(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118812712 A
(43)申请公布日 2024.10.22

(21)申请号 202410904761.3
(22)申请日 2018.07.11
(30)优先权数据
62/531,259 2017.07.11 US
62/531,190 2017.07.11 US
62/568,231 2017.10.04 US
62/577,257 2017.10.26 US
62/577,259 2017.10.26 US
(62)分案原申请数据
201880058511.5 2018.07.11
(71)申请人 指南针制药有限责任公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 P·博布罗维茨 P·威德布姆 M·M·施密特 J·M·拉乔伊 R·V·泰伊三世 梁倬纶 U·埃斯基欧卡克
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 张蕊蕊
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)

权利要求书9页 说明书134页 附图51页

(54)发明名称

结合人CD137的激动剂抗体及其用途

(57)摘要

本公开尤其涉及结合至CD137的表位并使CD137激动的化合物(例如抗体或其抗原结合片段),以及所述化合物在用于治疗癌症或改善癌症的一种或多种症状的方法中的用途。

CN 118812712 A

1.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM的亲和力(K_D)结合人CD137。

2.根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

3.根据权利要求2所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113和K114。

4.根据权利要求2至3中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114、N126以及I132。

5.根据权利要求2至4中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135。

6.根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135。

7.根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至表位,所述表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列。

8.根据权利要求7所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸残基。

9.根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111-114)的表位。

10.根据权利要求9所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位还包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基N126、I132和P135。

11.根据权利要求2至10中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位是非线性表位。

12.根据权利要求2至11中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中SEQ ID NO:3中残基K114的突变消除所述抗体或其抗原结合部分的结合。

13.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分以约45-95nM、50-90nM、55-85nM、60-80nM、65-75nM、55-75nM、40-70nM、50-80nM或60-90nM的亲和力(K_D)结合人CD137。

14.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至人CD137胞外域的非配体结合区。

15.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分:

(i)以约30-100nM的亲和力(K_D)结合人CD137;

(ii)结合至人CD137胞外域的非配体结合区;以及

(iii)结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

16.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分:

(i)以约30-100nM的亲和力(K_D)结合人CD137;

(ii)不抑制人CD137与人CD137配体之间的相互作用;以及

(iii)结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

17.根据权利要求1至15中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分不抑制CD137与CD137L之间的相互作用。

18.根据权利要求14至15中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述非配体结合区跨越富含半胱氨酸的结构域(CRD)III和CRD IV。

19.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。

20.根据权利要求1、2、3以及11至19中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含SEQ ID NO:3中的E111、T113、K114以及P135。

21.根据权利要求1至19中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX(SEQ ID NO:127)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。

22.根据权利要求19至21中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述重链CDR3中的残基D95、L100、Y100E、Y100G、Y100H或其组合突变成丙氨酸引起与人CD137的结合丧失。

23.根据权利要求19至22中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合突变成丙氨酸引起与人CD137的结合减少。

24.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分不抑制CD137:CD137L单体的三聚体的形成。

25.根据权利要求1、13、14、17至19以及21至24中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至位于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111-135内的表位。

26.根据权利要求25所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位是非线性表位。

27.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

28.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含选自由以下组成的组的重链和轻链CDR:

(a)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:70、79和90中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(b)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:71、80和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(c)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:72、81和92中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(d)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:73、82和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(e)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:74、83和93中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(f)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:75、84和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(g)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:74、85和94中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(h)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:76、86和95中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(i)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:77、87和93中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(j)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、88和90中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(k)分别如SEQ ID NO:49、57和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(l)分别如SEQ ID NO:49、58和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(m)分别如SEQ ID NO:49、59和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(n)分别如SEQ ID NO:49、60和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(o)分别如SEQ ID NO:50、61和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(p)分别如SEQ ID NO:50、58和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(q)分别如SEQ ID NO:51、62和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(r)分别如SEQ ID NO:52、63和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(s)分别如SEQ ID NO:50、64和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(t)分别如SEQ ID NO:50、65和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(u)分别如SEQ ID NO:51、108和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

(v)分别如SEQ ID NO:107、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;以及

(w)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:109、110和92中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

29.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或

其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、101和103;并且其中所述轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46和105。

30.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

31.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126),其中X是任何氨基酸。

32.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX(SEQ ID NO:128),其中X是任何氨基酸。

33.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中残基D95、L100、Y100E、Y100G、Y100H或其组合突变成丙氨酸引起与人CD1 37的结合丧失。

34.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合突变成丙氨酸引起与人CD137的结合减少。

35.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含由选自由以下组成的组的核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区:

(a)分别地SEQ ID NO:5和29;
(b)分别地SEQ ID NO:5和31;
(c)分别地SEQ ID NO:5和33;
(d)分别地SEQ ID NO:5和35;
(e)分别地SEQ ID NO:5和37;
(f)分别地SEQ ID NO:5和39;
(g)分别地SEQ ID NO:5和41;
(h)分别地SEQ ID NO:5和43;
(i)分别地SEQ ID NO:5和45;
(j)分别地SEQ ID NO:5和47;
(k)分别地SEQ ID NO:9和7;
(l)分别地SEQ ID NO:11和7;
(m)分别地SEQ ID NO:13和7;
(n)分别地SEQ ID NO:15和7;
(o)分别地SEQ ID NO:17和7;
(p)分别地SEQ ID NO:19和7;
(q)分别地SEQ ID NO:21和7;
(r)分别地SEQ ID NO:23和7;
(s)分别地SEQ ID NO:25和7;

(t)分别地SEQ ID NO:27和7;

(u)分别地SEQ ID NO:104和7;以及

(v)分别地SEQ ID NO:5和106。

36.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

(a)分别地SEQ ID NO:4和28;

(b)分别地SEQ ID NO:4和30;

(c)分别地SEQ ID NO:4和32;

(d)分别地SEQ ID NO:4和34;

(e)分别地SEQ ID NO:4和36;

(f)分别地SEQ ID NO:4和38;

(g)分别地SEQ ID NO:4和40;

(h)分别地SEQ ID NO:4和42;

(i)分别地SEQ ID NO:4和44;

(j)分别地SEQ ID NO:4和46;

(k)分别地SEQ ID NO:8和6;

(l)分别地SEQ ID NO:10和6;

(m)分别地SEQ ID NO:12和6;

(n)分别地SEQ ID NO:14和6;

(o)分别地SEQ ID NO:16和6;

(p)分别地SEQ ID NO:18和6;

(q)分别地SEQ ID NO:20和6;

(r)分别地SEQ ID NO:22和6;

(s)分别地SEQ ID NO:24和6;

(t)分别地SEQ ID NO:26和6;

(u)分别地SEQ ID NO:103和6;以及

(v)分别地SEQ ID NO:4和105。

37.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分特异性结合至人CD137并使其激动。

38.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分展现出选自由以下组成的组的以下特性中的至少一种或多种:

(a)诱导或增强CD137三聚体的二聚化;

(b)诱导或增强CD137三聚体的多聚化;

(c)诱导或增强T细胞激活;

(d)诱导或增强细胞毒性T细胞应答;

(e)诱导或增强T细胞增殖;

(f)诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生;以及

(g)特性(a)-(f)的任何组合。

39.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分相对于结合人CD137的参考抗体展现出选自由以下组成的组的以下特性中的至少一种或多种:

(a)不诱导或增强肝内T细胞激活;

(b)不诱导或增强肝内T细胞增殖;

(c)不诱导或增强脾内T细胞激活;

(d)不诱导或增强脾内T细胞增殖;

(e)不诱导或增强巨噬细胞激活;

(f)不诱导或增强巨噬细胞分化;

(g)不诱导或增强丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性;以及

(h)特性(a)-(g)的任何组合;并且其中所述参考抗体是乌瑞鲁单抗。

40.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分的特性不依赖于Fc受体结合。

41.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分的特性通过Fc受体结合而增强。

42.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分与食蟹猕猴CD137、小鼠CD137或两者交叉反应。

43.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体选自由以下组成的组:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD以及IgE抗体。

44.根据权利要求43所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是IgG1抗体或IgG4抗体。

45.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体包含野生型人IgG1或野生型人IgG4重链恒定区。

46.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体包含突变型IgG1重链恒定区。

47.根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体包含突变型IgG4重链恒定区。

48.根据权利要求47所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述突变型IgG4重链恒定区在Ser228处包含取代。

49.根据权利要求48所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述突变型IgG4重链恒定区包含S228P取代。

50.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据前述权利要求中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,以及药学上可接受的载体。

51.一种核酸,所述核酸包含编码根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分的轻链、重链、或轻链和重链两者的核苷酸序列。

52.一种表达载体,所述表达载体包含根据权利要求51所述的核酸。

53.一种细胞,所述细胞用根据权利要求52所述的表达载体转化。

54.一种用于产生特异性结合人CD137的单克隆抗体或其抗原结合部分的方法,所述方法包括在允许所述单克隆抗体或抗原结合部分表达的条件下维持根据权利要求53所述的

细胞。

55.根据权利要求54所述的方法,所述方法还包括获得所述单克隆抗体或其抗原结合部分。

56.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据权利要求50所述的药物组合物用于制造通过诱导或增强受试者体内人CD137三聚体的二聚化来治疗癌症的药剂的用途。

57.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据权利要求50所述的药物组合物用于制造通过诱导或增强受试者体内人CD137三聚体的多聚化来治疗癌症的药剂的用途。

58.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据权利要求50所述的药物组合物用于制造通过诱导或增强受试者体内T细胞激活来治疗癌症的药剂的用途。

59.根据权利要求58所述的用途,其中所述T细胞激活在肿瘤微环境中发生。

60.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据权利要求50所述的药物组合物用于制造通过诱导或增强受试者体内的细胞毒性T细胞应答来治疗癌症的药剂的用途。

61.根据权利要求60所述的用途,其中所述细胞毒性T细胞应答在肿瘤微环境中发生。

62.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据权利要求50所述的药物组合物用于制造通过诱导或增强受试者体内免疫细胞的细胞因子产生来治疗癌症的药剂的用途。

63.根据权利要求62所述的用途,其中产生的所述细胞因子是IL-2、TNFα、IL-13、IFNγ或其组合。

64.根据权利要求62或权利要求63所述的用途,其中所述细胞因子产生在肿瘤微环境中发生。

65.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据权利要求50所述的药物组合物用于制造通过诱导或增强受试者体内T细胞增殖来治疗癌症的药剂的用途。

66.根据权利要求65所述的用途,其中所述T细胞增殖在肿瘤微环境中发生。

67.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据权利要求50所述的药物组合物用于制造通过减少或抑制肿瘤生长来治疗癌症的药剂的用途。

68.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据权利要求50所述的药物组合物用于制造用于治疗受试者的癌症的药剂的用途。

69.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据权利要求50所述的药物组合物用于制造治疗受试者的癌症的药剂的用途。

70.根据权利要求67-69中任一项所述的用途,其中在施用所述分离的单克隆抗体或抗原结合部分之后,免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润增加。

71.根据权利要求70所述的用途,其中所述免疫细胞表达CD45。

72.根据权利要求67-71中任一项所述的用途,其中在施用所述分离的单克隆抗体或抗原结合部分之后,肿瘤微环境中调节性T(Treg)细胞的数量减少。

73.根据权利要求72所述的用途,其中所述Treg细胞表达CD4、FOXP-3和CD25。

74.根据权利要求67-73中任一项所述的用途,其中在施用所述分离的单克隆抗体或抗原结合部分之后,肿瘤微环境中巨噬细胞的数量减少。

75.根据权利要求74所述的用途,其中所述巨噬细胞表达CD45和CD11b。

76.根据权利要求67-75中任一项所述的用途,其中在施用所述分离的单克隆抗体或抗原结合部分之后,肿瘤微环境中T细胞耗竭减少。

77.根据权利要求76所述的用途,其中T细胞耗竭减少包含TIGIT、PD-1、LAG-3或其组合的表达减少。

78.根据权利要求69至77中任一项所述的用途,其中所述癌症选自由以下组成的组:黑色素瘤、神经胶质瘤、肾癌、乳腺癌、血液癌症以及头颈癌。

79.根据权利要求68所述的用途,其中所述血液癌症是B细胞淋巴瘤。

80.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据权利要求50所述的药物组合物用于制造诱导抗肿瘤记忆免疫应答的药剂的用途。

81.根据前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述抗体或抗原结合部分结合Fc γ受体。

82.根据前述权利要求67-81中任一项所述的用途,其中CD4+T细胞、CD8+T细胞、自然杀伤细胞或其组合的耗尽使所述抗体或其抗原结合部分的功效降低。

83.一种用于检测生物样品中人CD137的存在或不存在的方法,所述方法包括:

(i)使生物样品与根据权利要求1至49中任一项所述的抗体或抗原结合部分接触,其中所述抗体或抗原结合部分用可检测物质标记;以及

(ii)检测结合至人CD137的所述抗体或抗原结合部分,由此检测所述生物样品中人CD137的存在或不存在。

84.一种试剂盒,所述试剂盒包含容器,所述容器包含根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,和任选的药学上可接受的载体,或根据权利要求50所述的药物组合物,以及包装插页,所述包装插页包含有关施用所述抗体或药物组合物,以用于治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、或减少或抑制其肿瘤生长的说明书。

85.一种试剂盒,所述试剂盒包含容器,所述容器包含根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,和任选的药学上可接受的载体,或根据权利要求50所述的药物组合物,以及包装插页,所述包装插页包含有关单独或与另一种试剂组合施用所述抗体或药物组合物,以用于治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、或减少或抑制其肿瘤生长的说明书。

86.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分用于制造供治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、或减少或抑制其肿瘤生长的药剂的用途。

87.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或抗原结合部分用于制造供治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、或减少或抑制其肿瘤生长的药剂。

88.根据权利要求1至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,所述分离

的单克隆抗体或抗原结合部分用作药剂。

结合人CD137的激动剂抗体及其用途

[0001] 本申请是申请日为2018年7月11日、申请号为201880058511.5、名称为“结合人CD137的激动剂抗体及其用途”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2017年7月11日提交的美国临时专利申请系列号62/531,259;2017年7月11日提交的美国临时专利申请系列号62/531,190;2017年10月4日提交的美国临时专利申请系列号62/568,231;2017年10月26日提交的美国临时专利申请系列号62/577,257;2017年10月26日提交的美国临时专利申请系列号62/577,259的权益。上述参考的申请的全部内容以引用的方式并入本文。

背景技术

[0004] 近年来,越来越多的证据表明,免疫系统是肿瘤形成和进展的一大障碍。在癌症患者体内存在具有抗肿瘤潜力或活性的天然存在的T细胞的原理使得肿瘤学中免疫治疗方法的开发变得合理。免疫细胞,如T细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞,可展现抗肿瘤活性并有效地控制恶性肿瘤的发生和生长。肿瘤特异性或肿瘤相关抗原可诱导免疫细胞识别并消除恶性疾病(Chen和Mellman,(2013)《免疫(Immunity)》39(1):1-10)。尽管存在肿瘤特异性免疫应答,但恶性肿瘤通常会通过多种免疫调节机制来逃避或避开免疫攻击,使得无法控制肿瘤的发生和进展(Motz和Coukos,(2013)《免疫》39(1):61730)。实际上,癌症的新兴特点是利用这些免疫调节机制并废弃抗肿瘤免疫应答,由此引起肿瘤逃避并逃离免疫杀伤(Hanahan和Weinberg(2011)《细胞(Cell)》144(5):646-674)。

[0005] 癌症免疫疗法中的新方法涉及阻碍这些免疫逃避和逃离机制,并诱导内源性免疫系统抵抗肿瘤。CD137(又称为“肿瘤坏死因子受体超家族成员9”(TNFRSF9)、4-1BB和“淋巴细胞激活诱导”(ILA))是属于肿瘤坏死因子超家族的跨膜共刺激受体蛋白。CD137是在TCR激活后诱导的T细胞共刺激受体(Nam等人,(2005)《当前癌症药物靶标(Curr Cancer Drug Targets)》5:357363;Watts等人,(2005)《免疫学年评(Annu Rev Immunol)》23:23-68)。CD137除在激活的CD4+和CD8+T细胞上表达外,还在CD4+CD25+调节性T细胞、激活的自然杀伤(NK)细胞和NKT细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞以及树突状细胞上表达。

[0006] 在生理条件下,CD137与CD137配体(CD137L)连接,该配体是存在于包括B细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞在内的抗原呈递细胞上的一种激动剂膜分子(Watts等人,(2005)《免疫学年评》23:23-68)。CD137在与其配体相互作用后引起TCR诱导的T细胞增殖增加、细胞因子产生、功能成熟以及CD8+T细胞存活期延长。已在许多模型中证明使用各种激动剂(例如激动性抗体、重组CD137L蛋白质和CD137特异性适体)进行CD137共刺激在启动免疫系统攻击肿瘤方面的潜力(Dharmadhikari等人(2016)《肿瘤免疫学(Oncoimmunology)》5(4):e1113367和其中的参考文献)。近期有关激动性CD137抗体(乌瑞鲁单抗(Urelumab),BMS-663513;Bristol-Myers Squibb)临床评价的报告记录了人受试者的治疗相关不良事件的观察结果,包括与抗体剂量相关的严重肝毒性(转氨酶升高)指征(Segal等人(2016)《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》23(8):1929-1936)。相比之下,与抗PD-1抗体(派姆单

抗(pembrolizumab))组合测试的不同激动性CD137抗体(乌托米单抗(Utomilumab),PF05082566;Pfizer)尽管不会引起任何剂量限制性毒性,但仍显示出与单独抗PD1抗体疗法相当的结果(Tolcher,A.等人(2017)《临床癌症研究》23(18):5349-5357)。这些结果突出显示,对于患有包括癌症在内适于用CD137激动剂治疗的各种疾病和病症的患者,仍需要结合至人CD137并展现足以开发安全且有效的治疗的特征的新颖激动性抗体。

发明内容

[0007] 本公开至少部分地基于发现在动物中展现出保护性抗肿瘤免疫的新颖激动剂抗CD137抗体。值得注意的是,本文所述的抗体在较宽剂量范围内有效抵抗多种肿瘤类型。此外,如在工作实施例中所例示,本文所述的抗体针对众多肿瘤是治疗有效的。例如,用本文所述的激动剂抗CD137抗体治疗荷瘤小鼠引起大到1,800mm^3的肿瘤的完全消退。如图15中所示,此类小鼠的治疗也引起保护性免疫。而且,与观察到的功效同时发生的是肿瘤微环境中的阳性免疫表型变化,如免疫细胞浸润增加以及伴随的调节性T细胞和耗竭的T细胞群减少(参见例如图22A-22D)。

[0008] 如上所述,CD137的激动作用与人体的某些不良事件,包括肝毒性相关死亡相关(参见例如Segal等人(2017)《临床癌症研究》23(8):19291935)。在动物模型中也观察到由激动剂抗CD137抗体(如3H3抗体)治疗引起的类似毒性(参见例如Bartkowiak等人(2018)《临床癌症研究》24(5):1138-1151)。然而,如通过例如血浆肝酶(例如丙氨酸氨基转移酶(ALT))水平和免疫细胞浸润所测定,本文所述的激动剂抗CD137抗体对肝具有极小影响。例如,尚无在用所述抗体治疗的小鼠中肝内或脾内免疫细胞浸润增加的证据。因此,本文所述的抗体不仅是高度有效的,而且与CD137激动作用相关的某些毒性极低。

[0009] 虽然本公开不受任何特定理论或作用机制约束,但相信本文所述抗体的优良治疗和低毒性特性部分地来源于其亲和力以及其所结合的新颖表位中的一种或两种。也就是说,本文所述的抗体共有不同于其它激动剂抗CD137抗体的共同的新颖表位。而且,如工作实施例中所例示,相较于结合至CD137的不同表位的激动剂抗体,本文所述的抗体接合这一表位引起差异的体外活性,如对调节性T细胞增殖、$CD8^+$T细胞和巨噬细胞的细胞因子产生以及细胞内信号传导的影响。此外,已展示抗体的亲和力范围(“集中点(sweet spot)”)对于抗肿瘤活性是极佳的。例如,经显示,相较于较高或较低亲和力的抗体,中间亲和力的抗体针对众多肿瘤更有效。

[0010] 鉴于前述,在一些方面,本公开提供了特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分以介于约40nM至约100nM之间的亲和力(K_D)结合人CD137。在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约110nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137。在一些方面,抗CD137抗体对人CD137的亲和力是mAb10对小鼠CD137的亲和力的至少两倍(例如至少三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍或10倍)。在一些方面,抗CD137抗体的亲和力不超过500、450、400、350、300、250、200、250、200、175、150、125、110或100nM。在一些方面,抗CD137抗体对人CD137的亲和力是mAb10对小鼠CD137的亲和力的至少两倍(例如至少三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍或10倍),但不超过500、450、400、350、300、250、200、250、200、175、150、125、110或100nM。

[0011] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中氨基酸111132中的一个或多个(例如一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或全部25个)的表位。在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至在SEQ ID NO:3中的氨基酸111-132内的表位。在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至SEQ ID NO:3中氨基酸111132的全部或一部分。在一些方面,所述表位包含SEQ ID NO:3中的K114。在一些方面,所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113和K114。在一些方面,所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114、N126以及I132。在一些方面,所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114以及P135。在一些方面,所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135。在一些方面,所述抗体或其抗原结合部分以介于约30nM与约100nM之间(例如介于约30nM与约110nM之间)的亲和力结合至人CD137。

[0012] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分以约40-100nM(例如介于约40nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137,并且结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137,并且结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。在一些方面,所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113和K114。在一些方面,所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114、N126以及I132。在一些方面,所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114以及P135。在一些方面,所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135。

[0013] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如约30nM至约100nM)的亲和力(K_D)结合人CD137,并且结合至人CD137上的表位,该表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列。在一些方面,所述表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸残基。

[0014] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137,并且结合至人CD137上位于SEQ ID NO:3中氨基酸残基111135内的表位。在一些方面,所述表位是至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。在一些方面,所述表位少于25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸。

[0015] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137,并且结合至人CD137上包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的

氨基酸残基111114)的表位。在一些方面,所述表位还包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基N126、I132和P135。

[0016] 在前述方面中的任一个中,表位是非线性表位。在前述方面中的任一个中,SEQ ID NO:3中残基K114的突变将消除所述抗体或其抗原结合部分与人CD137的结合。

[0017] 在前述方面中的任一个中,本文所述的抗体或抗原结合部分结合人CD137的亲和力(K_D)是约30-100nM、30-95nM、45-95nM、50-90nM、55-85nM、60-80nM、65-75nM、55-75nM、40-70nM、50-80nM或60-90nM。在一些方面,所述抗体或抗原结合部分结合至人CD137胞外域的非配体结合区。在一些方面,所述抗体或抗原结合部分不抑制CD137与CD137L之间的相互作用。在一些方面,所述非配体结合区跨越富含半胱氨酸的结构域(CRD)III和CRD IV。在前述方面中的任一个中,所述抗体或抗原结合部分不抑制CD137:CD137L单体的三聚体的形成。

[0018] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分:

[0019] (i)以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0020] (ii)结合至人CD137胞外域的非配体结合区;以及

[0021] (iii)结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[0022] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分:

[0023] (i)以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0024] (ii)不抑制人CD137与人CD137配体之间的相互作用;以及

[0025] (iii)结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[0026] 在一些方面,本公开的特征在于一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分:(i)以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137以及(ii)不抑制CD137:CD137L单体的三聚体的形成(即,CD137:CD137L三聚体:三聚体复合物)。在一些方面,本公开的特征在于一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分:(i)以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137以及(ii)结合至人CD137胞外域的非配体结合区。在一些方面,本公开的特征在于一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分:(i)以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137以及(ii)不抑制人CD137与CD137配体之间的相互作用。

[0027] 在前述方面中的任一个中,所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。在一些方面,所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX(SEQ ID NO:127)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。在前述方面中的任一个中,重链CDR3中的残基D95、L100、Y100E、Y100G、Y100H或其组合突变成丙氨酸引起与人CD137的结合丧失。在前述方面中的任一个中,残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合突变成丙氨酸引起与人CD137的结合减少。在前述方面中的任一个中,所述抗体或抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

[0028] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0029] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;以及

[0030] (ii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。在一些方面,X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[0031] 在另一方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0032] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;以及

[0033] (ii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$(SEQ ID NO:128)的重链CDR3,其中X_1是任何氨基酸,其中X_2是非极性氨基酸,其中X_3是非极性氨基酸,其中X_4是任何氨基酸,其中X_5是极性氨基酸,其中X_6是任何氨基酸,其中X_7是任何氨基酸,其中X_8是极性氨基酸,其中X_9是极性氨基酸,并且其中X_{10}是任何氨基酸。在一些方面,X_2是脯氨酸,X_3是苯丙氨酸或色氨酸,X_5是天冬氨酸或谷氨酸,X_8是酪氨酸,并且X_9是酪氨酸。

[0034] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0035] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;以及

[0036] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位。

[0037] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0038] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0039] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位;

[0040] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸;或

[0041] (iv)其组合。在一些方面,X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[0042] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0043] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0044] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位;

[0045] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$(SEQ ID NO:128)的重链CDR3,其中X_1是任何氨基酸,其中X_2是非极性氨基酸,其中X_3是非极性氨基酸,其中X_4是任何氨基酸,其中X_5是极性氨基酸,其中X_6是任何氨基酸,其中X_7是任何氨基

酸,其中X_8是极性氨基酸,其中X_9是极性氨基酸,并且其中X_{10}是任何氨基酸;或

[0046] (iv)其组合。在一些方面,X_2是脯氨酸,X_3是苯丙氨酸或色氨酸,X_5是天冬氨酸或谷氨酸,X_8是酪氨酸,并且X_9是酪氨酸。

[0047] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0048] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0049] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位;以及

[0050] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。在一些方面,X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[0051] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0052] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0053] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位;以及

[0054] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$(SEQ ID NO:128)的重链CDR3,其中X_1是任何氨基酸,其中X_2是非极性氨基酸,其中X_3是非极性氨基酸,其中X_4是任何氨基酸,其中X_5是极性氨基酸,其中X_6是任何氨基酸,其中X_7是任何氨基酸,其中X_8是极性氨基酸,其中X_9是极性氨基酸,并且其中X_{10}是任何氨基酸。在一些方面,X_2是脯氨酸,X_3是苯丙氨酸或色氨酸,X_5是天冬氨酸或谷氨酸,X_8是酪氨酸,并且X_9是酪氨酸。

[0055] 在前述方面中的任一个中,表位包含K114。在前述方面中的任一个中,表位包含E111、T113和K114。在前述方面中的任一个中,表位包含E11、T113、K114、N126以及I132。在前述方面中的任一个中,表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135。

[0056] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0057] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;以及

[0058] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至表位,所述表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列。

[0059] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0060] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0061] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至表位,所述表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列;

[0062] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:

126)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸;或

[0063] (iv)其组合。在一些方面,X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[0064] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0065] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0066] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至表位,所述表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列;

[0067] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$(SEQ ID NO:128)的重链CDR3,其中X_1是任何氨基酸,其中X_2是非极性氨基酸,其中X_3是非极性氨基酸,其中X_4是任何氨基酸,其中X_5是极性氨基酸,其中X_6是任何氨基酸,其中X_7是任何氨基酸,其中X_8是极性氨基酸,其中X_9是极性氨基酸,并且其中X_{10}是任何氨基酸;或

[0068] (iv)其组合。在一些方面,X_2是脯氨酸,X_3是苯丙氨酸或色氨酸,X_5是天冬氨酸或谷氨酸,X_8是酪氨酸,并且X_9是酪氨酸。

[0069] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0070] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0071] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至表位,所述表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列;以及

[0072] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。在一些方面,X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[0073] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0074] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0075] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至表位,所述表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列;以及

[0076] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$(SEQ ID NO:128)的重链CDR3,其中X_1是任何氨基酸,其中X_2是非极性氨基酸,其中X_3是非极性氨基酸,其中X_4是任何氨基酸,其中X_5是极性氨基酸,其中X_6是任何氨基酸,其中X_7是任何氨基酸,其中X_8是极性氨基酸,其中X_9是极性氨基酸,并且其中X_{10}是任何氨基酸。在一些方面,X_2是脯氨酸,X_3是苯丙氨酸或色氨酸,X_5是天冬氨酸或谷氨酸,X_8是酪氨酸,并且X_9是酪氨酸。

[0077] 在前述方面中的任一个中,表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸残基。

[0078] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0079] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的

亲和力结合人CD137;以及

[0080] (ii)抗体或其抗原结合部分特异性结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111114)的表位。

[0081] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0082] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0083] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111114)的表位;

[0084] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸;或

[0085] (iv)其组合。在一些方面,X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[0086] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0087] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0088] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111-114)的表位;

[0089] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$(SEQ ID NO:128)的重链CDR3,其中X_1是任何氨基酸,其中X_2是非极性氨基酸,其中X_3是非极性氨基酸,其中X_4是任何氨基酸,其中X_5是极性氨基酸,其中X_6是任何氨基酸,其中X_7是任何氨基酸,其中X_8是极性氨基酸,其中X_9是极性氨基酸,并且其中X_{10}是任何氨基酸;或

[0090] (iv)其组合。在一些方面,X_2是脯氨酸,X_3是苯丙氨酸或色氨酸,X_5是天冬氨酸或谷氨酸,X_8是酪氨酸,并且X_9是酪氨酸。

[0091] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0092] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0093] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111-114)的表位;以及

[0094] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。在一些方面,X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[0095] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中

[0096] (i)所述抗体或抗原结合部分以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0097] (ii)所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111-114)的表位;以及

[0098] (iii)所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$(SEQ

ID NO:128)的重链CDR3,其中X_1是任何氨基酸,其中X_2是非极性氨基酸,其中X_3是非极性氨基酸,其中X_4是任何氨基酸,其中X_5是极性氨基酸,其中X_6是任何氨基酸,其中X_7是任何氨基酸,其中X_8是极性氨基酸,其中X_9是极性氨基酸,并且其中X_{10}是任何氨基酸。在一些方面,X_2是脯氨酸,X_3是苯丙氨酸或色氨酸,X_5是天冬氨酸或谷氨酸,X_8是酪氨酸,并且X_9为酪氨酸

[0099] 在前述方面中的任一个中,表位包含SEQ ID NO:3中的残基ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111114)。在一些方面,表位包含SEQ ID NO:3中的ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111-114)以及SEQ ID NO:3中的残基N126、I132和P135。

[0100] 在前述方面中的任一个中,表位是非线性表位。在一些方面,人CD137(SEQ ID NO:3)中残基K114的突变使所述抗体或其抗原结合部分与人CD137的结合消除。

[0101] 在前述方面中的任一个中,所述抗体或其抗原结合部分包括含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX(SEQ ID NO:128)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。在一些方面,本文所述的抗体或抗原结合部分的重链CDR3中的残基D95、L100、Y100E、Y100G、Y100H或其组合的突变引起与人CD137的结合丧失。在一些方面,本文所述的抗体或抗原结合部分的重链CDR3中的残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合突变成丙氨酸引起与人CD137的结合减少。在其它方面,本文所述的抗体或抗原结合部分的重链CDR3中的残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合突变成除丙氨酸外的任何残基引起与人CD137的结合增加。

[0102] 在前述方面中的任一个中,所述抗体或其抗原结合部分以约45-95nM、5090nM、5585nM、6080nM、6575nM、5575nM、4070nM、5080nM或6090nM的(K_D)结合人CD137。在前述方面中的任一个中,所述抗体或其抗原结合部分以约45nM至约95nM、约50至约90nM、约55至约85nM、约60至约80nM、约65至约75nM、约55至约75nM、约40至约70nM、约50至约80nM、或约60至约90nM的(K_D)结合人CD137。

[0103] 在前述方面中的任一个中,所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

[0104] 在前述方面中的任一个中,所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,所述重链和轻链CDR选自由以下组成的组:

[0105] (a)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;以及

[0106] (b)分别如SEQ ID NO:51、108和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0107] 在前述方面中的任一个中,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含选自由SEQ ID NO:4和101组成的组的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ IDNO:6的氨基酸序列。

[0108] 在前述方面中的任一个中,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0109] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;以及

[0110] (b)分别地SEQ ID NO:101和6。

[0111] 在前述方面中的任一个中,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含与选自由SEQ ID NO:4和101组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少

90％相同的氨基酸序列。

[0112] 在前述方面中的任一个中,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列:

[0113] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;以及

[0114] (b)分别地SEQ ID NO:101和6。

[0115] 在前述方面中的任一个中,所述抗体或抗原结合部分包含重链和轻链,所述重链和轻链包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0116] (a)分别地SEQ ID NO:129和133;以及

[0117] (b)分别地SEQ ID NO:131和133。

[0118] 在前述方面中的任一个中,本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分是人CD137活性的激动剂。

[0119] 在前述方面中的任一个中,本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分与mAb1或mAb1的抗原结合片段竞争结合至人CD137的表位。

[0120] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含选自由以下组成的组的重链和轻链CDR:

[0121] (a)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0122] (b)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:70、79和90中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0123] (c)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:71、80和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0124] (d)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:72、81和92中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0125] (e)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:73、82和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0126] (f)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:74、83和93中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0127] (g)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:75、84和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0128] (h)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:74、85和94中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0129] (i)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:76、86和95中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0130] (j)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:77、87和93中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0131] (k)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、88和90中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0132] (l)分别如SEQ ID NO:49、57和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别

如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0133] (m)分别如SEQ ID NO:49、58和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0134] (n)分别如SEQ ID NO:49、59和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0135] (o)分别如SEQ ID NO:49、60和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0136] (p)分别如SEQ ID NO:50、61和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0137] (q)分别如SEQ ID NO:50、58和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0138] (r)分别如SEQ ID NO:51、62和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0139] (s)分别如SEQ ID NO:52、63和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0140] (t)分别如SEQ ID NO:50、64和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0141] (u)分别如SEQ ID NO:50、65和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0142] (v)分别如SEQ ID NO:51、108和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0143] (w)分别如SEQ ID NO:107、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;以及

[0144] (x)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:109、110和92中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0145] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、101和103;并且其中所述轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46和105。

[0146] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含由选自由以下组成的组的核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区:

[0147] (a)分别地SEQ ID NO:5和7;以及

[0148] (b)分别地SEQ ID NO:102和7。

[0149] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含由选自由以下组成的组的核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区:

[0150] (a)分别地SEQ ID NO:5和7;

[0151] (b)分别地SEQ ID NO:5和29;

[0152] (c)分别地SEQ ID NO:5和31;

[0153] (d)分别地SEQ ID NO:5和33;

[0154] (e)分别地SEQ ID NO:5和35;

[0155] (f)分别地SEQ ID NO:5和37;

[0156] (g)分别地SEQ ID NO:5和39;

[0157] (h)分别地SEQ ID NO:5和41;

[0158] (i)分别地SEQ ID NO:5和43;

[0159] (j)分别地SEQ ID NO:5和45;

[0160] (k)分别地SEQ ID NO:5和47;

[0161] (l)分别地SEQ ID NO:9和7;

[0162] (m)分别地SEQ ID NO:11和7;

[0163] (n)分别地SEQ ID NO:13和7;

[0164] (o)分别地SEQ ID NO:15和7;

[0165] (p)分别地SEQ ID NO:17和7;

[0166] (q)分别地SEQ ID NO:19和7;

[0167] (r)分别地SEQ ID NO:21和7;

[0168] (s)分别地SEQ ID NO:23和7;

[0169] (t)分别地SEQ ID NO:25和7;

[0170] (u)分别地SEQ ID NO:27和7;

[0171] (v)分别地SEQ ID NO:102和7;

[0172] (w)分别地SEQ ID NO:104和7;以及

[0173] (x)分别地SEQ ID NO:5和106。

[0174] 在又其它方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

[0175] 在另一方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126),其中X是任何氨基酸。在一些方面,X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[0176] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX(SEQ ID NO:127),其中X是任何氨基酸。在一些方面,X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[0177] 在又其它方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126),其中X是任何氨基酸,并且其中残基D95、L100、Y100E、Y100G、Y100H或其组合的突变引起与人CD137的结合的丧失。

[0178] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗

原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX(SEQ ID NO:127),其中X是任何氨基酸,并且其中残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合的突变引起与人CD137的结合减少。

[0179] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX(SEQ ID NO:127),其中X是任何氨基酸,并且其中残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合突变成除丙氨酸外的任何残基引起与人CD137的结合增加。

[0180] 在又其它方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DX1X2X3X4LX5X6X7X8YX9YYX10(SEQ ID NO:128),其中X1是任何氨基酸,其中X2是非极性氨基酸,其中X3是非极性氨基酸,其中X4是任何氨基酸,其中X5是极性氨基酸,其中X6是任何氨基酸,其中X7是任何氨基酸,其中X8是极性氨基酸,其中X9是极性氨基酸,并且其中X10是任何氨基酸。在一些方面,其中X2是脯氨酸,其中X3是苯丙氨酸或色氨酸,其中X5是天冬氨酸或谷氨酸,其中X8是酪氨酸,并且其中X9是酪氨酸。

[0181] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0182] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;

[0183] (b)分别地SEQ ID NO:4和28;

[0184] (c)分别地SEQ ID NO:4和30;

[0185] (d)分别地SEQ ID NO:4和32;

[0186] (e)分别地SEQ ID NO:4和34;

[0187] (f)分别地SEQ ID NO:4和36;

[0188] (g)分别地SEQ ID NO:4和38;

[0189] (h)分别地SEQ ID NO:4和40;

[0190] (i)分别地SEQ ID NO:4和42;

[0191] (j)分别地SEQ ID NO:4和44;

[0192] (k)分别地SEQ ID NO:4和46;

[0193] (l)分别地SEQ ID NO:8和6;

[0194] (m)分别地SEQ ID NO:10和6;

[0195] (n)分别地SEQ ID NO:12和6;

[0196] (o)分别地SEQ ID NO:14和6;

[0197] (p)分别地SEQ ID NO:16和6;

[0198] (q)分别地SEQ ID NO:18和6;

[0199] (r)分别地SEQ ID NO:20和6;

[0200] (s)分别地SEQ ID NO:22和6;

[0201] (t)分别地SEQ ID NO:24和6;

[0202] (u)分别地SEQ ID NO:26和6;

[0203] (v)分别地SEQ ID NO:101和6;

[0204] (w)分别地SEQ ID NO:103和6;以及

[0205] (x)分别地SEQ ID NO:4和105。

[0206] 在其它方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、101和103;并且其中所述轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46和105。

[0207] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

[0208] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;

[0209] (b)分别地SEQ ID NO:4和28;

[0210] (c)分别地SEQ ID NO:4和30;

[0211] (d)分别地SEQ ID NO:4和32;

[0212] (e)分别地SEQ ID NO:4和34;

[0213] (f)分别地SEQ ID NO:4和36;

[0214] (g)分别地SEQ ID NO:4和38;

[0215] (h)分别地SEQ ID NO:4和40;

[0216] (i)分别地SEQ ID NO:4和42;

[0217] (j)分别地SEQ ID NO:4和44;

[0218] (k)分别地SEQ ID NO:4和46;

[0219] (l)分别地SEQ ID NO:8和6;

[0220] (m)分别地SEQ ID NO:10和6;

[0221] (n)分别地SEQ ID NO:12和6;

[0222] (o)分别地SEQ ID NO:14和6;

[0223] (p)分别地SEQ ID NO:16和6;

[0224] (q)分别地SEQ ID NO:18和6;

[0225] (r)分别地SEQ ID NO:20和6;

[0226] (s)分别地SEQ ID NO:22和6;

[0227] (t)分别地SEQ ID NO:24和6;

[0228] (u)分别地SEQ ID NO:26和6;

[0229] (v)分别地SEQ ID NO:101和6;

[0230] (w)分别地SEQ ID NO:103和6;以及

[0231] (x)分别地SEQ ID NO:4和105。

[0232] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链序列,所述重链和轻链序列包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0233] (a)分别地SEQ ID NO:129和133;以及

[0234] (b)分别地SEQ ID NO:131和133。

[0235] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链序列,所述重链和轻链序列具有分别如SEQ ID NO:129和133中所示的氨基酸序列。

[0236] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链序列,所述重链和轻链序列具有分别如SEQ ID NO:131和133中所示的氨基酸序列。

[0237] 在前述方面中的任一个中,所述抗体或抗原结合部分特异性结合至人CD137并使其激动。

[0238] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分展现出选自由以下组成的组的以下特性中的至少一种或多种:

[0239] (a)诱导或增强CD137三聚体的二聚化;

[0240] (b)诱导或增强CD137三聚体的多聚化;

[0241] (c)诱导或增强T细胞激活;

[0242] (d)诱导或增强细胞毒性T细胞应答;

[0243] (e)诱导或增强T细胞增殖;

[0244] (f)诱导或增强细胞因子产生;以及

[0245] (g)特性(a)(f)的任何组合。

[0246] 在前述方面中的任一个中,相对于结合人CD137的参考抗体,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分展现出选自由以下组成的组的以下特性中的至少一种或多种:

[0247] (a)不诱导或增强肝内T细胞激活;

[0248] (b)不诱导或增强肝内T细胞增殖;

[0249] (c)不诱导或增强脾内T细胞激活;

[0250] (d)不诱导或增强脾内T细胞增殖;

[0251] (e)不诱导或增强巨噬细胞激活;

[0252] (f)不诱导或增强巨噬细胞分化;

[0253] (g)不诱导或增强丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性;以及

[0254] (h)特性(a)-(g)的任何组合。在一些方面,参考抗体是乌瑞鲁单抗。

[0255] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分诱导或增强肿瘤微环境中人CD137介导的T细胞激活,但不会显著诱导或增强脾和/或肝中人CD137介导的T细胞激活。

[0256] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分诱导或增强肿瘤微环境中的T细胞激活,但不会显著诱导或增强脾和/或肝中的T细胞激活。

[0257] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分诱导或增强肿瘤微环境中人CD137介导的细胞毒性T细胞应答,但不会显著诱导或增强脾和/或肝中人CD137介导的细胞毒性T细胞应答。

[0258] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分诱导或增强肿瘤微环境中的细胞毒性T细胞应答,但不会显著诱导或增强脾和/或肝中的T细胞应答。

[0259] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分诱导肿瘤微

环境中人CD137介导的T细胞增殖,但不会显著诱导脾和/或肝中人CD137介导的T细胞增殖。

[0260] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分诱导肿瘤微环境中的T细胞增殖,但不会显著诱导脾和/或肝中的T细胞增殖。

[0261] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分诱导肿瘤微环境中人CD137介导的T细胞浸润,但不会显著诱导脾和/或肝中人CD137介导的T细胞浸润。

[0262] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分诱导肿瘤微环境中的T细胞浸润,但不会显著诱导脾和/或肝中的T细胞浸润。

[0263] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段诱导或增强肿瘤微环境中人CD137介导的细胞因子产生,但不会显著诱导或增强脾和/或肝中人CD137介导的细胞因子产生。

[0264] 在前述方面中的任一个中,本文所述的抗体或抗原结合部分的特性不依赖于Fc γ受体结合。在一些方面,本文所述的抗体或抗原结合部分的特性通过Fc γ受体结合而增强。

[0265] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分与mAb1(即,包含分别为SEQ ID NO:4和6的重链和轻链可变序列的抗体)交叉竞争。在一些方面,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分与mAb1(即,包含分别为SEQ ID NO:4和6的重链和轻链可变序列的抗体)、mab8(即,包含分别为SEQ ID NO:101和6的重链和轻链可变序列的抗体)或mAb10(即,包含分别为SEQ ID NO:26和6的重链和轻链可变序列的抗体)交叉竞争。在一些方面,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分与mab8(即,包含分别为SEQ ID NO:101和6的重链和轻链可变序列的抗体)交叉竞争。在一些方面,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分与mAb10(即,包含分别为SEQ ID NO:26和6的重链和轻链可变序列的抗体)交叉竞争。

[0266] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分至少包含mAb1(即,包含分别为SEQ ID NO:4和6的重链和轻链可变序列的抗体)的功能特性。在一些方面,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分至少包含mAb1(即,包含分别为SEQ ID NO:4和6的重链和轻链可变序列的抗体)、mab8(即,包含分别为SEQ ID NO:101和6的重链和轻链可变序列的抗体)或mAb10(即,包含分别为SEQ ID NO:26和6的重链和轻链可变序列的抗体)的功能特性。在一些方面,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分至少包含mab8(即,包含分别为SEQ ID NO:101和6的重链和轻链可变序列的抗体)的功能特性。在一些方面,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分至少包含mAb10(即,包含分别为SEQ ID NO:26和6的重链和轻链可变序列的抗体)的功能特性。

[0267] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分的K_D值至少等于mAb1(即,包含分别为SEQ ID NO:4和6的重链和轻链可变序列的抗体)。在一些方面,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分的K_D值至少等于mAb1(即,包含分别为SEQ ID NO:4和6的重链和轻链可变序列的抗体)、mab8(即,包含分别为SEQ ID NO:101和6的重链和轻链可变序列的抗体)或mAb10(即,包含分别为SEQ ID NO:26和6的重链和轻链可变序列的抗体)。在一些方面,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分的K_D值至少等于mab8(即,包含分别为SEQ ID NO:101和6的重链和轻链可变序列的抗体)。在一些方面,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分的K_D值至少等于mAb10(即,包含分别为SEQ ID NO:26和6的重链和轻链可变序列的抗体)。

[0268] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分与食蟹猕猴CD137和/或小鼠CD137交叉反应。

[0269] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分选自由以下组成的组:IgG1、IgG2、和IgG3、IgG4、和IgM、以及IgA1和IgA2、和IgD、以及IgE抗体。在一些方面,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分是IgG1抗体或IgG4抗体。

[0270] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体包含野生型IgG1或野生型IgG4重链恒定区。在一些方面,所述分离的单克隆抗体包含突变型IgG1重链恒定区。在一些方面,所述分离的单克隆抗体包括突变型IgG4重链恒定区。在一些方面,突变型IgG4重链恒定区在Ser228处包含取代。在一些方面,突变型IgG4重链恒定区包含取代S228P。

[0271] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分结合CD137的表位,其中构成抗体所结合的表位的氨基酸残基位于构成本文所述的mAb1抗体的互补位的氨基酸残基的4埃范围内。

[0272] 在前述方面中的任一个中,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分结合CD137的表位,其中抗体所结合的表位的突变将抑制、减少或阻断与所述抗体以及与抗体mAb1两者的结合。

[0273] 在前述方面中的任一个中,所述分离的抗体或其抗原结合部分是完全人的或人源化的(即,完全人或人源化抗体或其抗原结合部分)。

[0274] 在一些方面,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,和药学上可接受的载体。

[0275] 在其它方面,本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分的轻链、重链、或轻链和重链两者的核苷酸序列。在一些方面,所述核酸包含SEQ ID NO:5和7。在一些方面,所述核酸包含SEQ ID NO:102和7。在一些方面,本公开提供了一种表达载体,所述表达载体包含本文所述的核酸。在其它方面,本公开提供了一种用本文所述的表达载体转化的细胞。

[0276] 在另一方面,本公开提供了一种用于产生特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分的方法,所述方法包括在允许所述单克隆抗体或其抗原结合部分表达的条件下维持本文所述的细胞。在一些方面,用于产生特异性结合人CD137的单克隆抗体或其抗原结合部分的方法还包括获得所述单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0277] 在又一方面,本公开提供了一种用于诱导或增强受试者体内人CD137三聚体的二聚化的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或本文所述的药物组合物。

[0278] 在另一方面,本公开提供了一种用于诱导或增强受试者体内人CD137三聚体的多聚化的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或本文所述的药物组合物。

[0279] 在其它方面,本公开提供了一种用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的T细胞激活的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或本文所述的药物组合物。在一些方面,T细胞激活是在肿瘤微环境中发生。在其它方面,在受试者的脾和/或肝中不会显著发生T细胞激活。

[0280] 在另一方面,本公开提供了一种用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的细胞

毒性T细胞应答的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或本文所述的药物组合物。在一些方面,细胞毒性T细胞应答是在肿瘤微环境中发生。在其它方面,在受试者的脾和/或肝中不会显著发生细胞毒性T细胞应答。

[0281] 在一些方面,本公开提供了一种用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的细胞因子产生的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或本文所述的药物组合物。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2、TNFα、IL-13、IFNγ或其组合。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2。在一些方面,产生的细胞因子是TNFα。在一些方面,产生的细胞因子是IL13。在一些方面,产生的细胞因子是IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2和TNFα。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2和IL-13。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是TNFα和IL13。在一些方面,产生的细胞因子是TNFα和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IL13和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IL2、TNFα和IL13。在一些方面,产生的细胞因子是IL2、TNFα和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IFNγ、TNFα和IL-13。在其它方面,细胞因子产生是在肿瘤微环境中发生。在又其它方面,在受试者的脾和/或肝中不会显著发生细胞因子产生。

[0282] 在另一方面,本公开提供了一种用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的T细胞增殖的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或本文所述的药物组合物。在一些方面,T细胞增殖是在肿瘤微环境中发生。在其它方面,在受试者的脾和/或肝中不会显著发生T细胞增殖。

[0283] 在另一方面,本公开提供了一种用于减少或抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或本文所述的药物组合物。

[0284] 在又一方面,本公开提供了一种用于治疗受试者的由人CD137介导的病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或本文所述的药物组合物。

[0285] 在一些方面,本公开提供了一种用于治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或本文所述的药物组合物。在一些方面,癌症选自由以下组成的组:黑色素瘤、神经胶质瘤、肾癌、乳腺癌、血液癌症以及头颈癌。在一些方面,所述血液癌症是B细胞淋巴瘤。

[0286] 在一些方面,本公开提供了一种诱导抗肿瘤储存免疫应答的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或本文所述的药物组合物。

[0287] 在前述方面中的任一个中,在施用抗体或抗原结合部分后,免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润增加。在一些方面,免疫细胞表达CD45。

[0288] 在前述方面中的任一个中,在施用抗体或抗原结合部分后,肿瘤微环境中调节性T(Treg)细胞的数量减少。在一些方面,Treg细胞表达CD4、FOXP-3和CD24。

[0289] 在前述方面中的任一个中,在施用单克隆抗体或抗原结合部分后,肿瘤微环境中巨噬细胞的数量减少。在一些方面,巨噬细胞表达CD45和CD11b。

[0290] 在前述方面中的任一个中,在施用抗体或抗原结合部分之后,T细胞耗竭减少。在一些方面,T细胞耗竭的减少包含TIGIT、PD1、LAG3的表达减少或其组合。在一些方面,T细胞

耗竭的减少包含TIGIT和PD1的表达减少。

[0291] 在前述方面中的任一个中,CD4+T细胞、CD8+T细胞、自然杀伤细胞或其组合的耗尽使所述抗体或其抗原结合部分的功效降低。

[0292] 在另一方面,本公开提供了一种用于检测生物样品中人CD137的存在或不存在的方法,所述方法包括:

[0293] (a)使生物样品与本文所述的抗体或抗原结合部分接触,其中所述抗体或抗原结合部分用可检测物质标记;以及

[0294] (b)检测结合至人CD137的抗体或抗原结合部分,由此检测所述生物样品中人CD137的存在或不存在。

[0295] 在另一方面,本公开提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含容器,所述容器包含本文所述的抗体或抗原结合部分、和任选的药学上可接受的载体,或本文所述的药物组合物,以及包装插页,所述包装插页包含有关施用所述抗体或药物组合物,以治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、减少或抑制其肿瘤生长的说明书。

[0296] 在另一方面,本公开提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含容器,所述容器包含本文所述的抗体或抗原结合部分、和任选的药学上可接受的载体,或本文所述的药物组合物,以及包装插页,所述包装插页包含有关单独或与另一种试剂组合施用所述抗体或药物组合物,以用于治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、减少或抑制其肿瘤生长的说明书。

[0297] 在另一方面,本公开提供了如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的T细胞激活的用途。在其它方面,本公开提供了如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分用于诱导或增强受试者体内人CD137三聚体的多聚化的用途。在另一方面,本公开提供了如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的细胞毒性T细胞应答的用途。在其它方面,本公开提供了如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的细胞因子产生的用途。在另一方面,本公开提供了如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的T细胞增殖的用途。

[0298] 在另一方面,本公开提供了如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分用于减少或抑制有需要的受试者体内的肿瘤生长的用途。在其它方面,本公开提供了如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分用于治疗有需要的受试者的由人CD137介导的病症的用途。在另一方面,本公开提供了如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分用于治疗有需要的受试者的癌症的用途。

[0299] 在另一方面,本公开提供了如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分用于制造供治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、减少或抑制其肿瘤生长的药剂的用途。在其它方面,本公开提供了如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分用于制造供治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、减少或抑制其肿瘤生长的药剂。在另一方面,本公开提供了如本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分用作药剂。

[0300] 本申请还包括以下项目。

[0301] 1.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分以约30-100nM的亲和力(K_D)结合人CD137。

[0302] 2.根据项目1所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[0303] 3.根据项目2所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113和K114。

[0304] 4.根据项目2至3中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114、N126以及I132。

[0305] 5.根据项目2至4中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135。

[0306] 6.根据项目1所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135。

[0307] 7.根据项目1所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至表位,所述表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列。

[0308] 8.根据项目7所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸残基。

[0309] 9.根据项目1所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111-114)的表位。

[0310] 10.根据项目9所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位还包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基N126、I132和P135。

[0311] 11.根据项目2至10中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位是非线性表位。

[0312] 12.根据项目2至11中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中SEQ ID NO:3中残基K114的突变消除所述抗体或其抗原结合部分的结合。

[0313] 13.根据前述项目中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分以约45-95nM、50-90nM、55-85nM、6080nM、6575nM、5575nM、4070nM、5080nM或6090nM的亲和力(K_D)结合人CD137。

[0314] 14.根据前述项目中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至人CD137胞外域的非配体结合区。

[0315] 15.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分:

[0316] (i)以约30-100nM的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0317] (ii)结合至人CD137胞外域的非配体结合区;以及

[0318] (iii)结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[0319] 16.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分:

[0320] (i)以约30-100nM的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0321] (ii)不抑制人CD137与人CD137配体之间的相互作用;以及

[0322] (iii)结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[0323] 17.根据项目1至15中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分不抑制CD137与CD137L之间的相互作用。

[0324] 18.根据项目14至15中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述非配体结合区跨越富含半胱氨酸的结构域(CRD)III和CRD IV。

[0325] 19.根据前述项目中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。

[0326] 20.根据项目1、2、3以及11至19中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位包含SEQ ID NO:3中的E111、T113、K114以及P135。

[0327] 21.根据项目1至19中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包括含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX(SEQ ID NO:127)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。

[0328] 22.根据项目19至21中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述重链CDR3中的残基D95、L100、Y100E、Y100G、Y100H或其组合突变成丙氨酸引起与人CD137的结合丧失。

[0329] 23.根据项目19至22中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合突变成丙氨酸引起与人CD137的结合减少。

[0330] 24.根据前述项目中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分不抑制CD137:CD137L单体的三聚体的形成。

[0331] 25.根据项目1、13、14、17至19以及21至24中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至位于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111135内的表位。

[0332] 26.根据项目25所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述表位是非线性表位。

[0333] 27.根据前述项目中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

[0334] 28.根据项目1至27中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含选自由以下组成的组的重链和轻链CDR:

[0335] (a)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;以及

[0336] (b)分别如SEQ ID NO:51、108和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0337] 29.根据项目1至27中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含选自由SEQ ID NO:4和101组成的组的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0338] 30.根据项目1至27中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0339] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;以及

[0340] (b)分别地SEQ ID NO:101和6。

[0341] 31.根据项目1至27中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含与选自由SEQ ID NO:4和101组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0342] 32.根据项目1至27中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

[0343] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;以及

[0344] (b)分别地SEQ ID NO:101和6。

[0345] 33.根据项目1至27中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含重链和轻链,所述重链和轻链包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0346] (a)分别地SEQ ID NO:129和133;以及

[0347] (b)分别地SEQ ID NO:131和133。

[0348] 34.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含选自由以下组成的组的重链和轻链CDR:

[0349] (a)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0350] (b)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:70、79和90中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0351] (c)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:71、80和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0352] (d)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:72、81和92中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0353] (e)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:73、82和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0354] (f)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:74、83和93中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0355] (g)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:75、84和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0356] (h)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:74、85和94中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0357] (i)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:76、86和95中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0358] (j)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:77、87和93中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0359] (k)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、88和90中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0360] (l)分别如SEQ ID NO:49、57和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0361] (m)分别如SEQ ID NO:49、58和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0362] (n)分别如SEQ ID NO:49、59和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0363] (o)分别如SEQ ID NO:49、60和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0364] (p)分别如SEQ ID NO:50、61和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0365] (q)分别如SEQ ID NO:50、58和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0366] (r)分别如SEQ ID NO:51、62和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0367] (s)分别如SEQ ID NO:52、63和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0368] (t)分别如SEQ ID NO:50、64和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0369] (u)分别如SEQ ID NO:50、65和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0370] (v)分别如SEQ ID NO:51、108和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0371] (w)分别如SEQ ID NO:107、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;以及

[0372] (x)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:109、110和92中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0373] 35.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、101和103;并且其中所述轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46和105。

[0374] 36.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

[0375] 37.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗

体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126),其中X是任何氨基酸。

[0376] 38.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX(SEQ ID NO:128),其中X是任何氨基酸。

[0377] 39.根据项目1至27中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含由选自由以下组成的组的核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区:

[0378] (a)分别地SEQ ID NO:5和7;以及

[0379] (b)分别地SEQ ID NO:102和7。

[0380] 40.根据项目37至39中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中残基D95、L100、Y100E、Y100G、Y100H或其组合突变成丙氨酸引起与人CD137的结合丧失。

[0381] 41.根据项目37至40中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合突变成丙氨酸引起与人CD137的结合减少。

[0382] 42.根据项目1至27中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含由核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区,所述核苷酸序列与选自由以下组成的组的核苷酸序列具有至少90%同一性:

[0383] (a)分别地SEQ ID NO:5和7;以及

[0384] (b)分别地SEQ ID NO:102和7。

[0385] 43.根据项目42所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包含由分别与SEQ ID NO:5和7具有至少90%同一性的核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区。

[0386] 44.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含由选自由以下组成的组的核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区:

[0387] (a)分别地SEQ ID NO:5和7;

[0388] (b)分别地SEQ ID NO:5和29;

[0389] (c)分别地SEQ ID NO:5和31;

[0390] (d)分别地SEQ ID NO:5和33;

[0391] (e)分别地SEQ ID NO:5和35;

[0392] (f)分别地SEQ ID NO:5和37;

[0393] (g)分别地SEQ ID NO:5和39;

[0394] (h)分别地SEQ ID NO:5和41;

[0395] (i)分别地SEQ ID NO:5和43;

[0396] (j)分别地SEQ ID NO:5和45;

[0397] (k)分别地SEQ ID NO:5和47;

[0398] (l)分别地SEQ ID NO:9和7;

[0399] (m)分别地SEQ ID NO:11和7;

[0400] (n)分别地SEQ ID NO:13和7;

[0401] (o)分别地SEQ ID NO:15和7;

[0402] (p)分别地SEQ ID NO:17和7;

[0403] (q)分别地SEQ ID NO:19和7;

[0404] (r)分别地SEQ ID NO:21和7;

[0405] (s)分别地SEQ ID NO:23和7;

[0406] (t)分别地SEQ ID NO:25和7;

[0407] (u)分别地SEQ ID NO:27和7;

[0408] (v)分别地SEQ ID NO:102和7;

[0409] (w)分别地SEQ ID NO:104和7;以及

[0410] (x)分别地SEQ ID NO:5和106。

[0411] 45.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0412] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;

[0413] (b)分别地SEQ ID NO:4和28;

[0414] (c)分别地SEQ ID NO:4和30;

[0415] (d)分别地SEQ ID NO:4和32;

[0416] (e)分别地SEQ ID NO:4和34;

[0417] (f)分别地SEQ ID NO:4和36;

[0418] (g)分别地SEQ ID NO:4和38;

[0419] (h)分别地SEQ ID NO:4和40;

[0420] (i)分别地SEQ ID NO:4和42;

[0421] (j)分别地SEQ ID NO:4和44;

[0422] (k)分别地SEQ ID NO:4和46;

[0423] (l)分别地SEQ ID NO:8和6;

[0424] (m)分别地SEQ ID NO:10和6;

[0425] (n)分别地SEQ ID NO:12和6;

[0426] (o)分别地SEQ ID NO:14和6;

[0427] (p)分别地SEQ ID NO:16和6;

[0428] (q)分别地SEQ ID NO:18和6;

[0429] (r)分别地SEQ ID NO:20和6;

[0430] (s)分别地SEQ ID NO:22和6;

[0431] (t)分别地SEQ ID NO:24和6;

[0432] (u)分别地SEQ ID NO:26和6;

[0433] (v)分别地SEQ ID NO:101和6;

[0434] (w)分别地SEQ ID NO:103和6;以及

[0435] (x)分别地SEQ ID NO:4和105。

[0436] 46.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含与选自由以

下组成的组的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、101和103;并且其中所述轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46和105。

[0437] 47.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列:

[0438] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;

[0439] (b)分别地SEQ ID NO:4和28;

[0440] (c)分别地SEQ ID NO:4和30;

[0441] (d)分别地SEQ ID NO:4和32;

[0442] (e)分别地SEQ ID NO:4和34;

[0443] (f)分别地SEQ ID NO:4和36;

[0444] (g)分别地SEQ ID NO:4和38;

[0445] (h)分别地SEQ ID NO:4和40;

[0446] (i)分别地SEQ ID NO:4和42;

[0447] (j)分别地SEQ ID NO:4和44;

[0448] (k)分别地SEQ ID NO:4和46;

[0449] (l)分别地SEQ ID NO:8和6;

[0450] (m)分别地SEQ ID NO:10和6;

[0451] (n)分别地SEQ ID NO:12和6;

[0452] (o)分别地SEQ ID NO:14和6;

[0453] (p)分别地SEQ ID NO:16和6;

[0454] (q)分别地SEQ ID NO:18和6;

[0455] (r)分别地SEQ ID NO:20和6;

[0456] (s)分别地SEQ ID NO:22和6;

[0457] (t)分别地SEQ ID NO:24和6;

[0458] (u)分别地SEQ ID NO:26和6;

[0459] (v)分别地SEQ ID NO:101和6;

[0460] (w)分别地SEQ ID NO:103和6;以及

[0461] (x)分别地SEQ ID NO:4和105。

[0462] 48.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链序列,所述重链和轻链序列包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0463] (a)分别地SEQ ID NO:129和133;以及

[0464] (b)分别地SEQ ID NO:131和133。

[0465] 49.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含具有分别如SEQ ID NO:129和133中所示的氨基酸序列的重链和轻链序列。

[0466] 50.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗

体或其抗原结合部分包含具有分别如SEQ ID NO:131和133中所示的氨基酸序列的重链和轻链序列。

[0467] 51.根据前述项目中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分特异性结合至人CD137并使其激动。

[0468] 52.根据前述项目中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分展现出选自由以下组成的组的以下特性中的至少一种或多种:

[0469] (a)诱导或增强CD137三聚体的二聚化;

[0470] (b)诱导或增强CD137三聚体的多聚化;

[0471] (c)诱导或增强T细胞激活;

[0472] (d)诱导或增强细胞毒性T细胞应答;

[0473] (e)诱导或增强T细胞增殖;

[0474] (f)诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生;以及

[0475] (g)特性(a)-(f)的任何组合。

[0476] 53.根据前述项目中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分相对于结合人CD137的参考抗体展现出选自由以下组成的组的以下特性中的至少一种或多种:

[0477] (a)不诱导或增强肝内T细胞激活;

[0478] (b)不诱导或增强肝内T细胞增殖;

[0479] (c)不诱导或增强脾内T细胞激活;

[0480] (d)不诱导或增强脾内T细胞增殖;

[0481] (e)不诱导或增强巨噬细胞激活;

[0482] (f)不诱导或增强巨噬细胞分化;

[0483] (g)不诱导或增强丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性;以及

[0484] (h)特性(a)-(g)的任何组合。

[0485] 54.根据项目53所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述参考抗体是乌瑞鲁单抗。

[0486] 55.根据项目52至54中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分的特性不依赖于Fc受体结合。

[0487] 56.根据项目52至54中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分的特性通过Fc受体结合而增强。

[0488] 57.根据前述项目中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分与食蟹猕猴CD137、小鼠CD137或两者交叉反应。

[0489] 58.根据项目1至47和51至57中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体选自由以下组成的组:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD以及IgE抗体。

[0490] 59.根据项目58所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是IgG1抗体或IgG4抗体。

[0491] 60.根据项目1至47和51至57中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体包含野生型人IgG1或野生型人IgG4重链恒定区。

[0492] 61.根据项目1至47和51至57中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分，其中所述抗体包含突变型IgG1重链恒定区。

[0493] 62.根据项目1至47和51至57中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分，其中所述抗体包含突变型IgG4重链恒定区。

[0494] 63.根据项目62所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分，其中所述突变型IgG4重链恒定区在Ser228处包含取代。

[0495] 64.根据项目63所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分，其中所述突变型IgG4重链恒定区包含S228P取代。

[0496] 65.一种药物组合物，所述药物组合物包含根据前述项目中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分，以及药学上可接受的载体。

[0497] 66.一种核酸，所述核酸包含编码根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分的轻链、重链、或轻链和重链两者的核苷酸序列。

[0498] 67.一种表达载体，所述表达载体包含根据项目66所述的核酸。

[0499] 68.一种细胞，所述细胞用根据项目67所述的表达载体转化。

[0500] 69.一种用于产生特异性结合人CD137的单克隆抗体或其抗原结合部分的方法，所述方法包括在允许所述单克隆抗体或抗原结合部分表达的条件下维持根据项目68所述的细胞。

