



(12) 发明专利申请

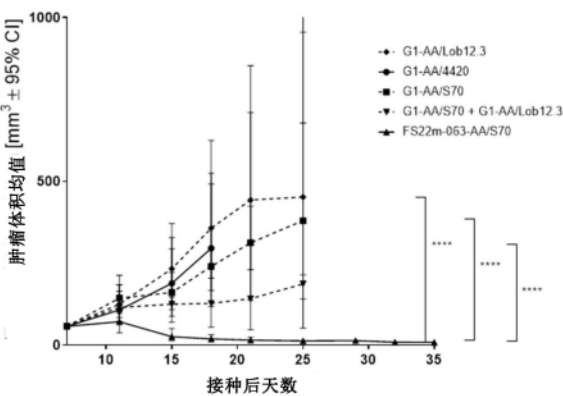
(10) 申请公布号 CN 119264257 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 07

(21) 申请号	202411396182.9	C07K 16/30 (2006.01)
(22) 申请日	2019.07.12	C12N 15/13 (2006.01)
(30) 优先权数据		A61K 39/395 (2006.01)
	1811408.2 2018.07.12 GB	A61P 35/00 (2006.01)
		A61P 31/00 (2006.01)
(62) 分案原申请数据		
	201980059925.4 2019.07.12	
(71) 申请人	英沃克斯制药有限公司	
地址	英国伦敦	
(72) 发明人	M·莱金斯 J·穆诺兹-奥拉亚	
	S·佩乔科娃 M·图纳	
(74) 专利代理机构	上海一平知识产权代理有限公司	
	31266	
专利代理师	李旭旭 徐迅	
(51) Int. Cl.		权利要求书3页 说明书111页
	C07K 16/28 (2006.01)	序列表 (电子公布) 附图19页

(54) 发明名称  
包含CD137抗原结合位点的FC结合片段

(57) 摘要  
本发明涉及结合CD137的特异性结合成员。所述特异性结合成员包含位于该特异性结合成员的恒定结构域中的CD137抗原结合位点,所述特异性结合成员可应用于,例如癌症和感染性疾病的治疗。



1. 一种特异性结合成员,其结合CD137并且包含位于该特异性结合成员的CH3结构域中的CD137抗原结合位点,所述CD137抗原结合位点包括位于所述CH3结构域的AB结构环中的第一序列,其中所述第一序列包含序列PPY(SEQ ID NO:10)。

2. 如权利要求1所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包括在AB结构环中的插入。

3. 如权利要求2所述的特异性结合成员,其中所述插入长度为5个氨基酸。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的特异性结合成员,其中所述第一序列为以下特异性结合成员的第一序列:

- (i) SEQ ID NO:138所示的FS22-172-003;
- (ii) SEQ ID NO:129所示的FS22-172-002;
- (iii) SEQ ID NO:147所示的FS22-172-004;
- (iv) SEQ ID NO:120所示的FS22-172-001;
- (v) SEQ ID NO:156所示的FS22-172-005;
- (vi) SEQ ID NO:110所示的FS22-172-006;或
- (vii) SEQ ID NO:110所示的FS22-172。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员还包括位于CH3结构域的EF结构环中的第二序列,并且其中所述第二序列是SEQ ID NO:111所示的特异性结合成员FS22-172-003、FS22-172-002、FS22-172-004、FS22-172-001、FS22-172-005、FS22-172-006或FS22-172的第二序列。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的特异性结合成员,其中,所述特异性结合成员包括以下特异性结合成员的CH3结构域序列:

- (i) SEQ ID NO:139所示的FS22-172-003;
- (ii) SEQ ID NO:130所示的FS22-172-002;
- (iii) SEQ ID NO:148所示的FS22-172-004;
- (iv) SEQ ID NO:121所示的FS22-172-001;
- (v) SEQ ID NO:157所示的FS22-172-005;
- (vi) SEQ ID NO:165所示的FS22-172-006;或
- (vii) SEQ ID NO:112所示的FS22-172。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含分别如SEQ ID NO:141、132、150、123、159、167和114所示的特异性结合成员FS22-172-003、FS22-172-002、FS22-172-004、FS22-172-001、FS22-172-005、FS22-172-006或FS22-172的序列。

8. 如权利要求1至3中任一项所述的特异性结合成员,其中所述第一序列为如SEQ ID NO:19所示的特异性结合成员FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011、FS22-053-017、FS22-053-014、FS22-053-010、FS22-053-012、FS22-053-013、FS22-053-015、FS22-053-016和/或FS22-053的第一序列。

9. 如权利要求1至3或8中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员还包含位于CH3结构域的EF结构环中的第二序列,并且其中所述第二序列是以下特异性结合成员的第二序列:

- (i) SEQ ID NO:20所示的FS22-053-008;
- (ii) SEQ ID NO:29所示的FS22-053-009;
- (iii) SEQ ID NO:47所示的FS22-053-011;
- (iv) SEQ ID NO:101所示的FS22-053-017;
- (v) SEQ ID NO:74所示的FS22-053-014;
- (vi) SEQ ID NO:38所示的FS22-053-010;
- (vii) SEQ ID NO:56所示的FS22-053-012;
- (viii) SEQ ID NO:65所示的FS22-053-013;
- (ix) SEQ ID NO:83所示的FS22-053-015;
- (x) SEQ ID NO:92所示的FS22-053-016;或
- (xi) SEQ ID NO:174所示的FS22-053。

10. 如权利要求1至3和8至9中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包括以下特异性结合成员的CH3结构域序列:

- (i) SEQ ID NO:21所示的FS22-053-008;
- (ii) SEQ ID NO:30所示的FS22-053-009;
- (iii) SEQ ID NO:48所示的FS22-053-011;
- (iv) SEQ ID NO:102所示的FS22-053-017;
- (v) SEQ ID NO:75所示的FS22-053-014;
- (vi) SEQ ID NO:39所示的FS22-053-010;
- (vii) SEQ ID NO:57所示的FS22-053-012;
- (viii) SEQ ID NO:66所示的FS22-053-013;
- (ix) SEQ ID NO:84所示的FS22-053-015;
- (x) SEQ ID NO:93所示的FS22-053-016;或
- (xi) SEQ ID NO:175所示的FS22-053。

11. 如权利要求1至3和8至10中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含分别如SEQ ID NO:23、32、50、104、77、41、59、68、86、95和15所示的特异性结合成员FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011、FS22-053-017、FS22-053-014、FS22-053-010、FS22-053-012、FS22-053-013、FS22-053-015、FS22-053-016或FS22-053的序列。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包括特异性结合成员FS22-172-003或FS22-053-008,优选FS22-172-003的第一序列,第一和第二序列,CH3结构域序列,或其序列。

13. 如前述权利要求1至12中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员还包含基于CDR的抗原结合位点。

14. 如权利要求13所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员是抗体分子。

15. 如权利要求15所述的抗体分子,其中所述基于CDR的抗原结合位点结合选自下组的第二抗原:免疫细胞抗原、肿瘤抗原和病原性抗原。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子,其中所述特异性结合成员或抗体分子已经被修饰以减少或消除所述特异性结合成员或抗体分子与一种或多种Fc  $\gamma$  受体的结合。

17.一种核酸分子,其编码如权利要求1至16中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子。

18.一种重组宿主细胞,其包含如权利要求17所述的核酸。

19.产生权利要求1至16中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子的方法,其包括在产生特异性结合成员或抗体分子的条件培养权利要求18的重组宿主细胞。

20.如权利要求1至16中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子,用于通过疗法治疗人或动物体的方法中。

21.如权利要求20所述应用的特异性结合成员或抗体分子,其中所述治疗是个体癌症或感染性疾病的治疗。

## 包含CD137抗原结合位点的FC结合片段

[0001] 本申请是申请日为2019年7月12日,申请号为201980059925.4,发明名称为“包含CD137抗原结合位点的FC结合片段”的发明专利申请的分案申请。

### 发明领域

[0002] 本发明涉及结合CD137的特异性结合成员。所述特异性结合成员包含位于特异性结合成员的恒定结构域中的CD137抗原结合位点,并且可用于例如癌症和感染性疾病的治疗。

### 发明背景

[0003] 细胞信号传导是所有生物生命的重要组成部分,通常涉及与可溶性或表面表达的配体相互作用的细胞表面受体。这种相互作用导致受体,配体或两者的变化。例如,配体结合可以诱导受体的构象变化,使它们聚集成二聚体或寡聚体。然后,这种聚集效应导致细胞内信号传导途径的激活。有许多以此方式激活的受体,包括肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的成员,例如CD137。

[0004] CD137(4-1BB;TNFRSF9)是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的共刺激分子。众所周知,CD137在激活后会在CD8<sup>+</sup>T细胞上被上调,也可以在激活的CD4<sup>+</sup>辅助T细胞、B细胞、调节性T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和树突状细胞(DC)中表达(Bartkowiak和Curran,2015年)。在1997年首次描述了CD137在增强T细胞细胞毒性中的主要功能作用(Shuford等人,1997),此后不久就提出了抗CD137 mAb作为抗癌治疗剂。

[0005] CD137是一种跨膜蛋白,具有四个胞外富含半胱氨酸的结构域,称为CRD1-4,并具有负责CD137信号传导的胞质区域。CD137的配体是CD137L。尽管不存在CD137/CD137L复合物的晶体结构,但可以预测CD137与CD137L形成三聚体/三聚体复合物(Won等人,2010)。CD137L的结合导致受体三聚体的形成和随后多个受体三聚体的聚集,并导致CD137信号级联的激活。该信号级联反应为T细胞提供了针对激活诱导的细胞死亡的生存信号(Hurtado等人,1997),从而在维持有效的T细胞免疫应答和产生免疫记忆中起着至关重要的作用(Bartkowiak和Curran,2015)。

[0006] CD137在白细胞生物学中的作用已被广泛了解,其在肿瘤免疫学中的作用有着明确的生物学基础。CD137由活化的T细胞表达,并已用作鉴定抗原特异性CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的标志物。通常,CD137在CD8<sup>+</sup>T细胞上的表达高于CD4<sup>+</sup>T细胞(Wen等人,2002)。就CD8<sup>+</sup>T细胞而言,通过产生干扰素 $\gamma$ 和白介素2引起的增殖、存活和细胞毒性效应功能归因于CD137聚集。CD137聚集还有助于记忆CD8<sup>+</sup>T细胞的分化和维持。在CD4<sup>+</sup>T细胞的某些亚群中,CD137聚集类似地导致增殖和活化,并导致细胞因子如白介素2的释放(Makkouk等人,2016)。

[0007] 通过肿瘤靶向单克隆抗体介导的自然杀伤细胞(NK)介导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)已被证明在体外和体内通过激动性抗CD137单克隆抗体刺激CD137而增强(Bartkowiak和Curran,2015)。NK细胞通过其Fc受体结合抗体,根据抗体同种型,这可以导致NK细胞活化,引起细胞毒性颗粒释放和靶细胞裂解(Kohrt等人,2012)。Kohrt及其同事证

明了抗CD137激动剂抗体与治疗性药物利妥昔单抗、曲妥珠单抗和西妥昔单抗组合给药时可通过增强ADCC来增强它们的抗肿瘤活性(Kohrt等人,2014;Kohrt等人,2011)。此外,人NK细胞通过FcγR与细胞结合抗体结合后,上调CD137的表达。已显示,随后用抗CD137抗体刺激这些NK细胞可增强其针对肿瘤细胞的ADCC(Chester等人,2015;Chester等人,2016)。

[0008] B淋巴细胞在激活时也表达CD137。CD137配体与CD137的结合增强了B细胞的增殖、存活和细胞因子的产生。在CD40与其配体CD154(CD40配体)结合后,在正常和恶性人B细胞上也诱导CD137表达,如果随后CD137被激活,则导致B细胞存活增加。(Vinay和Kwon,2011)。

[0009] 还已经证明CD137在肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的肿瘤反应性亚型上表达。已证明CD137单一疗法在几种临床前免疫原性肿瘤模型(例如MC38、CT26和B细胞淋巴瘤)中有效。已证明将CD137与其他抗癌药(例如化学疗法,细胞因子和其他检查点调节剂)结合使用,可提高既有肿瘤的生长降低。具体地,在各种临床前异种移植模型中,抗CD137抗体与抗CD20、抗EGFR和抗HER-2抗体的组合已显示出对降低肿瘤生长的协同作用(Kohrt等人,2014;Kohrt等人,2012;Kohrt等人,2011)。

[0010] 肿瘤靶向单克隆抗体疗法与用抗CD137激动剂抗体治疗的结合在淋巴瘤(Kohrt等人,2011)、头颈癌、结直肠癌(Kohrt等人,2014)和乳腺癌(Kohrt等人,2012)的临床前模型中显示出令人鼓舞的结果。临床上还测试了多种靶向肿瘤的单克隆抗体与CD137激动剂抗体的结合,包括抗CD20 mAb利妥昔单抗(NCT01307267,NCT02951156)、抗EGFR mAb西妥昔单抗(NCT02110082)和抗CS1 mAb依洛珠单抗(NCT02252263)。但是,由于与CD137激动剂抗体治疗相关的剂量限制性高度肝脏炎症,临床发展已减缓。尤鲁单抗(Urelumab,BMS-663513)是一种非配体封闭性人IgG4同种型抗体(Chester等人,2018),是首个进入临床试验的抗CD137抗体,但在观察到显著的靶向性、剂量依赖性肝毒性后,这些药物被停用(Chester等人,2018)。最近,治疗实体瘤的临床试验建议使用尤鲁单抗,其中将尤鲁单抗治疗与放疗(NCT03431948)或其他治疗性抗体,如利妥昔单抗(NCT01775631)、西妥昔单抗(NCT02110082)、抗PD-1抗体纳武单抗(NCT02253992、NCT02534506、NCT02845323)、以及纳武单抗和抗LAG-3抗体BMS986016(NCT02658981)的组合联合使用。但是,为减少与尤鲁单抗治疗相关的肝毒性,在这些试验中必须限制尤鲁单抗的剂量,且疗效令人失望(Chester等人,2018)。

[0011] 辉瑞抗CD137抗体埃托米鲁单抗(Utomilumab)(PF-05082566)是人IgG2同种型抗体,在晚期癌症的I期临床试验中剂量范围为0.03mg/kg至10mg/kg,未观察到剂量限制性毒性(Chester等人,2016;Segal等人,2018)。但是,在实体瘤患者中,使用该抗体的总体客观应答率仅为3.8%,这可能表明埃托米鲁单抗的药效和临床疗效比尤鲁单抗弱,同时具有更有利的安全性(Chester等人,2018;Segal等人,2018)。已将埃托米鲁单抗与放射疗法(NCT03217747)或化学疗法结合进行测试,并与其他抗体疗法(包括抗PD-L1抗体阿维单抗(NCT02554812)和抗PD-1抗体派姆单抗(NCT02179918))结合进行测试,以评估不同治疗组合的安全性、耐受性、剂量限制性毒性(DLT)、最大耐受剂量(MTD)和功效。这些试验正在进行中,早期结果表明,剂量达到5mg/kg时无DLT,且埃托米鲁单抗和派姆单抗联合用药的患者反应率为26%。埃托米鲁单抗与阿维单抗的三联组合以及其他免疫肿瘤学疗法也正在测试中(NCT02554812,NCT03217747)。

[0012] 许多靶向CD137的双特异性分子也处于早期开发阶段,其中许多衍生自基于非抗

体的支架或融合蛋白技术。已经报道了使用基于DARPin支架蛋白的技术开发靶向CD137和FAPalpha的双特异性分子的方法 (Link等人,2018;Reichen等人,2018)。还显示了使用靶向HER2和EphA2的DART分子通过肿瘤靶向CD137激动活化T细胞 (Liu等人,2017)。也正在开发通过FAPalpha或CD19靶向实体瘤和淋巴瘤中肿瘤的CD137L融合蛋白。临床上最先进的CD137双特异性分子 (也是唯一一种含有全长抗体的CD137) 是PRS-343,一种CD137/HER2双特异性分子。在该分子中,CD137通过人工结合蛋白 (抗心动肽) 以IgG4格式与靶向HER2的抗体曲妥珠单抗的Fc部分相连。据报道,PRS-343在人源化小鼠模型中可在HER2过表达的部位淋巴细胞上提供CD137的肿瘤靶标依赖性活化作用,但与单独使用曲妥珠单抗治疗相比,未观察到肿瘤生长抑制作用的改善 (Hinner等人,2016年和WO 2016/177802 A1)。PRS-343最近已进入I期临床试验,用于治疗一系列实体瘤,以评估其安全性、耐受性和功效 (NCT03330561)。

#### [0013] 发明说明

[0014] 如上文背景部分所述,由于治疗与剂量限制的高度肝炎 (尤鲁单抗) 或低临床疗效 (埃托米鲁单抗) 有关,CD137激动剂分子的临床发展受到了阻碍。

[0015] 本发明人认识到,本领域需要表现出高活性但不与剂量限制性肝炎相关的CD137激动剂分子。这样的分子可以以该分子最优的效力和功效的剂量施用于个体,并且可以例如作为免疫治疗剂用于癌症的治疗,或在感染性疾病的治疗中使用。

[0016] 不希望被理论所束缚,认为存在于肝脏中的T细胞可能具有被抗CD137激动剂分子激活的潜力,从而导致肝脏炎症。脓毒血症/病毒感染后,CD8+T细胞可促进肝脏炎症和凋亡 (Wesche-Soldato等人,2007)。小鼠中的抗CD137激动剂抗体疗法已显示可导致CD137依赖性T细胞浸润肝脏 (Dubrot J等人,2010)。这些研究的结果加在一起表明,高活性的抗CD137激动剂抗体 (如尤鲁单抗) 可能导致活化的CD8+T细胞浸润肝脏,从而导致肝脏炎症。或者,用尤鲁单抗治疗观察到的剂量限制性肝毒性可能是由于该抗体结合的特定表位。

[0017] 本发明人进行了广泛的选择和亲和力成熟程序以分离一组抗原结合Fc片段 (在本文中也称为“Fcabs”), 在其CH3结构域中包含CD137结合位点,并且结合二聚CD137的亲和力高于结合单体CD137的与。

[0018] 如本文所述,“亲和力”可以指抗体分子与其同源抗原之间的结合相互作用的强度,通过 $K_D$ 测量。对于本领域技术人员显而易见的是,其中抗体分子能够与抗原形成多重结合相互作用 (例如,其中抗体分子能够与抗原二价结合并且任选地抗原是二聚体), 通过 $K_D$ 测得的亲和力也可能受亲合力影响,其中亲合力是指抗体-抗原复合物的整体强度。

[0019] 激活后,T细胞的CD137表达上调。不希望受理论的束缚,据认为由于CD137在活化的T细胞上高表达,CD137在此类细胞表面上将以二聚体、三聚体和更高阶多聚体的形式存在。相反,幼稚的免疫细胞,例如幼稚的T细胞,在其细胞表面表达的CD137水平低或可忽略,因此存在的任何CD137都可能是单体形式。因此,与例如幼稚的免疫细胞相反,预期结合二聚体CD137的亲和力比结合单体CD137的亲和力更高的Fcabs将优先结合活化的免疫细胞,例如活化的T细胞。

[0020] 本发明的Fcab也能够结合二聚体食蟹猴CD137。这是有益的,因为它允许在临床前开发过程中对食蟹猴进行毒理学和功效测试。考虑到用某些抗CD137抗体观察到的肝脏炎症,在抗体分子与CD137结合的情况下这是特别有利的。分离的两个Fcab FS22-053-014和

FS22-053-017也与小鼠CD137结合。这是有利的,因为它使得在向食蟹猴或人类给药之前在小鼠中测试相同的Fcab。在正常情况下,需要一种与小鼠CD137结合的Fcab。

[0021] 本发明人意外地发现,分离的抗CD137 Fcab分子优先结合二聚体而不是单体CD137,并且能够亲和力成熟,在它们的CH3结构域的AB环中都包含PPY基序以及5个氨基酸的插入。在初始文库筛选后分离的另一种抗CD137 Fcab谱系不具有这些功能,并且不能使其亲和力成熟,因此无法进一步研究。不希望受理论的束缚,据认为由于脯氨酸残基的柔性有限,PPY基序的存在可通过形成更刚性或暴露的环结构来促进延伸的抗原结合区的形成。或者,PPY序列可以代表参与与CD137结合的特定保守基序,因为已经证明富含脯氨酸的序列与例如SH3结构域蛋白中的芳香族序列结合。此外,由于已经在两个分开的Fcab谱系中独立地选择了PPY保守序列,因此对于CD137上的表位结合可能是重要的。此外,在分离的大多数Fcab的CH3结构域的EF环中存在保守的LE或LD序列,这表明该氨基酸序列对于CD137结合也可能是重要的。

[0022] 如上文背景部分所述,CD137配体与其受体CD137的初始连接引发了一系列事件,导致CD137三聚化,接着是受体聚集,激活了NFkB细胞内信号传导途径,随后激活了免疫细胞。为了使治疗剂有效活化CD137,需要以模仿三聚体配体的方式将几种CD137单体桥接在一起。

[0023] 埃托米鲁单抗是IgG2分子,其激动剂活性依赖于通过Fcγ受体的交联。尤鲁单抗是具有组成性活性的IgG4分子,因此它的活性不需要通过Fcγ受体的交联,尽管它的激动剂活性在某些Fcγ受体交联时会增强。Fcγ受体遍布整个人体。因此,埃托米鲁单抗和尤鲁单抗的免疫细胞激活活性不仅限于体内的特定部位,还可能发生在肝脏或体内其他部位。

[0024] 本发明人已经证明,本发明的Fcab需要交联以聚集和活化CD137。但是,应注意,这不是结合CD137的Fcab的固有特征。而是,在筛选程序中分离出的许多Fcab都与CD137结合,但不需要交联进行CD137聚集和活化,或者在没有交联的情况下诱导有限的CD137聚集和活化。

[0025] 如上所述,Fcγ受体介导的交联具有在整个人体中发现Fcγ受体的缺点,因此CD137活化不限于特定部位。因此,本发明人将突变引入Fcab的CH2结构域中以减少或消除Fcγ受体结合。因此,在没有通过除Fcγ受体以外的试剂的交联的情况下,本发明的Fcab不表现出CD137激动剂活性,因此预期不会诱导肝炎症。

[0026] 本发明人已经认识到,本发明的抗CD137 Fcab可以用于制备结合除CD137外的第二抗原,例如肿瘤抗原的多特异性,例如双特异性分子。优选地,多特异性分子双价地结合第二抗原,尽管预期在第二抗原是细胞结合的肿瘤抗原的情况下,抗原的单价结合也将足以交联特异性结合成员/抗体分子并诱导CD137聚集和活化。具体地,本发明人已经制备了包含本发明的抗CD137 Fcab的抗体分子,该抗体分子通过其Fab区双价结合第二抗原。本发明人已经表明,这种双特异性抗体分子能够在所述第二抗原的存在下条件性激活CD137,而无需例如通过常规抗体分子所需的Fcγ受体介导的交联来激活CD137。认为抗体分子与第二抗原的结合引起抗体分子在所述抗原位点的交联,这继而导致T细胞表面上CD137的聚集和活化。因此,抗体分子的激动活性取决于存在的第二抗原和CD137。换句话说,激动活性取决于两种抗原的存在。此外,认为在第二抗原的存在下抗体的交联有助于通过抗体分子的恒定域抗原结合位点结合的CD137的聚集。因此,在第二抗原是疾病抗原,例如肿瘤抗原的情



况下,预期抗体分子能够以疾病依赖的方式例如在肿瘤微环境中活化免疫细胞。例如,预期免疫细胞的这种靶向活化将有利于避免用尤鲁单抗治疗所见的肝脏炎症。

[0027] 本发明人还证明,包含本发明的抗CD137 Fcab的双特异性抗体分子能够抑制体内的肿瘤生长,其中被抗体分子结合的第二抗原是免疫细胞抗原、肿瘤抗原或在肿瘤细胞和免疫细胞上均表达的抗原。此外,与两个单特异性抗体分子的组合相比,用双特异性抗体分子观察到更有效的肿瘤生长抑制,其中两个抗体分子之一包含与双特异性分子相同的恒定域,另一个抗体分子包含与双特异性分子相同的可变域结合位点,表明当两个结合位点存在于同一分子中时,可以观察到CD137的聚集和信号传导增强,以及由此导致的T细胞活化和相应的抗肿瘤作用。

[0028] 包含本发明的抗CD137 Fcab和对第二抗原具有特异性的Fab区的抗体分子优选地双价结合CD137和第二抗原。这是有利的,因为预计两个靶标的二价结合将使表达CD137的T细胞与第二种抗原之间的桥接更稳定,从而延长T细胞位于特定部位(例如肿瘤微环境)的时间,并且可以对疾病(例如肿瘤)发挥作用。这与绝大多数常规的双特异性抗体形式不同,后者是异二聚体并通过一个Fab臂单价结合每个靶抗原。预期这样的单价相互作用不仅不稳定,而且在许多情况下首先不足以在第一位置诱导TNF受体,例如CD137的聚集。

[0029] 在一个替代的优选实施方案中,抗体分子包含能够双价结合CD137的本发明的抗CD137 Fcab和第二抗原(例如单个Fab结构域)的特异性单价结合位点。单价结合位点可以结合例如肿瘤相关抗原。在此类分子的背景下,第二抗原的单价结合有望使抗体分子更紧密地堆积在细胞表面,从而增强CD137的聚集,从而导致T细胞活化。

[0030] 包含本发明的抗CD137 Fcab的抗体分子的另一个特征是CD137和第二抗原的两个抗原结合位点都包含在抗体结构本身内。尤其是,抗体分子不需要经由接头或其他手段将其他蛋白质与抗体分子融合以产生与两个靶标均二价结合的分子。这具有许多优点。具体地,可以使用与用于产生标准抗体的方法相似的方法来产生抗体分子,因为它们不包含任何额外的融合部分。由于接头可能随时间降解,导致抗体分子的异质群体,因此该结构还有望提高抗体的稳定性。仅具有一种融合蛋白的群中的那些抗体可能无法像具有两种融合蛋白的那些抗体一样有效地诱导TNF受体(如CD137)的条件激动。接头的裂解/降解可以在向患者施用治疗剂之前或之后进行(例如,通过酶促裂解或患者的体内pH),从而导致其有效性降低,同时在患者体内循环。由于抗体分子中没有接头,因此预期抗体分子在给药前后都保留相同数目的结合位点。此外,从分子的免疫原性的观点来看,抗体分子的结构也是优选的,因为当将分子施用于患者时,融合蛋白或接头或两者的引入可诱导免疫原性,导致治疗效果降低。

[0031] 本发明人进一步证明,与其中CD137结合位点不是抗体结构的一部分,但是提供了例如通过柔性接头经结合附接到例如抗体分子或其部分的分子相比,由本发明的Fcab分子的刚性结构产生的CD137抗原结合位点的刚性定位和/或紧密接近,有利于诱导CD137聚集。

[0032] 因此,本发明提供:

[0033] [1]一种特异性结合成员,其结合CD137并且包含位于该特异性结合成员的CH3结构域中的CD137抗原结合位点,所述CD137抗原结合位点包括位于所述CH3结构域的AB结构环中的第一序列,其中所述序列包含序列PPY(SEQ ID NO:10)。

[0034] [2]根据[1]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包括在AB结构环中

的插入。

[0035] [3]根据[2]所述的特异性结合成员,其中所述插入的长度为1至10个氨基酸。

[0036] [4]根据[3]所述的特异性结合成员,其中所述插入的长度为4至6个氨基酸。

[0037] [5]根据[4]所述的特异性结合成员,其中所述插入长度为5个氨基酸。

[0038] [6]根据[2]至[5]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述插入位于所述特异性结合成员的CH3结构域的10和19位之间,其中氨基酸残基编号根据ImMunoGeneTics (IMGT) 编号方案。

[0039] [7]根据[6]所述的特异性结合成员,其中所述插入位于所述特异性结合成员的CH3结构域的14和17位之间。

[0040] [8]根据[7]所述的特异性结合成员,其中所述插入位于所述特异性结合成员的CH3结构域的16和17位之间。

[0041] [9]根据[2]至[8]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述插入位于所述特异性结合成员的CH3结构域的16.5至16.1位,其中氨基酸残基编号根据ImMunoGeneTics (IMGT) 编号方案。

[0042] [10]根据[1]至[9]中任一项所述的特异性结合成员,其中PPY序列位于CH3结构域的15和17位之间,并且其中氨基酸残基编号根据IMGT编号方案。

[0043] [11]根据[1]至[10]中任一项所述的特异性结合成员,其中PPY序列位于CH3结构域的16和17位之间,并且其中氨基酸残基编号根据IMGT编号方案。

[0044] [12]根据[11]所述的特异性结合成员,其中所述PPY序列位于CH3结构域的16.3、16.2和16.1位。

[0045] [13]根据[1]至[12]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述第一序列为以下特异性结合成员的第一序列:

[0046] (i)SEQ ID NO:138所示的FS22-172-003;

[0047] (ii)SEQ ID NO:129所示的FS22-172-002;

[0048] (iii)SEQ ID NO:147所示的FS22-172-004;

[0049] (iv)SEQ ID NO:120所示的FS22-172-001;

[0050] (v)SEQ ID NO:156所示的FS22-172-005。

[0051] (vi)SEQ ID NO:110所示的FS22-172-006;或

[0052] (vii)SEQ ID NO:110所示的FS22-172。

[0053] [14]根据[13]所述的特异性结合成员,其中所述第一序列是以下特异性结合成员的第一序列:

[0054] (i)SEQ ID NO:138所示的FS22-172-003;

[0055] (ii)SEQ ID NO:129所示的FS22-172-002;

[0056] (iii)SEQ ID NO:147所示的FS22-172-004;

[0057] (iv)SEQ ID NO:120所示的FS22-172-001;

[0058] (v)SEQ ID NO:156所示的FS22-172-005。或

[0059] (vi)SEQ ID NO:110所示的FS22-172-006。

[0060] [15]根据[14]所述的特异性结合成员,其中所述第一序列是以下特异性结合成员的第一序列:

- [0061] (i)SEQ ID NO:138所示的FS22-172-003;
- [0062] (ii)SEQ ID NO:129所示的FS22-172-002;或
- [0063] (iii)SEQ ID NO:147所示的FS22-172-004。
- [0064] [16]根据[15]所述的特异性结合成员,其中所述第一序列是SEQ ID NO:138所示的特异性结合成员FS22-172-003的第一序列。
- [0065] [17]根据[10]所述的特异性结合成员,其中所述PPY序列位于CH3结构域的16、16.5和16.4位。
- [0066] [18]根据[1]至[10]或[17]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述第一序列为特异性结合成员FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011、FS22-053-017、FS22-053-014、FS22-053-010、FS22-053-012、FS22-053-013、FS22-053-015、FS22-053-016或FS22-053,优选特异性结合成员FS22-053-008的第一序列,如SEQ ID NO:19所示。
- [0067] [19]根据[13]至[16]或[18]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述第一序列位于所述特异性结合成员的CH3结构域的14和17位之间,其中氨基酸残基编号根据IMGT编号方案。
- [0068] [20]根据[19]所述的特异性结合成员,其中所述第一序列位于所述特异性结合成员的CH3结构域的15、16、16.5、16.4、16.3、16.2和16.1位。
- [0069] [21]根据[1]至[20]中任一项的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员还包含位于CH3结构域的EF结构环中的第二序列。
- [0070] [22]根据[21]所述的特异性结合成员,其中所述第二序列是特异性结合成员FS22-172-003、FS22-172-002、FS22-172-004、FS22-172-001、FS22-172-005、FS22-172-006或FS22-172,优选特异性结合成员FS22-172-003的第二序列,如SEQ ID NO:111所示。
- [0071] [23]根据[21]所述的特异性结合成员,其中所述第二序列是以下特异性结合成员的第二序列:
- [0072] (i)SEQ ID NO:20所示的FS22-053-008;
- [0073] (ii)SEQ ID NO:29所示的FS22-053-009;
- [0074] (iii)SEQ ID NO:47所示的FS22-053-011;
- [0075] (iv)SEQ ID NO:101所示的FS22-053-017;
- [0076] (v)SEQ ID NO:74所示的FS22-053-014;
- [0077] (vi)SEQ ID NO:38所示的FS22-053-010;
- [0078] (vii)SEQ ID NO:56所示的FS22-053-012;
- [0079] (viii)SEQ ID NO:66所示的FS22-053-013;
- [0080] (ix)SEQ ID NO:83所示的FS22-053-015;
- [0081] (x)SEQ ID NO:92所示的FS22-053-016;或
- [0082] (xi)SEQ ID NO:174所示的FS22-053。
- [0083] [24]根据[23]所述的特异性结合成员,其中所述第二序列是以下特异性结合成员的第二序列:
- [0084] (i)SEQ ID NO:20所示的FS22-053-008;
- [0085] (ii)SEQ ID NO:29所示的FS22-053-009;
- [0086] (iii)SEQ ID NO:47所示的FS22-053-011;

- [0087] (iv)SEQ ID NO:101所示的FS22-053-017;
- [0088] (v)SEQ ID NO:74所示的FS22-053-014。
- [0089] [25]根据[24]所述的特异性结合成员,其中所述第二序列是以下特异性结合成员的第二序列:
- [0090] (i)SEQ ID NO:20所示的FS22-053-008;
- [0091] (ii)SEQ ID NO:29所示的FS22-053-009;
- [0092] (iii)SEQ ID NO:47所示的FS22-053-011;或
- [0093] (iv)SEQ ID NO:101所示的FS22-053-017。
- [0094] [26]根据[25]所述的特异性结合成员,其中所述第二序列是SEQ ID NO:20所示的特异性结合成员FS22-053-008的第二序列。
- [0095] [27]根据[21]至[26]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述第二序列位于所述特异性结合成员的CH3结构域的92-98位,其中氨基酸残基编号根据IMGT编号方案。
- [0096] [28]根据[1]至[27]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员还包含位于CH3结构域的CD结构环中的第三序列。
- [0097] [29]根据[28]所述的特异性结合成员,其中第三序列位于特异性结合成员的43至78位,其中氨基酸残基编号根据IMGT编号方案。
- [0098] [30]根据[28]至[29]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述第三序列具有SEQ ID NO:2所示的序列。
- [0099] [31]根据[1]至[30]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述CH3结构域是人IgG1 CH3结构域。
- [0100] [32]根据[1]至[16],[19]至[22]和[27]至[31]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含以下特异性结合成员的CH3结构域序列:
- [0101] (i)SEQ ID NO:139所示的FS22-172-003;
- [0102] (ii)SEQ ID NO:130所示的FS22-172-002;
- [0103] (iii)SEQ ID NO:148所示的FS22-172-004;
- [0104] (iv)SEQ ID NO:121所示的FS22-172-001;
- [0105] (v)SEQ ID NO:157所示的FS22-172-005;
- [0106] (vi)SEQ ID NO:165所示的FS22-172-006;或
- [0107] (vii)SEQ ID NO:112所示的FS22-172。
- [0108] [33]根据[32]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含以下特异性结合成员的CH3结构域序列:
- [0109] (i)SEQ ID NO:139所示的FS22-172-003;
- [0110] (ii)SEQ ID NO:130所示的FS22-172-002;
- [0111] (iii)SEQ ID NO:148所示的FS22-172-004;
- [0112] (iv)SEQ ID NO:121所示的FS22-172-001;
- [0113] (v)SEQ ID NO:157所示的FS22-172-005;或
- [0114] (vi)SEQ ID NO:165所示的FS22-172-006。
- [0115] [34]根据[33]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含以下特异性结合成员的CH3结构域序列:

- [0116] (i)SEQ ID NO:139所示的FS22-172-003;
- [0117] (ii)SEQ ID NO:130所示的FS22-172-002;或
- [0118] (iii)SEQ ID NO:148所示的FS22-172-004。
- [0119] [35]根据[34]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含SEQ ID NO:139所示的特异性结合成员FS22-172-003的CH3结构域序列。
- [0120] [36]根据[1]至[10],[17]至[18],[19]至[21]和[23]至[31]中任一项的所述特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包括以下特异性结合成员的CH3结构域序列:
- [0121] (i)SEQ ID NO:21所示的FS22-053-008;
- [0122] (ii)SEQ ID NO:30所示的FS22-053-009;
- [0123] (iii)SEQ ID NO:48所示的FS22-053-011;
- [0124] (iv)SEQ ID NO:102所示的FS22-053-017;
- [0125] (v)SEQ ID NO:75所示的FS22-053-014;
- [0126] (vi)SEQ ID NO:39所示的FS22-053-010;
- [0127] (vii)SEQ ID NO:57所示的FS22-053-012;
- [0128] (viii)SEQ ID NO:66所示的FS22-053-013;
- [0129] (ix)SEQ ID NO:84所示的FS22-053-015;
- [0130] (x)SEQ ID NO:93所示的FS22-053-016;或
- [0131] (xi)SEQ ID NO:175所示的FS22-053。
- [0132] [37]根据[36]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含以下特异性结合成员的CH3结构域序列:
- [0133] (i)SEQ ID NO:21所示的FS22-053-008;
- [0134] (ii)SEQ ID NO:30所示的FS22-053-009;
- [0135] (iii)SEQ ID NO:48所示的FS22-053-011;
- [0136] (iv)SEQ ID NO:102所示的FS22-053-017;或
- [0137] (v)SEQ ID NO:75所示的FS22-053-014。
- [0138] [38]根据[37]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含以下特异性结合成员的CH3结构域序列:
- [0139] (i)SEQ ID NO:21所示的FS22-053-008;
- [0140] (ii)SEQ ID NO:30所示的FS22-053-009;
- [0141] (iii)SEQ ID NO:48所示的FS22-053-011;或
- [0142] (iv)SEQ ID NO:102所示的FS22-053-017。
- [0143] [39]根据[38]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含SEQ ID NO:21所示的特异性结合成员FS22-053-008的CH3结构域序列。
- [0144] [40]根据[37]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含SEQ ID NO:102所示的特异性结合成员FS22-053-017的CH3结构域序列。
- [0145] [41]根据[37]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含SEQ ID NO:75所示的特异性结合成员FS22-053-014的CH3结构域序列。
- [0146] [42]根据[1]至[41]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员还包含CH2结构域,优选人IgG1的CH2结构域。

[0147] [43]根据[1]至[42]中任一项的所述特异性结合成员,其中所述特异性结合成员是两条相同的多肽链的二聚体,其各自包含CH2和CH3结构域。

[0148] [44]根据[42]或[43]所述的特异性结合成员,其中所述CH2结构域具有SEQ ID NO:6或5所示的序列。

[0149] [45]根据[42]至[44]中任一项所述的特异性结合成员,其在CH2结构域的N末端还包含免疫球蛋白铰链区或其部分,优选人IgG1铰链区或其部分。

[0150] [46]根据[45]所述的特异性结合成员,其中所述铰链区具有SEQ ID NO:179所示的序列或其片段。

[0151] [47]根据[46]所述的特异性结合成员,其中所述铰链区具有SEQ ID NO:7所示的序列。

[0152] [48]根据[1]至[16],[19]至[22],[27]至[35]和[42]至[47]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含分别如SEQ ID NO:141、132、150、123、159、167和114所示的特异性结合成员FS22-172-003、FS22-172-002、FS22-172-004、FS22-172-001、FS22-172-005、FS22-172-006或FS22-172的序列。

[0153] [49]根据[48]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包括分别如SEQ ID NO:141、132、150、123、159和167所示的特异性结合成员FS22-172-003、FS22-172-002、FS22-172-004、FS22-172-001、FS22-172-005或FS22-172-006的序列。

[0154] [50]根据[49]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含分别如SEQ ID NO:141、132和150所示的特异性结合成员FS22-172-003、FS22-172-002或FS22-172-004的序列。

[0155] [51]根据[50]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包括SEQ ID NO:141所示的特异性结合成员FS22-172-003的序列。

[0156] [52]根据[1]至[10],[17]至[18],[19]至[21],[23]至[31]和[36]至[47]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包括如SEQ ID NO:23、32、50、104、77、41、59、68、86、95和175所示的特异性结合成员FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011、FS22-053-017、FS22-053-014、FS22-053-010、FS22-053-012、FS22-053-013、FS22-053-015、FS22-053-016或FS22-053的序列。

[0157] [53]根据[52]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含分别如SEQ ID NO:23、32、50、104和77所示的特异性结合成员FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011、FS22-053-017或FS22-053-014的序列。

[0158] [54]根据[53]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包含分别如SEQ ID NO:23、32、50和103所示的特异性结合成员FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011或FS22-053-017的序列。

[0159] [55]根据[54]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员包括SEQ ID NO:23所示的特异性结合成员FS22-053-008的序列。

[0160] [56]根据[1]至[55]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员结合人CD137。

[0161] [57]根据[56]所述的特异性结合成员,其中所述人CD137具有、包含如SEQ ID NO:181所示的序列或由其组成。

[0162] [58]根据[1]至[55]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员结合二聚体CD137的亲合力比结合单体CD137的更高。

[0163] [59]根据[1]至[58]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员结合食蟹猴CD137。

[0164] [60]根据[59]所述的特异性结合成员或抗体分子,其中所述食蟹猴CD137具有、包含如SEQ ID NO:183所示的序列或由其组成。

[0165] [61]根据[1]至[60]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员还包含第二抗原结合位点。

[0166] [62]根据[61]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员是多特异性分子。

[0167] [63]根据[62]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员是双特异性、三特异性或四特异性分子。

[0168] [64]根据[63]所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员是双特异性分子。

[0169] [65]根据[61]至[64]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述第二抗原结合位点是基于CDR的抗原结合位点。

[0170] [66]根据[65]所述的特异性结合成员,其中第二抗原结合位点包含重链可变域CDR1、CDR2和CDR3,以及轻链可变域CDR1、CDR2和CDR3。

[0171] [67]根据[61]至[66]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述第二抗原结合位点包含重链可变域和轻链可变域。

[0172] [68]根据[61]至[67]中任一项所述的特异性结合成员,其中所述特异性结合成员是抗体分子。

[0173] [69]根据[68]所述的抗体分子,其中所述抗体分子是人IgG1分子。

[0174] [70]根据[65]至[69]中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子的基于CDR的抗原结合位点结合选自下组的第二抗原:免疫细胞抗原,和疾病抗原。

[0175] [71]根据[70]所述的抗体分子,其中所述疾病抗原是肿瘤抗原或病原体抗原。

[0176] [72]根据[70]所述的抗体分子,其中所述免疫细胞抗原是免疫调节分子,例如PD-L1。

[0177] [73]根据[70]所述的抗体分子,其中所述免疫细胞抗原是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的成员。

[0178] [74]根据[71]所述的抗体分子,其中所述肿瘤抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。

[0179] [75]根据[71]或[74]所述的抗体分子,其中所述肿瘤抗原是癌细胞上的细胞表面抗原。

[0180] [76]根据[71]所述的抗体分子,其中所述肿瘤抗原是可溶性多聚体。

[0181] [77]根据[76]所述的抗体分子,其中可溶性多聚体至少是二聚体。

[0182] [78]根据[77]所述的抗体分子,其中可溶性多聚体至少是三聚体。

[0183] [79]根据[71]所述的抗体分子,其中所述病原体抗原是细菌或病毒抗原。

[0184] [80]根据[70]至[79]中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子能够在第二抗原存在下活化免疫细胞上存在的CD137。

[0185] [81]根据[70]至[80]中任一项所述的抗体分子,其中所述抗体分子与CD137和第二抗原的结合引起CD137在免疫细胞上的聚集。

[0186] [82]根据[80]或[81]所述的抗体分子,其中所述免疫细胞是T细胞。

[0187] [83]根据[1]至[82]中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子,其中所述特异性结合成员或抗体分子已经被修饰以减少或消除特异性结合成员或抗体分子的CH2结构域与一个或多个Fc $\gamma$ 受体的结合。

[0188] [84]根据[1]至[83]中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子,其中所述特异性结合成员或抗体分子不激活Fc $\gamma$ 受体。

[0189] [85]根据[83]或[84]所述的特异性结合成员或抗体分子,其中所述Fc $\gamma$ 受体选自下组:Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RI Ib和Fc $\gamma$ RIII。

[0190] [86]根据[1]至[85]中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子,其中所述特异性结合成员或抗体分子与生物活性分子缀合。

[0191] [87]根据[1]至[85]中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子,其中所述特异性结合成员或抗体分子缀合至可检测标记。

[0192] [88]一种核酸分子,其编码[1]至[85]中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子。

[0193] [89]根据[88]所述的核酸分子,其中所述核酸分子包括:

[0194] (i) 分别如SEQ ID NO:22、31、49、103、76、40、58、67、85、94和176所示的特异性结合成员FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011、FS22-053-017、FS22-053-014、FS22-053-010、FS22-053-012、FS22-053-013、FS22-053-015、FS22-053-016或FS22-053的CH3结构域核酸序列;或

[0195] (ii) 分别如SEQ ID NO:140、131、149、122、158、166和113所示的特异性结合成员FS22-172-003、FS22-172-002、FS22-172-004、FS22-172-001、FS22-172-005、FS22-172-006或FS22-172的CH3结构域核酸序列。

[0196] [90]根据[88]或[89]所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含以下核酸序列:特异性结合成员:

[0197] (i) 分别如SEQ ID NO:24、33、51、105、78、42、60、69、87、96和177所示的FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011、FS22-053-017、FS22-053-014、FS22-053-010、FS22-053-012、FS22-053-013、FS22-053-015、FS22-053-016或FS22-053;或

