(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111406067 B
(45)授权公告日 2022.11.08

(21)申请号 201880062146.5

(22)申请日 2018.08.02

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111406067 A

(43)申请公布日 2020.07.10

(30)优先权数据
PCT/EP2017/069839 2017.08.04 EP
PCT/EP2018/052946 2018.02.06 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.03.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/071002 2018.08.02

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/025545 EN 2019.02.07

(73)专利权人 健玛保
地址 丹麦哥本哈根
专利权人 生物技术公司

(72)发明人 I.阿尔汀塔斯 D.萨提基恩
R.拉德梅克 P.帕伦 U.沙辛
F.吉塞克 A.缪克 C.格伦维茨

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 张文辉

(51)Int.Cl.
C07K 16/10(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 2017123650 A2,2017.07.20
WO 2016110576 A1,2016.07.14
WO 2016110584 A1,2016.07.14

审查员 段珊

权利要求书4页 说明书69页
序列表31页 附图21页

(54)发明名称

与PD-L1和CD137结合的结合剂及其用途

(57)摘要

本发明涉及新的结合剂及其在医学中的用途。特别地，本发明涉及结合剂，如结合人PD-L1和结合人CD137的双特异性抗体。本发明还涉及本发明的抗体的用途以及用于产生本发明的抗体的方法、核酸构建体和宿主细胞。

CN 111406067 B

1.结合剂,其包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中所述第二抗原结合区抑制人PD-L1与人PD-1的结合,

其中所述第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别以SEQ ID NO:9、10、11所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列和分别以SEQ ID NO: 13、GAS、SEQ ID NO: 14所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;和

其中所述第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别以SEQ ID NO: 18、19、20所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列和分别以SEQ ID NO: 22、DDN、SEQ ID NO:23所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

2.根据权利要求1的结合剂,其中所述第一抗原结合区包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与以SEQ ID NO: 15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。

3.根据权利要求1的结合剂,其中所述第一抗原结合区包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含以SEQ ID NO: 15所示的序列。

4.根据权利要求1的结合剂,其中所述第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含与以SEQ ID NO: 16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。

5.根据权利要求1的结合剂,其中所述第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含以SEQ ID NO: 16所示的序列。

6.根据权利要求1的结合剂,其中所述第一抗原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)包含以SEQ ID NO: 15所示的序列,所述轻链可变区(VL)包含以SEQ ID NO: 16所示的序列。

7.根据权利要求1的结合剂,其中所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与如SEQ ID NO: 17中所示的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。

8.根据权利要求1的结合剂,其中所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH),其中所述VH包含如SEQ ID NO: 17中所示的序列。

9.根据权利要求1的结合剂,其中所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含与如SEQ ID NO: 21中所示的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。

10.根据权利要求1的结合剂,其中所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含轻链可变区(VL),其中所述VL包含如SEQ ID NO: 21中所示的序列。

11.根据权利要求1的结合剂,其中所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含如SEQ ID NO: 17中所示的序列并且所述VL包含如SEQ ID NO: 21中所示的序列。

12.根据权利要求1-11中任一项的结合剂,其包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

所述第一抗原结合区包含包括如SEQ ID NO: 15中所示的序列的重链可变区(VH),并

且

所述第二抗原结合区包含包括如SEQ ID NO: 17中所示的序列的重链可变区(VH)。

13.根据权利要求1-11中任一项的结合剂,其包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

所述第一抗原结合区包含包括如SEQ ID NO: 15中所示的序列的重链可变区(VH)和包括如SEQ ID NO: 16中所示的序列的轻链可变区(VL),

并且

所述第二抗原结合区包含包括如SEQ ID NO: 17中所示的序列的重链可变区(VH)和包括如SEQ ID NO: 21中所示的序列的轻链可变区(VL)。

14.根据权利要求1-11中任一项的结合剂,其中所述结合剂是免疫球蛋白分子。

15.根据权利要求1-11中任一项的结合剂,其中所述结合剂为全长抗体的形式。

16.根据权利要求1-11中任一项的结合剂,其中每个可变区包含三个互补决定区,CDR1、CDR2和CDR3和四个框架区,FR1、FR2、FR3和FR4。

17.根据权利要求16的结合剂,其中所述互补决定区和所述框架区以如下顺序从氨基末端至羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

18.根据权利要求1-11中任一项的结合剂,其包含(i) 包含所述第一重链可变区(VH)并进一步包含第一重链恒定区(CH)的多肽,和(ii) 包含所述第二重链可变区(VH)并进一步包含第二重链恒定区(CH)的多肽。

19.根据权利要求1-11中任一项的结合剂,其包含(i) 包含所述第一轻链可变区(VL)并进一步包含第一轻链恒定区(CL)的多肽,和(ii) 包含所述第二轻链可变区(VL)并进一步包含第二轻链恒定区(CL)的多肽。

20.根据权利要求18的结合剂,其是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,其中

a. 所述第一结合臂包含i) 包含所述第一重链可变区(VH)和所述第一重链恒定区(CH)的多肽和ii) 包含所述第一轻链可变区(VL)和所述第一轻链恒定区(CL)的多肽,并且;

b. 所述第二结合臂包含iii) 包含所述第二重链可变区(VH)和所述第二重链恒定区(CH)的多肽和iv) 包含所述第二轻链可变区(VL)和所述第二轻链恒定区(CL)的多肽。

21.根据权利要求18的结合剂,其中所述第一和第二重链恒定区(CH)的每一个均包含恒定区域1区(CH1区)、铰链区、CH2区和CH3区的一个或多个。

22.根据权利要求1-11中任一项的结合剂,其中所述结合剂属于选自下组的同种型:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

23.根据权利要求1-11中任一项的结合剂,其中所述结合剂是全长IgG1抗体。

24.根据权利要求1-11中任一项的结合剂,其中

a. 所述与人CD137结合的第一抗原结合区源自人抗体,和/或

b. 所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区源自人抗体。

25.根据权利要求1-11中任一项的结合剂,其中在所述第一重链恒定区(CH)中,至少一个与选自下组的位置相对应的位置中的氨基酸已经被取代:根据EU编号的人IgG1重链中的T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409,并且在所述第二重链恒定区(CH)中,至少一个与选自下组的位置相对应的位置中的氨基酸已经被取代:根据EU编号的人IgG1重链中的

T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409，并且其中所述第一和所述第二重链不在相同的位置中被取代。

26.根据权利要求25的结合剂，其中(i) 在所述第一重链恒定区(CH)中，与根据EU编号的人IgG1重链中F405相对应的位置中的氨基酸为L，并且在所述第二重链恒定区(CH)中，与根据EU编号的人IgG1重链中K409相对应的位置中的氨基酸为R，或者(ii) 在所述第一重链中，与根据EU编号的人IgG1重链中K409相对应的位置中的氨基酸为R，并且在所述第二重链中，与根据EU编号的人IgG1重链中F405相对应的位置中的氨基酸为L。

27.根据权利要求1-11中任一项的结合剂，其中在所述第一和第二重链恒定区(CH)的至少一个中，与根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235、D265、N297和P331相对应的位置中的一个或多个氨基酸分别不是L、L、D、N和P。

28.根据权利要求27的结合剂，其中在所述第一和第二重链中，与根据EU编号的人IgG1重链中位置L234和L235相对应的位置分别是F和E。

29.根据权利要求27的结合剂，其中在所述第一和第二重链恒定区(HC)中，与根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235和D265相对应的位置分别是F、E和A。

30.根据权利要求29的结合剂，其中所述第一和第二重链恒定区两者的与根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235和D265相对应的位置分别是F、E和A，并且其中(i) 所述第一重链恒定区的与根据EU编号的人IgG1重链中F405相对应的位置为L，并且所述第二重链恒定区的与根据EU编号的人IgG1重链中K409相对应的位置为R，或者(ii) 所述第一重链的与根据EU编号的人IgG1重链中K409相对应的位置为R，并且所述第二重链的与根据EU编号的人IgG1重链中F405相对应的位置为L。

31.根据权利要求28的结合剂，其中所述第一和第二重链恒定区两者的与根据EU编号的人IgG1重链中位置L234和L235相对应的位置分别是F和E，并且其中(i) 所述第一重链恒定区的与根据EU编号的人IgG1重链中F405相对应的位置为L，并且所述第二重链的与根据EU编号的人IgG1重链中K409相对应的位置为R，或者(ii) 所述第一重链恒定区的与根据EU编号的人IgG1重链中K409相对应的位置为R，并且所述第二重链的与根据EU编号的人IgG1重链中F405相对应的位置为L。

32.根据权利要求1-11中任一项的结合剂，其中所述结合剂是多特异性抗体。

33.根据权利要求32的结合剂，其中所述结合剂是双特异性抗体。

34.根据权利要求1-11中任一项的结合剂，其中所述结合剂诱导和/或增强T细胞的增殖。

35.根据权利要求34的结合剂，其中所述T细胞是$CD4^+$和/或$CD8^+$ T细胞。

36.根据权利要求1-11中任一项的结合剂，其中仅当所述第二抗原结合区与PD-L1结合时，所述结合剂才激活CD137信号传导。

37.根据权利要求34的结合剂，其中T细胞的增殖通过将表达特定T细胞受体(TCR)的T细胞与在主要组织相容性复合体上呈递相应抗原的树突细胞(DC)共培养来测量，所述相应抗原被所述TCR识别。

38.根据权利要求21所述的结合剂，其中所述第一和第二重链恒定区(CH)的每一个均至少包含铰链区、CH2区和CH3区。

39.核酸，其编码根据权利要求1至38中任一项的结合剂。

40.表达载体,其包含根据权利要求39的核酸。

41.细胞,其包含根据权利要求39的核酸或根据权利要求40的表达载体。

42.根据权利要求41的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

43.根据权利要求42的细胞,其中所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢细胞。

44.组合物,其包含根据权利要求1至38中任一项的结合剂、根据权利要求39的核酸、根据权利要求40的表达载体或根据权利要求41-43中任一项的细胞。

45.根据权利要求44的组合物,其是药物组合物。

46.根据权利要求45的组合物,其进一步包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

47.根据权利要求1至11中任一项的结合剂、根据权利要求39的核酸、根据权利要求40的表达载体、根据权利要求41-43中任一项的细胞或根据权利要求44至46中任一项的组合物,其用作药物。

48.根据权利要求47的结合剂、核酸、表达载体、细胞或组合物,其用于癌症的治疗中。

49.根据权利要求48使用的结合剂、核酸、表达载体、细胞或组合物,其中所述癌症以实体瘤的存在为特征。

50.根据权利要求49使用的结合剂、核酸、表达载体、细胞或组合物,其中所述癌症选自下组:黑色素瘤、卵巢癌、肺癌、结肠癌和头颈癌。

51.根据权利要求50使用的结合剂、核酸、表达载体、细胞或组合物,其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。

52.根据权利要求1至37中任一项的结合剂、根据权利要求38的核酸、根据权利要求39的表达载体、根据权利要求41-43中任一项的细胞或根据权利要求44至46中任一项的组合物在制备药物中的用途,其中所述药物是用于治疗以实体瘤的存在为特征的癌症的药物。

53.根据权利要求52的用途,其中所述癌症选自下组:黑色素瘤、卵巢癌、肺癌、结肠癌和头颈癌。

54.根据权利要求53的用途,其中所述肺癌是非小细胞肺癌(NSCLC)。

55.根据权利要求54的用途,其中所述用途包括与一种或多种另外的治疗剂组合。

56.根据权利要求55的用途,其中所述治疗剂是化学治疗剂。

57.用于生产根据权利要求33的双特异性抗体的方法,其包括以下步骤:

a. 培养产生第一抗体的宿主细胞,并任选地从培养物中纯化所述第一抗体,所述第一抗体包含如权利要求1-6、12和13中任一项中所定义的与人CD137结合的抗原结合区;

b. 培养产生第二抗体的宿主细胞,并任选地从培养物中纯化所述第二抗体,所述第二抗体包含如权利要求1和7至13中任一项中所定义的与人PD-L1结合的抗原结合区;

c. 在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育,以及

d. 获得所述CD137xPD-L1双特异性抗体。

与PD-L1和CD137结合的结合剂及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及新的结合剂及其在医学中的用途。具体而言，本发明涉及结合人PD-L1和结合人CD137的结合剂，如双特异性抗体。本发明还涉及本发明的结合剂的用途以及产生本发明的抗体的方法、核酸构建体和宿主细胞。

[0002] 发明背景

[0003] CD137(4-1BB,TNFRSF9)是肿瘤坏死因子(TNF)受体(TNFR)家族的成员。CD137是$CD8^+$和$CD4^+$T细胞、调节性T细胞(Treg)、自然杀伤(NK)和NKT细胞、B细胞和嗜中性粒细胞上的共刺激分子。在T细胞上，CD137不是组成型表达，而是在T细胞受体(TCR)激活后诱导。经由其天然配体4-1BBL或激动剂抗体的刺激导致使用TNFR相关因子(TRAF)-2和TRAF-1作为衔接物的信号传导。通过CD137的早期信号传导涉及K-63多泛素化反应，其最终导致核因子(NF)-κB和丝裂原激活蛋白(MAP)-激酶途径的激活。信号传导导致增加的T细胞共刺激、增殖、细胞因子产生、成熟和延长的$CD8^+$T细胞存活。已显示针对CD137的激动性抗体在各种临床前模型中促进T细胞的抗肿瘤控制(Murillo et al.2008Clin.Cancer Res.14(21):6895-6906)。刺激CD137的抗体可以诱导T细胞的存活和增殖，从而增强抗肿瘤免疫应答。刺激CD137的抗体已在现有技术中公开，包括乌瑞鲁单抗(urelumab)，一种人IgG4抗体(WO2005035584)和乌托鲁单抗(utomilumab)，一种人IgG2抗体(Fisher et al.2012Cancer Immunol.Immunother.61:1721-1733)。

[0004] 程序性死亡配体1(PD-L1、PDL1、CD274、B7H1)是一种33kDa的单通过I型膜蛋白。基于可变剪接，已经描述了PD-L1的三种同等型。PD-L1属于免疫球蛋白(Ig)超家族，并且含有一个Ig样C2型域和一个Ig样V型域。新鲜分离的T和B细胞表达的PD-L1量可忽略不计，并且一定分数(约16％)的CD14+单核细胞组成性表达PD-L1。然而，已知干扰素-γ(IFNγ)上调肿瘤细胞上的PD-L1。

[0005] PD-L1通过以下方式阻碍抗肿瘤免疫性：1)通过与其在活化的T细胞上的受体，即程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)(CD279)结合来耐受肿瘤反应性T细胞；2)通过经由肿瘤细胞表达的PD-L1的PD-1信号转导使肿瘤细胞对CD8+T细胞和Fas配体介导的裂解有抗性；3)通过经由T细胞表达的CD80(B7.1)的反向信号传导耐受T细胞；和4)促进诱导的T调节细胞的发育和维持。PD-L1在许多人癌症中表达，包括黑色素瘤、卵巢癌、肺癌和结肠癌(Latchman et al.,2004Proc Natl Acad Sci USA 101,10691-6)。

[0006] PD-L1阻断抗体已在几种已知过表达PD-L1的癌症(包括黑色素瘤,NSCLC)中显示出临床活性。例如，阿特珠单抗(atezolizumab)是针对PD-L1的人源化IgG1单克隆抗体。目前它在临床试验中作为针对多种适应症的免疫疗法，包括各种类型的实体瘤(参见例如Rittmeyer等,2017Lancet389:255-265)并且已批准用于非小细胞肺癌和膀胱癌适应症。FDA已经批准阿利库单抗(Avelumab)(一种PD-L1抗体)(Kaufman et al Lancet Oncol.2016;17(10):1374-1385)用于治疗12岁及以上的具有转移性Merkel细胞癌的成人和儿童患者，并且目前在针对多种癌症适应症的临床试验中，包括膀胱癌、胃癌、头颈癌、间皮瘤、NSCLC、卵巢癌和肾癌。德瓦鲁单抗(Durvalumab)(一种PD-L1抗体)批准用于局部晚期

或转移性尿路上皮癌适应症，并且在多种实体瘤和血液癌中的临床开发中(参见例如Massard et al.,2016J Clin Oncol.34(26):3119-25)。已经在WO2004004771、WO2007005874、WO2010036959、WO2010077634、WO2013079174、WO2013164694、WO2013173223和WO2014022758中描述了其他抗PD-L1抗体。

[0007] Horton等人(J Immunother Cancer.2015;3(Suppl 2):O10)公开了激动性4-1BB抗体与中和性PD-L1抗体的组合。

[0008] 乌托鲁单抗和阿利库单抗的组合疗法目前正在临床中进行测试(Chen et al.,J Clin Oncol 35,2017suppl;abstr TPS7575以及临床试验NCT02554812)。

[0009] 然而，尽管本领域有所进展，仍需要可以结合PD-L1和CD137两者的多特异性抗体。这些将给出与表达PD-L1的抗原呈递细胞(APC)或肿瘤细胞和表达CD137的T细胞的同时结合，从而导致(细胞毒性)T细胞的条件活化。PD-L1与活化T细胞上表达的PD1结合将导致T细胞抑制。因此，本发明的目的是提供PD-L1xCD137双特异性结合剂，如双特异性抗体，其阻断PD1-(PD-L1)抑制性信号传导，并同时经由与活化T细胞上表达的CD137分子反式结合来共刺激T细胞，其中活化通过反式结合发生。这可以导致抗肿瘤免疫的有效诱导。本发明的另一个目的是提供具有惰性Fc区或可替代地不具有Fc结合区的PD-L1xCD137双特异性结合剂，从而提供当与CD137结合时，不诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)或T细胞上其他Fc介导的效应器功能的双特异性结合剂。本发明的另一个目的是提供适用于活化T细胞的PD-L1xCD137双特异性结合剂。本发明的另一个目的是提供适用于活化肿瘤特异性T细胞如肿瘤浸润T细胞的PD-L1xCD137双特异性结合剂。本发明的另一个目的是提供与本领域中目前的治疗选择相比具有改善的毒理学概况的双特异性结合剂。本发明的又一个目的是提供与本领域中目前的治疗选择相比具有改善的功效概况的结合剂。

[0010] 发明概述

[0011] 在第一方面，本发明提供了结合剂，其包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区，其中第二抗原结合区抑制人PD-L1与人PD-1的结合。此类包含第一和第二抗原结合区的结合剂具有双重作用：

[0012] 首先，结合剂通过其PD-L1结合区结合表达PD-L1的肿瘤细胞或抗原呈递细胞(APC)，而结合剂通过其CD137结合区结合并活化T细胞，从而导致T细胞的条件性活化。因此，不受理论的束缚，当结合剂同时与PD-L1和CD137结合时，根据本发明的结合剂可以介导CD137的聚集(clustering)。为了充分激活该受体和CD137介导的T细胞共刺激，需要结合剂使CD137聚集。其次，结合剂因此使T细胞紧邻肿瘤细胞，从而促进T细胞杀伤肿瘤细胞。此外，不受任何具体理论的限制，假设使表达PD-L1的肿瘤细胞和效应T细胞(如$CD8^+$T细胞)彼此紧邻可以引发干扰素-γ的释放，其继而可以上调肿瘤细胞上的PD-L1，从而促进向肿瘤募集更多结合剂并进一步增强其杀伤。

[0013] 最后，本发明的结合剂抑制人PD-L1与人PD-1的结合，从而防止PD-L1阻碍通过PD-1的抗肿瘤免疫。因此，该结合剂防止T细胞接收通过PD-1/PD-L1相互作用的抑制信号，而接收通过与CD137分子结合的激活信号，从而导致加强T细胞增殖、活化、效应器和记忆功能的信号传导。

[0014] 本发明的PD-L1xCD137结合剂在治疗环境中特别有用，其中可以同时实现T细胞上激活受体如CD137的刺激和抑制信号如PD-1/PD-L1的阻断。与分别刺激CD137和经由PD-L1

阻断PD-1/PD-L1相比，这可以导致更高幅度的T细胞增殖、活化和存活。

[0015] 在本发明的一个实施方案中，PD-L1xCD137结合剂是双特异性抗体。

[0016] 在本发明的另一个实施方案中，结合剂是双特异性抗体，其具有与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区，其中第二抗原结合区抑制人PD-L1与人PD-1的结合。

[0017] 在本发明的进一步的实施方案中，结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区，其中a)第一抗原结合区包含包括分别如SEQ ID NO:9、10、11中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH)以及包括分别如SEQ ID NO:13、GAS、14中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL)，并且b)第二抗原结合区包含包括分别如SEQ ID NO:18、19、20中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH)以及包括分别如SEQ ID NO:22、DDN、23中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL)。

[0018] 或者，结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区，其中a)第一抗原结合区包含包括分别如SEQ ID NO:50、51、52中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH)以及包括分别如SEQ ID NO:54、SAS、55中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL)，并且b)第二抗原结合区包含包括分别如SEQ ID NO:18、19、20中所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH)以及包括分别如SEQ ID NO:22、DDN、23中所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL)。

[0019] 在本发明的另一个实施方案中，结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区，其源自人源化抗体，和/或与人PD-L1结合的第二抗原结合区，其源自人抗体。

[0020] 在进一步的方面，本发明涉及本发明的结合剂在医学中的用途，特别是用于治疗癌症。

[0021] 本发明的这些和其他方面以及实施方案，包括编码此类结合剂(例如抗体)的氨基酸序列的核酸；包含此类核酸的表达载体；包含此类核酸或表达载体的细胞；包含此类结合剂、核酸、表达载体或细胞的组合物；用于治疗癌症或其他疾病的此类结合剂、核酸、表达载体、细胞或组合物；生产此类结合剂(例如双特异性抗体)的方法；以及基于此类结合剂(例如多特异性，特别是双特异性抗体)的诊断方法和试剂盒将在下面进一步详细描述。

[0022] 附图简述

[0023] 图1：人、非洲象和野猪CD137的序列比对。非洲象和野猪CD137中与人序列中的氨基酸不同的氨基酸以黑色突出显示。

[0024] 图2：CD137改组构建体，其含有非洲象(改组5)或野猪(改组1-4、6)CD137域。

[0025] 图3：在HEK293-T17细胞上的CD137改组构建体表达。

[0026] 用CD137改组构建体转染HEK293-T17细胞。使用识别人、野猪和非洲象CD137的多克隆抗CD137抗体，通过流式细胞术测量构建体的细胞表面表达。

[0027] 图4：抗体CD137-009与HEK293-T17细胞上表达的CD137改组构建体的结合。用CD137改组构建体和用人CD137(hCD137 wt)、非洲象或野猪CD137转染HEK293-T17细胞。通过流式细胞术测量抗体CD137-009与HEK293-T17细胞上表达的这些构建体的结合。用多克隆抗CD137抗体染色显示为对照。

[0028] 图5：单价抗体b12-FEALxPD-L1-547-FEAR对PD-1/PD-L1相互作用的作用。在PD-1/

PD-L1抑制生物测定法中确定了b12-FEALxPD-L1-547-FEAR的作用。显示的数据是一个代表性实验的相对于对照(不添加抗体)的诱导倍数。

[0029] 图6:CD137xPD-L1双特异性抗体的预期作用模式的示意图。(A)PD-L1在抗原呈递细胞(APC)以及肿瘤细胞上表达。PD-L1与表达负调节分子PD-1的T细胞结合有效地超越了T细胞活化信号,并最终导致T细胞抑制。(B)添加CD137xPD-L1双特异性抗体后,经由PD-L1特异性臂阻断抑制性PD-1:PD-L1相互作用,并且同时双特异性抗体通过细胞间相互作用提供对T细胞上表达的CD137的激动性信号传导,导致强烈的T细胞共刺激。

[0030] 图7:在具有活性PD-1/PD-L1轴的抗原特异性T细胞测定法中通过CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR对PD-1/PD-L1介导的T细胞抑制的释放和另外的$CD8^+$T细胞增殖的共刺激。在存在0.1μg/mL和0.02μg/mL CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR、b12-FEALxPD-L1-547-FEAR或b12对照抗体的情况下,将用密蛋白(claudin)-6特异性TCR-和PD-1-体外翻译(IVT)-RNA电穿孔的CFSE标记的T细胞与经密蛋白-6-IVT-RNA电穿孔的未成熟树突细胞一起温育5天。通过流式细胞术测量$CD8^+$T细胞增殖。显示的数据是(A和C)来自两个不同供体的代表性CFSE直方图,以及(B和D)如使用FlowJo软件计算的相应的分裂细胞百分比和增殖指数。(B)显示对来自(A)中代表性显示的供体1的数据的分析。(D)显示对来自(C)中代表性显示的供体2的数据的分析。误差条(SD)表示实验中的变化(三次重复,使用来自一个供体的细胞)。

[0031] 图8:在具有活性PD1/PD-L1轴的抗原特异性T细胞测定法中,双特异性抗体CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR的EC_{50}值的分析。在存在CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR(从1至0.00015μg/mL的3倍连续稀释液)的情况下,将用密蛋白-6特异性TCR-和PD-1-IVT-RNA电穿孔的CFSE标记的T细胞与经密蛋白-6-IVT-RNA电穿孔的未成熟树突细胞一起温育5天。通过流式细胞术测量$CD8^+$T细胞增殖。显示的数据是分裂细胞的百分比(空心菱形)和增殖指数(实心三角形)作为抗体浓度的函数。误差条(SD)表示实验中的变化(六次重复,使用来自一个供体的细胞)。通过非线性回归拟合曲线,并使用GraphPad Prism软件确定EC_{50}值。

[0032] 图9:在具有活性PD1/PD-L1轴的抗原特异性T细胞测定法中,CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR与两种单价结合CD137抗体(CD137-009-FEALxb12-FEAR+b12-FEALxPD-L1-547-FEAR)或两种亲本抗体(CD137-009+PD-L1-547)的组合的比较。在存在0.25μg/mL(i)CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR,(ii)CD137-009-FEALxb12+b12-FEALxPD-L1-547-FEAR,(iii)CD137-009-FEALxb12,(iv)b12-FEALxPD-L1-547-FEAR,(v)CD137-009+PD-L1-547,(vi)CD137-009,(vii)PD-L1-547或(viii)b12对照抗体的情况下,将用密蛋白-6特异性TCR-和PD1-IVT-RNA电穿孔的CFSE标记的T细胞与经密蛋白-6-IVT-RNA电穿孔的未成熟树突细胞一起温育五天。通过流式细胞术测量$CD8^+$T细胞增殖。显示的数据为(A)代表性CFSE直方图,以及(B和C)如使用FlowJo软件计算的相应的分裂细胞百分比平均值和增殖指数。误差条(SD)表示实验中的变化(三次重复,使用来自一个供体的细胞)。

[0033] 图10:通过CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR进行来自人非小细胞肺癌组织切除的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的离体扩增。将来自切除组织的肿瘤片与10U/mL IL-2和指定浓度的CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR一起培养。培养10天后,收获细胞并通过流式细胞术分析。(A)TIL计数为与未处理对照相比的倍数扩增;(B)$CD3^+CD8^+$T细胞计数为与未处理对照相比的倍数扩增;(C)$CD3^+CD4^+$T细胞计为与未处理对照相比的倍数扩增;(D)$CD3^-CD56^+$NK细

胞计数为与未处理对照相比的倍数扩增。条代表n＝5个单独孔的平均值±SD,其中每孔两个肿瘤片作为起始材料。

[0034] 图11:在OT-1过继细胞转移设置中,mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A小鼠替代抗体对抗原特异性T细胞增殖的作用。从供体小鼠分离的卵清蛋白(OVA)特异性OT1^{+}Thy1.1^{+}双阳性细胞毒性T细胞经眶后(r.o.)注射入原生C57BL/6受体小鼠中。过继细胞转移后次日,用100μg OVA作为抗原刺激物对受体小鼠进行r.o注射,随后每小鼠进行r.o.注射100μg或20μg mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A、mCD137-3H3xb12或mPD-L1-MPDL3280Axb12抗体。注射PBS(在图中表示为单独的OVA)用作基线参考,且未处理的动物用作阴性对照。6天后,经由r.o.路径抽取100μL血液并针对Thy1.1^{+}CD8^{+}T细胞进行分析。显示的数据是(A)OT-1过继细胞转移实验概述的示意图,以及(B)第6天每个治疗组的Thy1.1^{+}CD8^{+}T细胞频率。正方形代表单个动物并且误差条(SD)表示实验中的变化(每组n＝5只小鼠)。使用单向方差分析与Tukey的多重比较检验进行统计分析;ns＝组之间无显著差异,***＝P<0.001。

[0035] 图12:mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A小鼠替代抗体在皮下同基因CT26小鼠肿瘤模型中的抗肿瘤功效。在肿瘤达到≥30mm^{3}的体积后,用每肿瘤腹腔内注射20μg(i)mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A、(ii)mCD137-3H3xb12或(iii)mPD-L1-MPDL3280Axb12抗体或(iv)PBS处理带有皮下CT26肿瘤的雌性BALB/c小鼠。给药时间表为:前八次注射每2-3天一次,随后每7天注射一次,直到实验结束。在第29天,经由r.o.路径抽取100μL血液并对gp70特异性CD8^{+}T细胞进行分析。显示的数据是(A)肿瘤生长曲线,其中每条线代表一只小鼠,(B)所得的Kaplan-Meier生存分析,以及(C)植入后第29天每个治疗组的gp70特异性CD8^{+}T细胞频率。PFS＝无进展生存。

[0036] 图13:单特异性二价PD-L1抗体和单价b12xPD-L1抗体与肿瘤细胞的结合。PD-L1-547和b12-FEALxPD-L1-547-FEAR与MDA-MB-231(A)、PC-3(B)和SK-MES-1(C)细胞的结合。显示的数据是如通过流式细胞术测定的平均荧光强度(MFI)。包括单特异性二价b12抗体作为阴性对照。

[0037] 图14:CD137抗体与在位置1至163处具有丙氨酸突变的CD137变体的结合。结合表示为zscore(倍数变化),作为与对照抗体相比结合的变化的量度。zscore(倍数变化)定义为(标准化gMFI$_{aa位置}$-μ)/σ,其中μ和σ是所有突变体上标准化gMFI的平均值和标准偏差。其中结合的zscore低于-1.5(以虚线表示)的残基被认为是“结合突变体的丧失”。结合中具有正zscore的残基是非交叉阻断CD137特异性对照抗体的结合残基的丧失。x轴上的数字是指氨基酸位置。(A)使用CD137-005-FEAR-A488作为非交叉阻断CD137特异性对照抗体进行标准化,b12-FEALxCD137-009-FEAR-A488与在位置1至163处具有丙氨酸或甘氨酸突变的CD137变体的结合的zscore。(B)使用CD137-MOR7480-FEAR-A488作为非交叉阻断CD137特异性对照抗体进行标准化,CD137-005-FEAR-A488与在位置1至163处具有丙氨酸或甘氨酸突变的CD137变体的结合的zscore。(C)使用CD137-005-FEAR-A488作为非交叉阻断CD137特异性对照抗体进行标准化,CD137-MOR7480-FEAR-A488与在位置1至163处具有丙氨酸或甘氨酸突变的CD137变体的结合的zscore。

[0038] 图15:在非抗原特异性T细胞增殖测定法中,PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR与两种单价对照(b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR+b12-FEALxPD-L1-547-FEAR)或两种亲本抗体(CD137-009-HC7LC2-FEAR+PD-L1-547-FEAR)的组合的比较。将CFSE标记的

PBMC与次优浓度的抗CD3抗体(0.03μg/mL和0.1μg/mL),或不与(w/o)抗CD3抗体(作为T细胞活化的阴性对照)温育,并在存在0.2μg/mL i)PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR、ii)b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR+b12-FEALxPD-L1-547-FEAR各自、iii)b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR、iv)b12-FEALxPD-L1-547-FEAR、v)CD137-009-HC7LC2-FEAR+PD-L1-547-FEAR各自、vi)CD137-009-HC7LC2-FEAR、vii)PD-L1-547-FEAR或viii)b12-IgG-FEAL对照抗体的情况下培养四天。通过流式细胞术测量$CD4^+$(A)和$CD8^+$(B)T细胞增殖。来自三个供体的数据显示为如使用FlowJo v10.4软件计算的三个重复的平均扩增指数。误差条(SD)表示实验中的变化(三次重复,使用来自一个供体的细胞)。

[0039] 图16:在非抗原特异性T细胞增殖测定法中,通过PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEARx确定诱导T细胞增殖的EC_{50}值。将CFSE标记的PBMC与次优浓度的抗CD3抗体和PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR(1-0.00015μg/mL)的连续稀释液或1μg/mL b12 IgG(作为对照抗体)一起温育4天。显示了来自两个代表性供体的数据;用0.03μg/mL的抗CD3刺激来自供体1的PBMC(A,B),并且用0.09μg/mL的抗CD3刺激来自供体2的PBMC(C,D)。通过流式细胞术测量$CD4^+$(A和C)和$CD8^+$(B和D)T细胞增殖。显示的数据是如使用FlowJo v10.4软件计算并用四参数对数拟合进行拟合的三个重复的平均扩增指数值。误差条(SD)表示实验中的变化(三次重复,使用来自一个供体的细胞)。

[0040] 图17:在具有或不具有对T细胞的PD-1电穿孔的抗原特异性T细胞测定法中,PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR对10种促炎细胞因子分泌的作用。在存在不同浓度的CD137-009-HC7LC2-FEALxPD-L1-547-FEAR(三倍连续稀释;范围从1μg/mL至0.00015μg/mL)或b12对照抗体b12-IgG-FEAL的情况下,将用CLDN6-特异性TCR-且用或不用2μg PD1-IVT-RNA电穿孔的T细胞与经CLDN6-IVT-RNA电穿孔的iDC一起温育。抗体添加后48小时,使用MSD V-Plex人促炎组1(10-Plex)试剂盒通过多重夹心免疫测定法测定上清液的细胞因子水平。每个数据点代表三个单独孔的平均值±SD。

[0041] 图18:在抗原非特异性T细胞测定法中,PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR对10种促炎细胞因子分泌的作用。在存在不同浓度的PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR(三倍连续稀释;范围从1μg/mL至0.00015μg/mL)或b12对照抗体b12-IgG-FEAL的情况下,用抗CD3抗体次优地刺激人PBMC。抗体添加后48小时,使用MSD V-Plex人促炎组1(10-Plex)试剂盒通过多重夹心免疫测定法测定上清液中的细胞因子水平。每个数据点代表三个单独孔的平均值±SD。

[0042] 发明详述

[0043] 定义

[0044] 术语“免疫球蛋白”是指由两对多肽链,一对轻(L)低分子量链和一对重(H)链组成的一类结构相关的糖蛋白,所有四个通过二硫键相互连接。免疫球蛋白的结构已得到充分表征。例如参见Fundamental Immunology Ch.7(Paul,W.,ed.,2nd ed.Raven Press,N.Y.(1989))。简言之,每条重链通常由重链可变区(本文缩写为VH或VH)和重链恒定区(本文缩写为CH或CH)组成。重链恒定区通常由三个域CH1,CH2和CH3组成。铰链区是重链的CH1和CH2域之间的区域,并且是高柔性的。铰链区中的二硫键是IgG分子中两条重链之间相互作用的一部分。每条轻链通常由轻链可变区(在本文中简称为VL或VL)和轻链恒定区(在本文中简称为CL或CL)组成。轻链恒定区通常由一个域CL组成。VH和VL区可进一步细分为高变性区

(或结构上定义的环的序列和/或形式上可高变的高变区),也称为互补决定区(CDR),其散布着更为保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL通常由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4(另参见Chothia and Lesk J.Mol.Biol.196,901-917(1987))。除非另有说明或与上下文矛盾,否则本文的CDR序列是根据DomainGapAlign(Lefranc MP.,Nucleic Acids Research 1999;27:209-212和Ehrenmann F.,Kaas Q.and Lefranc M.-P.Nucleic Acids Res.,38,D301-307(2010);还见因特网http地址www.imgt.org/)的IMGT规则鉴定。除非另有说明或与上下文矛盾,在本发明中提及恒定区中的氨基酸位置根据EU编号(Edelman et al.,Proc Natl Acad Sci U S A.1969May;63(1):78-85;Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版1991NIH Publication No.91-3242)。例如,本文的SEQ ID NO:93根据EU编号列出了IgG1m(f)重链恒定区的氨基酸位置118-447。

[0045] 如本文所用,术语“对应于位置…的氨基酸”是指人IgG1重链中的氨基酸位置编号。其他免疫球蛋白中相应的氨基酸位置可通过与人IgG1的比对找到。因此,一个序列中的氨基酸或片段“对应于”另一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或类似物)通常在默认设置与另一氨基酸或片段比对,并且与人IgG1重链具有至少50%,至少80%,至少90%或至少95%的同一性的氨基酸或片段。认为在本领域中公知的是如何比对序列或序列中的片段,从而确定与根据本发明的氨基酸位置的序列中的相应位置。

[0046] 在本发明的上下文中,术语“结合剂”是指能够结合所期望的抗原的任何试剂。在本发明的某些实施方案中,结合剂是抗体、抗体片段或其构建体。结合剂也可以包含合成的、修饰的或非天然存在的部分,特别是非肽部分。此类部分可以例如连接期望的抗原结合功能或区域,如抗体或抗体片段。在一个实施方案中,结合剂是包含抗原结合CDR或可变区的合成构建体。

[0047] 在本发明的上下文中,术语“抗体”(Ab)是指具有在典型的生理条件下以相当长的时间段的半衰期,例如至少约30分钟,至少约45分钟,至少约1小时,至少约2小时,至少约4小时,至少约8小时,至少约12小时,约24小时或更多,约48小时或更多,约3、4、5、6、7或更多天等,或任何其他相关的功能定义的时段(例如足以诱发,促进,增强和/或调节与抗体与抗原的结合相关的生理应答的时间和/或足以使抗体募集效应器活性的时间)与抗原特异性结合的能力的免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的片段或其任一者的衍生物。免疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。本文所用的术语“抗原结合区”是指与抗原相互作用并包含VH区和VL区两者的区域。术语抗体在本文中使用时不仅包含单特异性抗体,而且还包括包含多个,例如两个或多个,例如三个或更多个不同的抗原结合区的多特异性抗体。抗体(Ab)的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和补体系统的成分(例如C1q),即补体激活的经典途径中的第一成分。如上所述,除非另有说明或与上下文明显矛盾,否则本文中的术语抗体包括作为抗原结合片段,即,保留与抗原特异性结合的能力的抗体片段。已经显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段进行。术语“抗体”中涵盖的抗原结合片段的实例包括(i)Fab’或Fab片段,由VL,VH,CL和CH1域组成的单价片段或如WO2007059782(Genmab)中所述的单价抗体;(ii)$F(ab')_2$片段,包含在铰链区处通过二硫键连接的两个Fab片段的二价

片段;(iii)基本上由VH和CH1域组成的Fd片段;(iv)基本上由抗体单臂的VL和VH域组成的Fv片段,(v)基本上由VH域组成,也称为域抗体(Holt et al;Trends Biotechnol.2003Nov;21(11):484-90)的dAb片段(Ward et al.,Nature 341,544-546(1989));(vi)骆驼科抗体或纳米抗体分子(Revets et al;Expert Opin Biol Ther.2005Jan;5(1):111-24)和(vii)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个域VL和VH由不同的基因编码,但可以使用重组方法通过合成接头将它们连接起来,所述合成接头使它们能够制备成单一蛋白链,其中VL区和VH区配对以形成单价分子(称为单链抗体或单链Fv(scFv),参见例如Bird et al.,Science 242,423-426(1988)和Huston et al.,PNAS USA 85,5879-5883(1988))。除非另有说明或上下文明确指出,否则此类单链抗体涵盖在术语抗体内。尽管此类片段通常包括在抗体的含义内,但是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。在本发明的上下文中,这些和其他有用的抗体片段以及此类片段的双特异性形式在本文中进一步讨论。还应理解,除非另有说明,术语抗体还包括多克隆抗体、单克隆抗体(mAb)、抗体样多肽,例如嵌合抗体和人源化抗体,以及可通过任何已知技术,例如酶促裂解,肽合成和重组技术提供的保留与抗原特异性结合的能力的抗体片段(抗原结合片段)。产生的抗体可以具有任何同种型。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IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgD,IgA,IgE或IgM)。当在本文中提到特定同种型,例如IgG1时,该术语不限于特定的同种型序列,例如特定的IgG1序列,但用于表示抗体在序列上比其他同种型更接近该同种型,例如IgG1。因此,例如本发明的IgG1抗体可以是天然存在的IgG1抗体的序列变体,包括恒定区中的变异。

[0048] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指单一分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物显示出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,其具有源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,所述杂交瘤包含与永生化细胞融合的B细胞,所述B细胞获自转基因或转染色体非人动物,例如转基因小鼠,其具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0049] 在本发明的上下文中,术语“双特异性抗体”或“bs”是指具有由不同抗体序列限定的两个不同抗原结合区的抗体。在一些实施方案中,所述不同抗原结合区结合相同抗原上的不同表位。然而,在优选的实施方案中,所述不同的抗原结合区结合不同的靶抗原。双特异性抗体可以是任何形式,包括下文所述的任何双特异性抗体形式。

[0050] 当在本文中使用时,除非上下文矛盾,术语“Fab臂”或“臂”包括一个重链-轻链对,并且本文中与“半分子”可互换地使用。

[0051] 当双特异性抗体描述为包含“源自”第一抗体的半分子抗体和“源自”第二抗体的半分子抗体时,术语“源自”表示双特异性抗体是通过任何已知的方法将来自所述第一抗体和第二抗体中每种的所述半分子重组为所得的双特异性抗体产生的。在此上下文下,“重组”并不旨在受到任何特定的重组方法的限制,因此包括下文所述的所有产生双特异性抗体的方法,包括例如通过半分子交换的重组以及在核酸水平处进行重组和/或通过在同一细胞中两个半分子的共表达。

[0052] 在本发明的上下文中,术语“单价抗体”是指抗体分子能够结合抗原的单个分子,因此不能够使抗原或细胞交联。

[0053] 当在抗体的上下文中使用时，术语“全长”表示该抗体不是片段，但是含有通常在自然界中对于该同种型发现的特定同种型的所有域，例如IgG1抗体的VH，CH1，CH2，CH3，铰链，VL和CL域。