[0501] 70.根据项目69所述的方法，所述方法还包括获得所述单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0502] 71.一种用于诱导或增强受试者体内人CD137三聚体的二聚化的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分，或根据项目65所述的药物组合物。

[0503] 72.一种用于诱导或增强受试者体内人CD137三聚体的多聚化的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分，或根据项目65所述的药物组合物。

[0504] 73.一种用于诱导或增强受试者体内T细胞激活的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分，或根据项目65所述的药物组合物。

[0505] 74.根据项目73所述的方法，其中所述T细胞激活在肿瘤微环境中发生。

[0506] 75.一种用于诱导或增强受试者体内的细胞毒性T细胞应答的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分，或根据项目65所述的药物组合物。

[0507] 76.根据项目75所述的方法，其中所述细胞毒性T细胞应答在肿瘤微环境中发生。

[0508] 77.一种用于诱导或增强受试者体内免疫细胞的细胞因子产生的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分，或根据项目65所述的药物组合物。

[0509] 78.根据项目77所述的方法，其中产生的所述细胞因子是IL2、TNFα、IL13、IFNγ或其组合。

[0510] 79.根据项目77或项目78所述的方法，其中所述细胞因子产生在肿瘤微环境中发

生。

[0511] 80.一种用于诱导或增强受试者体内T细胞增殖的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据项目65所述的药物组合物。

[0512] 81.根据项目80所述的方法,其中所述T细胞增殖在肿瘤微环境中发生。

[0513] 82.一种用于减少或抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据项目65所述的药物组合物。

[0514] 83.一种用于治疗受试者的由人CD137介导的病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据项目65所述的药物组合物。

[0515] 84.一种用于治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据项目65所述的药物组合物。

[0516] 85.根据项目82至84中任一项所述的方法,其中在施用所述分离的单克隆抗体或抗原结合部分之后,免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润增加。

[0517] 86.根据项目85所述的方法,其中所述免疫细胞表达CD45。

[0518] 87.根据项目82至86中任一项所述的方法,其中在施用所述分离的单克隆抗体或抗原结合部分之后,肿瘤微环境中调节性T(Treg)细胞的数量减少。

[0519] 88.根据项目87所述的方法,其中所述Treg细胞表达CD4、FOXP-3和CD25。

[0520] 89.根据项目82至88中任一项所述的方法,其中在施用所述分离的单克隆抗体或抗原结合部分之后,肿瘤微环境中巨噬细胞的数量减少。

[0521] 90.根据项目89所述的方法,其中所述巨噬细胞表达CD45和CD11b。

[0522] 91.根据项目82至90中任一项所述的方法,其中在施用所述分离的单克隆抗体或抗原结合部分之后,肿瘤微环境中T细胞耗竭减少。

[0523] 92.根据项目91所述的方法,其中T细胞耗竭减少包含TIGIT、PD-1、LAG-3或其组合的表达减少。

[0524] 93.根据项目84至92中任一项所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:黑色素瘤、神经胶质瘤、肾癌、乳腺癌、血液癌症以及头颈癌。

[0525] 94.根据项目83所述的方法,其中所述血液癌症是B细胞淋巴瘤。

[0526] 95.一种诱导抗肿瘤记忆免疫应答的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,或根据项目65所述的药物组合物。

[0527] 96.根据项目71至95中任一项所述的方法,其中所述抗体或抗原结合部分结合Fcγ受体。

[0528] 97.根据项目82至95中任一项所述的方法,其中CD4+T细胞、CD8+T细胞、自然杀伤细胞或其组合的耗尽使所述抗体或其抗原结合部分的功效降低。

[0529] 98.一种用于检测生物样品中人CD137的存在或不存在的方法,所述方法包括:

[0530] (i)使生物样品与根据项目1至64中任一项所述的抗体或抗原结合部分接触,其中

所述抗体或抗原结合部分用可检测物质标记;以及

[0531] (ii)检测结合至人CD137的所述抗体或抗原结合部分,由此检测所述生物样品中人CD137的存在或不存在。

[0532] 99.一种试剂盒,所述试剂盒包含容器,所述容器包含根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,和任选的药学上可接受的载体,或根据项目65所述的药物组合物,以及包装插页,所述包装插页包含有关施用所述抗体或药物组合物,以用于治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、或减少或抑制其肿瘤生长的说明书。

[0533] 100.一种试剂盒,所述试剂盒包含容器,所述容器包含根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,和任选的药学上可接受的载体,或根据项目65所述的药物组合物,以及包装插页,所述包装插页包含有关单独或与另一种试剂组合施用所述抗体或药物组合物,以用于治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、或减少或抑制其肿瘤生长的说明书。

[0534] 101.根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分用于制造供治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、或减少或抑制其肿瘤生长的药剂的用途。

[0535] 102.根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或抗原结合部分用于制造供治疗有需要的受试者的癌症或延迟其癌症进展、或减少或抑制其肿瘤生长的药剂。

[0536] 103.根据项目1至64中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,所述分离的单克隆抗体或抗原结合部分用作药剂。

附图说明

[0537] 图1提供了描绘亲本抗CD137抗体mAb1的亲和力成熟克隆的结合亲和力分布的图。

[0538] 图2提供了显示如通过与人或小鼠CD137的结合亲和力(K_D)测量的mAb1CDRH3丙氨酸扫描的结果的示意图。

[0539] 图3A显示人CD137的氨基酸序列,其中构成mAb1、mAb4或mAb5所结合的表位的残基以粗体指示。

[0540] 图3B是描绘如通过表面等离子体共振测定的mAb1与小鼠和大鼠CD137的胞外域的动力学结合数据的图。

[0541] 图3C提供了结合至CD137L(以灰色显示)的人CD137的x射线结晶图像,且残基E111、T113、K114和P135以球形显示。

[0542] 图3D提供了在三聚体形成中结合至CD137L(以灰色显示)的人CD137的x射线结晶图像,且残基E111、T113、K114和P135以球形显示。

[0543] 图4A提供了流式细胞数据的散点图,描绘了CD44+T细胞上的TIGIT(顶图)或PD-1(底图)表达响应于抗CD137抗体而增加。

[0544] 图4B提供了描绘在用抗CD137抗体治疗后小鼠脾中表达TIGIT(顶图)或PD1(底图)的CD8+CD44+T细胞的定量的图。

[0545] 图4C提供了描绘在用抗CD137抗体治疗后小鼠脾中CD8+T细胞的定量的图,以CD45+细胞的百分比(左图)或每个脾中的细胞数量(右图)表示。

[0546] 图5A提供了显示在用指定剂量的抗CD137抗体治疗后小鼠体内各个CT26肿瘤体积的图。

[0547] 图5B是显示图5A中所提供的平均肿瘤体积的图。

[0548] 图5C是KaplanMeier图,显示了在用抗CD137抗体治疗后肿瘤的总体存活率。

[0549] 图5D是显示用致瘤CT26细胞再激发的小鼠体内的肿瘤体积的图。

[0550] 图6A提供了显示在用亲本和亲和力成熟的抗CD137抗体治疗后小鼠体内各个CT26肿瘤体积的图。

[0551] 图6B是提供图6A中所提供的平均肿瘤体积的图。

[0552] 图7提供了描绘在用指定剂量抗CD137抗体治疗后脾T细胞(顶图)和肿瘤浸润白细胞(底图)中的CD8+或CD4+T细胞的百分比的图。

[0553] 图8提供了显示当在存在或不存在淋巴细胞耗尽抗体下,用mAb1治疗小鼠时的各个肿瘤体积的图。CD4+T细胞用GK1.5耗尽(中间图),CD8+T细胞用YTS169.4耗尽(从右侧起第二个图),并且NK细胞用抗无唾液酸-GM1抗体耗尽(右侧最后一个图)。

[0554] 图9提供了显示具有CT26肿瘤(结肠癌)、EMT6肿瘤(乳腺癌)、A20肿瘤(B细胞淋巴瘤)或MC38肿瘤(结肠癌)并用mAb8或同型对照抗体治疗的小鼠体内的各个肿瘤体积的图。

[0555] 图10A-10C显示了以每只小鼠150μg施用的抗CD137抗体的体内抗肿瘤功效。各个肿瘤体积示于10A中,平均肿瘤体积示于10B中且存活率百分比示于10C中。

[0556] 图11A-11C显示了以每只小鼠20μg施用的抗CD137抗体的体内抗肿瘤功效。各个肿瘤体积示于11A中,平均肿瘤体积示于11B中且存活率百分比示于11C中。

[0557] 图12提供了显示具有CT26肿瘤的小鼠中的单个肿瘤体积并用不同剂量mAb1(即,12.5、25、50、100或200μg)或同型对照治疗的小鼠体内各个肿瘤体积的图。

[0558] 图13A和13B显示了Fc结合在mAb1的抗肿瘤功效中的贡献。图13A显示了作为IgG4同型或IgG4无糖基化同型的mAb1。平均肿瘤体积显示于顶图上,并且各个肿瘤体积显示于底图上。图13B显示了作为IgG4同型或IgG1无糖基化同型的mAb1。平均肿瘤体积显示于顶图上,并且各个肿瘤体积显示于底图上。

[0559] 图14A-14D显示了在接受治疗之前,在具有较大确定的肿瘤(即,500mm^3)的小鼠中抗CD137抗体的体内抗肿瘤功效。各个肿瘤体积示于14A和14D中,平均肿瘤体积示于14B中且存活率百分比示于14C中。

[0560] 图15提供了KaplanMeier存活率曲线,显示了预先用来自图14A-14C的mAb1、mAb8或同型对照治疗并且被认为治愈、在相对侧腹中用CT26细胞再激发的小鼠中的保护性抗肿瘤免疫。

[0561] 图16A提供流式细胞数据的散点图,显示了在用指定剂量抗CD137抗体治疗后CD45+肝内T细胞的扩增。

[0562] 图16B提供了描绘在用指定剂量抗CD137抗体治疗后肝内CD8+T细胞(左图)和CD4+T细胞(右图)的定量的图。

[0563] 图17A提供了在用亲和力成熟的抗CD137抗体治疗小鼠后脾T细胞中CD3+、CD4+或CD8+T细胞的百分比的图。

[0564] 图17B提供了在用亲和力成熟的抗CD137抗体治疗小鼠后肝T细胞中CD3+、CD4+或CD8+T细胞的百分比的图。

[0565] 图18A提供了在用亲和力成熟的抗CD137抗体治疗小鼠后表达TIGIT、PD-1或LAG3的脾CD8+CD44+T细胞的百分比的图。

[0566] 图18B提供了在用亲和力成熟的抗CD137抗体治疗小鼠后表达TIGIT、PD1或LAG3的肝CD8+CD44+T细胞的百分比的图。

[0567] 图19A提供了在用亲和力成熟的抗CD137抗体治疗小鼠后表达TIGIT、PD-1或LAG3的脾CD4+CD44+T细胞的百分比的图。

[0568] 图19B提供了在用亲和力成熟的抗CD137抗体治疗小鼠后表达TIGIT、PD-1或LAG3的肝CD4+CD44+T细胞的百分比的图。

[0569] 图20A-20C提供了由多次施用不同剂量的抗CD137抗体mAb1、mAb8或3H3引起的体内毒性指标的图。图20A是显示在施用抗CD137抗体后肝中CD8+T细胞的百分比的图。图20B是显示在施用抗CD137抗体的小鼠的血浆中丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性的图。图20C是显示在施用抗CD137抗体的小鼠的血浆中TNFα的水平的图。

[0570] 图21提供了用苏木精和曙红(H&E)染色的来自如图20A-20C中所述用mAb1、mAb8、3H3或同型对照治疗的小鼠的肝切片的代表性图像。箭头指示免疫细胞的浸润。

[0571] 图22A-22D提供代表性FACS图,显示了肿瘤微环境中的免疫细胞重编程。向具有CT26肿瘤的小鼠施用多剂mAb8或同型对照(第0天、第3天、第6天和第9天)。图22A显示基于CD45表达的总体免疫细胞浸润。图22B显示如由FOXP3和CD25表达测量的Treg细胞的减少。图22C显示如通过PD1和TIGIT表达测量的T细胞耗竭的减少。图22D显示如通过F4/80和CD11b表达测量的肿瘤相关巨噬细胞的减少。

[0572] 图23显示了来自具有CT26肿瘤并用抗CD137抗体mAb1和3H3或同型对照治疗的小鼠的脾的免疫表型分析。

[0573] 图24是显示在OVA刺激分析中,当用指定抗CD137抗体刺激时由鼠类T细胞产生的IL-2(pg/ml)的浓度的图。鼠类抗PD-1(RMP1-14)连同阿特珠单抗(Atezolizumab)(抗PDL1抗体)用作比较物。

[0574] 图25A和25B是显示在OVA刺激分析中,当用指定抗CD137抗体刺激时表达CD25(25A)或TIGIT(25B)的鼠类CD8+T细胞的百分比的图。鼠类抗PD-1(RMP1-14)和鼠类抗CD137(3H3)连同阿特珠单抗(抗PDL1抗体)用作比较物。

[0575] 图26提供条形图,描绘了在与板结合的抗CD137抗体一起培育后,CD3+T细胞所产生的细胞因子(IL2、TNFα、IL13和IFNγ)的定量。细胞因子水平以抗CD3抗体相比基线激活的倍数增加显示。

[0576] 图27A-27C提供了描绘在用抗CD137抗体处理后在混合淋巴细胞反应中IFNγ产生的剂量应答的图。使用抗PD1抗体(可瑞达(Keytruda);Merck)作为对照。

[0577] 图28是显示在抗CD137抗体mAb1、mAb8、mAb4或mAb5、或同型对照存在下与工程改造成表达CD32的CHO细胞(CHO-CD32细胞)共培养的人T细胞中IFNγ产生的图。

[0578] 图29是显示当在抗CD137抗体mAb1、mAb8、mAb4或mAb5、同型对照存在或不存在下与工程改造成表达CD32的CHO细胞(CHO-CD32细胞)共培养时Treg细胞的增殖情况的图。

[0579] 图30提供了显示在不同浓度的mAb1、mAb8、mAb4或mAb5存在下用NFκβ或SRF的荧光素酶报导体转导的CCL119细胞中的NFκβ和SRF信号传导的图。

[0580] 图31提供了显示在抗CD137抗体mAb1、3H3或LOB12.3、或同型对照存在下用TLR9激

动剂CpG刺激的骨髓源性小鼠巨噬细胞对IL6、TNFα或IL27的诱导的图。

[0581] 图32提供了显示在抗CD137抗体mAb1、mAb4或mAb5、或同型对照存在下用LPS刺激的人单核细胞源性巨噬细胞对TNFα的诱导的图。

[0582] 图33提供了显示如通过在抗CD137抗体mAb1、mAb4或mAb5、或同型对照存在下与PMA一起培养的THP1单核细胞中的CD64表达所测定的抗CD137抗体对巨噬细胞分化的影响的图。

[0583] 图34A-34C提供了显示来自接受人PBMC以及抗CD137抗体mAb1、mAb4或mAb5、或同种型对照的免疫感受态小鼠中hCD45+、hCD8+或hCD4+的百分比的图。

具体实施方式

[0584] 经显示,利用激动剂抗CD137抗体进行的癌症疗法可在小鼠中诱导免疫介导的肿瘤排斥,并且目前正在癌症患者中测试这种类型的类似试剂。先前的报导指示,施用抗CD137抗体可诱导肝中多克隆T淋巴细胞浸润的大量积累(Dubrot等人(2010)《癌症免疫学与免疫疗法(Cancer Immunology,Immunotherapy)》59(8):12231233),提示肝部炎症和药物诱发的肝毒性的可能。近期有关激动性抗CD137抗体(乌瑞鲁单抗,BMS663513;BristolMyers Squibb)的临床评价的报告记录了人受试者的治疗相关不良事件的观察结果,包括与抗体剂量相关的严重肝毒性(转氨酶升高)指征(Segal等人(2016)《临床癌症研究》23(8):19291936)。

[0585] 本公开提供了特异性结合至人CD137表位并使人CD137激动的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分与mAb1竞争结合至人CD137的表位。在一些方面,相较于抗小鼠CD137 3H3抗体(Melero等人(1997)《自然医学(Nature Medicine)》3(6):682-685;Uno等人(2006)《自然-医学》12(6):693-696)和处于临床开发中的至少两种抗人CD137抗体(BMS-663513/乌瑞鲁单抗,Bristol-Meyers Squibb;以及PF-05082566/乌托米单抗,Pfizer),本公开的抗CD137激动剂抗体诱导肿瘤微环境中CD8+T细胞的细胞因子产生和扩增,以及体内保护性抗肿瘤免疫且伴随毒性相关事件发生的可能性降低。

[0586] 定义

[0587] 除非另有说明,否则在权利要求书和说明书中使用的术语如下文所阐述而定义。

[0588] 必须注意的是,除非上下文另外明确规定,否则如说明书和所附权利要求书中所使用,单数形式“一个(种)”和“所述”包括多个(种)指示物。此外,除非上下文另外要求,否则单数形式的术语应包括复数,并且复数形式的术语应包括单数。

[0589] 如本文所使用,“约”将如本领域的普通技术人员所理解,并且根据其使用的背景而在一定范围内变化。如果本领域的普通技术人员根据其使用的上下文对该术语的使用不了解,则“约”将意味着特定值至多加上或减去10%。

[0590] 如本文所使用,术语“激动剂”是指部分或完全地促进、诱导、增加和/或激活本文所公开的天然多肽(例如CD137)的生物活性的任何分子。适合的激动剂分子具体地包括天然多肽、肽、反义寡核苷酸、小有机分子等的激动剂抗体或抗体片段、片段或氨基酸序列变体。在一些实施方案中,在激动剂存在下观察到以剂量依赖性方式激活。在一些实施方案中,所测量的信号(例如生物活性)比在相当条件下用阴性对照所测量的信号高至少约5%、

至少约10％、至少约15％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、或至少约100％。本文还公开了鉴别适合用于本公开的方法中的激动剂的方法。例如,这些方法包括但不限于结合分析,如酶联免疫吸附剂分析(ELISA)、Forte Bio©系统和放射免疫分析(RIA)。这些分析测定了激动剂结合所关注多肽(例如受体或配体,例如CD137)的能力,并因此指示该激动剂促进、增加或激活该多肽的活性的能力。激动剂的功效也可使用功能分析来测定,如激动剂激活或促进多肽的功能的能力。例如,功能分析可包含使多肽与候选激动剂分子接触,并测量通常与所述多肽相关的一种或多种生物活性的可检测变化。激动剂的效力通常由其EC_{50}值(激活激动剂应答的50％所需的浓度)确定。EC_{50}值越低,则激动剂的效力越高且激活最大生物应答所需的浓度越低。

[0591] 如本文所使用,术语“丙氨酸扫描”是指用于测定特定野生型残基对给定蛋白质或多肽的稳定性或功能(例如结合亲和力)的贡献的一种技术。该技术涉及用丙氨酸残基取代多肽中的野生型残基,随后评估丙氨酸取代的衍生物或突变型多肽的稳定性或功能(例如结合亲和力)并与野生型多肽相比较。用丙氨酸取代多肽中的野生型残基的技术是本领域已知的。

[0592] 术语“改善”是指在疾病状态,例如癌症的治疗中的任何治疗有益的结果,包括该疾病状态的预防、严重程度或进展的降低、减轻或治愈。

[0593] 如本文所使用,术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及稍后修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、γ羧基谷氨酸和O磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即,碳结合至氢、羧基、氨基和R基团,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍类。这些类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指结构不同于氨基酸的一般化学结构,但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化合物。

[0594] 氨基酸在本文中可由其通常已知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号提及。同样,核苷酸也可以由其公认的单字母代码提及。如此处所使用,“极性氨基酸”是指包含偏好驻留在水环境中的侧链的氨基酸。在一些实施方案中,极性氨基酸选自由以下组成的组:精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸以及酪氨酸。极性氨基酸可为带正电、带负电或呈电中性的。如本文所使用,“非极性氨基酸”是指选自由以下组成的组的氨基酸:丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸以及缬氨酸。

[0595] 如本文所使用,“氨基酸取代”是指预定氨基酸序列(起始多肽的氨基酸序列)中的至少一个现有氨基酸残基被另一个不同的“置换”氨基酸残基置换。“氨基酸插入”是指将至少一个额外氨基酸掺入预定氨基酸序列中。虽然插入物通常由插入一个或两个氨基酸残基组成,但也可以制备较大的“肽插入物”,例如插入约三个至约五个或甚至最多约十个、十五个或二十个氨基酸残基。如以上所公开,插入的残基可以是天然存在或非天然存在的。“氨基酸缺失”是指从预定氨基酸序列去除至少一个氨基酸残基。

[0596] 如本文所使用,术语“量”或“水平”是指一种物质(例如蛋白质)的可检测的数量、水平或丰度。当提及多肽,如本文所述的多肽时,术语“表达的水平(level of expression)”或“表达水平(expression level)”一般可互换使用,并且一般是指生物样品中(例如在细胞表面上)多肽的可检测量。

[0597] 如本文所使用,术语“抗CD137激动剂抗体”(与术语“抗CD137抗体”可互换使用)是指特异性结合至CD137并且部分或完全地促进、诱导、增加和/或激活CD137生物活性、应答和/或由CD137信号传导介导的下游路径或其它CD137介导的功能的抗体。在一些实施方案中,抗CD137激动剂抗体结合至CD137并允许CD137L结合。在一些实施方案中,抗CD137激动剂抗体结合至CD137并诱导CD137的多聚化。在一些实施方案中,抗CD137激动剂抗体结合至CD137并诱导CD137三聚体的二聚化。在一些实施方案中,抗CD137激动剂抗体结合至CD137并诱导CD137三聚体的多聚化。本文提供了抗CD137激动剂抗体的实例。用于检测三聚体:三聚体复合物的形成的方法是本领域技术人员已知的。例如,经显示,电子显微镜检查可检测此类复合物,参见例如Won,E.《生物化学杂志(The Journal of Biological Chemistry)》,第285卷(12):9202-9210(2010)。

[0598] 如本文所使用,术语“抗CD137mAb1”(与“mAb1”可互换使用)是指这样一种示例性抗CD137激动剂抗体,所述抗体包含以下可变重链(V_H)氨基酸序列:

[0599] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS(SEQ ID NO:4),

[0600] 和以下可变轻链(V_L)氨基酸序列:

[0601] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHLFPITFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:6)。

[0602] 如本文所使用,术语“抗CD137mAb8”(与“mAb8”可互换使用)是指这样一种示例性抗CD137激动剂抗体,所述抗体包含以下可变重链(V_H)氨基酸序列:

[0603] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGDTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS(SEQ ID NO:101);

[0604] 和以下可变轻链(V_L)氨基酸序列:

[0605] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHLFPITFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:6)。

[0606] 如本文所使用,术语“抗CD137mAb10”(与“mAb10”可互换使用)是指这样一种示例性抗CD137激动剂抗体,所述抗体包含以下可变重链(V_H)氨基酸序列:

[0607] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQAPGKGL EWVAAISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS（SEQ ID NO: 26）;

[0608] 和以下可变轻链(V_L)氨基酸序列：

[0609] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHLFP ITFGGGTKVEIK（SEQ ID NO: 6）。

[0610] 如本文所使用,术语“抗体”是指包含两个轻链多肽和两个重链多肽的完整抗体。完整抗体包括不同的抗体同型,包括IgM、IgG、IgA、IgD以及IgE抗体。术语“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合化或嵌合抗体、人源化抗体、灵长类动物化抗体、去免疫抗体以及完全人抗体。抗体可以产生于或来源于多种物种中的任一种,例如哺乳动物,如人类、非人灵长类动物(例如猩猩、狒狒或黑猩猩)、马、牛、猪、绵羊、山羊、狗、猫、兔、豚鼠、沙鼠、仓鼠、大鼠以及小鼠。抗体可以是纯化的或重组抗体。

[0611] 如本文所使用,术语“抗体片段”、“抗原结合片段”、“抗原结合部分”或类似术语是指抗体中保留结合至靶抗原(例如CD137)并抑制靶抗原活性的能力的片段。此类片段包括例如单链抗体、单链Fv片段(scFv)、Fd片段、Fab片段、Fab'片段或$F(ab')_2$片段。scFv片段是单一多肽链,该片段包括作为scFv来源的抗体的重链和轻链可变区。此外,内抗体、微型抗体、三功能抗体和双功能抗体也包括在抗体的定义内并且适用于本文所述的方法中。参见例如Todorovska等人(2001),《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》248(1):4766;Hudson和Kortt,(1999)《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》231(1):177-189;Poljak,(1994)《结构(Structure)》2(12):1121-1123;Rondon和Marasco,(1997)《微生物学年评(Annu.Rev.Microbiol.)》51:257283,所述文献各自的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0612] 如本文所使用,术语“抗体片段”还包括例如单域抗体,如骆驼化单域抗体。参见例如Muyldermans等人(2001),《生化科学趋势(Trends Biochem.Sci.)》26:230235;Nuttall等人(2000),《当代药物生物技术(Curr.Pharm.Biotech.)》1:253263;Reichmann等人(1999),《免疫学方法杂志(J.Immunol.Meth.)》231:2538;PCT申请公开号WO 94/04678和WO 94/25591;以及美国专利号6,005,079,所有这些专利都以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,本公开提供了单域抗体,所述抗体包含具有修饰的两个VH域,由此形成单域抗体。

[0613] 在一些实施方案中,抗原结合片段包括重链多肽的可变区和轻链多肽的可变区。在一些实施方案中,本文所述的抗原结合片段包含抗体的轻链和重链多肽的CDR。

[0614] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”是将外来抗原与MHC的复合物展示于表面上的一种细胞。T细胞使用T细胞受体(TCR)识别这一复合物。APC的实例包括但不限于树突状细胞(DC)、外周血单核细胞(PBMC)、单核细胞(如THP-1)、B淋巴母细胞样细胞(如C1R.A2、1518BLCL)以及单核细胞源性树突状细胞(DC)。一些APC通过吞噬作用或通过受体介导的内吞作用内化抗原。

[0615] 术语“抗原呈递”是指APC捕捉抗原并使其能够被T细胞识别而例如作为MHC-I和/或MHC-II缀合物的组分的一种方法。

[0616] 如本文所使用,术语“细胞凋亡”是指在多细胞生物体(例如人类)中发生的程序性细胞死亡的过程。引起细胞凋亡的高度调控的生化和分子事件可引起可观察到的细胞的特有形态变化,包括膜出泡、细胞体积收缩、染色体DNA凝聚和片段化,以及mRNA衰减。鉴别经历细胞凋亡的细胞,包括T细胞的常见方法是使细胞暴露于荧光团缀合的蛋白质(膜联蛋白V)。膜联蛋白V因能够结合至浆膜外叶上的磷脂酰丝氨酸作为细胞经历凋亡过程的早期指标而常被用于检测凋亡细胞。

[0617] 如本文所使用,术语“结合至固定的CD137”是指本公开的人抗体结合至在细胞表面上表达或附接至固体支撑物的CD137的能力。

[0618] 如本文所使用,术语“双特异性”或“双功能抗体”是指具有两个不同的重链/轻链对和两个不同结合位点的人工混合抗体。双特异性抗体可通过多种方法制造,包括杂交瘤融合或Fab’片段连接。参见例如,Songsivilai和Lachmann,(1990)《临床与实验免疫学(Clin.Exp.Immunol.)》79:315321;Kostelny等人(1992),《免疫学杂志(J.Immunol.)》148:1547-1553。

[0619] 传统上,双特异性抗体的重组制造是基于两个免疫球蛋白重链/轻链对的共表达,其中所述两个重链/轻链对具有不同特异性(Milstein and Cuello,(1983)《自然(Nature)》305:537539)。具有所希望的结合特异性(抗体抗原组合位点)的抗体可变域可与免疫球蛋白恒定域序列融合。重链可变区优选地与免疫球蛋白重链恒定域融合,所述重链恒定域包括铰链、CH2和CH3区的至少一部分。如需了解当前已知用于产生双特异性抗体的示例性方法的其它详情,参见例如Suresh等人(1986),《酶学方法(Methods Enzymol.)》121:210;PCT公开号WO 96/27011;Brennan等人(1985)《科学(Science)》229:81;Shalaby等人,《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》(1992)175:217-225;Kostelny等人(1992),《免疫学杂志(J.Immunol.)》148(5):15471553;Hollinger等人(1993),《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》90:6444-6448;Gruber等人(1994),《免疫学杂志(J.Immunol.)》152:5368;以及Tutt等人(1991),《免疫学杂志(J.Immunol.)》147:60。双特异性抗体还包括交联或异缀合抗体。异缀合抗体可以使用任何便利的交联方法制备。适合的交联剂以及多种交联技术是本领域中众所周知的,并且公开于美国专利号4,676,980中。

[0620] 还描述了直接从重组细胞培养物制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如,已使用亮氨酸拉链制备双特异性抗体。参见例如Kostelny等人(1992)《免疫学杂志》148(5):15471553。来自Fos和Jun蛋白质的亮氨酸拉链肽可通过基因融合连接至两种不同抗体的Fab′部分。抗体同二聚体可在铰链区处还原以形成单体,然后再氧化形成抗体异二聚体。这一方法也可用于制造抗体同二聚体。Hollinger等人(1993)《美国国家科学院院刊》90:64446448描述的“双功能抗体”提供了用于制备双特异性抗体片段的替代性机制。所述片段包含通过连接子连接至轻链可变域(VL)的重链可变域(VH),所述连接子太短而不允许同一条链上的两个域之间配对。因此,迫使一个片段的VH和VL域与另一个片段的互补VL和VH域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报导了通过使用单链Fv(scFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见例如Gruber等人(1994)《免疫学杂志》152:5368。或者,抗体可以是如例如Zapata等人(1995)《蛋白质工程(Protein Eng.)》8(10):10571062中所描述的

“线性抗体”。简单点说,这些抗体包含一对串联Fd区段(VHCH1VH-CH1),该对串联Fd区段形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0621] 具有超过两个价态的抗体(例如三特异性抗体)涵盖于且描述于例如Tutt等人(1991)《免疫学杂志》147:60中。

[0622] 本公开还包含多特异性抗体的变体形式,如Kim等人(2007)《自然生物技术(Nat Biotechnol)》25(11):12901297中所描述的双重可变域免疫球蛋白(DVD-Ig)分子。DVD-Ig分子被设计成使得来自两种不同亲本抗体的两个不同的轻链可变域(VL)通过重组DNA技术直接地或通过短连接子串联连接,随后与轻链恒定域连接。类似地,重链包含串联连接的两个不同的重链可变域(VH),随后是恒定域CH1和Fc区。由两种亲本抗体制备DVD-Ig分子的方法另外描述于例如PCT公开号WO 08/024188和WO 07/024715中。在一些实施方案中,双特异性抗体是串联Fab免疫球蛋白,其中具有第二种特异性的轻链可变区与完整抗体的重链可变区融合。此类抗体在例如国际专利申请公开号WO 2015/103072中有描述。

[0623] 如本文所使用,“癌症抗原”是指(i)肿瘤特异性抗原;(ii)肿瘤相关抗原;(iii)表达肿瘤特异性抗原的细胞;(iv)表达肿瘤相关抗原的细胞;(v)肿瘤上的胚胎抗原;(vi)自体肿瘤细胞;(vii)肿瘤特异性膜抗原;(viii)肿瘤相关膜抗原;(ix)生长因子受体;(x)生长因子配体;以及(xi)与癌症相关的任何其它类型的抗原或抗原呈递细胞或材料。

[0624] 术语“癌症”是技术公认的术语,并且是指上皮或内分泌组织的恶性疾病,包括呼吸系统癌、胃肠系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌以及黑色素瘤。本文描述的抗CD137抗体可用于治疗患有、疑似患有、或有较高风险发展包括肾癌或黑色素瘤在内的任何类型癌症的患者。示例性癌症包括从子宫颈、肺、前列腺、乳房、头颈部、结肠以及卵巢组织形成的那些。所述术语还包括癌肉瘤,包括由癌性和肉瘤性组织构成的恶性肿瘤。“腺癌”是指来源于腺体组织或其中肿瘤细胞形成可识别的腺体结构的癌症。

[0625] 如本文所使用,术语“竞争”当在竞争结合至同一表位的抗原结合蛋白(例如免疫球蛋白、抗体或其抗原结合片段)的情形中使用时,是指如通过分析法(例如竞争结合分析;交叉阻断分析)测定的抗原结合蛋白之间的相互作用,其中测试抗原结合蛋白(例如测试抗体)抑制(例如减少或阻断)参考抗原结合蛋白(例如参考抗体,如mAb1)与共同抗原(例如CD137或其片段)的特异性结合。在一些实施方案中,本文所述的抗体与mAb1(即,包含分别为SEQ ID NO:4和6的重链和轻链可变序列的抗体)、mab8(即,包含分别为SEQ ID NO:101和6的重链和轻链可变序列的抗体)或mAb10(即,包含分别为SEQ ID NO:26和6的重链和轻链可变序列的抗体)交叉竞争。