[0198] (ii) 分别如SEQ ID NO:142、133、151、124、160、168和115所示的FS22-172-003、FS22-172-002、FS22-172-004、FS22-172-001、FS22-172-005、FS22-172-006或FS22-172。

[0199] [91]根据[89]或[90]所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含以下特异性结合成员的CH3结构域核酸序列或核酸序列:

[0200] (i) FS22-172-003;或

[0201] (ii) FS22-053-008。

[0202] [92]一种载体,其包含[88]至[91]中任一项所述的核酸。

[0203] [93]一种重组宿主细胞,其包含[88]至[91]中任一项所述的核酸或[92]所述的载体。

[0204] [94]一种产生根据[1]至[85]中任一项所述的产生特异性结合成员或抗体分子的



方法,包括在产生特异性结合成员或抗体分子的条件培养[93]所述的重组宿主细胞。

[0205] [95][94]所述的方法,其进一步包括分离和/或纯化所述特异性结合成员或抗体分子。

[0206] [96]一种药物组合物,其包含根据[1]至[87]中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子和药学上可接受的赋形剂。

[0207] [97]根据[1]至[87]中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子用于通过疗法治疗人或动物体的方法中。

[0208] [98]一种治疗个体疾病或病症的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的根据[1]至[87]中任一项所述的特异性结合成员或抗体分子。

[0209] [99]根据[97]所述使用的特异性结合成员或抗体分子,或根据[98]所述的方法,其中所述治疗是个体癌症或感染性疾病的治疗。

[0210] [10]根据[97]或[99]所述使用的特异性结合成员或抗体分子,或根据[98]或[99]所述的方法,其中所述治疗方法包括将所述特异性结合成员或抗体分子与第二种治疗剂组合施用于个体。

## 附图说明

[0211] 图1:图1A,B和C显示了Fcab FS22-053、FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-010、FS22-053-011、FS22-053-012、FS22-053-013、FS22-053-014、FS22-053-015、FS22-053-016、FS22-053-017、FS22-172、FS22-172-001、FS22-172-002、FS22-172-003、FS22-172-004、FS22-172-005和FS22-172-006以及野生型(WT)Fcab CH3结构域的序列比对。根据IMGT,IMGT外显子(连续编号),EU和Kabat编号系统给出残基编号。图1D显示了与亲本FS22-053 CH3结构域相比,克隆FS22-053-008至FS22-053-016和FS22-053-017(参见实施例10.1)的CH3结构域的序列同一性百分比。图1E显示了与亲本FS22-053 CH3结构域相比,克隆FS22-172-001至FS22-172-006的CH3结构域的序列同一性百分比。

[0212] 图2显示了由发光值确定的NF- $\kappa$ B信号传导,作为由CD137聚集和激活引起的萤光素酶产生的量度。He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>形式的抗人CD137亲本Fcab FS22-053和FS22-172与蛋白L交联时,在HEK hCD137 NF- $\kappa$ B报告基因检测法中驱动有限的CD137聚集和NF- $\kappa$ B信号传导(空心 and 实心圆圈)。He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>形式的亲和力成熟的抗人CD137 Fcab FS22-053-008、-009、-011(空心正方形,三角形和菱形)和FS22-172-002、-003、-004(实心正方形,三角形和菱形)与蛋白L交联时,与亲本克隆相比,在HEK hCD137 NF- $\kappa$ B报告基因分析中可以驱动更强的CD137聚集和NF- $\kappa$ B信号传导。与亲和力成熟的抗人CD137 Fcab相比,与蛋白L交联时(虚线),阳性对照抗人CD137 mAb(20H4.9)显示出发光增强,EC50值更小。

[0213] 图3显示了在存在抗人CD137 Fcab的情况下,T细胞活化试验中IL-2的释放。PD-L1(S70 LALA)mAb<sup>2</sup>形式的FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011和FS22-172-002、FS22-172-003、FS22-172-004仅在与过表达PD-L1的HEK细胞交联时(空心 and 实心黑色符号)驱动CD137的聚集和激活,导致在D011.10 T细胞活化试验中释放小鼠白介素2(mIL-2)。在浓度增加时,阳性对照抗人CD137mAb(20H4.9)显示mIL-2释放增加(虚线),但是最大释放显著低于抗人CD137Fcab。与交联时(空心 and 实心黑色符号)相比,mAb<sup>2</sup>形式的所有PD-L1型抗人CD137Fcab不与过表达PD-L1的HEK细胞交联时(实心灰色符号),显示出mIL-2释放明显更

低。

[0214] 图4显示了在人原代CD8<sup>+</sup>T细胞活化试验中人IL-2(hIL-2)的释放。当mAb<sup>2</sup>被过表达PD-L1的HEK细胞交联时,亲和力成熟的PD-L1 mAb<sup>2</sup>形式的抗人CD137Fcab FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011、FS22-172-002、FS22-172-003和FS22-172-004,驱动CD8<sup>+</sup>T细胞的CD137活化,导致人IL-2的释放。亲和力成熟的Fcab的活性比亲本Fcab FS22-053(空心圆)和FS22-172(实心圆)更好。阳性对照抗人CD137 mAb(20H4.9)(虚线)显示hIL-2释放增加并且IL-2释放比用Fcab大,但是EC50值大于某些抗人CD137 Fcabs抗体,表明用某些抗人CD137 Fcab抗体达到了更好的活性。

[0215] 图5显示了由发光值确定的NF- $\kappa$ B信号传导,作为由CD137聚集和激活引起的萤光素酶产生的量度。在HEK mCD137 NF- $\kappa$ B报告基因分析中,当与蛋白L交联时,He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>格式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063驱动CD137聚集和NF- $\kappa$ B信号传导。在高于100nM的浓度下,并且当未与L蛋白交联时,FS22m-063驱动了一些CD137聚集和NF- $\kappa$ B信号传导,但水平远低于交联时(空心圆)。与未交联(空心方块)相比,与蛋白L(实心方块)交联时,阳性对照抗小鼠CD137mAb(Lob12.3)显示出发光增加,但是在最高抗体浓度下获得的最大响应明显低于抗小鼠CD137 Fcab的最大响应。如预期那样,同种型对照没有显示活性。

[0216] 图6显示了在用G1-AA/4420(IgG对照)、G1-AA/S70(PD-L1阳性对照)、G1-AA/Lob12.3(CD137阳性对照)、G1-AA/S70加G1-AA/Lob12.3的组合和FS22m-063-AA/S70(PD-L1 mAb<sup>2</sup>形式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治疗的C57BL6小鼠中皮下生长的MC38同系肿瘤模型的肿瘤体积测量值。显示了平均肿瘤体积[mm<sup>3</sup>]加或减95%的置信区间。与IgG对照治疗的小鼠、抗PD-L1阳性对照mAb治疗的小鼠、抗CD137阳性对照治疗的小鼠相比,FS22m-063-AA/S70能够在MC38同系肿瘤模型中显著降低肿瘤生长。使用混合模型分析,在整个研究时间内,增长率的统计显著性成对显示。\*\*\*\* $\leq 0.0001$ p值

[0217] 图7:A显示了在用G1-AA/4420(IgG对照)、G1-AA/F2(PD-1阳性对照)、G1/Lob12.3(CD137阳性对照)、G1-AA/F2加G1-AA/Lob12.3的组合和FS22m-063-AA/F2(PD-L1 mAb<sup>2</sup>形式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063)治疗的C57BL/6小鼠中皮下生长的MC38同系肿瘤模型的肿瘤体积测量值。显示了平均肿瘤体积[mm<sup>3</sup>]加或减95%的置信区间。与IgG对照治疗的小鼠相比,FS22m-063-AA/F2能够显著降低MC38同系肿瘤模型中的肿瘤生长。使用混合模型分析,在整个研究时间内,增长率的统计显著性成对显示。\*\*\*\* $\leq 0.0001$ p值。B显示了与图7A相同的数据,不同的是分别显示了每只治疗小鼠的肿瘤体积。这突出表明,在研究过程中,除一只小鼠外,用FS22m-063-AA/F2治疗的所有小鼠均未显示任何肿瘤再生长。相反,在研究结束时,在用G1-AA/Lob12.3和G1-AA/F2治疗的小鼠中观察到了肿瘤再生长。

[0218] 图8显示了皮下间皮素阳性的CT26同系肿瘤模型(Balb/c)中的平均肿瘤体积测量值。用G1-AA/4420(IgG对照)或FS22m-063-AA/FS28m-228mAb<sup>2</sup>治疗小鼠。与IgG对照治疗的小鼠相比,用FS22m-063-AA/FS28m-228治疗的小鼠表现出显著的肿瘤生长抑制作用。绘制了平均肿瘤体积[mm<sup>3</sup>]加或减95%置信区间。使用混合模型分析,在整个研究时间内,增长率的统计显著性成对显示。\*\*\*\* $\leq 0.0001$ p值

[0219] 图9显示了用G1-AA/He1D1.3(人IgG1对照)、FS22m-063-AA/He1D1.3(模拟mAb<sup>2</sup>形式的抗小鼠CD137 Fcab)、FS22m-063-AA/4420(模拟mAb<sup>2</sup>形式的抗小鼠CD137 Fcab)、G1-AA/FS28m-228-010(抗小鼠MSLN mAb)、FS22m-063-AA/He1D1.3和G1-AA/FS28m-228-010(抗

小鼠CD137 Fcab加抗小鼠MSLN mAb)的组合以及FS22m-063-AA/FS28m-228-010(抗小鼠CD137/MSLN mAb<sup>2</sup>)治疗的CT26.G10同系肿瘤模型中的单个肿瘤体积测量值。与同种型对照以及其他治疗组相比,FS22m-063-AA/FS28m-228-010显示出肿瘤生长减少。

[0220] 图10显示了用G1-AA/He1D1.3(IgG对照)、FS22m-063-AA/He1D1.3(mAb<sup>2</sup>形式的抗小鼠CD137 Fcab)、FS22m-063-AA/4420(mAb<sup>2</sup>形式的抗小鼠CD137 Fcab)、G1-AA/FS28m-228-010(抗小鼠MSLN Fab)、FS22m-063-AA/He1D1.3和G1-AA/FS28m-228-010(抗小鼠CD137 Fcab加抗小鼠MSLN Fab)的组合以及FS22m-063-AA/FS28m-228-010(抗小鼠CD137/MSLN mAb<sup>2</sup>)治疗的CT26.G10同系肿瘤模型的Kaplan Meier生存曲线。结果表明,与同种型对照组或其他治疗组相比,FS22m-063-AA/FS28m-228-010治疗可显著提高存活率。

[0221] 图11显示了D011.10人CD137 T细胞活化试验中小鼠IL-2的释放,该试验测试了与蛋白L交联的小鼠和人交叉反应性模拟mAb<sup>2</sup>形式的CD137 Fcab FS22-053-014和FS22-053-017。当与蛋白L交联时,两个Fcab都能够激活CD137。阳性对照抗人CD137 mAb(20H4.9)显示mIL-2释放增加,与模拟mAb<sup>2</sup>的FS22-053-017一致。与交联时相比,未与蛋白L交联的模拟mAb<sup>2</sup>形式的两种抗人CD137 Fcab均显示可忽略的mIL-2释放(实心符号)。

[0222] 图12显示了D011.10小鼠CD137 T细胞活化试验中的小鼠IL-2释放,测试了与蛋白L交联时小鼠和人交叉反应性模拟mAb<sup>2</sup>形式的CD137 Fcab FS22-053-014和FS22-053-017。FS22-053-014和FS22-053-017,以及抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063,均以He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>形式与蛋白L交联时激活了CD137,从而释放了mIL-2。阳性对照抗小鼠CD137 mAb Lob12.3显示mIL-2释放如预期增加。与交联时相比,所有未经蛋白L交联(虚线)的模拟mAb<sup>2</sup>形式的抗CD137 Fcab均显示mIL-2释放大大降低。FS22-053-017在该测定中的活性较低(EC50比FS22-053-014低8倍),但在测定中仍显示出活性。

[0223] 图13显示了与包含野生型人IgG1 Fc CH3结构域的结构模板(PDB ID 5JII)相比,FS22 Fcab的同源性模型。图像显示5JII Fc(A),以及FS22-053-008(B)和FS-172-003(C) Fcab的代表性结构。每个结构的一个CH3结构域已使用灰带图表示法进行了渲染。AB,CD和EF环由色带的黑色阴影指示,并进行相应标记。为了对比目的,AB环的预测结构以虚线突出显示,并显示了由PPY基序引起的凸起,该凸起可能在结合中起关键作用。

[0224] 图14显示了mAb<sup>2</sup>形式的同源二聚Fcab(FS22-172-003-AA)(即包含2个CD137结合CH3结构域)相比于mAb<sup>2</sup>形式的异源二聚Fcab(包含1个CD137结合CH3结构域和一个野生型CH3结构域)的结合动力学的传感图。该传感图显示,即使仅通过一条结合链,两个分子都与CD137结合。与异源二聚体Fcab相比,两者解离速率不同,同源二聚体Fcab的解离曲线要慢得多。这些传感图证明抗CD137 Fcab可以双价结合CD137。

[0225] 图15显示了模拟mAb<sup>2</sup>形式的抗人CD137 Fcab(FS22-172-003-AA/He1D1.3)阳性对照抗体(G1-AA/20H4.9)和同型对照抗体(G1-AA/He1D1.3)与表达一系列CD137水平的细胞,包括阴性对照细胞系(hCD137<sup>neg</sup> D011.10)的结合(A)。通过流式细胞术确定结合。结果显示,尽管G1-AA/20H4.9能够结合所有表达CD137的细胞系(B-E),但FS22-172-003-AA/He1D1.3却不结合表达低水平CD137的D011.10细胞系(B),并且与阳性对照相比,结合倍数差异与细胞系表达的CD137的量成反比。

## 详细说明

[0226] 本发明涉及结合CD137的特异性结合成员。CD137也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员9 (TNFRSF9) 或4-1BB。特异性结合成员优选结合人CD137, 较优选人和食蟹猴CD137, 更优选二聚体人和食蟹猴CD137。被特异性结合成员结合的CD137的部分优选是CD137细胞外结构域。人和食蟹猴CD137的细胞外结构域可以分别包含SEQ ID NO:181和183中列出的序列或由其组成。特异性结合成员优选能够结合在细胞表面表达的CD137。该细胞优选是免疫细胞, 例如CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞或调节性T (Treg) 细胞, 优选CD8<sup>+</sup>T细胞, 或B细胞、自然杀伤(NK) 细胞、自然杀伤T (NKT) 细胞、树突状细胞 (DC) 或肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)。

[0227] 特异性结合成员优选特异性结合CD137。术语“特异性”可以指这样的情况, 其中特异性结合成员将不显示与除其特异性结合伴侣, 此处为CD137以外的分子的任何显著结合。术语“特异性”也适用于特异性结合成员对由许多抗原携带的特定表位 (例如CD137上的表位) 具有特异性的情况, 在这种情况下, 特异性结合成员将能够与多种携带该表位的抗原结合。特异性结合成员优选不与CD40、OX40和/或GITR结合或不显示任何显著结合。

[0228] 如上文背景部分所述, 用抗CD137抗体乌鲁单抗的患者治疗与剂量限制性高度肝炎相关。不希望受理论的束缚, 认为用乌鲁单抗治疗所见的肝脏炎症可能是由于存在于肝脏中的T细胞的活化, 或患者肝脏中活化的T细胞的浸润和积聚。为了选择具有减少或不引起肝脏炎症的分子, 本发明人选择了对CD137具有高亲合力的Fcab。具体地, 本发明人选择了结合二聚CD137的亲合力比结合单体CD137高的Fcab。在启动和激活时, T细胞CD137的表达上调。据认为由于CD137在活化的T细胞上的更高表达, CD137在此类细胞表面上将以二聚体、三聚体和更高阶的多聚体的形式存在。相反, 无活性的T细胞表达的CD137表达低或甚至不可检测。因此认为CD137即使在这种T细胞的表面上完全表达, 也很可能是单体形式。因此, 与无活性的T细胞, 例如肝脏中存在的无活性的T细胞相反, 认为与高亲和力的CD137结合的Fcab优先与活化的T细胞结合, 因此显示出减轻的或无脏肝炎症。

[0229] 特异性结合成员优选以60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、5nM、4nM、3nM或2nM的亲合力 ( $K_D$ ) 或更高的亲合力结合二聚体人CD137。

[0230] 在一个优选的实施方案中, 特异性结合成员结合二聚体CD137的亲合力高于结合单体CD137的。在一个优选的实施方式中, 所述特异性结合成员结合二聚CD137的亲合力比特异性结合成员对单体CD137的亲合力高至少50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、110倍、120倍、130倍、140倍、150倍、160倍、170倍或200倍。

[0231] 所述人CD137可以例如具有SEQ ID NO:183所列出的序列。不论抗原是单体形式还是二聚体形式, 序列都是相同的。

[0232] FS22-53和FS22-172谱系的特异性结合成员也已经显示出结合二聚体食蟹猴CD137。与食蟹猴CD137以及人CD137的结合是有益的, 因为它允许在施用于人之前在食蟹猴中测试特异性结合成员的功效和毒性。

[0233] 在一个优选的实施方式中, 所述特异性结合成员结合二聚体猕猴CD137的亲合力可以为250nM、200nM、150nM、140nM、120nM、100nM、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、5nM、4nM、3nM、或2nM的亲合力 ( $K_D$ ) 或更高。优选地, 所述特异性结合成员结合食蟹猴CD137的亲合力为2nM的亲合力 ( $K_D$ ) 或更高。

[0234] 特异性结合成员可以以相似的亲合力结合二聚体人CD137和二聚体食蟹猴CD137。

认为在食蟹猴中用特异性结合成员进行功效和毒性研究是有益的,这可以预测特异性结合成员在人类中的功效和毒性。

[0235] 因此,在一个优选的实施方式中,所述特异性结合成员结合二聚体食蟹猴CD137的亲合力高于或低于该特异性结合成员结合二聚体人CD137的亲合力不超过10倍,优选不超过5倍。

[0236] 所述特异性结合成员可以结合二聚体小鼠CD137,二聚体食蟹猴CD137和二聚体人CD137。认为这是有益的,因为相同的特异性结合成员可用于在小鼠中进行初始功效研究,在食蟹猴中进行毒性研究以及在人类中进行临床试验,从而有可能简化通往临床的道路。具体地,令人惊讶地发现特异性结合成员FS22-053-014和FS22-053-017与二聚体小鼠、人和食蟹猴CD137结合。

[0237] 特异性结合成员对同源抗原例如人或食蟹猴CD137的结合亲合力可以通过表面等离子体共振 (SPR) 例如Biacore确定。

[0238] 术语“特异性结合成员”描述了免疫球蛋白或其片段,其包含包含CD137抗原结合位点的恒定结构域。因此,如本文所用,术语“特异性结合成员”包括抗原结合片段,前提是所述抗原结合片段包含位于特异性结合成员恒定结构域中的CD137抗原结合位点。所述恒定域可以是CL、CH1、CH2、CH3或CH4结构域,所述恒定域优选是CH1、CH2或CH3结构域,更优选CH2或CH3结构域,最优选CH3结构域。特异性结合成员可以部分或全部合成产生。

[0239] 优选地,所述特异性结合成员包含CH2和CH3结构域,其中CH2或CH3结构域,优选CH3结构域,包含CD137抗原结合位点。所述特异性结合成员优选是两条(相同)多肽链的二聚体,每条包含CH2和CH3结构域。在一个优选的实施方式中,所述特异性结合成员在CH2结构域的N-末端还包含免疫球蛋白铰链区或其一部分。这样的分子在本文中也称为抗原结合Fc片段或Fcab<sup>TM</sup>。铰链区可以包含或由SEQ ID NO:179所示的序列或其片段组成。优选地,所述片段为如SEQ ID NO:179所示的序列的C末端片段。所述片段的长度可以是最多20,最多10,最多8或最多6个氨基酸。所述片段的长度可以是至少3,至少4,至少5或至少6个氨基酸。在一个优选的实施方式中,铰链区具有如SEQ ID NO:7所示的序列。

[0240] 在一个优选的实施方式中,特异性结合成员是抗体分子,优选单克隆抗体或其片段。抗体分子优选是人的或人源化的。抗体分子可以是免疫球蛋白G分子,例如IgG1, IgG2, IgG3或IgG4分子,优选为IgG1, IgG2或IgG4分子,更优选为IgG1分子或其片段。

[0241] 由于抗体可以多种方式修饰,因此术语“抗体分子”应解释为涵盖抗体的抗体片段、衍生物、功能性等价物和同源物,无论是天然的还是全部或部分合成的。包含CH3结构域的抗体片段的实例是抗体的Fc结构域。包含CDR序列和CH3结构域的抗体片段的实例是微抗体,其包含连接至CH3结构域的scFv (Hu等人, (1996), Cancer Res., 56(13):3055-61)。

[0242] 特异性结合成员包含CD137抗原结合位点。CD137抗原结合位点位于特异性结合成员的恒定结构域中,优选CH3结构域。CD137抗原结合位点在特异性结合成员的恒定结构域中包含一个或多个修饰的结构环。用于产生靶抗原的抗原结合位点的工程抗体恒定域结构环是本领域已知的,并且例如描述于Wozniak-Knopp G等人(2010); W02006/072620和W02009/132876。

[0243] 在广泛的选择和亲合力成熟程序之后,发明人分离了两组Fcab,其优先结合二聚体而不是单体人CD137。令人惊讶地,分离的Fcab在其AB结构环中全部包含序列PPY以及5个

氨基酸插入。从不同的选择活动中独立选择两组Fcab,每个都使用在结构AB环中包含五个氨基酸插入的文库。因此,对PPY序列进行了两次独立选择,表明该序列对CD137结合的重要性。从Fcab文库中分离的抗CD137 Fcab在AB结构环中不包含五个氨基酸插入,因此不再进行进一步研究,例如因为所选的Fcab不能亲和力成熟。这表明存在于AB结构环中的氨基酸插入对于CD137结合也可能是重要的。因此,序列PPY和5个氨基酸插入在AB结构环中的存在对于CD137结合可能是重要的,其中PPY序列可以任选地全部或部分地存在于5个氨基酸插入中。

[0244] 因此,特异性结合成员的CD137抗原结合位点可包含第一和/或第二序列,优选第一和第二序列,其中第一和第二序列分别位于特异性结合成员的恒定结构域,优选CH3结构域的AB和EF结构环中。

[0245] 在一个优选的实施方式中,特异性结合成员的CH3结构域的95和96位的残基是野生型的,即分别优选为精氨酸(R)和色氨酸(W)。这两个残基都位于EF结构环中。除非另有说明,否则本文中的氨基酸残基位置根据ImMunoGeneTics (IMGT) 编号方案编号。IMGT编号方案在LeFranc等人,2005年中有描述。

[0246] 第一序列优选包含序列PPY(SEQ ID NO:10)。

[0247] 所述PPY序列可以位于特异性结合成员的CH3结构域的10和19位之间,优选位于15和17位之间。在一个优选的实施方式中,所述PPY序列位于CH3结构域的16、16.5和16.4位。或者,所述PPY序列可以位于CH3结构域的16和17位之间。在另一个优选的实施方式中,所述PPY序列位于CH3结构域的16.3、16.2和16.1位。在IMGT编号方案中,插入的残基根据其所在环的方向进行编号。如果环方向“向上”,则插入的残基取紧接插入前的残基数,并按升序十进制数表示序列中插入的残基数,例如16、16.1、16.2、16.3,其中残基16之后有三个突变。如果环方向“向下”,则插入的残基取紧接插入前的残基数,并按降序十进制数表示序列中插入的残基数,例如16、16.3、16.2、16.1,其中在残基16之后又有三个突变(LeFranc等人,2005;LeFranc等人,2015)。

[0248] 在一个优选的实施方式中,所述AB结构环包含氨基酸插入。插入长度可以是1至10、2至9、3至7、4至6或5个氨基酸。优选地,插入长度为5个氨基酸。

[0249] 插入可位于特异性结合成员的CH3结构域的10和19位之间,优选在14和17位之间,更优选在16和17位之间。在一个优选的实施方式中,插入位于特异性结合成员的CH3结构域的16.5至16.1位,如图1所示。

[0250] 亲和力成熟后鉴定的大多数特异性结合成员在CH3结构域的97位上包含一个亮氨酸(L)残基。许多特异性结合成员在特异性结合成员的CH3结构域的98位还包含天冬氨酸(D)残基或谷氨酸(E)残基。这两个氨基酸变化都位于EF结构环中。这些结果表明,这些残基中的一个或两个对于CD137结合可能很重要。因此,第二序列优选包含序列LD或LE,其中LD或LE序列优选位于特异性结合成员的CH3结构域的97和98位。

[0251] 第一序列和第二序列可以是以下的CH3结构域的第一和第二序列:特异性结合成员FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005,FS22-172-006,或FS22-172,优选特异性结合成员FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005或FS22-172-006,更优选特异性结合成员FS22-172-003,FS22-172-002,或FS22-172-004,最优选特异性结合成员FS22-172-003。

[0252] 或者,第一序列和第二序列可以是以下的CH3结构域的第一和第二序列:特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017,FS22-053-014,FS22-053-010,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-015或FS22-053-016,或FS22-053,优选特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017,或FS22-053-014,更优选特异结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,或FS22-053-017,最优选特异结合成员FS22-053-008。在一个替代的优选实施方式中,第一序列和第二序列是特异性结合成员FS22-053-017或FS22-053-014的CH3结构域的第一和第二序列,更优选为特异性结合成员FS22-053-017。

[0253] 特异性结合成员FS22-053,FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-010,FS22-053-011,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-014,FS22-053-015,FS22-053-016,FS22-053-017,FS22-172,FS22-172-001,FS22-172-002,FS22-172-003,FS22-172-004,FS22-172-005和FS22-172-006的CH3结构域序列分别如SEQ ID NO:175、21、30、39、49、58、66、75、84、93、102、112、121、130、139、148、157和166所示。

[0254] 特异性结合成员FS22-053,FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-010,FS22-053-011,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-014,FS22-053-015,FS22-053-016,FS22-053-017,FS22-172,FS22-172-001,FS22-172-002,FS22-172-003,FS22-172-004,FS22-172-005和FS22-172-006的第一和第二序列可以是特异性结合成员FS22-053,FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-010,FS22-053-011,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-014,FS22-053-015,FS22-053-016,FS22-053-017,FS22-172,FS22-172-001,FS22-172-002,FS22-172-003,FS22-172-004,FS22-172-005和FS22-172-006的CH3结构域的14和17位之间以及91和99位之间的序列。

[0255] 或者,特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-010,FS22-053-011,FS22-053-012,和FS22-053-016的第一和第二序列可以分别是特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-010,FS22-053-011,FS22-053-012,和FS22-053-016的CH3结构域的14和17位,以及92和99位之间的序列。

[0256] 特异性结合成员FS22-053-015的第一和第二序列可替代地可以分别是特异性结合成员FS22-053-015的CH3结构域的14和17位,以及92和98位之间的序列。

[0257] 特异性结合成员的CD环序列优选是未修饰的,即野生型。因此,CD环序列优选具有SEQ ID NO:2所示的序列。CD环序列优选位于特异性结合成员的CH3结构域的43至78位。

[0258] 第一序列和第二序列可以是分别为特异性结合成员FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005,FS22-172-006,FS22-172,FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017,FS22-053-014,FS22-053-010,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-015,FS22-053-016,或FS22-053的完整AB和EF结构环序列。例如根据IMGT,IMGT外显子,EU或Kabat编号系统,确定CH3结构域序列中AB,CD和EF结构环的位置在技术人员的能力范围内,并在Hasenhindl等人,(2013)中进行了描述。在一个优选的实施方式中,根据IMGT编号系统的AB,CD和EF结构环分别位于特异性结合成员的CH3结构域的10和19、42和79以及91和102位之间。因此,在优选的实施方案中,第一,第二和第三序列是FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017,FS22-053-014,FS22-053-010,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-015,FS22-053-016,FS22-053,FS22-

172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005,FS22-172-006或FS22-172的CH3结构域的10和19、42和79以及91和102位之间的序列。

[0259] 在一个优选的实施方式中,特异性结合成员包括以下特异性结合成员的第一和/或第二序列,优选第一和第二序列:

[0260] (i)SEQ ID NO:141所示的FS22-172-003;

[0261] (ii)SEQ ID NO:132所示的FS22-172-002;

[0262] (iii)SEQ ID NO:150所示的FS22-172-004;

[0263] (iv)SEQ ID NO:123所示的FS22-172-001;

[0264] (v)SEQ ID NO:159所示的FS22-172-005;

[0265] (vi)SEQ ID NO:167所示的FS22-172-006;或

[0266] (vii)SEQ ID NO:114所示的FS22-172;其中第一和第二序列优选分别位于特异性结合成员的CH3结构域的14和17以及91和99位之间。

[0267] 在一个更优选的实施方式中,特异性结合成员包括以下特异性结合成员的第一和/或第二序列,优选第一和第二序列:

[0268] (i)SEQ ID NO:141所示的FS22-172-003;

[0269] (ii)SEQ ID NO:132所示的FS22-172-002;

[0270] (iii)SEQ ID NO:150所示的FS22-172-004;

[0271] (iv)SEQ ID NO:123所示的FS22-172-001;

[0272] (v)SEQ ID NO:159所示的FS22-172-005;或

[0273] (vi)SEQ ID NO:167所示的FS22-172-006。

[0274] 在又一个优选的实施方式中,特异性结合成员包括以下特异性结合成员的第一和/或第二序列,优选第一和第二序列:

[0275] (i)SEQ ID NO:141所示的FS22-172-003;

[0276] (ii)SEQ ID NO:132所示的FS22-172-002;或

[0277] (iii)SEQ ID NO:150所示的FS22-172-004。

[0278] 在一个更优选的实施方式中,特异性结合成员包括如SEQ ID NO:141所示的特异性结合成员FS22-172-003的第一和/或第二序列,优选第一和第二序列。

[0279] 在一个优选的实施方式中,特异性结合成员,特别是包含特异性结合成员FS22-172-006的第一和/或第二序列,优选第一和第二序列的特异性结合成员可以在该特异性结合成员的CH3结构域的19位包含亮氨酸(L)。

[0280] 在一个替代的优选实施方式中,特异性结合成员包括以下特异性结合成员的第一和/或第二序列,优选第一和第二序列:

[0281] (i)SEQ ID NO:23所示的FS22-053-008;

[0282] (ii)SEQ ID NO:32所示的FS22-053-009;

[0283] (iii)SEQ ID NO:50所示的FS22-053-011;

[0284] (iv)SEQ ID NO:104所示的FS22-053-017;

[0285] (v)SEQ ID NO:77所示的FS22-053-014;

[0286] (vi)SEQ ID NO:41所示的FS22-053-010;

[0287] (vii)SEQ ID NO:59所示的FS22-053-012;



- [0288] (viii)SEQ ID NO:68所示的FS22-053-013;
- [0289] (ix)SEQ ID NO:86所示的FS22-053-015;
- [0290] (x)SEQ ID NO:95所示的FS22-053-016;或
- [0291] (xi)SEQ ID NO:15所示的FS22-053;其中第一和第二序列优选分别位于特异性结合成员的CH3结构域的14和17以及91和99位之间。
- [0292] 在一个更优选的实施方式中,特异性结合成员包括以下特异性结合成员的第一和/或第二序列,优选第一和第二序列:
- [0293] (i)SEQ ID NO:23所示的FS22-053-008;
- [0294] (ii)SEQ ID NO:32所示的FS22-053-009;
- [0295] (iii)SEQ ID NO:50所示的FS22-053-011;
- [0296] (iv)SEQ ID NO:104所示的FS22-053-017;或
- [0297] (v)SEQ ID NO:77所示的FS22-053-014。
- [0298] 在一个更优选的实施方案中,特异性结合成员包含以下特异性结合成员的CH3结构域的第一和/或第二序列,优选第一和第二序列:
- [0299] (i)SEQ ID NO:23所示的FS22-053-008;
- [0300] (ii)SEQ ID NO:32所示的FS22-053-009;
- [0301] (iii)SEQ ID NO:50所示的FS22-053-011;或
- [0302] (iv)SEQ ID NO:104所示的FS22-053-017。
- [0303] 在一个更优选的实施方式中,特异性结合成员包括如SEQ ID NO:23所示的特异性结合成员FS22-053-008的第一和/或第二序列,优选第一和第二序列。
- [0304] 作为IMGT编号的替代方法,可以根据IMGT外显子编号(也称为连续编号)、EU编号或Kabat编号,对氨基酸残基位置,包括本文所述的氨基酸序列、取代、缺失和插入位置进行编号。CH3结构域残基位置的IMGT编号,IMGT外显子编号,EU编号和Kabat编号之间的一致性显示在图1中。因此,例如,在本申请中涉及第一序列分别位于特异性结合成员的CH3结构域的14和17位之间,其中残基位置根据IMGT编号方案进行编号的,第一序列位于CH3结构域的18和21位之间,其中残基位置根据IMGT外显子编号方案编号,如图1所示。或者,如本文所述,CH3结构域中氨基酸残基的位置,包括氨基酸序列的位置,取代、缺失和插入的位置,可以参考它们在SEQ ID NO:4所列出的野生型CH3结构域序列中的位置来定义。IMGT编号与野生型CH3结构域序列之间的一致性也显示在图1中。
- [0305] 在一个优选的实施方式中,特异性结合成员包含CH3结构域,该CH3结构域包含,具有或由特异性结合成员FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005,FS22-172-006,或FS22-172的CH3结构域序列组成,优选特异性结合成员FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005,或FS22-172-006的CH3结构域序列,更优选特异性结合成员FS22-172-003,FS22-172-002或FS22-172-004的CH3结构域序列,最优选特异性结合成员FS22-172-003的CH3结构域序列。
- [0306] 在一个替代的优选实施方式中,特异性结合成员包含CH3结构域,其包含,具有或由特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017,FS22-053-014,FS22-053-010,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-015,FS22-053-016或FS22-053的CH3结构域序列组成,优选特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-

011,FS22-053-017或FS22-053-014的CH3结构域序列,更优选特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011或FS22-053-017的CH3结构域序列,最优选特异性结合成员FS22-053-008的CH3结构域序列。

[0307] 特异性结合成员的CH3结构域可任选地在CH3结构域序列的直接C末端包含另外的赖氨酸残基(K)。

[0308] 可以采用单克隆抗体和其他抗体,并使用重组DNA技术的技术来生产保留原始抗体特异性的其他抗体或嵌合分子。这种的技术可以涉及将CDR或可变区引入不同的免疫球蛋白中。例如在EP-A-184187,GB 2188638A和EP-A-239400中描述了将一种免疫球蛋白的CDR引入另一种免疫球蛋白的方法。可以采用类似的技术将组成根据本发明的特异性结合成员的CD137抗原结合位点的恒定结构域序列引入恒定结构域中,例如,另一个特异性结合成员的CH3结构域,从而导致在其恒定结构域中包含CD137抗原结合位点的特异性结合成员。或者,可以用根据本发明的特异性结合成员的恒定结构域序列替换特异性结合成员的整个恒定结构域序列,以制备在其恒定结构域中包含CD137抗原结合位点的特异性结合成员。类似地,可以用包含CD137抗原结合位点的根据本发明的特异性结合成员的恒定结构域序列的相应片段替换特异性结合成员的恒定结构域序列的片段。

[0309] 特异性结合成员的CH2结构域可包含减少或消除CH2结构域与一种或多种Fc $\gamma$ 受体(例如Fc $\gamma$ RI,Fc $\gamma$ RIIa,Fc $\gamma$ RIIb,Fc $\gamma$ RIII和/或互补)结合的一种或多种突变。发明人假定减少或消除与Fc $\gamma$ 受体的结合将减少或消除由特异性结合成员介导的ADCC。类似地,预期减少或消除与补体的结合将减少或消除由特异性结合成员介导的CDC。减少或消除CH2结构域与一种或多种Fc $\gamma$ 受体和/或补体结合的突变是本领域已知的(Wang等人,2018)。这些突变包括在Bruhns等人,2009和Hezareh等人,2001中描述的“LALA突变”,该突变涉及用丙氨酸取代CH2结构域1.3和1.2位的亮氨酸残基(L1.3A和L1.2A)。或者,通过保守的N-联糖基化位点的突变产生无糖基抗体(通过将CH2结构域84.4位的天冬酰胺(N)突变为丙氨酸、甘氨酸或谷氨酰胺(N84.4A、N84.4G或N84.4Q))以降低IgG1效应子功能也是已知的(Wang等人,2018)。作为另一种选择,已知补体激活(C1q结合)和ADCC可通过将CH2结构域的114位脯氨酸突变为丙氨酸或甘氨酸(P114A或P114G)而降低(Idusogie等人,2000;Klein等人,2016)。也可以组合这些突变以产生具有进一步降低的或没有ADCC或CDC活性的特异性结合成员。

[0310] 因此,特异性结合成员可包含CH2结构域,其中CH2结构域优选包含:

[0311] (i) 1.3和1.2位的丙氨酸残基;和/或

[0312] (ii) 114位的丙氨酸或甘氨酸;和/或

[0313] (iii) 84.4位的丙氨酸、谷氨酰胺或甘氨酸;

[0314] 其中氨基酸残基编号根据IMGT编号方案。

[0315] 在一个优选的实施方式中,特异性结合成员包含CH2结构域,其中CH2结构域优选包含:

[0316] (i) 1.3和1.2位的丙氨酸残基;和/或

[0317] (ii) 114位的丙氨酸或甘氨酸;

[0318] 其中氨基酸残基编号根据IMGT编号方案。

[0319] 在另一个优选的实施方式中,特异性结合成员包含CH2结构域,其中CH2结构域包含:

- [0320] (i) 1.3位的丙氨酸残基;和
- [0321] (ii) 1.2位的丙氨酸残基;
- [0322] 其中氨基酸残基编号根据IMGT编号方案。
- [0323] 例如,CH2结构域可以具有SEQ ID NO:6所列出的序列。[LALA]
- [0324] 在一个替代的优选实施方式中,特异性结合成员包含CH2结构域,其中CH2结构域包括:
- [0325] (i) 1.3位的丙氨酸残基;
- [0326] (ii) 1.2位的丙氨酸残基;和
- [0327] (iii) 114位的丙氨酸;
- [0328] 其中氨基酸残基编号根据IMGT编号方案。
- [0329] 例如,CH2结构域可以具有SEQ ID NO:5所列出的序列。[LALA-PA]
- [0330] 在一个优选的实施方式中,所述特异性结合成员包含,具有或由特异性结合成员FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005,FS22-172-006,或FS22-172的CH2和CH3结构域序列组成,优选特异性结合成员FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005或FS22-172-006的CH2和CH3结构域序列,更优选特异结合成员FS22-172-003,FS22-172-002或FS22-172-004的CH2和CH3结构域序列,最优选特异性结合成员FS22-172-003的CH2和CH3结构域序列,其中特异性结合成员FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005,FS22-172-006和FS22-172的CH2和CH3结构域序列分别显示在SEQ ID NO:141、132、150、123、159、167和114中,从7号氨基酸开始。
- [0331] 在一个替代的优选实施方式中,所述特异性结合成员包含,具有或由特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017,FS22-053-014,FS22-053-010,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-015,FS22-053-016或FS22-053的CH2和CH3结构域序列组成,优选特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017或FS22-053-014的CH2和CH3结构域序列,更优选特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011或FS22-053-017的CH2和CH3结构域序列,最优选特异性结合成员FS22-053-008的CH2和CH3结构域序列,其中特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017,FS22-053-014,FS22-053-010,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-015,FS22-053-016和FS22-053的CH2和CH3结构域序列分别显示在SEQ ID NO:23、32、50、104、77、41、59、68、86、95和15中,从7号氨基酸开始。
- [0332] 在一个替代的优选实施方式中,所述特异性结合成员包含,具有或由特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017,FS22-053-014,FS22-053-010,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-015,FS22-053-016或FS22-053的序列组成,优选特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017或FS22-053-014的序列,更优选特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011或FS22-053-017的序列,最优选特异性结合成员FS22-053-008的序列,其中特异性结合成员FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017,FS22-053-014,FS22-053-010,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-015,FS22-053-016和FS22-053的序列分别在SEQ ID NO:23、32、50、104、77、41、59、68、86、95和15中列出。

[0333] 在一个优选的实施方式中,除了位于特异性结合成员恒定结构域中的CD137抗原结合位点之外,特异性结合成员还可包含与一个或多个另外的抗原结合的一个或多个另外的抗原结合位点。所述一个或多个另外的抗原结合位点优选特异性地结合其同源抗原。

[0334] 所述一个或多个另外的抗原结合位点可以结合CD137或另一种抗原。因此,特异性结合成员可以是多特异性分子,例如双特异性、三特异性或四特异性分子,优选双特异性分子。在一个优选的实施方式中,特异性结合成员能够同时结合CD137和一种或多种其他抗原。

[0335] 已知抗体分子具有包含离散结构域的模块化结构,该结构域可以以多种不同方式组合以产生多特异性,例如双特异性、三特异性或四特异性抗体形式。示例性的多特异性抗体形式在例如Spiess等人(2015)和Kontermann(2012)中描述。本发明的特异性结合成员可以以这种多特异性抗体形式使用。这具有通过在抗原结合位点恒定结构域(例如特异性结合成员的CH3结构域)的存在下将另外的抗原结合位点引入这种多特异性抗体形式的附加优点。

[0336] 例如,本发明的特异性结合成员可以是异二聚抗体分子,例如异二聚完整免疫球蛋白分子或其片段。在这种情况下,抗体分子的一部分将具有本文所述的一个或多个序列。例如,在本发明的特异性结合成员是双特异性异二聚抗体分子的情况下,该特异性结合成员可以包含含有如本文所述的CH3结构域的重链,该重链与结合除CD137以外的抗原的重链配对。制备异源二聚体抗体的技术是本领域已知的,包括旋钮入孔(KIHs)技术,该技术涉及对抗体分子的CH3结构域进行改造以产生“旋钮”或“孔”以促进链异二聚化。或者,可以通过将电荷对引入抗体分子中来制备异二聚抗体,以避免由于静电排斥而使CH3结构域同源二聚化,并通过静电吸引来指导异源二聚化。异二聚体抗体形式的实例包括CrossMab、mAb-Fv、SEED抗体和KIH IgG。

[0337] 或者,本发明的多特异性特异性结合成员可包含完整的免疫球蛋白分子或其片段以及额外的一个或多个抗原结合部分。抗原结合部分可以例如是Fv、scFv或单结构域抗体,并且可以与完整的免疫球蛋白分子或其片段融合。包含与完整免疫球蛋白分子融合的其他抗原结合部分的多特异性抗体分子的例子包括DVD-IgG、DVI-IgG、scFv4-IgG、IgG-scFv和scFv-IgG分子(Spiess等人,2015年;图1)。包含与包含CH3域的免疫球蛋白片段融合的其他抗原结合部分的多特异性抗体分子的实例包括例如scDiabody-CH3、Diabody-CH3和scFv-CH3 KIH(Spiess等人,2015;图1)。

[0338] 其他合适的多特异性形式对于技术人员将是显而易见的。

[0339] 在一个优选的实施方式中,特异性结合成员包含结合第二抗原的第二抗原结合位点,其中第二抗原结合位点优选是基于CDR的抗原结合位点。基于CDR的抗原结合位点是抗体可变区中的抗原结合位点。基于CDR的抗原结合位点是由六个CDR组成的;三个轻链可变域(VL)CDR和三个重链可变域(VH)CDR。

[0340] 针对给定抗原的抗体分子的制备以及此类抗体分子的CDR序列的确定是众所周知的,并且许多合适的技术是本领域已知的。CDR序列可以例如根据Kabat等人,1991或国际ImMunoGeneTics信息系统(IMG) (Lefranc等人,2015)确定。

[0341] 例如,特异性结合成员可以是mAb<sup>2</sup>(TM)双特异性抗体。如本文所指,mAb<sup>2</sup>双特异性抗体是IgG免疫球蛋白,其在它的每个可变区中包括基于CDR的抗原结合位点,并且在恒定

域中包括至少一个抗原结合位点。当本发明的特异性结合成员是mAb<sup>2</sup>形式时,除了在特异性结合成员的恒定结构域中的CD137抗原结合位点之外,该特异性结合成员由此还在其每个可变区中包含基于CDR的抗原结合位点。

[0342] 抗原结合位点的三个VH结构域CDR可以位于免疫球蛋白VH结构域内,并且三个VL结构域CDR可以位于免疫球蛋白VL结构域内。例如,基于CDR的抗原结合位点可以位于抗体可变区中。

[0343] 特异性结合成员可具有第二抗原的一个或优选多于一个,例如两个,基于CDR的抗原结合位点。因此,特异性结合成员可包含一个VH和一个VL结构域,但优选包含两个VH和两个VL结构域,即两个VH/VL结构域对,如天然存在的IgG分子的情况。

[0344] 在一些优选的实施方式中,特异性结合成员可以是包含两个可变区的免疫球蛋白,每个可变区包含第二抗原的基于CDR的抗原结合位点。

[0345] 在一个优选的实施方式中,所述抗体因此是结合CD137和第二抗原的抗体分子,所述抗体分子包含:

[0346] (i) 位于抗体分子的两个CH3结构域中的CD137的两个抗原结合位点;和

[0347] (ii) 第二抗原的两个基于CDR的抗原结合位点,每个由免疫球蛋白VH结构域和免疫球蛋白VL结构域形成。

[0348] 在一个更优选的实施方式中,所述抗体是完整的免疫球蛋白分子,例如,完整的IgG1分子,其与CD137和第二抗原结合,所述抗体分子包含:

[0349] (i) 位于抗体分子的两个CH3结构域中的CD137的两个抗原结合位点;和

[0350] (ii) 第二抗原的两个基于CDR的抗原结合位点,每个由免疫球蛋白VH结构域和免疫球蛋白VL结构域形成;和

[0351] 其中免疫球蛋白分子进一步包含CH1、CH2和CL结构域。

[0352] CD137的激活需要CD137在免疫细胞表面上聚集,例如T细胞表面,进而刺激细胞内信号通路和免疫细胞活化。在不存在特异性结合成员的交联的情况下,特异性结合成员与免疫细胞表面上的CD137的结合可能不会导致CD137聚集,因此可能不会导致免疫细胞活化。

[0353] 本发明人已经表明,在不存在特异性结合成员的交联的情况下,FS22-53和FS22-172谱系的特异性结合成员不会引起T细胞活化(参见实施例5)。

[0354] 如上所述,通过与Fcγ受体结合而使抗体分子交联既效率低下又不能靶向于特定的位置,例如,疾病的位置,因为在整个人体中都存在表达Fcγ受体的细胞。因此,由第二抗原结合位点结合的第二抗原优选不是Fcγ受体。

[0355] 在优选的实施方案中,本发明的特异性结合成员因此包含结合第二抗原的第二抗原结合位点,其中第二抗原能够结合并交联多个特异性结合成员。

[0356] 例如,本发明人已经表明,当第二抗原是多聚体分子时,特异性结合成员与第二抗原的结合导致或增强T细胞活化。因此,第二抗原优选是多聚体抗原,例如二聚体、三聚体或更高阶的多聚体,并因此能够交联几个特异性结合成员。

[0357] 本发明人还显示了使用CD137/第二抗原mAb<sup>2</sup>分子,其中第二抗原是表面抗原,例如细胞表面抗原,其可以是单体或多聚体,并且以高浓度存在和/或聚集在表面,例如在细胞表面,抗体分子与第二抗原的结合导致或增强T细胞活化。不希望受到理论的束缚,据认

为例如抗体分子与丰富的细胞表面抗原的结合,导致高浓度的抗体分子结合在细胞表面,这使抗体分子足够紧密地靠近,能够驱动CD137聚集和免疫细胞活化。因此,在一个优选的实施方式中,第二抗原是表面抗原,其以高浓度在表面例如细胞表面上表达。

[0358] 包含第二抗原结合位点的特异性结合成员,该第二抗原结合位点结合本文所述的第二抗原,并且仅在结合第二抗原时才激活免疫细胞,例如T细胞,或者在结合到第二抗原时增强其免疫细胞激活活性,也称为条件激动剂。这种与第二种抗原结合的免疫细胞活化活性独立于特异性结合成员与Fc $\gamma$ 受体和/或外部交联剂(如蛋白A或G或第二抗体)的结合,因此允许特异性结合成员靶向存在第二抗原的位点的条件激动剂活性。例如,在第二抗原是疾病抗原的情况下,特异性结合成员可以在疾病的部位而不是个体的其他部位选择性地激活免疫细胞。

[0359] 另外,仅依赖于与第二抗原结合而活化免疫细胞(例如T细胞)的特异性结合成员与依赖于通过其他机制(例如外部交联剂或通过Fc $\gamma$ 受体相互作用进行交联)进行交联的特异性结合成员相比,优选具有增加的免疫细胞激活活性。因为CD137的激活是更有效的,所以相对于其他特异性结合成员,可以在较低浓度的本文描述的特异性结合成员下实现免疫细胞的激活。

[0360] 因此,本发明的特异性结合成员优选地在特异性结合成员被交联(例如通过与第二抗原结合)时诱导增强的免疫细胞活化,例如T细胞的活化,而不是未与特异性结合成员交联时。

[0361] 抗体分子或特异性结合成员激活T细胞的能力可以使用T细胞活化实验来测量。T细胞在激活时释放IL-2。因此,T细胞活化实验可以测量IL-2的释放,以确定抗体分子或特异性结合成员诱导的T细胞活化的水平。

[0362] 例如,抗体分子或特异性结合成员激活T细胞的能力可以通过测量在特异性结合成员或抗体分子交联时,T细胞活化实验中T细胞实现IL-2的半数最大释放所需的抗体分子或特异性结合成员的浓度来确定。以下将其称为抗体分子或特异性结合成员的EC<sub>50</sub>。较低的EC<sub>50</sub>表示,在T细胞活化实验中实现T细胞的IL-2的半数最大释放需要较低浓度的抗体分子或特异性结合成员,因此该抗体分子或特异性结合成员具有较高的T细胞活化活性。例如,可以使用抗CH2抗体使特异性结合成员或抗体分子交联。

[0363] 在一个优选的实施方式中,抗体分子或特异性结合成员在T细胞活化实验中的EC<sub>50</sub>是在同一测定法中FS22-172-003/He1D1.3(包含LALA突变)的EC<sub>50</sub>的10倍、5倍、4倍、3倍或2倍以内,其中FS22-172-003/He1D1.3(LALA)包含或由SEQ ID NO:145所示的重链和SEQ ID NO:173所示的轻链组成。

[0364] 在一个优选的实施方式中,抗体分子或特异性结合成员在T细胞活化实验中的EC<sub>50</sub>是在同一测定法中FS22-053-008/He1D1.3(包含LALA突变)的EC<sub>50</sub>的10倍、5倍、4倍、3倍、或2倍以内,其中FS22-053-008/He1D1.3(LALA)包含或由SEQ ID NO:27所示的重链和SEQ ID NO:173所示的轻链组成。

[0365] 例如,抗体分子或特异性结合成员在T细胞活化实验中的EC<sub>50</sub>可以为5nM或以下,4nM或以下,3nM或以下,2nM或以下,1nM或以下,或0.5nM或以下。

[0366] 另外或可替代地,抗体分子或特异性结合成员激活T细胞的能力可以通过在存在抗体分子或特异性结合成员的情况下在T细胞活化实验中测量由T细胞释放的最大IL-2浓

度来确定,其中抗体分子或特异性结合成员是交联的。

[0367] 在一个优选的实施方式中,在存在交联的情况下,在存在抗体分子或特异性结合成员的情况下,在T细胞活化测定中由T细胞释放的IL-2的最大浓度是在存在FS22-053-008/He1D1.3 (包含LALA突变) 或FS22-172-003/He1D1.3 (包含LALA突变) 的情况下T细胞释放的IL-2最大浓度的3倍、2倍或1.5倍之内。

[0368] T细胞活化实验可以是如本文所述的T细胞实验,例如如本实施例中所所述的CD8+T细胞实验,参见例如实施例5.4。

[0369] 例如,T细胞活化实验可以是基于从人外周血单核细胞(PBMC)分离的CD8+T细胞的IL-2释放测定。例如,T细胞活化实验可包括从白细胞耗竭锥(leucocyte depletion cones)分离人PBMC。分离PBMC的方法是本领域已知的,并在本实施例中描述。然后可以从PBMC中分离出CD8+T细胞。从PBMC中分离CD8+T细胞的方法是本领域已知的,并在本实施例中描述。

[0370] 然后可以将CD8+T细胞添加到包被有抗人CD3抗体的板中。可以制备每种测试抗体分子或特异性结合成员的合适的稀释液,并将其添加至孔中。然后可以将T细胞与测试抗体在37°C, 5%CO<sub>2</sub>中孵育24小时。可以收集上清液并进行测定以确定上清液中IL-2的浓度。用于确定溶液中IL-2浓度的方法是本领域已知的,并且在本实施例中进行了描述。可以将人IL-2的浓度相对抗体分子或特异性结合成员的对数浓度作图。可以使用对数(激动剂)相对对响应方程拟合得到结果曲线。

[0371] 被特异性结合成员的第二抗原结合位点结合的第二抗原可以是免疫细胞抗原或疾病抗原。疾病抗原包括致病性抗原和肿瘤抗原。

[0372] 被特异性结合成员结合的免疫细胞抗原可以存在于与CD137相同或不同的免疫细胞上。

[0373] 免疫细胞抗原可以是CD137以外的肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的成员。TNFRSF受体是膜结合的细胞因子受体,其包含结合肿瘤坏死因子超家族(TNFSF)的一个或多个配体的细胞外富含半胱氨酸的结构域。

[0374] TNFRSF受体可以位于免疫细胞的表面上。在结合TNFRSF配体后,TNFRSF受体在免疫细胞表面上形成簇,从而激活免疫细胞。例如,结合配体的TNFRSF受体可以形成多聚体(例如三聚体),或多聚体簇。配体结合的TNFRSF受体簇的存在刺激了激活免疫细胞的细胞内信号传导途径。

[0375] 不希望被理论所束缚,认为通过与免疫细胞表面上的CD137和第二TNFRSF受体结合,特异性结合成员将引起CD137和第二TNFRSF受体聚集并激活免疫细胞。换句话说,当两个靶标都被结合时,特异性结合成员将充当TNFRSF受体激动剂。

[0376] TNFRSF受体包括CD27、CD40、EDA2R、EDAR、FAS、LTBR、RELT、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF4、TNFRSF6B、TNFRSF8、TNFRSF10A-10D、TNFRSF11A、TNFRSF11B、TNFRSF12A、TNFRSF13B、TNFRSF13C、TNFRSF14、TNFRSF17、TNFRSF18、TNFRSF19、TNFRSF21和TNFRSF25。

[0377] CD27(TNFRSF7:基因ID 939)具有NP\_001233.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001242.4的参考核苷酸序列编码。CD40(TNFRSF5:基因ID 958)具有NP\_001241.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001250.5的参考核苷酸序列编码。EDA2R(TNFRSF27:基因ID 60401)具有NP\_001186616.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001199687.2的参考核苷

酸序列编码。EDAR (基因ID 10913) 具有NP\_071731.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_022336.3的参考核苷酸序列编码。FAS (TNFRSF6; 基因ID 355) 具有NP\_000034.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_000043.5的参考核苷酸序列编码。LTBR (TNFRSF3; 基因ID 4055) 具有NP\_001257916.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001270987.1的参考核苷酸序列编码。RELT (TNFRSF19L; 基因ID 84957) 具有NP\_116260.2的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_032871.3的参考核苷酸序列编码。TNFRSF1A (基因ID 7132) 具有NP\_001056.1的参考氨基酸序列,并可以由NM\_001065.3的参考核苷酸序列编码。TNFRSF1B (基因ID 7133) 具有NP\_001057.1的参考氨基酸序列,并可以由NM\_001066.2的参考核苷酸序列编码。

[0378] TNFRSF4 (基因ID 7293) 具有NP\_003318的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_003327的参考核苷酸序列编码。TNFRSF6B (基因ID 8771) 具有NP\_003814.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_003823.3的参考核苷酸序列编码。TNFRSF8 (基因ID 943) 具有NP\_001234.3的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001243.4的参考核苷酸序列编码。TNFRSF10A (基因ID 8797) 具有NP\_003835.3的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_003844.3的参考核苷酸序列编码。TNFRSF10B (基因ID 8795) 具有NP\_003833.4的参考氨基酸序列,并可以由NM\_003842.4的参考核苷酸序列编码。TNFRSF10C (基因ID 8794) 具有NP\_003832.2的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_003841.4的参考核苷酸序列编码。TNFRSF10D (基因ID 8793) 具有NP\_003831.2的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_003840.4的参考核苷酸序列编码。TNFRSF11A (基因ID 8792) 具有XP\_011524547.1的参考氨基酸序列,并且可以由XM\_11526245.2的参考核苷酸序列编码。TNFRSF11B (基因ID 4982) 具有NP\_002537.3的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_002546.3的参考核苷酸序列编码。TNFRSF12A (基因ID 51330) 具有NP\_057723.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_016639.2的参考核苷酸序列编码。TNFRSF13B (基因ID 23495) 具有NP\_0036584.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_012452.2的参考核苷酸序列编码。TNFRSF13C (基因ID 115650) 具有NP\_443177.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_052945.3的参考核苷酸序列编码。TNFRSF14 (基因ID 8764) 具有NP\_001284534.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001297605.1的参考核苷酸序列编码。TNFRSF17 (基因ID 608) 具有NP\_001183.2的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001192.2的参考核苷酸序列编码。TNFRSF18 (基因ID 8784) 具有NP\_004195.2的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_004186.1的参考核苷酸序列编码。TNFRSF19 (基因ID 55504) 具有NP\_001191387.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001204458.1的参考核苷酸序列编码。NFRSF21 (基因ID 27242) 具有NP\_055267.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_014452.4的参考核苷酸序列编码。TNFRSF25 (DR3; 基因ID 8718) 与配体TNFSF15 (TL1A) 结合,具有NP\_001034753.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001039664.1的参考核苷酸序列编码。

[0379] 或者,由第二抗原结合位点结合的免疫细胞抗原可以是在免疫系统中具有调节功能的分子,而不是TNFRSF成员,例如免疫共刺激分子或抑制性检查点分子。此类免疫调节分子的实例包括ICOS (CD278)、LAG3、PD1、PD-L1、PD-L2、B7H3、B7H4、CTLA4、TIGIT、BTLA、HVEM、T细胞免疫球蛋白、含3 (TIM-3) 的粘蛋白结构域、CD47、CD73、A2aR、CD200、CD200R、集落刺激因子1受体 (CSF-1R)、VISTA CD28、CD80、LLT1、galectin-9、NKG2A、NKG2D和KIR。

[0380] 存在免疫细胞抗原的免疫细胞可以属于任何免疫细胞亚群,可以是T细胞、肿瘤浸润性白细胞 (TIL)、骨髓谱系细胞 (例如抗原呈递细胞 (APC)、NK细胞和/或B细胞)。当免疫细



胞抗原是TNFRSF受体时,其上存在TNFRSF受体的免疫细胞优选是T细胞。

[0381] 或者,第二抗原结合位点可以与如上所述疾病抗原结合。不希望被理论所束缚,认为特异性结合成员与CD137和疾病抗原的结合将导致疾病附近的T细胞的活化。然后,活化的T细胞可以启动、促进或参与免疫应答,例如针对病原体或癌细胞的免疫应答。Chen和Mellman (2013) 提供了免疫系统在识别和消除癌细胞中的作用的综述。

[0382] 在一个优选的实施方式中,疾病抗原是肿瘤抗原。肿瘤抗原是主要存在于肿瘤环境中而不普遍存在于个体其他地方的抗原。例如,肿瘤抗原可以存在于肿瘤细胞的表面上或可以存在于肿瘤微环境的其他基质细胞上或存在于肿瘤附近的生物流体中。因此,肿瘤抗原是个体中肿瘤细胞位置的标志。

[0383] 在一些实施方式中,肿瘤抗原可以是位于癌细胞表面上的抗原。优选地,肿瘤抗原在肿瘤细胞上被上调或过表达,而在没有肿瘤的情况下,来自相同组织的相应的正常体细胞不会大量表达。

[0384] 在一些实施方式中,与在没有肿瘤的情况下的相应正常组织的基质细胞相比,在肿瘤微环境的基质细胞上肿瘤抗原被上调或过表达。

[0385] 优选的肿瘤抗原存在于细胞表面上并且没有被快速内在化。

[0386] 可以使用本领域已知的方法鉴定适合于被特异性结合成员靶向的肿瘤抗原。例如,可以将靶向CD137受体和肿瘤抗原的特异性结合成员用于测定中,其中将表达CD137的细胞与表达肿瘤抗原的细胞共培养并例如通过T细胞活化试验,增殖试验或细胞毒性试验来测量表达CD137的细胞的活化。

[0387] 细胞表面肿瘤抗原可以是肿瘤相关抗原 (TAA) 或肿瘤特异性抗原 (TSA)。

[0388] 癌细胞表达的肿瘤抗原可以包括,例如,由癌症生殖系基因编码的癌-睾丸 (CT) 抗原,例如MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、GAGE-I、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、BAGE-I、RAGE-1、LB33/MUM-1、PRAME、NAG、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (MAGE-B4)、MAGE-C1/CT7、MAGE-C2、NY-ESO-1、LAGE-1、SSX-1、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-3、SSX-4、SSX-5、SCP-1和XAGE及其免疫原性片段或变体 (Simpson等人,2005; Gure等人,2005; Velazquez等人,2007; Andrade等人,2008; Tinguely等人,2008; Napoletano等人,2008)。

[0389] 其他细胞表面肿瘤抗原包括,例如,AFP、 $\alpha_v\beta_3$  (玻连蛋白受体)、 $\alpha_v\beta_6$ , B细胞成熟剂 (BCMA)、CA125 (MUC16)、CD4、CD20、CD22、CD33、CD52、CD56、CD66e、CD80、CD140b、CD227 (MUC1)、EGFR (HER1)、EpCAM、GD3神经节苷脂、HER2、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、前列腺特异性抗原 (PSA)、CD5、CD19、CD21、CD25、CD37、CD30、CD33、CD45、HLA-DR、抗独特型癌胚性抗原 (CEA) (例如癌胚抗原相关细胞粘附分子5 (CEACAM5))、TAG-72、叶酸结合蛋白、A33、G250、铁蛋白、糖脂 (例如神经节苷脂)、碳水化合物 (例如CA-125)、IL-2受体、成纤维细胞活化蛋白 (FAP)、IGF1R、B7H3、B7H4、PD-L1、CD200、EphA2和间皮素或其变体。这些和其他细胞表面肿瘤抗原描述于Carter等人,2004; Scott和Renner,2001; 以及Cheever等人,2009; Tai和Anderson,2015; 以及Podojil和Miller,2017。

[0390] 其他肿瘤抗原包括由应激癌细胞采用的非AUG翻译起始机制产生的框外肽-MHC复合物 (Malarkannan等人,1999)。

[0391] 其他肿瘤抗原包括肿瘤细胞或肿瘤微环境细胞表面上的肽-MHC复合物,其中肽-MHC复合物包含突变的细胞内肿瘤抗原的肿瘤特异性新抗原肽片段,其中肽新抗原包含一个或多个肿瘤特异性突变(Gubin等人,2015)。其他肿瘤抗原是本领域众所周知的(参见例如W000/20581;癌症疫苗和免疫疗法(2000),Stern,Beverley和Carroll编辑,剑桥大学出版社,剑桥)。这些肿瘤抗原的序列很容易从公共数据库中获得,但也可以在W01992/020356A1、W01994/005304A1、W01994/023031A1、W01995/020974A1、W01995/023874A1和W01996/026214A1中找到。

[0392] 优选的肿瘤抗原包括HER2、FAP、EpCAM、CEACAM5、CD20、CD73、PSMA、间皮素、EphA2、IGF1R、CD200、 $\alpha\beta_6$ 、BCMA、PD-L1、B7H3、B7H4和EGFR。

[0393] 在一个更优选的实施方式中,肿瘤抗原是间皮素(MSLN)。

[0394] 在另一个更优选的实施方式中,肿瘤抗原是PD-L1。

[0395] HER2(ERBB2;基因ID 2064)可以具有NP\_001005862.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001005862.2的参考核苷酸序列编码。FAP(基因ID 2191)可以具有NP\_001278736.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001291807.1的参考核苷酸序列编码。EpCAM(基因ID 4072)可以具有NP\_002345.2的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_002354.2的参考核苷酸序列编码。

[0396] CEACAM5(基因ID 1048)可以具有NP\_001278413.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001291484.2的参考核苷酸序列编码。CD20(MS4A1;基因ID 931)可以具有NP\_068769.2的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_021950.3的参考核苷酸序列编码。CD73(NT5E;基因ID 4907)可以具有NP\_001191742.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001204813.1的参考核苷酸序列编码。PSMA(FOLH1;基因ID 2346)可以具有NP\_001014986.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001014986.1的参考核苷酸序列编码。间皮素(MSLN;基因ID 10232)可以具有NP\_001170826.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001177355.2的参考核苷酸序列编码。EphA2(基因ID 1969)可以具有NP\_001316019.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001329090.1的参考核苷酸序列编码。IGF1R(基因ID 3480)可以具有NP\_000866.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_000875.4的参考核苷酸序列编码。CD200(基因ID 4345)可以具有NP\_001004196.2的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001004196.3的参考核苷酸序列编码。 $\alpha\beta_6$ 是由整联蛋白亚基 $\alpha V$ 和整联蛋白亚基 $\beta 6$ 组成的异源二聚体。整联蛋白亚基 $\alpha V$ (ITGAV;基因ID 3685)可以具有NP\_001138471.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001144999.2的参考核苷酸序列编码。整联蛋白亚基 $\beta 6$ (ITGB6;基因ID 3694)可以具有NP\_000879.2的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_000888.4的参考核苷酸序列编码。BCMA(TNFRSF17;基因ID 608)可以具有NP\_001183.2的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001192.2的参考核苷酸序列编码。PD-L1(CD274;基因ID 29126)可以具有NP\_001254635.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001267706.1的参考核苷酸序列编码。B7H3(CD276;基因ID 80381)可以具有NP\_001019907.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001024736.1的参考核苷酸序列编码。B7H4(VTCN1;基因ID 79679)可以具有NP\_001240778.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001253849.1的参考核苷酸序列编码。EGFR(基因ID 1956)可以具有NP\_001333826.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001346897.1的参考核苷酸序列编码。

[0397] 在其他实施方式中,肿瘤抗原可以是可溶性肿瘤抗原,例如由癌细胞产生或对癌

细胞响应的生长因子。可溶性因子可能在肿瘤附近的生物体液中上调或过表达。可溶性肿瘤抗原可以是多聚体,例如二聚体或三聚体。可溶性肿瘤抗原在肿瘤部位或肿瘤微环境中的浓度可能高于个体体内其他部位。肿瘤微环境和相关的可溶性肿瘤抗原在Bhome等人,(2015)中有更详细的描述。

[0398] 合适的可溶性肿瘤抗原包括VEGF、HGF、SDF1和TGF- $\beta$ ,例如TGF- $\beta$ -1、TGF- $\beta$ -2、TGF- $\beta$ -3和TGF- $\beta$ -4。

[0399] VEGF (VEGFA; 基因ID 7422) 具有NP\_001020537.2的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001025366.2的参考核苷酸序列编码。HGF (基因ID 3082) 具有NP\_000592.3的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_000601.5的参考核苷酸序列编码。SDF1 (CXCL12; 基因ID 6387) 具有NP\_000600.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_000609.6的参考核苷酸序列编码。TGF- $\beta$ -1 (TGFB1; 基因ID 7040) 可以具有NP\_000651.3的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_000660.6的参考核苷酸序列编码。TGF- $\beta$ -2 (TGFB2; 基因ID 7042) 可以具有NP\_001129071.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001135599.3的参考核苷酸序列编码。TGF- $\beta$ -3 (TGFB3; 基因ID 7043) 可以具有NP\_001316867.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001329938.1的参考核苷酸序列编码。TGF- $\beta$ -4 (LEFTY2; 基因ID 7044) 可以具有NP\_001165896.1的参考氨基酸序列,并且可以由NM\_001172425.2的参考核苷酸序列编码。

[0400] 在另一个优选的实施方式中,疾病抗原是病原性抗原。

[0401] 免疫细胞,例如T细胞、NK细胞和/或巨噬细胞在感染性疾病部位附近由特异性结合成员的活化预期可用于治疗感染性疾病。感染性疾病可以是急性或持续性感染性疾病,但优选是持续性感染性疾病。

[0402] 病原性抗原优选是由人病原体表达的抗原,例如病毒、细菌、真菌或寄生虫抗原(例如原生动物抗原),优选病毒或细菌抗原。病原性抗原是主要存在于病原体上或感染性疾病部位附近的抗原,而不是普遍存在于个体的其他部位的抗原。

[0403] 例如,病原性抗原可以是存在于病毒、细菌、真菌或寄生虫的表面上的抗原,或者是由病毒、细菌、真菌或寄生虫表达的可溶性抗原。病毒、细菌、真菌或寄生虫可以是本文其他部分提到的病毒、细菌、真菌或寄生虫。

[0404] 在病原性抗原是可溶性抗原的情况下,所述抗原可能在感染性疾病部位附近的生物体液中上调或过表达。例如,可溶性病原性抗原可以在感染性疾病的部位或附近以比个体体内其他部位更高的浓度存在。可溶性病原性抗原可以是多聚体,例如二聚体或三聚体。

[0405] 可以使用本领域已知的方法鉴定适合于被特异性结合成员靶向的病原性抗原。例如,靶向CD137和病原性抗原的特异性结合成员可以用于测定中,其中将表达CD137的细胞与病原体或病原性抗原共培养并通过例如T细胞活化试验,增殖试验或细胞毒性试验来测量表达OX40的细胞的活化。

[0406] 适合于被特异性结合成员靶向的许多病原性抗原在本领域中是进一步已知的,并且可以由技术人员根据待治疗的感染性疾病来选择。病毒抗原的实例包括由人免疫缺陷病毒(HIV)表达的蛋白p24、gp120和gp41,由乙肝病毒(HBV)表达的乙肝表面抗原(HBsAg)以及由流感病毒表达的血凝素和神经氨酸酶。细菌抗原的实例包括结核分枝杆菌表达的Rv1733、Rv2389和Rv2435n。

[0407] 特异性结合成员还可以包含如本文所述的第一或第二序列,AB CD或EF结构环序

列,CH3结构域,CH2结构域,Fcab,CDR,VH结构域,VL结构域,轻链和/或重链序列的变体。合适的变体可以通过序列改变或突变以及筛选的方法获得。在一个优选的实施方式中,包含一个或多个变体序列的特异性结合成员保留了亲本特异性结合成员的一个或多个功能特征,例如对CD137的结合特异性和/或结合亲和力。例如,包含一个或多个变体序列的特异性结合成员优选以与(亲本)特异性结合成员相同或更高的亲和力结合CD137。亲本特异性结合成员是不包含已被并入变体特异性结合成员中的氨基酸取代、缺失和/或插入的特异性结合成员。

[0408] 例如,特异性结合成员可包含与本文公开的第一、第二或第三序列,AB、CD或EF结构环序列,CH3结构域,CH2结构域,Fcab,CDR,VH结构域,VL结构域,轻链或重链序列具有至少有70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99与序列的%,至少99.1%,至少99.2%,至少99.3%,至少99.4%,至少99.5%,至少99.6%,至少99.7%,至少99.8%或至少99.9%的序列同一性的第一、第二或第三序列,AB、CD或EF结构环序列,CH3结构域,CH2结构域,Fcab,CDR,VH结构域,VL结构域,轻链和/或重链序列。

[0409] 在一个优选的实施方式中,特异性结合成员具有或包含CH3结构域序列,其与SEQ ID NO:21、30、48、102、75、39、57、66、84、93、175、139、130、148、121、157、165或112所示的CH3结构域序列具有至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%,至少99.1%,至少99.2%,至少99.3%,至少99.4%,至少99.5%,至少99.6%,至少99.7%,至少99.8%或至少99.9%的序列同一性,优选至少99%,至少99.1%,至少99.2%,至少99.3%,至少99.4%,至少99.5%,至少99.6%,至少99.7%,至少99.8%或至少99.9%的序列同一性。

[0410] 在另一个优选的实施方式中,特异性结合成员具有或包含CH2结构域序列,其与SEQ ID NO:5或6所示的CH2结构域序列具有至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%,至少99.1%,至少99.2%,至少99.3%,至少99.4%,至少99.5%,至少99.6%,至少99.7%,至少99.8%或至少99.9%的序列同一性。

[0411] 在另一个优选的实施方式中,特异性结合成员具有、包含、或由以下序列组成:所述序列与SEQ ID NO:23、32、50、104、77、41、59、68、86、95、15、141、132、150、123、159、167、114、25、34、52、106、79、43、61、70、88、97、16、143、134、152、125、161、169、或116所示的Fcab序列具有至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%,至少99.1%,至少99.2%,至少99.3%,至少99.4%,至少99.5%,至少99.6%,至少99.7%,至少99.8%或至少99.9%的序列同一性。

[0412] 通常参考算法GAP(威斯康星州GCG软件包,Accelrys公司,美国圣地亚哥)来定义序列同一性。GAP使用Needleman和Wunsch算法比对两个完整序列,从而最大程度地增加匹配数并最大程度地减少缺口数。通常,使用缺口创建罚分等于12,缺口延伸罚分等于4的默认参数。可以优选使用GAP,但是可以使用其他算法,例如BLAST(使用Altschul等人,1990的方法),FASTA(使用Pearson和Lipman,1988的方法)或Smith-Waterman算法(Smith和Waterman,1981)或TBLASTN程序,参见Altschul等人,1990,同上,通常采用默认参数。特别地,可以使用psi-Blast算法。

[0413] 特异性结合成员可以包含第一、第二或第三序列,AB、CD或EF结构环序列,CH3结构域,CH2结构域,Fcab,CDR,VH结构域,VL结构域,轻链或重链,其与本文公开的第一、第二或

第三序列,AB、CD或EF结构环序列,CH3结构域,CH2结构域,Fcab,CDR,VH结构域,VL结构域,轻链或重链序列相比,具有一个或多个氨基酸序列改变(氨基酸残基的添加、缺失、取代和/或插入),优选20个或更少,15个或更少,10个或更少,5个或更少,4个或更少,3个或更少,2个或更少,或1个的改变。

[0414] 在一个优选的实施方式中,与SEQ ID NO:21、30、48、102、75、39、57、66、84、93、175、139、130、148、121、157、165或112列出的CH3结构域序列相比,特异性结合成员可以包含具有一个或多个氨基酸序列改变(氨基酸残基的添加、缺失、取代和/或插入),优选20个或更少,15个或更少,10个或更少,5个或更少,4个或更少,3个或更少,2个或更少,或1个的改变的CH3结构域序列。

[0415] 在另一个优选的实施方式中,与SEQ ID NO:5或6列出的CH2结构域相比,特异性结合成员包含具有一个或多个氨基酸序列改变(氨基酸残基的添加、缺失、取代和/或插入),优选20个或更少,15个或更少,10个或更少,5个或更少,4个或更少,3个或更少,2个或更少,或1个的改变的CH2结构域序列。

[0416] 在一个优选的实施方式中,特异性结合成员可以包含或由这样的序列组成,与SEQ ID NO:23、32、50、104、77、41、59、68、86、95、15、141、132、150、123、159、167、114、25、34、52、106、79、43、61、70、88、97、16、143、134、152、125、161、169、或116列出的Fcab序列相比,所述序列具有一个或多个氨基酸序列改变(氨基酸残基的添加、缺失、取代和/或插入),优选20个或更少,15个或更少,10个或更少,5个或更少,4个或更少,3个或更少,2个或更少,或1个的改变。

[0417] 当特异性结合成员包含本文公开的第一序列,AB结构环序列,CH3结构域,Fcab或重链序列的变体时,特异性结合成员优选将序列PPY保留在特异性结合成员的CH3结构域的11和19位之间,优选在15和17位之间。另外,特异性结合成员优选在特异性结合成员的CH3结构域的16和17位之间保留插入,优选5个氨基酸插入。在另一个优选的实施方式中,特异性结合成员优选地将该序列保留在特异性结合成员的CH3结构域的97和98位处。

[0418] 特别地,特异性结合成员可以是(或抗体分子可以包含)特异性结合成员FS22-053的变体,其中该变体:

[0419] (i) 与本文公开的特异性结合成员FS22-053的序列相比,包括一个或多个氨基酸序列改变(氨基酸残基的添加、缺失、取代和/或插入),优选20个或更少,15个或更少,10个或更少,5个或更少,4个或更少,3个或更少,2个或更少或1个改变;或

[0420] (ii) 与本文公开的特异性结合成员FS22-053的序列具有至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%至少99%,至少99.1%,至少99.2%,至少99.3%,至少99.4%,至少99.5%,至少99.6%,至少99.7%,至少99.8%或至少99.9%的序列同一性;和

[0421] 其中特异性结合成员或抗体分子在特异性结合成员或抗体分子的CH3结构域的15和17位之间包含序列PPY,并且任选地在16和17位之间包含5个氨基酸插入;并且

[0422] 其中残基编号是根据IMGT残基编号方案。

[0423] 另外,或可选地,当特异性结合成员包含本文公开的CH3结构域,CH2和CH3结构域,Fcab,轻链或重链序列的变体时,所述变体优选在位于特异性结合成员的CH3结构域的AB,CD和EF结构环中的第一,第二和第三序列中不包含任何氨基酸改变。例如,所述变体在特异

性结合成员的CH3结构域的AB、CD和EF结构环中可以不包含任何氨基酸改变。

[0424] 在一个或多个氨基酸被另一个氨基酸取代的优选实施方式中,取代可以是保守取代,例如根据下表的取代。在一些实施方式中,中间列中相同类别的氨基酸被彼此取代,即例如非极性氨基酸被另一非极性氨基酸取代。在一些实施方案中,最右边一列中同一行中的氨基酸被彼此取代。

[0425]	脂肪族	非极性	G A P
			I L V
	极性-不带电	极性-不带电	C S T M
			N Q
	极性-带电	极性-带电	D E
			K R
	芳香族		H F W Y

[0426] 在一些实施方式中,取代在功能上可以是保守的。即,在一些实施方式中,与等效的未取代的特异性结合成员相比,取代可能不影响(或可能基本上不影响)包含取代的特异性结合成员的一种或多种功能性质(例如结合亲和力)。

[0427] 还考虑了一种特异性结合成员,其包含位于该特异性结合成员的恒定结构域,优选CH3结构域中的CD137抗原结合位点,并且与本发明的特异性结合成员竞争结合CD137,或结合CD137上的与本发明的特异性结合成员相同的表位。用于确定两个特异性结合成员竞争抗原的方法是本领域已知的。例如,可以使用表面等离子共振,例如Biacore,来确定两个特异性结合成员与抗原的竞争结合。映射由特异性结合成员结合的表位的方法在本领域中是类似已知的。

[0428] 在一些实施方式中,特异性结合成员可以不包含基于CDR的抗原结合位点。

[0429] 特别地,特异性结合成员可以不包含结合PD-L1的基于CDR的抗原结合位点。

[0430] 此外,或可选的,特异性结合成员可以不包含结合间皮素 (MSLN) 的基于CDR的抗原结合位点。

[0431] 例如,特异性结合成员可以不包含结合PD-L1或MSLN的基于CDR的抗原结合位点,其中特异性结合成员包括位于特异性结合成员FS22-53-008或FS22-172-003的CH3结构域的AB、CD和EF结构环中的第一、第二和第三序列,特异性结合成员FS22-53-008或FS22-172-003的CH3结构域的完整AB和EF结构环序列,和/或特异性结合成员FS22-53-008或FS22-172-003的CH3结构域序列。

[0432] 特别地,特异性结合成员可以不包含如下所示的FS22-172-003-AA/E12v2和FS22-053-008-AA/E12v2的CDR、VH和/或VL结构域,和/或重链和/或轻链序列。

[0433] FS22-172-003-AA/E12v2和FS22-053-008-AA/E12v2 VH结构域CDR

[0434] HCDR1 (IMGT) GYPFTSYG

[0435] HCDR1 (Kabat) SYGIS

[0436] HCDR2 (IMGT) ISAYSGGT

[0437] HCDR2 (Kabat) WISAYSGGTNYAQLQG

- [0438] HCDR3 (IMGT) ARDLFPTIFGVSYYYY
- [0439] HCDR3 (Kabat) DLFPTIFGVSYYYY
- [0440] FS22-172-003-AA/E12v2和FS22-053-008-AA/E12v2 VH结构域  
EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYPFTSYG**ISWVRQAPGQG
- [0441] LEWMGW**ISAYSGGT**NYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS  
DDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSYYYY**WGQGLTVTVSS
- [0442] FS22-172-003-AA/E12v2和FS22-053-008-AA/E12v2 VL结构域CDR
- [0443] LCDR1 (IMGT) QSIGNR
- [0444] LCDR1 (Kabat) RASQSIGNRLA
- [0445] LCDR2 (IMGT) EAS
- [0446] LCDR2 (Kabat) EASTSET
- [0447] LCDR3 (IMGT) QQSYSTPYT
- [0448] LCDR3 (Kabat) QQSYSTPYT
- [0449] FS22-172-003-AA/E12v2和FS22-053-008-AA/E12v2 VL结构域  
DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRAS**QSIGNRL**AWYQHKGPKAPKL
- [0450] LIY**EAST**SETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC**QQSY**  
**STPYT**FGQGTKLEIK
- [0451] 重链FS22-172-003-AA/E12v2  
EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPFTSYGISWVRQAPGQG**LEWMGWISAYSGGT**NYAQK  
LQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSYYYY**WGQGLTVTVSSASTKGPS  
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
- [0452] SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AAG**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0453] 轻链FS22-172-003-AA/E12v2  
DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRAS**QSIGNRL**AWYQHKGPKAPKL**LIYEAST**SETGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC**QQSYSTPYT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
- [0454] SVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT  
HQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0455] 重链FS22-053-008-AA/E12v2

- EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCASGYPTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQK  
LQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFTIFGVSYYYYWGQGLVTVSSASTKGPS  
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  
[0456] SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  
VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*
- [0457] 轻链FS22-053-008-AA/E12v2  
*DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRASQSIGNRLAWYQHKPGKAPKLLIYEASTSETGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA  
[0458] SVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT  
HQLSSPVTKSFNREGC*
- [0459] 此外,或可选地,特异性结合成员可以不包含以下列出的抗MSLN抗体FS28-256-271的CDR和/或VH和/或VL结构域。
- [0460] FS28-256-271VH结构域CDR  
[0461] HCDR1 (AA) (IMGT) GFTFTHTY  
[0462] HCDR1 (AA) (Kabat) HTYMS  
[0463] HCDR2 (AA) (IMGT) ISPTYSTT  
[0464] HCDR2 (AA) (Kabat) AISPTYSTTNYADSVKG  
[0465] HCDR3 (AA) (IMGT) ARYNAYHAALDY  
[0466] HCDR3 (AA) (Kabat) YNAYHAALDY  
[0467] FS28-256-271VH结构域  
*EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFTHTYMSWVRQAPGKLEWVSNIISPTYSTTNYADS  
[0468] VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYNAYHAALDYWGQGLVTVSS*
- [0469] FS28-256-271VL结构域CDR  
[0470] LCDR1 (AA) (IMGT) QSVSSSY  
[0471] LCDR1 (AA) (Kabat) RASQSVSSSYLA  
[0472] LCDR2 (AA) (IMGT) GAS  
[0473] LCDR2 (AA) (Kabat) GASSRAT  
[0474] LCDR3 (AA) (IMGT) QQTVPYPYT  
[0475] LCDR3 (AA) (Kabat) QQTVPYPYT  
[0476] FS28-256-271 VL结构域  
*EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRF  
[0477] SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTVPYPYTFGQGTKVEIK*
- [0478] 特异性结合成员可以与生物活性分子或可检测标记物缀合。在这种情况下,特异性结合成员可以被称为缀合物。此类缀合物可用于治疗本文所述的疾病。
- [0479] 例如,生物活性分子可以是免疫系统调节剂,例如细胞因子,优选人细胞因子。例



如,细胞因子可以是刺激T细胞活化和/或增殖的细胞因子。与特异性结合成员缀合的细胞因子的实例包括IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、GM-CSF和IFN- $\gamma$ 。

[0480] 或者,生物活性分子可以是配体陷阱,例如细胞因子(例如TGF- $\beta$ 或IL-6)的配体陷阱。

[0481] 可以与特异性结合成员偶联的合适的可检测标记在本领域中是已知的,包括放射性同位素,例如碘-125、碘-131、钇-90、铟-111和镓-67;以及荧光染料,例如荧光素、若丹明、藻红蛋白、德克萨斯红和花青染料衍生物,例如Cy7和Alexa750;发色染料,例如二氨基联苯胺;乳胶微球;酶标记,例如辣根过氧化物酶;具有光谱隔离吸收或发射特性的荧光粉或激光染料;和化学发光,例如生物素,可以通过与特定的同源可检测部分,例如经标记的抗生物素蛋白结合来检测。

[0482] 特异性结合成员可通过任何合适的共价或非共价键,例如二硫键或肽键,与生物活性分子或可检测标记缀合。当生物活性分子是细胞因子时,细胞因子可通过肽接头与特异性结合成员连接。合适的肽接头是本领域已知的,并且长度可以是5至25、5至20、5至15、10至25、10至20或10至15个氨基酸。

[0483] 在一些实施方式中,生物活性分子可以通过可裂解的接头与特异性结合成员缀合。接头可允许在治疗部位从特异性结合成员释放生物活性分子。接头可包括酰胺键(例如肽接头),二硫键或脲。例如,肽接头可被位点特异性蛋白酶切割,二硫键可被胞浆的还原环境切割,而脲可被酸介导的水解切割。

[0484] 缀合物可以是包含特异性结合成员和生物活性分子的融合蛋白。在这种情况下,可以通过肽接头或肽键将生物活性分子与特异性结合成员缀合。当特异性结合成员是多链分子时,例如当特异性结合成员是或包含Fcab或mAb<sup>2</sup>时,生物活性分子可以与特异性结合成员的一条或多条链缀合。例如,生物活性分子可以与mAb<sup>2</sup>分子的一条或两条重链缀合。融合蛋白的优点是易于生产和纯化,有利于临床级材料的生产。

[0485] 本发明还提供了分离的核酸分子或编码本发明的特异性结合成员的分子。技术人员使用本领域众所周知的方法来制备这种核酸分子将没有困难。

[0486] 在一个优选的实施方式中,所述核酸分子编码以下特异性结合成员的CH3结构域:FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005,FS22-172-006或FS22-172,优选FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005或FS22-172-006,更优选FS22-172-003,FS22-172-002或FS22-172-004,再更优选FS22-172-003。

[0487] 在一个替代的优选实施方式中,所述核酸分子编码以下特异性结合成员的CH3结构域:FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017,FS22-053-014,FS22-053-010,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-015,FS22-053-016或FS22-053,优选FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017或FS22-053-014,更优选FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011或FS22-053-017,再更优选FS22-053-008。

[0488] 这些特异性结合成员的CH3结构域序列在本文中描述。

[0489] 例如,编码以下特异性结合成员的CH3结构域的核酸分子:

[0490] (i) 分别如SEQ ID NO:22、31、49、103、76、40、58、67、85、94和176所示的FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011、FS22-053-017、FS22-053-014、FS22-053-010、FS22-

053-012、FS22-053-013、FS22-053-015、FS22-053-016或FS22-053;或

[0491] (ii) 分别如SEQ ID NO:140、131、149、122、158、166和113所示的FS22-172-003、FS22-172-002、FS22-172-004、FS22-172-001、FS22-172-005、FS22-172-006或FS22-172。

[0492] 在一个优选的实施方式中,所述核酸分子编码以下特异性结合成员:FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005,FS22-172-006或FS22-172,优选FS22-172-003,FS22-172-002,FS22-172-004,FS22-172-001,FS22-172-005或FS22-172-006,更优选FS22-172-003,FS22-172-002或FS22-172-004,再更优选FS22-172-003。

[0493] 在一个替代的优选实施方式中,所述核酸分子编码以下特异性结合成员:FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017,FS22-053-014,FS22-053-010,FS22-053-012,FS22-053-013,FS22-053-015,FS22-053-016或FS22-053,优选FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011,FS22-053-017或FS22-053-014,更优选FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-011或FS22-053-017,再更优选FS22-053-008。

[0494] 例如,编码以下特异性结合成员的核酸分子:

[0495] (i) 分别如SEQ ID NO:24、33、51、105、78、42、60、69、87、96和177所示的FS22-053-008、FS22-053-009、FS22-053-011、FS22-053-017、FS22-053-014、FS22-053-010、FS22-053-012、FS22-053-013、FS22-053-015、FS22-053-016或FS22-053;或

[0496] (ii) 分别如SEQ ID NO:142、133、151、124、160、168和115所示的FS22-172-003、FS22-172-002、FS22-172-004、FS22-172-001、FS22-172-005、FS22-172-006或FS22-172。

[0497] 分离的核酸分子可以用于表达本发明的特异性结合成员。核酸通常将以重组载体的形式提供用于表达。因此,本发明的另一方面提供了一种包含如上所述的核酸的载体。可以选择或构建合适的载体,其包含合适的调控序列,包括启动子序列、终止子片段、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和其他适当的序列。优选地,所述载体包含合适的调控序列以驱动核酸在宿主细胞中的表达。载体视情况而定可以是质粒,病毒例如噬菌体或噬菌粒。

[0498] 如本文所述的核酸分子或载体可以被引入宿主细胞。将核酸或载体引入宿主细胞的技术在本领域中是已经建立的,并且可以采用任何合适的技术。适合产生重组特异性结合成员的一系列宿主细胞是本领域已知的,包括细菌、酵母、昆虫或哺乳动物宿主细胞。优选的宿主细胞是哺乳动物细胞,例如CHO、NS0或HEK细胞,例如HEK293细胞。最优选的宿主细胞是CHO细胞。

[0499] 本发明的另一方面提供了一种产生本发明的特异性结合成员的方法,该方法包括在宿主细胞中表达编码该特异性结合成员的核酸,并任选地分离和/或纯化由此产生的特异性结合成员。培养宿主细胞的方法是本领域众所周知的。所述方法可以进一步包括分离和/或纯化特异性结合成员。纯化重组特异性结合成员的技术是本领域众所周知的,包括例如HPLC、FPLC或亲和色谱,例如使用蛋白A或蛋白L。在一些实施方案中,可以使用特异性结合成员上的亲和标签进行纯化。所述方法还可以包括将特异性结合成员任选地与如下所述的药学上可接受的赋形剂或其他物质一起配制成药物组合物。

[0500] 如上所述,CD137在免疫系统的细胞上表达,包括CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、Treg细胞、B细胞、NK细胞、NKT细胞、树突状细胞和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。已经显示CD137活化在增

