒定区人	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

[0816]

	HC IgG1m(f)-E430G	GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMH**G**ALHNHYTQKSLSLSPG
41	恒定区人 HC IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
42	恒定区人κ LC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
43	重链人 IgG1-LALA	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
44	HCDR 3 Kabat 和	AFYDDYDYNV

[0817]

	IMGT 的交集 (= Kabat)	
45	HCDR 3 IMGT	ARAFYDDYDYNV
46	HCDR 2 Kabat 和 IMGT 的交集 (= IMGT)	ISGGTIG
47	HCDR 2 Kabat	IISGGTIGHYASWAKG
	HCDR 1 Kabat 和 IMGT 的交集	SYN
48	HCDR 1 Kabat	SYNMG
49	HCDR 1 IMGT	GFSLYSYN
50	LCDR 3 交集 = Kabat = IMGT	AGGYSSSSDTT
	LCDR2 Kabat 和 IMGT 的交集 (= IMGT)	QAS
51	LCDR2 Kabat	QASKLET
52	LCDR1	QSVYGNNQ

[0818]

	Kabat 和 IMGT 的交集 (= IMGT)	
53	LCDR1 Kabat	QSSQSVYGNNQLS
54	VH MAB-19-0202	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLYSYNMGWVRQAPGK GLEYIGIISGGTIGHYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTED TATYFCARAFYDDYDYNVWGPGTLVTVSS
55	VL MAB-19-0202	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQSVYGNNQLSWYQQKP GQPPKLLIYQASKLETGVPSRFKGSGSGTQFTLTISDLESDDAA TYYCAGGYSSSSDTTFGGGTEVVVK
56	VH IgG1-PD1 (衍生自 MAB-19-0202 的 H5)	QVQLVESGGGLVQPGTSLRLSCSVS**GFSLYSYN**MGWVRQAPG KGLEYIGI**ISGGTIG**HYASWAKGRFTISRDTSKTTLYLQMNSLT TEDTATYFC**ARAFYDDYDYNV**WGPGTLVTVSS
57	VL IgG1-PD1 (衍生自 MAB-19-0202 的 L4)	AIQLTQSPSSLSASVGGTVTITCQSS**QSVYGNNQ**LSWYQQKPG QPPKLLIY**QAS**KLETGVPSRFRGSGSGTQFTLTISSLQSEDFATY YC**AGGYSSSSDTT**FGGGTEVVVK
58	人 PD-1 完整	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALL VVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPED RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAIS LAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVV GVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPS AVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGM GTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

[0819]

59	人 PD-1 完整的细胞外结构域	FLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNW YRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMS VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVP TAHPSPSPRPAGQFQTLV
60	核酸人 PD-1	agtttcccttccgctcacctccgcctgagcagtggagaaggcggcactctggtggggctgctccag gcatgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactgggctggcggcc aggatggttcttagactccccagacaggccctggaacccccccaccttctccccagccctgctcgt ggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagcttctccaacacatcggagagcttcgtgct aaactggtaccgcatgagccccagcaaccagacggacaagctggccgccttccccgaggaccg cagccagcccggccaggactgccgcttccgtgtcacacaactgcccaacgggcgtgacttccaca tgagcgtggtcagggcccggcgcaatgacagcggcacctacctctgtggggccatctccctggcc cccaaggcgcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcagggtgacagagagaagggcaga agtgcccacagcccaccccagcccctcacccaggccagccggccagttccaaaccctggtggtt ggtgtcgtgggcggcctgctgggcagcctggtgctgctagtctgggtcctggccgtcatctgctcc cgggccgcacgagggacaataggagccaggcgcaccggccagcccctgaaggaggacccctc agccgtgcctgtgttctctgtggactatggggagctggatttccagtggcgagagaagaccccgga gccccccgtgccctgtgtccctgagcagacggagtatgccaccattgtctttcctagcggaatgggc acctcatccccgcccgcaggggctcagctgacggccctcggagtgcccagccactgaggcctg aggatggacactgctcttggcccctctgaccggcttccttggccaccagtgttctgcagaccctcca ccatgagcccgggtcagcgcatttcctcaggagaagcaggcagggtgcaggccattgcaggccg tccaggggctgagctgcctgggggcgaccggggctccagcctgcacctgcaccaggcacagcc ccaccacaggactcatgtctcaatgcccacagtgagcccaggcagcaggtgtcaccgtcccctac agggagggccagatgcagtcactgcttcaggtcctgccagcacagagctgcctgcgtccagctcc ctgaatctctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgcctgcggcccggggctgaaggcgccgtg gccctgcctgacgccccggagcctcctgcctgaacttgggggctggttggagatggccttggagc agccaaggtgcccctggcagtggcatcccgaaacgccctggacgcagggcccaagactgggca caggagtgggaggtacatggggctggggactccccaggagttatctgctcctgcaggcctagag aagtttcagggaaggtcagaagagctcctggctgtggtgggcagggcaggaaacccctccaccctt tacacatgcccaggcagcacctcaggccctttgtggggcagggaagctgaggcagtaagcgggc

[0820]

		aggcagagctggaggcctttcaggcccagccagcactctggcctcctgccgccgcattccacccc agcccctcacaccactcgggagagggacatcctacggtcccaaggtcaggagggcagggctgg ggttgactcaggcccctcccagctgtggccacctgggtgttgggagggcagaagtgcaggcacct agggcccccatgtgcccaccctgggagctctccttggaacccattcctgaaattatttaaaggggtt ggccgggctcccaccagggcctgggtgggaaggtacaggcgttccccgggggcctagtacccc cgccgtggcctatccactcctcacatccacacactgcacccccactcctggggcagggccaccag catccaggcggccagcaggcacctgagtggctgggacaagggatccccttccctgtggttctatt atattataattataattaaatatgagagcatgctaaggaaaa
61	VH CD52-CAMPATH-1H	QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVS**GFTFTDFY**MNWVRQPPG RGLEWIGF**IRDKAKGYTT**EYNPSVKGRVTMLVDTSKNQFSLR LSSVTAADTAVYYC**AREGHTAAPFDY**WGQGSLVTVSS
62	VH CD52-CAMPATH-1H CDR1	GFTFTDFY
63	VH CD52-CAMPATH-1H CDR2	IRDKAKGYTT
64	VH CD52-CAMPATH-1H CDR3	AREGHTAAPFDY
65	VL CD52-CAMPATH-1H	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS**QNIDKY**LNWYQQKPGK APKLLIY**NTN**NLQTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYY C**LQHISRPRT**FGQGTKVEIK
66	VL CD52-CAMPATH-1H CDR1	QNIDKY
	VL CD52-CAMPATH-	NTN

[0821]

	1H CDR2	
67	VL CD52-CAMPATH-1H CDR3	LQHISRPRT
68	VH gp120-b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPG QRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSANTAYMEL RSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTTVI VSS
69	VH gp120-b12 CDR1	GYRFSNFV
70	VH gp120-b12 CDR2	INPYNGNK
71	VH gp120-b12 CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV
72	VL gp120-b12	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQA PRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC QVYGASSYTFGQGTKLERK
73	VL gp120-b12 CDR1	HSIRSRR
	VL gp120-b12 CDR2	GVS
74	VL gp120-b12-CDR3	QVYGASSYT
75	CD137-009 重链	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPG KGLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSL KTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

[0822]

		QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
76	CD137-009 轻链	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKPGKA PKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC HYYATISGLGVAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
77	PD-L1-547 重链	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFSTYAMSWVRQAPG KGLEWVSGFSGSGGFTFYADSVRGRFTISRDSSKNTLFLQMSS LRAEDTAVYYCAIPARGYNYGSFQHWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
78	PD-L1-547 轻链	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAP VLVVYDDNDRPSGLPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYY CQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
79	VH_CD137-009-H7	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPG KGLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSL KTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSS
80	VH_CD137-009-H7_CDR1	GFSLNDYW
81	VH_CD137-	IDVGGSL

[0823]

	009-H7_CDR2	
82	VH_CD137-009-H7_CDR3	ARGGLTYGFDL
83	VL_CD137-009-L2	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKPGKAPKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEIK
84	VL_CD137-009-L2_CDR1	EDISSY
	VL_CD137-009-L2_CDR2	GAS
85	VL_CD137-009-L2_CDR3	HYYATISGLGVA
86	VH-PD-L1-547	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVSGFSGSGGFTFYADSVRGRFTISRDSSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAIPARGYNYGSFQHWGQGTLVTVSS
87	VH- PD-L1-547-CDR1	GSTFSTYA
88	VH- PD-L1-547-CDR2	FSGSGGFT
89	VH- PD-L1-547-CDR3	AIPARGYNYGSFQH
90	VL- PD-L1-547	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDNDRPSGLPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL
91	VL- PD-L1-547-CDR1	NIGSKS

[0824]

	VL- PD-L1-547-CDR2	DDN
92	VL- PD-L1-547-CDR3	QVWDSSSDHVV
93	IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**R**LTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	IgG1-FEAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF**L**LYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	不含 C 端赖氨酸的 IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**R**LTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
96	不含 C 端赖氨酸的 IgG1-FEAL-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPK

[0825]

	Fc	DTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF**L**LYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
97	人 CD137(UniProtKB-Q07011；成熟序列)	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQ CKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQG QELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTS TALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCEL
98	人 PD-L1(UniProtKB-Q9NZQ7;成熟序列)	FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEME DKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITD VKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREE KLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAH PPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDT NSKKQSDTHLEET
99	派姆单抗 VH CDR1	GYTFTNYY
100	派姆单抗 VH CDR2	INPSNGGT
101	派姆单抗 VH CDR3	ARRDYRFDMGFDY
102	派姆单抗 VL CDR1	KGVSTSGYSY
	派姆单抗 VL CDR2	LAS
103	派姆单抗 VL CDR3	QHSRDLPLT
104	派姆单抗	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAP

[0826]

	VH	GQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMEL KSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS
105	派姆单抗 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQK PGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK
106	派姆单抗重链	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAP GQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMEL KSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGLTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
107	派姆单抗轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQK PGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
108	纳武单抗重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMN SLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV

[0827]

		LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK
109	纳武单抗轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
110	阿替利珠单抗重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPG KGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
111	阿替利珠单抗轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
112	MAB-19-0202-HC FR1	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLY
113	MAB-19-	WVRQAPGKGLEYIG

[0828]

	0202-HC FR2	
114	MAB-19-0202-HC FR3	RFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCAR
115	MAB-19-0202-HC FR4	WGPGTLVTVSS
116	MAB-19-0202-LC FR1	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC
117	MAB-19-0202-LC FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
118	MAB-19-0202-LC FR3	GVPSRFKGSGSGTQFTLTISDLESDDAATYYC
119	MAB-19-0202-LC FR4	FGGGTEVVVK
120	MAB-19-0202-H5 FR1	QVQLVESGGGLVQPGTSLRLSCSVSGFSLY
121	MAB-19-0202-H5 FR2	WVRQAPGKGLEYIG
122	MAB-19-0202-H5 FR3	RFTISRDTSKTTLYLQMNSLTTEDTATYFCAR
123	MAB-19-0202-H5	WGPGTLVTVSS

[0829]

	FR4	
124	MAB-19-0202-L4 FR1	AIQLTQSPSSLSASVGGTVTITC
125	MAB-19-0202-L4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
126	MAB-19-0202-L4 FR3	GVPSRFRGSGSGTQFTLTISSLQSEDFATYYC
127	MAB-19-0202-L4 FR4	FGGGTEVVVK
128	恒定区人 HC IgG1m(f)-L234F-L235E-G236R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**GPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
129	人 PD-L1(UniProtKB - Q9NZQ7; incl.信号肽序列: aa 1-18)	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECFPV EKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRAR LLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITV KVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSD HQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLD PEENHTAELVIPELPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRL RKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
130	人 CD137(UniP	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQ ICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECD

[0830]

	rotKB - Q07011; incl.信号肽序列: aa 1-23)	CTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQ KRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASS VTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
131	IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LNluc	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPG RAPKLVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEAD YYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE **CSSLGSSGVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLF QNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQI EKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPY EGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTIN GVTGWRLCERILA**
132	IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LHalo	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPG RAPKLVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEAD YYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE **CSSLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHYVEVLGERMH YVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAP DLIGMGKSDKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIH DWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFA RETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEM DHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMD WLHQSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDI GPGLNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG**
133	IgG1-b12-P329R-E345R-	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQA PRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC QVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS

[0831]

	LNLuc	VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECS **LGSSGVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNL GVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIF KVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIA VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVT GWRLCERILA**
134	IgG1-b12-P329R-E345R-LHalo	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQA PRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC QVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECS **LEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVD VGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIG MGKSDKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIHDWG SALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFARETF QAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHY REPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLH QSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDIGPGL NLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG**
135	IgG1-CD27-A-LNLuc	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPG RAPKLVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEAD YYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS**SLGSSGVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLF QNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQI EKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPY EGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTIN GVTGWRLCERILA**
136	IgG1-CD27-	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPG

[0832]

	A-LHalo	RAPKLVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEAD YYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE **CSSLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHYVEVLGERMH YVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAP DLIGMGKSDKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIH DWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFA RETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEM DHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMD WLHQSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDI GPGLNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG**
137	IgG1-CD20-11B8-E430G-LNLuc	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSDWPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**SLGS SGVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVS VTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVV YPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFD GKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWR LCERILA**
138	IgG1-CD37-37.3-E430G-LHalo	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIRSNLAWYQQKQGKS PQLLVNVATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTY YCQHYWGTTWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC **SLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHYVEVLGERMHYV DVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLI GMGKSDKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIHDW GSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFARE**

[0833]

		TFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDH YREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWL HQSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDIGPG LNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG
139	IgG1-PD1 重链	QVQLVESGGGLVQPGTSLRLSCSVS**GFSLYSYN**MGWVRQAPG KGLEYIGI**ISGGTIG**HYASWAKGRFTISRDTSKTTLYLQMNSLT TEDTATYFC**ARAFYDDYDYNV**WGPGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
140	IgG1-PD1 轻链	AIQLTQSPSSLSASVGGTVTITCQSS**QSVYGNNQ**LSWYQQKPG QPPKLLIY**QAS**KLETGVPSRFRGSGSGTQFTLTISSLQSEDFATY YC**AGGYSSSSDTT**FGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

[0834] 实施例2:抗CD27抗体在CD27激活报告细胞测定中的激动剂活性

[0835] 使用CD27 Thaw and Use生物测定试剂盒(Promega,Custom Assay Services,CAS#CS1979A25)测量具有和不具有E345R或E430G六聚化增强的Fc突变的不同抗CD27抗体的CD27激动剂活性。该试剂盒含有NF-κB报告基因-Jurkat重组细胞,其在NF-κB应答元件的控制下表达萤火虫荧光素酶基因并且组成型表达人CD27,并基本上根据制造商的说明书使用。简而言之,解冻Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/CD27 Jurkat细胞,并在Bio-Glo荧光素酶测定缓冲液中,将其与抗体稀释系列(最终浓度范围0.04-20μg/mL)在96孔平底培养板(PerkinElmer,Cat#6005680)中,在37℃、5% CO_2下孵育6小时。抗CD27抗体是野生型(WT*)IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C、IgG1-CD27-D、IgG1-CD27-E、IgG1-CD27-F和每种抗体的携带E430G或E345R突变的变体。抗CD27基准抗体是IgG1-CD27-131A(WT和E430G变体)和非六聚化IgG1-CD27-15(IgG1-CD27-15-P329R-E345R-K439E,其携带防止六聚化的Fc突变的组合,因此突变在本实验的背景下是功能上不相关的,因此在图中称为WT)和包含E345R突变的IgG1-CD27-15的六聚化变体。抗HIV gp120人抗体,IgG1-b12-E345R,用作非结合阴性对照抗体(ctrl)。抗体孵育后,将Bio-Glo荧光素酶测定试剂(平衡

至室温)添加到每个孔中并在室温下孵育5-10分钟。使用EnVision Multilabel Reader(PerkinElmer)测量发光,并在使用GraphPad Prism软件生成的条形图中以相对发光单位(RLU)呈现。

[0836] 与抗体克隆IgG1-CD27-A至-E以及基准抗体IgG1-CD27-131A(用E430G测试)和IgG1-CD27-15(用E345R测试;图1)的对应的WT抗体相比,六聚化增强的Fc突变(E345R或E430G)的引入导致增强的CD27激动作用。

[0837] 然而,IgG-CD27-A、B和C在引入E430G或E345R后,在所有测试浓度下都表现出增强的CD27激动剂活性,含有六聚化增强的突变的IgG1-CD27-D和E变体在最低抗体浓度下没有表现出增强的激动作用。具有E430G或E345R突变的IgG1-CD27-F变体仅在测试的最高抗体浓度下显示出增强的CD27激动作用。对于变体IgG1-CD27-A至-E,E345R突变的引入导致比E430G突变更强的CD27激活。分别与具有E430G突变的IgG1-CD27-131A或具有E345R突变的CD27-15相比,具有E345R突变的抗体IgG1-CD27-A至-E显示出更高或相似的CD27激活。

[0838] *IgG1-CD27-B和IgG1-CD27-F的WT抗体在IgG Fc结构域中携带F405L突变,该突变在本实验的背景下是功能上不相关的。

[0839] 实施例3抗人CD27抗体对重组人、小鼠和食蟹猴CD27的结合亲和力

[0840] 在Octet HTX仪器(FortéBio,Portsmouth,UK)上使用无标记生物层干涉测定法确定五种抗人CD27 IgG1抗体(IgG1-CD27-A、-B、-C、-D和-E)对重组人、食蟹猴和小鼠CD27蛋白的结合亲和力。使用包含一个CD27特异性Fab臂和非结合Fab臂的双特异性抗体进行实验,使得该抗体对于CD27是单价的。这些双特异性抗体通过CD27抗体和非结合抗体之间受控的Fab臂交换生成(如Labrijn AF et al.,Nat Protoc.2014Oct;9(10):2450-63中所述)。

[0841] 为了确定CD27抗体对人和小鼠CD27的亲和力,将100nM重组His标记的小鼠或人CD27蛋白(Sino Biological,Cat#10039-H08B1[人],Cat#50110-M08H[小鼠])加载到预先设定的抗-五-HIS(HIS1K)生物传感器(FortéBio,Cat#18-5120)上,持续600sec。

[0842] 为了评估CD27抗体对食蟹猴CD27的亲和力,将5μg/mL重组食蟹猴CD27-Fc融合蛋白(R&D系统,Cat#9904-CD-100)加载到激活的胺反应性第二代(AR2G)生物传感器(FortéBio,Cat#18-5092)上。

[0843] 在样品稀释剂(FortéBio,Cat#18-1104)中进行300sec的基线测量后,在样品稀释剂中以两倍稀释步骤确定0.78-800nM抗体浓度系列的CD27抗体的缔合(200sec)和解离(1,000sec)。使用150kDa的抗体分子量进行计算。将参考传感器与样品稀释剂一起孵育。

[0844] 使用数据采集软件v11.1.1.19(FortéBio)采集数据,并用数据分析软件v9.0.0.14(FortéBio)进行分析。通过减去参考传感器校正每个抗体的数据踪迹。将Y轴与基线的最后10sec进行比对,并应用解离和Savitzky-Golay滤波的步骤间校正比对。当响应<0.05nm,并且计算的平衡接近饱和(使用50sec的解离时间,Req/Rmax>95%)时,从分析中排除数据踪迹。将数据用1:1模型拟合,使用设定为200sec的关联感兴趣窗口和设定为50sec的解离时间。基于决定系数(R^2)选择解离时间,其是对曲线拟合优度的估计(优选>0.98),曲线的视觉检查,以及在缔合步骤期间至少5%的信号衰减。

[0845] 可以准确地确定三种CD27抗体(IgG1-CD27-A、-B、-C)对人CD27的亲和力,其中K_D值在纳摩尔范围内(表2)。对于IgG1-CD27-D和-E,生物层干涉测定实验证实了其与人类

CD27的结合亲和力在相似的范围内,尽管次优的曲线拟合不允许计算精确的K_D值(如表2所示)。

[0846] IgG1-CD27-A和-B也显示出与重组食蟹猴CD27的结合,其中K_D值在与人CD27的结合相同的范围内。用IgG1-CD27-C、-D和-E获得的结果也证实了与食蟹猴CD27结合,亲和力在相似范围内,尽管次优曲线拟合不允许计算精确的K_D值(如表2所示)。

[0847] 对于抗体IgG1-CD27-C,仅观察到与重组小鼠CD27的结合。

[0848] 表2.IgG1-CD27-A至-E抗体对来自指定物种的CD27的结合亲和力。

[0849]

样品	加样	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
IgG1-CD27-A	人 CD27-His	1.3E-07	1.3E+05	1.8E-02
	小鼠 CD27-His	n.b.		
	Cyno CD27-Fc	1.2E-07	1.7E+05	2.0E-02
IgG1-CD27-B	人 CD27-His	5.4E-08	3.3E+05	1.8E-02
	小鼠 CD27-His	n.b.		
	Cyno CD27-Fc	3.5E-08	6.5E+05	2.3E-02
IgG1-CD27-C	人 CD27-His	7.0E-08	1.4E+05	9.8E-03
	小鼠 CD27-His	4.3E-07	5.0E+04	2.2E-02
	Cyno CD27-Fc	5.1E-08*	1.2E+05*	6.4E-03*
IgG1-CD27-D	人 CD27-His	4.5E-08*	1.4+05*	6.4E-03*
	小鼠 CD27-His	n.b.	n.b.	n.b.
	Cyno CD27-Fc	2.1E-08*	2.4E+05*	5.0E-03*
IgG1-CD27-E	人 CD27-His	4.9E-08*	1.3+05*	6.4E-03*
	小鼠 CD27-His	n.b.	n.b.	n.b.
	Cyno CD27-Fc	3.5E-08*	1.6E+05*	5.5E-03*

[0850] *:观察到结合,但由于次优曲线拟合,KD、k_{on}和k_{dis}是不太可靠的值,导致使用1:1模型的解释不可靠。

[0851] n.b.:未观察到结合。

[0852] 实施例4:抗CD27抗体与细胞表面表达的人和食蟹猴CD27的结合

[0853] 使用瞬时转染的HEK293F细胞和内源表达CD27的原代T细胞,通过流式细胞术分析抗CD27抗体IgG1-CD27-A至E*和现有技术IgG1-CD27-131A*与细胞表面表达的人和食蟹猴CD27的结合。非结合对照抗体IgG1-b12-FEAR用作阴性对照抗体。

[0854] 根据制造商的说明使用293fectin转染试剂(ThermoFisher,Cat#12347019),用编码全长人或食蟹猴CD27的哺乳动物表达载体pSB瞬时转染FreeStyle 293-F悬浮细胞(HEK293F;ThermoFisher,Cat#R79007)。

[0855] 根据制造商的说明书,通过使用淋巴细胞分离培养基(LSM;Corning,Cat#25-072CV)的低密度梯度离心,从获自人健康供体(Sanquin血库,荷兰)或食蟹猴(BPRC,荷兰,

Cat#S-1135)的白细胞层纯化人和食蟹猴PBMC。

[0856] 将细胞接种在96孔板(每孔100,000个细胞;Greiner Bio-one,Cat#650180)中,用于顺序孵育,其间进行FACS缓冲液洗涤步骤,该缓冲液由PBS(Lonza,Cat#BE17-517Q)+1%BSA(Roche,Cat#10735086001)+0.02%叠氮化钠(Bio-World,Cat#41920044-3)组成。应用以下孵育:抗体浓度系列(0.0001-10μg/mL终浓度)在4℃下30分钟;活/死标志物FVS510(BD,Cat#564406,在PBS中1:1,000稀释)在室温下20分钟;PE标记的多克隆山羊抗人IgG(Jackson Immuno Research,Cat#109-116-098,1:500稀释)在4℃下30分钟;和用于T细胞鉴定的抗CD3抗体(抗人CD3:BD,Cat#555335,1:10稀释;抗cyno CD3:Miltenyi,Cat#130-091-998,1:10稀释)在4℃下30分钟。在FACSCelesta流式细胞仪(BD)和FlowJo软件上分析所有样品。使用GraphPad Prism对数据进行处理和可视化。

[0857] 所有测试的抗体在人T细胞和转染的HEK293F细胞上均显示出与人CD27的剂量依赖性结合(图2A、B)。与IgG1-CD27-A和IgG1-CD27-131A的中等结合以及IgG1-CD27-D和IgG1-CD27-E的低结合相比,观察到IgG1-CD27-B和IgG1-CD27-C的最高的最大结合,其中使用人T细胞差异最明显。对于与食蟹猴CD27 T细胞的结合,观察到IgG1-CD27-B的结合最高,其次是Ig1-CD27-131A和IgG1-CD27-A。观察到IgG1-CD27-D和-E的结合较低,而IgG1-CD27-C显示出与食蟹猴T细胞的最小结合。所有CD27抗体均显示出与用食蟹猴CD27转染的HEK细胞的剂量依赖性结合。对于IgG1-CD27-B和IgG1-CD27-131-A观察到最高的最大结合,对于IgG1-CD27-A、-D和-E观察到稍低的结合。IgG1-CD27-C显示出与用食蟹猴CD27转染的HEK细胞的最低结合(图2C,D)。

[0858] 总之,IgG1-CD27-A和IgG1-CD27-B显示出与在人或食蟹猴T细胞上内源性表达以及在转染的HEK细胞中瞬时表达的人和食蟹猴CD27的剂量依赖性结合,。IgG1-CD27-A和IgG-CD27-131A显示出与人T细胞相当的结合,而IgG1-CD27-B显示出更高的最大结合。

[0859] *N.B.IgG1-CD27-A、-B、-C、-D和-E在IgG Fc结构域中携带突变F405L-L234F-L235E-D265A,其在本实验的背景下是功能上不相关的。IgG1-CD27-131A在IgG1 Fc结构域中携带功能上不相关的F405L突变。

[0860] 实施例5:抗CD27抗体与天然人CD27-A59T变体的结合

[0861] 大约19%的人群在胞外域中表达携带A59T突变的天然CD27变体(SEQ ID NO.2)。通过流式细胞术测试抗CD27抗体IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C*和基准IgG1-CD27-131A与人CD27-A59T的结合。非结合抗体IgG1-b12-FEAL用作阴性对照抗体。将瞬时转染的表达人CD27-A59T的HEK293F细胞(15,000个细胞/孔)与系列浓度(0.0001-10μg/mL,使用10倍稀释步骤)的初级测试抗体IgG1-CD27-A至-C、非结合对照抗体IgG1-b12(ctrl)和现有技术基准IgG-CD27-131A(其先前已描述为结合CD27-A59T(WO2018/058022))一起孵育。孵育后,用多克隆山羊抗人IgG对抗体进行PE标记。在FACSCelesta流式细胞仪(BD)和FlowJo软件上分析结合。使用GraphPad Prism v.8对数据进行处理和可视化。

[0862] 测试的抗CD27抗体IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C和IgG1-CD27-131A显示出与CD27-A59T转染的HEK293F细胞的剂量依赖性结合,在不同抗体之间具有相似的结合曲线(图3)。

[0863] *N.B.IgG1-CD27-A、-B和-C在IgG Fc结构域中携带突变F405L-L234F-L235E-D265A,其在本实验的背景下是功能上不相关的。IgG1-CD27-131A在IgG1 Fc结构域中携带

功能上不相关的F405L突变。

[0864] 实施例6:抗CD27抗体诱导人T细胞增殖

[0865] 由于在引入E345R或E430G突变时通过Fc-Fc相互作用增强的IgG六聚化增强了抗CD27抗体的CD27激动剂活性(实施例2),在体外测试了携带E430G或E345R突变的IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B和IgG1-CD27-C抗体变体增加TCR活化的T细胞增殖的能力。

[0866] 另外,引入据报道可以减少与C1q和Fc γR的结合(G237A或P329R)或增强与C1q的结合(K326A/E333A双突变)的Fc突变,以测试其对携带E345R或E430G突变的CD27抗体的CD27激动剂活性的潜在影响。K326A/E333A双突变先前被证明可以增强C1q的结合,并有助于增强DR5特异性人源IgG1抗体的激动活性,该抗体包括Fc-Fc相互作用增强的突变(WO2018/146317A1)。除了E430G或E345R之外,将突变G237A、P329R或K326A/E333A引入IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B和IgG1-C(表3),并且使用从健康供体(Sanquin血库,荷兰)获得的人PBMC确定它们对T细胞增殖的影响。

[0867] 表3.抗体IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B或IgG1-CD27-C的Fc结构域中的突变及其生物学效应

[0868]

Fc 突变	E430G	E345R	P329R	G237A	K326/E333A
描述的效应	增强的六聚化	增强的六聚化	降低的 C1q/FcγR 结合	降低的 C1q/FcγR 结合	增强的 C1q 结合
抗体*					
IgG1-CD27-X-E430G	+				
IgG1-CD27-X-P329R-E430G	+		+		
IgG1-CD27-X-G237A-E430G	+			+	
IgG1-CD27-X-K326A-E333A-E430G	+				+
IgG1-CD27-X-E345R		+			
IgG1-CD27-X-P329R-E345R		+	+		
IgG1-CD27-X-G237A-E345R		+		+	
IgG1-CD27-X-K326A-E333A-E345R		+			+

[0869] *IgG1-CD27-X中的X是指IgG1-CD27克隆IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B或IgG1-CD27-C。

[0870] 将PBMC以5x 10^6个细胞/mL的密度重悬于PBS中,并根据制造商的说明使用CellTrace CFSE细胞增殖试剂盒(Invitrogen,Cat#C34564;1:10,000)用CFSE进行标记。CFSE标记的PBMC(100,000个细胞/孔)在补充有5%正常人血清(NHS;Sanquin,Cat#B0625)的T细胞激活培养基(ATCC,Cat#80528190)中,在96孔圆底板(Greiner Bio-one,Cat#650180)中与0.1μg/mL的抗CD3抗体克隆UCHT1(Stemcell Technologies,Cat#60011)孵育以激活T细胞,并且与CD27抗体(最终浓度1μg/mL)在37℃/5% CO_2下一起孵育96h。对于通过流式细胞术鉴定$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞亚群中的活细胞,将细胞与活/死标志物FVS510(1:1,000)在室温下连续孵育20分钟,并且与淋巴细胞标志物的染色混合物在暗处在4℃下孵育30分钟,该染色混合物含有APC-eFluor780标记的抗人CD4抗体(Invitrogen,Cat#47-0048-

42,1:50)、AlexaFluor700标记的抗人CD8a抗体(BioLegend,Cat#301028;1:100)、PE-Cy7标记的小鼠抗人CD14抗体(BD Biosciences,Cat#557742;1:50)和BV785标记的抗人CD19抗体(BioLegend,Cat#363028;1:50)。在FACSCelesta(BD Biosciences)流式细胞仪上测量样品,并且使用FlowJo 10软件分析活$CD4^+$和$CD8^+$T细胞亚群中的CFSE稀释峰($FVS510^-CD14^-CD19^-CD4^+$和$FVS510^-CD14^-CD19^-CD8^+$),作为T细胞增殖的读出。T细胞增殖表示为增殖细胞的百分比或分裂指数,两者均通过使用FlowJo软件(版本10)进行计算。增殖(分裂)细胞的百分比通过对已经经历过CFSE稀释的细胞进行门控来确定($CFSE^{低峰}$)。分裂指数是细胞经历的平均分裂次数。使用GraphPad Prism版本8生成热图。使用来自四个不同健康供体的PBMC进行增殖测定。

[0871] 与对照抗体相比,携带E430G或E345R突变的IgG1-CD27-A、-B和-C变体在四个测试的供体中的两个中诱导CD8+ T细胞增殖的小幅增加。将另外的突变(P329R、G237A或K326A/E333A)引入携带E430G突变的IgG1-CD27-A、-B或-C变体中,在四个PBMC供体中显示出对$CD8^+$ T细胞增殖的不同影响。相反,将P329R突变引入携带E345R突变的IgG1-CD27-A和IgG1-CD27-C变体中持续增加了它们增强活化的$CD8^+$ T细胞增殖的能力。这特别适用于IgG1-CD27-A;而对于IgG-CD27-A-E345R、IgG1-CD27-B-E345R和IgG1-CD27-C-E345R,测量的$CD8^+$ T细胞增殖在每个供体中相当,引入另外的P329R突变始终导致克隆IgG1-CD27-A-E345R相比于IgG1-CD27-B-E345R或IgG1-CD27-C-E345R更高的$CD8^+$ T细胞增殖。因此,在TCR激活的$CD8^+$ T细胞增殖方面,E345R突变与P329R突变组合的效果在克隆IgG1-CD27-A上比在IgG1-CD27-B和IgG1-CD27-C上始终较大。在所有测试的抗体变体中,IgG1-CD27-A-E345R-P329R在所有供体中诱导了$CD8^+$ T细胞增殖的最大增加(图4A)。

[0872] 与包含单一突变E345R的抗体相比,将突变G237A或K326A-E333A添加到携带E345R突变的CD27抗体变体中,在测试的任何克隆中都不会或仅极小程度地增加$CD8^+$ T细胞的增殖(图4A)。

[0873] 同样在$CD4^+$ T细胞中,在IgG1-CD27-A-E345R-P329R存在下观察到T细胞增殖的最高和最一致的增加(图4B)。虽然仅携带E430G或E345R突变的IgG1-CD27-A、-B和-C变体在$CD4^+$ T细胞增殖方面通常是相当的,但引入另外的P329R突变导致携带E345R变体的IgG1-CD27-A变体在$CD4^+$ T细胞增殖方面比携带E430G或E345R突变的IgG1-CD27-A-E430G或IgG1-CD27-B或-C变体有更大的增加。在测试的四个供体中的三个中观察到了这种效应。在供体1中,除了E430G或E345R之外的其他突变对$CD4^+$ T细胞增殖的影响通常很小,并且在该供体中观察到的影响在其他三个供体中没有再现。

[0874] 对于IgG1-CD27-C,E345R与P329R突变的组合也持续增加$CD4^+$ T细胞增殖,尽管单独的E345R突变与E345R和P329R的组合之间的差异对于克隆IgG1-CD27-C小于比对于克隆-A较小。对于克隆IgG1-CD27-B,在四个供体中的两个中观察到,与IgG1-CD27-B-E345R相比,IgG1-CD27-B-E345R-P329R导致$CD4^+$ T细胞增殖适度增加。

[0875] 将P329R、G327A或K326A/E333A突变引入携带E430G突变的IgG1-CD27-A、-B或-C变体中,不会诱导或不会持续诱导对$CD4^+$ T细胞增殖的影响。相似地,在携带E345R突变的IgG1-CD27-A、-B或-C变体中引入G327A或K326A/E333A后,未观察到影响或无持续影响。

[0876] 总之,IgG1-CD27-A-E345R-P329R持续诱导活化的$CD8^+$ T细胞和$CD4^+$ T细胞增殖的最高增加,这表明IgG1-CD27-A-E345R-P329R诱导最有效的CD27激动作用。先前的研究已经

表明,相比于没有P329R突变的DR5特异性六聚化增强型抗体,具有P329R突变的DR5特异性、六聚化增强型抗体在诱导DR5激动作用方面显示出降低的能力(Overdijk et al,Mol Canc Ther2020)。因此,认为令人惊讶的是,在IgG1-CD27-A中,除了E345R突变之外,P329R突变的引入增强了CD27激动剂活性。此外,不知道为什么E345R+P329R突变对于IgG1-CD27-A的组合效应始终大于对于IgG1-CD27-B或IgG1-CD27-C的组合效应。

[0877] 实施例7:抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R对人T细胞增殖的诱导

[0878] 使用人健康供体PBMC,在CSFE稀释测定中分析IgG1-CD27-A-P329R-E345R增加TCR刺激的人$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞增殖的能力,并与现有技术抗CD27克隆IgG1-CD27-131A*、IgG1-CD27-CDX1127和IgG1-CD27-BMS986215*进行比较。如实施例6中所述进行T细胞增殖测定,具有微小偏差(75,000个细胞/孔;浓度范围0.002-10μg/mL)。包括使用不具有抗CD3刺激的T细胞的样品,测试在没有T细胞受体激活的情况下抗体的潜在CD27激动剂活性(图5A和5B)。这种活性是不期望的,因为如果抗体能够诱导静息T细胞的增殖,则会造成安全风险。

[0879] 使用FlowJo软件将增殖的T细胞的百分比(图5A、B、C、D)计算为具有降低的CFSE荧光的细胞的百分比,这表明了细胞分裂。扩增指数(图5E和5F)鉴定了孔中细胞的倍数增加,并使用FlowJo版本10中的增殖建模工具进行计算。必要时对峰值进行手动调整,以便更一致地确定存在的峰的数量。

[0880] 本文测试的本发明的CD27抗体和现有技术抗体均不诱导未刺激的T细胞的增殖(即,在没有CD3交联的情况下)(图5A和B)。

[0881] 大多数CD27抗体在测试的最高抗体浓度下诱导一些活化的$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞的增殖(图5C和D)。基于此,计算扩增指数(图5E和F)。与现有技术抗CD27克隆IgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127和IgG1-CD27-BMS986215相比,本发明的抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R在体外更大地增强了$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞的增殖。

[0882] *对于IgG1-CD27-131A和IgG1-CD27-BMS986215,使用携带F405L突变的变体,其在本实验的背景下是功能上不相关的。

[0883] 实施例8:C1q与膜结合CD27抗体的结合

[0884] P329R突变之前被描述为减少IgG1抗体与C1q和Fcγ R的相互作用(Overdijk et al,Molecular Cancer Therapeutics 2020)。使用人健康供体T细胞,在细胞C1q结合测定中体外测试了P329R突变对包含E345R突变的IgG1-CD27-A的C1q结合的影响。抗HIV gp120人抗体,IgG1-b12-F405L,用作非结合同种型阴性对照抗体(ctrl)。使用RosetteSep人T细胞富集混合物(Stemcell,Cat#15061)从人健康供体PBMC富集T细胞,并将其重悬于培养基(补充有0.1% BSA和1% Pen/Strep[Lonza,Cat#DE17-603E]的RPMI 1640[Gibco,Cat#A10491-01])中。T细胞(2×10^6细胞/孔)在聚苯乙烯96孔圆底板中与抗体稀释系列(从15μg/mL最终测定浓度开始的8x 5倍稀释)在37℃下预孵育15分钟,以使抗体与T细胞结合。然后,将细胞在冰上冷却,补充NHS作为人C1q的来源(20% NHS最终测定浓度),并在冰上孵育45分钟。随后将细胞与FITC标记的兔抗人C1q抗体(DAKO,Cat#F0254;20μg/mL)在冰上孵育30分钟,并重悬于含有TO-PRO-3(ThermoFisher,Cat#T3605;1:5,000稀释)的FACS缓冲液中。通过流式细胞术测量活细胞上的FITC信号来确定C1q结合。

[0885] 膜结合的WT IgG1-CD27-A抗体未显示C1q结合(图6)。六聚化增强突变E430G或E345R(IgG1-CD27-A-E430G和IgG1-CD27-A-E345R)的引入导致C1q与T细胞表面上的CD27抗

体的结合,这与六聚C1q蛋白与细胞表面上的六聚抗体环结构的增加的结合亲和力一致(图6)。在IgG1-CD27-A-E345R中引入P329R突变(IgG1-CD27-A-P329R-E345R)导致C1q结合丧失(图6),这表明IgG1-CD27-A-P329R-E345R不能结合C1q。

[0886] 这些数据显示IgG1-CD27-A-P329R-E345R在结合T细胞的细胞表面上的CD27时不能结合C1q。这表明C1q结合不会有助于IgG1-CD27-A-P329R-E345R的抗体诱导的CD27激动剂活性。这与先前描述的其他六聚化增强的激动性抗体相反。此外,缺乏C1q结合表明IgG1-CD27-A-P329R-E345R不能激活补体激活的经典通路。因此,预计IgG1-CD27-A-P329R-E345R不会诱导T细胞上的补体激活和CDC,这种活性是不被期望的。

[0887] 实施例9:抗CD27抗体与人Fc受体的结合

[0888] 使用Biacore表面等离子体共振(SPR)系统分析IgG1-CD27-A-P329R-E345R与人FcγR变体的结合,并与抗HIV gp120抗体IgG1-b12(ctrl)进行比较。根据制造商的说明书,使用胺耦合和His捕获试剂盒(Cytiva,Cat#BR100050和Cat#29234602)用抗His抗体共价包被Biacore系列S传感器芯片CM5(Cytiva,Cat#29104988)。然后,将HBS-P+(Cytiva,Cat#BR100827)中的125nM FcγR受体FcγRIa、FcγRIIa(167-His[H]和167-Arg[R])、FcγRIIb或FcγRIIIa(176-Phe[F]和176-Val[V])(Sino Biological,Cat#10256-H08S-B,Cat#10374-H27H,Cat#10374-H27H1-B,Cat#10259-H27H1-B,Cat#10389-H27H-B和Cat#10389-H27H1-B)捕获到表面上。在经过三轮缓冲液冲洗后,使用范围为0-3,000nM的FcγRI和0-10,000nM的其他FcγR的抗体,将抗体样品注射36个循环,以生成结合曲线。在FcR包被的表面(活性表面)上分析的每个样品也在没有FcR(参考表面)的平行流动室上进行分析,其用于背景校正。从抗His包被的表面解离是通过使用10mM甘氨酸-HCl pH1.5(Cytiva,Cat#BR100354)再生表面来进行的。使用Biacore Insight评估软件(Cytiva)生成传感图,并应用四参数逻辑(4PL)拟合来计算IgG1-CD27-A-P329R-E345R针对参考样品(ctrl)的相对结合。

[0889] 尽管在较高抗体浓度下观察到一些结合,但与ctrl抗体相比,IgG1-CD27-A-P329R-E345R与高亲和力受体FcγRIa的结合明显降低(图7A)。IgG1-CD27-A-P329R-E345R不与人低亲和力受体FcγRIIa(图7B和C)、FcγRIIb(图7D)和FcγRIIIa(图7E和F)结合。

[0890] 总之,IgG1-CD27A-P329R-E345R显示出与人IgG Fc受体的极小的结合(FcγRIa)或不结合(FcγRIIa、FcγRIIb和FcγRIIIa)。

[0891] 实施例10:抗CD27抗体IgG1-CD27-A-E345R-P329R与人T细胞的结合

[0892] 使用流式细胞术更详细地表征了IgG1-CD27-A-P329R-E345R与人健康供体T细胞上的CD27的结合。抗HIV gp120抗体变体,IgG1-b12-P329R-E345R,用作非结合对照抗体(ctrl)。人PBMC从获自人健康供体的白细胞层中分离。将FACS缓冲液中的PBMC(1x 10^5个细胞/孔)添加到聚苯乙烯96孔圆底板(Greiner bio-one,Cat#650101)中,并通过在4℃下以300xg离心3分钟来沉淀。将细胞重悬于FACS缓冲液中的50μL/孔系列抗体稀释液(以3倍稀释步骤,范围为0.0015至10μg/mL)中,并在4℃下孵育30分钟。将细胞沉淀,用FACS缓冲液洗涤两次,并以50μL/孔与FITC缀合的二抗(FITCAffiniPure F(ab')$_2$片段山羊抗人IgG,F(ab')$_2$片段特异性,Jackson ImmunoResearch,Cat#109-096-097,1:100稀释)在暗处在4℃下一起孵育30分钟。将细胞再次沉淀,用FACS缓冲液洗涤两次,并在50μL/孔的淋巴细胞标志物的染色混合液中在暗处4℃下孵育30分钟,该染色混合液含有BV711标记的抗人CD19抗

体(BioLegend,Cat#302246,1:50)、AlexaFluor700标记的抗人CD8a抗体(BioLegend,Cat#301028,1:100)、APC-eFluor780标记的抗人CD4抗体(Invitrogen,Cat#47-0048-42,1:50)、PE-CF594标记的小鼠抗人CD56抗体(BD Biosciences,Cat#564849,1:100)、PE-Cy7标记的小鼠抗人CD14抗体(BD Biosciences,Cat#557742,1:50)和eFluor450标记的抗人CD3抗体(Invitrogen,Cat#48-0037-42,1:50)。将细胞再次沉淀,使用FACS缓冲液洗涤两次,并重悬于80μL含有死亡细胞标志物7-氨基-放线菌素D(7-AAD;BD Biosciences,Cat#51-68981E,1:240稀释)的FACS缓冲液中。在LSRFortessa(BD)流式细胞仪上通过流式细胞术测量样品,并使用FlowJo软件进行分析。使用GraphPad Prism 8软件,使用非线性回归(具有可变斜率的S形剂量反应)对结合曲线进行分析。

[0893] 抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R显示出与健康供体T细胞的剂量依赖性结合,与$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞具有相似的结合特征(图8)。

[0894] 实施例11:抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R对CD27细胞信号传导的FcγR非依赖性诱导

[0895] 可以诱导不依赖于次级FcγR介导的交联的CD27信号传导的CD27特异性单克隆抗体在不存在FcγR阳性细胞的情况下可能具有免疫刺激性,这在携带FcγR的细胞频率低的肿瘤中是有利的。

[0896] 在存在或不存在携带FcγR的细胞的情况下测试IgG1-CD27-A-P329R-E345R的CD27激动剂活性,并将其与相应的WT抗体IgG1-CD27-A和现有技术抗体IgG1-CD27-131A*、IgG1-CD27-CDX1127和IgG1-CD27-BMS986215*进行比较。非结合抗体IgG1-b12-P329R-E345R用作阴性对照(ctrl)。基本上如实施例2中所述进行CD27报告基因测定,不同之处在于在当前实施例中,Thaw-and-Use GloResponse NFκB-Luc2/CD27 Jurkat细胞在表达人FcγRIIb的细胞的存在下进行培养,可以促进膜结合抗体的FcγR介导的交联。

[0897] 将Thaw-and-Use效应子FcγRIIb CHO-K1细胞(Promega,Cat#JA2251)铺板在96孔平底培养板(PerkinElmer,Cat#0815)中,未稀释或以三个递增的稀释度(1/3,1/9,1/27),并在37℃/5% CO_2下孵育过夜。将贴壁的表达FcγRIIb的细胞的上清液替换为在Bio-Glo荧光素酶测定缓冲液中的固定细胞浓度的Thaw-and-Use NFκB-Luc2/CD27 Jurkat细胞悬浮液(对于未稀释的FcγRIIb CHO-K1细胞,以1:1的NFκB-Luc2/CD27 Jurkat:FcγRIIb CHO-K1比率开始),其中含有抗体的系列稀释(最终浓度范围0.0002-10μg/mL)。在37℃/5% CO_2下孵育6h后,如实施例2所述,将板平衡至室温,测量生物发光并表示为RLU。

[0898] IgG1-CD27-A-P329R-E345R诱导剂量依赖性CD27激活,其不依赖于表达FcγRIIb的细胞(图9A)。相反,相应的WT抗体IgG1-CD27-A,其不含E345R六聚化增强突变和P329R突变,在表达FcγRIIb的细胞存在下仅显示出CD27激动作用(图9A-E)。类似地,通过现有技术抗体IgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127和IgG1-CD27-BMS986215的CD27激活也依赖于表达FcγRIIb的细胞的存在,并且随着NFκB-Luc2/CD27 Jurkat:FcγRIIb CHO-K1比率的降低而逐渐降低(图9F-J)。

[0899] 总之,这些数据表明IgG1-CD27-A-P329R-E345R可以不依赖于次级FcγR介导的交联诱导CD27激动作用。这与依赖于携带FcγR的细胞的存在来诱导CD27激动作用的现有技术抗CD27抗体相反。

[0900] *对于IgG1-CD27-131A和IgG1-CD27-BMS986215,使用携带F405L突变的变体,其在

本实验的背景下是功能上不相关的。

[0901] 实施例12:在小鼠中研究的在不存在靶标结合的情况下的抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R的药代动力学(PK)分析

[0902] 在不存在靶结合的情况下,在小鼠中分析抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R*的药代动力学特征,并与相应的WT抗体IgG1-CD27-A*进行比较。IgG1-CD27-A不结合小鼠CD27(实施例3,表2),因此设计实验以在体内测试在不存在靶标结合的情况下的IgG1-CD27-A和IgG1-CD27-A-P329R-E345R的药代动力学行为。本研究由Crown Bioscience(中国)由合格人员根据批准的IACUC方案和Crown Bioscience,Inc.标准操作程序进行。11-12周龄雌性SCID小鼠(C.B-17,Vital River Laboratory Animal Technology Co.,Ltd.(VR,北京,中国;每组3只小鼠)以200μL的注射体积静脉注射500μg抗体(25mg/kg)。在抗体施用后10分钟、4h、1d、2d、7d、14d和21d收集40μL血液样品,从血液样品中收集血浆并将其储存在-80℃直至通过ELISA确定总人IgG浓度。将96孔ELISA板(Greiner,Cat#655092)在4℃下用2μg/mL抗人IgG(Sanquin,荷兰,产品编号M9105,批号8000260395)包被过夜,随后用PBSA(补充有0.2%牛血清白蛋白[BSA,Roche,Cat#10735086001]的PBS)封闭1h。接下来,在其间进行洗涤步骤,将抗人IgG包被的板依次与在ELISA缓冲液(补充有0.05%吐温20[Sigma-Aldrich,Cat#P1379]的PBSA)中连续稀释的血浆样品在室温下孵育1h,与多克隆过氧化物酶缀合的山羊抗人IgG二抗(Jackson,Cat#109-035-098)在室温下孵育1h,以及最后与2,2′-氮基-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS;Roche,Cat#11112422001)在板振荡器上在室温下孵育1h。通过添加2%草酸(Riedel de Haen,Cat#33506)终止反应。用于注射的相应的材料的稀释系列被用来生成参考曲线。在EL808微量滴定板阅读器(BioSPX)中在405nm处测量吸光度,并绘制总人IgG浓度(μg/mL)。

[0903] IgG1-CD27-A-P329R-E345R与对应的WT抗体IgG1-CD27-A的PK概况之间没有实质性差异(图10),如通过在小鼠中静脉注射后不同时间点测量血浆IgG水平所确定的。

[0904] 尽管与小鼠中人IgG1的预测相比,观察到IgG1-CD27-A-P329R-E345R及其WT对应物(IgG1-CD27-A)在初始(分布)阶段的下降更陡,但两种抗体的末端消除与基于2区室模型的人野生型IgG1的预测率一致(Bleeker WK,Teeling JL,Hack CE.Blood.2001Nov 15;98(10):3136-42)。

[0905] 总之,这证明了P329R和E345R突变的引入在不存在靶标结合的情况下不影响IgG1-CD27-A的药代动力学特性。

[0906] N.B.本实施例中描述的实验使用携带F405L突变的IgG1-CD27-A和IgG1-CD27-A-P329R-E345R的变体,其在本实验的背景下是功能上不相关的。

[0907] 实施例13:抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R对抗体依赖性细胞吞噬作用的诱导

[0908] 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)主要通过NK细胞上表达的FcγRIIIa介导,而抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)可由单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞经由FcγRI、FcγRIIa和FcγRIII介导(Hayes,J.M et al 2016)。为了了解抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R与FcγRIa的残留结合(实施例9)对表达FcγRIa的免疫细胞的效应子功能的影响,使用CTV标记的$CD27^+$伯基特淋巴瘤Daudi细胞作为靶细胞,和人单核细胞衍生的巨噬细胞(hMDM)作为效应细胞(E:T=2:1),体外分析IgG1-CD27-A-P329R-E345R诱导ADCP的能

力。

[0909] 根据制造商的说明书,使用CD14微珠(Miltenyi Biotec,cat.no.130-050-201)通过阳性选择从PBMC中分离hMDM。将PBMC离心(1,200RPM,5分钟,RT)并以1.25×10^7PBMC/mL的密度重悬于冰冷的单核细胞分离缓冲液(PBS,0.5% BSA,2mM EDTA)中。每80μL PBMC悬浮液添加20μL CD14微珠,并在4℃下在滚筒式搅拌器上孵育15分钟。添加30mL冰冷的单核细胞分离缓冲液,将PBMC/CD14微珠混合物离心(300×g,10分钟,4℃)并重悬于6mL冰冷的单核细胞分离缓冲液中。用3mL冰冷的单核细胞分离缓冲液冲洗LS柱(Miltenyi Biotec,cat.no.130-042-401),每个柱装载有3mL PBMC/CD14微珠混合物。在$CD14^-$细胞流过并用冰冷的单核细胞分离缓冲液对柱子进行三次清洗后,通过使用柱塞在3mL冰冷的单核细胞分离缓冲液中回收$CD14^+$单核细胞。使用ViaStain™活力染料吖啶橙/碘化丙啶(AOPI;Nexcelom Bioscience,cat.no.CS2-0106)在Cellometer Auto 2000细胞活力计数器(Nexcelom Bioscience)上对$CD14^+$细胞进行计数,并以0.8×10^6个细胞/mL的密度悬浮在Celgene®GMP DC培养基(CellGenix,cat.no.20801-0500)中,该培养基补充有巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF;Gibco,cat.no.PH9501;50ng/mL终浓度)和3mL单核细胞悬浮液(即,2.4×10^6个单核细胞)在100mm^2具有UpCell™表面的Nunc™培养皿中,这种培养皿允许通过将平板放置在室温下来收获细胞(Thermo Fisher Scientific,cat.no.174902)。孵育三天后,向平板添加2mL含有5×M-CSF的新鲜培养基。孵育7天后(37℃,5%CO_2),通过将平板在室温下放置1至1.5h,将巨噬细胞从表面分离。分离的巨噬细胞通过离心沉淀,使用AOPI计数,并以1×10^6个细胞/mL的密度重悬在培养基(含10% DBSI的RPMI 1640)中。

[0910] 根据制造商的说明,使用CellTrace™紫罗兰细胞增殖试剂盒(Thermo Fisher Scientific,cat.no.C34557)对人伯基特淋巴瘤Daudi细胞(ATCC®CCL-213™)进行标记。简而言之,将细胞追踪紫罗兰(CTV)以终浓度为0.2μM添加至含有1×10^6个Daudi细胞/mL的PBS中,并在37℃下在黑暗中孵育20分钟(15mL孵育体积)。添加10mL DBSI以灭活未结合的染料。细胞通过离心(300xg,5分钟)沉淀,在PBS中洗涤,并用AOPI计数。将CTV标记的Daudi细胞以0.5×10^6个细胞/mL的密度重悬在培养基中。

[0911] 对于ADCP测定,将hMDM(50,000个细胞/孔)和CTV标记的Daudi细胞(25,000个细胞/孔)一起在冰上接种在96孔板中(E:T=2:1),最终体积为150μl培养基,并与抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R或抗CD20抗体IgG1-CD20(0.000001至10μg/mL浓度范围,10倍稀释)一起孵育4h(37℃,5%CO_2)。孵育后,添加100μL人BD Fc Block™(BD Biosciences,cat.no.564220;FACS缓冲液中1:100),并在4℃下孵育10分钟。细胞通过离心(300×g,5分钟)沉淀,重悬于含有PE-Cy7缀合的抗人CD11b抗体(BioLegend,cat.no.301322;1:80)和TO-PRO-3(Thermo Fisher Scientific,cat.no.T3605;1:25,000)的FACS缓冲液中,并在4℃下孵育30分钟。洗涤细胞,将其重悬于FACS缓冲液中,收集细胞并在FACSymphony™A3细胞分析仪(BD Biosciences)上进行分析。使用FlowJo软件分析数据以测量活靶细胞数量和吞噬性hMDM,并使用GraphPad Prism软件进行处理和可视化。

[0912] 根据以下公式计算每种条件下的活Daudi细胞的百分比:

[0913] 活Daudi细胞%=$\left(\frac{\text{与测试抗体孵育的TO-PRO-3}^-\text{CD11b}^-\text{CTV}^+\text{细胞\%}}{\text{不与抗体孵育的TO-PRO-3}^-\text{CD11b}^-\text{CTV}^+\text{细胞\%}}\right)\times 100$

[0914] 每种条件下吞噬性hMDM的量确定为TO-PRO-$3^-$$CD11b^+$$CTV^+$细胞%。

[0915] 使用来自四种不同人健康供体的hMDM,在吞噬测定中,IgG1-CD27-A-P329R-E345R不增加吞噬性hMDM的百分比或降低活Daudi细胞的百分比。这证明IgG1-CD27-A-P329R-E345R的残余Fcγ RIa结合不导致Fcγ RIa介导的效应子功能(来自图11所示的代表性人健康供体的数据)。阳性对照抗体IgG1-CD20有效诱导表达高水平CD20的Daudi细胞的吞噬作用,如通过吞噬性hMDM的百分比的增加和活Daudi细胞的百分比的减少所证明的。

[0916] 总之,与Fcγ RIa的残留结合不足以诱导$CD27^+$细胞的IgG1-CD27-A-P329R-E345R依赖性ADCP。

[0917] 实施例14:通过测量C4d沉积确定的抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R的液相靶标非依赖性补体激活

[0918] 在活性Fc区的情况下,Fc-Fc相互作用增强的抗体通常作为单体IgG1分子存在于溶液中,并且在靶标结合时在细胞表面上六聚化以形成C1q对接位点(Diebolder,C.A et al 2014;de Jong,R.N et al,2016)。抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R的IgG Fc结构域通过引入P329R突变而沉默,这导致缺乏与膜结合的IgG1-CD27-A-P329R-E345R的C1q结合(图6)。为了证实IgG1-CD27-A-P329R-E345R在不存在靶标结合的情况下不能激活溶液中的补体,通过确定C4d沉积来研究液相靶标非依赖性补体激活,这被认为是激活经典补体通路的量度。使用MicroVue™C4d酶免疫测定(EIA;Quidel,cat.no.A008),通过酶联免疫吸附测定(ELISA)分析IgG1-CD27-A-P329R-E345R的液相C4d片段沉积,并根据制造商的方案进行。热聚集γ球蛋白(HAGG;补体激活剂;Quidel,cat.no.A114)用作测定的阳性对照。IgG1-b12和IgG1-b12-RGY(WO2014006217A1))被包括作为对照抗体。已经描述了在IgG1抗体中引入E345R/E430G/S440Y(RGY)Fc突变会诱导溶液中六聚体的形成,导致液相补体激活(Diebolder,C.Aet al,2014;Wang,G.,R.N et al,2016;de Jong,R.N et al,2016)。IgG1-b12-P329R-E345R被包括作为同种型对照抗体。

[0919] 在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中制备抗体稀释液至1mg/mL的浓度,除了HAGG,其被稀释至10mg/mL的浓度。然后,将测试样品在90％(终浓度)正常人血清(NHS)(CompTech,Lot.No.42a)中进一步稀释至100μg/mL(对于单克隆IgG)或1,000μg/mL(对于HAGG)的浓度,并在37℃下孵育1h。平行地,“无抗体”样品(无抗体,90％ NHS)和“仅PBS”样品(无抗体,无NHS)被包括作为阴性对照。然后,将样品在冷试剂盒提供的补体样品稀释剂中以1:250稀释。同时,将包被有小鼠抗人C4d抗体的条置于96孔板中,用250至300μL洗涤缓冲液洗涤测定孔三次,其中在第一次洗涤后有1分钟等待步骤。将测试样品添加到孔中(100μL/孔),并且作为阴性对照,仅补体样品稀释剂(空白)用于ELISA中。平行地,将试剂盒提供的100μL标准品(标准品A-E)和内部对照添加到单独的孔中。将平板在室温下温育30分钟。然后,如上所述用洗涤缓冲液洗涤平板五次。将50μL C4d缀合物(过氧化物酶缀合的山羊抗人C4d)添加到孔中,并将平板在室温下孵育30分钟。在如上所述用洗涤缓冲液进行五次洗涤步骤后,添加100μL C4d底物[0.7％2-2’-氮基-二-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸二铵盐],并再次将平板在室温下孵育30分钟。最后,添加50μl试剂盒提供的终止溶液,并在1h内,使用ELISA读板器(EL808 BioSPX,BioTek)在405nm处测量光密度。

[0920] IgG1-CD27-A-P329R-E345R和对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R(具有与IgG1-CD27-A-P329R-E345R相同的Fc骨架)在100μg/mL的测试浓度下不诱导液相C4d沉积;测量的C4d水平与具有野生型Fc结构域的对照抗体(IgG1-b12)和无抗体对照的背景水平相似(图

12)。相反,已知在溶液中形成六聚体的阳性对照抗体IgG1-b12-RGY诱导C4d沉积至与HAGG相同的水平。

[0921] 这些数据显示IgG1-CD27-A-P329R-E345R在体外不诱导靶标非依赖性液相补体激活。

[0922] 实施例15:抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R与CD70竞争配体结合的能力

[0923] 为了确定抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R是否干扰CD27与其天然配体CD70的相互作用,在存在和不存在过量IgG1-CD27-A-P329R-E345R的情况下,研究了饱和浓度的生物素化重组人CD70胞外结构域(ECD)与人伯基特淋巴瘤细胞系Daudi上内源性表达的CD27的结合。

[0924] 在补充有10%供体牛血清和铁(DBSI;Gibco,cat.no.20731-030)的RPMI 1640培养基(Gibco,cat.no.A10491-01)中培养的Daudi细胞(ATCC®CCL-213™),以50,000个细胞/孔接种在圆底96孔板(Greiner Bio One,cat.no.650261)中。通过离心(300×g,在4℃下3分钟)沉淀细胞,并将其重悬于含有抗CD27或对照抗体(50μg/mL终浓度)的FACS缓冲液(PBS,1%BSA[Roche,cat.no.1073508600])中。以饱和浓度(6μg/mL)添加生物素化重组人CD70 ECD(Abcam,cat.no.ab271443),并将细胞在4℃下孵育30分钟。

[0925] 将细胞洗涤两次,并在4℃下重悬于含有亮紫(BV)421™标记的链霉亲和素(BioLegend,cat.no.405225;0.0025μg/mL终浓度)和R藻红蛋白(PE)标记的多克隆AffiniPure F(ab')$_2$片段山羊抗人IgG Fc(Jackson ImmunoResearch,cat.no.109 116 098;0.0025μg/mL终浓度)的FACS缓冲液中,持续30分钟。将细胞洗涤两次,重悬于含有TO-PRO-3碘化物(Thermo Fisher Scientific,cat.no.T3605;1:25,000)的FACS缓冲液中并进行分析。在BD FACSymphony™ A3流式细胞仪(BD Biosciences)上收集数据,并使用FlowJo软件进行分析。为了补偿,向每个孔中添加一滴UltraComp eBeads™补偿珠(Life Technologies,cat.no.01-2222-42)。添加2μL的每种抗体,并将混合物孵育20分钟。离心平板,将珠子重悬于FACS缓冲液中并进行测量。对于活力补偿,将细胞在65℃下处理10分钟,并与活细胞1:1混合。将细胞离心并重悬于在FACS缓冲液中稀释的TO-PRO-3中。使用GraphPad Prism对数据进行处理和可视化。

[0926] IgG1-CD27-A-P329R-E345R或IgG1-CD27-A不阻断CD70 ECD与CD27$^+$Daudi细胞的结合,因为CD70结合水平与用非结合同种型对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R或IgG1-b12孵育的Daudi细胞或没有抗体的细胞的CD70结合水平是相当的(图13)。此外,现有技术抗CD27抗体IgG1-CD27-BMS986215和IgG1-CD27-131A显示出对CD27与CD70 ECD结合的弱阻断作用。相反,在现有技术抗CD27抗体IgG1-CD27-CDX1127(图13)存在下,CD70不能结合Daudi细胞上的表面CD27,该抗CD27抗体IgG1-CD27-CDX1127之前被报道能够阻断配体结合(Vitale et al,2012)。

[0927] 总之,IgG1-CD27-A-P329R-E345R结合不阻断CD27被Daudi细胞上其天然配体CD70的结合。

[0928] 实施例16:多克隆刺激的人PBMC与抗CD27抗体孵育后的T细胞活化标志物表达

[0929] 使用从三个不同健康人供体获得的PBMC研究IgG1-CD27-A-P329R-E345R对多克隆活化的T细胞中T细胞活化标志物表达的影响。在将PBMC与IgG1-CD27-A-P329R-E345R或现有技术抗CD27抗体孵育2天和5天后,分析HLA-DR、CD25、CD107a和4-1BB的表达。