[0626] “来源于”指定多肽或蛋白质的多肽或氨基酸序列是指所述多肽的起源。优选地,来源于特定序列的多肽或氨基酸序列具有与该序列或其一部分基本上相同的氨基酸序列,其中所述部分由至少10-20个氨基酸、优选地至少2030个氨基酸、更优选地至少3050个氨基酸组成,或者本领域的普通技术人员可通过其它方式将其鉴别为在该序列中具有其起点。来源于另一种肽的多肽相对于起始多肽可具有一个或多个突变,例如一个或多个氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代或具有一个或多个氨基酸残基插入或缺失。

[0627] 多肽可包含非天然存在的氨基酸序列。此类变体必须与起始分子具有低于100%的序列同一性或相似性。在某些实施方案中,变体将例如在变体分子的长度上具有与起始多肽的氨基酸序列具约75%至小于100%,更优选地约80%至小于100%、更优选地约85%

至小于100％、更优选地约90％至小于100％(例如91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％)并且最优选地约95％至小于100％的氨基酸序列同一性或相似性的氨基酸序列。

[0628] 在某些实施方案中,起始多肽序列与由其得到的序列之间存在一个氨基酸差异。相对于这一序列的同一性或相似性在本文中定义为在对准序列并且必要时引入空位以达到最大序列同一性百分比之后,候选序列中与起始氨基酸残基相同的氨基酸残基(即,相同残基)的百分比。在某些实施方案中,多肽由选自表3或表4中所示序列的氨基酸序列组成、基本上由所述氨基酸序列组成或包含所述氨基酸序列。在某些实施方案中,多肽包括与选自表3或表4中所示序列的氨基酸序列至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,多肽包括与选自表3或表4中所示序列的连续氨基酸序列至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同的连续氨基酸序列。在某些实施方案中,多肽包括的氨基酸序列具有选自表3或表4中所示序列的氨基酸序列中的至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400或500个(或这些数字内的任何整数)连续氨基酸。

[0629] 在某些实施方案中,本公开的抗体由核苷酸序列编码。本发明的核苷酸序列可用于许多应用,包括:克隆、基因疗法、蛋白质表达和纯化、突变引入、有需要的宿主体内的DNA疫苗接种、用于例如被动免疫的抗体产生、PCR、引物和探针产生等。在某些实施方案中,本发明的核苷酸序列包含选自表3或表4中所示序列的核苷酸序列、由所述核苷酸序列组成、或基本上由所述核苷酸序列组成。在某些实施方案中,核苷酸序列包括与选自表3或表4中所示序列的核苷酸序列至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同的核苷酸序列。在某些实施方案中,核苷酸序列包括与选自表3或表4中所示序列的连续核苷酸序列至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同的连续核苷酸序列。在某些实施方案中,核苷酸序列包括的核苷酸序列具有选自表3或表4中所示序列的核苷酸序列中的至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400或500个(或这些数字内的任何整数)连续核苷酸。

[0630] 本领域的普通技术人员还应理解,适用于本文公开的方法中的抗体可以被改变,以使得它们的序列不同于作为其来源的天然存在的或天然序列,同时保留这些天然序列的期望活性。例如,可以在“非必需”氨基酸残基处进行核苷酸或氨基酸取代,引起保守取代或变化。可通过标准技术,如定点诱变和PCR介导的诱变引入突变。

[0631] 适用于本文公开的方法中的抗体可在一个或多个氨基酸残基处,例如在必需或非必需氨基酸残基处包含保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基置换的氨基酸取代。本领域中已定义具有类似侧链的氨基酸残基的家族,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β分支的侧

链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,结合多肽中的非必需氨基酸残基优选地用来自同一侧链家族的另一个氨基酸残基置换。在某些实施方案中,氨基酸链段可以用结构类似且侧链家族成员的次序和/或组成不同的链段置换。或者,在某些实施方案中,可沿编码序列的全部或一部分随机引入突变,如通过饱和诱变引入,并且由此得到的突变体可掺入本发明的结合多肽中,并针对这些结合多肽结合至所希望的靶的能力进行筛选。

[0632] 如本文所使用,术语抗原"交叉呈递"是指通过APC上的I类和II类MHC分子将外源蛋白质抗原呈递给T细胞。

[0633] 如本文所使用,术语"交叉反应"是指本公开的抗体结合至来自不同物种的CD137的能力。例如,结合人CD137的本公开的抗体也可结合另一物种的CD137。如本文所使用,交叉反应性是通过检测在结合分析(例如SPR、ELISA)中与纯化抗原的特异性反应性,或与生理学上表达CD137的细胞结合或以其它方式功能上相互作用来测量。用于测定交叉反应性的方法包括如本文所述的标准结合分析,例如使用Biacore™ 2000SPR仪器(瑞典乌普萨拉(Uppsala,Sweden)的Biacore AB)进行的Biacore™表面等离子体共振(SPR)分析,或流式细胞技术。

[0634] 如本文所使用,术语"细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答"是指由细胞毒性T细胞诱导的免疫应答。CTL应答主要由$CD8^+$T细胞介导。

[0635] 如本文所使用,术语"二聚化"是指由两个通常非共价结合的大分子,如蛋白质或蛋白质多聚体形成大分子复合物。同二聚化是指当大分子(例如蛋白质)性质相同时的二聚化过程。异二聚化是指当大分子(例如蛋白质)性质不相同时的二聚化过程。用于测定二聚化的方法是本领域技术人员已知的。例如,此类方法包括但不限于酵母双杂交分析、荧光共振能量转移(FRET)、生物发光共振能量转移(BRET)、蛋白质质谱法、倏逝波法、尺寸排阻色谱法、分析型超速离心、散射技术、NMR波谱法、等温滴定量热法、荧光各向异性法、荧光相关光谱法(FCS)、光脱色荧光恢复技术(FRAP)、近距成像(PRIM)以及双分子荧光互补(BiFC)(参见例如Gell D.A.,Grant R.P.,Mackay J.P.(2012)蛋白质低聚化的检测和定量(The Detection and Quantitation of Protein Oligomerization.),Matthews J.M.(编)《生物学中的蛋白质二聚化和低聚化(Protein Dimerization and Oligomerization in Biology.)》,《实验医学与生物学进展(Advances in Experimental Medicine and Biology)》,第747卷,Springer,纽约州纽约(New York,NY);以及Xie,Q.等人《分子生物学方法(Methods Mol Biol)》,2011;680:328)。

[0636] 如本文所使用,术语"CD137的二聚化"是指两个CD137三聚体的二聚化。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强CD137的二聚化。在一些实施方案中,相对于在抗CD137激动剂抗体不存在下二聚化的量,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强CD137的二聚化。在一些实施方案中,相对于在参考抗CD137激动剂抗体存在下二聚化的量,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强CD137的二聚化。在一些实施方案中,二聚化增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0637] 如本文所使用,术语"EC_{50}"是指在体外或体内分析中诱导最大应答的50%,即在最大应答与基线之间的中间的应答的抗体或其抗原结合部分的浓度。

[0638] 如本文所使用,术语“有效剂量(effective dose)”或“有效剂量(effective dosage)”定义为足以实现或至少部分地实现所希望的作用的量。术语“治疗有效剂量”定义为足以治愈或至少部分地停滞患有疾病的患者的疾病及其并发症的量。有效用于这一用途的量将取决于所治疗病症的严重程度和患者自身免疫系统的一般状态。

[0639] 如本文所使用,术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原(例如CD137)上抗原结合蛋白(例如免疫球蛋白、抗体或抗原结合片段)所特异性结合的决定簇或位点。蛋白质抗原的表位可被划分成“线性表位”和“构象表位”。如本文所使用,术语“线性表位”是指由连接的氨基酸的连续线性序列形成的表位。蛋白质抗原的线性表位典型地在暴露于化学变性剂(例如酸、碱、溶剂、交联试剂、离液剂、二硫键还原剂)或物理变性剂(例如热加热、放射性、或机械剪切或应力)后仍保留。在一些实施方案中,表位是非线性的,又称为中断的表位。如本文所使用,术语“构象表位”或“非线性表位”是指由因多肽三级折叠而并置的非连续氨基酸形成的表位。构象表位典型地在用变性剂处理后消失。表位典型地包括呈独特空间构象的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。在一些实施方案中,表位包括呈独特空间构象的少于25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸。一般说来,对特定靶分子具有特异性的抗体或其抗原结合片段将优先识别并结合至蛋白质和/或大分子的复杂混合物内靶分子上的特定表位。在一些实施方案中,表位不包括人CD137胞外域的所有氨基酸。

[0640] 本公开还涵盖结合至CD137上的表位的抗体,所述表位包含本文所述的特定抗体识别的表位的全部或一部分(例如相同或重叠区、或在所述区域之间或跨越所述区域的区域)。

[0641] 如本文所使用,术语“表位定位”是指鉴别靶蛋白质抗原上的抗体或其抗原结合片段的结合位点或表位的过程或方法。本文提供了表位定位方法和技术。

[0642] 如本文所使用,术语“CD137”是指跨膜蛋白质的肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族的特定成员。本领域中CD137的替代性名称和缩写包括“肿瘤坏死因子受体超家族成员9”(TNFRSF9)、4-1BB和“淋巴细胞激活诱导”(ILA)(Alderson等人(1994)《欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol)》24(9):2219-2227;Schwarz等人(1993)《基因(Gene)》134(2):295298)。包括前导序列、跨膜域和细胞质域在内的全长人CD137的示例性氨基酸序列在表4(SEQ ID NO:3)中示出并在此处示出:

[0643] MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSP
CPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHC
LGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNC
SLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQI
ISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
EEDGCSCRFPEEEEGGCEL。

[0644] 如本文所使用,术语“CD137L”或“CD137配体”是指跨膜蛋白质的肿瘤坏死因子(TNF)家族的成员。本领域中CD137L的替代性名称和缩写包括“肿瘤坏死因子超家族成员9”(TNFSF9)和4-1BB配体(4-1BBL)(Alderson等人(1994)《欧洲免疫学杂志》24(9):22192227)。全长CD137L的示例性氨基酸序列在表4(SEQ ID NO:97)中示出。

[0645] 如本文所使用,术语“Fc介导的效应功能”或“Fc效应功能”是指除抗体的主要功能

和目的之外的抗体的生物活性。例如,治疗性激动性抗体的效应功能是除靶蛋白或路径激活之外的生物活性。抗体效应功能的实例包括C1q结合和补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;表达Fc受体的血小板的激活的缺乏;以及B细胞激活。许多效应功能从Fc结合至Fcγ受体开始。

[0646] 如本文所使用,术语"Fc受体"是指在免疫效应细胞的表面上发现的由抗体Fc区所结合的多肽。在一些实施方案中,Fc受体是Fcγ受体。Fcγ受体存在三个子类:FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)和FγcRIII(CD16)。全部四种IgG同型(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)结合并激活Fc受体FcγRI、FcγRIIA和FcγRIIIA。FcγRIIB是一种抑制性受体,并因此,抗体与这一受体结合不激活补体和细胞应答。FcγRI是一种结合至呈单体形式的IgG的高亲和力受体,而FcγRIIA和FcγRIIA是仅结合呈多聚体形式的IgG并具有略微较低的亲和力的低亲和力受体。抗体与Fc受体和/或C1q的结合由Fc区内的特定残基或结构域控制。结合也取决于位于铰链区内和抗体CH2部分内的残基。在一些实施方案中,本文所述的抗体的激动性和/或治疗活性取决于Fc区与Fc受体(例如FcγR)的结合。在一些实施方案中,本文所述的抗体的激动性和/或治疗活性因Fc区与Fc受体(例如FcγR)结合而增强。

[0647] 如本文所使用,术语"糖基化模式"定义为碳水化合物单元共价连接至蛋白质,更确切地说共价连接至免疫球蛋白蛋白质的模式。当本领域的普通技术人员认识到异源抗体的糖基化模式与非人转基因动物物种中的所述糖基化模式的相似性高于作为所述转基因中CH基因来源的物种的糖基化模式时,异源抗体的糖基化模式可表征为基本上类似于非人转基因动物物种所产生的抗体上天然存在的糖基化模式。

[0648] 如本文所使用,术语"血液癌症"包括淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或淋巴系恶性疾病,以及脾和淋巴结的癌症。示例性淋巴瘤包括B细胞淋巴瘤(B细胞血液癌症)和T细胞淋巴瘤。B细胞淋巴瘤包括霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)和大多数的非霍奇金氏淋巴瘤。B细胞淋巴瘤的非限制性实例包括弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴细胞性淋巴瘤(与慢性淋巴细胞性白血病重叠)、套细胞淋巴瘤(MCL)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、纵隔大B细胞淋巴瘤、瓦尔登斯特仑氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿。T细胞淋巴瘤的非限制性实例包括结外T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤和血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤。血液恶性疾病还包括白血病,如但不限于继发性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病和急性淋巴母细胞性白血病。血液恶性疾病还包括骨髓瘤,如但不限于多发性骨髓瘤和冒烟性多发性骨髓瘤。术语血液恶性疾病涵盖其它血液和/或B细胞或T细胞相关癌症。

[0649] 如本文所使用,术语"人抗体"包括具有人生殖系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如果存在的话)的抗体。本公开的人抗体可包括不由人生殖系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如由体外随机诱变或位点特异性诱变或由体细胞突变引入的突变)(参见例如Lonberg等人(1994)《自然(Nature)》368(6474):856-859);Lonberg,(1994)《实验药理学手册(Handbook of Experimental Pharmacology)》113:49101;Lonberg和Huszar,(1995)《国际免疫学评论(Intern.Rev.Immunol.)》13:65-93;以及Harding和Lonberg,(1995)《纽约科

学院年报(Ann.N.Y.Acad.Sci.)》764:536-546)。然而,术语“人抗体”不包括将来源于另一哺乳动物物种如小鼠生殖系的CDR序列移植至人构架序列上的抗体(即,人源化抗体)。

[0650] 如本文所使用,术语“异源抗体”是关于产生这种抗体的转基因非人生物体定义。这一术语是指氨基酸序列或编码核酸序列对应于并非由转基因非人动物组成的生物体中发现的氨基酸序列或编码核酸序列并且一般来自除转基因非人动物之外的物种的抗体。

[0651] 术语“诱导免疫应答”与“增强免疫应答”可互换使用,并且是指刺激针对特定抗原的免疫应答(即,被动或适应性)。如关于诱导CDC或ADCC所使用的术语“诱导”是指对特定直接细胞杀灭机制的刺激。

[0652] 如本文所使用,“需要预防”、“需要治疗”或“有需要”的受试者是指适当的医学从业人员(例如在人类情况下是医生、护士或护理从业人员;在非人哺乳动物的情况下是兽医)判断将合理地受益于给定治疗(如用包含抗CD137抗体的组合物治疗)的受试者。

[0653] 术语“体内”是指在活生物体中发生的过程。

[0654] 如本文所使用,术语“分离的抗体”意图指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如特异性结合至人CD137的分离的抗体基本上不含特异性结合除CD137外的抗原的抗体)。然而,特异性结合至表位的分离的抗体可与来自不同物种的其它CD137蛋白质具有交叉反应性。不过,抗体在如本文所述的特异性结合分析中展示与人CD137的特异性结合。此外,分离的抗体典型地基本上不含其它细胞材料和/或化学物质。在一些实施方案中,具有不同CD137特异性的“分离的”抗体的组合是以明确确定的组成组合。

[0655] 如本文所使用,术语“分离的核酸分子”是指编码结合至CD137的抗体或抗体部分(例如V_H、V_L、CDR3)的核酸,意图指这样一种核酸分子,该核酸分子中编码所述抗体或抗体部分的核苷酸序列不含编码结合除CD137外的抗原的抗体或抗体部分的其它核苷酸序列,所述其它序列可以天然地侧接人基因组DNA中的核酸。例如,选自表3或表4中所示序列的序列对应于构成本文所述抗CD137抗体单克隆抗体的重链(V_H)和轻链(V_L)可变区的核苷酸序列。

[0656] 如本文所使用,“同型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如IgM或IgG1)。在一些实施方案中,本公开的人单克隆抗体属于IgG1同型。在一些实施方案中,本公开的人单克隆抗体属于IgG1同型并且包含突变。在一些实施方案中,本公开的人单克隆抗体属于IgG2同型。在一些实施方案中,本公开的人单克隆抗体属于IgG3同型。在一些实施方案中,本公开的人单克隆抗体属于IgG4同种型。在一些实施方案中,本公开的人单克隆抗体属于IgG4同型并且包含突变。在一些实施方案中,突变是在Ser228处的取代。在一些实施方案中,在Ser228处的取代是S228P。

[0657] 如本文所使用,术语“同型转换”是指抗体的类别或同型从一种Ig类别变为其它Ig类别之一的现象。

[0658] 如本文所使用,术语“KD”或“K_D”是指抗体与抗原之间的结合反应的平衡解离常数。K_D值是抗体解离速率常数(kd)与抗体缔合速率常数(ka)的比率的数字表示。K_D值与抗体对抗原的结合亲和力成反比。K_D值越小,则抗体对其抗原的亲和力越高。亲和力是单个分子与其配体结合的强度,并且典型地通过平衡解离常数(K_D)测量和报导,平衡解离常数用于评价双分子相互作用的强度并对其排序。

[0659] 如本文所使用,术语“kd”或“k_d”(或者“koff”或“k_{off}”)意图指抗体自抗体/抗原复合物解离的解离速率常数。kd值是每秒衰减或解离的复合物的分数的数字表示,并以单位

sec^{1}表示。

[0660] 如本文所使用,术语“ka”或“k_a”(或者“kon”或“k_{on}”)意图指抗体与抗原缔合的缔合速率常数。ka值是在1摩尔浓度(1M)的抗体和抗原溶液中每秒形成的抗体/抗原复合物的数字表示,并以单位$M^{1}sec^{1}$表示。

[0661] 如本文所使用,术语“连接”、“融合”或“融合物”可互换使用。这些术语是指通过包括化学缀合或重组手段在内的任何方式将两个更多个元件或组分或结构域接合在一起。化学缀合(例如使用异双官能交联剂)的方法是本领域已知的。

[0662] 如本文所使用,“局部施用”或“局部递送”是指不依赖于通过血管系统将所述组合物或试剂输送至其预定靶组织或部位的递送。例如,所述组合物可以通过注射或植入所述组合物或试剂或通过注射或植入含有所述组合物或试剂的装置来递送。在靶组织或部位附近局部施用之后,所述组合物或试剂、或其一种或多种组分可扩散至预定靶组织或部位。

[0663] 如本文所使用,“MHC分子”是指两种类型的分子,即I类MHC和II类MHC。I类MHC分子将抗原呈递至特定CD8+T细胞并且II类MHC分子将抗原呈递至特定CD4+T细胞。以外源方式递送至APC的抗原主要被处理用于与II类MHC缔合。相比之下,以内源方式递送至APC的抗原主要被处理用于与I类MHC缔合。

[0664] 如本文所使用,术语“单克隆抗体”是指对特定表位展示单一结合特异性和亲和力的抗体。因此,术语“人单克隆抗体”是指展示单一结合特异性并具有来源于人生殖系免疫球蛋白序列的可变区和任选的恒定区的抗体。在一些实施方案中,人单克隆抗体是由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括从转基因非人动物,例如转基因小鼠获得的B细胞,所述B细胞具有与永生化细胞融合的包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0665] 如本文所使用,术语“多聚化”是指典型地通过非共价相互作用结合形成包含超过两个大分子如蛋白质的大分子复合物。用于测定多聚化的方法是本领域技术人员已知的,并且如以上关于二聚化所描述。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强CD137的多聚化。在一些实施方案中,相对于在抗CD137激动剂抗体不存在下多聚化的量,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强CD137的多聚化。在一些实施方案中,相对于在参考抗CD137激动剂抗体存在下多聚化的量,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强CD137的多聚化。在一些实施方案中,多聚化增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0666] 如本文所使用,应用于对象的术语“天然存在”是指对象可在自然界中发现的事实。例如,可以从自然界中的来源分离并且未在实验室中人工有意修饰的存在于生物体(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0667] 如本文所使用,术语“未转换的同型”是指当未发生同型转换时产生的重链的同型类别;编码未转换的同型的CH基因典型地是直接在功能重排的VDJ基因的下游的第一个CH基因。同型转换已被分类为经典或非经典同型转换。经典同型转换是通过重组事件发生,所述重组事件涉及转基因中的至少一个转换序列区。非经典同型转换可通过例如人σ_{μ}与人$_{\mu}$(δ相关缺失)之间的同源重组发生。替代性非经典转换机制,如转基因间和/或染色体间重组等,可能发生并实现同型转换。

[0668] 如本文所使用,术语“核酸”是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。除非特别限制,否则所述术语涵盖含有已知的天然核苷酸类似物的核酸,所

述核酸具有与参考核酸类似的结合特性并且以类似于天然存在的核苷酸的方式代谢。除非另外指示,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守性修饰的变体(例如简并密码子取代)和互补序列,以及明确指示的序列。确切地说,简并密码子取代可通过产生一个或多个选定(或全部)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人,《核酸研究(Nucleic Acid Res.)》19:5081,1991;Ohtsuka等人,《生物化学(Biol.Chem.)》260:26052608,1985;以及Cassol等人,1992;Rossolini等人,《分子与细胞探针(Mol.Cell.Probes)》8:9198,1994)。对于精氨酸和亮氨酸,第二个碱基处的修饰也可以是保守性的。术语核酸可与由基因、cDNA和基因编码mRNA互换使用。

[0669] 本文所使用的多核苷酸可由任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸组成,所述多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸可以是未修饰的RNA或DNA、或修饰的RNA或DNA。例如,多核苷酸可由单链和双链DNA、呈单链和双链区的混合物的DNA、单链和双链RNA、以及呈单链和双链区的混合物的RNA、包含呈单链区、或更典型地呈双链区或呈单链区与双链区的混合物的DNA和RNA的混合分子构成。此外,多核苷酸可由包含RNA或DNA或RNA和DNA的三链区构成。多核苷酸还可以含有一个或多个出于稳定性或出于其它原因修饰的修饰过的碱基或DNA或RNA主链。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化碱基和不常见碱基如肌苷。可对DNA和RNA进行多种修饰;因此,“多核苷酸”涵盖以化学方式、酶方式或代谢方式修饰的形式。

[0670] 当一个核酸与另一个核酸序列呈功能性关系时,该核酸是“可操作地连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则该启动子或增强子可操作地连接至该序列。对于转录调控序列,可操作地连接意味着,连接的DNA序列是连续的,并且在必要时,接合连续并在阅读框中的两个蛋白质编码区。对于转换序列,可操作地连接指示所述序列能够实现转换重组。

[0671] 如本文所使用,术语“互补位”,又称为“抗原结合位点”是指识别并结合至抗原上的表位的抗体的一部分或其抗原结合片段,其包含位于可变重链和轻链内的一组互补决定区(CDR)。

[0672] 如本文所使用,“肠胃外施用(parenteral administration)”、“经肠胃外施用(administered parenterally)”和其它语法等效短语是指除肠和表面施用外的通常通过注射进行的施用模式,并且包括但不限于静脉内、鼻内、眼内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、椎管内、硬膜外、脑内、颅内、颈动脉内以及胸骨内注射和输注。

[0673] 如本文所使用,术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人和其它哺乳动物受试者。

[0674] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情况下,术语“同一性百分比”是指当比较并对准达到最大对应性时,如使用下文描述的序列比较算法之一(例如BLASTP和BLASTN或技术人员可用的其它算法)或通过目视检查所测量的具有指定百分比的核苷酸或氨基酸残基相同的两个或更多个序列或子序列。取决于应用,“同一性百分比”可存在于该序列供比较的区域内,例如功能域内,或替代地,存在于待比较的两个序列的全长内。对于序列比较,典型地一个序列充当参考序列以与测试序列相比较。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入到计算机中,必要时,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。接着,序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0675] 供比较序列的最佳比对可例如通过Smith和Waterman,《应用数学进展(Adv.Appl.Math.)》2:482(1981)的局部同源性算法;Needleman和Wunsch,《生物化学杂志(J.Mol.Biol.)》48:443(1970)的同源性比对算法;Pearson和Lipman,《美国国家科学院院刊》85:2444(1988)的相似性搜索方法;这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA;威斯康星州麦迪逊(Madison,Wis.)的575Science Dr.,),或通过目测检查(一般参见Ausubel等人,下文)进行。

[0676] 适于测定序列同一性百分比和序列相似性百分比的算法的一个实例是BLAST算法,该算法在Altschul等人,《分子生物学杂志》215:403-410(1990)中有描述。用于执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)网站公开获得。

[0677] 如本文一般所使用,“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适合与人类和动物的组织、器官和/或体液接触使用而不具有过度毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症,并与合理的效益/风险比相称的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0678] 如本文所使用,“药学上可接受的载体”是指并且包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。组合物可包括药学上可接受的盐,例如酸加成盐或碱加成盐(参见例如Berge等人(1977)《制药科学杂志(J Pharm Sci)》66:1-19)。

[0679] 如本文所使用,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用以指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0680] 如本文所使用,术语“预防”当关于病症使用时,是指相对于不接受组合物的受试者,施用组合物使受试者的医学病症的症状的频率降低,或延迟症状的发作。

[0681] 如本文所使用,术语“纯化的”或“分离的”当用于本文所述的任何蛋白质(抗体或片段)时是指多肽已经从天然伴随该多肽存在的组分(例如蛋白质或其它天然存在的生物或有机分子),例如其它蛋白质、脂质以及原核生物中表达蛋白质的核酸分离或纯化。典型地,当多肽以重量计构成样品中总蛋白质的至少60%(例如至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%或99%)时,该多肽是纯化的。

[0682] 如本文所使用,术语“重排”是指重链或轻链免疫球蛋白基因座的一种构型,其中V区段被定位成在编码基本上完整的V_H或V_L域的构象中分别紧邻DJ或J区段。重排的免疫球蛋白基因座可以通过与生殖系DNA比较来鉴别;重排的基因座将具有至少一个重组的七聚体/九聚体同源性元件。

[0683] 如本文所使用,术语“受体聚簇”是指使一组受体在特定细胞位置处聚组或局部积累,通常诱导或扩大信号传导应答的细胞过程。许多蛋白质受体结合同源配体和簇,即,在结合其同源配体后形成二聚体、三聚体、低聚物或多聚体。例如,PDGF受体和TNF受体超家族成员分别在配体结合后形成二聚体和三聚体。同源配体诱导的聚簇(例如二聚化、多聚化)诱导通过受体的信号转导。因此,本公开的抗体或其抗原结合片段可通过结合至多于一个受体使受体激活并在存在或不存在同源配体结合下,诱导或稳定二聚化、三聚化和/或多聚化。

[0684] TNFR信号传导(Wajant(2015)《细胞死亡与分化(Cell Death Differ)》22(11):

17271741),特别是TNFRSF激活需要受体聚簇和多聚化。4-1BB(CD137)、CD40、GITR、CD27、DR3、DR5以及Fas是已知需要聚簇以触发下游信号传导的一些TNFSF受体。4-1BB受体必须交联才能进行信号传导的实验证据来自Rabu等人。据这些作者报导,人41BBL的1三聚体形式对人T细胞没有激活作用,而该蛋白质交联形成2个或更多个三聚体将产生较强激活的蛋白质(Rabu等人(2005)《生物化学杂志》280:41472-41481)。因此,在一些实施方案中,抗CD137激动剂抗体诱导CD137的2个或更多个三聚体的多聚化。

[0685] 如本文所使用,术语"重组宿主细胞"(或简称为"宿主细胞")意图指引入了重组表达载体的细胞。应理解,此类术语不仅意图指特定的主题细胞,而且还指这种细胞的后代。因为某些修饰可能由于突变或环境影响而出现在后续数代中,所以此类子代实际上可能与亲本细胞不相同,但仍包括在如本文所使用的术语"宿主细胞"的范围内。

[0686] 如本文所使用,术语"重组人抗体"包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如(a)从关于人免疫球蛋白基因转基因或转染色体的动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤分离的抗体;(b)从被转化用于表达抗体的宿主细胞分离,例如从转染瘤分离的抗体;(c)从重组、组合人抗体文库分离的抗体;以及(d)通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其它DNA序列的任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体包含利用特定人生殖系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区,所述人生殖系免疫球蛋白序列是由生殖系基因编码,但包括例如在抗体成熟期间发生的后续重排和突变。如本领域所知的(参见例如,Lonberg(2005)《自然生物技术(Nature Biotech.)》23(9):11171125),可变区含有抗原结合域,所述抗原结合域是由重排形成对外来抗原具有特异性的抗体的各种基因编码。除重排之外,可变区还可通过多个单氨基酸变化(称为体细胞突变或高频突变)进一步修饰,以增加抗体对外来抗原的亲和力。恒定区将进一步响应于抗原而变化(即,同型转换)。因此,响应于抗原而编码轻链和重链免疫球蛋白多肽的重排且体细胞突变的核酸分子可能与原始核酸分子不具有序列同一性,而是会基本上相同或相似(即具有至少80%同一性)。

[0687] 如本文所使用,术语"参考抗体"(与"参考mAb"可互换使用)或"参考抗原结合蛋白"是指结合至人CD137上的特定表位并用于确定本身与一种或多种不同抗体之间的关系的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该关系是参考抗体和一种或多种不同抗体与CD137上同一表位的结合。如本文所使用,所述术语暗示可用于测试或分析中,如本文所述的测试或分析(例如竞争结合分析)中,作为竞争物的抗CD137抗体,其中所述分析可用于发现、鉴别或开发结合至同一表位的一种或多种不同抗体。示例性参考抗体(mAb1)的可变重链(V_H)和轻链(V_L)氨基酸序列提供于表4中(V_H1,SEQ ID NO.4;V_H2,SEQ ID NO.6)。在一些实施方案中,该术语暗示可用于测试或分析中,作为比较物的抗CD137抗体,其中所述分析可用于辨别抗体的特征(例如肝毒性、抗肿瘤功效)。在一些实施方案中,参考抗体是乌瑞鲁单抗。在一些实施方案中,参考抗体为乌托米单抗。

[0688] 如本文所使用,术语"特异性结合"、"选择性结合"、"选择性地结合"和"特异性地结合"是指抗体结合至预定抗原上的表位。典型地,当通过表面等离子体共振(SPR)技术,在BIACORE 2000仪器中使用重组人CD137作为分析物且抗体作为配体测定时,该抗体以大约小于10^6M,如大约小于10^7M、10^8M、10^9M或10^{10}M甚至更低的平衡解离常数(K_D)结合,并且结合至预定抗原的亲和力是结合至除该预定抗原或密切相关的抗原外的非特异性抗原(例如

BSA、酪蛋白)的亲和力的至少两倍。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原具有特异性的抗体”在本文中与术语“特异性结合至抗原的抗体”可互换使用。

[0689] 如本文所使用,术语“转换序列”是指负责转换重组的DNA序列。“转换供体”序列,典型地是μ转换区,将在转换重组期间待缺失的构建体区的5’端(即,上游)。“转换受体”区将在待缺失的构建区与置换恒定区之间(例如γ、ε等)。由于不存在总是发生重组的特定位点,故最终基因序列典型地无法由构建体预测。

[0690] 如本文所使用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。例如,本发明的方法和组合物可用于治疗患有免疫病症的受试者。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0691] 对于核酸,术语“基本上同源”指示,当在适当核苷酸插入或缺失存在下最佳地对准并比较时,两个核酸或其指定序列中至少约80%的核苷酸,通常至少约90%至95%的核苷酸,并且更优选地至少约98%至99.5%的核苷酸相同。或者,当这些区段在选择性杂交条件下与所述链的补体杂交时,存在相当大的同源性。

[0692] 两个序列之间的同一性百分比随这些序列共有的相同位置的数量而变(即,同源性%=相同位置的数量/位置总数×100),其中要考虑为最佳地对准这两个序列而需要引入的空位的数量和每个空位的长度。序列的比较和两个序列之间同一性百分比的测定都可以使用数学算法实现,如以下非限制性实施例中所述。

[0693] 两个核苷酸序列之间的同一性百分比可使用GCG软件包(可得自http://www.gcg.com)中的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵以及空位权重40、50、60、70或80和长度权重1、2、3、4、5或6测定。两个核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比也可使用E.Meyers和W.Miller(CABIOS,4:11-17(1989))的算法,使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4测定,该算法已被并入到ALIGN程序(2.0版)中。另外,两个氨基酸序列之间的同一性百分比可使用Needleman和Wunsch(《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》(48):444453(1970))算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,以及空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6测定,该算法已被并入到GCG软件包(可得自http://www.gcg.com)中的GAP程序。