强CD8<sup>+</sup>T细胞的增殖、存活和细胞毒性效应子功能以及CD8<sup>+</sup>T细胞分化和记忆CD8<sup>+</sup>T细胞的维持中发挥作用。CD137在CD4<sup>+</sup>T细胞上的表达水平比CD8<sup>+</sup>T细胞低,但已被证明与诱导CD4<sup>+</sup>T细胞的某些子集的增殖和活化有关。还证明了CD137的活化可增强NK细胞介导的ADCC以及B细胞的增殖、存活和细胞因子的产生。

[0501] 鉴于CD137的免疫应答增强活性,已经在癌症治疗以及慢性感染的治疗中研究了CD137激动剂分子。

[0502] 因此,本文所述的特异性结合成员可用于治疗应用,特别是在癌症的治疗中。另外,预期特异性结合成员可用于治疗感染性疾病,例如持续性感染性疾病。

[0503] 如本文所述的特异性结合成员可以用于治疗人体或动物体的方法。本发明的相关方面提供了:

[0504] (i) 本文所述的用作药物的特异性结合成员,

[0505] (ii) 本文所述的特异性结合成员用于治疗疾病或病症的方法,

[0506] (iii) 本文所述的特异性结合成员在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途;和,

[0507] (iv) 治疗个体的疾病或病症的方法,其中所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的本文所述的特异性结合成员。

[0508] 所述个体可以是患者,优选人类患者。

[0509] 治疗可以是达到某种期望的治疗效果的任何治疗或疗法,例如,抑制或延缓病情进展,并且包括进展速度的降低,进展速度的停滞,病情的改善,病情的治愈或缓解(无论是部分还是全部),预防、改善、延迟、减轻或阻止一种或多种病状和/或症状,或延长个体或患者的生存期,超出了在没有治疗的情况下的预期。

[0510] 还包括作为预防措施(即预防)的治疗。例如,对于易患或有可能发生或再次发生疾病(如癌症)的个体,可按本文所述进行治疗。这种治疗可以预防或延迟个体中疾病的发生或再发生。

[0511] 所描述的治疗方法可以包括除特异性结合成员之外对个体施用至少一种其他治疗。因此,本文所述的特异性结合成员可以单独地或与一种或多种其他治疗组合地施用于个体。当特异性结合成员与另一种治疗组合施用于个体时,附加治疗可以与特异性结合成员施用的同时,相继或分开地施用于个体。在特异性结合成员与附加治疗同时施用的情况下,可以将特异性结合成员和附加治疗作为组合制剂施用于个体。例如,附加疗法可以是用于待治疗疾病的已知疗法或治疗剂。

[0512] 尽管可以单独施用特异性结合成员,但是特异性结合成员通常将以药物组合物的形式施用,该药物组合物除了特异性结合成员外还可以包含至少一种组分。因此,本发明的另一方面提供了包含如本文所述的特异性结合成员的药物组合物。还提供了一种包括将特异性结合成员配制成药物组合物的方法。

[0513] 除了特异性结合成员之外,药物组合物还可包含药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲液、稳定剂或本领域技术人员众所周知的其他材料。如本文所用,术语“药学上可接受的”是指化合物、材料、组合物和/或剂型,其在合理的医学判断范围内,适用于与受试者(例如,人)的组织接触而无过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,并与合理的获益/风险比相称。在与制剂的其他成分相容的意义上,每种载体,赋形剂等也必须是“可接受的”。

载体或其他材料的确切性质将取决于给药途径,这可以通过输注、注射或任何其他合适的途径进行,如下所述。

[0514] 对于肠胃外,例如皮下或静脉内给药,例如通过注射,包含特异性结合成员的药物组合物可以是肠胃外可接受的水溶液形式,其不含热原并且具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员能够使用例如等渗媒介物,例如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液来制备合适的溶液。可以根据需要使用防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂,包括诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸的缓冲剂;抗氧化剂,例如抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐的抗衡离子,例如钠;金属配合物(例如锌蛋白配合物);和/或非离子表面活性剂,例如TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。

[0515] 在一些实施方式中,可以以冻干的形式提供特异性结合成员以在施用前重建。例如,冻干的特异性结合成员可以在施用给个体之前在无茵水中重构并与盐水混合。

[0516] 给药可以以“治疗有效量”,这足以显示出对个体的益处。实际给药的量以及给药的速率和时程将取决于所治疗疾病的性质和严重程度,所治疗的特定个体,个体的临床状况,疾病原因,组合物递送部位,特异性结合成员的类型,给药方法,给药时间表和医生已知的其他因素。治疗处方,例如剂量等的决定属于全科医生和其他医生的责任,并且可能取决于症状的严重程度和/或所治疗疾病的进展。适当剂量的免疫球蛋白在本领域中是众所周知的(Ledermann等人,(1991) Int. J. Cancer 47:659-664;和Bagshawe等人,(1991) 抗体、免疫缀合物和放射药物4:915-922)。可以使用本文所述的具体剂量,或在《医师案头参考》(Physician's Desk Reference) (2003)中指出的适用于所施用抗体分子的剂量。对于抗体分子,可以通过在动物模型中比较体外活性和体内活性来确定特异性结合成员的治疗有效量或合适剂量。将小鼠和其他试验动物中的有效剂量外推至人的方法是已知的。精确剂量将取决于许多因素,包括待治疗区域的大小和位置以及特异性结合成员的精确性质。

[0517] 对于全身性应用,典型的免疫球蛋白剂量范围为100 $\mu$ g至1g,对于局部应用,典型的免疫球蛋白剂量范围为1 $\mu$ g至1mg。可以开始施用较高负荷剂量,然后施用一个或多个较低剂量。这是成年个体单次治疗的剂量,可以针对儿童和婴儿按比例调整剂量,也可以针对其他特异性结合成员形式按分子量调整剂量。

[0518] 根据医生的判断,可以每天,每周两次,每周或每月间隔重复治疗。个体的治疗方案可能取决于特定结合成员组合物的药代动力学和药效学性质,给药途径和所治疗疾病的性质。

[0519] 治疗可以是周期性的,并且两次给药之间的时间可以是大约两周或更长时间,例如大约三周或更长时间,大约四周或更长时间,大约每月一次或更长时间,大约五周或更长时间,或者大约六周或更长时间。例如,治疗可以是每两到四周或每四到八周。合适的制剂和给药途径如上所述。

[0520] 在一个优选的实施方式中,本文所述的特异性结合成员可用于治疗癌症的方法。

[0521] 癌症的特征可能是恶性癌细胞的异常增殖。当提到特定类型的癌症,例如乳腺癌时,这是指相关组织例如乳房组织的恶性细胞的异常增殖。位于乳房中但是另一组织例如卵巢组织的恶性细胞异常增殖的结果的继发性癌症不是本文所指的乳腺癌,而是卵巢癌。

[0522] 所述癌症可以是原发性或继发性癌症。因此,本文所述的特异性结合成员可用于治疗个体癌症的方法,其中所述癌症是原发性肿瘤和/或肿瘤转移。

[0523] 使用本文所述的特异性结合成员治疗的癌症的肿瘤可以包含表达CD137的TIL,例如在他们的细胞表面。在一个实施方式中,可能已经确定肿瘤包含表达CD137的TIL。用于确定抗原在细胞表面上表达的方法是本领域已知的,并且包括例如流式细胞术。

[0524] 例如,使用本文所述的特异性结合成员治疗的癌症可以选自下组:白血病,例如急性髓细胞性白血病(AML)、慢性髓细胞性白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL);淋巴瘤,例如霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤;实体癌,例如肉瘤(例如软组织肉瘤)、皮肤癌(例如默克尔细胞癌)、黑色素瘤、膀胱癌(例如尿路上皮癌)、大脑癌(例如多形胶质母细胞瘤)、乳腺癌、子宫/子宫内膜癌、卵巢癌(例如卵巢浆液性囊腺瘤)、前列腺癌、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌(SCLC))、大肠癌(例如大肠腺癌)、子宫颈癌(例如子宫颈鳞状细胞癌和子宫颈腺癌)、肝癌(例如肝细胞癌)、头颈癌(例如头颈鳞状细胞癌)、食道癌、胰腺癌、肾癌(例如肾细胞癌)、肾上腺癌、胃癌(例如胃腺癌)、睾丸癌、胆囊癌和胆道癌(例如胆管癌)、甲状腺癌、胸腺癌、骨癌和脑癌。

[0525] 在一个优选的实施方式中,使用本文所述的特异性结合成员治疗的癌症是实体癌。更优选地,使用本文所述的特异性结合成员治疗的癌症是选自以下的实体癌:肉瘤、黑色素瘤、膀胱癌、大脑癌、乳腺癌、子宫/子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、结直肠癌、宫颈癌、肝癌、头颈癌、胰腺癌、肾癌和胃癌。

[0526] 在癌症的情况下,所述治疗可以包括抑制癌症的生长,包括完全的癌症缓解,和/或抑制癌症的转移,以及抑制癌症的复发。癌症生长通常是指许多指标中的任何一个,这些指标表明癌症内的状态已发展为更发展的形式。因此,用于测量对癌症生长的抑制的指标包括癌细胞存活率的降低,肿瘤体积或形态的降低(例如,如使用计算机断层摄影(CT),超声检查或其他成像方法所确定的),肿瘤生长延迟,肿瘤脉管系统的破坏,迟发型超敏性皮肤测试性能的改善,抗癌免疫细胞或其他抗癌免疫反应活性的增加,以及肿瘤特异性抗原水平的降低。在个体中激活或增强对癌性肿瘤的免疫应答可以改善个体抵抗癌症生长的能力,特别是已经在受试者中存在的癌症的生长和/或降低个体中癌症生长的倾向。

[0527] 在癌症治疗的背景下,本文所述的特异性结合成员可以与另一种抗癌疗法或治疗剂(例如已证明是合适的抗癌疗法或治疗剂,或预期适合于治疗所讨论的癌症)联合施用给个体。例如,可以将特异性结合成员与化学治疗剂、放射疗法、免疫治疗剂、抗肿瘤疫苗、溶瘤病毒、过继细胞转移(ACT)疗法(例如过继NK细胞)或嵌合抗原受体(CAR)T细胞,自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或 $\gamma/\delta$ T细胞或激素治疗的治疗剂联合施用于个体。

[0528] 不希望被理论所束缚,认为本文所述的特异性结合成员可以在抗癌疗法中充当佐剂。具体地,认为例如将特异性结合成员与化学疗法和/或放射疗法组合,或与抗肿瘤疫苗组合地施用于个体,将引发比单独使用化学疗法和/或放射疗法,或使用抗肿瘤疫苗更强烈的针对癌症的免疫应答。

[0529] 与本文所述的特异性结合成员组合施用的一种或多种化学治疗剂可以选自下组：紫杉烷类、细胞毒性抗生素、酪氨酸激酶抑制剂、PARP抑制剂、B-Raf酶抑制剂、MEK抑制剂、c-MET抑制剂、VEGFR抑制剂、PDGFR抑制剂、烷基化剂、铂类似物、核苷类似物、抗叶酸剂、沙利度胺衍生物、抗肿瘤化学治疗剂等。紫杉烷类包括多西紫杉醇、紫杉醇和纳布紫杉醇；细胞毒性抗生素包括放线菌素、博来霉素和蒽环类药物，如阿霉素、米托蒽醌和缬卢比；酪氨酸激酶抑制剂包括厄洛替尼、吉非替尼、阿西替尼、PLX3397、伊马替尼、科米替尼(cobemitinib)和曲美替尼；PARP抑制剂包括吡拉帕尼；B-Raf酶抑制剂包括维罗非尼和达拉非尼；烷基化剂包括达卡巴嗪、环磷酰胺和替莫唑胺；铂类似物包括卡铂、顺铂和奥沙利铂；核苷类似物包括阿扎胞苷、卡培他滨、氟达拉滨、氟尿嘧啶和吉西他滨；抗叶酸药物包括甲氨蝶呤和培美曲塞。适用于本发明的其他化学治疗剂包括达法替尼(Defactinib)、恩替司他、艾瑞布林、伊立替康和长春碱。

[0530] 与本文所述的抗体分子一起给药的优选治疗剂是阿霉素、米托蒽醌、环磷酰胺、顺铂和奥沙利铂。

[0531] 用于与本文所述的特异性结合成员组合施用的放射疗法可以是外部束放射疗法或近距离放射疗法。

[0532] 与本文所述的特异性结合成员组合施用的免疫治疗剂可以是治疗性抗体分子、核酸细胞因子或基于细胞因子的疗法。例如，治疗性抗体分子可以结合免疫调节分子，例如抑制性检查点分子或免疫共刺激分子，或肿瘤抗原，例如细胞表面肿瘤抗原或可溶性肿瘤抗原。治疗性抗体分子可以结合的免疫调节分子的实例包括CTLA-4、LAG-3、TIGIT、TIM-3、VISTA、PD-L1、PD-1、CD47、CD73、CSF-1R、KIR、CD40、HVEM、IL-10和CSF-1。治疗性抗体分子可以结合的先天免疫系统的受体的实例包括TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR7、TLR9、RIG-1样受体(例如RIG-1和MDA-5)和STING。治疗性抗体分子可以结合的肿瘤抗原的实例包括HER2、EGFR、CD20和TGF- $\beta$ 。

[0533] 与本文所述的特异性结合成员组合施用的核酸可以是siRNA。

[0534] 细胞因子或基于细胞因子的疗法可以选自下组：IL-2、缀合IL-2的前药、GM-CSF、IL-7、IL-12、IL-9、IL-15、IL-18、IL-21和I型干扰素。

[0535] 用于治疗癌症的抗肿瘤疫苗已在临床中实施，并在科学文献中进行了详细讨论(例如Rosenberg, S. 2000)。这主要涉及通过使用这些细胞作为疫苗接种方法来提示免疫系统对自体或同种异体癌细胞表达的各种细胞标记物作出反应的策略，无论是否带有粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。GM-CSF在抗原呈递方面引起强烈反应，与上述策略一起使用时效果特别好。

[0536] 化疗剂、放射疗法、免疫治疗剂、抗肿瘤疫苗、溶瘤病毒、ACT疗法、或激素治疗剂优选为用于所讨论的癌症的化学治疗剂、放射疗法、免疫治疗剂、抗肿瘤疫苗、溶瘤病毒、ACT疗法、或激素治疗剂，即化疗剂、放射疗法、免疫治疗剂、抗肿瘤疫苗、溶瘤病毒、ACT疗法、或激素治疗剂已被证明在所讨论的癌症的治疗中有效。选择合适的已被证明对所述癌症有效的化疗剂、放射疗法、免疫治疗剂、抗肿瘤疫苗、溶瘤病毒、ACT疗法、或激素治疗剂，完全在熟练技术人员的能力范围内。

[0537] 鉴于CD137的免疫应答增强活性，预期CD137激动剂分子可用于治疗感染性疾病。因此，在另一个优选的实施方式中，本文所述的抗体分子可用于治疗感染性疾病，例如急性

或持续性感染性疾病的方法。

[0538] 不希望受到理论的束缚,认为CD137激动剂分子可能能够通过诱导先天免疫细胞例如嗜中性粒细胞和单核细胞的快速浸润和活化,从而有助于清除导致急性感染性疾病的病原体。因此,在另一个实施方式中,本文所述的抗体分子可以用于治疗急性感染性疾病,例如急性细菌性疾病的方法。在优选的实施方式中,所述急性感染性疾病是由革兰氏阳性细菌如李斯特菌(*Listeria*),肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)或金黄色葡萄球菌属(*Staphylococcus aureus*)的细菌感染引起的急性细菌性疾病。

[0539] 感染性疾病通常可通过免疫系统清除,但某些感染会持续很长时间,例如数月或数年,并且无法通过免疫系统有效抵抗。这种感染也称为持续性或慢性感染。

[0540] 优选地,本文所述的抗体分子用于治疗持续性感染性疾病,例如持续性病毒、细菌、真菌或寄生虫感染,优选持续性病毒或细菌感染。

[0541] 在一个优选的实施方式中,使用本文所述的抗体分子治疗的持续性病毒感染是由人免疫缺陷病毒(HIV)、爱泼斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒、巨细胞病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒或水痘带状疱疹病毒引起的持续性感染。

[0542] 在一个优选的实施方式中,使用本文所述的抗体分子治疗的持续性细菌感染是以下的持续性感染:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、流感嗜血杆菌(*Hemophilus influenza*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、苍白螺旋体(*Treponema pallidum*)、或肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)。

[0543] 已经描述了CD137激动在治疗革兰氏阳性细菌感染的背景中是有益的。因此,在一个优选的实施方式中,使用本文所述的抗体分子治疗的持续性细菌感染是由革兰氏阳性细菌引起的持续性感染。在一个更优选的实施方式中,持续性细菌感染是由选自下组的革兰氏阳性细菌引起的持续性感染:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)和肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)。

[0544] 在一个优选的实施方式中,使用本文所述的特异性结合成员治疗的持续性真菌感染是以下的持续性感染:念珠菌(例如白色念珠菌(*Candida albicans*))、隐球菌(例如加蒂隐球菌(*Cryptococcus gattii*)或新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*))、篮状菌(青霉属)(例如马尔菲尼篮状菌(*Talaromyces marneffe*))、小孢子菌(例如奥杜盎小孢子菌(*Microsporum audouinii*))或断发毛癣菌(*Trichophyton tonsurans*)。

[0545] 在一个优选的实施方式中,使用本文所述的特异性结合成员治疗的持续性寄生虫感染是以下的持续性感染:疟原虫(例如恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*))或利什曼原虫(例如杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*))。

[0546] 在持续感染性疾病的治疗中,治疗可以包括消除感染,减少个体的病原性负荷,防止感染复发。例如,治疗可以包括预防、改善、延迟、减轻或阻止持续感染的一种或多种症状和/或体征。或者,治疗可包括预防感染性疾病。

[0547] 在治疗感染性疾病的情况下,本文所述的特异性结合成员可以与用于治疗感染性疾病的另一种治疗剂例如已证明适合或预期适合于治疗所述感染性疾病的治疗剂组合施用于个体。例如,可以将特异性结合成员与免疫治疗剂组合施用于个体。与本文所述的抗体

分子组合施用的免疫治疗剂可以是治疗性抗体分子。例如,治疗性抗体分子可以结合先天免疫系统的受体。治疗性抗体分子可以结合的先天免疫系统的受体的实例包括TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR7、TLR9、RIG-1样受体(例如RIG-1和MDA-5)和STING。

[0548] 当特异性结合成员用于预防感染性疾病时,可以将特异性结合成员与用于所述病原体的疫苗组合施用。不希望受到理论的束缚,认为本文所述的特异性结合成员可以在疫苗接种中充当佐剂。具体而言,认为特异性结合成员与疫苗组合施用于个体会引发比使用单独的疫苗更强烈的针对病原体的免疫应答。

[0549] 鉴于包括以下实验实施例的本公开,本发明的其他方面和实施方式对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0550] 本说明书中提及的所有文件均通过引用整体并入本文。

[0551] 在本文中使用的“和/或”应被视为两个指定的特征或部件中的每个具有或不具有另一个的具体公开。例如,“A和/或B”将被视为(i) A, (ii) B以及(iii) A和B中的每一个的具体公开,就像每个在本文中分别列出一样。

[0552] 除非上下文另外指示,否则以上阐述的特征的描述和定义不限于本发明的任何特定方面或实施例,并且等同地适用于所描述的所有方面和实施例。

[0553] 除非上下文另外指出,否则本发明的其他方面和实施方式提供了上述诸方面和实施方式,其中术语“由…构成”或“基本上由…构成”替换术语“包含”。

[0554] 现在将通过示例的方式并参考上述附图来说明本发明的某些方面和实施方式。

实施例

[0555] 实施例1:人、小鼠和食蟹猴抗原的生产、表征和选择

[0556] 1.1重组抗原

[0557] 已知肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)成员倾向于形成多聚体,当与它们的同源配体结合时会聚成簇(Croft, M. 2003)。这种由于其功能而聚集的倾向使生产在溶液中不聚集的可溶性重组蛋白以用于体外选择具有挑战性,例如噬菌体和酵母展示以及用于表征所选蛋白。

[0558] 测试了几种可商购的重组抗原,由于存在的聚集体水平,发现大多数不适合用于这些选择。在测试的那些中,仅生物素化的人类分泌的CD137, hFc融合蛋白(BPS Biosciences, 目录号71171), 以下称为“hCD137-hFc-Avi-BPS”具有足够低的聚集度, 适用于实验中, 尽管取得的成功有限(参见实施例2)。

[0559] 由于大多数商用抗原被认为不合适, 因此, 内部生产了以下重组二聚体和单体CD137抗原(参见表1)以供选择:

[0560] 表1

[0561]

类型	名称	物种	可溶性或细胞	生物素化	抗原形式
重组体	mCD137-mFc-Avi	小鼠	可溶	是	二聚体
重组体	mCD137-Avi-His	小鼠	可溶	是	单体
重组体	hCD137-mFc-Avi	人	可溶	是	二聚体
重组体	hCD137-Avi-His	人	可溶	是	单体
重组体	cCD137-mFc-Avi	食蟹猴	可溶	是	二聚体



[0562] 单体抗原是通过克隆编码人胞外域的DNA (SEQ ID NO:181) 或小鼠CD137 (SEQ ID NO:185) 以及Avi序列和6个C末端组氨酸残基进入使用EcoRI-HF和BamHI-HF限制酶修饰的pFUSE载体 (英杰公司, 目录号pfuse-mg2afc2)。将载体转染到HEK293-6E细胞 (加拿大国家研究委员会) 中, 并使用HisTrap<sup>TM</sup> excel镍柱 (GE生命科学29048586) 和尺寸排阻色谱法 (SEC) 纯化表达的CD137, 以确保抗原是单个种类, 并且不包含聚集体。

[0563] 为了产生二聚体抗原, 将编码与mIgG2a Fc结构域融合带有Avi序列的人、小鼠或食蟹猴CD137的胞外结构域以及的DNA构建体克隆到修饰的pFUSE载体中, 并转染到HEK293-6E细胞中。使用MabSelect SuRe<sup>TM</sup>蛋白A柱 (GE保健公司, 11003494) 和尺寸排阻色谱法 (SEC) 纯化重组CD137, 以确保抗原是单一类型且不包含聚集体。

[0564] 使用BirA生物素-生物素蛋白连接酶反应试剂盒 (Avidity有限责任公司, BirA500) 对每种二聚和单体抗原进行生物素化处理, 以产生标记有单个生物素分子的单体CD137抗原和标记有两个生物素分子的二聚体CD137抗原, 每个这两种单体上一个。将3mg抗原与7.8μl BirA酶混合物混合, 使酶与底物的摩尔比为1:50。然后按照制造商的建议添加添加剂 (142μl Biomix A, 142μl Biomix B, 142μl 生物素), 并将反应混合物在室温下孵育2小时。立即使用Amicon30μm过滤器 (默克密理博UFC503096) 将反应混合物缓冲液交换为DPBS (生命技术公司14190-169)。

[0565] 蛋白质通过SEC进一步纯化, 以确保去除BirA酶并产生最终的无高分子量聚集体的高质量单分散蛋白质制剂。更详细地, 将来自同一生产批次的材料混合在一起, 并通过尺寸排阻高效液相色谱 (SE-HPLC), SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和尺寸排阻色谱多角度光散射 (SEC-MALS) 进行稳定性和纯度分析。在链霉亲和素迁移的SDS-PAGE凝胶中确认了蛋白质的完全生物素化。通过表面等离子体共振 (SPR) 证实重组人和小鼠抗原体外结合抗CD137阳性对照抗体 (分别为20H4.9 (美国专利号7288638) 和Lob12.3 (南安普敦大学)), 并且通过流式细胞术证实结合表达人和小鼠CD137配体的D011.10细胞。将细胞与CD137抗原孵育1小时, 然后使用荧光标记的抗小鼠Fc片段抗体检测细胞结合。如上所述, 通过流式细胞术确认重组食蟹猴抗原结合表达食蟹猴CD137配体的D011.10细胞 (国立犹太健康中心)。为确保选择方案中使用的材料具有尽可能高的纯度, 对抗原进行了彻底的蛋白质表征, 以确保不超过2%的蛋白质聚集体存在。

#### [0566] 1.2细胞表达的抗原

[0567] 生产表达全长小鼠CD137 (SEQ ID NO:184) 或人CD137 (SEQ ID NO:180) 的D011.10细胞 (国立犹太健康中心), 分别命名为“D011.10.mCD137”和“D011.10.hCD137”, 以便以膜结合构象呈递抗原, 最类似于其天然形式, 用于选择和进一步表征选定的Fcab, 如表2中所列。

[0568] 使用慢病毒-X HTX包装系统 (Takara, 目录号631249), 利用慢病毒转导产生这些过表达人或小鼠CD137受体的D011.10细胞。含有编码人CD137 (SEQ ID NO:180) 或小鼠CD137 (SEQ ID NO:184) 的cDNA的Lenti-X表达载体 (pLVX) (Takara, 目录号631253) 与Lenti-X HTX包装混合物一起共转染到Lenti-X293T细胞系 (Takara, 目录号632180) 中以产生病毒。然后用这些慢病毒载体转导D011.10细胞系。

[0569] 通过流式细胞术分别将20H4.9和Lob12.3抗CD137阳性对照抗体与细胞结合, 证实了人CD137或小鼠CD137在这些细胞上的表达。将细胞与人或小鼠阳性对照抗体孵育1小时,

然后使用荧光标记的抗人Fc检测抗体 (Stratech科技有限公司, 目录号109-546-098-JIR) 检测细胞结合。

[0570] 还使用相同的慢病毒转导方法生成了表达食蟹猕猴CD137的D011.10细胞, 命名为“D011.10.cCD137”, 并用于测试抗人CD137 Fcab与食蟹猕猴CD137的交叉反应性。如前所述, 通过流式细胞术通过使抗CD137阳性对照抗体 (MOR\_7480.1, US2012/0237498 A1) 与细胞结合来确认食蟹猕猴CD137的表达。

[0571] 表2

[0572]	类型	名称	物种	介绍
	细胞	D011.10.hCD137	人	细胞表达
	细胞	D011.10.mCD137	小鼠	细胞表达
	细胞	D011.10.cCD137	食蟹猴	细胞表达

[0573] 实施例2: 抗人CD137抗体初步选择

[0574] 为了找到与人CD137结合的Fcab, 并最大限度地提高已鉴定结合物的多样性, 采用了酵母和噬菌体展示选择活动。由于CD137在许多非免疫细胞类型中的表达水平较低, 因此决定选择选择性靶向大量表达CD137的细胞 (例如活化T细胞) 的抗人CD137 Fcab。不希望受到理论的束缚, 据推测, 具有非常低或可忽略的CD137表达水平的细胞更有可能在其细胞表面具有单体状态的CD137, 这与活化的T细胞具有高度上调的CD137表达的情况不同, 其中大多数蛋白质预期以二聚体、三聚体或更高的多聚体状态存在于细胞表面。

[0575] 过表达CD137的细胞或重组二聚体人CD137蛋白被用于Fcab选择中, 以暴露那些具有代表性的表位, 这些表位促进与高度上调的多聚CD137的细胞的结合相互作用。此外, 使用二聚体抗原被认为有利于选择与CD137紧密结合并与靶标结合更长时间的二价Fcab, 继而又被认为有利于优先结合CD137表达水平上调的细胞。在这种情况下, 没有使用单体重组CD137, 以防止选择非常高亲和力的单价Fcab结合物, 这可能会结合CD137过强。

[0576] 该选择策略的目的是获得能够优先结合活化T细胞且不能与仅显示单体CD137的幼稚T细胞或表达非常低水平CD137的其他细胞良好结合的Fcab。通过选择相对于单体抗原优先与二聚体和多聚体抗原二价结合的CD137 Fcab, 认为潜在的脱靶T细胞活化将被降低, 同时伴随着毒性的降低。

[0577] 噬菌体展示

[0578] 展示人IgG1 CH3结构域六个原始噬菌体文库用于通过噬菌体展示进行选择。所有六个文库均包含随机的AB环 (根据IMGT编号在14-18位包含残基) 和随机的EF环 (根据IMGT编号在92-101位包含残基)。其中一个文库包含在EF环的101位上插入了两个或四个氨基酸 (由两个或四个NNK密码子编码) 的克隆 (根据IMGT编号, 插入的残基位于101.4-101.1位)。

[0579] 总共进行了12次选择活动以鉴定抗人CD137结合物。使用六个噬菌体文库, 使用内部hCD137-mFc-Avi抗原或商业来源的hCD137-hFc-Avi-BPS抗原和/或D011.10.hCD137抗原表达细胞进行选择。由于使用hCD137-hFc-Avi-BPS重组抗原从早期选择中仅鉴定出一个功能性Fcab序列, 因此将内部hCD137-mFc-Avi用于重组CD137的剩余选择中。使用100nM生物素化抗原进行初始轮次, 使用内部生产的500nM未标记的重组人Fc片段进行去选择步骤。噬菌体结合物被包被有链霉亲和素或中性亲和素的磁珠捕获。对于选择输出, 通过噬菌体

ELISA (A450-630nm高于0.4)检测到与Fc片段的非特异性结合,引入了进一步的去选择步骤,由此将生物素化的Fc片段(内部生产)与噬菌体输出一起孵育。通过磁性捕获生物素化的Fc结合噬菌体将非Fc结合物与Fc结合物分离。

[0580] 为了找到CD137的膜结合天然构象的结合物,进行如下细胞选择:将重组抗原选择物的噬菌体输出与缺少人CD137的D011.10细胞一起孵育以去除不需要的结合物,例如那些非特异性结合细胞。接下来,将噬菌体与 $1 \times 10^7$  D011.10.hCD137细胞孵育,通过胰蛋白酶消化洗脱结合物,然后进行下一轮繁殖。第三轮遵循类似的过程,通过将D011.10.hCD137细胞的数量减少到 $5 \times 10^6$ 来增加选择压力。

[0581] 在每一轮选择之后进行噬菌体ELISA,以确定抗原特异性噬菌体的富集。将96孔链霉亲和素平板用 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 生物素化抗原包被过夜。用4%的PBS封闭板后,将 $50 \mu\text{l}$ 含噬菌体的细菌上清液添加到每个孔中,并在室温下以450rpm摇动孵育1小时。通过倒转板并用含0.1%吐温的PBS洗涤4次并用PBS洗涤4次来去除噬菌体溶液。然后加入抗M13噬菌体-HRP缀合的抗体,以检测与固定抗原结合的噬菌体。通过倒转板并用含0.1%吐温的PBS洗涤4次并用PBS洗涤4次来去除噬菌体溶液。将TMB微孔过氧化物酶溶液添加到每个孔中,并在30分钟的时间内显色。用1M硫酸终止反应,并在微量滴定板读数器中于 $\text{OD}_{450-630}$ 读数。特异性命中定义为对重组CD137表现出比背景(被定义为阴性对照,即PBS或阴性非结合噬菌体,例如野生型CH3)高至少4倍的信号强度,并且比与生物素化的重组Fc片段的结合强度至少高10倍。

[0582] 对第2轮和第3轮的细胞选择输出进行噬菌体荧光激活细胞分选(phage FACS)分析。简要地说,将 $2 \times 10^5$ 细胞转移到圆底微量滴定板中。将噬菌体上清液加入细胞中,并在4℃下孵育1小时。然后将细胞在冰冷的2%BSA的PBS缓冲液中洗涤两次,重悬于 $100 \mu\text{l}$ 抗M13抗体和缀合FITC的山羊抗小鼠IgG F(ab')片段的溶液中,并与细胞一起孵育1小时。在PBS中洗涤3次后,在流式细胞仪中分析细胞。在噬菌体FACS中,特异性命中定义为对CD137阳性细胞呈现的几何平均荧光强度(MFI)的信号,比重组CD137的结合信号至少高10倍,比背景(如阴性对照(PBS)所定义的)至少高4倍。

[0583] 通过噬菌体ELISA筛选3230个噬菌体克隆与二聚体重组hCD137抗原的结合,并将重组Fc用作阴性对照。通过噬菌体FACS筛选了1140个噬菌体克隆与D011.10.hCD137细胞的特异性结合。然后对单个命中进行测序,并为所得的76个独特序列分配Fcab克隆标识符,并将其亚克隆到含有He1D1.3 IgG1重链表达盒的pTT5表达载体(加拿大国家研究委员会)中,以在体内表达mAb<sup>2</sup>形式的Fcab克隆(参见实施例3.1)。

[0584] 酵母展示

[0585] 展示人IgG1的CH1至CH3结构域四个原始酵母文库用于通过酵母展示进行选择。所有四个文库在CH3结构域中包含随机的AB环(根据IMGT编号在14至18位包含残基)和随机的EF环(根据IMGT编号在92至101位包含残基)。两个文库还包含在CH3结构域的AB环中16位的五个氨基酸残基插入(根据IMGT编号在16.5至16.1位的残基)。

[0586] 内部hCD137-mFc-Avi抗原或商业来源的hCD137-hFc-Avi-BPS抗原用于通过四个酵母文库进行选择,尽管与噬菌体选择相似,但在早期选择后未使用商业来源的抗原,而是使用内部抗原。对于每个文库,使用磁性细胞分离(MACS)进行第一轮选择。用 $1.25 \mu\text{M}$ 未标记的人或小鼠Fc进行去选择步骤后,文库经生长,诱导并且将 $1 \times 10^{10}$ 细胞与250或300nM生物素化的重组抗原孵育。通过添加链霉亲和素磁珠并使用MACS LS柱(美天旂生物技术130-

042-401) 分离酵母结合物。在FACS-Aria II仪器(BD Bioscience)上通过荧光激活细胞分选(FACS)进行随后的选择,通过使用荧光标记的抗体检测结合的抗原(抗生物素-APC(美天旖生物技术130-090-856)、链霉亲和素-APC(BD生物科学349024)或中性亲和素-DyLight-488(赛默飞世尔22832),正确折叠的IgG支架(抗人IgG CH2结构域-FITC(Biorad AbD Serotec (MCA647F)),或aga2-IgG构建体的表达(抗Xpress(生命技术公司R91025)和抗小鼠IgG-FITC(西格玛F2653-.5ML))。只要有可能,就将抗原标志物与一种结构标志物结合使用,以通过酵母表面Fcab表达使结合强度信号归一化。未染色和对照的酵母菌群用于建立如下分选门:在FSC-A和SSC-A图中的酵母细胞,FSC-W和FSC-H图中的酵母用于区分多重态或萌芽的酵母细胞,以及FITC-A和APC-A图可检测结合的Fcab双阳性。

[0587] 通过使用前一轮中使用的抗原浓度执行输出质量控制,凭经验确定每一轮中使用的抗原浓度。如果结合富集在前一轮中增加(>5倍),则抗原浓度按1:2或1:3下降,否则保持恒定。还遵循该过程来确定需要进行几轮选择,以及选择分支是否被认为已经耗尽(如果多样性下降到仅少数主导序列,或者两轮后抗原结合没有增加)。

[0588] 从文库选择中鉴定出2784个酵母单克隆,分别进行如下筛选:每轮选择后,使用FACS-Aria II(BD Biosciences)仪器将单个酵母细胞点样在SDCAA琼脂平板上,并在以下流式细胞术抗原结合测定中进行筛选:单克隆菌落生长直到菌落达到2mm的直径,然后转移到含有600 $\mu$ l SDCAA液体培养基的深孔板上。培养物在30 $^{\circ}$ C下以1000rpm摇动过夜生长。通过用光密度为1(OD600=1)的诱导培养基SGRCOA替换生长培养基,来诱导aga2-IgG蛋白支架的表达。将细胞与生物素化的重组二聚体人抗原或小鼠Fc片段一起孵育,以区别于与重组hCD137抗原的Fc部分结合的酵母克隆。使用链霉亲和素-APC标记结合两种蛋白质的酵母细胞。抗CH2-FITC抗体也用作结构IgG标记。为了分析筛选的结果,绘制与Fc片段的结合,并去除与生物素化的Fc结合的任何克隆。结合被定义为高于0.2%的APC荧光阳性细胞的细胞,使用未染色和阴性对照样品放置门。

[0589] 在不同的抗原浓度和条件下重复选择,例如增加诱导温度,降低选择严格性或减少轮数,以增加命中数。命中测序显示相当低的输出多样性,只有9个Fcab克隆被鉴定出具有独特的序列:FS22-053、FS22-172、FS22-173、FS22-174、FS22-175、FS22-176、FS22-177、FS22-178和FS22-179。

[0590] 实施例3:来自初始选择的抗人CD137 Fcab的表征

[0591] 3.1制备“模拟”mAb<sup>2</sup>形式的抗人CD137 Fcab

[0592] 产生了由IgG1分子组成的“模拟”mAb<sup>2</sup>抗体,其包含从噬菌体中分离的76个抗人CD137 Fcab克隆和从酵母选择中分离出的9个克隆,以mAb<sup>2</sup>形式表征Fcab。通过将包含AB、CD和EF环的部分CH3结构域Fcab替换为抗鸡卵溶菌酶抗体He1D1.3的CH3结构域的相应区域来制备模拟mAb<sup>2</sup>。He1D1.3抗体的产生描述于Tello等人,1993。抗体He1D1.3的重链和轻链序列分别显示在SEQ ID 186和173中。模拟的mAb<sup>2</sup>分子是通过在HEK293-6E细胞中瞬时表达而产生的。为了评估产生的蛋白质量,使用来自PALL的带有Protein A定量生物传感器的Octall QKe平台通过生物层干涉法对IgG蛋白质含量进行了定量(18-5021)。使用mAb SelectSure柱通过蛋白A亲和色谱法纯化蛋白。53种噬菌体来源的CD137mAb<sup>2</sup>蛋白的检测结果低于检测阈值,因此被认为不适合进一步分析。使用mAb Select SuRe蛋白A柱(GE保健公司,11003494)纯化了32个mAb<sup>2</sup>:FS22-005,FS22-007,FS22-033,FS22-042,FS22-049,FS22-

050,FS22-052,FS22-053,FS22-054,FS22-167,FS22-169,FS22-170,FS22-171,FS22-172,FS22-173,FS22-174,FS22-175,FS22-176,FS22-177,FS22-178,FS22-179,FS22-180,FS22-181,FS22-183,FS22-184,FS22-186,FS22-187,FS22-191,FS22-192,FS22-193,FS22-194,FS22-195。

[0593] 为了比较表达水平,一些早期的Fcabs也被亚克隆并表达为HEK293-6E细胞中的可溶性Fcabs(包含截短的铰链),并使用mAb Select SuRe蛋白A柱进行纯化。有趣的是,发现某些Fcab以模拟mAb<sup>2</sup>形式比以可溶性Fcab观察到具有明显更好的生物物理行为和产量。原始克隆FS22-053就是这种情况,它以非常低的产率作为可溶性Fcab产生,但是当以模拟mAb<sup>2</sup>形式表达时,这种克隆提高了25倍,从而导致更多的克隆可用于鉴定。

### [0594] 3.2通过BLI与重组抗原结合

[0595] 在单点结合实验中,使用Octet QKe平台通过生物层干涉法测试了31种纯化的模拟mAb<sup>2</sup>分子(不包括克隆FS22-175)与人重组抗原的结合。使用链霉亲和素BLI生物传感器(PALL 18-5021)在动力学缓冲液(PALL)中以10μg/ml的量捕获生物素化的hCD137-mFc-Avi抗原。然后将传感器在含有在同一动力学缓冲液中以1:1比例稀释的纯化的mAb<sup>2</sup>的孔中浸泡240秒,然后浸入含有1x动力学缓冲液的孔中240秒。结合命中按照简单的布尔是/否标准分类,该标准由上述缓冲液和野生型IgG1对照He1D1.3 mAb(G1/He1D1.3)的BLI响应定义:12个mAb<sup>2</sup>未结合,而19个结合了包被CD137的传感器(FS22-007,FS22-033,FS22-042,FS22-049,FS22-050,FS22-052,FS22-053,FS22-054,FS22-169,FS22-172,FS22-173,FS22-174,FS22-179,FS22-180,FS22-181,FS22-183,FS22-187,FS22-194,FS22-195)。

### [0596] 3.3所选抗CD137模拟mAb<sup>2</sup>在人NF-κB报告基因分析中的活性

[0597] TNFR信号传导需要多聚化和聚集(Bitra等人,2017)。当CD137与相关配体CD137L相互作用时,它会聚集并激活NF-κB信号通路。激动剂分子在驱动CD137聚集和激活中模拟配体,从而激活NF-κB信号通路。已知一些激动性抗体可在结合后固有地引起CD137聚集,例如尤鲁单抗,而另一些则需要抗体本身进行额外的交联以诱导CD137聚集,例如尤米鲁单抗(utomi lumab,Fisher等人,2012)。已知效应细胞上的Fcγ受体会在体内诱导这种交联,尽管这种交联效率低下并且可能在治疗目的部位之外发生。由于剂量限制性毒性已经与某些抗CD137抗体的治疗相关联,因此决定选择不具有固有激动能力的抗CD137结合Fcab,而仅选择那些需要额外交联以诱导CD137聚集的抗体。因此,开发了一种能够通过交联的抗体在细胞表面表达的CD137聚集时检测细胞中的NF-κB信号通路的激活的测定法,但是当抗体未交联时显示极小的活性。然后,该方法用于测试模拟mAb<sup>2</sup>形式的27个抗CD137 Fcab克隆和6个抗CD20 mAb<sup>2</sup>形式的抗CD137 Fcab克隆的激动功能活性,而与是否通过BLI发现Fcab结合重组抗原无关。

[0598] 在测试中,蛋白L被用作交联剂以驱动模拟mAb<sup>2</sup>经由其Fab部分进行交联,并测量了NF-κB的活化。

[0599] 使用EcoRI-HF和XhoI限制酶将编码人CD137(SEQ ID 180)的cDNA亚克隆到pMSCV-新霉素载体(Takara Clontech,目录号634401)中。RetroPack PT67细胞系(Clontech,目录号631510)用于按照制造商的方案生产逆转录病毒颗粒。该逆转录病毒随后被用于转导先前通过使用包含控制荧光素酶表达的NF-κB敏感启动子的Qiagen Cignal Lenti NFκB Reporter(luc)(凯杰公司,目录号336851)慢病毒转导Flp-In T-REx 293HEK细胞系(生命

技术公司,R780-07)产生的HEK.FRT.luc细胞。这些HEK.FRT.luc.hCD137细胞用于筛选在选择中鉴定出的含有CD137结合物的模拟mAb<sup>2</sup>。

[0600] 在DPBS(生命技术公司,14190169)中制备每种模拟mAb<sup>2</sup>的2 $\mu$ M稀释液,并在报告细胞培养基(DMEM(Gibco,目录号61965-026);10%FCS(Gibco,目录号10270-106);1x青链霉素(Gibco,目录号15140-122);弹性蛋白15 $\mu$ g/ml(Melford实验室有限公司,目录号B1105);嘌呤霉素5 $\mu$ g/ml(生命技术公司,目录号A11113803);博来霉素100 $\mu$ g/ml(InvivGen,目录号11006-33-0);遗传霉素500 $\mu$ g/ml(生命技术公司,目录号10131-027)中1:3稀释。蛋白L(生命技术公司,21189)被用作人工交联剂,并以1:4的摩尔比与mAb<sup>2</sup>分子混合。孵育24小时后,根据制造商的说明,用100 $\mu$ l Promega Bio-Glo<sup>TM</sup>荧光素酶测定试剂(Promega目录号G7941)处理细胞,并在酶标仪上使用Gen5软件(BioTek)以0.5秒的积分时间测量发光。发光值是荧光素酶的量度,是响应交联的Fcab诱导的CD137的聚集而激活NF- $\kappa$ B信号通路而产生的。将发光值相对于Fcab的对数浓度作图,并在GraphPad Prism中使用对数(激动剂)相对响应方程拟合所得曲线。

[0601] 通过与未交联时相比,与蛋白L交联时荧光素酶信号至少增加了10倍,确定了命中。确定这些克隆能够诱导CD137聚集并随后激活下游信号通路。在所有测试的克隆中,有两个能够在交联时诱导荧光素酶增加10倍,FS22-053和FS22-172,尽管二者均无法确定EC50。两者均被选择用于D011.10 T细胞活化试验中的进一步表征。出乎意料的是,尽管通过BLI与CD137靶标结合,但在交联条件下未观察到剩余克隆的活性,这可能表明它们结合在CD137的无关表位上,或者这些克隆的亲和力不足以牢固地结合CD137以起始NF- $\kappa$ B信号级联。

[0602] 总体而言,虽然测试了30种以上的Fcab,但从初始选择中仅鉴定出两种Fcab(FS22-053和FS22-172),它们在交联时在NF- $\kappa$ B报告基因分析中表现出所需的功能,而在未交联时几乎没有活性。

[0603] 3.4所选抗CD137模拟mAb<sup>2</sup>在D011.10 T细胞活化试验中的活性

[0604] 通过活化的T细胞上的激动剂分子进行的CD137聚集引发T细胞活化和下游信号传导,导致但不限于IL-2产生。由于FS22-053和FS22-172在NFKB报告基因检测中被鉴定为具有活性,因此在T细胞活化试验中测试了它们激活CD137的能力。开发了一种使用经工程化以过度表达人CD137的D011.10 T细胞的D011.10 T细胞活化试验,并通过测量IL-2释放来评估T细胞活化。