[0930] 将新鲜分离的75,000个PBMC/孔接种在96孔U型底板(Greiner Bio-One)中的细胞培养基中。将重复的孔与抗CD3抗体(UCHT1克隆;干细胞;0.1μg/mL);和IgG1-CD27-A-P329R-E345R(0.0005至30μg/mL,三倍稀释);或现有技术抗CD27抗体IgG1-CD27-CDX1127、IgG1-CD27-131A和IgG1-CD27-BMS986215(30μg/mL);或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R(10μg/mL)同时孵育。为了确定在没有处理的情况下的每种活化标志物的表达,将具有未处理(无抗CD3或抗CD27抗体)细胞的重复对照孔仅补充培养基。为了设置用于鉴定活化标志物阳性细胞的门控,使用荧光减一(FMO)对照。对于FMO对照,除了重复孔中对应于活化标志物的抗体之外,将实验中使用的所有抗体添加至来自用抗CD3抗体激活的一个供体的75,000个PBMC/孔中。没有染色抗体的单个孔中来自每个供体的未处理细胞被包括作为阴性对照。为了检测活细胞,来自每个供体的未处理的细胞在单个孔中单独用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色。

[0931] 孵育两天或五天后(37℃,5% CO_2),将平板用FACS缓冲液洗涤一次,并重悬于FACS缓冲液中的抗体混合物中,其含有针对T细胞活化标志物4-1BB、CD25、CD107a、人白细胞抗原(HLA)-DR的抗体;和用于流式细胞术中门控$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞亚群的抗体。在4℃下孵育30分钟后,将所有平板用FACS缓冲液洗涤两次,并将细胞重悬于FACS缓冲液中。使用FlowJo软件在BD LSRFortessa细胞分析仪上分析样品,以确定$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞上每个T细胞活化标志物的中位荧光强度(MFI)和阳性细胞百分比。抗CD27抗体诱导的T细胞活化标志物表达水平的变化表示为抗CD27抗体样品相对于非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R的MFI的倍数变化。使用FlowJo软件在BD LSRFortessa™细胞分析仪(BD Biosciences)上分析样品。

[0932] IgG1-CD27-A-P329R-E345R增加活化的$CD4^+$ T细胞上CD25、CD107a和4-1BB的表达(图14A)。这些影响在孵育2天后比孵育5天后更明显。在$CD8^+$ T细胞上,与IgG1-CD27-A-P329R-E345R孵育导致在孵育2天和5天后HLA-DR、CD107a和4-1BB的表达增加(图14B)。

[0933] 在与三种现有技术抗体孵育2天和5天后,还对T细胞活化标志物的表达进行了评估。IgG1-CD27-131A和IgG1-CD27-BMS986215诱导$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞上HLA-DR、4-1BB、CD25和CD107a表达的相当的增加,而与IgG1-CD27-CDX1127孵育2或5天对T细胞活化标志物表达的影响不太明显。

[0934] 总之,多克隆激活的PBMC与IgG1-CD27-A-P329R-E345R孵育导致$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞上活化标志物HLA-DR、CD25、CD107a和4-1BB的表达增加。

[0935] 实施例17:在人CD27-KI小鼠模型中注射抗CD27抗体后,OVA蛋白免疫的小鼠中OVA特异性$CD8^+$ T细胞的百分比

[0936] 通过流式细胞术分析IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理对hCD27 KI OVA模型中脾细胞中抗原特异性T细胞的扩增的影响。

[0937] C57BL/6背景上的纯合人CD27(hCD27)-KI小鼠(hCD27 KI小鼠)获自北京百奥赛图有限公司(品系名称C57BL/6-Cd27tm1(CD27)/Bcgen,库存号110006)。该品系是与Crown Bioscience的HuGEMM™平台合作开发的,特点是在具有功能性免疫系统的小鼠中具有人源化药物靶点(在本例中为CD27)。在hCD27 KI小鼠中,编码胞外结构域的小鼠CD27基因的外显子1-5被人CD27外显子1-5替换。通过在hCD27-KI小鼠中皮下(s.c.)注射免疫原卵清蛋白(OVA),对OVA特异性T细胞进行体内诱导,并通过同时用抗体静脉内(i.v.)处理小鼠来测试

IgG1-CD27-A-P329R-E345R的激动剂影响。

[0938] 在第0天,小鼠皮下注射5mg OVA(InvivoGen,cat.no.vac-pova-100,lot.no.EFP-42-04),并通过静脉注射IgG1-CD27-A-P329R-E345R(30mg/kg)、IgG1-CD27-CDX1127(30mg/kg)或IgG1-b12-P329R-E345R(30mg/kg)到尾静脉进行处理。在第12天和第21天,用OVA加强小鼠,并像第0天那样用抗体处理。在第10天、第19天和第24天,经由颊囊或隐静脉将血液采集在含有乙二胺四乙酸二钾的BD Microtainer®血液采集管(K2-EDTA;BD,cat.no.365974)中,并立即用于进一步分析。在第28天,将小鼠安乐死并在无菌条件下切除脾脏。

[0939] 将在RPMI1640培养基(Thermo Fisher Scientific,cat.no.C22400500BT)中切除的脾组织转移至gentleMACs™C管(Miltenyi Biotec,cat.no.130-093-237),并根据制造商的说明使用gentleMACs™解离器(Miltenyi,cat.no.130-093-235)机械解离成单细胞悬浮液。解离后,将细胞悬浮液通过70μm细胞过滤器(Falcon,cat.no.352350)过滤。接下来,通过在3mL洗涤缓冲液(补充有4% FBS[Gibco,cat.no.10099141]的无菌PBS[Hyclone,SH0256.01B])中重悬将样品洗涤两次。在Cellometer Auto T4(Nexcelom Bioscience)上计数细胞,并将细胞数调整至每管2×10^6个脾细胞。

[0940] 将2×10^6个脾细胞转移至FACS管(Falcon,cat.no.352052)并重悬于洗涤缓冲液(补充有4% FBS[Gibco,cat.no.10099141]的无菌PBS[Hyclone,SH0256.01B])中,其补充有1μg/mL纯化的大鼠抗小鼠CD16/CD32(小鼠BD Fc Block™,BD Biosciences,cat.no.553141)。在2-8℃下在黑暗中预孵育10分钟后,添加10μL PE标记的OVA-四聚体(MBL Life science,cat.no.TS 50011C),并将样品轻轻涡旋,然后在2-8℃下在黑暗中进一步孵育30-60分钟。在没有洗涤的情况下,添加用于T细胞亚群的流式细胞术门控的标记抗体和化合物。将样品轻轻涡旋,并在2-8℃下在黑暗中孵育另外的30分钟。接下来,通过在2mL洗涤缓冲液中重悬,将样品洗涤两次,并以300xg离心5分钟。最后,将细胞重悬于250μL洗涤缓冲液中,并在BD LSRFortessa™ X-20细胞分析仪(BD Biosciences)上进行分析。使用Kaluza分析软件(Beckman Coulter)处理数据。

[0941] IgG1-CD27-A-P329R-E345R增加了同时注射有OVA蛋白疫苗的小鼠脾脏中OVA特异性$CD8^+$ T细胞的百分比。用30mg/kg IgG1-CD27-CDX1127处理的小鼠中OVA特异性$CD8^+$ T细胞的百分比低于IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理组,并且与IgG1-b12-P329R-E345R处理组相当(图15)。在外周血样品中进行了相似的观察。

[0942] 实施例18:来自用抗CD27抗体注射的OVA免疫小鼠的脾脏的OVA特异性$CD8^+$ T细胞的IFNγ分泌

[0943] 将RPMI1640培养基(参见实施例17)中切除的脾组织在70μm细胞过滤器(Falcon,cat.no.352350)上轻轻捣碎,通过离心(1,500rpm,5分钟)沉淀,并重悬于10mL铵-氯-钾(ACK)裂解缓冲液(Invitrogen,cat.no.A1049201)中。在室温下孵育3-5分钟后,将样品用10-20mL PBS洗涤两次,并重悬于补充有50U/mL青霉素和50μg/mL链霉素(pen/strep,Gibco,cat.no.15070-063)的5mL Cellular Technology Limited(CTL)测试™培养基(ImmunoSpot,cat.no.CTLT-005)中。将收集的脾细胞再次通过70μm细胞过滤器过滤,并在Vi-CELL™XR细胞活力分析仪(Beckman Coulter)上计数,以用含pen/strep的CTL测试培养基将浓度调节至3.125×10^6个细胞/mL。

[0944] 使用小鼠IFN-γELISpotPLUS试剂盒(Mabtech,cat.no.3321-4HPW-2)分析脾细胞

的IFNγ产生,基本上如制造商所述。将预包被的MultiScreenHTS IP Filter(MSIP)白色平板(mAb AN18)每个孔用200μL无菌PBS洗涤四次,并用200μL含有pen/strep的CTL测试培养基调节(RT,30分钟)。去除培养基,将5×10^5个脾细胞/孔以重复方式与2μg/mL $OVA_{257-264}$肽SIINFEKL(Invivogen,cat.no.vac-sin)或乱序对照肽FILKSINE(SB-PEPTIDE,cat.no.SB073-1MG),以总体积为180μL/孔,在湿润培养箱(37℃,5% CO_2)中孵育20h。作为IFNγ产生的阳性对照,脾细胞与由500ng/mL佛波酯(PMA)和10μg/mL离子霉素(PMA+离子霉素,Dakewe Biotech,cat.no.DKW ST PI)组成的细胞刺激混合物平行孵育。不含肽的脾细胞的培养物被包括作为阴性对照。孵育后,去除细胞,并用PBS洗涤平板五次。接下来,平板用生物素化检测mAb(R4-6A2;RT,2小时)、链霉亲和素-辣根过氧化物酶(HRP;RT,1h)以及最后用3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物溶液(全部由试剂盒提供)依次孵育,中间用PBS进行五个洗涤步骤。当出现明显的斑点时,通过在去离子水中广泛洗涤来停止反应。使用spotAID V8软件(AID)在AID iSpot ELISpot读取器(Autoimmun Diagnostika[AID]GMBH,ELR08IFL)上对斑点进行计数。使用GraphPad Prism软件分析ELISpot数据并以条形图呈现,并以来自每个处理组(n=5)的所有小鼠的每孔平均斑点数±SEM呈现。

[0945] 来自所有IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理的动物组的脾细胞显示出响应于用OVA肽处理的IFNγ产生的增加,如通过ELISpot分析所证明的(图16)。用乱序对照肽刺激脾细胞不诱导或诱导极少的IFNγ产生,这表明IFNγ由OVA特异性T细胞产生。相反,在来自用30mg/kg IgG1-CD27-CDX1127处理的小鼠的脾细胞中未观察到IFNγ产生。

[0946] 实施例19:IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理对OVA免疫小鼠体内T细胞激活的影响

[0947] 通过分析PD-1在衍生自OVA处理的hCD27-KI小鼠的$CD8^+$ T细胞上的表达,在体内研究了IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理对$CD8^+$ T细胞激活的影响。如实施例17所述处理小鼠。此外,获得脾细胞和通过FACS分析脾细胞的方法描述于实施例17中。

[0948] 在第28天,IgG1-CD27-A-P329R-E345R诱导表达活化标志物PD-1的$CD8^+$ T细胞的百分比的增加。$CD8^+PD\text{-}1^+$ T细胞百分比在用IgG1-CD27-CDX1127或对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R处理的动物中低(图17)。

[0949] 实施例20:IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理对OVA免疫小鼠中T细胞亚群的体内诱导的影响

[0950] 通过分析来自OVA处理的hCD27-KI小鼠的脾细胞样品中CD44和CD62L的表达,研究了IgG1-CD27-A-P329R-E345R对T细胞亚群扩增的影响。通过流式细胞术定量衍生自IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理的、OVA免疫的hCD27-KI小鼠的脾脏的记忆$CD8^+$ T细胞。记忆T细胞被分类为效应记忆($CD44^+CD62L^-$)和前效应T细胞($CD44^-CD62L^-$;Nakajima,Y.,K et al2018)。如实施例17所述处理小鼠。此外,获得脾细胞和通过FACS分析脾细胞的方法描述于实施例17中。

[0951] 当与用IgG1-b12-P329R-E345R处理的小鼠的脾细胞相比时,IgG1-CD27-A-P329R-E345R(30mg/kg)在第28天诱导脾脏中前效应T细胞和效应记忆$CD8^+$ T细胞的百分比增加(图18)。在$CD45^+$群体中,IgG1-CD27-A-P329R-E345R诱导的前效应T细胞和效应记忆T细胞的百分比高于IgG1-CD27-CDX1127(30mg/kg),而在脾细胞的$CD8^+$部分,这两种抗CD27抗体诱导的这些T细胞群体的平均百分比是相当的。

[0952] 实施例21:IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理对OVA免疫小鼠中T细胞的体内扩增的

影响

[0953] 通过分析来自OVA处理的hCD27-KI小鼠的脾细胞和血液样品中CD3的表达,研究了IgG1-CD27-A-P329R-E345R对T细胞扩增的影响。如实施例17所述处理小鼠。此外,获得脾细胞和血液样品以及通过流式细胞术分析脾细胞和血液样品的方法描述于实施例17中。

[0954] 与用非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R处理相比,用30mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理OVA免疫的hCD27-KI小鼠没有增加脾脏中$CD3^+$ T细胞的百分比(图19)。相反,用基准抗体IgG1-CD27-CDX1127(30mg/kg)处理导致脾脏中$CD3^+$ T细胞的降低。在外周血样品中进行了相似的观察。

[0955] 实施例22:抗原特异性研究中IgG1-CD27-A-P329R-E345R对T细胞细胞因子产生的影响

[0956] 使用已被其同源抗原刺激的T细胞研究IgG1-CD27-A-P329R-E345R增加细胞因子产生的能力。根据制造商的说明书,通过Ficoll-Paque密度梯度分离(GE Healthcare,cat.no.17 144 0 03)从从健康人供体获得的白细胞层中分离PBMC。

[0957] 人磁性CD14和CD8微珠(Miltenyi Biotec,cat.no.分别为130 050 201和130 045 201)用于来自人PBMC的$CD14^+$单核细胞的阳性选择和$CD14^-$PBL的阴性选择,和来自冷冻PBL的$CD8^+$ T细胞的阳性选择。将细胞悬浮液离心,并以每80μL MACS缓冲液1×10^7个活细胞重悬于磁激活细胞分选(MACS)缓冲液(含有5mM EDTA和1%人白蛋白的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水[DPBS])中。每1×10^7个细胞,添加12μL CD14或CD8微珠。随后的MACS分离使用自动磁性细胞分离仪器或通过手动分离进行。根据制造商的说明,使用autoMACS®Pro分离器(Miltenyi Biotec)进行自动MACS分离。将洗脱的$CD14^+$单核细胞和$CD8^+$ T细胞离心(8分钟,300xg,室温下),重悬于X-VIVO 15培养基(Lonza)中,并用赤藓红B溶液计数用于进一步使用;即单核细胞分化为iDC或具有PD-1和/或CLDN6特异性T细胞受体(TCR)mRNA的$CD8^+$ T细胞的电穿孔。

[0958] 对于生成单核细胞衍生的iDC,在DC培养基(RPMI 1640,5%混合人血清[PHS;One Lambda,cat.no.A25761],1×最小必需培养基非必需氨基酸溶液[MEM NEAA,Life Technologies,cat.no.11140 035],1mM丙酮酸钠[Life Technologies,cat.no.11360 039])中,在T175烧瓶中,培养(37℃,5% CO_2)多至40×10^6个PBMC衍生的$CD14^+$单核细胞5天,该DC培养基补充有100ng/mL人粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF;Miltenyi Biotec,cat.no.130-093-868)和50ng/mL人IL-4(Miltenyi Biotec,cat.no.130093 924)。培养3天后,每个烧瓶更换一半培养基。由于从烧瓶中取出的培养基含有非粘附的单核细胞,因此将其离心(8分钟,300xg,RT),弃去上清液,将细胞沉淀重悬于新鲜DC培养基中,然后与200ng/mL GM-CSF和200ng/mL IL-4(终浓度)一起返回到起始烧瓶中。孵育5天后,使用含有2mM EDTA的10mL DPBS将粘附在培养瓶上的iDC分离(37℃,10分钟)。将分离的iDC洗涤,沉淀(8分钟,300xg,室温下)并用于用CLDN6 mRNA进行电穿孔。

[0959] 用编码人CLDN6特异性的小鼠TCR的α和β链的RNA单独或与编码PD-1的RNA一起电穿孔人$CD8^+$ T细胞,并且用编码人CLDN6的RNA电穿孔人单核细胞衍生的iDC。使用ECM 830方波电穿孔系统(BTX®),在室温下,在250μL X-VIVO 15培养基中电穿孔多至5×10^6个iDC或15×10^6个$CD8^+$ T细胞。将细胞与RNA混合,脉冲(T细胞使用500V、3ms的条件,iDC使用300V、12ms的条件),并立即用750μL预热的测定培养基(具有5%PHS的IMDM GlutaMAX[Life

technologies,cat.no.31980030])稀释。将电穿孔的iDC转移到6孔或12孔板中,并过夜培养(37℃,5% CO_2)。过夜孵育后,通过流式细胞术对电穿孔的$CD8^+$ T细胞和iDC进行评估,以评估细胞纯度、转染的RNA($CD8^+$ T细胞上的PD-1和CLDN6-TCR,和iDC上的CLDN6)的表达,以及$CD8^+$ T细胞上的CD27和PD-1和iDC上的PD-L1的基线表达。大约78%至93%、78%至92%和36%至98%的电穿孔的$CD8^+$T细胞分别表达CLDN6-TCR、PD-1和内源性CD27。大约47%至91%和94%至99%的电穿孔的iDC分别表达CLDN6和内源性PD-L1(未显示)。

[0960] 将$CD8^+$ T细胞和iDC以10:1的比率(每孔7.5×10^4个T细胞和7.5×10^3个iDC)接种在96孔圆底板中。在测定培养基中稀释IgG1-CD27-A-P329R-E345R,并将25μl稀释的IgG1-CD27-A-P329R-E345R添加至孔中,以达到10μg/mL的终浓度。相似地,添加对照抗体IgG1-CD27-131A和IgG1-b12-P329R-E345R以达到10μg/mL的终浓度。通过测量转导以表达CLDN6-TCR的T细胞的上清液中的细胞因子,对抗体处理后的抗原特异性T细胞活性进行体外分析,其中T细胞与转导以表达和呈递CLDN6的iDC共培养。两天后收集上清液,并且按照制造商的说明,使用10-spot U-PLEX ImmunoOncology Group1(人)试剂盒(MSD;cat.no.K151AEL2),通过多重电化学发光测定(ECLIA)确定多种促炎细胞因子和趋化因子的浓度。

[0961] 对于10-spot U-PLEX ImmunoOncology Group1试剂盒,将生物素化的捕获抗体与指定的具有生物素结合结构域的接头在室温下预孵育30分钟,然后与终止溶液孵育30分钟。通过在室温下振荡孵育1hr,将平板用接头偶联的捕获抗体的混合物包被。将平板用1×MSD洗涤缓冲液洗涤三次。将上清液样品或试剂盒标准品在测定稀释剂中1:2稀释,添加至孔中并在室温下持续振荡孵育2h。将平板用洗涤缓冲液洗涤三次,并与来自试剂盒的SULFO-TAG缀合的检测抗体在室温下持续振荡孵育1h。在添加读取缓冲液B以催化电化学发光反应之前,将平板用洗涤缓冲液洗涤三次。通过在MESO QuickPlex SQ 120成像仪(MSD)上测量光强度,立即分析平板。

[0962] 通过对孵育两天后的$CD8^+$ T细胞/iDC共培养物(n=4个不同的供体)的上清液的多重ECLIA,对IgG1-CD27-A-P329R-E345R诱导的细胞因子产生的变化进行评估。IgG1-CD27-A-P329R-E345R在$CD8^+$ T细胞/iDC与表达内源性水平的PD-1的$CD8^+$ T细胞的共培养物中诱导GM-CSF和IFNγ产生的显著增加(图20A),同时还观察到IL-13和TNFα产生的增加。在含有PD-1过表达的T细胞的培养物中观察到相同细胞因子的显著增加(图20B)。虽然当T细胞过表达PD-1时,细胞因子水平通常降低,但在IgG1-CD27-A-P329R-E345R存在下,细胞因子产生的相对增加(倍数增加)在这种情况下通常更高(图20A和B)。相反,与非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R相比,现有技术抗CD27抗体IgG1-CD27-131A显示出对细胞因子产生的极小影响(图20A和B)。

[0963] 实施例23:与IgG1-CD27-A-P329R-E345R孵育的抗原特异性$CD8^+$ T细胞的细胞毒性相关分子的表达

[0964] 在转导以表达CLDN6-TCR的人健康供体T细胞和MDA-MB-231_hCLDN6靶细胞的共培养物中,通过流式细胞术分析抗原特异性T细胞上细胞毒性相关分子的表达,研究抗体处理后T细胞介导的细胞毒性的诱导。

[0965] 通过慢病毒转导生成MDA-MB-231_hCLDN6细胞。为此,在250μL补充有10% FBS(非热灭活的)的Dulbecco改良eagle培养基(DMEM,Thermo Fisher Scientific,cat.no.31966-047)中,将2×10^5个MDA-MB-231细胞每孔接种在12孔组织培养板中。将细胞

在37℃下孵育1-2h(7.5%CO_2)。将含有编码人CLDN6(pL64b42E(EF1a-hClaudin6)Hygro-T2A-GFP)的慢病毒载体的上清液在冰上解冻,并在总体积750μL DMEM/10% FBS中稀释,以获得2×10^5、8×10^4和3.2×10^4TU/mL的滴度。这些滴度分别对应于1、0.4和0.16的MOI。然后将上清液添加至MDA-MB-231细胞中,并将细胞在37℃(5%CO_2)下孵育72h,不进行扰动。对于本实施例中描述的实验,将MDA-MB-231-hCLDN6细胞在DMEM/10% FBS中培养。将细胞在70%至90%融合度时传代或收获用于实验。通过用Accutase(Thermo Fisher Scientific,cat.no.A11105010)处理5分钟(37℃,7.5% CO_2)将细胞分离,并通过添加培养基进行重悬。将细胞离心(300xg,室温下4分钟)并计数。MDA-MB-231_hCLDN6细胞培养不超过20代。

[0966] 将MDA-MB-231_hCLDN6细胞以1.2至1.5×10^4个细胞/孔接种在96孔平底板(用于流式细胞术分析)和xCELLigence E板(Agilent,cat.no.05232368001;用于阻抗测量)中,并允许在室温下沉降30分钟。接下来,将平板分别在培养箱和xCELLigence实时细胞分析(RTCA)仪器(ACEA Biosciences)中孵育一天(37℃,5% CO_2)。

[0967] 用CLDN6-特异性TCR mRNA对分离的$CD8^+$ T细胞(参见实施例22)进行电穿孔,并过夜孵育。$CD8^+$ T细胞分离和电穿孔后,T细胞培养物含有49%至99%的$CD8^+$ T细胞。这些电穿孔的$CD8^+$ T细胞中,大约78%至93%表达CLDN6-TCR,并且59%至98%的CLDN6-TCR^+CD8^+细胞是$CD27^+$。将细胞离心(8分钟,300xg,室温下),重悬于DMEM/10% FBS中并计数。将细胞再次离心,以3×10^6个细胞/mL重悬在DMEM/10% FBS中,并添加到含有先前接种的MDA-MB-231_hCLDN6细胞的孔中(1.5×10^5个$CD8^+$ T细胞/孔;T细胞:肿瘤细胞,效应子:靶标,10:1的比率)。将IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-131A和非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R以10μg/mL添加至共培养物中。通过流式细胞术确定CD107a和GzmB表达。

[0968] 在10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R的存在下孵育两天后,与用非结合对照抗体或现有技术抗CD27抗体IgG1-CD27-131A处理相比,$GzmB^+CD107a^+CD8^+$ T细胞的百分比显著增加(图21)。

[0969] 总之,这些数据显示IgG1-CD27-A-P329R-E345R能够在活化的抗原特异性T细胞上诱导细胞毒性相关分子。

[0970] 实施例24:IgG1-CD27-A-P329R-E345R诱导T细胞介导的肿瘤细胞毒性的能力

[0971] 为了评估T细胞介导的细胞毒性,在IgG1-CD27-A-P329R-E345R、现有技术抗CD27抗体IgG1-CD27-131A或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R的存在下,将CLDN6-TCR电穿孔的$CD8^+$ T细胞与MDA-MB-231_hCLDN6细胞在xCELLigence实时细胞分析仪器(Acea Biosciences)中共培养5天,每隔两小时进行阻抗测量,如实施例23所述。细胞指数值来源于以两小时间隔进行的阻抗测量。曲线下的面积(AUC)从共培养五天的细胞指数数据获得。将AUC归一化至用IgG1-b12-P329R-E345R处理的共培养物。阻抗的大小取决于细胞数量、细胞形态和细胞大小以及细胞与板的附着强度,在这种特定情况下,其一起用作肿瘤细胞团的间接读出。在该实验环境中阻抗的降低被认为是$CD8^+$ T细胞杀伤肿瘤细胞的替代物。应该注意的是,阻抗可能低估了由于T细胞增殖引起的肿瘤细胞杀伤。

[0972] IgG1-CD27-A-P329R-E345R诱导细胞指数降低,表明肿瘤细胞杀伤。IgG1-CD27-131A对细胞指数没有明显影响,表明增加肿瘤细胞杀伤的能力极小(图22)。

[0973] 实施例25:IgG1-CD27-A-P329R-E345R诱导肿瘤浸润淋巴细胞扩增的能力

[0974] 使用从NSCLC患者手术切除的冷冻保存的肿瘤,离体评估IgG1-CD27-A-P329R-

E345R诱导肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)亚群(CD4+和CD8+T细胞、NK细胞和调节性T细胞[Treg])的能力。

[0975] 将手术切除的人NSCLC组织置于转运培养基(HypoThermosol®FRS保存液[BioLife Solutions,cat.no.101104]、7.5μg/mL两性霉素B[Thermo Fisher Scientific,cat.no.15290026]和300个单位/mL(U/mL)pen/strep[Thermo Fisher Scientific,cat.no.15140-122])中。将样品在洗涤培养基(5mL x VIVO 15[Lonza]、2.5μg/mL两性霉素B[Thermo Fisher Scientific和100U/mL pen/strep[Thermo Fisher Scientific])中洗涤三次并转移到细胞培养皿中。用解剖刀切除脂肪组织和坏死区域,并将组织切成约5mm^3的片段。将每个片段置于单独的冷冻小瓶中,并向每个小瓶中添加1mL冷冻培养基(FBS,10% DMSO)。将小瓶转移到受控冷冻室(Mr.Frosty冷冻容器)中,将其置于-80℃冰箱中。在-80℃下至少16h后,将小瓶转移至液氮中长期储存。

[0976] 每个实验将4至6个冷冻保存的小瓶在37℃水浴中解冻约2分钟,每个小瓶含有约5mm^3来自一个肿瘤样本的肿瘤片段,用洗涤培养基洗涤五次,并转移到细胞培养皿中。用解剖刀将肿瘤片段进一步切成约1mm^3的片段。在用IL-2和处理抗体培养后,大多数片段用于TIL扩增,并且剩余片段用于确定基线处特异性细胞表面标志物的表达,无需任何处理。

[0977] 在含有45至50U/mL IL-2(Proleukin S;Novartis Pharma,cat.no.PZN-02238131)的0.1mL预热的TIL培养基(X-VIVO 15[Lonza],含有2%人血清白蛋白[HSA;CSL Behring,cat.no.PZN-00504775],100U/mL pen/strep[Thermo Fisher Scientific]和2.5μg/mL两性霉素B[Thermo Fisher Scientific])中,将每孔两个肿瘤片段(平均)接种在24孔板(用于测定的总体积容量为2ml/孔)中。将IgG1-CD27-A-P329R-E345R稀释在含有45至50U/mL IL-2的TIL培养基中,并将900μL这些稀释液适当地添加到孔中。孔中IgG1-CD27-A-P329R-E345R的终浓度为1或10μg/mL。作为对照,将含有45至50U/mL IL-2而不含抗体的培养基添加到单独孔中的肿瘤片段中。对于每个供体的每个实验条件,总共孵育8至16个孔。

[0978] 培养3天后,向孔中添加含有45-50U/mL IL-2和IgG1-CD27-A-P329R-E345R的新鲜TIL培养基(1mL/孔,抗体浓度同上)。在测定开始后第5天和第14/17天之间,用显微镜定期监测培养物从组织片段迁移的TIL的增殖和TIL微簇的形成。如果在7或8天培养后在一个孔中观察到>25个TIL微簇,则将来自两个相同处理的原始孔的细胞和组织片段重悬并混合到具有培养基的6孔板的一个孔中(测定中使用的总体积容量为5至6mL/孔),并添加含有IL 2的新鲜TIL培养基(估计IL-2终浓度为33U/mL)。

[0979] 每两至三天,向培养物补充新鲜的含IL-2的TIL培养基。将添加到培养物中的培养基中的IL-2浓度降低至10U/mL,或在整个测定中,在用培养基补充孔后,首先降低至25U/mL,然后降低至10U/mL。在第14天或第17天,收获细胞用于流式细胞术分析。

[0980] 与用单独的IL-2处理的对照培养物相比,IgG1-CD27-A-P329R-E345R增强了TIL亚型的扩增,观察到$CD8^+$ T细胞和Treg的细胞计数的最大相对增加,其次是$CD4^+$ T细胞和NK细胞。对于所有TIL亚群,1μg/mL的IgG1-CD27-A-P329R-E345R的扩增比10μg/mL的扩增更明显(表4和图23)。

[0981] 表4.IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理的TIL的倍数扩增

[0982] 将衍生自人NSCLC样本的肿瘤组织与低剂量的IL-2在存在或不存在IgG1-CD27-A-P329R-E345R的情况下一起培养。在处理14至17天后,通过流式细胞术确定指定细胞亚群的

绝对细胞计数。显示了IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理的培养物相对于用IL-2处理的培养物的细胞数量的倍数差异。显示的数据来自在五个独立实验中测试的个体患者的五个肿瘤组织。P＝0.0236,1μg/mL vs.10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R(双因素方差分析)。

[0983]

细胞群	全部 TIL		$CD4^+$ T 细胞		$CD8^+$ T 细胞		Treg		NK 细胞	
IgG1-CD27-A-P329R-E345R 浓度(μg/mL)	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10
患者#578	14.9	2.1	19.3	2.3	19.6	2.9	86.9	2.1	11.3	1.1
患者#507	27.9	5.1	33.7	4.4	107.1	17.4	32.2	11.9	14.4	6.0
患者#594	0.6	1.5	0.4	1.0	1.8	2.2	0.4	2.3	0.8	2.6

[0984]

患者#592	0.9	0.8	0.4	0.2	2.9	1.7	4.8	2.6	2.3	1.2
患者#561	0.8	1.6	0.2	2.9	0.8	1.0	n.d.	n.d.	1.1	1.2
平均值±SD[a]	11.1 ± 11.3	2.4 ± 1.6	13.5± 14.0	2.0 ± 1.6	32.9 ± 43.4	6.1± 6.6	31.1± 34.5	4.9± 4.1	7.2± 5.8	2.7± 2.0

[0985] [a]平均值和SD计算排除了患者#561,以便细胞群之间具有更好的可比性。

[0986] 缩写:ANOVA＝方差分析;n.d.＝未确定;NK＝自然杀伤;NSCLC＝非小细胞肺癌;SD＝标准差;TIL＝肿瘤浸润淋巴细胞;Treg＝调节性T细胞。

[0987] 实施例26:BRET分析以评估细胞表面IgG1-CD27-A-P329R-E345R分子的分子间相互作用

[0988] 使用生物发光共振能量转移(BRET)分析确定携带六聚化增强突变(E345R)的CD27抗体在与细胞表面上的CD27结合后增加分子间Fc-Fc相互作用的能力。这种基于分子接近度的测定通过测量从生物发光蛋白供体到荧光蛋白受体的能量转移来检测蛋白质相互作用。能量转移仅在供体和受体非常接近时发生(<10nm[Wu and Brand,1994;Dacres et al,2012])。

[0989] 首先,使用间接免疫荧光测定(QIFIKIT,Agilent Technologies,cat.no.K0078),在huCD27-K562和Daudi细胞上确定CD27以及CD20和CD37(作为阳性对照分子)的细胞表面表达,huCD27-K562是经遗传修饰以稳定表达人CD27的人慢性髓系白血病细胞系。将细胞以100,000个细胞/孔接种,并与10μg/mL一抗(CD27:IgG1-7730-143-C102S-FEAL;CD20:IgG1-11B8-FEAR;CD37:IgG1-3009-010-FEAR)一起孵育。随后,用FITC标记的多克隆山羊抗人IgG(Jackson Immuno Research,cat.no.109-096-097)一起孵育、同时与用限定数量的抗体分子包被的QIFIKIT珠一起孵育。通过将测试样品的测量平均荧光强度(MFI)内插到校准曲线上来确定每个细胞的抗体分子数,该校准曲线是通过绘制单个珠群针对每个珠的已知抗体

分子数的MFI生成的。在LSRFortessa细胞分析流式细胞仪(BD Biosciences)上测量样品，并使用FlowJo软件进行分析。

[0990] QiFi分析显示出Daudi细胞上的中度CD27表达和高CD20和CD37表达，而huCD27-K562细胞表达高水平的CD27，但不表达CD20和CD37(表5)。

[0991] 表5:每个细胞的抗体分子的细胞表面表达

[0992]

	huCD27-K562	Daudi
CD27	390,373	15,484
CD20	-	180,217
CD37	-	219,663

[0993] 基本上根据制造商的说明书进行BRET测定(NanoBRET™系统，Promega，cat.no.N1661)。为了生成NanoLuc(供体)和HaloTag(受体)标记的抗体，通过基因合成制备具有NanoLuc或HaloTag的可变轻链序列(表1，序列131-138)，将其克隆到适当的表达载体中，并如实施例1中所述产生全长抗体。用于分析，将0.5x10^{5}个huCD27-K562或Daudi细胞接种在96孔圆底板(Greiner Bio-One，cat.no.650101)中，总体积为100μL。通过离心(300xg，3分钟)沉淀细胞，并将其重悬于50μL测定培养基(Opti-MEM I[Gibco，cat.no.11058-021]+4% FBS[ATCC，cat.no.30-2020])中，该测定培养基含有各自浓度为5μg/mL的NanoLuc或HaloTag标记的抗体对的混合物。接着，添加50μL HaloTag NanoBret 618配体(Promega，cat.no.G980A，在测定培养基中1:1000稀释)。对于每种抗体混合物，通过添加50μL不含HaloTag NanoBret618配体的培养基，同时制备无配体对照样品。将细胞在37℃下避光孵育30分钟，用培养基洗涤两次，并重悬于不含FBS的100μL测定培养基中。向每个孔中添加25μL NanoBret NanoGlo底物(Promega，cat.no.N1571，在不含FBS的测定培养基中1:200稀释)。将平板振荡30s，并将120μL每种样品转移至OptiPlate(Perkin Elmer，cat.no.6005299)。EnVision多标记阅读器(Perkin Elmer)用于测量460nm处的供体发射和618nm处的受体发射。

[0994] 以milliBRET单位(mBU)计算BRET＝(618nm$_{em}$/460nm$_{em}$)x1000。

[0995] 结果报告为校正的BRET，其针对供体贡献的背景或渗透进行校正，并计算为:mBU配体-mBU无配体对照。

[0996] 将NanoLuc和HaloTag标记的IgG1-CD27-A-P329R-E345R抗体在结合细胞表面上的CD27后的接近度与携带相同标签的WT IgG1-CD27-A抗体进行比较。IgG1-CD20-11B8-E430G-LNLuc和IgG1-CD37-37.3-E430G-LHalo抗体，其含有诱导六聚化的E430G突变(WO2019243636A1)，用作邻近诱导的BRET的阳性对照。先前已使用分子邻近测定表明，IgG1-CD20-11B8-E430G和IgG1-CD37-37.3-E430G在与表达CD20和CD37的细胞结合后形成异六聚体(Oostindie，S.C.et al，Haematologica，2019)。非结合抗体IgG1-b12-P329R-E345R用作阴性对照。

[0997] 作为BRET信号诱导的阳性和阴性对照，Daudi细胞(高CD20和CD37表达)和huCD27-K562细胞(无CD20和CD37表达)用抗体对IgG1-CD20-11B8-E430G-LNLuc和IgG1-CD37-37.3-E430G-LHalo调理。仅在Daudi细胞上检测到BRET诱导，而在缺乏CD20和CD37的huCD27-K562细胞上未检测到BRET诱导(图24)。相似地，非结合对照抗体对(IgG1-b12-P329R-E345R-LNLuc+IgG1-b12-P329R-E345R-LHalo)不在任一细胞系上诱导BRET。当用带有六聚化增强

突变的NanoLuc和HaloTag标记的CD27抗体的混合物(IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LNLuc+IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LHalo)调理huCD27-K562细胞时,检测到高BRET,而Daudi细胞上的BRET不超过背景水平(图24)。与携带P329R和E345R突变的CD27抗体相比,IgG1-CD27-A-LNLuc和IgG1-CD27-A-LHalo(WT)抗体的混合物在huCD27-K562细胞上诱导相当低的BRET,并且在Daudi细胞上不诱导BRET。这些结果表明BRET信号与较高的靶标表达相关。发现huCD27-K562细胞上的CD27表达比Daudi细胞上高约26倍,而huCD27-K562细胞上结合CD27的IgG1-CD27-A-P329R-E345R的BRET水平比Daudi细胞上高约24倍。NanoLuc和HaloTag标记的非结合和结合CD27的抗体对的混合物(分别为IgG1-b12-P329R-E345R-LNLuc+IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LHalo,和IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LNLuc+IgG1-b12-P329R-E345R-LHalo)在任一细胞系上均不诱导BRET。这证实了观察到的BRET依赖于与细胞表面靶标结合的供体和受体抗体的同时相互作用。

[0998] 总之,与其WT变体相比,IgG1-CD27-A-P329R-E345R在huCD27-K562细胞上诱导高BRET。该发现证实了与其WT变体相比,膜结合的IgG1-CD27-A-P329R-E345R分子之间增强的接近度,与细胞表面结合的抗体之间E345R增强的Fc-Fc相互作用一致。

[0999] N.B.本实施例中描述的实验使用携带F405L突变的IgG1-CD27-A的变体,其在本实验的背景下是功能上不相关的。

[1000] 实施例27:IgG1-CD27-A-P329R-E345R与Fc γ RIa^{+}M0和M1巨噬细胞的结合

[1001] 实施例9使用表面等离子体共振(SPR)评估IgG1-CD27-A-P329R-E345R与人Fc γ R变体的结合,显示出与重组人IgG Fc受体分子的结合极小(Fc γ RIa)或不结合(Fc γ RIIa、Fc γ RIIb和Fc γ RIIIa)。残留的Fc γ RIa结合不足以诱导CD27^{+}细胞的IgG1-CD27-A-P329R-E345R依赖性ADCP(参加实施例13)。为了进一步排除IgG1-CD27-A-P329R-E345R与Fc γ RIa阳性巨噬细胞的相互作用,确定了IgG1-CD27-A-P329R-E345R与M0和M1巨噬细胞的Fc介导的结合。

[1002] 如实施例13所述,将人CD14^{+}单核细胞从来自两个健康供体的PBMC中分离,并通过在补充有50ng/mL M-CSF(Gibco,cat.no.PHC 9501)的培养基(CellGenix,cat.no.20801-0500)中培养细胞以获得M0巨噬细胞以分化为单细胞衍生的巨噬细胞,或者在补充有50ng/mL GM-CSF(Immunotools,cat.no.11343125)的培养基中培养细胞以分化为M1巨噬细胞。培养6天后,根据表6中定义的标记物的表达,通过FACS分析确认M0和M1表型。另外,两种巨噬细胞亚型都被证实表达人Fc受体Fc γ RIa,Fc γ RII和Fc γ RIIIa(表6)。

[1003] 表6:

[1004]

表型标志物	M0	M1
CD40(BD Pharmingen,cat.no.561211,1:50稀释)	+	+
CD86(MACS,cat.no.30-097-877,1:50稀释)	+	++
CD163(Biolegend,cat.no.333612,1:200稀释)	+/-	-
CD206(Biolegend,cat.no.321136,1:200稀释)	+/-	+
Fc受体		
Fc γ RIa(Biolegend,cat.no.305006,1:25稀释)	++	++
Fc γ RII(BD Pharmingen,cat.no.552883,1:50稀释)	++	++
Fc γ RIIIa(BD Pharmingen,cat.no.555407,1:50稀释)	+	+/-

[1005] 将IgG1-CD27-A-P329R-E345R与M0和M1巨噬细胞的结合与作为Fcγ RIa结合的阳性对照的具有不相关抗原结合区的WT IgG1抗体(IgG1-b12)的结合进行比较,以及与同样携带先前描述的减少与Fcγ R相互作用的P329R突变(IgG1-b12-P329R-E345R)的变体的结合进行比较。由于巨噬细胞不应表达CD27,因此假设观察到的任何结合均经由Fcγ RIa发生,Fcγ RIa是唯一结合单价IgG的Fcγ R。将分化的巨噬细胞与IgG1-CD27-A-P329R-E345R或对照抗体(DC培养基中30μg/mL)孵育15分钟,并且与PE标记的多克隆山羊抗人IgG(Jackson Immuno Research,cat.no.109-116-097,1:200稀释,4℃下,30分钟)一起孵育。孵育后,将细胞洗涤并重悬于100μL含有核染色DAPI(BD Pharmingen,cat.no.564907,1:5000稀释)的FACS缓冲液中。在FACSymphony流式细胞仪(BD Biosciences)上测量样品,并使用FlowJo软件进行分析。

[1006] 无论是IgG1-CD27-A-P329R-E345R还是对照IgG1-b12-P329R-E345R,均未观察到与从两个独立供体分离的M0或M1巨噬细胞高于背景(仅二抗)的结合(图25)。含有活性Fc区的WT IgG1-b12始终与M0和M1巨噬细胞结合。

[1007] 总之,IgG1-CD27-A-P329R-E345R和对照IgG1-b12-P329R-E345R不结合表达Fcγ RIa、Fcγ RII和Fcγ RIIIa的M0或M1巨噬细胞。

[1008] 实施例28:IgG1-PD1的生成和筛选材料

[1009] PD-1和Fcγ R构建体

[1010] 生成编码各种全长PD-1变体的质粒:人(智人;UniProtKB ID:Q15116)、食蟹猴(Macaca fascicularis;UniProtKB ID:B0LAJ3)、狗(Canis familiaris;UniProtKB ID:E2RPS2)、兔(Oryctolagus cuniculus;UniProtKB ID:G1SUF0)、猪(Sus scrofa;UniProtKB ID:A0A287A1C3)、大鼠(Rattus norvegicus;UniProtKB ID:D3ZIN8)和小鼠(Mus musculus;UniProtKB ID:Q02242),以及编码人Fcγ RIa(UniProtKB ID:P12314)的质粒。

[1011] 瞬时表达全长PD-1或Fcγ R变体的CHO-S细胞系的生成

[1012] 根据制造商的说明书,使用FreeStyle™Max试剂(ThermoFisher Scientific,cat.no.16447100)和OptiPRO™无血清培养基(ThermoFisher Scientific,cat.no.12309019),用PD-1或Fcγ R质粒转染CHO-S细胞(适应悬浮生长的CHO细胞的亚克隆;ThermoFisher Scientific,cat.no.R800-07)。

[1013] 抗体变体的产生

[1014] IgG1-PD1

[1015] 用重组人His标记的PD-1蛋白(R&D Systems,cat.no.8986-PD)免疫三只新西兰白兔。分选来自血液的单个B细胞,并通过人PD-1酶联免疫吸附测定(ELISA)、细胞人PD-1结合测定和人PD-1/PD-L1阻断生物测定筛选上清液中PD-1特异性抗体的产生。从筛选阳性B细胞中提取RNA并进行测序。重链和轻链的可变区是基因合成的,并克隆含有突变L234A和L235A(LALA;Labrijn等人,Sci Rep 2017,7:2476)的人免疫球蛋白恒定部分(IgG1/κ)的N端,其中氨基酸位置编号根据Eu编号(SEQ ID NO:43)以最小化与Fcγ 受体的相互作用。

[1016] 使用无293转染试剂(Novagen/Merck)通过Tecan Freedom Evo装置进行HEK293-FreeStyle细胞的瞬时转染。使用具有平板自动进样器的Dionex Ultimate 3000HPLC上的蛋白-A亲和层析从细胞上清液中纯化产生的嵌合抗体。纯化的抗体用于进一步分析,特别是通过人PD-1ELISA、细胞人PD-1结合测定、人PD-1/PD-L1阻断生物测定和T细胞增殖测定

进行再测试。将嵌合兔抗体MAB-19-0202(SEQ ID NO:54和55)鉴定为表现最佳的克隆并随后人源化。

[1017] 嵌合PD-1抗体MAB-19-0202的可变区序列示于下表中。表7显示了重链的可变区，而表8显示了轻链的可变区。在这两种情况下，定义了根据Kabat编号的框架区(FR)以及互补决定区(CDR)。带下划线的氨基酸表示根据IMGT编号的CDR。粗体字母表示Kabat和IMGT编号的交集。

[1018] 表7：

[1019]

重链							
序列 ID	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
MAB-19-0202-HC SEQ ID NO: 54	QSVE ESGG RLVT PGTP LTLTC TVSG FSLY	SYNM G	WVR QAPG KGLE YIG	IISGG TIGH YASW AKG	RFTIS KTSS TTVD LKMT SLTTE DTAT YFCA R	AFYD DYDY NV	WGPG TLVT VSS

[1020] 表8：

[1021]

轻链							
序列 ID	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
MAB-19-0202-LC SEQ ID NO: 55	AAVL TQTP SPVS AAVG GTVTI SC	QSSQ SVYG NNQL S	WYQ QKPG QPPK LLIY	QASK LET	GVPS RFKG SGSG TQFT LTISD LESD DAAT YYC	AGGY SSSSD TT	FGGG TEVV VK

[1022] 人源化重链和轻链可变区抗体序列通过结构建模辅助CDR移植、基因合成和克隆的人免疫球蛋白恒定部分(具有LALA突变的IgG1/κ)的N端生成。人源化抗体用于进一步分析，特别是通过人PD-1ELISA、细胞人PD-1结合测定、人PD-1/PD-L1阻断生物测定和T细胞增殖测定进行再测试。将人源化抗体MAB-19-0618(SEQ ID NO:56和57)鉴定为表现最佳的克隆。

[1023] 表9中列出了重组人源化序列的人源化轻链和重链的抗体ID的分配。人源化轻链

和重链的可变区序列示于表10和11中。表10显示了重链的可变区，而表11显示了轻链的可变区。在这两种情况下，定义了根据Kabat编号的框架区(FR)以及互补决定区(CDR)。带下划线的氨基酸表示根据IMGT编号的CDR。

[1024] 表9：

[1025]

抗体 ID	轻链		重链	
	人源化变体	轻链 SEQ ID NO:	人源化变体	重链 SEQ ID NO:
MAB-19-0618	MAB-19-0202-L4	57	MAB-19-0202-H5	56

[1026] 表10：

[1027]

重链							
序列 ID	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4

[1028]

MAB-19-0202-H5 SEQ ID NO: 56	QVQLVESGGGLVQPGTSLRLSCSVSGFSLY	SYNMG	WVRQAPGKGLEYIG	IISGGTIGHYASWAKG	RFTISRDTSKTTLYLQMNSLTTEDTATYFCAR	AFYDDYDYNV	WGPGTLVTVSS

[1029] 表11：

[1030]

轻链							
序列 ID	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
MAB-19-0202-L4 SEQ ID NO: 57	AIQLTQSPSSLSASVGGTVTITC	QSSQSVYGNNQLS	WYQQKPGQPPKLLIY	QASKLET	GVPSRFRGSGSGTQFTLTISSLQSEDFATYYC	AGGYSSSSDTT	FGGGTEVVVK

[1031] 基因合成MAB-19-0618的重链和轻链的可变区的序列,并通过连接非依赖性克隆(LIC)克隆到表达载体中,该载体具有密码子优化的编码含有Fc沉默突变L234F、L235E和G236R(FER)的人IgG1m(f)重链恒定结构域(其中氨基酸位置编号根据Eu编号)(SEQ ID NO:38)和人κ轻链恒定结构域(SEQ ID NO:42)的序列。所得抗体命名为IgG1-PD1。

[1032] 使用GS Xceed®表达系统(Lonza)生成表达IgG1-PD1的稳定细胞系。通过Lonza Biologics plc将编码IgG1-PD1的重链和轻链的序列分别克隆到表达载体pXC-18.4和pXC-Kappa(含有谷氨酰胺合成酶[GS]基因)中。然后,通过将来自重链载体的完整表达盒连接到轻链载体中来构建编码IgG1-PD1的重链和轻链两者的双基因载体(DGV)。将该DGV的DNA用限制性内切酶PvuI-HF(New England Biolabs,R3150L)线性化,并用于稳定转染CHOK1SV®GS-KO®细胞。纯化IgG1-PD1用于功能表征。

[1033] IgG1-CD52-E430G

[1034] 在C1q结合和Fcγ R信号传导实验中,人IgG1抗体用作阳性对照,该抗体具有Fc结构域(SEQ ID NO:40)中的E430G六聚化增强突变(WO2013/004842A2)和与CAMPATH-1H(CD52特异性抗体)相同的抗原结合域(Crowe et al.,1992Clin Exp Immunol.87(1):105-110)(SEQ ID NO:61和65)。

[1035] 对照抗体

[1036] 在多个实验中,使用与b12(一种HIV1 gp120特异性抗体)具有相同抗原结构域的人IgG1抗体作为阴性对照(Barbas et al.,J Mol Biol.1993Apr5;230(3):812-2)。通过从头基因合成(GeneArt Gene Synthesis;ThermoFisher Scientific,德国)制备b12的V_H和V_L结构域(SEQ ID NO:68和72),并将其克隆到含有人IgG1m(f)同种型(SEQ ID NO:37)或其变体(包含L234F/L235E/G236R突变以及在本研究背景下功能上不相关的另外的Fc结构域中的K409R突变,缩写为FERR突变)(SEQ ID NO:39)的人IgG1重链恒定区(即,CH1、铰链、CH2和CH3区)的表达载体中,或克隆到包含人IgG4重链恒定区(SEQ ID NO:41);或人κ轻链(LC)的恒定区(SEQ ID NO:42)的表达载体中,具体取决于所选的结合结构域。抗体通过在生产细胞系中转染重链和轻链表达载体获得,并将其纯化用于功能表征。

[1037] 实施例29:IgG1-PD1与来自不同物种的PD-1的结合

[1038] 使用瞬时表达来自不同动物物种的PD-1的CHO-S细胞,通过流式细胞术评估IgG1-PD1与通常用于非临床毒理学研究的物种的PD-1的结合。

[1039] 将CHO-S细胞(5×10^4个细胞/孔)接种在圆底96孔板中。在补充有0.1%[w/v]牛血清白蛋白[BSA;Roche,cat.no.10735086001]和0.02%[w/v]叠氮化钠[NaN_3;bioWORLD,cat.no.41920044-3])的Genmab(GMB)荧光激活细胞分选(FACS)缓冲液(磷酸盐缓冲盐水[PBS;Lonza,cat.no.BE17-517Q,在蒸馏水中稀释至1×PBS]中制备IgG1-PD1、IgG1-ctrl-FERR和派姆单抗的抗体稀释物(1.7×10^{-4}-30μg/mL或5.6×10^{-5}-10μg/mL,3倍稀释)。仅在最高检测浓度(30μg/mL或10μg/mL)下纳入派姆单抗的IgG4同种型对照(BioLegend,cat.no.403702)。将细胞离心,除去上清液,并将细胞在50μL的抗体稀释物中在4℃下孵育30分钟。用GMB FACS缓冲液洗涤细胞两次,并与50μL二抗R-藻红蛋白(PE)缀合的山羊抗人IgG $F(ab')_2$(Jackson ImmunoResearch,cat.no.109-116-098;在GMB FACS缓冲液中1:500稀释)在4℃下一起孵育30分钟,避光保存。将细胞用GMB FACS缓冲液洗涤两次,重悬于补充有2mM乙二胺四乙酸(EDTA;Sigma-Aldrich,cat.no.03690)和4',6-二脒基-2-苯基吲哚

(DAPI)活力标志物(1:5,000;BD Pharmingen,cat.no.564907)的GMB FACS缓冲液中。使用FlowJo软件,在Intellicyt® iQue PLUS筛选器(Intellicyt Corporation)上通过流式细胞术分析抗体与活细胞的结合(如通过DAPI排除鉴定的)。在GraphPad Prism中使用非线性回归分析(四参数剂量反应曲线拟合)分析结合曲线。

[1040] 使用瞬时转染以在细胞表面上表达人、食蟹猴、狗、兔、猪、大鼠或小鼠PD-1蛋白的CHO-S细胞,通过流式细胞术评估IgG1-PD1与不同物种的PD-1的结合。对于人和食蟹猴PD-1,观察到IgG1-PD1的剂量依赖性结合(图26A-B)。派姆单抗显示出相当的结合。观察到IgG1-PD1与啮齿动物PD-1的交叉反应性显著降低,并且仅在最高浓度下(小鼠、大鼠;图26C-D),并且没有观察到与毒理学研究中经常使用的其他物种的PD-1的结合(兔、狗、猪;图26E)。未观察到IgG1-PD1与未转染的对照细胞的结合(图26E),也未观察到作为阴性对照包括在内的IgG1-ctrl-FERR与任何测试物种的PD-1的结合(图26)。

[1041] 总之,IgG1-PD1显示出与膜表达的人和食蟹猴PD-1相当的结合,并且与小鼠、大鼠、兔、狗和猪PD-1的结合显著较低低或不结合。

[1042] 实施例30:通过表面等离子体共振确定与人和食蟹猴PD-1的结合

[1043] 使用Biacore 8K SPR系统,通过表面等离子体共振(SPR)分析固定化IgG1-PD1、派姆单抗和纳武单抗与人和食蟹猴PD-1的结合。具有C-端His-标签的重组人和食蟹猴PD-1胞外结构域(ECD)获自Sino Biological(cat.no.分别为HPLC-10377-H08H和90311-C08H)。

[1044] 根据制造商的说明书,使用胺偶联和人抗体捕获试剂盒,2型(Cytiva,cat.no.BR100050和BR100839)用抗Fc抗体共价包被Biacore系列S传感器芯片CM5(Cytiva,cat.no.29149603)。

[1045] 随后,将IgG1-PD1(2nM)、纳武单抗(Bristol-Myers Squibb,批号ABP6534;1.25nM)和派姆单抗(Merck Sharp&Dohme,批号T019263;1.25nM),在HBS-EP+缓冲液(Cytiva,cat.no.BR100669;在蒸馏水[B Braun,cat.no.00182479E]中稀释至1×)中稀释,在25℃下以10μL/分钟的流速和60秒的接触时间捕获到表面上。这导致捕获的水平为约50个共振单位(RU)。

[1046] 在HBS-EP+缓冲液的三个启动循环后,注射人或食蟹猴PD-1ECD样品(0.19-200nM;在HBS-EP+缓冲液中稀释2倍;12个循环)以生成结合曲线。在抗体包被的表面(活性表面)上分析的每个样品也在没有抗体(参考表面)的平行流动室上进行分析,其用于背景校正。

[1047] 在每个循环结束时,使用10mM甘氨酸-HCl pH 1.5(Cytiva,cat.no.BR100354)再生表面。使用Biacore Insight评估软件(Cytiva)中预定义的“使用捕获的多循环动力学”评估方法分析数据。从分析中省略了具有最高浓度的人或食蟹猴PD-1(200nM)的样品以允许更好的数据曲线拟合。

[1048] 固定化IgG1-PD1以1.45±0.05nM的结合亲和力(K_D)与人PD-1ECD结合(表10)。纳武单抗和派姆单抗结合人PD-1ECD的结合亲和力与IgG1-PD1的K_D相当,即,具有低纳摩尔范围内的K_D值(分别为4.43±0.08nM和3.59±0.10nM)(表12)。

[1049] 固定化IgG1-PD1结合食蟹猴PD-1ECD的K_D为2.74±0.58nM(表11),与IgG1-PD1对人PD-1的亲和力相当。纳武单抗和派姆单抗结合食蟹猴PD-1ECD的结合亲和力与IgG1-PD1对食蟹猴PD-1ECD的K_D相当,并且与纳武单抗和派姆单抗对人PD-1ECD的K_D相当,即,具有低纳摩尔范围内的K_D值(分别为2.93±0.58nM和0.90±0.06nM)(表13)。

[1050] 表12.通过表面等离子体共振确定的PD-1抗体对人PD-1胞外结构域的结合亲和力。通过SPR确定的IgG1-PD1、纳武单抗和派姆单抗对人PD-1的ECD的的结合速率常数k_a(1/Ms),解离速率常数k_d(1/s)和平衡解离常数K_D(M)。

[1051]

抗体	K_D(M)		k_a(1/M×s)		k_d(1/s)	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
IgG1-PD1[a]	1.45×10^{-9}	4.51×10^{-11}	5.17×10^{5}	2.03×10^{4}	7.51×10^{-4}	9.61×10^{-6}
纳武单抗[b]	4.43×10^{-9}	8.49×10^{-11}	4.06×10^{5}	3.54×10^{3}	1.80×10^{-3}	2.12×10^{-5}
派姆单抗[b]	3.59×10^{-9}	9.90×10^{-11}	2.12×10^{6}	1.36×10^{6}	7.57×10^{-3}	4.71×10^{-3}

[1052] [a]三个独立实验的平均值和SD。

[1053] [b]两个独立实验的平均值和SD。

[1054] 缩写:K_D=平衡解离常数;k_a=结合速率常数;k_d=解离速率常数或解离速率;SD=标准差。

[1055] 表13.通过表面等离子体共振确定的PD-1抗体对食蟹猴PD-1胞外结构域的结合亲和力。通过SPR确定的IgG1-PD1、纳武单抗和派姆单抗对食蟹猴PD-1的ECD的的结合速率常数k_a(1/Ms),解离速率常数k_d(1/s)和平衡解离常数K_D(M)。

[1056]

抗体	K_D(M)		k_a(1/M×s)		k_d(1/s)	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
IgG1-PD1[a]	2.74×10^{-9}	5.79×10^{-10}	5.34×10^{5}	9.39×10^{4}	1.43×10^{-3}	7.23×10^{-5}
纳武单抗[a]	2.93×10^{-9}	5.81×10^{-10}	3.28×10^{5}	5.07×10^{4}	9.43×10^{-4}	9.07×10^{-5}
派姆单抗b	8.99×10^{-10}	5.73×10^{-11}	7.14×10^{5}	3.04×10^{4}	6.42×10^{-4}	6.86×10^{-5}

[1057] [a]三个独立实验的平均值和SD。

[1058] [b]两个独立实验的平均值和SD。

[1059] 缩写:K_D=平衡解离常数;k_a=结合速率常数;k_d=解离速率常数或解离速率;SD=标准差。

[1060] 实施例31:IgG1-PD1对PD-1配体结合和PD-1/PD-L1信号传导的影响

[1061] 为了证实IgG1-PD1作为经典免疫检查点抑制剂发挥作用,在体外评估了IgG1-PD1破坏PD-1配体结合和PD-1检查点功能的能力。

[1062] 通过流式细胞术评估IgG1-PD1与重组人PD-L1和PD-L2对膜表达的人PD-1的竞争性结合。将用人PD-1瞬时转染的CHO-S细胞(参见实施例26;5×10^{4}个细胞/孔)添加到圆底96孔板(Greiner,cat.no.650180)的孔中,沉淀并置于冰上。将在PBS(Cytiva,cat.no.SH3A3830.03)中稀释的生物素化重组人PD-L1(R&D Systems,cat.no.AVI156)或PD-L2(R&D Systems,cat.no.AVI1224)添加至细胞(终浓度:1μg/mL),之后立即添加在PBS中稀释的一定浓度范围的IgG1-PD1、派姆单抗(MSD,批号T019263和T036998)或IgG1-ctrl-FERR(终浓度:30μg/mL至0.5ng/mL,三倍稀释步骤)。然后,将细胞在室温下孵育45分钟。将细胞用PBS洗涤两次,并与50μl链霉亲和素-别藻蓝蛋白(R&D Systems,cat.no.F0050;在PBS中1:20稀释)在4℃下孵育30分钟,避光。将细胞用PBS洗涤两次,并重悬于20μL GMB

FACS缓冲液中。使用FlowJo软件,在Intellicyt® iQue Screener PLUS(Sartorius)上通过流式细胞术分析链霉亲和素-别藻蓝蛋白结合。

[1063] 基本上如制造商所述,使用基于生物发光细胞的PD-1/PD-L1阻断报告基因测定(Promega,cat.no.J1255)确定IgG1-PD1对PD-1和PD-L1的功能相互作用的影响。简而言之,将PD-L1 aAPC/CHO-K1细胞和PD-1效应细胞的共培养物与连续稀释的IgG1-PD1、派姆单抗(MSD,批号10749880或T019263)、纳武单抗(Bristol-Myers Squibb,批号11024601)或IgG1-ctrl-FERR(最终测定浓度:15-0.0008μg/mL,3倍稀释或10-0.0032μg/mL,5倍稀释)在37℃、5% CO_2下孵育6小时。然后,将细胞在室温下与重构的Bio-Glo™孵育5-30分钟,之后使用Infinite®F200 PRO读数器(Tecan)或EnVision多标签平板读数器(PerkinElmer)测量发光(以相对光单位[RLU]表示)。

[1064] 使用GraphPad Prism软件通过非线性回归分析(四参数剂量反应曲线拟合)分析剂量反应曲线,并从拟合曲线中得出观察到50%最大(抑制)效果的浓度(EC_{50}/IC_{50})。

[1065] IgG1-PD1以剂量依赖性方式破坏人PD-L1和PD-L2与膜表达的人PD-1的结合(图27),PD-L1结合抑制的IC_{50}值为2.059±0.653μg/mL(13.9±4.4nM),PD-L2结合抑制的IC_{50}值为1.659±0.721μg/mL(11.2±4.9nM),即,在纳摩尔范围内(表14)。派姆单抗显示出具有相当效力的PD-L1和PD-L2结合抑制,即,纳摩尔范围内的IC_{50}值。

[1066] 使用基于细胞的生物发光PD-1/PD-L1阻断报告基因测定测试PD-1/PD-L1轴的功能性阻断。在不存在和存在浓度稀释系列的IgG1-PD1、派姆单抗或纳武单抗的情况下,孵育表达人PD-1并携带NFAT-RE驱动的荧光素酶的报告Jurkat T细胞和表达人PD-L1和抗原非依赖性TCR激活剂的PD-L1aAPC/CHOK1细胞的共培养物。IgG1-ctrl-FERR被包括作为阴性对照。PD-1/PD-L1相互作用的阻断导致PD1/PDL1介导的抑制信号的释放,导致TCR激活和NFAT-RE-介导的荧光素酶表达(测量发光)。IgG1-PD1诱导PD-1^+报告T细胞中TCR信号传导的剂量依赖性增加(图28)。EC_{50}为0.165±0.056μg/mL(1.12±0.38nM;表15)。派姆单抗相似地减轻了PD-1介导的TCR信号传导的抑制,EC_{50}为0.129±0.051μg/mL(0.86±0.34nM),即,具有相当的效力。纳武单抗减轻了TCR信号传导的抑制,EC_{50}为0.479±0.198μg/mL(3.28±1.36nM),即,具有略低的效力。

[1067] 总之,IgG1-PD1通过阻断PD-1配体结合和破坏PD-1免疫检查点功能,作为经典的体外免疫检查点抑制剂。

[1068] 表14.IgG1-PD1介导的PD-1配体结合抑制的IC_{50}值。从竞争结合曲线计算IC_{50}值。

[1069]

与人 PD-L1 的竞争性结合 (平均 IC_{50}[±SD])				与人 PD-L2 的竞争性结合 (平均 IC_{50}[±SD])			
IgG1-PD1		派姆单抗		IgG1-PD1		派姆单抗	
μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM
2.059 [± 0.653]	13.9 [± 4.4]	1.134 [± 0.493]	7.6 [± 3.3]	1.659 [± 0.721]	11.2 [± 4.9]	1.186 [± 0.770]	8.0 [± 5.2]