[0054] 当在本文中使用时，除非上下文矛盾，术语“Fc区”是指由免疫球蛋白重链的两个Fc序列组成的抗体区，其中所述Fc序列至少包含铰链区，CH2域和CH3域。

[0055] 当在本文中使用时，术语“第一和第二CH3区域之间的异二聚体相互作用”是指第一-CH3/第二-CH3异二聚体蛋白质中的第一CH3区域和第二CH3区域之间的相互作用。

[0056] 当在本文中使用时，术语“第一和第二CH3区的同二聚体相互作用”是指第一-CH3/第一-CH3同二聚体蛋白中的第一CH3区和另一个第一CH3区之间的相互作用以及第二CH3/第二CH3同二聚体蛋白中第二CH3区和另一个第二CH3区之间的相互作用。

[0057] 如本文所用，在抗体与预定抗原或表位结合的上下文中，术语“结合”或“能够结合”通常是具有对应于约10^{-7}M或更小，诸如约10^{-8}M或更小，诸如约10^{-9}M或更小，约10^{-10}M或更小，约10^{-11}M或甚至更小的K_D的亲和力结合，当使用Bio-Layer干扰量度法(BLI)进行测定时，或例如在使用抗原作为配体和抗体作为分析物，在BIAcore 3000仪器中使用表面等离子体共振(SPR)技术进行测定时。抗体以对应于K_D的亲和力结合预定抗原，所述K_D比所述抗体对除预定抗原或紧密相关抗原以外的非特异性抗原(例如BSA，酪蛋白)的结合K_D低至少10倍，例如低至少100倍，例如低至少1,000倍，例如低至少10,000倍，例如至少100,000倍。亲和力较高的量取决于抗体的K_D，因此，当抗体的K_D非常低(即抗体具有高度特异性)时，则对抗原的亲和力比对非特异性抗原的亲和力低的程度可以是至少10,000倍。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 在一个优选的实施方案中，本发明的抗体是分离的。如本文所用，“分离的抗体”旨在指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。在优选的实施方案中，特异性结合PD-L1和CD137的分离的双特异性抗体基本上不含特异性结合PD-L1或CD137的单特异性抗体。在另一个优选的实施方案中，抗体或包含抗体的药物组合物基本上不含不能结合PD-L1的天然产生的抗体。在另一个优选的实施方案中，相对于天然存在的抗PD-L1抗体的结构，本发明的抗体在其氨基酸序列上具有结构变化，其中所述结构变化导致所述抗体相对于所述天然存在的抗PD-L1抗体表现出的功能性改变的功能性，所述功能性选自下组：(i)PD-L1结合亲和力，(ii)抑制PD-L1与PD-1结合的能力，(iii)诱导Fc介导的效应器功能的能力和(iv)不诱导Fc介导的效应器功能的能力。

[0061] 当在本文中使用时，术语“PD-L1”是指程序性死亡配体1蛋白。PD-L1存在于人和其他物种中，因此，除非上下文矛盾，否则术语“PD-L1”不限于人PD-L1。人、猕猴(食蟹猴)、非洲象、野猪和小鼠PD-L1序列可分别通过Genbank登录号NP_054862.1、XP_005581836、XP_003413533、XP_005665023和NP_068693找到。人PD-L1的序列也显示在SEQ ID NO:28中，其中预测氨基酸1-18为信号肽。猕猴(食蟹猴)PD-L1的序列也显示在SEQ ID NO:29中，其中预测氨基酸1-18为信号肽。

[0062] 当在本文中使用时，术语“PD-L2”是指人程序性死亡1-配体2蛋白(Genbank登录号NP_079515)。

[0063] 当在本文中使用时，术语“PD-1”是指人程序性死亡1蛋白，也称为CD279。

[0064] 当在本文中使用时，术语“CD137”是指人137蛋白分化簇。CD137(4-1BB)，也称为TNFRSF9，是配体TNFSF9/4-1BBL的受体。据信CD137参与T细胞活化。在一个实施方案中，CD137是人CD137，具有UniProt登录号Q07011。人CD137的序列也显示在SEQ ID NO:30中，其中预测氨基酸1-23为信号肽。在一个实施方案中，CD137是食蟹猴(Macaca fascicularis)CD137，具有UniProt登录号A9YYE7-1。食蟹猴CD137的序列显示在SEQ ID NO:31中，其中预测氨基酸1-23为信号肽。野猪(Sus scrofa)CD137显示在SEQ ID NO:38中，其中预测氨基酸1-23为信号肽。非洲象(Loxodonta africana)CD137显示在SEQ ID NO:39中，其中预测氨基酸1-23为信号肽。

[0065] “PD-L1抗体”或“抗PD-L1抗体”是特异性结合抗原PD-L1，特别是人PD-L1的如上所述的抗体。

[0066] “CD137抗体”或“抗CD137抗体”是特异性结合抗原CD137的如上所述的抗体。

[0067] “CD137xPD-L1抗体”、“抗CD137xPD-L1抗体”、“PD-L1xCD137抗体”或“抗PD-L1xCD137抗体”是包含两个不同的抗原结合区的双特异性抗体，所述抗原结合区之一特异性结合抗原PD-L1并且所述抗原结合区之一特异性结合抗原CD137。

[0068] 本发明还提供了包含实施例抗体的VL区，VH区或一个或多个CDR的功能性变体的抗体。在抗体的上下文中使用的VL，VH或CDR的功能性变体仍然允许抗体至少保留“参考”或“亲本”抗体的相当大比例(至少约50％，60％，70％，80％，90％，95％或更多)亲和力和/或特异性/选择性，在某些情况下，此类抗体可以比亲本抗体以更大的亲和力，选择性和/或特异性结合。

[0069] 此类功能性变体通常与亲本抗体保持相当大的序列同一性。两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置数的函数(即，％同源性＝相同位置数/位置总数x 100)，其中要考虑到缺口的数量和每个缺口的长度，其需要被引入以实现两个序列的最佳比对。两个核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比可以例如使用已经并入ALIGN program(第2.0版)中的E.Meyers and W.Miller,Comput.Appl.Biosci 4,11-17(1988)的算法，使用PAM120加权残基表，12的缺口长度罚分和4缺口方法确定。此外，两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用Needleman and Wunsch,J.Mol.Biol.48,444-453(1970)算法确定。

[0070] 示例性的变体包括那些与亲本抗体序列的VH和/或VL和/或CDR区主要相差保守取代的变体。例如，变体中的10个，例如9、8、7、6、5、4、3、2或1个取代是保守的氨基酸残基取代。

[0071] 在本发明的上下文中，保守取代可以通过下表中反映的氨基酸类别内的取代来定义：

[0072] 用于保守取代的氨基酸残基类别

[0073]

酸性残基	Asp (D)和Glu (E)
碱性残基	Lys (K), Arg (R)和His (H)
亲水性不带电荷残基	Ser (S), Thr (T), Asn (N)和Gln (Q)
脂肪族不带电荷残基	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L)和Ile (I)
非极性不带电荷残基s	Cys (C), Met (M)和Pro (P)
芳香族残基	Phe (F), Tyr (Y)和Trp (W)

[0074] 在本发明的上下文中,除非另外指出,否则以下标记用于描述突变:i)将给定位置中的氨基酸取代写为例如K409R,意指用精氨酸取代蛋白质的位置409处的赖氨酸;ii)对于特定的变体,使用特定的三字母或一字母代码,包括代码Xaa和X表示任何氨基酸残基。因此,在位置409处用精氨酸取代赖氨酸称为:K409R,并且在位置409处用任何氨基酸残基取代赖氨酸称为K409X。若在位置409处缺失赖氨酸,则用K409*表示它。

[0075] 在本发明的上下文中,“抑制PD-L1与PD-1的结合”是指在能够结合PD-L1的抗体存在下,PD-L1与PD-1的结合的任何可检测的显著降低。通常,抑制是指由抗PD-L1抗体的存在引起的PD-L1与PD-1之间的结合的至少约10%的降低,例如至少约15%的降低,例如至少约20%的降低,例如至少40%的降低。PD-L1与PD-1结合的抑制可以通过任何合适的技术来确定。在一个实施方案中,如本文实施例6中所述确定抑制。

[0076] 除非与上下文矛盾,否则本文所用的术语“特异性”旨在具有以下含义。如果两种抗体结合相同的抗原和相同的表位,则它们具有“相同的特异性”。

[0077] 术语“表位”是指能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由诸如氨基酸或糖侧链等的分子的表面分组组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象性和非构象性表位的区别在于,在存在变性溶剂的情况下,与前者而非后者的结合丧失。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,例如被特异性抗原结合肽有效阻断或覆盖的氨基酸残基(换言之,氨基酸残基在特异性抗原结合肽的足迹内)。

[0078] 如本文所用,术语“嵌合抗体”是指下述抗体,其中可变区源自非人物种(例如,源自啮齿动物)并且恒定区源自不同物种,例如人。开发出用于治疗应用的嵌合单克隆抗体以降低抗体的免疫原性。如在嵌合抗体的上下文中使用,术语“可变区”或“可变域”是指包含免疫球蛋白的重链和轻链两者的CDR和框架区的区域。嵌合抗体可通过使用标准DNA技术,如Sambrook et al.,1989,Molecular Cloning:A laboratory Manual,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,第15章中所述来产生。嵌合抗体可以是遗传或酶工程化重组抗体。产生嵌合抗体在本领域技术人员的知识范围内,因此,可以通过除本文所述方法之外的方法来进行根据本发明的嵌合抗体的产生。

[0079] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指遗传工程化的非人抗体,其含有人抗体恒定域和经修饰以与人可变域含有高水平序列同源性的非人可变域。这可以通过将6个一起形

成抗原结合位点的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)的框架残基替换为人构架区(反向突变)。结构同源性建模可以帮助鉴定框架区中对于抗体的结合特性重要的氨基酸残基。因此,人源化抗体可包含非人CDR序列,主要是人框架区(其任选地包含一个或多个向非人氨基酸序列的氨基酸反向突变),以及完全人恒定区。任选地,可以应用不一定是反向突变的其他氨基酸修饰,以获得具有优选特性,例如亲和力和生物化学特性的人源化抗体。

[0080] 如本文所用,术语“人抗体”是指具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,由体外随机或位点特异性诱变或体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所用,术语“人抗体”不意图包括其中源自另一哺乳动物物种,例如小鼠或大鼠的种系的CDR序列已被植入到人框架序列上的抗体。人单克隆抗体可以通过多种技术产生,包括常规的单克隆抗体方法,例如,Kohler and Milstein,Nature 256:495(1975)的标准体细胞杂交技术。尽管体细胞杂交程序是优选的,但是原则上可以采用其他产生单克隆抗体的技术,例如,使用人抗体基因文库的B淋巴细胞的病毒或致癌转化或噬菌体展示技术。用于制备分泌人单克隆抗体的杂交瘤的合适的动物系统是鼠系统。在小鼠中产生杂交瘤是一种非常完善建立的程序。用于分离经免疫的脾细胞用于融合的免疫方案和技术是本领域已知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。因此,人单克隆抗体可以例如使用携带部分的人免疫系统而非小鼠或大鼠系统的转基因或转染色体小鼠或大鼠产生。因此,在一个实施方案中,人抗体获自转基因动物,例如小鼠或大鼠,其携带人种系免疫球蛋白序列替换动物免疫球蛋白序列。在此类实施方案中,抗体源自引入动物中的人种系免疫球蛋白序列,但是最终的抗体序列是所述人种系免疫球蛋白序列被内源性动物抗体机制通过体细胞超突变和亲和力成熟进一步修饰的结果,参见例如Mendez et al.1997Nat Genet.15(2):146-56。术语“还原条件”或“还原环境”是指底物(本文为抗体铰链区中的半胱氨酸残基)相比于被氧化更可能被还原的条件或环境。

[0081] 如本文所用,术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)旨在指已经引入有表达载体,例如编码本发明的抗体的表达载体的细胞。重组宿主细胞包括例如转染瘤,如CHO,CHO-S,HEK,HEK293,HEK-293F,Expi293F,PER.C6或NS0细胞,以及淋巴细胞。

[0082] 术语“治疗/处理”是指以缓解,改善,阻止或消除(治愈)症状或疾病状态为目的施用有效量的本发明的治疗活性抗体。

[0083] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指在必需的剂量且持续必需的时间段对于实现期望的治疗结果有效的量。抗体的治疗有效量可以随着因素,诸如个体的疾病状态,年龄,性别和体重以及抗体在个体中引起期望的应答的能力而变化。治疗有效量也是抗体或抗体部分的任何毒性或有害作用均被治疗有益作用超过的量。

[0084] 术语“抗独特型抗体”是指识别通常与抗体的抗原结合位点相关的独特决定簇的抗体。

[0085] 术语“竞争”是指第一抗体和第二抗体之间针对同一抗原的竞争。或者,“竞争(compete)”也可以指抗体与内源配体之间对结合内源配体的相应受体的竞争。如果抗体阻止内源配体与其受体的结合,则据说此类抗体阻断该配体与其受体的内源性相互作用,并

因此与内源配体竞争。本领域技术人员熟知如何测试抗体对结合靶抗原的竞争。此类方法的实例是所谓的交叉竞争测定法，其可以例如作为ELISA或通过流式细胞术进行。或者，可以使用生物层干涉术确定竞争。

[0086] 本发明的其他方面和实施方案

[0087] 如上所述，在第一方面，本发明涉及结合剂，其包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区，其中第二抗原结合区抑制人PD-L1与人PD-1的结合。

[0088] 因此，此类结合剂包含两个不同的抗原结合区，一个能够结合PD-L1，并且另一个能够结合CD137。

[0089] 如本发明的发明人所示，根据本发明的结合剂可以通过与CD137结合而在一个细胞中激活和/或诱导增殖，同时与另一细胞上的PD-L1结合。在人类中，CD137在活化的T细胞(如$CD8^+$T细胞和$CD4^+$T细胞)上表达，而PD-L1主要在抗原呈递细胞(APC)(如树突细胞或肿瘤细胞)上表达。因此，根据本发明能够结合CD137和PD-L1两者的结合剂，如双特异性抗体，能够同时结合T细胞和APC或T细胞和肿瘤细胞。因此，根据本发明的结合剂，如双特异性抗体，可以通过同时结合细胞上的PD-L1和CD137来介导APC和T细胞之间的细胞间相互作用。因此，这可以导致抗原特异性T细胞的增殖。此外，根据本发明的结合剂，如双特异性抗体，可以通过同时结合肿瘤细胞上的PD-L1和T细胞上的CD137来介导肿瘤细胞和T细胞之间的细胞间相互作用。因此，这可以通过与T细胞上的CD137结合而导致在存在肿瘤细胞的情况下T细胞的进一步活化，而肿瘤细胞上PD-L1的结合使T细胞和肿瘤细胞紧密接近。因此，在存在肿瘤细胞的情况下活化T细胞可以导致T细胞对肿瘤细胞的杀伤增强。此外，根据本发明的结合剂的PD-L1抗原结合区抑制肿瘤细胞上的PD-L1与T细胞上的PD-1结合的能力阻止了肿瘤细胞能够诱导T细胞抑制，从而逃避了活化T细胞的抗肿瘤作用。

[0090] 因此，本发明的结合剂，双特异性抗体，可以用于治疗可以得益于T细胞的再活化的疾病，如癌症。

[0091] 在本发明的一个实施方案中，第二抗原结合区与如SEQ ID NO:28中所示的人PD-L1或其成熟多肽结合。

[0092] 在本发明的一个实施方案中，第二抗原结合区与如SEQ ID NO:29中所示的食蟹猴(Macaca fascicularis)PD-L1或其成熟多肽结合。因此，具有针对人和食蟹猴PD-L1两者具有交叉特异性的抗原结合区的结合剂适用于食蟹猴的临床前测试。

[0093] 能够结合相同抗原如PD-L1的不同结合剂如抗体可以结合所述抗原的不同区域。在一些情况下，一种PD-L1抗体与PD-L1的结合仍可以允许不同的PD-L1抗体与PD-L1的结合。但是，在其他情况下，一种PD-L1抗体与PD-L1的结合可以与不同的PD-L1抗体与PD-L1的结合竞争(阻断)。因此，竞争实验提供了抗体在靶抗原上结合的位置的信息，其可能影响抗体结合的功能效果。

[0094] 在本发明的一个实施方案中，与人PD-L1结合的第二抗原结合区不与人PD-L2结合。

[0095] 在本发明的一个实施方案中，所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含抗体的重链和轻链可变区，其与包含以下的抗体竞争人PD-L1结合：

[0096] a.重链可变区，其包含重链互补决定区3(HCDR3)，所述HCDR3具有SEQ ID NO:20中

所示的序列或其中SEQ ID NO:20中多达一个氨基酸(如一个氨基酸)经修饰的序列,和

[0097] b.轻链可变区,其包含轻链互补决定区3(LCDR3),所述LCDR3具有SEQ ID NO:23中所示的序列或其中SEQ ID NO:23中多达两个氨基酸(如两个氨基酸,如一个氨基酸)经修饰的序列。

[0098] 在本发明的一个实施方案中,所述经修饰的氨基酸可以是氨基酸取代,如保守氨基酸取代。在本发明的一个实施方案中,在SEQ ID NO:20中修饰多达一个氨基酸,如在SEQ ID NO:20中多达一个保守氨基酸取代。在本发明的一个实施方案中,在SEQ ID NO:23中修饰多达两个氨基酸,如在SEQ ID NO:23中一个,如两个保守氨基酸取代。

[0099] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含抗体的重链和轻链可变区,其与包含以下的抗体竞争人PD-L1结合:

[0100] a.重链可变区,其包含重链互补决定区1、2和3(HCDR1、HCDR2和HCDR3),其分别具有SEQ ID NO:18、19和20中所示的序列,和

[0101] b.轻链可变区,其包含轻链互补决定区1、2和3(LCDR1、LCDR2和LCDR3),其分别具有SEQ ID NO:22、DDN和23中所示的序列。

[0102] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含抗体的重链和轻链可变区,其与包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的抗原结合区竞争结合人PD-L1,其中VH包含如SEQ ID NO:17中所示的序列,且VL包含如SEQ ID NO:21中所示的序列。竞争与靶抗原结合的抗体可以结合抗原上的不同表位,其中表位彼此如此接近,以至于与一个表位结合的第一抗体阻止了第二抗体与另一表位结合。然而,在其他情况下,两种不同的抗体可以结合抗原上的相同表位,并在竞争结合测定法中竞争结合。

[0103] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含抗体的重链和轻链可变区,所述抗体具有包含以下重链可变区和轻链可变区的抗体对PD-L1的特异性,所述重链可变区包含HCDR3,其具有SEQ ID NO:20中所示的序列或其中SEQ ID NO:20中多达一个氨基酸被修饰的序列,所述轻链可变区包含LCDR3,其具有SEQ ID NO:23中所示的序列或其中SEQ ID NO:23中多达两个氨基酸被修饰的序列。

[0104] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含抗体的重链和轻链可变区,所述抗体与包含重链可变区和轻链可变区的抗体结合PD-L1上的相同表位,所述重链可变区包含HCDR1、HCDR2和HCDR3,其分别具有SEQ ID NO:18、19和20中所示的序列,或其中在SEQ ID NO:18、19和20中所示的HCDR序列上总共多达一个氨基酸被修饰的序列,所述轻链可变区包含LCDR1、LCDR2和LCDR3,其分别具有SEQ ID NO:22、DDN和23中所示的序列,或其中在SEQ ID NO:22、DDN和23中所示的LCDR序列上总共多达两个氨基酸被修饰的序列。由此,描述了允许VH的三个HCDR序列中多达一个氨基酸修饰和VL的三个LCDR序列中多达两个氨基酸修饰的实施方案。

[0105] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区与包含VH和VL的抗体结合人PD-L1的相同表位,所述VH包含如SEQ ID NO:17中所示的序列,所述VL包含如SEQ ID NO:21中所示的序列。因此,在一个实施方案中,与人PD-L1结合的抗原结合区与包含特定VH和VL序列的抗体结合相同的表位应理解为:本发明的结合剂和抗体与PD-L1分子上的相同氨基酸结合。可以通过本领域技术人员已知的标准丙氨酸扫描实验或抗体-抗原结晶实验来确定结合剂和一种或多种抗体与靶抗原上的相同表位结合。

[0106] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含包括HCDR3的重链可变区(VH),所述HCDR3具有SEQ ID NO:20中所示的序列或其中在SEQ ID NO:20中多达一个氨基酸被修饰的序列。

[0107] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含包括HCDR2的重链可变区(VH),所述HCDR2具有SEQ ID NO:19中所示的序列或其中在SEQ ID NO:19中多达一个氨基酸被修饰的序列。

[0108] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含包括HCDR1的重链可变区(VH),所述HCDR1具有SEQ ID NO:18中所示的序列或其中在SEQ ID NO:18中多达一个氨基酸被修饰的序列。

[0109] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:18、19和20中所示的序列,其中在三个HCDR序列中总共多达三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在三个HCDR序列中总共多达一个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在三个HCDR序列中总共多达两个氨基酸被修饰。在一个实施方案中,在相同的HCDR序列中多达两个氨基酸被修饰。在一个实施方案中,在不同的HCDR序列中多达两个氨基酸被修饰。在一个实施方案中,在三个HCDR序列中总共多达三个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰。在一个实施方案中,在相同的HCDR序列中多达三个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰。在一个实施方案中,在不同的HCDR序列中多达三个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰。

[0110] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:18、19和20中所示的序列。

[0111] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含包括LCDR3的轻链可变区(VL),所述LCDR3具有SEQ ID NO:23中所示的序列或其中在SEQ ID NO:23中多达两个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。

[0112] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含包括LCDR2的轻链可变区(VL),所述LCDR2具有DDN所示的序列或其中在DDN中多达一个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。

[0113] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含包括LCDR1的轻链可变区(VL),所述LCDR1具有SEQ ID NO:22中所示的序列或其中在SEQ ID NO:22中多达两个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。

[0114] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:22、DDN和23中所示的序列,其中在三个LCDR序列中总共多达两个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰。

[0115] 在本发明的一个实施方案中,所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:22、DDN和23中所示的序列。

[0116] 在本发明的一个实施方案中，所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH)和包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL)，其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别是如SEQ ID NO:18、19和20中所示的序列，并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别是如SEQ ID NO:22、DDN和23中所示的序列。

[0117] 在本发明的一个实施方案中，所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)，其包含与如SEQ ID NO:17中所示的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。

[0118] 在本发明的一个实施方案中，其中所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含轻链可变区(VL)，其包含与如SEQ ID NO:21中所示的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。

[0119] 因此，例如，所述能够与人PD-L1结合的抗原结合区包含：

[0120] 与SEQ ID NO:17中所示的VH序列具有至少70％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:21所示的VL序列具有至少70％氨基酸序列同一性的VL序列，或

[0121] 与SEQ ID NO:17中所示的VH序列具有至少75％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:21所示的VL序列具有至少75％氨基酸序列同一性的VL序列，或

[0122] 与SEQ ID NO:17中所示的VH序列具有至少80％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:21所示的VL序列具有至少80％氨基酸序列同一性的VL序列，或

[0123] 与SEQ ID NO:17中所示的VH序列具有至少85％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:21所示的VL序列具有至少85％氨基酸序列同一性的VL序列，或

[0124] 与SEQ ID NO:17中所示的VH序列具有至少90％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:21所示的VL序列具有至少90％氨基酸序列同一性的VL序列，或

[0125] 与SEQ ID NO:17中所示的VH序列具有至少95％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:21所示的VL序列具有至少95％氨基酸序列同一性的VL序列，或

[0126] 与SEQ ID NO:17中所示的VH序列具有至少97％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:21所示的VL序列具有至少97％氨基酸序列同一性的VL序列，或

[0127] 与SEQ ID NO:17中所示的VH序列具有至少99％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:21所示的VL序列具有至少99％氨基酸序列同一性的VL序列，或

[0128] 与SEQ ID NO:17中所示的VH序列具有至少100％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:21所示的VL序列具有至少100％氨基酸序列同一性的VL序列。

[0129] 在本发明的一个实施方案中，所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)，其中VH包含如SEQ ID NO:17中所示的序列。

[0130] 在本发明的一个实施方案中，所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含轻链可变区(VL)，其中VL包含如SEQ ID NO:21中所示的序列。

[0131] 在本发明的一个优选实施方案中，所述与人PD-L1结合的第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和可变区(VL)，其中VH包含如SEQ ID NO:17中所示的序列，并且VL包含如SEQ ID NO:21中所示的序列。

[0132] 在进一步的实施方案中，所述VH和VL序列各自包含三个CDR序列，分别为CDR1、

CDR2和CDR3,以及四个框架序列,分别为FR1、FR2、FR3和FR4,并且VH的各自组合的FR1、FR2、FR3和FR4框架序列与所述VH序列的各自组合的FR1、FR2、FR3和FR4框架序列具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%的氨基酸序列同一性,且其中VH CDR序列未突变,并且其中VL的各自组合的FR1、FR2、FR3和FR4框架序列与所述VL序列的各自组合的FR1、FR2、FR3和FR4框架序列具有至少90%、至少95%、至少97%或至少99%的氨基酸序列同一性,且其中VL CDR序列未突变。在该实施方案的上下文中,%同一性是指将框架序列一起视为一个连续序列而没有中间CDR序列时所获得的同一性百分比。

[0133] CD137

[0134] 如上所述,本发明的上述结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合。因此,根据本发明的结合剂可以是双特异性抗体,其具有与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中第二抗原结合区抑制人PD-L1与人PD-1的结合。

[0135] 在本发明的一个实施方案中,第一抗原结合区与如SEQ ID NO:30中所示的人CD137或其成熟多肽结合。

[0136] 在本发明的一个实施方案中,第一抗原结合区与如SEQ ID NO:31中所示的食蟹猴(Macaca fascicularis)CD137或其成熟多肽结合。因此,具有针对人和食蟹猴CD137两者具有交叉特异性的抗原结合区的结合剂适用于食蟹猴的临床前测试。

[0137] 在本发明的一个实施方案中,通过与用以下构建体转染的细胞的细胞结合测量,第一抗原结合区与如SEQ ID NO:30中所示的人CD137或其成熟多肽结合的程度高于与如SEQ ID NO:33中所示的突变体人CD137或其成熟多肽结合的程度。如SEQ ID NO:33中所示的突变体人CD137(改组5/象)对应于以下人CD137的氨基酸序列,其中氨基酸48-88被来自象CD137的相应氨基酸替换。在本发明的一个实施方案中,与如SEQ ID NO:30中所示的人CD137或其成熟多肽相比,第一抗原结合区与如SEQ ID NO:33中所示的突变体人CD137(改组5/象)或其成熟多肽的结合减少。在本发明的一个实施方案中,第一抗原结合区不结合如SEQ ID NO:33中所示的突变体人CD137或其成熟多肽(改组5/象)。因此,在本发明的一个实施方案中,与人CD137结合的第一抗原结合区与人CD137的表位结合,其位于由SEQ ID NO:30的位置48-88限定的氨基酸序列内,对应于SEQ ID NO:41的位置25-65,如表位,其包含或需要SEQ ID NO:30的位置48-88(对应于SEQ ID NO:41的位置25-65)处的以下氨基酸的一个或多个:C、P、P、N、S、F、S、S、A、G、G、Q、R、T、C、D、I、C、R、Q、C、K、G、V、F、R、T、R、K、E、C、S、S、T、S、N、A、E、C、D、C。第一抗原结合区与人CD137的结合可以取决于SEQ ID NO:30的位置48-88(对应于SEQ ID NO:41的位置25-65)所限定的氨基酸的序列内的任何氨基酸残基,如SEQ ID NO:30的位置48-88(对应于SEQ ID NO:41的位置25-65)处的以下氨基酸的一个或多个:C、P、P、N、S、F、S、S、A、G、G、Q、R、T、C、D、I、C、R、Q、C、K、G、V、F、R、T、R、K、E、C、S、S、T、S、N、A、E、C、D、C。

[0138] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区与如SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列中的至少一个氨基酸结合,如至少2个、至少3个、至少4个或至少5个氨基酸。

[0139] 具体而言,如当通过丙氨酸扫描确定时;例如如以下和实施例13中所述,根据本发明的抗体与人CD137的结合可以取决于以下氨基酸残基中的一个或多个:SEQ ID NO:41中位置13处的Phe(F)、位置30处的Phe(F)、位置38处的Thr(T)、位置40处的Asp(D)和位置60处

的Asn(N)，其分别对应于SEQ ID:30中的F36、F53、T61、D63和N83。

[0140] 根据该实施方案，与具有SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列的野生型CD137相比，抗体与以下突变体CD137的结合得以减少，所述突变体CD137中在对应于SEQ ID NO:41中位置13、30、38、40和60的位置处的任何一个或多个氨基酸残基已被丙氨酸取代。优选地，结合减少确定为所述抗体的zscore(倍数变化)小于-1.5，其中如实施例13中所述计算抗体与突变体CD137结合的zscore(倍数变化)。

[0141] 位置13处的Phe(F)和/或位置30处的Phe(F)可能对表位具有结构影响，而没有直接参与抗体的结合。因此，根据本发明的抗体可以结合人CD137上的表位，其中SEQ ID NO:41中位置38处的Thr(T)、位置40处的Asp(D)和/或位置60处的Asn(N)直接参与抗体的结合。

[0142] 在另一个实施方案中，根据本发明的抗体与人CD137的结合可以取决于以下氨基酸残基的一个或多个：SEQ ID NO:41中位置1处的Leu(L)、位置2处的Lln(Q)、位置4处的Pro(P)、位置11处的Gly(G)、位置12处的Thr(T)、位置15处的Asp(D)和位置20处的Gln(Q)，其分别对应于SEQ ID NO:30的L24、Q25、P27、G34、T35、D38和Q43。

[0143] 根据该实施方案，与具有SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列的野生型CD137相比，抗体与以下突变体CD137的结合得以减少，所述突变体CD137中在对应于SEQ ID NO:41中位置1、2、4、11、12、15和20的位置处的任何一个或多个氨基酸残基已被丙氨酸取代。优选地，结合减少确定为所述抗体的zscore(倍数变化)小于-1.5，其中如实施例13中所述计算抗体与突变体CD137结合的zscore(倍数变化)。

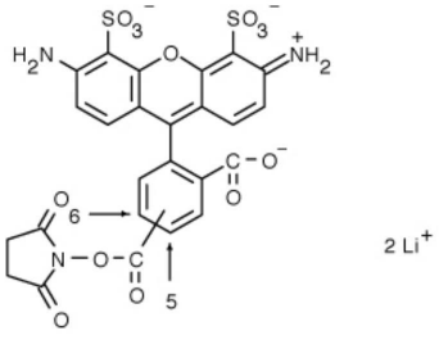
[0144] 比较与野生型和丙氨酸取代的CD137的结合的规程可以包括以下步骤：

[0145] i)在合适的细胞系如HEK293细胞中表达野生型和丙氨酸取代的CD137；

[0146] ii)转染后一天收获细胞，并且对于每个数据点，在FACS缓冲液(磷酸盐缓冲盐水(PBS)，1％牛血清白蛋白，0.02％叠氮化钠)中，将100.000个细胞的样品与如经根据式I的化合物(A488)标记的本发明的抗体在室温下温育30分钟；

[0147] iii)用FACS缓冲液洗涤每个样品，并通过流式细胞术对其进行分析，并确定抗体结合的荧光强度的几何平均值(gMFI)；和

[0148] iv)如实施例13中所述将数据标准化为非交叉阻断CD137特异性抗体的结合强度并计算zscore(倍数变化)。

[0149] 

式I

[0150] 如实施例13中所述，可以使用以下等式针对非交叉阻断CD137特异性对照抗体的结合强度对数据进行标准化：

[0151] $$标准化gMFI_{aa位置} = Log_{10}\left(\frac{gMFI_{测试Ab}}{gMFI_{对照Ab}}\right)$$

[0152] 其中的“aa位置”是指突变为丙氨酸或甘氨酸的位置。

[0153] 可以根据以下计算来计算zscore：

[0154] $$zscore(倍数变化) = \frac{标准化gMFI_{aa位置} - \mu}{\sigma}$$

[0155] 其中μ和σ是从所有突变体计算出的标准化gMFI的平均值和标准偏差。

[0156] 在本发明的一个实施方案中，当通过与用SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:30中所示的构建体转染的细胞的细胞结合测量时，第一抗原结合区与如SEQ ID NO:34中所示的突变体人CD137(改组4/野猪)或其成熟多肽结合的程度和其与如SEQ ID NO:30中所示的人CD137或其成熟多肽结合的程度相同。如SEQ ID NO:34中所示的突变体人CD137(改组4/野猪)对应于以下人CD137的氨基酸序列，其中氨基酸89-114被来自野猪CD137的相应氨基酸替换。因此，在本发明的一个实施方案中，与人CD137结合的第一抗原结合区不与人CD137的表位结合，其包含或需要SEQ ID NO:30的位置89-114处的一个或多个氨基酸。

[0157] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区与包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的抗原结合区竞争结合人CD137，其中VH包含如SEQ ID NO:8中所示的序列，且VL包含如SEQ ID NO:12中所示的序列。

[0158] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区与包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的抗原结合区竞争结合人CD137，其中VH包含如SEQ ID NO:15中所示的序列，且VL包含如SEQ ID NO:16中所示的序列。

[0159] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区与包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的抗原结合区竞争结合人CD137，其中VH包含如SEQ ID NO:49中所示的序列，且VL包含如SEQ ID NO:53中所示的序列。

[0160] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含抗体的重链和轻链可变区，其与包含以下的抗体竞争人CD137结合：

[0161] a.重链可变区，其包含重链互补决定区3(HCDR3)，其具有SEQ ID NO:11中所示的序列或其中SEQ ID NO:11中多达三个氨基酸(如三个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸)经修饰的序列，和

[0162] b.轻链可变区，其包含轻链互补决定区3(LCDR3)，其具有SEQ ID NO:14中所示的序列或其中SEQ ID NO:14中多达四个氨基酸(如四个氨基酸，如三个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸)经修饰的序列。

[0163] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含抗体的重链和轻链可变区，其与包含以下的抗体竞争人CD137结合：

[0164] a.重链可变区，其包含重链互补决定区3(HCDR3)，其具有SEQ ID NO:52中所示的序列或其中SEQ ID NO:52中多达三个氨基酸(如三个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸)经修饰的序列，和

[0165] b.轻链可变区，其包含轻链互补决定区3(LCDR3)，其具有SEQ ID NO:55中所示的序列或其中SEQ ID NO:55中多达四个氨基酸(如四个氨基酸，如三个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸)经修饰的序列。

[0166] 在本发明的一个实施方案中，在HCDR3序列中多达一个氨基酸，如一个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中，在HCDR3序列中多达两个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸被修饰。在一个实施方案中，在HCDR3序列中多达三个氨基酸，如三个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中，在LCDR3序列中多达一个氨基酸，如一个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中，在LCDR3序列中多达两个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸被修饰。在一个实施方案中，在LCDR3序列中多达三个氨基酸，如三个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸被修饰。在一个实施方案中，在LCDR3序列中多达四个氨基酸，如四个氨基酸，如三个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸被修饰。

[0167] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含抗体的重链和轻链可变区，其与包含以下的抗体竞争人CD137结合：

[0168] a.重链可变区，其包含重链互补决定区1、2和3(HCDR1、HCDR2和HCDR3)，其分别具有SEQ ID NO:9、10和11中所示的序列，和

[0169] b.轻链可变区，其包含轻链互补决定区1、2和3(LCDR1、LCDR2和LCDR3)，其分别具有SEQ ID NO:13、GAS和14中所示的序列。

[0170] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含抗体的重链和轻链可变区，其与包含以下的抗体竞争人CD137结合：

[0171] a.重链可变区，其包含重链互补决定区1、2和3(HCDR1、HCDR2和HCDR3)，其分别具有SEQ ID NO:50、51和52中所示的序列，和

[0172] b.轻链可变区，其包含轻链互补决定区1、2和3(LCDR1、LCDR2和LCDR3)，其分别具有SEQ ID NO:54、SAS和55中所示的序列。

[0173] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区与包含以下的抗体结合人CD137的相同表位：如SEQ ID NO:15中所示的VH序列和如SEQ ID NO:16中所示的VL序列。

[0174] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区与包含以下的抗体结合人CD137的相同表位：如SEQ ID NO:49中所示的VH序列和如SEQ ID NO:53中所示的VL序列。

[0175] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含抗体的重链和轻链可变区，所述抗体对包含以下重链可变区和轻链可变区的抗体的CD137具有特异性：所述重链可变区包含HCDR3，其具有SEQ ID NO:11中所示的序列或其中SEQ ID NO:11中多达三个氨基酸，如三个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸被修饰的序列，所述轻链可变区包含LCDR3，其具有SEQ ID NO:14中所示的序列或其中SEQ ID NO:14中多达四个氨基酸，如三个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸被修饰的序列。

[0176] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含抗体的重链和轻链可变区，所述抗体对包含以下重链可变区和轻链可变区的抗体的CD137具有特异性：所述重链可变区包含HCDR3，其具有SEQ ID NO:52中所示的序列或其中SEQ ID NO:52中多达三个氨基酸，如三个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸被修饰的序列，所述轻链可变区包含LCDR3，其具有SEQ ID NO:55中所示的序列或其中SEQ ID NO:55中多达四个氨基酸，如三个氨基酸，如两个氨基酸，如一个氨基酸被修饰的序列。

[0177] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括

HCDR3的重链可变区(VH),所述HCDR3具有SEQ ID NO:11中所示的序列或其中在SEQ ID NO:11中多达三个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。在本发明的一个实施方案中,在HCDR3序列中多达一个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR3序列中多达两个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR3序列中多达三个氨基酸被修饰。

[0178] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括HCDR3的重链可变区(VH),所述HCDR3具有SEQ ID NO:52中所示的序列或其中在SEQ ID NO:52中多达三个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。在本发明的一个实施方案中,在HCDR3序列中多达一个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR3序列中多达两个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR3序列中多达三个氨基酸被修饰。

[0179] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括HCDR2的重链可变区(VH),所述HCDR2具有SEQ ID NO:10中所示的序列或其中在SEQ ID NO:10中多达三个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。在本发明的一个实施方案中,在HCDR2序列中多达一个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR2序列中多达两个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR2序列中多达三个氨基酸被修饰。

[0180] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括HCDR2的重链可变区(VH),所述HCDR2具有SEQ ID NO:51中所示的序列或其中在SEQ ID NO:51中多达三个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。在本发明的一个实施方案中,在HCDR2序列中多达一个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR2序列中多达两个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR2序列中多达三个氨基酸被修饰。

[0181] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括HCDR1的重链可变区(VH),所述HCDR1具有SEQ ID NO:9中所示的序列或其中在SEQ ID NO:9中多达三个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。在本发明的一个实施方案中,在HCDR1序列中多达一个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR1序列中多达两个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR1序列中多达三个氨基酸被修饰。

[0182] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括HCDR1的重链可变区(VH),所述HCDR1具有SEQ ID NO:50中所示的序列或其中在SEQ ID NO:50中多达三个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。在本发明的一个实施方案中,在HCDR1序列中多达一个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR1序列中多达两个氨基酸被修饰。在本发明的一个实施方案中,在HCDR1序列中多达三个氨基酸被修饰。

[0183] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:9、10和11中所示的序列,其中在三个HCDR序列中总共多达三个氨基酸被修饰。

[0184] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括

HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:50、51和52中所示的序列,其中在三个HCDR序列中总共多达三个氨基酸被修饰。

[0185] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:9、10和11中所示的序列。

[0186] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:50、51和52中所示的序列。

[0187] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括LCDR3的轻链可变区(VL),所述LCDR3具有SEQ ID NO:14中所示的序列或其中在SEQ ID NO:14中多达四个氨基酸,如四个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。

[0188] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括LCDR3的轻链可变区(VL),所述LCDR3具有SEQ ID NO:55中所示的序列或其中在SEQ ID NO:55中多达四个氨基酸,如四个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。

[0189] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括LCDR2的轻链可变区(VL),所述LCDR2具有GAS中所示的序列或其中在GAS中多达两个氨基酸被修饰的序列。在本发明的一个实施方案中,在GAS序列中多达一个氨基酸被修饰。

[0190] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括LCDR2的轻链可变区(VL),所述LCDR2具有SAS中所示的序列或其中在SAS中多达两个氨基酸被修饰的序列。在本发明的一个实施方案中,在SAS序列中多达一个氨基酸被修饰。

[0191] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括LCDR1的轻链可变区(VL),所述LCDR1具有SEQ ID NO:13中所示的序列或其中在SEQ ID NO:13中多达四个氨基酸,如四个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。

[0192] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括LCDR1的轻链可变区(VL),所述LCDR1具有SEQ ID NO:54中所示的序列或其中在SEQ ID NO:54中多达四个氨基酸,如四个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰的序列。

[0193] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:13、GAS、14中所示的序列,其中在三个HCDR序列中总共多达四个氨基酸,如四个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰。

[0194] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:54、SAS、55中所示的序列,其中在三个HCDR序列中总共多达四个氨基酸,如四个氨基酸,如三个氨基酸,如两个氨基酸,如一个氨基酸被修饰。

[0195] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括

LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL)，其中LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:13、GAS、14中所示的序列。

[0196] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL)，其中LCDR1，LCDR2和LCDR3序列分别包含如SEQ ID NO:54、SAS、55中所示的序列。

[0197] 在本发明的一个优选实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的中链可变区(VH)和包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL)，其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别是如SEQ ID NO:9、10、11中所示的序列并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别是如SEQ ID NO:13、GAS、14中所示的序列。

[0198] 在本发明的一个优选实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的中链可变区(VH)和包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL)，其中HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别是如SEQ ID NO:50、51和52中所示的序列并且LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别是如SEQ ID NO:54、SAS、55中所示的序列。

[0199] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)，其包含与如SEQ ID NO:15中所示的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。在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)，其包含与如SEQ ID NO:8中所示的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。

[0200] 在本发明的一个实施方案中，所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)，其包含与如SEQ ID NO:49中所示的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。

[0201] 在本发明的一个实施方案中，其中所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含轻链可变区(VL)，其包含与如SEQ ID NO:16中所示的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。