[0694] 本公开的核酸和蛋白质序列还可以用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索,由此例如鉴别相关序列。此类搜索可使用Altschul等人((1990)《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》215:40310中的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)执行。BLAST核苷酸搜索可用NBLAST程序,分数=100,字长=12执行,以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可用XBLAST程序,分数=50,字长=3执行,以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得带空位的对准以达到比较目的,可利用如Altschul等人,(1997)《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》25(17):33893402中所述的Gapped BLAST。当利用BLAST和Gapped BLAST程序时,可使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见http://www.ncbi.nlm.nih.gov。

[0695] 核酸可以存在于整个细胞中、细胞溶解产物中或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过标准技术,包括碱/SDS处理、CsCl分层(CsCl banding)、柱色谱法、琼脂糖凝胶电泳以及本领域众所周知的其它技术从其它细胞组分或其它污染物,例如其它细胞核酸或蛋白质纯化出核酸时,所述核酸是“分离的”或“基本上纯的”。参见F.Ausubel等人,《当代分子

生物学实验室指南(Current Protocols in Molecular Biology)》,Greene Publishing and Wiley Interscience,纽约(1987)。

[0696] 本公开的核酸组合物尽管通常呈天然序列(修饰的限制性位点等除外),但也可根据标准技术,由cDNA、其基因组或混合物突变以提供基因序列。对于编码序列,这些突变可根据需要而影响氨基酸序列。具体来说,涵盖与本文所述的天然V、D、J、恒定序列、转换序列以及其它此类序列基本上同源或来源于这些序列的DNA序列(其中"来源于"指示一个序列与另一个序列相同或由另一个序列修饰得到)。

[0697] 如本文所使用,术语"肿瘤微环境"(或者"癌症微环境";缩写为TME)是指肿瘤或赘瘤所处的细胞环境或微环境,包括周围血管以及非癌性细胞,包括但不限于免疫细胞、成纤维细胞、骨髓源性炎性细胞和淋巴细胞。信号传导分子和胞外基质也包含TME。肿瘤和周围的微环境紧密相关并且不断地相互作用。肿瘤可通过释放胞外信号、促进肿瘤血管生成和诱导外周免疫耐受性来影响微环境,而微环境中的免疫细胞可影响肿瘤细胞的生长和进化。

[0698] 术语"T细胞"是指可通过细胞表面上T细胞受体的存在而区别于其它白细胞的一类白细胞。T细胞存在若干子集,包括但不限于T辅助细胞(又名T_H细胞或$CD4^+$T细胞)和亚型,包括T_H1、T_H2、T_H3、T_H17、T_H9和T_{FH}细胞;细胞毒性T细胞(即,T_C细胞、$CD8^+$T细胞、细胞毒性T淋巴细胞、T杀伤细胞、杀伤T细胞);记忆性T细胞和亚型,包括中枢记忆性T细胞(T_{CM}细胞)、效应记忆性T细胞(T_{EM}和T_{EMRA}细胞);以及驻留记忆性T细胞(T_{RM}细胞);调节性T细胞(又名T_{reg}细胞或抑制性T细胞)和亚型,包括$CD4^+FOXP3^+T_{reg}$细胞、$CD4^+FOXP3T_{reg}$细胞、Tr1细胞、Th3细胞和$T_{reg}17$细胞;自然杀伤T细胞(又名NKT细胞);黏膜相关恒定T细胞(MAIT);和γdelta T细胞(γδT细胞),包括Vγ9/Vδ2T细胞。以上提到或未提到的T细胞中的任一种或多种都可以作为本发明的使用方法的靶细胞类型。

[0699] 如本文所使用,术语"T细胞激活"或"T细胞的激活"是指这样一种细胞过程,在该细胞过程中,在表面上表达抗原特异性T细胞受体的成熟T细胞识别其同源抗原并通过进入细胞周期,分泌细胞因子或溶解酶,并起始执行或变得能够执行基于细胞的效应功能来作出响应。T细胞激活需要至少两个信号变得完全激活。第一个是在抗原-主要组织相容性复合物(MHC)接合T细胞抗原特异性受体(TCR)后发生,并且第二个是通过随后接合共刺激分子(例如CD28)发生。这些信号被传输至细胞核,并引起T细胞的克隆扩增、细胞表面上激活标记物的上调、分化成效应细胞、细胞毒性或细胞因子分泌的诱导、细胞凋亡的诱导或其组合。

[0700] 如本文所使用,术语"T细胞介导的应答"是指T细胞介导的任何应答,所述T细胞包括但不限于效应T细胞(例如$CD8^+$细胞)和辅助T细胞(例如$CD4^+$细胞)。T细胞介导的应答包括例如T细胞的细胞毒性和增殖。

[0701] 如本文所使用,术语"治疗有效量"或"治疗有效剂量"或本文所用的类似术语意图指将引起所希望的生物或医学反应(例如癌症的一种或多种症状的改善)的试剂(例如抗CD137抗体或其抗原结合片段)的量。

[0702] 如本文所使用,术语"治疗(treating/treating/treatment)"是指本文所述的治疗性或预防性措施。"治疗"的方法采用对需要此类治疗的受试者,例如需要增强针对特定抗原的免疫应答的受试者或最终可能患上此类病症的受试者施用本公开的人抗体,以便预

防、治愈、延迟所述病症或复发病症、降低其严重程度或改善其一种或多种症状,或者使受试者的存活期延长超过在无此类治疗存在下所预期的存活期。

[0703] 如本文所使用,术语“未重排的”或“生殖系构型”是指V区段未被重组以便紧邻D或J区段的构型。

[0704] 如本文所使用,术语“载体”意图指这样一种核酸分子,该核酸分子能够转运其所连接的另一个核酸。一种类型的载体是“质粒”,质粒是指可在其中连接额外DNA区段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外DNA区段可连接至病毒基因组中。某些载体能够在引入了这些载体的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其它载体(例如非游离型哺乳动物载体)可在引入宿主细胞中后整合至宿主细胞的基因组中,并由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导其可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般来说,重组DNA技术中利用的表达载体通常呈质粒形式。在本说明书中,“质粒”与“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明意图包括此类其它形式的表达载体,如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),这些载体起到等效的功能。

[0705] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。下文描述了优选的方法和材料,不过,与本文所述的方法和材料类似或等效的方法和材料也可用于实践或测试本发明所公开的方法和组合物。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都以全文引用的方式并入本文中。

[0706] 抗CD137抗体及其抗原结合片段

[0707] 本公开提供了特异性结合至CD137并使其激动的抗体。在一些方面,本公开提供了可用于治疗癌症的抗CD137激动剂抗体。在一些实施方案中,抗CD137激动剂抗体诱导细胞因子产生。在一些实施方案中,抗CD137激动剂抗体增加肿瘤微环境中CD8+T细胞的数量。在一些实施方案中,抗CD137激动剂抗体诱导保护性抗肿瘤免疫。本公开还提供了在体内施用后,基本上不增加脾内或肝内CD4+和/或CD8+T细胞群的抗CD137激动剂抗体。

[0708] 人CD137是有255个氨基酸的跨膜多肽(SEQ ID NO:3;登录号NM_001561;NP_001552)并且是在系统发育上保守的肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的成员。CD137(或者4-1BB、TNFR超家族9)及其配体(CD137L)参与众多免疫活动的调控。CD137配体与其在激活T细胞上表达的受体CD137交联,并共刺激T细胞活性。CD137是激活诱导的共刺激分子。近期的研究披露,CD137介导的抗癌作用主要是基于其激活T细胞的能力,特别是诱导细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答,并诱导细胞因子产生,特别是诱导产生大量的IFNγ的能力(Ye等人(2014)《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》20(1):44-55)CD137配体是细胞表面上的一种跨膜蛋白,并将信号传输至表达其的细胞中,这一现象称为“逆向信号传导”或“反向信号传导”)。在大多数类型的白细胞和一些非免疫细胞上发现CD137配体的表达。在单核细胞(单核细胞、巨噬细胞和DC)中,CD137配体信号传导诱导激活、迁移、存活和分化。

[0709] 因此,在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至CD137并使其激动,并且允许或促进CD137L结合。在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至CD137并使其激动。在一些实施方案中,本公开所提供的抗CD137抗体结合至CD137并使其激动,并且共刺激T细胞的激活。

[0710] 在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段具有以下特性或特征中的一种或多种:

[0711] a)特异性结合至人CD137;

[0712] b)结合至人和食蟹猕猴CD137;以及

[0713] c)结合至人和小鼠CD137。

[0714] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至CD137并共刺激T细胞活性。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至CD137并诱导或增强T细胞激活、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答、T细胞增殖、细胞因子产生或其组合。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段在肿瘤微环境中结合至CD137并诱导或增强T细胞激活、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答、T细胞增殖、细胞因子产生或其组合。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体或其抗原结合片段不显著诱导或增强肝内和/或脾内T细胞激活和/或T细胞增殖。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合至CD137并诱导IFNγ的产生。在一些实施方案中,本公开所提供的抗体结合至CD137并诱导IL-2、TNF-α、IL-13或其组合的产生。

[0715] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体特异性结合至CD137并使其激动。在一些实施方案中,CD137的激动作用是通过测定由免疫细胞产生的细胞因子的浓度来测量。用于分析细胞因子产生的方法是本领域已知的并且被用于实施例中。在一些实施方案中,免疫细胞产生的细胞因子增加指示CD137激动作用。在一些实施方案中,CD137的激动作用是通过分析T细胞增殖来测量。在一些实施方案中,T细胞增殖增加指示CD137激动作用。在一些实施方案中,CD137的激动作用是通过定量相关分子的磷酸化或在相关启动子之后的基因报告子的表达测量细胞信号传导的水平来测量。在一些实施方案中,细胞信号传导增加指示CD137激动作用。在一些实施方案中,CD137的激动作用是通过测量肿瘤体积来测量。在一些实施方案中,肿瘤体积减小指示CD137激动作用。

[0716] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体诱导、增加或稳定CD137的低聚化、多聚化或其它更高级的聚簇。在一些实施方案中,通过荧光显微镜检查来观察CD137在细胞表面上的聚簇。

[0717] 本文提供了结合至CD137并使其激动的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段(i)以约30100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;(ii)结合本文所述的人CD137上的表位;和/或(iii)包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3。

[0718] CD137的亲和力

[0719] 在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间或介于约40nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137。在一些实施方案中,抗CD137抗体对人CD137的亲和力是mAb10对小鼠CD137的亲和力的至少两倍(例如至少三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍或10倍)。在一些实施方案中,抗CD137抗体的亲和力不超过500、450、400、350、300、250、200、250、200、175、150、125、110或100nM。在一些实施方案中,抗CD137抗体对人CD137的亲和力是mAb10对小鼠CD137的亲和力的至少两倍(例如至少三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍或10倍),但不超过500、450、400、350、300、250、200、250、200、175、150、125、110或100nM。抗体的亲和力

是与单个CD137多肽结合的强度。在一些实施方案中,亲和力由平衡解离常数(K_D)指示。K_D值与抗体对抗原的结合亲和力成反比。因此,K_D值越小,则抗体对其抗原的亲和力越大。

[0720] 用于测定抗体对其抗原的亲和力的方法是本领域中已知的。用于测定结合亲和力的示例性方法采用了表面等离子体共振。表面等离子体共振是一种光学现象,它允许通过例如使用BIAcore系统(瑞典乌普萨拉和新泽西州皮斯卡特维(Piscataway,N.J.)的Pharmacia Biosensor AB)检测生物传感器基质内蛋白质浓度的改变来分析实时生物特异性相互作用。更多描述,参见Jonsson,U.等人(1993)《临床生物学年鉴(Ann.Biol.Clin.)》51:1926;Jonsson,U.,i(1991)《生物技术(Biotechniques)》11:620627;Johnsson,B.等人(1995)《分子识别杂志(J.Mol.Recognit.)》8:125131;以及Johnsson,B.等人(1991)《分析生物化学(Anal.Biochem.)》198:268-277。

[0721] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以约40-100nM的亲和力(K_D)结合人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约3040nM、4050nM、5060nM、6070nM、7080nM、8090nM、90100nM、4555nM、5565nM、7585nM、8595nM、4595nM、5090nM、5585nM、6080nM、6575nM、55-75nM、40-70nM、50-80nM或60-90nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约6080nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约60-75nM。

[0722] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约60-90nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约5080nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约40-70nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约55-75nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约6575nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约6080nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约55-85nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约50-90nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约4595nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约85-95nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约75-85nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约7585nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约55-65nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约45-55nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约8090nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约7080nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约60-70nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约5060nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约40-50nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约30-40nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是约30nM、约31nM、约32nM、约33nM、约34nM、约35nM、约36nM、约37nM、约38nM、约39nM、约40nM、约

41nM、约42nM、约43nM、约44nM、约45nM、约46nM、约47nM、约48nM、约49nM、约50nM、约51nM、约52nM、约53nM、约54nM、约55nM、约56nM、约57nM、约58nM、约59nM、约60nM、约61nM、约62nM、约63nM、约64nM、约65nM、约66nM、约67nM、约68nM、约69nM、约70nM、约71nM、约72nM、约73nM、约74nM、约75nM、约76nM、约77nM、约78nM、约79nM、约80nM、约81nM、约82nM、约83nM、约84nM、约85nM、约86nM、约87nM、约88nM、约89nM、约90nM、约91nM、约92nM、约93nM、约94nM、约95nM、约96nM、约97nM、约98nM、约99nM、约100nM、约101nM、约102nM、约103nM、约104nM、约105nM、约106nM、约107nM、约108nM、约109nM或约110nM。

[0723] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是至少30nM但小于约110nM、至少31nM但小于约109nM、至少32nM但小于约108nM、至少33nM但小于约107nM、至少34nM但小于约106nM、至少35nM但小于约105nM、至少36nM但小于约104nM、至少37nM但小于约103nM、至少38nM但小于约102nM、至少39nM但小于约101nM、至少40nM但小于约100nM、至少41nM但小于约99nM、至少42nM但小于约98nM、至少43nM但小于约97nM、至少44nM但小于约96nM、至少45nM但小于约95nM、至少46nM但小于约94nM、至少47nM但小于约93nM、至少48nM但小于约92nM、至少49nM但小于约91nM、至少50nM但小于约90nM、至少51nM但小于约89nM、至少52nM但小于约88nM、至少53nM但小于约87nM、至少54nM但小于约86nM、至少55nM但小于约85nM、至少56nM但小于约84nM、至少57nM但小于约83nM、至少58nM但小于约82nM、至少59nM但小于约81nM、至少60nM但小于约80nM、至少61nM但小于约79nM、至少62nM但小于约78nM、至少63nM但小于约77nM、至少64nM但小于约76nM,或至少65nM但小于约75nM。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的亲和力(K_D)是至少40nM但小于约100nM。

[0724] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体与来自多于一个物种的CD137多肽交叉反应。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合食蟹猕猴CD137和人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合小鼠CD137和人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137、小鼠CD137和食蟹猕猴CD137。

[0725] CD137表位结合

[0726] 在一些实施方案中,特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中氨基酸111-132中的一个或多个(例如一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或全部25个)的表位。在一些实施方案中,特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分结合至SEQ ID NO:3中氨基酸111-132内的表位。在一些方面,本公开提供了一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分结合至SEQ ID NO:3中氨基酸111132的全部或一部分。在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至人CD137的包含SEQ ID NO:3中的残基K114的表位。在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至人CD137的包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113和K114的表位。在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至人CD137的包含SEQ ID NO:3中的残基E111、T113、K114、N126以及I132的表位。在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至人CD137的包含SEQ ID NO:3中的E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位。在一些实施方

案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至人CD137的包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位。

[0727] 在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至人CD137的表位,该表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置100至135、101至135、102至135、103至135、104至135、105至135、106至135、107至135、108至135、109至135、110至135、或111至135的一个或多个氨基酸残基的序列。在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至人CD137的表位,该表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列。在一些实施方案中,表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸残基。

[0728] 在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至在SEQ ID NO:3中氨基酸位置100至135、101至135、102至135、103至135、104至135、105至135、106至135、107至135、108至135、109至135、110至135或111至135内的人CD137的表位。在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至在SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135内的人CD137的表位。在一些实施方案中,表位包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸残基。

[0729] 在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至人CD137的包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111-114)的表位。在一些实施方案中,氨基酸残基L112可以是另一个氨基酸残基。

[0730] 在一些实施方案中,表位是非线性表位。在一些实施方案中,氨基酸残基K114突变使得本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段与人CD137的结合消除。

[0731] 在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至人CD137的包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列的表位,其中该表位至少包含氨基酸K114,并且其中所述抗体或其抗原结合部分结合小鼠CD137,而不结合大鼠CD137。在一些实施方案中,表位是非线性表位。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分结合小鼠CD137和食蟹猕猴CD137,而不结合大鼠CD137。在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段与人、小鼠、大鼠和食蟹猕猴CD137的结合是通过表面等离子体共振(SPR)测定。

[0732] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分结合至小鼠、食蟹猕猴或人CD137的亲和力是该抗体对大鼠CD137的亲和力的至少10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、500倍或1000倍。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分结合至小鼠、食蟹猕猴或人CD137的亲和力是该抗体对相对于人CD137在SEQ ID NO:3中114位不包含赖氨酸的CD137多肽的亲和力的至少10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、500倍或1000倍。

[0733] 在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至人CD137的表位并与mAb1竞争结合至人CD137的表位。在一些实施方案中,本文所述的分离的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段结合至CD137并使其激动。在一些实施方案中,本公开所提供的抗CD137抗体结合至CD137并使其激动,并且共刺激T细胞的激活。

[0734] 本公开提供了竞争结合至CD137上的表位的抗体(例如mAb1),所述表位包含由本

文所述的一种或多种特定参考抗体识别的表位的全部或一部分。在一些实施方案中,抗CD137抗体结合至人CD137的表位并且与参考抗体(例如mAb1)竞争结合至人CD137的表位,并且其中所述抗体或其抗原结合片段以1×10^{6}或更低的平衡解离常数K_D结合人CD137。在一些实施方案中,抗CD137抗体结合至CD137上的表位,其中所述表位的一个或多个突变将抑制、减少或阻断与所述抗体和参考抗体(例如mAb1)两者的结合。在一些实施方案中,参考抗体是本文所述的mAb1抗体。在一些实施方案中,参考抗体是表3或表4中提供的任何一种抗体。

[0735] 因此,可通过对包含结合至CD137的抗体或其片段或部分的晶体结构进行x射线结晶分析来评估本公开所提供的抗CD137抗体。在一些方面,本公开提供的抗体所结合的表位是通过测定人CD137抗原上驻留或位于抗体互补位残基的4埃(Å)内的残基来鉴别,例如mAb1。

[0736] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少3个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少4个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少5个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少6个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少7个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少8个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少9个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少10个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少12个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少3个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少13个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少14个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位是至少15个氨基酸残基。

[0737] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于25个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于24个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于23个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于22个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于21个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于20个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于19个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于18个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于17个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于16个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于15个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于14个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于13个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于12个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于11个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于10个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137

抗体所结合的表位少于9个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于8个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于7个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于6个氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体所结合的表位少于5个氨基酸残基。

[0738] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合至含少于25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸的表位,并且包含SEQ ID NO:3中的氨基酸残基K114。

[0739] 可变区

[0740] 在一些实施方案中,本文提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含如表3和4中所示的重链和轻链可变序列。

[0741] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含选自由以下组成的组的重链和轻链CDR:

[0742] (a)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0743] (b)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:70、79和90中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0744] (c)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:71、80和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0745] (d)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:72、81和92中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0746] (e)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:73、82和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0747] (f)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:74、83和93中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0748] (g)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:75、84和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0749] (h)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:74、85和94中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0750] (i)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:76、86和95中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0751] (j)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:77、87和93中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0752] (k)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、88和90中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0753] (l)分别如SEQ ID NO:49、57和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0754] (m)分别如SEQ ID NO:49、58和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0755] (n)分别如SEQ ID NO:49、59和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别

如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0756] (o)分别如SEQ ID NO:49、60和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0757] (p)分别如SEQ ID NO:50、61和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0758] (q)分别如SEQ ID NO:50、58和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0759] (r)分别如SEQ ID NO:51、62和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0760] (s)分别如SEQ ID NO:52、63和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0761] (t)分别如SEQ ID NO:50、64和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0762] (u)分别如SEQ ID NO:50、65和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0763] (v)分别如SEQ ID NO:51、108和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0764] (w)分别如SEQ ID NO:107、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;以及

[0765] (x)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:109、110和92中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0766] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、101和103;并且其中所述轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46和105。

[0767] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

[0768] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0769] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;

[0770] (b)分别地SEQ ID NO:4和28;

[0771] (c)分别地SEQ ID NO:4和30;

[0772] (d)分别地SEQ ID NO:4和32;

[0773] (e)分别地SEQ ID NO:4和34;

[0774] (f)分别地SEQ ID NO:4和36;

[0775] (g)分别地SEQ ID NO:4和38;

[0776] (h)分别地SEQ ID NO:4和40;

[0777] (i)分别地SEQ ID NO:4和42;

[0778] (j)分别地SEQ ID NO:4和44;

[0779] (k)分别地SEQ ID NO:4和46;

[0780] (l)分别地SEQ ID NO:8和6;

[0781] (m)分别地SEQ ID NO:10和6;

[0782] (n)分别地SEQ ID NO:12和6;

[0783] (o)分别地SEQ ID NO:14和6;

[0784] (p)分别地SEQ ID NO:16和6;

[0785] (q)分别地SEQ ID NO:18和6;

[0786] (r)分别地SEQ ID NO:20和6;

[0787] (s)分别地SEQ ID NO:22和6;

[0788] (t)分别地SEQ ID NO:24和6;

[0789] (u)分别地SEQ ID NO:26和6;

[0790] (v)分别地SEQ ID NO:101和6;

[0791] (w)分别地SEQ ID NO:103和6;以及

[0792] (x)分别地SEQ ID NO:4和105。

[0793] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、101和103;并且其中所述轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46和105。

[0794] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

[0795] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;

[0796] (b)分别地SEQ ID NO:4和28;

[0797] (c)分别地SEQ ID NO:4和30;

[0798] (d)分别地SEQ ID NO:4和32;

[0799] (e)分别地SEQ ID NO:4和34;

[0800] (f)分别地SEQ ID NO:4和36;

[0801] (g)分别地SEQ ID NO:4和38;

[0802] (h)分别地SEQ ID NO:4和40;

[0803] (i)分别地SEQ ID NO:4和42;

[0804] (j)分别地SEQ ID NO:4和44;

[0805] (k)分别地SEQ ID NO:4和46;

[0806] (l)分别地SEQ ID NO:8和6;

[0807] (m)分别地SEQ ID NO:10和6;

[0808] (n)分别地SEQ ID NO:12和6;

[0809] (o)分别地SEQ ID NO:14和6;

[0810] (p)分别地SEQ ID NO:16和6;

[0811] (q)分别地SEQ ID NO:18和6;

[0812] (r)分别地SEQ ID NO:20和6;

[0813] (s)分别地SEQ ID NO:22和6;

[0814] (t)分别地SEQ ID NO:24和6;

[0815] (u)分别地SEQ ID NO:26和6;

[0816] (v)分别地SEQ ID NO:101和6;

[0817] (w)分别地SEQ ID NO:103和6;以及

[0818] (x)分别地SEQ ID NO:4和105。

[0819] 在一些实施方案中,本文提供了特异性结合人CD137的抗体,所述抗体包含由选自由以下组成的组的核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区:

[0820] (a)分别地SEQ ID NO:5和7;

[0821] (b)分别地SEQ ID NO:5和29;

[0822] (c)分别地SEQ ID NO:5和31;

[0823] (d)分别地SEQ ID NO:5和33;

[0824] (e)分别地SEQ ID NO:5和35;

[0825] (f)分别地SEQ ID NO:5和37;

[0826] (g)分别地SEQ ID NO:5和39;

[0827] (h)分别地SEQ ID NO:5和41;

[0828] (i)分别地SEQ ID NO:5和43;

[0829] (j)分别地SEQ ID NO:5和45;

[0830] (k)分别地SEQ ID NO:5和47;

[0831] (l)分别地SEQ ID NO:9和7;

[0832] (m)分别地SEQ ID NO:11和7;

[0833] (n)分别地SEQ ID NO:13和7;

[0834] (o)分别地SEQ ID NO:15和7;

[0835] (p)分别地SEQ ID NO:17和7;

[0836] (q)分别地SEQ ID NO:19和7;

[0837] (r)分别地SEQ ID NO:21和7;

[0838] (s)分别地SEQ ID NO:23和7;

[0839] (t)分别地SEQ ID NO:25和7;

[0840] (u)分别地SEQ ID NO:27和7;

[0841] (v)分别地SEQ ID NO:102和7;

[0842] (w)分别地SEQ ID NO:104和7;以及

[0843] (x)分别地SEQ ID NO:5和106。

[0844] 在一些实施方案中,本文提供了特异性结合人CD137的抗体,所述抗体包含由核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区,所述核苷酸序列与选自由以下组成的组的核苷酸序列具有至少90%同一性:

[0845] (a)分别地SEQ ID NO:5和7;

[0846] (b)分别地SEQ ID NO:5和29;

[0847] (c)分别地SEQ ID NO:5和31;

[0848] (d)分别地SEQ ID NO:5和33;

[0849] (e)分别地SEQ ID NO:5和35;

[0850] (f)分别地SEQ ID NO:5和37;

[0851] (g)分别地SEQ ID NO:5和39;

[0852] (h)分别地SEQ ID NO:5和41;

[0853] (i)分别地SEQ ID NO:5和43;

[0854] (j)分别地SEQ ID NO:5和45;

[0855] (k)分别地SEQ ID NO:5和47;

[0856] (l)分别地SEQ ID NO:9和7;

[0857] (m)分别地SEQ ID NO:11和7;

[0858] (n)分别地SEQ ID NO:13和7;

[0859] (o)分别地SEQ ID NO:15和7;

[0860] (p)分别地SEQ ID NO:17和7;

[0861] (q)分别地SEQ ID NO:19和7;

[0862] (r)分别地SEQ ID NO:21和7;

[0863] (s)分别地SEQ ID NO:23和7;

[0864] (t)分别地SEQ ID NO:25和7;

[0865] (u)分别地SEQ ID NO:27和7;

[0866] (v)分别地SEQ ID NO:102和7;

[0867] (w)分别地SEQ ID NO:104和7;以及

[0868] (x)分别地SEQ ID NO:5和106。

[0869] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区由选自由以下组成的组的核苷酸序列编码:SEQ ID NO:5、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、102和104;并且其中所述轻链可变区由选自由以下组成的组的核苷酸序列编码:SEQ ID NO:7、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47和106。

[0870] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区由与选自由以下组成的组的核苷酸序列具有至少90%同一性的核苷酸序列编码:SEQ ID NO:5、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、102和104;并且其中所述轻链可变区由与选自由以下组成的组的核苷酸序列具有至少90%同一性的核苷酸序列编码:SEQ ID NO:7、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47和106。

[0871] 在一些实施方案中,本文提供了特异性结合至人CD137的抗CD137抗体,并且所述抗体包含具有氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。在一些实施方案中,X是除丙氨酸外的任何氨基酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:126中残基D95、L100、Y100E、Y100G和/或Y100H的突变引起与人CD137的结合丧失。

[0872] 在一些实施方案中,本文提供了特异性结合至人CD137的抗CD137抗体,并且所述抗体包含具有氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX(SEQ ID NO:127)的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:126中的残基F98、D100A、Y100D和/或Y100F和/或Y100H突变成丙氨酸引起与人CD137的结合丧失。在一些实施方案中,SEQ ID NO:126中的残基F98、D100A、Y100D和/或Y100F和/或Y100H突变成除丙氨酸外的任何残基引起与人CD137

的结合增加。

[0873] 在一些实施方案中,本文提供了特异性结合至人CD137的抗CD137抗体,并且所述抗体包含具有氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$(SEQ ID NO:128)的重链CDR3,其中X_1是任何氨基酸,其中X_2是非极性氨基酸,其中X_3是非极性氨基酸,其中X_4是任何氨基酸,其中X_5是极性氨基酸,其中X_6是任何氨基酸,其中X_7是任何氨基酸,其中X_8是极性氨基酸,其中X_9是极性氨基酸,并且其中X_{10}是任何氨基酸。在一些实施方案中,X_2是脯氨酸,其中X_3是苯丙氨酸或色氨酸,其中X_5是天冬氨酸或谷氨酸,其中X_8是酪氨酸,并且其中X_9是酪氨酸。

[0874] 在抗体或其抗原结合部分的重链CDR3内的氨基酸残基在结合至指定靶(例如CD137)中的作用可通过本领域技术人员已知的方法确定。在一些实施方案中,使用丙氨酸扫描完成初始分析以确定抗原结合的关键残基。如本文所述,丙氨酸扫描是用于确定特定野生型残基对给定蛋白质或多肽的稳定性或功能(例如结合亲和力)的作用的技术。该技术涉及用丙氨酸残基取代多肽中的野生型残基中,随后评估丙氨酸取代的衍生物或突变型多肽的稳定性或功能(例如结合亲和力)并与野生型多肽相比较。在一些实施方案中,进一步对鉴别为不重要的残基进行评价以调节抗体与抗原的结合(例如增加或减少结合)。此类分析的非限制性实例是深度突变扫描。这一方法允许评价大量突变。在一些实施方案中,使重链CDR3内的每个氨基酸残基突变成每个另外的氨基酸残基(除丙氨酸外),并评估结合。用于分析氨基酸残基突变的影响的其它方法是本领域中已知的。在一些实施方案中,利用了这些方法评估所有重链和轻链CDR中的残基在结合至人CD137中的作用。

[0875] 示例性CD137结合抗体

[0876] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以约40100nM(例如介于约40nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137上的前述表位(例如包含K114)。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137并且结合人CD137上的前述表位(例如包含K114)。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137并且包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合所述的人CD137上的前述表位(例如包含K114)并且包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137,结合人CD137上的前述表位(例如包含K114)并且包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX(SEQ ID NO:126)的重链CDR3。

[0877] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0878] (i)以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;以及

[0879] (ii)包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$的重链CDR3,其中$X_1$是任何氨基酸,其中$X_2$是非极性氨基酸,其中$X_3$是非极性氨基酸,其中$X_4$是任何氨基酸,其中$X_5$是极性氨基酸,其中$X_6$是任何氨基酸,其中$X_7$是任何氨基酸,其中$X_8$是极性氨基酸,其中$X_9$是极性氨基

酸,并且其中X_{10}是任何氨基酸。

[0880] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0881] (i)以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;以及

[0882] (ii)结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位。

[0883] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0884] (i)以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0885] (ii)结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位;

[0886] (iii)包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX的重链CDR3,其中X是任何氨基酸;或

[0887] (iv)其组合。

[0888] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0889] (i)以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0890] (ii)结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位;

[0891] (iii)包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$的重链CDR3,其中$X_1$是任何氨基酸,其中$X_2$是非极性氨基酸,其中$X_3$是非极性氨基酸,其中$X_4$是任何氨基酸,其中$X_5$是极性氨基酸,其中$X_6$是任何氨基酸,其中$X_7$是任何氨基酸,其中$X_8$是极性氨基酸,其中$X_9$是极性氨基酸,并且其中$X_{10}$是任何氨基酸;或

[0892] (iv)其组合。

[0893] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0894] (i)以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0895] (ii)特异性结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位;以及

[0896] (iii)包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。

[0897] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0898] (i)以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0899] (ii)结合至人CD137上包含SEQ ID NO:3中的一个或多个残基E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位;以及

[0900] (iii)包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$的重链CDR3,其中$X_1$是任何氨基酸,其中$X_2$是非极性氨基酸,其中$X_3$是非极性氨基酸,其中$X_4$是任何氨基酸,其中$X_5$是极性氨基酸,其中$X_6$是任何氨基酸,其中$X_7$是任何氨基酸,其中$X_8$是极性氨基酸,其中$X_9$是极性氨基酸,并且其中$X_{10}$是任何氨基酸。

[0901] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0902] (i)以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;以及

[0903] (ii)结合至包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列的表位。

[0904] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0905] (i)以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0906] (ii)结合至包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列的表位;

[0907] (iii)包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX的重链CDR3,其中X是任何氨基酸;或

[0908] (iv)其组合。

[0909] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0910] (i)以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0911] (ii)结合至包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列的表位;

[0912] (iii)包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$的重链CDR3,其中$X_1$是任何氨基酸,其中$X_2$是非极性氨基酸,其中$X_3$是非极性氨基酸,其中$X_4$是任何氨基酸,其中$X_5$是极性氨基酸,其中$X_6$是任何氨基酸,其中$X_7$是任何氨基酸,其中$X_8$是极性氨基酸,其中$X_9$是极性氨基酸,并且其中$X_{10}$是任何氨基酸;或

[0913] (iv)其组合。

[0914] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0915] (i)以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0916] (ii)结合至包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列的表位;以及