[1070] 缩写:IC_{50}=观察到50%抑制作用的浓度;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;PD-L1=程序性细胞死亡1配体1;PD-L2=程序性细胞死亡1配体2;SD=标准差。

[1071] 表15.PD-1/PD-L1检查点阻断的EC_{50}。在PD-1/PD-L1阻断报告基因测定中,$PD\text{-}1^{+}$报告T细胞和PD-L1 aAPC/CHO-K细胞的共培养物与系列浓度的IgG1-PD1、派姆单抗或纳武单抗一起孵育。通过测量发光来确定PD-1/PD-L1检查点功能的抑制,其导致报告T细胞中下游TCR信号传导和荧光素酶表达。从得到的剂量反应曲线,计算EC_{50}值。

[1072]

平均 EC_{50}[±SD]					
IgG1-PD1		派姆单抗		纳武单抗	
μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM
0.165[± 0.056]	1.12[± 0.38]	0.129[±0.051]	0.86[± 0.34]	0.479[±0.198]	3.28[± 1.36]

[1073] 缩写:aAPC=人工抗原呈递细胞;CHO=中国仓鼠卵巢;EC_{50}=观察到50%的最大效应的浓度;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;PD-L1=程序性细胞死亡1配体1;SD=标准差;TCR=T细胞受体。

[1074] 实施例32:抗原特异性增殖测定以确定IgG1-PD1增强活化的T细胞增殖的能力

[1075] 为了确定IgG1-PD1增强T细胞增殖的能力,使用过表达PD-1的人$CD8^{+}$T细胞进行抗原特异性增殖测定。

[1076] HLA-A*02+外周血单核细胞(PBMC)获自健康供体(Transfusionszentrale,大学医院,Mainz,德国)。根据制造商的说明书,使用抗CD14微珠(Miltenyi;cat.no.130-050-201)通过磁珠激活细胞分选(MACS)技术从PBMC分离单核细胞。将外周血淋巴细胞(PBL,CD14阴性部分)冷冻保存在含有10%DMSO(AppliChem GmbH,cat.no.A3672,0050)和10%人白蛋白(CSL Behring,PZN 00504775)的RPMI 1640中,用于T细胞分离。为了分化成未成熟的DC(iDC),将1×10^{6}个单核细胞/mL在RPMI 1640(Life Technologies GmbH,cat.no.61870-010)中培养5天,该RPMI 1640含有5%混合人血清(One Lambda Inc.,cat.no.A25761)、1mM丙酮酸钠(Life Technologies GmbH,cat.no.11360-039)、1x非必需氨基酸(Life Technologies GmbH,cat.no.11140-035)、200ng/mL粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF;Miltenyi,cat.no.130-093-868)和200ng/mL白细胞介素-4(IL-4;Miltenyi,cat.no.130-093-924)。培养3天后,一半的培养基被新鲜的培养基替换。在第5天,通过收集非粘附细胞收获iDC,并通过与含有2mM EDTA的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)在37°下孵育10分钟来分离粘附细胞。用DPBS洗涤后,将iDC冷冻保存在含有10% DMSO的胎牛血清(FBS;Sigma-Aldrich,cat.no.F7524)中,以供将来用于抗原特异性T细胞测定。

[1077] 在抗原特异性$CD8^{+}$ T细胞增殖测定开始的前一天,将来自同一供体的冷冻PBL和iDC解冻。根据制造商的说明书,使用抗CD8微珠(Miltenyi;cat.no.130-045-201)通过MACS技术从PBL分离$CD8^{+}$ T细胞。在250μL X-Vivo15培养基(Lonza,cat.no.BE02-060Q)中,用每种10μg体外转录(IVT)的RNA(编码对人claudin-6(CLDN6;HLA-A*02限制性;描述于WO 2015150327A1中)具有特异性的鼠TCR的α和β链)和10μg IVT-RNA(编码PD-1(UniProt Q15116))电穿孔约10×10^{6}至15×10^{6} $CD8^{+}$ T细胞。将细胞转移到4-mm电穿孔比色皿(VWR International GmbH,cat.no.732-0023),并使用BTX ECM®830电穿孔系统(BTX;500V,1x3 ms脉冲)进行电穿孔。电穿孔后,立即将细胞转移到含有5%混合人血清的新鲜IMDM GlutaMAX培养基(Life Technologies GmbH,cat.no.319800-030)中,并在37℃、5% CO_2下

静置至少1小时。根据制造商的说明书,使用PBS中的1.6μM羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE;Life Technologies GmbH,cat.no.V12883)标记T细胞,并在补充有5%混合人血清的IMDM培养基中孵育过夜。

[1078] 使用如上所述的电穿孔系统(300V,1x12 ms脉冲),在250μL X-Vivo15培养基中,用2μg编码全长人CLDN6的IVT-RNA(WO 2015150327 A1)电穿孔多至5×10^6解冻的iDC,并且将其在补充有5%混合人血清的IMDM培养基中孵育过夜。

[1079] 第二天,收获细胞。通过流式细胞术证实了iDC上CLDN6的细胞表面表达,以及T细胞上CLDN6特异性TCR和PD-1的细胞表面表达。为此,用DyLight650缀合的CLDN6特异性抗体(非可商购的;内部生产)对iDC进行染色。将T细胞用亮紫(BV)421缀合的抗小鼠TCR-β链抗体(Becton Dickinson GmbH,cat.no.562839)和别藻蓝蛋白(APC)缀合的抗人PD-1抗体(Thermo Fisher Scientific,cat.no.17-2799-42)染色。

[1080] 在96孔圆底板中,在IgG1-PD1、派姆单抗(Keytruda®,MSD Sharp&Dohme GmbH,PZN 10749897)或纳武单抗(Opdivo®,Bristol-Myers Squibb,PZN 11024601)的存在下,这些药物以4倍连续稀释(范围从0.00005至0.8μg/mL)在含有5%混合人血清的IMDM培养基中,将电穿孔的iDC与电穿孔、CFSE标记的T细胞以1:10的比率孵育。阴性对照抗体IgG1-ctrl-FERR以0.8μg/mL的单一浓度使用。培养4d后,将细胞用APC缀合的抗人CD8抗体染色。使用BD FACSCelesta™流式细胞仪(Becton Dickinson GmbH),通过流式细胞术分析$CD8^+$ T细胞中CFSE稀释度来评估T细胞增殖。

[1081] 使用FlowJo软件10.7.1版本分析流式细胞术数据。使用FlowJo中的增殖建模工具评估$CD8^+$ T细胞的CFSE标记稀释,并使用积分公式计算扩增指数。使用4参数对数拟合在GraphPad Prism版本9(GraphPad Software,Inc.)中生成剂量反应曲线。使用GraphPad Prism版本9通过Friedman检验和Dunn多重比较检验确定统计学显著性。

[1082] IgG1-PD1以剂量依赖性方式增强$CD8^+$ T细胞的抗原特异性增殖(图29),具有皮摩尔范围内的EC_{50}值(表16)。用派姆单抗或纳武单抗处理也以剂量依赖性方式增强T细胞增殖。派姆单抗的平均EC_{50}与IgG1-PD1相当,而纳武单抗的EC_{50}显著(P=0.0267)高于IgG1-PD1的EC_{50}。

[1083] 表16:抗原特异性增殖测定中的EC_{50}值。如通过抗原特异性T细胞增殖测定法所测量的,使用$CD8^+$ T细胞扩增指数确定IgG1-PD1、派姆单抗和纳武单抗的EC_{50}值。显示的数据是基于4参数对数拟合计算的值。缩写:EC_{50}=半最大有效浓度;FERR=L234F/L235E/G236R-K409R;PD1=程序性细胞死亡蛋白1;SD=标准差。

[1084]

平均 EC_{50}[±SD]					
IgG1-PD1		派姆单抗		纳武单抗	
μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM
0.0124 [± 0.0018]	0.0837 [± 0.0123]	0.0152 [± 0.0049]	0.1018 [± 0.0333]	0.0701 [± 0.0238]	0.4802 [± 0.1632]

[1085] 实施例33:同种异体MLR测定中IgG1-PD1对细胞因子分泌的影响

[1086] 为了研究IgG1-PD1在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中增强细胞因子分泌的能力,

在IgG1-PD1的存在下共培养三对独特的同种异体人成熟树突状细胞(MDC)和$CD8^+$ T细胞。使用IFNγ特异性免疫测定法测量IFNγ的水平,而使用定制的Luminex多重免疫测定法确定单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、GM-CSF、白细胞介素(IL)-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL12-p40、IL-15、IL-17α和肿瘤坏死因子(TNFα)的水平。

[1087] 人$CD14^+$单核细胞获自健康供体(BioIVT)。为了分化为未成熟的树突状细胞(iDC),将单核细胞在补充有10%热灭活胎牛血清(FBS;Gibco,cat.no.16140071)、100ng/mL GM-CSF和300ng/mL IL-4(BioLegend,cat.no.766206)的RPMI-1640完全培养基(ATCC改良配方;Thermo Fisher,cat.no.A1049101)中在37℃下培养6天。在第4天,用含有补充剂的新鲜培养基替换培养基。为了使iDC成熟,在开始MLR测定之前,将细胞在补充有10% FBS、100ng/mL GM-CSF、300ng/mL IL-4和5μg/mL脂多糖(LPS;Thermo Fisher Scientific,cat.no.00 497 6 93)的RPMI-1640完全培养基中在37℃下孵育24h。同时,将从同种异体健康供体获得的纯化的$CD8^+$ T细胞(BioIVT)解冻,并在补充有10% FBS和10ng/mL IL-2(BioLegend,cat.no.589106)的RPMI-1640完全培养基中在37℃下孵育过夜。

[1088] 第二天,收获LPS成熟的树突状细胞(mDC)和同种异体$CD8^+$ T细胞,并将其分别以4×10^5细胞/mL和4×10^6细胞/mL重悬于预热的AIM-V培养基(Thermo Fisher Scientific,cat.no.12055091)中。在37℃下,在96孔圆底板中的AIM-V培养基中,在浓度范围(0.001-30μg/mL)的抗体IgG1-PD1、IgG1-ctrl-FERR或派姆单抗(MSD,cat.no.T019263)的存在下,或在30μg/mL IgG4同种型对照(BioLegend,cat.no.403702)的存在下,将mDC(20,000个细胞/孔)与同种异体幼稚$CD8^+$ T细胞(200,000个细胞/孔)一起孵育。

[1089] 5d后,将无细胞上清液从每个孔转移到新的96孔板中,并储存在-80℃下,直到进一步分析细胞因子浓度。

[1090] 根据制造商的说明书,在Envision仪器上使用IFNγ特异性免疫测定(Alpha Lisa IFNγ试剂盒;Perkin Elmer,cat.no.AL217)确定IFNγ水平。

[1091] 使用定制的Luminex®多重免疫测定(Millipore,订单号SPR1526),基于人TH17磁珠组(MILLIPLEX®),确定MCP-1、GM-CSF、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL12-p40、IL-15、IL-17α和TNFα的水平。简而言之,将无细胞上清液解冻,并将10μL各样品添加到用1x洗涤缓冲液预洗的384孔板(Greiner Bio-One,cat.no.781096)的孔中的10μL测定缓冲液中。同时,将测定缓冲液中的10μL标准品或对照添加到孔中,之后添加10μL测定培养基。将针对不同细胞因子的磁珠混合,并在珠稀释剂中稀释至1x浓度,之后将10μL混合的珠添加到每个孔中。将平板在4℃下密封并孵育,振荡过夜。将孔用60μL 1x洗涤缓冲液洗涤三次。随后,将10μL定制检测抗体添加到每个孔中,并将平板在室温下密封并振荡孵育1h。接下来,向每个孔中添加10μL链霉亲和素-PE,并将平板在室温下密封并振荡孵育30分钟。如上所述用60μL 1x洗涤缓冲液洗涤孔三次,之后通过在室温下振荡5分钟将珠重悬于75μL Luminex Sheath Fluid中。在Luminex FlexMap 3D系统上运行样品。

[1092] 在MLR测定开始和结束时,使用PE-Cy7缀合的抗PD-1(BioLegend,cat.no.329918;1:20)、别藻蓝蛋白缀合的抗PD-L1(BioLegend,cat.no.329708;1:80)、BUV496-缀合的抗CD3(BD Biosciences,cat.no.612940;1:20)和BUV395-缀合的抗CD8(BD Biosciences,cat.no.563795;1:20),通过流式细胞术证实$CD8^+$ T细胞上PD-1的表达和mDC上PD-L1的表达。

[1093] IgG1-PD1以剂量依赖性方式持续增强IFNγ的分泌(图30)。IgG1-PD1还增强MCP-1、GM-CSF、IL-2、IL-6、IL-12p40、IL-17α、IL-10和TNFα的分泌(图31)。派姆单抗对细胞因子分泌具有相当的作用。

[1094] 实施例34:评估C1q与IgG1-PD1的结合

[1095] 使用激活的人$CD8^+$ T细胞评估补体蛋白C1q与在恒定重链区中携带FER Fc沉默突变的IgG1-PD1的结合。作为阳性对照,将IgG1-CD52-E430G包括在内,其具有基于CD52抗体CAMPATH-1H的V_H和V_L结构域,并且具有已知当与细胞表面结合时有效结合C1q的Fc增强的骨架。作为非结合阴性对照抗体,将IgG1-ctrl-FERR和IgG1-ctrl包括在内。

[1096] 根据制造商的说明书,使用RosetteSep™人$CD8^+$ T细胞富集混合物(Stemcell Technologies,cat.no.15023C.2)通过阴性选择,或使用CD8微珠(Miltenyi Biotec,cat.no.130-045-201)和LS柱(Miltenyi Biotec,cat.no.130-042-401)通过经由磁性激活细胞分选(MACS)阳性选择,从获自健康志愿者(Sanquin)的白细胞层中纯化(富集)人$CD8^+$ T细胞。将纯化的T细胞重悬于T细胞培养基(Roswell Park Memorial Institute[RPMI]-1640培养基,含有25mM HEPES和L-谷氨酰胺[Lonza,cat.no.BE12-115F],补充有含铁的10%热灭活供体牛血清[DBSI;Gibco,cat.no.20731-030]和青霉素/链霉素[pen/strep;Lonza,cat.no.DE17-603E])中。

[1097] 将抗CD3/CD28珠(Dynabeads™人T激活剂CD3/CD28;ThermoFisher Scientific,cat.no.11132D)用PBS洗涤并重悬于T细胞培养基中。将珠子以1:1的比率添加到富集的人$CD8^+$ T细胞中,并且在37℃,5% CO_2下孵育48h。然后,使用磁体除去珠子,将细胞在PBS中洗涤两次并再次计数。

[1098] 使用IgG1-PD1(30μg/mL)和R-藻红蛋白(PE)缀合的山羊抗人IgG F(ab')$_2$(在GMB FACS缓冲液中1:200稀释;Jackson ImmunoResearch,cat.no.109-116-098)或商业化的PE缀合的PD-1抗体(BioLegend,cat.no.329906;1:50稀释),通过流式细胞术证实活化的$CD8^+$ T细胞上的PD-1表达。

[1099] 将活化的$CD8^+$ T细胞接种在圆底96孔板(30,000或50,000个细胞/孔)中,沉淀,并重悬于30μL测定培养基(含有25mM HEPES和L-谷氨酰胺的RPMI-1640,补充有0.1%[w/v]牛血清白蛋白部分V[BSA;Roche,cat.no.10735086001]和青霉素/链霉素)中。随后,将50μL IgG1-PD1、IgG1-ctrl-FERR、IgG1-CD52-E430G或IgG1-ctrl(终浓度为1.7×10^{-4}-30μg/mL,测定培养基中3倍稀释步骤)添加到每个孔中,并在37℃下孵育15分钟以允许抗体与细胞结合。

[1100] 添加人血清(20μL/孔;Sanquin,批号20L15-02)作为C1q的来源,至最终浓度为20%。将细胞在冰上孵育45分钟,然后用冷的GMB FACS缓冲液洗涤两次,并在存在或不存在别藻蓝蛋白缀合的小鼠抗CD8(BD Biosciences,cat.no.555369;在GMB FACS缓冲液中1:50稀释)的情况下,与50μL异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的兔抗人C1q(终浓度20μg/mL[DAKO,cat.no.F0254];在GMB FACS缓冲液中1:75稀释)在4℃下在暗处孵育30分钟。将细胞用冷GMB FACS缓冲液洗涤两次,重悬于补充有2mM乙二胺四乙酸(EDTA;Sigma-Aldrich,cat.no.03690)和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)活力染料(1:5,000;BD Pharmingen,cat.no.564907)的20μL GMB FACS缓冲液中。在Intellicyt® iQue Screener PLUS(Sartorius)或iQue3(Sartorius)上通过流式细胞术分析C1q与活细胞的结合(如通过DAPI

排除鉴定的)。使用GraphPad Prism软件,使用非线性回归分析(具有可变斜率的S形剂量反应)对结合曲线进行分析。

[1101] 尽管观察到与膜结合的IgG1-CD52-E430G的剂量依赖性Clq结合,但未观察到与膜结合的IgG1-PD1或与非结合对照抗体的Clq结合(图32)。

[1102] 这些结果表明IgG1-PD1的功能惰性骨架不结合Clq。

[1103] 实施例35:通过SPR确定的IgG1-PD1与Fcγ受体的结合

[1104] 通过SPR在体外评估IgG1-PD1与固定化FcγR(FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb和FcγRIIIa)的结合。包括FcγRIIa(H131和R131)和FcγRIIIa(V158和F158)的两种多态性变体。作为FcγR结合的阳性对照,将具有野生型Fc区的IgG1-ctrl包括在内。

[1105] 在第一个实验中,使用Biacore 8K SPR系统分析IgG1-PD1或IgG1-ctrl与固定化的人重组FcγR变体(FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb和FcγRIIIa)的结合。在第二组实验中,使用相同的方法,分析IgG1-PD1、纳武单抗(Bristol-Meyers Squibb,批号ABP6534)、派姆单抗(Merck Sharp&Dohme,批号U013442)、多塔利单抗(GlaxoSmithKline,批号1822049)、西米普利单抗(Regeneron,批号1F006A)、IgG1-ctrl或IgG4-ctrl的结合。

[1106] 根据制造商的说明书,使用胺耦合和His捕获试剂盒(Cytiva,cat.no.BR100050和cat.no.29234602)用用抗组氨酸(His)抗体共价包被Biacore系列S传感器芯片CM5(Cytiva,cat.no.29104988)。在HBS-EP+(Cytiva,cat.no.BR100669)中稀释的FcγRIa、FcγRIIa(H131和R131)、FcγRIIb和FcγRIIIa(V158和F158)(分别为SinoBiological,cat.no.10256-H08S-B、10374-H08H1、10374-H27H、10259-H27H、10389-H27H1和10389-H27H)被捕获到包被有抗His的传感芯片表面上,流速为10μL/分钟,接触时间为60秒,以实现约350-600共振单位(RU)的捕获水平。

[1107] 在HBS-EP+缓冲液的三个启动循环之后,使用表17中所示的抗体范围,注射测试抗体(IgG1-PD1、纳武单抗、派姆单抗、多塔利单抗、西米普利单抗、IgG1-ctrl或IgG4-ctrl)以生成结合曲线。在具有捕获的FcγR的表面(活性表面)上分析的每个样品也在没有捕获的FcγR的平行流动池(参考表面)上进行分析,其用于背景校正。从其他传感图中减去含有HBS-EP+作为(模拟)分析物的第三启动循环以产生双重参考数据。

[1108] 在每个循环结束时,使用10mM甘氨酸-HCl pH 1.5(Cytiva,cat.no.BR100354)再生表面。使用Biacore Insight评估软件(Cytiva)生成传感图,并且四参数逻辑拟合应用于终点测量(结合平台与捕获后基线的对比)。第一个实验的数据(n=1;合格的SPR测定)如图33所示;第二组实验(n=3)的数据如图34所示。

[1109] 表17.与单个FcγR结合的检测条件

[1110]

FcγR	检测的抗 PD-1 抗体浓度范围		
	起始浓度(nM)	倍数稀释	最低浓度(nM)
FcγRIa	3,000	1:3	0.02
FcγRIIa-H131	10,000	1:2.5	0.42
FcγRIIa-R131	10,000	1:2.5	0.42
FcγRIIb	10,000	1:2	4.9
FcγRIIIa-V158	10,000	1:3	0.06
FcγRIIIa-F158	10,000	1:2.5	0.42

[1111] 第一个实验的结果显示IgG1-Ctrl与所有FcγR结合,而未观察到IgG1-PD1与FcγRIa、FcγRIIa(H131和R131)、FcγRIIb和FcγRIIIa(V158和F158)的结合(图31)。

[1112] 第二组实验的结果证实IgG1-PD1缺乏FcγR结合(图32)。IgG4-ctrl和测试的其他抗PD-1抗体(纳武单抗、派姆单抗、多塔利单抗和西米普利单抗;所有IgG4亚类)显示出与FcγRIa、FcγRIIa-H131、FcγRIIa-R131和FcγRIIb的明确结合,以及与FcγRIIIa-F158和FcγRIIIa-V158的极小至非常微小的结合。

[1113] 这些数据证实了IgG1-PD1的Fc结构域缺乏FcγR结合,并证实了FcγR与纳武单抗、派姆单抗、多塔利单抗和西米普利单抗的结合。总之,这些数据表明IgG1-PD1的Fc结构域不能诱导FcγR介导的效应子功能(ADCC、ADCP)。

[1114] 实施例36:通过流式细胞术确定的IgG1-PD1与细胞表面表达的FcγRIa的结合

[1115] 使用流式细胞术分析IgG1-PD1、纳武单抗、派姆单抗、多塔利单抗和西米普利单抗与人细胞表面表达的FcγRIa的结合。

[1116] FcγRI在瞬时转染的CHO-S细胞上表达,并使用FITC缀合的抗FcγRI抗体(BioLegend,cat.no.305006;1:25)通过流式细胞术证实细胞表面表达。如实施例27中所述评估抗PD-1抗体与转染的CHO-S细胞的结合。简而言之,IgG1-PD1、纳武单抗(Bristol-Meyers Squibb,批号ABP6534)、派姆单抗(Merck Sharp&Dohme,批号U013442)、多塔利单抗(GlaxoSmithKline,批号1822049)、西米普利单抗(Regeneron,批号1F006A)、IgG1-ctrl和IgG1-ctrl-FERR的抗体稀释物(终浓度:1.69×10^{-4}-10μg/mL,3倍稀释)在GMB FACS缓冲液中制备。将细胞离心,除去上清液,并将细胞(50μL中30,000个细胞)与50μL抗体稀释物在4℃下孵育30分钟。用GMB FACS缓冲液洗涤细胞两次,并与50μL二抗(PE缀合的山羊抗人IgG F(ab')$_2$;1:500)在4℃下避光孵育30分钟。将细胞用GMB FACS缓冲液洗涤两次,并重悬于补充有2mM EDTA和DAPI活力标志物(1:5,000)的GMB FACS缓冲液中。

[1117] 通过PE阳性、DAPI阴性的门控分析,使用FlowJo软件,在IntellicytiQue PLUS筛选器(Intellicyt Corporation)上通过流式细胞术分析抗体与活细胞的结合。在GraphPad Prism中使用非线性回归分析(四参数剂量反应曲线拟合)分析结合曲线。

[1118] 在流式细胞术结合测定中,阳性对照抗体IgG1-ctrl(具有野生型Fc区)显示出与瞬时表达FcγRIa的细胞的结合,而未观察到阴性对照抗体IgG1-ctrl-FERR(具有含有FER惰性突变和在本研究的背景下功能上不相关的另外的K409R突变的Fc区)的结合(图35)。未观察到IgG1-PD1的结合,而观察到派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗和多塔利单抗的浓度

依赖性结合。

[1119] 这些数据证实了IgG1-PD1的Fc结构域缺乏Fc γ RIa结合,并证明了Fc γ RIa与纳武单抗、派姆单抗、多塔利单抗和西米普利单抗的结合。总之,这些数据表明IgG1-PD1的Fc结构域不能诱导Fc γ RIa介导的效应子功能。

[1120] 实施例37:IgG1-PD1与新生儿Fc受体的结合

[1121] 新生儿Fc受体(FcRn)通过保护IgG免于降解而使IgG具有长血浆半衰期。IgG在酸性(pH 6.0)内体环境中与FcRn结合,但在中性pH(pH 7.4)下与FcRn解离。抗体与FcRn的这种pH依赖性结合导致抗体与FcRn一起再循环,这防止了细胞内抗体降解,因此是抗体的体内药代动力学的指标。通过表面等离子体共振(SPR),在pH 6.0和pH 7.4下,体外评估IgG1-PD1与固定化FcRn的结合。

[1122] 使用Biacore 8K SPR系统分析IgG1-PD1与固定化人FcRn的结合。根据制造商的说明书,使用胺耦合和His捕获试剂盒(Cytiva,cat.no.BR100050和cat.no.29234602),用抗组氨酸(His)抗体共价包被Biacore系列S传感器芯片CM5(Cytiva,cat.no.29104988)。在pH 7.4的PBS-P+缓冲液(Cytiva,cat.no.28995084)中或者在pH被调整至6.0的PBS-P+缓冲液(通过添加盐酸[Sigma-Aldrich,cat.no.07102])中稀释至5nM的包被浓度的FcRn(SinoBiological,cat.no.CT071-H27H-B),以10μL/分钟的流速和60秒的接触时间被捕获在包被有抗His的传感器芯片的表面上。这导致约50RU的捕获水平。在pH 6.0或pH 7.4PBS-P+缓冲液的三个启动循环后,注射测试抗体(pH 6.0或pH 7.4PBS-P+缓冲液中的6.25-100nM IgG1-PD1、派姆单抗(MSD,批号T019263)或纳武单抗(Bristol-Myers Squibb,批号ABP6534)的两倍稀释系列)以生成结合曲线。在具有捕获的FcRn的表面(活性表面)上分析的每个样品也在没有捕获的FcRn的平行流动池(参考表面)上进行分析,其用于背景校正。从其他传感图中减去含有HBS-EP+作为(模拟)分析物的第三个启动循环以产生双重参考数据。在每个循环结束时,使用10mM甘氨酸-HCl pH 1.5(Cytiva,cat.no.BR100354)再生表面。使用Biacore Insight评估软件(Cytiva)中预定义的“使用捕获的多循环动力学”评估方法分析数据。数据基于三个独立的具有技术重复的实验。

[1123] 在pH 6.0下,IgG1-PD1以50nM的平均亲和力(K_D)结合FcRn(表18),其与具有野生型Fc区的IgG1-ctrl抗体相当(文献中报道了野生型IgG1分子的宽范围亲和力;在先前具有相同测定装置的内部实验中,12个数据点测量的IgG1-ctrl的平均K_D为34nM)。派姆单抗和纳武单抗的亲和力大约低两倍(K_D分别为116nM和133nM)。在pH 7.4下未观察到FcRn结合(未显示)。总之,这些结果证明IgG1-PD1 Fc区中的FER惰性突变不影响FcRn结合,并表明IgG1-PD1将保留典型的IgG体内药代动力学特性。

[1124] 表18.通过SPR确定的对FcRn的亲和力。通过SPR分析IgG1-PD1、派姆单抗和纳武单抗与包被有人FcRn的传感器芯片的结合。平均亲和力和SD是基于具有技术重复的三个独立测量。

[1125]

抗体	K_D(M)		k_a(1/M×s)		k_d(1/s)	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
IgG1-PD1	4.99×10^{-8}	6.85×10^{-9}	8.65×10^{5}	6.79×10^{4}	4.29×10^{-2}	4.88×10^{-3}
纳武单抗	1.33×10^{-7}	2.01×10^{-8}	5.18×10^{5}	4.70×10^{4}	6.89×10^{-2}	1.19×10^{-2}
派姆单抗	1.16×10^{-7}	1.69×10^{-8}	5.46×10^{5}	4.42×10^{4}	6.36×10^{-2}	1.15×10^{-2}

[1126] 缩写:$K_{D=}$平衡解离常数;k_a=结合速率常数;k_d=解离速率常数或解离速率;SD=标准差。

[1127] 实施例38:在没有靶标结合的情况下的IgG1-PD1的药代动力学分析

[1128] 在小鼠中分析IgG1-PD1的药代动力学特性。PD-1主要在活化的B和T细胞上表达,因此,预计其在非荷瘤SCID小鼠中的表达是有限的,该小鼠缺少成熟B和T细胞。另外,IgG1-PD1显示出与瞬时过表达小鼠PD-1的细胞的交叉反应显著降低(实施例27)。因此,预期IgG1-PD1在非荷瘤SCID小鼠中的药代动力学(PK)特性能够反映IgG1-PD1在不存在靶结合的情况下的PK特性。

[1129] 本研究中的小鼠饲养在中央实验室动物设施(Utrecht,荷兰)中。将所有小鼠饲养在单独通风的笼子中,并自由提供食物和水。所有实验均符合从指令(2010/63/EU)翻译的荷兰动物保护法(WoD),并得到荷兰中央动物实验委员会和当地伦理委员会的批准。SCID小鼠(C.B-17/IcrHan®Hsd-Prkdc^{scid},Envigo)静脉注射1或10mg/kg IgG1-PD1,每组使用3只小鼠。在抗体施用后10分钟、4h、1天、2天、8天、14天和21天,从隐静脉或颊静脉收集血样(40μL)。将血液收集到含有K_2-乙二胺四乙酸的小瓶中,并储存在-65℃下,直至确定抗体浓度。

[1130] 通过总人IgG(hIgG)电化学发光免疫测定(ECLIA),确定特异性hIgG浓度。将Meso Scale Discovery(MSD)标准板(96孔多阵列板,cat.no.L15XA-3)用在PBS(Lonza,cat.no.BE17-156Q)中稀释的小鼠抗hIgG捕获抗体(IgG2amm-1015-6A05)在2-8℃下包被16-24h。在用PBS-Tween(PBS-T;补充有0.05%(w/v)Tween-20的PBS[Sigma,cat.no.P1379])洗涤平板以除去未结合的抗体后,将未占据的表面在室温下封闭60±5分钟(补充有3%(w/v)阻断物-A[MSD,cat.no.R93AA-1]的PBS-T),然后用PBS-T洗涤。小鼠血浆样品最初在测定缓冲液(补充有1%(w/v)阻断物-A的PBS-T)中稀释50倍(2%小鼠血浆)。为了创建参考曲线,将IgG1-PD1(与用于注射的材料相同批次)在校准稀释剂(测定缓冲液中的2%小鼠血浆[K_2EDTA,混合血浆,BIOIVT,cat.no.MSE00PLK2PNN])中稀释(测量范围:0.156-20.0μg/mL;锚点:0.0781和40.0μg/mL)。为了适应样品中存在的预期宽范围的抗体浓度,将样品另外在样品稀释剂(测定缓冲液中2%小鼠血浆)中1:10或1:50稀释。将包被和封闭的板与50μL稀释的小鼠样品、参考曲线和适当的质量对照样品(加有IgG1-PD1的混合小鼠血浆,覆盖参考曲线的范围)在室温下孵育90±5分钟。用PBS-T洗涤后,将平板与SULFO-TAG缀合的小鼠抗hIgG检测抗体IgG2amm-1015-4A01在室温下孵育90±5分钟。用PBS-T洗涤后,通过添加读取缓冲液(MSD GOLD读取缓冲液,cat.no.R92TG-2)并使用MSD Sector S600读板器测量~620nm处的光发射来可视化固定的抗体。使用SoftMax Pro GxP软件v7.1进行分析数据的处理。不允许外推低于运行定量下限(LLOQ)或高于定量上限(ULOQ)。

[1131] 在不存在靶标结合的情况下,IgG1-PD1的血浆清除概况与通过基于人中IgG1清除率的两室模型预测的野生型人IgG1抗体在SCID小鼠中的清除概况相当(Bleeker et al., 2001,Blood.98(10):3136-42)(图36)。没有记录临床观察,也未观察到体重减轻。

[1132] 总之,这些数据表明,在不存在靶标结合的情况下,IgG1-PD1的PK特性与正常人IgG抗体的PK特性相当。

[1133] 实施例39:IgG1-PD1在人PD-1敲入小鼠中的抗肿瘤活性

[1134] IgG1-PD1仅显示出与瞬时过表达小鼠PD-1的细胞的有限结合(实施例27)。因此,为了评估IgG1-PD1在体内的抗肿瘤活性,使用了经过工程化改造以在小鼠PD-1基因位点表达人PD-1胞外结构域(ECD)的C57BL/6小鼠(hPD-1敲入[KI]小鼠)。

[1135] 所有动物实验均在Crown Bioscience Inc.进行,并在执行前获得其机构动物护理和使用委员会(IACUC)的批准。根据由实验动物护理评估和认证协会(AAALAC)的法规定义的良好动物实践饲养和处理动物。C57BL/6背景上的雌性纯合人PD-1敲入小鼠(hPD-1KI小鼠;北京百奥赛图有限公司;C57BL/6-Pdcd1$^{tm1(PDCD1)}$/Bcgen,库存号110003),7-9周龄,在右下腹皮下(SC)注射同系的MC38结肠癌细胞(1×10^6细胞)。使用卡尺(随机分组后每周三次)评估肿瘤生长,并且从卡尺测量计算肿瘤体积(mm^3)为:肿瘤体积=0.5×(长度×宽度^2),其中长度是最长肿瘤尺寸,宽度是垂直于长度的最长肿瘤尺寸。当肿瘤达到约60mm^3的平均体积时(表示为第0天),基于肿瘤体积和体重将小鼠随机化(每组9只小鼠)。在治疗开始时,小鼠静脉注射(IV;在PBS中给药体积10mL/kg)0.5、2或10mg/kg IgG1-PD1或派姆单抗(由Crown Bioscience Inc.从Merck获得,批号T042260),或静脉注射10mg/kg同种型对照抗体IgG1-ctrl-FERR。随后的剂量通过腹膜内(IP)施用。使用每周两剂的给药方案,持续三周(2QW×3)。每天监测动物的发病率和死亡率,并常规监测其他临床观察结果。当肿瘤体积超过1,500mm^3时或者当动物达到其他人道终点时,单个小鼠的实验结束。

[1136] 为了比较各组之间的无进展生存期,将曲线拟合应用于单个肿瘤生长图,以确定对于每只老鼠肿瘤体积超过500mm^3的进展的天数。将这些天数绘制在Kaplan-Meier存活曲线中,并用于使用SPSS软件在各个曲线之间进行Mantel-Cox分析。在所有组仍然完整的最后一天(即,直到研究中第一例肿瘤相关的死亡,即,第11天),使用非参数Mann-Whitney分析(在GraphPad Prism中)比较组间肿瘤体积的差异。P值与中位值(每组)一起呈现,包括中位值差异的95%置信区间(Hodges Lehmann)。

[1137] 小鼠没有表现出疾病迹象,但发现两只小鼠死亡(一只在2mg/kg IgG1-PD1组中,一只在2mg/kg派姆单抗治疗组中)。这些死亡的原因不确定。

[1138] 用IgG1-PD1和派姆单抗处理在所有测试剂量下抑制肿瘤生长(图37A)。在第11天,所有处理组完成的最后一天,在所有测试剂量下,用IgG1-PD1或派姆单抗处理的小鼠中的肿瘤显著小于用10mg/kg IgG1-ctrl-FERR处理的小鼠中的肿瘤(图37B)。另外,在10mg/kg下,用IgG1-PD1处理的小鼠的肿瘤体积显著小于用等同剂量的派姆单抗处理的小鼠(Mann-Whitney检验,p=0.0188)。

[1139] 与用10mg/kg IgG1-ctrl-FERR处理的小鼠相比,在所有测试剂量下,用IgG1-PD1或派姆单抗处理显著增加了无进展生存期(PFS)(图37C)。在10mg/kg下,与用派姆单抗处理的小鼠相比,用IgG1-PD1处理的小鼠的无进展生存期显著延长(中位PFS10mg/kg IgG1-PD1:20.56天,中位PFS10mg/kg派姆单抗:13.94天;P值=0.0021)。

[1140] 总之,IgG1-PD1在携带MC38肿瘤的hPD-1KI小鼠中表现出强大的抗肿瘤活性。

[1141] 实施例40.IgG1-PD1在人PD-1敲入小鼠中的PD活性

[1142] IgG1-PD1在携带MC38肿瘤的hPD-1KI小鼠中显示出强大的抗肿瘤活性(实施例39)。为了探索IgG1-PD1治疗的药效学影响,用IgG1-PD1处理携带MC38肿瘤的hPD-1KI小鼠,并在预定时间点收集血液、脾脏和肿瘤样品。使用流式细胞术和免疫组织化学(IHC)确定IgG1-PD1处理对免疫细胞的影响。

[1143] 如实施例39中所述建立携带MC38肿瘤的hPD-1KI小鼠模型。当肿瘤达到约60mm^3的平均体积时(表示为第0天),基于肿瘤体积将小鼠随机化(每组12只小鼠)。在治疗开始时,在第0、3和7天,小鼠静脉注射(在PBS中给药体积10mL/kg)0.5或10mg/kg IgG1-PD1,静脉注射10mg/kg派姆单抗(由Crown Bioscience Inc.从Merck获得,批号U036695),或静脉注射10mg/kg同种型对照抗体IgG1-ctrl-FERR。每天监测动物的发病率和死亡率,并常规监测其他临床观察结果。小鼠没有表现出疾病迹象。在第2、4和8天,将动物安乐死,并通过心脏穿刺收集血液(每个时间点每个处理组4只小鼠)用于外周血细胞的免疫表型分析。另外,收获脾脏和肿瘤。将肿瘤用福尔马林固定并用石蜡包埋用于IHC分析。

[1144] 根据制造商的说明书,使用gentleMACS™解离器(130-096-427,Miltenyi)酶促解离脾脏。将所得细胞悬浮液通过70μm细胞过滤器(Falcon,cat.no.352350)过滤,用5mL FACS洗涤缓冲液(10% FBS[Gibco,cat.no.10099-141],40mM EDTA[Boston BioProducts,cat.no.BM-711-K],溶于PBS中)洗涤。使用RBC裂解缓冲液(Bio-gems,cat.no.64010-00-100)裂解红细胞。将细胞用FACS洗涤缓冲液洗涤两次,并重悬于PBS中用于细胞计数。

[1145] 将血液样品和解离的脾脏样品与小鼠BD Fc Block™(BD Biosciences,cat.no.553141)在暗处在4℃下孵育10分钟,之后将细胞用表19中所述的在Fc阻断缓冲液中稀释的抗体组在4℃下染色30分钟。随后,将血液样品与RBC裂解缓冲液在室温下再孵育10分钟。然后,将来自血液和解离的脾脏样品两者的细胞用洗涤缓冲液洗涤三次。向每个样品中添加100μL123Count eBeads(eBioscience,cat.no.01-1234-42),之后通过流式细胞术分析样品。使用Kaluza分析软件分析流式细胞术数据。

[1146] 表19.免疫表型抗体组

[1147]

标志物	荧光团	克隆	供应商	Cat. no.	同种型	稀释度
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	Biolegend	103132	大鼠 IgG2b，κ	1:50
CD3	BUV395	17A2	BD Biosciences	740268	大鼠 IgG2b，κ	1:50
CD4	BV510	GK1.5	Biolegend	100449	大鼠 IgG2b，κ	1:40
CD8	PE-eF610	53-6.7	eBioscience	61-0081-82	大鼠 IgG2a，κ	1:50
CD44	AF700	IM7	Biolegend	103026	大鼠 IgG2b，κ	1:50
CD62L	BV785	MEL-14	Biolegend	104440	大鼠 IgG2a，κ	1:50
CD19[a]	FITC	6D5	Biolegend	115506	大鼠 IgG2a，κ	1:50
CD11b[a]	FITC	M1/70	Biolegend	101206	大鼠 IgG2b，κ	1:50
I-A/I-E (MHC II)	BV711	M5/114.15.2	Biolegend	107643	大鼠 IgG2b，κ	1:50
可固定活力染料	eF780	N.A.	eBioscience	65-0865-14	N.A.	1:100

[1148] [a]将CD19和CD11b组合在单个通道中以排除表达CD19和/或CD11b的细胞。缩写:BUV＝亮紫外光;BV＝亮紫;CD＝分化簇;Cy＝花青;eF＝eFluor;FITC＝异硫氰酸荧光素;IgG＝免疫球蛋白G;MHC＝主要组织相容性复合物;N.A.＝不适用;PE＝藻红蛋白;PerCP＝多甲藻黄素-叶绿素-蛋白。

[1149] 在IHC中使用兔抗CD3ε(Ventana,克隆2GV6,cat.no.790-4341;终浓度0.4μg/mL)、兔抗CD4(Abcam,克隆EPR19514,cat.no.ab183685;终浓度5μg/mL)、兔抗CD8(Cell Signaling,克隆D4W2Z,cat.no.98941;稀释1:200)和兔抗GZMB抗体(Abcam,克隆EPR22645-206,cat.no.ab255598;终浓度5μg/mL)评估异种移植肿瘤组织中CD3、CD4、CD8和颗粒酶B(GZMB)的表达,随后,使用抗兔特异性检测方案(OmniMap DAB抗Rb检测试剂盒,Roche,cat.no.05269679001,用于CD8 IHC测定与HQ信号扩增试剂盒(Roche,cat.no.06472320001)组合)以避免与潜在的残留小鼠IgG结合。使用HALO软件(Indica Labs),用定制的图像分析算法对数字图像进行活肿瘤区域内的细胞定量。通过计算活的(非坏死的)肿瘤区域内所有有核细胞的标志物阳性细胞的百分比来生成细胞定量读出。

[1150] 与非结合对照抗体IgG1-ctrl-FERR相比,用10mg/kg IgG1-PD1处理导致第8天的外周血中的T细胞(CD3$^+$,CD4$^+$和CD8$^+$)数量增加的明显趋势,而用10mg/kg派姆单抗处理导致外周T细胞数量的统计学显著降低(图38)。同时,与对照处理相比,在用10mg/kg IgG1-PD1处理的小鼠脾脏中,效应记忆(CD44$^+$CD62L$^-$)CD8$^+$ T细胞的百分比在第8天显著增加,但在用10mg/kg派姆单抗处理的小鼠的脾脏中没有增加(图39A)。与对照小鼠和用10mg/kg派姆单抗处理的小鼠相比,在用10mg/kg IgG1-PD1处理的小鼠的脾脏中观察到幼稚(CD44$^-$CD62L$^+$)CD8$^+$ T细胞的百分比伴随显著下降。用10mg/kg IgG1-PD1处理显著增加了第8天脾脏中MHC II类$^+$CD8$^+$ T细胞的百分比,这表明T细胞活化增加(图39B)。在用10mg/kg派姆单抗处理的小鼠的脾脏中观察到MHC II类$^+$CD8$^+$ T细胞的百分比相当的增加。

[1151] 在第8天,用10mg/kg派姆单抗处理的小鼠中肿瘤内CD3$^+$和CD8$^+$ T细胞的数量显著低于对照小鼠(图40A-C)。此外,在第8天,用10mg/kg IgG1-PD1处理的小鼠中表达细胞毒性效应分子GZMB的肿瘤内细胞的百分比显著高于用10mg/kg派姆单抗处理的小鼠和对照小鼠(图40D)。

[1152] 总之,IgG1-PD1的体内抗肿瘤活性与外周血和肿瘤内T细胞数量的增加、脾脏中效应记忆和活化的(MHC II$^+$类)CD8$^+$ T细胞的百分比的增加、以及肿瘤内GZMB$^+$细胞的百分比的增加相关。相比之下,派姆单抗处理的小鼠表现出有限的药效学变化。

[1153] 实施例41.IgG1-PD1与巨噬细胞的结合

[1154] IgG1-PD1显示不结合Fcγ R,而纳武单抗、派姆单抗、多塔利单抗和西米普利单抗显示结合Fcγ R(实施例35)。使用流式细胞术,在体外评估这些抗体结合表达Fcγ R的M2c样巨噬细胞的能力。

[1155] 根据制造商的说明书,在淋巴细胞分离培养基(Promocell,cat.no.C-44010)上通过密度梯度离心(20分钟,800×g,使用低制动)在LeucoSep™管(Greiner,cat.no.227290)中从三个健康人供体(Sanquin血液供应基金会,荷兰)的白细胞层纯化人外周血单核细胞(PBMC)。根据制造商的说明书,使用抗CD8微珠(Miltenyi;cat.no.130-050-201)通过MACS技术从PBMC纯化人单核细胞。CD14$^+$单核细胞以1.0×10^{6}个细胞/mL的密度重悬在补充有50ng/mL M-CSF(Gibco,cat.no.PHC9501)的CellGenix®GMP DC培养基(CellGenix,cat.no.20801-0500)中。为了使单核细胞向M2c样巨噬细胞极化,将纯化的单核细胞铺板在装有补充M-CSF的CellGenix GMP DC培养基的100mm^{2}具有UpCell™表面的Nunc™培养皿(8×10^{6}个细胞/培养皿,密度为1.0×10^{6}个细胞/mL;Thermo Fisher Scientific,cat.no.174902)中,并培养7天(37℃,5%CO_2),随后,在补充有50ng/mL M-CSF、50ng/mL IL-4(R&D Systems,cat.no.204-IL)和50ng/mL IL-10(R&D Systems,cat.no.1064-IL/CF)的CellGenix GMP DC培养基中培养3天。接下来,通过将培养皿在室温下放置40至60分钟,将巨噬细胞从培养皿表面分离。将分离的巨噬细胞通过离心(300×g,5分钟)沉淀,计数,并以1.5×10^{6}个细胞/mL的密度重悬于CellGenix GMP DC培养基中。使用亮紫(BV)421缀合的抗人CD163(BioLegend,cat.no.333612;1:200稀释)和BV711缀合的抗人CD206(BioLegend,cat.no.321136;1:200稀释)的混合物,通过流式细胞术确认单核细胞衍生的巨噬细胞的M2c样表型。使用FITC缀合的抗人CD64(Fcγ RIa;BioLegend,cat.no.305006;1:25稀释)、FITC缀合的抗人CD32(Fcγ RII;BD Pharmingen,cat.no.552883;1:50稀释)、PE缀合的抗人CD16a(Fcγ RIIIa;BD Pharmingen,cat.no.555407;1:50稀释)、PE缀合的抗PD-1抗体

(BioLegend,cat.no.329906;1:50稀释)、FITC缀合的IgG1同种型对照(BioLegend,cat.no.400108;1:25稀释)和PE缀合的IgG1同种型对照(BD Pharmingen,cat.no.555749;1:50稀释)评估M2c样巨噬细胞上的Fcγ R和PD-1的表达。将M2c样巨噬细胞与IgG1-PD1、派姆单抗(MSD,批号U013442)、纳武单抗(Bristol-Myers Squibb,批号ABP6534)、IgG4同种型对照(BioLegend,cat.no.403702)、IgG1-ctrl和IgG1-ctrl-FERR一起孵育24h,并用FACS缓冲液洗涤两次。将细胞与在FACS缓冲液中稀释的PE缀合的山羊抗人IgG F(ab')$_2$(Jackson ImmunoResearch,cat.no.109-116-097;1:200稀释)在4℃下孵育30分钟。用FACS缓冲液洗涤两次后,将细胞重悬于补充有活力染料4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI;BD Pharmingen,cat.no.564907;1:5,000稀释)的FACS缓冲液中,随后在BD LSRFortessa™细胞分析仪上测量并在FlowJo中分析。

[1156] 使用人单核细胞衍生的M2c样巨噬细胞(来自三个健康供体)评估IgG1-PD1、派姆单抗和纳武单抗与细胞膜上表达的Fcγ R的结合。首先通过流式细胞术证实了Fcγ RIa、Fcγ RII和Fcγ RIIIa的表达以及PD-1表达的缺失(图41A)。具有野生型IgG1 Fc结构域的IgG1-ctrl、Fc惰性IgG1-ctrl-FERR和IgG4同种型对照被包括作为对照。尽管IgG1-ctrl在孵育24h后显示出与M2c样巨噬细胞的有效结合,但对于任何测试的供体,未观察到IgG1-PD1或IgG1-ctrl-FERR的结合(图41B)。相反,派姆单抗、纳武单抗和IgG4同种型对照抗体均显示出高于背景对照的结合。总之,这些数据证明IgG1-PD1不与表达Fcγ R的M2c样巨噬细胞结合,而派姆单抗和纳武单抗与其结合。

[1157] 实施例42.IgG1-PD1诱导的Fcγ R信号传导

[1158] IgG1-PD1显示不与Fcγ R或M2c样巨噬细胞结合,而具有IgG4骨架的抗PD-1抗体显示与其结合(实施例35和41)。使用基于细胞的Fc效应子活性报告基因测定,在体外评估这些抗体诱导Fcγ R信号传导的能力。

[1159] 基本上如制造商所述,使用基于生物发光细胞的报告基因测定(Promega,分别为cat.no.GA1341、G988A、CS178B11和G988ACS1781E01)评估由IgG1-PD1、纳武单抗、派姆单抗、多塔利单抗和西米普利单抗诱导的Fcγ RI、Fcγ RIIa-H131、Fcγ RIIa-R131和Fcγ RIIb信号传导。简而言之,用PD-1转染的CHO细胞(内部产生;实施例28)与连续稀释的IgG1-PD1、派姆单抗(MSD,批号W003098)、纳武单抗(Bristol-Myers Squibb,批号8006768)、多塔利单抗(GlaxoSmithKline,批号1822049)、西米普利单抗(Regeneron,批号1F006A)、IgG1-ctrl-FERR或IgG4同种型(BioLegend,cat.no.403702)在37℃、5% CO_2下预孵育15分钟(Fcγ RI测定中的最终测定浓度:30-1.23×10^{-7}μg/mL,25倍稀释;其他Fcγ R测定中的最终测定浓度:30-0.00192μg/mL,5倍稀释)。具有增强六聚化的E430G突变的IgG1-CD52-E430G被包括作为阳性对照。基因工程化的Fcγ RI、Fcγ RIIa-H(Fcγ RIIa-H131)、Fcγ RIIa-R(Fcγ RIIa-R131)和Fcγ RIIb效应细胞以1:1的比率添加到培养物中,之后将样品在37℃、5%CO_2下孵育5h。接下来,将样品与重构的Bio-Glo™在室温下孵育10分钟,之后使用EnVision多标记读板器(PerkinElmer)测量发光(以RLU计)。

[1160] 具有E430G六聚化增强突变的膜结合IgG1-CD52-E430G诱导强Fcγ RI、Fcγ RIIa-R131、Fcγ RIIa-H131和Fcγ RIIb信号传导。膜结合的派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗和多塔利单抗(均为IgG4亚类)也诱导Fcγ RI、Fcγ RIIa-R131、Fcγ RIIa-H131和Fcγ RIIb信号传导,但程度较小,而膜结合的IgG1-PD1和非结合对照抗体(IgG1-ctrl-FERR,IgG4同种

型)不诱导(图42)。

[1161] 总之,这些数据证明膜结合的纳武单抗、派姆单抗、多塔利单抗和西米普利单抗诱导FcγRI、FcγRIIa-R131、FcγRIIa-H131和FcγRIIb信号传导。相反,膜结合的IgG1-PD1不能诱导FcγR介导的信号传导,这证实了IgG1-PD1的Fc结构域的功能惰性。

[1162] 实施例43:IgG1-CD27-A-P329R-E345R与DuoBody-PD-L1x4-1BB组合诱导多克隆活化的人T细胞增殖

[1163] 使用新鲜分离的人健康供体PBMC,通过流式细胞术分析IgG1-CD27-A-P329R-E345R与DuoBody-PD-L1x4-1BB组合对活化的人T细胞的影响,其中T细胞用CD3抗体多克隆刺激。

[1164] 根据制造商的说明书,使用淋巴细胞分离培养基(PromoCell,cat.no.C-44010)和LeucoSep管(Greiner Bio-One,cat.no.227290)通过低密度梯度离心从人健康供体白细胞层新鲜分离人外周血单核细胞(PBMC)。根据制造商的说明书,将PBMC以10×10^6个细胞/mL的密度重悬于PBS中,并使用CellTrace™Violet细胞增殖试剂盒(Thermo Fisher Scientific,cat.no.C34557)用CTV进行标记。将CTV标记的PBMC(75,000个细胞/孔)接种在96孔U型底板(Greiner Bio-One,cat.no.650180)中,并与0.1μg/mL CD3抗体克隆UCHT1(Stemcell,cat.no.60011)与IgG1-CD27-A-P329R-E345R(0.016至10μg/mL,五倍稀释)和DuoBody-PD-L1x4-1BB(0.000064至5μg/mL,五倍稀释)在培养基(RPMI 1640[Lonza,cat.no.12-115F]、10%含铁的供体牛血清[DBSI;Gibco,cat.no.20731-030]、1% Pen/Strep[Lonza,cat.no.DE17-603E];或具有Hepes和L-谷氨酰胺的IMDM[Lonza,cat.no.12-722F];5%人血清[Sigma Aldrich,cat.no.H4522,在65℃下热灭活30分钟],1%Pen/Strep[Lonza])中孵育4天。将细胞悬浮液沉淀,用FACS缓冲液(PBS[Lonza,cat.no.BE17517Q]、0.02%叠氮化钠[bioWorld,cat.no.419200443]、0.1%BSA[Roche,cat.no.43279213]、2mM EDTA[Sigma,cat.no.BCCD3789])洗涤一次,并与含有淋巴细胞标志物FITC标记的抗人CD4(BD Biosciences,cat.no.345768;1:50)和APC标记的抗人CD8(BD Biosciences,cat.no.555369;1:50)的FACS缓冲液在4℃下孵育30分钟。将细胞洗涤两次并重悬于含有活力染料7-氨基放线菌素D(7-AAD;BD Biosciences,cat.no.51 68981E;1:240)的FACS缓冲液中。在iQue+(BioRad)上获取流式细胞术数据。

[1165] 使用FlowJo软件(v10.7.1)中的增殖建模工具分析活$CD4^+$和$CD8^+$T细胞亚群(分别为FITC-$CD4^+$APC-$CD8^-$7-AAD^-和FITC-$CD4^-$APC-$CD8^+$7-AAD^-)中的CTV稀释峰,并根据以下公式确定扩增指数:

[1166] 培养开始时的细胞数=(G0)+(G1)/2+(G2)/4+(G3)/8+(G4)/16+…(GN/2N)

[1167] 扩增指数=总细胞数(G0至GN的和)/开始时的细胞数

[1168] G0至GN是单个增殖峰,G0代表未分裂的细胞部分,GN代表分裂N次的细胞部分。

[1169] 在整个抗体浓度范围内,在单独用IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理的PBMC样品中观察到$CD4^+$(图43A)和$CD8^+$(图43B)T细胞增殖的剂量依赖性增加。单独用DuoBody-PD-L1x4-1BB处理的样品的剂量反应曲线显示钟形曲线,在中间浓度下达到最高的扩增指数。IgG1-CD27-A-P329R-E345R与DuoBody-PD-L1x4-1BB的组合比单独的每种抗体更有效增加$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖,并且在测试的最高IgG1-CD27-A-P329R-E345R浓度(2至10μg/mL)与测试的DuoBody-PD-L1x4-1BB的中至高浓度(0.04至5μg/mL)组合时达到最大效果。

[1170] 这些数据表明,与单独的每种抗体相比,IgG1-CD27-A-P329R-E345R与DuoBody-PD-L1x4-1BB的组合诱导活化的T细胞增殖的更高的增加。

[1171] 实施例44:确定IgG1-CD27-A-P329R-E345R与DuoBody-PD-L1x4-1BB或PD-1/PD-L1抑制剂组合增强T细胞增殖和细胞因子分泌的能力的抗原特异性刺激测定

[1172] 为了确定与单药活性相比,IgG1-CD27-A-P329R-E345R与靶向PD-L1和4-1BB的双特异性抗体或PD-1/PD-L1抑制剂对T细胞增殖和细胞因子产生的组合影响,使用过表达PD-1的健康人$CD8^+$ T细胞和表达同源抗原的未成熟的树突状细胞(iDC)的共培养物进行抗原特异性刺激测定。

[1173] HLA-A*02^+外周血单核细胞(PBMC)获自健康供体(Transfusionszentrale,大学医院,Mainz,德国)。根据制造商的说明书,使用抗CD14微珠(Miltenyi;cat.no.130-050-201)通过磁珠激活细胞分选(MACS)技术从PBMC分离单核细胞。将外周血淋巴细胞(PBL,CD14阴性部分)冷冻保存在含有10%DMSO(AppliChem GmbH,cat.no.A3672,0050)和10%人白蛋白(CSL Behring,PZN 00504775)的RPMI 1640中,用于T细胞分离。为了分化成iDC,将40×10^6个单核细胞/mL在RPMI 1640(Life Technologies GmbH,cat.no.61870-010)中培养5天,该RPMI 1640含有5%混合人血清(One Lambda Inc.,cat.no.A25761)、1mM丙酮酸钠(Life Technologies GmbH,cat.no.11360-039)、1x非必需氨基酸(Life Technologies GmbH,cat.no.11140-035)、200ng/mL粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF;Miltenyi,cat.no.130-093-868)和200ng/mL人白细胞介素-4(IL-4;Miltenyi,cat.no.130-093-924)。在第3天,用含有补充剂的新鲜培养基替换一半培养基。在第5天,通过收集非贴壁细胞并通过与含有2mM EDTA的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)在37℃下孵育10分钟来分离贴壁细胞,收获iDC。在用DPBS洗涤后,将iDC冷冻保存在含有10% DMSO(AppliChem GmbH,cat.no.A3672,0050)的FBS(Sigma-Aldrich,cat.no.F7524)中,以供将来用于抗原特异性T细胞测定。

[1174] 在抗原特异性$CD8^+$ T细胞刺激测定开始的前一天,将来自同一供体的冷冻PBL和iDC解冻。根据制造商的说明书,使用抗CD8微珠(Miltenyi;cat.no.130-045-201)通过MACS技术从PBL分离$CD8^+$ T细胞。在250μL X-VIVO™15培养基(Lonza,cat.no.BE02-060Q)中,用每种10μg体外转录(IVT)的RNA(编码对人claudin-6(CLDN6;HLA-A*02限制性;描述于WO2015150327A1中)具有特异性的鼠TCR的α和β链)和10μg IVT-RNA(编码人PD-1(UniProt Q15116))电穿孔约10×10^6至15×10^6个$CD8^+$ T细胞。将细胞转移到4-mm电穿孔比色皿(VWR International GmbH,cat.no.732-0023),并使用BTX ECM®830电穿孔系统(BTX;500V,3ms脉冲)进行电穿孔。电穿孔后,立即将细胞转移到含有5%混合人血清的新鲜IMDM GlutaMAX培养基(Life Technologies GmbH,cat.no.319800-030)中,并在37℃、5% CO_2下静置至少1小时。根据制造商的说明书,在PBS中使用0.8μM羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE;Life Technologies GmbH,cat.no.V12883)标记T细胞,并在补充有5%人血清的IMDM培养基中孵育过夜。

[1175] 使用如上所述的电穿孔系统(300V,12ms脉冲),在250μL VIVO 15培养基中,用2μg编码全长人CLDN6(WO 2015150327 A1)的IVT-RNA电穿孔多至5×10^6个解冻的iDC,并且将其在补充有5%混合人血清的IMDM培养基中孵育过夜。

[1176] 在抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R(0.1、1或10μg/mL)或IgG1-CD27-131A

(10μg/mL)的存在下,或在DuoBody-PD-L1x4-1BB(0.2μg/mL)、IgG1-PD1(0.8μg/mL)、派姆单抗(Keytruda®,Merck Sharp&Dohme GmbH,PZN 10749897;0.8μg/mL)、nivolumab(Opdivo®,Bristol-Myers-Squibb11024601;1.6μg/mL)、阿替利珠单抗(Tecentriq©,Roche PZN 11306050;0.4μg/mL),单独或与IgG1-CD27-A-P329R-E345R(0.1、1或10μg/mL)或IgG1-CD27-131A(10μg/mL)组合的存在下,将电穿孔的iDC与电穿孔的CFSE标记的T细胞以1:10的比率(DC:T细胞)在96孔圆底板中含有5%混合人血清的IMDM培养基中孵育。培养4天后,将细胞用APC缀合的抗人CD8抗体染色。使用BD FACSCelesta™流式细胞仪(Becton Dickinson GmbH),通过流式细胞术分析$CD8^+$ T细胞中CFSE稀释度来评估T细胞增殖。

[1177] 使用FlowJo软件10.7.1版本分析流式细胞术数据。使用FlowJo中的增殖建模工具评估$CD8^+$ T细胞的CFSE标记稀释,并使用以下公式计算扩增指数。

[1178] 培养开始时的细胞数=(G0)+(G1)/2+(G2)/4+(G3)/8+(G4)/16+…(GN/2N)

[1179] 扩增指数=总细胞数(G0至GN的和)/开始时的细胞数

[1180] G0至GN是单个增殖峰,G0代表未分裂的细胞部分,GN代表分裂N次的细胞部分。

[1181] 根据制造商的说明书,使用用于检测一组10种人细胞因子(GM-CSF、IL-2、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-13、干扰素[IFN]γ、IFNγ诱导蛋白[IP]-10[也称为C-X-C基序趋化因子配体10]、巨噬细胞趋化蛋白[MCP]1和肿瘤坏死因子[TNF]-α;Meso Scale Discovery,cat.no.K15067L-2)的定制的U-Plex生物标志物组1(人)测定,或用于检测一组10种人细胞因子(GM-CSF、IL-2、IL-12p70、IL-13、干扰素[IFN]γ、IFNγ诱导蛋白[IP]-10[也称为C-X-C基序趋化因子配体10]、巨噬细胞趋化蛋白[MCP]1、巨噬细胞炎性蛋白[MIP]-1β、sCD27和肿瘤坏死因子[TNF]α;Meso Scale Discovery,cat.no.K151AEL-2)的U-Plex免疫肿瘤学组1(人)测定,通过多重电化学发光免疫测定(ECLIA)确定细胞培养上清液中的细胞因子浓度。

[1182] 用IgG1-CD27-A-P329R-E345R或DuoBody-PD-L1x4-1BB的单药处理增强了过表达PD-1的$CD8^+$ T细胞的增殖(图44A)。用IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB的组合处理比用每种化合物单独处理导致更高的增殖。

[1183] 与IgG1-CD27-A-P329R-E345R和抗PD-(L)1抗体作为单药相比,1或10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R和IgG1-PD1、派姆单抗、纳武单抗或阿替利珠单抗的组合增强了过表达PD-1的$CD8^+$ T细胞的增殖(图44B)。相反,与相应的抗PD-(L)1单药处理相比,10μg/mL IgG1-CD27-131A与IgG1-PD1或纳武单抗的组合仅导致增殖的小幅增加,并且10μg/mL IgG1-CD27-131A与派姆单抗或阿替利珠单抗的组合不增加增殖。

[1184] 在过表达PD-1的$CD8^+$ T细胞和iDC的共培养物中,与未处理的共培养物相比,用IgG1-CD27-A-P329R-E345R的单药处理适度增强了促炎细胞因子IFN-γ和GM-CSF的分泌,并且没有增强TNFα和IL-2的分泌(图45A)。DuoBody-PD-L1x4-1BB单药处理显著增强了这些细胞因子的分泌,而IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB的组合处理进一步增强了这些细胞因子的分泌。

[1185] 与单药处理相比,用1或10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R和IgG1-PD1、派姆单抗、纳武单抗或阿替利珠单抗的组合处理增强了IFNγ的分泌(图45B)。在1和10μg/mL浓度的IgG1-CD27-A-P329R-E345R与IgG1-PD1或纳武单抗或10μg/mL浓度的IgG1-CD27-A-P329R-E345R与派姆单抗或阿替利珠单抗的情况下,在上清液中测量的总IFNγ水平高于用

单药观察到的IFNγ水平的总和。相反,10μg/mL IgG1-CD27-131A和IgG1-PD1、派姆单抗、纳武单抗或阿替利珠单抗的组合不导致IFNγ分泌增加或仅导致小幅增加。