[0605] 如前所述,用旨在过表达小鼠或人CD137的慢病毒载体转导D011.10 T细胞(国立犹太健康中心)。以及FS22-053和FS22-172,在此D011.10 T细胞活化试验中测试了以下克隆:FS22-007,FS22-033,FS22-042,FS22-049,FS22-050,FS22-052,FS22-054(均采用“模拟”He1D1.3 mAb<sup>2</sup>形式)。制备具有或不具有重组蛋白L(生命技术公司,21189)交联剂的mAb<sup>2</sup>或20H4.9阳性对照mAb的稀释液,并将其添加到已用0.1 $\mu$ g/ml抗CD3抗体(克隆17A2,生物传奇,100208)包被过夜的96孔圆底板中的D011.10.hCD137细胞中。孵育18小时后,按照制造商的说明收集上清液,并用小鼠IL-2ELISA试剂盒(eBioscience,88-7024-86)进行分析。使用具有Gens软件(BioTek)的酶标仪在450nm处读板。从450nm的吸光度值中减去570nm的吸光度值(校正)。用于计算细胞因子浓度的标准曲线基于四参数对数曲线拟合(Gens软件,BioTek)。将mIL-2的浓度相对mAb<sup>2</sup>或基准mAb的对数浓度作图,并在GraphPad Prism中使用

对数(激动剂)相对响应方程拟合所得曲线。

[0606] 当在该测定中与蛋白L交联时,克隆FS22-053和FS22-172显示出显著增强的活性。FS22-053未交联时的活性为126nM,交联时的活性为21nM(提高了6倍),而FS22-172未交联时的活性为950nM,交联时的活性为44nM(提高了22倍)。结果,两个克隆均被选择进行亲和力成熟。此外,尽管克隆FS22-033在该试验中没有活性,但也被选择进行亲和力成熟,因为它可能与重组抗原结合在不同的表位,因为它在BLI结合测定中不与克隆FS22-053和FS22-172竞争结合(数据未显示)。认为克隆与CD137的结合亲和力的改善也可以导致功能活性的改善(参见实施例4.1)。

[0607] 3.5以CD137/CD20 mAb<sup>2</sup>形式制备抗人CD137 Fcab

[0608] 制备了一组抗CD137 Fcab(FS22-053,FS22-175,FS22-176,FS22-177,FS22-178,FS22-179),以便以生物学相关性更高的mAb<sup>2</sup>形式表征Fcab。通过将包含AB、CD和EF环的部分CH3结构域Fcab替换为抗CD20 2F2克隆的CH3结构域的相应区域(来自US 8,529,902 B2)来制备mAb<sup>2</sup>,以生产与CD137和CD20均结合的mAb<sup>2</sup>。这些CD137/CD20 mAb<sup>2</sup>通过在HEK293-6E细胞中瞬时表达而产生,并使用mAb Select SuRe蛋白A柱进行纯化。

[0609] 3.6抗CD137/CD20 mAb<sup>2</sup>在D011.10 T细胞活化试验中的活性

[0610] 实施例3.4描述了一种T细胞活化测定法,其中使用蛋白L使抗CD137模拟mAb<sup>2</sup>交联。该设置提供了一种可靠且可再现的方式来筛选大量分子,尽管当抗体和mAb<sup>2</sup>形成较高阶结构时,交联是次优的并且不能代表生理环境。在生物学上更相关的设置是其中mAb<sup>2</sup>分子通过其Fab臂与生物系统中存在的靶标结合而交联的设置。这种基于细胞的体外系统可通过Fab与细胞膜结合来优化抗体和mAb<sup>2</sup>的呈递,从而驱动抗体聚集,进而增加CD137 Fcab臂对其在T细胞上靶标的亲和力。

[0611] 将CD20<sup>+</sup>Daudi细胞(ATCC CCL-213)与实施例3.4中使用的D011.10.hCD137细胞以1:1的比例接种在96孔圆形底板中。在该D011.10 T细胞活化试验中测试了实施例3.5中产生的6个CD137/CD20 mAb<sup>2</sup>克隆。制备具有或不具有重组蛋白L(生命技术,21189)交联剂的mAb<sup>2</sup>或阳性对照mAb的稀释液,并将其添加到已用0.1μg/ml抗CD3抗体(克隆17A2,BioLegend,100208)包被过夜的96孔圆底板中的D011.10.hCD137和Daudi细胞中。孵育18小时后,按照制造商的说明收集上清液,并用小鼠IL-2ELISA试剂盒(eBioscience,88-7024-86)进行分析。使用具有Gens软件(BioTek)的酶标仪在450nm处读板。从450nm的吸光度值中减去570nm的吸光度值(校正)。用于计算细胞因子浓度的标准曲线基于四参数对数曲线拟合(Gens软件,BioTek)。将mIL-2的浓度相对mAb<sup>2</sup>或基准mAb的对数浓度作图,并在GraphPad Prism中使用对数(激动剂)相对响应方程拟合所得曲线。在所有测试的克隆中,FS22-053是唯一在这种基于CD20细胞的交联体系中显示出大量IL-2产生的克隆,EC50为0.3nM(在没有CD20+细胞的情况下为126nM)。

[0612] 实施例3.4和3.6表明,当通过蛋白L或通过Fab结合测试的mAb<sup>2</sup>形式的另一靶标(He1D1.3和CD20)基于细胞的交联时,FS22-053可以驱动D011.10 T细胞表面上的CD137的聚集和活化。

[0613] 实施例4:抗人Fcab的亲和力成熟

[0614] 如前所述,根据在NF-κB报告基因检测,D011.10 T细胞活化检测中的它们的功能特性(FS22-053和FS22-172),或认为与CD137的不同区域结合(FS22-033),选择了三个克隆

进行亲和力成熟。

**[0615] 4.1FS22-033的亲和力成熟**

**[0616]** 从FS22-033克隆构建了两个酵母菌和两个噬菌体展示文库,一个通过随机化CH结构3域AB环中的五个残基,另一个通过使用ELLA引物随机化CH3结构域EF环中的五个残基。ELLA引物规定了每种氨基酸所用的密码子及其在混合物中的相对丰度。从混合物中仅排除半胱氨酸,并且没有偏倚任何其他氨基酸。

**[0617]** 对于噬菌体FS22-033 AB和FS22-033 EF文库,在第1轮中使用200nM hCD137-mFc-Avi和在第2轮中使用10nM hCD137-mFc-Avi对亲和力成熟的克隆进行了两轮选择。通过噬菌体ELISA筛选每个选择输出的96个克隆。该筛选鉴定出24个独特的克隆(FS22-033-001至FS22-033-024),所有这些克隆均以含有He1D1.3的模拟mAb<sup>2</sup>产生,然后如实施例3.2所述通过BLI测试改善的结合动力学。在该试验中,这24个亲和力成熟的克隆没有一个比亲本FS22-033克隆表现更好,因此未进行研究。对于酵母FS22-033 AB和FS22-033 EF文库,按如下方式进行三轮选择:用300nM hCD137-mFc-Avi进行第1轮和第2轮选择,然后用300nM hCD137-mFc-Avi、300nM食蟹猴CD137-mFc-Avi或300nM hCD137-Avi-his进行第三轮选择。对来自第2轮和第3轮输出的1056个克隆进行测序,在抗原结合流式细胞术分析中使用30nM人类二聚体重组抗原筛选所有鉴定出的独特克隆,与亲本FS22-033克隆相比,改进了与抗原的结合,并通过与结合强度相关的APC+细胞的百分比对克隆进行排名。最好的五个克隆(FS22-033-025,FS22-033-026,FS22-033-027,FS22-033-028,FS22-033-029)然后作为He1D1.3mAb<sup>2</sup>生产(如实施例3.1中所述),并且如前所述,通过BLI测试了与人二聚体重组抗原的结合,但是没有一个克隆显示出相对于亲本FS22-033克隆具有改善的动力学特性,因此不再进一步研究这些克隆。

**[0618] 4.2FS22-053和FS22-172的亲和力成熟**

**[0619]** 从FS22-053和FS22-172 Fcab克隆构建了四个酵母展示文库。在每个克隆的CH3结构域的AB环中,使用具有与实施例4.1中所述相同的三核苷酸分布的ELLA引物,随机分配七个残基(根据IMGT在15-16.1位),制成文库FS22-053 AB和FS22-172 AB。使用ELLA引物在CH3结构域的EF环中随机分配五个残基(根据IMGT在92-94和97-98位),得到文库FS22-053 EF和FS22-172 EF。

**[0620]** 对于文库FS22-053 AB和FS22-053 EF,以及FS22-172 AB和FS22-172 EF,在酵母文库中使用二聚体hCD137-mFc-Avi抗原或hCD137-Avi-His单体抗原进行了三轮或四轮选择以亲和力成熟克隆。单体抗原与二聚体抗原交替使用,以确保克隆保留对抗原的亲和力,并且不通过亲和力专门结合。单体或二聚体抗原的使用以及所使用的浓度在每轮中通过流式细胞术根据经验确定,由在上一轮中是否观察到针对单体或二聚体抗原的富集来确定。与亲本分子相比,尽可能使用亲本以上的分选门来分离亲和力成熟的克隆。二聚体抗原的选择压力增加到1nM。在每个选择轮次中,将单个克隆点在琼脂平板上以评估选择进度。每个克隆分别生长和诱导,然后如前所述,使用生物素化的二聚体抗原以及抗CH2结构标记,通过流式细胞术确定其结合和结构参数。遵循该筛选级联以允许基于来自选择输出的克隆样品确定选择成功,并允许早期筛选的单个克隆可以随后作为可溶性蛋白产生。

**[0621]** 如前所述,在抗原结合流式细胞术中筛选了总共1152个酵母单克隆与生物素化重组抗原结合。FS22-053 EF文库的选择导致138个独特环序列的富集。同样,从FS22-172 AB



文库中分离出30个独特的环序列。文库FS22-053 AB和FS22-172 EF不包含与亲本克隆相比显示出任何结合性改善的任何克隆。来自FS22-053 EF和FS22-172 AB文库的最佳结合克隆的序列分析揭示了AB环中保守的PPY序列模式。由于该序列在亲和力成熟后是保守的,并且是在两个独立的Fcab谱系中独立选择的,因此对于CD137上的表位结合可能很重要。此外,保守的LE或LD序列模式位于FS22-053和FS22-172谱系克隆的CH3结构域的EF环中,这表明EF环中的此氨基酸基序对于改善结合是必需的。

[0622] 为了评估选择的进度以及是否有必要在亲和力成熟的克隆之间重组突变的AB和EF环,FS22-053 EF文库的前五个独特克隆 (FS22-053-008,FS22-053-009,FS22-053-010,FS22-053-011,FS22-053-012) 通过表现出与10nM二聚体人类抗原的特异性结合排名(在流式细胞术结合测定中高于30%APC阳性细胞),FS22-172 AB文库的前6个独特克隆 (FS22-172-001,FS22-172-002,FS22-172-003,FS22-172-004,FS22-172-005,FS22-172-006,在同样的实验中用10nM二聚体人抗原筛选时,全部显示出高于10%的APC阳性细胞) 以模拟mAb<sup>2</sup> (He1D1.3) 和模拟mAb<sup>2</sup> (PD-L1) mAb<sup>2</sup>产生,以评估随机环的功能和动力学改进。

[0623] 实施例5:“模拟”mAb<sup>2</sup>形式的亲和力成熟的抗人CD137 Fcab的构建、表达和表征

[0624] 5.1“模拟”和模型mAb<sup>2</sup>形式的抗人类CD137 Fcab的构建

[0625] 衍生自亲本FS22-053克隆 (FS22-053-001至FS22-053-016) 的16个亲和力成熟克隆,以及衍生自亲本FS22-172克隆 (FS22-172-001至FS22-172-006) 的6个克隆以mAb<sup>2</sup>形式制备。克隆FS22-053-001至FS22-053-007不做进一步的研究,因为它们不以mAb<sup>2</sup>形式表达,其表达水平不允许下游纯化用于进一步的测试和表征。发现与衍生自亲本克隆的CH3序列相比,其余的克隆在其CH3结构域中具有至少95%的序列同一性。通过将每个氨基酸位置与参考序列(亲本克隆FS22-053或FS22-172) 进行比较,生成百分比序列相似性矩阵。(图1D显示了与亲本FS22-053 CH3结构域相比,克隆FS22-053-008至FS22-053-016和FS22-053-017(参见实施例10.1) 的CH3结构域的序列同一性百分比。图1E显示了与亲本FS22-053 CH3结构域相比,克隆FS22-172-001至FS22-172-006的CH3结构域的序列同一性百分比。

[0626] 制备了He1D1.3中包含抗人CD137 Fcab的“模拟”mAb<sup>2</sup>抗体,以进一步表征mAb<sup>2</sup>形式的亲和力成熟的Fcab。如实施例3.1中所述制备这些mAb<sup>2</sup>。

[0627] 还生产了mAb<sup>2</sup>模型,其包含抗人CD137 Fcab和PD-L1结合Fab区(来自US 8,217,149B2的克隆YW243.55.S70)。它们的制备类似于实施例3.1中所述的方法,通过用Fcab的相应区域代替含有AB、CD和EF环的抗PD-L1结合抗体的CH3的一部分。这些PD-L1型mAb<sup>2</sup>在CH2结构域(AA) 中包含LALA突变。已知在人IgG1的CH2结构域中引入LALA突变会减少Fcγ受体的结合(Bruhns,P.等人,(2009) 和Hezareh M.等人,(2001))。

[0628] 通过在HEK293-6E细胞中瞬时表达产生CD137/He1D1.3和CD137-AA/PD-L1mAb<sup>2</sup>,并使用mAb Select SuRe蛋白A柱进行纯化。

[0629] 5.2在人类NF-κB报告基因细胞测定中模拟mAb<sup>2</sup>形式的人Fcab活性

[0630] 在与实施例3.3中描述的相同的NF-κB荧光素酶测定法中测试了表3中列出的模拟mAb<sup>2</sup> (He1D1.3) 形式的亲和力成熟的抗人CD137 Fcab的功能活性。使用Gen5软件(BioTek) 在酶标仪中以0.5秒的积分时间测量发光。该测定的结果如表3和图2所示。如预期的那样,没有蛋白L交联(-XL) 时没有Fcab表现出活性。与亲本CD137 Fcab相比,所有亲和力成熟的CD137 Fcab均显示出巨大的改善,然而虽然在此测定中为阳性,但无法计算EC<sub>50</sub>值(参见实

施例3.3)。与蛋白L(+XL)交联时,FS22-053-008和FS22-172-003显示出最好的活性,每个家族的EC<sub>50</sub>最低。

[0631] 表3

Fcab 克隆 (HelD1.3 mAb <sup>2</sup> 形式)	带有或不带有蛋白 L 交联 (XL) 的 NF-κB 信号	
	-XL	+ XL (EC <sub>50</sub> nM)
[0632] FS22-053-008	N/A	26.34
FS22-053-009	N/A	64.57
FS22-053-010	N/A	47.48
FS22-053-011	N/A	32.78
FS22-053-012	N/A	119.3
[0633]	FS22-172-002	N/A
	FS22-172-003	N/A
	FS22-172-004	N/A
	FS22-172-005	N/A
	FS22-172-006	N/A

[0634] N/A-不适用,因为信号低无法确定EC<sub>50</sub>

[0635] 5.3在人D011.10 T细胞活化试验中亲和力成熟的模拟mAb<sup>2</sup>形式的人Fcab的活性

[0636] 在表4中列出的亲和力成熟的模拟mAb<sup>2</sup>形式的人Fcab (PD-L1 LALA) 的功能活性在D011.10 T细胞活化测定中进行了测试,类似于实施例3.6中所述的测定。

[0637] HEK.mPD-L1细胞是通过使用KpnI和NotI限制性位点亚克隆编码小鼠PD-L1的cDNA (SEQ ID NO:188) 进入pcDNA5FRT载体 (生命技术公司), 然后使用Lipofectamine 2000 (生命技术公司, 11668-019) 将载体转化进入Flp-In T-REx293细胞系 (生命技术公司, R780-07)。使细胞在含有10%FBS, 100μg/ml潮霉素B (Melford实验室有限公司, Z2475) 和15μg/ml灭瘟素 (Blasticidin) (Melford实验室有限公司, B1105) 的DMEM中生长3-4周, 直到形成稳定转化的细胞集落为止。这些菌落在存在1μg/ml强力霉素 (西格玛奥德里奇, D9891) 的情况下进行扩增, 并使用PE偶联的PE偶联抗小鼠PD-L1 (MIH5) 抗体 (BD生物科学, 558091) 测试PD-L1的表达。

[0638] 使用细胞解离缓冲液分离细胞, 用PBS洗涤一次, 并将2x10<sup>5</sup>细胞铺种在96孔板的孔中, 然后与在PBS中以1:20稀释的抗体一起在4℃下孵育1小时。细胞在PBS中洗涤一次, 然后在Accuri C6细胞仪 (BD生物科学) 上进行测量, 并使用FlowJoX分析数据。再次证实了小鼠PD-L1的表达。

[0639] 在该D011.10 T细胞活化测定中测试了实施例5.1中以CD137/PD-L1 mAb<sup>2</sup>产生的15个克隆。制备mAb<sup>2</sup>或阳性对照mAb的稀释液, 并添加至在已被0.1μg/ml抗CD3抗体 (克隆17A2, 生物传奇, 100208) 包被过夜的96孔平底板的D011.10.hCD137 (每孔7.5x10<sup>3</sup>细胞) 和HEK.mPD-L1细胞 (每孔2x10<sup>4</sup>细胞) 或D011.10.hCD137 (7.5x10<sup>3</sup>细胞每孔) 孔) 和未转导以表达mPD-L1的HEK细胞 (每孔2x10<sup>4</sup>细胞) 中。孵育18小时后, 按照制造商的说明收集上清液, 并用小鼠IL-2ELISA试剂盒 (eBioscience, 88-7024-86) 进行分析。使用具有Gens软件 (BioTek) 的酶标仪在450nm处读板。从450nm的吸光度值中减去570nm的吸光度值 (校正)。用于计算细胞因子浓度的标准曲线基于四参数对数曲线拟合 (Gens软件, BioTek)。将mL-2的

浓度相对mAb<sup>2</sup>或基准mAb的对数浓度作图,并在GraphPad Prism中使用对数(激动剂)相对响应方程拟合所得曲线。通过测量IL-2的释放来检测T细胞活化。

[0640] 该测定的结果如表4和图3所示。在未通过与表达PD-L1的细胞结合而交联时(没有基于细胞的XL柱)没有观察到T细胞活性。交联后,通过释放高水平的IL-2和亚纳摩尔EC<sub>50</sub>值可以看出,所有mAb<sup>2</sup>均具有有效的T细胞活性。在浓度增加时,阳性对照抗人CD137 mAb (G1-AA/20H4.9)显示mIL-2释放增加,但是最大释放显著低于抗人CD137 Fcab的最大释放。除FS22-053-009和FS22-172-005以外的所有克隆的EC<sub>50</sub>均小于0.3nM,因此即使不优于阳性对照也是如此。观察到的最低E<sub>max</sub>为7758pg/ml,高于阳性对照,它是最大T细胞活化的量度,可能与体内更大的T细胞抗肿瘤活性有关。

[0641] 表4

Fcab 克隆 (PD-L1 模拟 mAb <sup>2</sup> 形式) 或 mAb	有或没有 mPD-L1 HEK 交联的 IL-2 释放		
	没有基于细胞的 XL	+ XL E <sub>max</sub> (IL-2 pg/ml)	+ XL EC <sub>50</sub> (nM)
FS22-053	N/A	5366	0.28
FS22-053-008	N/A	8176	0.28
FS22-053-009	N/A	8083	0.52
FS22-053-010	N/A	8301	0.15
FS22-053-011	N/A	7923	0.28
FS22-053-012	N/A	9808	0.20
FS22-053-013	N/A	15551	0.12
FS22-053-014	N/A	12849	0.09
FS22-053-015	N/A	17079	0.18
FS22-053-016	N/A	18003	0.10
FS22-172	N/A	5952	0.53
FS22-172-001	N/A	10006	0.23
FS22-172-002	N/A	7001	0.20
FS22-172-003	N/A	10958	0.18
FS22-172-004	N/A	7758	0.24
FS22-172-005	N/A	13021	1.27
FS22-172-006	N/A	9089	0.32
G1-AA/20H4.9	N/A	3755	0.26

[0643] N/A-不适用,因为信号低无法确定EC<sub>50</sub>

[0644] 5.4原代人CD8<sup>+</sup>T细胞活化试验

[0645] 实施例5.3中显示了Fcab激活在过表达CD137的HEK细胞上的CD137的活性。为了测试Fcabs在尚未经过工程改造以过表达CD137的细胞上的活性,需要原代人类T细胞测定。活化的细胞毒性CD8<sup>+</sup>T细胞负责直接杀死癌细胞,并在其细胞表面表达CD137 (Ye等人,2014)。已知CD137的聚集对于诱导下游信号传导和进一步的CD8<sup>+</sup>T细胞活化至关重要。因此,CD8<sup>+</sup>T细胞活化试验用于评估Fcab(以mAb<sup>2</sup>形式,如下详述)驱动聚集和随后的CD137下游信号传导的能力。CD8<sup>+</sup>T细胞的活化是通过IL-2的释放来确定的。

[0646] 为了分离T细胞,从血小板捐赠的副产物白细胞耗竭锥(leucocyte depletion cones)中分离出外周血单核细胞(PBMC)。简而言之,用PBS冲洗白细胞锥内容物并覆盖在Ficoll(西格玛奥德里奇,1440-02)梯度上。通过离心分离PBMC,并回收未穿过Ficoll梯度的细胞。用PBS进一步洗涤PBMC,并根据制造商的说明通过添加10ml 1X红细胞裂解缓冲液

(eBioscience, 00-4300-54) 裂解剩余的红细胞。根据制造商的说明, 使用CD8<sup>+</sup>T细胞分离试剂盒II (美天旖生物技术有限公司, 130-096-495) 从洗脱液中存在的PBMC中分离出CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0647] 与抗CD3抗体一起孵育用作驱动T细胞初始活化的第一信号。将96孔平底组织培养板用在PBS中的8 $\mu$ g/ml抗CD3抗体(克隆UCHT1, R&D系统, MAB100-SP)于4 $^{\circ}$ C包被过夜。然后用200 $\mu$ l PBS洗板3次。

[0648] 对于亲和力成熟的PD-L1模拟mAb<sup>2</sup>形式的人CD137 Fcab基于细胞的交联, 基本上如实施例5.3中所述生产了过表达hPD-L1 (HEK.hPD-L1) 的HEK293细胞, 但是通过亚克隆编码人PD-L1的cDNA (SEQ ID NO:187), 而不是小鼠PD-L1。将HEK.hPD-L1细胞以每孔 $2 \times 10^5$ 细胞接种在抗CD3抗体 (8 $\mu$ g/ml) 包被的96孔平底板的100 $\mu$ l T细胞培养基中 (RPMI培养基 (生命技术公司, 61870-044), 含10% FBS (生命技术公司), 1X青霉素链霉素 (生命技术公司, 15140122), 1mM丙酮酸钠 (Gibco, 11360-070), 10mM Hepes (西格玛奥德里奇, H0887), 2mM L-谷氨酰胺 (西格玛奥德里奇, G7513) 和50 $\mu$ M 2-巯基乙醇 (Gibco, M6250))。孵育4小时后, 一旦HEK.hPD-L1细胞或未转导以表达hPD-L1的HEK细胞发生粘附, 则应去除所有T细胞培养基, 并用含有浓度为 $5.0 \times 10^5$ 细胞/ml的T细胞的100 $\mu$ l T细胞培养基替换, 产生 $5.0 \times 10^4$ 细胞/孔。

[0649] 将mAb<sup>2</sup>在T细胞培养基中以2X终浓度从500nM开始稀释, 并进行1:3滴定。将100 $\mu$ l的mAb<sup>2</sup>滴定液添加到细胞中, 测定总体积为200 $\mu$ l且抗体浓度为1X。

[0650] 将阳性对照抗CD137抗体 (G1-AA/20H4.9) 和阴性对照同型IgG抗体 (G1-AA/He1D1.3) 分别以2X终浓度在T细胞培养基中稀释, 起始浓度为500nM (含500nM交联剂 (抗人CH2, 克隆MK1A6 (Jefferis等人, 1985和Jefferis等人, 1992), 由内部生产), 并按1:3滴定。将100 $\mu$ l稀释的阳性对照抗体/交联剂混合物或阴性对照IgG抗体/交联剂混合物添加到细胞中, 以达到200 $\mu$ l的测定总体积且抗体浓度为1X。

[0651] 该测定在37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>下孵育72小时。收集上清液并用人IL-2ELISA Ready-SET-Go!试剂盒 (eBioscience, 目录号88-7025-88) 根据制造商的说明进行测定。使用带有Gen5软件 (BioTek) 的读板器在450nm处读板。从450nm的吸光度值中减去630nm的吸光度值 (校正)。用于计算细胞因子浓度的标准曲线基于四参数对数曲线拟合 (Gen5软件, BioTek)。将人IL-2 (hIL-2) 的浓度相对抗体的对数浓度作图, 并在GraphPad Prism中使用对数 (激动剂) 相对响应方程拟合所得曲线。

[0652] 表5显示了在以基于细胞的交联测试的PD-L1模拟mAb<sup>2</sup>形式的亲和力成熟的Fcab克隆存在下, 在T细胞活化试验中观察到的EC<sub>50</sub>值和IL-2释放的最大响应。阳性对照抗人CD137 mAb (20H4.9) 与抗hCH2抗体交联时, 表现出hIL-2释放增加, EC<sub>50</sub>为0.5nM。所有克隆在测定中均具有活性, 大多数克隆表现出亚纳摩尔EC<sub>50</sub>的良好效价。包含Fcab FS22-053-007, FS22-053-008, FS22-053-010, FS22-053-011, FS22-053-012, FS22-172-003, FS22-172-004, FS22-172-005的mAb<sup>2</sup>以最低的EC<sub>50</sub> (在0.19至0.49nM的范围内) 引起最大的T细胞反应。还测试了mAb<sup>2</sup>的子集 (包含Fcab FS22-053-008, FS22-053-011, FS22-053-014, FS22-173-003和FS22-172-004) 在未通过HEK上表达的PD-L1交联时, 如预期的那样, 在该测定中没有活性。这证实了在NF-kB试验和D011.10 T细胞活化试验中看到的活性。图4显示了用于FS22-053-007-AA/PD-L1, FS22-053-008-AA/PD-L1和FS22-172-002-AA/PD-L1, FS22-172-

003-AA/PD-L1,FS22-172-004-AA/PD-L1 mAb<sup>2</sup>的T细胞活化试验的IL-2释放的代表性图。

[0653] 表5

Fcab 克隆 (PD-L1 模拟 mAb <sup>2</sup> 形式) 或 mAb	通过 hPD-L1 HEK 交联的 IL-2 释放	
	供体 170505B	
	Emax	EC50 (nM)
FS22-053	4344	0.55
FS22-053-007	13119	0.22
FS22-053-008	25112	0.42
FS22-053-009	15230	0.69
[0654] FS22-053-010	13978	0.37
FS22-053-011	14959	0.19
FS22-053-012	12282	0.20
FS22-172	10729	1.83
FS22-172-001	19135	0.58
FS22-172-002	20615	2.69
FS22-172-003	30311	0.45
FS22-172-004	22611	0.36
FS22-172-005	23626	0.49
[0655] FS22-172-006	27871	0.89
20H4.9	14780	0.89
20H4.9 + XL	44940	0.50

[0656] 5.5通过表面等离子体共振 (SPR) 确定抗人CD137 Fcab的特异性

[0657] 测试了抗人CD137 Fcab对人CD137与其他相关TNFSFR家族成员相比的特异性。以模拟mAb<sup>2</sup> (He1D1.3) 形式测试了8个Fcab,并在Biacore T200 (GE保健公司) 中通过SPR通过测试与其他人TNFRSF受体:CD40,OX40和GITR的结合来进行测量。使用胺偶联剂 (胺偶联试剂盒,GE保健公司,BR-1000-50) 将人CD40,GITR和OX40在Biacore CM5芯片 (GE保健公司,目录号29149603) 上包被至约1000RU。模拟mAb<sup>2</sup>形式的抗人CD137 Fcab (FS22-053-008/He1D1.3,FS22-053-009/He1D1.3,FS22-053-010/He1D1.3,FS22-053-011/He1D1.3,FS22-053-012/He1D1.3,FS22-053-014/He1D1.3,FS22-172-003/He1D1.3,FS22-172-004/He1D1.3) 稀释液在HBS-EP+缓冲液 (BR100669) 中以1μM开始制备,以30μl/min的速度注入3分钟,然后在缓冲液中解离4分钟。通过以30μl/min的速度注入pH 2.5的10mM甘氨酸12s来再生芯片。将针对不同TNFRSF成员的特异性抗体用作阳性对照,以验证Biacore芯片包被。用BIAevaluation3.2软件对数据进行双参考减法分析。Fcab不结合任何测试的TNFRSF受体,证明了它们对CD137的特异性。结果预计Fcab不会引起脱靶结合。

[0658] 5.6通过SPR测试模拟mAb<sup>2</sup>形式的抗人CD137 Fcab对人、食蟹猴和小鼠CD137的结合亲和力

[0659] 抗人CD137 Fcab (FS22-053-008,FS22-053-011,FS22-053-014,FS22-172-004,FS22-172-004) 对人、食蟹猴 (cyno) 和小鼠CD137的亲和力通过SPR测定,以确定Fcab是否可用于动物研究中的检测。按照制造商的建议 (GE保健公司,人Fab捕获试剂盒,#28958325),将抗人Fab捕获抗体固定在CM5系列S芯片 (GE保健公司#BR-1005-30) 的所有四个流通池上,平均表面密度为6000RU。通过以30μl/min的速度注入在HBS-EP+缓冲液 (GE保健公司#BR1006-69) 中稀释的3μg/ml mAb<sup>2</sup>溶液,将每个mAb<sup>2</sup>捕获至约150RU。然后将HBS-EP+缓冲液中不同浓度的人、食蟹猴或小鼠CD137抗原 (未生物素化的人、食蟹猴或小鼠CD137-mFc-Avi

或人CD137-Avi-His)以60 $\mu$ l/min的流速流过芯片3分钟,然后使其解离10分钟。在每种抗原浓度后,通过以30 $\mu$ l/min的流速注入pH 2.1的10mM甘氨酸30秒来再生芯片。在最高浓度的抗原之前和最低浓度的抗原之后注入缓冲液HBS-EP+以进行参考扣除,并随机重复其中一种浓度两次。用1:1Langmuir模型拟合结合动力学,以生成每个样品的平衡结合常数( $K_D$ )。数据分析使用BiaEvaluation软件3.2版进行。结果如表6所示。

[0660] 结果分析表明,与各个亲本分子相比,所有亲和力成熟的克隆对人和食蟹猴CD137的结合都有改善。对单体人CD137抗原的结合亲和力比对二聚人和食蟹猴Fc融合抗原弱(至少100倍)。如实施例2所述,所选Fcab优先与二聚体CD137而不是单体形式的CD137结合,该数据证实选择策略成功。这种动力学行为使它们不太可能与未刺激的T细胞上以最低水平表达的单体CD137结合,从而导致降低了与某些抗CD137单克隆抗体疗法相关的肝脏或全身毒性的风险。

[0661] 此数据还表明,抗人CD137 Fcab以与人二聚体CD137相当的亲和力与食蟹猴二聚体CD137结合。

[0662] 还测试了Fcab结合小鼠二聚体CD137的能力。除克隆FS22-053-014被意外发现对小鼠抗原的 $K_D$ 为24nM以外,其他克隆均未显示与小鼠抗原的强结合(如表6所示,其中N/A表示无法计算出 $K_D$ )。这是出乎意料的,因为小鼠CD137和人CD137共享少于57%的序列同源性。

[0663] 表6

[0664]	Fcab	人二聚体 CD137 $K_D$ (nM)	食蟹猴二聚体 CD137 $K_D$ (nM)	人单体 CD137 $K_D$ 相对 于人二聚体 $K_D$ 的倍数 差异	小鼠二聚体 CD137 $K_D$ (nM)
	FS22-053	38	34	N/A	N/A
	FS22-053-008	4.2	0.9	170 倍	N/A
	FS22-053-011	5.5	1.3	> 200 倍	N/A
	FS22-053-014	3.2	0.9	100 倍	24
	FS22-172	52	203	N/A	N/A
	FS22-172-003	1.5	1.3	> 200 倍	N/A
	FS22-172-004	4.3	3.5	> 200 倍	N/A

[0665] N/A-不适用,因为信号低无法确定 $K_D$

[0666] 5.7使用异源二聚和同源二聚Fcab确定Fcab结合价

[0667] Fcab通常包含两条同源二聚Fc链,在CH3结构域中具有抗原结合位点。由于两个CH3结构域中的这些抗原结合位点非常接近,因此测试了Fcab的结合价,以确定CH3结构域是否可以彼此独立地与CD137结合。使用柞臼突变(柞:T22W,臼:T22S L24A Y66V)(Atwell S等人,1997),通过将FS22-172-003的一条链与野生型Fc的一条链结合来构建包含单个抗原结合CH3结构域的异源二聚体Fcab。因此,每个异源二聚体在一条链中包含来自FS22-172-003(SEQ ID NO:139)的CH3和在另一条链中包含野生型CH3(SEQ ID NO:4)。以mAb<sup>2</sup>形式制备Fcab。

[0668] 通过SPR结合分析将异源二聚体Fcab与FS22-172-003同源二聚体分子(包含两个抗原结合CH3结构域)进行比较。对于该实验,单体人CD137-mFc-Avi比二聚体CD137抗原更优选。为了补偿实施例5.6中描述的与单体抗原的较弱结合,将人CD137-mFc-Avi固定在CM5芯片上至更高的450RU的密度。注入异源二聚体或同源二聚体Fcab,使其流过固定的抗原。图14中的结果表明,即使在这些次优条件下,仅包含一个CD137结合CH3结构域的源异二聚

体Fcab也能够结合抗原。观察到的异源二聚体Fcab的离解速率显著快于同源二聚体Fcab。这些结果证实了FS22-172-003Fcab能够通过任一个或两个CH3结构域与CD137结合,并且证实了实施例2中所述的选择策略是成功的,因为Fcab能够双价地结合其靶标。

[0669] 5.8抗CD137 Fcab与具有不同CD137表达水平的细胞的结合

[0670] 如实施例2中所述,选择Fcab结合CD137,使得它们优先结合具有升高的CD137表达水平的细胞。在实施例5.6中通过SPR确认了FS22-172-003的二价和因此而产生的亲和结合:与单体CD137相比,FS22-172-003表现出高亲和力和对二聚体CD137更强的结合。

[0671] 如实施例3.5中所述,产生表达不同水平的CD137的一系列D011.10细胞。为了确定每种细胞系中CD137的相对表达,根据制造商的方案(Quantum<sup>TM</sup>SimplyCellular® #816 Bangs Labs)确定了抗体结合能力(ABC)。减去背景后,按照CD137表达水平的顺序对每个细胞系进行排名:hCD137高(ABC:1206283),hCD137中等(ABC:404597),hCD137中/低(ABC:143065),hCD137低(ABC:14208),hCD137阴性(ABC:0)。

[0672] 对模拟mAb<sup>2</sup>形式的抗人CD137Fcab(FS22-172-003-AA/He1D1.3),阳性对照抗体(G1-AA/20H4.9)或同种型对照(G1-AA/He1D1.3)与上述每种细胞的结合测试如下:从T175细胞培养瓶中收获D011.10细胞,并以1200rpm离心3分钟,然后以 $2 \times 10^6$ /ml细胞重悬于由DPBS(生命技术公司,14190169)和1%BSA(西格玛奥德里奇,A7906)组成的冰冷FACS缓冲液中,每孔50 $\mu$ l接种在96孔V型底板中(Costar,3894)。将所有测试的抗体在120 $\mu$ l的FACS缓冲液中稀释。然后将D011.10细胞离心,除去上清液,并将细胞重悬于每种抗体稀释液100 $\mu$ l中,并在4℃下孵育45分钟。用150 $\mu$ l FACS缓冲液离心将细胞洗涤两次,重悬于100 $\mu$ l以1:1000的比例稀释的含山羊抗人IgG( $\gamma$ 链特异性)F(ab')<sub>2</sub>片段-R-藻红蛋白抗体(西格玛,P8047)的FACS缓冲液中,并在4℃下孵育45分钟。用150 $\mu$ l FACS缓冲液洗涤细胞一次,然后用150 $\mu$ l DPBS洗涤,重悬于1:10,000的含有DAPI(Biotium,40043)的150 $\mu$ l DPBS中,并在BDCantoII或iQue(Intellicyt)上读数。使用FlowJo v10分析数据,以确定每个孔中活细胞的PE信号几何平均值。

[0673] 如图15所示,与阳性对照G1-AA/20H4.9相比,FS22-172-003-AA/He1D1.3与具有较高CD137表达的细胞结合更强(图15D:CD137中等和图15E:CD137高),并且不与表达非常低水平的CD137的细胞结合(图15B:CD137低和图15C:CD137中等/低)。相比之下,阳性对照G1-AA/20H4.9与二聚体和单体抗原的结合更好,与二聚体或单体抗原的结合的K<sub>D</sub>在彼此的10倍之内,与FS22-172-003-AA/He1D1.3不同,如实施例5.6中所述,其与单体CD137抗原的结合比二聚体抗原弱至少200倍。

[0674] 实施例6:抗小鼠CD137抗体的初始选择

[0675] 为了在体内小鼠模型中测试抗CD137 Fcab的活性,生成并表征了与小鼠CD137特异性结合的Fcab。

[0676] 噬菌体展示

[0677] 先前用于选择与人CD137结合的Fcab的展示人IgG1 CH3结构域的六个天然噬菌体文库用于选择与小鼠CD137结合的Fcab,其中重组小鼠二聚体CD137或表达全长小鼠CD137的细胞用作抗原。

[0678] 使用六个噬菌体库的筛选中使用了内部mCD137-mFc-Avi抗原和表达mCD137的D011.10细胞(D011.10.mCD137)。遵循简单的选择方案,其中使用100nM生物素化抗原进行

所有选择轮次(总共三轮),使用500nM未标记重组人Fc片段进行去选择步骤。结合物被包被在链霉亲和素或中性亲和素上的磁珠捕获。此外,在表达小鼠CD137的D011.10.mCD137细胞上的选择中也使用了与重组抗原结合的第1轮输出。简而言之,将噬菌体输出与缺少小鼠CD137的D011.10细胞一起孵育,以去除不需要的结合物,例如非特异性结合细胞的结合物。接下来,将噬菌体与 $1 \times 10^7$  D011.10.mCD137细胞孵育。然后通过胰蛋白酶消化洗脱结合物,然后进行第二轮选择。第三轮遵循类似的过程,通过将D011.10.mCD137细胞的数量减少到 $5 \times 10^6$ 来增加选择压力。

[0679] 通过噬菌体ELISA(如前所述)筛选所有第3轮重组抗原输出(576个克隆)和所有第3轮细胞选择输出(576个克隆),并用于细胞与D011.10.mCD137细胞的结合。对于ELISA,大多数克隆都表现出高抗原结合信号强度( $OD_{450} > 1$ )。因此,去除显示出与和小鼠-Fc的结合相比抗原结合增加不到10倍的克隆。对于细胞结合,FITC MFI高于 $5 \times 10^5$ 被认为是阳性。三个噬菌体文库的性能明显较差,许多克隆表现出与D011.10.mCD137细胞和重组抗原的非特异性结合。如实施例3.1中所述,将34个Fcab克隆命中物亚克隆并产生为He1D1.3mAb<sup>2</sup>。

[0680] 酵母展示

[0681] 先前用于选择与人CD137结合的Fcab的展示人IgG1的CH1至CH3结构域四个天然酵母文库用于选择与小鼠CD137结合的Fcab。

[0682] 总共进行了53轮独立选择,以鉴定抗小鼠CD137结合物。内部生产的重组二聚体生物素化小鼠CD137(mCD137-mFc-Avi)抗原用于从天然酵母文库中选择结合物。简而言之,通过将天然文库与300nM重组抗原孵育来选择第1轮结合物,并用 $2.5 \mu\text{M}$ 未标记的小鼠IgG2a Fc片段进行去选择。使用MACS和链霉亲和素磁珠分离输出。如前面的实施例2所述,分别使用300nM重组抗原和 $1.5 \mu\text{M}$ 小鼠Fc进行三轮FACS选择的选择和去选择。

[0683] 将第2、3和4轮的单个克隆点到琼脂平板上。为了确定输出多样性,对每个选择输出的至少96个克隆进行了测序。通过流式细胞术筛选了126个独特的克隆(一个文库来自第3轮的50个克隆,另一个文库来自第3轮的48个克隆,其余文库来自第4轮的18个克隆)与重组抗原的结合。与重组抗原孵育时,在APC荧光通道中显示出高于10%阳性细胞的克隆,以及与重组mFc孵育时低于0.2%的克隆被视为命中。

[0684] 实施例7:来自初始选择的抗小鼠CD137 Fcab的表征

[0685] 7.1通过BLI确定抗小鼠CD137 Fcab的特异性

[0686] 抗小鼠CD137 Fcab对小鼠CD137的特异性以He1D1.3“模拟”mAb<sup>2</sup>形式进行了测试,并通过Octali QKe系统中的BLI通过测试Fcab与其他小鼠TNFRSF受体(CD40、OX40、GITR)的结合进行了测量。链霉亲和素生物传感器(PALL ForteBio18-5021)包被 $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 小鼠CD40、GITR、OX40受体(全部从R&D系统获得并使用赛默飞科技#21328的EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin试剂盒进行生物素化)。将模拟mAb<sup>2</sup>形式的抗小鼠CD137 Fcab在动力学缓冲液(PALL 18-1092)中以1:1稀释至最终浓度至少为 $1 \mu\text{M}$ 。将包被抗原的传感器浸入mAb<sup>2</sup>溶液中180秒,然后在 $1 \times$ 动力学缓冲液中浸泡180秒。将每种TNFRSF受体的抗体用作阳性对照。Fcab克隆FS22m-055,FS22m-063,FS22m-066,FS22m-075,FS22m-135,FS22m-055,FS22m-063,FS22m-066不与任何测试的TNFRSF受体结合,因此证明了它们对小鼠CD137的特异性。

[0687] 7.2在小鼠NF- $\kappa$ B报告基因细胞分析中模拟mAb<sup>2</sup>形式的小鼠Fcab的活性

[0688] 表达小鼠CD137序列(SEQ ID NO:184)的HEK.FRT.luc细胞是按照与实施例3.3相



同的方法制备的。根据实施例3.3中所述的方法,使用该细胞系HEK.FRT.luc.mCD137筛选含有先前选择的抗小鼠CD137 Fcab的mAb<sup>2</sup>。测试了56个mAb<sup>2</sup>,其中29个NF-kB活性呈阳性。含有带有LALA突变的人IgG1 Fc的Lob12.3(G1AA/Lob12.3)被用作阳性对照抗小鼠CD137 mAb,并显示出增加的发光,从而证实了该测定的有效性。He1D1.3(也包含具有LALA突变的人IgG1 Fc)被用作阴性对照人IgG同种型,以排除此试验中来自人IgG模拟Fab的干扰。在可能的情况下计算EC50,而活性未达到稳定状态的mAb<sup>2</sup>则被忽略,取而代之的是显示经典S型活性动力学的mAb<sup>2</sup>。mAb<sup>2</sup>按EC50和蛋白质L交联后活性倍数变化的顺序排列。选择FS22m-063是基于它具有最佳的交联EC50(1.44nM)和最高的交联活性倍数变化(27倍)。图5显示,在HEK mCD137 NF-kB报告基因分析中,He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>形式的抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063与蛋白L交联时,会驱动CD137聚集和NF-kB信号传导。

[0689] 实施例8:FS22m-063Fcab(以FS22m-063-AA/PD-L1 mAb<sup>2</sup>)的体内抗肿瘤活性

[0690] 已经表明FS22m-063Fcab能够在体外驱动CD137的聚集和活化,因此需要测试它们在体内激活CD137的能力。

[0691] 8.1制备mAb<sup>2</sup>形式的FS22m-063Fcab以在小鼠中进行体内测试

[0692] 使用类似于实施例7.1中产生模拟mAb<sup>2</sup>的方法,制备了包含抗小鼠CD137Fcab(FS22m-063)和PD-L1特异的Fab区的mAb<sup>2</sup>,并测试了其在MC38同系小鼠肿瘤模型中的体内抗肿瘤活性。

[0693] 对照:G1-AA/Lob12.3,G1-AA/S70,G1-AA/4420。

[0694] 通过将抗PD-L1抗体S70(来自US 8,217,149 B2的克隆YW243.55.S70)的重链可变区连接到包含LALA突变的人IgG1(G1m17)恒定区,并且将来自S70抗体的轻链可变区通过人κJ区与人恒定区(Lm1)连接,来生产体内实验的对照抗体。通过用FS22m-063替换上述重组过的构建体的CH3结构域来生成mAb<sup>2</sup>,并将其命名为“FS22m-063-AA/S70”。

[0695] 8.2FS22m-063-AA/S70 mAb<sup>2</sup>在MC38同系肿瘤模型中的活性

[0696] 同系小鼠模型被认为是用于测试抑制治疗靶点的抗肿瘤作用的合适的鼠类系统,并已广泛用于验证人类治疗剂的开发。MC38同系肿瘤模型用于本实验,因为已知MC38肿瘤具有高度免疫原性,并且对抗CD137抗体单一疗法有反应(Kocak等人,2006)并表达PD-L1(Juneja等人,2017)。