[0917] (iii)包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。

[0918] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0919] (i)以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0920] (ii)结合至包含对应于SEQ ID NO:3中氨基酸位置111至135的一个或多个氨基酸残基的序列的表位;以及

[0921] (iii)包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$的重链CDR3,其中$X_1$是任何氨基酸,其中$X_2$是非极性氨基酸,其中$X_3$是非极性氨基酸,其中$X_4$是任何氨基酸,其中$X_5$是极性氨基酸,其中$X_6$是任何氨基酸,其中$X_7$是任何氨基酸,其中$X_8$是极性氨基酸,其中$X_9$是极性氨基酸,并且其中$X_{10}$是任何氨基酸。

[0922] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0923] (i)以约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力结合人CD137;以及

[0924] (ii)结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111114)的表位。

[0925] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0926] (i)以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0927] (ii)结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111-114)的表位;

[0928] (iii)包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX的重链CDR3,其中X是任何氨基酸;或

[0929] (iv)其组合。

[0930] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0931] (i)以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0932] (ii)结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111-114)的表位;

[0933] (iii)包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$的重链CDR3,其中$X_1$是任何氨基酸,其中$X_2$是非极性氨基酸,其中$X_3$是非极性氨基酸,其中$X_4$是任何氨基酸,其中$X_5$是极性氨基酸,其中$X_6$是任何氨基酸,其中$X_7$是任何氨基酸,其中$X_8$是极性氨基酸,其中$X_9$是极性氨基酸,并且其中$X_{10}$是任何氨基酸;或

[0934] (iv)其组合。

[0935] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0936] (i)以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0937] (ii)结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111114)的表位;以及

[0938] (iii)包括含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX的重链CDR3,其中X是任何氨基酸。

[0939] 在一些实施方案中,抗CD137抗体

[0940] (i)以约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(K_D)结合人CD137;

[0941] (ii)结合至包含ELTK(对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111-114)的表位;以及

[0942] (iii)包括含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$的重链CDR3,其中$X_1$是任何氨基酸,其中$X_2$是非极性氨基酸,其中$X_3$是非极性氨基酸,其中$X_4$是任何氨基酸,其中$X_5$是极性氨基酸,其中$X_6$是任何氨基酸,其中$X_7$是任何氨基酸,其中$X_8$是极性氨基酸,其中$X_9$是极性氨基酸,并且其中$X_{10}$是任何氨基酸。

[0943] 在一些实施方案中,前述抗CD137抗体包含选自由以下组成的组的重链和轻链CDR:

[0944] (a)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;以及

[0945] (b)分别如SEQ ID NO:51、108和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0946] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含选自由SEQ ID NO:4和101组成的组的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0947] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0948] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;以及

[0949] (b)分别地SEQ ID NO:101和6。

[0950] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[0951] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;

[0952] (b)分别地SEQ ID NO:101和6;以及

[0953] (c)分别地SEQ ID NO:26和6。

[0954] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含由选自由以下组成的组的核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区:

[0955] (a)分别地SEQ ID NO:5和7;以及

[0956] (b)分别地SEQ ID NO:102和7。

[0957] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含由选自由以下组成的组的核苷酸序列编码

的重链可变区和轻链可变区：

[0958] (a)分别地SEQ ID NO:5和7；

[0959] (b)分别地SEQ ID NO:102和7;以及

[0960] (c)分别地SEQ ID NO:27和7。

[0961] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含与选自由SEQ ID NO:4和101组成的组的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列。

[0962] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含与选自由SEQ ID NO:4、26和101组成的组的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列。

[0963] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区由与选自由SEQ ID NO:5和102组成的组的核苷酸序列至少90％相同的核苷酸序列编码;并且其中所述轻链可变区由与SEQ ID NO:7的核苷酸序列至少90％相同的核苷酸序列编码。

[0964] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区由与选自由SEQ ID NO:5、27和102组成的组的核苷酸序列至少90％相同的核苷酸序列编码;并且其中所述轻链可变区由与SEQ ID NO:7的核苷酸序列至少90％相同的核苷酸序列编码。

[0965] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列：

[0966] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;以及

[0967] (b)分别地SEQ ID NO:101和6。

[0968] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列：

[0969] (a)分别地SEQ ID NO:4和6；

[0970] (b)分别地SEQ ID NO:101和6;以及

[0971] (c)分别地SEQ ID NO:26和6。

[0972] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区由与选自由以下组成的组的核苷酸序列至少90％相同的核苷酸序列编码：

[0973] (a)分别地SEQ ID NO:5和7;以及

[0974] (b)分别地SEQ ID NO:102和7。

[0975] 在一些实施方案中,抗CD137抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区由与选自由以下组成的组的核苷酸序列至少90％相同的核苷酸序列编码：

[0976] (a)分别地SEQ ID NO:5和7；

[0977] (b)分别地SEQ ID NO:102和7;以及

[0978] (c)分别地SEQ ID NO:27和7。

[0979] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体具有至少mAb1(即,包含分别为SEQ ID NO:4和6的重链和轻链可变序列的抗体)、mab8(即,包含分别为SEQ ID NO:101和6的重

链和轻链可变序列的抗体)或mAb10(即,包含分别为SEQ ID NO:26和6的重链和轻链可变序列的抗体)的功能特性。在一些实施方案中,本文所述的抗体的功能特性包括但不限于:诱导或增强CD137的二聚化;诱导或增强CD137的多聚化;诱导或增强CD137介导的T细胞激活;诱导或增强CD137介导的细胞毒性T细胞应答;诱导或增强CD137介导的T细胞增殖;诱导或增强CD137介导的细胞因子生成;缺乏肝内和/或脾内T细胞激活和/或T细胞增殖的诱导或增强;以及减少或抑制肿瘤生长。

[0980] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体结合人CD137的平衡解离常数K_D至少等于mAb1(即,包含分别为SEQ ID NO:4和6的重链和轻链可变序列的抗体)、mab8(即,包含分别为SEQ ID NO:101和6的重链和轻链可变序列的抗体)或mAb10(即,包含分别为SEQ ID NO:26和6的重链和轻链可变序列的抗体)。

[0981] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含人IgG1重链恒定区或人IgG4重链恒定区。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含人野生型IgG1重链恒定区或人野生型IgG4重链恒定区。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含如SEQ ID NO:1中所示的人野生型IgG1重链恒定区。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含突变型IgG1重链恒定区或突变型IgG4重链恒定区。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含突变型IgG4重链恒定区,其中所述突变型IgG4重链恒定区在残基Ser228处包含氨基酸取代。在一些实施方案中,残基Ser228处的氨基酸取代是S228P。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含IgG4重链恒定区,其中c末端赖氨酸残基被去除。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含IgG4重链恒定区,其中c末端赖氨酸残基被去除并且包含S228P氨基酸取代。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含如SEQ ID NO:2中所示的IgG4重链恒定区。

[0982] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链和轻链,所述重链和轻链包含分别如SEQ ID NO:129和133中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链和轻链,所述重链和轻链包含分别如SEQ ID NO:130和133中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链和轻链,所述重链和轻链包含分别如SEQ ID NO:131和133中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链和轻链,所述重链和轻链包含分别如SEQ ID NO:132和133中所示的氨基酸序列。

[0983] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链和轻链,所述重链和轻链包含分别与SEQ ID NO:129和133具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链和轻链,所述重链和轻链包含分别与SEQ ID NO:130和133具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链和轻链,所述重链和轻链包含分别与SEQ ID NO:131和133具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含重链和轻链,所述重链和轻链包含分别与SEQ ID NO:132和133具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0984] CD137结合抗体的表征和功能

[0985] I.亲和力

[0986] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以通过抗原结合分析测定的约40100nM(例如介于约40nM与约100nM之间)的亲和力(KD)结合人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以通过抗原结合分析测定的约30-100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(KD)结合人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以通过抗原结合分析测定的约45-95nM、50-90nM、55-85nM、60-80nM、65-75nM、55-75nM、40-70nM、50-80nM或60-90nM的亲和力(KD)结合人CD137。

[0987] 在一些实施方案中,抗原结合分析测定了抗CD137抗体对CD137多肽的结合亲和力。在一些实施方案中,抗原结合分析是表面等离子体共振。因此,在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以使用表面等离子体共振测定的约40-100nM(例如介于约40nM至约100nM之间)的亲和力(KD)结合人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以使用表面等离子体共振测定的约30100nM(例如介于约30nM与约100nM之间)的亲和力(KD)结合人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以使用表面等离子体共振测定的约4595nM、5090nM、5585nM、6080nM、6575nM、5575nM、4070nM、5080nM或6090nM的亲和力(KD)结合人CD137。

[0988] 短语“表面等离子体共振”包括一种光学现象,它允许通过例如使用BIAcore系统(瑞典乌普萨拉和新泽西州皮斯卡特维的Pharmacia Biosensor AB)检测生物传感器基质内蛋白质浓度的改变来分析实时生物特异性相互作用。更多描述,参见Jönsson,U.等人(1993)《临床生物学年鉴》51:19-26;Jönsson,U.等人(1991)《生物技术》11:620-627;Johnsson,B.等人(1995)《分子识别杂志》8:125-131;以及Johnnson,B.等人(1991)《分析生物化学》198:268-277。在一些实施方案中,抗原结合分析是生物膜干涉法(BLI)。因此,在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以使用生物膜干涉法测定的约40-100nM(例如介于约40nM至约100nM之间)的亲和力(KD)结合人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以使用生物膜干涉法测定的约30100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(KD)结合人CD137。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体以使用生物膜干涉法测定的约4595nM、5090nM、5585nM、6080nM、6575nM、55-75nM、40-70nM、50-80nM或60-90nM的亲和力(KD)结合人CD137。

[0989] 短语“生物膜干涉法”或“BLI”包括允许测量光学层检测表面厚度的亚纳米级变化的一种光学现象。在一些实施方案中,生物分子在传感器表面处结合并改变光学层厚度。光学层厚度变化的量值与结合分子的质量或分子量成比例。在一些实施方案中,将CD137固定至传感器表面以测量抗体结合,其中结合引起分子量的变化,由此产生光学层厚度的相应变化。在一些实施方案中,BLI是用OCTET系统(ForteBio)执行。

[0990] II.免疫细胞作用

[0991] 在一些实施方案中,如通过细胞因子分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生。在一些实施方案中,细胞因子分析测定由与抗CD137抗体接触的免疫细胞所分泌的至少一种细胞因子的量,其中所述至少一种细胞因子的量增加指示抗CD137抗体诱导或增强细胞因子产生。在一些实施方案中,相较于对照抗体(例如不结合至CD137并且不诱导细胞因子产生的抗体),细胞因子产生的增加是至少1倍、2倍、3倍、4倍

或5倍。

[0992] 在一些实施方案中,如通过细胞因子分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,其中所述细胞因子分析包括以下步骤:

[0993] (i)使所述免疫细胞与所述抗CD137抗体接触;以及

[0994] (ii)测定所述免疫细胞产生的至少一种细胞因子的量,

[0995] 其中所述至少一种细胞因子的量增加指示所述抗CD137抗体诱导或增强所述免疫细胞的细胞因子产生。

[0996] 在一些实施方案中,如通过细胞因子分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,其中所述细胞因子分析包括以下步骤:

[0997] (i)使所述免疫细胞与抗CD137抗体接触;以及

[0998] (ii)测定所述免疫细胞产生的至少一种细胞因子的量,以及

[0999] (iii)将所述免疫细胞产生的所述至少一种细胞因子的量与由参考免疫细胞分泌的量相比较,

[1000] 其中所述参考免疫细胞与对照抗体接触,并且其中由所述免疫细胞产生的所述至少一种细胞因子的量相对于所述参考免疫细胞产生的量增加指示对人CD137介导的细胞因子产生的诱导或增强。

[1001] 在一些实施方案中,如通过细胞因子分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,其中所述细胞因子分析包括以下步骤:

[1002] (i)使免疫细胞与抗CD137抗体接触;

[1003] (ii)测定所述免疫细胞产生的至少一种细胞因子的量,以及

[1004] (iii)将所述免疫细胞产生的所述至少一种细胞因子的量与由参考免疫细胞分泌的量或水平相比较,

[1005] 其中所述参考免疫细胞不与所述抗CD137抗体接触,并且其中由所述免疫细胞产生的所述至少一种细胞因子的量相对于所述参考免疫细胞分泌的量增加,指示对人CD137介导的所述免疫细胞的细胞因子产生的诱导或增强。

[1006] 在一些实施方案中,所述至少一种细胞因子选自由以下组成的组:IL2、IFNγ、TNFα、IL13及其组合。在一些实施方案中,细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,细胞因子是IFNγ。在一些实施方案中,细胞因子是TNFα。在一些实施方案中,细胞因子是IL13。在一些实施方案中,抗CD137抗体诱导或增强IL2产生。在一些实施方案中,抗CD137抗体诱导或增强TNFα产生。在一些实施方案中,抗CD137抗体诱导或增强IL-13产生。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2。在一些方面,产生的细胞因子是TNFα。在一些方面,产生的细胞因子是IL13。在一些方面,产生的细胞因子是IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IL2和TNFα。在一些方面,产生的细胞因子是IL2和IL13。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是TNFα和和IL13。在一些方面,产生的细胞因子是TNFα和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IL13和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2、TNFα和IL-13。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2、TNFα和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IFNγ、TNFα和IL-13。

[1007] 在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中,参考免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中,所述T细胞是CD8+T细胞。

[1008] 在一些实施方案中,细胞因子分析是细胞因子珠粒阵列分析。细胞因子珠粒阵列分析是一种基于珠粒的免疫分析,它允许对样品中的多种细胞因子进行多重分析物流式细胞测定。使用大小或颜色不同的微球的是细胞因子珠粒阵列分析的基础,其中每个微球(或"珠粒")涂有特异性结合至抗原(例如细胞因子)的抗体。然后,将涂有抗体的珠粒与检测器抗体一起引入到样品中。然后,通过流式细胞术分析珠粒:抗原:检测器抗体复合物。市售细胞因子珠粒阵列分析包括但不限于BD™细胞测定珠粒阵列系统(BD Biosciences)和Luminex®分析(R和D Systems)。在一些实施方案中,通过细胞因子珠粒阵列分析来测定人CD137介导的细胞因子产生的诱导或增强。在一些实施方案中,通过Luminex®分析测定人CD137介导的细胞因子产生的诱导或增强。

[1009] 在一些实施方案中,细胞因子分析是Meso Scale Discovery(MSD)分析(Meso Scale Diagnostics;马里兰州罗克维尔(Rockville,MD))。MSD分析是基于检测特异性结合至感兴趣的抗原(例如细胞因子)的电化学发光标记的抗体的一种市售分析。MSD分析包括在微孔板各孔底部的高结合碳电极,这些电极允许附接生物试剂(例如捕捉对细胞因子具有特异性的抗体)。MSD分析使用了与检测抗体缀合的电化学发光标记。将样品添加至微孔板各孔中,并通过MSD仪器对板电极施加电力,使电化学发光标记发射光。测量光强度以对样品中的分析物(例如细胞因子)定量。在一些实施方案中,通过Meso Scale Discovery(MSD)分析测定人CD137介导的细胞因子产生的诱导或增强。

[1010] 在一些实施方案中,如通过T细胞激活分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活。在一些实施方案中,T细胞激活分析测定由与本文所述的抗CD137抗体接触的T细胞所分泌的至少一种细胞因子的量,其中所述至少一种细胞因子的量增加指示T细胞激活的诱导或增强。在一些实施方案中,相较于对照抗体(例如不结合至CD137并且不诱导细胞因子产生的抗体),细胞因子产生的增加是至少1倍、2倍、3倍、4倍或5倍。

[1011] 在一些实施方案中,如通过T细胞激活分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活,其中所述T细胞激活分析包括以下步骤:

[1012] (i)从受试者分离T细胞;

[1013] (ii)使所述T细胞与抗CD137抗体接触;以及

[1014] (iii)测定在(ii)后由所述T细胞分泌的至少一种细胞因子的量,

[1015] 其中所述至少一种细胞因子的水平增加指示所述抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活。

[1016] 在一些实施方案中,如通过T细胞激活分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活,其中所述T细胞激活分析包括以下步骤:

[1017] (i)从受试者分离T细胞;

[1018] (ii)使所述T细胞与抗CD137抗体接触;

[1019] (iii)测定由所述T细胞分泌的至少一种细胞因子的量;以及

[1020] (iv)将所述T细胞产生的所述至少一种细胞因子的量与由参考T细胞分泌的量或水平相比较,

[1021] 其中所述参考T细胞不与所述抗CD137抗体接触,并且其中由所述T细胞产生的所述至少一种细胞因子的量相对于所述参考T细胞分泌的量增加,指示所述抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活。

[1022] 在一些实施方案中,如通过T细胞激活分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活,其中所述T细胞激活分析包括以下步骤:

[1023] (i)从受试者分离T细胞;

[1024] (ii)使所述T细胞与抗CD137抗体接触;

[1025] (iii)测定由所述T细胞分泌的至少一种细胞因子的量;以及

[1026] (iv)将所述T细胞产生的所述至少一种细胞因子的量与由参考T细胞分泌的量相比较,

[1027] 其中所述参考T细胞与对照抗体接触,并且其中由所述T细胞产生的所述至少一种细胞因子的量相对于所述参考T细胞分泌的量增加,指示所述抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活。

[1028] 在一些实施方案中,T细胞激活分析包括测定在与本文所述的抗CD137抗体接触后由T细胞分泌的至少一种细胞因子的水平,其中所述至少一种细胞因子选自由以下组成的组:IL2、IFNγ、TNFα和IL13。在一些实施方案中,细胞因子是IL2。在一些实施方案中,细胞因子是IFNγ。在一些实施方案中,细胞因子是TNFα。在一些实施方案中,细胞因子是IL-13。在一些实施方案中,T细胞激活分析包含细胞因子分析,如本文所述的那些,用于测定至少一种细胞因子的量。在一些方面,产生的细胞因子是IL2。在一些方面,产生的细胞因子是TNFα。在一些方面,产生的细胞因子是IL-13。在一些方面,产生的细胞因子是IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2和TNFα。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2和IL-13。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是TNFα和IL13。在一些方面,产生的细胞因子是TNFα和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IL13和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IL2、TNFα和IL13。在一些方面,产生的细胞因子是IL-2、TNFα和IFNγ。在一些方面,产生的细胞因子是IFNγ、TNFα和IL-13。

[1029] 在一些实施方案中,如通过T细胞激活分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活,其中所述T细胞激活分析包括检测T细胞上至少一种激活标记物的表面表达,并且其中所述至少一种激活标记物的表达水平增加指示T细胞激活的诱导或增强。在一些实施方案中,“表面表达增加”是指表面表达相对于在对照抗体存在下或在无抗体存在下的表面表达增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[1030] 在一些实施方案中,如在体外通过T细胞激活分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活,其中所述T细胞激活分析包括以下步骤:

[1031] (i)从受试者分离T细胞;

[1032] (ii)使所述T细胞与抗CD137抗体接触;以及

[1033] (iii)检测所述T细胞上至少一种激活标记物的表面表达,

[1034] 其中至少一种激活标记物的表面表达增加指示所述抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活。

[1035] 在一些实施方案中,如通过T细胞激活分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活,其中所述T细胞激活分析包括以下步骤:

[1036] (i)从受试者分离T细胞;

[1037] (ii)使所述T细胞与抗CD137抗体接触;

[1038] (iii)测定所述T细胞上至少一种激活标记物的表面表达;以及

[1039] (iv)将所述T细胞上至少一种激活标记物的表面表达与参考T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达相比较,

[1040] 其中所述参考T细胞不与所述抗CD137抗体接触,并且其中在所述T细胞上至少一种激活标记物的表面表达相对于所述参考T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达增加,指示所述抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活。

[1041] 在一些实施方案中,如通过T细胞激活分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活,其中所述T细胞激活分析包括以下步骤:

[1042] (i)从受试者分离T细胞;

[1043] (ii)使所述T细胞与抗CD137抗体接触;

[1044] (iii)测定所述T细胞上至少一种激活标记物的表面表达,

[1045] (iv)将所述T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达与参考T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达相比较,

[1046] 其中所述参考T细胞与对照抗体接触,并且其中,所述T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达相对于参考T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达增加,指示所述抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活。

[1047] 在一些实施方案中,如在体内通过T细胞激活分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活,其中所述T细胞激活分析包括以下步骤:

[1048] (i)向受试者施用所述抗CD137抗体;

[1049] (ii)从所述受试者分离T细胞;以及

[1050] (iii)检测所述T细胞上至少一种激活标记物的表面表达,

[1051] 其中至少一种激活标记物的表面表达增加指示所述抗CD137抗体诱导或增强CD137介导的T细胞激活。

[1052] 在一些实施方案中,如通过T细胞激活分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活,其中所述T细胞激活分析包括以下步骤:

[1053] (i)向受试者施用所述抗CD137抗体;

[1054] (ii)从所述受试者分离T细胞;

[1055] (iii)之后,测定所述T细胞上至少一种激活标记物的表面表达;以及

[1056] (iv)将所述T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达与参考T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达相比较,

[1057] 其中所述参考T细胞是从未施用所述抗CD137抗体的受试者分离,并且其中所述T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达相对于所述参考T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达增加,指示所述抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活。

[1058] 在一些实施方案中,如通过T细胞激活分析所测定,本文所述的抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活,其中所述T细胞激活分析包括以下步骤:

[1059] (i)向受试者施用所述抗CD137抗体;

[1060] (ii)从所述受试者分离T细胞;

[1061] (iii)测定所述T细胞上至少一种激活标记物的表面表达;以及

[1062] (iv)将所述T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达与参考T细胞上所述至

少一种激活标记物的表面表达相比较，

[1063] 其中所述参考T细胞是从与对照抗体接触的受试者分离，并且其中所述T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达相对于所述参考T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达增加，指示所述抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活。

[1064] 在一些实施方案中，如在体内通过T细胞激活分析所测定，本文所述的抗CD137抗体不诱导或增强肝内T细胞激活，其中所述T细胞激活分析包括以下步骤：

[1065] (i)向受试者施用所述抗CD137；

[1066] (ii)从所述受试者的肝分离T细胞；

[1067] (iii)检测所述T细胞上至少一种激活标记物的表面表达；以及

[1068] (iv)将所述T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达与参考T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达相比较，

[1069] 其中所述参考T细胞是从未施用所述抗CD137抗体的受试者分离，任选地，其中所述参考T细胞是从施用对照抗体的受试者分离，并且其中所述T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达相对于所述参考T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达不存在增加，指示所述抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活。

[1070] 在一些实施方案中，如在体内通过T细胞激活分析所测定，本文所述的抗CD137抗体不诱导或增强脾内T细胞激活，其中所述T细胞激活分析包括以下步骤：

[1071] (i)向受试者施用所述抗CD137；

[1072] (ii)从所述受试者的脾分离T细胞；

[1073] (iii)检测所述T细胞上至少一种激活标记物的表面表达；以及

[1074] (iv)将所述T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达与参考T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达相比较，

[1075] 其中所述参考T细胞是从未施用所述抗CD137抗体的受试者分离，任选地，其中所述参考T细胞是从施用对照抗体的受试者分离，并且其中所述T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达相对于所述参考T细胞上所述至少一种激活标记物的表面表达不存在增加，指示所述抗CD137抗体诱导或增强T细胞激活。

[1076] 在一些实施方案中，“不诱导或增强”意图指无活性(例如T细胞激活)或相对于参考抗体的增加，缺乏活性增加。

[1077] 在一些实施方案中，T细胞激活标记物的表面表达等于在无抗体存在下的表面表达。在一些实施方案中，T细胞激活标记物的表面表达小于在参考抗体存在下的表面表达，所述参考抗体诱导或增强表面表达，使其比在无抗体存在下的表面表达高至少1倍、5倍、10倍、50倍或100倍。

[1078] 在一些实施方案中，所述至少一种激活标记物选自由CD25、CD69和CD40L组成的组。在一些实施方案中，一种或多种激活标记物是CD25。

[1079] 在一些实施方案中，T细胞是从具有肿瘤的受试者分离。在一些实施方案中，T细胞是从肿瘤分离。在一些实施方案中，对照抗体是同型对照抗体。

[1080] 在一些实施方案中，如通过免疫细胞浸润分析所测定，本文所述的抗CD137抗体诱导或增强一个或多个免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中，如通过免疫细胞浸润分析所测定，本文所述的抗CD137抗体减少一个或多个免疫细胞向肿瘤微环境中的

浸润。

[1081] 在一些实施方案中,免疫细胞浸润分析测定肿瘤中表达一种或多种免疫细胞标记物的免疫细胞的数量。在一些实施方案中,所述一种或多种免疫细胞标记物用抗体标记。在一些实施方案中,所述一种或多种免疫细胞标记物选自由以下组成的组:CD45、CD25、FOXP3、CD4、CD8、F4/80、CD11b、TIGIT以及PD1。在一些实施方案中,肿瘤中表达一种或多种免疫细胞标记物的免疫细胞的数量是通过流式细胞术测定的。利用流式细胞术对表达一种或多种免疫细胞标记物的免疫细胞定量的方法是本领域中已知的。

[1082] 在一些实施方案中,如通过免疫细胞浸润分析所测定,相对于参考抗体,抗CD137抗体诱导或增强一个或多个免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,参考抗体是包含与所述抗CD137抗体相同的同型且不特异性结合至CD137的抗体。在一些实施方案中,参考抗体是包含与所述抗CD137抗体相同的同型并且特异性结合至CD137的抗体。在一些实施方案中,参考抗体是包含与所述抗CD137抗体不同的同型且不特异性结合至CD137的抗体。在一些实施方案中,参考抗体是包含与所述抗CD137抗体不同的同型并且特异性结合至CD137的抗体。

[1083] 在一些实施方案中,如通过免疫细胞浸润分析所测定,本文所述的抗CD137抗体增加受试者体内表达CD45的免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润,其中所述分析包括以下步骤:

[1084] (i)向具有肿瘤的受试者施用所述抗CD137抗体;

[1085] (ii)获得所述肿瘤的样品;

[1086] (iii)使所述样品与特异性结合至CD45的荧光标记的检测抗体接触,其中所述检测抗体对表达CD45的免疫细胞荧光标记;以及

[1087] (iv)通过流式细胞术测定表达CD45的荧光标记的免疫细胞的数量,

[1088] 其中所述肿瘤中表达CD45的荧光免疫细胞的数量增加指示抗CD137抗体诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,表达CD45的免疫细胞的数量增加是肿瘤微环境中总细胞的至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。

[1089] 在一些实施方案中,如通过免疫细胞浸润分析所测定,本文所述的抗CD137抗体减少或抑制一个或多个免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,如通过免疫细胞浸润分析所测定,相对于参考抗体,所述抗CD137抗体使一个或多个免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润减少。在一些实施方案中,参考抗体是包含与所述抗CD137抗体相同的同型且不特异性结合至CD137的抗体。在一些实施方案中,参考抗体是包含与所述抗CD137抗体相同的同型并且特异性结合至CD137的抗体。在一些实施方案中,参考抗体是包含与所述抗CD137抗体不同的同型且不特异性结合至CD137的抗体。在一些实施方案中,参考抗体是包含与所述抗CD137抗体不同的同型并且特异性结合至CD137的抗体。在一些实施方案中,免疫细胞的减少是肿瘤微环境中总细胞的不到40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%。

[1090] 在一些实施方案中,如通过免疫细胞浸润分析所测定,本文所述的抗CD137抗体使受试者体内肿瘤相关巨噬细胞向肿瘤微环境中的浸润减少,其中所述分析包括以下步骤:

[1091] (i)获得所述肿瘤的样品;

[1092] (ii)使所述样品与标记所述肿瘤相关巨噬细胞的一种或多种抗体接触,其中所述

一种或多种抗体特异性结合至免疫细胞标记物,所述免疫细胞标记物选自由以下组成的组:F4/80、CD11b、CD45及其组合;以及

[1093] (iii)通过流式细胞术测定被标记的肿瘤相关巨噬细胞的数量。在一些实施方案中,肿瘤相关巨噬细胞是肿瘤微环境中免疫细胞的不到40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%。在一些实施方案中,肿瘤相关巨噬细胞表达F4/80、CD11b和CD45。

[1094] 在一些实施方案中,如通过免疫细胞浸润分析所测定,本文所述的抗CD137抗体使受试者体内调节性T细胞(Treg)向肿瘤微环境中的浸润减少,其中所述分析包括以下步骤:

[1095] (i)获得所述肿瘤的样品;

[1096] (ii)使所述样品与标记肿瘤相关巨噬细胞的一种或多种抗体接触,其中所述一种或多种抗体特异性结合至免疫细胞标记物,所述免疫细胞标记物选自由以下组成的组:CD25、FOXP-3、CD4及其组合;以及

[1097] (iii)通过流式细胞术测定被标记的Treg细胞的数量。在一些实施方案中,Treg细胞是肿瘤微环境中CD4+T细胞的不到35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%。在一些实施方案中,Treg细胞表达CD4、FOXP-3和CD25。

[1098] 在一些实施方案中,如通过T细胞耗竭分析所测定,本文所述的抗CD137抗体保护T细胞免于发生T细胞耗竭和/或逆转T细胞耗竭。耗竭的T细胞基于其潜在分子机制可与其它T细胞功能异常如无功能和衰老相区分(Crespo等人(2013)《免疫学新见(Curr Opin Immunol)》25(2):241221)。无能力是在致敏期间因共刺激信号缺乏而发生,并且衰老是在广泛增殖后出现的生长停滞,而耗竭的T细胞来自于最初获得并提供T细胞效应功能的T细胞,但是由于通常存在于肿瘤中的持久抗原和炎性介体引起的持续T细胞受体(TCR)刺激而展现出T细胞效应功能的逐渐退化(Wherry和Kurachi(2015)《自然综述:免疫学(Nat Rev Immunol)》15(8):486-99)。T细胞耗竭的标志包括但不限于相对于未耗竭的T细胞,体内和/或离体T细胞功能的持续退化、多种抑制性受体(IR)(例如PD-1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、CD244、CD160、TIGIT)的表达增加、效应细胞因子分泌(例如IL2、干扰素γ(IFNγ)、肿瘤坏死因子α(TNFα))的进行性损失或减少、CC趋化因子(β-趋化因子)的损失或减少、对IL-7和IL-15的不良响应性、增殖能力的损失或减弱、体内和/或离体细胞溶解活性的损失或降低、改变的细胞代谢以及不同的转录谱。严重耗竭的T细胞可导致缺失(Yi等人(2010)《免疫学(Immunology)》129(4):474481)。

[1099] 在一些实施方案中,如通过T细胞耗竭分析所测定,本文所述的抗CD137抗体保护T细胞免于发生T细胞耗竭和/或逆转T细胞耗竭,其中所述T细胞耗竭分析测定由用本文所述的抗CD137抗体处理的T细胞所分泌的一种或多种效应细胞因子的量或水平,其中所述一种或多种效应细胞因子的量或水平指示对T细胞耗竭的防止或逆转。在一些实施方案中,T细胞耗竭分析包括以下步骤:

[1100] (i)从受试者(例如人受试者)分离T细胞;

[1101] (ii)使所述T细胞与诱导T细胞耗竭的抗原接触;

[1102] (iii)使所述T细胞与所述抗CD137抗体接触;

[1103] (iv)测定由所述T细胞分泌的一种或多种效应细胞因子的量;以及

[1104] (v)将由所述T细胞分泌的所述一种或多种效应细胞因子的量或水平与由参考T细胞分泌的量或水平相比较,

[1105] 其中所述参考T细胞不与诱导T细胞耗竭的抗原接触,并且其中由所述T细胞与由参考T细胞分泌的所述一种或多种效应细胞因子的量或水平的差异指示对T细胞耗竭的防止或逆转。

[1106] 在一些实施方案中,所述一种或多种效应细胞因子选自IL2、IFNγ和TNFα。在一些实施方案中,所述一种或多种效应细胞因子的量或水平是通过ELISA测定。适合于测定所述一种或多种效应细胞因子的量或水平的ELISA是本领域中已知的。在一些实施方案中,所述一种或多种效应细胞因子的量或水平是通过Meso Scale Discovery测定。在一些实施方案中,所述一种或多种效应细胞因子的量或水平是通过本文所述的细胞因子产生分析中的任一种测定。

[1107] 耗竭的T细胞的逐步功能异常伴随IR的表达,所述IR在与靶细胞上的配体相互作用后将抑制信号传输至细胞核。因此,在一些实施方案中,如通过T细胞耗竭分析所测定,本文所述的抗CD137抗体防止T细胞耗竭和/或逆转T细胞耗竭,其中所述T细胞耗竭分析测定用本文所述的抗CD137抗体处理的T细胞上一种或多种抑制性受体的表达水平,其中所述一种或多种抑制性受体的表达水平指示对T细胞耗竭的防止或逆转。在一些实施方案中,T细胞耗竭分析包括以下步骤:

[1108] (i)从受试者(例如人受试者)分离T细胞;