[1186] 这些数据表明,与每个单独的抗体相比,IgG1-CD27-A-P329R-E345R与PD-1/PD-L1抑制剂或与DuoBody-PD-L1x4-1BB的组合诱导$CD8^+$ T细胞增殖和细胞因子分泌的更强的增加。

[1187] 实施例45:IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB的组合对CLDN6特异性T细胞介导的细胞毒性的影响

[1188] 在表达CLDN6-TCR的人健康供体T细胞和MDA-MB-231_hCLDN6靶细胞的共培养物中,通过细胞阻抗测量来分析在组合的IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB处理后的T细胞介导的细胞毒性的诱导。

[1189] 通过慢病毒转导生成MDA-MB-231_hCLDN6细胞。为此,将250μL补充有10% FBS(Biochrom,cat.no.S0115;非热失活的)的Dulbecco改良eagle培养基(DMEM,Thermo Fisher Scientific,cat.no.31966-047)中的2×10^5个MDA-MB-231人乳腺癌细胞接种在12孔组织培养板的每个孔中。将细胞在37℃下孵育1-2h(7.5% CO_2)。将含有编码人CLDN6(pL64b42E(EF1a-hClaudin6)Hygro-T2A-GFP)的慢病毒载体的上清液在冰上解冻,并在总体积750μL的DMEM/10% FBS中稀释,以获得2×10^5、8×10^4和3.2×10^4TU/mL的滴度。这些滴度分别对应于1、0.4和0.16的MOI。然后将上清液添加至MDA-MB-231细胞中,并将细胞在37℃(5% CO_2)下孵育72h,不进行扰动。对于本实施例中描述的实验,将MDA-MB-231-hCLDN6细胞在DMEM/10%FBS中培养。将细胞在70%至90%融合度下传代或收获用于实验。通过用Accutase(Thermo Fisher Scientific,cat.no.A11105010)处理5分钟(37℃,7.5%CO_2)将细胞分离,并通过添加培养基进行重悬。将细胞离心(300xg,室温下4分钟)并计数。MDA-MB-231_hCLDN6细胞培养不超过20代。

[1190] 根据制造商的说明书,人磁性CD8微珠(Miltenyi Biotec,cat.no.130-045-201)用于来自冷冻外周血白细胞的$CD8^+$ T细胞的阳性选择。将细胞悬浮液离心,并以每80μL MACS缓冲液1×10^7个活细胞重悬于磁激活细胞分选(MACS)缓冲液(含有5mM EDTA[Sigma-Aldrich,cat.no.03690]和1%人白蛋白[CSL Behring,cat.no.PZN-00504775]的Dulbecco's PBS[Thermo Fisher,cat.no.14190250])中。每1×10^7个细胞,添加12μL CD8微珠。将细胞和微珠的混合物在2至8℃孵育15分钟。用MACS缓冲液洗涤后,通过离心(8分钟,300×g,室温[RT]下)将混合物沉淀,将其重悬于MACS缓冲液中,并通过30μm细胞过滤器(BD Biosciences,cat.no.340626)过滤。随后的MACS分离使用自动磁性细胞分离仪器或通过手动分离进行,取决于可用性。使用autoMACS®Pro分离器(Miltenyi Biotec)进行自动MACS分离。在加载细胞/微珠混合物之前,根据制造商的说明书,用MACS缓冲液冲洗磁分离柱。使用预设的阳性选择程序"POSSEL_s"。对于手动MACS分离,将LS柱(Miltenyi Biotec,cat.no.130-042-401)置于MidiMACS™或QuadroMACS™分离器中并用MACS缓冲液平衡。用CD8微珠标记的细胞装载柱子,并允许细胞通过重力流流过。用MACS缓冲液洗涤三次后,将柱从磁体上移除,并使用提供的柱塞用MACS缓冲液分两步洗脱磁珠标记的标记细胞。

[1191] 分离的$CD8^+$ T细胞用编码对人CLDN6特异的小鼠TCR的α和β链的RNA电穿孔。使用ECM 830方波电穿孔系统(BTX®),在室温下在250μL X-VIVO™15SF培养基(Lonza,cat.no.BE02-060Q)中电穿孔多至$10-15\times10^6$个T细胞。将细胞与RNA混合,脉冲(500V、

3ms),并立即用750μL预热的测定培养基(具有5% PHS的IMDM GlutaMAX[Life technologies,cat.no.31980030])稀释。过夜孵育后,通过流式细胞术评估电穿孔的$CD8^+$ T细胞以评估细胞纯度、转染RNA的表达和在$CD8^+$ T细胞上CD27的基线表达。为此,在30至50μL染色缓冲液(DPBS、2%FBS、2mM EDTA)中,首先用滴定量的BV605标记的抗CD8、DyLight650标记的抗CLDN6和BV480标记的抗CD27(分别稀释1:600、1:10 0和1:50)对单细胞悬浮液进行CD8、CD27和CLDN6染色。在染色期间添加可固定活力染料eFluor780(Thermo Fisher Scientific,cat.no.65-0865-14;1:2,000)。染色程序在2至8℃下避光进行15至20分钟。将细胞用染色缓冲液洗涤两次(5分钟,450xg,室温下),并重悬于染色缓冲液中用于流式细胞术分析。在BD FACSCelesta流式细胞仪上获取流式细胞术数据。大约78%至93%、78%至92%和36%至98%的电穿孔的$CD8^+$ T细胞分别表达CLDN6-TCR和内源性CD27。

[1192] 通过在xCELLigence实时细胞分析(RTCA)仪器(ACEA Biosciences)上的阻抗测量进行肿瘤细胞杀伤的实时细胞分析。在该实验环境中阻抗的降低被认为是$CD8^+$ T细胞杀伤肿瘤细胞的替代物。应该注意的是,阻抗可能低估了由于T细胞增殖引起的肿瘤细胞杀伤。MDA-MB-231_hCLDN6细胞以1.2至1.5×10^4个细胞/孔接种在xCELLigence E板96(Agilent,cat.no.05232368001)中,并允许在室温下放置30分钟。接下来,将平板在xCELLigence RTCA仪器(37℃,5% CO_2)中孵育1天。

[1193] 将表达CLDN6-TCR的T细胞以1.5×10^5个$CD8^+$ T细胞/孔添加到已接种的MDA-MB-231_hCLDN6细胞中,得到T细胞:肿瘤细胞(效应:靶标)的比率为10:1。将IgG1-CD27-A-P329R-E345R(1或10μg/mL)、DuoBody-PD-L1x4-1BB(0.2μg/mL)或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R(10μg/mL)添加到共培养物中。将E板96中的共培养物在抗体存在下在xCELLigence RTCA仪器中无干扰地孵育五天,以两小时间隔进行阻抗测量作为总细胞质量(细胞指数)的读出。使用GraphPad Prism软件以图形方式显示呈现随时间变化的细胞指数值的图表,并用于确定曲线下面积(AUC),其将每个用测试抗体处理的共培养物归一化至用非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R处理的共培养物。

[1194] 实时细胞分析显示,与阴性对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R相比,单独的IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB显著增强$CD8^+$T细胞介导的肿瘤细胞杀伤(图46A)。当两种化合物组合使用时,肿瘤细胞杀伤最明显。在混合分析中,用IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB的组合处理的培养物的归一化的AUC显著低于单独用IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理的培养物的AUC(图46B)。虽然在统计学上不显著,但组合处理的培养物的AUC也低于单独用DuoBody-PD-L1x4-1BB处理的培养物的AUC。

[1195] 实施例46:抗原特异性细胞毒性测定中IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB的组合对T细胞细胞毒性相关分子的表达的影响

[1196] 如实施例40中所述,使用与抗体一起孵育的表达CLDN6-TCR的$CD8^+$T细胞与hCLDN6-MDA-MB-231细胞共培养物通过流式细胞术来评估IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB的组合对抗原特异性$CD8^+$T细胞上脱粒标志物CD107a和细胞毒性介质颗粒酶B(GzmB)的表达的影响。

[1197] 将共培养物在抗体存在下孵育两天,随后对CD8、CD107a(溶酶体相关膜蛋白-1[LAMP-1])和GzmB进行染色,用于通过流式细胞术进行分析,除了在共培养开始时已经添加到所有处理条件中的CD107a抗体,因为CD107a在细胞毒性颗粒上表达并在T细胞脱粒后随

之再内化。对于流式细胞术,进行基本上如实施例40中所述的程序,但有以下不同。孵育两天后,将小体积的含有Golgi-Plug(布雷菲德菌素A;最终稀释于220μL:1:1,000)的培养基添加到细胞中,随后再孵育4h。然后收获细胞,并通过流式细胞术分析$CD8^+$ T细胞中细胞内GzmB和CD107a的表达。对于细胞内染色,首先将细胞用染色缓冲液洗涤两次(5分钟,450×g,室温下),并重悬于200μL Histofix2%(Carl Roth;cat.no.P087.4,用DPBS1:2稀释)中,随后在2至8℃下避光孵育至少20分钟。然后,将细胞离心(5分钟,600xg,2至8℃),用1x透化缓冲液(Thermo Fisher Scientific,cat.no.00-8333-56)洗涤,并使用滴定量的PE标记的抗GzmB(BD,cat.no.561142;1:2300稀释)和AF647标记的抗CD107a抗体(Biolegend,cat.no.328611;1:2,500稀释)在1x透化缓冲液中对细胞内标志物进行染色。细胞内标志物的染色程序在2至8℃下避光进行20至60分钟。然后,将细胞用1x透化缓冲液洗涤两次(5分钟,600xg,室温下),并重悬于染色缓冲液中用于流式细胞术分析。在BD FACSCelesta流式细胞仪上获取流式细胞术数据。将使用来自6个健康供体的细胞测量的GzmB和CD107a的平均荧光强度(MFI)归一化至对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R(10μg/mL)的MFI。

[1198] 与用单独的DuoBody-PD-L1x4-1BB处理相比,IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB组合处理的增加的细胞毒性能力与显著增加的GzmB的表达水平相关(图47A)。另外,与仅用IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理相比,IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB组合处理增加了CD107a的表达水平(图47B)。与单独的DuoBody-PD-L1x4-1BB处理相比,10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB的组合显著增加了表达GzmB和CD107a两者的$CD8^+$ T细胞的百分比(图40C)。与用非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R处理相比,用单独的1或10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R或DuoBody-PD-L1x4-1BB的单药处理增加了表达GzmB和CD107a两者的$CD8^+$ T细胞的百分比。

[1199] 总之,IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB组合处理的细胞毒性能力的增加与$CD8^+$ T细胞中脱粒标志物CD107a和细胞毒性介质GzmB的增加的表达相关。

[1200] 实施例47:用IgG1-CD27-A-P329R-E345R与DuoBody-PD-L1x4-1BB组合离体处理的NSCLC肿瘤片段的细胞培养物中肿瘤浸润淋巴细胞的扩增

[1201] 评估了IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB组合处理对肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的不同亚群的扩增的影响。使用TIL的离体研究使用冷冻保存的肿瘤组织进行,该肿瘤组织已经从德国Mainz大学医院的三名NSCLC患者中通过手术切除。

[1202] 将手术切除的人NSCLC组织置于转运培养基(HypoThermosol® FRS保存液[BioLife Solutions,cat.no.101104]、7.5μg/mL两性霉素B[Thermo Fisher Scientific,cat.no.15290026]和300单位/mL(U/mL)青霉素/链霉素[Thermo Fisher Scientific,cat.no.15140-122])中。将样品在洗涤培养基(5mL x VIVO 15[Lonza]、2.5μg/mL两性霉素B[Thermo Fisher Scientific和100U/mL青霉素/链霉素[Thermo Fisher Scientific])中洗涤三次并转移到细胞培养皿中。用解剖刀切除脂肪组织和坏死区域,并将组织切成约5mm^3的片段。将每个片段置于单独的冷冻小瓶中,并向每个小瓶中添加1mL冷冻培养基(FBS[Biochrom,cat.no.S0115],10% DMSO[AppliChem,cat.no.A3672,0100])。将小瓶转移到受控冷冻室(Mr.Frosty冷冻容器;Thermo Fisher Scientific)中,将其置于-80℃冰箱中。在-80℃下至少16h后,将小瓶转移至液氮中长期储存。

[1203] 每个实验将四至六个冷冻保存的小瓶在37℃水浴中解冻约2分钟,每个小瓶含有

约5mm^{3}来自一个肿瘤样本的肿瘤片段,用洗涤培养基洗涤五次,并转移到细胞培养皿中。用解剖刀将肿瘤片段进一步切成约1mm^{3}的片段。在用IL-2和处理抗体培养后,大多数片段用于TIL扩增,并且剩余片段用于确定基线处特异性细胞表面标志物的表达,无需任何处理。

[1204] 在含有45至50U/mL IL-2(Proleukin S;Novartis Pharma,cat.no.PZN-02238131)的100μL预热的TIL培养基(X-VIVO 15[Lonza,cat.no.BE02-060Q],含有2%人血清白蛋白[HSA;CSL Behring,cat.no.PZN-00504775],100U/mL青霉素/链霉素和2.5μg/mL两性霉素B)中,将每孔两个肿瘤片段(平均)接种在24孔板(用于测定的总体积容量为2ml/孔)中。将抗体稀释在含有45至50U/mL IL-2的TIL培养基中,并将0.9mL这些稀释液适当地添加到孔中。孔中IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB的最终浓度分别为1或10μg/mL和0.2μg/mL。作为对照,将不含抗体的含有IL-2的培养基添加到单独的孔中。对于每个供体的每个实验条件,总共使用8至16个孔。将平板在37℃,5% CO_2下孵育。

[1205] 培养3天后,向孔中添加含有45至50U/mL IL-2、IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB的新鲜TIL培养基(1mL/孔,抗体浓度同上)。在测定开始后第5天和第14天之间,用显微镜定期监测培养物从组织片段迁移的TIL的增殖和TIL微簇的形成。如果在7或8天培养后在一个孔中观察到>25个TIL微簇,则将来自两个相同处理的原始孔的细胞和组织片段重悬并混合到具有培养基的6孔板的一个孔中(测定中使用的总体积容量为5至6mL/孔),并添加含有IL 2的新鲜的TIL培养基(33U/mL IL-2)。每两至三天,向培养物补充新鲜的含IL-2的TIL培养基。将添加到培养物中的培养基中的IL-2浓度降低至10U/mL,或在整个测定中,在用培养基补充孔后,首先降低至25U/mL,然后降低至10U/mL。如下所述通过流式细胞术分析培养物。将冷冻保存的肿瘤片段解冻,并如上所述进一步切碎。通过用柱塞和细胞过滤器机械解离肿瘤片段来生成单细胞悬浮液。将细胞离心(8分钟,300×g,室温下),并重悬于染色缓冲液中用于流式细胞术分析。

[1206] 对于流式细胞术分析,首先用滴定量的抗体(表20)对单细胞悬浮液进行细胞表面标志物染色,抗体在30至50μL染色缓冲液(Dulbecco's PBS[DPBS;Thermo Fisher,cat.no.14190250]、2% FBS和2mM EDTA[Sigma,cat.no.BCCD3789])中稀释。

[1207] 表20:用于流式细胞术的荧光标记抗体。

[1208]

靶标	标记	参考	公司	稀释度
CD3	太平洋蓝	558117	BD Biosciences	1:100
CD4	PerCP-eF710	46-0047-42	Thermo Fisher Scientific	1:100 – 1:200
CD8α	BV605	564116	BD Biosciences	1:400
CD25	APC-eF780	47-0259-42	Thermo Fisher Scientific	1:100

[1209]

CD56	BV786	740979	BD Biosciences	1:100

[1210] 将Brilliant Stain Buffer Plus(BD Biosciences,cat.no.566385)以1:5的最终稀释度添加到抗体混合物中。在细胞表面染色期间添加可固定活力染色剂700(BD

Biosciences,cat.no.564997;1:1,000至1:1,500)。染色程序在2至8℃下避光进行15-20分钟。将细胞用染色缓冲液洗涤两次(5分钟,450xg,室温下),并重悬于染色缓冲液中用于流式细胞术分析。

[1211] 在BD FAC Symphony或BD FACSCelesta流式细胞仪上获取流式细胞术数据。在采集之前,将30μL CountBright绝对计数珠(Thermo Fisher Scientific,cat.no.C36950)添加到每个样品中用于绝对细胞计数。通过流式细胞术鉴定和定量以下TIL群体:$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞,和自然杀伤(NK)细胞。在单细胞的活门控内,$CD56^+$NK细胞和$CD3^+$被门控。在$CD3^+$门控内,对$CD4^+$和$CD8^+$细胞进行进一步门控。使用FlowJo软件10.7.1版分析流式细胞术数据。使用下式确定绝对细胞数:

[1212] $$细胞数 = \frac{事件计数(细胞)}{事件计数(珠子)} \times 珠子浓度 \times 样品体积$$

[1213] IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB作为单一处理分别在三分之二和三分之三的样本中诱导$CD8^+$ T细胞和NK细胞的增殖(图48和表21)。$CD8^+$ T细胞和NK细胞扩增通过IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB组合处理进一步增强。重要的是,在标本中检测到对$CD8^+$ T细胞和NK细胞的强烈的组合效应,其中IgG1-CD27-A-P329R-E345R(样本#592)或DuoBody-PD-L1x4-1BB(样本#578)具有适度的单药效应。单独的DuoBody-PD-L1x4-1BB对$CD4^+$ T细胞具有边际效应,并且与单药IgG1-CD27-A-P329R-E345R相比,组合处理没有显著增强$CD4^+$ T细胞扩增。

[1214] 表21:与仅IL-2相比,用IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB的组合处理的TIL亚群的倍数扩增。衍生自人NSCLC样本的肿瘤片段仅用低剂量IL-2培养,或在1μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R、0.2μg/mL DuoBody-PD-L1x4-1BB或两者的组合的存在下培养。14d后通过流式细胞术确定指定细胞亚群的绝对细胞计数。显示了相对于仅用IL-2处理的培养物,抗体处理的培养物的数量的倍数差异。所示数据来自三个独立实验。NK,自然杀伤;n.d.,未确定;n.t.,未测试;PD-L1,程序性细胞死亡1配体1;SD,标准差。

[1215]

	相对于阴性对照(无抗体)，用抗体处理的样品的细胞数量的倍数差异								
细胞群	CD4+ T 细胞			CD8+ T 细胞			NK 细胞		
IgG1-CD27-A-P329R-E345R	+	-	+	+	-	+	+	-	+
DuoBody-PD-L1x4-1BB	-	+	+	-	+	+	-	+	+
患者#561	0.8	1.0	1.2	0.2	3.2	1.5	1.1	11.2	13.4
患者#578	19.3	1.9	9.8	19.6	4.3	31.3	11.3	5.0	51.3
患者#592	0.4	0.3	1.8	2.3	14.6	41.5	2.3	26.9	54.6
平均值±SD	9.9 ± 9.5	1.1 ± 0.7	6.8 ± 4.5	7.4 ± 8.7	7.4 ± 5.1	24.8 ± 17.0	4.9 ± 4.6	14.4 ± 9.2	39.8 ± 18.7

[1216] 实施例48:在CD8混合淋巴细胞反应测定中IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD1/PD-L1检查点抑制剂的组合显示出对IFNγ产生的增强作用

[1217] 为了分析IgG1-CD27-A-P329R-E345R与IgG1-PD1或派姆单抗的组合是否可以比用每种单独的抗体处理导致增强的免疫激活,进行了混合淋巴细胞反应(MLR)测定。在IgG1-CD27-A-P329R-E345R与IgG1-PD1或派姆单抗组合的存在下或在相同浓度范围内单独的任一抗体的存在下,将同种异体树突状细胞(DC)和T细胞共培养5天。

[1218] 用于MLR测定的来自同种异体供体对的$CD14^+$单核细胞和$CD8^+$ T细胞获自BioIVT(表22)。

[1219] 表22:MLR测定中使用的单核细胞和T细胞的同种异体供体对

[1220]

供体对	人 CD14+单核细胞		人 CD8+ T 细胞	
	批号	供体 ID	批号	供体 ID
1	LS112418861	58355	LS1170885	CC00481
2			LS1169965	M7281

[1221] 为了将$CD14^+$单核细胞分化为未成熟的树突状细胞(iDC),将1.5×10^6个单核细胞/mL在T25培养瓶(Falcon,cat.no.353108)中在补充有10%热失活的FBS(Thermo Fisher Scientific,cat.no.16140071)、100ng/mL GM-CSF(BioLegend,cat.no.766106)和300ng/mL IL-4(BioLegend,cat.no.766206)的RPMI-1640培养基(ATCC改良;Thermo Fisher

Scientific,cat.no.A1049101)中在37℃,5% CO_2下孵育6天。在第4天,吸出旧培养基,并添加具有补充剂的新鲜培养基。在第6天,通过收集非贴壁细胞来收获iDC。为了使iDC成熟,在开始MLR测定之前,将1-1.5×10^6个细胞/mL在补充有10% FBS、100ng/mL GM-CSF、300ng/mL IL-4和5μg/mL脂多糖(LPS;Thermo Fisher Scientific,cat.no.00-4976-93)的RPMI-1640培养基(ATCC改良)中在37℃,5%CO_2下孵育24h。

[1222] 在MLR测定开始的前一天,将人$CD8^+$ T细胞解冻并以1×10^6个细胞/mL在T75培养瓶(Falcon,cat.no.353136)中在补充有10% FBS和10ng/mL IL-2(BioLegend,cat.no.589106)的RPMI-1640培养基(ATCC改良)中在37℃,5%CO_2下孵育过夜。第二天,收获$CD8^+$ T细胞和LPS成熟的DC,并将其分别以4×10^6个细胞/mL和4×10^5个细胞/mL重悬于预热的AIM-V培养基(Thermo Fisher Scientific,cat.no.12055091)中。在连续稀释的IgG1-CD27-A-P329R-E345R(最终浓度范围0.001-30μg/mL)、IgG1-PD1(最终浓度范围0.001-100μg/mL)和/或派姆单抗(终浓度:1μg/mL)的存在下,将来自同种异体供体对的20,000DC和200,000 $CD8^+$ T细胞在圆底96孔板中的AIM-V培养基中在37℃,5% CO_2下共培养5天(DC:T细胞比率为1:10)。同时,为了确认供体的响应性,将T细胞与ImmunoCult™人CD3/CD28 T细胞激活剂(Stemcell,cat.no.10971)在37℃下孵育5天。五天后,将平板以500×g离心5分钟,并将无细胞上清液从每个孔转移到新的圆底96孔板中并储存在-80℃,直到进一步分析细胞因子浓度。

[1223] 为了评估细胞因子分泌,通过免疫测定确定第5天MLR测定的上清液中的细胞因子水平。根据制造商的说明书,在Envision仪器上使用AlphaLISA人IFNγ检测试剂盒(PerkinElmer,cat.no.AL217)确定IFNγ水平。使用定制的基于MILLIPLEX®MAP人TH17磁珠板(HTH17MAG-14K)的Luminex®多重免疫测定(Millipore,订单号SPR1526),确定GM-CSF的水平,基本上如制造商所述。简而言之,将来自MLR测定的冷冻上清液解冻,并将10μL各样品添加到384孔板(Greiner Bio-One,cat.no.781096)中的每孔10μL测定缓冲液中,该384孔板用1x试剂盒提供的洗涤缓冲液预洗。在平行对照孔中,将10μL AIM-V培养基添加到10μL测定缓冲液中的标准品或对照品中。将包被有针对GM-CSF的抗体的彩色编码磁珠混合,并在珠稀释剂中稀释至1x浓度,之后将10μL混合的珠添加到每个孔中。将平板通过脉冲旋转至1,000RPM短暂离心,密封并在4℃下振荡孵育过夜。使用用于384孔板的Flick和Blot磁性分离板(Thermo Fisher Scientific,cat.no.VP 771HHG4),用每孔60μL 1x洗涤缓冲液洗涤珠子三次。随后,向每个孔中添加10μL生物素化的定制检测抗体混合物,并将平板通过脉冲旋转至1,000RPM短暂离心,密封并在室温下振荡孵育1h。接下来,向每个孔中添加10μL PE缀合的链霉亲和素,并将平板通过脉冲旋转至1,000RPM短暂离心,密封并在室温下振荡孵育30分钟。用60μL 1x洗涤缓冲液将孔洗涤三次,如上所述,之后通过在室温下振荡5分钟,将珠子重新悬浮在75μL Luminex Sheath Fluid中。从每个孔中收集50μL样品,并在使用FLEXMAP 3D校准试剂盒(Millipore,cat.no.F3D-CAL-K25)校准的Luminex FLEXMAP 3D®系统上运行。使用5参数对数曲线拟合方法,在Belysa™免疫测定曲线拟合软件(Merck)中进行中位荧光强度(MFI)的曲线拟合。

[1224] 虽然用单独的IgG1-CD27-A-P329R-E345R(10μg/mL)处理不诱导IFNγ或GM-CSF的分泌,但用1μg/mL单独的IgG1-PD1或派姆单抗处理诱导IFNγ和GM-CSF两者的分泌(图49)。通过将IgG1-PD1(1μg/mL)或派姆单抗(1μg/mL)与10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R组合

处理,可以增强IFNγ和GM-CSF的分泌。

[1225] 为了评估IgG1-CD27-A-P329R-E345R和抗PD-1抑制剂抗体的组合处理是否协同地增加免疫激活,针对每个供体对分别处理从IgG1-CD27-A-P329R-E345R与IgG1-PD1的组合获得的IFNγ分泌数据以进行协同分析。通过减去对照值(无处理对照孔),将各处理条件下的IFNγ浓度(μg/ml)归一化,并表示为测定中(IFNγ诱导)最大值的百分比。使用R(v4.1.0)中的SynergyFinder软件包(v3.2.2;Zheng,S et al.2021.SynergyFinder Plus:towards a better interpretation and annotation of drug combination screening datasets.bioRxiv,10.1101/2021.06.01.446564),分析两种组合的抗体之间的相互作用。协同效应被定义为观察到的效果超过预期效果,如通过两个参考模型(协同评分模型):最高单药(HAS;Berenbaum,M.C.(1989)What is synergy?Pharmacol Rev,41,93-141)和Bliss(Bliss,C.I.(1939)The Toxicity of Poisons Applied Jointly1.Annals of Applied Biology,26,585-615)计算的。每个模型对于预期效果都做出了不同的假设(详见相应的参考资料)。

[1226] IgG1-CD27-A-P329R-E345R和IgG1-PD1的组合处理在两个模型中在IgG1-CD27-A-P329R-E345R和IgG1-PD1浓度范围内都显示出协同作用(图50)。在供体对1中,当0.01μg/mL IgG1-PD1与一定范围的IgG1-CD27-A-P329R-E345R浓度(0.1-30μg/mL;图50A)组合时,观察到最强的协同作用。在供体对2中,当1μg/mL IgG1-PD1与一定范围的IgG1-CD27-A-P329R-E345R浓度(0.01-10μg/mL;图50B)组合时,观察到最强的协同作用。

[1227] 总之,这些数据显示,与CD8 MLR测定中的单药处理相比,IgG1-CD27-A-P329R-E345R和抗PD1抗体的组合处理可以增强细胞因子分泌。IgG1-CD27-A-P329R-E345R和IgG1-PD1的组合处理显示出可协同增强IFNγ分泌。

[1228] 实施例49:IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD-1/PD-L1抑制剂的组合对抗原特异性T细胞介导的细胞毒性的影响

[1229] 通过在过表达PD-1和表达CLDN6-TCR的人健康供体$CD8^+$ T细胞和作为靶标的表达PD-L1和CLDN6的人乳腺癌细胞系的共培养物中的阻抗测量进行实时细胞分析,分析组合的IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD-1/PD-L1抑制剂处理后T细胞介导的细胞毒性的诱导。

[1230] 通过慢病毒转导,用模型抗原claudin-6稳定转导人$PD\text{-}L1^+$乳腺癌细胞系MDA-MB-231(ATCC®,HTB-26TM)。磁性抗人CD8微珠(Miltenyi Biotec,cat.no.130-045-201)用于来自解冻的HLA-A*02阳性PBMC的$CD8^+$ T细胞的阳性选择,如实施例45中所述。$CD8^+$ T细胞的纯度高于91%。纯化的$CD8^+$ T细胞用编码PD-1的RNA以及编码对人CLDN6具有特异性的鼠TCR的α和β链的RNA电穿孔,如实施例45中所述。

[1231] 过夜孵育后,通过流式细胞术确认电穿孔的$CD8^+$ T细胞上的CLDN6-TCR和PD-1的细胞表面表达。为此,用7-氨基放线菌素D(7-AAD;BD Biosciences,cat.no.51-68981E;1:100稀释)、分别在50μL染色缓冲液(DPBS、2%FBS、2mM EDTA)中以1:400、1:50和1:33稀释的滴定量的BV605标记的抗CD8抗体、Alexa Fluor 488标记的抗PD-1抗体和BV421标记的抗TCRβ抗体,对单细胞悬浮液进行活力、CD8、PD-1和鼠TCRβ染色。染色程序在2-8℃下避光进行15分钟。将细胞用染色缓冲液洗涤两次(5分钟,460xg,室温下),并重悬于染色缓冲液中用于流式细胞术分析。在BD FACSCelesta流式细胞仪上获取流式细胞术数据。大约48%至95%和52%至92%的电穿孔$CD8^+$ T细胞分别表达PD-1和CLDN6-TCR。

[1232] 如实施例45所述,通过在xCELLigence实时细胞分析(RTCA)仪器(ACEABiosciences)上的阻抗测量进行肿瘤细胞杀伤的实时细胞分析。将表达CLDN6-TCR和PD-1的T细胞以7.5×10^4个$CD8^+$ T细胞/孔添加到1.5×10^4个已接种的MDA-MB-231_hCLDN6细胞中,得到T细胞:肿瘤细胞(效应子:靶表)的比率为5:1。将IgG1-CD27-A-P329R-E345R(10μg/mL)、IgG1-PD1(0.8μg/mL)、派姆单抗(0.8μg/mL)、纳武单抗(1.6μg/mL)或阿替利珠单抗(0.4μg/mL)作为单药或作为IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD-1/PD-L1抑制剂的组合添加到共培养物中。非结合抗体IgG1-b12-P329R-E345R(10μg/mL)用作阴性对照。在抗体存在下,将共培养物在xCELLigence RTCA仪器中无干扰地孵育五至六天,以两至三小时间隔进行阻抗测量作为总细胞质量的读出。将数据归一化至$CD8^+$ T细胞/肿瘤细胞共培养物的起始时间点,其设置为1(细胞指数)。使用GraphPad Prism软件以图形方式显示呈现随时间变化的细胞指数值的图表,并用于确定曲线下面积(AUC),其将每个用测试抗体处理的共培养物归一化至用非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R处理的共培养物。

[1233] 实时细胞分析显示出与非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R相比,作为单药的IgG1-CD27-A-P329R-E345R和所有测试的PD-1-PD-L1抑制剂增强了$CD8^+$ T细胞介导的肿瘤细胞杀伤(图51A)。当PD-1/PD-L1抑制剂用于与IgG1-CD27-A-P329R-E345R组合时,肿瘤细胞杀伤进一步增强。在来自11至14个供体的合并分析中,与单药处理相比,用IgG1-CD27-A-P329R-E345R和IgG1-PD1、派姆单抗、纳武单抗或阿替利珠单抗的组合处理的培养物显示出显著更低的归一化的AUC值(图51B)。

[1234] 实施例50:在抗原特异性细胞毒性测定中IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD-1/PD-L1抑制剂的组合对T细胞细胞毒性相关分子的表达的影响

[1235] 如实施例49所述,使用过表达PD-1和表达CLDN6-TCR的$CD8^+$ T细胞与MDA-MB-231_hCLDN6细胞的共培养物,通过流式细胞术评估IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD-1/PD-L1抑制剂的组合对抗原特异性$CD8^+$ T细胞上脱粒标志物CD107a(溶酶体相关膜蛋白-1[LAMP-1])和细胞毒性介质颗粒酶B(GzmB)的表达的影响。

[1236] 在抗体的存在下,将共培养物孵育两天,随后通过流式细胞术分析活力以及CD8、CD107a和GzmB表达。考虑到CD107a在细胞毒性颗粒上表达并因此在T细胞脱粒后再内化,在共培养开始时,AF647标记的抗CD107a抗体(Biolegend,cat.no.328611;1:3,333稀释)已添加到所有处理条件中。孵育两天后,将小体积的含有Golgi-Plug(布雷菲德菌素A;最终稀释于220μL:1:1,000)的测定培养基(20μL/孔)添加到细胞中,随后在37℃下再孵育4h。对于细胞外染色,将细胞离心并重悬于50μL含有BV605标记的抗CD8抗体(1:600)和可固定活力染料eFluor780(Thermo Fisher Scientific,cat.no.65-0865-14;1:2,000)的染色缓冲液中。细胞外染色程序在2至8℃下避光进行20分钟。对于随后的细胞内染色,将细胞用染色缓冲液洗涤两次(5分钟,460×g,室温下),并重悬于200μL Histofix 2%(Carl Roth;cat.no.P087.4,用DPBS1:2稀释)中,随后在RT下避光孵育15分钟。将细胞离心(5分钟,600xg,2至8℃),用透化缓冲液(Thermo Fisher Scientific,cat.no.00-8333-56)洗涤,并在透化缓冲液中使用PE标记的抗GzmB抗体(BD,cat.no.561142;1:300稀释)染色GzmB。细胞内染色程序在2至8℃下避光进行20分钟。然后,将细胞用透化缓冲液洗涤两次(5分钟,460xg,室温下),并重悬于染色缓冲液中用于流式细胞术分析。在BD FACSCelesta流式细胞仪上获取流式细胞术数据。

[1237] 与用非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R处理相比,用IgG1-CD27-A-P329R-E345R或PD-1/PD-L1抑制剂的单药处理增加了表达GzmB和CD107a两者的$CD8^+$ T细胞的百分比(图52)。与单药处理相比,IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD-1/PD-L1抑制剂的组合显著增加了表达GzmB和CD107a两者的$CD8^+$ T细胞的百分比。

[1238] 总之,IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD-1/PD-L1组合处理增加的$CD8^+$ T细胞的细胞毒性能力(实施例49)同时伴有$CD8^+$ T细胞脱粒标志物CD107a和细胞毒性介质蛋白GzmB表达的增加。

附图说明

[1239] 图1显示了如CD27 Jurkat报告基因生物测定中所确定的抗CD27抗体及其六聚化增强的Fc变体的CD27激动剂活性。Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/CD27 Jurkat报告细胞与抗体浓度系列(从左至右:0.04μg/mL、0.30μg/mL、2.50μg/mL和20μg/mL)的指定抗体一起孵育6h。荧光素酶活性,作为CD27细胞内信号传导的读出,通过确定发光(RLU:相对发光单位)来定量。以下抗体被包括在内作为WT IgG1和/或具有E430G或E345R突变的变体,如以下所示:包含E345R突变的非结合抗HIV-gp120对照抗体(IgG1-b12-E345R,ctrl),抗CD27抗体IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C、IgG1-CD27-D、IgG1-CD27-E和IgG1-CD27-F,以及现有技术抗CD27基准抗体IgG1-CD27-131A和IgG1-CD27-15。

[1240] 图2显示了如流式细胞术确定的抗CD27抗体与PBMC中的(A,C)T细胞或(B,D)CD27转染的HEK293F细胞上表达的(A,B)人和(C,D)食蟹猴CD27的结合。抗体结合以中位荧光强度(MFI)呈现。抗HIV-gp120抗体IgG1-b12-FEAR(ctrl)被包括在内作为非结合阴性对照抗体。

[1241] 图3显示了如通过流式细胞术确定的抗CD27抗体IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B和IgG1-CD27-C与在HEK293F细胞上表达的人CD27-A59T变体的结合。抗体结合以中位MFI呈现。抗HIV-gp120抗体IgG1-b12-FEAL(ctrl)被包括在内作为非结合阴性对照抗体。

[1242] 图4显示了如在CSFE稀释测定中通过流式细胞术确定的,在1μg/mL携带Fc突变E430R或E345R与Fc突变P329R、G237A或K326A-E33A组合的CD27特异性抗体变体IgG1-CD27-A、-B或-C的存在下,TCR刺激的(A)$CD8^+$和(B)$CD4^+$ T细胞增殖的热图。来自四个人健康供体的PMBC用作T细胞的来源。T细胞增殖表示为T细胞分裂指数或增殖的T细胞的百分比,其通过使用FlowJo软件,对已经经历CFSE稀释($CFSE^{低峰}$)的细胞进行门控来计算。

[1243] 图5显示了如通过流式细胞术确定的,用IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-A-P329R-E345R或现有技术抗CD27克隆IgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127和IgG1-CD27-BMS986215孵育人健康供体PBMC后,增殖的T细胞的百分比(A-D),(A、B)未刺激的或(C-F)TCR刺激的(A、C、E)$CD4^+$或(B、D、F)$CD8^+$ T细胞的(E、F)扩增指数。抗HIV-gp120抗体变体IgG1-b12-E345R-P329R(ctrl)被包括在内作为非结合阴性对照抗体。增殖细胞%通过对已经经历过CFSE稀释($CFSE^{低峰}$)的细胞进行门控来计算。扩增指数鉴定了孔中细胞的倍数增加,并使用FlowJo版本10中的增殖建模工具进行计算。必要时对峰值进行手动调整,以便更一致地确定存在的峰的数量。

[1244] 图6显示了如通过FACS确定的C1q与本发明的膜结合CD27抗体的结合。测试含有E430G或E345R六聚化增强突变(IgG1-CD27-A-E430G和IgG1-CD27-A-E345R)和P329R突变

(IgG1-CD27-A-P329R-E345R)的IgG1-CD27-A变体结合C1q的能力。抗HIV-gp120抗体IgG1-b12-F405L(ctrl)被包括在内作为非结合阴性对照抗体。

[1245] 图7显示了通过表面等离子体共振(SPR)确定的IgG1-CD27-A-P329R-E345R与人Fc受体的结合。Biacore表面芯片与抗His抗体共价连接,并包被有重组His标记的Fc受体(A)Fcγ RIa、(B)Fcγ RIIa-H、(C)Fcγ RIIa-R、(D)Fcγ RIIb、(E)Fcγ RIIIa-F或(F)Fcγ RIIIa-V。将抗HIV-gp120抗体IgG1-b12(ctrl)包括在内作为参考。显示的是在背景减去(无Fc受体流动池)后通过Biacore SPR确定的绝对共振单位。

[1246] 图8显示了如通过流式细胞术确定的IgG1-CD27-A-P329R-E345R与人健康供体PBMC样品中人(A)$CD4^+$和(B)$CD8^+$ T细胞亚群的结合。阴性对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R(ctrl)是包含P329R和E345R突变的抗HIV gp120非结合同种型对照抗体。呈现的数据是重复样品的平均MFI+/-SD。

[1247] 图9显示了如在报告基因测定中确定的在存在和不存在Fcγ R介导的交联的情况下,抗CD27抗体的CD27激动剂活性。在(A,F)不存在或(B-J)存在Fcγ RIIb-CHO-K1细胞的情况下,以(B,G)1:1、(C,H)1:1/3、(D,I)1:1/9或(E,J)1:1/27的NFκB-luc2/CD27 Jurkat:Fcγ RIIb CHO-K1的比率,将固定数量的NFκB-luc2/CD27 Jurkat报告细胞与(A-E)IgG1-CD27-A-P329R-E345R或IgG1-CD27-A、(F-J)IgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127或IgG1-CD27-BMS986215一起培养。IgG1-b12-P329R-E345R和IgG1-b12是抗HIV gp120非结合对照抗体(ctrl)。将发光测量为CD27激活的读出,并以相对发光单位(RLU)呈现。

[1248] 图10显示了静脉注射25mg/kg IgG-CD27-A或IgG-CD27-A-P329R-E345R抗体后,SCID小鼠血浆中的人IgG水平。总人IgG血浆浓度通过夹心ELISA确定,并针对注射后的时间绘图。显示的数据是每组(n=3只小鼠)血液样品的平均血浆浓度+/-SEM。

[1249] 图11显示了在IgG1-CD27-A-P329R-E345R或野生型CD20抗体IgG1-CD20的存在下,与hMDM(E:T=2:1)共培养4h后的活$CD27^+$Daudi细胞的百分比。Daudi细胞用CellTrace™Violet标记,并且细胞活力通过流式细胞术测量。显示的数据是活Daudi细胞(TO-PRO-$3^-CTV^+CD11b^-$)重复的平均值±SD百分比,归一化至在两个实验中测试的四个供体中的一个的无抗体对照。

[1250] 图12显示了通过ELISA确定的在NHS中孵育IgG1-CD27-A-P329R-E345R后的C4d沉积。IgG1-b12-P329R-E345R是同种型对照抗体,并且IgG1-b12是具有WT Fc结构域的对照抗体;IgG1-b12-RGY是C4d沉积的阳性对照抗体(溶液中的六聚体抗体)。所示为进行的三个实验中的一个代表性实验中重复三次的平均值±SD。

[1251] 图13显示了抗CD27抗体对Daudi细胞上CD70结合的抑制。在存在或不存在50μg/mL非结合对照抗体(IgG1-b12-P329E-E345R或IgG1-b12)或CD27抗体(IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127、IgG1-CD27-BMS986215或IgG1-CD27-131A)的情况下,将$CD27^+$Daudi细胞与6μg/mL生物素化重组人CD70 ECD一起孵育。使用BV421标记的链霉亲和素,通过流式细胞术检测生物素化CD70片段与Daudi细胞的结合。显示的数据是来自进行的三个实验中的一个代表性实验中重复的孔的gMFI±SD。

[1252] 图14显示了用抗CD27抗体处理后,多克隆激活的$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞中T细胞活化标志物的表达水平。将人健康供体PBMC与0.1μg/mL CD3抗体和30μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27抗体基准或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R一起孵育两天或五天。在抗

体处理的样品中(A)$CD4^+$和(B)$CD8^+$ T细胞表面上T细胞活化标志物HLA-DR、CD69、GITR、CD25、CD107a和4-1BB的表达水平通过流式细胞术定量,并以相对于相同供体的非结合对照样品的MFI(±SD)的平均倍数变化呈现。虚线指示用IgG1-b12-P329R-E345R处理的细胞的倍数变化,其用作非结合对照并设置为1。显示的数据来自在一个实验中重复的测试的三个供体。

[1253] 图15显示了用OVA免疫和用抗CD27抗体处理后,hCD27-KI小鼠脾脏中OVA特异性$CD8^+$ T细胞的百分比。在第0、12和21天,hCD27-KI小鼠皮下注射5mg OVA,并同时用30mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R静脉内处理。在第28天,将小鼠安乐死,切除脾脏,并加工成单细胞悬浮液。OVA特异性$CD8^+$ T细胞的扩增通过流式细胞术评估。所示数据为来自进行的一个实验的每个处理组(每组5只小鼠)的$CD8^+$细胞的OVA^+%的平均值±SD。

[1254] 图16显示了如通过IFNγ-ELISpot测量的,用OVA免疫并用抗CD27抗体处理后第28天产生IFNγ的脾细胞数量。在第0、12和21天,hCD27-KI小鼠皮下注射5mg OVA,并同时用30mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R静脉内处理。在第28天,将脾脏切除,加工成单细胞悬浮液,并使用IFNγ-ELISpot检测产生IFN的脾细胞。显示的数据是来自进行的一个实验(每组5只小鼠)的每个处理组的每孔的平均斑点数±SEM。

[1255] 图17显示了用OVA免疫并用抗CD27抗体处理后,hCD27-KI小鼠脾脏中活化的$CD8^+$ T细胞的百分比。在第0、12和21天,hCD27-KI小鼠皮下注射5mg OVA,并同时用30mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R静脉内处理。在第28天,将小鼠安乐死,切除脾脏,并加工成单细胞悬浮液。通过流式细胞术测量脾脏中$CD8^+$细胞的$PD\text{-}1^+$百分比,在脾脏样品中评估$CD8^+$ T细胞的激活。所示数据为来自进行的一个实验的每个处理组(每组5只小鼠)的平均值±SD。

[1256] 图18显示了用OVA免疫并用抗CD27抗体处理后,hCD27-KI小鼠脾脏中效应$CD8^+$ T细胞的百分比。在第0、12和21天,hCD27-KI小鼠皮下注射5mg OVA,并同时用30mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R静脉内处理。在第28天,将小鼠安乐死,切除脾脏,并加工成单细胞悬浮液。通过流式细胞术检测CD44和CD62L的表达来评估记忆T细胞的扩增。所示数据为来自进行的一个实验的每个处理组(每组5只小鼠)的平均值±SD。(A)$CD45^+$细胞中的$CD8^+CD44^+CD62L^-$效应记忆的百分比。(B)$CD8^+$ T细胞中的$CD44^+CD62L^-$效应记忆的百分比。(C)$CD45^+$细胞中的$CD8^+CD44^-CD62L^-$前效应的百分比。(D)$CD8^+$ T细胞中的$CD44^-CD62L^-$前效应的百分比。

[1257] 图19显示了用OVA免疫并用抗CD27抗体处理后,hCD27-KI小鼠脾脏中T细胞的百分比。在第0、12和21天,hCD27-KI小鼠皮下注射5mg OVA,并同时用30mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R静脉内处理。在第28天,将小鼠安乐死,切除脾脏,并加工成单细胞悬浮液。通过流式细胞术评估血液和脾脏中的$CD3^+$细胞。所示数据为来自进行的一个实验的每个处理组(每组5只小鼠)的平均值±SD。

[1258] 图20显示了抗原特异性研究中IgG1-CD27-A-P329R-E345R对T细胞细胞因子产生的影响。将(A)表达内源性PD-1或(B)过表达PD-1的表达CLDN6-TCR的$CD8^+$ T细胞和自体表

达CLDN6的iDC的共培养物与10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27基准抗体IgG1-CD27-131A或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R一起孵育两天。通过多重ECLIA分析共培养上清液中的细胞因子水平。显示的数据是来自进行的两个实验中测试的七个供体中的一个代表性供体中一式三份孔的平均浓度±SD。缩写:CLDN6=claudin 6;ECLIA=电化学发光测定;iDC=未成熟的树突状细胞;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;SD=标准差;TCR=T细胞受体。

[1259] 图21显示了与IgG1-CD27-A-P329R-E345R孵育的抗原特异性$CD8^+$ T细胞的细胞毒性相关分子的表达。在IgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27基准IgG1-CD27-131A或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R的存在下,将CLDN6-TCR电穿孔的CD8+ T细胞与hCLDN6-MDA-MB-231细胞共培养两天。通过流式细胞术确定GzmB和CD107a的细胞内表达。显示了表达GzmB和CD107a两者的CD8+ T细胞的百分比,以及CD8+ T细胞中GzmB和CD107a的表达水平(MFI归一化至IgG1-b12-P329R-E345R)。显示的数据是在两个实验中实验中单次重复测试的六个供体的平均值±SD。**,P<0.01;*,P<0.05;Friedman检验与Dunn多重比较检验。缩写:CLDN6=claudin 6;GzmB=颗粒酶B;MFI=平均荧光强度;SD=标准差;TCR=T细胞受体。

[1260] 图22显示了在IgG1-CD27-A-P329R-E345R存在下,抗原特异性CD8+T细胞介导的肿瘤细胞杀伤。通过实时细胞分析评估CD8+ T细胞介导的hCLDN6-MDA-MB-231细胞的杀伤。在IgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27基准IgG1-CD27-131A或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R的存在下,将CLDN6 TCR电穿孔的CD8+ T细胞与hCLDN6-MDA-MB-231细胞共培养五天。细胞指数值来源于以两小时间隔进行的阻抗测量。AUC从五天共培养的细胞指数数据获得。将每种处理条件的AUC归一化至来自相同供体的IgG1-b12-P329R-E345R处理的培养物。显示的数据是来自两个实验中实验中重复测试的六个供体的平均值±SD。**,P<0.01;Friedman检验与Dunn多重比较检验。缩写:AUC=曲线下的面积;CLDN6=claudin 6;SD=标准差;TCR=T细胞受体。

[1261] 图23显示了用IgG1-CD27-A-P329R-E345R处理后,原代肿瘤培养物中CD4+和CD8+ T细胞和NK细胞的绝对细胞数。在存在或不存在10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R的情况下,用低剂量的IL-2(45至50U/mL)培养人NSCLC肿瘤组织。在处理14天后,通过流式细胞术确定TIL亚群的绝对细胞计数。显示的数据是来自进行的四个实验中的一个实验中测试的五个肿瘤组织中的一个的四个重复孔的平均值±SD。缩写:IL=白细胞介素;NK=自然杀伤;NSCLC=非小细胞肺癌;SD=标准差;U/mL=单位/mL。

[1262] 图24显示了Daudi和huCD27-K562细胞的细胞表面上的IgG1-CD27-A-P329R-E345R抗体之间通过生物发光共振能量转移(BRET)分析确定的分子接近度。将细胞与NanoLuc(供体)和HaloTag-(受体)标记的抗体(各5μg/mL)的混合物一起孵育:如所示的IgG1-CD27-A-P329R-E345R、WT IgG1-CD27-A或非结合对照IgG1-b12-P329R-E345R。抗体对IgG1-CD20-11B8-E430G-LNLuc和IgG1-CD37-37.3-E430G-Lhalo用作阳性对照。BRET以milliBRET单位(mBU)=(618nmen/460nmen)×1000计算,并通过减去无配体对照值校正供体渗出。显示的数据是来自进行的三个实验中的一个代表性实验中的重复的孔的校正的BRET。

[1263] 图25显示了与作为FcγRIa结合的阳性对照的具有不相关抗原结合区的WT IgG1抗体(IgG1-b12)和携带P329R和E345R突变的相同抗体的变体(IgG1-b12-P329R-E345R)相

比,IgG1-CD27-A-P329R-E345R与M0和M1巨噬细胞的结合。使用PE标记的山羊抗人二抗,通过流式细胞术检测抗体与巨噬细胞的结合。显示的数据是测试的两个供体的平均值+SD。

[1264] 图26显示了IgG1-PD1与不同物种的PD-1的结合。用不同物种的PD-1瞬时转染的CHO-S细胞与IgG1-PD1、派姆单抗或非结合对照抗体IgG1-ctrl-FERR和IgG4-ctrl一起孵育,并使用流式细胞术分析结合。将与IgG1-PD1孵育的未转染的CHO-S细胞包括在内作为阴性对照。A-B.显示的数据是来自四个实验中的一个代表性实验的重复孔的几何平均荧光强度(gMFI)±SD。C-D.显示的数据是来自两个实验中一个代表性实验的重复孔的gMFI±SD。E.显示的数据是来自四个实验中的一个代表性实验的重复孔的几何平均荧光强度(gMFI)±SD。缩写:gMFI=几何平均荧光强度;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;PE=R-藻红蛋白。

[1265] 图27显示了IgG1-PD1与PD-L1和PD-L2对人PD-1的竞争性结合。在IgG1-PD1或派姆单抗存在下,用人PD-1瞬时转染的CHO-S细胞与1μg/mL生物素化的重组人PD-L1(A)或PD-L2(B)一起孵育。将IgG1-ctrl-FERR包括在内作为阴性对照。用链霉亲和素-别藻蓝蛋白染色细胞,并且通过使用流式细胞术测量链霉亲和素-别藻蓝蛋白$^{+}$细胞的百分比来确定结合生物素化的PD-L1或PD-L2的细胞的百分比。无抗体对照和未转染样品中链霉亲和素-别藻蓝蛋白$^{+}$细胞的百分比用虚线表示。所示数据来自三个单独实验中的一个代表性实验的单次重复。缩写:Ab=抗体;CHO-S=中国仓鼠卵巢,悬浮液;ctrl=对照;FERR=L234F/L235E/G236R-K409R;PD-L1=程序性细胞死亡蛋白1;PD-L1=程序性细胞死亡1配体1;PD-L2=程序性细胞死亡1配体2。

[1266] 图28显示了IgG1-PD1对PD-1/PD-L1检查点的功能性抑制。使用基于细胞的生物发光PD-1/PD-L1阻断报告基因测定测试PD-1/PD-L1轴的阻断。显示的数据是五个(派姆单抗和IgG1-PD1)、三个(IgG1-ctrl-FERR)或两个(纳武单抗)实验中的一个代表性实验中重复孔的平均发光±SD。缩写:FERR=L234F/L235E/G236R-K409R;PD1=程序性细胞死亡蛋白1;PD-L1=程序性细胞死亡1配体1;RLU=相对光单位;SD=标准差。

[1267] 图29显示了抗原特异性T细胞增殖测定中IgG1-PD1增强CD8^{+} T细胞增殖。人CD8^{+} T细胞用编码CLDN6特异性TCR的RNA和编码PD-1的RNA电穿孔,并用CFSE标记。然后,在IgG1-PD1、派姆单抗、纳武单抗或IgG1-ctrl-FERR的存在下,将T细胞与用编码CLDN6的RNA电穿孔的iDC共培养。4d后通过流式细胞术分析T细胞的CFSE稀释度,并用于计算扩增指数。显示了来自在三个独立实验中评估的四个供体中的一个代表性供体(26268_B)的数据。误差棒表示重复孔的SD。使用GraphPad Prism,通过4参数对数拟合来拟合曲线。缩写:CFSE=羧基荧光素琥珀酰亚胺酯;FERR=L234F/L235E/G236R-K409R;PD1=程序性细胞死亡蛋白1;SD=标准差。

[1268] 图30显示了同种异体MLR测定中IgG1-PD1诱导的IFNγ分泌。在IgG1-PD1或派姆单抗的存在下,将三对独特的同种异体人mDC和CD8+ T细胞的供体对共培养5d。将IgG1-ctrl-FERR和IgG4同种型对照包括在内作为阴性对照。使用IFNγ特异性免疫测定分析上清液中的IFNγ分泌。显示的数据是三个独特的同种异体供体对的浓度的平均值±平均值的标准误差(SEM)。缩写:FERR=L234F/L235E/G236R-K409R;IFN=干扰素;IgG=免疫球蛋白G;mDC=成熟树突状细胞;MLR=混合淋巴细胞反应;SEM=平均值的标准误差。

[1269] 图31显示了同种异体MLR测定中IgG1-PD1诱导的细胞因子分泌。在1μg/mL IgG1-PD1或派姆单抗的存在下,将三对独特的同种异体人mDC和CD8^{+} T细胞的供体对共培养5d。

将IgG1-ctrl-FERR包括在内作为阴性对照。使用Luminex分析上清液中的细胞因子分泌。(A)细胞因子水平表示为相对于在未处理的共培养物中测量的细胞因子水平的平均倍数变化。(B)显示了三个独特的同种异体供体对的细胞因子产生水平,水平线表示平均值、上限和下限。缩写:FC=倍数变化;FERR=L234F/L235E/G236R-K409R;GM-CSF=粒细胞巨噬细胞集落刺激因子;IgG=免疫球蛋白G;IL=白细胞介素;MCP-1=单核细胞趋化蛋白1;mDC=成熟树突状细胞;MLR=混合淋巴细胞反应;TNF=肿瘤坏死因子。

[1270] 图32显示了C1q与膜结合IgG1-PD1的结合。使用刺激的人$CD8^+$ T细胞分析C1q与IgG1-PD1的结合。与IgG1-PD1、IgG1-ctrl-FERR、IgG1-ctrl或阳性对照抗体IgG1-CD52-E430G(无惰性突变且具有六聚化增强突变)一起孵育后,将细胞与作为C1q来源的人血清育一起孵育。用FITC缀合的兔抗C1q抗体检测C1q的结合。显示的数据是来自三个可比较的实验中七个供体中的一个代表性的供体的重复孔的几何平均荧光强度(gMFI)±标准差(SD)。缩写:FITC=异硫氰酸荧光素;gMFI=几何平均荧光强度;PE=R-藻红蓝蛋白。

[1271] 图33显示了IgG1-PD1的FcγR结合。IgG1-PD1与固定化的人重组FcγR构建体的结合通过合格测定中的SPR(n=1)分析。IgG1-PD1的FcγRIa(A)、FcγRIIa-H131(B)、FcγRIIa-R131(C),FcγRIIb(D),FcγRIIIa-F158(E)和FcγRIIIa-V158(F)结合。将抗体IgG1-ctrl(没有FER惰性突变)包括在内作为结合的阳性对照。缩写:ctrl=对照;FcγR=Fcγ受体;IgG=免疫球蛋白G;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;RU=共振单位。

[1272] 图34显示了IgG1-PD1和几种其他抗PD-1抗体的FcγR结合。IgG1-PD1、纳武单抗、派姆单抗、多塔利单抗和西米普利单抗与固定化的人重组FcγR构建体的结合通过SPR(n=3)分析。测试抗体的FcγRIa(A)、FcγRIIa-H131(B)、FcγRIIa-R131(C)、FcγRIIb(D)、FcγRIIIa-F158(E)和FcγRIIIa-V158(F)结合。将IgG1-ctrl和IgG4-ctrl抗体包括在内作为具有野生型Fc区的IgG1和IgG4分子的FcγR结合的阳性对照。显示了三个单独实验的结合响应±SD。缩写:ctrl=对照;FcγR=Fcγ受体;IgG=免疫球蛋白G;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;RU=共振单位。

[1273] 图35显示了IgG1-PD1和几种其他抗PD-1抗体的FcγRIa结合。通过流式细胞术分析IgG1-PD1、纳武单抗、派姆单抗、多塔利单抗和西米普利单抗与瞬时表达人FcγRIa的CHO-S细胞的结合。将IgG1-ctrl和IgG1-ctrl-FERR包括在内分别作为阳性和阴性对照。缩写:ctrl=对照;FcγR=Fcγ受体;FERR=L234F/L235E/G236R-K409R;huIgG=人免疫球蛋白G;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;PE=R-藻红蛋白。

[1274] 图36显示了小鼠血浆样品中的总人IgG。在t=0时,小鼠静脉内注射1或10mg/kg IgG1-PD1,并在注射后10分钟、4h、1d、2d、8d、14d和21d采集系列血浆样品。通过ECLIA确定每只小鼠血浆样品中的总huIgG。数据表示为三只单独小鼠的平均huIgG浓度±SD。虚线表示通过基于人IgG清除率的双室模型预测的野生型(wt)huIgG的血浆浓度(Bleeker et al.,2001,Blood.98(10):3136-42)。虚线表示LLOQ和ULOQ。缩写:huIgG=人IgG;IgG=免疫球蛋白G;LLOQ=定量下限;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;SD=标准差;ULOQ=定量上限。

[1275] 图37显示了IgG1-PD1在人PD-1敲入小鼠中的抗肿瘤活性。通过在hPD-1KI小鼠中SC植入建立MC38结肠癌同基因肿瘤模型。向小鼠施用0.5、2或10mg/kg IgG1-PD1或派姆单抗或10mg/kg IgG1-Ctrl-FERR 2QW×3(每组9只小鼠)。(A)各组的平均肿瘤体积±SEM,直到该组完成的最后时间点。(B)所有组均完成的最后一天不同组的肿瘤体积(第11天)。显示

的数据是每个处理组中个体小鼠的肿瘤体积,以及每个治疗组的平均肿瘤体积±SEM。使用Mann-Whitney分析比较治疗组与IgG1-ctrl-FERR处理组的肿瘤体积,*p<0.05、**p<0.01和***p<0.001。C.无进展生存期,定义为具有肿瘤体积小于500mm^{3}的小鼠的百分比,显示为Kaplan-Meier曲线。分析排除了2mg/kg IgG1-PD1组中的一只小鼠,在肿瘤体积超过500mm^{3}之前,该小鼠在第16天被发现因不明原因死亡。缩写:2QW×3=每周两次,持续三周;ctrl=对照;FERR=L234F/L235E/G236R/K409R突变;IgG=免疫球蛋白G;KI=敲入;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;SC=皮下;SEM=平均值的标准误差。

[1276] 图38显示了用IgG1-PD1处理的人PD-1敲入小鼠中的外周T细胞计数动态。通过在hPD-1KI小鼠中SC植入建立MC38结肠癌同基因肿瘤模型。在第0、3和7天向小鼠施用0.5或10mg/kg IgG1-PD1、10mg/kg派姆单抗或10mg/kg IgG1-ctrl-FERR(每组12只小鼠)。在第2、4和8天从每组4只小鼠安乐死后收集外周血样品,并通过流式细胞术进行分析。显示的是活CD45+白细胞亚群内每μL血液CD3+(A)、CD4+(B)和CD8+(C)T细胞的数量的平均值±SD。使用Mann-Whitney分析比较治疗组与IgG1-ctrl-FERR处理组,以及10mg/kg IgG1-PD1组与10mg/kg派姆单抗组,*p<0.05。缩写:ctrl=对照;FERR=L234F/L235E/G236R/K409R突变;IgG=免疫球蛋白G;KI=敲入;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;SC=皮下;SD=标准差。

[1277] 图39显示了用IgG1-PD1处理的人PD-1敲入小鼠中脾脏T细胞亚群的PD标志物。通过在hPD-1KI小鼠中SC植入建立MC38结肠癌同基因肿瘤模型。在第0、3和7天向小鼠施用0.5或10mg/kg IgG1-PD1、10mg/kg派姆单抗或10mg/kg IgG1-ctrl-FERR(每组12只小鼠)。在第2、4和8天收获脾脏(每组和时间点n=4只小鼠)并通过流式细胞术进行分析。显示了第8天脾脏中效应记忆(CD44+CD62L-)、中央记忆(CD44+CD62L+)和幼稚(CD44-CD62L+)CD8+ T细胞的百分比(A)和总CD8+ T细胞群内MHC II类+细胞的百分比(B)的平均值±SD。使用Mann-Whitney分析比较治疗组与IgG1-ctrl-FERR处理组,以及10mg/kg IgG1-PD1组与10mg/kg派姆单抗组,*p<0.05。缩写:ctrl=对照;FERR=L234F/L235E/G236R/K409R突变;IgG=免疫球蛋白G;KI=敲入;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;SC=皮下;SD=标准差。

[1278] 图40显示了用IgG1-PD1处理的人PD-1敲入小鼠中肿瘤内细胞的变化。通过在hPD-1KI小鼠中SC植入建立MC38结肠癌同基因肿瘤模型。在第0、3和7天向小鼠施用0.5或10mg/kg IgG1-PD1、10mg/kg派姆单抗或10mg/kg IgG1-ctrl-FERR(每组12只小鼠)。在第8天切除异种移植肿瘤(每组n=4只小鼠)并通过IHC进行分析。显示了第8天所有有核细胞的CD3+ T细胞(A)、CD4+ T细胞(B)、CD8+ T细胞(C)和GZMB+细胞(D)的百分比的平均值±SD。使用Mann-Whitney分析比较治疗组与IgG1-ctrl-FERR处理组,以及10mg/kg IgG1-PD1组与10mg/kg派姆单抗组,*p<0.05。缩写:ctrl=对照;FERR=L234F/L235E/G236R/K409R突变;GZMB=颗粒酶B;IgG=免疫球蛋白G;KI=敲入;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;SC=皮下;SD=标准差。

[1279] 图41显示了IgG1-PD1和其他抗PD-1抗体与人单核细胞衍生的FcγR+M2c样巨噬细胞的结合。(A)相对于相关的同种型对照和未染色的M2c样巨噬细胞,FcγRIa、FcγRII、FcγRIIIa和PD-1的表达在归一化数据的叠加直方图中可视化,来自测试的三个供体中的一个代表性供体。(B)通过流式细胞术分析孵育24h后的IgG1-PD1、派姆单抗、纳武单抗和对照抗体与人单核细胞衍生的FcγR+M2c样巨噬细胞的结合。相对于背景对照显示的结合(仅与二抗结合,由黑色虚线指示)。圆点表示在两个独立实验中测量的三个单独供体,并且条形

图和误差棒分别表示三个供体的平均值±SD。缩写:ctrl=对照;FERR=L234F/L235E/G236R/K409R突变;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;SD=标准差。

[1280] 图42显示了由膜结合的IgG1-PD1和其他抗PD-1抗体诱导的FcγR信号传导。使用基于细胞的生物发光FcγRI(A)、FcγRIIa-R131(B)、FcγRIIa-H131(C)和FcγRIIb(D)报告基因测定来测试由膜结合的IgG1-PD1和几种其他抗PD-1抗体诱导的FcγR信号传导。将具有增六聚化的E430G突变的IgG1-CD52-E430G包括在内作为阳性对照。显示的数据是来自三个实验中的一个代表性实验的重复孔的平均相对光单位±SD。缩写:Ab=抗体;FERR=L234F/L235E/G236R/K409R突变;PD-1=程序性细胞死亡蛋白1;RLU=相对光单位;SD=标准差。