[0697] 在研究开始之前,将9-10周龄,每只重17.92至23.89g的C57BL/6雌性小鼠(杰克逊实验室)休息一星期。将所有动物植入微芯片,并赋予唯一的标识符。每个队列有12只小鼠。首先扩增、储存了MC38结肠癌细胞系(美国国家癌症研究所),然后对病原体进行了预筛查,结果表明它们不含病原体。每只动物接受在右侧皮下注射在100μl无血清培养基(Dulbecco的改良Eagle培养基)中的1x 10<sup>6</sup>细胞。接种肿瘤细胞后7天,将在此时间点没有肿瘤的小鼠从研究中移除。

[0698] 将FS22m-063-AA/S70 mAb<sup>2</sup>和对照抗体(G1-AA/Lob12.3(CD137阳性对照),G1-AA/S70(阳性对照PD-L1),G1-AA/4420(同种型对照))在DPBS+1mM精氨酸+0.05Tween 80中以每剂20μg的固定浓度腹膜内注射到小鼠体内。在肿瘤接种后第7、9和11天,每只小鼠通过200μl腹膜内(IP)注射接受mAb<sup>2</sup>分子或对照抗体。进行了精确的肿瘤测量,在所述日期进行了任何药物剂量的给药,并且在剩余的研究中对小鼠进行了密切观察。用卡尺进行肿瘤体积测量,以确定肿瘤的最长轴和最短轴。以下公式用于计算肿瘤体积:

[0699]  $L \times (S^2) / 2$

[0700] 其中L=最长轴;S=最短轴

[0701] 如图6所示,与使用任何对照抗体处理的小鼠相比,FS22m-063-AA/S70 mAb<sup>2</sup>表现出显著的肿瘤生长抑制作用。使用混合模型分析比较了所有组,在整个研究时间内增长率的统计显著性成对显示。如表7所示,出乎意料的是,在研究结束时,用FS22m-063-AA/S70 mAb<sup>2</sup>治疗的所有小鼠均无肿瘤,相比之下,在用抗PD-L1和抗CD137抗体(G1-AA/S70+G1-AA/Lob12.3)组合治疗或仅PD-L1或CD137抗体的12只小鼠中只有4只无肿瘤。

[0702] 表7:MC38同系肿瘤模型中每个治疗组的无肿瘤小鼠

[0703]	组	%无肿瘤小鼠	无肿瘤小鼠数目
	G1-AA/Lob12.3	16%	2/12
[0704]	G1-AA/4420	0%	0/12
	G1-AA/S70	16%	2/12
	G1-AA/S70 + G1-AA/Lob12.3	33%	4/12
	FS22m-063-AA/S70	100%	12/12

[0705] 该研究表明,在具有完全正常免疫系统的小鼠中,CD137激动可能是通过PD-L1交联的结果,导致肿瘤的生长减少,可能是由于肿瘤中CD8<sup>+</sup>T细胞的细胞毒性增加。

[0706] 实施例9:FS22m-063Fcab(以FS22m-063-AA/PD-1mAb<sup>2</sup>)的体内抗肿瘤活性

[0707] 已经证明FS22m-063Fcab能够在体外驱动CD137的聚集和激活,因此需要测试它们通过另一个Fab靶标激活CD137的能力(在这种情况下在体内仅在免疫细胞上发现一个靶标,PD-1)

[0708] 9.1制备mAb<sup>2</sup>形式的FS22m-063Fcab以在小鼠中进行体内测试

[0709] 使用与实施例7.1中产生的模拟mAb<sup>2</sup>类似的方法,制备了包含抗小鼠CD137Fcab,FS22m-063和PD-1特异性的Fab区的mAb<sup>2</sup>,并在MC38同系小鼠肿瘤模型中测试了体内抗肿瘤活性。

[0710] 通过将抗PD-L1抗体F2(来自W0 2004/056875 A1的克隆PD1-F2)的重链可变区连接到包含LALA突变的人IgG1(G1m17)恒定区,并且将来自F2抗体的轻链可变区通过人κJ区与人恒定区(Lm1)连接,来生产体内实验的对照抗体。通过用FS22m-063替换上述重组过的构建体的CH3结构域来生成mAb<sup>2</sup>,并将其命名为“FS22m-063-AA/F2”。

[0711] 9.2FS22m-063-AA/F2 mAb<sup>2</sup>在MC38同系肿瘤模型中的活性

[0712] 如实例8.2所述,MC38同系肿瘤模型用于本实验,但存在以下偏差:

[0713] 将9-11周龄的C57BL/6雌性小鼠(查尔斯河)植入微芯片,并赋予其唯一标识符。每个队列有12只小鼠。每只动物接受在右侧皮下注射在100μl无血清培养基中的1x 10<sup>6</sup>MC38结直肠癌细胞。

[0714] FS22m-063-AA/F2 mAb<sup>2</sup>和对照抗体(G1-AA/Lob12.3(CD137阳性对照),G1-AA/F2(阳性对照PD-1),G1-AA/4420(同种型对照))在DPBS+1mM精氨酸+0.05Tween 80中以每剂20μg的固定浓度腹膜内注射到小鼠体内。一旦肿瘤体积达到50-60mm<sup>3</sup>(第0天)并且在第一次给药后的第2天和第4天,每只小鼠通过200μl腹膜内(IP)注射接受mAb<sup>2</sup>分子或对照抗体。如实施例8.2中所述测量肿瘤。

[0715] 如图7A和B所示,与用同种型对照抗体阳性对照PD-1抗体治疗的小鼠相比,FS22m-063-AA/F2 mAb<sup>2</sup>显示出高度显著的肿瘤生长抑制。如表8所示,在研究结束时,出乎意料的

是用FS22m-063-AA/F2 mAb<sup>2</sup>治疗的12只小鼠是无肿瘤的,相比之下,在用抗PD-L1和抗CD137抗体(G1-AA/S70+G1-AA/Lob12.3)组合治疗的12只小鼠中只有7只是无肿瘤的。

[0716] 表8

[0717]	组	%无肿瘤小鼠	无肿瘤小鼠数目
	G1/Lob12.3	50%	6/12
	G1-AA/4420	0%	0/12
	G1-AA/F2	16%	2/12
	G1-AA/F2+G1-AA/Lob12.3	50%	6/12
	FS22m-063-AA/F2	83%	10/12

[0718] 该研究表明,在具有完全免疫系统功能的小鼠中,CD137激动作用可能是通过PD-1参与的交联和附加的PD-1阻断作用的结果,导致肿瘤的生长减少,可能是由于肿瘤中CD8<sup>+</sup>T细胞的细胞毒性增加。

[0719] 还显示当CD137 Fcab为mAb<sup>2</sup>形式时,可以通过Fab臂与免疫细胞靶标的结合而发生交联,从而导致CD137的聚集和激活。

[0720] 实施例10:mCD137/MSLN mAb<sup>2</sup>的体内抗肿瘤活性

[0721] 已经显示出包含FS22m-063Fcab和PD-L1 Fab的mAb<sup>2</sup>的功效(实施例8),希望测试mAb<sup>2</sup>形式的CD137 Fcab通过其Fab臂与肿瘤特异性抗原(TAA)(在这种情况下是间皮素(MSLN))导致的mAb<sup>2</sup>交联来活化CD137的能力。预期这种靶向肿瘤的方法在将T细胞活化定位于肿瘤微环境方面是有益的,因为仅在表达MSLN的地方发生mAb<sup>2</sup>的交联以及CD137的激动作用。

[0722] 构建了表达小鼠MSLN的同系小鼠肿瘤模型。表达全长小鼠间皮素(SEQ ID NO: 189)的CT26结肠癌细胞(ATCC,CRL-2638)通过使用pcDNA3.1载体(+) (赛默飞世尔科技,目录号V79020)进行脂质体转染(Lipofectamine 3000,赛默飞世尔科技,目录号L3000008)制备。按照制造商的方案,将CT26细胞用含有小鼠MSLN cDNA的pcDNA3.1载体转染。使用遗传霉素作为选择抗生素(600μg/ml)在完全培养基(RPMI,10%FBS)中可实现稳定的转染。

[0723] 通过使用阳性对照抗体MOR6626(WO 2009/068204 A1),通过流式细胞术确认了小鼠MSLN在CT26细胞上的表达。具体地,将细胞与阳性对照抗体一起孵育1小时,然后使用荧光标记的抗人IgG检测抗体(Stratech科技有限公司,目录号109-546-098-JIR)检测细胞结合。扩增克隆群,然后使用相同的流式细胞术分析确定其相对表达水平,然后选择一个克隆并命名为CT26.G10。

[0724] CT26.G10肿瘤生长被确认为体内。将8-10周龄的Balb/c雌性小鼠(查尔斯河)植入微芯片,并赋予其唯一标识符。每组有17只小鼠,每只动物接受在右侧皮下注射在100μl无血清培养基中的1x 10<sup>5</sup>细胞。每周用卡尺进行三次肿瘤体积测量,如实施例8中所述。根据实施例8中所述的英国内政部法规进行研究。

[0725] 在研究结束时收集组织,并通过免疫组织化学染色在福尔马林固定石蜡包埋的(FFPE)肿瘤组织中确认膜结合的间皮素的表达,如下所示:将4μm FFPE组织切片脱去石蜡,并在97℃下使用低pH 6.1(Dako PT Link)抗原修复,然后用过氧化物酶封闭和蛋白质封闭,然后与浓度为1μg/ml的抗间皮素一抗一起孵育(生命周期生物科学,目录号LS-C407883)。使用标记的聚合物-HRP抗兔第二试剂和DAB(3,3'-二氨基联苯胺)显色终点

(Dako EnVision+系统)检测抗间皮素抗体。

[0726] 为了评估Fcab FS22m-063的功效,体内测试了以下分子或组合:具有LALA突变的人IgG1同种型的抗MSLN FS28m-228-010抗体(G1-AA/FS28m-228-010),两种模拟mAb<sup>2</sup>形式的Fcab(FS22m-063-AA/He1D1.3和FS22m-063-AA/4420),FS28m-228-010抗体与具有LALA突变的模拟CD137 mAb<sup>2</sup>(G1-AA/FS28m-228-010+FS22m-063-AA/He1D1.3),人同种型对照抗体(G1-AA/He1D1.3),最后是具有LALA突变的CD137/MSLNmAb<sup>2</sup>(FS22m-063-AA/FS28m-228-010)。

[0727] 在研究开始之前,将8-10周龄且每只体重20-25g的Balb/c雌性小鼠(查尔斯河)休息1周。将所有动物植入微芯片,并给予唯一标识。除FS22m-063-AA/4420(n=10小鼠)外,每个队列包括20只小鼠。扩增CT26.G10结肠癌细胞系并产生细胞库。每只动物接受在左侧皮下注射在100μl无血清培养基中的 $1 \times 10^5$ 细胞。肿瘤细胞接种后12天没有肿瘤的小鼠从研究中去除。

[0728] 制备了200μg剂量的每种抗体(~10mg/kg),并将其腹膜内(IP)注射小鼠。另外,对于组合组,FS22m-063-AA/He1D1.3和G1-AA/FS28m-228-010均以每剂200μg(~10mg/kg)制备。接种肿瘤后第12、14和16天,对小鼠施用200μl剂量(q2dx3)。每周使用卡尺进行三次肿瘤体积测量,并密切监测小鼠。研究终点是根据小鼠的肿瘤体积和状况通过人道终点确定的。

[0729] 如图9所示,与G1-AA/He1D1.3同型对照相比,FS22m-063-AA/FS28m-228-010mAb<sup>2</sup>显著抑制了肿瘤的生长。表9显示了在整个研究过程中使用混合模型分析对所有治疗组的肿瘤生长率的成对比较,将所有组与G1-AA/He1D1.3同种型对照进行了比较。

[0730] 表9:使用混合模型分析成对比较肿瘤生长的结果,将所有组与G1-AA/He1D1.3同种型对照进行比较。

组	P 值 混合模型分析	
G1-AA/He1D1.3 10mg/kg (阴性对照)		
G1-AA/FS28m-228-010 10mg/kg	0.4367	NS
[0731] FS22m-063-AA/He1D1.3 10mg/kg	0.0017	***
FS22m-063-AA/4420 10mg/kg	0.7067	NS
G1-AA/FS28m-228-010 10mg/kg + FS22m-063-AA/He1D1.3 10mg/kg	0.2093	NS
FS22m-063-AA/FS28m-228-010 10mg/kg	0.0000	****

[0732] NS  $p \geq 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ 在研究结束时,所有荷载的肿瘤等于或小于 $62.5\text{mm}^3$ 的动物均被视为完全应答动物(见表10)。在研究结束时,抗CD137/MSLN mAb<sup>2</sup>治疗的动物中有35%对治疗完全反应,而在G1-AA/He1D1.3同种型对照,FS22m-063-AA/He1D1.3,FS22m-063-AA/4420,以及FS22m-063-AA/He1D1.3和G1-AA/FS28m-228-010组合组中则为0%。

[0733] 表10:到研究结束时,在CT26.G10同系肿瘤模型中无肿瘤小鼠(肿瘤 $\leq 62.\text{mm}^3$ )的数量和百分比。

[0734]	组	研究结束时无肿瘤小鼠
	G1-AA/He1D1.3 10mg/kg (阴性对照)	0/20(0%)
	G1-AA/FS28m-228-010 10mg/kg	1/20(5%)
	FS22m-063-AA/He1D1.3 10mg/kg	0/20(0%)
	FS22m-063-AA/4420 10mg/kg	0/10(0%)
	G1-AA/FS28m-228-010 10mg/kg + FS22m-063-AA/He1D1.3 10mg/kg	0/20(0%)
	FS22m-063-AA/FS28m-228-010 10mg/kg	7/20(35%)

[0735] 生存分析(图10和表11)显示,与G1-AA/He1D1.3抗体相比,FS22m-063-AA/FS28m-228-010mAb<sup>2</sup>诱导了显著的生存优势,而组分(G1-AA/FS28m-228-010,FS22m-063-AA/He1D1.3)或G1-AA/FS28m-228-010+FS22m-063-AA/4420没有显示出生存优势。此外,与G1-AA/He1D1.3(29天),FS22m-063-AA/He1D1.3(30天),FS22m-063-AA/4420(29天),G1-AA/FS28m-228-010(30天)以及FS22m-063-AA/He1D1.3与G1-AA/FS28m-228-010的组合(29天)相比,FS22m-063-AA/FS28m-228-010mAb<sup>2</sup>的中位生存时间延长为42.5天。

[0736] 表11:用每种化合物处理的动物的中位存活时间,以及CT26.G10同系肿瘤模型中成对统计分析(对数秩)的结果。

[0737]	组	中位生存期(天)	P 值 对数秩	
	G1-AA/He1D1.3 10mg/kg	29		
	G1-AA/FS28m-228-010 10mg/kg	30	0.993	NS
	FS22m-063-AA/He1D1.3 10mg/kg	30	0.3952	NS
	FS22m-063-AA/4420 10mg/kg	29	0.9645	NS
	G1-AA/FS28m-228-010 10mg/kg + FS22m-063-AA/He1D1.3 10mg/kg	29	0.4706	NS
	FS22m-063-AA/FS28m-228-010 10mg/kg	42.5	<0.0001	****

[0738] NS  $p \geq 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ 这些数据表明mAb<sup>2</sup>通过MSLN交联能够驱动肿瘤中的CD137激动,该双特异性抗体的作用优于单独靶向CD137和/或MSLN(甚至组合)的作用,从而显著提高了荷瘤小鼠的存活率。不含任何MSLN靶向Fab的模拟mAb<sup>2</sup>形式的Fcab(FS22m-063-AA/He1D1.3或FS22m-063-AA/4420)在本研究中未显示任何内在活性。

[0739] 实施例11:选择以获得能够结合鼠和人CD137的Fcab

[0740] 由于意外地发现一些与人CD137结合的Fcab也与小鼠CD137结合(结合人、小鼠和食蟹猴CD137的特异性参见实施例5.5),因此决定查看这些克隆是否可以被改善。

[0741] 11.1:定点修饰以消除FS22-053-014克隆中潜在的序列责任性

[0742] 选择小鼠-人交叉反应性克隆FS22-053-014是因为显示它能够通过SPR与小鼠二聚体CD137抗原结合(参见实施例5.5)。然而,经过进一步的序列分析,它具有潜在的序列责任性,这可能是由于Q98D突变以及野生型G99位产生DG基序导致其CH3结构域EF环中翻译后天冬氨酸异构化的结果。FS22-053谱系中的其他亲和力成熟的克隆(参见表12)在EF环的同

一位置处包含Q98E修饰。根据制造商的建议,使用QuickChange II诱变试剂盒(安捷伦,目录号200523)通过定点诱变将Q98D突变为Q98E,得到了克隆FS22-053-017。下表12显示了克隆FS22-053-008、FS22-172-003和FS22-172-004的CH3结构域的EF环中经常出现的LE基序,以及克隆FS22-053-014的CH3结构域的EF环中的DG基序。

[0743] 表12

G1 CH3	EF 环 (92-101)									
	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V
FS22-053-008	D	Y	W	R	W	L	E	G	N	V
FS22-053-011	D	Y	W	R	W	T	D	G	N	V
FS22-053-014	Y	H	W	R	W	L	D	G	N	V
FS22-172-003	G	A	D	R	W	L	E	G	N	V
FS22-172-004	G	A	D	R	W	L	E	G	N	V
FS22-053-017	Y	H	W	R	W	L	E	G	N	V

[0745] 实施例12:突变FS22-053-017Fcab克隆的表征

[0746] 12.1在人CD137 D011.10 T细胞活化试验中模拟mAb<sup>2</sup>形式的FS22-053-017Fcab的活性

[0747] 将Fcab克隆FS22-053-017亚克隆并表达为He1D1.3“模拟”mAb<sup>2</sup>,然后在如实施例3.4中所述的人CD137 D011.10 T细胞活化试验中,与同样为He1D1.3mAb<sup>2</sup>形式的FS22-053-014克隆进行比较。G1-AA/20H4.9用作抗CD137阳性对照,G1-AA/D1.3用作IgG对照。测试的mAb<sup>2</sup>可以不与蛋白L交联,也可以以1:4的比例与蛋白L交联。

[0748] 表13

Fcab 克隆(以 He1D1.3 mAb <sup>2</sup> 形式) 或 mAb	有或没有蛋白 L 交联的 IL-2 释放		
	没有 XL	+ XL Emax (IL-2 pg/ml)	+ XL EC50 (nM)
FS22-053-014	N/A	4174	0.73
FS22-053-017	N/A	4956	0.82
G1-AA/20H4.9	未测定	5018	0.82

[0750] N/A-不适用,因为信号低无法确定EC50

[0751] 表13和图12中的结果表明,模拟mAb<sup>2</sup>形式的FS22-053-17Fcab和模拟mAb<sup>2</sup>形式的FS22-053-014Fcab在相同的D011.10 T细胞活化试验中被蛋白L交联时具有相当的活性。因此,进行诱变不会对功能活性产生负面影响。模拟mAb<sup>2</sup>形式的两个克隆在没有交联时都没有活性。

[0752] 如预期那样,阳性对照抗CD137仅在交联时才具有活性,而IgG对照无论是否交联都没有活性。

[0753] 12.2在鼠CD137 D011.10 T细胞活化试验中模拟mAb<sup>2</sup>形式的突变FS22-053-017Fcab的活性

[0754] 还将FS22-053-017克隆(He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>形式)与鼠CD137结合的Fcab克隆FS22m-063(也为He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>形式)以及亲本FS22-053-014克隆(He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>形式)在如实施例3.4中所述的小鼠CD137 D011.10 T细胞活化试验中比较。mAb<sup>2</sup>分子与蛋白质L以4:1的摩尔比(mAb<sup>2</sup>:蛋白质L)交联。

[0755] 如预期的那样,当通过蛋白L交联时,所有测试的分子显示出通过IL-2释放测量的活性,但是当未交联时则没有活性。选择的与小鼠CD137结合的FS22m-063在测定中具有最

佳活性,交联时EC50为0.39nM。FS22-053-14和FS22-053-017在测定中均具有活性,表明功能并未因诱变而丧失,尽管FS22-053-017的活性略有降低,当与蛋白L交联时,与FS22-053-14相比EC50降低了约8倍。图12显示HelD1.3模拟mAb<sup>2</sup>形式的亲和力和成熟的人和鼠交叉反应性CD137 Fcabs FS22-053-014和FS22-053-017,以及抗小鼠CD137 Fcab FS22m-063,与蛋白L交联时激活CD137,从而在D011.10 T细胞活化试验中导致mIL-2的释放。

[0756] 表14

Fcab 克隆 (以 HelD1.3 mAb <sup>2</sup> 形式) 或 mAb	有或没有蛋白 L 交联的 IL-2 释放		
	没有 XL	+ XL Emax (IL-2 pg/ml)	+ XL EC50 (nM)
[0757] <b>FS22-053-014</b>	N/A	28071	2.04
<b>FS22-053-017</b>	N/A	41042	16.74
<b>FS22m-063</b>	N/A	24175	0.39
<b>G1-AA/Lob12.3 +蛋白 L</b>	N/A	21332	2.26

[0758] N/A-不适用,因为信号低无法确定EC50

[0759] 12.3FS22-053-017的结合动力学

[0760] 在Biacore T200系统上通过SPR将Fcab克隆FS22-053-017的平衡解离常数( $K_D$ )与FS22-053-014的平衡解离常数进行了比较。对于hCD137-mFc-Avi抗原,使用以下方法:将抗人Fab分子固定在CM5芯片上,使其表面密度介于9,000和11,000反应单位(RU)之间。将抗体在HBS-EP缓冲液中稀释至4 $\mu$ g/ml,并以30 $\mu$ l/s的流速被抗Fab分子捕获。使用了八种不同浓度的hCD137-mFc抗原:200nM;66.67nM;22.22nM(包括两次),7.41nM;2.47nM;0.82nM,0.27nM;0.091(用HBS-EP+缓冲液稀释)流过捕获的mAb<sup>2</sup>。

[0761] 对于mCD137-mFc-Avi结合动力学测定,使用了不同的方法。将小鼠PD-L1-mFc-Avi固定在CM5芯片上,使其表面密度为200RUs。将含有FS22-053-014和FS22-053-017Fcab与抗小鼠PD-L1 Fab(S70)组合的mAb<sup>2</sup>在HBS-EP缓冲液中稀释至7.5 $\mu$ g/ml,并通过固定的mPD-L1蛋白以60 $\mu$ l/s的流速捕获。使用了八种不同浓度的mCD137-mFc抗原:使600nM;200nM;66.67nM(包括两次),22.2nM;7.1nM;2.47nM;0.82nM(在HBS-EP+缓冲液中稀释)流过捕获的mAb<sup>2</sup>。

[0762] 使用Biacore T200评估软件进行数据分析。减去空白流通池,并使用具有质量传递的1:1Langmuir结合模型拟合曲线,将RI设置为常数为零,将 $R_{max}$ 设置为局部。结果总结在表15中,并且显示出两个Fcab克隆对人抗原的动力学特性非常相似,从而证明将Q98D突变为Q98E对与人抗原的结合没有负面影响。与小鼠抗原的结合强度降低2倍也与实施例11.2中所示的功能数据一致。

[0763] 表15

分子	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)
FS22-053-014/HelD1.3	$8.304 \times 10^4$	$3.656 \times 10^{-4}$	4.403
FS22-053-017/HelD1.3	$8.853 \times 10^4$	$4.062 \times 10^{-4}$	4.588
FS22-053-014/mPD-L1	$1.509 \times 10^5$	$4.025 \times 10^{-3}$	27
FS22-053-017/mPD-L1	$1.064 \times 10^5$	$5.186 \times 10^{-3}$	49

[0765] 实施例13:PPY参与抗原结合(保守PPY基序的丙氨酸扫描)

[0766] 如实施例5中所述,在两个独立选择的Fcab的AB环中鉴定了PPY序列基序,并且该基序在分析的所有亲和力成熟的克隆中均是保守的。因此,需要理解该基序与CD137的结合和整个蛋白质结构关系。丙氨酸扫描是一种常用的生物学技术,用于确定蛋白质-蛋白质相互作用中特定残基的重要性。简而言之,依次将三个氨基酸中的每一个氨基酸然后一致地用丙氨酸残基取代。丙氨酸被认为是化学上最惰性的非大体积残基,因此被认为不太可能有助于结合。

[0767] 13.1生产用于丙氨酸扫描的突变克隆

[0768] 通过在亲本克隆(FS22-172-003和FS22-053-008)上进行定点诱变产生突变克隆。表16中总结了AB环内氨基酸取代的位置,所有其他残基均保守于其各自的亲本。然后按照实施例3所述,在HEK293-6E细胞中瞬时表达mAb<sup>2</sup>变体,并使用mAb Select SuRe蛋白A柱纯化。突变体的表达产量与亲本相似,因此这表明丙氨酸取代对蛋白质生产没有影响。

[0769] 表16

[0770]	亲本克隆	AB 环的原始序列	AB 环的突变序列	克隆名称
	FS22-53-008	NPPYLFS (SEQ ID NO: 19)	NAPYLFS	FS22-053-008 APY
			NPAYLFS	FS22-053-008 PAY
			NPPALFS	FS22-053-008 PPA
			NAAALFS	FS22-053-008 AAA
	FS22-172-003	PYIIPPY (SEQ ID NO: 138)	PYIIAPY	FS22-172-003 APY
			PYIIPAY	FS22-172-003 PAY
			PYIIPPA	FS22-172-003 PPA
			PYIIAAA	FS22-172-003 AAA

[0771] 13.2突变克隆的结合动力学

[0772] 使用来自ForteBio的Octet QK<sup>e</sup>系统比较了2个亲本克隆和8个突变体克隆的结合动力学。将二聚体生物素化的hCD137-mFc-Avi以10ug/ml的量捕获到链霉亲和素传感器上,然后分析与浓度为200nM的每个mAb<sup>2</sup>的相互作用。与亲本克隆相比,所有FS22-172-003突变克隆的mAb<sup>2</sup>与二聚体抗原的结合均被破坏,克隆FS22-172-003\_AAA和FS22-172-003\_APY失去所有结合,而克隆FS22-172-003\_PPA和FS22-172-003\_PAY与亲本相比虽然显著减少(响应单位降低了5.5和4.4倍),但仍保持了一定的结合力。与亲本FS22-053-008克隆相比,FS22-053-008的结合也受到影响,变体PAY和AAA失去所有结合,并且变体APY和PPA显示出与抗原的结合减少且缔合特性减慢。该数据表明PPY基序对于两个mAb<sup>2</sup>与CD137抗原的结合都很重要。

[0773] 13.3同源性建模

[0774] 考虑到PPY基序参与结合,在计算机上模拟Fcab以评估CH3结构域中的蛋白质结构预测是有益的。使用MOE软件套件(化学计算集团ULC) 2019.0101版进行结构同源性建模和后续构象探索。蛋白数据库[PDB]结构5JII中的Fc区用作FS22-172-003和FS22-053-008的Fcab区的结构模板。由于相对于所选结构模板而言,在AB和EF环区中存在插入,因此应用了具有残基侧链优化的从头环搜索,以生成AB和EF环结构体。将所得的同源性模型的能量最小化,并根据几何标准进行评分,这些标准包括骨架键长、角度、二面角和手性。使用LowModeMD模拟方法,分数通过标准的结构同源性模型被用作进行构象采样的基础,在MOE内实施。

[0775] 图13中的同源性模型显示,与模板5JII相比,两个Fcab的AB和EF环都采用不同的



构象,其中PPY基序在从CH3结构域核心伸出的AB环中发挥作用。PPY基序还介导相互作用,导致AB环构象稳定,通过环内以及环与结构的其余部分之间的相互作用。使用LowModeMD模拟进行的构象搜索也突出显示,PPY基序中的酪氨酸残基与CH3结构域中同一链的CH3结构域中的Q3 (IMGT) 和D12 (IMGT) 相互作用,可能稳定了AB环。结合实施例13.2所示的结果,这表明PPY基序对于FS22-172-003和FS22-053-008与CD137的结合都是重要的。

[0776] 序列表

[0777] 野生型 (WT) Fcab CH3结构域结构环的氨基酸序列

[0778] WT Fcab AB环-RDELTKNQ (SEQ ID NO:1)

[0779] WT Fcab CD环-SNGQPENNY (SEQ ID NO:2)

[0780] WT Fcab EF环-DKSRWQQGNV (SEQ ID NO:3)

[0781] WT Fcab CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)

[0782] 下划线为AB、CD和EF环

[0783] GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLY  
SKLTVDKSRWQQGNVFS~~CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG~~

[0784] 具有LALA-PA突变的Fcab CH2结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:5)

[0785] 下划线为LALA-PA突变

[0786] APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK

[0787] 具有LALA突变的Fcab CH2结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)

[0788] 下划线为LALA突变

[0789] APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

[0790] 截短的Fcab铰链区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)

[0791] TCPPCP

[0792] 具有LALA突变的WT Fcab的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)

[0793] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)

[0794] **TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
*RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN*  
*VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

[0795] 不含LALA突变的WT Fcab的氨基酸序列 (SEQ ID NO:9)

[0796] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

[0797] **TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
*RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN*  
*VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0798] PPY基序的氨基酸序列 (SEQ ID NO:10)

[0799] PPY

- [0800] 具有LALA突变的Fcab FS22-033的氨基酸序列 (SEQ ID NO:11)
- [0801] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)  
**TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*
- [0802] *RDEYFEQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVARHRWQLGN*  
*VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*
- [0803] 不含LALA突变的Fcab FS22-033的氨基酸序列 (SEQ ID NO:12)
- [0804] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)  
**TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*
- [0805] *RDEYFEQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVARHRWQLGN*  
*VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*
- [0806] 具有LALA突变的FS22-033/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:13)
- [0807] VH结构域 (下划线)
- [0808] QVQLQESGPGLV RPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN SALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSRDEYFEQEVSLTCLVKGFYPSDIA  
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVARHRWQLGN  
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0809] 不含LALA突变的FS22-033/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:14)
- [0810] VH结构域 (下划线)
- [0811] QVQLQESGPGLV RPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN SALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSRDEYFEQEVSLTCLVKGFYPSDIA  
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVARHRWQLGN  
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0812] 具有LALA突变的Fcab FS22-053的氨基酸序列 (SEQ ID NO:15)
- [0813] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)  
**TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*
- [0814] *RDELNPPYLF SNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYYNR*  
*WQDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*
- [0815] 不含LALA突变的Fcab FS22-053的氨基酸序列 (SEQ ID NO:16)
- [0816] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

- TCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
 [0817] *RDELNPPYLF***SNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYYNR**  
*WQDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*
- [0818] 具有LALA突变的FS22-053/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:17)  
 [0819] VH结构域 (下划线)
- [0820] QVQLQESGPGLV**RPSQTL****SLTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN****SALKSRVTM**  
**LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYL****DYWGQGS****LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK**  
**DYFPEPVT****SVNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV****PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH**  
**TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA****KTKPREEQYNSTYR**  
**VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLF****SNQVSLTCLVKGFY**  
**PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYYNRWQDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG**
- [0821] 不含LALA突变的FS22-053/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:18)  
 [0822] VH结构域 (下划线)
- [0823] QVQLQESGPGLV**RPSQTL****SLTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN****SALKSRVTM**  
**LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYL****DYWGQGS****LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK**  
**DYFPEPVT****SVNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV****PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH**  
**TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA****KTKPREEQYNSTYR**  
**VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLF****SNQVSLTCLVKGFY**  
**PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYYNRWQDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG**
- [0824] Fcab FS22-053-008CH3结构域结构环序列的氨基酸序列  
 [0825] FS22-053-008第一序列-NPPYLF (SEQ ID NO:19)  
 [0826] FS22-053-008第二序列-DYWRWLE (SEQ ID NO:20)  
 [0827] Fcab FS22-053-008CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:21)  
 [0828] 下划线为第一和第二序列
- [0829] GQPREPQVYTLPPSRDEL**NPPYLF****SNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF**  
**FLYSKLTVDYWRWLE****GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG**
- [0830] Fcab FS22-053-008CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:22)  
 [0831] GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTG  
 TTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
 TGGGCAGCCGGAACAACATAAGACCACGCTCCCGTACTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
 TCACCGTGGATTACTGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCAC  
 TACTACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCGGT
- [0832] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-008的氨基酸序列 (SEQ ID NO:23)  
 [0833] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)

TCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
[0834] KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK*GQPREPQVYTLPPS*  
*RDELNPPYLF**SNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWR*  
*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0835] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-008的核酸序列 (SEQ ID NO:24)

[0836] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACTGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0837] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-008的氨基酸序列 (SEQ ID NO:25)

[0838] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
[0839] KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK*GQPREPQVYTLPPS*  
*RDELNPPYLF**SNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWR*  
*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0840] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-008的核酸序列 (SEQ ID NO:26)

[0841] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGTGGTGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACTGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0842] 具有LALA突变的FS22-053-008/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:  
27)

[0843] VH结构域 (下划线)

[0844] QVQLQESGPGLRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLF

PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0845] 不含LALA突变的FS22-053-008/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 28)

[0846] VH结构域(下划线)

[0847] QVQLQESGPGLVPRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0848] Fcab FS22-053-009CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[0849] FS22-053-009第一序列-NPPYLF (SEQ ID NO:19)

[0850] FS22-053-009第二序列-EHTRWLD (SEQ ID NO:29)

[0851] Fcab FS22-053-009CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:30)

[0852] 下划线为第一和第二序列

[0853] GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF  
FLYSKLTVEHTRWLDGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0854] Fcab FS22-053-009CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:31)

[0855] GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTG  
TTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGAACATACTAGGTGGCTGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGT

[0856] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-009的氨基酸序列 (SEQ ID NO:32)

[0857] 铰链区(下划线),CH2结构域(粗体),CH3结构域(斜体),LALA突变(粗体和下划线)

TCPPCP**APEAAGG**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
**KTKPREEQYNSTYRV****SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[0858] *RDELNPPYLF**SNQVSLTCLVKGFY**PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVEHTR*  
*WLDGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0859] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-009的核酸序列 (SEQ ID NO:33)

[0860] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGCCGGTGGTCTTCCGTGTTCTTCTTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTACA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGAACATACTAGGTGGCTGGATGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGT

[0861] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-009的氨基酸序列 (SEQ ID NO:34)

[0862] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

TCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**  
[0863] *RDELNPPYLF**SNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVEHTR*  
*WLDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0864] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-009的核酸序列 (SEQ ID NO:35)

[0865] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGTGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAACATACTAGGTGGCTGGATGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0866] 具有LALA突变的FS22-053-009/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:36)

[0867] VH结构域 (下划线)

[0868] QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVEHTRWLDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0869] 不含LALA突变的FS22-053-009/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:37)

[0870] VH结构域 (下划线)

[0871] QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVEHTRWLDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0872] Fcab FS22-053-010CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[0873] FS22-053-010第一序列-NPPYLF (SEQ ID NO:19)

[0874] FS22-053-010第二序列-DYMRWLD (SEQ ID NO:38)

[0875] Fcab FS22-053-010CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:39)

[0876] 下划线为第一和第二序列

[0877] GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF  
FLYSKLTVDYMRWLDGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0878] Fcab FS22-053-010CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:40)

[0879] GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTG  
TTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGATTACATGAGGTGGCTGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0880] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-010的氨基酸序列 (SEQ ID NO:41)

[0881] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)

[0882] TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYMRWLDGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLS  
LSPG

[0883] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-010的核酸序列 (SEQ ID NO:42)

[0884] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAATATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGATTACATGAGGTGGCTGGATGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0885] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-010的氨基酸序列 (SEQ ID NO:43)

[0886] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

[0887] TCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYMRWLDGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLS  
LSPG

[0888] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-010的核酸序列 (SEQ ID NO:44)

[0889] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGAAGTGTGGTGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAATATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGATTACATGAGGTGGCTGGATGGGAACGT

CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0890] 具有LALA突变的FS22-053-010/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 45)

[0891] VH结构域(下划线)

[0892] QVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN SALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLF SNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTV DYM RWLDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0893] 不含LALA突变的FS22-053-010/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 46)

[0894] VH结构域(下划线)

[0895] QVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN SALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLF SNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTV DYM RWLDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0896] Fcab FS22-053-011CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[0897] FS22-053-011第一序列-NPPYLFS (SEQ ID NO:19)

[0898] FS22-053-011第二序列-DYWRWD (SEQ ID NO:47)

[0899] Fcab FS22-053-011CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:48)

[0900] 下划线为第一和第二序列

[0901] GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLF SNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSF  
FLYSKLTV DYM RWLDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0902] Fcab FS22-053-011CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:49)

[0903] GGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTG  
TTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGATTACTGGAGGTGGACTGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCAC  
TACACTCAGAAGAGCTTGTCCTGTGCGCCGGA

[0904] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-011的氨基酸序列 (SEQ ID NO:50)

[0905] 铰链区(下划线),CH2结构域(粗体),CH3结构域(斜体),LALA突变(粗体和下划线)

TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
*RDELNPPYLF SNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTV DYM RW*  
*WDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0907] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-011的核酸序列 (SEQ ID NO:51)



[0908] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACTGGAGGTGGACTGATGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0909] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-011的氨基酸序列 (SEQ ID NO:52)

[0910] 铰链区(下划线),CH2结构域(粗体),CH3结构域(斜体)

TCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[0911] *RDELNPPYLF***SNQVSLTCLVKGF***YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWR*  
*WTDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0912] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-011的核酸序列 (SEQ ID NO:53)

[0913] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGCTGCTGGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACTGGAGGTGGACTGATGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0914] 具有LALA突变的FS22-053-011/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:54)

[0915] VH结构域(下划线)

[0916] QVQLQESGPG**LVRPSQ**TL**SLTCTVSGST**FSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN**SALKSRVTM**  
**LVDTSKNQ**FS**LR**LSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQ**GS**LVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK**  
**DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH**  
**TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR**  
**VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLF****SNQVSLTCLVKGFY**  
**PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWRWTDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG**

[0917] 不含LALA突变的FS22-053-011/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:55)

[0918] VH结构域(下划线)

[0919] QVQLQESGPG**LVRPSQ**TL**SLTCTVSGST**FSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN**SALKSRVTM**  
**LVDTSKNQ**FS**LRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQ**GS**LVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK****

DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDYWRWTDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0920] Fcab FS22-053-012CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[0921] FS22-053-012第一序列-NPPYLFS (SEQ ID NO:19)

[0922] FS22-053-012第二序列-DHMRWLE (SEQ ID NO:56)

[0923] Fcab FS22-053-012CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:57)

[0924] 下划线为第一和第二序列

[0925] GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF  
FLYSKLTVDHMRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0926] Fcab FS22-053-012CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:58)

[0927] GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTG  
TTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGATCATATGAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0928] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-012的氨基酸序列 (SEQ ID NO:59)

[0929] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)

TCPPCP**APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[0930] *RDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDHMR*  
*WLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0931] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-012的核酸序列 (SEQ ID NO:60)

[0932] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCATATGAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0933] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-012的氨基酸序列 (SEQ ID NO:61)

[0934] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

- TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
GTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
[0935] RDELNPPYLFNSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDHMR  
WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0936] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-012的核酸序列 (SEQ ID NO:62)
- [0937] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGTGGTGGTCTTCGGTGTTCCTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCATATGAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
- [0938] 具有LALA突变的FS22-053-012/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:63)
- [0939] VH结构域 (下划线)
- [0940] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDHMRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0941] 不含LALA突变的FS22-053-012/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:64)
- [0942] VH结构域 (下划线)
- [0943] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDHMRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0944] Fcab FS22-053-013CH3结构域结构环序列的氨基酸序列
- [0945] FS22-053-013第一序列-NPPYLF (SEQ ID NO:19)
- [0946] FS22-053-013第二序列-GYERWLE (SEQ ID NO:65)
- [0947] Fcab FS22-053-013CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:66)
- [0948] 下划线为第一和第二序列
- [0949] GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF  
FLYSLKLTVGYERWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0950] Fcab FS22-053-013CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:67)

[0951] GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTG  
TTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGGTTACGAAAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0952] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-013的氨基酸序列 (SEQ ID NO:68)

[0953] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)

TCPPCP**APEA**AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
**KTKPREEQ****YNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[0954] *RDELNPPYLF**SNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVG**YER*  
*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0955] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-013的核酸序列 (SEQ ID NO:69)

[0956] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTACA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGGTTACGAAAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0957] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-013的氨基酸序列 (SEQ ID NO:70)

[0958] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

TCPPCP**APELL**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
**KTKPREEQ****YNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[0959] *RDELNPPYLF**SNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVG**YER*  
*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0960] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-013的核酸序列 (SEQ ID NO:71)

[0961] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGAAGCTGCTGGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTACA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGGTTACGAAAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0962] 具有LALA突变的FS22-053-013/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 72)

[0963] VH结构域(下划线)

[0964] QVQLQESGPGLVPRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN  
SALKSRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS�TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKTVGYERWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0965] 不含LALA突变的FS22-053-013/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 73)

[0966] VH结构域(下划线)

[0967] QVQLQESGPGLVPRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN  
SALKSRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS�TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKTVGYERWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0968] Fcab FS22-053-014CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[0969] FS22-053-014第一序列-NPPYLF (SEQ ID NO:19)

[0970] FS22-053-014第一序列-YHWRWLD (SEQ ID NO:74)

[0971] Fcab FS22-053-014CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:75)

[0972] 下划线为第一和第二序列

[0973] GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSS  
FLYSLKTVYHWRWLDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0974] Fcab FS22-053-014CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:76)

[0975] GGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTG  
TTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGATACATTGGAGGTGGCTGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCAC  
TACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCCGA

[0976] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-014的氨基酸序列 (SEQ ID NO:77)

[0977] 铰链区(下划线),CH2结构域(粗体),CH3结构域(斜体),LALA突变(粗体和下划线)

TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[0978] *RDELNPPYLFNSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKTVYHWR*  
*WLDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0979] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-014的核酸序列 (SEQ ID NO:78)

[0980] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTTCTCCCGCCAAGCCG

AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGTACCATTGGAGGTGGCTGGATGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0981] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-014的氨基酸序列 (SEQ ID NO:79)

[0982] 铰链区(下划线),CH2结构域(粗体),CH3结构域(斜体)

TCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[0983] *RDELNPPYLF***SNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK***TPPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWR*  
*WLDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0984] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-014的核酸序列 (SEQ ID NO:80)

[0985] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGCTGGGTGGTCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGTACCATTGGAGGTGGCTGGATGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0986] 具有LALA突变的FS22-053-014/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:81)

[0987] VH结构域(下划线)

[0988] QVQLQESGPG**LVRPSQTL**SLTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN**SALKSRVTM**  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS**LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK**  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWRWLDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0989] 不含LALA突变的FS22-053-014/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:82)

[0990] VH结构域(下划线)

[0991] QVQLQESGPG**LVRPSQTL**SLTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN**SALKSRVTM**  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS**LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK**  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTQVYHWRWLDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0992] Fcab FS22-053-015CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[0993] FS22-053-015第一序列-NPPYLFS (SEQ ID NO:19)

[0994] FS22-053-015第二序列-DHWRWLQ (SEQ ID NO:83)

[0995] Fcab FS22-053-015CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:84)

[0996] 下划线为第一和第二序列

[0997] GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDHWRWLQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0998] Fcab FS22-053-015CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:85)

[0999] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-015的氨基酸序列 (SEQ ID NO:86)

[1000] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)

TCPPCP**APEAAG**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
[1001] **KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDHWRWLQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[1002] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-015的核酸序列 (SEQ ID NO:87)

[1003] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAATCTCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGATCATTGGAGGTGGCTGCAGGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1004] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-015的氨基酸序列 (SEQ ID NO:88)

[1005] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

TCPPCP**APELLG**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
[1006] **KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDHWRWLQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[1007] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-015的核酸序列 (SEQ ID NO:89)

[1008] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGTGGGTGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC

AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACCTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCATTGGAGGTGGCTGCAGGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1009] 具有LALA突变的FS22-053-015/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 90)

[1010] VH结构域 (下划线)

[1011] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDHWRWLGQNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1012] 不含LALA突变的FS22-053-015/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 91)

[1013] VH结构域 (下划线)

[1014] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDHWRWLGQNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1015] Fcab FS22-053-016CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[1016] FS22-053-016第一序列-NPPYLFS (SEQ ID NO:19)

[1017] FS22-053-016第二序列-DYIRWLN (SEQ ID NO:92)

[1018] Fcab FS22-053-016CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:93)

[1019] 下划线为第一和第二序列

[1020] GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF  
FLYSKLTVDYIRWLNGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1021] Fcab FS22-053-016CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:94)

[1022] GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTG  
TTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGATTACATCAGGTGGCTGAACGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1023] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-016的氨基酸序列 (SEQ ID NO:95)

[1024] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)

[1025] TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE



EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYIRWLNQNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS  
LSPG

[1026] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-016的核酸序列 (SEQ ID NO:96)

[1027] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAGTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACATCAGGTGGCTGAACGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1028] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-016的氨基酸序列 (SEQ ID NO:97)

[1029] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

[1030] TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYIRWLNQNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS  
LSPG

[1031] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-016的核酸序列 (SEQ ID NO:98)

[1032] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGTGGTGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAGTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACATCAGGTGGCTGAACGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1033] 具有LALA突变的FS22-053-016/He1D1.3模拟物mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:99)

[1034] VH结构域 (下划线)

[1035] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYLQYWGQSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDYIRWLNQNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1036] 不含LALA突变的FS22-053-016/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:

100)

[1037] VH结构域(下划线)

[1038] QVQLQESGPGLV RPSQ T L S L T C T V S G S T F S G Y G V N W V R Q P P G R G L E W I G M I W G D G N T D Y N S A L K S R V T M  
L V D T S K N Q F S L R L S S V T A A D T A V Y Y C A R E R D Y R L D Y W G Q G S L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K  
D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H  
T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R  
V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L N P P Y L F S N Q V S L T C L V K G F Y  
P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D Y I R W L N G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G

[1039] Fcab FS22-053-017CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[1040] FS22-053-017第一序列-NPPYLFS (SEQ ID NO:19)

[1041] FS22-053-017第二序列-YHWRWLE (SEQ ID NO:101)

[1042] Fcab FS22-053-017CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:102)

[1043] 下划线为第一和第二序列

[1044] GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF  
FLYSKLTIVYHWRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1045] Fcab FS22-053-017CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:103)

[1046] GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACTCTGCCCCCTTCACGCGACGAACCTCAATCCGCCCTACCTG  
TTCTCCAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTTGTGAAGGGTTTCTACCCATCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
CGGACAGCCGGAGAACAATAAGACTACCCCGCCTGTGCTGGACTCGGACGGCAGCTTCTTCTTGTACTCCAAAC  
TGACCGTGTACCACTGGCGGTGGCTGGAAGGGAACGTGTTAGCTGCTCCGTCATGCATGAAGCCCTGCACAACCAC  
TACACCCAGAAGTCCCTCTCGCTCTCTCCGGT

[1047] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-017的氨基酸序列 (SEQ ID NO:104)

[1048] 铰链区(下划线),CH2结构域(粗体),CH3结构域(斜体),LALA突变(粗体和下划线)

TCPPCP**APEAAGG**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
**KTKPREEQ**YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG**QPREPQVYTLPPS**  
RDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTIVYHWR  
WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1049] 具有LALA突变的Fcab FS22-053-017的核酸序列 (SEQ ID NO:105)

[1051] ACTTGCCCGCCTTGCCCAGCCCCGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
TCTGCCCCCTTCACGCGACGAACCTCAATCCGCCCTACCTGTTCTCCAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTTGTGAAGG  
GTTTCTACCCATCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGACAGCCGGAGAACAATAAGACTACCCCGCCT  
GTGCTGGACTCGGACGGCAGCTTCTTCTTGTACTCCAACTGACCGTGTACCACTGGCGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
GTTTAGCTGCTCCGTCATGCATGAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTCTCGCTCTCTCCGGT

[1052] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-017的氨基酸序列 (SEQ ID NO:106)

[1053] 铰链区(下划线),CH2结构域(粗体),CH3结构域(斜体)

- TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
[1054] GTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWR  
WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1055] 不含LALA突变的Fcab FS22-053-017的核酸序列 (SEQ ID NO:107)
- [1056] ACTTGCCCGCCTTGCCCAGCCCCGGAAGTGTGGTGGTCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
TCTGCCCCCTTCACGCGACGAAGTCAATCCGCCCTACCTGTTCTCCAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTTGTGAAGG  
GTTTCTACCCATCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGACAGCCGGAGAACAATAAGACTACCCCGCCT  
GTGCTGGACTCGGACGGCAGCTTCTTCTTGTACTCCAACTGACCGTGTACCACTGGCGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
GTTTAGCTGCTCCGTATGCATGAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTCTCGCTCTCTCCGGGT
- [1057] 具有LALA突变的FS22-053-017/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:108)
- [1058] VH结构域 (下划线)
- [1059] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1060] 不含LALA突变的FS22-053-017/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:109)
- [1061] VH结构域 (下划线)
- [1062] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1063] Fcab FS22-172 CH3结构域结构环序列的氨基酸序列
- [1064] FS22-172第一序列-RKYPPY (SEQ ID NO:110)
- [1065] FS22-172第二序列-GADRWLE (SEQ ID NO:111)
- [1066] Fcab FS22-172 CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:112)
- [1067] 下划线为第一和第二序列
- [1068] GQPREPQVYTLPPSRDELRKYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF  
FLYSLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1069] Fcab FS22-172 CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:113)

[1070] GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAAATACTACCCG  
CCGTACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAACAACATAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1071] 具有LALA突变的Fcab FS22-172的氨基酸序列 (SEQ ID NO:114)

[1072] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)

[1073] TCPPCP**APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**

[1074] RDEL RKYYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR  
WLEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1075] 具有LALA突变的Fcab FS22-172的核酸序列 (SEQ ID NO:115)

[1076] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAAATACTACCCGCCGTACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1077] 不含LALA突变的Fcab FS22-172的氨基酸序列 (SEQ ID NO:116)

[1078] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

TCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**  
[1079] RDEL RKYYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR  
WLEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1080] 不含LALA突变的Fcab FS22-172的核酸序列 (SEQ ID NO:117)

[1081] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGTGGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAAATACTACCCGCCGTACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

- [1082] 具有LALA突变的FS22-172/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:118)
- [1083] VH结构域(下划线)
- [1084] QVQLQESGPGLV RPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN SALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYL DYWGQGS LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL RKYYPPYNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1085] 不含LALA突变的FS22-172/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:119)
- [1086] VH结构域(下划线)
- [1087] QVQLQESGPGLV RPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN SALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYL DYWGQGS LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL RKYYPPYNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1088] Fcab FS22-172-001CH3结构域结构环序列的氨基酸序列
- [1089] FS22-172-001第一序列-PFVMPPY (SEQ ID NO:120)
- [1090] FS22-172-001第二序列-GADRWLE (SEQ ID NO:111)
- [1091] Fcab FS22-172-001CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:121)
- [1092] 下划线为第一和第二序列
- [1093] GQPREPQVYTLPPSRDEL PFVMPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF  
FLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1094] Fcab FS22-172-001CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:122)
- [1095] GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGCCATTCGTTATGCCA  
CCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
- [1096] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-001的氨基酸序列 (SEQ ID NO:123)
- [1097] 铰链区(下划线), CH2结构域(粗体), CH3结构域(斜体), LALA突变(粗体和下划线)  
TCPPCP**APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
*RDEL PFVMPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR*  
*WLEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG*
- [1098]
- [1099] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-001的核酸序列 (SEQ ID NO:124)
- [1100] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGAAGCTGCCGTGGTCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACACAACCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGCAGTACAACCTCTA

CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATTTCGTTATGCCACCATAACAACAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1101] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-001的氨基酸序列 (SEQ ID NO:125)

[1102] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

TCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[1103] *RDELFPVMPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR*  
*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[1104] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-001的核酸序列 (SEQ ID NO:126)

[1105] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGTGGTGGTTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATTTCGTTATGCCACCATAACAACAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1106] 具有LALA突变的FS22-172-001/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:127)

[1107] VH结构域 (下划线)

[1108] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS�TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELFPVMPPYNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1109] 不含LALA突变的FS22-172-001/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:128)

[1110] VH结构域 (下划线)

[1111] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS�TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELFPVMPPYNQVSLTCLVKGFY

PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1112] Fcab FS22-172-002CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[1113] FS22-172-002第一序列-PFQMPPY (SEQ ID NO:129)

[1114] FS22-172-002第二序列-GADRWLE (SEQ ID NO:111)

[1115] Fcab FS22-172-002CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:130)

[1116] 下划线为第一和第二序列

[1117] GQPREPQVYTLPPSRDELPFQMPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF  
FLYSKLTVGADRWLEGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1118] Fcab FS22-172-002CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:131)

[1119] GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGCCATTCCAGATGCCA  
CCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGAGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1120] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-002的氨基酸序列 (SEQ ID NO:132)

[1121] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)

[1122] TCPPCP**APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*

[1123] *RDEL****PFQMPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR***  
*WLEGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[1124] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-002的核酸序列 (SEQ ID NO:133)

[1125] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGAAGTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAATATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGCCATTCCAGATGCCACCATAACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAGAACAATAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1126] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-002的氨基酸序列 (SEQ ID NO:134)

[1127] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

TCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[1128] *RDEL****PFQMPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR***  
*WLEGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[1129] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-002的核酸序列 (SEQ ID NO:135)

[1130] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGAAGTGCTGGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCAAGCCG

AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATTCCAGATGCCACCATAACAACAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1131] 具有LALA突变的FS22-172-002/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 136)

[1132] VH结构域(下划线)

[1133] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYLRYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELFPQMPPYNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1134] 不含LALA突变的FS22-172-002/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 137)

[1135] VH结构域(下划线)

[1136] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYLRYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELFPQMPPYNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1137] Fcab FS22-172-003CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[1138] FS22-172-003第一序列-PYIIPPY (SEQ ID NO:138)

[1139] FS22-172-003第二序列-GADRWLE (SEQ ID NO:111)

[1140] Fcab FS22-172-003CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:139)

[1141] 下划线为第一和第二序列

[1142] GQPREPQVYTLPPSRDELPYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF  
FLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1143] Fcab FS22-172-003CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:140)

[1144] GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATACATCATCCCA  
CCATAACAACAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCAC  
TACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTGCCCCGGT



[1145] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-003的氨基酸序列 (SEQ ID NO:141)

[1146] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)

TCPPCP**APEA**AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

[1147] **KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*

*RDELPYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR*

*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[1148] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-003的核酸序列 (SEQ ID NO:142)

[1149] ACTTGCCCGCCTTGCCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATACATCATCCCACCATAACAACAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCTGTGCGCCCGGT

[1150] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-003的氨基酸序列 (SEQ ID NO:143)

[1151] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

TCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**

[1152] **KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*

*RDELPYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR*

*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[1153] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-003的核酸序列 (SEQ ID NO:144)

[1154] ACTTGCCCGCCTTGCCCAGCCCCGGAAGTGTGGTGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATACATCATCCCACCATAACAACAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCTGTGCGCCCGGT

[1155] 具有LALA突变的FS22-172-003/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:145)

[1156] VH结构域 (下划线)

[1157] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVT  
MLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAAYYCARERDYRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD

KTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIYI IPPYNQVSLTC  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS  
PG

[1158] 不含LALA突变的FS22-172-003/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 146)

[1159] VH结构域(下划线)

[1160] QVQLQESGPGLVLRPSQTLSLTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN SALKSRVT  
MLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA VYYCARERDYRLDYWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD  
KTHTCPPCPAPELLGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIYI IPPYNQVSLTC  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS  
PG

[1161] Fcab FS22-172-004CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[1162] FS22-172-004第一序列-NYIYPPY (SEQ ID NO:147)

[1163] FS22-172-004第二序列-GADRWLE (SEQ ID NO:111)

[1164] Fcab FS22-172-004CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:148)

[1165] 下划线为第一和第二序列

[1166] GQPREPQVYTLPPSRDELNYIYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSS  
FLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1167] Fcab FS22-172-004CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:149)

[1168] GGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGACACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGAACCTACATCTACCCA  
CCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCAC  
TACACTCAGAAGAGCTTGTCCTGTCGCCCCGA

[1169] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-004的氨基酸序列 (SEQ ID NO:150)

[1170] 铰链区(下划线),CH2结构域(粗体),CH3结构域(斜体),LALA突变(粗体和下划线)

[1171] TCPPCP**APEAAGG**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
**KTKPREEQYN**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

[1172] *RDELNYIYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVGADR*  
*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[1173] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-004的核酸序列 (SEQ ID NO:151)

[1174] ACTTGCCCGCCTTGCCCAGCCCCGAAGTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC

CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACTACATCTACCCACCATAACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1175] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-004的氨基酸序列 (SEQ ID NO:152)

[1176] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)

TCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[1177] *RDELNYIYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR*  
*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

[1178] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-004的核酸序列 (SEQ ID NO:153)

[1179] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACTACATCTACCCACCATAACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1180] 具有LALA突变的FS22-172-004/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:154)

[1181] VH结构域 (下划线)

[1182] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS�TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNYIYPPYNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1183] 不含LALA突变的FS22-172-004/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:155)

[1184] VH结构域 (下划线)

[1185] QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNSALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS�TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNYIYPPYNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1186] Fcab FS22-172-005CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

- [1187] FS22-172-005第一序列-QQVYPPY (SEQ ID NO:156)
- [1188] FS22-172-005第二序列-GADRWLE (SEQ ID NO:111)
- [1189] Fcab FS22-172-005CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:157)
- [1190] 下划线为第一和第二序列
- [1191] GQPREPQVYTLPPSRDELQQVYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF  
FLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1192] Fcab FS22-172-005CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:158)
- [1193] GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGCAGCAGGTTTACCCA  
CCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
- [1194] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-005的氨基酸序列 (SEQ ID NO:159)
- [1195] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体), LALA突变 (粗体和下划线)  
TCPPCP**APEA****AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[1196] *RDELQQVYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR*  
*WLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*
- [1197] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-005的核酸序列 (SEQ ID NO:160)
- [1198] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACCTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCAGCAGGTTTACCCACCATAACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
- [1199] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-005的氨基酸序列 (SEQ ID NO:161)
- [1200] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)  
TCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
[1201] *RDELQQVYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR*  
*WLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*
- [1202] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-005的核酸序列 (SEQ ID NO:162)
- [1203] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGTGGTGGTGGTCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTA

CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCAGCAGGTTTACCCACCATAACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1204] 具有LALA突变的FS22-172-005/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 163)

[1205] VH结构域(下划线)

[1206] QVQLQESGPGLVPRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELQQVYPPYNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1207] 不含LALA突变的FS22-172-005/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 164)

[1208] VH结构域(下划线)

[1209] QVQLQESGPGLVPRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELQQVYPPYNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1210] Fcab FS22-172-006CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[1211] FS22-172-006第一序列-RKYPPY (SEQ ID NO:110)

[1212] FS22-172-006第二序列-GADRWLE (SEQ ID NO:111)

[1213] Fcab FS22-172-006CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:165)

[1214] 下划线为第一和第二序列

[1215] GQPREPQVYTLPPSRDELRKYPPYNQLSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF  
FLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1216] Fcab FS22-172-006CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:166)

[1217] GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAAATACTACCCG  
CCGTACAACCAGCTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1218] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-006的氨基酸序列 (SEQ ID NO:167)

[1219] 铰链区(下划线),CH2结构域(粗体),CH3结构域(斜体),LALA突变(粗体和下划线)

- [1220] TCPPCP**APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*
- [1221] *RDEL RKYYPPYNQLSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR*  
*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*
- [1222] 具有LALA突变的Fcab FS22-172-006的核酸序列 (SEQ ID NO:168)
- [1223] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAAATACTACCCGCCGTACAACCAGCTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
- [1224] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-006的氨基酸序列 (SEQ ID NO:169)
- [1225] 铰链区 (下划线), CH2结构域 (粗体), CH3结构域 (斜体)  
TCPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPPS*  
*RDEL RKYYPPYNQLSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR*  
*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*
- [1226] *RDEL RKYYPPYNQLSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADR*  
*WLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*
- [1227] 不含LALA突变的Fcab FS22-172-006的核酸序列 (SEQ ID NO:170)
- [1228] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGTGGTGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAAATACTACCCGCCGTACAACCAGCTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
- [1229] 具有LALA突变的FS22-172-006/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:  
171)
- [1230] VH结构域 (下划线)
- [1231] QVQLQESGPGLV RPSQTLSLTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYN SALKSRVTM  
LVDT SKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYL DYWGQGS LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVK  
DYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL RKYYPPYNQLSLTCLVKGFY

PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1232] 不含LALA突变的FS22-172-006/He1D1.3模拟mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 172)

[1233] VH结构域(下划线)

[1234] QVQLQESGPGLVGPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELRYKYPPYNQLSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1235] He1D1.3模拟物mAb<sup>2</sup>轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:173)

[1236] VL结构域(下划线)

[1237] DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGSGT  
QYSLKINSIQPEDFGSYQCQHFWSPTPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1238] Fcab FS22-053 CH3结构域结构环序列的氨基酸序列

[1239] FS22-053第一序列-NPPYLFS (SEQ ID NO:19)

[1240] FS22-053第二序列-YYNRWQD (SEQ ID NO:174)

[1241] Fcab FS22-053 CH3结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:175)

[1242] (第一和第二序列用下划线标出)。

[1243] GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDG  
SFFLYSKLTVYYNRWQDGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1244] Fcab FS22-053 CH3结构域的核酸序列 (SEQ ID NO:176)

[1245] GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTG  
TTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA  
TGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGTATTATAACAGGTGGCAGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGT

[1246] 具有LALA的Fcab FS22-053 Fcab的核酸序列 (SEQ ID NO:177)

[1247] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGAAGCTGCCGGTGGTCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACAAGTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGTATTATAACAGGTGGCAGGATGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGT

[1248] 没有LALA的Fcab FS22-053 Fcab的核酸序列 (SEQ ID NO:178)

[1249] ACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAAGTGTGGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCG  
AAGGATACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGT  
GAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTA  
CCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCC  
AACAAGGCGCTGCCTGCCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCCAAGGGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGTATTATAACAGGTGGCAGGATGGGAACGT  
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[1250] 全长免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:179)

[1251] EPKSCDKTHTCPPCP

[1252] 人CD137的氨基酸序列 (SEQ ID NO:180)

[1253] 细胞外结构域 (斜体); 跨膜和细胞内结构域 (粗体)

[1254] lqdpesncpagtfcddnnrnqicspcppnsfssaggqrtdicrqckgvfrtrkecsstsnaecdctpg  
fhclgagcsmceqdkqgqeltkkgckdccfgtfndqkrigicrpwtncslgksvlnvgtkerdrvvcgppspadlsp  
gassvtppaparepghspqI ISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  
CRFPEEEEEGGCEL

[1255] 人CD137细胞外结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:181)

[1256] LQDPCSNCPAGTFCDDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGF  
HCLGAGCSMCEQDKQGGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRIGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGA  
SSVTPPAPAREPGHSPQ

[1257] 食蟹猴CD137的氨基酸序列 (SEQ ID NO:182)

[1258] 细胞外结构域 (斜体); 跨膜和细胞内结构域 (粗体)

*LQDLCSNCPAGTFCDDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAEC*  
*DCISGYHCLGAECMCEQDKQGGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRIGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKE*  
[1259] *RDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQ**IIFFLALTSTVVLFLFFLVLRFSVVKRSRKLL***  
***YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL***

[1260] 食蟹猴CD137细胞外结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:183)

[1261] LQDLCSNCPAGTFCDDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDISGY  
HCLGAECMCEQDKQGGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRIGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGA  
SSATPPAPAREPGHSPQ

[1262] 小鼠CD137的氨基酸序列 (SEQ ID NO:184)

[1263] 细胞外结构域 (斜体); 跨膜和细胞内结构域 (粗体)

*vqnsdncqpgtfcrkynpvckscppstfssigqpncnicrvcagyfrfkfcssthnaece*  
*ciegfhlgpqctrcekdcprgqeltkqgcktcslgtfndqngtgverpwtncslgrsvlktgtte*  
[1264] *kdvvcgppvvsfspsttisvtpeggpgghslqv**TLFLALTSALLLALIFITLLFSVLKWIRKKFPH***  
***IFKQPFKKTTGAAQEEDACSCRCPQEEEEGGGGYEL***

[1265] 小鼠CD137细胞外结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:185)



[1266] VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNCNICRVACAGYFRFKKFCSSSTHNAECECIEGFH  
CLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTFNQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKDVVCGPPVVSFSPST  
TISVTPEGGPGGHSLLQVL

[1267] G1/He1D1.3 mAb重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:186)

[1268] QVQLQESGPGLVGPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKSRVTM  
LVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1269] 人PD-L1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:187)

[1270] MRIFAVFIFMTYWHLNRAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVH  
GEEDLKVQHSSYRQARLLKDKLSLGNAAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDP  
VTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAE  
LVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

[1271] 鼠PD-L1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:188)

[1272] MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQVIQFV  
AGEEDLKPHSNFRGRASLPKDQLKGNAAALQITDVKLQDAGVYCCI ISYGGADYKRITLKVNAKYRKINQRISV  
DPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTSRTEGMLLNVTSRLVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHT  
AELIIPELPATHPPQNRTHWVLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET

[1273] 小鼠间皮素的氨基酸序列 (SEQ ID NO:189)

[1274] DAEQKACPPGKEPKYKVEDLIFYQWELEACVDGTMLARQMDLVNEIPFTYEQLSIFKHKLDKTYPQGY  
PESLIQQLGHFFRYVSPEDIHQWNVTSPTVKTLLKVSQKQKMAQAIALVACYLRGGGLDEDVMKALGDIPLSYL  
CDFSPQDLHSPSSVMWLVGPDLDKCSQRHLGLLYQKACSAFQNVSGLEYFEKIKTFLGGASVKDLRALSQHNVM  
DIATFKRLQVDSLVLGSVAEVQKLLGPNIVDLKTEEDKSPVRDWLFRQHKKDLRLGLGLQGGIPNGYLVLDNFVRE  
AFS

[1275] FS22m-063-AA/FS28m-228mAb<sup>2</sup>重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:190)

[1276] EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYFMVWRQAPGKGLEWVSMISPKSSNTYYADSVKGRFT  
ISRDNSTNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWFTPARFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEPYWSYVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVMNRYWELGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1277] FS22m-063-AA/FS28m-228mAb<sup>2</sup>的轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:191)

[1278] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG  
TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQPFPSFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK  
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1279] G1AA/He1D1.3 mAb (具有LALA)的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:192)

- QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNAL  
KSRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS�TVSSASTKGPSVFPLAPS  
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY
- [1280] ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV  
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1281] FS22-172-004-AA/S70 (具有LALA) 的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:193)  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADS  
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLA  
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
- [1282] TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1283] FS22-172-004-AA/S70 (不含LALA) 的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:194)
- [1284] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNYIIPPYNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1285] FS22-172-004-AA/S70的轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:194)
- [1286] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [1287] FS22-172-003-AA/S70 (具有LALA) 的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:195)
- [1288] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPYIIPPYNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1289] FS22-172-003-AA/S70 (不含LALA) 的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:196)
- [1290] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIIIPPYNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1291] FS22-172-002-AA/S70 (具有LALA) 的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:197)

[1292] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIQMPYPYNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1293] FS22-172-002-AA/S70 (不含LALA) 的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:198)

[1294] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIQMPYPYNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1295] FS22-172-002-AA/S70重链 (不含LALA) (SEQ ID NO:199)

[1296] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIQMPYPYNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1297] FS22-172-002-AA/S70重链 (具有LALA) (SEQ ID NO 200)

[1298] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIQMPYPYNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1299] FS22-053-011-AA/S70重链 (不含LALA) (SEQ ID NO:201)

[1300] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWRWTDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1301] FS22-053-011-AA/S70重链 (具有LALA) (SEQ ID NO:202)

[1302] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWRWTDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1303] FS22-053-008-AA/S70重链(具有LALA) (SEQ ID NO:203)

[1304] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVEHTRWLDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1305] FS22-053-008-AA/S70重链(不含LALA) (SEQ ID NO:204)

[1306] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFT  
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVEHTRWLDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1307] FS22m-063-AA/F2重链(不含LALA) (SEQ ID NO:205)

[1308] EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYWSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT  
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENWGSYFDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEPYWSYVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVNMNRWELGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1309] FS22m-063-AA/F2重链(不含LALA) (SEQ ID NO:206)

[1310] EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYWSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT  
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENWGSYFDLWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEPYWSYVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVNMNRWELGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1311] FS22m-063-AA/F2轻链 (SEQ ID NO:207)

[1312] DIVMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGRAPKVLIYKASTLESQVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1313] FS22m-063/FS28m-228重链(不含LALA) (SEQ ID NO:208)

[1314] EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYFMVWRQAPGKGLEWVSMISPKSSNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWFTPARFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEPYWSYVSLTCLVKGFYPSTIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVMNRYWELGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[1315] 参考文献

[1316] 本说明书中提及的所有文件均通过引用整体并入本文。

[1317] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 基本的局部比对搜索工具 (Basic local alignment search tool), J. Mol. Biol. 215(3), 403-10 (1990)。

[1318] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 缺口BLAST和PSI-BLAST: 新一代蛋白质数据库搜索程序 (Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs), Nucleic Acids Res. 25(17), 3389-402 (1997)。

[1319] Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW, 癌症/睾丸抗原表达对晚期多发性骨髓瘤患者的预后影响 (Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients), Cancer Immun. 8, 2 (2008)。

[1320] Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P, 使用异源二聚体通过噬菌体展示库重建同型二聚体的结构域界面 (Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library), J. Mol. Biol. 270(1), 26-35 (1997)。

[1321] Bagshawe KD, Sharma SK, Springer CJ, Antoniop P, Rogers GT, Burke PJ, Melton R, 抗体-酶缀合物可以从肿瘤部位无活性的前体产生细胞毒性药物 (Antibody-enzyme conjugates can generate cytotoxic drugs from inactive precursors at tumor sites), 抗体、免疫缀合物和放射性药物 4, 915-922 (1991)。

[1322] Bartkowiak, T. 和 Curran, M. A., 2015, 4-1BB 激动剂: 肿瘤免疫的多潜能增强剂 (4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity), 肿瘤学前沿, 5: 117, 第 1-17 页。

[1323] Bhome R, Bullock MD, Al Saihati HA, Goh RW, Primrose JN, Sayan AE, Mirnezami AH, 肿瘤微环境的俯视图: 结构、细胞和信号传导 (A top-down view of the tumor microenvironment: structure, cells and signaling), Front. Cel. Dev. Biol. 3, 33 (2015)。

[1324] Bitra A, Tzanko D, Wang J, Picarda G, Benedict C, Croft M, Zajonc D. 2017, 鼠 4-1BB 的晶体结构及其与 4-1BBL 的相互作用支持 galectin-9 在 4-1BB 信号传导中的作用 (Crystal structure of murine 4-1BB and its interaction with 4-1BBL support a role for galectin-9 in 4-1BB signalling), 生物化学杂志。

[1325] Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S,

Daëron M., 2009, 血液 113(16), 3716-25。

[1326] Carter P, Smith L, Ryan M, 用于肿瘤靶向抗体的细胞表面抗原的鉴定和验证 (Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology), *Endocr. Relat. Cancer* 11(4), 659-87 (2004)。

[1327] Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, Mellman I, Prindiville SA, Viner JL, Weiner LM, Matrisian LM, Clin. Cancer Res. 15(17), 5323-37 (2009)。

[1328] Chen DS, Mellman I, 肿瘤学遇见免疫学: 癌症-免疫周期 (Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle), *Immunity* 39(1), 1-10 (2013)。

[1329] Chester, C. 等人, 2015, 双重抗体疗法可利用先天性抗肿瘤免疫反应增强对肿瘤的抗体靶向 (Dual antibody therapy to harness the innate anti-tumor immune response to enhance antibody targeting of tumors), 免疫学最新观点, 33, 第1-8页。

[1330] Chester, C. 等人, 2018, 针对4-1BB的免疫疗法: 机理基础、临床结果和未来策略 (Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies), 血液, 131(1), 第49-57页。

[1331] Chester, C., Ambulkar, S. 和 Kohrt, H.E., 2016, 4-1BB激动剂: 在癌症免疫治疗中添加促进剂 (4-1BB agonism: adding the accelerator to cancer immunotherapy), 癌症免疫学, 65(10): 1243-1248

[1332] Croft, M., 2003, TNFR家族的共同刺激成员: 有效T细胞免疫的关键? (Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?), *Nat. Rev. Immunol.* 3: 609-620。

[1333] Dubrot J, Milheiro F, Alfaro C, Palasón A, Martínez-Forero I, Pérez-Gracia JL, Morales-Kastresana A, Romero-Trevejo JL, Ochoa MC, Hervás-Stubbs S, Prieto J, Jure-Kunkel M, Chen L, Melero I, 用抗CD137mAb进行治疗会导致肝脏T细胞大量积累, 而在该器官中没有选择性的抗肿瘤免疫治疗作用 (Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ), *Cancer Immunol. Immunother.* 59(8), 1223-33 (2010)。

[1334] Fisher T, Kamperschroer C, Oliphant T, Love V, Lira P, Doyonnas R, Bergqvist S, Baxi S, Rohner A, Shen A, Huang C, Sokolowski S, Sharp L, 2012, 单克隆抗体PF-05082566靶向4-1BB可增强T细胞功能并促进抗肿瘤活性 (Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes anti-tumour activity), *Cancer Immunol Immunother.* 61: 1721-1733。

[1335] Gubin MM, Artyomov MN, Mardis ER, Schreiber RD, 肿瘤新抗原: 建立个性化癌症免疫疗法的框架 (Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy), *J. Clin. Invest.* 125(9), 3413-21 (2015)。

[1336] Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnajatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK, 癌症-睾丸基因协调表达是非小细胞肺癌预后不良的标志 (Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of

poor outcome in non-small cell lung cancer), Clin.Cancer Res.11(22),8055-62 (2005)。

[1337] Hasenhindl C,Traxlmayr MW,Wozniak-Knopp G,Jones PC,Stadlmayr G,RükerF,Obinger C,文库规模的稳定性评估:评估IgG1-Fc CH3域C末端环的可交换性和残基插入的快速方法(Stability assessment on a library scale:a rapid method for the evaluation of the commutability and insertion of residues in C-terminal loops of the CH3 domains of IgG1-Fc),Protein Eng.Des.Sel.,26(10),675-82 (2013)。

[1338] Hezareh M,Hessell AJ,Jensen RC, van de Winkel JG,Parren PW,2001, J.Virol.75(24),12161-8)。

[1339] Hinner等人,“CD137 (4-1BB)/HER2双特异性的PRS-343结合辅助性T细胞,导致肿瘤生长抑制和TIL扩增”在CRI-CIMT-AACR国际癌症免疫治疗会议:将科学转化为生存上的海报展示;2016年9月25日至28日;纽约州,纽约。

[1340] Hu S,Shively L,Raubitschek A,Sherman M,Williams LE,Wong JY,Shively JE,Wu AM,微型体:一种新颖的工程化抗癌胚抗原抗体片段(单链Fv-CH3),可快速、高水平地靶向异种移植物(Minibody:A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment(single-chain Fv-CH3)which exhibits rapid,high-level targeting of xenografts),Cancer Res.56(13),3055-61(1996)。

[1341] Hurtado,J.C.,Kim,Y.J.和Kwon,B.S.,1997,通过4-1BB的信号与先前激活的脾T细胞共刺激并抑制激活诱导的细胞死亡(Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death),免疫学杂志(马里兰州,巴尔的摩:1950),158(6),第2600-2609页。

[1342] Idusogie EE,Presta LG,Gazzano-Santoro H,Totpal K,Wong PY,Ultsch M,Meng YG,Mulkerrin MG,Clq结合位点在具有人IgG1 Fc的嵌合抗体rituxan上的定位(Mapping of the Clq binding site on rituxan,a chimeric antibody with a human IgG1 Fc),J.Immunol.164(8),4178-84(2000)。

[1343] Jefferis R,Reimer CB,Skvaril F,de Lange G,Ling NR,Lowe J,Walker MR,Phillips DJ,Aloisio CH,Wells TW,对人IgG亚类具有特异性的单克隆抗体的评估:IUIS/WHO合作研究的结果(Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG sub-classes:results of an IUIS/WHO collaborative study),Immunol.Lett.1,223-52(1985)。

[1344] Jefferis R,Reimer CB,Skvaril F,de Lange GG,Goodall DM,Bentley TL,Phillips DJ,Vlug A,Harada S,Radil J,对人IgG亚类具有特异性的单克隆抗体的评估:第二次IUIS/WHO合作的结果研究(Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses:results of the 2nd IUIS/WHO collaborative study),Immunol.Lett.31(2),143-68(1992)。

[1345] Juneja V,McGuire K,Manguso R,LaFleur M,Collins N,Haining N,Freeman G,Sharpe A,2017,肿瘤细胞上的PD-L1足以逃避免疫原性肿瘤并抑制CD8 T细胞的细胞毒性(PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors

and inhibits CD8 T cell cytotoxicity), JEM 214(4):895。

[1346] Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C.《具有免疫学意义的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第5版,NIH出版号91-3242,华盛顿特区:美国卫生与公共服务部(1991)。

[1347] Klein C, Schaefer W, Regula JT, 使用CrossMAb技术生成双特异性和多特异性抗体(The use of CrossMAb technology for the generation of bi-and multispecific antibodies), MAbs.8(6), 1010-20(2016)。

[1348] Kocak E, Lute K, Chang X, May KF Jr, Exten KR, Zhang H, Abdessalam SF, Lehman AM, Jarjoura D, Zheng P, Liu Y, 2006, 抗CTL抗原4和抗4-1BB抗体的联合治疗可增强癌症免疫力并降低自身免疫性(Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity), Cancer Res 66(14):7276-84。

[1349] Kohrt, H.E. 等人, 2010, CD137刺激增强了抗CD20抗体的抗淋巴瘤活性(CD137 stimulation enhances the antilymphoma activity of anti-CD20 antibodies), 血液, 117(8), 第2423-2432页。

[1350] Kohrt, H.E. 等人, 2014, 靶向CD137增强西妥昔单抗的功效(Targeting CD137 enhances the efficacy of cetuximab), 临床研究杂志, 124(6), 第2668-2682页。

[1351] Kohrt, H.E., Houot, R., Weiskopf, K. 等人, 2012b, 用CD137特异性抗体刺激自然杀伤细胞可增强曲妥珠单抗在乳腺癌异种移植模型中的功效(Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer), 临床研究杂志, 122(3), 第1066-1075页。

[1352] Kontermann(2012), 双特异性抗体的双重靶向策略(Dual targeting strategies with bispecific antibodies), MAbs 4(2):182-97。

[1353] Ledermann JA, Begent RH, Massof C, Kelly AM, Adam T, Bagshawe KD, 用放射性标记的癌胚抗原抗体反复治疗的I期研究, 间歇或连续给予环孢素A以抑制免疫反应(A phase-I study of repeated therapy with radiolabelled antibody to carcinoembryonic antigen using intermittent or continuous administration of cyclosporin A to suppress the immune response), Int.J.Cancer 47(5), 659-64 (1991)。

[1354] Lefranc MP, Giudicelli V, Duroux P, Jabado-Michaloud J, Folch G, Aouinti S, Carillon E, Duvergey H, Houles A, Paysan-Lafosse T, Hadi-Saljoqi S, Sasorith S, Lefranc G, Kossida S, IMGT®, 国际免疫遗传学信息系统®25年(IMGT®, the international ImmunoGenetics information system®25years on), Nucleic Acids Res.43(数据库问题), D413-22(2015)。

[1355] Lefranc MP, Pommié C, Kaas Q, Duprat E, Bosc N, Guiraudou D, Jean C, Ruiz M, Da Piedade I, Rouard M, Foulquier E, Thouvenin V, Lefranc G, IMGT免疫球蛋白和T细胞受体恒定域和Ig超家族C样域的唯一编号(IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains), Dev.Comp.Immunol.29(3), 185-203(2005)。



[1356] Lin W.等人,2008,CD137在人NK细胞上的Fc依赖性表达:洞悉抗CD137单克隆抗体的“激动作用”(Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells:insights into ‘agonistic’ effects of anti-CD137 monoclonal antibodies),112(3)699-707

[1357] Link等人,2018,MP0310的临床前药理学:4-1BB/FAP双特异性DARPin候选药物促进肿瘤限制性T细胞共刺激(Preclinical pharmacology of MP0310:A 4-1BB/FAP bispecific DARPin drug candidate promoting tumor-restricted T-cell costimulation)[摘要],美国癌症研究协会年会;2018年4月14日至18日;芝加哥:AACR;8摘要编号3752。

[1358] Liu等人,2017,双特异性DART®蛋白质对CD137共刺激途径的肿瘤抗原表达依赖性激活(Tumor Antigen Expression-dependent Activation of the CD137 Costimulatory Pathway by Bispecific DART® Proteins),美国癌症研究协会年会,2017年4月1日至5日,华盛顿特区,摘要编号3642。

[1359] Makkouk,A.,Chester,C.和Kohrt,H.E,2016,抗CD137癌症免疫疗法的原理(Rationale for anti-CD137 cancer immunotherapy),欧洲癌症杂志(英国牛津:1990),54,第112-119页。

[1360] Malarkannan S,Horng T,Shih PP,Schwab S,Shastri N,通过新颖的翻译起始机制展示框架外肽/MHC I类复合物(Presentation of out-of-frame peptide/MHC class I complexes by a novel translation initiation mechanism),免疫10(6),681-90(1999)。

[1361] Napoletano C,Bellati F,Tarquini E,Tomoo F,Taurino F,Spagnoli G,Rughetti A,Muzii L,Nuti M,Benedetti Panici P,MAGE-A和NY-ESO-1在宫颈癌中的表达:预后因素和化学疗法的影响(MAGE-A and NY-ESO-1 expression in cervical cancer: prognostic factors and effects of chemotherapy),Am.J.Obstet.Gynecol.198(1),99.e1-99.e7(2008)。

[1362] Pearson WR,Lipman DJ,改进的生物序列比较工具(Improved tools for biological sequence comparison),Proc.Natl.Acad.Sci.美国,85(8),2444-8(1988)。

[1363] Podojil JR,Miller SD,B7-H4潜在靶向治疗癌症(Potential targeting of B7-H4 for the treatment of cancer),Immunol.Rev.276(1),40-51(2017)。

[1364] Reichen等人,2018,通过SPECT/CT和定量生物分布分析了F细胞介导的T细胞激动性FAP/4-1BB DARPin候选药物的肿瘤蓄积(FAP-mediated tumor accumulation of a T-cell agonistic FAP/4-1BB DARPin drug candidate analyzed by SPECT/CT and quantitative biodistribution)[摘要],美国癌症研究协会年会;2018年4月14日至18日;芝加哥:AACR;摘要编号3029。

[1365] Ridgway J.B.B,Presta L.G,Carter P,抗体CH3结构域的“旋钮入孔”工程用于的重链异二聚化(‘Knobs-into-holes’ engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization),Protein Engineering9(7),617-621(1996)。

[1366] Rosenberg S,癌症疫苗的开发(Development of Cancer Vaccines),ASCO教育书籍春季:60-62(2000)。

[1367] Scott AM,Renner C,抗体识别的肿瘤抗原(Tumour Antigens Recognized by

Antibodies), eLS(2001)。

[1368] Segal, N.H. 等人, 2018, 4-1BB/CD137 激动剂单剂埃托米鲁单抗 (PF-05082566) 在晚期癌症患者中的 I 期研究 (Phase I Study of Single-Agent Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Patients with Advanced Cancer), 临床癌症研究, 24(8):1816-1823。

[1369] Shuford, W.W., Klussman, K. 和 Tritchler, D.D., 1997, 4-1BB 共刺激信号优先诱导 CD8+T 细胞增殖, 并导致体内细胞毒性 T 细胞反应的扩增 (4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses), J Exp Med, 186(1):47-55。

[1370] Simpson AJ, Cabellero OL, Jungbluth OL, Chen YT, Old LJ, 癌症/睾丸抗原, 配子发生和癌症 (Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer), Nat.Rev.Cancer 5(8), 615-25(2005)。

[1371] Smith TF, Waterman MS, 常见分子亚序列的鉴定 (Identification of common molecular subsequences), J.Mol.Biol.147(1), 195-7(1981)。

[1372] Spiess, Zhai, Carter (2015), 双特异性抗体替代的分子形式和治疗应用 (Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies), 分子免疫学, 67:95-106。

[1373] Tai YT, Anderson KC, 在多发性骨髓瘤中靶向 B 细胞成熟抗原 (Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma), 免疫疗法 7(11), 1187-99(2015)。

[1374] Tello 等人, 1993, 抗溶菌酶抗体的抗原结合的三维结构和热力学 (Three-dimensional structure and thermodynamics of antigen binding by anti-lysozyme antibodies), Biochem Soc.Trans., 21(4):943-6。

[1375] Tinguely M, Jenni B, Knights A, Lopes B, Korol D, Rousson V, Curioni Fontecedro A, Cogliatti Bittermann AG, Schmid U, Dommann-Scherrer C, Maurer R, Renner C, Probst-Hensch NM, Moch H, Knuth A, Zippelius A, 浆细胞骨髓瘤中的 MAGE-C1/CT-7 表达: 亚细胞定位对临床结果的影响 (MAGE-C1/CT-7 expression in plasma cell myeloma: sub-cellular localization impacts on clinical outcome), Cancer Sci. 99(4), 720-5(2008)。

[1376] Velazquez EF, Jungbluth AA, Yancovitz M, Gnjatich S, Adams S, O'Neill D, Zavilevich K, Albukh T, Christos P, Mazumdar M, Pavlick A, Polsky D, Shapiro R, Berman R, Spira J, Busam K, Osman I, Bhardwaj N, 原发性和转移性恶性黑色素瘤 (MM) 中癌症/睾丸抗原 NY-ESO-1 的表达 - 与预后因素相关 (Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in primary and metastatic malignant melanoma (MM) - correlation with prognostic factors), Cancer Immun. 7, 11(2007)。

[1377] Vinay, D.S. 和 Kwon, B.S., 2011, T 细胞以外的 4-1BB 信号传导 (4-1BB signalling beyond T cells), Cell Mol Immunol. 8(4):284-284

[1378] Wang X, Mathieu M, Brezski RJ, IgG Fc 工程改造以调节抗体效应子功能 (IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions), 蛋白质细胞, 9(1), 63-73 (2018)。

[1379] Wen T, Bukczynski J, Watts TH., 2002, 4-1BB配体介导的人类T细胞共刺激诱导CD4和CD8 T细胞扩增、细胞因子产生和细胞溶解效应子功能的发展 (4-1BB Ligand-Mediated Costimulation of Human T Cells Induces CD4 and CD8 T Cell Expansion, Cytokine Production, and the Development of Cytolytic Effector Function), 免疫学杂志, 168(10):4897-906。

[1380] Wesche-Soldato DE, Chung CS, Gregory SH, Salazar-Mather TP, Ayala CA, Ayala A, CD8+T细胞在败血症后促进肝脏炎症和细胞凋亡:Fas-FasL的作用 (CD8+T cells promote inflammation and apoptosis in the liver after sepsis:role of Fas-FasL), Am.J.Pathol. 171(1), 87-96 (2007)。

[1381] Westwood, J.A. 等人, 2014, 在小鼠myc驱动的血液系统癌症中的抗CD137和抗CD40抗体联合治疗 (Combination anti-CD137 and anti-CD40 antibody therapy in murine myc-driven hematological cancers), 白血病研究, 38(8), 第948-954页。

[1382] Won, E.-Y. 等人, 2009, 人4-1BB配体的三聚体的结构在肿瘤坏死因子超家族成员中是独特的 (The structure of the trimer of human 4-1BB ligand is unique among members of the tumor necrosis factor superfamily), 生物化学杂志, 285(12), 第9202-9210页。

[1383] Wozniak-Knopp G, Bartl S, Bauer A, Mostageer M, Woisetschläger M, Antes B, Ettl K, Kainer M, Weberhofer G, Wiederkum S, Himmler G, Mudde GC, Rüker F, 在结构环中引入抗原结合位点免疫球蛋白恒定域:具有改造的HER2/neu结合位点和抗体特性的Fc片段 (Introducing antigen-binding sites in structural loops of immunoglobulin constant domains:Fc fragments with engineered HER2/neu-binding sites and antibody properties), Protein Eng.Des.Sel. 23(4), 289-97 (2010)。

[1384] Ye Q, Song D, Poussin M, Yamamoto T, Best A, Li C, Coukos G, Powell Jr D, 2014, CD137可以准确鉴定并富集肿瘤中天然存在的肿瘤反应性T细胞 (CD137 accurately identifies and enriches for naturally-occurring tumor-reactive T cells in tumor), 临床癌症研究 20(1):44-55。

[illegible]

图1A

图1B

[illegible]

图1C

Fcab 克隆	与克隆 FS22-053 的 CH3 结构域相比在 CH3 结构域中的序列同一性百分比
FS22-053-008	96.4%
FS22-053-009	96.4%
FS22-053-010	97.3%
FS22-053-011	97.3%
FS22-053-012	95.5%
FS22-053-013	96.4%
FS22-053-014	97.3%
FS22-053-015	95.5%
FS22-053-016	96.4%
FS22-053-017	96.4%

图1D

Fcab 克隆	与克隆 FS22-172 的 CH3 结构域相比在 CH3 结构域中的序列同一性百分比
FS22-172-001	96.4%
FS22-172-002	96.4%
FS22-172-003	96.4%
FS22-172-004	97.3%
FS22-172-005	97.3%
FS22-172-006	99.1%