[1109] (ii)使所述T细胞与诱导T细胞耗竭的抗原接触;

[1110] (iii)使所述T细胞与所述抗CD137抗体接触;

[1111] (iv)测定T细胞上一种或多种抑制性受体的表达水平;以及

[1112] (v)将T细胞上一种或多种抑制性受体的表达水平与由参考T细胞分泌的量或水平相比较,其中所述参考T细胞不与诱导T细胞耗竭的抗原接触,并且其中T细胞上与参考T细胞上一种或多种抑制性受体表达水平的差异指示对T细胞耗竭的防止或逆转。

[1113] 在一些实施方案中,所述一种或多种抑制性受体选自TIGIT和PD-1。在一些实施方案中,所述一种或多种抑制性受体的表达水平是通过流式细胞术测定。通过流式细胞术测定免疫细胞(例如T细胞)上抑制性受体的表达水平的方法是本领域中已知的。

[1114] 在一些实施方案中,耗竭的T细胞的量是肿瘤微环境中总CD8+或CD4+T细胞的不到20%、15%、10%或5%。

[1115] 当本文所述的分析提到'从受试者分离T细胞'时,应理解,宜对先前从受试者分离的T细胞执行该分析。

[1116] 当本文所述的分析提到(i)向受试者施用所述抗CD137抗体和(ii)从所述受试者分离T细胞时,应理解,宜对先前从施用了所述抗CD137抗体的受试者分离的T细胞执行该分析。

[1117] 当本文所述的分析提到'获得所述肿瘤的样品'时,应理解,该分析宜对先前从受试者分离的肿瘤样品执行。

[1118] 当本文所述的分析提到(i)向具有肿瘤的受试者施用所述抗CD137抗体和(ii)获得肿瘤样品时,应理解,该分析宜对先前从施用了所述抗CD137抗体的受试者分离的肿瘤样品执行。

[1119] III.非配体结合

[1120] 在一些实施方案中,如通过配体结合分析所测定,本文所述的抗CD137抗体结合至

CD137的非配体结合区。配体结合分析(LBA)是一种分析或分析程序,它提供对两个反应物分子(例如受体与配体多肽)之间发生的相互作用的测量。适宜地,LBA提供对两个反应物分子(例如受体与配体多肽)之间的亲和力程度的测量。例如,在一些实施方案中,配体结合分析被用于测定配体分子(例如CD137L)与受体(例如CD137)结合的存在、速率、程度或其组合。在一些实施方案中,为了测定配体与受体结合的存在、速率和/或程度,配体结合分析包含检测配体:受体复合物的形成。在一些实施方案中,为了测定配体与受体结合的存在、速率和/或程度,配体结合分析包含测定配体:受体复合物的解离。

[1121] 在一些实施方案中,配体:受体复合物的形成和/或解离是通过检测与受体形成的复合物中荧光标记的配体来测定。在一些实施方案中,配体:受体复合物的形成和/或解离是通过检测和/或定量与配体形成的复合物中荧光标记的受体的量来测定。在一些实施方案中,配体:受体复合物的形成和/或解离是通过检测和/或定量特异性结合至配体:受体复合物的荧光标记的抗体的量来测定。检测和定量荧光的方法是本领域中已知的,并且包括但不限于荧光偏振(FP)和荧光各向异性(FA)。

[1122] 在一些实施方案中,配体:受体复合物的形成和/或解离是通过检测和/或定量与受体形成的复合物中放射性标记的配体的量来测定。在一些实施方案中,配体:受体复合物的形成和/或解离是通过检测和/或定量与配体形成的复合物中放射性标记的受体的量来测定。在一些实施方案中,配体:受体复合物的形成和/或解离是通过检测和/或定量特异性结合至配体:受体复合物的放射性标记的抗体的量来测定。检测和定量放射性的方法是本领域中已知的,并且包括但不限于定量放射自显影和闪烁计数。

[1123] 在一些实施方案中,配体:受体复合物的形成和/或解离是通过检测和/或定量与受体形成的复合物中生物发光标记的配体的量来测定。在一些实施方案中,配体:受体复合物的形成和/或解离是通过检测和/或定量与配体形成的复合物中生物发光标记的受体的量来测定。在一些实施方案中,配体:受体复合物的形成和/或解离是通过检测和/或定量特异性结合至配体:受体复合物的生物光光标记的抗体的量来测定。检测和定量生物发光的方法是本领域中已知的,并且包括但不限于发光法(luminometry)。

[1124] 在一些实施方案中,配体:受体复合物的形成和/或解离是通过如以上所描述的表面等离子体共振(SPR)来测定。

[1125] 在一些实施方案中,配体结合分析通过测定在抗体存在下配体与受体结合的存在、速率和/或程度来确定特异性结合至受体的抗体(例如抗CD137抗体)是否影响配体:受体复合物的形成。在一些实施方案中,特异性结合至受体(例如CD137)并减少、破坏或阻断配体:受体复合物(例如CD137:CD137L复合物)形成的抗体(例如抗CD137抗体)被称为“配体阻断抗体”。在一些实施方案中,“配体阻断抗体”可使配体:受体复合物(例如CD137:CD137L复合物)的形成相较于在无配体阻断抗体存在下发生的配体:受体复合物(例如CD137:CD137L复合物)的形成减少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。在一些实施方案中,特异性结合至受体(例如CD137)并且不减少、破坏或阻断配体:受体复合物(例如CD137:CD137L复合物)形成的抗体(例如抗CD137抗体)被称为“非配体阻断抗体”。在一些实施方案中,“非配体阻断抗体”可使配体:受体复合物(例如CD137:CD137L复合物)的形成相较于在无非配体阻断抗体存在下发生的配体:受体复合物(例如CD137:CD137L复合物)的形成减少不到10%、不到5%、不到2%或不到1%。因此,在一些实施方案中,配体结合分析表

征作为“配体阻断抗体”或“非配体阻断抗体”结合至受体的抗体。

[1126] 在一些实施方案中,配体结合分析表征特异性结合至受体并促进配体:受体复合物形成的抗体。在一些实施方案中,配体结合分析表征特异性结合至受体并使配体:受体复合物的形成稳定的抗体。在一些实施方案中,抗体对配体:受体复合物形成的诱导和/或稳定作用促成该抗体的激动作用。在一些实施方案中,如通过配体结合分析所测定,本文所述的抗CD137抗体使CD137激动。

[1127] 在一些实施方案中,如通过配体结合分析(LBA)所测定,本文所述的分离的抗CD137抗体或其抗原结合片段结合至CD137并诱导CD137L结合。

[1128] 在一些实施方案中,如通过配体结合分析所测定,本文所述的分离的抗CD137抗体或其抗原结合片段结合至CD137并诱导CD137L结合,其中所述配体结合分析包括以下步骤:

[1129] (i)将抗CD137抗体与CD137和CD137L以各种浓度组合,其中CD137与CD137L形成CD137:CD137L复合物,以及

[1130] (ii)在所述抗CD137抗体存在下,随时间检测所述CD137:CD137L复合物,

[1131] 其中在所述抗CD137抗体存在下CD137:CD137L复合物增加指示所述抗CD137抗体诱导CD137L结合至CD137。在抗CD137抗体存在下CD137:CD137L复合物增加可以是在无抗CD137抗体存在下CD137:CD137L复合物的量的至少1.5倍、至少2倍、至少5倍、至少10倍或至少20倍。

[1132] 在一些实施方案中,如通过配体结合分析所测定,本文所述的分离的抗CD137抗体或其抗原结合片段结合至CD137的非配体结合区结合,其中所述配体结合分析包括以下步骤:

[1133] (i)将抗CD137抗体与CD137和CD137L以各种浓度组合,其中CD137与CD137L形成CD137:CD137L复合物,以及

[1134] (ii)在所述抗CD137抗体存在下,随时间检测所述CD137:CD137L复合物,

[1135] 其中在所述抗CD137抗体存在下所述CD137:CD137L复合物没有变化指示所述抗CD137抗体结合至CD137的非配体结合区。在一些实施方案中,CD137:CD137L复合物的小于2%的变化指示所述抗CD137抗体结合至CD137的非配体结合区。在一些实施方案中,CD137:CD137L复合物的小于5%的变化指示所述抗CD137抗体结合至CD137的非配体结合区。在一些实施方案中,CD137:CD137L复合物的小于10%的变化指示所述抗CD137抗体结合至CD137的非配体结合区。

[1136] 在一些实施方案中,如通过生物膜干涉法所测定,本文所述的抗CD137抗体结合至CD137的非配体结合区。在一些实施方案中,如通过表面等离子体共振成像(SPRi)所测定,本文所述的抗CD137抗体结合至CD137的非配体结合区。在一些实施方案中,将CD137和CD137L依序施加至预装载有抗CD137抗体的传感器(即,所述抗体被捕捉于传感器上)。在一些实施方案中,抗CD137抗体与非配体结合区域的结合是由暴露于CD137L时应答增加指示。

[1137] IV.CD137结合抗体的功能

[1138] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体以约30-100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合至人CD137,并抑制或减少T细胞耗竭。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体以约30100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合至人CD137,并诱导或增强T细胞激活。在一些实施方案中,本文所述的抗

CD137激动剂抗体以约30-100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)亲和力结合至人CD137,并诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体以约30-100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合至人CD137,并诱导或增强T细胞增殖。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体以约30100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合至人CD137,并展现出抗肿瘤功效。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体以约30-100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合至人CD137,并抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体以约30100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合至人CD137,并诱导或增强NFκβ信号传导。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体以约30-100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合至人CD137,并诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体以约30100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合至人CD137,并且不诱导肝毒性。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体以约30-100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合至人CD137,并且结合至胞外CD137上的非配体结合域。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体以约30-100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合至人CD137,并且不抑制CD137与CD137L的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体以约30100nM(例如介于约30nM至约100nM之间)的亲和力(K_D)结合至人CD137,并且结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[1139] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少T细胞耗竭,并诱导或增强T细胞激活。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少T细胞耗竭,并诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少T细胞耗竭,并诱导或增强T细胞增殖。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少T细胞耗竭,并展现出抗肿瘤功效。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少T细胞耗竭,并抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少T细胞耗竭,并诱导或增强NFκβ信号传导。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少T细胞耗竭,并诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少T细胞耗竭并且不诱导肝毒性。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少T细胞耗竭,并结合至胞外CD137上的非配体结合域。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少T细胞耗竭,并且不抑制CD137与CD137L的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少T细胞耗竭,并结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[1140] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞激活,并诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞激活,并诱导或增强T细胞增殖。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞激活,并展现出抗肿瘤功效。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞激活,并抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞激活,并诱导或增强NFκβ信号

传导。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞激活,并诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞激活,并且不诱导肝毒性。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞激活,并结合至胞外CD137上的非配体结合域。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞激活,并且不抑制CD137与CD137L的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞激活,并结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[1141] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,并诱导或增强T细胞增殖。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,并展现出抗肿瘤功效。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,并抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,并诱导或增强NFκβ信号传导。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,并诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,并且不诱导肝毒性。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,并结合至胞外CD137上的非配体结合域。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,并且不抑制CD137与CD137L的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞的细胞因子产生,并且结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[1142] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞增殖,并展现出抗肿瘤功效。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞增殖,并抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞增殖,并诱导或增强NFκβ信号传导。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞增殖,并诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞增殖,并且不诱导肝毒性。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞增殖,并结合至胞外CD137上的非配体结合域。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞增殖,并且不抑制CD137与CD137L的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强T细胞增殖,并结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[1143] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体展现出抗肿瘤功效,并抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体展现出抗肿瘤功效并诱导或增强NFκβ信号传导。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体展现出抗肿瘤功效,并诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体展现出抗肿瘤功效,并且不诱导肝毒性。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体展现出抗肿瘤功效,并结合至胞外CD137上的非配体结合域。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体展现出抗肿瘤功效,并且不抑制CD137与CD137L的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体展现出抗肿瘤功效,并且结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[1144] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活,并诱导或增强NFκβ信号传导。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活,并诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活,并且不诱导肝毒性。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活,并结合至胞外CD137上的非配体结合域。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活并且不抑制CD137与CD137L的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体抑制或减少巨噬细胞分化和/或激活,并结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[1145] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强NFκβ信号传导,并诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强NFκβ信号传导并且不诱导肝毒性。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强NFκβ信号传导,并结合至胞外CD137上的非配体结合域。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强NFκβ信号传导,并且不抑制CD137与CD137L的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强NFκβ信号传导,并且结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[1146] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润,并且不诱导肝毒性。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞渗入肿瘤微环境中,并结合至细胞外CD137上的非配体结合域。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润,并且不抑制CD137与CD137L的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体诱导或增强免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润,并结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[1147] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体不诱导肝毒性,并结合至胞外CD137上的非配体结合域。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体不诱导肝毒性,并且不抑制CD137与CD137L的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体不诱导肝毒性,并且结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[1148] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体结合至胞外CD137上的非配体结合域,并且不抑制CD137与CD137L的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体结合至胞外CD137上的非配体结合域,并结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137激动剂抗体不抑制CD137与CD137L的相互作用,并结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。

[1149] 表位定位

[1150] 本公开提供了抗CD137抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合至人CD137的表位并参考mAb(例如mAb1)竞争结合至人CD137的表位。用于表征、定位或以其它方式阐述抗CD137抗体表位的方法可分组成结构、功能或计算方法。特别适合确定抗体与其所结合的相应抗原之间相互作用的精确分子架构的结构方法是x射线结晶学(或称“x射线共结晶学”)。键结的抗体-抗原对的晶体结构能够非常准确地测定来自抗原的表位和抗体的互补位两者中侧链和主链原子的个别氨基酸之间的关键相互作用。彼此在4埃

(Å)范围内的氨基酸一般被认为是接触残基。所述方法典型地涉及抗体和抗原的纯化、复合物的形成和纯化,随后是连续数轮的结晶筛选和优化以获得衍射质量晶体。结构解决方案常常在同步源处遵循x射线结晶学获得。用于表位定位的其它结构方法包括但不限于氢氘交换结合质谱法、交联结合质谱法和核磁共振(NMR)(参见例如《分子生物学方法中的表位定位方案(Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology)》,第66卷,G.E.Morris编辑(1996);Abbott等人(2014)《免疫学(Immunology)》142(4):526535)。

[1151] 用于表位定位的功能方法是本领域中众所周知的,并且典型地涉及抗体与完整蛋白质、蛋白质片段或肽的结合的评估或定量。用于表位定位的功能方法可用于例如鉴别线性表位或构象表位,和/或可用于推断两种或更多种不同抗体结合至相同或相似表位的时间。用于表位定位的功能方法包括例如免疫印迹和免疫沉淀分析,其中测试CD137中的重叠或连续肽与抗CD137抗体,例如mAb1的反应性。用于表位定位的其它功能方法包括基于阵列的寡肽扫描(或称为"重叠肽扫描"或"肽扫描分析")、定点诱变(例如丙氨酸扫描诱变)和高通量诱变定位(例如鸟枪诱变定位(shotgun mutagenesis mapping))。

[1152] 已知多种类型的竞争性结合分析,例如:固相直接或间接放射性免疫分析(RIA)、固相直接或间接酶免疫分析(EIA)、夹心竞争分析(参见Stahli等人,《酶学方法(Methods in Enzymology)》9:242(1983));固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见Kirkland等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》137:3614(1986));固相直接标记分析、固相直接标记夹心分析(参见Harlow和Lane,《抗体技术实验指南(Antibodies:ALaboratory Manual)》,Cold Spring Harbor Press(1988));利用I125标记的固相直接标记RIA(参见Morel等人,《分子免疫学(Mol.Immunol.)》25(1):7(1988));固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Cheung等人,《病毒学(Virology)》176:546(1990));以及直接标记RIA。(Moldenhauer等人,《斯堪的纳维亚免疫学杂志(Scand.J.Immunol.)》32:77(1990))。典型地,这些分析涉及使用结合至固体表面或细胞的纯化的抗原以及1)未标记的测试抗原结合蛋白和标记的参考抗原结合蛋白,或2)标记的测试抗原结合蛋白和未标记的参考抗原结合蛋白。通过在测试抗原结合蛋白存在下,测定结合至固体表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。通常,测试抗原结合蛋白是过量存在的。通过竞争分析鉴别的抗原结合蛋白(竞争抗原结合蛋白)包括结合至与参考抗原结合蛋白(例如mAb1)相同的表位的抗原结合蛋白以及结合至与参考抗原结合蛋白(例如mAb1)所结合的表位足够接近以发生位阻的相邻表位的抗原结合蛋白。关于确定竞争性结合的方法的额外详情提供于本文的实施例中。通常,当竞争抗原结合蛋白过量(例如约1倍、约5倍、约10倍、约20倍、约50倍或约100倍过量)存在时,它将使参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合抑制(例如减少或阻断)至少约4045%、约4550%、约5055%、约5560%、约6065%、约6570%、约7075%、或约75%或更高百分比。在一些情况下,结合被抑制至少约80-85%、约85-90%、约90-95%、约95-97%、或约97%或更高百分比。

[1153] 定点诱变方法涉及靶向定点诱变,其中通过沿着蛋白质序列系统地引入取代,然后确定每个取代对抗体结合的影响来鉴别关键氨基酸。这可通过"丙氨酸扫描诱变"(Cunningham和Wells(1989)《科学》244:1081-085)或CD137中氨基酸残基的一些其它形式的点诱变来完成。在不受理论束缚的情况下,如果抗原中减少或消除第一抗体的结合的基本上所有氨基酸突变都减少或消除第二种或更多种抗体的结合,则这两种或更多种抗体(例如测试抗体和参考抗体,例如mAb1)具有相同的表位。

[1154] 鸟枪诱变定位利用了靶基因的综合质粒突变文库,其中该文库中的每个克隆都具有独特的氨基酸突变,并且整个文库涵盖靶蛋白中的每个氨基酸。将构成突变文库的克隆单独地布置于微孔板中,使其在活哺乳动物细胞内表达,并测试其与感兴趣的抗体的免疫反应性。通过反应性的损失来鉴别对于抗体表位至关重要的氨基酸是,然后将其定位至蛋白质结构上以显现表位。哺乳动物细胞内靶蛋白抗原的表达通常提供靶蛋白抗原的天然结构,这允许将线性和构象表位结构定位于复杂蛋白质上。(Paes等人,《美国化学学会杂志(J.Am.Chem.Soc.)》131(20):6952-6954(2009);Banik和Doranz,《基因工程与生物技术新闻(Genetic Engineering and Biotechnology News)》3(2):25-28(2010))。

[1155] 抗CD137抗体所结合的表位还可以使用肽扫描方法测定。在肽扫描中,测试来自靶蛋白CD137的重叠区段的短肽序列的文库结合感兴趣的抗体的能力。合成肽,并通过多种固相筛选方法中的任一种(Reineke等人,《生物技术近期述评(Curr.Opin.Biotechnol.)》12:59-64,2001),如"肽扫描"方法(WO 84/03564;WO 93/09872)中所述,例如使用ELISA或BIACORE,或在芯片上筛选结合。

[1156] 可使用近期开发的称为支架上肽的化学键联(chemical linkage of peptides onto scaffolds,CLIPS)的技术定位构象表位。肽的松散端附连至合成支架上,使得带支架的肽能够呈现与完整蛋白质中的相应序列相同的空间结构。CLIPS技术被用于将线性肽固定成环状结构('单环'形式),并将蛋白质结合位点的不同部分集合在一起('双环'、'三环'等形式),由此产生可用于分析抗体结合的构象表位。(美国专利号7,972,993)。

[1157] 本公开提供的抗体所结合的表位还可以使用计算方法定位。在这些方法中,例如,将肽片段文库展示于噬菌体或细胞的表面上。然后,通过使用选择性结合分析筛选针对这些片段的抗体来定位表位。已开发出多种计算工具,这些工具允许基于使用噬菌体展示获得的亲和选择的线性肽来预测构象表位(Maylo等人(2007)《生物信息学(Bioinformatics)》23:32443246)。还可采用通过噬菌体展示检测构象表位的方法。也可以微生物展示系统在细胞表面上表达适当折叠的抗原片段,以鉴别构象表位(Cochran等人,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Meth.)》287:147158,2004;Rockberg等人,《自然方法(Nature Methods)》5:1039-1045,2008)。

[1158] 涉及蛋白水解和质谱的方法也可用于测定抗体表位(Baerga-Ortiz等人,《蛋白质科学(Protein Sci.)》2002年6月;1 1(6):1300-1308)。在限制性蛋白水解中,不同蛋白酶在抗体存在和不存在下裂解抗原,并且通过质谱法鉴别片段。表位是在抗体结合后免于蛋白水解的抗原区(Suckau等人,《美国国家科学院院刊》87:9848-9852,1990)。额外的基于蛋白水解的方法包括例如选择性化学修饰(Fiedler等人,《生物缀合物化学(Bioconjugate Chemistry)》1998,9(2):236234,1998)、表位切除(Van de Water等人,《临床免疫学(Clin.Immunol.)》,1997,85(3):229235,1997),以及近期开发的氢氘(H/D)交换法(Flanagan,N.,《基因工程与生物技术新闻》3(2):25-28,2010)。

[1159] 在一些实施方案中,如通过诱变和哺乳动物展示所测定,本文所述的抗CD137抗体结合至位于SEQ ID NO:3中的氨基酸残基111135内的表位。在一些实施方案中,如通过诱变和哺乳动物展示所测定,本文所述的抗CD137抗体结合至包含SEQ ID NO:3中的K114的表位。在一些实施方案中,如通过诱变和哺乳动物展示所测定,本文所述的抗CD137抗体结合至包含SEQ ID NO:3中的E111、T113和K114的表位。在一些实施方案中,如通过诱变和哺乳

动物展示所测定,本文所述的抗CD137抗体结合至包含SEQ ID NO:3中的E111、T113、K114和P135的表位。在一些实施方案中,如通过诱变和哺乳动物展示所测定,本文所述的抗CD137抗体结合至包含SEQ ID NO:3中的E111、T113、K114、N126、I132以及P135的表位。

[1160] 用于产生抗CD137抗体及其抗原结合片段的方法

[1161] 本公开的特征还在于用于产生本文所述的抗CD137抗体或其抗原结合片段中的任一种的方法。在一些实施方案中,用于制备本文所述的抗体的方法可包括用适当免疫原对受试者(例如非人哺乳动物)免疫接种。适用于产生本文所述抗体中的任一种的免疫原在本文中示出。例如,为了产生结合至CD137的抗体,熟练技术人员可以用全长CD137多肽,如包含SEQ ID NO.3中所描绘的氨基酸序列的全长人CD137多肽对适合受试者(例如非人哺乳动物,如大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、狗、猫、猪、山羊、马或非人灵长类动物)免疫接种。

[1162] 适合受试者(例如非人哺乳动物)可以用适当抗原免疫接种,随后进行多次加强免疫接种,其次数足以引起哺乳动物产生抗体。免疫原可以在佐剂存在下施用给受试者(例如非人哺乳动物)。可用于在受试者体内产生抗体的佐剂包括但不限于蛋白质佐剂;细菌佐剂,例如全细菌(BCG,短小棒杆菌(Corynebacterium parvum)或明尼苏达沙门氏菌(Salmonella minnesota))和细菌组分,包括细胞壁骨架、海藻糖二霉菌酸酯、单磷酰脂质A、结核杆菌(tubercle bacillus)的甲醇提取残余物(MER)、完全或不完全弗氏佐剂(Freund's adjuvant);病毒佐剂;化学佐剂,例如氢氧化铝、以及碘乙酸盐和胆固醇琥珀酸单酯。可用于诱导免疫应答的方法中的其它佐剂包括例如霍乱毒素和副痘病毒蛋白。另见Biex等人(1999)《自体免疫(Autoimmunity)》31(1):1524。还参见例如Lodmell等人(2000)《疫苗(Vaccine)》18:10591066;Johnson等人(1999)《药物化学杂志(J Med Chem)》42:46404649;Baldridge等人(1999)《方法(Methods)》19:103-107;以及Gupta等人(1995)《疫苗(Vaccine)》13(14):1263-1276。

[1163] 在一些实施方案中,所述方法包括制备杂交瘤细胞系,所述细胞系分泌结合至免疫原的单克隆抗体。例如,如上所述,用CD137多肽对适合哺乳动物,如实验室小鼠免疫接种。可在至少一次免疫原加强免疫接种后两至四天,分离出被免疫接种的哺乳动物的产抗体细胞(例如脾B细胞),然后使其在培养物中短暂生长,随后与适合骨髓瘤细胞系的细胞融合。细胞可在融合促进剂,如牛痘病毒或聚乙二醇存在下融合。对在融合中获得的混合细胞进行克隆,并选出分泌所希望抗体的细胞克隆。例如,免疫接种适合免疫原的Balb/c小鼠的脾细胞可以与骨髓瘤细胞系PAI或骨髓瘤细胞系Sp2/0Ag 14的细胞融合。在融合后,使细胞在适合培养基中以规律时间间隔扩增,以便防止正常骨髓瘤细胞过度生长希望的杂交瘤细胞,所述培养基补充有选择培养基,例如HAT培养基。然后,针对所希望抗体,例如结合至CD137的抗体的分泌来筛选所获得的杂交瘤细胞。

[1164] 在一些实施方案中,熟练技术人员可如例如美国专利号6,300,064(颁予Knappik等人;Formsys AG)和Schoonbroodt等人(2005)《核酸研究(Nucleic Acids Res)》33(9):e81中所述,从无免疫偏好的文库中鉴别出抗CD137抗体。

[1165] 在一些实施方案中,本文所述的方法可涉及以下技术或结合以下技术使用:例如噬菌体展示技术、细菌展示、酵母表面展示、真核病毒展示、哺乳动物细胞展示以及无细胞(例如核糖体展示)抗体筛选技术(参见例如Etz等人(2001)《细菌学杂志(J Bacteriol)》183:69246935;Cornelis(2000)《生物技术近期述评(Curr Opin Biotechnol)》11:450-

454;Klemm等人(2000)《微生物学(Microbiology)》146:3025-3032;Kieke等人(1997)《蛋白质工程(Protein Eng)》10:1303-1310;Yeung等人(2002)《生物技术进展(Biotechnol Prog)》18:212220;Boder等人(2000)《酶学方法(Methods Enzymology)》328:430-444;Grabherr等人(2001)《组合化学与高通量筛选(Comb Chem High Throughput Screen)》4:185-192;Michael等人(1995)《基因疗法(Gene Ther)》2:660-668;Pereboev等人(2001)《病毒学杂志(J Virol)》75:71077113;Schaffitzel等人(1999)《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》231:119135;以及Hanes等人(2000)《自然生物技术(Nat Biotechnol)》18:12871292)。

[1166] 使用各种噬菌体展示方法鉴别抗体的方法是本领域中已知的。在噬菌体展示方法中,将功能性抗体域展示于噬菌体粒子的表面上,所述噬菌体粒子携带有编码所述功能性抗体域的多核苷酸序列。此类噬菌体可用于展示由谱系或组合抗体文库(例如人类或鼠类)表达的抗体的抗原结合域,如Fab、Fv或二硫键稳定的Fv抗体片段。这些方法中使用的噬菌体典型地是丝状噬菌体,如fd和M13。抗原结合域被表达为与噬菌体衣壳蛋白pIII、pVIII或pIX中的任一种的重组融合蛋白形式。参见例如Shi等人(2010)《分子生物学杂志(JMB)》397:385-396。本文所述的可用于制备免疫球蛋白或其片段的噬菌体展示方法的实例包括Brinkman等人(1995)《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》182:4150;Ames等人(1995)《免疫学方法杂志J Immunol Methods)》184:177186;Kettleborough等人(1994)《欧洲免疫学杂志(Eur JImmunol)》24:952958;Persic等人(1997)《基因(Gene)》187:918;Burton等人(1994)《免疫学进展(Advances in Immunology)》57:191-280;以及PCT公开号WO 90/02809、WO 91/10737、WO 92/01047、WO 92/18619、WO 93/11236、WO 95/15982和WO 95/20401。适合方法在例如美国专利号5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743和5,969,108中也有描述。

[1167] 在一些实施方案中,噬菌体展示抗体文库可以使用从免疫接种过的哺乳动物的B细胞收集的mRNA产生。例如,可如上所述,从用CD137多肽免疫接种的小鼠分离出包含B细胞的脾细胞样品。可从细胞分离出mRNA并使用标准分子生物学技术将其转化成cDNA。参见例如Sambrook等人(1989)“分子克隆实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)”,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,纽约冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.);Harlow和Lane(1988),同上;Benny K.C.Lo(2004),同上;以及Borrebaek(1995),同上。编码免疫球蛋白重链和轻链多肽的可变区的cDNA被用于构建噬菌体展示文库。用于产生此类文库的方法描述于例如Merz等人(1995)《神经科学方法杂志(J Neurosci Methods)》62(1-2):213-9;Di Niro等人(2005)《生物化学杂志(Biochem J)》388(第3部分):889-894;以及Engberg等人(1995)《分子生物学方法(Methods Mol Biol)》51:355376。

[1168] 在一些实施方案中,可采用选择和筛选的组合来鉴别例如杂交瘤源性抗体群或噬菌体展示抗体文库中的感兴趣抗体。适合方法是本领域中已知的,并且描述于例如Hoogenboom(1997)《生物技术趋势(Trends in Biotechnology)》15:62-70;Brinkman等人(1995),同上;Ames等人(1995),同上;Kettleborough等人(1994),同上;Persic等人(1997),同上;以及Burton等人(1994),同上中。例如,使用标准分子生物学技术制备多种噬菌粒载体,这些噬菌粒载体各自编码噬菌体衣壳蛋白(例如M13噬菌体的pIII、pVIII或pIX)

与不同抗原组合区的融合蛋白,然后将其引入细菌群(例如大肠杆菌)中。在一些实施方案中,细菌中噬菌体的表达可需要使用辅助噬菌体。在一些实施方案中,不需要辅助噬菌体(参见例如Chasteen等人(2006)《核酸研究(Nucleic Acids Res)》34(21):e145)。回收由细菌产生的噬菌体,然后使其接触例如结合至固体支撑物(被固定)的靶抗原。噬菌体也可以接触溶液中的抗原,并且复合物随后结合至固体支撑物。

[1169] 可使用本领域中已知的任何免疫学或生物化学方法,表征使用上述方法筛选的抗体亚群针对特定抗原(例如人CD137)的特异性和结合亲和力。例如,抗体与CD137的特异性结合可例如使用免疫学或生物化学方法测定,所述方法如但不限于ELISA分析、SPR分析、免疫沉淀分析、亲和色谱以及如上所述的平衡透析。可用于分析抗体的免疫特异性结合和交叉反应性的免疫分析包括但不限于使用如Western印迹、RIA、A酶联免疫吸附分析(ELIS)、“夹心”免疫分析、免疫沉淀分析、免疫扩散分析、凝集分析、补体结合分析、免疫放射分析、荧光免疫分析以及蛋白质A免疫分析之类技术的竞争性和非竞争性分析系统。此类分析是常规的并且是本领域中众所周知的。

[1170] 应理解,上述方法也可用于确定例如抗CD137抗体是否不结合至全长、人CD137和/或CD137蛋白质。

[1171] 在所选CDR氨基酸序列是短序列(例如长度小于10-15个氨基酸)的实施方案中,可以如例如Shiraishi等人(2007)《核酸讨论会系列丛书(Nucleic Acids Symposium Series)》51(1):129-130和美国专利号6,995,259中所描述,以化学方式合成编码CDR的核酸。对于编码受体抗体的给定核酸序列,可使用标准分子生物学技术,用化学合成的核酸置换所述核酸序列中编码CDR的区域。化学合成的核酸的5’端和3’端可被合成以包含粘性端限制酶位点,以用于将所述核酸克隆至编码供体抗体的可变区的核酸中。或者,可使用本领域中已知的DNA组装技术(例如Gibson Assembly)将化学合成的核酸的片段接合在一起,所述片段能够一起编码抗体。

[1172] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体包含改变的重链恒定区,所述改变的重链恒定区相对于其对应的未改变的恒定区具有减弱(的或无)效应功能。涉及抗CD137抗体的恒定区的效应功能可通过改变恒定或Fc区的特性来调节。改变的效应功能包括例如以下活性中的一种或多种的调节:抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)、细胞凋亡、与一种或多种Fc受体的结合以及促炎性应答。调节是指含有改变的恒定区的主题抗体所展现的效应功能活性相较于该恒定区的未改变形式的活性增加、降低或消除。在特定实施方案中,调节包括活性消除或完全不存在的情况。

[1173] 具有改变的FcR结合亲和力和/或ADCC活性和/或改变的CDC活性的改变的恒定区是相较于该恒定区的未改变形式,具有增强或减弱的FcR结合活性和/或ADCC活性和/或CDC活性的多肽。展示与FcR的结合增加的改变的恒定区结合至少一种FcR的亲和力高于未改变的多肽的亲和力。展示与FcR的结合减少的改变的恒定区结合至少一种FcR的亲和力低于该恒定区的未改变形式的亲和力。相较于天然序列免疫球蛋白恒定或Fc区与FcR的结合水平,展示与FcR的结合减少的此类变体可与FcR具有极少结合或无明显结合,例如0至50%(例如低于50%、49%、48%、47%、46%、45%、44%、43%、42%、41%、40%、39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、