[1281] 图43显示了IgG1-CD27-A-P329R-E345R与DuoBody-PD-L1x4-1BB组合诱导多克隆激活的CD4+和CD8+ T细胞的增殖。将CTV标记的人健康供体PBMC与CD3抗体和IgG1-CD27-A-P329R-E345R和/或DuoBody-PD-L1x4-1BB一起孵育四天。通过流式细胞术分析T细胞的CTV稀释度,并用于计算扩增指数。显示的数据来自用0.1μg/mL CD3抗体刺激的样品中的(A)CD4+和(B)CD8+ T细胞。数值表示来自进行的四个实验中测试的六个供体中的一个代表性供体的单次重复的扩增指数。缩写:CD=分化簇;CTV=细胞示踪紫(cell trace vilolet);PBMC=外周血单核细胞;PD-L1=程序性细胞死亡1配体1;TCR=T细胞受体。

[1282] 图44显示了IgG1-CD27-A-P329R-E345R或IgG1-CD27-131A与DuoBody-PD-L1x4-1BB、IgG1-PD1、派姆单抗、纳武单抗或阿替利珠单抗组合对T细胞体外增殖的影响。人CD8+ T细胞用编码CLDN6特异性TCR的RNA和编码PD-1的RNA电穿孔,并用CFSE标记。然后,在(A)IgG1-CD27-A-P329R-E345R(1或10μg/mL)和/或DuoBody-PD-L1x4-1BB(0.2μg/mL)的存在下,或在(B)IgG1-CD27-A-P329R-E345R(0.1、1或10μg/mL)、IgG1-CD27-131A(10μg/mL)、IgG1-PD1(0.8μg/mL)、派姆单抗(0.8μg/mL)、纳武单抗(1.6μg/mL)、阿替利珠单抗(0.4μg/mL),或IgG1-CD27-A-P329R-E345R或IgG1-CD27-131A和抗PD-(L)1抗体之一的组合的存在下,将T细胞与用CLDN6电穿孔的iDC共培养4d。通过流式细胞术分析T细胞的CFSE稀释度并用于计算扩增指数。显示了来自在三个独立实验中测试的三至七个供体中的一个代表性供体的数据(IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-PD1、派姆单抗:n=7;纳武单抗、阿替利珠单抗:n=6;IgG1-CD27-131A:n=3)。误差棒表示重复的孔的SD。虚线表示在没有抗体处理的情况下,与iDC共培养的CD8+ T细胞的扩增指数。CFSE,羧基荧光素琥珀酰亚胺酯;CLDN6,claudin-6;iDC=未成熟的树突状细胞;PD-1,程序性细胞死亡蛋白1;SD,标准差;TCR,T细胞受体。

[1283] 图45显示了IgG1-CD27-A-P329R-E345R或IgG1-CD27-131A与DuoBody-PD-L1x4-1BB、IgG1-PD1、派姆单抗、纳武单抗或阿替利珠单抗组合对细胞因子体外分泌的影响。在(A)IgG1-CD27-A-P329R-E345R(1或10μg/mL)和/或DuoBody-PD-L1x4-1BB(0.2μg/mL)的存在下,或在(B)IgG1-CD27-A-P329R-E345R(0.1、1或10μg/mL)、IgG1-CD27-131A(10μg/mL)、IgG1-PD1(0.8μg/mL)、派姆单抗(0.8μg/mL)、纳武单抗(1.6μg/mL)、阿替利珠单抗(0.4μg/mL),或IgG1-CD27-A-P329R-E345R或IgG1-CD27-131A和抗PD-(L)1抗体之一的组合的存在下,如图37所示,将表达CLDN6特异性TCR和PD-1的人CD8+ T细胞与表达CLDN6的iDC共培养。在2(A)或4(B)d后,通过多重ECLIA确定上清液中(A)IFNγ,GM-CSF,TNFα和IL-2或(B)IFNγ的细胞因子浓度。显示了来自测试的四个(A)或三至七个(B,IgG1-CD27-A-P329R-E345R,

IgG1-PD1,派姆单抗:n＝7;纳武单抗,阿替利珠单抗:n＝6;IgG1-CD27-131A:n＝3)供体中的一个代表性供体的数据。误差棒表示一式三份孔的SD。虚线表示在没有抗体处理的情况下,CD8+ T细胞/iDC共培养物中的细胞因子浓度。CFSE,羧基荧光素琥珀酰亚胺酯;CLDN6,claudin-6;ECLIA,电化学发光免疫测定;iDC＝未成熟的树突状细胞;PD-1,程序性细胞死亡蛋白1;SD,标准差;TCR,T细胞受体。

[1284] 图46显示了组合的IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB处理对CD8+ T细胞体外细胞毒性的影响。通过实时细胞分析评估针对MDA-MB-231_hCLDN6细胞的CD8+ T细胞介导的细胞毒活性。在IgG1-CD27-A-P329R-E345R(1或10μg/mL)、DuoBody-PD-L1x4-1BB(0.2μg/mL)、两者的组合或阴性对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R(10μg/mL)的存在下,将表达CLDN6-TCR的CD8+ T细胞与hCLDN6-MDA-MB-231细胞共培养5d。细胞指数值来源于以2小时间隔进行的阻抗测量。(A)在评估的六个供体中,一个供体的细胞指数曲线。误差棒表示重复孔的SD。(B)在整个5-d共培养期间使用细胞指数数据进行AUC分析。将每种处理条件的AUC归一化至来自相同供体的IgG1-b12-P329R-E345R处理的培养物。显示了来自两个单独实验的合并数据。误差棒表示SD(n＝6,每个供体重复孔的平均值)。*,P<0.05;Friedman检验与Dunn多重比较检验。

[1285] 图47显示了组合的IgG1-CD27-A-P329R-E345R和DuoBody-PD-L1x4-1BB处理对GzmB和CD107a体外表达的影响。在IgG1-CD27-A-P329R-E345R(1或10μg/mL)、DuoBody-PD-L1x4-1BB(0.2μg/mL)、两者的组合或阴性对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R(10μg/mL)的存在下,将表达CLDN6-TCR的CD8+ T细胞与MDA-MB-231_hCLDN6细胞共培养2d。通过流式细胞术分析GzmB和CD107a的细胞内表达。显示了CD8+ T细胞中表达(A)GzmB、(B)CD107a或(C)GzmB和CD107a两者(标准化至IgG1-b12-P329R-E345R,如虚线所示)的CD8+ T细胞的百分比。虚线和灰色阴影表示用IgG1-b12-P329R-E345R处理的共培养物中GzmB+CD107a+细胞的平均百分比和范围(即,最大值和最小值)。显示了来自两个单独实验的合并数据(n＝6个供体)。误差棒表示SD。*,P<0.05;Friedman检验与Dunn多重比较检验。

[1286] 图48显示了NSCLC TIL亚群的细胞数。衍生自人NSCLC样本的肿瘤片段仅用低剂量IL-2培养,或在1μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R、0.2μg/mL DuoBody-PD-L1x4-1BB或两者的组合的存在下培养。14d后通过流式细胞术确定指定细胞亚群的绝对细胞计数。符号表示重复孔,线表示进行的三个实验中一个实验的重复的平均值。NK,自然杀伤;PD-L1,程序性细胞死亡1配体1;SD,标准差。

[1287] 图49显示了在不存在或存在10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R的情况下,用IgG1-PD1(1μg/mL)或派姆单抗(1μg/mL)处理的CD8混合淋巴细胞反应(MLR)测定中测量的细胞因子浓度。显示了(A)IFNγ和(B)GM-CSF的浓度水平(pg/ml)。显示了来自两个单独实验的合并数据(n＝2个供体)。误差棒表示SD。

[1288] 图50显示了在不存在或存在10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R的情况下,用IgG1-PD1(1μg/mL)或派姆单抗(1μg/mL)处理的CD8 MLR测定中测量的细胞因子浓度的协同分析。通过减去对照值(无处理对照孔),将各处理条件下的IFNγ浓度归一化,并表示为测定中(IFNγ诱导)最大值的百分比。IFNγ诱导值表示两次重复的平均值。使用R(v4.1.0)中的SynergyFinder软件包(v3.2.2)[1]分析组合的两种抗体之间的相互作用。协同效应定义为观察到的效应超过预期效应,如通过两个参考模型(协同评分模型)计算的:最高单药(HSA)

和Bliss。显示了2个不同供体对(A和B)的HSA和Bliss协同分析图。

[1289] 图51显示了组合的IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD-1/PD-L1抑制剂处理对CD8+ T细胞体外细胞毒性的影响。通过实时细胞分析评估针对MDA-MB-231_hCLDN6细胞的CD8+ T细胞介导的细胞毒活性。在IgG1-CD27-A-P329R-E345R(10μg/mL)、IgG1-PD1(0.8μg/mL)、派姆单抗(0.8μg/mL)、纳武单抗(1.6μg/mL)、阿替利珠单抗(0.4μg/mL)或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R(10μg/mL)的存在下,作为单药或作为IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD-1/PD-L1抑制剂的组合,将表达PD-1和CLDN6-TCR的CD8+T细胞与MDA-MB-231_hCLDN6细胞共培养5-6d。细胞指数值来源于以2-3小时间隔进行的阻抗测量。(A)在评估的11-14个供体中,一个供体的细胞指数曲线(B)在5-6天共培养的整个持续时间内使用细胞指数数据进行AUC分析。将每种处理条件的AUC归一化至来自相同供体的IgG1-b12-P329R-E345R处理的培养物(虚线)。显示了来自六个单独实验的11-14个供体的合并数据。误差棒表示SD(符号表示每个供体重复孔的平均值)。*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001;Friedman检验与Dunn多重比较检验。

[1290] 图52显示了组合的IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD-1/PD-L1抑制剂处理对CD8+ T细胞的GzmB和CD107a体外表达的影响。在IgG1-CD27-A-P329R-E345R(10μg/mL)、IgG1-PD1(0.8μg/mL)、派姆单抗(0.8μg/mL)、纳武单抗(1.6μg/mL)、阿替利珠单抗(0.4μg/mL)或非结合对照抗体IgG1-b12-P329R-E345R(10μg/mL)的存在下,作为单药或作为IgG1-CD27-A-P329R-E345R和PD-1/PD-L1抑制剂的组合,将表达PD-1和CLDN6-TCR的CD8+T细胞与MDA-MB-231_hCLDN6细胞共培养2d。通过流式细胞术分析GzmB和CD107a的细胞内表达。表达GzmB和CD107a两者的CD8+ T细胞的百分比显示为来自六个单独实验中测试的11-14个供体的合并数据。虚线表示用IgG1-b12-P329R-E345R处理的共培养物中GzmB+CD107a+细胞的平均值。误差棒表示SD(符号表示每个供体重复孔的平均值)。*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001;Friedman检验与Dunn多重比较检验。

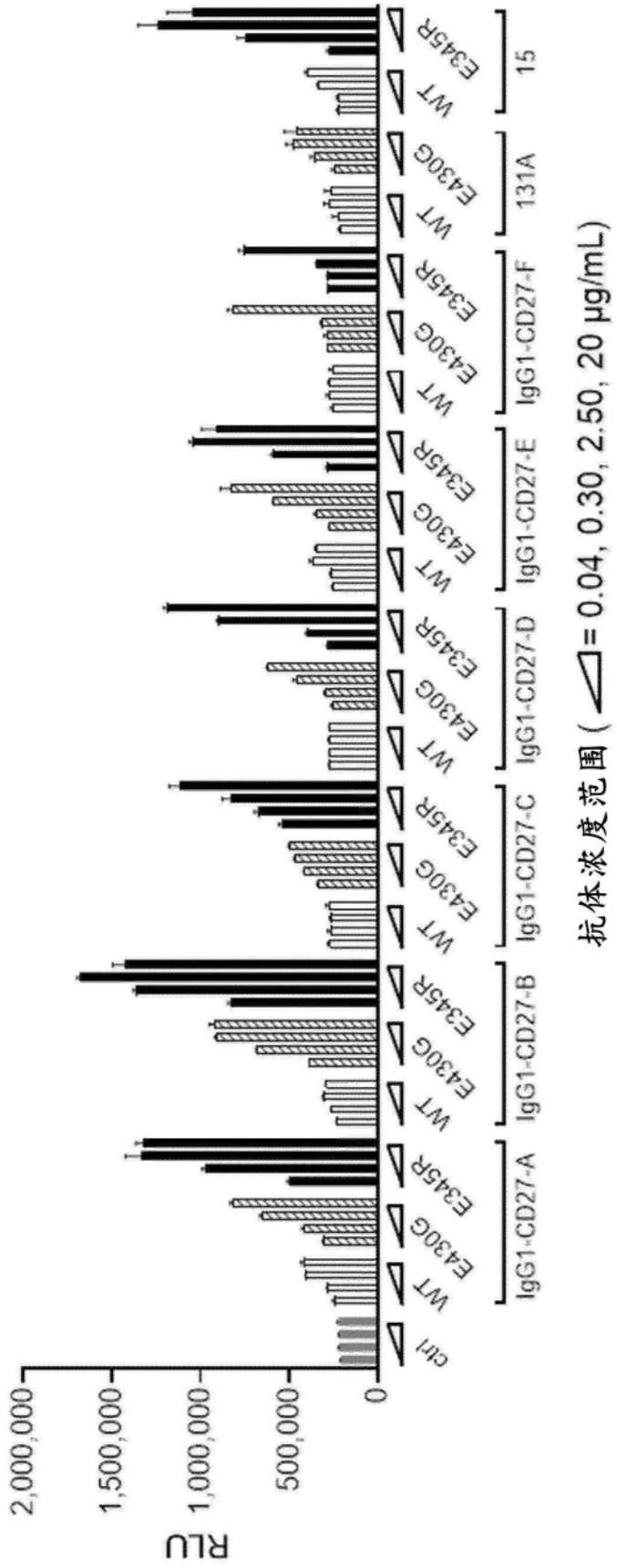

RLU
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
ctrl
WT
E430G
E345R
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
IgG1-CD27-D
IgG1-CD27-E
IgG1-CD27-F
131A
15
抗体浓度范围（ = 0.04, 0.30, 2.50, 20 μg/mL）

图1

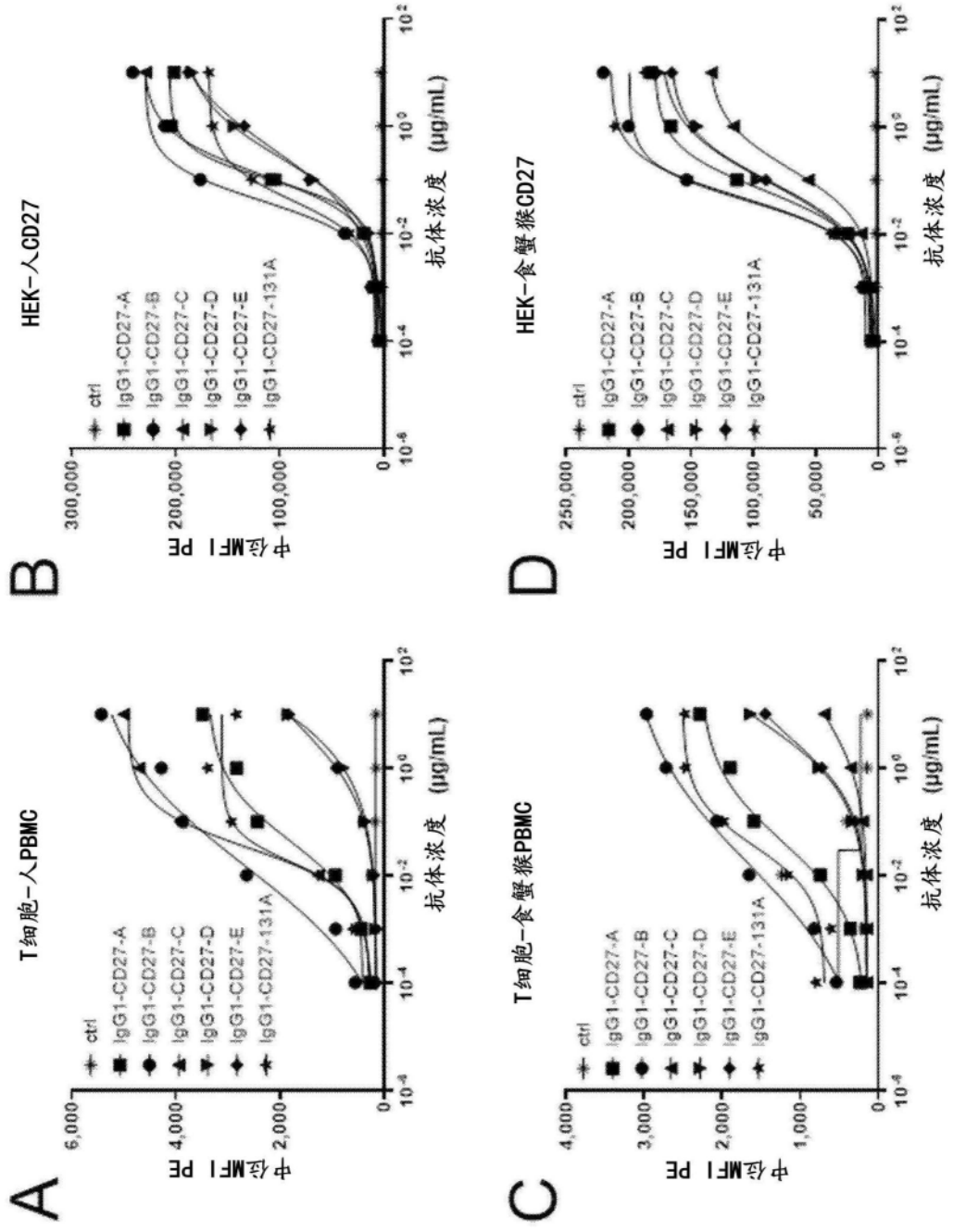

A
T细胞-人PBMC
B
HEK-人CD27
C
T细胞-食蟹猴PBMC
D
HEK-食蟹猴CD27
中位MFI PE
抗体浓度 (μg/mL)
ctrl
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
IgG1-CD27-D
IgG1-CD27-E
IgG1-CD27-131A

图2

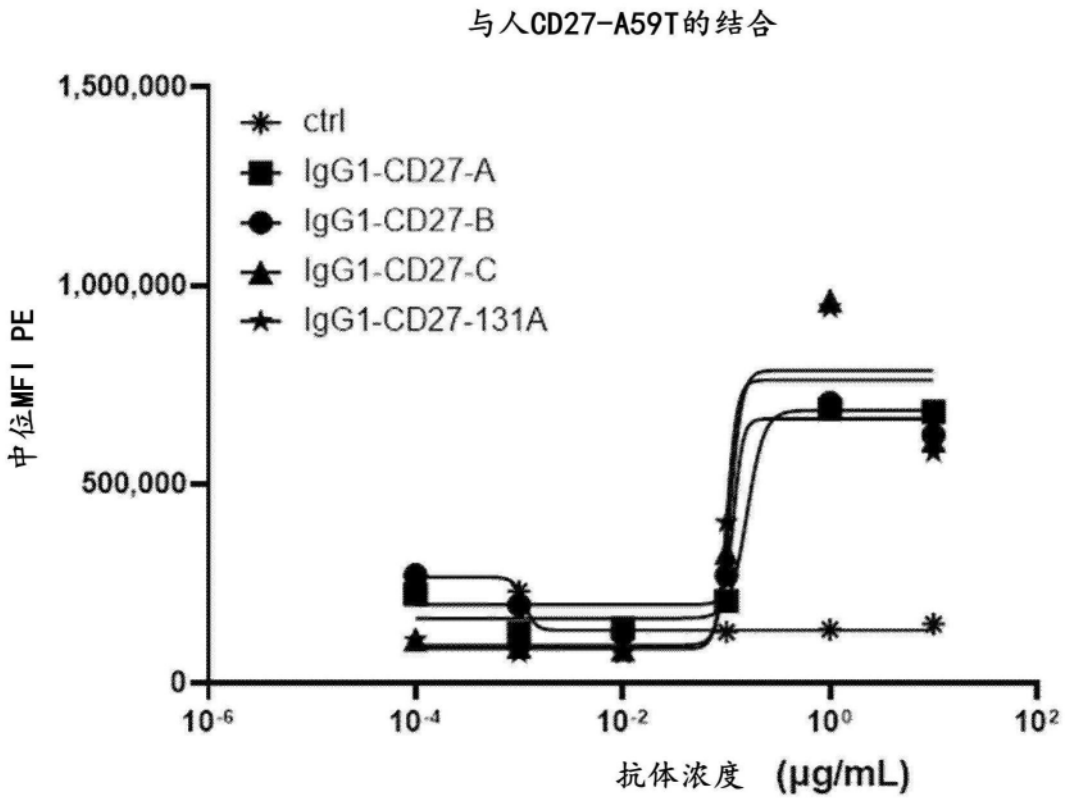

与人CD27-A59T的结合
1,500,000
1,000,000
500,000
0
中位MFI PE
ctrl
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
IgG1-CD27-131A
10-6
10-4
10-2
100
102
抗体浓度 (μg/mL)

图3

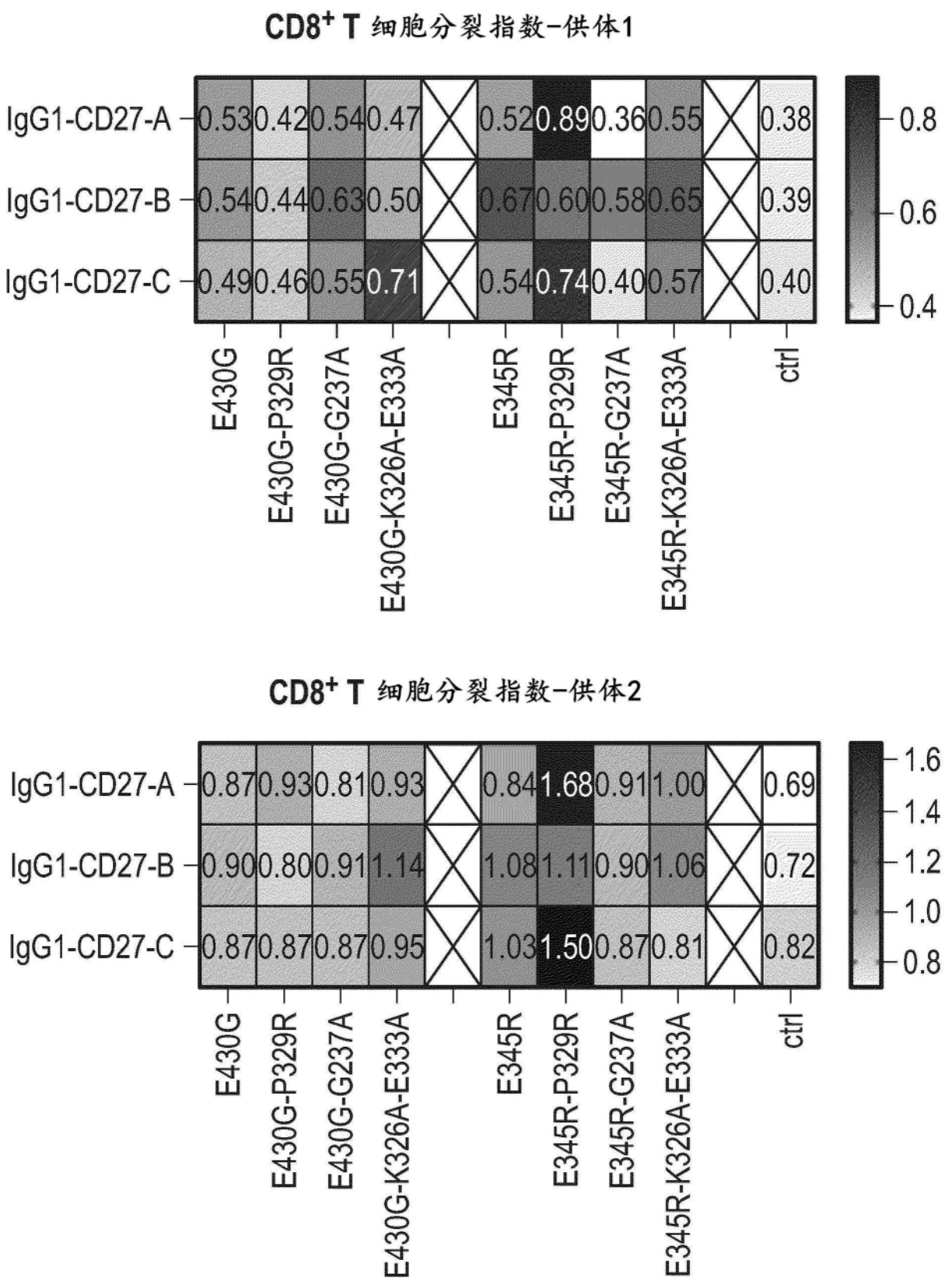

CD8+ T 细胞分裂指数-供体1
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
0.53 0.42 0.54 0.47 0.52 0.89 0.36 0.55 0.38
0.54 0.44 0.63 0.50 0.67 0.60 0.58 0.65 0.39
0.49 0.46 0.55 0.71 0.54 0.74 0.40 0.57 0.40
0.8
0.6
0.4
E430G
E430G-P329R
E430G-G237A
E430G-K326A-E333A
E345R
E345R-P329R
E345R-G237A
E345R-K326A-E333A
ctrl
CD8+ T 细胞分裂指数-供体2
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
0.87 0.93 0.81 0.93 0.84 1.68 0.91 1.00 0.69
0.90 0.80 0.91 1.14 1.08 1.11 0.90 1.06 0.72
0.87 0.87 0.87 0.95 1.03 1.50 0.87 0.81 0.82
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
E430G
E430G-P329R
E430G-G237A
E430G-K326A-E333A
E345R
E345R-P329R
E345R-G237A
E345R-K326A-E333A
ctrl

图4A

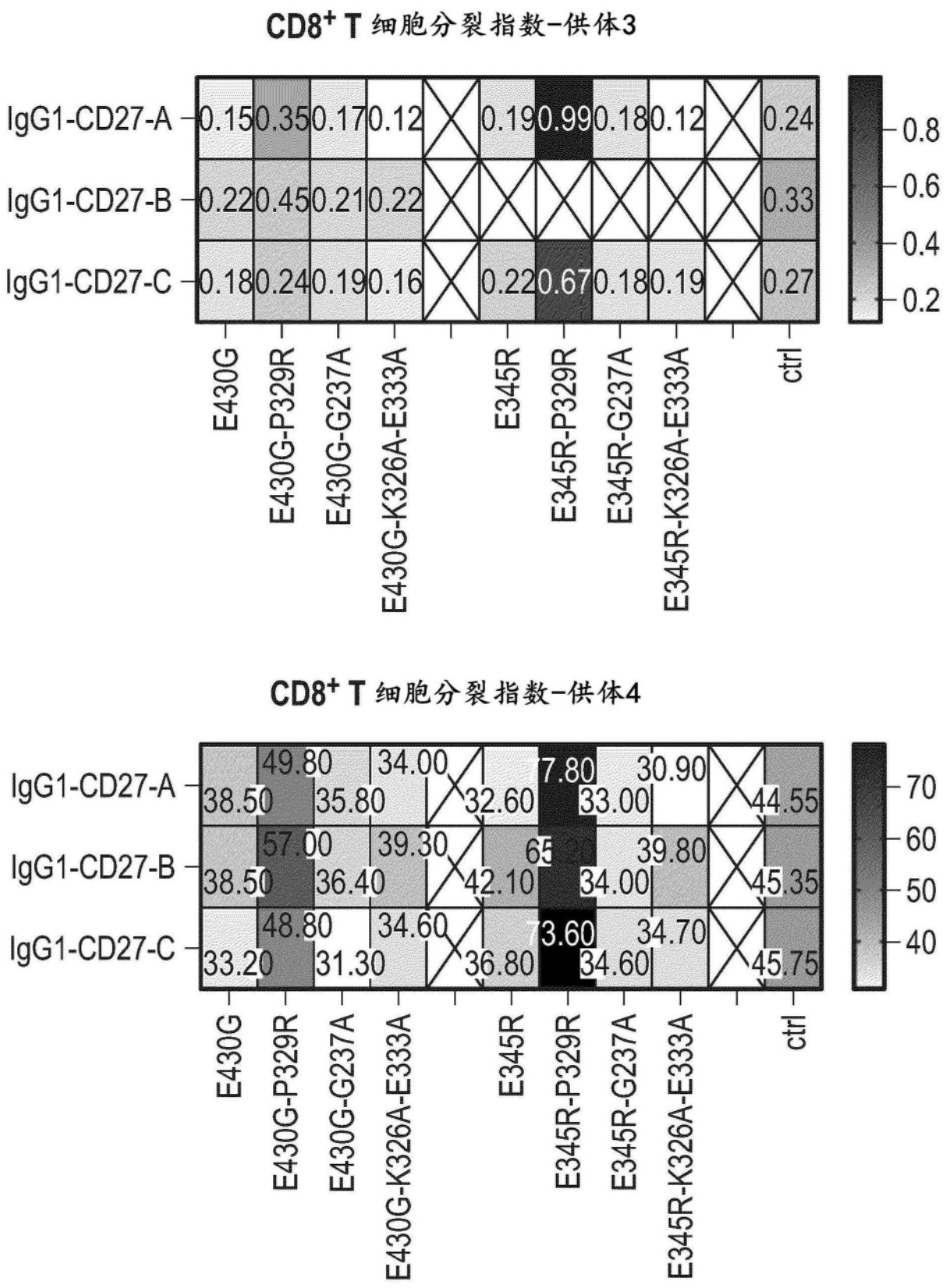

CD8+ T 细胞分裂指数-供体3
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
0.15 0.35 0.17 0.12 0.19 0.99 0.18 0.12 0.24
0.22 0.45 0.21 0.22 0.33
0.18 0.24 0.19 0.16 0.22 0.67 0.18 0.19 0.27
0.8
0.6
0.4
0.2
E430G
E430G-P329R
E430G-G237A
E430G-K326A-E333A
E345R
E345R-P329R
E345R-G237A
E345R-K326A-E333A
ctrl
CD8+ T 细胞分裂指数-供体4
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
49.80 34.00 30.90
38.50 35.80 32.60 33.00 44.55
57.00 39.30 39.80
38.50 36.40 42.10 34.00 45.35
48.80 34.60 34.70
33.20 31.30 36.80 34.60 45.75
70
60
50
40
E430G
E430G-P329R
E430G-G237A
E430G-K326A-E333A
E345R
E345R-P329R
E345R-G237A
E345R-K326A-E333A
ctrl

图4A(续)

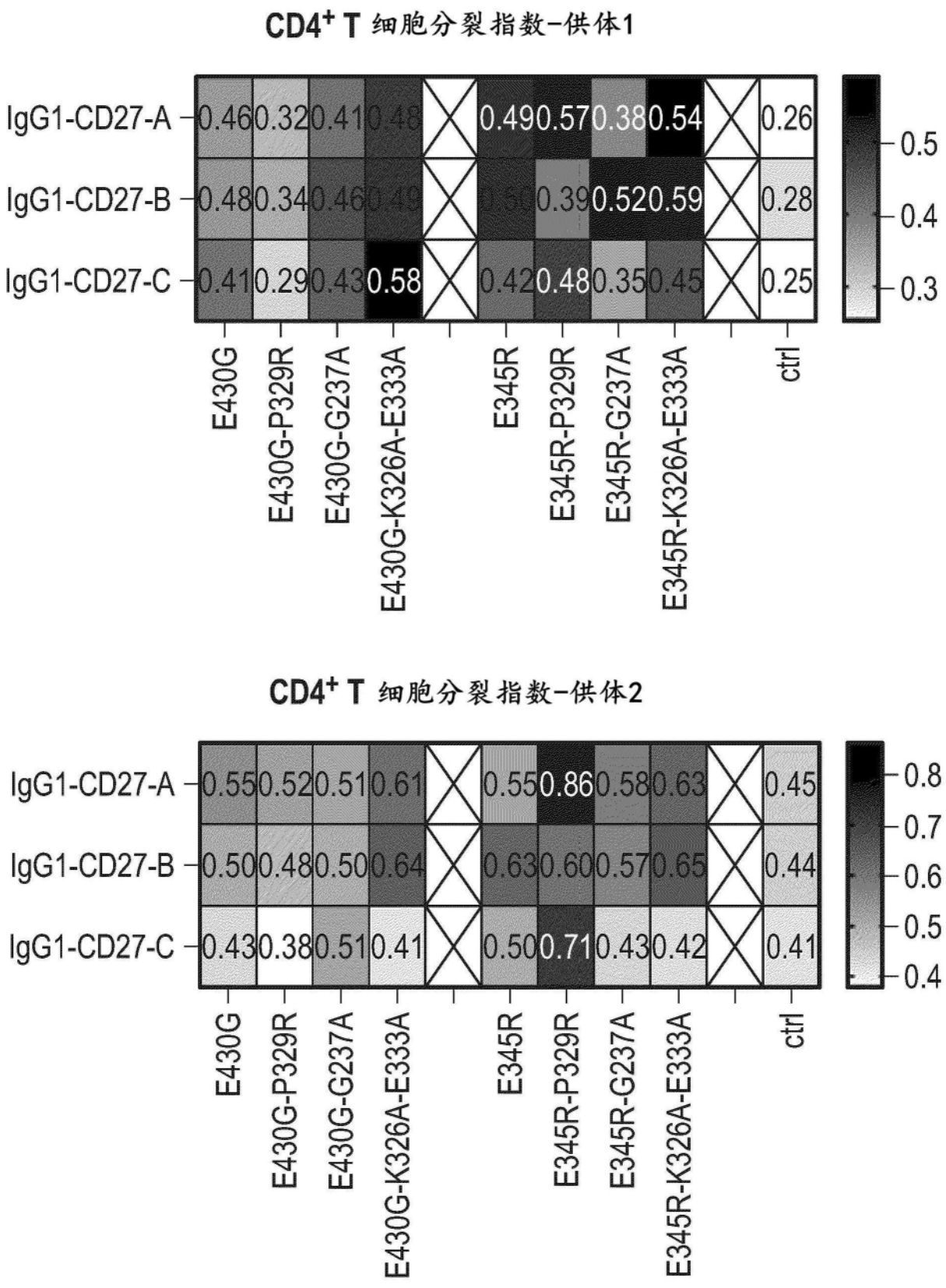

CD4+ T 细胞分裂指数-供体1
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
0.46 0.32 0.41 0.48 0.49 0.57 0.38 0.54 0.26
0.48 0.34 0.46 0.49 0.39 0.52 0.59 0.28
0.41 0.29 0.43 0.58 0.42 0.48 0.35 0.45 0.25
0.5
0.4
0.3
E430G
E430G-P329R
E430G-G237A
E430G-K326A-E333A
E345R
E345R-P329R
E345R-G237A
E345R-K326A-E333A
ctrl
CD4+ T 细胞分裂指数-供体2
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
0.55 0.52 0.51 0.61 0.55 0.86 0.58 0.63 0.45
0.50 0.48 0.50 0.64 0.63 0.60 0.57 0.65 0.44
0.43 0.38 0.51 0.41 0.50 0.71 0.43 0.42 0.41
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
E430G
E430G-P329R
E430G-G237A
E430G-K326A-E333A
E345R
E345R-P329R
E345R-G237A
E345R-K326A-E333A
ctrl

图4B

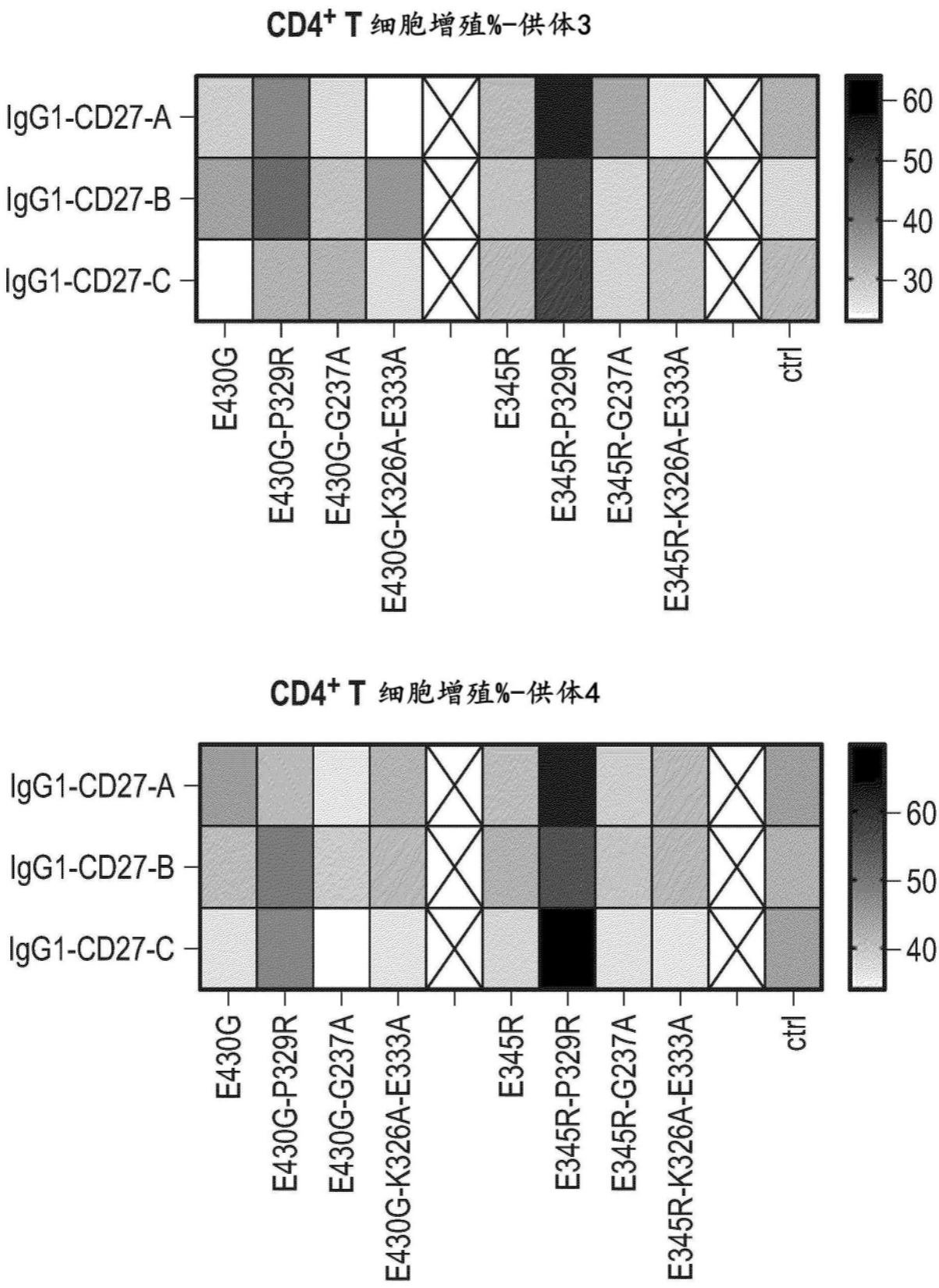

CD4+ T 细胞增殖%-供体3
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
60
50
40
30
E430G
E430G-P329R
E430G-G237A
E430G-K326A-E333A
E345R
E345R-P329R
E345R-G237A
E345R-K326A-E333A
ctrl
CD4+ T 细胞增殖%-供体4
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
60
50
40
E430G
E430G-P329R
E430G-G237A
E430G-K326A-E333A
E345R
E345R-P329R
E345R-G237A
E345R-K326A-E333A
ctrl

图4B(续)

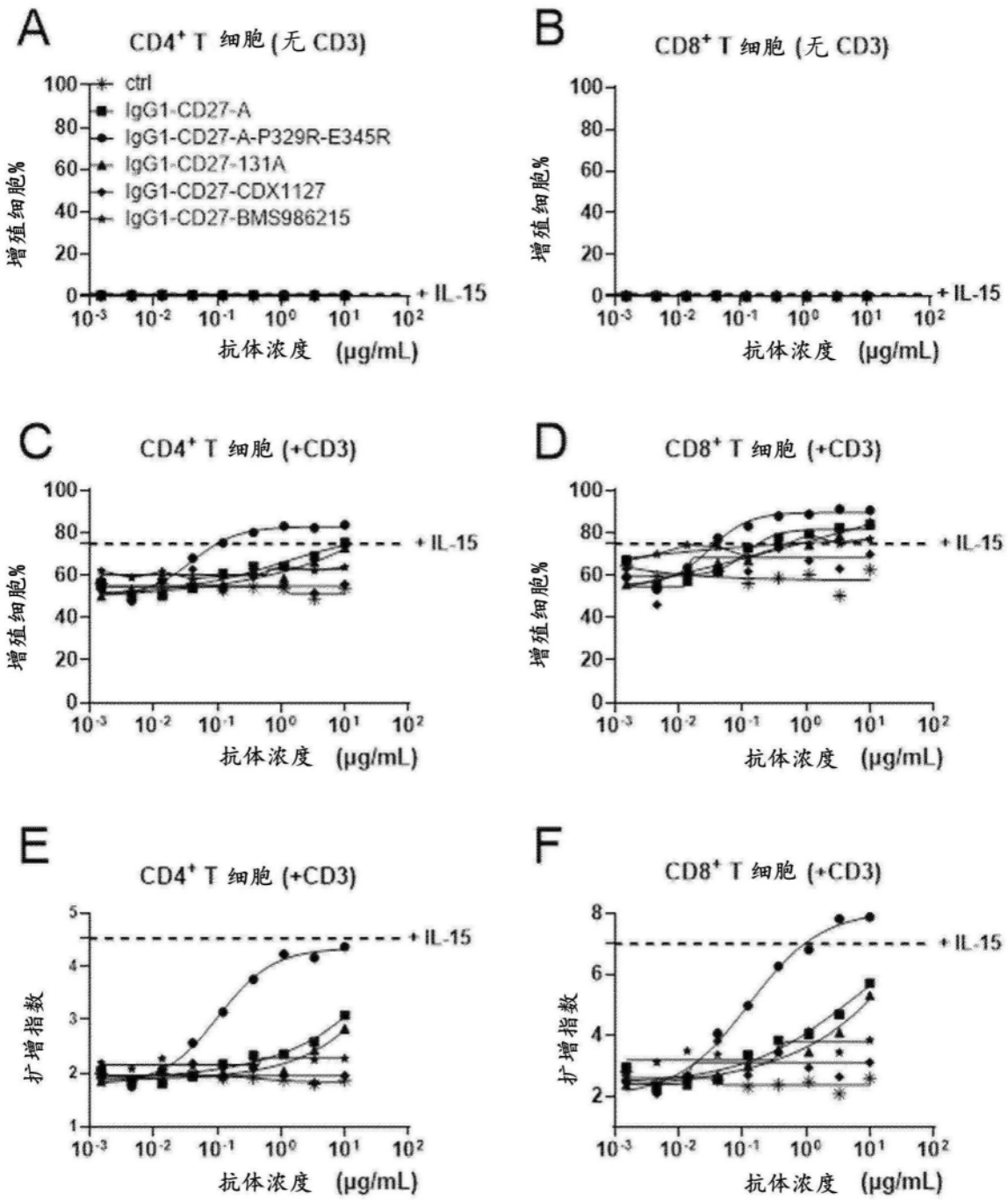

A
CD4+ T 细胞 (无 CD3)
ctrl
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-CD27-131A
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-CD27-BMS986215
增殖细胞%
+ IL-15
抗体浓度 (μg/mL)
B
CD8+ T 细胞 (无 CD3)
增殖细胞%
+ IL-15
抗体浓度 (μg/mL)
C
CD4+ T 细胞 (+CD3)
增殖细胞%
+ IL-15
抗体浓度 (μg/mL)
D
CD8+ T 细胞 (+CD3)
增殖细胞%
+ IL-15
抗体浓度 (μg/mL)
E
CD4+ T 细胞 (+CD3)
扩增指数
+ IL-15
抗体浓度 (μg/mL)
F
CD8+ T 细胞 (+CD3)
扩增指数
+ IL-15
抗体浓度 (μg/mL)

图5

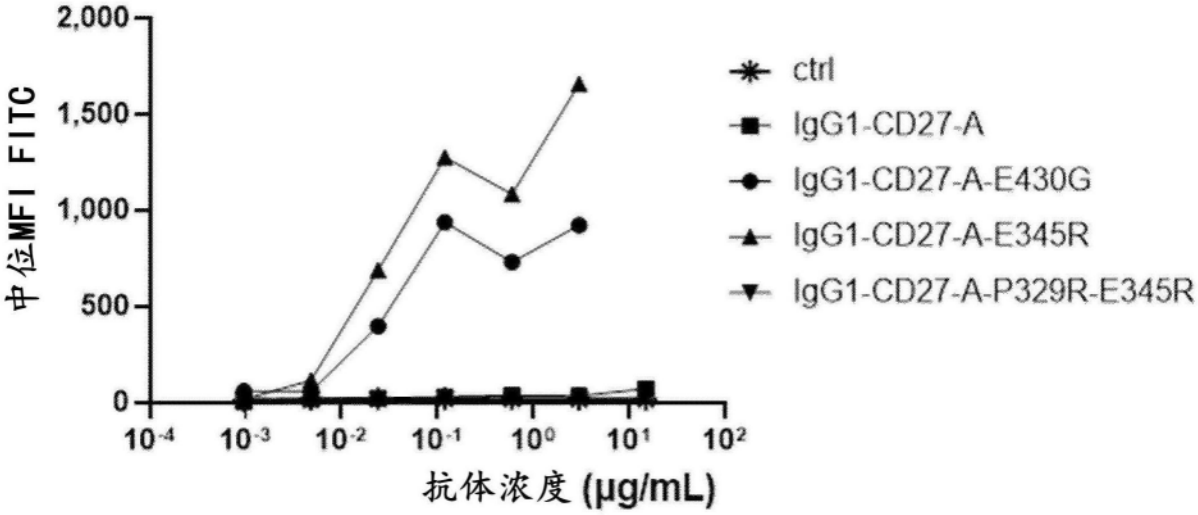

2,000
1,500
1,000
500
0
中位MFI FITC
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102
抗体浓度 (μg/mL)
ctrl
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-A-E430G
IgG1-CD27-A-E345R
IgG1-CD27-A-P329R-E345R

图6

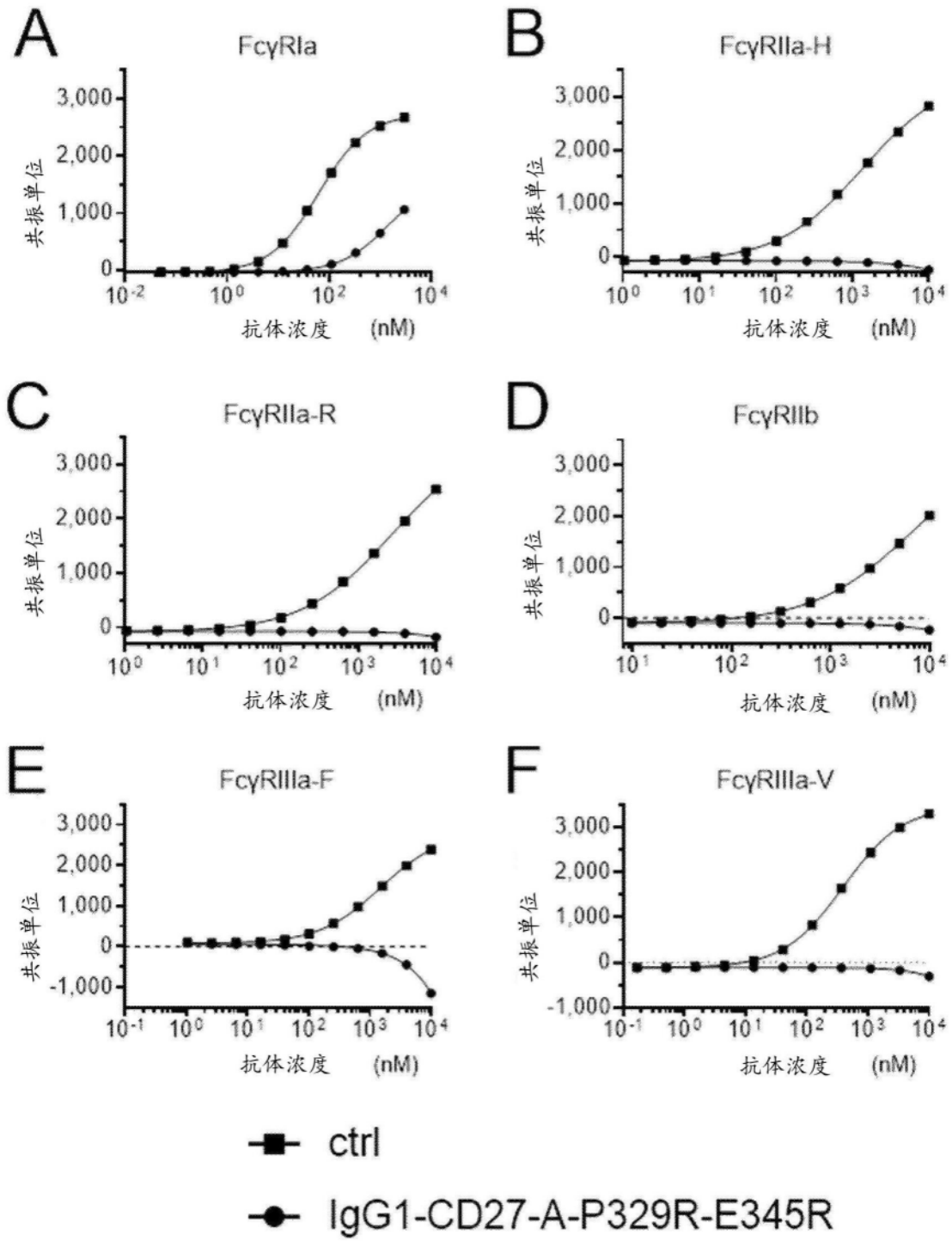

A
FcγRIa
B
FcγRIIa-H
C
FcγRIIa-R
D
FcγRIIb
E
FcγRIIIa-F
F
FcγRIIIa-V
共振单位
抗体浓度 (nM)
ctrl
IgG1-CD27-A-P329R-E345R

图7

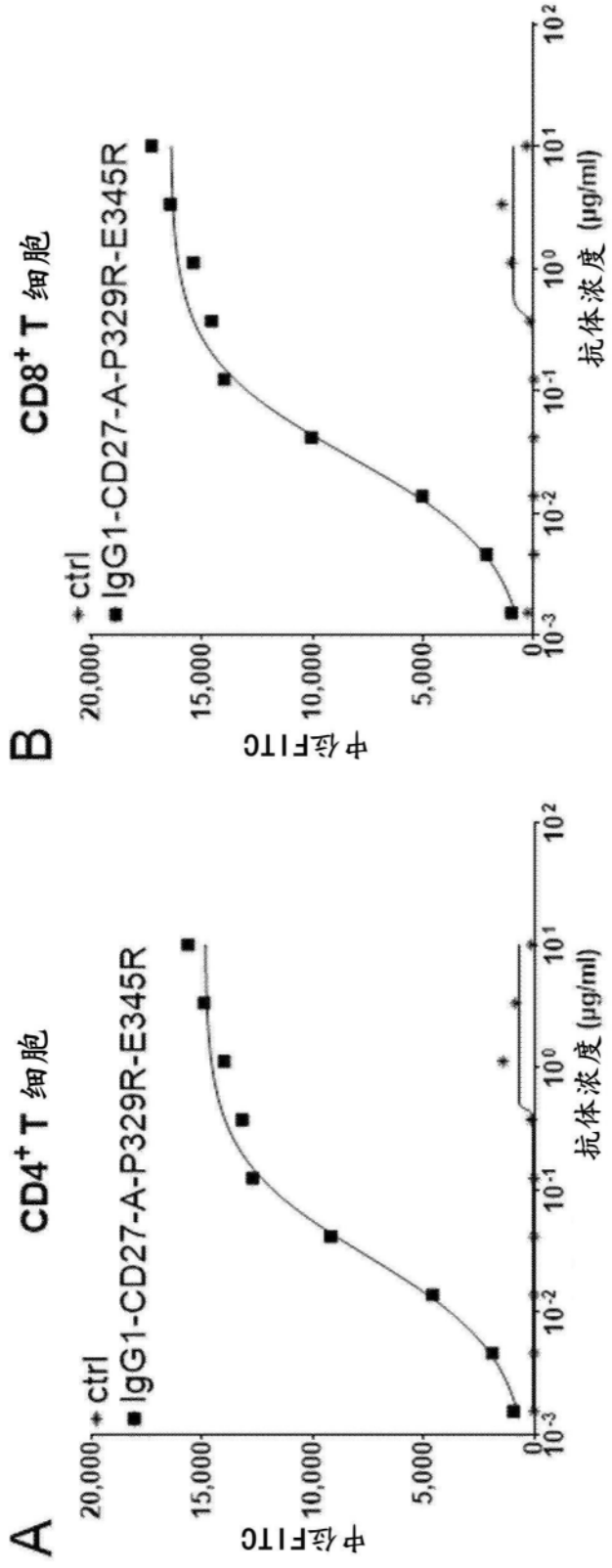

A
CD4+ T 细胞
ctrl
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
中位FITC
20,000
15,000
10,000
5,000
0
10-3
10-2
10-1
100
101
102
抗体浓度 (μg/ml)
B
CD8+ T 细胞
ctrl
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
中位FITC
20,000
15,000
10,000
5,000
0
10-3
10-2
10-1
100
101
102
抗体浓度 (μg/ml)

图8

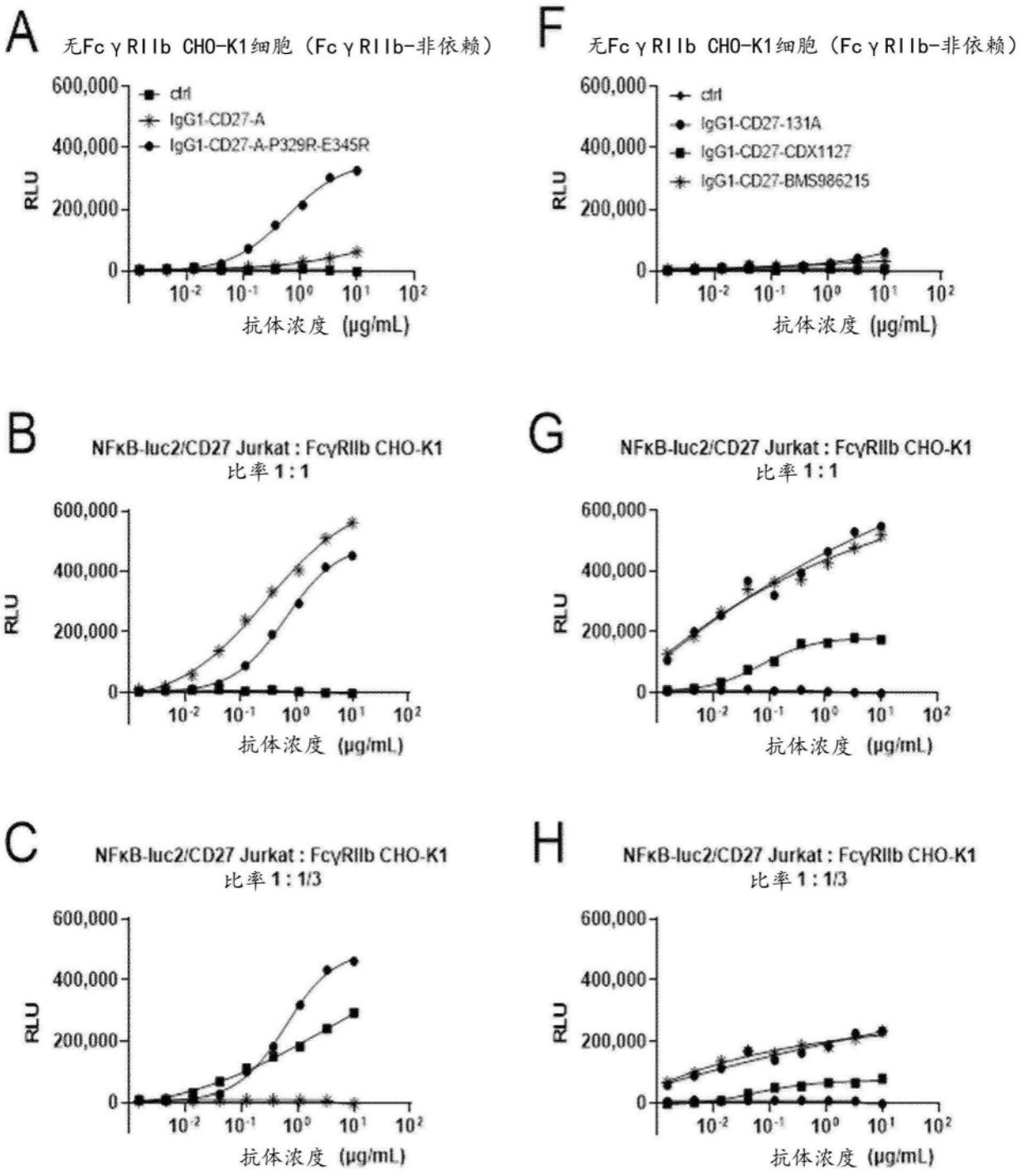

A
无FcγRIIb CHO-K1细胞（FcγRIIb-非依赖）
ctrl
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
RLU
600,000
400,000
200,000
0
10-2 10-1 100 101 102
抗体浓度 (μg/mL)
F
无FcγRIIb CHO-K1细胞（FcγRIIb-非依赖）
ctrl
IgG1-CD27-131A
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-CD27-BMS986215
RLU
600,000
400,000
200,000
0
10-2 10-1 100 101 102
抗体浓度 (μg/mL)
B
NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1
比率 1 : 1
RLU
600,000
400,000
200,000
0
10-2 10-1 100 101 102
抗体浓度 (μg/mL)
G
NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1
比率 1 : 1
RLU
600,000
400,000
200,000
0
10-2 10-1 100 101 102
抗体浓度 (μg/mL)
C
NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1
比率 1 : 1/3
RLU
600,000
400,000
200,000
0
10-2 10-1 100 101 102
抗体浓度 (μg/mL)
H
NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1
比率 1 : 1/3
RLU
600,000
400,000
200,000
0
10-2 10-1 100 101 102
抗体浓度 (μg/mL)

图9

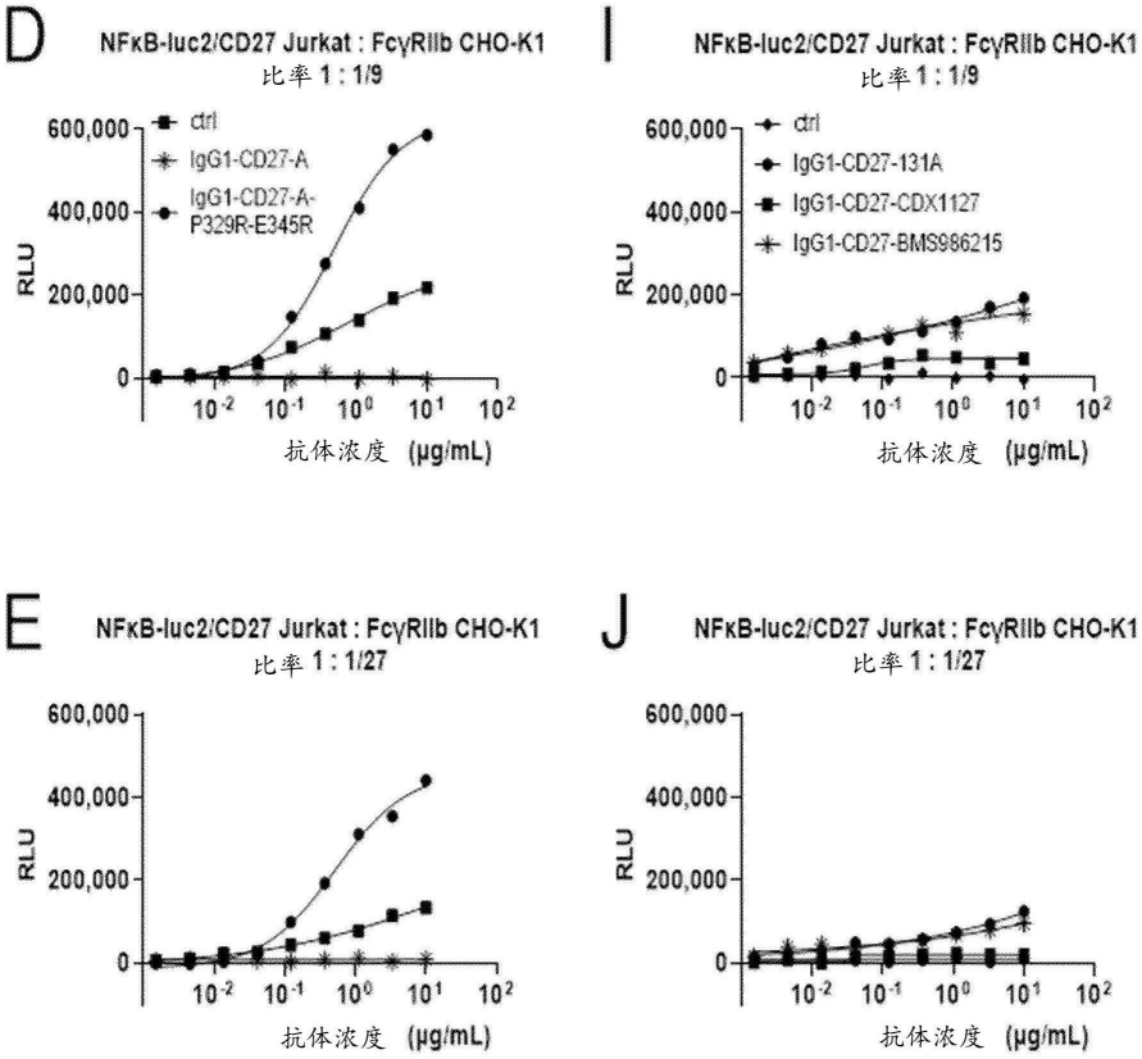

D
NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1
比率 1 : 1/9
ctrl
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
RLU
600,000
400,000
200,000
0
10-2 10-1 100 101 102
抗体浓度 (μg/mL)
I
NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1
比率 1 : 1/9
ctrl
IgG1-CD27-131A
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-CD27-BMS986215
RLU
600,000
400,000
200,000
0
10-2 10-1 100 101 102
抗体浓度 (μg/mL)
E
NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1
比率 1 : 1/27
RLU
600,000
400,000
200,000
0
10-2 10-1 100 101 102
抗体浓度 (μg/mL)
J
NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1
比率 1 : 1/27
RLU
600,000
400,000
200,000
0
10-2 10-1 100 101 102
抗体浓度 (μg/mL)

图9(续)