[0202] 在本发明的一个实施方案中，其中所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含轻链可变区(VL)，其包含与如SEQ ID NO:12中所示的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。

[0203] 在本发明的一个实施方案中，其中所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含轻链可变区(VL)，其包含与如SEQ ID NO:53中所示的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。

[0204] 因此，例如，所述能够与人CD137结合的第一抗原结合区包含：

[0205] 与SEQ ID NO:15中所示的VH序列具有至少70％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:16所示的VL序列具有至少70％氨基酸序列同一性的VL序列，或

[0206] 与SEQ ID NO:15中所示的VH序列具有至少75％氨基酸序列同一性的VH序列和与

SEQ ID NO:16所示的VL序列具有至少75％氨基酸序列同一性的VL序列,或

[0207] 与SEQ ID NO:15中所示的VH序列具有至少80％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:16所示的VL序列具有至少80％氨基酸序列同一性的VL序列,或

[0208] 与SEQ ID NO:15中所示的VH序列具有至少85％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:16所示的VL序列具有至少85％氨基酸序列同一性的VL序列,或

[0209] 与SEQ ID NO:15中所示的VH序列具有至少90％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:16所示的VL序列具有至少90％氨基酸序列同一性的VL序列,或

[0210] 与SEQ ID NO:15中所示的VH序列具有至少95％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:16所示的VL序列具有至少95％氨基酸序列同一性的VL序列,或

[0211] 与SEQ ID NO:15中所示的VH序列具有至少97％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:16所示的VL序列具有至少97％氨基酸序列同一性的VL序列,或

[0212] 与SEQ ID NO:15中所示的VH序列具有至少99％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:16所示的VL序列具有至少99％氨基酸序列同一性的VL序列,或

[0213] 与SEQ ID NO:15中所示的VH序列具有至少100％氨基酸序列同一性的VH序列和与SEQ ID NO:16所示的VL序列具有至少100％氨基酸序列同一性的VL序列。

[0214] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH),其中VH包含如SEQ ID NO:15中所示的序列。

[0215] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),其中VL包含如SEQ ID NO:16中所示的序列。

[0216] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含如SEQ ID NO:15中所示的序列且VL包含如SEQ ID NO:16中所示的序列。

[0217] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH),其中VH包含如SEQ ID NO:8中所示的序列。

[0218] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),其中VL包含如SEQ ID NO:12中所示的序列。

[0219] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含如SEQ ID NO:8中所示的序列且VL包含如SEQ ID NO:12中所示的序列。

[0220] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH),其中VH包含如SEQ ID NO:49中所示的序列。

[0221] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),其中VL包含如SEQ ID NO:53中所示的序列。

[0222] 在本发明的一个实施方案中,所述与人CD137结合的第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含如SEQ ID NO:49中所示的序列且VL包含如SEQ ID NO:53中所示的序列。

[0223] 双特异性结合剂

[0224] 如上所述,根据本发明的结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区。因此,根据本发明的结合剂可以是多特异性结合剂,例如,多特

异性抗体或双特异性抗体。

[0225] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0226] a.第一抗原结合区包含包括HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR3序列如SEQ ID NO:11中所示,并且

[0227] b.第二抗原结合区包含包括HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR3序列如SEQ ID NO:20中所示。

[0228] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0229] a.第一抗原结合区包含包括HCDR2序列的重链可变区(VH),所述HCDR2序列如SEQ ID NO:10中所示,并且

[0230] b.第二抗原结合区包含包括HCDR2序列的重链可变区(VH),所述HCDR2序列如SEQ ID NO:19中所示。

[0231] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0232] a.第一抗原结合区包含包括HCDR1序列的重链可变区(VH),所述HCDR1序列如SEQ ID NO:9中所示,并且

[0233] b.第二抗原结合区包含包括HCDR1序列的重链可变区(VH),所述HCDR1序列如SEQ ID NO:18中所示。

[0234] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0235] c.第一抗原结合区包含包括HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR3序列如SEQ ID NO:52中所示,并且

[0236] d.第二抗原结合区包含包括HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR3序列如SEQ ID NO:20中所示。

[0237] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0238] c.第一抗原结合区包含包括HCDR2序列的重链可变区(VH),所述HCDR2序列如SEQ ID NO:51中所示,并且

[0239] d.第二抗原结合区包含包括HCDR2序列的重链可变区(VH),所述HCDR2序列如SEQ ID NO:19中所示。

[0240] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0241] a.第一抗原结合区包含包括HCDR1序列的重链可变区(VH),所述HCDR1序列如SEQ ID NO:50中所示,并且

[0242] b.第二抗原结合区包含包括HCDR1序列的重链可变区(VH),所述HCDR1序列如SEQ ID NO:18中所示。

[0243] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0244] a.第一抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别如SEQ ID NO:9、10、11中所示,并且

[0245] b.第二抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别如SEQ ID NO:18、19、20中所示。

[0246] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0247] a.第一抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别如SEQ ID NO:50、51、52中所示,并且

[0248] b.第二抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH),所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别如SEQ ID NO:18、19、20中所示。

[0249] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0250] a.第一抗原结合区包含包括LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR3序列如SEQ ID NO:14中所示,并且

[0251] b.第二抗原结合区包含包括LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR3序列如SEQ ID NO:23中所示。

[0252] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0253] a.第一抗原结合区包含包括LCDR2的轻链可变区(VL),所述LCDR2具有序列GAS,并且

[0254] b.第二抗原结合区包含包括LCDR2的轻链可变区(VL),所述LCDR2具有序列DDN。

[0255] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0256] a.第一抗原结合区包含包括LCDR1序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1序列如SEQ ID NO:13中所示,并且

[0257] b.第二抗原结合区包含包括LCDR1序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1序列如SEQ ID NO:22中所示。

[0258] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0259] c.第一抗原结合区包含包括LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR3序列如SEQ ID NO:55中所示,并且

[0260] d.第二抗原结合区包含包括LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR3序列如SEQ ID NO:23中所示。

[0261] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0262] c.第一抗原结合区包含包括LCDR2的轻链可变区(VL),所述LCDR2具有序列SAS,并且

[0263] d.第二抗原结合区包含包括LCDR2的轻链可变区(VL),所述LCDR2具有序列DDN。

[0264] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与

人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0265] c.第一抗原结合区包含包括LCDR1序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1序列如SEQ ID NO:54中所示,并且

[0266] d.第二抗原结合区包含包括LCDR1序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1序列如SEQ ID NO:22中所示。

[0267] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0268] a.第一抗原结合区包含包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别如SEQ ID NO:13、GAS、14中所示,并且

[0269] b.第二抗原结合区包含包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别如SEQ ID NO:22、DDN、23中所示。

[0270] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0271] a.第一抗原结合区包含包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别如SEQ ID NO:54、SAS、55中所示,并且

[0272] b.第二抗原结合区包含包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别如SEQ ID NO:22、DDN、23中所示。

[0273] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0274] a.第一抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH)和包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别如SEQ ID NO:9、10和11中所示,所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别如SEQ ID NO:13、GAS和14中所示,并且

[0275] b.第二抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH)和包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别如SEQ ID NO:18、19、20中所示,所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别如SEQ ID NO:22、DDN、23中所示。

[0276] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0277] a.第一抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH)和包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别如SEQ ID NO:50、51和52中所示,所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别如SEQ ID NO:54、SAS和55中所示,并且

[0278] b.第二抗原结合区包含包括HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链可变区(VH)和包括LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链可变区(VL),所述HCDR1、HCDR2和HCDR3序列分别如SEQ ID NO:18、19、20中所示,所述LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别如SEQ ID NO:22、DDN、23中所示。

[0279] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0280] a.第一抗原结合区包含重链可变区(VH),其包含如SEQ ID NO:8中所示的序列,并且

[0281] b.第二抗原结合区包含重链可变区(VH),其包含如SEQ ID NO:17中所示的序列。

[0282] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0283] a.第一抗原结合区包含重链可变区(VH),其包含如SEQ ID NO:15中所示的序列,并且

[0284] b.第二抗原结合区包含重链可变区(VH),其包含如SEQ ID NO:17中所示的序列。

[0285] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0286] a.第一抗原结合区包含重链可变区(VH),其包含如SEQ ID NO:49中所示的序列,并且

[0287] b.第二抗原结合区包含重链可变区(VH),其包含如SEQ ID NO:17中所示的序列。

[0288] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0289] a.第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),其包含如SEQ ID NO:12中所示的序列,并且

[0290] b.第二抗原结合区包含轻链可变区(VL),其包含如SEQ ID NO:21中所示的序列。

[0291] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0292] a.第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),其包含如SEQ ID NO:16中所示的序列,并且

[0293] b.第二抗原结合区包含轻链可变区(VL),其包含如SEQ ID NO:21中所示的序列。

[0294] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0295] a.第一抗原结合区包含轻链可变区(VL),其包含如SEQ ID NO:53中所示的序列,并且

[0296] b.第二抗原结合区包含轻链可变区(VL),其包含如SEQ ID NO:21中所示的序列。

[0297] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0298] a.第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述VH如SEQ ID NO:8中所示,所述VL如SEQ ID NO:12中所示,并且

[0299] b.第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述VH如SEQ ID NO:17中所示,所述VL如SEQ ID NO:21中所示。

[0300] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与人PD-L1结合的第二抗原结合区,其中

[0301] a.第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述VH如SEQ ID NO:15中所示,所述VL如SEQ ID NO:16中所示,并且

[0302] b.第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述VH如SEQ ID NO:17中所示,所述VL如SEQ ID NO:21中所示。

[0303] 在本发明的一个实施方案中,结合剂包含与人CD137结合的第一抗原结合区和与

人PD-L1结合的第二抗原结合区，其中

[0304] a.第一抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，所述VH如SEQ ID NO:49中所示，所述VL如SEQ ID NO:53中所示，并且

[0305] b.第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，所述VH如SEQ ID NO:17中所示，所述VL如SEQ ID NO:21中所示。

[0306] 在本发明的另一个实施方案中，结合剂是多特异性抗体，如双特异性抗体。

[0307] 在本发明的一个优选实施方案中，结合剂是双特异性抗体。

[0308] 在本发明的一个实施方案中，结合剂为全长抗体或抗体片段的形式。

[0309] 在本发明的一个实施方案中，结合剂，特别是以多特异性抗体如双特异性抗体的形式，包含第一和第二抗原结合区，其中每个抗原结合区都包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，并且其中优选地，所述可变区各自包含三个CDR序列，分别为CDR1、CDR2和CDR3，以及四个框架序列，分别为FR1、FR2、FR3和FR4。因此，重链可变区中的CDR可以分别表示为HCDR1、HCDR2和HCDR3，且轻链可变区中的CDR可以分别表示为LCDR1、LCDR2和LCDR3。此外，重链可变区中的框架序列可以分别表示为HFR1、HFR2、HFR3和HFR4，且轻链可变区中的框架序列可以分别表示为LFR1、LFR2、LFR3和LFR4。

[0310] 因此，在本发明的多特异性如双特异性抗体的一个实施方案中，每个抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述可变区各自包含三个CDR序列，分别为CDR1、CDR2和CDR3，以及四个框架序列，分别为FR1、FR2、FR3和FR4。在本发明的双特异性抗体的其他优选实施方案中，抗体包含两个重链恒定区(CH)和两个轻链恒定区(CL)。

[0311] 在本发明的一个实施方案中，结合剂，特别是以多特异性抗体如双特异性抗体的形式，包含所述第一抗原结合区和所述第二抗原结合区，所述第一抗原结合区包含第一重链可变区(VH)和第一轻链可变区(VL)，并且所述第二抗原结合区包含第二重链可变区(VH)和第二轻链可变区(VL)。

[0312] 在本发明的一个实施方案中，结合剂，特别是以多特异性抗体如双特异性抗体的形式，包含重链和轻链可变区，其中每个可变区包含三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)和四个框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0313] 在本发明的一个实施方案中，结合剂，特别是以多特异性抗体如双特异性抗体的形式，包含所述互补性决定区和所述框架区，其从氨基端至羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0314] 在本发明的一个实施方案中，结合剂，特别是以多特异性抗体如双特异性抗体的形式，包含重链可变区，其中互补决定区和框架区从氨基末端至羧基末端按以下顺序排列:HFR1、HCDR1、HFR2、HCDR2、HFR3、HCDR3、HFR4。

[0315] 在本发明的一个实施方案中，结合剂，特别是以多特异性抗体如双特异性抗体的形式，包含轻链可变区，其中互补决定区和框架区从氨基末端至羧基末端按以下顺序排列:LFR1、LCDR1、LFR2、LCDR2、LFR3、LCDR3、LFR4。

[0316] 在本发明的一个实施方案中，结合剂包含多肽，其中该多肽是重链(HC)。在本发明的一个实施方案中，重链(HC)包含可变重链区(VH)和重链恒定区(CH)。

[0317] 在本发明的一个实施方案中，重链恒定区(CH)包含恒定区域1区(CH1)、铰链区、恒定区域2区(CH2)和恒定区域3区(CH3)。

[0318] 在本发明的一个实施方案中,结合剂,特别是以多特异性抗体如双特异性抗体的形式,包含(i)多肽,其包含所述第一重链可变区(VH)并进一步包含第一重链恒定区(CH),和(ii)多肽,其包含所述第二重链可变区(VH)并进一步包含第二重链恒定区(CH)。

[0319] 在本发明的一个实施方案中,结合剂,特别是以多特异性抗体如双特异性抗体的形式,包含(i)多肽,其包含所述第一轻链可变区(VL)并进一步包含第一轻链恒定区(CL),和(ii)多肽,其包含所述第二轻链可变区(VL)并进一步包含第二轻链恒定区(CL)。

[0320] 在本发明的一个实施方案中,结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体,如多特异性,优选双特异性抗体,其中

[0321] a.第一结合臂包含i)多肽,其包含所述第一重链可变区(VH)和所述第一重链恒定区(CH),和ii)多肽,其包含所述第一轻链可变区(VL)和所述第一轻链恒定区(CL),并且

[0322] b.第二结合臂包含iii)多肽,其包含所述第二重链可变区(VH)和所述第二重链恒定区(CH),和iv)多肽,其包含所述第二轻链可变区(VL)和所述第二轻链恒定区(CL)。

[0323] 在本发明的一个实施方案中,结合剂,特别是以多特异性抗体例如双特异性抗体的形式,包含第一和第二重链恒定区(CH),其包含恒定区域1区(CH1区)、铰链区、CH2区和CH3区的一个或多个,优选至少铰链区、CH2区和CH3区。

[0324] 在本发明的一个实施方案中,结合剂,特别是以多特异性抗体例如双特异性抗体的形式,属于选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的同种型。在本发明的一个实施方案中,同种型选自下组:人IgG1、人IgG2、人IgG3和人IgG4。

[0325] 在本发明的一个实施方案中,第一抗原结合区源自兔抗体。在本发明的一个实施方案中,第一抗原结合区源自人源化抗体。在本发明的一个实施方案中,第一结合臂源自全长抗体。在本发明的一个实施方案中,第一结合臂源自单克隆抗体。在本发明的一个实施方案中,第一结合臂源自全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在本发明的一个实施方案中,第二抗原结合区源自大鼠抗体。在本发明的一个实施方案中,第二抗原结合区是人。在本发明的一个实施方案中,第二抗原结合区源自人源化抗体。在本发明的一个实施方案中,第二结合臂源自全长抗体。在本发明的一个实施方案中,第二结合臂源自单克隆抗体。在本发明的一个实施方案中,第二结合臂源自全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在本发明的一个实施方案中,第一和第二抗原结合区源自人源化抗体。在本发明的一个实施方案中,第一和第二抗原结合区是人抗体。在本发明的一个实施方案中,第一和第二结合臂源自全长抗体,如源自全长IgG1,λ(lambda)或IgG1,κ(kappa)抗体。在本发明的一个实施方案中,第一和第二结合臂源自单克隆抗体。

[0326] 在本发明的一个实施方案中,第一抗原结合区源自IgG1 lambda,且第二抗原结合区源自IgG1 kappa。

[0327] 本文所述的抗体包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4抗体及其组合,其中重链是不同的同种型和/或亚类的。在各种实施方案中,抗体是IgG1抗体,更具体地是IgG1,kappa或IgG1,lambda同种型(即IgG1,κ,λ)、IgG2a抗体(例如IgG2a,κ,λ)、IgG2b抗体(例如IgG2b,κ,λ)、IgG3抗体(例如IgG3,κ,λ)或IgG4抗体(例如IgG4,κ,λ)。

[0328] 在本发明的一个实施方案中,结合剂是多特异性的,如双特异性的结合剂。在本发明的一个实施方案中,结合剂是抗体(特别是多特异性抗体,例如双特异性抗体),如嵌合或人源化或人抗体。在本发明的一个实施方案中,结合剂为全长抗体或抗体片段的形式。在本

发明的一个实施方案中，第一抗原结合区源自单克隆抗体。在本发明的一个实施方案中，第二抗原结合区源自单克隆抗体。在本发明的一个实施方案中，第一抗原结合区源自单克隆抗体，且第二抗原结合区源自单克隆抗体。

[0329] 在本发明的一个实施方案中，结合剂是全长IgG1抗体。在本发明的一个实施方案中，结合剂是全长人IgG1抗体。在本发明的一个实施方案中，结合剂是在恒定区具有一个或多个突变的全长人IgG1抗体。

[0330] 在本发明的一个实施方案中，结合剂是嵌合、人源化或人抗体。在其中结合剂是双特异性抗体的本发明的实施方案中，两个半分子都可以是人的、人源化的或嵌合的，或者半分子的特征可以关于序列来源不同。

[0331] 在本发明的一个实施方案中，结合剂包含第一和第二抗原结合区，其中

[0332] a.与CD137结合的第一抗原结合区源自嵌合抗体，和/或

[0333] b.与人PD-L1结合的第二抗原结合区源自嵌合抗体。

[0334] 在本发明的一个实施方案中，结合剂包含第一和第二抗原结合区，其中

[0335] a.与CD137结合的第一抗原结合区源自人源化抗体，和/或

[0336] b.与人PD-L1结合的第二抗原结合区源自人源化抗体。

[0337] 在本发明的一个实施方案中，结合剂包含第一和第二抗原结合区，其中

[0338] a.与人CD137结合的第一抗原结合区源自人抗体，和/或

[0339] b.与人PD-L1结合的第二抗原结合区源自人抗体。

[0340] 在本发明的一个优选实施方案中，结合剂包含第一和第二抗原结合区，其中

[0341] a.与人CD137结合的第一抗原结合区源自人源化抗体，和/或

[0342] b.与人PD-L1结合的第二抗原结合区源自人抗体。

[0343] 在本发明的一个实施方案中，结合剂，特别是以多特异性抗体如双特异性抗体的形式，包含第一和第二重链恒定区(CH)，其包含CH3区并且其中两个CH3区包含不对称突变。

[0344] 在本发明的一个优选实施方案中，结合剂，特别是以多特异性抗体如双特异性抗体的形式，包含第一和第二重链恒定区(CH)，其中所述第一和第二重链的每一个包含至少铰链区、CH2和CH3区，其中在所述第一重链恒定区(CH)中，至少一个与选自下组的位置相对应的位置中的氨基酸已经被取代：根据EU编号的人IgG1重链中的T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409，并且在所述第二重链中，至少一个与选自下组的位置相对应的位置中的氨基酸已经被取代：根据EU编号的人IgG1重链中的T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409，并且其中所述第一和所述第二重链不在相同的位置中被取代。

[0345] 更优选地，(i)在所述第一重链恒定区(CH)中，与根据EU编号的人IgG1重链中F405相对应的位置中的氨基酸为L，并且在所述第二重链恒定区(CH)中，与根据EU编号的人IgG1重链中K409相对应的位置中的氨基酸为R，或者(ii)在所述第一重链中，与根据EU编号的人IgG1重链中K409相对应的位置中的氨基酸为R，并且在所述第二重链中，与根据EU编号的人IgG1重链中F405相对应的位置中的氨基酸为L。

[0346] 在本发明的一个实施方案中，结合剂是抗体，如多特异性，优选双特异性抗体，其中与包含相同的第一和第二抗原结合区以及包含人IgG1铰链、CH2和CH3区的两个重链恒定区(CH)的另一种抗体相比，所述抗体诱导Fc介导的效应器功能的程度较小。在本发明的一个实施方案中，所述第一和第二重链恒定区经修饰，使得与除包含未经修饰的第一和第二

重链以外相同的抗体相比，所述抗体诱导Fc介导的效应器功能的程度较小。

[0347] 在本发明的一个实施方案中，所述Fc介导的效应器功能通过与IgG Fc(Fcγ)受体结合、与C1q结合或诱导Fc介导的FcR交联来测量。

[0348] 在本发明的一个优选实施方案中，所述Fc介导的效应器功能通过与C1q结合来测量。

[0349] 在本发明的一个实施方案中，所述第一和第二重链恒定区已经经修饰，使得与野生型抗体相比，C1q与所述抗体的结合减少，优选减少至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少97％或100％，其中C1q结合优选通过ELISA确定。

[0350] 在本发明的一个实施方案中，在所述第一和第二重链恒定区的至少一个中，与根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235、D265、N297和P331相对应的位置中的一个或多个氨基酸分别不是L、L、D、N和P。在本发明的一个实施方案中，在所述第一和第二重链恒定区中，与根据EU编号的人IgG1重链中位置L234和L235相对应的位置分别是F和E。在本发明的一个实施方案中，在所述第一和第二重链中，与根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235和D265相对应的位置分别是F、E和A。

[0351] 在其他特别优选的实施方案中，结合剂是PD-L1xCD137双特异性抗体，其包含第一和第二重链恒定区，其中所述第一和第二重链恒定区两者的与根据EU编号的人IgG1重链中位置L234、L235和D265相对应的位置分别是F、E和A，并且其中(i)所述第一重链的与根据EU编号的人IgG1重链中F405相对应的位置为L，并且所述第二重链的与根据EU编号的人IgG1重链中K409相对应的位置为R，或者(ii)所述第一重链的与根据EU编号的人IgG1重链中K409相对应的位置R，并且所述第二重链的与根据EU编号的人IgG1重链中F405相对应的位置为L。

[0352] 在本发明的一个实施方案中，结合剂诱导和/或增强T细胞的增殖。在本发明的一个实施方案中，所述T细胞是$CD4^+$和/或$CD8^+$T细胞。

[0353] 在本发明的一个实施方案中，仅当第二抗原结合区与PD-L1结合时，结合剂才激活CD137信号传导。

[0354] 在本发明的一个实施方案中，通过将表达特异性T细胞受体(TCR)的T细胞与呈递主要组织相容性复合体上相应抗原(其被TCR识别)的树突细胞(DC)共培养来测量T细胞的增殖。

[0355] 在一个实施方案中，通过抗原特异性测定法确定所述T细胞增殖的诱导或增强，其中DC用密蛋白-6抗原转染，并且T细胞用TCR(其识别DC上HLA-A2中呈递的密蛋白-6衍生的表位)转染。该测定法描述于实施例7中。

[0356] 本发明的双特异性结合剂可以能够在人肿瘤组织的离体培养物中介导肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的扩增。TIL的扩增可以是1.5倍或更多、2倍或更多、3倍或更多、4倍或更多、5倍或更多、6倍或更多、7倍或更多、8倍或更多、9倍或更多或者10倍或更多。$CD3^-CD56^+$自然杀伤(NK)细胞的扩增可以是至少10倍，如至少20倍、至少30倍、至少40倍或如至少50倍。$CD3^+CD8^+$细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的扩增可以是至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍或如至少7倍。优选地，将TIL的扩增确定为响应于与0.01、0.1和1μg/mL相对应的浓度的双特异性结合剂温育的人非小细胞肺癌组织样品的TIL扩增，如响应于与0.1μg/mL相对应的浓度的双特异性结合剂温育。

[0357] 可以在包括以下步骤的测定法中确定TIL的扩增：

[0358] i)提供肿瘤组织的切除样品，如新鲜的切除样品，并在造血细胞培养基中洗涤样品，

[0359] ii)将肿瘤组织切成直径为1-2mm的片，并提供含有两片肿瘤组织的样品，

[0360] iii)在组织培养板的孔中含10％人血清白蛋白、抗生素和Proleukin®S(重组人IL-2类似物；SEQ ID NO:56)的造血细胞培养基(如Lonza™X-VIVO™15)中，将样品与处于0.1μg/ml的浓度的本发明的双特异性结合剂于37℃，5％CO_2下培养72小时；其中当在样品中观察到超出25个TIL微簇时，将所述样品中的细胞分开并转移至6个样品或组织培养板的6个孔中，

[0361] iv)10-14天的总温育期后收获TIL，并用针对人CD3、人CD4、人CD56和人CD8的标记抗体以及用对非活细胞进行染色的染料(如氨基放线菌素D)对其进行染色；并且

[0362] v)通过流式细胞术分析每个样品。

[0363] 本发明的双特异性结合剂可以特别地能够诱导外周血单个核细胞(PBMC)群体中的$CD40^+$和$CD8^+$T细胞的扩增，其中通过与抗CD3抗体(如克隆UCHT1)一起温育来活化T细胞，如次优活化，所述抗CD3抗体优选处于0.03和0.1μg/mL之间的浓度，并优选与处于对应于0.2μg/mL的浓度的本发明的双特异性结合剂一起温育。具体而言，确定T细胞扩增的过程可以包括以下步骤：

[0364] i)从健康供体的血沉棕黄层获得PBMC，如通过Ficoll梯度分离，

[0365] ii)用PBS中的羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记PBMC，

[0366] iii)提供包含75000个CFSE标记的PBMC的样品，并在含谷氨酰胺且补充有人AB血清的Iscove的改良Dulbecco培养基中，将该样品与抗CD3抗体(优选对于每个供体而言，处于预定的0.03和0.1μg/mL之间的浓度作为诱导次优的T细胞增殖的浓度)和处于0.2μg/mL的浓度的本发明的双特异性结合剂在37℃，5％CO_2一起温育4天，

[0367] iv)用针对人CD4、人CD8、人CD56的标记抗体和染色非活细胞的染料(如7-氨基放线菌素D)对PBMC进行染色；并且

[0368] v)通过流式细胞术分析样品中不同亚群($CD4^+$和$CD8^+$T细胞)中的CSFE。

[0369] 抗体形式

[0370] 如上所述，本领域已经描述了多种形式的抗体。本发明的结合剂原则上可以是任何同种型的抗体。同种型的选择通常将由期望的Fc介导的效应器功能(如ADCC诱导)或对缺少Fc介导的效应器功能的抗体(“惰性”抗体)的需要引导。示例性的同种型是IgG1，IgG2，IgG3和IgG4。可以使用人轻链恒定区中的kappa或lambda。本发明的抗体的效应器功能可以通过同种型转换成例如IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgD，IgA，IgE或IgM抗体改变，用于各种治疗用途。在一个实施方案中，本发明的抗体的两条重链均为IgG1同种型，例如IgG1，κ。任选地，重链可以在铰链和/或CH3区中修饰，如本文其他地方所述。

[0371] 优选地，每个抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，并且其中所述可变区各自包含三个CDR序列，分别为CDR1、CDR2和CDR3，以及四个框架序列，分别为FR1、FR2、FR3和FR4。此外，优选地，抗体包含两个重链恒定区(CH)和两个轻链恒定区(CL)。

[0372] 在本发明的一个实施方案中，结合剂是全长抗体，例如全长IgG1抗体。在另一个实施方案中，抗体是全长IgG4抗体，优选具有稳定化的铰链区。使IgG4铰链区稳定化的修饰，

例如核心铰链中的S228P突变已经在本领域中进行了描述，参见例如Labrijn et al., 2009Nat Biotechnol.27(8):767-71。

[0373] 在本发明的其他实施方案中，本发明的结合剂包含抗体片段，例如Fab'或Fab片段、由VL、VH、CL和CH1域组成的单价片段、如WO2007059782(Genmab)中所述的单价抗体、$F(ab')_2$片段、Fd片段、Fv片段、dAb片段、骆驼科(camelid)抗体或纳米抗体(nanobodies)、或分离的互补决定区(CDR)。

[0374] 本发明的结合剂优选是人的、人源化的或嵌合抗体。在抗体是双特异性抗体的实施方案中，两个半分子可以是人的、人源化的或嵌合的，或者半分子可以就序列起源而言特征不同。

[0375] 例如，在一个实施方案中，结合剂，例如双特异性抗体包含两个各包含抗原结合区的半分子，其中

[0376] (i)包含能够结合人PD-L1的抗原结合区的半分子是嵌合的，和/或

[0377] (ii)包含能够结合人CD137的抗原结合区的半分子(若有的话)是嵌合的。

[0378] 例如，在另一个实施方案中，双特异性抗体包含两个各包含抗原结合区的半分子，其中

[0379] (i)包含能够结合人PD-L1的抗原结合区的半分子是人源化的，和/或

[0380] (ii)包含能够结合CD137的抗原结合区的半分子(若有的话)是人源化的。

[0381] 例如，在另一个实施方案中，双特异性抗体包含两个各包含抗原结合区的半分子，其中

[0382] (i)包含能够结合人PD-L1的抗原结合区的半分子是人的和/或

[0383] (ii)包含能够结合人CD137的抗原结合区的半分子(若有的话)是人的。

[0384] 因此，例如，在一个实施方案中，能够结合人PD-L1的抗原结合区是人源化的，并且若存在的话，能够结合人CD137的抗原结合区是人源化的。

[0385] 在本发明的一个不同的实施方案中，能够结合人PD-L1的抗原结合区是人的，并且若存在的话，能够结合人CD137的抗原结合区是人的。

[0386] 在另一个实施方案中，结合剂是双特异性抗体，其包含能够结合人PD-L1的抗原结合区和能够结合人CD137的抗原结合区，其中包含能够结合人PD-L1的抗原结合区域的半分子是人的、人源化的或嵌合的，并且包含能够结合人CD137的抗原结合区的半分子是人源化的。

[0387] 优选地，包含能够结合人PD-L1的抗原结合区的半分子是人的，并且包含能够结合人CD137的抗原结合区的半分子是人源化的。

[0388] 双特异性抗体形式

[0389] 双特异性抗体的许多不同形式和用途是本领域已知的，并且已由Kontermann; Drug Discov Today,2015Jul;20(7):838-47和MAbs,2012Mar-Apr;4(2):182-97进行了综述。

[0390] 根据本发明的双特异性抗体不限于任何特定的双特异性形式或生产它的方法。

[0391] 可用于本发明的双特异性抗体分子的实例包括:(i)具有包含不同抗原结合区的两个臂的单一抗体;和(ii)对两个不同表位具有特异性的单链抗体，例如，通过两个额外的肽接头串联连接的scFv;(iii)双重可变域抗体(DVD-Ig)，其中每个轻链和重链含有通过短

肽连接串联的两个可变域(Wu et al.,Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin(DVD-Ig™)Molecule,于:Antibody Engineering,Springer Berlin Heidelberg(2010));(iv)化学连接的双特异性(Fab')2片段;(v)Tandab,其是两个单链双抗体(diabodies)的融合体,产生四价双特异性抗体,该四价双特异性抗体对每个靶抗原具有两个结合位点;(vi)柔性体(flexibody),其是scFv与双抗体的组合,产生多价分子;(vii)基于蛋白质激酶A中"二聚化和对接域"的所谓"对接和锁定"分子,其当应用于Fab时可以产生由与不同Fab片段连接的两个相同的Fab片段组成的三价双特异性结合蛋白;(viii)所谓的Scorpion分子,其包含例如与人Fab臂的两个末端融合的两个scFv;和(ix)双抗体。

[0392] 在本发明的一个实施方案中,本发明的结合剂是双抗体或交叉抗体(cross-body)。在一个实施方案中,本发明的结合剂是经由受控Fab臂交换获得的双特异性抗体(例如WO2011131746(Genmab)中所述)。

[0393] 不同类别的根据本发明的结合剂的实例包括但不限于:(i)具有互补CH3域以迫使异二聚化的IgG样分子;(ii)重组IgG样双重靶向分子,其中分子的两侧各含有至少两种不同抗体的Fab片段或Fab片段的部分;(iii)IgG融合分子,其中全长IgG抗体与额外的Fab片段或Fab片段的部分融合;(iv)Fc融合分子,其中单链Fv分子或稳定化的双抗体与重链恒定域、Fc区或其部分融合;(v)Fab融合分子,其中不同的Fab片段融合在一起,融合至重链恒定域,Fc区或其部分;和(vi)基于ScFv和双抗体的重链抗体(例如,域抗体,纳米抗体),其中不同的单链Fv分子或不同的双抗体或不同的重链抗体(例如,域抗体,纳米抗体)彼此融合或融合到另一种蛋白质或载体分子,其融合到重链恒定域、Fc区或其部分。

[0394] 具有互补CH3域分子的IgG样分子的实例包括但不限于Triomab/Quadroma分子(Trion Pharma/Fresenius Biotech;Roche,WO2011069104)、所谓的突出-入-空穴分子(Genentech,WO9850431)、CrossMAbs(Roche,WO2011117329)和静电匹配分子(Amgen,EP1870459和WO2009089004;Chugai,US201000155133;Oncomed,WO2010129304)、LUZ-Y分子(Genentech,Wranik et al.J.Biol.Chem.2012,287(52):43331-9,doi:10.1074/jbc.M112.397869.Epub 2012Nov 1)、DIG-body和PIG-body分子(Pharmabcine,WO2010134666,WO2014081202)、链交换工程化域体(SEEDbody)分子(EMD Serono,WO2007110205)、Biclonics分子(Merus,WO2013157953)、Fc Δ Adp分子(Regeneron,WO201015792)、双特异性IgG1和IgG2分子(Pfizer/Rinat,WO11143545)、Azymetric支架分子(Zymeworks/Merck,WO2012058768)、mAb-Fv分子(Xencor,WO2011028952)、二价双特异性抗体(WO2009080254)和DuoBody®分子(Genmab,WO2011131746)。

[0395] 重组IgG样双重靶向分子的实例包括但不限于双重靶向(DT)-Ig分子(WO2009058383)、二合一抗体(Genentech;Bostrom,et al 2009.Science 323,1610-1614.)、交联的Mab(Karmanos Cancer Center)、mAb2(F-Star,WO2008003116)、Zybody分子(Zyngenia;LaFleur et al.MAbs.2013Mar-Apr;5(2):208-18)、采用共同轻链的方法(Crucell/Merus,US7,262,028),κλBodies(NovImmune,WO2012023053)和CovX-body(CovX/Pfizer;Doppalapudi,V.R.,et al 2007.Bioorg.Med.Chem.Lett.17,501-506.)。

[0396] IgG融合分子的实例包括但不限于双重可变域(DVD)-Ig分子(Abbott,US7,612,181)、双重域双头抗体(Unilever;Sanofi Aventis,WO20100226923)、IgG类双特异性分子

(ImClone/Eli Lilly,Lewis etal.Nat Biotechnol.2014Feb;32(2):191-8)、Ts2Ab(MedImmune/AZ;Dimasi et al.J Mol Biol.2009Oct30;393(3):672-92)和BsAb分子(Zymogenetics,WO2010111625)、HERCULES分子(Biogen Idec,US007951918)、scFv融合分子(Novartis)、scFv融合分子(Changzhou Adam Biotech Inc,CN 102250246)和TvAb分子(Roche,WO2012025525,WO2012025530)。

[0397] Fc融合分子的实例包括但不限于ScFv/Fc融合体(Pearce et al.,Biochem Mol Biol Int.1997Sep;42(6):1179-88)、SCORPION分子(Emergent BioSolutions/Trubion,Blankenship JW,et al.AACR 100th Annual meeting 2009(Abstract#5465);Zymogenetics/BMS,WO2010111625)、双重亲和力再靶向技术(Fc-DART)分子(MacroGenics,WO2008157379,WO2010080538)和Dual(ScFv)2-Fab分子(National Research Center for Antibody Medicine-China)。

[0398] Fab融合双特异性抗体的实例包括但不限于F(ab)2分子(Medarex/AMGEN;Deo et al J Immunol.1998Feb 15;160(4):1677-86.)、双重作用或Bis-Fab分子(Genentech,Bostrom,et al 2009.Science 323,1610-1614.)、锁定对接(DNL)分子(ImmunoMedics,WO2003074569,WO2005004809)、二价双特异性分子(Biotecnol,Schoonjans,J Immunol.2000Dec 15;165(12):7050-7.)和Fab-Fv分子(UCB-Celltech,WO2009040562A1)。

[0399] 基于ScFv,基于双抗体的抗体和域抗体的实例包括但不限于双特异性T细胞结合剂(BiTE)分子(Micromet,WO2005061547)、串联双抗体分子(TandAb)(Affimed)Le Gall et al.,Protein Eng Des Sel.2004Apr;17(4):357-66.)、双重亲和力再靶向技术(DART)分子(MacroGenics,WO2008157379,WO2010080538)、单链双抗体分子(Lawrence,FEBS Lett.1998Apr 3;425(3):479-84)、TCR样分子(AIT,ReceptorLogics)、人血清清蛋白ScFv融合体(Merrimack,WO2010059315)和COMBODY分子(Epigen Biotech,Zhu et al.Immunol Cell Biol.2010Aug;88(6):667-75.)、双重靶向纳米抗体(Ablynx,Hmila et al.,FASEB J.2010)和双重靶向仅重链域抗体。

[0400] 一方面,本发明的双特异性抗体包括包含第一CH3区域的第一Fc序列和包含第二CH3区域的第二Fc序列,其中第一和第二CH3区域的序列不同并且使得所述第一和第二CH3区域之间的异二聚体相互作用比所述第一和第二CH3区域的每个同二聚体相互作用更强。在WO2011131746和WO2013060867(Genmab)(其通过引用并入本文)中提供了关于这些相互作用以及可以如何实现它们的更多细节。

[0401] 如本文进一步所述,基于一种同二聚体起始PD-L1抗体和一种在CH3区中仅含有几个保守的不对称突变的同二聚体起始CD137抗体,可以使用特定方法以高收率获得稳定的双特异性PD-L1xCD137抗体。不对称突变是指所述第一和第二CH3区的序列在不同位置处含有氨基酸取代。

[0402] 在一个实施方案中,如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体包含第一CH3区和第二CH3区,所述第一CH3区具有选自下组的位置处的氨基酸取代:人IgG1重链中的366、368、370、399、405、407和409并且第二CH3区具有选自下组的位置处的氨基酸取代:人IgG1重链中的366、368、370、399、405、407和409,并且其中第一和第二CH3区在相同位置中未取代。

[0403] 在一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体包含第一CH3区和第二CH3区，所述第一CH3区具有人IgG1重链中位置366处的氨基酸取代，并且所述第二CH3区具有选自下组的位置处的氨基酸取代：人IgG1重链中的368、370、399、405、407和409。在一个实施方案中，人IgG1重链中位置366处的氨基酸取代选自Ala、Asp、Glu、His、Asn、Val或Gln。

[0404] 在一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体包含第一CH3区和第二CH3区，所述第一CH3区具有人IgG1重链中位置368处的氨基酸取代，并且所述第二CH3区具有选自下组的位置处的氨基酸取代：人IgG1重链中的366、370、399、405、407和409。

[0405] 在一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体包含第一CH3区和第二CH3区，所述第一CH3区具有人IgG1重链中位置370处的氨基酸取代，并且所述第二CH3区具有选自下组的位置处的氨基酸取代：人IgG1重链中的366、368、399、405、407和409。

[0406] 在一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体包含第一CH3区和第二CH3区，所述第一CH3区具有人IgG1重链中位置399处的氨基酸取代，并且所述第二CH3区具有选自下组的位置处的氨基酸取代：人IgG1重链中的366、368、370、405、407和409。

[0407] 在一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体包含第一CH3区和第二CH3区，所述第一CH3区具有人IgG1重链中位置405处的氨基酸取代，并且所述第二CH3区具有选自下组的位置处的氨基酸取代：人IgG1重链中的366、368、370、399、407和409。

[0408] 在一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体包含第一CH3区和第二CH3区，所述第一CH3区具有人IgG1重链中位置407处的氨基酸取代，并且所述第二CH3区具有选自下组的位置处的氨基酸取代：人IgG1重链中的366、368、370、399、405和409。

[0409] 在一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体包含第一CH3区和第二CH3区，所述第一CH3区具有人IgG1重链中位置409处的氨基酸取代，并且所述第二CH3区具有选自下组的位置处的氨基酸取代：人IgG1重链中的366、368、370、399、405和407。

[0410] 因而，在一个实施方案中，在如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体包含所述第一和第二CH3区的序列，其含有不对称突变，即两个CH3区中的不同位置处的突变，例如CH3区之一中位置405处的突变和另一个CH3区中的位置409处的突变。

[0411] 在一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，第一CH3区具有409位置处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys并且所述第二CH3区具有选自下组的位置处的氨基酸取代：366、368、370、399、405和407。在一个此类实施方案中，所述第一CH3区具有409位置处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys，并且所述第二CH3区具有405位置处的除Phe外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、

Trp、Tyr、Cys、Lys或Leu。在本文的进一步的实施方案中，所述第一CH3区具有409位置处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys，并且所述第二CH3区具有405位置处的除Phe、Arg或Gly以外的氨基酸，例如Leu、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Lys、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys。

[0412] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，所述第一CH3区包含405位置处的Phe和409位置处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys并且所述第二CH3区包含405位置处的除Phe以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr、Leu、Met或Cys和409位置处的Lys。在本文的进一步实施方案中，所述第一CH3区包含405位置处的Phe和409位置处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr，或Cys并且所述第二CH3区包含405位置处的除Phe、Arg或Gly以外的氨基酸，例如Leu、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Met、Lys、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys和409位置处的Lys。

[0413] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，所述第一CH3区包含405位置处的Phe和409位置处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys并且所述第二CH3区包含位置405处的Leu和位置409处的Lys。在本文的进一步的实施方案中，所述第一CH3区包含位置405处的Phe和位置409处的Arg并且所述第二CH3区包含位置405处的除Phe、Arg或Gly以外的氨基酸，例如Leu、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Met、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys和位置409处的Lys。在另一个实施方案中，所述第一CH3区包含位置405处的Phe和位置409处的Arg并且所述第二CH3区包含位置405处的Leu和位置409处的Lys。