图1E

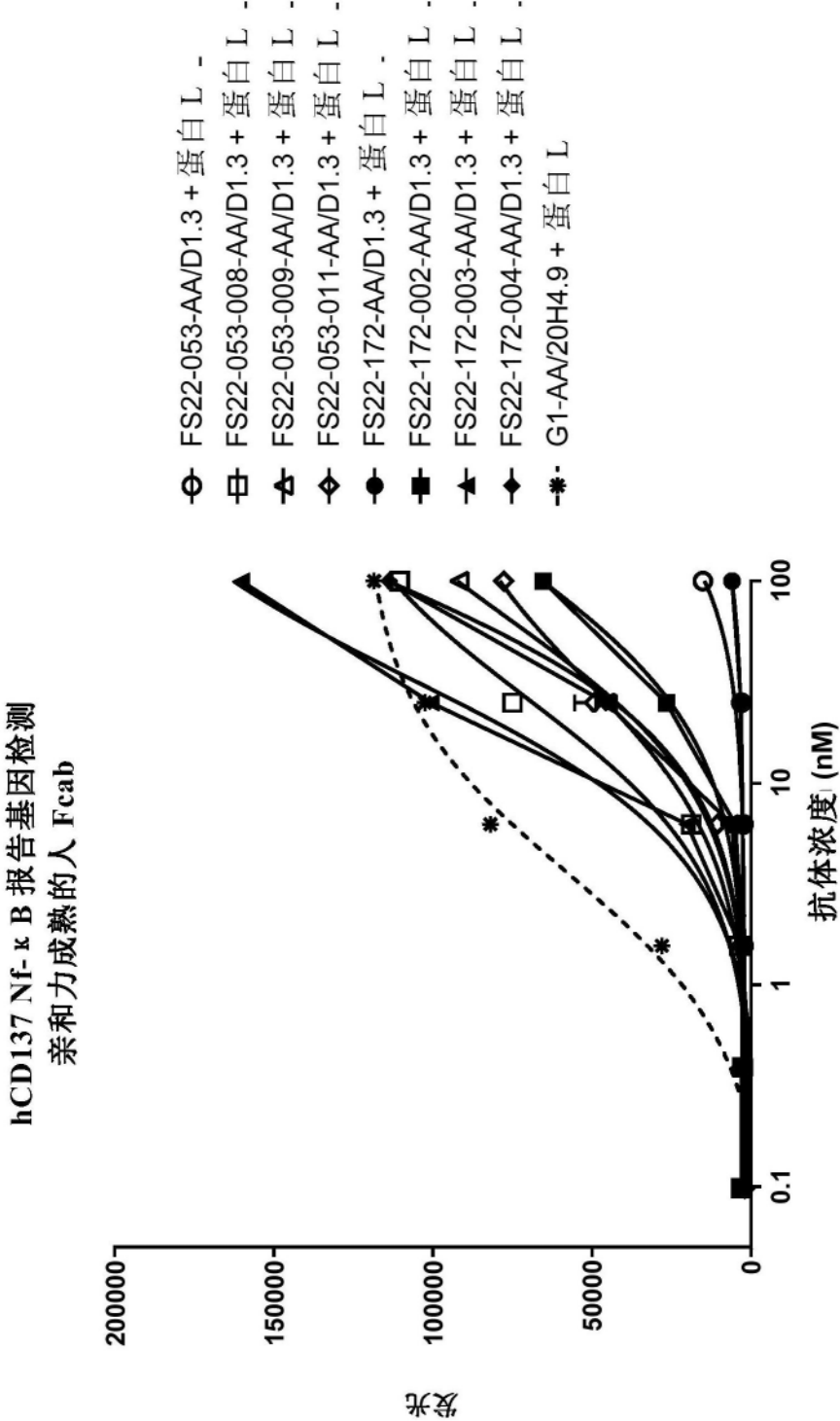


图2



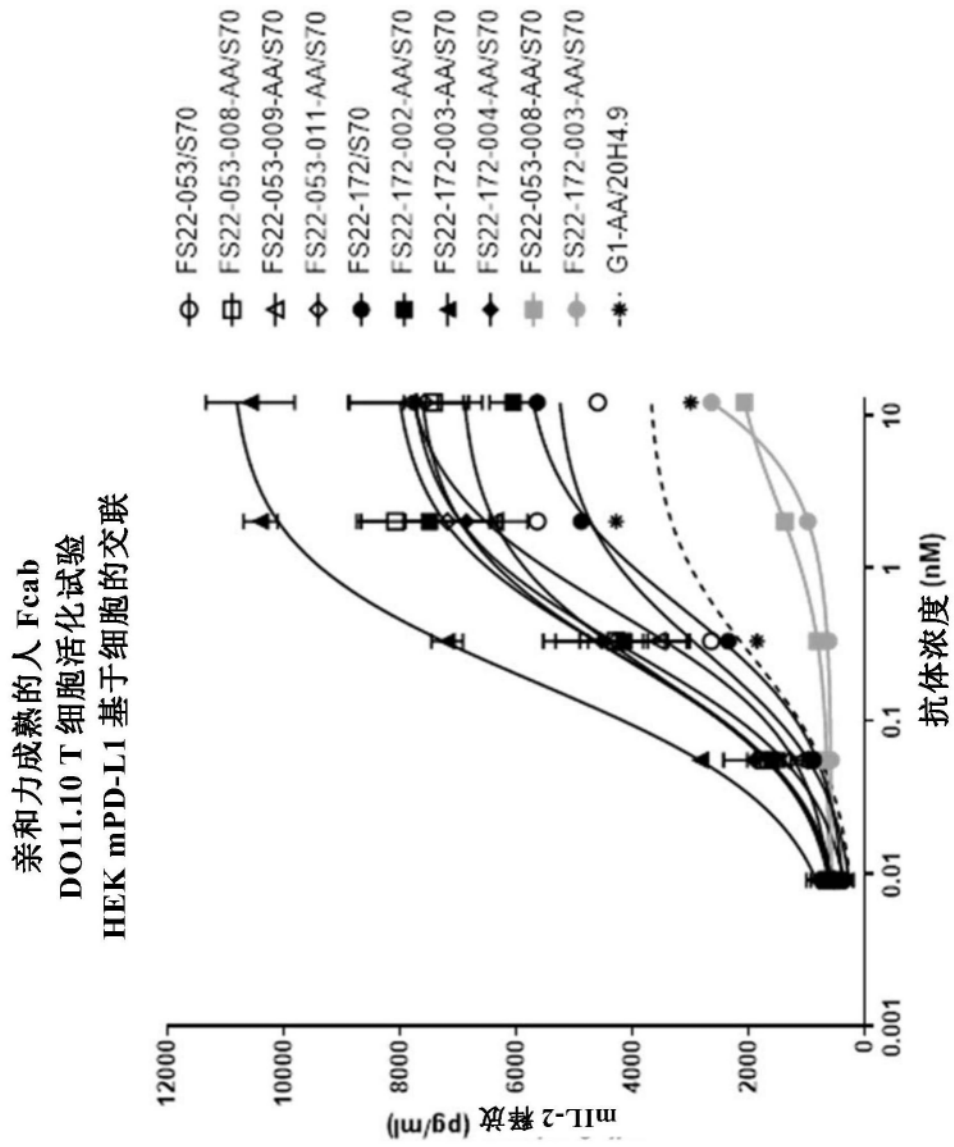


图3

原代人 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化试验  
供体 170505B  
HEK mPD-L1 基于细胞的交联

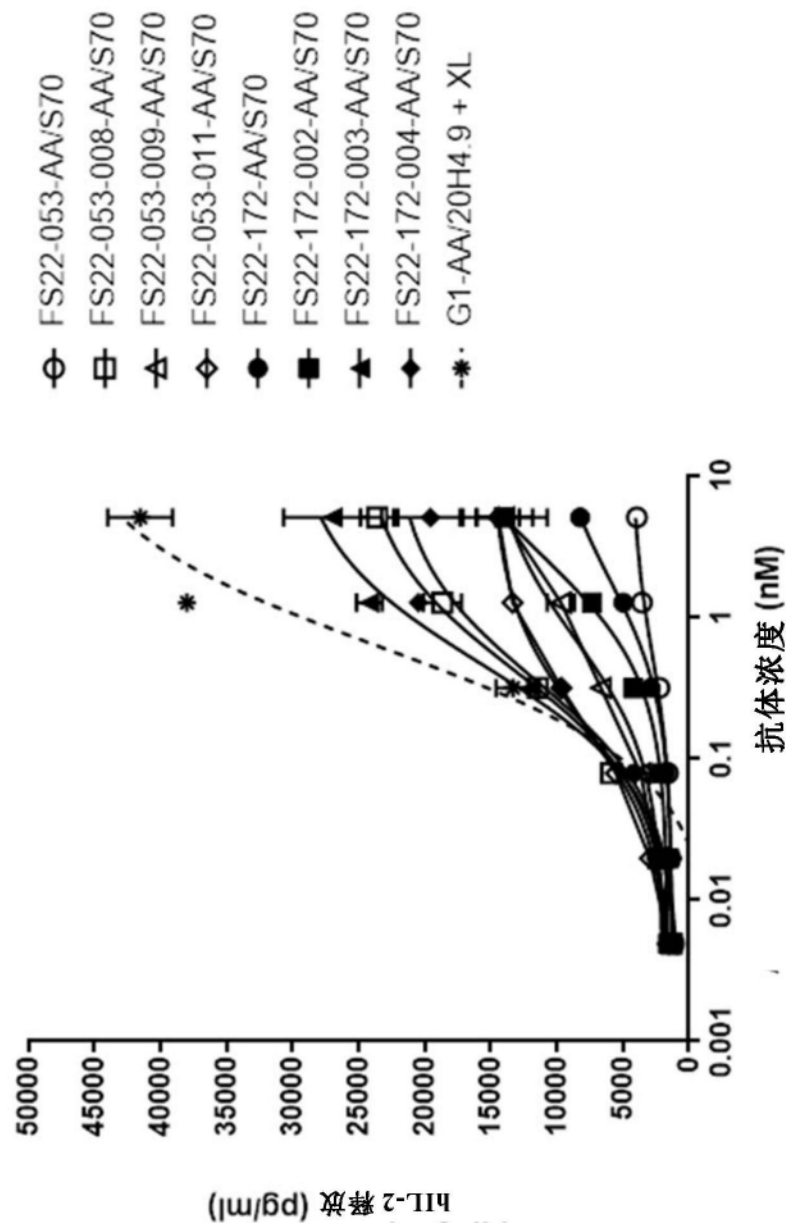


图4

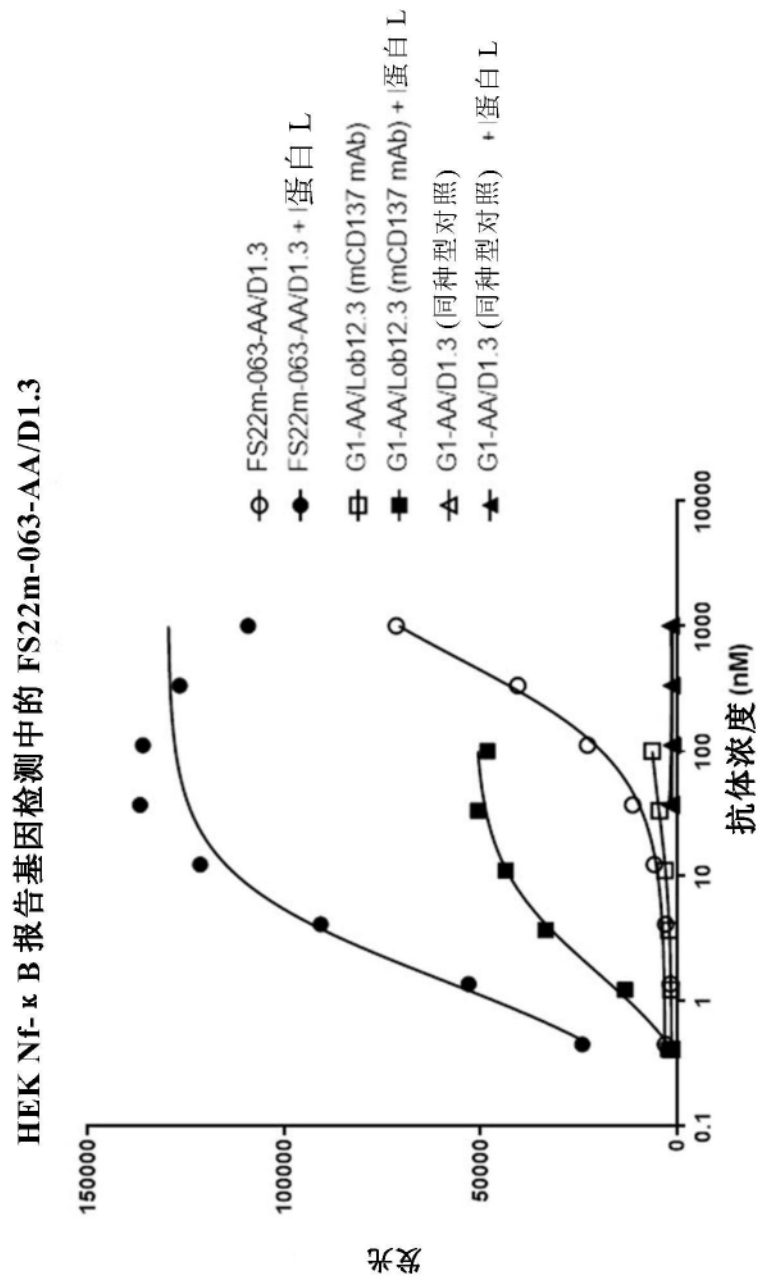


图5

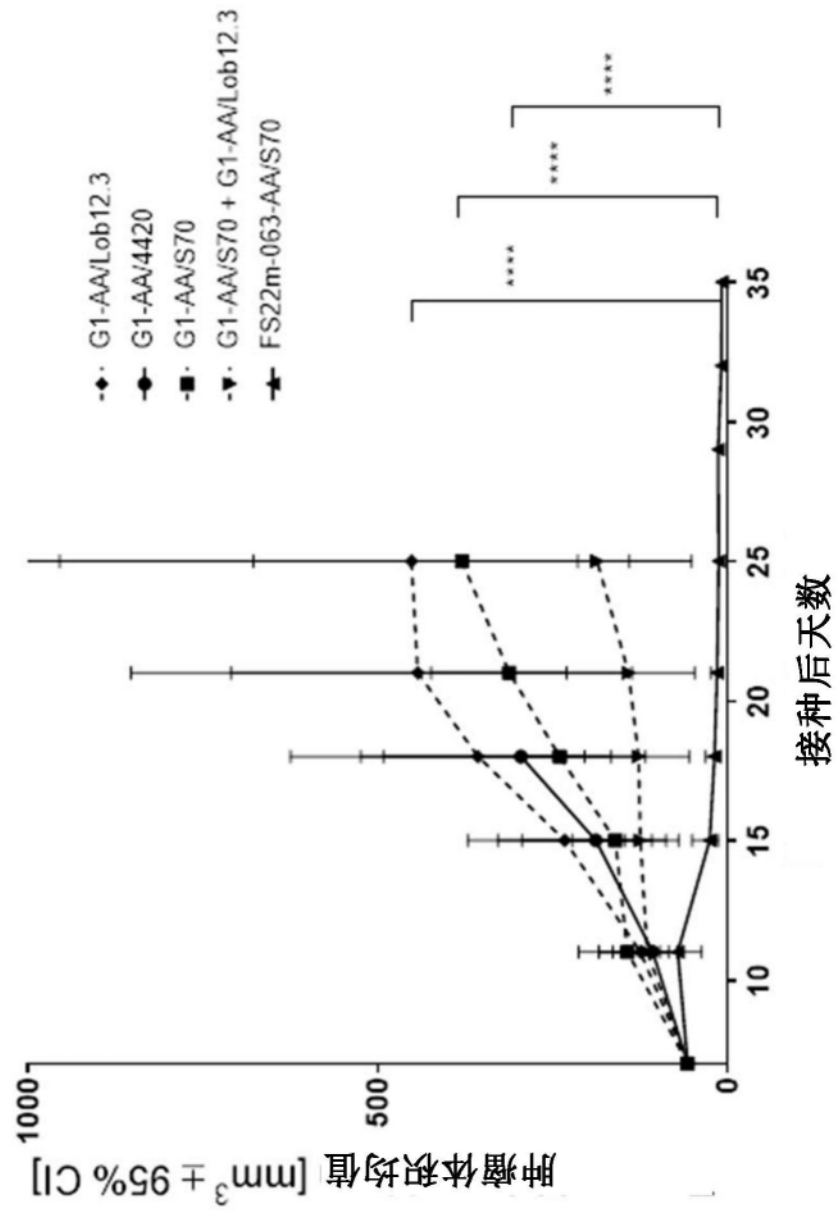


图6

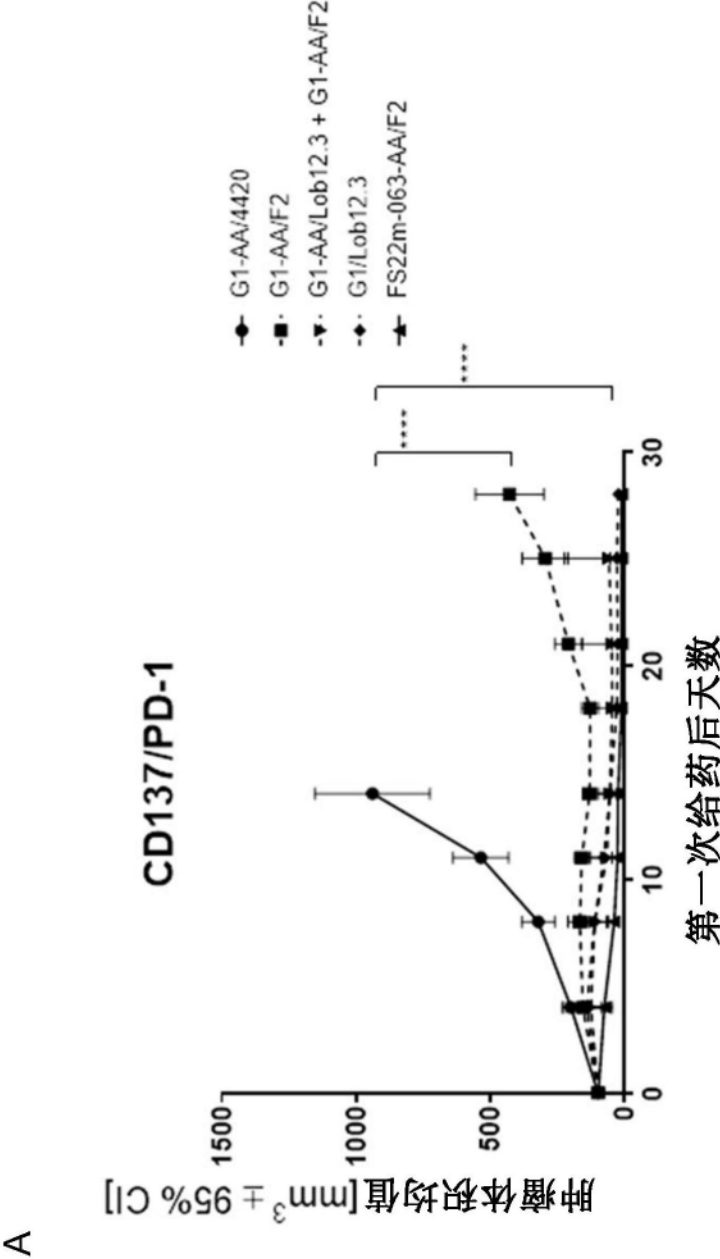


图7

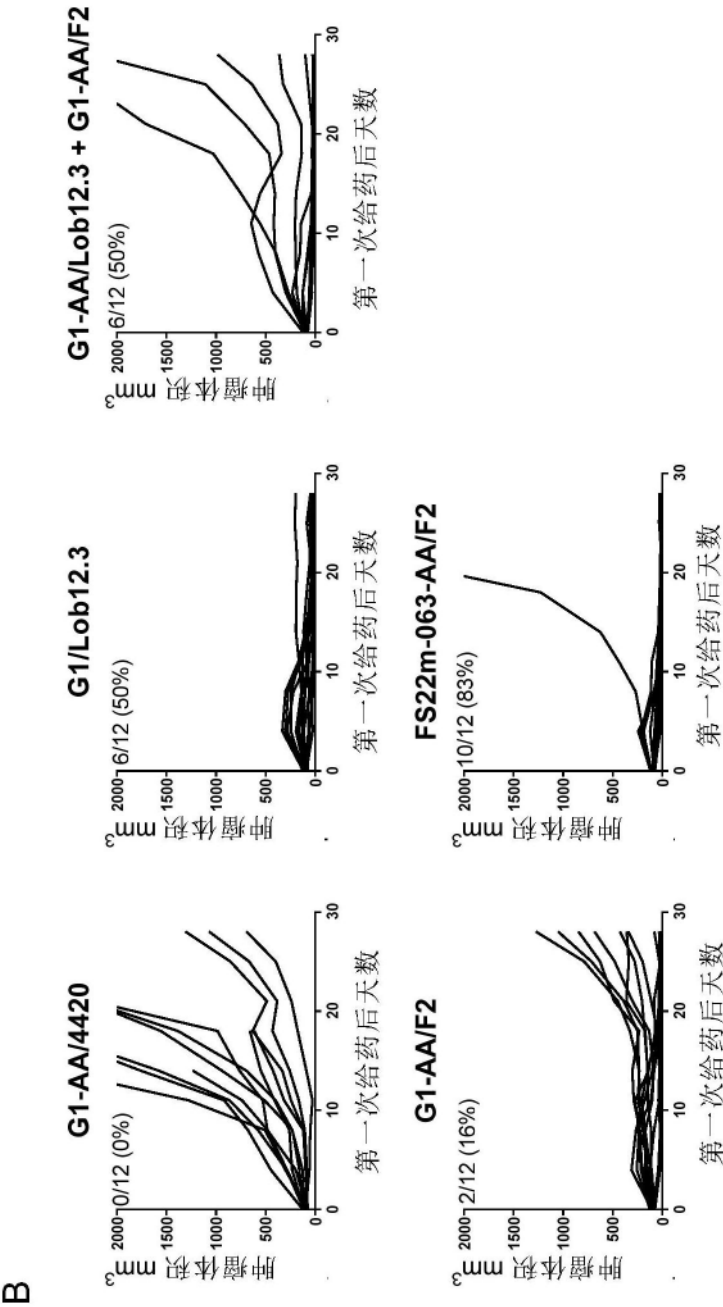


图7续

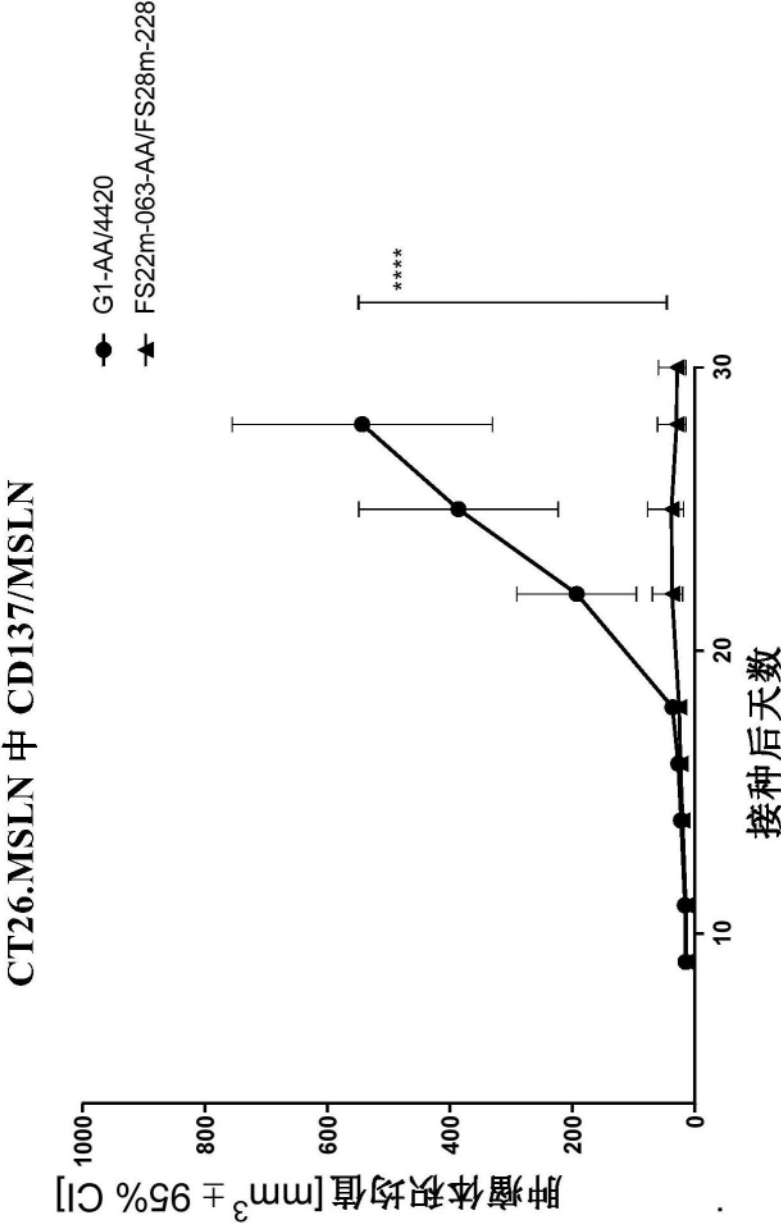


图8

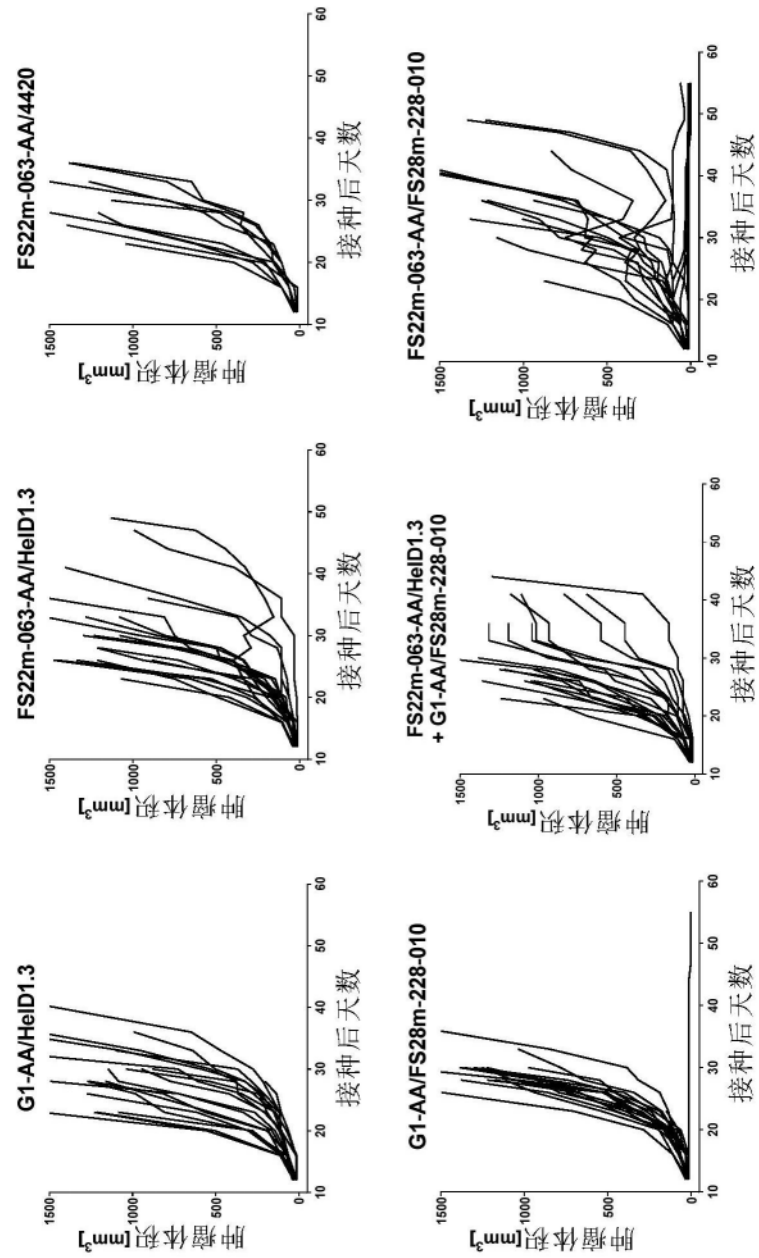


图9



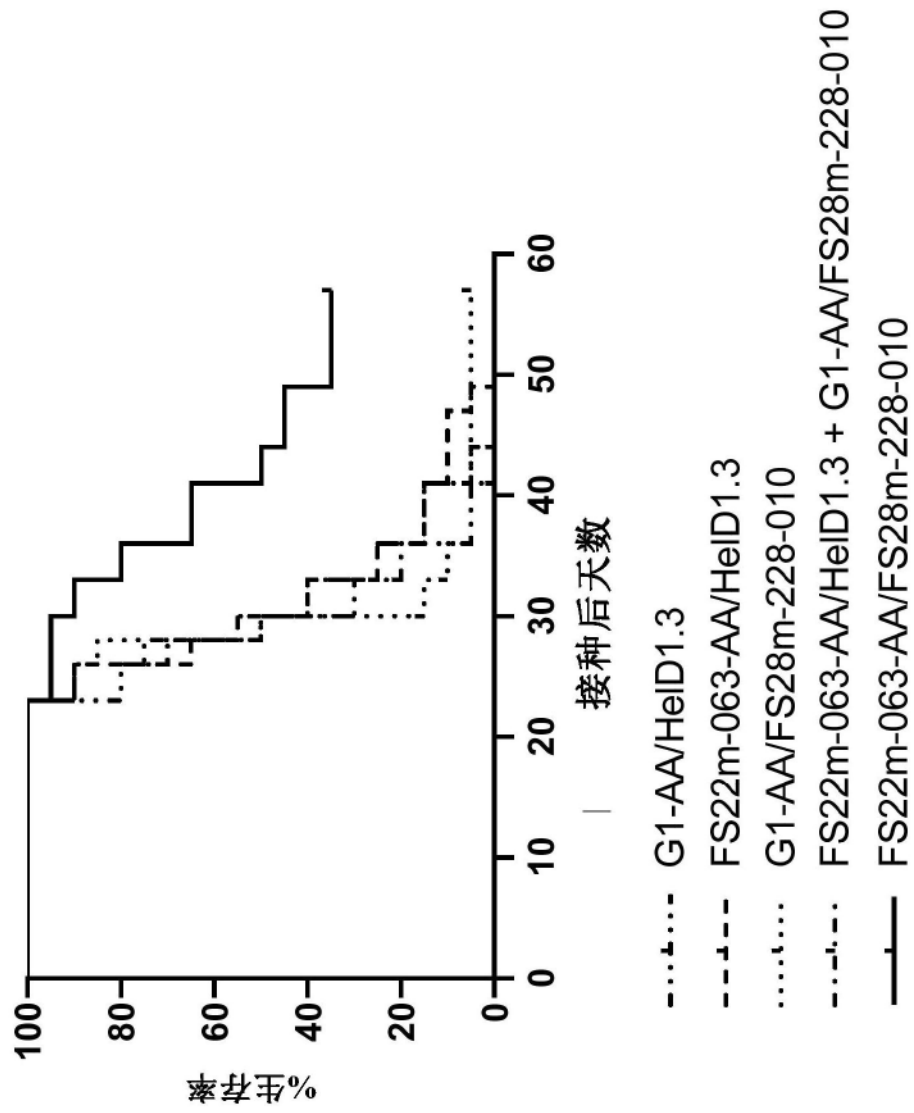


图10

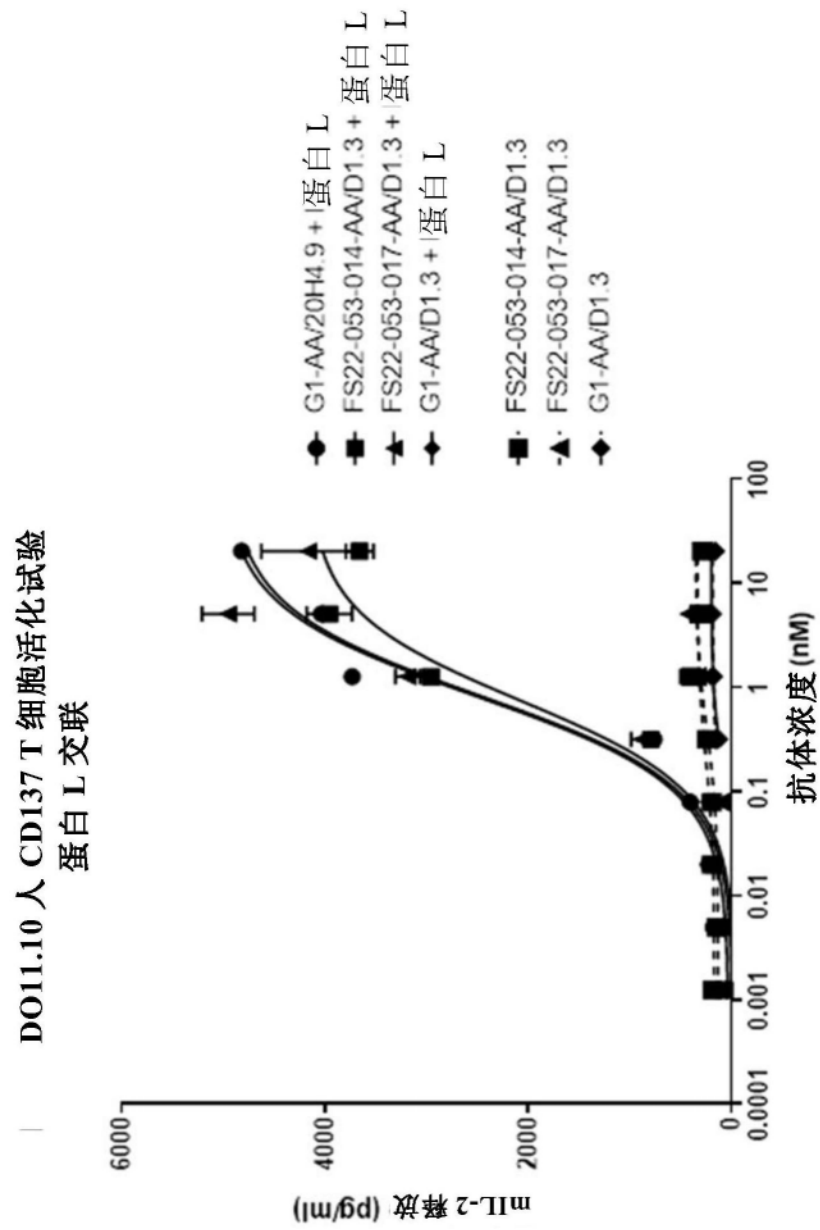


图11

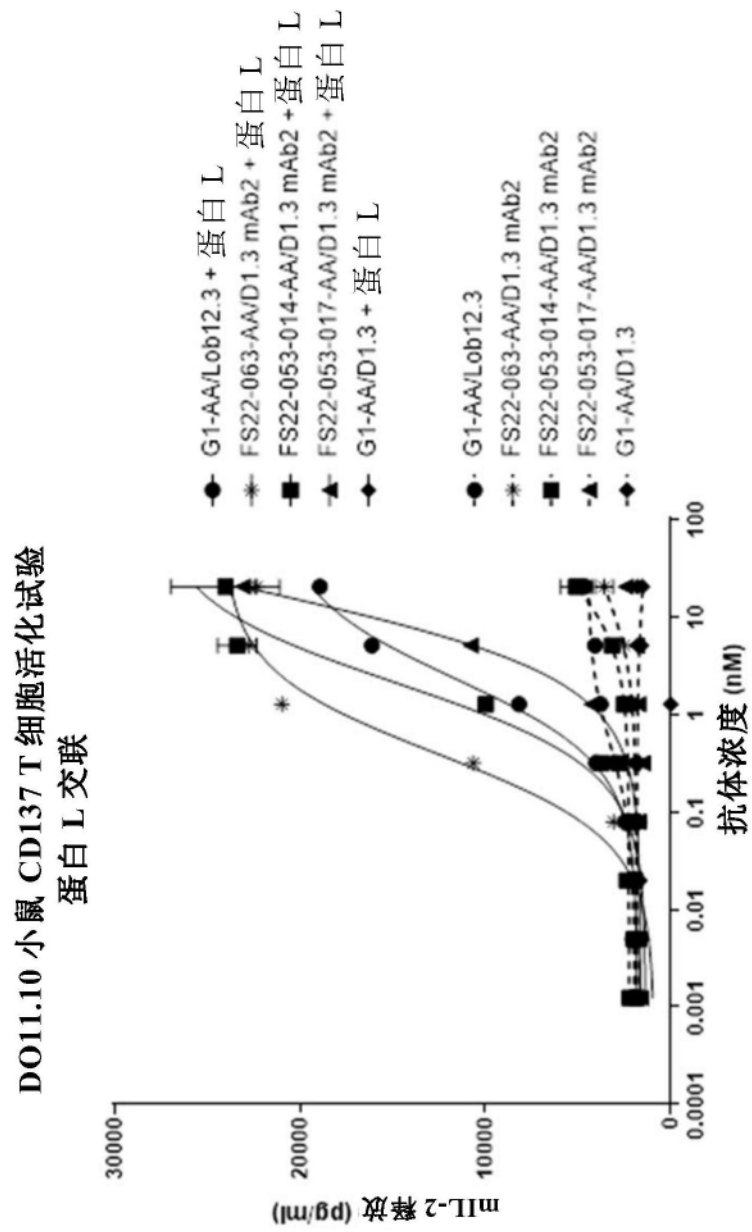


图12

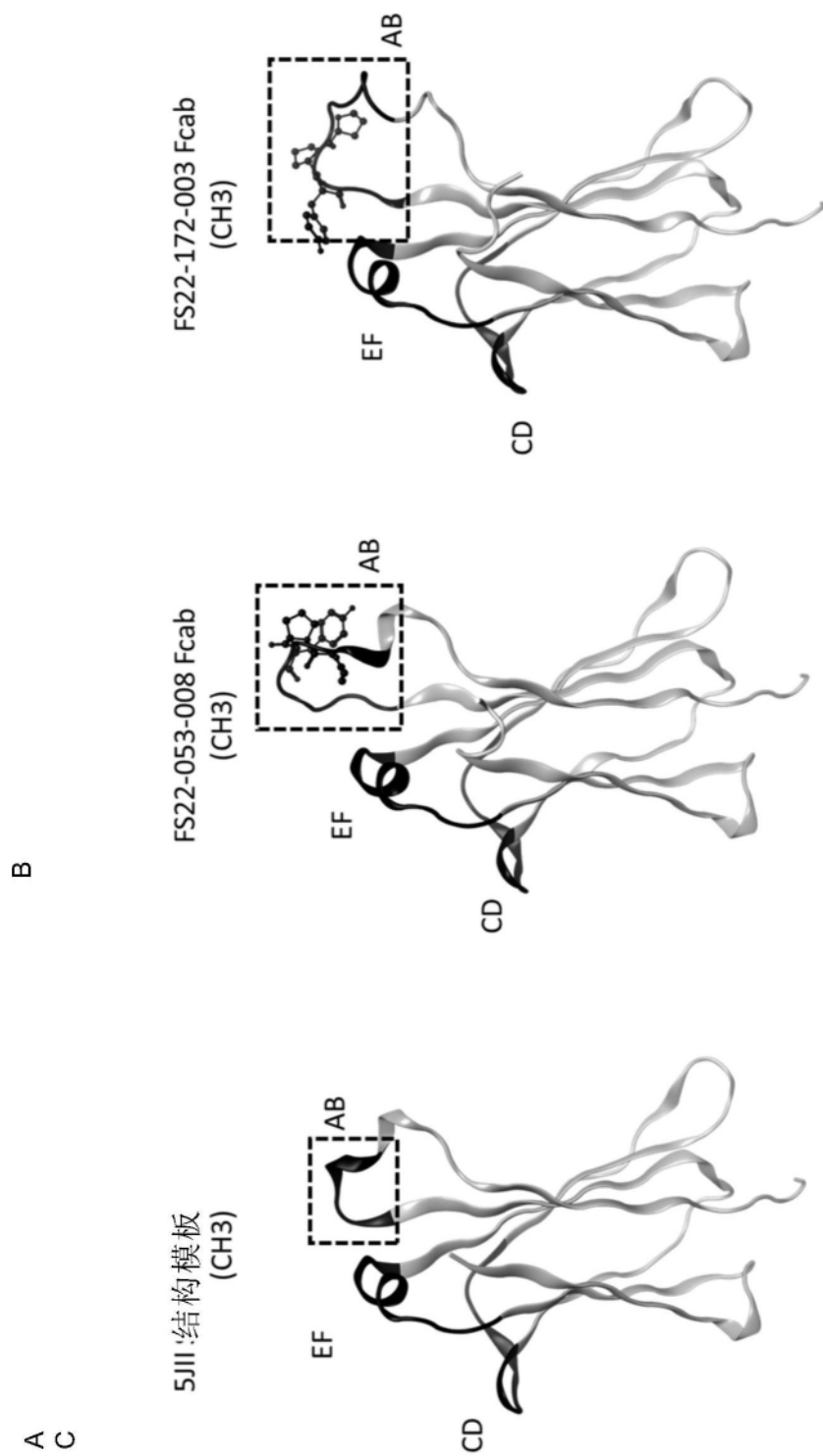


图13

固定在 CM5 SPR 芯片上的人  
CD137-mFc-Avi [450RU]

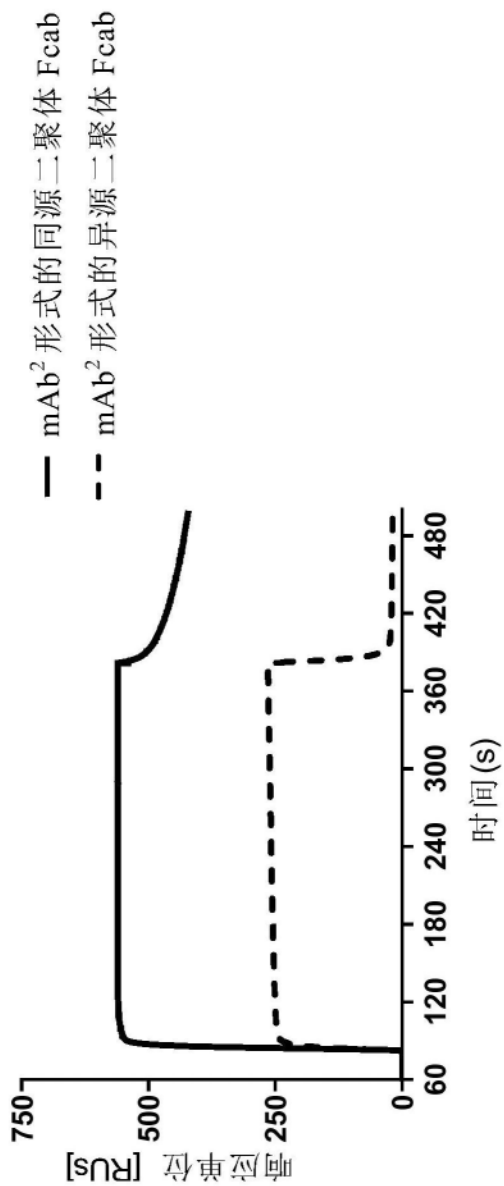


图14

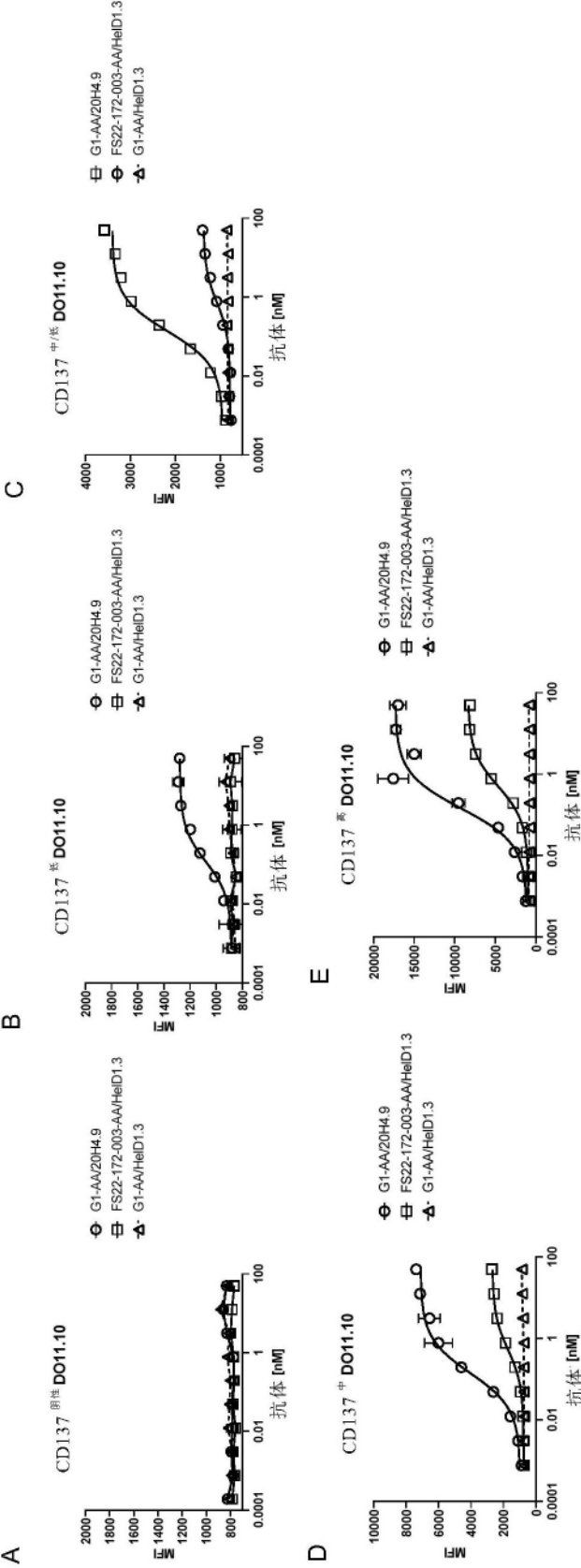


图15