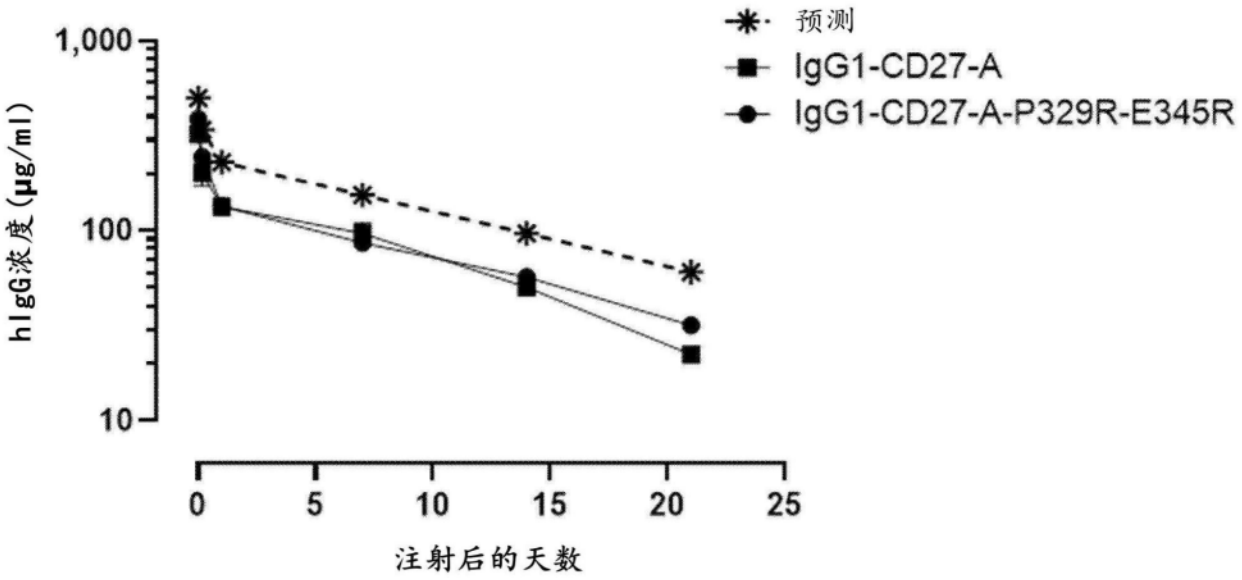

预测
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
hIgG浓度(μg/ml)
1,000
100
10
0
5
10
15
20
25
注射后的天数

图10

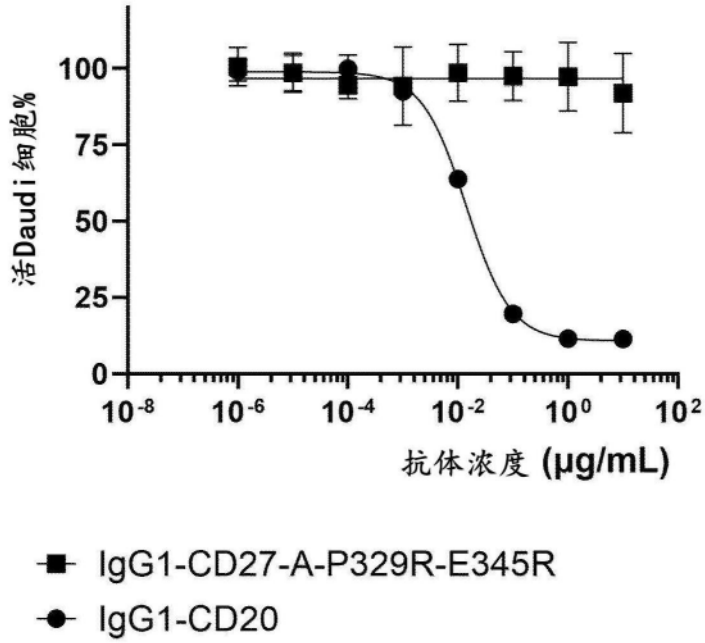

活Daudi细胞%
100
75
50
25
0
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102
抗体浓度 (μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-CD20

图11

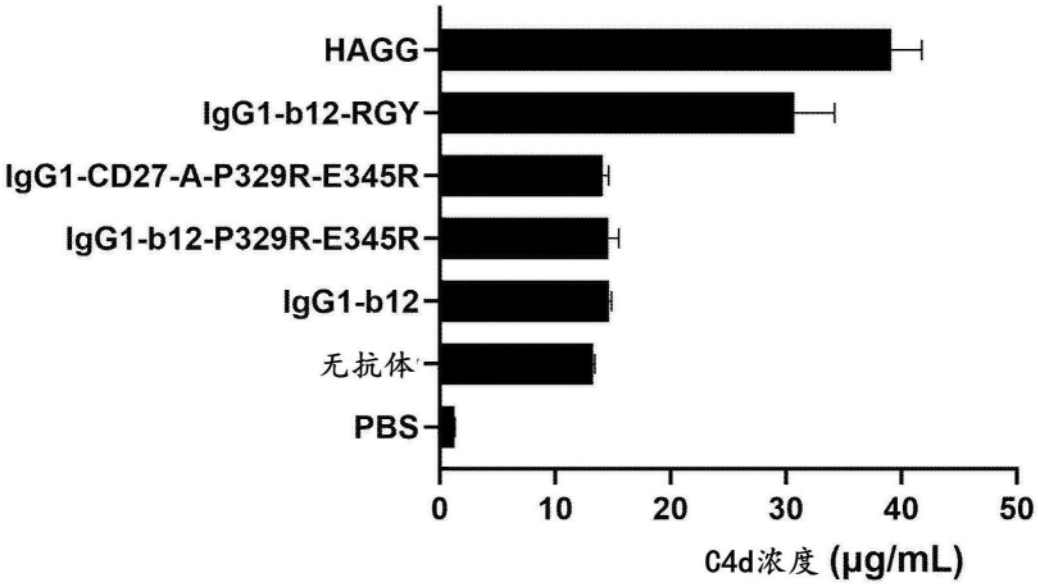

HAGG
IgG1-b12-RGY
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-b12-P329R-E345R
IgG1-b12
无抗体
PBS
0
10
20
30
40
50
C4d浓度 (μg/mL)

图12

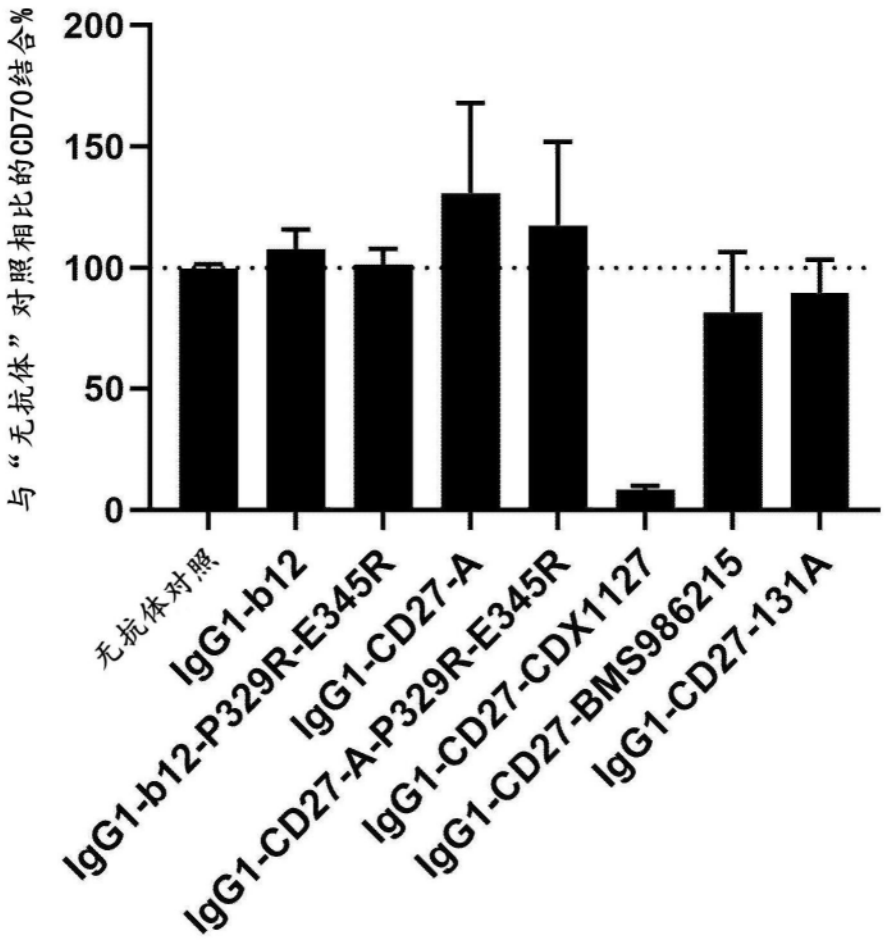

与“无抗体”对照相比的CD70结合%
200
150
100
50
0
无抗体对照
IgG1-b12
IgG1-b12-P329R-E345R
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-CD27-BMS986215
IgG1-CD27-131A

图13

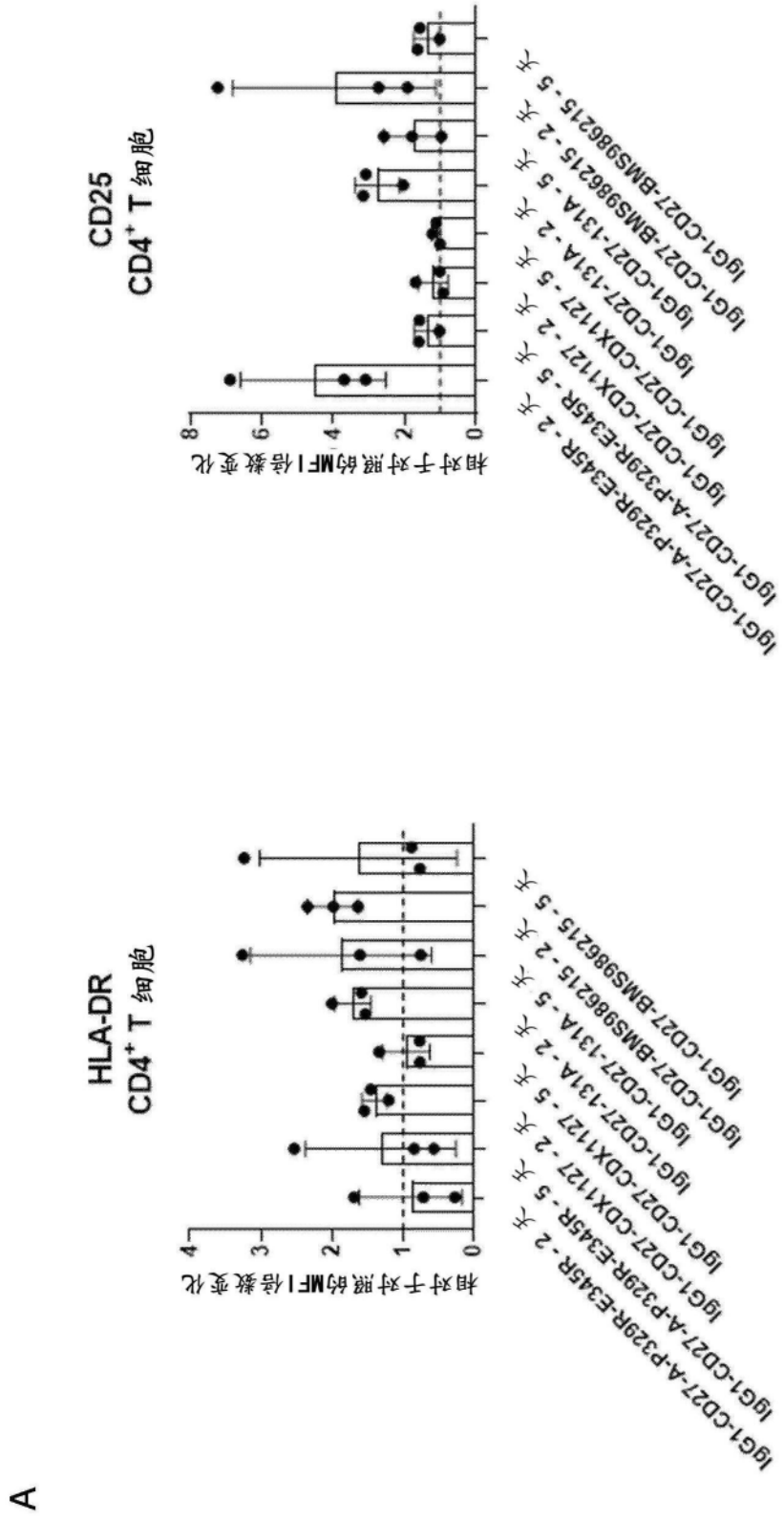

A
HLA-DR
CD4+ T 细胞
相对于对照的MFI倍数变化
0
1
2
3
4
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 2 天
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 5 天
IgG1-CD27-CDX1127 - 2 天
IgG1-CD27-CDX1127 - 5 天
IgG1-CD27-131A - 2 天
IgG1-CD27-131A - 5 天
IgG1-CD27-BMS986215 - 2 天
IgG1-CD27-BMS986215 - 5 天
CD25
CD4+ T 细胞
相对于对照的MFI倍数变化
0
2
4
6
8
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 2 天
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 5 天
IgG1-CD27-CDX1127 - 2 天
IgG1-CD27-CDX1127 - 5 天
IgG1-CD27-131A - 2 天
IgG1-CD27-131A - 5 天
IgG1-CD27-BMS986215 - 2 天
IgG1-CD27-BMS986215 - 5 天

图14A

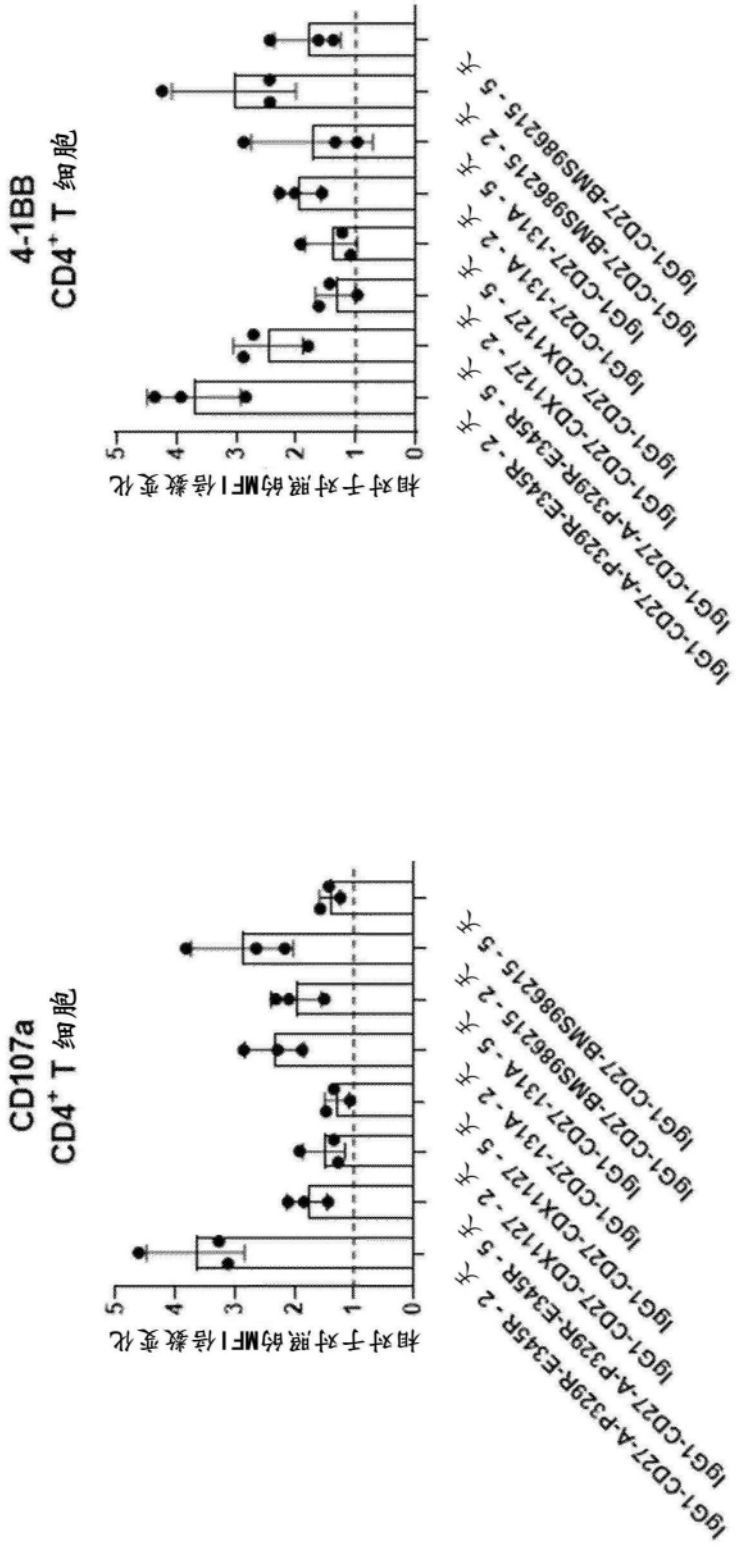

4-1BB
CD4+ T 细胞
相对于对照的MFI倍数变化
0
1
2
3
4
5
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 2 μg
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 5 μg
IgG1-CD27-CDX1127 - 2 μg
IgG1-CD27-CDX1127 - 5 μg
IgG1-CD27-131A - 2 μg
IgG1-CD27-131A - 5 μg
IgG1-CD27-BMS986215 - 2 μg
IgG1-CD27-BMS986215 - 5 μg
CD107a
CD4+ T 细胞
相对于对照的MFI倍数变化
0
1
2
3
4
5
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 2 μg
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 5 μg
IgG1-CD27-CDX1127 - 2 μg
IgG1-CD27-CDX1127 - 5 μg
IgG1-CD27-131A - 2 μg
IgG1-CD27-131A - 5 μg
IgG1-CD27-BMS986215 - 2 μg
IgG1-CD27-BMS986215 - 5 μg

图14A(续)

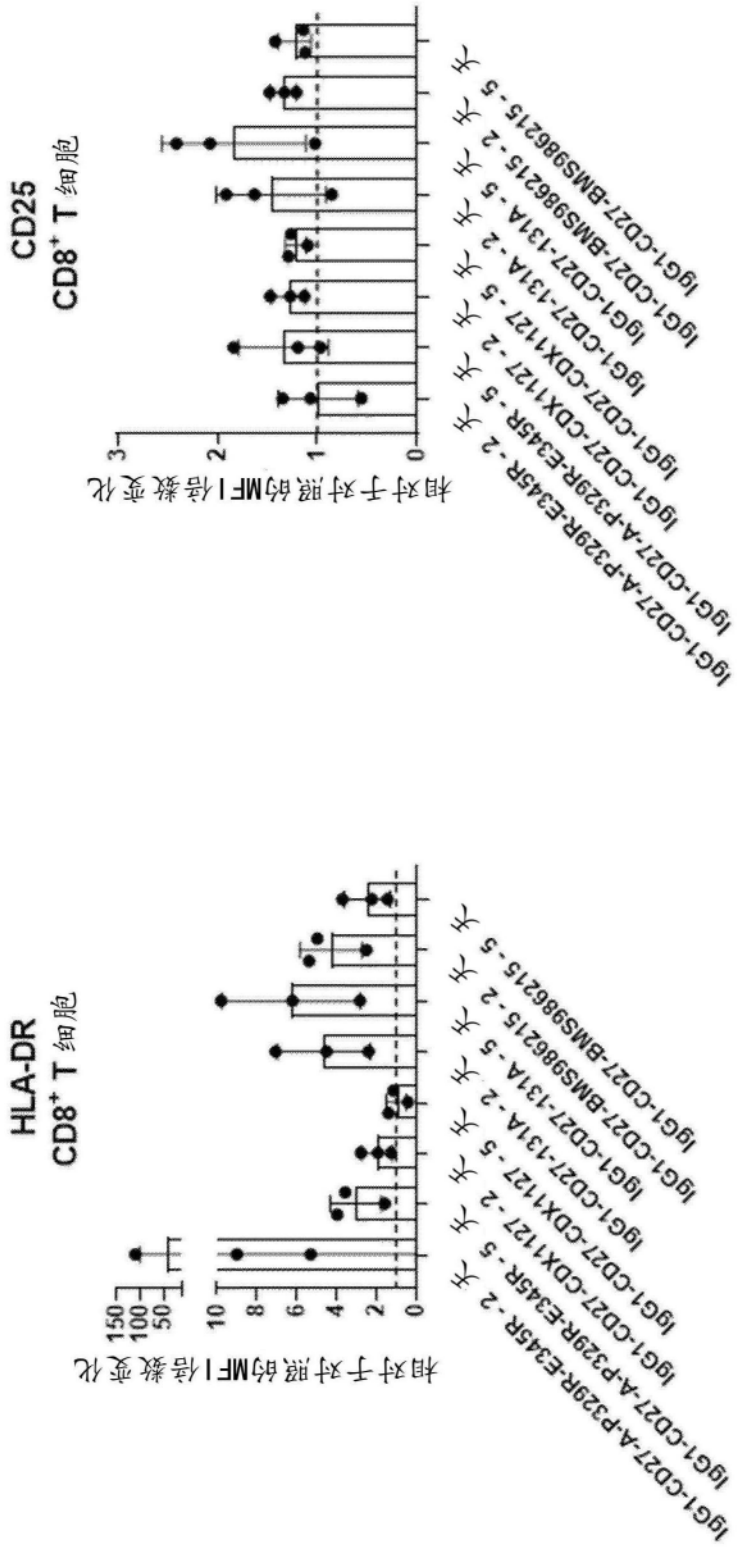

CD25
CD8+ T 细胞
相对于对照的MFI倍数变化
0
1
2
3
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 2 天
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 5 天
IgG1-CD27-CDX1127 - 2 天
IgG1-CD27-CDX1127 - 5 天
IgG1-CD27-131A - 2 天
IgG1-CD27-131A - 5 天
IgG1-CD27-BMS986215 - 2 天
IgG1-CD27-BMS986215 - 5 天
HLA-DR
CD8+ T 细胞
相对于对照的MFI倍数变化
0
2
4
6
8
10
50
100
150
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 2 天
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 5 天
IgG1-CD27-CDX1127 - 2 天
IgG1-CD27-CDX1127 - 5 天
IgG1-CD27-131A - 2 天
IgG1-CD27-131A - 5 天
IgG1-CD27-BMS986215 - 2 天
IgG1-CD27-BMS986215 - 5 天

图14B

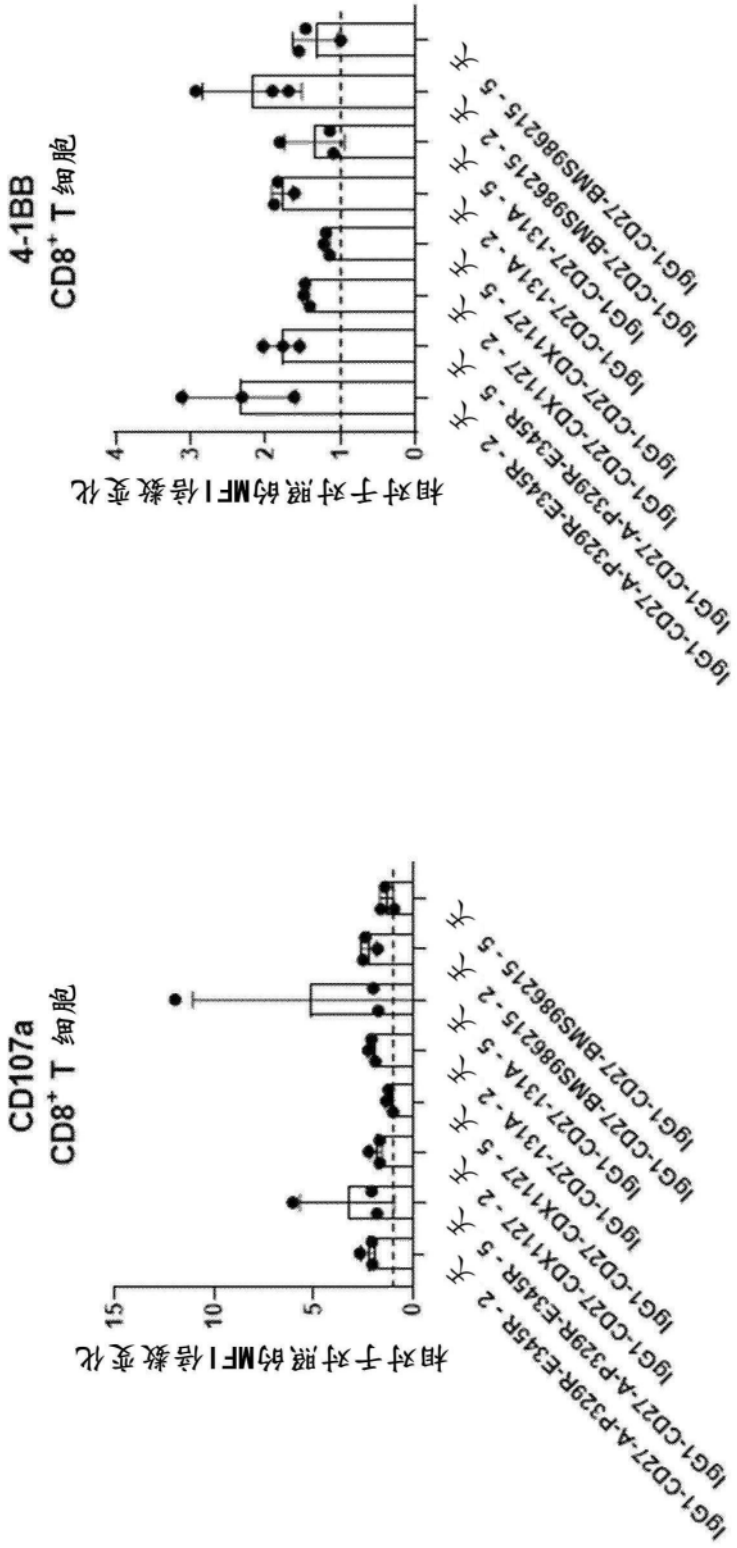

4-1BB
CD8+ T 细胞
相对于对照的MFI倍数变化
0
1
2
3
4
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 2 次
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 5 次
IgG1-CD27-CDX1127 - 2 次
IgG1-CD27-CDX1127 - 5 次
IgG1-CD27-131A - 2 次
IgG1-CD27-131A - 5 次
IgG1-CD27-BMS986215 - 2 次
IgG1-CD27-BMS986215 - 5 次
CD107a
CD8+ T 细胞
相对于对照的MFI倍数变化
0
5
10
15
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 2 次
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 5 次
IgG1-CD27-CDX1127 - 2 次
IgG1-CD27-CDX1127 - 5 次
IgG1-CD27-131A - 2 次
IgG1-CD27-131A - 5 次
IgG1-CD27-BMS986215 - 2 次
IgG1-CD27-BMS986215 - 5 次

图14B(续)

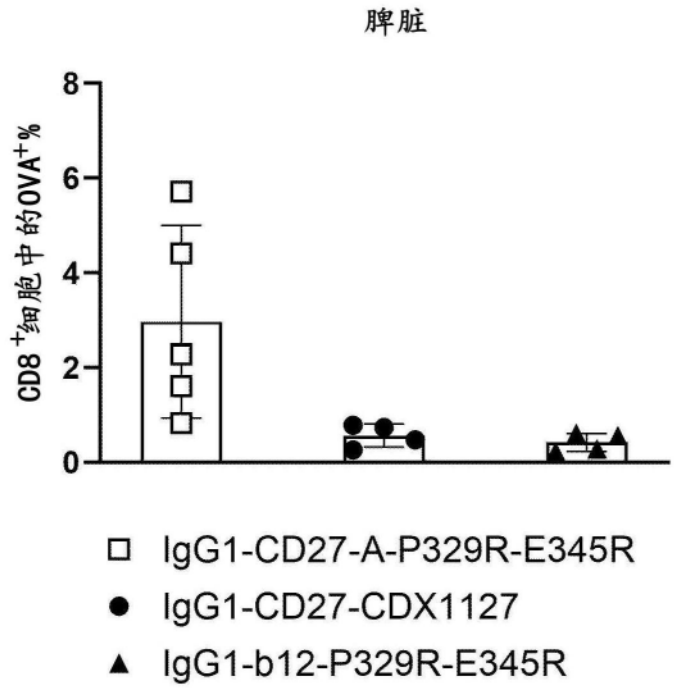

脾脏
CD8+细胞中的OVA+%
8
6
4
2
0
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-b12-P329R-E345R

图15

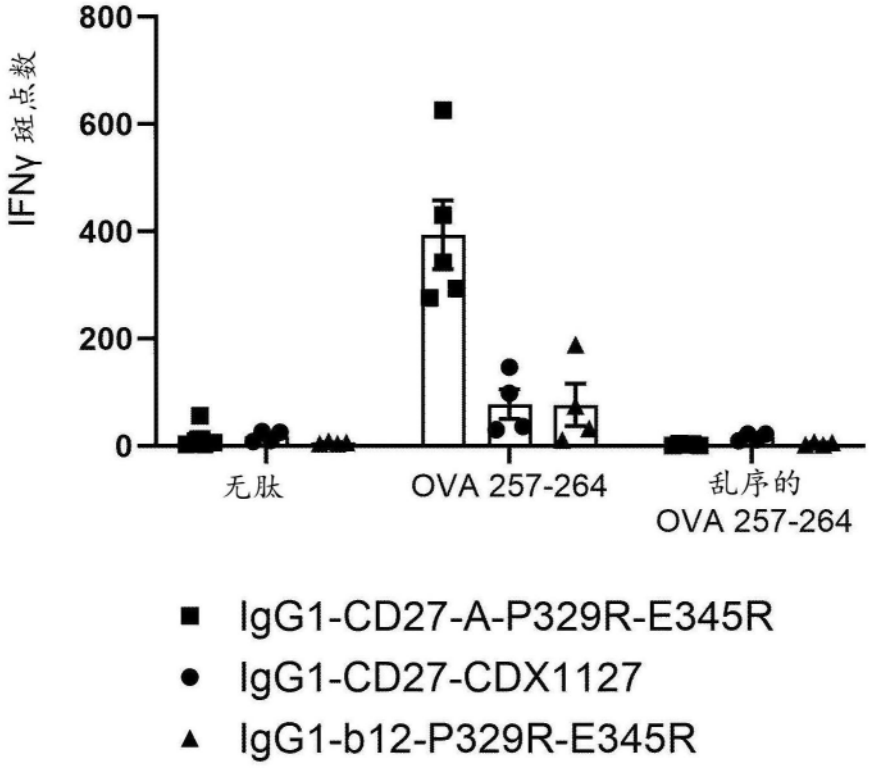

IFNγ 斑点数
800
600
400
200
0
无肽
OVA 257-264
乱序的
OVA 257-264
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-b12-P329R-E345R

图16

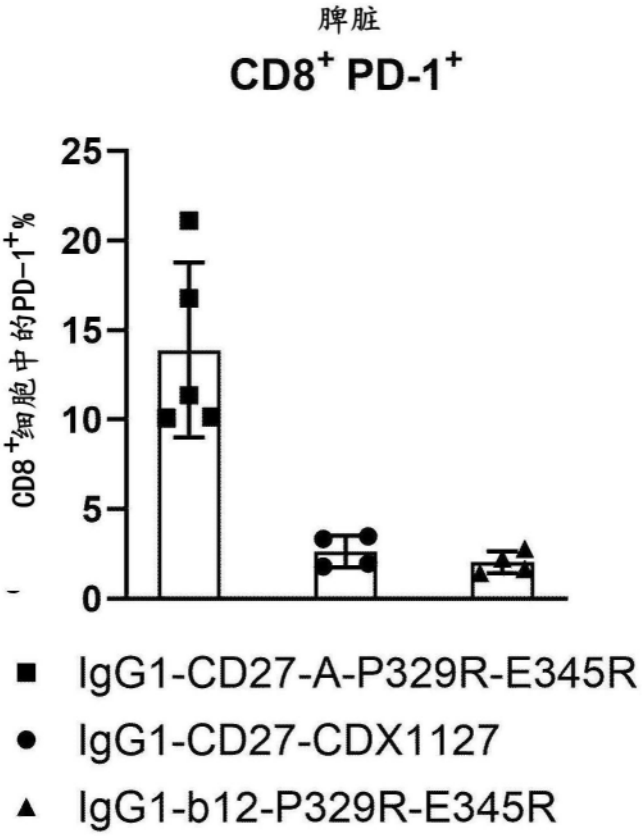

脾脏
CD8+ PD-1+
CD8+细胞中的PD-1+%
25
20
15
10
5
0
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-b12-P329R-E345R

图17

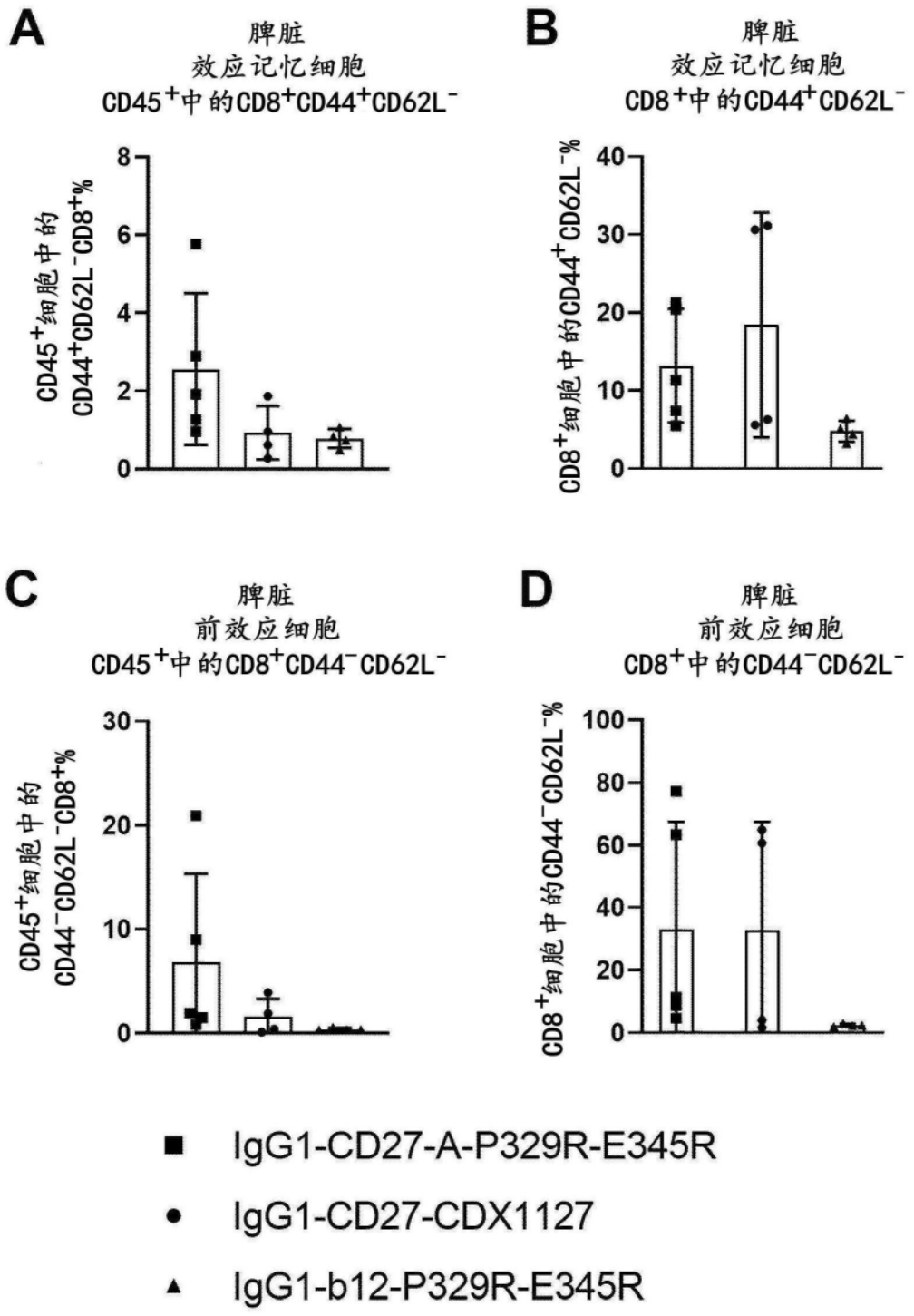

A
脾脏
效应记忆细胞
CD45+中的CD8+CD44+CD62L-
CD45+细胞中的CD44+CD62L-CD8+%
B
脾脏
效应记忆细胞
CD8+中的CD44+CD62L-
CD8+细胞中的CD44+CD62L-%
C
脾脏
前效应细胞
CD45+中的CD8+CD44-CD62L-
CD45+细胞中的CD44-CD62L-CD8+%
D
脾脏
前效应细胞
CD8+中的CD44-CD62L-
CD8+细胞中的CD44-CD62L-%
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-b12-P329R-E345R

图18

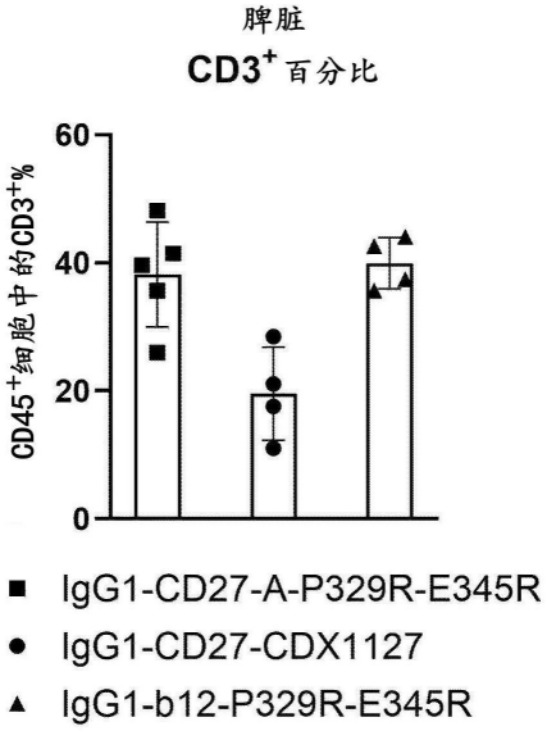

脾脏
CD3+百分比
CD45+细胞中的CD3+%
60
40
20
0
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-b12-P329R-E345R

图19

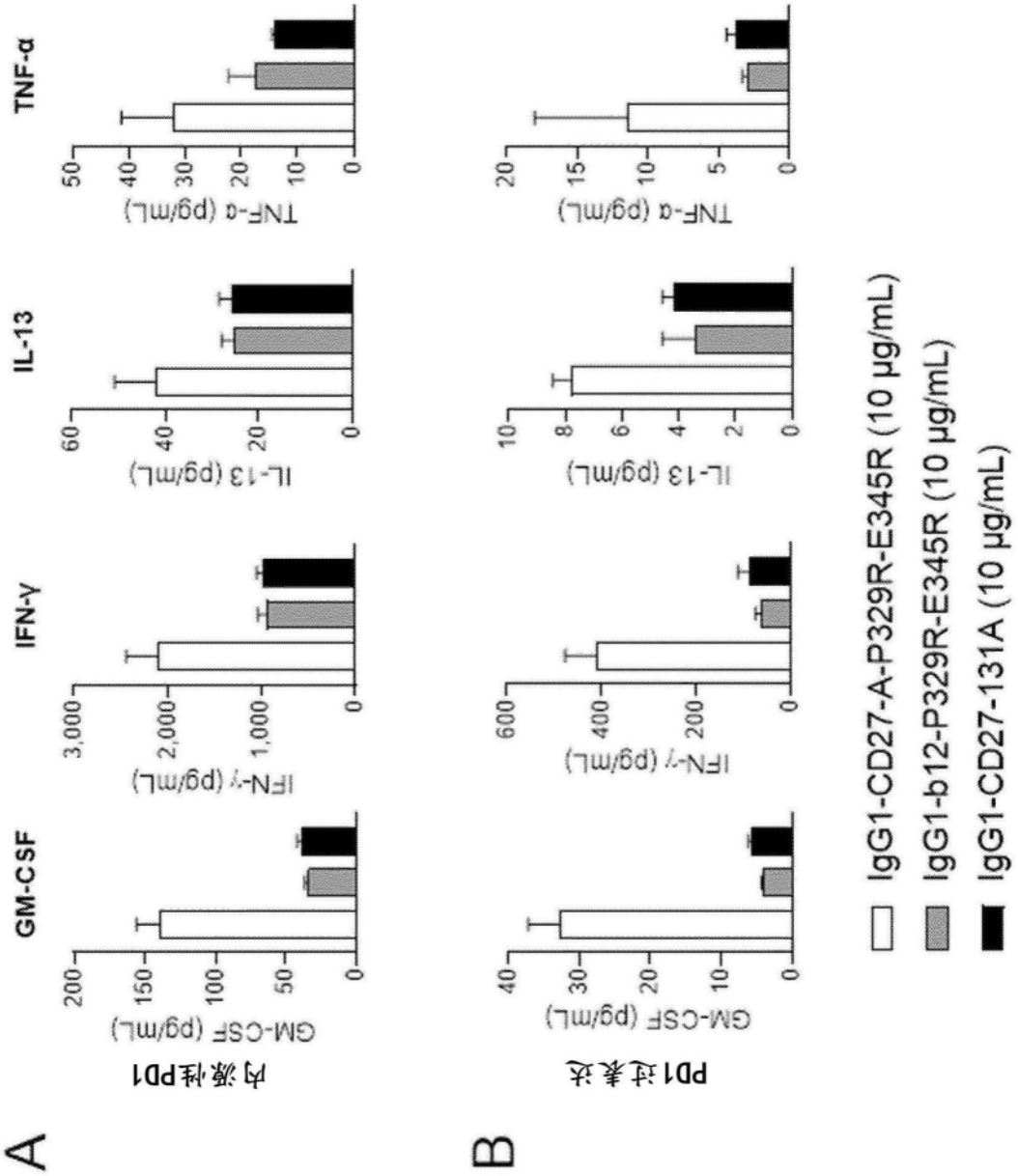

A
内源性PD1
GM-CSF
GM-CSF (pg/mL)
IFN-γ
IFN-γ (pg/mL)
IL-13
IL-13 (pg/mL)
TNF-α
TNF-α (pg/mL)
B
PD1过表达
GM-CSF (pg/mL)
IFN-γ (pg/mL)
IL-13 (pg/mL)
TNF-α (pg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-b12-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-CD27-131A (10 μg/mL)

图20

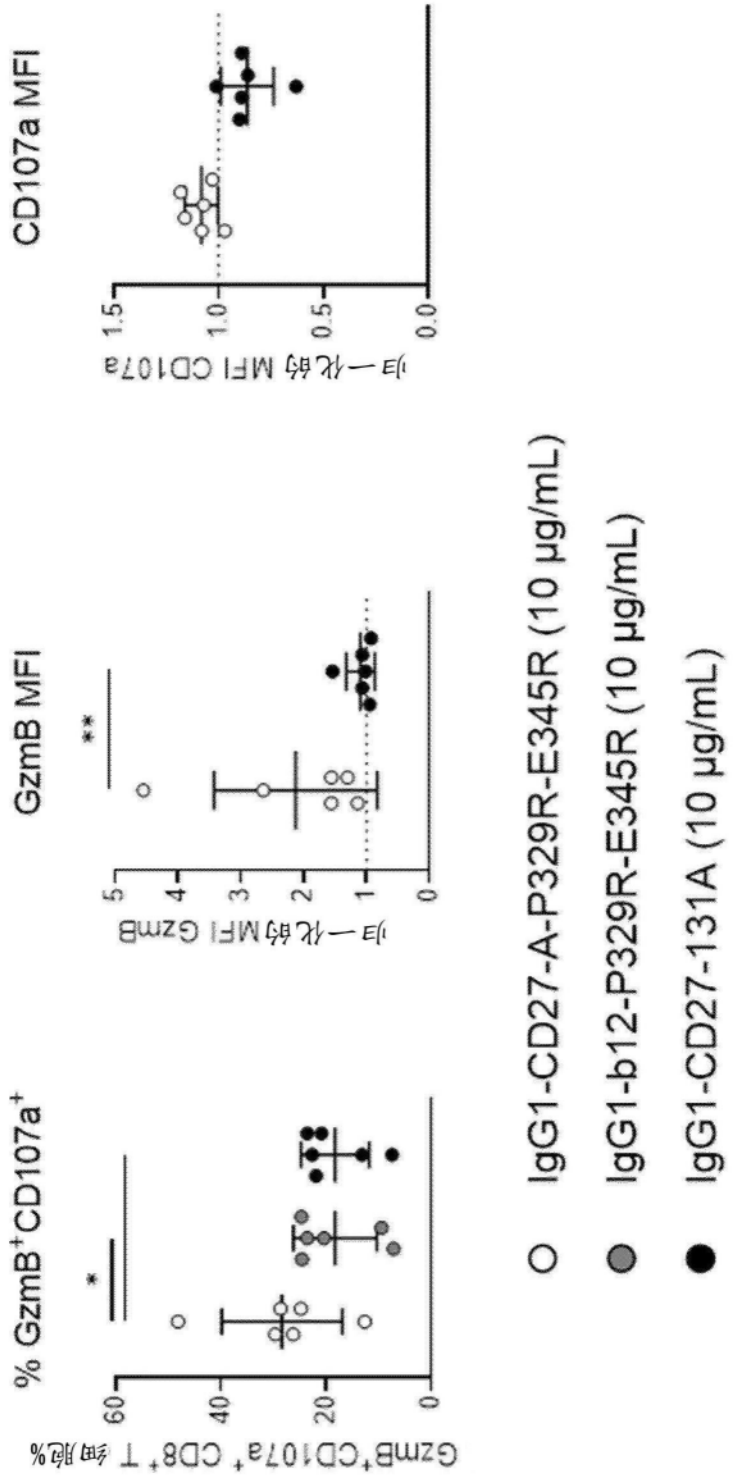

% GzmB+CD107a+
GzmB MFI
CD107a MFI
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 µg/mL)
IgG1-b12-P329R-E345R (10 µg/mL)
IgG1-CD27-131A (10 µg/mL)

图21

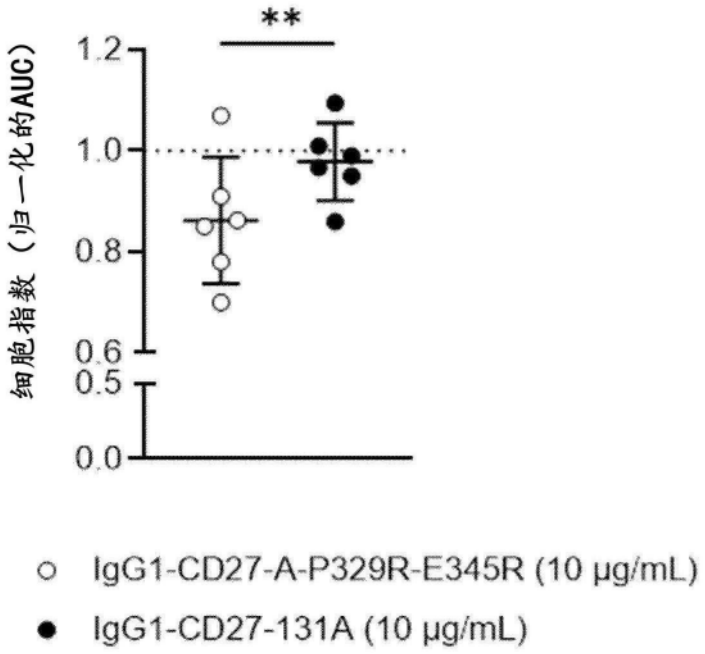

**
细胞指数（归一化的AUC）
1.2
1.0
0.8
0.6
0.5
0.0
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-CD27-131A (10 μg/mL)

图22

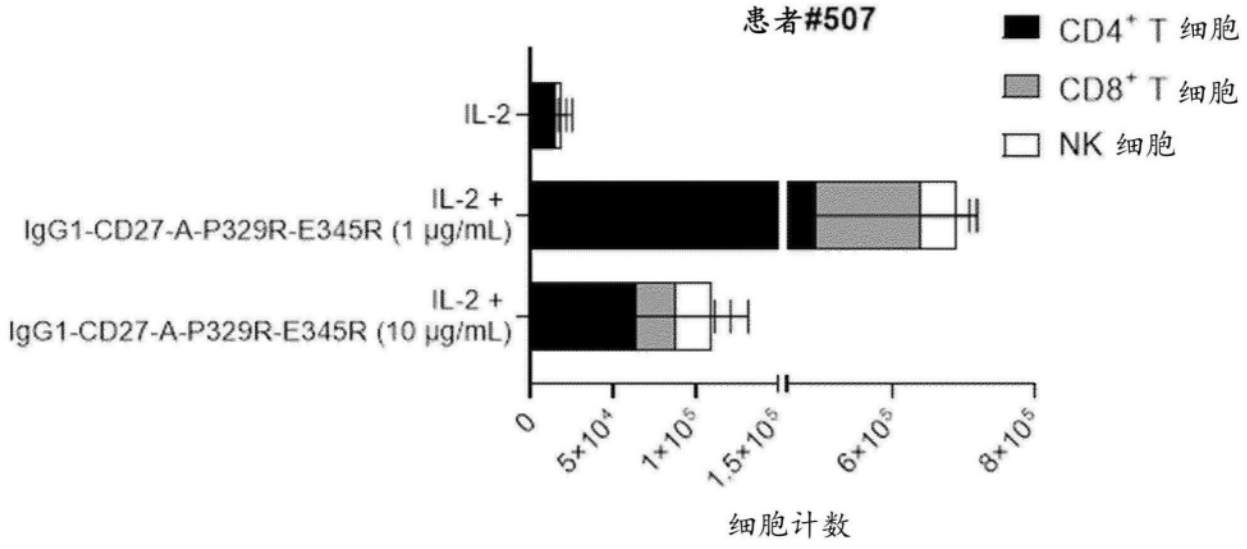

患者#507
CD4+ T 细胞
CD8+ T 细胞
NK 细胞
IL-2
IL-2 +
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (1 μg/mL)
IL-2 +
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
0
5×10⁴
1×10⁵
1.5×10⁵
6×10⁵
8×10⁵
细胞计数

图23

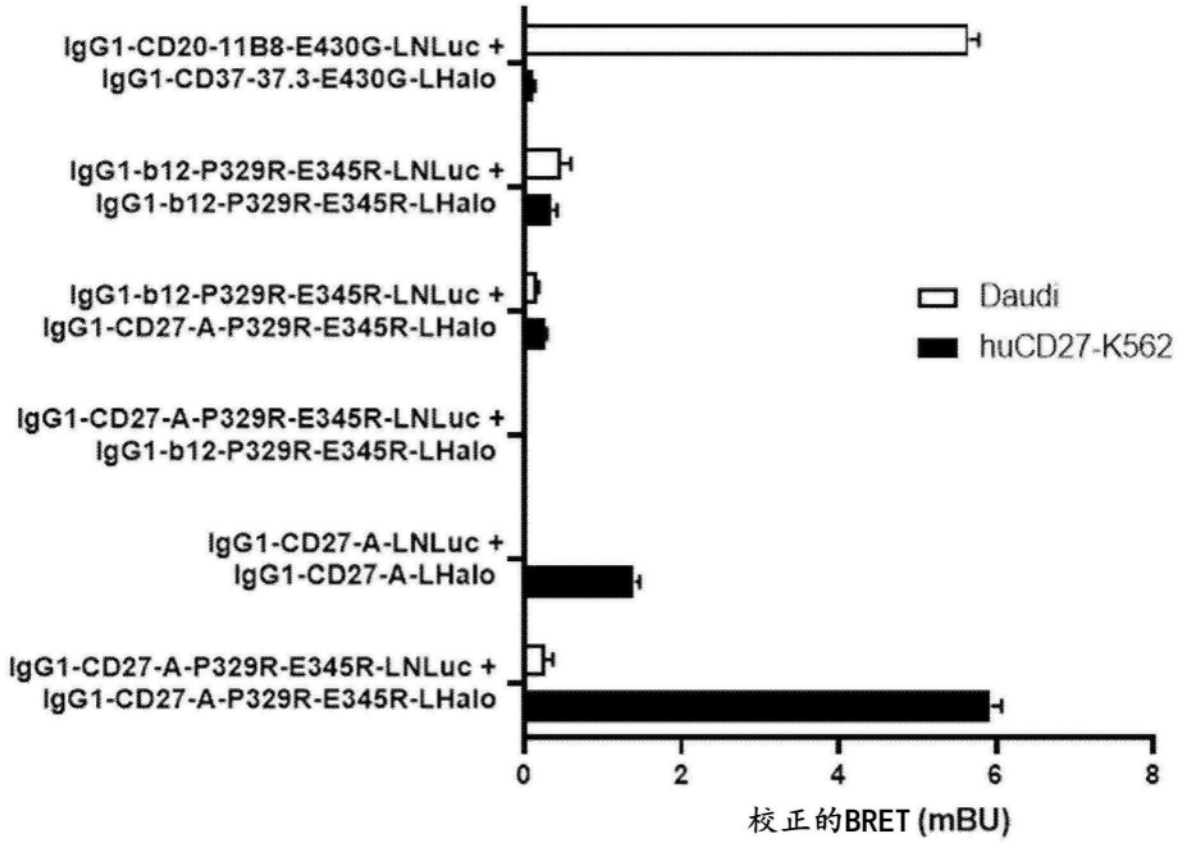

IgG1-CD20-11B8-E430G-LNLuc +
IgG1-CD37-37.3-E430G-LHalo
IgG1-b12-P329R-E345R-LNLuc +
IgG1-b12-P329R-E345R-LHalo
IgG1-b12-P329R-E345R-LNLuc +
IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LHalo
IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LNLuc +
IgG1-b12-P329R-E345R-LHalo
IgG1-CD27-A-LNLuc +
IgG1-CD27-A-LHalo
IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LNLuc +
IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LHalo
Daudi
huCD27-K562
0
2
4
6
8
校正的BRET (mBU)

图24

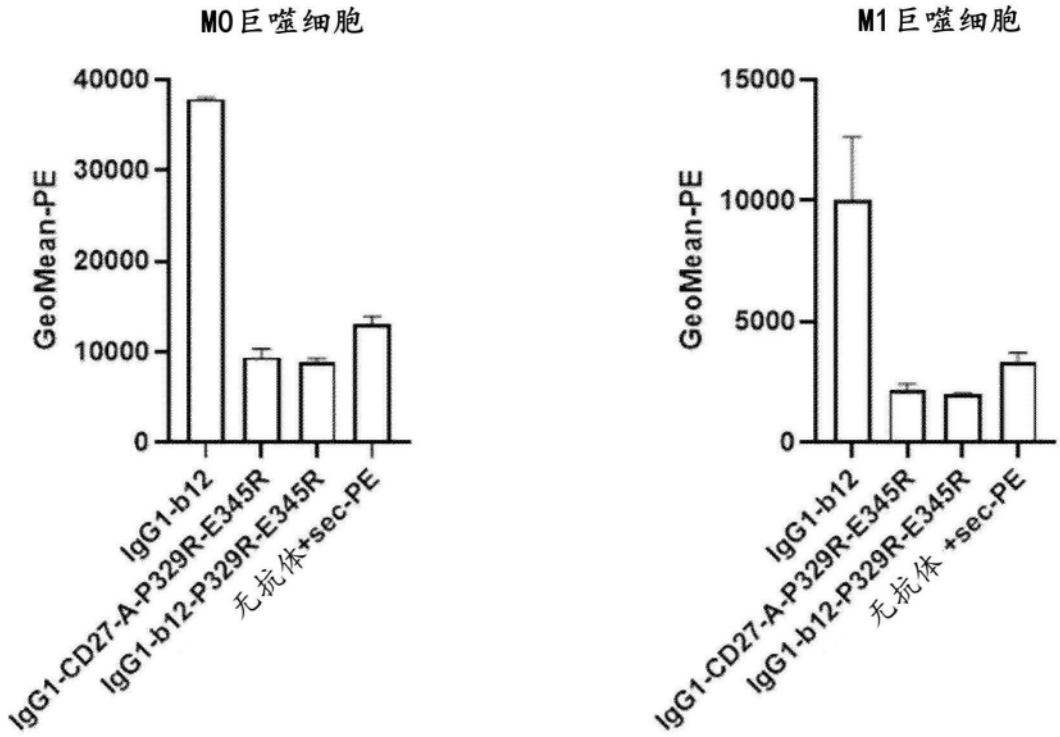

M0巨噬细胞
GeoMean-PE
40000
30000
20000
10000
0
IgG1-b12
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-b12-P329R-E345R
无抗体+sec-PE
M1巨噬细胞
GeoMean-PE
15000
10000
5000
0
IgG1-b12
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-b12-P329R-E345R
无抗体 +sec-PE

图25

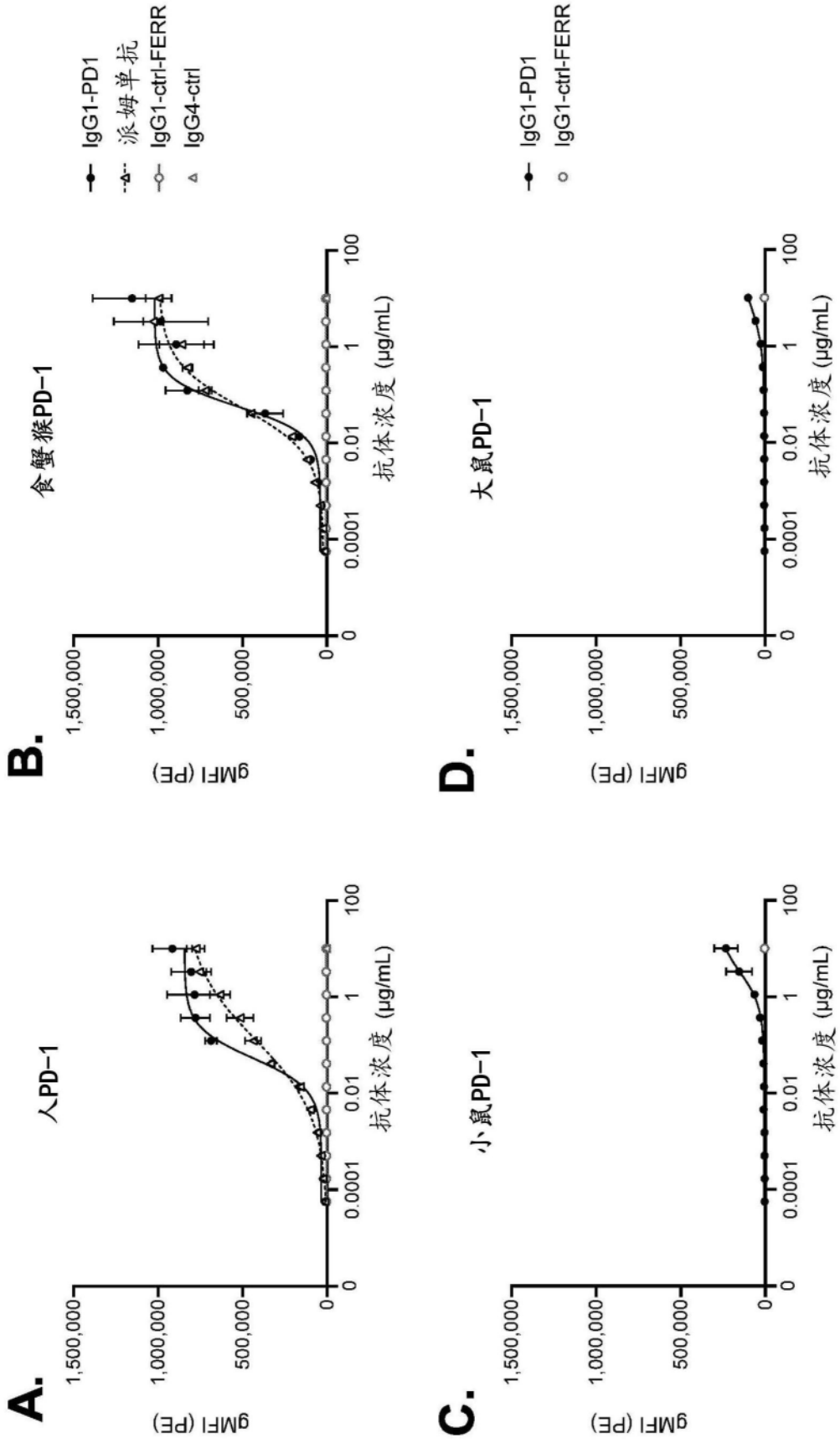

A.
人PD-1
gMFI (PE)
1,500,000
1,000,000
500,000
0
0
0.0001
0.01
1
100
抗体浓度 (μg/mL)
B.
食蟹猴PD-1
IgG1-PD1
派姆单抗
IgG1-ctrl-FERR
IgG4-ctrl
C.
小鼠PD-1
D.
大鼠PD-1
IgG1-PD1
IgG1-ctrl-FERR

图26

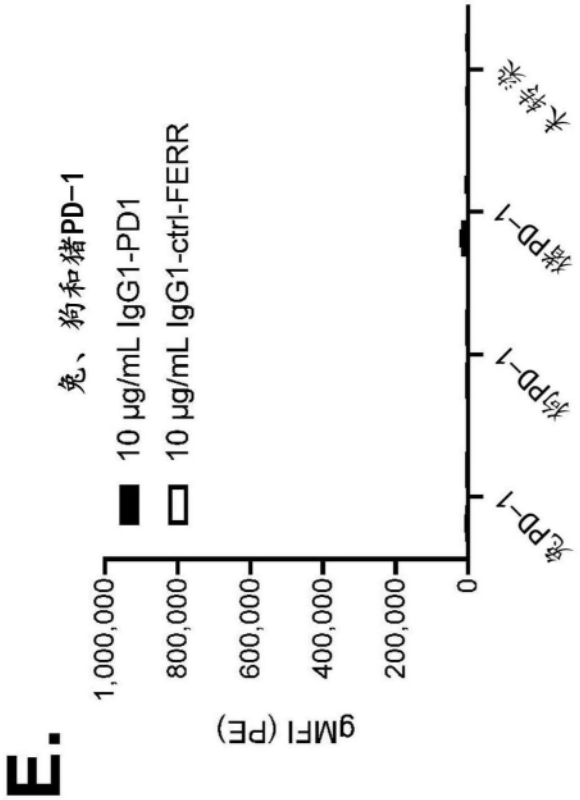

兔、狗和猪PD-1
10 μg/mL IgG1-PD1
10 μg/mL IgG1-ctrl-FERR
gMFI (PE)
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
兔PD-1
狗PD-1
猪PD-1
未染色

图26(续)

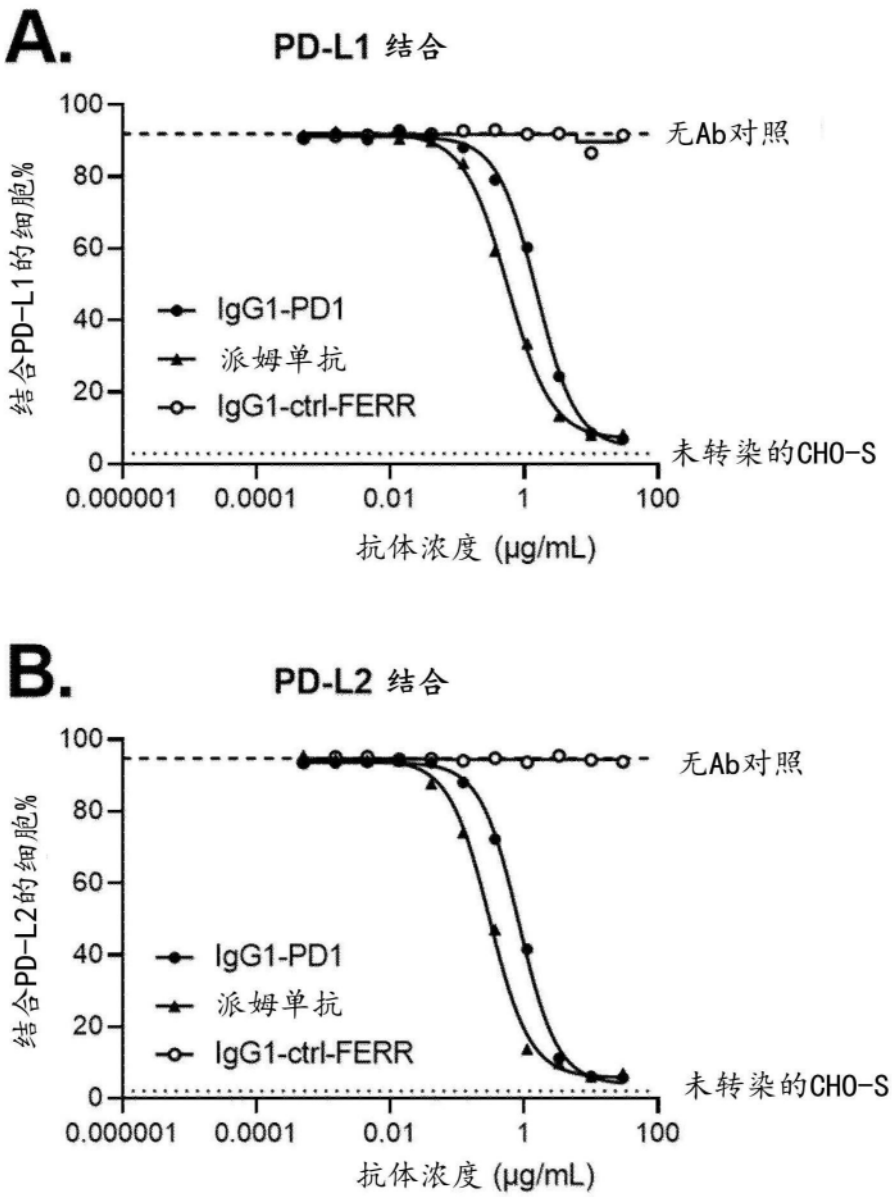

A.
PD-L1 结合
结合PD-L1的细胞%
100
80
60
40
20
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
抗体浓度 (μg/mL)
IgG1-PD1
派姆单抗
IgG1-ctrl-FERR
无Ab对照
未转染的CHO-S
B.
PD-L2 结合
结合PD-L2的细胞%
100
80
60
40
20
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
抗体浓度 (μg/mL)
IgG1-PD1
派姆单抗
IgG1-ctrl-FERR
无Ab对照
未转染的CHO-S