[0414] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，所述第一CH3区包含位置409处的除Lys、Leu或Met外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys并且所述第二CH3区包含位置409处的Lys、位置370处的Thr和位置405处的Leu。在另一个实施方案中，所述第一CH3区包含位置409处的Arg并且所述第二CH3区包含位置409处的Lys、位置370处的Thr和位置405处的Leu。

[0415] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，所述第一CH3区包含位置370处的Lys、位置405处的Phe和位置409处的Arg，并且所述第二CH3区包含位置409处的Lys、位置370处的Thr和位置405处的Leu。

[0416] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，所述第一CH3区包含位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys并且所述第二CH3区包含位置409处的Lys和：a)位置350处的Ile和位置405处的Leu，或b)位置370处的Thr和位置405处的Leu。

[0417] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性

抗体,所述第一CH3区包含位置409处的Arg并且所述第二CH3区包含位置409处的Lys和:a)位置350处的Ile和位置405处的Leu,或b)位置370处的Thr和位置405处的Leu。

[0418] 在另一个实施方案中,如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体,所述第一CH3区包含位置350处的Thr、位置370处的Lys、位置405处的Phe和位置409处的Arg并且所述第二CH3区包含位置409处的Lys和:a)位置350处的Ile和位置405处的Leu,或b)位置370处的Thr和位置405处的Leu。

[0419] 在另一个实施方案中,如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体,所述第一CH3区包含位置350处的Thr、位置370处的Lys、位置405处的Phe和位置409处的Arg,并且所述第二CH3区包含位置350处的Ile、位置370处的Thr、位置405处的Leu和位置409处的Lys。

[0420] 在一个实施方案中,如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体,所述第一CH3区具有位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸并且所述第二CH3区具有位置405处的除Phe以外的氨基酸,诸如除Phe、Arg或Gly以外;或者所述第一CH3区具有位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸并且所述第二CH3区具有位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr以外的氨基酸。

[0421] 在一个实施方案中,如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体包含具有位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸的第一CH3区和具有位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr以外的氨基酸的第二CH3区。

[0422] 在一个实施方案中,如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体包含具有位置407处的Tyr和位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸的第一CH3区和具有位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr以外的氨基酸和位置409处的Lys的第二CH3区。

[0423] 在本发明的一个实施方案中,如本文中公开的任何实施方案中限定的双特异性抗体包含具有位置407处的Tyr和位置409处的Arg的第一CH3区和具有位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr以外的氨基酸和位置409处的Lys的第二CH3区。

[0424] 在本发明的另一个实施方案中,所述第一CH3区具有位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸,例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys并且所述第二CH3区具有位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr以外的氨基酸,例如Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、His、Asn、Pro、Trp或Cys。在本发明的另一个实施方案中,所述第一CH3区具有位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸,例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys并且所述第二CH3区具有位置407处的Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp。

[0425] 在另一个实施方案中,如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体,所述第一CH3区具有位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸,例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys并且所述第二CH3区具有位置407处的Gly、Leu、Met、Asn或Trp。

[0426] 在另一个实施方案中,如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体,所述第一CH3区具有位置407处的Tyr和位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸,例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys并且

所述第二CH3区具有位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr以外的氨基酸，例如Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、His、Asn、Pro、Trp或Cys和位置409处的Lys。

[0427] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，所述第一CH3区具有位置407处的Tyr和位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys，并且所述第二CH3区具有位置407处的Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp和位置409处的Lys。

[0428] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，所述第一CH3区具有位置407处的Tyr和位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys，并且所述第二CH3区具有位置407处的Gly、Leu、Met、Asn或Trp和位置409处的Lys。

[0429] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，所述第一CH3区具有位置407处的Tyr和位置409处的Arg并且所述第二CH3区具有位置407处的除Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、Ser或Thr以外的氨基酸，例如Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、His、Asn、Pro、Trp或Cys和位置409处的Lys。

[0430] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，所述第一CH3区具有位置407处的Tyr和位置409处的Arg，并且所述第二CH3区具有位置407处的Ala、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Val或Trp和位置409处的Lys。

[0431] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，所述第一CH3区具有位置407处的Tyr和位置409处的Arg并且所述第二CH3区具有位置407处的Gly、Leu、Met、Asn或Trp和位置409处的Lys。

[0432] 在另一个实施方案中，如本文中公开的任何实施方案中限定的本发明的双特异性抗体，第一CH3区具有位置409处的除Lys、Leu或Met以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys并且第二CH3区具有

[0433] (i)位置368处的除Phe、Leu和Met以外的氨基酸，例如Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、Tyr或Cys，或

[0434] (ii)位置370处的Trp，或

[0435] (iii)位置399处的除Asp、Cys、Pro、Glu或Gln以外的氨基酸，例如Phe、Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Arg、His、Asn、Trp、Tyr或Cys，或

[0436] (iv)位置366处的除Lys、Arg、Ser、Thr或Trp以外的氨基酸，例如Phe、Leu、Met、Ala、Val、Gly、Ile、Asn、His、Asp、Glu、Gln、Pro、Tyr或Cys。

[0437] 在一个实施方案中，第一CH3区具有位置409处的Arg、Ala、His或Gly并且第二CH3区具有

[0438] (i)位置368处的Lys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、Val、或Trp，或

[0439] (ii)位置370处的Trp，或

[0440] (iii)位置399处的Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、Arg或Tyr，或

[0441] (iv)位置366处的Ala、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、Met或Tyr。

[0442] 在一个实施方案中,第一CH3区具有位置409处的Arg,并且第二CH3区具有

[0443] (i)位置368处的Asp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、Val、或Trp,或

[0444] (ii)位置370处的Trp,或

[0445] (iii)位置399处的Phe、His、Lys、Arg或Tyr,或

[0446] (iv)位置366处的Ala、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln。

[0447] 在本发明的一个优选实施方案中,双特异性抗体包含第一和第二重链,其中所述第一和第二重链各自至少包含铰链区、CH2和CH3区,其中(i)所述第一重链中对应于人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L,并且所述第二重链中对应于人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,或(ii)所述第一重链中对应于人IgG1重链中K409的位置中的氨基酸是R,并且所述第二重链中对应于人IgG1重链中F405的位置中的氨基酸是L。

[0448] 在上文规定的氨基酸取代外,所述第一和第二重链可以含有相对于野生型重链序列的进一步的氨基酸取代、缺失或插入。

[0449] 在本发明的一个实施方案中,所述第一和所述第二Fc序列都不包含(核心)铰链区中的Cys-Pro-Ser-Cys序列。

[0450] 在本发明的进一步的实施方案中,所述第一和所述第二Fc序列两者包含(核心)铰链区中的Cys-Pro-Pro-Cys序列。

[0451] 制备双特异性抗体的方法

[0452] 传统方法诸如杂交杂交瘤和化学缀合方法(Marvin and Zhu(2005)Acta Pharmacol Sin 26:649)可以用于制备本发明的双特异性抗体。除了期望的双特异性抗体外,在宿主细胞中共表达两种抗体(它们由不同的重链和轻链组成)导致可能的抗体产物的混合物,其然后可以通过例如亲和层析或类似方法分离。

[0453] 当共表达不同抗体构建体时,也可以使用有利于形成功能性双特异性产物的策略,例如,Lindhofer et al.(1995J Immunol 155:219)所述的方法。产生不同抗体的大鼠和小鼠杂交瘤的融合导致有限数量的异二聚体蛋白,这是由于优先的物种限制的重/轻链配对。相对于同二聚体促进异二聚体形成的另一种策略是“突出-入-空穴”策略,其中在第一重链多肽中引入突出,并且在第二重链多肽中引入相应的腔,使得该突出可以位于这两个重链的界面处的腔中,从而促进异二聚体的形成并阻碍同二聚体的形成。通过用较大的侧链替换来自第一多肽的界面的小的氨基酸侧链来构建“突出”。通过用较小的氨基酸侧链替换大的氨基酸侧链在第二多肽的界面中创建与突出相同或相似大小的补偿“腔”(美国专利5,731,168)。EP1870459(Chugai)和WO2009089004(Amgen)描述了有利于在宿主细胞中不同抗体域共表达后异二聚体形成的其他策略。在这些方法中,构成这两个CH3域中CH3-CH3界面的一个或多个残基替换为带电荷的氨基酸,使得同二聚体的形成在静电上是不利的,而异二聚化在静电上是有利的。WO2007110205(Merck)描述了另一种策略,其中利用IgA和IgG CH3域之间的差异来促进异二聚化。

[0454] WO2008119353(Genmab)中已经描述了另一种产生双特异性抗体的体外方法,其中双特异性抗体通过还原条件下温育后两个单特异性抗体IgG4-或IgG4-样抗体之间的“Fab臂”或“半分子”交换(交换重链和连接的轻链)形成。所得的产物是具有两个可以包含不同序列的Fab臂的双特异性抗体。

[0455] 本发明的制备双特异性PD-L1xCD137抗体的优选方法包括WO2011131746和

WO2013060867(Genmab)中描述的方法,包括以下步骤:

[0456] a)提供包含Fc区的第一抗体,所述Fc区包含第一CH3区;

[0457] b)提供包含第二Fc区的第二抗体,所述Fc区包含第二CH3区,其中第一抗体是CD137抗体且第二抗体是PD-L1抗体,或反之亦然;

[0458] 其中所述第一和第二CH3区域的序列是不同的,并且使得所述第一和第二CH3区域之间的异二聚体相互作用强于所述第一和第二CH3区域的每个同二聚体相互作用;

[0459] c)在还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育;和

[0460] d)获得所述双特异性PD-L1xCD137抗体。

[0461] 类似地,提供了用于产生根据本发明的抗体的方法,该方法包括以下步骤:

[0462] a)培养产生包含如本文定义的能够结合人CD137的抗原结合区的第一抗体的宿主细胞,并从培养物中纯化所述第一抗体;

[0463] b)培养产生包含如本文定义的能够结合人PD-L1的抗原结合区的第二抗体的宿主细胞,从培养物中纯化所述第二抗体;

[0464] c)在足以使铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育,并且

[0465] d)获得所述双特异性抗体。

[0466] 在本发明的一个实施方案中,在足以使铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育,其中在所得异二聚体抗体中所述第一抗体和第二抗体之间的异二聚体相互作用使得在37℃的24小时后在0.5mM GSH未发生Fab臂交换。

[0467] 不受理论的限制,在步骤c)中,亲本抗体的铰链区中的重链二硫键被还原,然后所得的半胱氨酸能够与另一个亲本抗体分子(最初具有不同的特异性)的半胱氨酸残基形成重链间的二硫键。在此方法的一个实施方案中,步骤c)中的还原条件包括添加还原剂,例如选自下组的还原剂:2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫丁四醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和β-巯基-乙醇,优选选自下组的还原剂:2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羧乙基)膦。在另一个实施方案中,步骤c)包括恢复条件以变为非还原性的或还原性较小的,例如通过除去还原剂,例如通过脱盐。

[0468] 对于此方法,可以使用上述的任何CD137和PD-L1抗体,包括分别包含第一和/或第二Fc区的第一和第二CD137和PD-L1抗体。此类第一和第二Fc区域(包括此类第一和第二Fc区域的组合)的例子可以包括上述的任何一个。在一个特定的实施方案中,可以分别选择第一抗体和第二CD137和PD-L1抗体,以获得如本文所述的双特异性抗体。

[0469] 在此方法的一个实施方案中,所述第一和/或第二抗体是全长抗体。

[0470] 第一和第二抗体的Fc区可以是任何同种型,包括但不限于IgG1,IgG2,IgG3或IgG4。在此方法的一个实施方案中,所述第一和第二抗体的Fc区均为IgG1同种型。在另一个实施方案中,所述抗体的Fc区之一是IgG1同种型,并且另一个是IgG4同种型。在后一个实施方案中,所得的双特异性抗体包含IgG1的Fc序列和IgG4的Fc序列,因此就效应器功能的激活而言可具有令人感兴趣的中间性质。

[0471] 在另一个实施方案中,已经将抗体起始蛋白之一工程化改造为不结合蛋白A,从而允许通过使产物通过蛋白A柱而将异二聚体蛋白与所述同二聚体起始蛋白分离。

[0472] 如上所述,同二聚体起始抗体的第一和第二CH3区的序列是不同的,并且使得所述第一和第二CH3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一和第二CH3区的每个同二聚体相互作用。在WO2011131746和WO2013060867(Genmab)(其在此通过引用完整并入)中已经提供了关于这些相互作用以及如何可以实现它们的更多细节。

[0473] 特别地,在分别结合CD137和PD-L1的两种同二聚体起始抗体的基础上,可以使用本发明的上述方法以高产率获得稳定的双特异性PD-L1xCD137抗体,并且在CH3区中仅含有几个保守的不对称突变。不对称突变是指所述第一和第二CH3区的序列在不同位置处含有氨基酸取代。

[0474] 本发明的双特异性抗体也可以通过在单一细胞中共表达编码第一和第二多肽的构建体来获得。因此,在另一方面,本发明涉及生产双特异性抗体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0475] a)提供编码第一多肽的第一核酸构建体,所述第一多肽包含第一抗体重链的第一Fc序列和第一抗原结合区,所述第一Fc序列包含第一CH3区,

[0476] b)提供编码第二多肽的第二核酸构建体,所述第二多肽包含第二抗体重链的第二Fc序列和第二抗原结合区,所述第二Fc序列包含第二CH3区,

[0477] 其中所述第一和第二CH3区域的序列是不同的,并且使得所述第一和第二CH3区域之间的异二聚体相互作用强于所述第一和第二CH3区域的每个同二聚体相互作用,并且其中所述第一同二聚体蛋白质具有位置409处的Lys,Leu或Met以外的氨基酸,并且所述第二同二聚体蛋白在选自下组的位置处具有氨基酸取代:366、368、370、399、405和407,

[0478] 任选地,其中所述第一和第二核酸构建体编码所述第一和第二抗体的轻链序列

[0479] c)在宿主细胞中共表达所述第一和第二核酸构建体,和

[0480] d)从细胞培养物中获得所述异二聚体蛋白。

[0481] 用于产生本发明抗体的材料和方法

[0482] 在其他方面,本发明涉及用于重组产生根据本发明的抗体的材料和方法。合适的表达载体(包括启动子,增强子等)以及合适的用于产生抗体的宿主细胞是本领域公知的。

[0483] 因此,一方面,提供了核酸构建体,其包含:

[0484] (i)编码抗体的重链序列的核酸序列,所述抗体包含如本文所定义的能够结合人PD-L1的抗原结合区,和/或

[0485] (ii)编码抗体的轻链序列的核酸序列,所述抗体包含如本文定义的能够结合人PD-L1的抗原结合区。

[0486] 在一个实施方案中,核酸构建体进一步包含:

[0487] (i)编码抗体的重链序列的核酸序列,所述抗体包含如本文所定义的能够结合人CD137的抗原结合区,和

[0488] (ii)编码抗体的轻链序列的核酸序列,所述抗体包含如本文所定义的能够结合人CD137的抗原结合区。

[0489] 在另一方面,本发明涉及表达载体,其包含如本文上文所定义的核酸构建体。

[0490] 在另一方面,本发明涉及编码根据本文所述的任何方面或实施方案的结合剂的核酸或其多肽链。在另一方面,本发明涉及包含核酸的表达载体。

[0491] 在本发明的上下文中,表达载体可以是任何合适的载体,包括染色体,非染色体和

合成核酸载体(包含合适的表达控制元件组的核酸序列)。此类载体的实例包括SV40的衍生物,细菌质粒,噬菌体DNA,杆状病毒,酵母质粒,源自质粒和噬菌体DNA的组合的载体,以及病毒核酸(RNA或DNA)载体。在一个实施方案中,PD-L1或CD137抗体编码核酸包含在裸露的DNA或RNA载体中,包括例如线性表达元件(例如由Sykes and Johnston,Nat Biotech 17,355-59(1997)所述),紧密的核酸载体(例如在US 6,077,835和/或WO 00/70087中所述),质粒载体,例如pBR322,pUC 19/18或pUC 118/119,"蚊"最小程度尺寸的核酸载体(如Schakowski et al.,Mol Ther 3,793-800(2001)中所述),或作为沉淀的核酸载体构建体,如$Ca_3(PO_4)2$沉淀的构建体(如例如WO200046147,Benvenisty and Reshef,PNAS USA 83,9551-55(1986),Wigler et al.,Cell 14,725(1978)和Coraro and Pearson,Somatic Cell Genetics 7,603(1981)中所述)。此类核酸载体及其用途是本领域公知的(参见例如US5,589,466和US 5,973,972)。

[0492] 在一个实施方案中,载体适合在细菌细胞中表达PD-L1抗体和/或CD137抗体。此类载体的实例包括表达载体,例如BlueScript(Stratagene),pIN载体(Van Heeke&Schuster,J Biol Chem 264,5503-5509(1989),pET载体(Novagen,Madison WI)等。

[0493] 此外/或者,表达载体可以是适合在酵母系统中表达的载体。可以采用适合在酵母系统中表达的任何载体。合适的载体包括例如包含组成型或诱导型启动子,例如α因子,醇氧化酶和PGH的载体(综述于:F.Ausubel et al.编Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing and Wiley InterScience New York(1987)和Grant et al.,Methods in Enzymol 153,516-544(1987))。

[0494] 此外/或者,表达载体可以是适合在哺乳动物细胞中表达的载体,例如包含谷氨酰胺合成酶作为选择标志物的载体,例如Bebbington(1992)Biotechnology(NY)10:169-175中描述的载体。

[0495] 核酸和/或载体也可以包含编码分泌/定位序列的核酸序列,所述分泌/定位序列可以将诸如新生多肽链的多肽靶向到周质空间或进入细胞培养基中。此类序列是本领域已知的,并且包括分泌前导序列或信号肽。

[0496] 表达载体可以包含任何合适的启动子,增强子和其他表达促进元件或与之相关。此类元件的例子包括强表达启动子(例如人CMV IE启动子/增强子以及RSV,SV40,SL3-3,MMTV和HIV LTR启动子),有效的多聚(A)终止序列,大肠杆菌中质粒产物的复制起点,作为选择标志物的抗生素抗性基因和/或便利的克隆位点(例如,多接头)。与组成型启动子例如CMV IE相反,核酸还可以包含诱导型启动子。

[0497] 在一个实施方案中,编码PD-L1和/或CD137抗体的表达载体可以位于病毒载体中和/或通过病毒载体递送至宿主细胞或宿主动物。

[0498] 在另一个方面,本发明涉及宿主细胞,其包含上文规定的核酸构建体或表达载体中的一种或多种。

[0499] 因此,本发明还涉及产生本发明的抗体的重组真核或原核宿主细胞,如转染瘤。

[0500] 宿主细胞的实例包括酵母,细菌,植物和哺乳动物细胞,例如CHO,CHO-S,HEK,HEK293,HEK-293F,Expi293F,PER.C6或NS0细胞或淋巴细胞。优选的宿主细胞是CHO-K1细胞。

[0501] 在本发明的一个实施方案,细胞是哺乳动物细胞,如中国仓鼠卵巢细胞。

[0502] 例如,在一个实施方案中,宿主细胞可包含稳定整合到细胞基因组中的第一和第二核酸构建体。在另一个实施方案中,本发明提供了细胞,其包含非整合的核酸,例如质粒,粘粒,噬菌粒或线性表达元件,其包含如上规定的第一和第二核酸构建体。

[0503] 在另一方面,本发明涉及产生如本文所定义的PD-L1抗体的杂交瘤。

[0504] Fc区

[0505] 在本发明的一些实施方案中,根据本发明的结合剂除抗原结合区以外还包括由两条重链的Fc序列组成的Fc区。

[0506] 第一和第二Fc序列可以各自具有任何同种型,包括但不限于IgG1,IgG2,IgG3和IgG4,并且可以包含一个或多个突变或修饰。在一个实施方案中,第一和第二Fc序列中的每个是IgG4同种型或自其衍生的,任选地具有一个或多个突变或修饰。在另一个实施方案中,第一和第二Fc序列中的每个是IgG1同种型或自其衍生的,任选地具有一个或多个突变或修饰。在另一个实施方案中,Fc序列之一是IgG1同种型的并且另一个是IgG4同种型的,或源自此类相应的同种型,任选地具有一个或多个突变或修饰。

[0507] 在本发明的一个实施方案中,一个或两个Fc序列是效应器功能缺陷的。例如,一个或多个Fc序列可以是IgG4同种型,或非IgG4类型,例如,IgG1,IgG2或IgG3,其已经经过突变以降低或甚至消除介导效应器功能(如ADCC)的能力。此类突变已经记载于例如Dall'Acqua WF et al.,J Immunol.177(2):1129-1138(2006)和Hezareh M,J Virol.;75(24):12161-12168(2001)。在另一个实施方案中,一个或两个Fc序列包含IgG1野生型序列。

[0508] 根据本发明的抗体可以在Fc区中包含修饰。当抗体包含此类修饰时,它可能成为惰性或非活化抗体。如本文所用,术语"惰性"、"惰性的"或"非活化的"是指至少不能结合任何Fcγ受体,不能诱导Fc介导的FcR交联或不能通过个别抗体的两个Fc区诱导FcR介导的靶抗原交联,或无法结合C1q的Fc区。人源化或嵌合CD137或PD-L1抗体的Fc区的惰性使用单特异性形式的抗体有利地测试。

[0509] 可以构建几种变体以使抗体的Fc区对于与Fcγ(gamma)受体和C1q的相互作用变得无活性以用于治疗性抗体开发。此类变体的例子在本文中描述。

[0510] 因此,在本发明的抗体的一个实施方案中,所述抗体包含第一和第二重链,其中一个或两个重链被修饰,使得相对于除包含未修饰的第一重链和第二重链以外相同的抗体,该抗体在较小程度上诱导Fc介导的效应器功能。此类Fc介导的效应器功能可通过测定,通过结合Fcγ受体,通过结合C1q或通过诱导Fc介导的FcR交联来测量。

[0511] 在另一个此类实施方案中,重链和轻链恒定序列已经被修饰,使得与未修饰的抗体相比,C1q与所述抗体的结合降低至少70%,至少80%,至少90%,至少95%,至少97%或100%,其中C1q结合是通过ELISA确定的。

[0512] 因此,可以修饰在与C1q和Fcγ受体的相互作用中起主要作用的Fc区中的氨基酸。

[0513] 可以被修饰(例如IgG1同种型抗体中)的氨基酸位置的实例包括位置L234,L235和P331。它们的组合,例如L234F/L235E/P331S,可导致与人CD64,CD32,CD16和C1q的结合大大降低。

[0514] 因此,在一个实施方案中,在对应于L234,L235和P331的至少一个位置中的氨基酸可以分别是A,A和S(Xu et al.,2000,Cell Immunol.200(1):16-26;Oganesyan et al.,2008,Acta Cryst.(D64):700-4)。此外,L234F和L235E氨基酸取代可导致与Fcγ受体和C1q

具有消除的相互作用的Fc区(Canfield et al.,1991,J.Exp.Med.(173):1483-91;Duncan et al.,1988,Nature(332):738-40)。因此,在一个实施方案中,对应于L234和L235的位置中的氨基酸可以分别是F和E。D265A氨基酸取代可以降低与所有Fcγ受体的结合并防止ADCC(Shields et al.,2001,J.Biol.Chem.(276):6591-604)。因此,在一个实施方案中,对应于D265的位置中的氨基酸可以是A。可以通过将位置D270,K322,P329和P331突变来消除与C1q的结合。将这些位置突变为D270A或K322A或P329A或P331A可以使抗体缺乏CDC活性(Idusogie EE,et al.,2000,J Immunol.164:4178-84)。因此,在一个实施方案中,在对应于D270,K322,P329和P331的至少一个位置上的氨基酸可以分别是A,A,A和A。

[0515] 使Fc区与Fcγ受体和C1q的相互作用最小化的替代方法是通过除去抗体的糖基化位点。将位置N297突变为例如Q,A或E除去糖基化位点,该位点对于IgG-Fc gamma受体相互作用至关重要。因此,在一个实施方案中,在对应于N297的位置中的氨基酸可以是G,Q,A或E(Leabman et al.,2013,MAbs;5(6):896-903)。可以通过以下突变获得使Fc区与Fcγ受体的相互作用最小化的另一种替代方法;P238A,A327Q,P329A或E233P/L234V/L235A/G236del(Shields et al.,2001,J.Biol.Chem.(276):6591-604)。

[0516] 或者,尽管报告了与Fcγ受体的相互作用(Parren et al.,1992,J.Clin Invest.90:1537-1546;Bruhns et al.,2009,Blood 113:3716-3725),但认为人IgG2和IgG4亚类在其与C1q和Fc gamma受体的相互作用中自然受到损害。可以在这两种同种型中进行消除这些残留相互作用的突变,从而降低与FcR结合相关的不利副作用。对于IgG2,这些包括L234A和G237A,并且对于IgG4,包括L235E。因此,在一个实施方案中,对应于人IgG2重链中的L234和G237的位置的氨基酸可以分别是A和A。在一个实施方案中,对应于人IgG4重链中L235的位置中的氨基酸可以是E。

[0517] 进一步使IgG2抗体中与Fcγ受体和C1q的相互作用最小化的其他方法包括在WO2011066501和Lightle,S.,et al.,2010,Protein Science(19):753-62中描述的那些方法。

[0518] 抗体的铰链区在与Fcγ受体和补体的相互作用方面也可以是重要的(Brekke et al.,2006,J Immunol 177:1129-1138;Dall'Acqua WF,et al.,2006,J Immunol 177:1129-1138)。因此,铰链区中的突变或其缺失可影响抗体的效应器功能。

[0519] 因此,在一个实施方案中,抗体包含第一和第二免疫球蛋白重链,其中在所述第一和第二免疫球蛋白重链的至少一个中,对应于人IgG1重链中位置L234,L235,D265,N297和P331的位置中的一个或多个氨基酸分别不是L,L,D,N和P。

[0520] 在一个实施方案中,在第一和第二重链两者中,在与人IgG1重链中的位置L234,L235,D265,N297和P331对应的位置中的一个或多个氨基酸分别不是L,L,D,N和P。

[0521] 在本发明的一个实施方案中,在所述第一重链和第二重链两者中,与人IgG1重链中的位置D265对应的位置中的氨基酸不是D。

[0522] 因此,在本发明的一个实施方案中,在所述第一重链和第二重链两者中,与人IgG1重链中位置D265对应的位置中的氨基酸选自下组:A和E。

[0523] 在本发明的另一个实施方案中,在所述第一和第二重链中的至少一个中,对应于人IgG1重链中的位置L234和L235的位置中的氨基酸分别不是L和L。

[0524] 在本发明的一个特定的实施方案中,在所述第一和第二重链的至少一个中,对应

于人IgG1重链中的位置L234和L235的位置中的氨基酸分别为F和E。

[0525] 在本发明的一个实施方案中，在所述第一重链和第二重链两者中，与人IgG1重链中的位置L234和L235对应的位置中的氨基酸分别为F和E。

[0526] 在本发明的一个特定的实施方案中，在所述第一和第二重链的至少一个中，与人IgG1重链中的位置L234，L235和D265对应的位置中的氨基酸分别为F，E和A。

[0527] 在本发明的一个特别优选的实施方案中，在所述第一和第二重链两者中，与人IgG1重链中的位置L234，L235和D265对应的位置中的氨基酸分别为F，E和A。

[0528] 在本发明的另一个特别优选的实施方案中，结合剂是包含第一和第二重链的双特异性抗体，其中根据第一重链和第二重链两者的EU编号，对应于人IgG1重链中位置L234和L235的位置分别是F和E，并且(i)根据第一重链的EU编号对应于人IgG1重链中F405的位置为L，并且根据第二重链的EU编号对应于人IgG1重链中K409的位置为R，或(ii)根据第一重链的EU编号对应于人IgG1重链中K409的位置为R，并且根据第二重链的EU编号对应于人IgG1重链中F405的位置为L。

[0529] 在本发明的另一个特别优选的实施方案中，结合剂是包含第一和第二重链的双特异性抗体，其中根据第一重链和第二重链两者的EU编号，对应于人IgG1重链中的位置L234，L235和D265的位置分别为F，E和A，其中(i)根据第一重链的EU编号与人IgG1重链中F405对应的位置为L，并且根据第二重链的EU编号与人IgG1重链中K409对应的位置为R，或(ii)根据第一重链的EU编号与人IgG1重链中K409对应的位置为R，并且根据第二重链的EU编号与人IgG1重链中F405对应的位置为L。

[0530] 具有三个氨基酸取代L234F，L235E和D265A以及另外的K409R或F405L突变的组合的抗体变体在本文中分别以后缀“FEAR”或“FEAL”命名。

[0531] 在一个优选的实施方案中，本发明的双特异性抗体包含：

[0532] (i)源自IgG1-CD137-FEAL的半分子抗体和源自IgG1-PDL1-547-FEAR的半分子抗体，或

[0533] (ii)源自IgG1-CD137-FEAR的半分子抗体和源自IgG1-PD-L1-547-FEAL的半分子抗体。

[0534] 在本发明的另一个实施方案中，已经对构成双特异性抗体的一部分的一种或两种抗体进行了工程化改造，以减少或增加与新生儿Fc受体(FcRn)的结合，从而操作双特异性抗体的血清半衰期。增加或减少血清半衰期的技术是本领域公知的。参见例如Dall’Acqua et al.2006,J.Biol.Chem.,281:23514-24;Hinton et al.2006,J.Immunol.,176:346-56;和Zalevsky et al.2010Nat.Biotechnol.,28:157-9。

[0535] 缀合物

[0536] 在另一方面，本发明提供与一个或多个治疗部分，例如细胞因子，免疫抑制剂，免疫刺激分子和/或放射性同位素连接或缀合的抗体。此类缀合物在本文中称为“免疫缀合物”或“药物缀合物”。包括一种或多种细胞毒素的免疫缀合物称为“免疫毒素”。

[0537] 在一个实施方案中，第一和/或第二Fc序列与药物或前药缀合或包含用于所述药物或前药的受体基团。此类受体基团可以例如为非天然氨基酸。

[0538] 组合物

[0539] 在一方面，本发明涉及组合物，其包含根据本文公开的任何实施方案或方面的结

合剂(如双特异性抗体)、核酸、表达载体或细胞。在本发明的一个实施方案中,组合物是药物组合物。在本发明的一个实施方案中,组合物进一步包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0540] 在进一步的方面,本发明涉及药物组合物,其包含根据本文公开的任何实施方案的结合剂(如多特异性抗体,如双特异性抗体)、核酸、表达载体或宿主细胞和药学可接受的载体。

[0541] 本发明的药物组合物可以含有本发明的一种结合剂(如一种多特异性,优选双特异性抗体)或本发明的不同结合剂(如多特异性抗体如双特异性抗体)的组合。

[0542] 可以根据常规技术配制药物组合物,例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,Gennaro,Ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1995中公开的那些。本发明的药物组合物可以例如包括稀释剂,填充剂,盐,缓冲剂,去污剂(例如非离子去污剂,例如Tween-20或Tween-80),稳定剂(例如糖或不含蛋白质的氨基酸),防腐剂,组织固定剂,增溶剂和/或适合包含在药物组合物中的其他材料。

[0543] 药学上可接受的载体包括与本发明的结合剂(例如,多特异性如双特异性抗体)、核酸、表达载体或宿主细胞在生理上相容的任何和所有合适的溶剂,分散介质,涂层材料,抗菌和抗真菌剂,等张剂,抗氧化剂和吸收延迟剂等。可以在本发明的药物组合物中使用的合适的水性和非水性载体的实例包括水,盐水,磷酸盐缓冲盐水,乙醇,右旋糖,多元醇(例如甘油,丙二醇,聚乙二醇等),和它们的合适的混合物,植物油,羧甲基纤维素胶体溶液,黄蓍胶和可注射的有机酯,例如油酸乙酯,和/或各种缓冲剂。药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。可以例如通过使用诸如卵磷脂的涂层材料,在分散液的情况下通过维持需要的粒径,以及使用表面活性剂来维持来适当的流动性。

[0544] 本发明的药物组合物还可包含药学可接受的的抗氧化剂,例如(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸,盐酸半胱氨酸,硫酸氢钠,焦亚硫酸钠,亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯,丁基化羟基茴香醚,丁基化羟基甲苯,卵磷脂,没食子酸丙酯,α-生育酚等;和(3)金属螯合剂,诸如柠檬酸,乙二胺四乙酸(EDTA),山梨糖醇,酒石酸,磷酸。

[0545] 本发明的药物组合物还可在组合物中包含等张剂,例如糖,多元醇,例如甘露醇,山梨糖醇,甘油或氯化钠。

[0546] 本发明的药物组合物还可包含一种或多种适合所选施用途径的佐剂,例如防腐剂,湿润剂,乳化剂,分散剂,防腐剂或缓冲剂,它们可以增强药物组合物的货架期或有效性。本发明的结合剂(如多特异性如双特异性抗体)可以与保护结合剂免于快速释放的载体一起制备,例如控释制剂,包括植入物,透皮贴剂和微囊化递送系统。此类载体可以包括明胶,单硬脂酸甘油酯,二硬脂酸甘油酯,可生物降解的生物相容性聚合物,例如单独或与蜡一起使用的乙烯乙酸乙烯酯,聚酸酐,聚乙醇酸,胶原蛋白,聚原酸酯和聚乳酸,或本领域公知的其他材料。制备此类制剂的方法是本领域技术人员通常已知的。

[0547] 无菌注射溶液可通过将所需量的活性化合物在根据需要具有一种成分或多种成分的组合(例如,如上文列举)的适当的溶剂中掺入,随后进行灭菌微滤来制备。通常,通过将活性化合物掺入含有基本分散介质和所需要的其他成分(例如,来自从上文列举的那些)

的无菌媒介物中制备分散体。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下，制备方法的实例是真空干燥和冷冻干燥(冻干)，其从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分和任何其他期望成分的粉末。

[0548] 可以改变药物组合物中活性成分的实际剂量水平，以便获得一定量的活性成分，所述量对于特定患者，组合物和施用模式有效实现期望的治疗响应，而对患者没有毒性。选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素，包括所采用的本发明的特定组合物或其酰胺的活性，施用途径，施用时间，所用特定化合物的排出速率，治疗持续时间，与所用特定组合物结合使用的其他药物，化合物和/或材料，所治疗患者的年龄，性别，体重，状况，一般健康状况和既往病史，以及医学领域中公知的类似因素。

[0549] 药物组合物可以通过任何合适的途径和方式施用。在一个实施方案中，胃肠外施用本发明的药物组合物。如本文所用，“胃肠外施用”是指除肠和局部施用以外的施用方式，通常通过注射，并且包括表皮，静脉内，肌内，动脉内，鞘内，囊内，眶内，心内，皮内，腹膜内，腱内，经气管，皮下，表皮下，关节内，囊下，蛛网膜下，脊柱内，颅内，胸腔内，硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0550] 在一个实施方案中，通过静脉内或皮下注射或输注施用所述药物组合物。

[0551] 用途

[0552] 一方面，本发明涉及根据本文公开的任一项实施方案的结合剂或如本文公开的核酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物，用作药物。

[0553] 在另一方面，本发明涉及根据本文公开的任一项实施方案中的结合剂，或如本文公开的核酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物，用于治疗疾病，例如癌症。

[0554] 在另一方面，本发明涉及治疗疾病的方法，该方法包括向有此需要的受试者施用有效量的根据本文公开的任一项实施方案的结合剂或如本文公开的核酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物。

[0555] 特别地，根据本发明的结合剂可用于治疗环境中，在该治疗环境中期望表达PD-L1的细胞的特异性靶向和T细胞介导的杀伤，并且在某些此类适应症和环境中它们与常规抗PD-L1相比可以更有效。

[0556] 本发明的结合剂在治疗和诊断多种PD-L1相关疾病中也具有额外的效用。例如，结合剂(特别是抗体)可用于在体内或体外引发以下一种或多种生物学活性：抑制表达PD-L1的细胞的生长和/或分化；杀死表达PD-L1的细胞；在存在人效应细胞的情况下介导表达PD-L1的细胞的吞噬作用或ADCC；在补体存在下介导表达PD-L1的细胞的CDC；介导表达PD-L1的细胞的凋亡；和/或在与PD-L1结合后诱导转位进入脂筏中。在另一方面，本发明涉及治疗疾病的方法，其包括向有此需要的受试者施用根据本文公开的任何实施方案的结合剂、核酸、表达载体、细胞或组合物。在本发明的一个实施方案中，方法涉及疾病的治疗，其中疾病是癌症。

[0557] 一方面，本发明涉及根据本文公开的任一项实施方案的结合剂，或如本文公开的核酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物，用于治疗癌症。

[0558] 在另一方面，本发明涉及根据本文公开的任一项实施方案的结合剂，或如本文公开的核酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物，其用于治疗以实体瘤的存在为特征的癌症疾病。

[0559] 在本发明的一个实施方案中，如本文所公开的结合剂、核酸、表达载体、细胞或组合物用于治疗癌症或治疗癌症的方法中，其中癌症以实体瘤的存在为特征，或选自下组：黑色素瘤、卵巢癌、肺癌、结肠癌和头颈癌。

[0560] 在另一方面，本发明涉及根据本文公开的任何实施方案的结合剂，或如本文公开的核酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物，用于治疗选自下组的癌症疾病：黑色素瘤，卵巢癌，肺癌，结直肠癌，头颈癌，胃癌，乳腺癌，肾癌，膀胱癌，食道癌，胰腺癌，肝癌，胸腺瘤和胸腺癌，脑癌，胶质瘤，肾上腺皮质癌，甲状腺癌，其他皮肤癌，肉瘤，多发性骨髓瘤，白血病，淋巴瘤，脊髓发育不良综合征，卵巢癌，子宫内膜异位癌，前列腺癌，阴茎癌，霍奇金淋巴瘤，非霍奇金淋巴瘤，Merkel细胞癌和间皮瘤。

[0561] 在一个具体的实施方案中，肺癌是非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0562] 在另一方面，本发明涉及根据本文公开的任一项实施方案的结合剂或如本文公开的核酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物在制备药物，例如用于治疗癌症的药物中的用途，例如以实体瘤的存在为特征的癌症疾病或选自下组的癌症疾病：黑色素瘤，卵巢癌，肺癌，结肠癌和头颈癌。

[0563] 在本发明的一个实施方案中，根据本文公开的任何实施方案的方法或用途包含与一种或多种另外的治疗剂，如化学治疗剂组合。

[0564] 在一方面，本发明涉及用于生产根据本文公开的任何实施方案的双特异性抗体的方法，其包括以下步骤：

[0565] a.培养产生第一抗体的宿主细胞，所述第一抗体包含与人CD137结合的抗原结合区，并任选地从培养物中纯化所述第一抗体；

[0566] b.培养产生第二抗体的宿主细胞，所述第二抗体包含与人PD-L1结合的抗原结合区，并任选地从培养物中纯化所述第二抗体；

[0567] c.在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起温育，以及

[0568] d.获得所述CD137xPD-L1双特异性抗体。

[0569] 本发明还涉及抑制表达PD-L1的一种或多种肿瘤细胞的生长和/或增殖，和/或诱导杀伤和/或消除表达PD-L1的一种或多种肿瘤细胞的方法，该方法包括向有此需要的个体施用本发明的结合剂(例如双特异性抗体)或本发明的组合物。

[0570] 本发明还涉及用于治疗癌症的方法，包括

[0571] a)选择患有包含表达PD-L1的肿瘤细胞的癌症的受试者，和

[0572] b)向受试者施用本发明的结合剂(例如双特异性抗体)或本发明的药物组合物。

[0573] 调整上述治疗方法和用途中的剂量方案以提供最佳的期望响应(例如治疗响应)。例如，可以施用单次推注，可以随时间施用数个分开的剂量，或者可以根据治疗情况的紧急程度指示按比例减少或增加剂量。胃肠外组合物可以配制成剂量单位形式，以易于施用和剂量均匀。

[0574] 结合剂的有效剂量和剂量方案取决于要治疗的疾病或状况，并且可以由本领域技术人员确定。本发明化合物的治疗有效量的示例性非限制性范围是约0.001-10mg/kg，诸如约0.001-5mg/kg，例如约0.001-2mg/kg，诸如约0.001-1mg/kg，例如约0.001、约0.01、约0.1、约1或约10mg/kg。本发明的结合剂(例如双特异性抗体)的治疗有效量的另一个示例性

的非限制性范围是约0.1-100mg/kg，诸如约0.1-50mg/kg，例如约0.1-20mg/kg，例如约0.1-10mg/kg，例如约0.5，例如约0.3、约1、约3、约5、或约8mg/kg。

[0575] 具有本领域普通技术的医师或兽医可以容易地确定并开出所需要的药物组合物的有效量。例如，医师或兽医可以以比实现期望治疗效果所需要的水平更低的水平开始在药物组合物中使用的结合剂(例如双特异性抗体)剂量，并逐渐增加剂量直至实现期望的效果。通常，本发明的结合剂(例如双特异性抗体)的合适的日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。施用可以例如是胃肠外的，例如静脉内，肌肉内或皮下的。在一个实施方案中，可以通过以mg/m^2计算的每周剂量通过输注来施用结合剂(例如双特异性抗体)。此类剂量可以例如基于上文根据以下提供的mg/kg剂量：剂量(mg/kg)x 70:1.8。此类施用可以重复例如1至8次，例如3至5次。可以通过2至24小时，例如2至12小时的时段内持续输注进行施用。在一个实施方案中，可以通过长时间(例如超过24小时)内缓慢连续输注来施用结合剂(例如双特异性抗体)，以减少毒性副作用。

[0576] 在一个实施方案中，当一周一次给予时，结合剂可以以以固定剂量计算的每周剂量施用直至8次，例如4至6次。此类方案可以根据需要重复一次或多次，例如在6个月或12个月后。此类固定剂量可以例如基于以上提供的mg/kg剂量，体重估计为70kg。可以通过例如取出生物样品并使用靶向本发明抗体的PD-L1抗原抗原结合区的抗独特型抗体，测量施用后血液中本发明的结合剂(例如双特异性抗体)的量确定或调节剂量。