图27

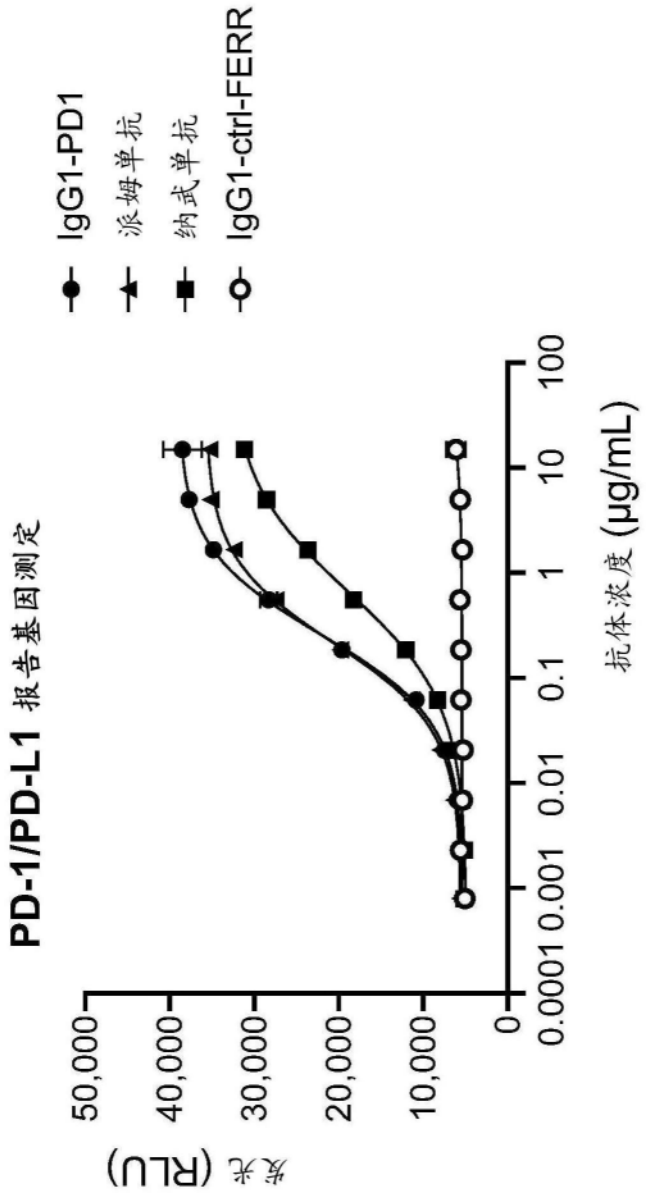

PD-1/PD-L1 报告基因测定
IgG1-PD1
派姆单抗
纳武单抗
IgG1-ctrl-FERR
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
(RLU)
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
抗体浓度 (μg/mL)

图28

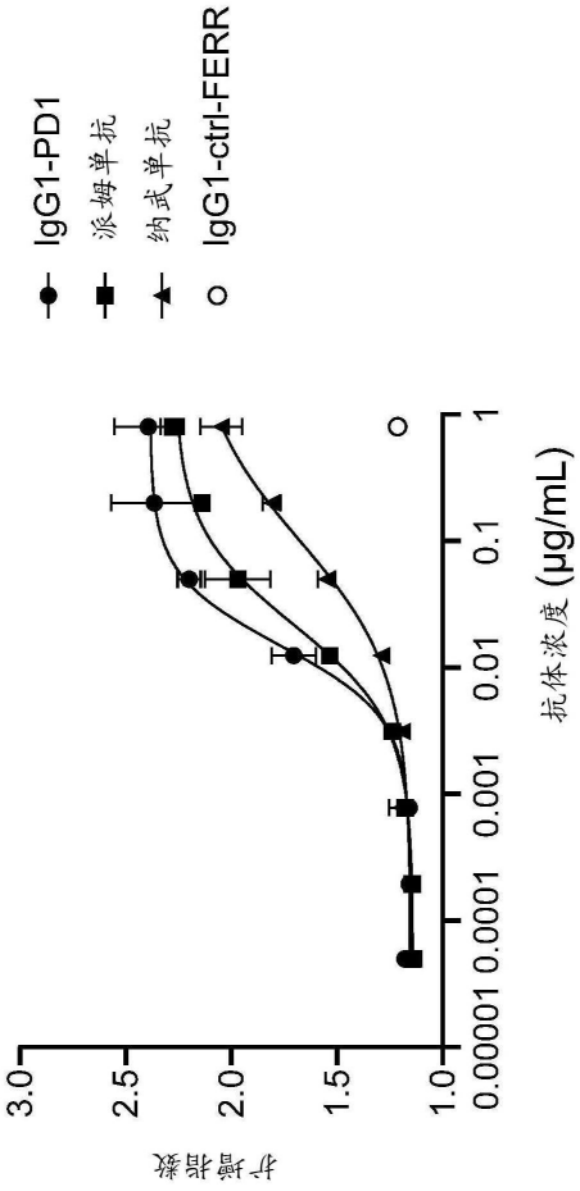

IgG1-PD1
派姆单抗
纳武单抗
IgG1-ctrl-FERR
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
抗体浓度 (μg/mL)

图29

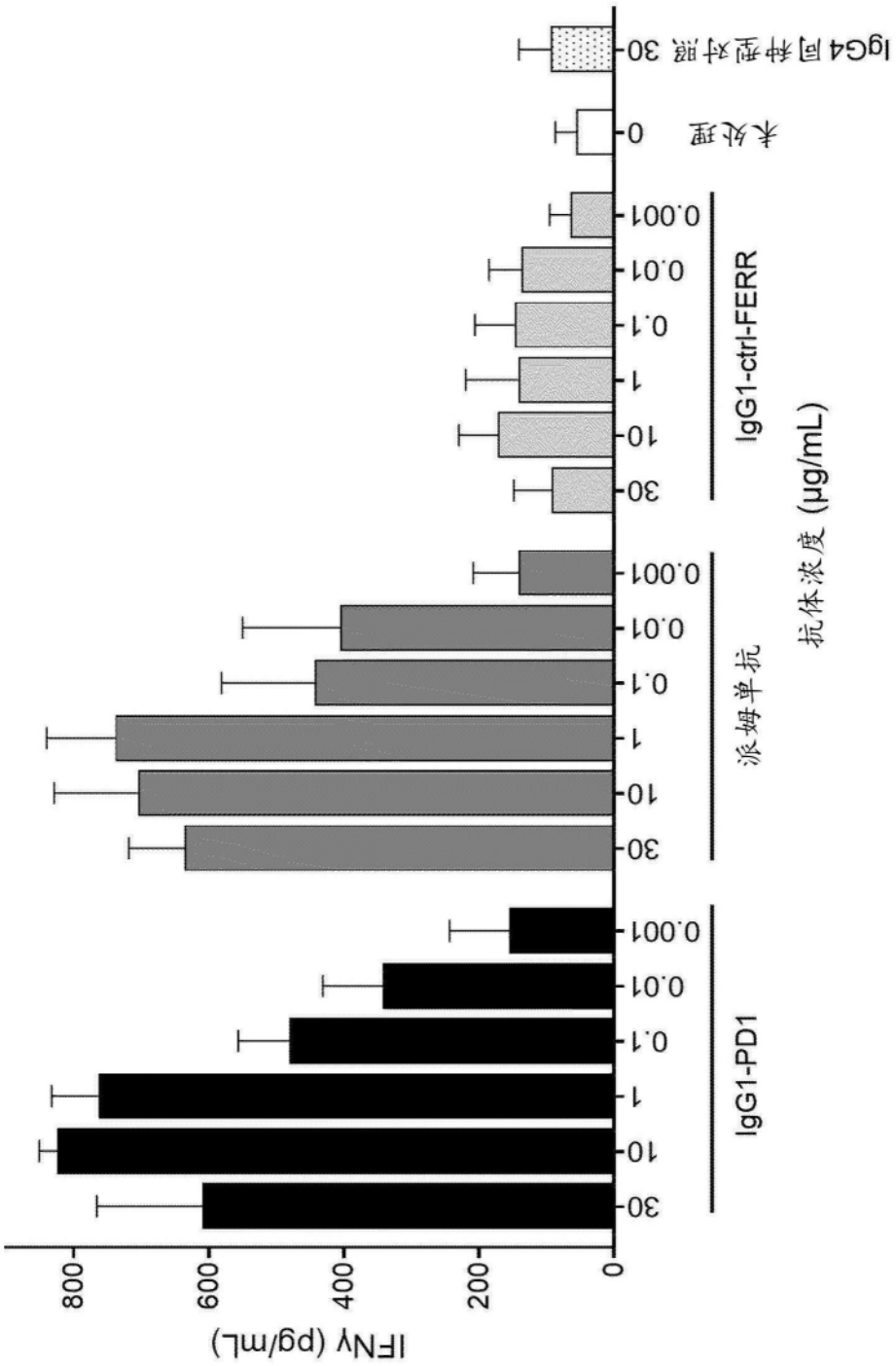

IFNγ (pg/mL)
0
200
400
600
800
IgG1-PD1
派姆单抗
IgG1-ctrl-FERR
未处理
IgG4同种型对照
抗体浓度 (μg/mL)
30
10
1
0.1
0.01
0.001
0

图30

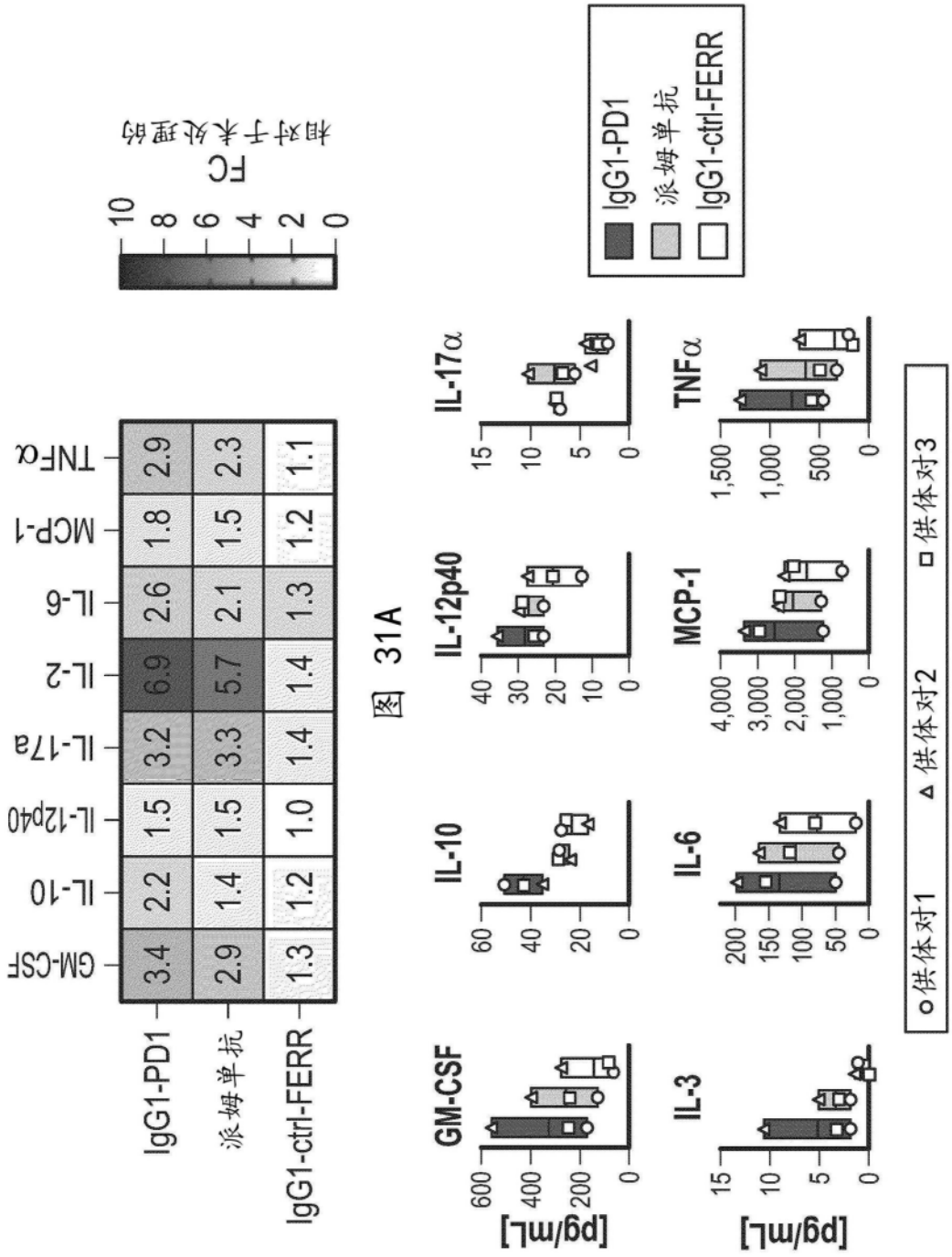

相对于未处理的
FC
10
8
6
4
2
0
IgG1-PD1
派姆单抗
IgG1-ctrl-FERR
GM-CSF
IL-10
IL-12p40
IL-17a
IL-2
IL-6
MCP-1
TNFα
3.4 2.2 1.5 3.2 6.9 2.6 1.8 2.9
2.9 1.4 1.5 3.3 5.7 2.1 1.5 2.3
1.3 1.2 1.0 1.4 1.4 1.3 1.2 1.1

图 31A

IgG1-PD1
派姆单抗
IgG1-ctrl-FERR
GM-CSF
IL-10
IL-12p40
IL-17α
IL-3
IL-6
MCP-1
TNFα
[pg/mL]
供体对1
供体对2
供体对3

图 31B

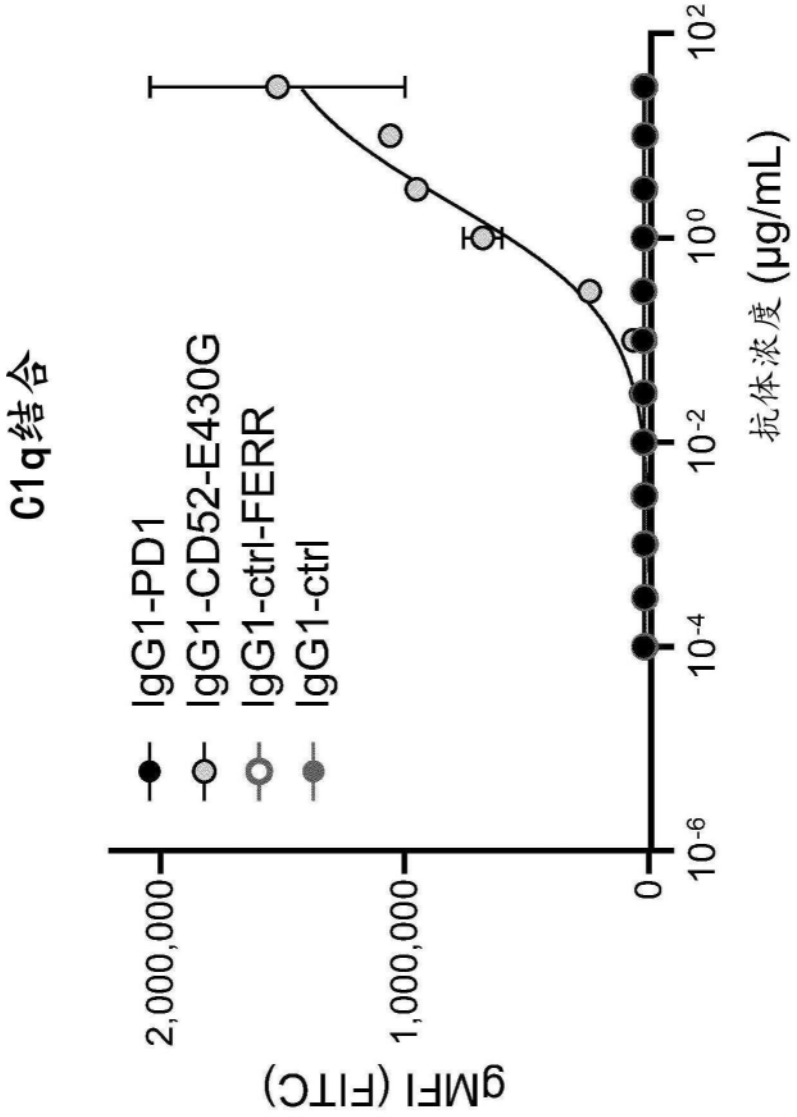

C1q结合
IgG1-PD1
IgG1-CD52-E430G
IgG1-ctrl-FERR
IgG1-ctrl
gMFI (FITC)
2,000,000
1,000,000
0
10-6
10-4
10-2
100
102
抗体浓度 (μg/mL)

图32

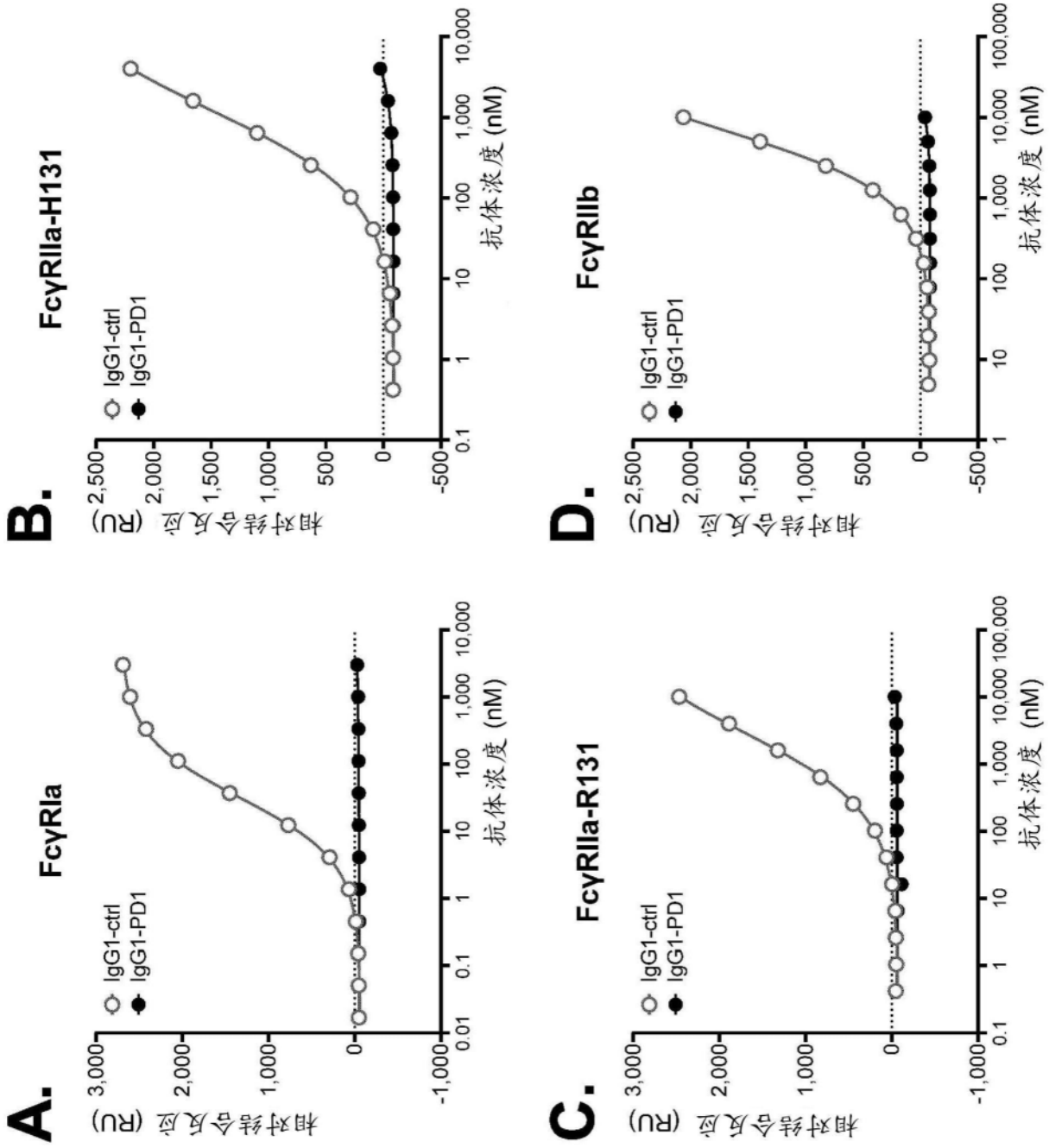

A.
FcγRIa
IgG1-ctrl
IgG1-PD1
相对结合反应 (RU)
抗体浓度 (nM)
B.
FcγRIIa-H131
C.
FcγRIIa-R131
D.
FcγRIIb

图33

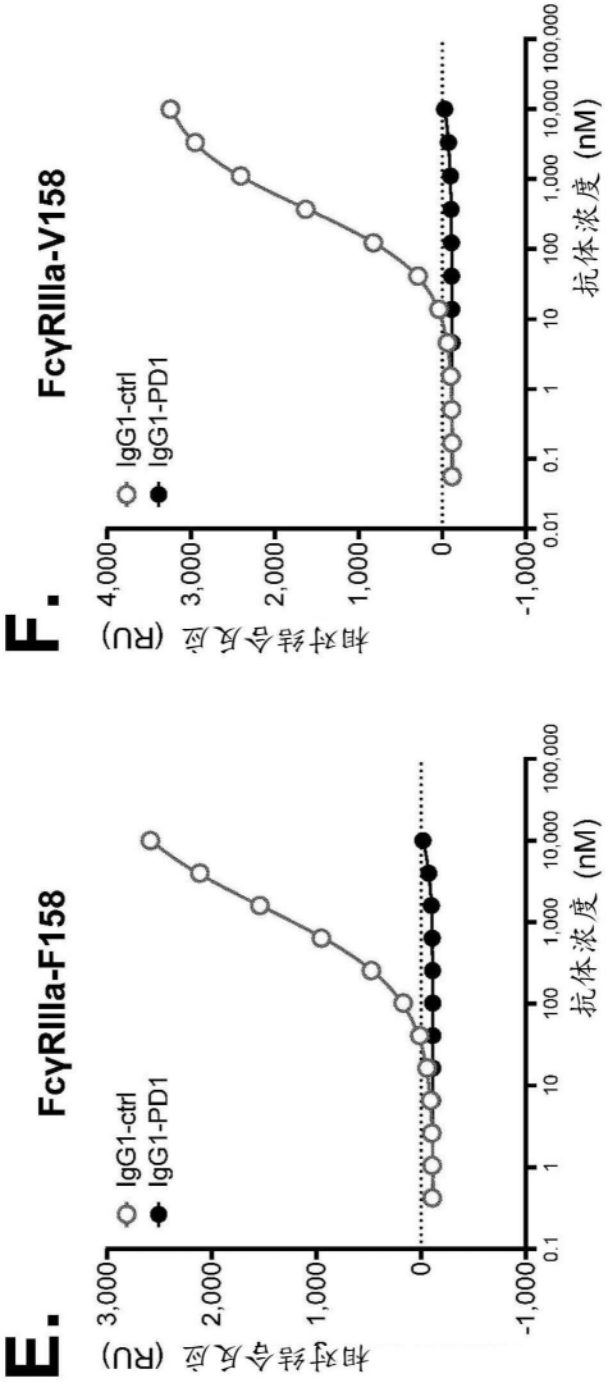

F.
FcγRIIIa-V158
IgG1-ctrl
IgG1-PD1
相对结合反应 (RU)
4,000
3,000
2,000
1,000
0
-1,000
0.01
0.1
1
10
100
1,000
10,000
100,000
抗体浓度 (nM)
E.
FcγRIIIa-F158
IgG1-ctrl
IgG1-PD1
相对结合反应 (RU)
3,000
2,000
1,000
0
-1,000
0.1
1
10
100
1,000
10,000
100,000
抗体浓度 (nM)

图33(续)

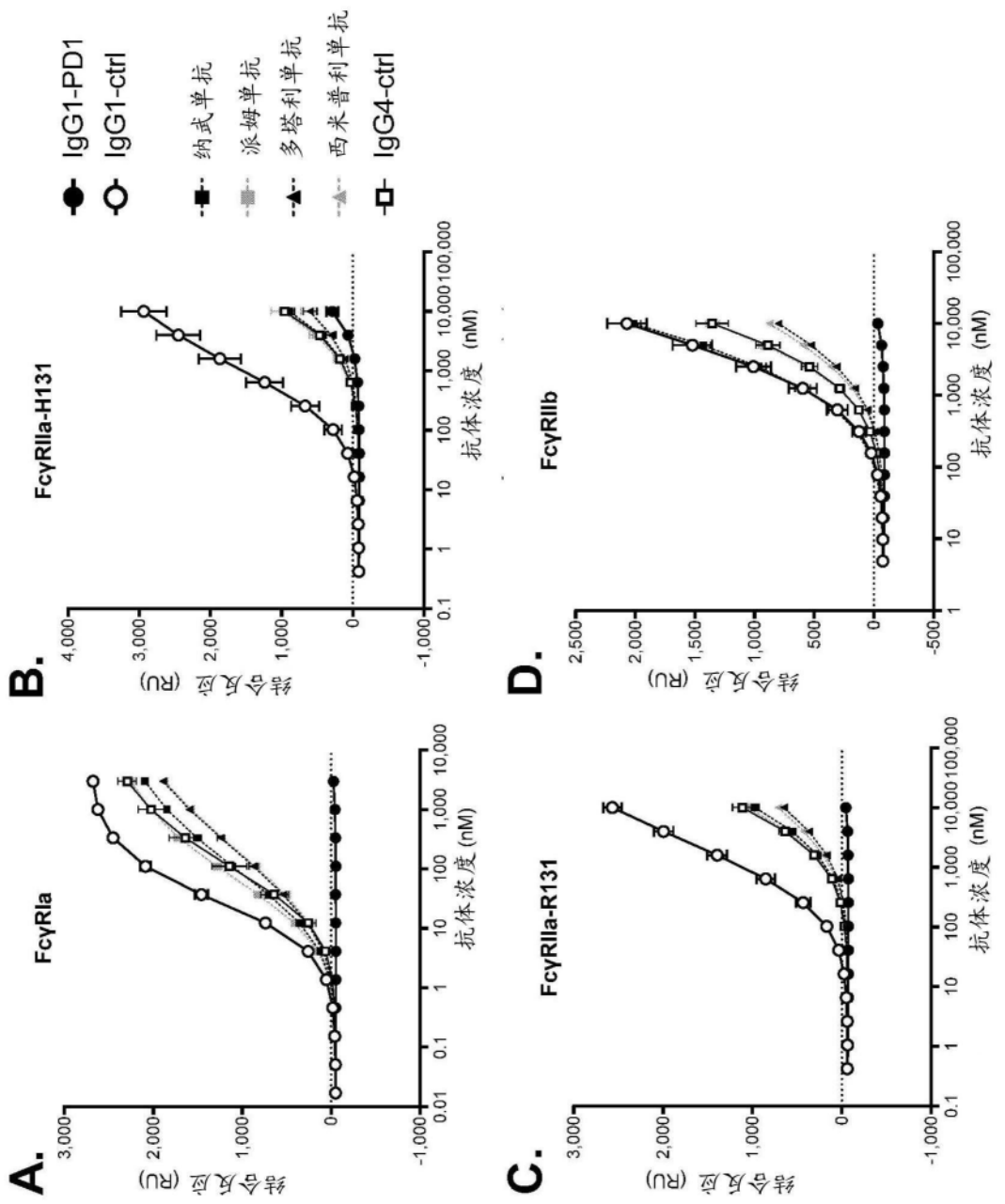

A.
FcγRIa
结合反应 (RU)
抗体浓度 (nM)
B.
FcγRIIa-H131
IgG1-PD1
IgG1-ctrl
纳武单抗
派姆单抗
多塔利单抗
西米普利单抗
IgG4-ctrl
C.
FcγRIIa-R131
D.
FcγRIIb

图34

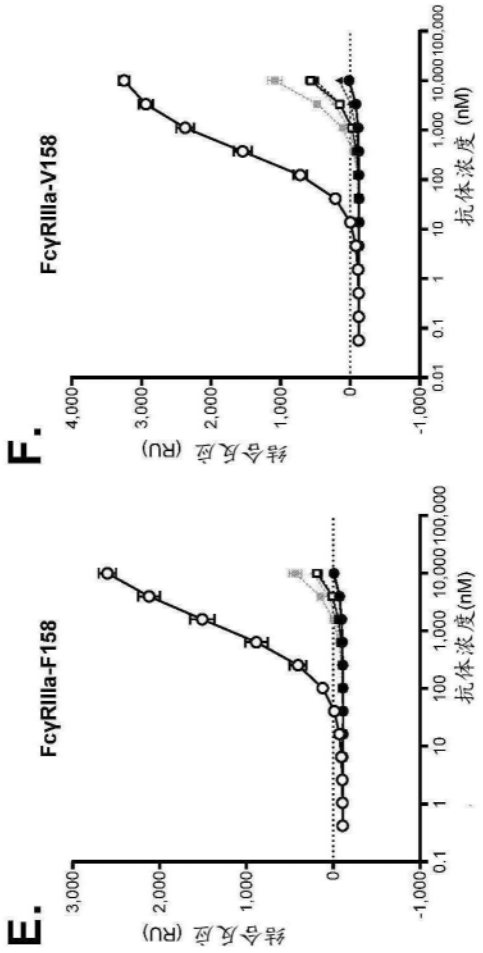

F.
FcγRIIIa-V158
结合反应 (RU)
4,000
3,000
2,000
1,000
0
-1,000
0.01
0.1
1
10
100
1,000
10,000
100,000
抗体浓度 (nM)
E.
FcγRIIIa-F158
结合反应 (RU)
3,000
2,000
1,000
0
-1,000
0.1
1
10
100
1,000
10,000
100,000
抗体浓度(nM)

图34(续)

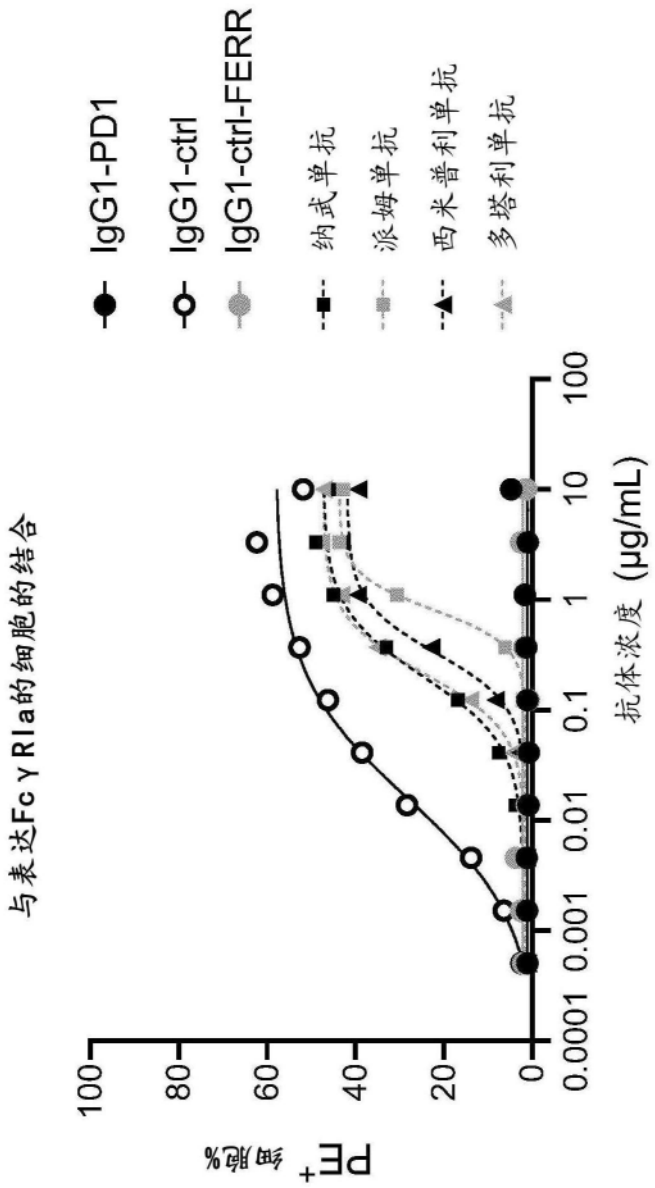

IgG1-PD1
IgG1-ctrl
IgG1-ctrl-FERR
纳武单抗
派姆单抗
西米普利单抗
多塔利单抗
PE+ 细胞%
100
80
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度 (μg/mL)
与表达FcγRIIa的细胞的结合

图35

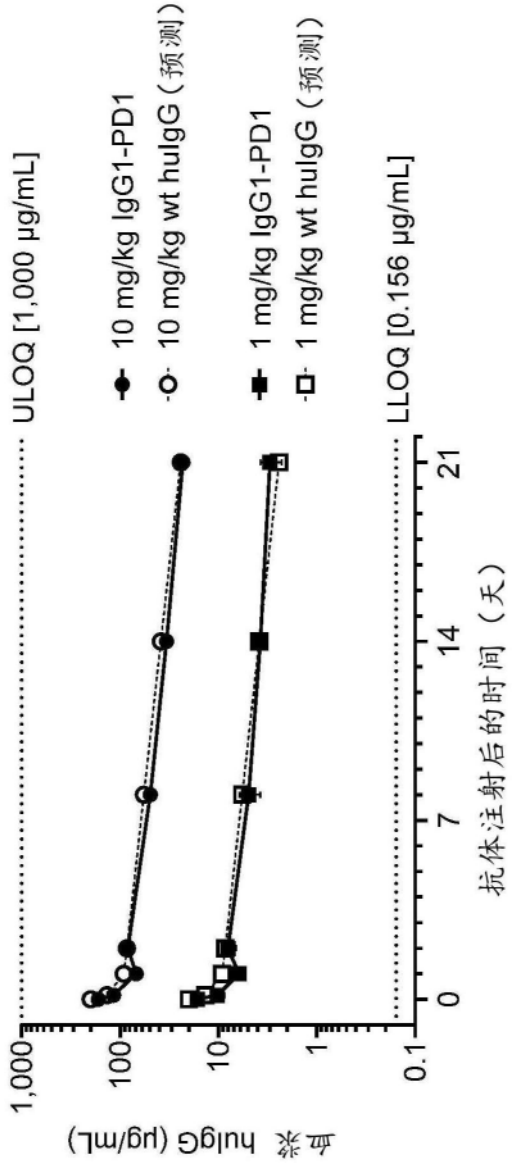

ULOQ [1,000 µg/mL]
10 mg/kg IgG1-PD1
10 mg/kg wt huIgG（预测）
1 mg/kg IgG1-PD1
1 mg/kg wt huIgG（预测）
LLOQ [0.156 µg/mL]
1,000
100
10
1
0.1
血浆 huIgG (µg/mL)
0
7
14
21
抗体注射后的时间（天）

图36

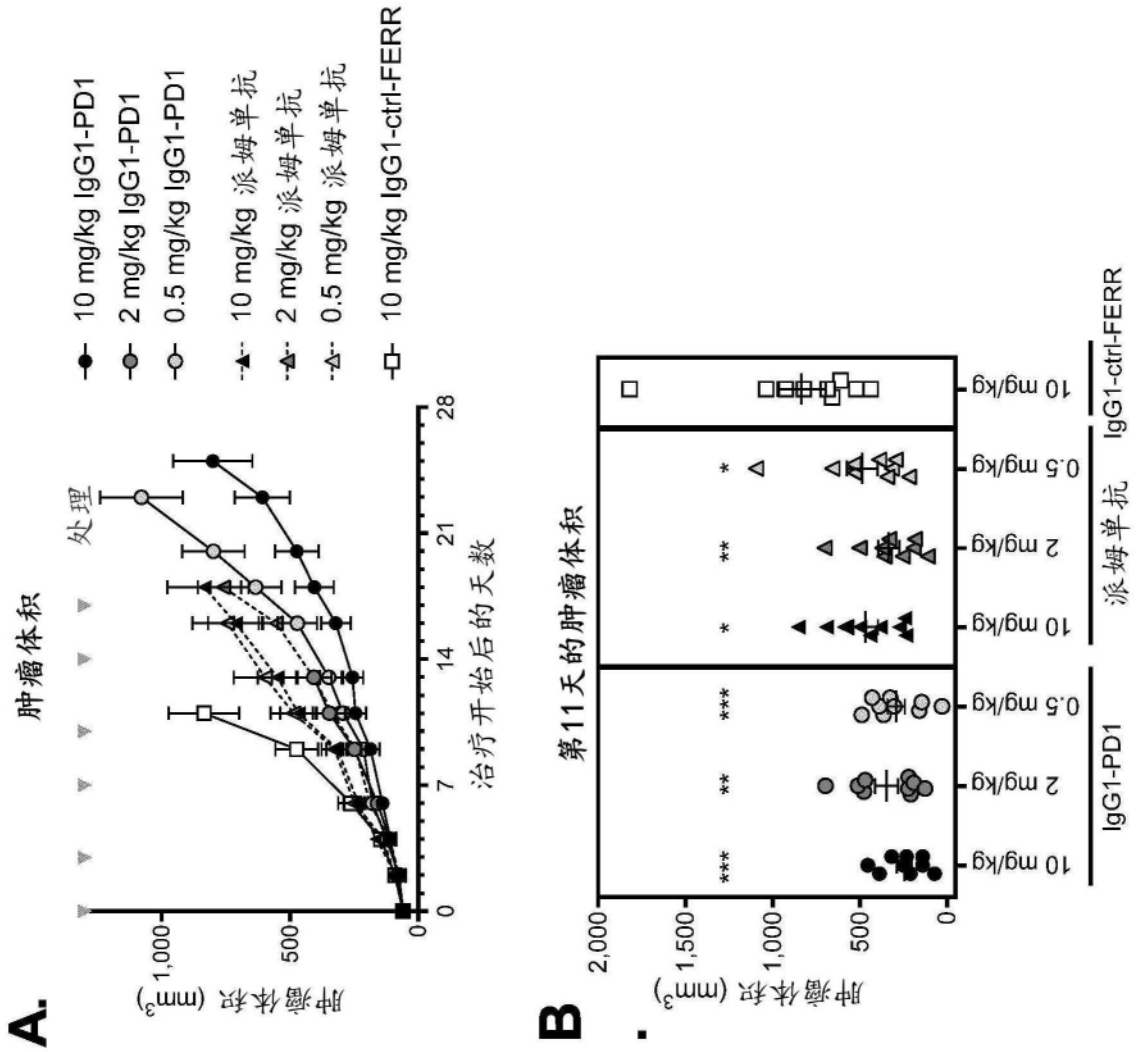

A.
肿瘤体积
处理
10 mg/kg IgG1-PD1
2 mg/kg IgG1-PD1
0.5 mg/kg IgG1-PD1
10 mg/kg 派姆单抗
2 mg/kg 派姆单抗
0.5 mg/kg 派姆单抗
10 mg/kg IgG1-ctrl-FERR
肿瘤体积 (mm3)
治疗开始后的天数
B.
第11天的肿瘤体积
肿瘤体积 (mm3)
IgG1-PD1
派姆单抗
IgG1-ctrl-FERR

图37

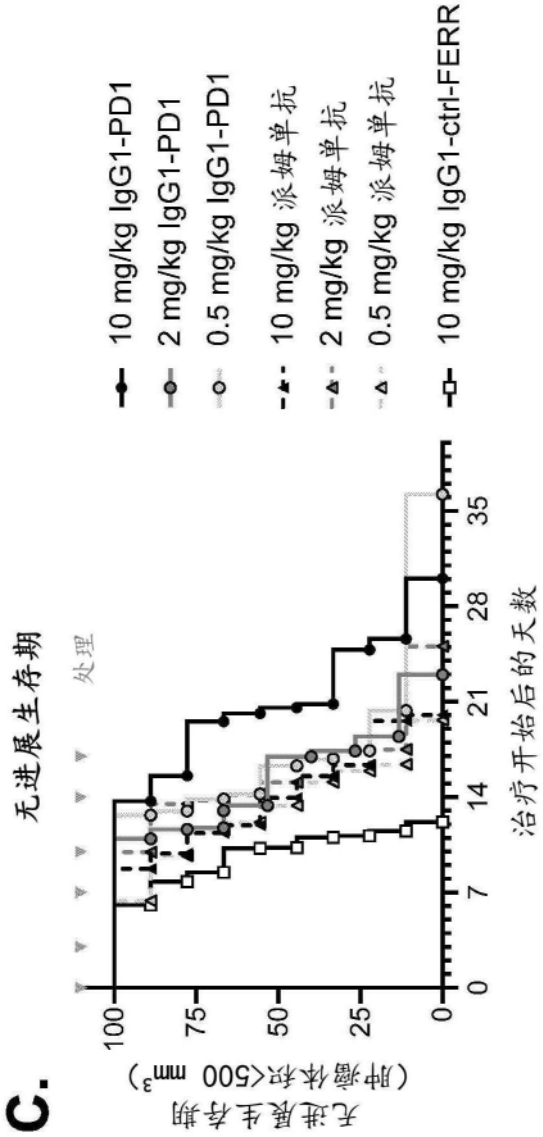

C.
无进展生存期
处理
10 mg/kg IgG1-PD1
2 mg/kg IgG1-PD1
0.5 mg/kg IgG1-PD1
10 mg/kg 派姆单抗
2 mg/kg 派姆单抗
0.5 mg/kg 派姆单抗
10 mg/kg IgG1-ctrl-FERR
无进展生存期
(肿瘤体积<500 mm³)
100
75
50
25
0
0
7
14
21
28
35
治疗开始后的天数

图37(续)

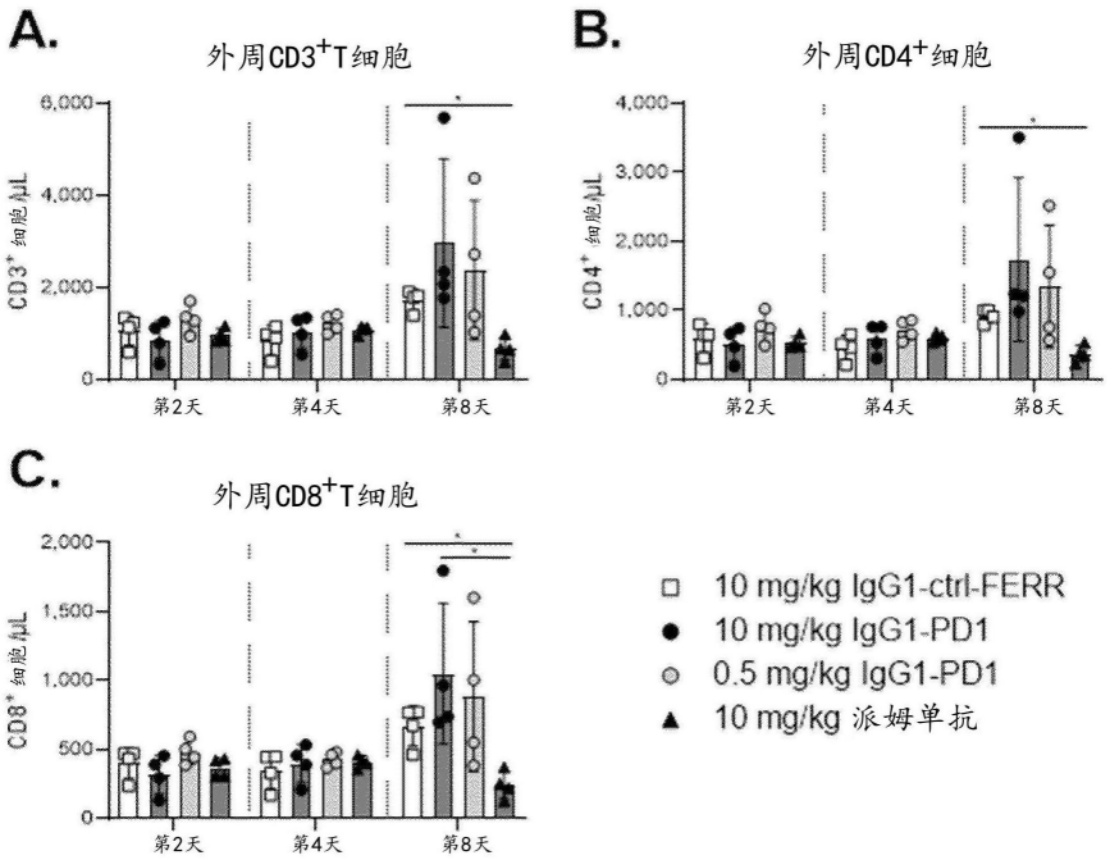

A.
外周CD3+T细胞
CD3+细胞/μL
6,000
4,000
2,000
0
第2天
第4天
第8天
B.
外周CD4+细胞
CD4+细胞/μL
4,000
3,000
2,000
1,000
0
第2天
第4天
第8天
C.
外周CD8+T细胞
CD8+细胞/μL
2,000
1,500
1,000
500
0
第2天
第4天
第8天
10 mg/kg IgG1-ctrl-FERR
10 mg/kg IgG1-PD1
0.5 mg/kg IgG1-PD1
10 mg/kg 派姆单抗

图38

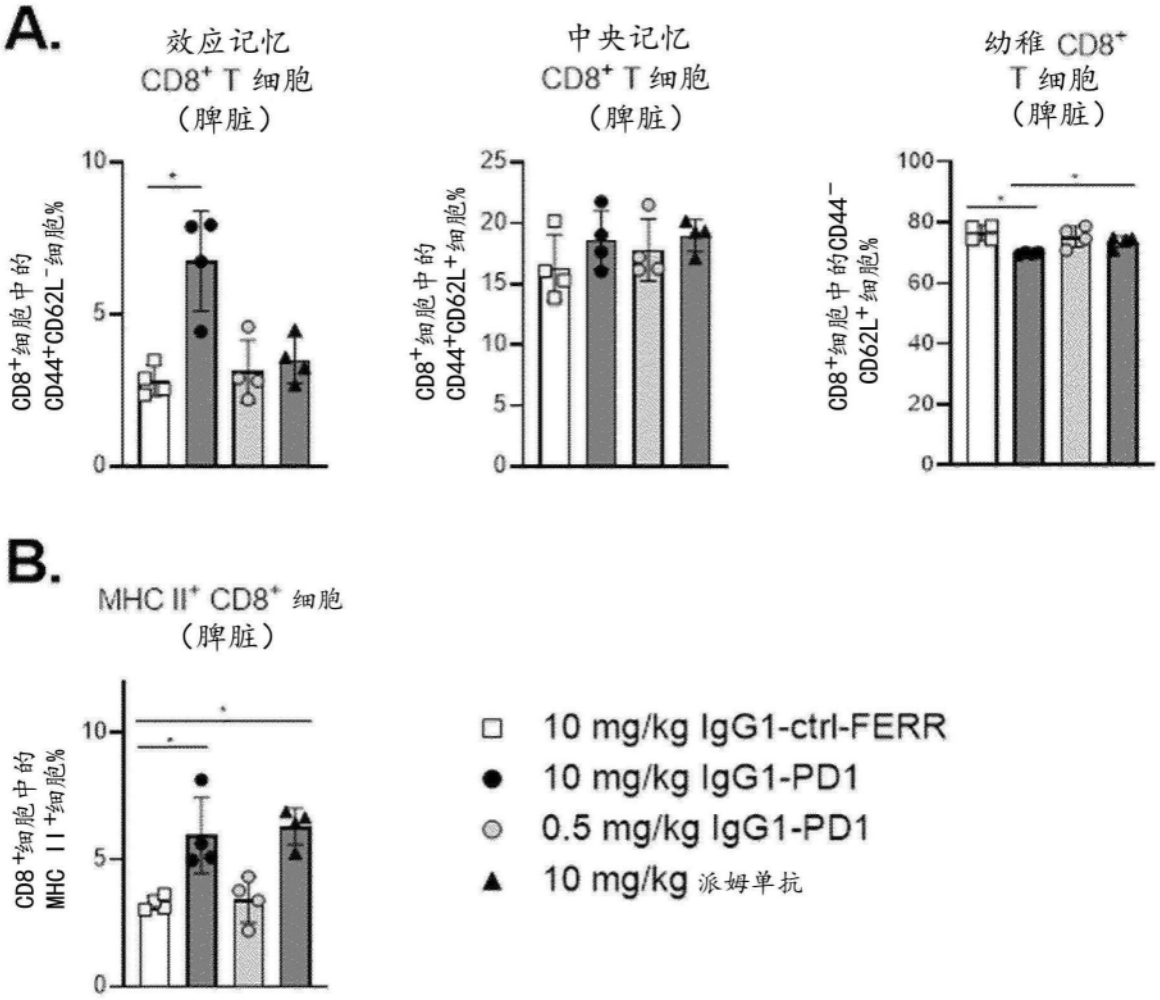

A.
效应记忆
CD8+ T 细胞
（脾脏）
CD8+细胞中的
CD44+CD62L-细胞%
中央记忆
CD8+ T 细胞
（脾脏）
CD8+细胞中的
CD44+CD62L+细胞%
幼稚 CD8+
T 细胞
（脾脏）
CD8+细胞中的CD44-
CD62L+细胞%
B.
MHC II+ CD8+ 细胞
（脾脏）
CD8+细胞中的
MHC II+细胞%
10 mg/kg IgG1-ctrl-FERR
10 mg/kg IgG1-PD1
0.5 mg/kg IgG1-PD1
10 mg/kg 派姆单抗

图39

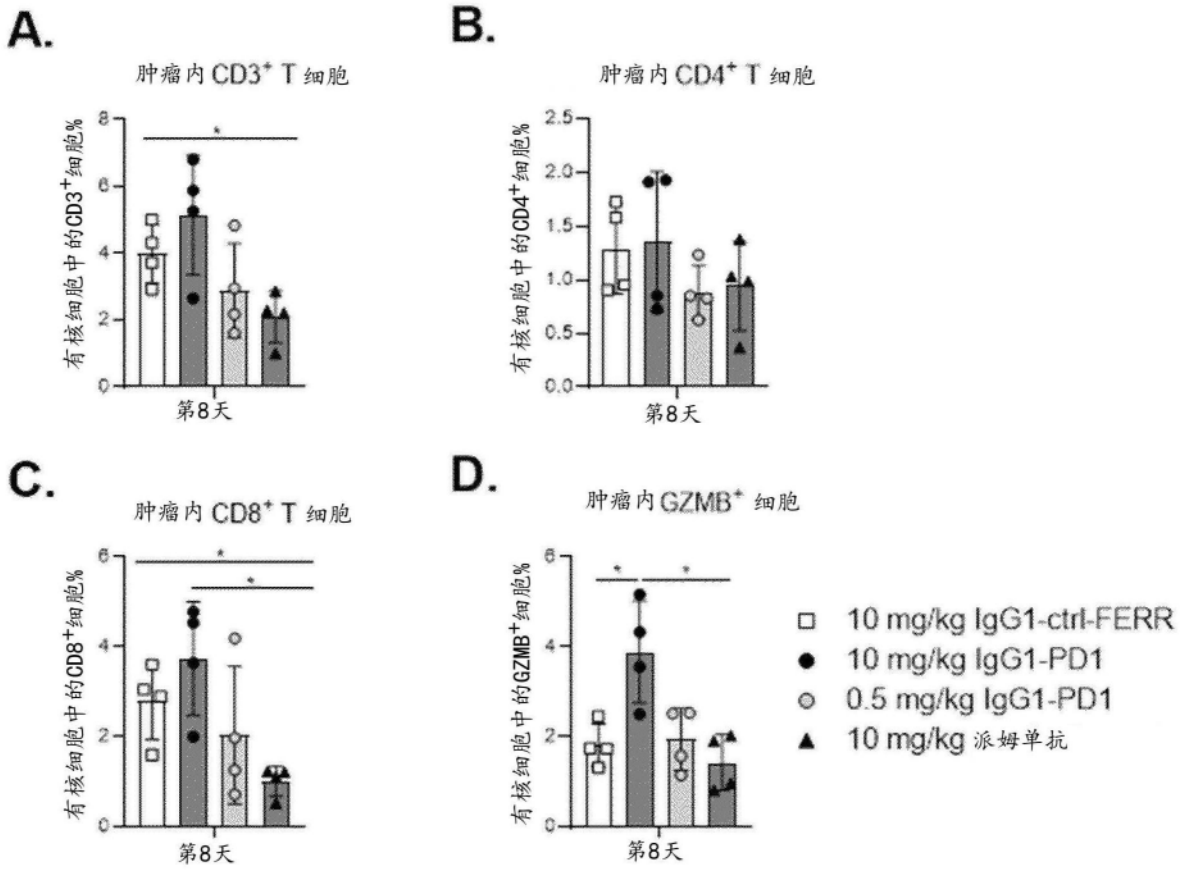

A.
肿瘤内 CD3+ T 细胞
有核细胞中的CD3+细胞%
第8天
B.
肿瘤内 CD4+ T 细胞
有核细胞中的CD4+细胞%
第8天
C.
肿瘤内 CD8+ T 细胞
有核细胞中的CD8+细胞%
第8天
D.
肿瘤内 GZMB+ 细胞
有核细胞中的GZMB+细胞%
第8天
10 mg/kg IgG1-ctrl-FERR
10 mg/kg IgG1-PD1
0.5 mg/kg IgG1-PD1
10 mg/kg 派姆单抗

图40

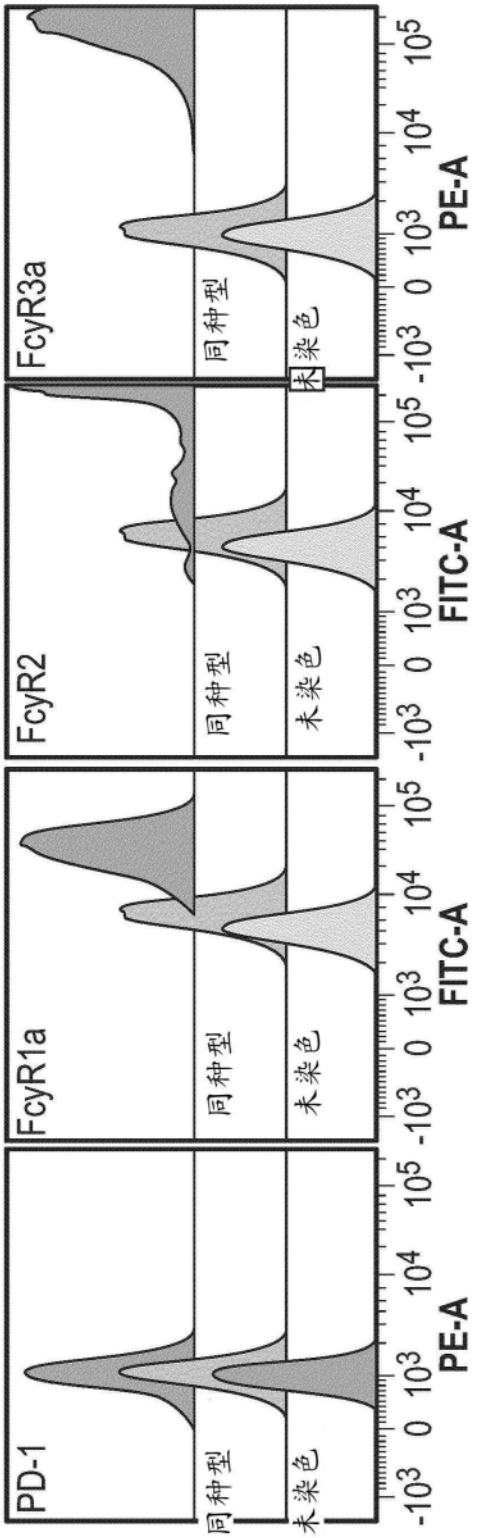

PD-1
FcyR1a
FcyR2
FcyR3a
同种型
未染色
PE-A
FITC-A
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
-10^3 0 10^3 10^4 10^5

图 41A

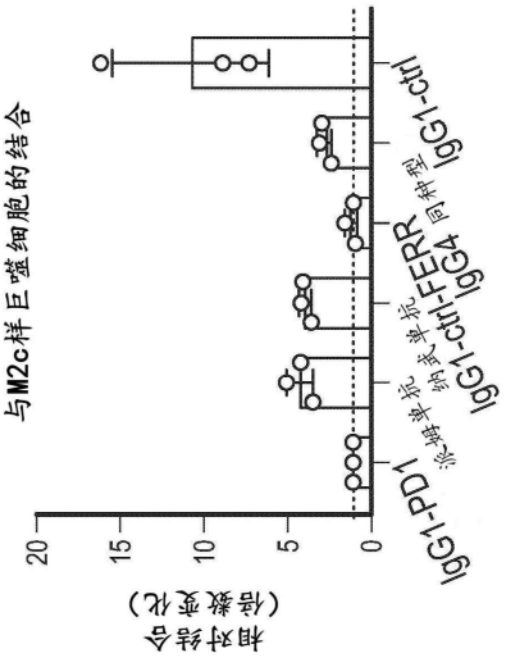

与M2c样巨噬细胞的结合
相对结合
(倍数变化)
20
15
10
5
0
IgG1-PD1
IgG1-ctrl-FERR
IgG4
IgG1-ctrl
单抗
单抗
同种型
同种型

图 41B

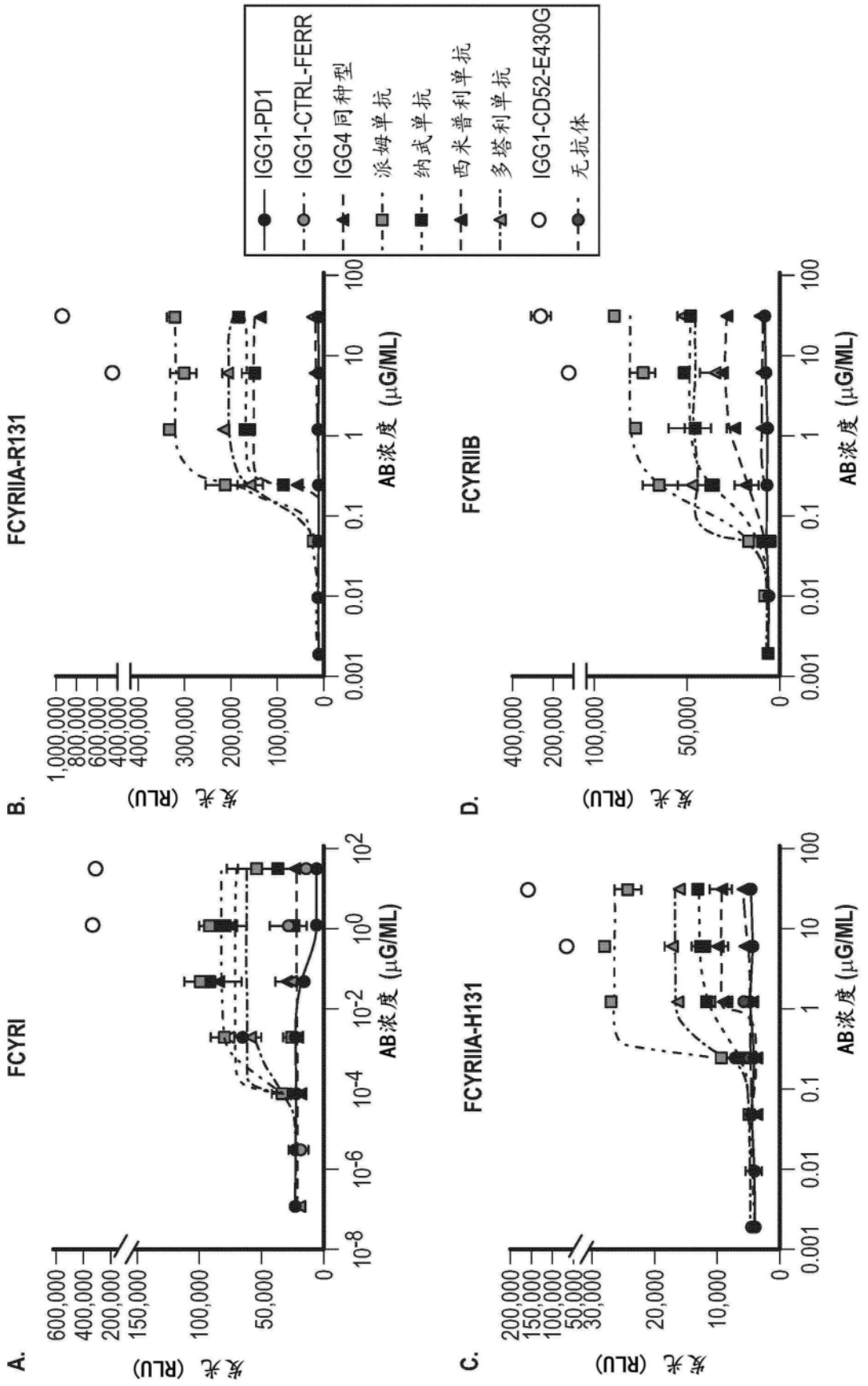

A.
FCYRI
B.
FCYRIIA-R131
C.
FCYRIIA-H131
D.
FCYRIIB
发光 (RLU)
AB浓度 (μG/ML)
IGG1-PD1
IGG1-CTRL-FERR
IGG4 同种型
派姆单抗
纳武单抗
西米普利单抗
多塔利单抗
IGG1-CD52-E430G
无抗体

图42

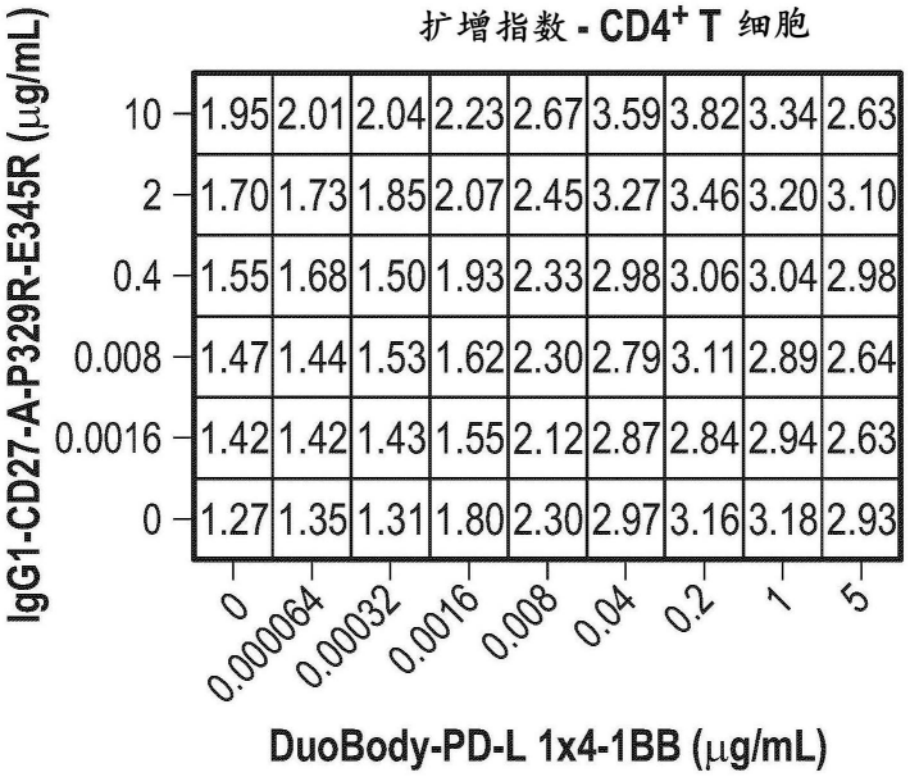

扩增指数 - CD4+ T 细胞
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (μg/mL)
10 1.95 2.01 2.04 2.23 2.67 3.59 3.82 3.34 2.63
2 1.70 1.73 1.85 2.07 2.45 3.27 3.46 3.20 3.10
0.4 1.55 1.68 1.50 1.93 2.33 2.98 3.06 3.04 2.98
0.008 1.47 1.44 1.53 1.62 2.30 2.79 3.11 2.89 2.64
0.0016 1.42 1.42 1.43 1.55 2.12 2.87 2.84 2.94 2.63
0 1.27 1.35 1.31 1.80 2.30 2.97 3.16 3.18 2.93
0 0.000064 0.00032 0.0016 0.008 0.04 0.2 1 5
DuoBody-PD-L 1x4-1BB (μg/mL)

图43A

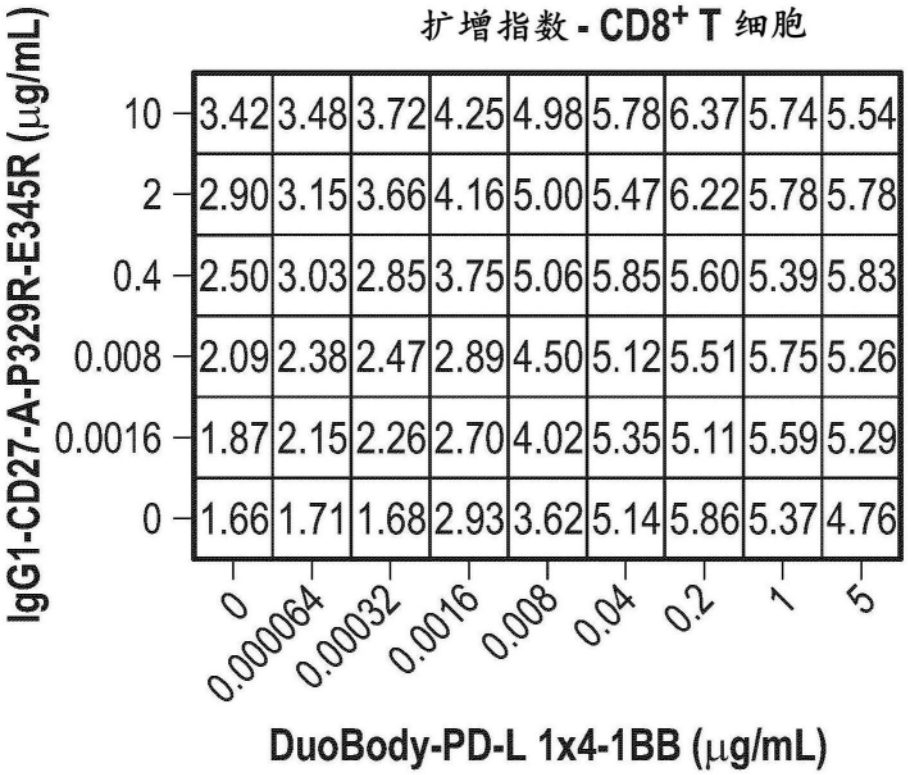

扩增指数 - CD8+ T 细胞
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (μg/mL)
10 3.42 3.48 3.72 4.25 4.98 5.78 6.37 5.74 5.54
2 2.90 3.15 3.66 4.16 5.00 5.47 6.22 5.78 5.78
0.4 2.50 3.03 2.85 3.75 5.06 5.85 5.60 5.39 5.83
0.008 2.09 2.38 2.47 2.89 4.50 5.12 5.51 5.75 5.26
0.0016 1.87 2.15 2.26 2.70 4.02 5.35 5.11 5.59 5.29
0 1.66 1.71 1.68 2.93 3.62 5.14 5.86 5.37 4.76
0 0.000064 0.00032 0.0016 0.008 0.04 0.2 1 5
DuoBody-PD-L 1x4-1BB (μg/mL)

图43B

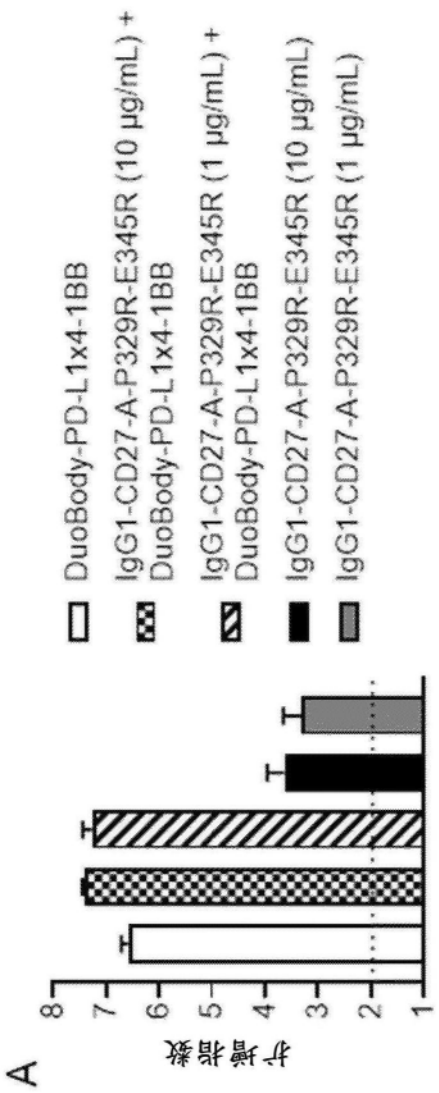

A
扩增指数
8
7
6
5
4
3
2
1
DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 µg/mL) + DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (1 µg/mL) + DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 µg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (1 µg/mL)

图44

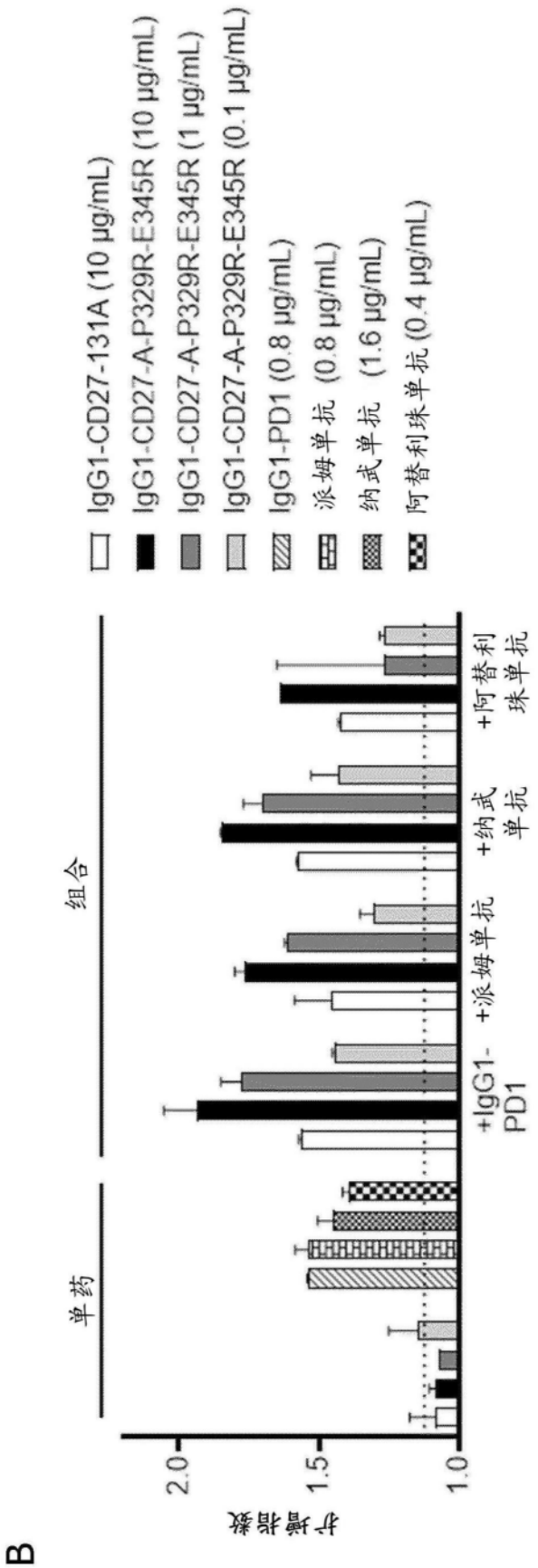

B
扩增指数
2.0
1.5
1.0
单药
组合
+IgG1-PD1
+派姆单抗
+纳武单抗
+阿替利珠单抗
IgG1-CD27-131A (10 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (1 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (0.1 μg/mL)
IgG1-PD1 (0.8 μg/mL)
派姆单抗 (0.8 μg/mL)
纳武单抗 (1.6 μg/mL)
阿替利珠单抗 (0.4 μg/mL)

图44(续)

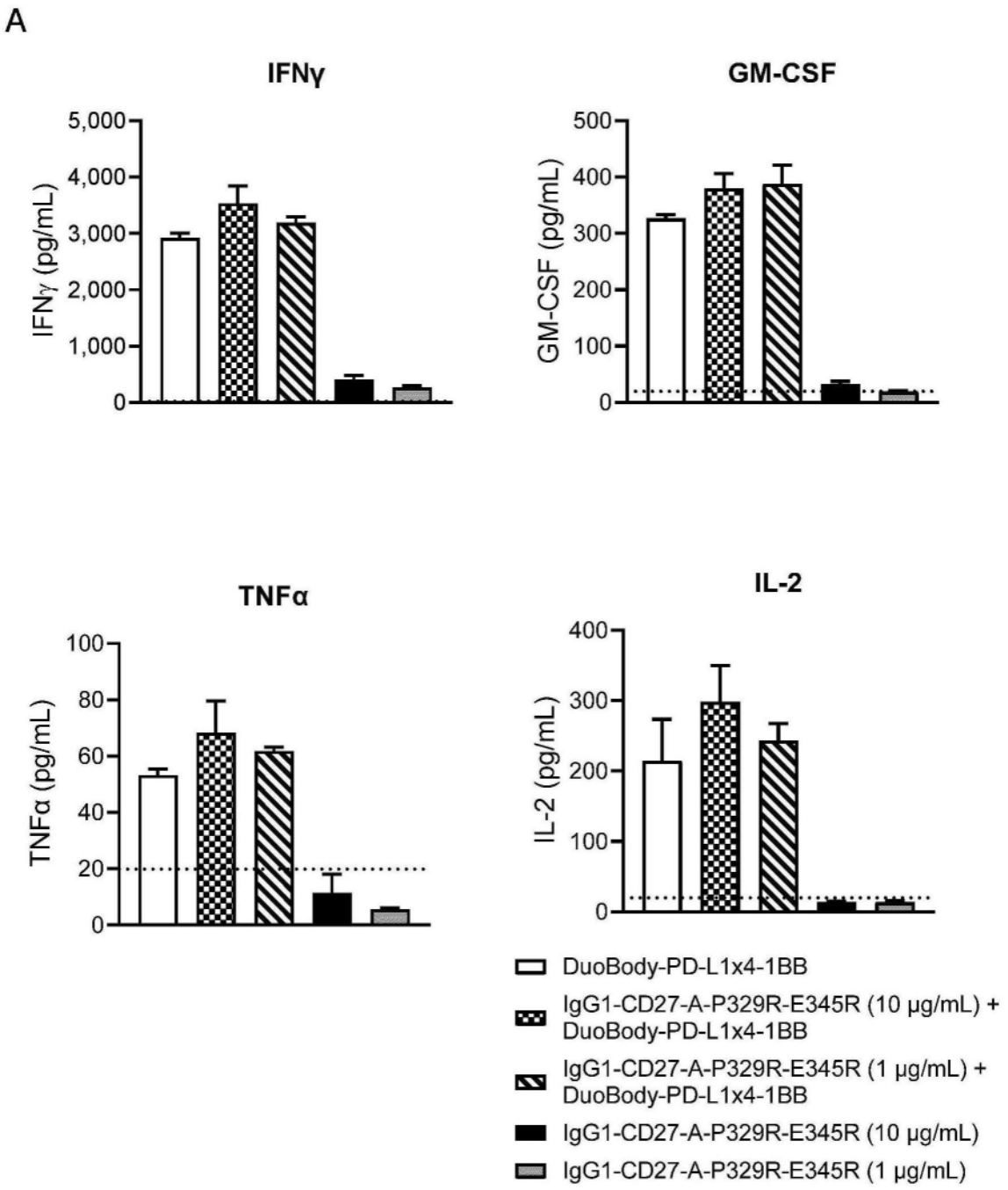

A
IFNγ
IFNγ (pg/mL)
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
GM-CSF
GM-CSF (pg/mL)
500
400
300
200
100
0
TNFα
TNFα (pg/mL)
100
80
60
40
20
0
IL-2
IL-2 (pg/mL)
400
300
200
100
0
DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL) + DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (1 μg/mL) + DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (1 μg/mL)

图45

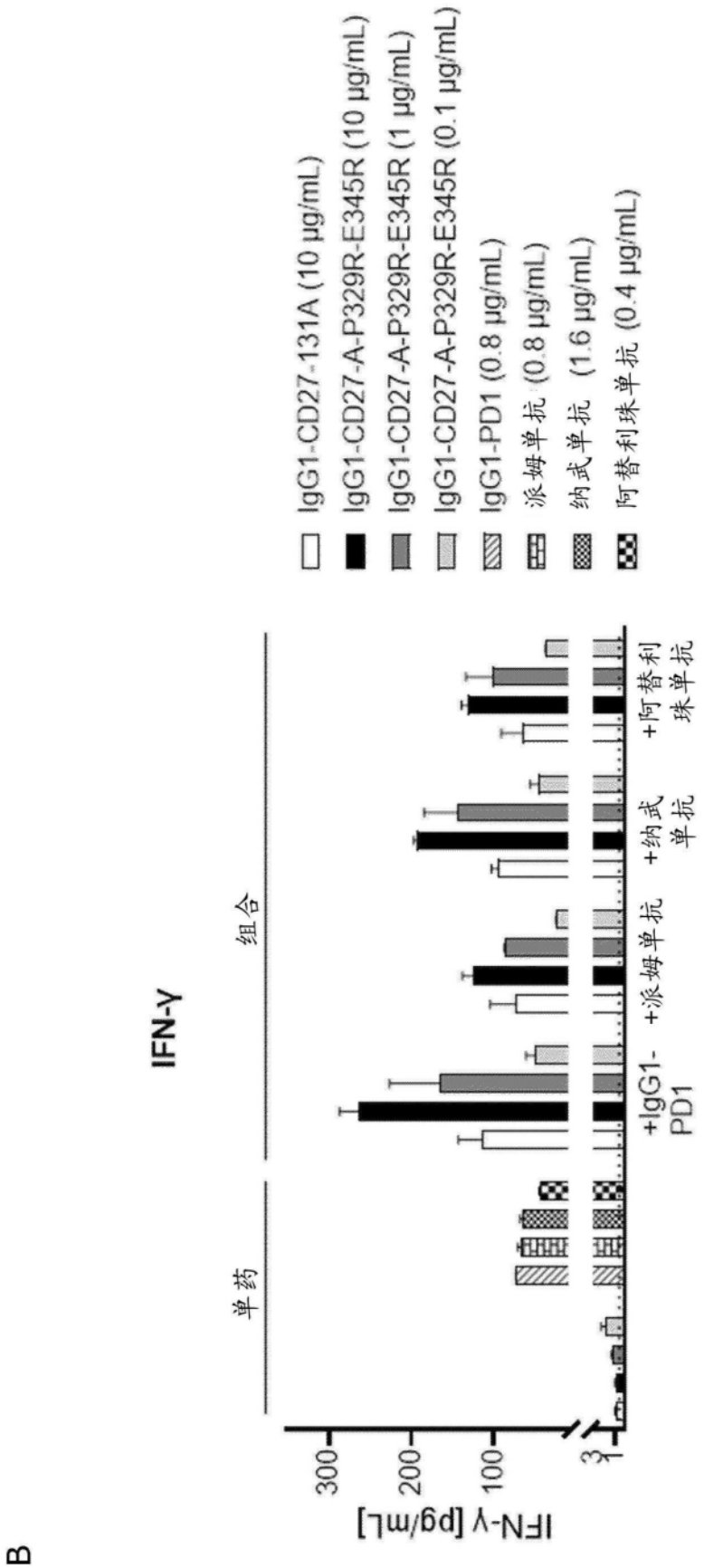

B
IFN-γ
IFN-γ [pg/mL]
300
200
100
3
1
单药
组合
+IgG1-PD1
+派姆单抗
+纳武单抗
+阿替利珠单抗
IgG1-CD27-131A (10 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (1 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (0.1 μg/mL)
IgG1-PD1 (0.8 μg/mL)
派姆单抗 (0.8 μg/mL)
纳武单抗 (1.6 μg/mL)
阿替利珠单抗 (0.4 μg/mL)

图45(续)

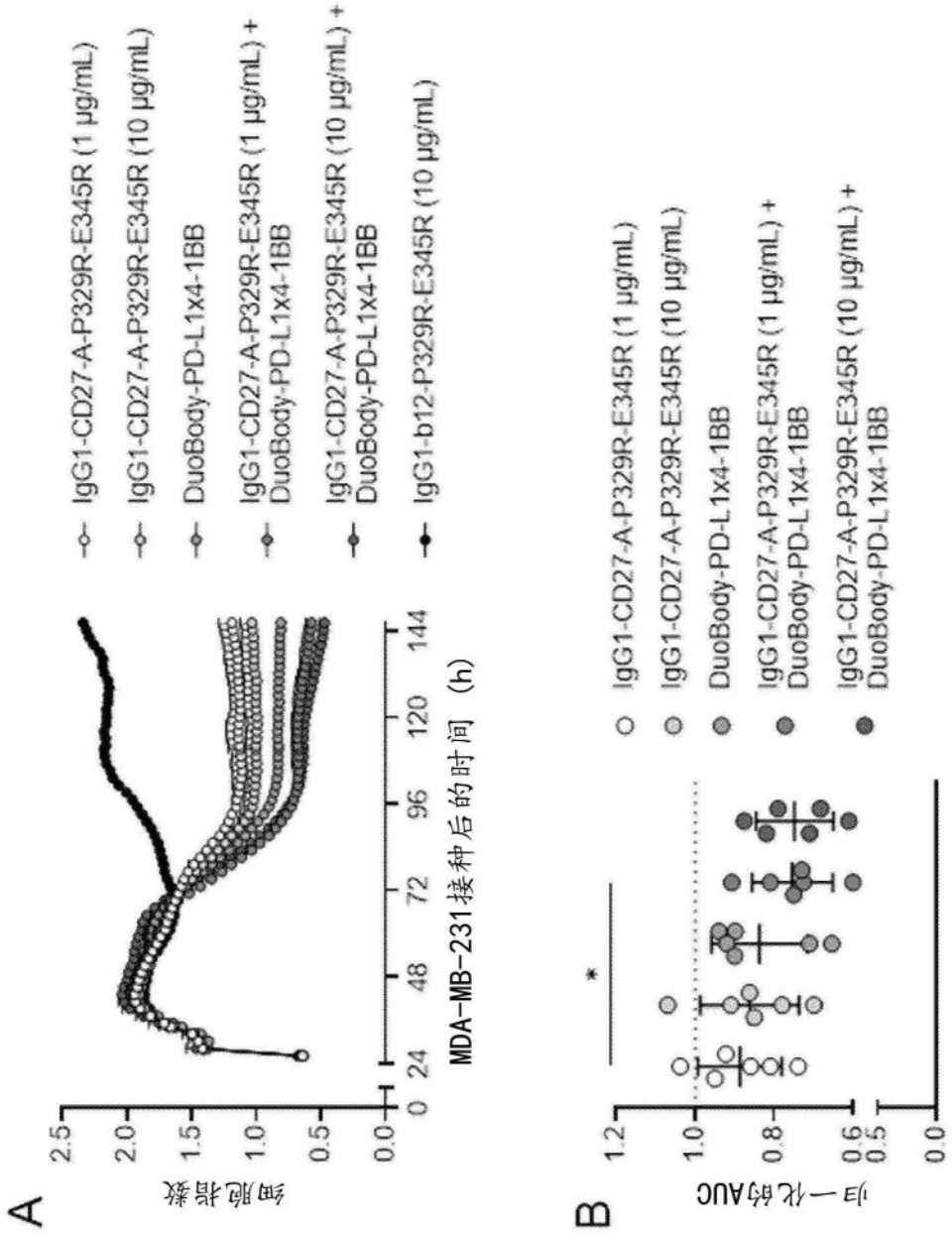

A
细胞指数
MDA-MB-231接种后的时间 (h)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (1 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (1 μg/mL) + DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL) + DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-b12-P329R-E345R (10 μg/mL)
B
归一化的AUC
*

图46

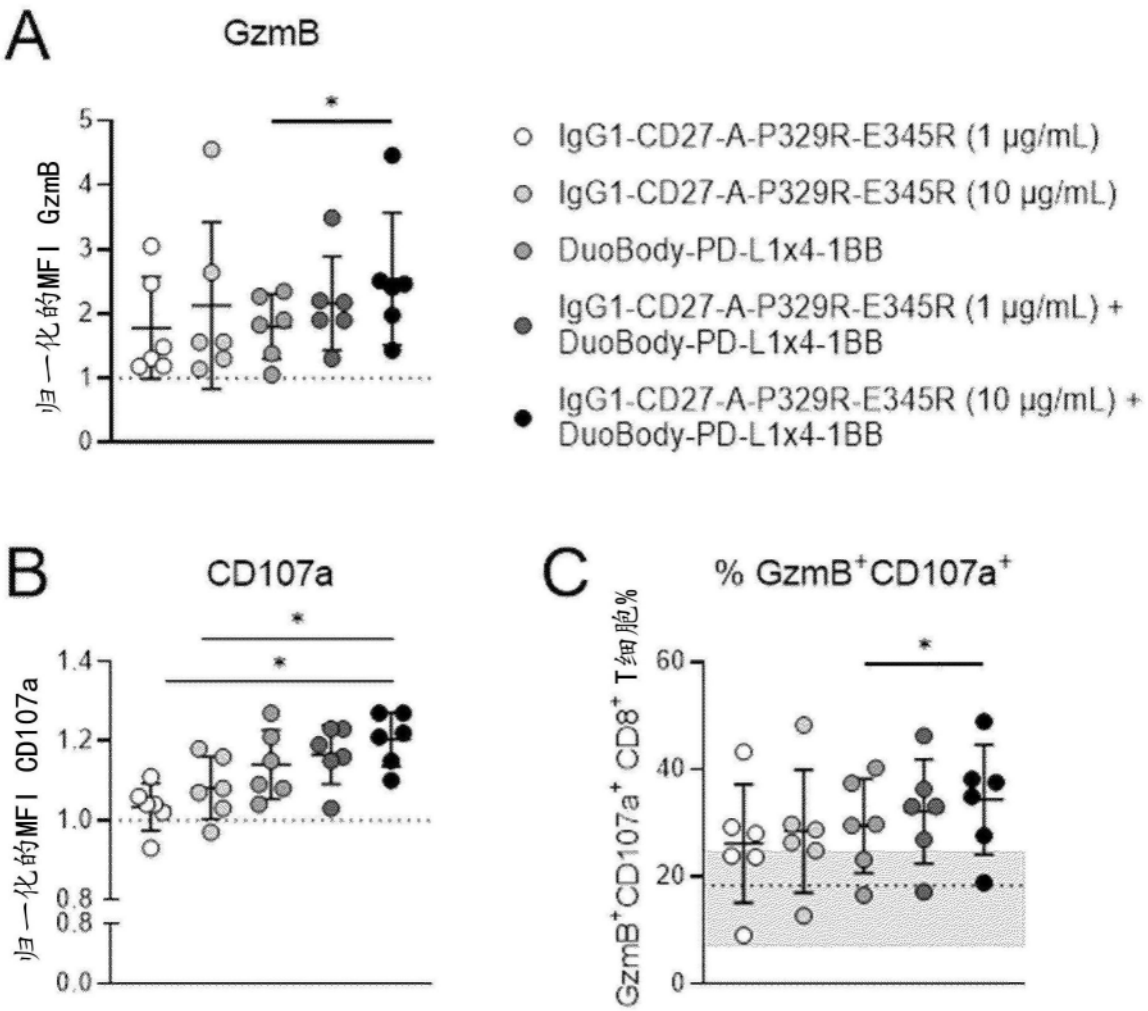

A
GzmB
归一化的MFI GzmB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (1 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (1 μg/mL) + DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL) + DuoBody-PD-L1x4-1BB
B
CD107a
归一化的MFI CD107a
C
% GzmB+CD107a+
GzmB+CD107a+ CD8+ T细胞%

图47

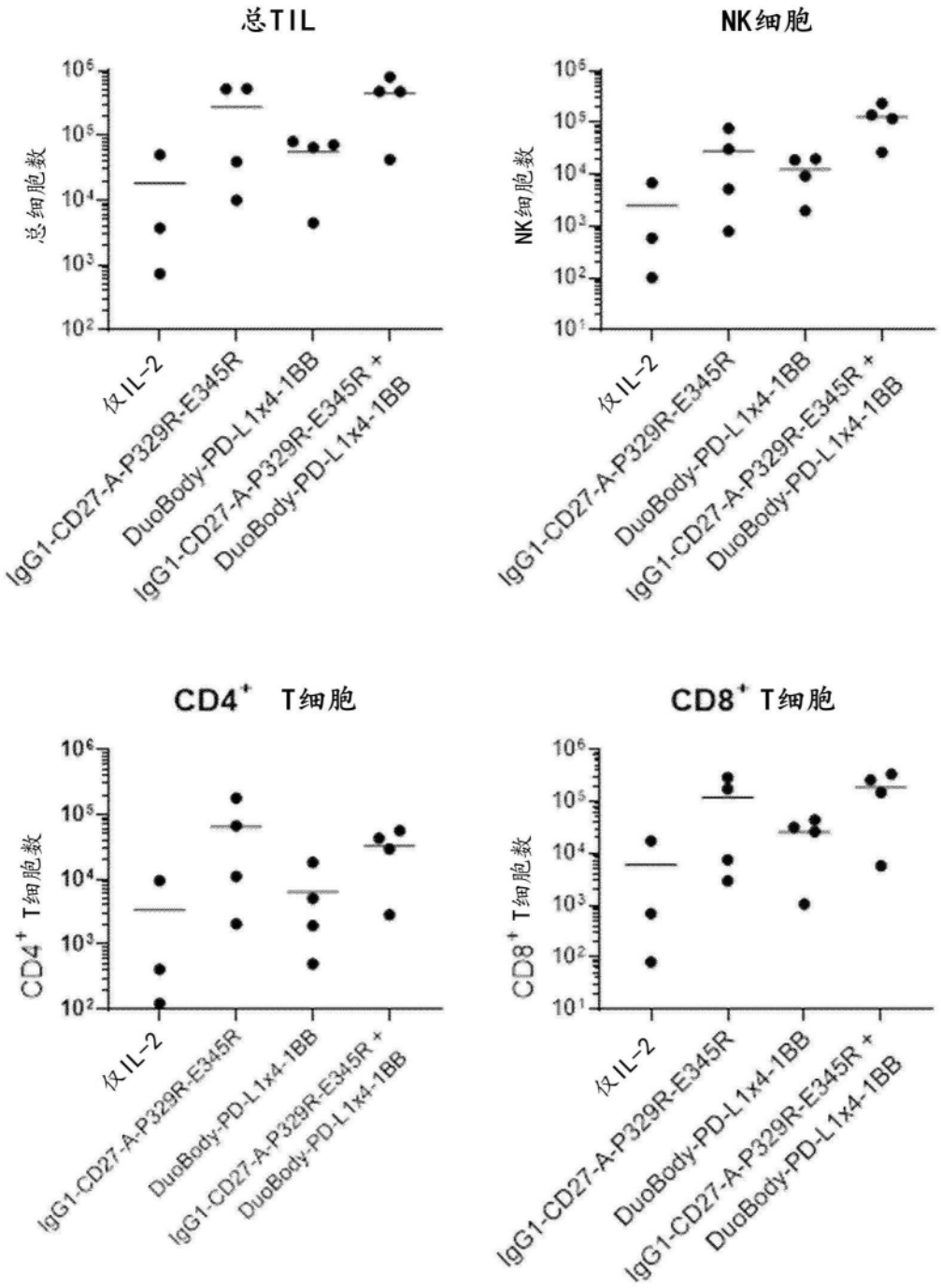

总TIL
总细胞数
NK细胞
NK细胞数
CD4+ T细胞
CD4+ T细胞数
CD8+ T细胞
CD8+ T细胞数
仅IL-2
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
DuoBody-PD-L1x4-1BB
IgG1-CD27-A-P329R-E345R + DuoBody-PD-L1x4-1BB

图48

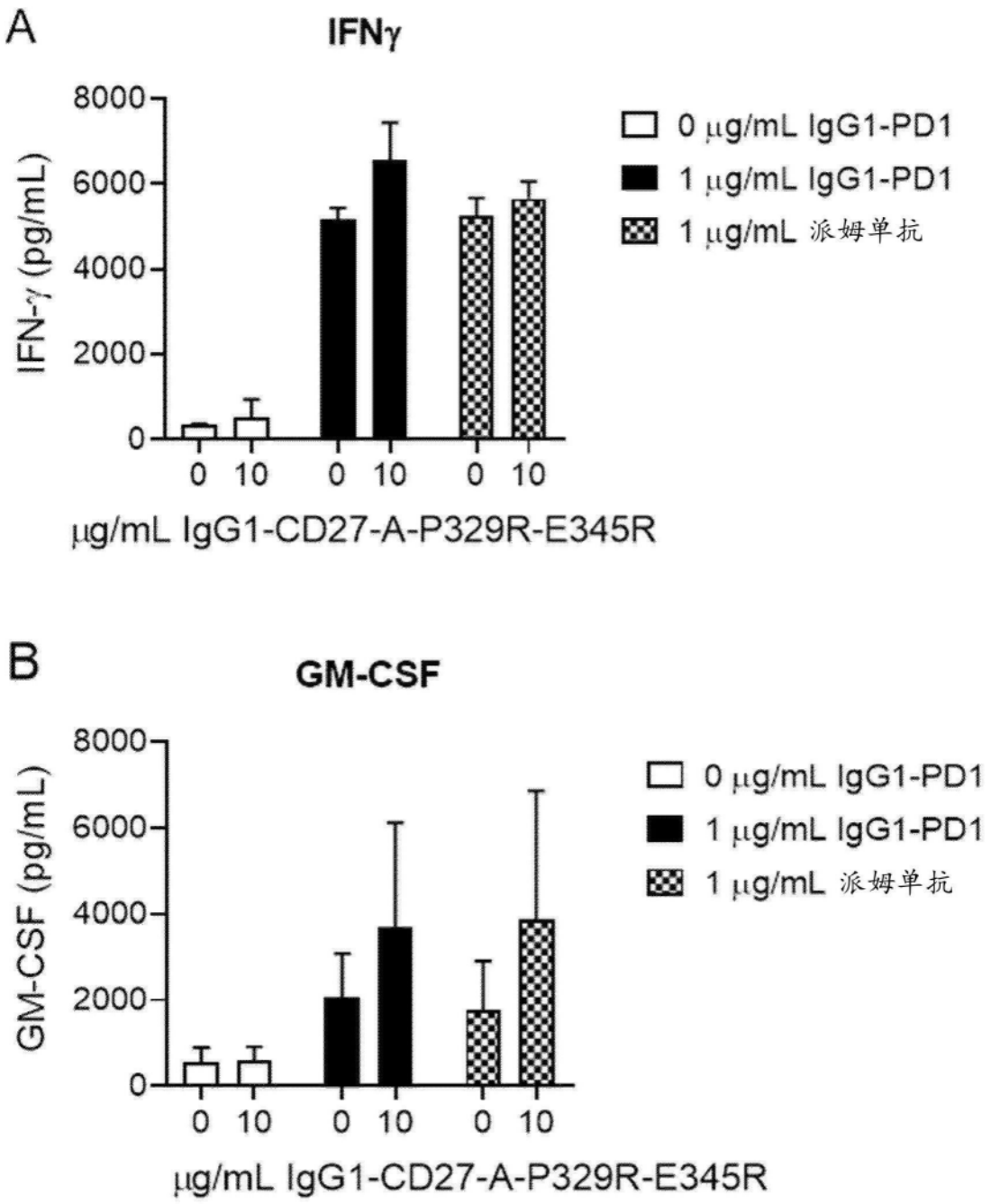

A
IFNγ
IFN-γ (pg/mL)
8000
6000
4000
2000
0
0 10 0 10 0 10
μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R
0 μg/mL IgG1-PD1
1 μg/mL IgG1-PD1
1 μg/mL 派姆单抗
B
GM-CSF
GM-CSF (pg/mL)
8000
6000
4000
2000
0
0 10 0 10 0 10
μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R
0 μg/mL IgG1-PD1
1 μg/mL IgG1-PD1
1 μg/mL 派姆单抗

图49

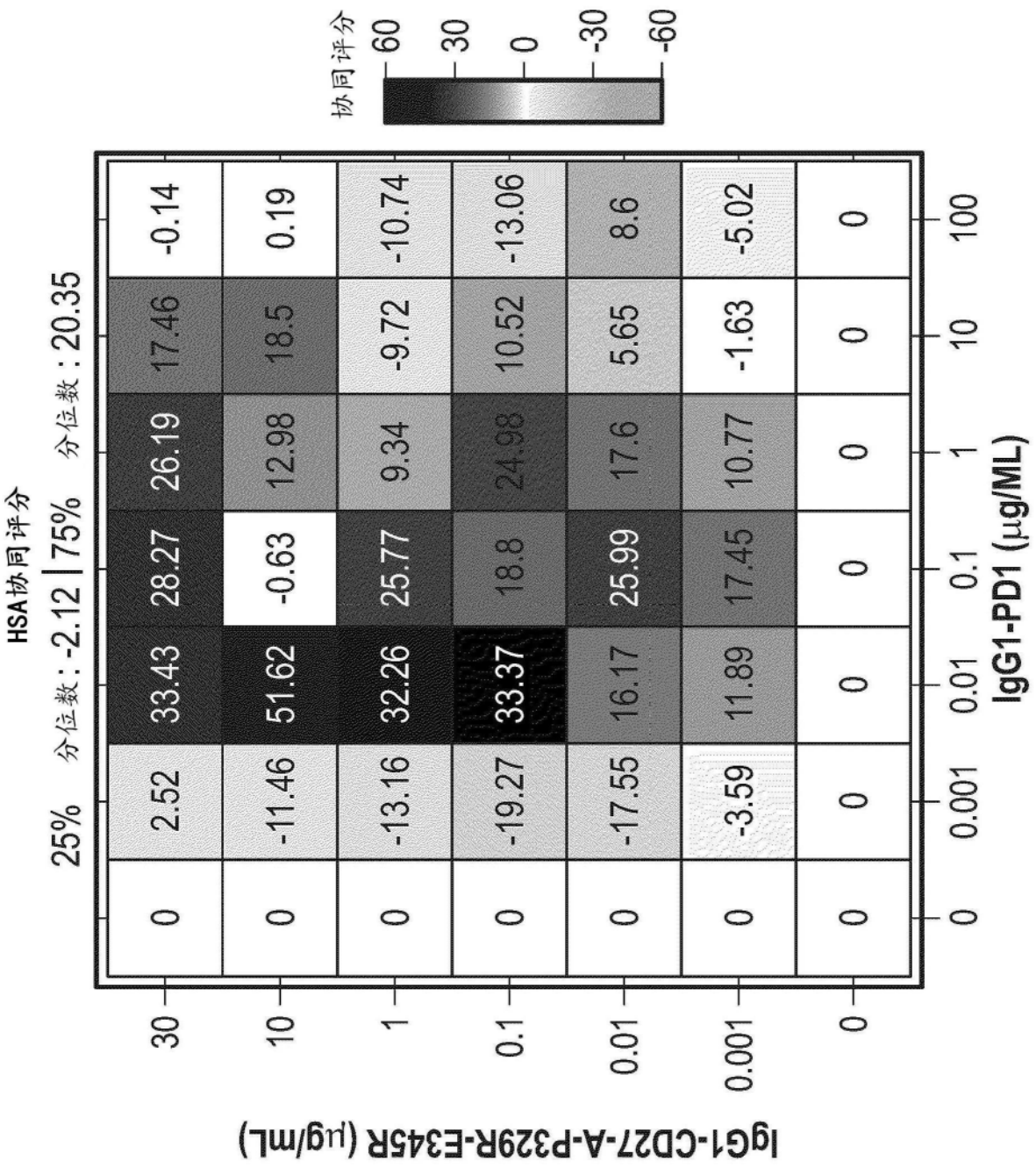

协同评分
60
30
0
-30
-60
HSA协同评分
25% 分位数：-2.12 | 75% 分位数：20.35
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (μg/mL)
IgG1-PD1 (μg/ML)
30
10
1
0.1
0.01
0.001
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
0 2.52 33.43 28.27 26.19 17.46 -0.14
0 -11.46 51.62 -0.63 12.98 18.5 0.19
0 -13.16 32.26 25.77 9.34 -9.72 -10.74
0 -19.27 33.37 18.8 24.98 10.52 -13.06
0 -17.55 16.17 25.99 17.6 5.65 8.6
0 -3.59 11.89 17.45 10.77 -1.63 -5.02
0 0 0 0 0 0 0

图50A

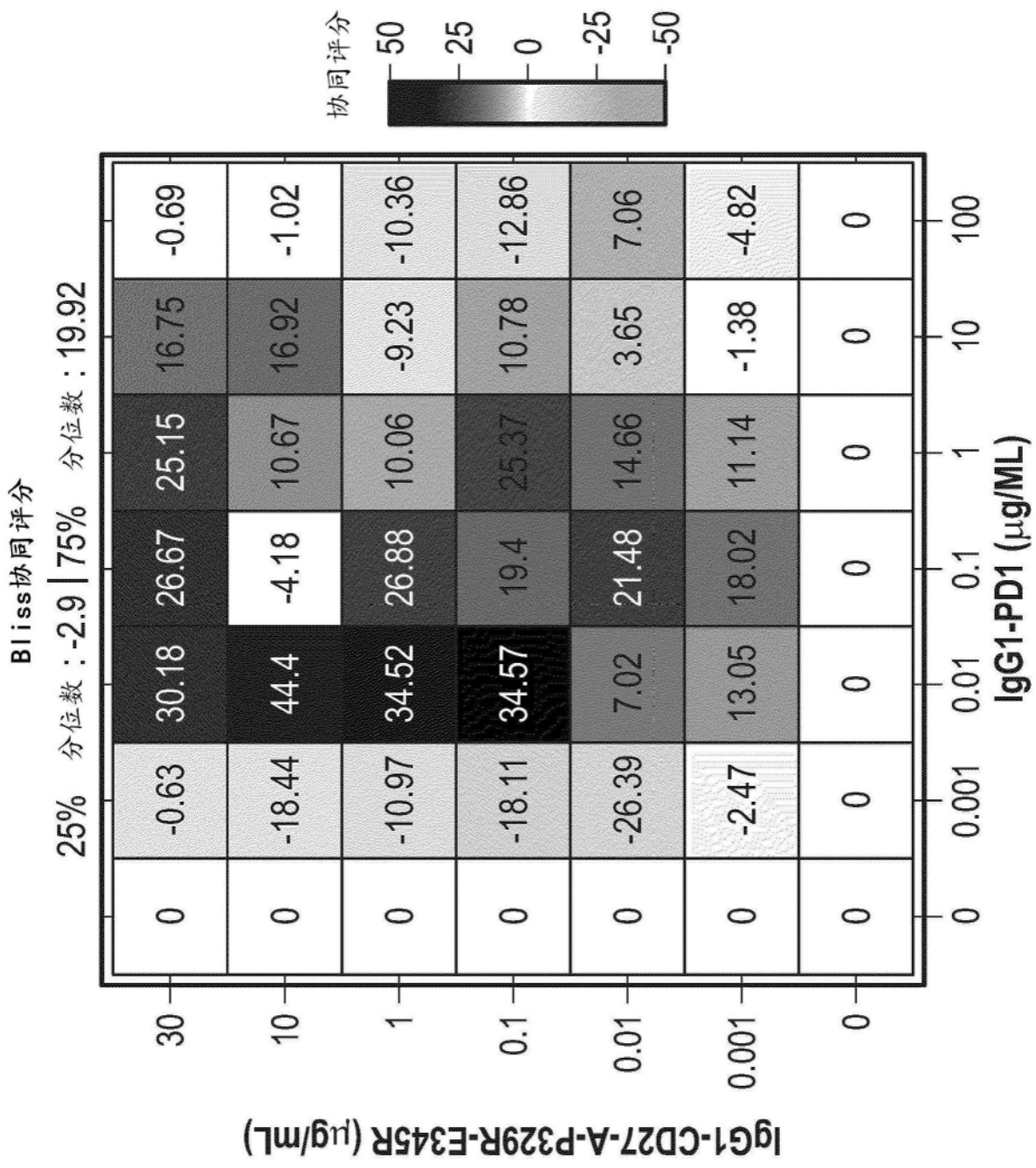

协同评分
50
25
0
-25
-50
Bliss协同评分
25% 分位数：-2.9 | 75% 分位数：19.92
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (μg/mL)
IgG1-PD1 (μg/ML)
30
10
1
0.1
0.01
0.001
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
0 -0.63 30.18 26.67 25.15 16.75 -0.69
0 -18.44 44.4 -4.18 10.67 16.92 -1.02
0 -10.97 34.52 26.88 10.06 -9.23 -10.36
0 -18.11 34.57 19.4 25.37 10.78 -12.86
0 -26.39 7.02 21.48 14.66 3.65 7.06
0 -2.47 13.05 18.02 11.14 -1.38 -4.82
0 0 0 0 0 0 0

图50A(续)

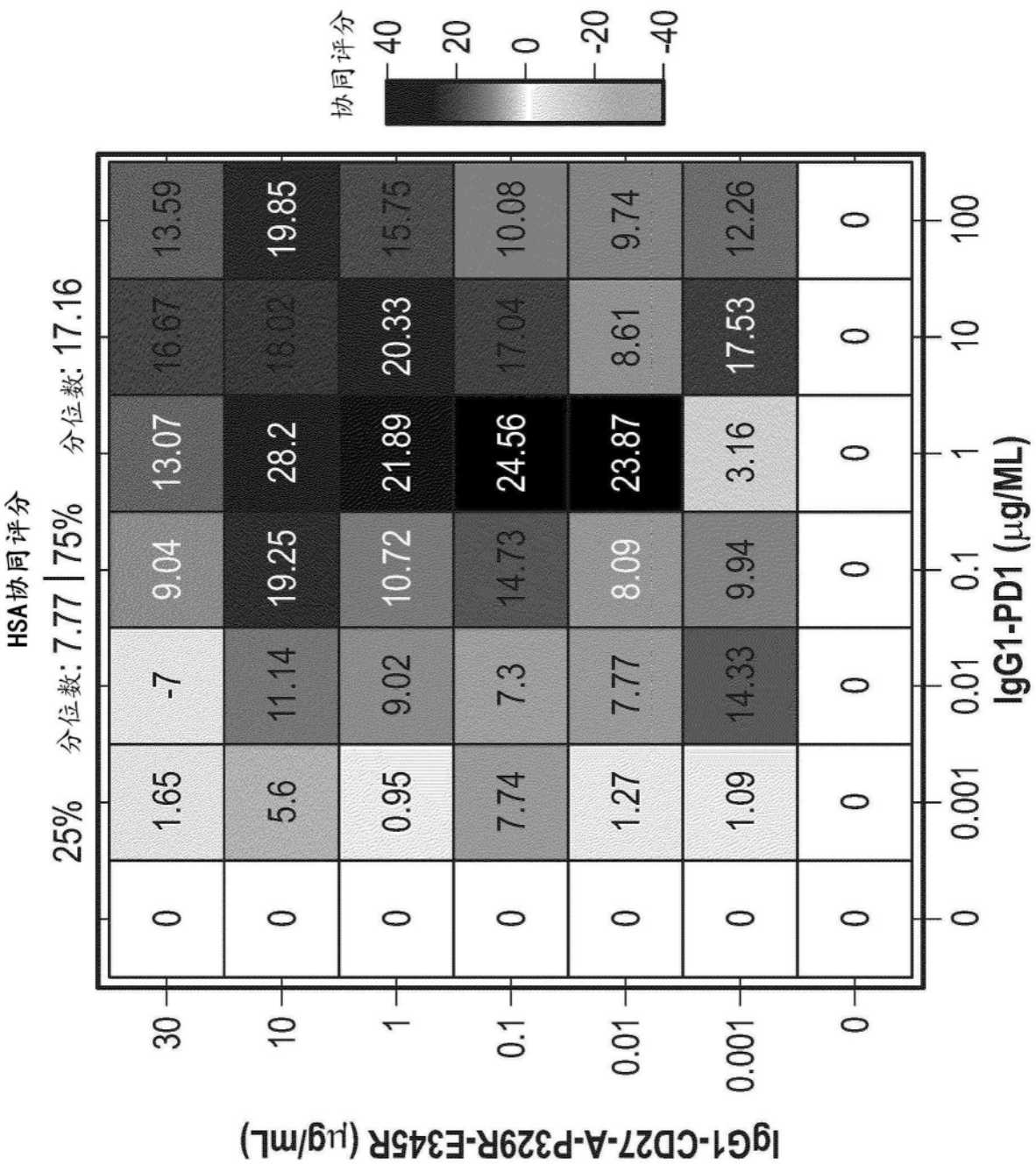

协同评分
40
20
0
-20
-40
HSA协同评分
25% 分位数: 7.77 | 75% 分位数: 17.16
0 1.65 -7 9.04 13.07 16.67 13.59
0 5.6 11.14 19.25 28.2 18.02 19.85
0 0.95 9.02 10.72 21.89 20.33 15.75
0 7.74 7.3 14.73 24.56 17.04 10.08
0 1.27 7.77 8.09 23.87 8.61 9.74
0 1.09 14.33 9.94 3.16 17.53 12.26
0 0 0 0 0 0 0
30
10
1
0.1
0.01
0.001
0
0 0.001 0.01 0.1 1 10 100
IgG1-PD1 (μg/ML)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (μg/mL)

图50B

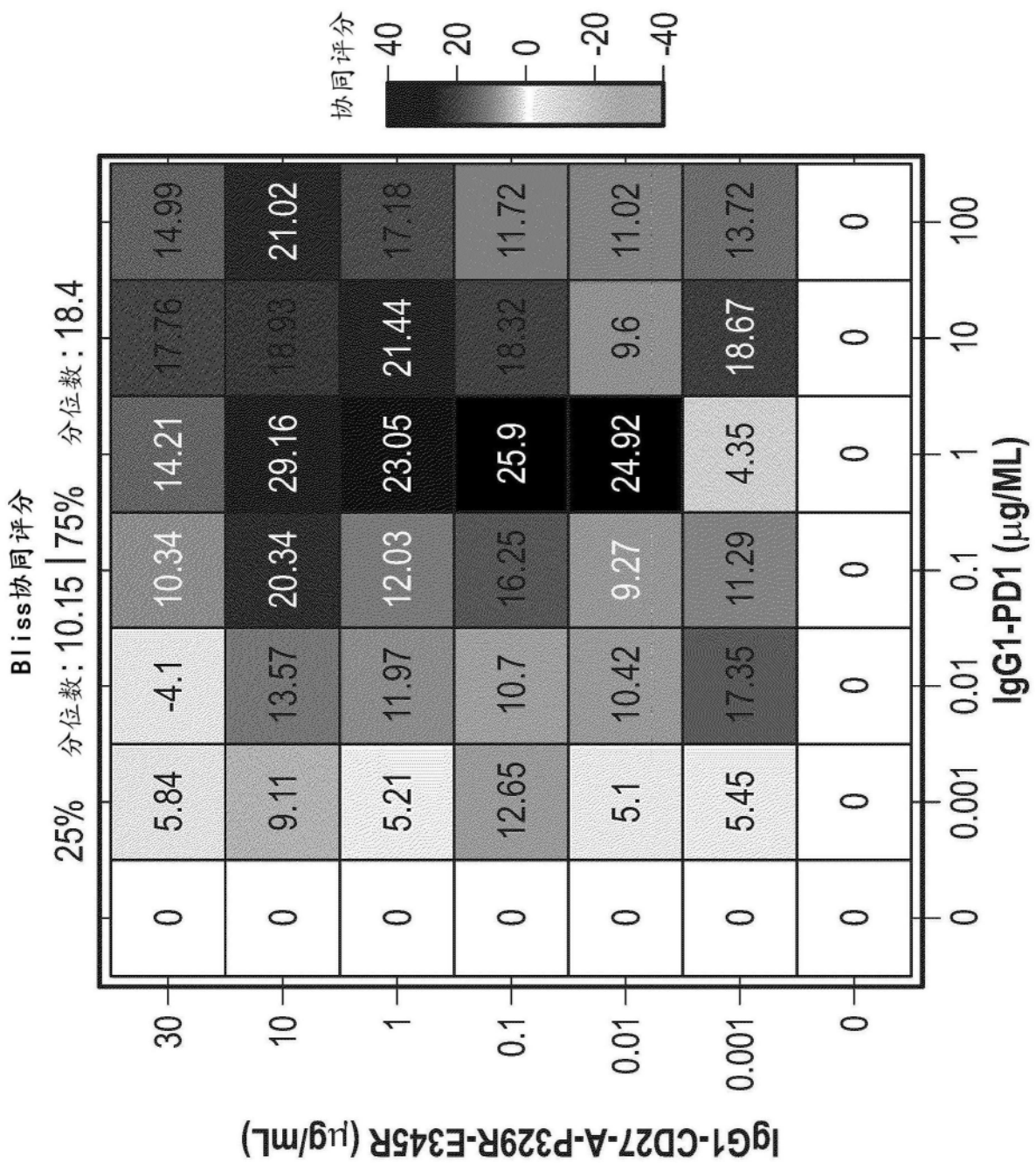

协同评分
40
20
0
-20
-40
Bliss协同评分
25% 分位数：10.15 | 75% 分位数：18.4
0 5.84 -4.1 10.34 14.21 17.76 14.99
0 9.11 13.57 20.34 29.16 18.93 21.02
0 5.21 11.97 12.03 23.05 21.44 17.18
0 12.65 10.7 16.25 25.9 18.32 11.72
0 5.1 10.42 9.27 24.92 9.6 11.02
0 5.45 17.35 11.29 4.35 18.67 13.72
0 0 0 0 0 0 0
30
10
1
0.1
0.01
0.001
0
0 0.001 0.01 0.1 1 10 100
IgG1-PD1 (μg/ML)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (μg/mL)

图50B(续)

A

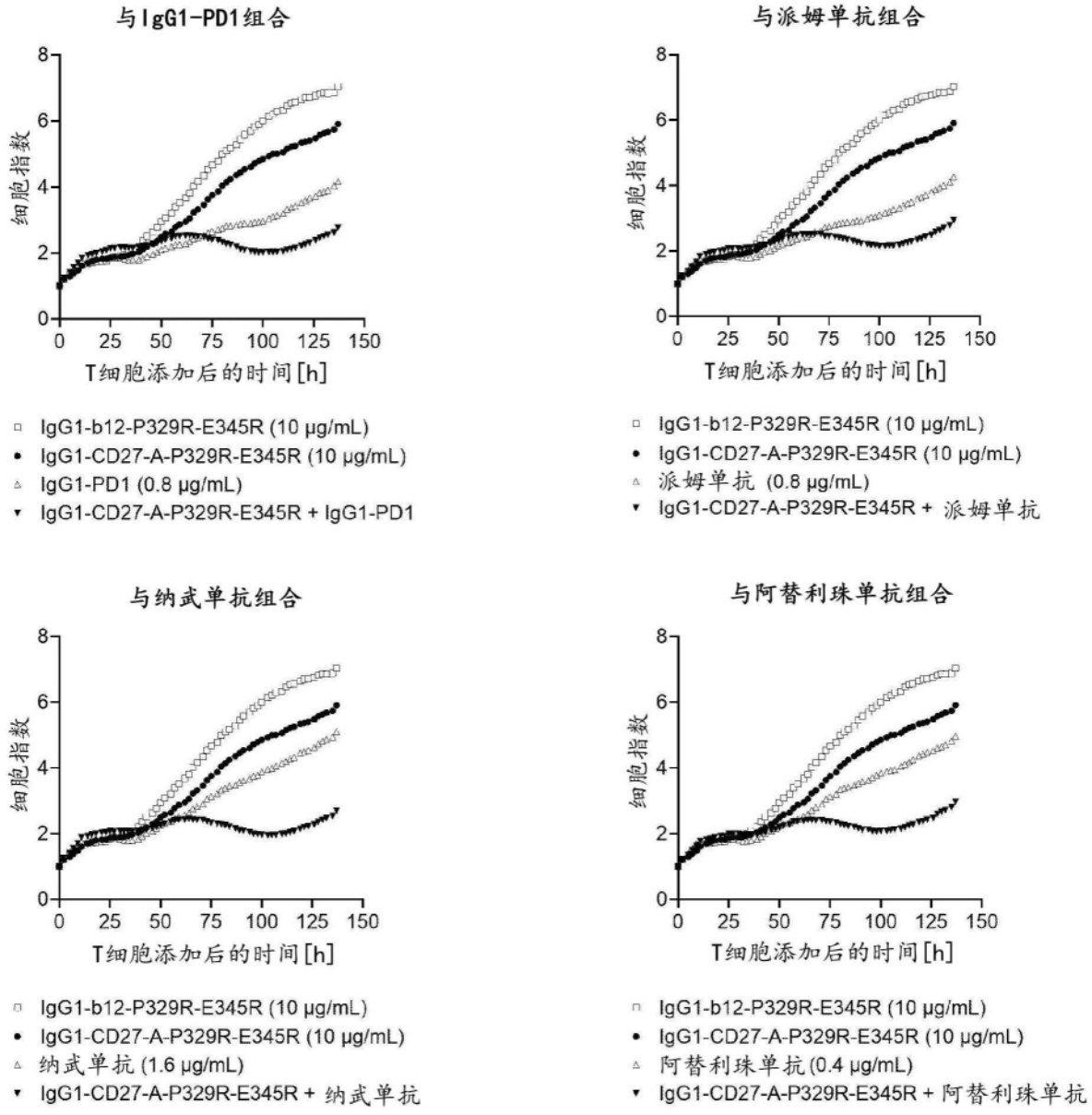

与IgG1-PD1组合
细胞指数
T细胞添加后的时间[h]
IgG1-b12-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-PD1 (0.8 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R + IgG1-PD1
与派姆单抗组合
细胞指数
T细胞添加后的时间[h]
IgG1-b12-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
派姆单抗 (0.8 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R + 派姆单抗
与纳武单抗组合
细胞指数
T细胞添加后的时间[h]
IgG1-b12-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
纳武单抗 (1.6 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R + 纳武单抗
与阿替利珠单抗组合
细胞指数
T细胞添加后的时间[h]
IgG1-b12-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
阿替利珠单抗(0.4 μg/mL)
IgG1-CD27-A-P329R-E345R + 阿替利珠单抗

图51A

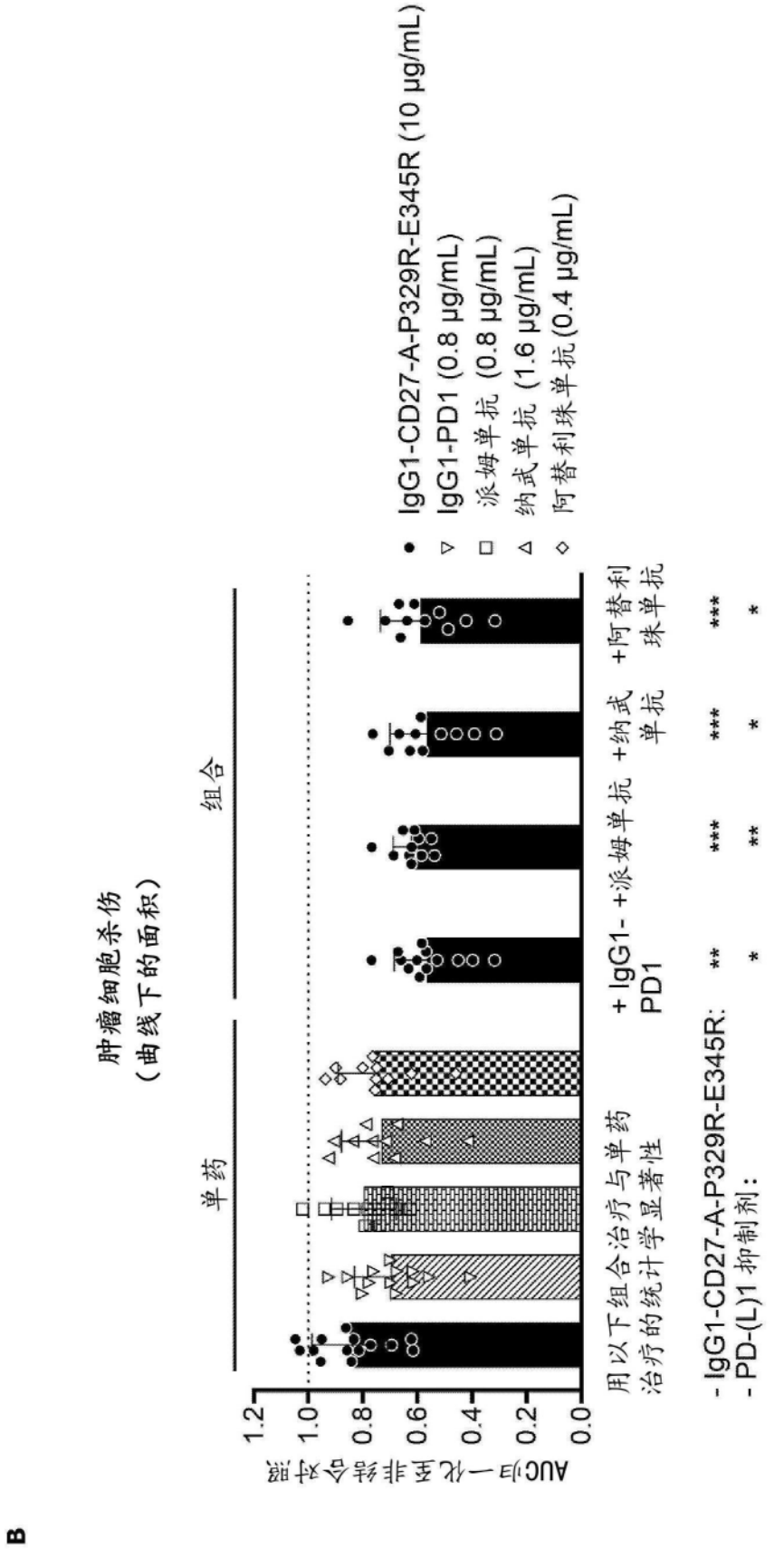

B
肿瘤细胞杀伤
（曲线下的面积）
单药
组合
AUC归一化至非结合对照
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-PD1 (0.8 μg/mL)
派姆单抗 (0.8 μg/mL)
纳武单抗 (1.6 μg/mL)
阿替利珠单抗(0.4 μg/mL)
用以下组合治疗与单药治疗的统计学显著性
+ IgG1-PD1
+派姆单抗
+纳武单抗
+阿替利珠单抗
- IgG1-CD27-A-P329R-E345R:
- PD-(L)1 抑制剂:
**
*
***
**
***
*
***
*

图51B

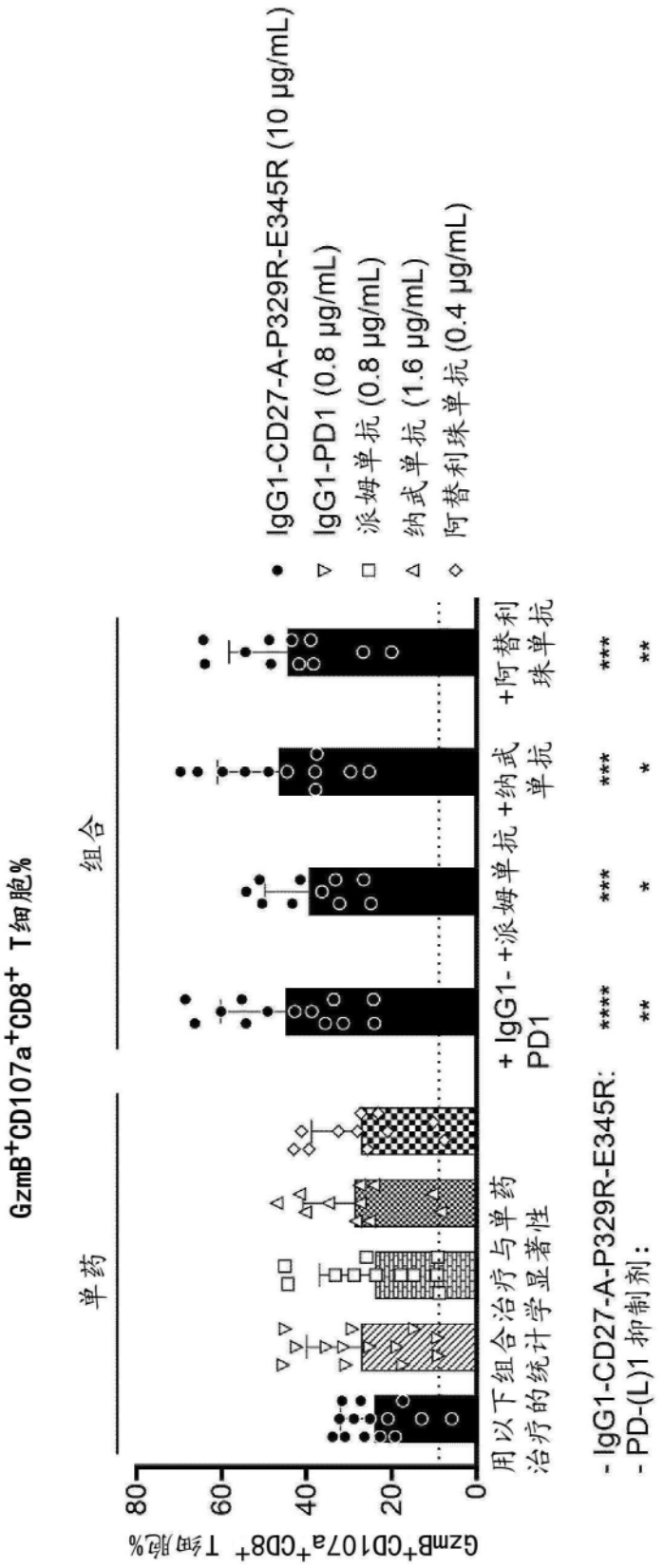

GzmB+CD107a+CD8+ T细胞%
单药
组合
IgG1-CD27-A-P329R-E345R (10 μg/mL)
IgG1-PD1 (0.8 μg/mL)
派姆单抗 (0.8 μg/mL)
纳武单抗 (1.6 μg/mL)
阿替利珠单抗 (0.4 μg/mL)
+ IgG1-PD1
+派姆单抗
+纳武单抗
+阿替利珠单抗
用以下组合治疗与单药治疗的统计学显著性
- IgG1-CD27-A-P329R-E345R:
- PD-(L)1 抑制剂:
****
***
***
***
**
*
*
**

图52