[0577] 在一个实施方案中，可以将结合剂作为维持疗法施用，诸如例如每周一次，持续6个月或更长时间。

[0578] 还可以预防性地施用结合剂，以降低发生癌症的风险，延迟癌症进展中事件的发生和/或降低癌症缓解时复发的风险。

[0579] 本发明的结合剂也可以在联合疗法中施用，即与对于要治疗的疾病或病状相关的其他治疗剂组合。因此，在一个实施方案中，含有结合剂(例如双特异性抗体)的药物用于与一种或多种其他治疗剂组合，例如细胞毒剂，化学治疗剂或抗血管生成剂。

[0580] 在一方面，本发明涉及与如本文公开的任何一个实施方案中所定义的第一和/或第二抗原结合区结合的抗独特型抗体。

[0581] 在另一方面，本发明涉及与如本文公开的任何一个实施方案中所定义的CD137结合区结合的抗独特型抗体。

[0582] 在另一方面，本发明涉及与如本文公开的任何一个实施方案中所定义的PD-L1结合区结合的抗独特型抗体。

[0583] 通过以下实施例进一步说明本发明，这些实施例不应解释为限制本发明的范围。

[0584] 序列

[0585] 表1

[0586]

SEQ ID	名称	序列
1	VH_b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWV RQAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTAD TSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQ DNYYMDVWGKGTTVIVSS
2	VH_b12-CDR1	GYRFSNFV
3	VH_b12-CDR2	INPYNGNK
4	VH_b12-CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV
5	VL_b12	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQH KPGQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITR VEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK
6	VL_b12-CDR1	HSIRSRR
	VL_b12-CDR2	GVS
7	VL_b12-CDR3	QVYGASSYT
8	VH_CD137-009	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNDYWMSWVR QAPGKGLEWIGYIDVGGSLYYASWAKGRFTISRTSTTV DLKMTSLTTEDTATYFCARGGLTYGFDLWGPGTLVTV SS
9	VH_CD137-009_CDR 1	GFSLNDYW
10	VH_CD137-009_CDR 2	IDVGGSL
11	VH_CD137-009_CDR 3	ARGGLTYGFDL
12	VL_CD137-009	DIVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASEDISSYLAWYQQ KPGQRPKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTEYALTISD

[0587]

		LESADAATYYCHYYATISGLGVAFGGGTEVVVK
13	VL_CD137-009_CDR1	EDISSY
	VL_CD137-009_CDR2	GAS
14	VL_CD137-009_CDR3	HYYATISGLGVA
15	VH_CD137-009-H7	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWV RQAPGKGLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDS KSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQG TLVTVSS
9	VH_CD137-009-H7_CDR1	GFSLNDYW
10	VH_CD137-009-H7_CDR2	IDVGGSL
11	VH_CD137-009-H7_CDR3	ARGGLTYGFDL
16	VL_CD137-009-L2	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQ KPGKAPKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISS LQPEDIATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEIK
13	VL_CD137-009-L2_CDR1	EDISSY
	VL_CD137-009-L2_CDR2	GAS
14	VL_CD137-009-L2_CDR3	HYYATISGLGVA
17	VH-PD-L1-547	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFSTYAMSWV RQAPGKGLEWVSGFSGSGGFTFYADSVRGRFTISRDSS KNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAIPARGYNYGSFQHWG QGTLVTVSS
18	VH- PD-L1-547-CDR1	GSTFSTYA
19	VH- PD-L1-547-CDR2	FSGSGGFT
20	VH- PD-L1-547-CDR3	AIPARGYNYGSFQH
21	VL- PD-L1-547	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVVYDDNDRPSGLPERFSGSNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL
22	VL- PD-L1-547-CDR1	NIGSKS
	VL- PD-L1-547-CDR2	DDN
23	VL- PD-L1-547-CDR3	QVWDSSSDHVV
24	IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**R**LTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	IgG1-FEAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL

[0588]

		GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF**L**LYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	Kappa-C	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	Lambda-C	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
28	人PD-L1	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMT IECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLK VQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVY RCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSE HELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREE KLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPE LPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMM DVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
29	食蟹猴PD-L1	MRIFAVFIFTIYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTI ECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKV QHSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYR CMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEH ELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEK LLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRLDPEENHTAELVIPEL PLALPPNERTHLVILGAIFLLLGVALTFIFYLRKGRMMD MKKCGIRVTNSKKQRDTQLEET
30	人CD137	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFF LALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
31	食蟹猴CD137	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDLCSNCPAGTFCD NNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKE CSSTSNAECDCISGYHCLGAECSMCEQDCKQGQELTK KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQIIFFL ALTSTVVLFLLFFLVLRFSVVKRSRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
32	人CD137改组6（野猪CD137的氨基酸24-47）	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSVPDPCSNCSAGTFCG KNIQELCMPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRK ECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELT KKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNG TKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISF FLALTSTALLGGCEL
33	人CD137改组5（非洲	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPLNSFSSTGGQMNCDMCRKCEGVFKTK

[0589]

	象 CD137 的氨基酸 48-88)	RACSPTRDAECECTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQEL TKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVN GTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQII SFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
34	人CD137改组4 (野猪 CD137 的氨基酸 89-114)	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKE CSSTSNAECDCVPGFRCLGAGCAMCEEYCQQGQELTQ KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFF LALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
35	人CD137改组3 (野猪 CD137 的氨基酸 115-138)	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK EGCKDCSFGTFNDEEHGVCRPWTDCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFF LALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
36	人CD137改组2 (野猪 CD137 的氨基酸 139-161)	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLAGKPVLMNGT KARDVVCGPRPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISF FLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
37	人CD137改组1 (野猪 CD137 的氨基酸 162-186)	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPTDFSPGTPSTTMPVPGGEPGHTSHIISFF LALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL
38	野猪CD137	MGNGYYNIVATVLLVMNFERTRSVPDPCSNCSAGTFC GKNIQELCMPCPSNSFSSTSGQKACNVCRKCEGVFRTK KECSSTSNAVCECVPGFRCLGAGCAMCEEYCQQGQEL TQEGCKDCSFGTFNDEEHGVCRPWTDCSLAGKPVLMN GTKARDVVCGPRPTDFSPGTPSTTMPVPGGEPGHTSHV IIFFLALMSTAVFVLVSYLALRFSVVQQGRKKLLYIVKQ PFLKPAQTVQEEDACSCRFPEEEEGECEL
39	非洲象CD137	MGNGYYNMVATVLLVMNFERTGAVQDSCRDCLAGT YCVKNESQICSPCPLNSFSSTGGQMNCDMCRKCEGVF KTKRACSPTRDAECECVSGFHCLGAGCTMCQQDCKQ GQELTKEGCKDCCLGTFNDQKNGICRPWTNCSLEGKS VLANGTKKRDVVCGPPAADSFPDTSSVTVPAPERKPD HHPQIITFFLALISAALLFLVFFLVVRFSVAKWGRKKLL YIFKQPFIKPVQTAQEEDGCSCRFPEEEEGDCEL
40	人CD137 氨基酸48-88	CPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC DC

[0590]

41	人CD137（成熟蛋白质）	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTC DICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCS MCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPW TNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTP PAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL
42	VH-CD137-MOR7480-FEAR	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVR QMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYSPSFQGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTLV TVSS
43	VH-CD137-MOR7480-FEAR_CDR1	GYSFSTYW
44	VH-CD137-MOR7480-FEAR_CDR2	IYPGDSYT
45	VH-CD137-MOR7480-FEAR_CDR3	ARGYGIFDY
46	VL-CD137-MOR7480 (Lambda)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQK PGQSPVLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ AMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL
47	VL-CD137-MOR7480_CDR1	NIGDQY
	VL-CD137-MOR7480_CDR2	QDK
48	VL-CD137-MOR7480_CDR3	ATYTGFGSLAV
49	VH-CD137-005-FEAR	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFTISDFHVTWVRQ APGKGLEWIGTIITSASTTAYATWARGRFTISKSSTTVN LKIVSPTTEDTATYFCARSTYTDTSGYYFDFWGQGTLV TVSS
50	VH-CD137-005-FEAR_CDR1	GFTISDFH
51	VH-CD137-005-FEAR_CDR2	IITSASTT
52	VH-CD137-005-FEAR_CDR3	ARSTYTDTSGYYFDF
53	VL-CD137-005 (Kappa)	AQVLTQTASPVSAAVGGTVIINCQSSQSIYNGNRLSWY QQKPGQPPKLLIYSASTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLAI SDVQSDDAATYYCLGSYDCDSADCFAFGGGTEVVVE
54	VL-CD137-005_CDR1	QSIYNGNR
	VL-CD137-005_CDR2	SAS
55	VL-CD137-005_CDR3	LGSYDCDSADCFA
56	重组人白介素类似物 (Proleukin® (aldesleukin))	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL ELKGSETTFMSEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
57	MPDL3280A VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWY RQAPGKGLEWYAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWG

[0591]

		QGTLVTVSS
58	MPDL3280A VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK

实施例

[0592] 实施例1:CD137抗体的生成

[0593] 如WO2016/110584的实施例1中所述生成抗体CD137-005和CD137-009。简而言之,用含有人CD137-Fc融合蛋白的蛋白质混合物对兔进行免疫。从血液中分选出单一B细胞,并通过ELISA和流式细胞术筛选CD137特异性抗体的产生。从筛选阳性的B细胞中提取RNA并进行测序。基因合成重链和轻链的可变区,并将其克隆到人IgG1 kappa表达载体或人IgG1 lambda表达载体中,其包括含有以下氨基酸突变的人IgG1重链:L234F、L235E、D265A和F405L(FEAL)或F405L(FEAL),其中氨基酸位置编号是根据EU编号(对应于SEQ ID NO:25)。嵌合CD137抗体(CD137-009)的可变区序列显示于本文的序列表SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:12中。

[0594] 实施例2:兔(嵌合)CD137抗体的人源化

[0595] 来自兔抗CD137-009的人源化抗体序列在Antitope(Cambridge,UK)生成。使用种系人源化(CDR-移植)技术生成人源化抗体序列。基于人种系序列设计人源化V区基因,所述人种系序列与兔抗体的VH和Vκ氨基酸序列具有最接近的同源性。设计了一系列7个VH和3个Vκ(VL)种系人源化V区基因。使用Swiss PDB产生非人亲本抗体V区的结构模型并进行分析以鉴定V区框架中可以对抗体的结合特性重要的氨基酸。注意到这些氨基酸掺入一种或多种变体CDR-移植的抗体中。用作人源化设计基础的种系序列示于表2中。

[0596] 表2:最接近匹配的人种系V区段和J区段序列。

[0597]

抗体	重链		轻链(κ)	
	人V区种系区段	人J区种系区段	人V区种系区段	人J区种系区段
兔抗 CD137-009	hIGHV3-49*04	hIGHJ4	hIGKV1-33*01	IGKJ4

[0598] 然后使用Antitope专有的计算机技术,iTope™和TCED™(T细胞表位数据库)选择具有最低潜在T细胞表位发生率的变体序列(Perry,L.C.A,Jones,T.D.and Baker,M.P.New Approaches to Prediction of Immune Responses to Therapeutic Proteins during Preclinical Development(2008).Drugs in R&D 9(6):385-396;20;Bryson,C.J.,Jones,T.D.and Baker,M.P.Prediction of Immunogenicity of Therapeutic Proteins(2010).Biodrugs 24(1):1-8)。最后,对设计的变体的核苷酸序列进行了密码子优化。

[0599] 人源化CD137抗体(CD137-009-HC7LC2)的可变区序列显示在本文的序列表SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16中。

[0600] 实施例3:在野猪CD137或象CD137和人CD137之间进行DNA改组以确定CD137抗体的对结合重要的域

[0601] 为了确定对CD137抗体与人CD137结合重要的域,在人和野猪CD137(sus scrofa;XP_005665023)之间或人和非洲象CD137(loxodonta africana;XP_003413533)之间进行DNA改组。通过用野猪(改组构建体1-4、6)或象(改组构建体5)域替换人域,从编码人CD137的DNA制备改组构建体。改组构建体的氨基酸序列显示于表1中。

[0602] 如果人CD137中的域对于抗CD137抗体的结合是重要的,则在用野猪或非洲象域替换该域时将丧失结合。

[0603] 人和野猪之间以及人和非洲象CD137之间的同源性分别为70.2％和74.5％。选择这两个物种的要求是，与人相比，非洲象和野猪中感兴趣的域有足够的差异，从而导致结合的丧失，而保留关键的结构相互作用，这对于最小化错误折叠或表达丧失的风险是必要的。图1显示了人、野猪和非洲象CD137的序列比对。图2显示了含有野猪CD137或非洲象CD137域的人CD137的构建体，如所示。

[0604] 将3×10^6个HEK293T-17细胞接种在T75培养瓶(Greiner Bio-One，目录号658175)中的含有10％FCS(Biochrom，目录号S 0115)的20mL RPMI 1640GlutaMAX培养基中。在O/N温育后，根据制造商的说明书，使用TransIT®-LT1转染试剂，Mirus Bio(VWR International，目录号731-0029)，用组成型活性人延伸因子-1alpha(EF-1alpha)启动子下游的编码改组构建体或野猪、非洲象或人CD137的表达载体瞬时转导细胞。次日，使用1.5mL Accutase(Sigma Aldrich，目录号A6964)(在37℃温育5分钟)收获细胞，并且基本上同上所述进行流式细胞术，以测量改组构建体和人、非洲象和野猪CD137的表面表达，并测量抗体克隆与不同改组构建体的结合。为了测量构建体的细胞表面表达，将转导的细胞与1μg/mL山羊多克隆抗人CD137(R&D Systems，目录号AF838)在FACS缓冲液中温育(4℃，20分钟)，然后与APC标记的抗山羊IgG(H+L)(R&D Systems，目录号F0108)(4℃，20分钟)温育。通过将转导的细胞与1μg/mL的抗体克隆一起温育，然后与APC标记的AffiniPure F(ab')2片段(1:50最终稀释；Jackson，目录号109-136-127)一起温育来测量不同CD137抗体克隆与表达改组构建体的细胞的结合。

[0605] 所有CD137改组构建体以及人、非洲象和野猪CD137以相似的表达水平在细胞表面上表达(图3)。

[0606] 图4显示CD137-009显示出与非洲象和野猪CD137的结合丧失。与结合人CD137相比，CD137-009也显示出与改组构建体5的结合丧失。

[0607] 实施例4：PD-L1抗体的生成

[0608] 在Aldevron GmbH(Freiburg，Germany)进行免疫和杂交瘤的产生。将编码人PD-L1氨基酸19-238的cDNA克隆到Aldevron专有表达质粒中。通过使用用于颗粒轰击的手持式装置(“基因枪”)，使用皮内应用涂有人PD-L1 cDNA的金颗粒，对OmniRat动物(表达具有完全人独特型的抗体的多样化全集的转基因大鼠；Ligand Pharmaceuticals Inc.，San Diego，USA)进行免疫来生成抗体PD-L1-547。一系列免疫后收集血清样品，并在流式细胞仪中对用上述表达质粒瞬时转染以表达人PD-L1的HEK细胞进行测试。分离产生抗体的细胞，并根据标准程序与小鼠骨髓瘤细胞(Ag8)融合。提取来自产生PD-L1特异性抗体的杂交瘤的RNA，并进行测序。重链和轻链的可变区(SEQ ID NO:17和21)经基因合成并克隆到人IgG1 lambda表达载体中，其包括含有以下氨基酸突变的人IgG1重链：L234F、L235E、D265A和K409R(FEAR)，其中氨基酸位置编号是根据EU编号(对应于SEQ ID NO:24)。

[0609] 实施例5：通过2-MEA诱导的Fab臂交换产生双特异性抗体

[0610] 通过在受控的还原条件下进行Fab臂交换产生双特异性IgG1抗体。该方法的基础是使用互补的CH3域，该CH3域在特定的测定条件下促进异二聚体的形成，如WO2011/131746中所述。将F405L和K409R(EU编号)突变引入相关抗体中，以创建具有互补CH3域的抗体对。

[0611] 为了生成双特异性抗体，将两种亲本互补抗体(每种抗体的终浓度为0.5mg/mL)与75mM 2-巯基乙胺-HCl(2-MEA)在31℃下以100μL PBS的总体积温育5小时。通过使用旋转柱

(Microcon离心过滤器,30k,Millipore)根据制造商的方案除去还原剂2-MEA来终止还原反应。

[0612] 通过组合以下来自实施例1和4的抗体生成双特异性抗体:

[0613] -CD137-009-FEAL抗体与PD-L1-547-FEAR抗体组合

[0614] -PD-L1-547-FEAL抗体与CD137-009-FEAR组合

[0615] -PD-L1-547-FEAL抗体与CD137-009-HC7LC2-FEAR抗体组合

[0616] -b12-FEAL抗体与PD-L1-547-FEAR抗体、与CD137-009-FEAR或与CD137-009-HC7LC2-FEAR抗体组合,使用抗体b12作为第一臂,所述抗体b12是gp120特异性抗体(Barbas,CF.J Mol Biol.1993Apr 5;230(3):812-23)

[0617] -PD-L1-547-FEAL或CD137-009-FEAL与b12-FEAR抗体

[0618] 实施例6:PD-L1抗体对PD-1/PD-L1相互作用的影响

[0619] 如在Promega(Madison,USA)开发的PD-1/PD-L1抑制生物测定法中测定单价PD-L1抗体b12-FEALxPD-L1-547-FEAR对PD-1和PD-L1相互作用的影响。这是一种基于生物发光细胞的测定法,其由两种遗传工程化细胞系组成:PD-1效应细胞,其是表达由NFAT响应元件(NFAT-RE)驱动的人PD-1和萤光素酶报告物的Jurkat T细胞,以及PD-L1 aAPC/CHO-K1细胞,其是表达人PD-L1和工程化细胞表面蛋白的CHO-K1细胞,所述工程化细胞表面蛋白设计为以不依赖于抗原的方式激活关联TCR。当将两种细胞类型共培养时,PD-1/PD-L1相互作用抑制TCR信号传导和NFAT-RE介导的发光。添加阻断PD-1/PD-L1相互作用的抗体释放抑制信号,并导致TCR活化和NFAT-RE介导的发光。

[0620] 根据制造商的方案融化PD-L1 aAPC/CHO-K1细胞(Promega,目录号J109A),重悬于含有10%胎牛血清(FBS;Promega,目录号:J121A)的Ham's F12培养基(Promega,目录号J123A)中,并接种在96孔平底培养板(CulturPlate-96,Perkin Elmer,目录号6005680)中。将板在37℃,5%CO_2温育16小时。除去上清液,并且添加抗体的连续稀释(最终浓度范围为5至0.001μg/mL;在含1%胎牛血清[FBS;Promega,目录号J121A]的RPMI 1640[Lonza,目录号BE12-115F]中的4倍稀释)。添加PD-1效应细胞(Promega,目录号J115A;根据制造商的方案融化并重悬于RPMI/1%FBS)。将板在37℃,5%CO_2温育6小时。平衡至室温后,将40μl Bio-Glo试剂(Bio-Glo萤光素酶测定缓冲液[Promega,目录号G7198]中根据制造商的方案重建的Bio-Glo萤光素酶测定底物[Promega目录号G720B])添加到每孔。将板在室温温育5-10分钟,并使用EnVision Multilabel Reader(PerkinElmer)测量发光。相对于对照(未添加抗体),对PD1-PD-L1相互作用的影响如下计算:

[0621] 诱导倍数=RLU(诱导-背景)/RLU(无抗体对照-背景),RLU是相对光单位

[0622] 图5显示单价抗体b12-FEALxPD-L1-547-FEAR有效地抑制了PD1-PD-L1相互作用。

[0623] 实施例7:抗原特异性$CD8^+$T细胞增殖测定法以测量与PD-L1和CD137结合的双特异性抗体的作用

[0624] CD137xPD-L1双特异性抗体的预期作用模式的示意图显示于图6中。

[0625] 为了在抗原特异性测定法中测量通过靶向PD-L1和CD137的双特异性抗体对T细胞增殖的诱导,用密蛋白-6体外转录RNA(IVT-RNA)转染树突细胞(DC)以表达密蛋白-6抗原。用PD-1IVT-RNA和用密蛋白-6特异性HLA-A2限制性T细胞受体(TCR)转染T细胞。该TCR可以识别DC上HLA-A2中呈递的密蛋白-6衍生表位。CD137xPD-L1双特异性抗体可以交联在单核

细胞衍生的树突细胞上或肿瘤细胞上内源表达的PD-L1以及T细胞上的CD137，从而导致抑制了抑制性PD-1/PD-L1相互作用以及同时CD137的聚集，导致T细胞增殖。在T细胞上表达的CD137受体的聚集导致CD137受体的激活，从而将共刺激信号传递到T细胞。

[0626] HLA-A2^{+}外周血单个核细胞(PBMC)获自健康供体(Transfusionszentrale, University Hospital,Mainz,Germany)。根据制造商的说明，使用抗CD14MicroBead(Miltenyi;目录号130-050-201)，通过磁激活细胞分选(MACS)技术从PBMC中分离出单核细胞。将外周血淋巴细胞(PBL,CD14阴性级分)冷冻，用于将来T细胞分离。为了分化成未成熟的DC(iDC)，将1x10^{6}个单核细胞/ml在含有5％人AB血清(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,目录号H4522-100ML)，丙酮酸钠(Life Technologies GmbH,目录号11360-039)，非必需氨基酸(Life Technologies GmbH,目录号11140-035)，100IU/mL青霉素-链霉素(Life Technologies GmbH,目录号15140-122)，1000IU/mL粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF;Miltenyi,目录号130-093-868)和1,000IU/mL白介素-4(IL-4;Miltenyi,目录号130-093-924)的RPMI GlutaMAX(Life technologies GmbH,目录号61870-044)中培养5天。在这五天期间，一次将一半的培养基替换为新鲜的培养基。通过收集非贴壁细胞来收获iDC，并且通过与含有2mM EDTA的PBS在37℃温育10分钟来分离贴壁细胞。洗涤后，将iDC冷冻在含有10％v/v DMSO(AppliChem GmbH,目录号A3672,0050)+50％v/v人AB血清的RPMI GlutaMAX中，以用于将来的抗原特异性T细胞测定法。

[0627] 在开始抗原特异性CD8^{+}T细胞增殖测定法的前一天，将来自同一供体的冷冻PBL和iDC解冻。根据制造商的说明，使用抗CD8 MicroBead(Miltenyi,目录号130-045-201)通过MACS技术从PBL中分离出CD8^{+}T细胞。使用BTX ECM® 830电穿孔系统设备(BTX;500V,1x 3ms脉冲)在4-mm电穿孔比色皿(VWR International GmbH,目录号732-0023)中用250μL X-Vivo15(Biozym Scientific GmbH,目录号881026)中的10μg编码α链的体外翻译(IVT)-RNA加10μg编码密蛋白-6特异性鼠TCR的β链的IVT-RNA(HLA-A2受限;描述于WO2015150327A1中)加10μg编码PD-1的IVT-RNA对约10-15x 10^{6}个CD8^{+}T细胞进行电穿孔。电穿孔后，立即将细胞转移到新鲜的补充有5％人AB血清的IMDM培养基(Life Technologies GmbH,目录号12440-061)中，并在37℃，5％CO_2下静置至少1小时。根据制造商的说明，使用PBS中的1.6μM羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE;Invitrogen,目录号C34564)标记T细胞，并在补充有5％人AB血清的IMDM培养基中温育，O/N。

[0628] 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5μg编码全长密蛋白-6的IVT-RNA电穿孔多达5x 10^{6}个解冻的iDC，并在补充有5％人AB血清的IMDM培养基中温育，O/N。

[0629] 次日，收获细胞。通过流式细胞术检查DC上的密蛋白-6和PD-L1以及T细胞上的TCR和PD-1的细胞表面表达。用Alexa647缀合的CLDN6特异性抗体(非市售;内部生产)和抗人CD274抗体(PD-L1,eBioscienes,目录号12-5983)对DC进行染色，并用抗小鼠TCRβ链抗体(Becton Dickinson GmbH,目录号553174)和抗人CD279抗体(PD-1,eBioscienes,目录号17-2799)对T细胞染色。在存在双特异性或对照抗体的情况下，在96孔圆底板中补充有5％人AB血清的IMDM GlutaMAX中将5,000个经电穿孔的DC与50,000个经电穿孔的CFSE标记的T细胞一起温育。5天后通过流式细胞术测量T细胞增殖。通过FlowJo软件基于表明细胞分裂的CFSE峰进行了T细胞增殖的详细分析。结果中，“％分裂的细胞”表示进入分裂的细胞的百

分比，而“增殖指数”表示进入分裂的细胞的分裂的平均数。

[0630] 与和b12(作为常规IgG1)温育相比，具有一个无关的结合臂的单价PD-L1对照抗体b12-FEALxPD-L1-547-FEAR在一定程度上增强了T细胞增殖，并且双特异性抗体CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR诱导$CD8^+$T细胞的强烈增殖(图7)。这通过分裂细胞百分比的增加(图7B和D的左图)以及增殖指数的增加(图7B和D的右图)两者来反映。

[0631] 另外，该测定法中的EC_{50}值是针对CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR确定的。为此，以1至0.00015μg/mL的3倍连续稀释液对双特异性抗体进行分析(图8)。通过FlowJo软件确定分裂细胞的百分比和增殖指数。使用GraphPad Prism 5软件(GraphPad Software,San Diego,CA,USA)，通过非线性回归(具有可变斜率的S形剂量响应)来分析曲线。CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR诱导抗原特异性T细胞增殖的EC_{50}值对于“%分裂的细胞”为0.003492μg/mL，而对于“增殖指数”为0.005388μg/mL。

[0632] 实施例8：在具有活性PD1/PD-L1轴的抗原特异性T细胞测定法中将靶向PD-L1和CD137的双特异性抗体与两种单价结合的CD137和PD-L1抗体或两种亲本抗体(PD-L1-547+CD137-009)的组合进行比较

[0633] 为了测量靶向PD-L1和CD137的双特异性抗体对T细胞增殖的诱导，进行了具有活性PD1/PD-L1轴的抗原特异性T细胞增殖测定法(类似于实施例7的一般测定设置)。简而言之，在存在双特异性或对照抗体的情况下，在96孔圆底板中补充有5％人AB血清的IMDM GlutaMAX中将5,000个经密蛋白-6-IVT-RNA电穿孔的DC与50,000个经密蛋白-6特异性TCR和PD1-IVT-RNA电穿孔的CFSE标记的T细胞一起温育。5天后通过流式细胞术测量T细胞增殖。使用FlowJo软件基于表明细胞分裂的CFSE峰进行了T细胞增殖的详细分析。结果中，“%分裂的细胞”表示进入分裂的细胞的百分比，而“增殖指数”表示进入分裂的细胞的分裂的平均数。

[0634] 当与IgG1-b12进行比较时，具有一个无关的结合臂的单价CD137对照抗体CD137-009-FEALxb12-FEAR和相应的二价亲本抗体CD137-009都不对T细胞增殖具有影响。相比之下，与和IgG1-b12对照抗体温育相比，与单价PD-L1对照抗体以及二价亲本抗体(分别为b12-FEALxPD-L1-547-FEAR和PD-L1-547)温育导致T细胞增殖适度增强。与组合的单价对照抗体(CD137-009-FEALxb12-FEAR+b12-FEALxPD-L1-547-FEAR)和组合的相应亲本抗体(CD137-009+PD-L1-547)一起温育后，可检测到相当水平的T细胞增殖。相反，双特异性抗体CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR诱导了$CD8^+$T细胞强烈的增殖，这优于两种组合的对照(单价和二价)(图9)。这通过分裂细胞百分比的增加(图9B)以及增殖指数的增加(图9C)两者反映出来。

[0635] 实施例9：离体TIL扩增测定法以评估CD137xPD-L1双特异性抗体对肿瘤浸润淋巴细胞的作用。

[0636] 为了评估CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR对肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的作用，如下进行人肿瘤组织的离体培养。通过使用抹刀(spatula)或血清移液管将分离的肿瘤块从含有洗涤培养基的6孔板(Fisher Scientific目录号10110151)的一个孔中转移到下一个孔，将新鲜的人肿瘤组织切除样品洗涤3次。洗涤培养基由补充有1％Pen/Strep(Thermo Fisher，目录号15140-122)和1％两性霉素B(Fungizone)(Thermo Fisher，目录号15290-026)的X-VIVO 15(Biozym，目录号881024)组成。接下来，用手术刀(Braun/Roth，目录号

5518091BA223)切割肿瘤,并切成直径约1-2mm的片。将两片各自放入含有1mL TIL培养基(X-VIVO 15,10%人血清白蛋白(HSA,CSL Behring,目录号PZN-6446518)1%Pen/Strep,1%两性霉素B并补充有10U/mL IL-2(Proleukin®S,Novartis Pharma,目录号02238131))的24孔板(VWR international,目录号701605)的一个孔中。以指定的最终浓度添加CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR。将培养板在37℃和5%CO_2下温育。72小时后,将1mL含有指定浓度的双特异性抗体的新鲜TIL培养基添加到每个孔中。每隔一天经由显微镜监测孔中是否存在TIL簇。当在各个孔中检测到超过25个TIL微簇时,分别转移孔。为了分开TIL培养物,将24孔板的孔中的细胞重悬于2mL培养基中,并将其转移至6孔板的孔中。另外,每个孔补充了另外2mL的TIL培养基。

[0637] 经过10-14天的总培养时段后,收获TIL,并通过流式细胞仪进行分析。用以下试剂对细胞进行染色,所有试剂均在染色缓冲液(含有5%FCS和5mM EDTA的D-PBS)中1:50稀释:抗人CD4-FITC(Miltenyi Biotec,目录号130-080-501),抗人CD3-PE-Cy7(BD Pharmingen,目录号563423),7-氨基放线菌素D(7-AAD,Beckman Coulter,目录号A07704),抗人CD56-APC(eBioscience,目录号17-0567-42)和抗人CD8-PE(TONBO,目录号50-0088)。为了允许定量比较不同处理组之间获得的细胞,在最后的洗涤步骤之后,将细胞沉淀重悬在补充有BD™CompBead(BD biosciences,目录号51-90-9001291)的FACS缓冲液中。在BD FACSCanto™II流式细胞仪(Becton Dickinson)上进行流式细胞术分析,并使用FlowJo 7.6.5软件分析采集的数据。通过将获得的7AAD阴性级分相对于获得的珠计数进行标准化来计算与6孔板中相应孔相关的每1,000个珠的相对活TIL计数,$CD3^+CD8^+$T细胞计数,$CD3^+CD4^+$T细胞计数和$CD3^-CD56^+$NK细胞计数。

[0638] 图10显示了来自人非小细胞肺癌组织样品的TIL扩增的分析。在此,添加了以下浓度的CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR:0.01、0.1和1μg/mL;来自相同患者的未添加抗体的组织样品用作阴性对照。培养10天后,收获TIL并通过流式细胞术分析。对于源自24孔板的不同孔的每种抗体浓度,测量了五个样品(来自5个原始孔)。与没有抗体对照样品的情况下相比,在所有用双特异性抗体培养的样品中,TIL的活计数显著增加。总体而言,当向培养物中添加0.1μg/mL CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR时,观察到多达10倍的活TIL扩增(图10A)。$CD3^+CD4^+$T辅助细胞仅略微扩增(图10C;2.8倍扩增),而相比之下,对于$CD3^-CD56^+$NK细胞可见最明显的TIL扩增(图10D;相对于对照的多达64倍扩增)。还观察到了对$CD3^+CD8^+$细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的强烈作用(图10B;相对于对照的7.4倍扩增)。

[0639] 实施例10:在OT-1CD8+过继性T细胞转移后,与mPD-L1和mCD137结合的替代双特异性小鼠抗体对C57BL/6小鼠中卵清蛋白特异性T细胞增殖的作用

[0640] 使用基于受控Fab臂交换的生成鼠双特异性抗体的方法生成替代小鼠双特异性抗体mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A、mCD137-3H3xb12和mPD-L1-MPDL3280Axb12(Labrijn et al,2017Sci Rep.7(1):2476和WO2016097300)。

[0641] 从BioXcell(目录号BE0239)获得与小鼠4-1BB结合的单克隆抗体3H3,并在ProtTech进行了蛋白质测序。使用专有方法推导推断的cDNA序列。重链和轻链的可变区经基因合成并克隆到小鼠IgG2a表达载体中,其包括含有以下氨基酸突变的鼠IgG2a恒定区:L234A、L235A、F405L和R411T。类似地,将b12的可变区克隆到该表达载体中。

[0642] 已经描述了抗体MPDL3280A(重链和轻链可变序列分别如SEQ ID NO:57和58中所

示)结合人和小鼠PD-L1两者。将该抗体的重链和轻链的可变区克隆到小鼠IgG2a表达载体中,其包括含有以下氨基酸突变的鼠IgG2a恒定区:L234A、L235A、T370K和K409R。

[0643] 如上文所述,通过Fab臂交换在受控的还原条件下生成双特异性小鼠(本质上是大鼠-人-小鼠嵌合)抗体。

[0644] 在研究入组前至少六天,将体重在17至24g之间的6-8周龄的雌性C57BL/6JOlaHsd小鼠(Envigo RMS GmbH,Rossdorf,Germany)驯化。这些小鼠用作受体。对OT-1和Thy1.1等位基因两者纯合的雌性或雄性C57BL/6Thy1.1 x C57BL/6J OT-1小鼠进行内部繁殖(从C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/Crl和B6.PL-Thy1a/CyJ小鼠杂交)并用作供体。小鼠可以自由进食食物(ssniff M-Z autoclavable Soest,Germany)和无菌水,并在22℃±2℃及相对湿度55%±15%的12小时光照/黑暗周期下饲养。

[0645] 在研究开始的当天,处死C57BL/6Thy1.1 x C57BL/6J OT-1供体小鼠并分离脾脏。机械分离脾脏,并通过用红细胞裂解缓冲液(8.25g/L NH_4Cl,1g/L $KHCO_3$、0.1mM EDTA,pH7)重悬脾细胞沉淀物来裂解红细胞。随后,用Dulbecco的PBS(DPBS)洗涤脾细胞,并使用CD8a(Ly-2)MicroBead,小鼠与autoMACS Pro Separator(两者均为Miltenyi Biotec GmbH,Bergisch Gladbach,Germany)组合来分离$CD8^+$T细胞。每C57BL/6JOlaHsd受体小鼠经眶后注射总体积为200μL的$CD8^+$/$OT\text{-}1^+$/$Thy1.1^+$T细胞(2.5-5x10^5个细胞)。在过继性细胞转移后次日,用100μg卵清蛋白/200μL PBS作为抗原刺激物对受体小鼠进行眶后“接种疫苗”。6小时后,用相应的双特异性抗体对小鼠进行眶后处理。详细地,每小鼠注射100μg或20μg的mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A、mCD137-3H3xb12或mPD-L1-MPDL3280Axb12抗体。普通PBS的注射用作基线参考,并且未处理的动物(仅接受供体细胞的小鼠)用作阴性对照。6天后,经由眶后途径抽取100μL血液,并在BD FACSCanto II细胞仪(Becton Dickinson GmbH)上使用V500大鼠抗小鼠CD45(Becton Dickinson GmbH,目录号561487),FITC大鼠抗小鼠CD8a(Life Technologies,目录号MCD0801)和Alexa Fluor 647抗大鼠CD90/小鼠CD90.1(BioLegend Europe,目录号202508)抗体对$Thy1.1^+CD8^+$T细胞进行分析。Thy1.1(CD90.1)阳性用作OT-1特异性T细胞的替代物。

[0646] 图11A是OT-1过继性T细胞转移测定法概述的示意图。图11B显示了如通过流式细胞术确所定的$Thy1.1^+CD8^+$T细胞频率的分析。对于每种双特异性抗体处理方式,使用n=5只小鼠。与未处理的动物相比,单独的卵清蛋白抗原刺激导致Thy1.1+CD8+T细胞频率的可检测到的增加。有趣的是,与仅用卵清蛋白处理的动物相比,具有一个不相关的b12结合臂的两种单价对照抗体mCD137-3H3-xb12和mPD-L1-MPDL3280Axb12均不能够增强卵清蛋白特异性OT-1T细胞扩增。相反,双特异性抗体mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A能够诱导OT-1T细胞的强烈增殖,导致在两种测试的剂量水平(20和100μg抗体)下,T细胞频率为10-20%$CD8^+$/$OT\text{-}1^+$/$Thy1.1^+$T(总T细胞群的百分比)。

[0647] 实施例11:与mPD-L1和mCD137的结合的替代双特异性小鼠抗体对皮下同基因CT26小鼠肿瘤模型中肿瘤生长的作用

[0648] 在研究入组前至少六天,将体重在17至24g之间的6-8周龄的雌性BALB/cRj小鼠(Janvier,Genest-St.-Îsle,France)驯化。小鼠可以自由进食食物(ssniff M-Z autoclavable Soest,Germany)和无菌水,并在22℃±2℃及相对湿度55%±10%的12小时光照/黑暗周期下饲养。从ATCC®(目录号CRL-2638™)获得CT26细胞,并在补充有10%胎

牛血清(FBS)(Biochrom,目录号S 0115)的Roswell Park Memorial Institute培养基(RPMI)1640培养基,GlutaMAX™(Life technologies,目录号61870-044)中在5%CO_2中,37℃下培养。使用StemPro®Accutase®细胞解离试剂(Life technologies,目录号A1110501)收获细胞,将其重悬于DPBS(Life technologies,目录号14190-169),并且每小鼠0.5x10^6个细胞/100μl皮下(SC)植入到雌性BALB/c Rj小鼠剃光的右侧腹。每2-3天通过卡尺测量来评价肿瘤体积,并使用以下公式将其表示为垂直直径的乘积:$a^2 \times b/2$,其中b是两个直径的较长者(a＜b)。当平均肿瘤体积达到30mm^3时,将动物分为四组。次日开始处理,腹腔内注射20μg与mPD-L1和mCD137结合的双特异性抗体(mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A),其中具有一个无关的结合臂的单价mCD137对照抗体或mPD-L1对照抗体(mCD137-3H3xb12和mPD-L1-MPDL3280Axb12)或PBS作为阴性对照。给药时间表为前八次注射每2-3天一次,随后每7天注射一次,直到实验结束。肿瘤细胞接种后第29天,经由眶后途径抽取100μL血液,并在BD FACSCanto II细胞仪(Becton Dickinson GmbH)上使用V500大鼠抗小鼠CD45(Becton Dickinson GmbH,目录号561487)、FITC大鼠抗小鼠CD8α(Life technologies,目录号MCD0801)抗体和T-Select H-2Ld MuLV gp70四聚体-SPSYVYHQF-APC(MBL Ltd.Corp.,目录号TS-M521-2)对gp70特异性$CD8^+$T细胞进行分析(gp70是CT26肿瘤细胞上表达的包膜蛋白)。

[0649] 图12A显示所有四个处理组的肿瘤生长曲线,其中各个线代表单个肿瘤/小鼠。每个绘图的底部给出了各个处理组的无进展生存(PFS)频率。图12B展示了相应的Kaplan-Meier生存曲线,直到肿瘤细胞接种后第71天实验结束。图12C显示了如通过流式细胞术确定的gp70四聚体$^+CD8^+$T细胞频率的分析。对于每种处理方式,分析了肿瘤细胞植入后第29天仍然存活的所有小鼠。总而言之,与mPD-L1和mCD137结合的双特异性抗体(mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A)提供了最有效的肿瘤控制,其中10只动物中有5只(即50%)进入完全肿瘤消退。相比之下,对于mCD137-3H3xb12对照,观察到抗肿瘤作用稍弱,但仍很突出;处理导致11只动物中有3只(即27%)能够排斥肿瘤。在这两种情况下,所有进入完全缓解的小鼠直至实验结束均保持无肿瘤。与之形成鲜明对比的是,经mPD-L1-MPDL3280Axb12处理的分组以及PBS对照两者均不能够控制肿瘤负荷,其中mPD-L1-MPDL3280Axb12处理至少导致在肿瘤细胞接种后第15和30天之间,11只动物中有2只(即18%)有一些间歇性肿瘤生长抑制。当查看能够结合gp70四聚体的$CD8^+$T细胞的频率时,在mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A处理的动物中可检测到最高的gp70特异性CD8+T细胞频率(2.14%±1.52%)。相比之下,mCD137-3H3xb12(0.90%±0.46%)、mPD-L1-MPDL3280Axb12(0.94%±1.06%)和PBS处理的对照动物(0.66%±0.49%)中的gp70四聚体$^+$CD8-T细胞频率要低得多,在这三种处理方式之间只有最小程度的差异。

[0650] 实施例12:PD-L1抗体或b12xPD-L1双特异性抗体与肿瘤细胞的结合

[0651] PD-L1抗体和b12xPD-L1双特异性抗体与人肿瘤细胞系MDA-MB-231(乳腺癌;ATCC;目录号HTB-26),PC-3(前列腺腺癌;ATCC;目录号CRL-1435)和SK-MES-1(肺鳞状细胞癌;ATCC;目录号HTB-58)的结合通过流式细胞术分析。

[0652] 将细胞(3-5x10^4个细胞/孔)在聚苯乙烯96孔圆底板(Greiner bio-one,目录号650101)中与50μL PBS/0.1%BSA/0.02%叠氮化物(FACS缓冲液)中抗体的连续稀释液(5倍稀释步骤,范围为0.0001至10μg/mL)于4℃温育30分钟。在FACS缓冲液中洗涤两次后,将细

胞与二抗中于4℃温育30分钟。作为二抗，对于所有实验使用50μL FACS缓冲液中以1:500稀释的缀合有R-藻红蛋白(PE)的山羊抗人IgG F(ab')$_2$(目录号109-116-098,Jackson ImmunoResearch Laboratories,Inc.,West Grove,PA)。接下来，将细胞在FACS缓冲液中洗涤两次，重悬于20μL FACS缓冲液中，并在iQue筛选器(Intellicyt Corporation,USA)上进行分析。使用非线性回归(具有可变斜率的S形剂量响应)，使用GraphPad Prism V75.04软件(GraphPad Software,San Diego,CA,USA)分析结合曲线。

[0653] 使用MPDL3280A(重链和轻链可变序列分别如SEQ ID NO:57和58中所示)，如所描述的(Poncelet and Carayon,1985,J.Immunol.Meth.85:65-74)进行定量流式细胞术(QIFIKIT®,Dako;目录号K0078)，以定量MDA-MB-231,PC-3和SK-MES-1细胞的质膜上的抗原密度。确定细胞系具有以下PD-L1抗原密度(ABC,抗体结合能力)：

[0654] • MDA-MB-231:约21,000个ABC/细胞

[0655] • PC-3:约6,000个ABC/细胞

[0656] • SK-MES-1:约30,000个ABC/细胞

[0657] 与MDA-MB-231细胞的结合

[0658] 图13(A)显示b12-FEALxPD-L1-547-FEAR与MDA-MB-231细胞的剂量依赖性结合，具有比单特异性二价PD-L1-547-FEAR更高的最大结合。

[0659] 与PC-3细胞的结合

[0660] 图13(B)显示b12-FEALxPD-L1-547-FEAR与PC3细胞的剂量依赖性结合，具有比单特异性二价PD-L1-547-FEAR更高的最大结合。

[0661] 与SK-MES-1细胞的结合

[0662] 图13(C)显示b12-FEALxPD-L1-547-FEAR与SK-MES-1细胞的剂量依赖性结合，具有比单特异性二价PD-L1-547-FEAR更高的最大结合。

[0663] 实施例13:使用丙氨酸扫描确定CD137氨基酸残基对抗体结合的贡献

[0664] 文库设计

[0665] 合成了CD137(Uniprot Q07011)单残基丙氨酸文库(Geneart)，其中人CD137的胞外域中的所有氨基酸残基都单独突变为丙氨酸，除了已经含有丙氨酸或半胱氨酸的位置。为了使抗原的结构破坏的机会最小化，不对半胱氨酸进行突变。具有丙氨酸的位置突变为甘氨酸。将文库克隆到含有CMV/TK-polyA表达盒、Amp抗性基因和pBR322复制起点的pMAC表达载体中。

[0666] 文库产生和筛选

[0667] 根据制造商的说明(Thermo Scientific)，在FreeStyle HEK293细胞中分别表达野生型CD137和丙氨酸突变体。转染后一天，收获细胞。在FACS缓冲液中，将约100,000个细胞与20μL感兴趣的AlexaFluor®488-(A488-)缀合的抗体温育(表3)。将细胞在室温下温育30分钟。随后，使用150-200μL FACS缓冲液通过离心将细胞洗涤两次。将细胞悬浮在30μL FACS缓冲液中，并保存在4℃下，直到使用iQue筛选器通过流式细胞仪进行分析。

[0668] 整个实验重复三次。

[0669] 表3:用于在使用丙氨酸扫描确定CD137氨基酸残基在抗体结合中的贡献的抗体。在进行实验之前，根据制造商的说明将抗体用Alexa488(Invitrogen,目录号A20000)标记。CD137-MOR7480-FEAR是替代MOR7480抗体，将其克隆到含有FEAR突变的人IgG1主链中。

[0670]

抗体	最终浓度	缀合物
b12-FEALxCD137-009-FEAR-A488	3 μg/mL	Alexa488
CD137-005-FEAR-A488		
CD137-MOR7480-FEAR-A488		

[0671] 数据分析

[0672] 对于每个样品,将每细胞结合的抗体的平均量确定为活的单细胞群体的荧光强度的几何平均值(gMFI)。gMFI受抗体对CD137突变体的亲和力和每细胞CD137突变体的表达水平的影响。由于特定的丙氨酸突变可以影响突变体CD137的表面表达水平,并且通常为了校正每个CD137突变体的表达差异,使用以下等式相对于非交叉阻断CD137特异性对照抗体的结合强度将数据标准化:

[0673] $$标准化\,gMFI_{aa位置} = Log_{10}\left(\frac{gMFI_{测试Ab}}{gMFI_{对照Ab}}\right)$$

[0674] 其中的"aa位置"是指突变为丙氨酸或甘氨酸的位置。为了表示抗体结合的丧失或获得,可以根据以下计算来计算zscore:

[0675] $$zscore(倍数变化) = \frac{标准化\,gMFI_{aa位置} - \mu}{\sigma}$$

[0676] 其中μ和σ是从所有突变体计算出的标准化gMFI的平均值和标准偏差。

[0677] zscore为0表示与参考抗体的结合相比,特定抗体没有结合丧失或获得;zscore>0表示与参考抗体的结合相比,结合的获得;zscore<0表示与参考抗体的结合相比,结合的丧失。在大多数情况下,如由zscore确定的结合的获得是由于参考抗体与特定的丙氨酸或甘氨酸突变体的结合丧失引起的。为了校正样品变化,只有其中结合的zscore低于-1.5的CD137氨基酸残基被认为是"结合突变体的丧失"。

[0678] 如果针对特定CD137突变体的对照抗体的gMFI低于平均$gMFI_{aa位置}$-平均$gMFI_{对照Ab}$的2.5x SD,则将数据从分析中排除(假设那些CD137突变体的表达水平不足以得出结论)。

[0679] 图14显示了CD137抗体与在位置1至163(根据SEQ ID 41)处具有丙氨酸或甘氨酸突变的CD137变体的结合丧失。结果表明

[0680] • 当aa L1、Q2、P4、G11、T12、D15或Q20突变为丙氨酸时,抗体CD137-005-FEAR显示出结合的丧失。这表明抗体CD137-005-FEAR的结合至少依赖于人CD137的aa L1、Q2、P4、G11、T12、D15、Q20,

[0681] • 当aa F13、F30、T38、D40或N60突变为丙氨酸时,抗体b12-FEALxCD137-009-FEAR显示出结合的丧失。这表明抗体b12-FEALxCD137-009-FEAR的结合至少依赖于人CD137的aa F13、F30、T38、D40和N60。由于F13和F30最有可能在结构上影响表位相互作用,因此抗体b12-FEALxCD137-009-FEAR至少依赖于aa T38、D40和N60,

[0682] • 当aa L72、G93、F102、N103、I109、R111或W113突变为丙氨酸时,抗体CD137-MOR7048-FEAR显示出结合的丧失。这表明抗体MOR7048的结合至少依赖于人CD137的aa L72、G93、F102、N103、I109、R111和W113。

[0683] 实施例14:非抗原特异性T细胞增殖测定法以测量与PD-L1和CD137结合的双特异

性抗体的作用

[0684] PD-L1xCD137双特异性抗体的预期作用模式的示意图显示于图6中。

[0685] 为了测量多克隆活化的T细胞中T细胞增殖的诱导,将PBMC与次优浓度的抗CD3抗体(克隆UCHT1)一起温育以活化T细胞,与PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR双特异性抗体或对照抗体组合。在PBMC群体中,表达PD-L1的细胞可以通过双特异性抗体的PD-L1特异性臂结合,而群体中的T细胞可以通过CD137特异性臂结合。在该测定法中,T细胞增殖是经由CD137特异性臂使T细胞反式激活的量度,其通过经由双特异性抗体与表达PD-L1的细胞交联并通过阻断PD-L1:PD-1相互作用来诱导,其测量为T细胞增殖。

[0686] 使用Ficoll梯度(VWR,目录号17-5446-02)从健康供体(Transfusionszentrale,University Hospital,Mainz,Germany)的血沉棕黄层获得PBMC。根据制造商的说明,使用PBS中的1.6μM羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)(Thermo Fisher,目录号C34564)标记PBMC。在96孔圆底板(Sigma Aldrich,CLS3799-50EA)中每孔接种75,000个CFSE标记的PBMC,并在补充有5%人AB血清的150μL IMDM Gluta MAX中与对每个供体预先确定以诱导次优T细胞增殖的次优浓度的抗CD3抗体(R&D Systems,克隆UCHT1,目录号MAB100;0.03-0.1μg/mL终浓度)以及双特异性或对照抗体在37℃,5%CO_2中温育四天。通过流式细胞术分析$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的增殖,基本上如上所述。含有PE标记的CD4抗体(BD Biosciences,目录号555347;1:80最终稀释度)、PE-Cy7标记的CD8α抗体(克隆RPA-T8,eBioscience,目录号25-0088-41;1:80最终稀释度)、APC标记的CD56抗体(eBiosciences,目录号17-0567;1:80最终稀释度)和7-AAD(Beckman Coulter,目录号A07704;1:80最终稀释度)的30μL FACS缓冲液用于染色细胞并从分析中排除$CD56^+$自然杀伤(NK)细胞和$7\text{-}AAD^+$死细胞。在BD FACSCanto II流式细胞仪(BD Biosciences)上测量样品作为增殖读出。通过FlowJo 10.4软件基于表明细胞分裂的CFSE峰对T细胞增殖进行详细分析,并在GraphPad Prism版本6.04(GraphPad Software,Inc)中使用导出的扩增指数值绘制剂量反应曲线。扩增指数确定了整个培养的倍数扩增;扩增指数为2.0表示细胞计数加倍,而扩增指数为1.0表示整个细胞计数没有变化。

[0687] 通过测试了用于刺激的两种不同的抗CD3浓度以及无抗CD3作为对照,分析了来自三个不同供体的PBMC。图15显示双特异性抗体PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR诱导了$CD4^+$和$CD8^+$T细胞两者的强烈扩增。当与和同种型对照抗体b12 IgG一起温育相比,具有一个无关臂的单价CD137对照抗体b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR和相应的二价亲本抗体CD137-009-HC7LC2-FEAR不影响$CD4^+$(A)或$CD8^+$(B)T细胞增殖。仅当抗CD3对PBMC的刺激已经导致强烈的T细胞活化(如仅培养基的对照组中通过较高的扩增指数所观察到的[参见供体1在0.1μg/ml的抗CD3刺激下])时,与b12 IgG相比,单价PD-L1对照抗体以及二价亲本抗体(分别为b12-FEALxPD-L1-547-FEAR和PD-L1-547-FEAR)略微增强了T细胞增殖。对于组合的单价对照抗体(b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR+b12-FEALxPD-L1-547-FEAR)和组合的相应的亲本抗体(CD137-009-HC7LC2-FEAR+PD-L1-547-FEAR)也可检测到与单价和二价PD-L1对照抗体相当的T细胞增殖水平。然而,由双特异性PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR抗体诱导的增殖的增强优于两种组合对照(单价和二价)(图15)。

[0688] 在另一项独立研究中,使用从两个供体获得的PBMC确定了PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR的EC_{50}值,所述供体分别用0.03和0.09μg/mL抗CD3次优地刺

激。使用在1μg/mL开始且在0.15ng/mL结束的连续稀释液对PD-L1-547-FEAL xCD137-009-HC7LC2-FEAR进行测定，并包括处于1μg/mL的b12-IgG-FEAL作为同种型对照抗体。对于$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的增殖，生成了剂量反应曲线(图16)，并且对于$CD8^+$T细胞的增殖，还确定了EC_{20}、EC_{50}和EC_{90}值，如表4中所示。

[0689] 表4.基于如通过非抗原特异性T细胞增殖测定法测量的$CD8^+$T细胞扩增数据，确定PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR的EC_{20}、EC_{50}和EC_{90}值。显示的数据是基于四个参数对数拟合计算的值(图16)。

[0690]

供体	抗 CD3 [μg/ml]	EC_{50} 值 [μg/ml]	Hill 斜率 (Hill-Slope)	计算的 EC_{20} [μg/ml]	计算的 EC_{90} [μg/ml]
1	0.03	0.01218	1.134	0.00359	0.08455

[0691]

2	0.09	0.00689	0.635	0.00078	0.21917

[0692] 实施例15:抗原特异性$CD8^+$T细胞增殖测定法以测量由与PD-L1和CD137结合的双特异性抗体诱导的细胞因子释放

[0693] 基本上如实施例7所述进行，在抗原特异性测定法中测量了靶向PD-L1和CD137的双特异性抗体PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR诱导的细胞因子释放。

[0694] 用10μg编码TCRα链和10μg编码β链的RNA(具有或不具有2μg编码PD-1的IVT RNA)对T细胞进行电穿孔。经电穿孔的T细胞未经CFSE标记(如上所述)，但是在电穿孔后立即转移到补充有5％人AB血清的新鲜IMDM培养基(Life Technologies GmbH，目录号12440-061)中。如上所述，用5μg密蛋白-6(CLDN6)编码RNA对iDC电穿孔。在O/N温育后，如上所述，用Alexa647缀合的CLDN6-特异性抗体对DC染色并且用抗小鼠TCRβ链抗体和抗人CD279抗体对T细胞进行染色。

[0695] 在存在不同浓度的PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR双特异性抗体或对照抗体b12xIgG-FEAL的情况下，在96孔圆底板中的补充有5％人AB血清的IMDM GlutaMAX中将5,000个经电穿孔的DC与50,000个经电穿孔的T细胞一起温育。48小时温育时段后，将板以500x g离心5分钟，并将上清液小心地从每个孔转移到新鲜的96孔圆底板中，并存储在-80℃直至在MSD®平台上进行细胞因子分析。根据制造商的说明在MESO QuickPlex SQ 120仪器(Meso Scale Diagnostics，LLC.，目录号R31QQ-3)上通过MSD V-Plex人促炎组1(10-Plex)试剂盒(Meso Scale Diagnostics，LLC.，目录号K15049D-2)分析了从抗原特异性增殖测定法收集的上清液中10种不同细胞因子的细胞因子水平。

[0696] PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR的添加导致主要IFN-γ、TNF-α、IL-13和IL-8分泌的浓度依赖性增加(图17)。所有其他细胞因子(IL-10、IL-12p70、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6)的细胞因子水平均未升高到高于用对照抗体b12-IgG-FEAL处理的共培养物中检测到的那些水平。当将其中未用PD-1RNA电穿孔的T细胞的T细胞:DC共培养物与其中用2μg PD-1RNA电穿孔的T细胞的T细胞:DC共培养物进行比较时，对于无PD-1RNA电穿孔共培养

物,可检测到稍高的细胞因子水平。对于PD-L1-547-FEALxCD137-009-FEAR剂量反应曲线以及b12-IgG-FEAL对照抗体值均观察到这一点。

[0697] 实施例16:抗原非特异性体外T细胞增殖测定法以测量由与PD-L1和CD137结合的双特异性抗体诱导的细胞因子释放

[0698] 基本上如上文所述(实施例14)进行,在抗原非特异性体外T细胞增殖测定法中测量靶向PD-L1和CD137的双特异性抗体PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR诱导的细胞因子释放。反式结合,即双臂同时与其各自的靶标结合对十种促炎性细胞因子(IFN-γ、TNF-α、IL-13、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6)的细胞因子释放的作用通过在添加抗体后48小时收集的上清液的多重夹心免疫测定法分析。

[0699] PBMC未经CSFE标记(如上所述),但在分离后立即接种,并且仅使用一种浓度的抗CD3抗体(最终浓度为0.03μg/mL)。

[0700] 48小时温育时段后,通过以500x g离心5分钟收集细胞,并将上清液小心地从每个孔转移到新鲜的96孔圆底板中,并存储在-80℃直至在MSD®平台上进行细胞因子分析。根据制造商的说明在MESO QuickPlex SQ 120仪器(Meso Scale Diagnostics,LLC.,目录号R31QQ-3)上通过MSD V-Plex人促炎组1(10-Plex)试剂盒(Meso Scale Diagnostics,LLC.,目录号K15049D-2)分析了收集的上清液中10种不同细胞因子的细胞因子水平。

[0701] 添加PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR诱导了主要IFN-γ、TNF-α、IL-2和IL-13的浓度依赖性的分泌增加(图18)。对于IL-10、IL-12p70以及IL-4,也可检测到仅具有轻微升高的水平的剂量反应曲线。IL-1β、IL-6和IL-8的细胞因子水平保持在基线水平,因此与用对照抗体b12-IgG-FEAL处理的共培养物中检测到的那些水平相当。

[0001] 序列表

[0002] <110> 健玛保

[0003] 生物技术公司

[0004] <120> 与PD-L1和CD137结合的结合剂及其用途

[0005] <130> P/0116-WO-PCT[3]

[0006] <150> PCT/EP2017/069839

[0007] <151> 2017-08-04

[0008] <150> PCT/EP2018/052946

[0009] <151> 2018-02-06

[0010] <160> 58

[0011] <170> PatentIn version 3.5

[0012] <210> 1

[0013] <211> 127

[0014] <212> PRT

[0015] <213> 人

[0016] <400> 1

[0017] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0018] 1 5 10 15

[0019] Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe

[0020] 20 25 30

[0021] Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met

[0022] 35 40 45

[0023] Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe

[0024] 50 55 60

[0025] Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr

[0026] 65 70 75 80

[0027] Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0028] 85 90 95

[0029] Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr

[0030] 100 105 110

[0031] Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser

[0032] 115 120 125

[0033] <210> 2

[0034] <211> 8

[0035] <212> PRT

[0036] <213> 人

[0037] <400> 2

[0038] Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe Val

[0039] 1 5

[0040] <210> 3

[0041] <211> 8

[0042] <212> PRT

[0043] <213> 人

[0044] <400> 3

[0045] Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys

[0046] 1 5

[0047] <210> 4

[0048] <211> 20

[0049] <212> PRT

[0050] <213> 人

[0051] <400> 4

[0052] Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr

[0053] 1 5 10 15

[0054] Tyr Met Asp Val

[0055] 20

[0056] <210> 5

[0057] <211> 108

[0058] <212> PRT

[0059] <213> 人

[0060] <400> 5

[0061] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0062] 1 5 10 15

[0063] Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg

[0064] 20 25 30

[0065] Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val

[0066] 35 40 45

[0067] Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser

[0068] 50 55 60

[0069] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu

[0070] 65 70 75 80

[0071] Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser

[0072] 85 90 95

[0073] Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys

[0074] 100 105

[0075] <210> 6

[0076] <211> 7

[0077] <212> PRT

[0078] <213> 人

[0079] <400> 6

[0080] His Ser Ile Arg Ser Arg Arg

[0081] 1 5

[0082] <210> 7

[0083] <211> 9

[0084] <212> PRT

[0085] <213> 人

[0086] <400> 7

[0087] Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser Tyr Thr

[0088] 1 5

[0089] <210> 8

[0090] <211> 114

[0091] <212> PRT

[0092] <213> 人

[0093] <400> 8

[0094] Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro

[0095] 1 5 10 15

[0096] Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asp Tyr Trp

[0097] 20 25 30

[0098] Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

[0099] 35 40 45

[0100] Tyr Ile Asp Val Gly Gly Ser Leu Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

[0101] 50 55 60

[0102] Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr

[0103] 65 70 75 80

[0104] Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly

[0105] 85 90 95

[0106] Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val

[0107] 100 105 110

[0108] Ser Ser

[0109] <210> 9

[0110] <211> 8

[0111] <212> PRT

[0112] <213> 人

[0113] <400> 9

[0114] Gly Phe Ser Leu Asn Asp Tyr Trp

[0115] 1 5

[0116] <210> 10

[0117] <211> 7

[0118] <212> PRT

[0119] <213> 人

[0120] <400> 10

[0121] Ile Asp Val Gly Gly Ser Leu

[0122] 1 5

[0123] <210> 11

[0124] <211> 11

[0125] <212> PRT

[0126] <213> 人

[0127] <400> 11

[0128] Ala Arg Gly Gly Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Leu

[0129] 1 5 10

[0130] <210> 12

[0131] <211> 110

[0132] <212> PRT

[0133] <213> 人

[0134] <400> 12

[0135] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly

[0136] 1 5 10 15

[0137] Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Ser Tyr

[0138] 20 25 30

[0139] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Arg Leu Ile

[0140] 35 40 45

[0141] Tyr Gly Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala

[0142] 50 55 60

[0143] Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ala Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Ser

[0144] 65 70 75 80

[0145] Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Tyr Tyr Ala Thr Ile Ser Gly

[0146] 85 90 95

[0147] Leu Gly Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys

[0148] 100 105 110

[0149] <210> 13

[0150] <211> 6

[0151] <212> PRT

[0152] <213> 人

[0153] <400> 13

[0154] Glu Asp Ile Ser Ser Tyr

[0155] 1 5

[0156] <210> 14

[0157] <211> 12

[0158] <212> PRT

[0159] <213> 人

[0160] <400> 14

[0161] His Tyr Tyr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Gly Val Ala

[0162] 1 5 10

[0163] <210> 15

[0164] <211> 117

[0165] <212> PRT

[0166] <213> 人

[0167] <400> 15

[0168] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

[0169] 1 5 10 15

[0170] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asp Tyr

[0171] 20 25 30

[0172] Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0173] 35 40 45

[0174] Gly Tyr Ile Asp Val Gly Gly Ser Leu Tyr Tyr Ala Ala Ser Val Lys

[0175] 50 55 60

[0176] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile Ala Tyr Leu

[0177] 65 70 75 80

[0178] Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0179] 85 90 95

[0180] Arg Gly Gly Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu

[0181] 100 105 110

[0182] Val Thr Val Ser Ser

[0183] 115

[0184] <210> 16

[0185] <211> 110

[0186] <212> PRT

[0187] <213> 人

[0188] <400> 16

[0189] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0190] 1 5 10 15

[0191] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Ser Tyr

[0192] 20 25 30

[0193] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

[0194] 35 40 45

[0195] Tyr Gly Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
[0196] 50 55 60
[0197] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0198] 65 70 75 80
[0199] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Tyr Tyr Ala Thr Ile Ser Gly
[0200] 85 90 95
[0201] Leu Gly Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0202] 100 105 110
[0203] <210> 17
[0204] <211> 121
[0205] <212> PRT
[0206] <213> 人
[0207] <400> 17
[0208] Glu Val Gln Leu Leu Glu Pro Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0209] 1 5 10 15
[0210] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Thr Tyr
[0211] 20 25 30
[0212] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0213] 35 40 45
[0214] Ser Gly Phe Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
[0215] 50 55 60
[0216] Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Phe
[0217] 65 70 75 80
[0218] Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0219] 85 90 95
[0220] Ala Ile Pro Ala Arg Gly Tyr Asn Tyr Gly Ser Phe Gln His Trp Gly
[0221] 100 105 110
[0222] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0223] 115 120
[0224] <210> 18
[0225] <211> 8
[0226] <212> PRT
[0227] <213> 人
[0228] <400> 18
[0229] Gly Ser Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
[0230] 1 5
[0231] <210> 19
[0232] <211> 8
[0233] <212> PRT

[0234] <213> 人

[0235] <400> 19

[0236] Phe Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr

[0237] 1 5

[0238] <210> 20

[0239] <211> 14

[0240] <212> PRT

[0241] <213> 人

[0242] <400> 20

[0243] Ala Ile Pro Ala Arg Gly Tyr Asn Tyr Gly Ser Phe Gln His

[0244] 1 5 10

[0245] <210> 21

[0246] <211> 108

[0247] <212> PRT

[0248] <213> 人

[0249] <400> 21

[0250] Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

[0251] 1 5 10 15

[0252] Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

[0253] 20 25 30

[0254] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr

[0255] 35 40 45

[0256] Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Leu Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

[0257] 50 55 60

[0258] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

[0259] 65 70 75 80

[0260] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His

[0261] 85 90 95

[0262] Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[0263] 100 105

[0264] <210> 22

[0265] <211> 6

[0266] <212> PRT

[0267] <213> 人

[0268] <400> 22

[0269] Asn Ile Gly Ser Lys Ser

[0270] 1 5

[0271] <210> 23

[0272] <211> 11

[0273] <212> PRT

[0274] <213> 人

[0275] <400> 23

[0276] Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val

[0277] 1 5 10

[0278] <210> 24

[0279] <211> 330

[0280] <212> PRT

[0281] <213> 人工序列

[0282] <220>

[0283] <223> 具有FEAR取代的IgG1

[0284] <400> 24

[0285] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

[0286] 1 5 10 15

[0287] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

[0288] 20 25 30

[0289] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

[0290] 35 40 45

[0291] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

[0292] 50 55 60

[0293] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

[0294] 65 70 75 80

[0295] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0296] 85 90 95

[0297] Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

[0298] 100 105 110

[0299] Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

[0300] 115 120 125

[0301] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0302] 130 135 140

[0303] Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

[0304] 145 150 155 160

[0305] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

[0306] 165 170 175

[0307] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

[0308] 180 185 190

[0309] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

[0310] 195 200 205

[0311] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

[0312] 210 215 220

[0313] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

[0314] 225 230 235 240

[0315] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

[0316] 245 250 255

[0317] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

[0318] 260 265 270

[0319] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

[0320] 275 280 285

[0321] Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

[0322] 290 295 300

[0323] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

[0324] 305 310 315 320

[0325] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0326] 325 330

[0327] <210> 25

[0328] <211> 330

[0329] <212> PRT

[0330] <213> 人工序列

[0331] <220>

[0332] <223> 具有FEAL取代的IgG1

[0333] <400> 25

[0334] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

[0335] 1 5 10 15

[0336] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

[0337] 20 25 30

[0338] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

[0339] 35 40 45

[0340] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

[0341] 50 55 60

[0342] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

[0343] 65 70 75 80

[0344] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0345] 85 90 95

[0346] Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

[0347] 100 105 110

[0348] Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

[0349] 115 120 125

[0350] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0351] 130 135 140

[0352] Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

[0353] 145 150 155 160

[0354] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

[0355] 165 170 175

[0356] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

[0357] 180 185 190

[0358] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

[0359] 195 200 205

[0360] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

[0361] 210 215 220

[0362] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

[0363] 225 230 235 240

[0364] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

[0365] 245 250 255

[0366] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

[0367] 260 265 270

[0368] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu

[0369] 275 280 285

[0370] Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

[0371] 290 295 300

[0372] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

[0373] 305 310 315 320

[0374] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0375] 325 330

[0376] <210> 26

[0377] <211> 107

[0378] <212> PRT

[0379] <213> 人

[0380] <400> 26

[0381] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

[0382] 1 5 10 15

[0383] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

[0384] 20 25 30

[0385] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

[0386] 35 40 45

[0387] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

[0388] 50 55 60

[0389] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

[0390] 65 70 75 80

[0391] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

[0392] 85 90 95

[0393] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0394] 100 105

[0395] <210> 27

[0396] <211> 106

[0397] <212> PRT

[0398] <213> 人

[0399] <400> 27

[0400] Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser

[0401] 1 5 10 15

[0402] Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

[0403] 20 25 30

[0404] Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro

[0405] 35 40 45

[0406] Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

[0407] 50 55 60

[0408] Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

[0409] 65 70 75 80

[0410] Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val

[0411] 85 90 95

[0412] Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

[0413] 100 105

[0414] <210> 28

[0415] <211> 290

[0416] <212> PRT

[0417] <213> 人

[0418] <220>

[0419] <221> 信号

[0420] <222> (1)..(18)

[0421] <400> 28

[0422] Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu

[0423] 1 5 10 15

[0424] Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr

[0425] 20 25 30

[0426] Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu

[0427] 35 40 45

[0428] Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile

[0429] 50 55 60

[0430] Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser

[0431] 65 70 75 80

[0432] Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn

[0433] 85 90 95

[0434] Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr

[0435] 100 105 110

[0436] Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val

[0437] 115 120 125

[0438] Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val

[0439] 130 135 140

[0440] Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr

[0441] 145 150 155 160

[0442] Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser

[0443] 165 170 175

[0444] Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn

[0445] 180 185 190

[0446] Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr

[0447] 195 200 205

[0448] Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu

[0449] 210 215 220

[0450] Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His

[0451] 225 230 235 240

[0452] Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr

[0453] 245 250 255

[0454] Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys

[0455] 260 265 270

[0456] Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu

[0457] 275 280 285

[0458] Glu Thr

[0459] 290

[0460] <210> 29

[0461] <211> 290

[0462] <212> PRT

[0463] <213> 食蟹猴

[0464] <220>

[0465] <221> 信号

[0466] <222> (1)..(18)

[0467] <400> 29

[0468] Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Thr Ile Tyr Trp His Leu Leu
[0469] 1 5 10 15
[0470] Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
[0471] 20 25 30
[0472] Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
[0473] 35 40 45
[0474] Asp Leu Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
[0475] 50 55 60
[0476] Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Asn
[0477] 65 70 75 80
[0478] Tyr Arg Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
[0479] 85 90 95
[0480] Ala Ala Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
[0481] 100 105 110
[0482] Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
[0483] 115 120 125
[0484] Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
[0485] 130 135 140
[0486] Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
[0487] 145 150 155 160
[0488] Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
[0489] 165 170 175
[0490] Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Leu Asn
[0491] 180 185 190
[0492] Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu Ile Phe Tyr
[0493] 195 200 205
[0494] Cys Ile Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
[0495] 210 215 220
[0496] Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
[0497] 225 230 235 240
[0498] Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Phe Leu Leu Leu Gly Val Ala Leu Thr
[0499] 245 250 255
[0500] Phe Ile Phe Tyr Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Met Lys Lys Cys
[0501] 260 265 270
[0502] Gly Ile Arg Val Thr Asn Ser Lys Lys Gln Arg Asp Thr Gln Leu Glu
[0503] 275 280 285
[0504] Glu Thr
[0505] 290
[0506] <210> 30

[0507] <211> 255

[0508] <212> PRT

[0509] <213> 人

[0510] <220>

[0511] <221> 信号

[0512] <222> (1)..(23)

[0513] <400> 30

[0514] Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

[0515] 1 5 10 15

[0516] Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

[0517] 20 25 30

[0518] Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys

[0519] 35 40 45

[0520] Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

[0521] 50 55 60

[0522] Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser

[0523] 65 70 75 80

[0524] Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly

[0525] 85 90 95

[0526] Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

[0527] 100 105 110

[0528] Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

[0529] 115 120 125

[0530] Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

[0531] 130 135 140

[0532] Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro

[0533] 145 150 155 160

[0534] Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala

[0535] 165 170 175

[0536] Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

[0537] 180 185 190

[0538] Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu

[0539] 195 200 205

[0540] Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

[0541] 210 215 220

[0542] Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

[0543] 225 230 235 240

[0544] Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

[0545] 245 250 255

[0546] <210> 31

[0547] <211> 253

[0548] <212> PRT

[0549] <213> 食蟹猴

[0550] <220>

[0551] <221> 信号

[0552] <222> (1)..(23)

[0553] <400> 31

[0554] Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

[0555] 1 5 10 15

[0556] Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro

[0557] 20 25 30

[0558] Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys

[0559] 35 40 45

[0560] Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

[0561] 50 55 60

[0562] Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser

[0563] 65 70 75 80

[0564] Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly

[0565] 85 90 95

[0566] Ala Glu Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

[0567] 100 105 110

[0568] Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

[0569] 115 120 125

[0570] Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

[0571] 130 135 140

[0572] Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro

[0573] 145 150 155 160

[0574] Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala

[0575] 165 170 175

[0576] Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Phe Phe Leu Ala

[0577] 180 185 190

[0578] Leu Thr Ser Thr Val Val Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Val Leu Arg

[0579] 195 200 205

[0580] Phe Ser Val Val Lys Arg Ser Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys

[0581] 210 215 220

[0582] Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys

[0583] 225 230 235 240

[0584] Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu

[0585] 245 250

[0586] <210> 32

[0587] <211> 205

[0588] <212> PRT

[0589] <213> 人工序列

[0590] <220>

[0591] <223> 人-野猪嵌合CD137

[0592] <220>

[0593] <221> 信号

[0594] <222> (1)..(23)

[0595] <400> 32

[0596] Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

[0597] 1 5 10 15

[0598] Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Val Pro Asp Pro Cys Ser Asn Cys Ser

[0599] 20 25 30

[0600] Ala Gly Thr Phe Cys Gly Lys Asn Ile Gln Glu Leu Cys Met Pro Cys

[0601] 35 40 45

[0602] Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

[0603] 50 55 60

[0604] Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser

[0605] 65 70 75 80

[0606] Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly

[0607] 85 90 95

[0608] Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

[0609] 100 105 110

[0610] Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

[0611] 115 120 125

[0612] Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

[0613] 130 135 140

[0614] Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro

[0615] 145 150 155 160

[0616] Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala

[0617] 165 170 175

[0618] Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

[0619] 180 185 190

[0620] Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Gly Gly Cys Glu Leu

[0621] 195 200 205

[0622] <210> 33

[0623] <211> 255

[0624] <212> PRT

[0625] <213> 人工序列

[0626] <220>

[0627] <223> 人-野猪嵌合CD137

[0628] <220>

[0629] <221> 信号

[0630] <222> (1)..(23)

[0631] <400> 33

[0632] Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

[0633] 1 5 10 15

[0634] Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

[0635] 20 25 30

[0636] Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys

[0637] 35 40 45

[0638] Pro Leu Asn Ser Phe Ser Ser Thr Gly Gly Gln Met Asn Cys Asp Met

[0639] 50 55 60

[0640] Cys Arg Lys Cys Glu Gly Val Phe Lys Thr Lys Arg Ala Cys Ser Pro

[0641] 65 70 75 80

[0642] Thr Arg Asp Ala Glu Cys Glu Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly

[0643] 85 90 95

[0644] Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

[0645] 100 105 110

[0646] Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

[0647] 115 120 125

[0648] Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

[0649] 130 135 140

[0650] Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro

[0651] 145 150 155 160

[0652] Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala

[0653] 165 170 175

[0654] Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

[0655] 180 185 190

[0656] Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu

[0657] 195 200 205

[0658] Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

[0659] 210 215 220

[0660] Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

[0661] 225 230 235 240

[0662] Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

[0663] 245 250 255

[0664] <210> 34

[0665] <211> 255

[0666] <212> PRT

[0667] <213> 人工序列

[0668] <220>

[0669] <223> 人-野猪嵌合CD137

[0670] <220>

[0671] <221> 信号

[0672] <222> (1)..(23)

[0673] <400> 34

[0674] Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

[0675] 1 5 10 15

[0676] Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

[0677] 20 25 30

[0678] Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys

[0679] 35 40 45

[0680] Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

[0681] 50 55 60

[0682] Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser

[0683] 65 70 75 80

[0684] Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Val Pro Gly Phe Arg Cys Leu Gly

[0685] 85 90 95

[0686] Ala Gly Cys Ala Met Cys Glu Glu Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Glu Leu

[0687] 100 105 110

[0688] Thr Gln Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

[0689] 115 120 125

[0690] Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

[0691] 130 135 140

[0692] Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro

[0693] 145 150 155 160

[0694] Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala

[0695] 165 170 175

[0696] Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

[0697] 180 185 190

[0698] Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu

[0699] 195 200 205

[0700] Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

[0701] 210 215 220

[0702] Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
[0703] 225 230 235 240
[0704] Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
[0705] 245 250 255
[0706] <210> 35
[0707] <211> 255
[0708] <212> PRT
[0709] <213> 人工序列
[0710] <220>
[0711] <223> 人-野猪嵌合CD137
[0712] <220>
[0713] <221> 信号
[0714] <222> (1)..(23)
[0715] <400> 35
[0716] Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
[0717] 1 5 10 15
[0718] Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
[0719] 20 25 30
[0720] Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
[0721] 35 40 45
[0722] Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
[0723] 50 55 60
[0724] Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
[0725] 65 70 75 80
[0726] Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
[0727] 85 90 95
[0728] Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
[0729] 100 105 110
[0730] Thr Lys Glu Gly Cys Lys Asp Cys Ser Phe Gly Thr Phe Asn Asp Glu
[0731] 115 120 125
[0732] Glu His Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asp Cys Ser Leu Asp Gly Lys
[0733] 130 135 140
[0734] Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
[0735] 145 150 155 160
[0736] Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
[0737] 165 170 175
[0738] Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
[0739] 180 185 190
[0740] Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu

[0741] 195 200 205

[0742] Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

[0743] 210 215 220

[0744] Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

[0745] 225 230 235 240

[0746] Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

[0747] 245 250 255

[0748] <210> 36

[0749] <211> 255

[0750] <212> PRT

[0751] <213> 人工序列

[0752] <220>

[0753] <223> 人-野猪嵌合CD137

[0754] <220>

[0755] <221> 信号

[0756] <222> (1)..(23)

[0757] <400> 36

[0758] Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

[0759] 1 5 10 15

[0760] Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

[0761] 20 25 30

[0762] Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys

[0763] 35 40 45

[0764] Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

[0765] 50 55 60

[0766] Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser

[0767] 65 70 75 80

[0768] Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly

[0769] 85 90 95

[0770] Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

[0771] 100 105 110

[0772] Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

[0773] 115 120 125

[0774] Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Ala Gly Lys

[0775] 130 135 140

[0776] Pro Val Leu Met Asn Gly Thr Lys Ala Arg Asp Val Val Cys Gly Pro

[0777] 145 150 155 160

[0778] Arg Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala

[0779] 165 170 175

[0780] Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
[0781] 180 185 190
[0782] Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
[0783] 195 200 205
[0784] Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
[0785] 210 215 220
[0786] Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
[0787] 225 230 235 240
[0788] Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
[0789] 245 250 255
[0790] <210> 37
[0791] <211> 255
[0792] <212> PRT
[0793] <213> 人工序列
[0794] <220>
[0795] <223> 人-野猪嵌合CD137
[0796] <220>
[0797] <221> 信号
[0798] <222> (1)..(23)
[0799] <400> 37
[0800] Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
[0801] 1 5 10 15
[0802] Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
[0803] 20 25 30
[0804] Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
[0805] 35 40 45
[0806] Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
[0807] 50 55 60
[0808] Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
[0809] 65 70 75 80
[0810] Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
[0811] 85 90 95
[0812] Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
[0813] 100 105 110
[0814] Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
[0815] 115 120 125
[0816] Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
[0817] 130 135 140
[0818] Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro

[0819] 145 150 155 160
[0820] Ser Pro Thr Asp Phe Ser Pro Gly Thr Pro Ser Thr Thr Met Pro Val
[0821] 165 170 175
[0822] Pro Gly Gly Glu Pro Gly His Thr Ser His Ile Ile Ser Phe Phe Leu
[0823] 180 185 190
[0824] Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
[0825] 195 200 205
[0826] Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
[0827] 210 215 220
[0828] Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
[0829] 225 230 235 240
[0830] Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
[0831] 245 250 255
[0832] <210> 38
[0833] <211> 255
[0834] <212> PRT
[0835] <213> 野猪
[0836] <220>
[0837] <221> 信号
[0838] <222> (1)..(23)
[0839] <400> 38
[0840] Met Gly Asn Gly Tyr Tyr Asn Ile Val Ala Thr Val Leu Leu Val Met
[0841] 1 5 10 15
[0842] Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Val Pro Asp Pro Cys Ser Asn Cys Ser
[0843] 20 25 30
[0844] Ala Gly Thr Phe Cys Gly Lys Asn Ile Gln Glu Leu Cys Met Pro Cys
[0845] 35 40 45
[0846] Pro Ser Asn Ser Phe Ser Ser Thr Ser Gly Gln Lys Ala Cys Asn Val
[0847] 50 55 60
[0848] Cys Arg Lys Cys Glu Gly Val Phe Arg Thr Lys Lys Glu Cys Ser Ser
[0849] 65 70 75 80
[0850] Thr Ser Asn Ala Val Cys Glu Cys Val Pro Gly Phe Arg Cys Leu Gly
[0851] 85 90 95
[0852] Ala Gly Cys Ala Met Cys Glu Glu Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Glu Leu
[0853] 100 105 110
[0854] Thr Gln Glu Gly Cys Lys Asp Cys Ser Phe Gly Thr Phe Asn Asp Glu
[0855] 115 120 125
[0856] Glu His Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asp Cys Ser Leu Ala Gly Lys
[0857] 130 135 140

[0858] Pro Val Leu Met Asn Gly Thr Lys Ala Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
[0859] 145 150 155 160
[0860] Arg Pro Thr Asp Phe Ser Pro Gly Thr Pro Ser Thr Thr Met Pro Val
[0861] 165 170 175
[0862] Pro Gly Gly Glu Pro Gly His Thr Ser His Val Ile Ile Phe Phe Leu
[0863] 180 185 190
[0864] Ala Leu Met Ser Thr Ala Val Phe Val Leu Val Ser Tyr Leu Ala Leu
[0865] 195 200 205
[0866] Arg Phe Ser Val Val Gln Gln Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Val
[0867] 210 215 220
[0868] Lys Gln Pro Phe Leu Lys Pro Ala Gln Thr Val Gln Glu Glu Asp Ala
[0869] 225 230 235 240
[0870] Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Cys Glu Leu
[0871] 245 250 255
[0872] <210> 39
[0873] <211> 255
[0874] <212> PRT
[0875] <213> 非洲象
[0876] <220>
[0877] <221> 信号
[0878] <222> (1)..(23)
[0879] <400> 39
[0880] Met Gly Asn Gly Tyr Tyr Asn Met Val Ala Thr Val Leu Leu Val Met
[0881] 1 5 10 15
[0882] Asn Phe Glu Arg Thr Gly Ala Val Gln Asp Ser Cys Arg Asp Cys Leu
[0883] 20 25 30
[0884] Ala Gly Thr Tyr Cys Val Lys Asn Glu Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys
[0885] 35 40 45
[0886] Pro Leu Asn Ser Phe Ser Ser Thr Gly Gly Gln Met Asn Cys Asp Met
[0887] 50 55 60
[0888] Cys Arg Lys Cys Glu Gly Val Phe Lys Thr Lys Arg Ala Cys Ser Pro
[0889] 65 70 75 80
[0890] Thr Arg Asp Ala Glu Cys Glu Cys Val Ser Gly Phe His Cys Leu Gly
[0891] 85 90 95
[0892] Ala Gly Cys Thr Met Cys Gln Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
[0893] 100 105 110
[0894] Thr Lys Glu Gly Cys Lys Asp Cys Cys Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln
[0895] 115 120 125
[0896] Lys Asn Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Glu Gly Lys

[0897] 130 135 140

[0898] Ser Val Leu Ala Asn Gly Thr Lys Lys Arg Asp Val Val Cys Gly Pro

[0899] 145 150 155 160

[0900] Pro Ala Ala Asp Ser Phe Pro Asp Thr Ser Ser Val Thr Val Pro Ala

[0901] 165 170 175

[0902] Pro Glu Arg Lys Pro Asp His His Pro Gln Ile Ile Thr Phe Phe Leu

[0903] 180 185 190

[0904] Ala Leu Ile Ser Ala Ala Leu Leu Phe Leu Val Phe Phe Leu Val Val

[0905] 195 200 205

[0906] Arg Phe Ser Val Ala Lys Trp Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

[0907] 210 215 220

[0908] Lys Gln Pro Phe Ile Lys Pro Val Gln Thr Ala Gln Glu Glu Asp Gly

[0909] 225 230 235 240

[0910] Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Asp Cys Glu Leu

[0911] 245 250 255

[0912] <210> 40

[0913] <211> 41

[0914] <212> PRT

[0915] <213> 人

[0916] <400> 40

[0917] Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp

[0918] 1 5 10 15

[0919] Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser

[0920] 20 25 30

[0921] Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys

[0922] 35 40

[0923] <210> 41

[0924] <211> 232

[0925] <212> PRT

[0926] <213> 人

[0927] <400> 41

[0928] Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn

[0929] 1 5 10 15

[0930] Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser

[0931] 20 25 30

[0932] Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val

[0933] 35 40 45

[0934] Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp

[0935] 50 55 60

[0936] Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
[0937] 65 70 75 80
[0938] Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
[0939] 85 90 95
[0940] Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
[0941] 100 105 110
[0942] Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
[0943] 115 120 125
[0944] Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
[0945] 130 135 140
[0946] Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
[0947] 145 150 155 160
[0948] Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu
[0949] 165 170 175
[0950] Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val Lys Arg
[0951] 180 185 190
[0952] Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
[0953] 195 200 205
[0954] Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
[0955] 210 215 220
[0956] Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
[0957] 225 230
[0958] <210> 42
[0959] <211> 116
[0960] <212> PRT
[0961] <213> 人工序列
[0962] <220>
[0963] <223> 具有FEAR取代的VH-CD137
[0964] <400> 42
[0965] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
[0966] 1 5 10 15
[0967] Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
[0968] 20 25 30
[0969] Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0970] 35 40 45
[0971] Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
[0972] 50 55 60
[0973] Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0974] 65 70 75 80

[0975] Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[0976] 85 90 95
[0977] Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0978] 100 105 110
[0979] Thr Val Ser Ser
[0980] 115
[0981] <210> 43
[0982] <211> 8
[0983] <212> PRT
[0984] <213> 人
[0985] <400> 43
[0986] Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr Trp
[0987] 1 5
[0988] <210> 44
[0989] <211> 8
[0990] <212> PRT
[0991] <213> 人
[0992] <400> 44
[0993] Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr
[0994] 1 5
[0995] <210> 45
[0996] <211> 9
[0997] <212> PRT
[0998] <213> 人
[0999] <400> 45
[1000] Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr
[1001] 1 5
[1002] <210> 46
[1003] <211> 108
[1004] <212> PRT
[1005] <213> 人
[1006] <400> 46
[1007] Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
[1008] 1 5 10 15
[1009] Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
[1010] 20 25 30
[1011] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
[1012] 35 40 45
[1013] Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

[1014] 50 55 60

[1015] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

[1016] 65 70 75 80

[1017] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu

[1018] 85 90 95

[1019] Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[1020] 100 105

[1021] <210> 47

[1022] <211> 6

[1023] <212> PRT

[1024] <213> 人

[1025] <400> 47

[1026] Asn Ile Gly Asp Gln Tyr

[1027] 1 5

[1028] <210> 48

[1029] <211> 11

[1030] <212> PRT

[1031] <213> 人

[1032] <400> 48

[1033] Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val

[1034] 1 5 10

[1035] <210> 49

[1036] <211> 119

[1037] <212> PRT

[1038] <213> 人

[1039] <400> 49

[1040] Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro

[1041] 1 5 10 15

[1042] Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Phe His

[1043] 20 25 30

[1044] Val Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

[1045] 35 40 45

[1046] Thr Ile Ile Thr Ser Ala Ser Thr Thr Ala Tyr Ala Thr Trp Ala Arg

[1047] 50 55 60

[1048] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ser Ser Thr Thr Val Asn Leu Lys Ile

[1049] 65 70 75 80

[1050] Val Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser

[1051] 85 90 95

[1052] Thr Tyr Thr Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly

[1053] 100 105 110

[1054] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[1055] 115

[1056] <210> 50

[1057] <211> 8

[1058] <212> PRT

[1059] <213> 人

[1060] <400> 50

[1061] Gly Phe Thr Ile Ser Asp Phe His

[1062] 1 5

[1063] <210> 51

[1064] <211> 8

[1065] <212> PRT

[1066] <213> 人

[1067] <400> 51

[1068] Ile Ile Thr Ser Ala Ser Thr Thr

[1069] 1 5

[1070] <210> 52

[1071] <211> 15

[1072] <212> PRT

[1073] <213> 人

[1074] <400> 52

[1075] Ala Arg Ser Thr Tyr Thr Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe

[1076] 1 5 10 15

[1077] <210> 53

[1078] <211> 113

[1079] <212> PRT

[1080] <213> 人

[1081] <400> 53

[1082] Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly

[1083] 1 5 10 15

[1084] Gly Thr Val Ile Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Ile Tyr Asn Gly

[1085] 20 25 30

[1086] Asn Arg Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu

[1087] 35 40 45

[1088] Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe

[1089] 50 55 60

[1090] Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Ala Ile Ser Asp Val

[1091] 65 70 75 80

[1092] Gln Ser Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Asp Cys
[1093] 85 90 95
[1094] Asp Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val
[1095] 100 105 110
[1096] Glu
[1097] <210> 54
[1098] <211> 8
[1099] <212> PRT
[1100] <213> 人
[1101] <400> 54
[1102] Gln Ser Ile Tyr Asn Gly Asn Arg
[1103] 1 5
[1104] <210> 55
[1105] <211> 13
[1106] <212> PRT
[1107] <213> 人
[1108] <400> 55
[1109] Leu Gly Ser Tyr Asp Cys Asp Ser Ala Asp Cys Phe Ala
[1110] 1 5 10
[1111] <210> 56
[1112] <211> 153
[1113] <212> PRT
[1114] <213> 人工序列
[1115] <220>
[1116] <223> 重组人白介素类似物
[1117] <220>
[1118] <221> 信号
[1119] <222> (1)..(20)
[1120] <400> 56
[1121] Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
[1122] 1 5 10 15
[1123] Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
[1124] 20 25 30
[1125] Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
[1126] 35 40 45
[1127] Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
[1128] 50 55 60
[1129] Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
[1130] 65 70 75 80

[1131] Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
[1132] 85 90 95
[1133] Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
[1134] 100 105 110
[1135] Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Ser Glu Tyr Ala
[1136] 115 120 125
[1137] Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
[1138] 130 135 140
[1139] Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
[1140] 145 150
[1141] <210> 57
[1142] <211> 118
[1143] <212> PRT
[1144] <213> 人
[1145] <400> 57
[1146] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1147] 1 5 10 15
[1148] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
[1149] 20 25 30
[1150] Trp Ile His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Tyr
[1151] 35 40 45
[1152] Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1153] 50 55 60
[1154] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
[1155] 65 70 75 80
[1156] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1157] 85 90 95
[1158] Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[1159] 100 105 110
[1160] Leu Val Thr Val Ser Ser
[1161] 115
[1162] <210> 58
[1163] <211> 107
[1164] <212> PRT
[1165] <213> 人
[1166] <400> 58
[1167] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1168] 1 5 10 15
[1169] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

[1170] 20 25 30

[1171] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[1172] 35 40 45

[1173] Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[1174] 50 55 60

[1175] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[1176] 65 70 75 80

[1177] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala

[1178] 85 90 95

[1179] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[1180] 100 105

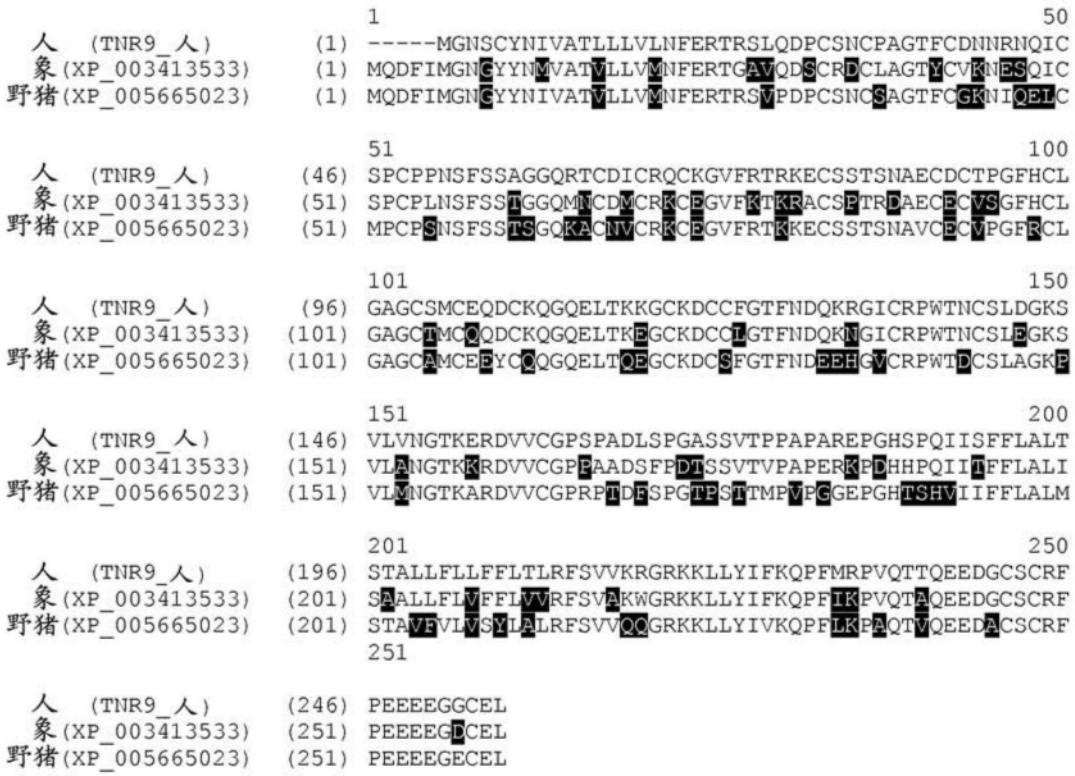

1 50
人 (TNR9_人) (1) -----MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC
象(XP_003413533) (1) MQDFIMGNCYYNMVATVLLVMNFERTGAVQDSCRDCLAGTYCVKNESQIC
野猪(XP_005665023) (1) MQDFIMGNCYYNIVATVLLVMNFERTRSVPDPCSNCSAGTFCGKNIQELC
51 100
人 (TNR9_人) (46) SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCL
象(XP_003413533) (51) SPCPLNSFSSTGGQMNCDMCRKCEGVFKTKRACSPTRDAECECVSGFHCL
野猪(XP_005665023) (51) MPCPSNSFSSTSGQKACNVCRKCEGVFRTKKECSSTSNAVCECVPGFRCL
101 150
人 (TNR9_人) (96) GAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS
象(XP_003413533) (101) GAGCTMCQQDCKQGQELTKEGCKDCCLGTFNDQKNGICRPWTNCSLEGKS
野猪(XP_005665023) (101) GAGCAMCEEYCQQGQELTQEGCKDCSFGTFNDEEHGVCRPWTDCSLAGKP
151 200
人 (TNR9_人) (146) VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALT
象(XP_003413533) (151) VLANGTKKRDVVCGPEAADSFPDTSSVTVPAPERKPDHHPQIITFFLALI
野猪(XP_005665023) (151) VLVNGTKARDVVCGPRPTDFSPGTPSTTMPVPGGEPGHTSHVIIFFLALM
201 250
人 (TNR9_人) (196) STALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
象(XP_003413533) (201) SAALLFLVFFLVVRFSVAKWGRKKLLYIFKQPFIKPVQTAQEEDGCSCRF
野猪(XP_005665023) (201) STAVFVLVSYLALRFSVVQQGRKKLLYIVKQPFLKPAQTVQEEDACSCRF
251
人 (TNR9_人) (246) PEEEEGGCEL
象(XP_003413533) (251) PEEEEGDCEL
野猪(XP_005665023) (251) PEEEEGECEL

图1

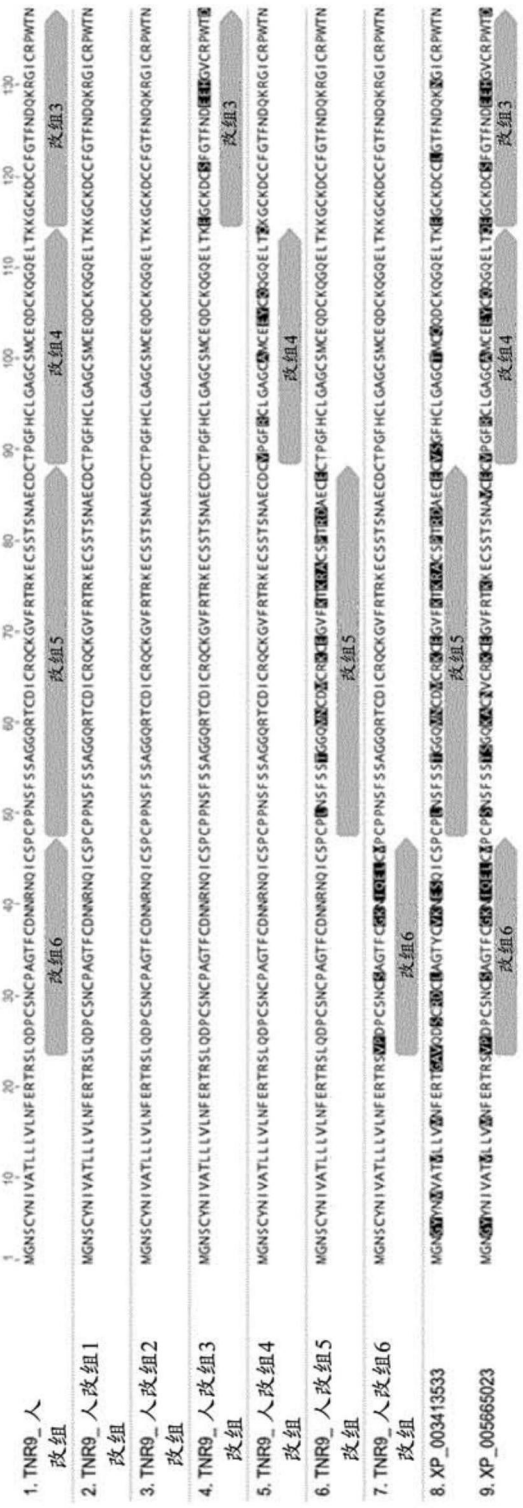

1. TNR9_人改组
2. TNR9_人改组1
3. TNR9_人改组2
4. TNR9_人改组3
5. TNR9_人改组4
6. TNR9_人改组5
7. TNR9_人改组6
8. XP_003413533
9. XP_005665023
改组6
改组5
改组4
改组3
改组2
改组1

图2

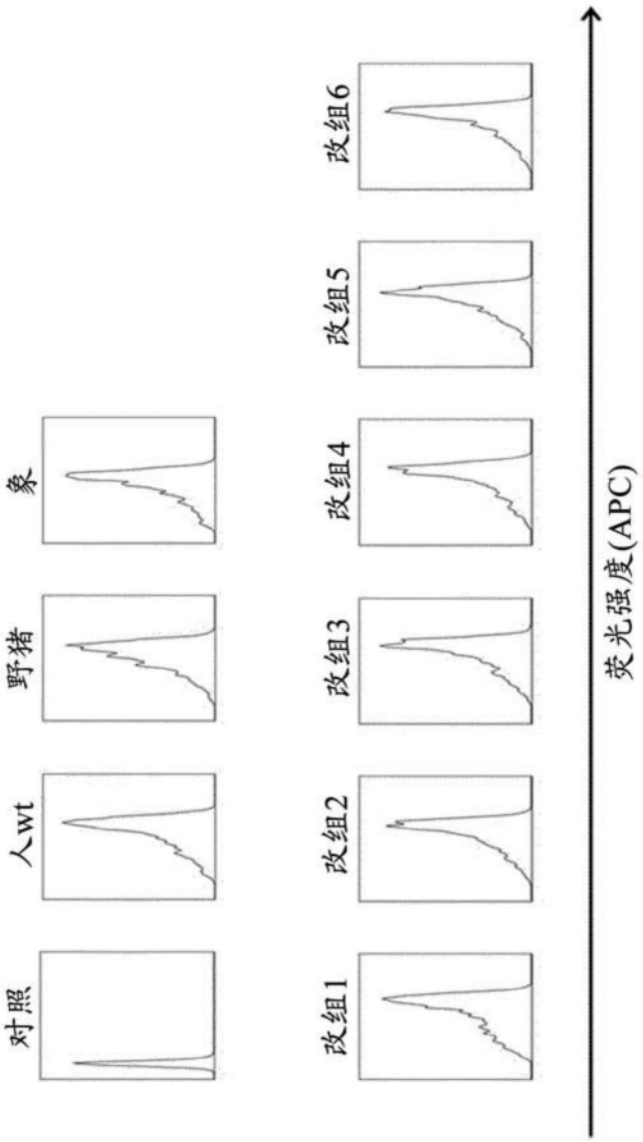


图3

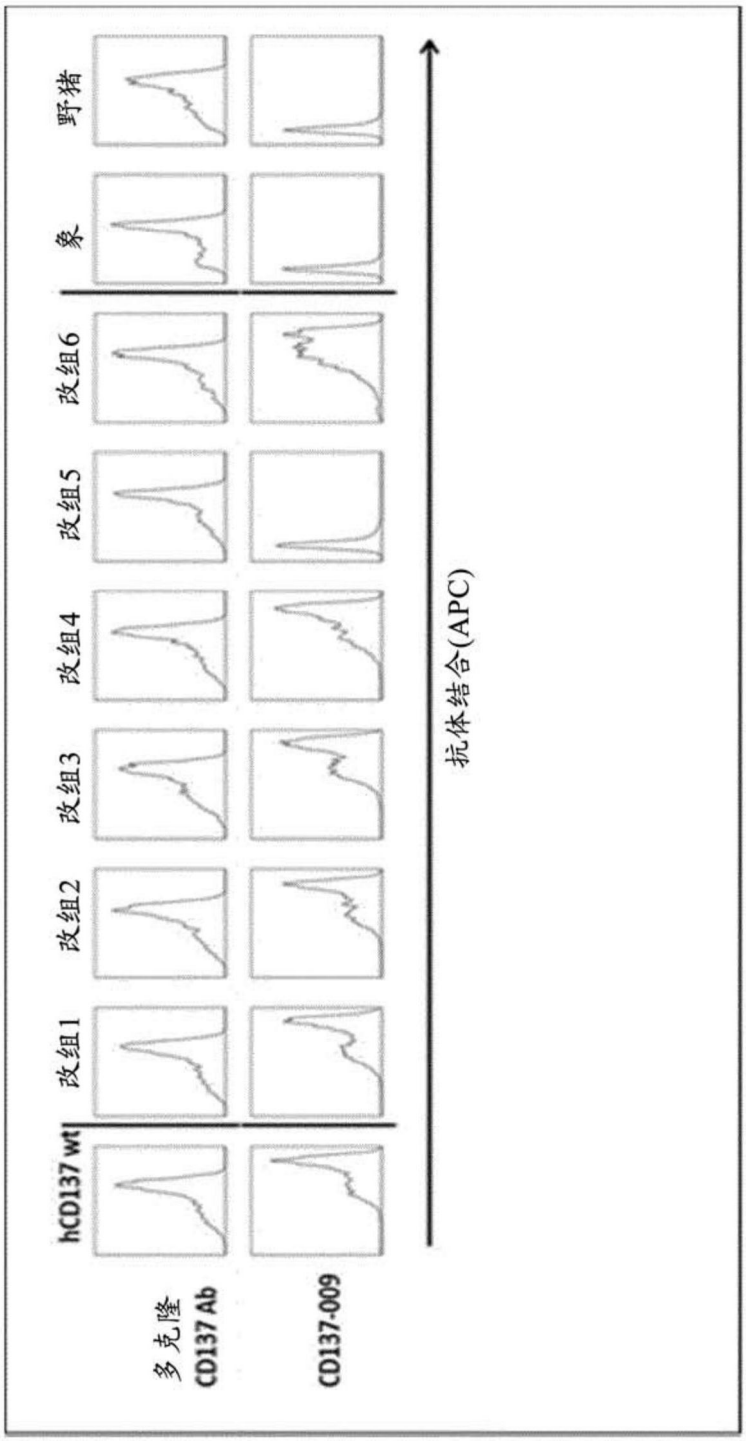

hCD137 wt
改组1
改组2
改组3
改组4
改组5
改组6
象
野猪
多克隆 CD137 Ab
CD137-009
抗体结合(APC)

图4

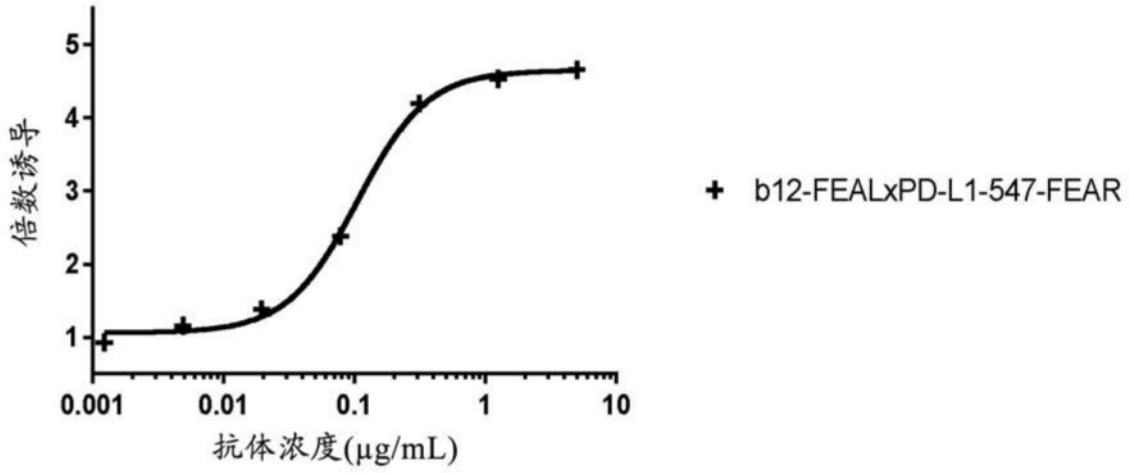

倍数诱导
5
4
3
2
1
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体浓度(μg/mL)
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR

图5

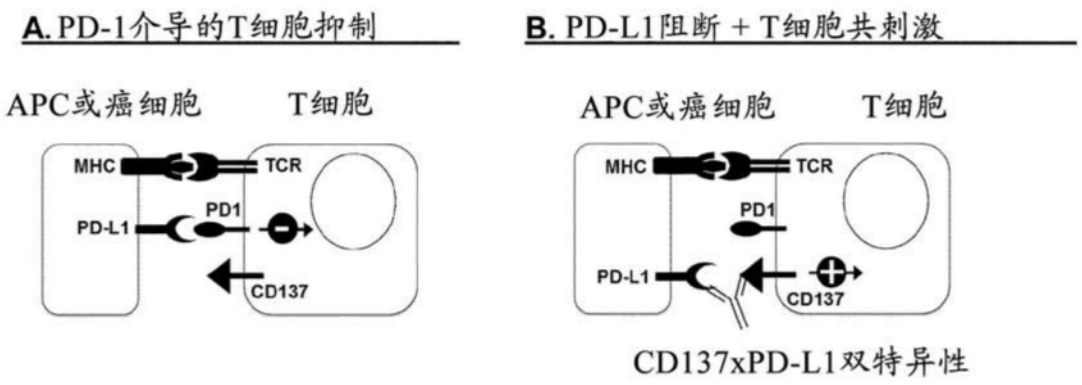

A. PD-1介导的T细胞抑制
APC或癌细胞
T细胞
MHC
TCR
PD1
PD-L1
CD137
B. PD-L1阻断 + T细胞共刺激
APC或癌细胞
T细胞
MHC
TCR
PD1
PD-L1
CD137
CD137xPD-L1双特异性

图6

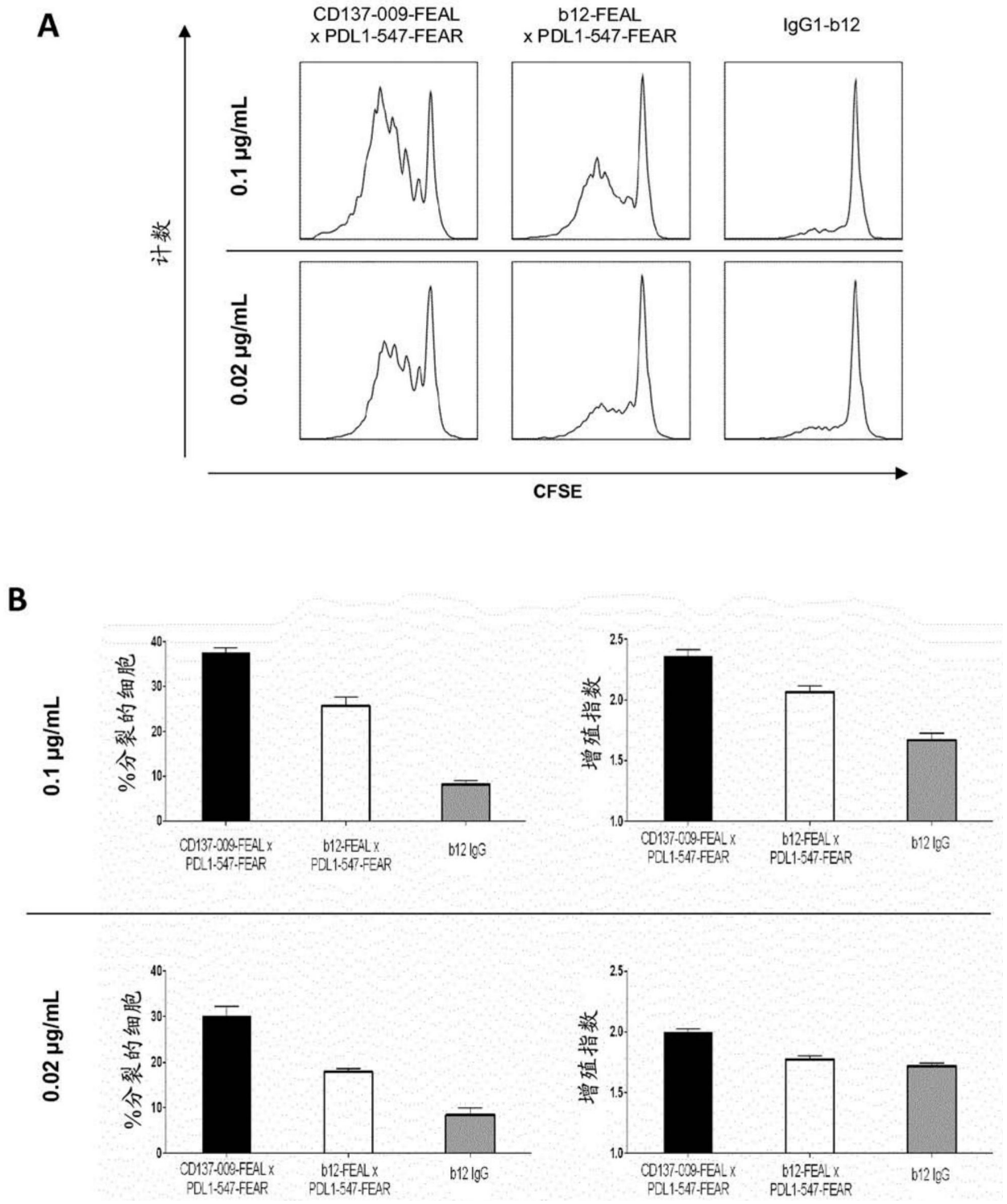

A
CD137-009-FEAL x PDL1-547-FEAR
b12-FEAL x PDL1-547-FEAR
IgG1-b12
0.1 μg/mL
0.02 μg/mL
计数
CFSE
B
0.1 μg/mL
0.02 μg/mL
%分裂的细胞
增殖指数
CD137-009-FEAL x PDL1-547-FEAR
b12-FEAL x PDL1-547-FEAR
b12 IgG

图7

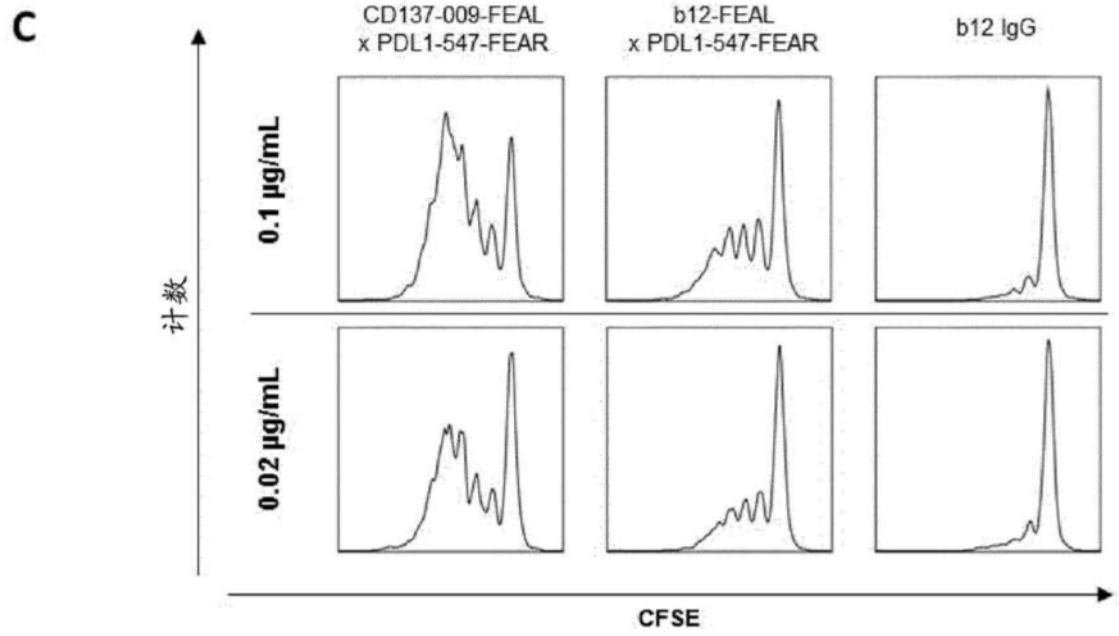

C
CD137-009-FEAL
x PDL1-547-FEAR
b12-FEAL
x PDL1-547-FEAR
b12 IgG
0.1 µg/mL
0.02 µg/mL
计数
CFSE

图7(续)

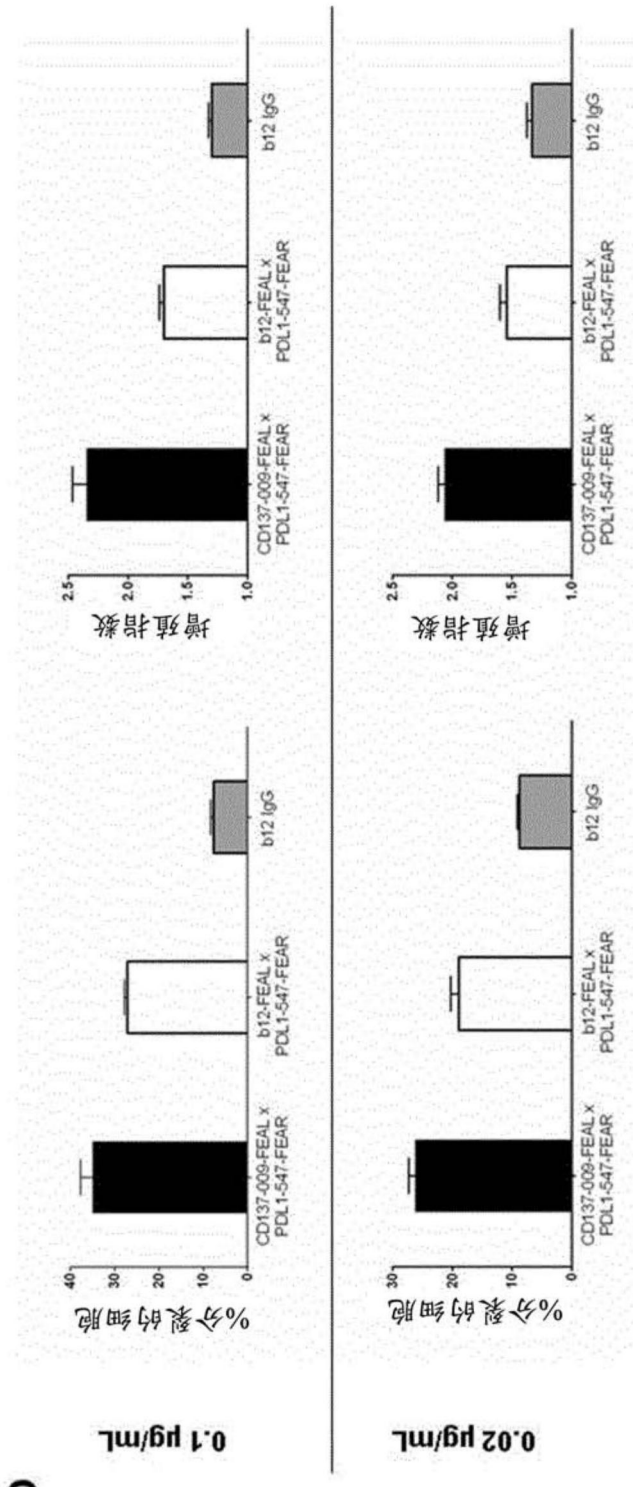
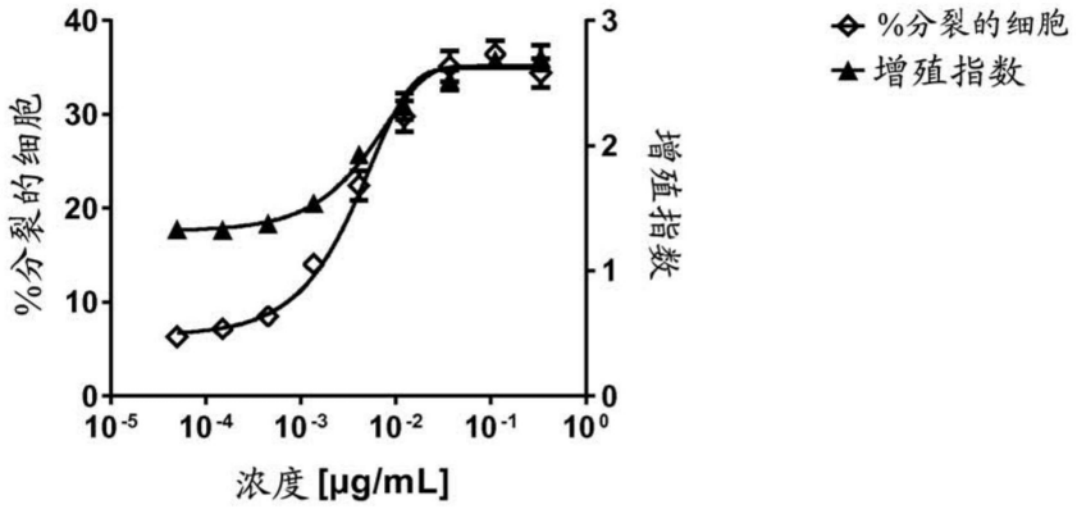

D
0.1 μg/mL
0.02 μg/mL
%分裂的细胞
增殖指数
CD137-009-FEAL x PDL1-547-FEAR
b12-FEAL x PDL1-547-FEAR
b12 IgG

图7(续)



	%分裂的细胞	增殖指数
EC_{50}	0.003492 μg/mL	0.005388 μg/mL

图8

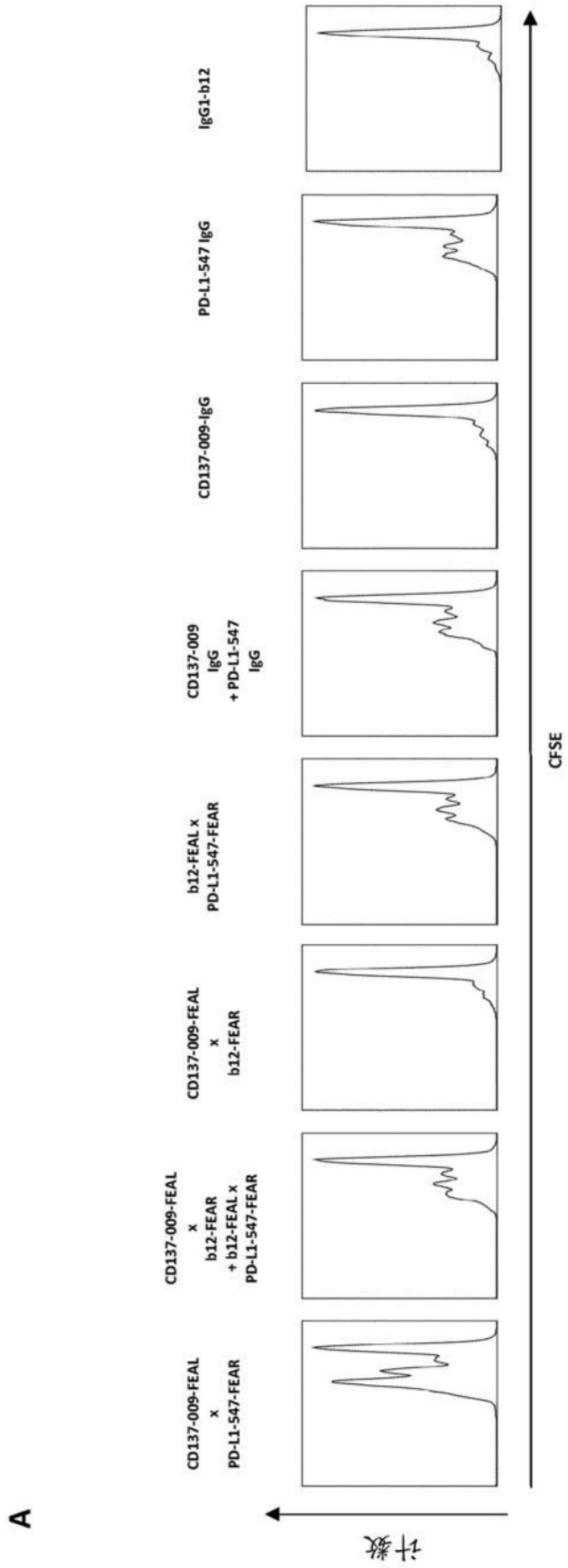
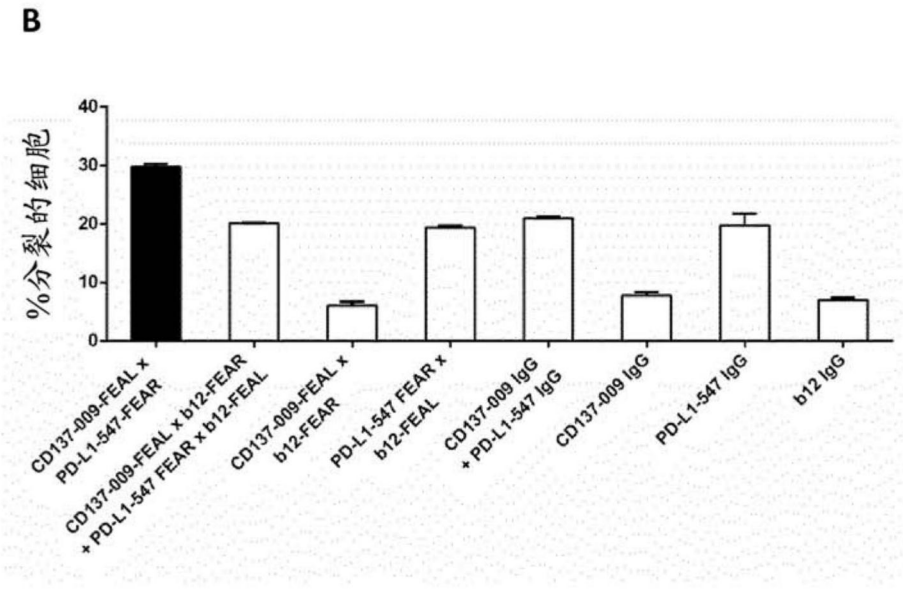

A
计数
CFSE
CD137-009-FEAL x PD-L1-547-FEAR
CD137-009-FEAL x b12-FEAR + b12-FEAL x PD-L1-547-FEAR
CD137-009-FEAL x b12-FEAR
b12-FEAL x PD-L1-547-FEAR
CD137-009 IgG + PD-L1-547 IgG
CD137-009-IgG
PD-L1-547 IgG
IgG1-b12

图9


B
%分裂的细胞
40
30
20
10
0
CD137-009-FEAL x PD-L1-547-FEAR
CD137-009-FEAL x b12-FEAR + PD-L1-547 FEAR x b12-FEAL
CD137-009-FEAL x b12-FEAR
PD-L1-547 FEAR x b12-FEAL
CD137-009 IgG + PD-L1-547 IgG
CD137-009 IgG
PD-L1-547 IgG
b12 IgG

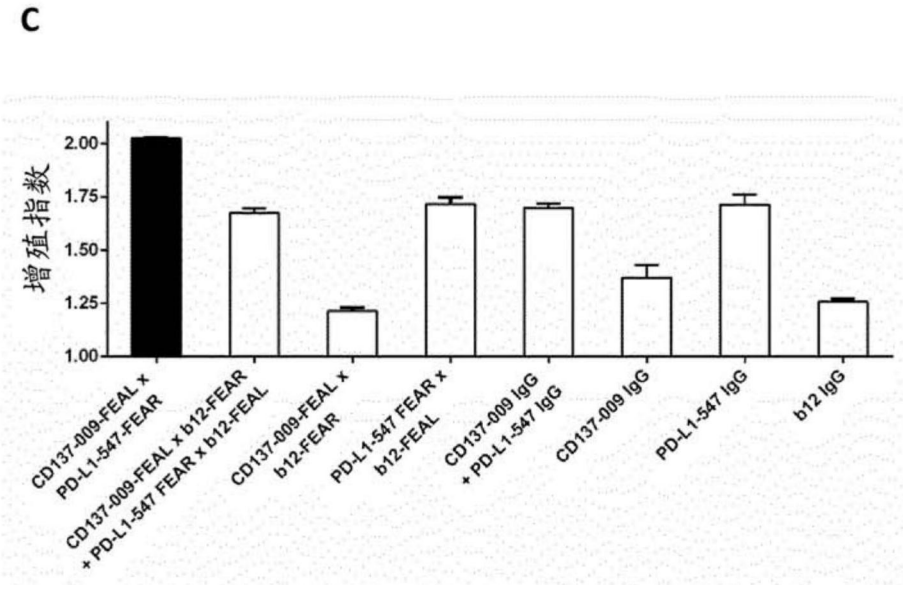

C
增殖指数
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
CD137-009-FEAL x PD-L1-547-FEAR
CD137-009-FEAL x b12-FEAR + PD-L1-547 FEAR x b12-FEAL
CD137-009-FEAL x b12-FEAR
PD-L1-547 FEAR x b12-FEAL
CD137-009 IgG + PD-L1-547 IgG
CD137-009 IgG
PD-L1-547 IgG
b12 IgG

图9(续)

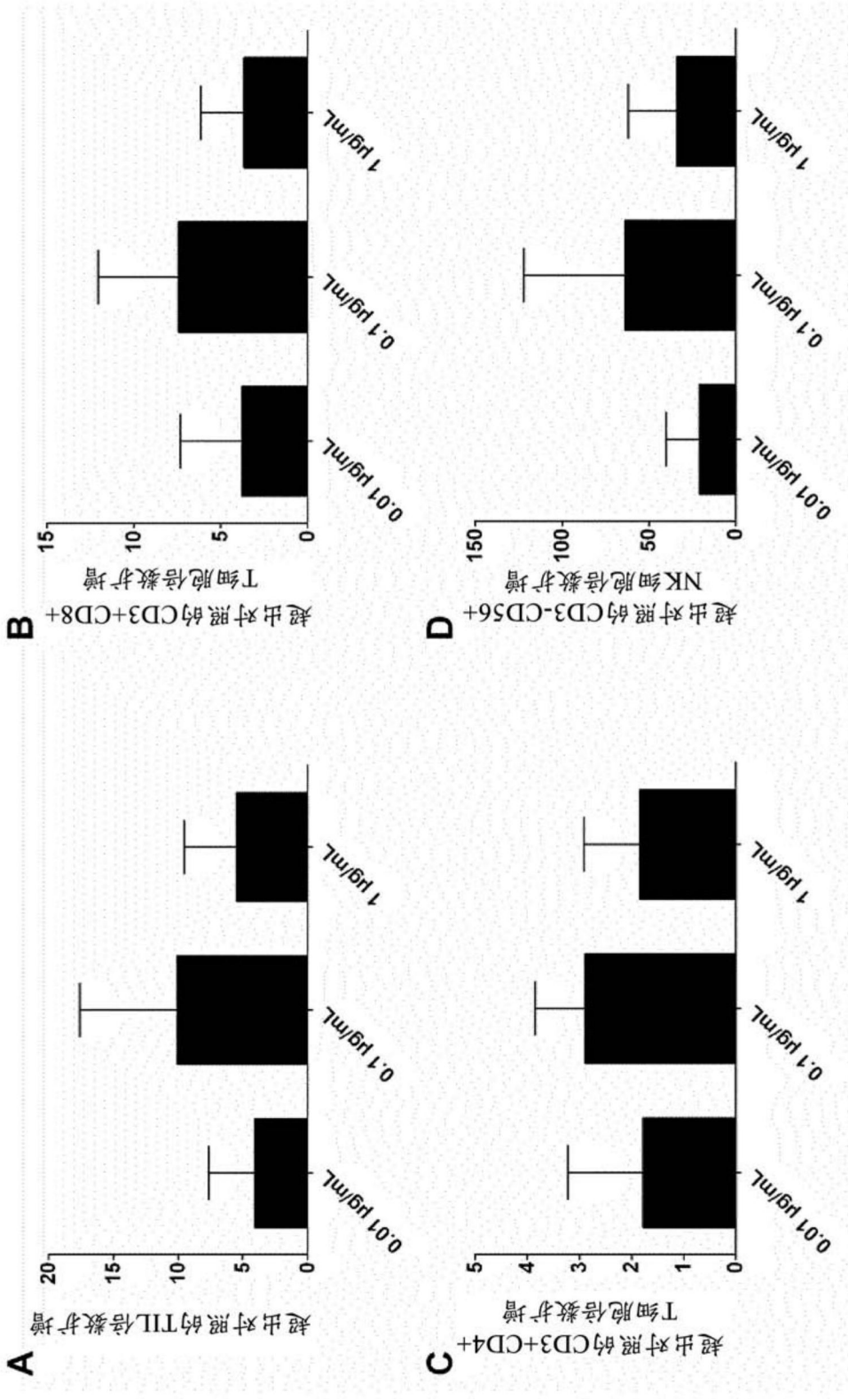

A
超出对照的TIL倍数扩增
0
5
10
15
20
0.01 μg/mL
0.1 μg/mL
1 μg/mL
B
超出对照的CD3+CD8+
T细胞倍数扩增
0
5
10
15
0.01 μg/mL
0.1 μg/mL
1 μg/mL
C
超出对照的CD3+CD4+
T细胞倍数扩增
0
1
2
3
4
5
0.01 μg/mL
0.1 μg/mL
1 μg/mL
D
超出对照的CD3-CD56+
NK细胞倍数扩增
0
50
100
150
0.01 μg/mL
0.1 μg/mL
1 μg/mL

图10

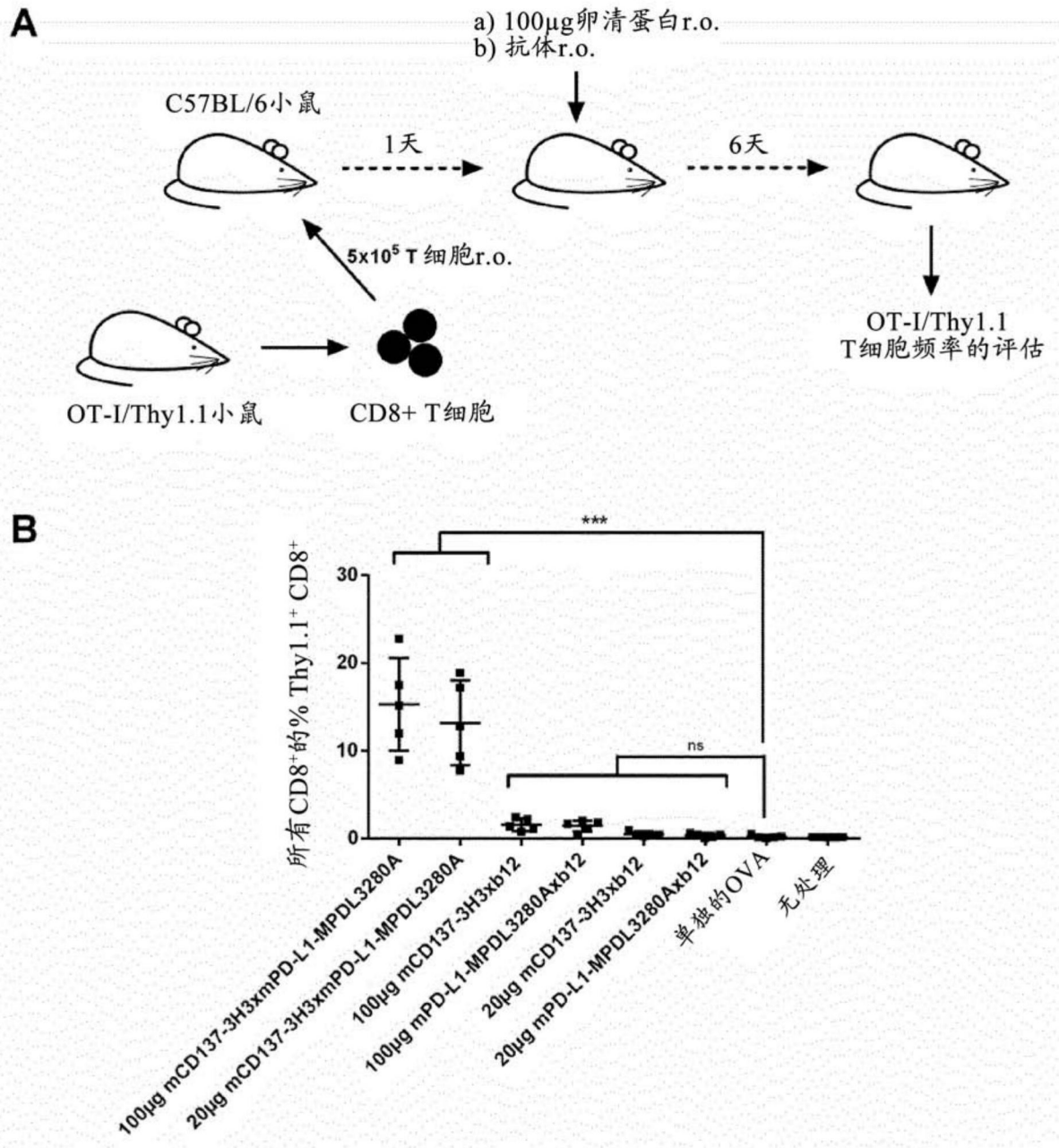

A
a) 100μg卵清蛋白r.o.
b) 抗体r.o.
C57BL/6小鼠
1天
6天
5x10^5 T细胞r.o.
OT-I/Thy1.1
T细胞频率的评估
OT-I/Thy1.1小鼠
CD8+ T细胞
B
***
ns
所有CD8+的% Thy1.1+ CD8+
30
20
10
0
100μg mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A
20μg mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A
100μg mCD137-3H3xb12
100μg mPD-L1-MPDL3280Axb12
20μg mCD137-3H3xb12
20μg mPD-L1-MPDL3280Axb12
单独的OVA
无处理

图11

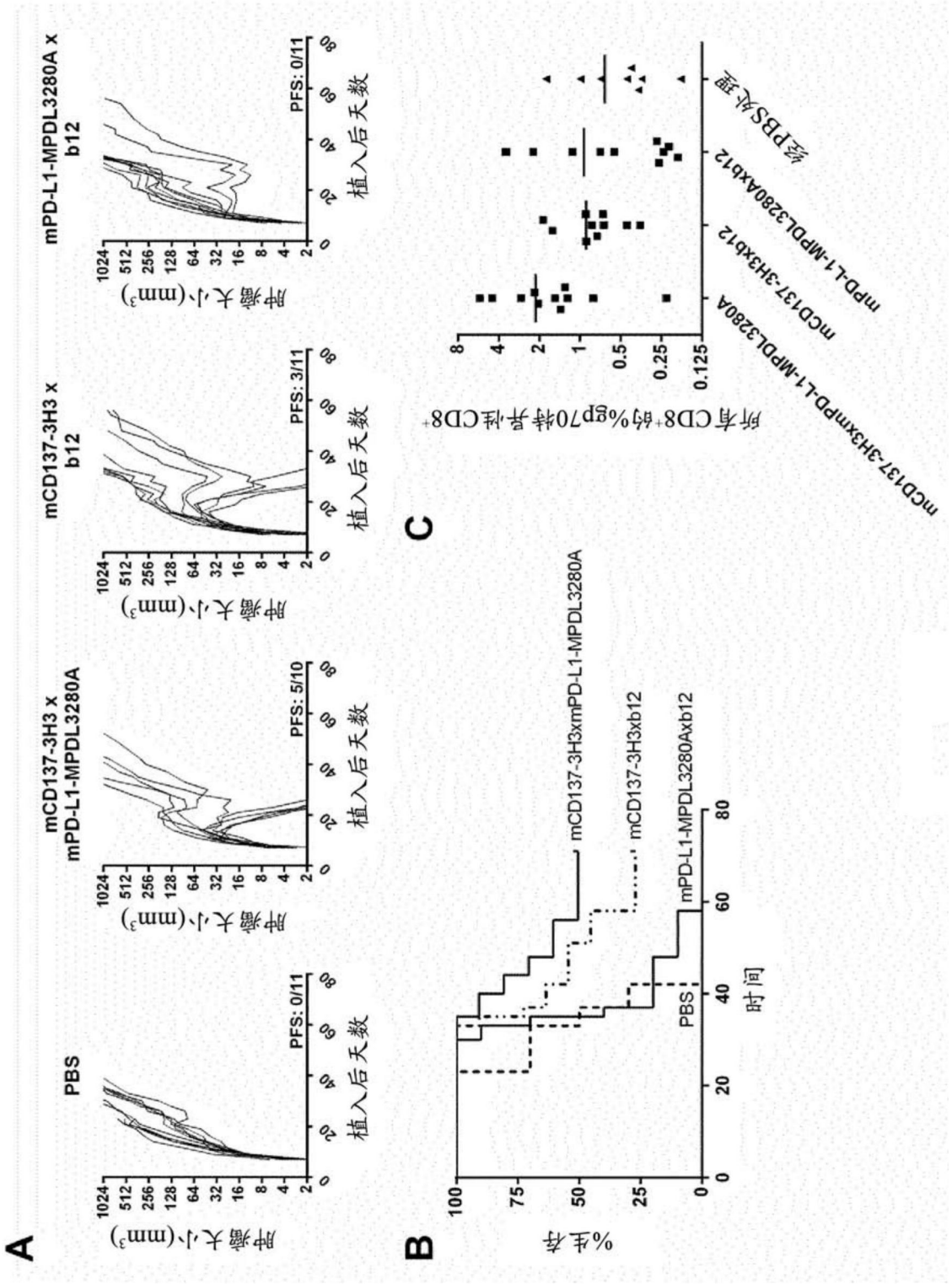

A
PBS
mCD137-3H3 x mPD-L1-MPDL3280A
mCD137-3H3 x b12
mPD-L1-MPDL3280A x b12
肿瘤大小(mm³)
植入后天数
PFS: 0/11
PFS: 5/10
PFS: 3/11
PFS: 0/11
B
%生存
时间
PBS
mPD-L1-MPDL3280Axb12
mCD137-3H3xb12
mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A
C
所有CD8+的%gp70特异性CD8+
mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A
mCD137-3H3xb12
mPD-L1-MPDL3280Axb12
经PBS处理

图12

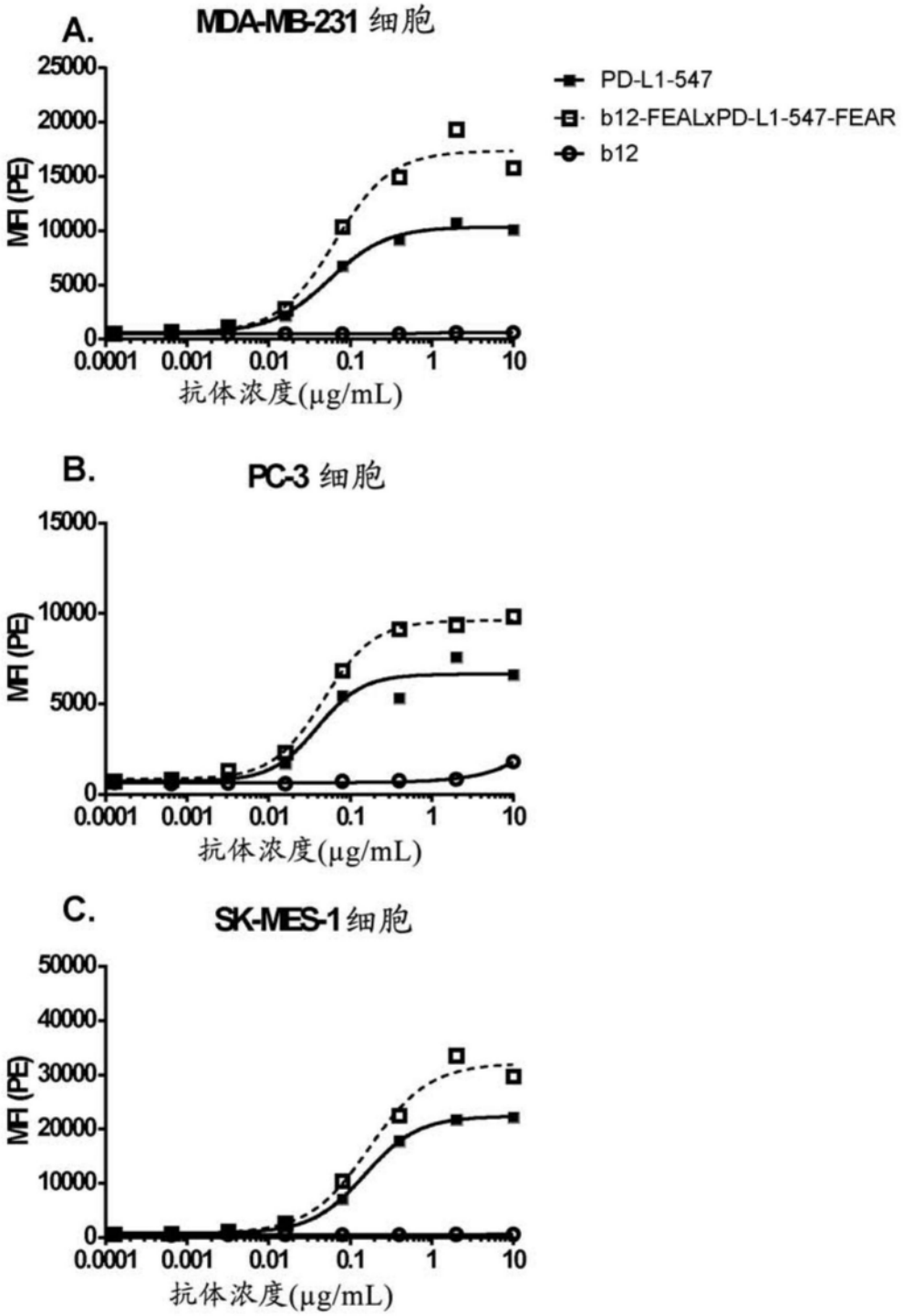

A.
MDA-MB-231 细胞
MFI (PE)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体浓度(μg/mL)
PD-L1-547
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR
b12
B.
PC-3 细胞
MFI (PE)
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体浓度(μg/mL)
C.
SK-MES-1细胞
MFI (PE)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体浓度(μg/mL)

图13

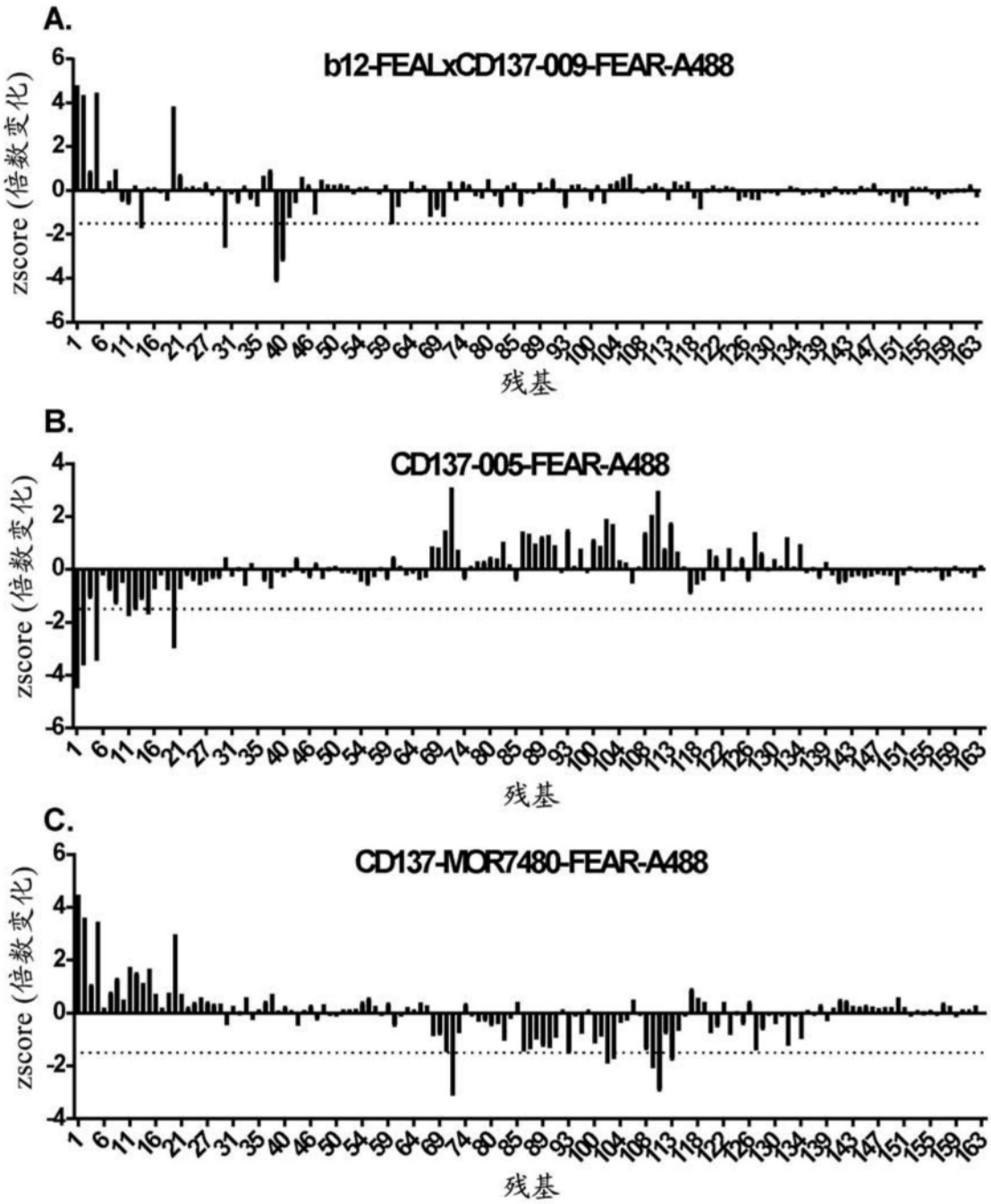

A.
b12-FEALxCD137-009-FEAR-A488
zscore (倍数变化)
残基
B.
CD137-005-FEAR-A488
zscore (倍数变化)
残基
C.
CD137-MOR7480-FEAR-A488
zscore (倍数变化)
残基

图14

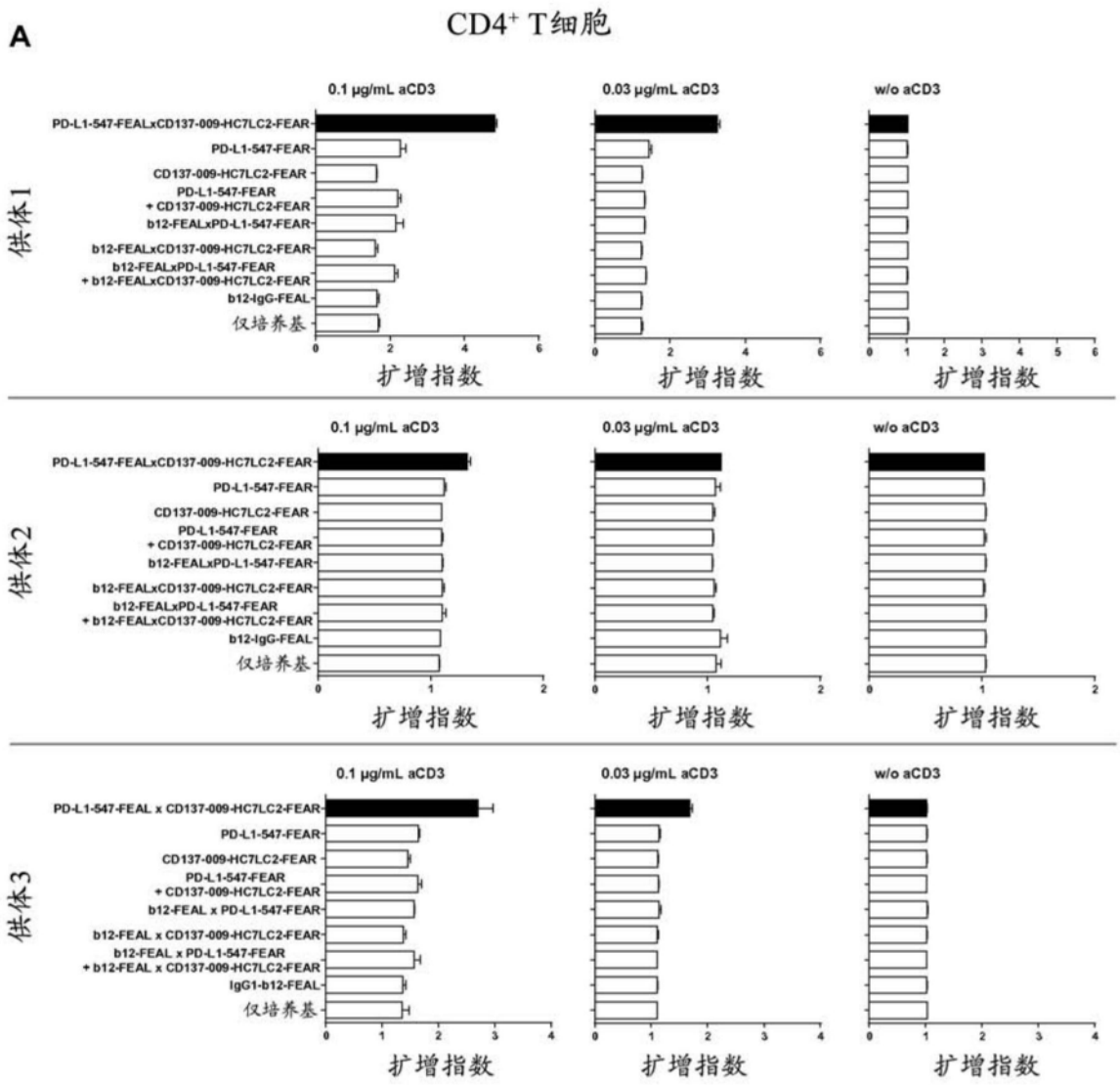

A
CD4+ T细胞
供体1
供体2
供体3
0.1 μg/mL aCD3
0.03 μg/mL aCD3
w/o aCD3
PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
PD-L1-547-FEAR
CD137-009-HC7LC2-FEAR
PD-L1-547-FEAR + CD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR
b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR + b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-IgG-FEAL
仅培养基
PD-L1-547-FEAL x CD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEAL x PD-L1-547-FEAR
b12-FEAL x CD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEAL x PD-L1-547-FEAR + b12-FEAL x CD137-009-HC7LC2-FEAR
IgG1-b12-FEAL
扩增指数

图15

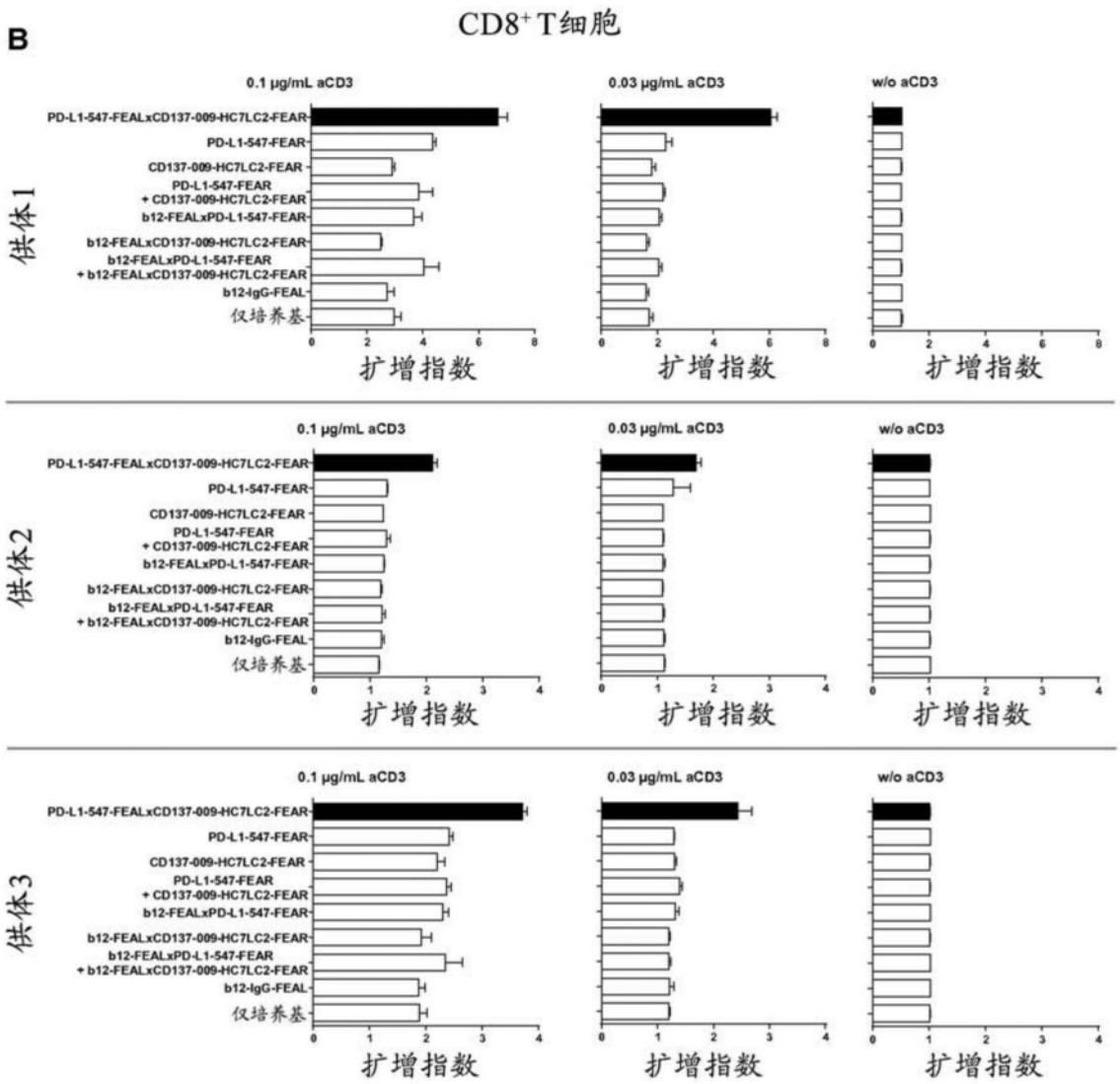

B
CD8+T细胞
0.1 μg/mL aCD3
0.03 μg/mL aCD3
w/o aCD3
PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
PD-L1-547-FEAR
CD137-009-HC7LC2-FEAR
PD-L1-547-FEAR + CD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR
b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR + b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-IgG-FEAL
仅培养基
扩增指数
供体1
供体2
供体3

图15(续)

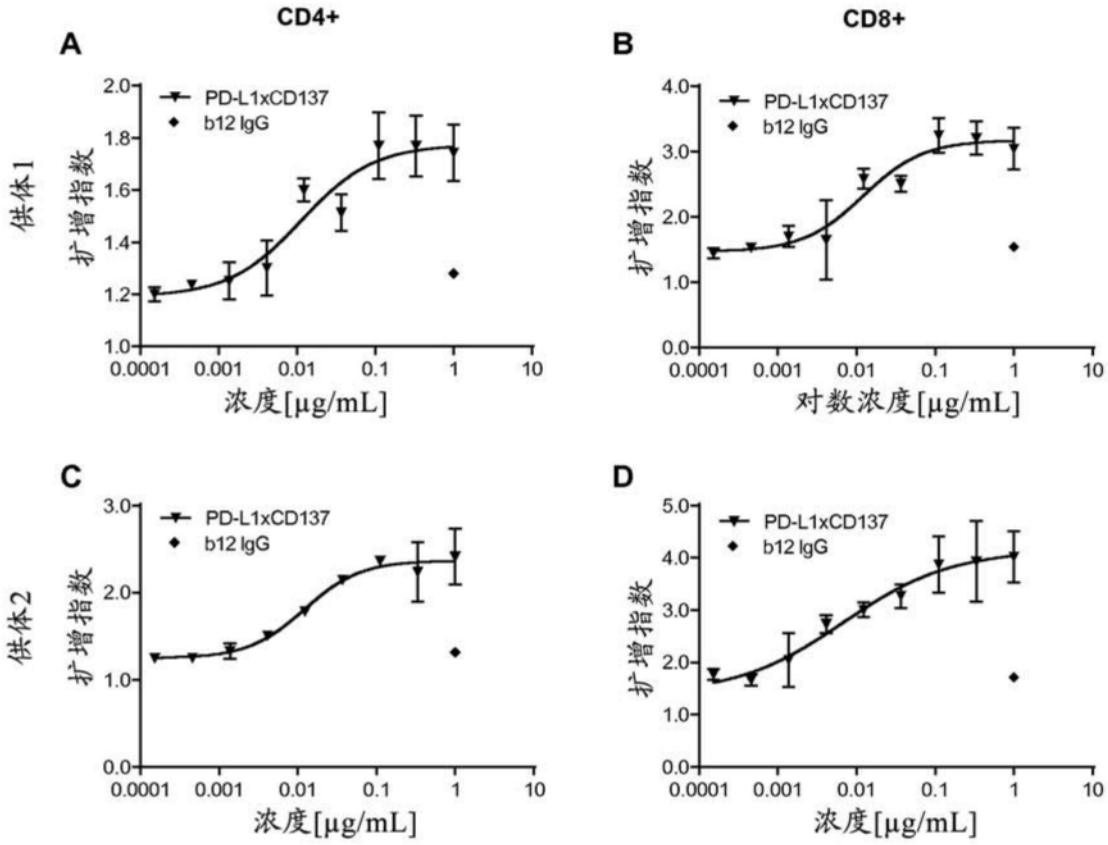

CD4+
CD8+
A
B
C
D
供体1
供体2
PD-L1xCD137
b12 IgG
扩增指数
浓度[μg/mL]
对数浓度[μg/mL]

图16

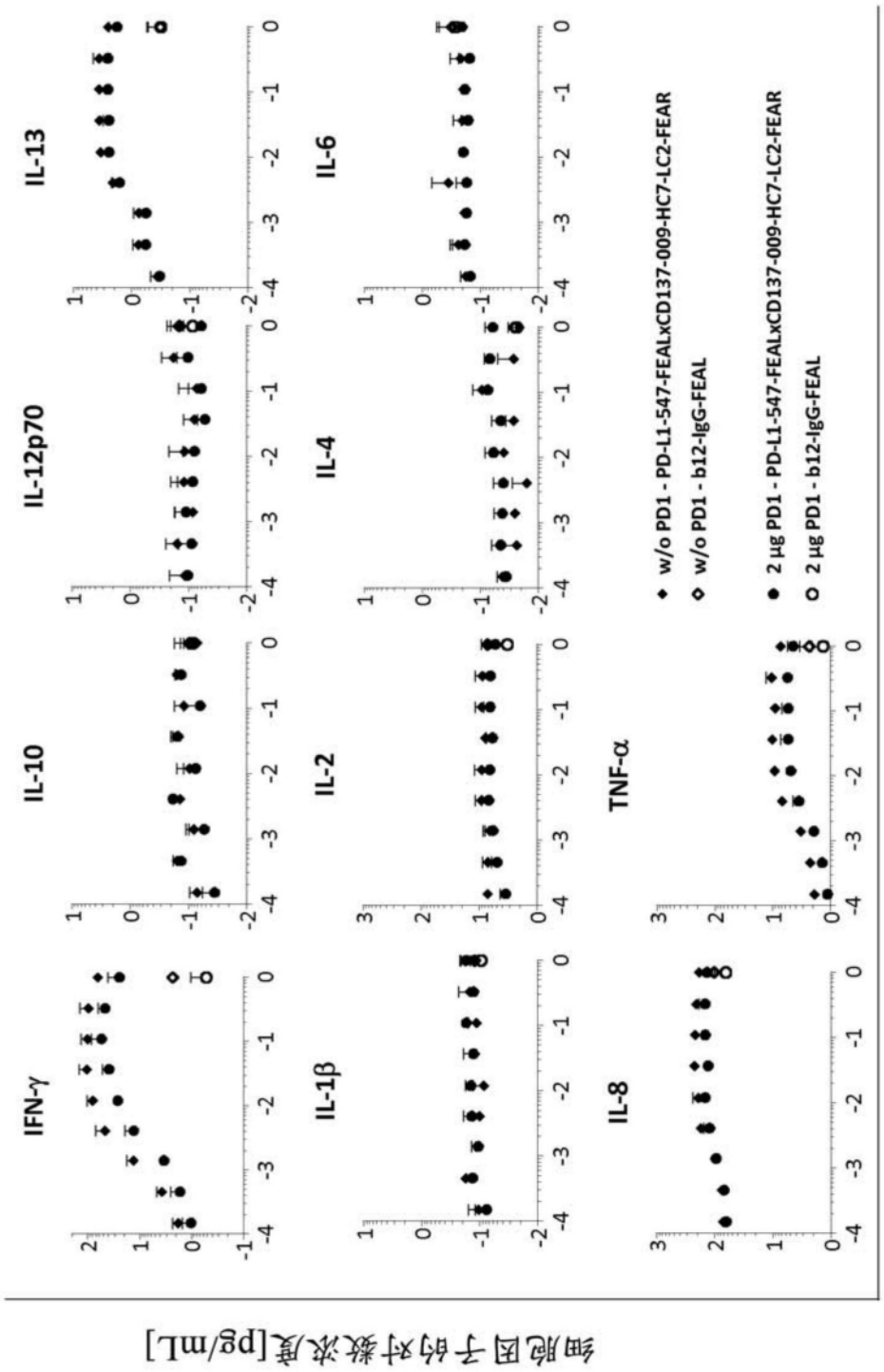

IFN-γ
IL-10
IL-12p70
IL-13
IL-1β
IL-2
IL-4
IL-6
IL-8
TNF-α
w/o PD1 - PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7-LC2-FEAR
w/o PD1 - b12-IgG-FEAL
2 µg PD1 - PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7-LC2-FEAR
2 µg PD1 - b12-IgG-FEAL
细胞因子的对数浓度[pg/mL]
对数浓度[µg/mL]

图17

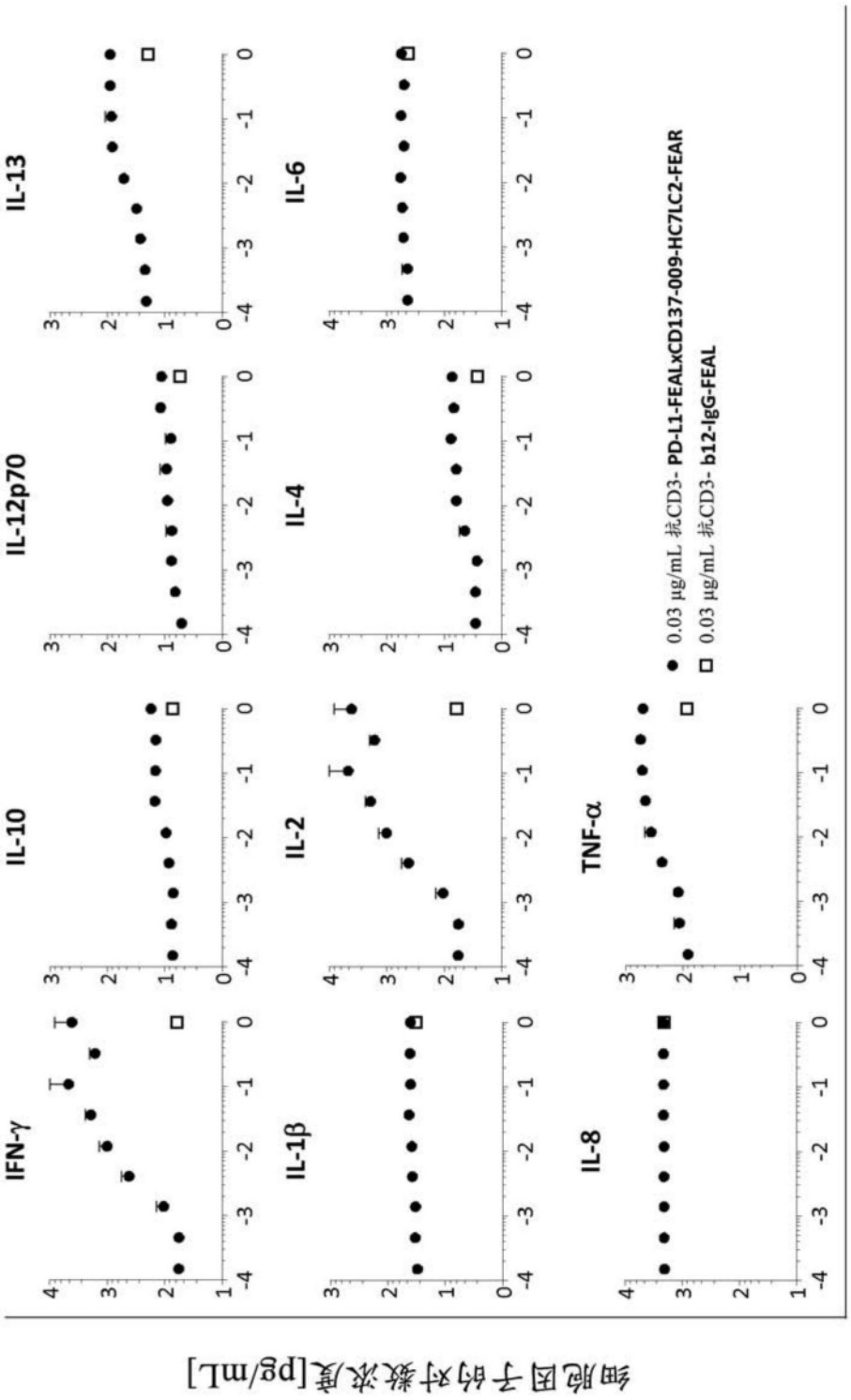

IFN-γ
IL-10
IL-12p70
IL-13
IL-1β
IL-2
IL-4
IL-6
IL-8
TNF-α
0.03 μg/mL 抗CD3- PD-L1-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
0.03 μg/mL 抗CD3- b12-IgG-FEAL
细胞因子的对数浓度[pg/mL]
对数浓度[μg/mL]

图18