5%、4%、3%、2%或1%)结合至FcR。类似地,展示被调节的ADCC和/或CDC活性的改变的恒定区可展现出相较于未改变的恒定区增加或降低的ADCC和/或CDC活性。例如,在一些实施方案中,包含改变的恒定区的抗CD137抗体可展现出该恒定区的未改变形式的ADCC和/或CDC活性的约0至50%(例如低于50%、49%、48%、47%、46%、45%、44%、43%、42%、41%、40%、39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%)。本文所述的包含改变的恒定区且该恒定区展示降低的ADCC和/或CDR的抗CD137抗体可展现出降低的ADCC和/或CDC活性,或不展现ADCC和/或CDC活性。

[1174] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体展现出降低的效应功能,或不展现效应功能。在一些实施方案中,抗CD137抗体包含混合恒定区或其一部分,如G2/G4混合恒定区(参见例如Burton等人(1992)《免疫学进展(Adv Immun)》51:118;Canfield等人(1991)《实验医学杂志(J Exp Med)》173:14831491;以及Mueller等人(1997)《分子免疫学(Mol Immunol)》34(6):441-452)。参见上文。

[1175] 在一些实施方案中,抗CD137抗体可含有展现出增强或降低的补体依赖性细胞毒性(CDC)的改变的恒定区域。调节的CDR活性可通过在抗体Fc区中引入一个或多个氨基酸取代、插入或缺失来实现。参见例如美国专利号6,194,551。替代地或另外地,可在Fc区中引入半胱氨酸残基,由此允许在该区域中形成链间二硫键。由此产生的同二聚体抗体可具有改善的或降低的内化能力和/或增加或降低的补体介导的细胞杀伤。参见例如Caron等人(1992)《实验医学杂志(J Exp Med)》176:11911195;和Shopes(1992)《免疫学(Immunol)》148:29182922;PCT公开号WO 99/51642和WO 94/29351;Duncan和Winter(1988)《自然(Nature)》322:73840;以及美国专利号5,648,260和5,624,821。

[1176] 重组抗体表达和纯化

[1177] 本文所述的抗体或其抗原结合片段可以使用分子生物学和蛋白质化学领域已知的多种技术制备。例如,可将编码抗体重链和轻链多肽中的一种或两种的核酸插入含有转录和翻译调控序列的表达载体中,所述转录和翻译调控序列包括例如启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列、转录终止子信号、多聚腺苷酸化信号以及增强子或激活因子序列。所述调控序列包括启动子以及转录起始和终止序列。另外,表达载体还可包括多于一个复制系统,由此使其能够维持在两种不同的生物体中,例如维持在哺乳动物或昆虫细胞中进行表达,以及维持在原核宿主中进行克隆和扩增。

[1178] 有若干可能的载体系统可用于在哺乳动物细胞中由核酸表达克隆的重链和轻链多肽。一类载体依赖于所希望的基因序列整合至宿主细胞基因组中。稳定整合了DNA的细胞可通过同时引入药物抗性基因,如大肠杆菌gpt(Mulligan和Berg(1981)《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》78:2072)或Tn5neo(Southern和Berg(1982)《分子与应用遗传学(Mol Appl Genet)》1:327)进行选择。可选择标记物基因可连接至待表达的DNA基因序列,或通过共转染而引入同一细胞中(Wigler等人(1979)《细胞(Cell)》16:77)。第二类载体利用DNA元件,这些DNA元件赋予染色体外质粒自主复制能力。这些载体可来源于动物病毒,如牛乳头瘤病毒(Sarver等人(1982)《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》,79:7147)、巨细胞病毒、多瘤病毒(Deans等人(1984)《美国国家科学院院刊》81:

1292)或SV40病毒(Lusky和Botchan(1981)《自然》293:79)。

[1179] 表达载体可通过适合于核酸的后续表达的方式引入细胞中。引入方法在很大程度上由以下论述的靶向细胞类型决定。示例性方法包括$CaPO_4$沉淀、脂质体融合、阳离子性脂质体、电穿孔、病毒感染、葡聚糖介导的转染、聚凝胺介导的转染、原生质体融合以及直接显微注射。

[1180] 适于抗体或其抗原结合片段表达的宿主细胞包括酵母、细菌、昆虫、植物以及哺乳动物细胞。特别值得关注的是细菌如大肠杆菌、真菌如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)、昆虫细胞如SF9、哺乳动物细胞系(例如人细胞系)以及原代细胞系。

[1181] 在一些实施方案中,抗体或其片段可以在转基因动物(例如转基因哺乳动物)中表达并从其纯化。例如,可如Houdebine(2002)《生物技术近期述评(Curr Opin Biotechnol)》13(6):625-629;van Kuik-Romeijn等人(2000)《转基因研究(Transgenic Res)》9(2):155-159;以及Pollock等人(1999)《免疫学方法(J Immunol Methods)》231(1-2):147157中所描述,在转基因非人哺乳动物(例如啮齿动物)中产生抗体并且从乳汁将其分离。

[1182] 抗体及其片段可通过在一定条件下培养被表达载体转化的宿主细胞一段时间,由这些细胞产生,所述表达载体含有编码所述抗体或片段的核酸,且所述培养的条件和时间量足以允许所述蛋白质表达。此类蛋白质表达条件将随表达载体和宿主细胞的选择而变化,并且本领域技术人员通过常规实验将很容易确定。例如,在大肠杆菌中表达的抗体可由包涵体再折叠(参见例如Hou等人(1998)《细胞因子(Cytokine)》10:31930)。细菌表达系统及其使用方法是本领域众所周知的(参见《当代分子生物学实验室指南》,Wiley&Sons;以及《分子克隆实验室手册》-第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,纽约(2001))。密码子、适合表达载体和适合宿主细胞的选择将取决于多种因素而变化,并且可根据需要容易地优化。本文所述的抗体(或其片段)可在哺乳动物细胞中或在其它表达系统中表达,所述系统包括但不限于酵母、杆状病毒,以及体外表达系统(参见例如Kaszubska等人(2000)《蛋白质表达和纯化(Protein Expression and Purification)》18:213-220)。

[1183] 在表达之后,可分离出抗体及其片段。取决于样品中存在的其它组分,抗体或其片段可通过本领域技术人员已知的多种方式分离或纯化。标准纯化方法包括电泳技术、分子技术、免疫学技术和色谱技术,包括离子交换色谱法、疏水色谱法、亲和色谱法和反相HPLC色谱法。例如,抗体可使用标准抗抗体柱(例如蛋白质A或蛋白质G柱)纯化。超滤和透滤技术联合蛋白质浓缩也是有用的。参见例如(1994)“蛋白质纯化(Protein Purification),第3版,”Springer-Verlag,纽约州纽约市(New York City,New York)。所需纯化程度将根据所希望的用途而变化。在一些情况下,不需要纯化表达的抗体或其片段。

[1184] 用于测定纯化的抗体或其片段的产率或纯度的方法是本领域中已知的,并且包括例如Bradford分析、UV光谱、双缩脲蛋白质(Biuret protein)分析、Lowry蛋白质分析、酰胺黑蛋白质分析、高压液相色谱法(HPLC)、质谱法(MS)以及凝胶电泳方法(例如使用蛋白质染色剂,如考马斯蓝(Coomassie Blue)或胶体银染色剂)。

[1185] 抗体或其抗原结合片段的修饰

[1186] 抗体或其抗原结合片段可在其表达和纯化后进行修饰。所述修饰可以是共价或非共价修饰。这些修饰可通过例如使多肽的靶氨基酸残基与有机衍生化剂反应而引入所述抗

体或片段中,所述有机衍生化剂能够与选定的侧链或末端残基反应。适合修饰位点可使用多种标准中的任一种选择,所述标准包括例如抗体或片段的结构分析或氨基酸序列分析。

[1187] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可与异源部分缀合。异源部分可以是例如异源多肽、治疗剂(例如毒素或药物)或可检测标记,如但不限于放射性标记、酶标记、荧光标记、重金属标记、发光标记、或亲和标记如生物素或抗生蛋白链菌素。适合异源多肽包括例如抗原标签(例如FLAG(DYKDDDDK;SEQ ID NO:98)、聚组氨酸(6-His;HHHHHH;SEQ ID NO:99)、血凝素(HA;YPYDVPDYA;SEQ ID NO:100)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或麦芽糖结合蛋白(MBP),以用于纯化所述抗体或片段。异源多肽还包括可用作诊断或可检测标记物的多肽(例如酶),例如荧光素酶、荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白(GFP))或氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyl transferase,CAT)。适合放射性标记包括:^{32}P、^{33}P、^{14}C、^{125}I、^{131}I、^{35}S和^{3}H。适合荧光标记包括但不限于荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、绿色荧光蛋白(GFP)、DyLight™488、藻红素(PE)、碘化丙锭(PI)、PercP、PEAlexaFluor®700、Cy5、别藻蓝蛋白以及Cy7。发光标记包括例如多种发光镧系元素(例如铕或铽)螯合物中的任一种。例如,适合的铕螯合物包括二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或四氮杂环十二烷1,4,7,10-四乙酸(DOTA)的铕螯合物。酶标记包括例如碱性磷酸酶、CAT、荧光素酶和辣根过氧化酶。

[1188] 两种蛋白质(例如抗体和异源部分)可使用多种已知的化学交联剂中的任一种交联。此类交联剂的实例是通过键联连接两个氨基酸残基的那些,所述键联包括“受阻”二硫键。在这些键联中,交联单元内的二硫键受到保护(通过阻碍该二硫键任一侧上的基团)以免在例如还原型谷胱甘肽或酶二硫键还原酶的作用下还原。一种适合的试剂,即4琥珀酰亚氨氧基羰基α甲基α(2吡啶二硫基)甲苯(SMPT)利用在两种蛋白质之一上的末端赖氨酸和在另一种蛋白质上的末端半胱氨酸,而在该两种蛋白质之间形成此类键联。还可使用通过每种蛋白质上的不同的偶合部分交联的异双官能试剂。其它有用的交联剂包括但不限于连接两个氨基(例如N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰基琥珀酰亚胺)、两个巯基(例如1,4-双马来酰亚胺基丁烷)、一个氨基和一个巯基(例如间马来酰亚胺基苯甲酰基N羟基琥珀酰亚胺酯)、一个氨基和一个羧基(例如4[对叠氮基水杨基酰胺基]丁胺)、以及一个氨基和精氨酸侧链上存在的一个胍基(例如对叠氮基苯基乙二醛单水合物)的试剂。

[1189] 在一些实施方案中,放射性标记可与抗体的氨基酸主链直接缀合。或者,可包括放射性标记作为较大分子的一部分(例如间[^{125}I]碘苯基N羟基琥珀酰亚胺([^{125}I]MiPNHS)中的^{125}I),它结合至游离氨基形成相关蛋白质的间碘苯基(mIP)衍生物(参见例如Rogers等人(1997)《核医学杂志(J Nucl Med)》38:1221-1229)或作为螯合物(例如与DOTA或DTPA螯合)的一部分,该螯合物又被结合至蛋白质主链。将放射性标记或含有放射性标记的较大分子/螯合物与本文所述的抗体或抗原结合片段缀合的方法是本领域中已知的。此类方法涉及在有助于放射性标记或螯合物与蛋白质结合的条件(例如pH、盐浓度和/或温度)下,将所述蛋白质与放射性标记一起温育(参见例如美国专利号6,001,329)。

[1190] 用于将荧光标记(有时称为“荧光团”)与蛋白质(例如抗体)缀合的方法是蛋白质化学领域中已知的。例如,可使用附接至荧光团的琥珀酰亚胺基(NHS)酯或四氟苯基(TFP)酯部分将荧光团与蛋白质中的游离氨基(例如赖氨酸的游离氨基)或巯基(例如半胱氨酸的巯基)缀合。在一些实施方案中,荧光团可以与异双官能交联剂部分如磺基SMCC缀合。适合缀合方法涉及在有助于荧光团结合至蛋白质的条件下,将抗体蛋白质或其片段与荧光团一

起温育。参见例如Welch和Redvanly(2003)“放射性药物手册:放射性化学和应用(Handbook of Radiopharmaceuticals:Radiochemistry and Applications),”John Wiley and Sons (ISBN 0471495603)。

[1191] 在一些实施方案中,所述抗体或片段可例如用改善所述抗体在循环中,例如血液、血清或其它组织中的稳定性和/或保持力的部分修饰。例如,所述抗体或片段可如例如Lee等人(1999)《生物缀合物化学(Bioconjug Chem)》10(6):9738;Kinstler等人(2002)《先进药物递送评论(Advanced Drug Deliveries Reviews)》54:477485;以及Roberts等人(2002)《先进药物递送评论》54:459-476中所述被聚乙二醇化,或被羟乙基淀粉化(Fresenius Kabi,Germany;参见例如Pavisić等人(2010)《国际药学杂志(Int J Pharm)》387(1-2):110119)。稳定部分可使抗体(或片段)的稳定性或保持力改善至少1.5倍(例如至少2倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、或50倍或更高倍数)。

[1192] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可经历酶或化学处理,或者由细胞产生,由此使所述抗体或片段具有减少的糖基化或不存在糖基化。用于产生糖基化减少的抗体的方法是本领域中已知的,并且在例如美国专利号6,933,368;Wright等人(1991)《欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J)》10(10):27172723;以及Co等人(1993)《分子免疫学(Mol Immunol)》30:1361中有描述。

[1193] 药物组合物和配制物

[1194] 在某些实施方案中,本发明提供一种药物组合物,所述药物组合物包含抗CD137抗体和药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。

[1195] 在某些实施方案中,可接受的配制物材料优选在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。在某些实施方案中,配制物材料适于皮下和/或静脉内施用。在某些实施方案中,所述药物组合物可含有配制物材料,用于改变、维持或保留例如所述组合物的pH值、克分子渗透压浓度、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放的速率、吸附或渗透。在某些实施方案中,适合配制物材料包括但不限于氨基酸(如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(如硼酸盐、碳酸氢盐、TrisHCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其它有机酸);增积剂(如甘露糖醇或甘氨酸);螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(如咖啡因(caffeine)、聚乙烯吡咯烷酮、β-环糊精或羟丙基-β环糊精);填充剂;单糖;二糖;以及其它碳水化合物(如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐抗衡离子(如钠);防腐剂(如苯扎氯铵(benzalkoniumchloride)、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定(chlorhexidine)、山梨酸或过氧化氢);溶剂(如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(如甘露糖醇或山梨糖醇);悬浮剂;表面活性剂或润湿剂(如普朗尼克(pluronics)、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨酸酯如聚山梨酸酯20、聚山梨酸酯80、曲通(triton)、缓血酸胺(tromethamine)、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊(tyloxapal));稳定性增强剂(如蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(如碱金属卤化物,优选氯化钠或氯化钾;甘露糖醇、山梨糖醇);递送媒剂;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。(《雷氏药学大全(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第18版,A.R.Gennaro编辑,Mack Publishing Company

(1995))。在某些实施方案中,所述配制物包含PBS;20mM NaOAC,pH 5.2,50mM NaCl;和/或10mM NAOAC,pH 5.2,9%蔗糖。在某些实施方案中,最佳的药物组合物将由本领域技术人员根据例如预定施用途径、递送形式和希望的剂量确定。参见例如《雷氏药学大全》,同上。在某些实施方案中,此类组合物可能会影响抗CD137抗体的物理状态、稳定性、体内释放速率和/或体内清除速率。

[1196] 在某些实施方案中,药物组合物中的主要媒剂或载体可以是水性的或非水性的。例如,在某些实施方案中,适合媒剂或载体可以是注射用水、生理盐水溶液或人工脑脊液,其中可补充有供肠胃外施用的组合物中常见的其它材料。在某些实施方案中,盐水包含等渗磷酸盐缓冲盐水。在某些实施方案中,中性缓冲盐水或盐水与血清白蛋白的混合物也是示例性媒剂。在某些实施方案中,药物组合物包含约pH7.08.5的Tris缓冲液、或约pH4.05.5的乙酸盐缓冲液,其还可包括山梨糖醇或因此其适合的替代物。在某些实施方案中,包含抗CD137抗体的组合物可通过将具有所希望纯度的所选组合物与任选的配制剂(《雷氏药学大全》,同上)混合而制备为冻干饼或水溶液形式以便储存。此外,在某些实施方案中,包含抗CD137抗体的组合物可使用适当赋形剂如蔗糖配制为冻干物形式。

[1197] 在某些实施方案中,可以选择药物组合物用于肠胃外递送。在某些实施方案中,可以选择组合物以供吸入或通过消化道递送,如口服。此类药学上可接受的组合物的制备在本领域技术人员的能力范围内。

[1198] 在某些实施方案中,存在的配制物组分的浓度是施用部位可接受的。在某些实施方案中,使用了缓冲剂将组合物维持在生理pH值或略微较低的pH值,典型地维持在约5至约8的pH值范围内。

[1199] 在某些实施方案中,当预期肠胃外施用时,治疗组合物可呈在药学上可接受的媒剂中包含抗CD137抗体的无热原、肠胃外可接受的水溶液形式。在某些实施方案中,用于肠胃外注射的媒剂是无菌蒸馏水,抗CD137抗体在其中被配制为无菌、等渗溶液形式并且适当地保存。在某些实施方案中,制备可涉及将所希望分子与如可注射微球、生物可蚀解粒子、聚合化合物(如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠粒或脂质体之类试剂一起配制,该试剂可提供产品的控制性或持续释放,该产品然后可通过积存式注射递送。在某些实施方案中,也可以使用透明质酸,并且它可以具有促进循环中持续时间的维持的作用。在某些实施方案中,可使用植入式药物递送装置来引入所希望的分子。

[1200] 在某些实施方案中,药物组合物可被配制用于吸入。在某些实施方案中,抗CD137抗体可被配制为干粉形式以供吸入。在某些实施方案中,包含抗CD137抗体的吸入溶液可在推进剂存在下配制以供气雾剂递送。在某些实施方案中,溶液可被雾化。肺施用在PCT申请号PCT/US94/001875中有进一步描述,该案描述了化学修饰的蛋白质的肺递送。

[1201] 在某些实施方案中,预期配制物可通过口服施用。在某些实施方案中,以这种方式施用的抗CD137抗体可在常用于混配如片剂和胶囊之类固体剂型的载体的存在或不存在下配制。在某些实施方案中,胶囊可被设计成在胃肠道中某一点处释放配制物中的活性部分,此时生物利用率最大化并且体循环前降解最少。在某些实施方案中,可包括至少一种额外试剂以促进抗CD137抗体的吸收。在某些实施方案中,还可采用稀释剂、调味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、悬浮剂、片剂崩解剂以及粘合剂。

[1202] 在某些实施方案中,药物组合物可涉及有效数量的抗CD137抗体与适于制造片剂

的无毒赋形剂的混合物。在某些实施方案中,通过将片剂溶解于无菌水或另一种适当的媒剂中,可制备出呈单位剂型的溶液。在某些实施方案中,适合的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂,如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖或磷酸钙;或粘合剂,如淀粉、明胶或阿拉伯胶;或润滑剂,如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[1203] 额外药物组合物对于本领域技术人员来说是显而易见的,包括呈持续或受控递送配制物形式的含抗CD137抗体的配制物。在某些实施方案中,本领域技术人员也已知用于配制多种其它持续或受控递送构件的技术,如脂质体载体、生物可蚀解微粒或多孔珠粒和积存式注射液。参见例如PCT申请号PCT/US93/00829,该案描述了用于递送药物组合物的多孔聚合物微粒的受控释放。在某些实施方案中,持续释放制剂可包括呈成形制品,例如膜或微胶囊形式的半透性聚合物基质。持续释放基质可包括聚酯、水凝胶、聚交酯(美国专利号3,773,919和EP 058,481)、L谷氨酸与L谷氨酸γ乙酯的共聚物(Sidman等人,《生物聚合物(Biopolymers)》,22:547556(1983))、聚(甲基丙烯酸2羟基乙酯)(Langer等人,《生物医学材料研究杂志(J.Biomed.Mater.Res.)》,15:167-277(1981);和Langer,《化学技术(Chem.Tech.)》,12:98-105(1982))、乙烯乙酸乙烯酯(Langer等人,同上)或聚D()3羟基丁酸(EP 133,988)。在某些实施方案中,持续释放组合物还可包括脂质体,所述脂质体可通过本领域中已知的若干方法中的任一种来制备。参见例如Eppstein等人,《美国国家科学院科学院刊》,82:3688-3692(1985);EP 036,676;EP 088,046;以及EP 143,949。

[1204] 用于体内施用的药物组合物典型地是无菌的。在某些实施方案中,这可通过过滤穿过无菌过滤膜来实现。在某些实施方案中,在所述组合物冻干的情况下,可在冻干和复水之前或之后使用这一方法进行灭菌。在某些实施方案中,供肠胃外施用的组合物可呈冻干形式或呈溶液形式储存。在某些实施方案中,肠胃外组合物一般被放到具有无菌接取口的容器,例如具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶中。

[1205] 在某些实施方案中,在配制好药物组合物后,可将其以溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体或以脱水或冻干粉末形式储存于无菌小瓶中。在某些实施方案中,此类配制物可呈即用形式或呈在施用前复水的形式(例如冻干形式)储存。

[1206] 在某些实施方案中,提供了用于制造单剂量施用单元的试剂盒。在某些实施方案中,该试剂盒可包含具有干燥蛋白质的第一容器和具有水性配制物的第二容器。在某些实施方案中,包括了含有单室和多室预填充式注射器(例如液体注射器和冻干剂注射器)的试剂盒。

[1207] 在某些实施方案中,打算用于治疗的包含抗CD137抗体的药物组合物的有效量将取决于例如治疗背景和目标。本领域技术人员应了解,根据某些实施方案,用于治疗的适当剂量水平因此将部分地取决于所递送的分子、使用抗CD137抗体的适应症、施用途径以及患者的体格(体重、体表或器官大小)和/或状况(年龄和一般健康状况)。在某些实施方案中,临床医师可调定剂量并改变施用途径以获得最佳治疗效果。

[1208] 在某些实施方案中,给药频率将考虑所用配制物中抗CD137抗体的药物动力学参数。在某些实施方案中,临床医生将施用组合物,直到达到实现所希望作用的剂量。在某些实施方案中,组合物因此可随时间以单次剂量或两次或更多次剂量(所述剂量可含有或可不含相同量的所希望分子),或通过植入装置或导管连续输注来施用。本领域的普通技术人员常规地对适当剂量作出进一步改进,并且这在技术人员常规执行的任务范围内。在某些

实施方案中,适当剂量可通过使用适当的剂量应答数据确定。

[1209] 在某些实施方案中,药物组合物的施用途径符合已知方法,例如口服;通过静脉内、腹膜内、脑内(脑实质内)、脑室内、肌肉内、皮下、眼内、动脉内、门脉内或病变内途径注射;通过持续释放系统;或通过植入装置。在某些实施方案中,所述组合物可通过推注施用,或通过输注连续地施用,或通过植入装置施用。在某些实施方案中,组合疗法中的个别成分可通过不同途径施用。

[1210] 在某些实施方案中,所述组合物可通过植入膜、海绵或另一种适当的材料局部地施用,在植入的膜、海绵或另一种适当的材料上吸收或囊封有所希望的分子。在使用植入装置的某些实施方案中,可将所述装置植入任何适合组织或器官中,并且所希望分子可通过扩散、定时释放大丸剂或连续施用递送。在某些实施方案中,可能希望离体使用包含抗CD137抗体的药物组合物。在这样的情况下,使从患者取出的细胞、组织和/或器官暴露于包含抗CD137抗体的药物组合物,之后,将细胞、组织和/或器官植入回到患者体内。

[1211] 在某些实施方案中,抗CD137抗体可通过植入某些细胞进行递送,所述细胞已使用如本文所述的方法基因工程改造成表达和分泌所述多肽。在某些实施方案中,所述细胞可以是动物或人细胞,并且可以是自体、异体或异种细胞。在某些实施方案中,细胞可以被永生化。在某些实施方案中,为了降低免疫应答的可能性,所述细胞可被囊封以避免周围组织的浸润。在某些实施方案中,囊封材料典型地是生物相容性、半渗透性聚合物外壳或膜,所述聚合物外壳或膜允许蛋白质产物释放,但阻止患者的免疫系统或周围组织中的其它有害因素破坏细胞。

[1212] 应用

[1213] 本文所述的组合物可被用于诊断和治疗应用。例如,可检测地标记的抗原结合分子可用于分析中,以检测样品(例如生物样品)中靶抗原的存在或量。组合物可用于体外分析中以研究靶抗原功能(例如CD137介导的细胞信号传导或应答)的抑制。在一些实施方案中,例如,在组合物结合至靶抗原(例如蛋白质或多肽)并使其激活的情况下,这些组合物可在被设计用于鉴别额外新颖化合物的分析中用作阳性对照,所述额外新颖化合物也诱导靶蛋白或多肽的活性和/或另外可用于治疗与靶蛋白或多肽相关的病症。例如,在用于鉴别诱导、增加或刺激CD137功能的额外化合物(例如小分子、适体或抗体)的分析中,可使用CD137激活组合物作为阳性对照。所述组合物也可用于下文详细阐述的治疗方法中。

[1214] 试剂盒

[1215] 在一些实施方案中,本公开提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含本文所述的抗CD137抗体。在一些实施方案中,试剂盒包括如本文所公开的抗CD137抗体和使用说明书。所述试剂盒可在适合容器中包含抗CD137抗体、一种或多种对照以及本领域众所周知的各种缓冲剂、试剂、酶和其它标准成分。

[1216] 所述容器可包括至少一个小瓶、孔、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其它容器构件,抗CD137抗体可放置于其中,并且在一些情况下适当地分成等分试样。在提供额外组分的情况下,所述试剂盒可含有能放置这一组分的额外容器。所述试剂盒还可包括呈紧密密封的用于容纳抗CD137抗体的构件和任何其它试剂容器以供商业销售。此类容器可包括注射成型或吹塑成型塑料容器,其中将保持所希望的小瓶。容器和/或试剂盒可包括附有关于使用和/或警告的说明书的标签。

[1217] 在一些实施方案中,试剂盒包括含抗CD137抗体和药学上可接受的载体,或包含抗CD137抗体的药物组合物的容器,以及有关治疗有需要的受试者的癌症、或延迟其癌症进展、或减少或抑制其肿瘤生长的说明书。在一些实施方案中,试剂盒包括含抗CD137抗体和药学上可接受的载体、或包含抗CD137抗体的药物组合物的容器,以及有关向有需要的受试者施用单独或与另一种试剂组合的抗CD137抗体,以治疗该受试者的癌症、或延迟其癌症进展、或减少或抑制其肿瘤生长的说明书。

[1218] 使用方法

[1219] 本发明的组合物具有多种体外和体内效用,这些效用涉及CD137的检测和/或定量、和/或CD137功能的激动作用。

[1220] 上述组合物尤其可用于治疗或预防受试者的多种癌症的方法中。所述组合物可使用多种方法施用给受试者,例如人受试者,所述方法部分地取决于施用途径。该途径可以是例如静脉内注射或输注(IV)、皮下注射(SC)、腹膜内(IP)注射、肌肉内注射(IM)或鞘内注射(IT)。注射可以是推注或连续输注。

[1221] 施用可通过例如局部输注、注射或借助于植入物来实现。植入物可以是多孔、无孔或凝胶状材料,包括膜,如硅胶膜或纤维。植入物可被配置成用于将组合物持续或定期释放到受试者。参见例如美国专利申请公开号20080241223;美国专利号5,501,856、4,863,457和3,710,795;EP488401;以及EP 430539,其中每一种的公开内容以全文引用的方式并入本文中。组合物可借助于植入式装置递送给受试者,所述植入式装置基于例如扩散、可蚀解或对流系统,例如渗透泵、可生物降解的植入物、电扩散系统、电渗流系统、蒸气压泵、电解泵、泡腾泵(effervescent pump)、压电泵、基于侵蚀的系统或电机械系统。

[1222] 在一些实施方案中,通过局部施用将抗CD137抗体或其抗原结合片段治疗性递送给受试者。

[1223] 本文所述的抗体或其片段的适合剂量可取决于多种因素,包括例如待治疗的受试者的年龄、性别和体重以及所使用的特定抑制剂化合物,所述剂量能够治疗或预防受试者的癌症。例如,治疗患有癌症的受试者所需的全抗CD137抗体的剂量可不同于治疗同一位受试者所需的CD137结合Fab'抗体片段的剂量。影响施用给受试者的剂量的其它因素包括例如癌症的类型或严重程度。例如,患有转移性黑色素瘤的受试者需要施用的抗CD137的剂量可能不同于患有胶质母细胞瘤的受试者所需的剂量。其它因素可包括例如同时或先前影响受试者的其它医学病症、受试者的一般健康状况、受试者的遗传倾向、饮食、施用时间、排泄速率、药物组合以及施用给受试者的任何其它额外治疗剂。还应理解,任何特定受试者的具体剂量和治疗方案也将取决于医学从业人员(例如医生或护士)的判断。本文描述了适合的剂量。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体在高剂量和低剂量下都是有效的。

[1224] 药物组合物可包括治疗有效量的本文所述的抗CD137抗体或其抗原结合片段。本领域的普通技术人员部分地基于所施用抗体的作用,或在使用多于一种试剂情况下抗体和一种或多种额外活性剂的组合作用,可容易地测定此类有效量。本文所述的抗体或其片段的治疗有效量也可根据如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体(和一种或多种额外活性剂)在个体体内引起所希望的应答,例如肿瘤生长减少的能力之类因素而变化。例如,治疗有效量的抗CD137抗体可抑制和/或预防特定病症,和/或本领域已知的或本文所述的特定病症的任一种症状(减轻其严重程度或消除其发生)。治疗有效量也是治疗有益作用胜

过组合物的任何有毒或有害作用的量。

[1225] 任何本文所述抗体或其片段的适合人剂量可在例如I期剂量递增研究中进一步评价。参见例如van Gurp等人(2008)《美国移植杂志(Am J Transplantation)》8(8):17111718;Hanouska等人(2007)《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》13(2,第1部分):523531;以及Hetherington等人(2006)《抗微生物剂与化学疗法(Antimicrobial Agents and Chemotherapy)》50(10):3499-3500。

[1226] 在一些实施方案中,所述组合物含有本文所述的任何抗体或其抗原结合片段以及一种或多种(例如两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、10种、或11种或更多种)额外治疗剂,由此使组合物作为整体是治疗有效的。例如,一种组合物可含有本文所述的抗CD137抗体和烷基化剂,其中所述抗体和试剂各自呈当组合时在治疗上有效地治疗或预防受试者的癌症(例如黑色素瘤)的浓度。

[1227] 此类组合物的毒性和治疗功效可通过已知药物程序在细胞培养物或实验动物(例如本文所述的任何癌症的动物模型)中测定。这些程序可用于例如测定LD_{50}(使群体的50%致死的剂量)和ED_{50}(对群体的50%治疗有效的剂量)。有毒作用与治疗作用之间的剂量比是治疗指数,并且它可用比率LD_{50}/ED_{50}表示。展现出高治疗指数的抗体或其抗原结合片段是优选的。尽管可使用展现出有毒副作用的组合物,但应小心设计递送系统,该递送系统使此类化合物靶向受影响组织的部位并且使对正常细胞的潜在损害减到最小,并由此减少副作用。

[1228] 由细胞培养分析和动物研究获得的数据可用于配制用于人体的一系列剂量。此类抗体或其抗原结合片段的剂量一般在包括ED_{50}且具有极小毒性或无毒性的所述抗体或片段的循环浓度范围内。剂量可取决于所采用的剂型和所利用的施用途径而在此范围内变化。对于本文所述的抗CD137抗体,治疗有效剂量最初可由细胞培养分析估计。剂量可在动物模型中配制以实现循环血浆浓度范围,所述浓度范围包括如在细胞培养中测定的EC_{50}(即,实现对症状的半数最大抑制作用的抗体的浓度)。此类信息可用于更准确地测定在人体中的有用剂量。血浆中的水平可例如通过高效液相色谱法测量。在一些实施方案中,例如,当希望局部施用(例如施用至眼睛或关节)时,可使用细胞培养或动物模型来测定在局部部位内实现治疗有效浓度所需的剂量。

[1229] 在一些实施方案中,所述方法可与其它癌症疗法组合执行。例如,所述组合物可在放射、手术、靶向或细胞毒性化学疗法、化学放射疗法、激素疗法、免疫疗法、基因疗法、细胞移植疗法、精准医学、基因组编辑疗法或其它药物疗法的同时、之前或之后施用给受试者。

[1230] 如上所述,本文所述的组合物(例如抗CD137组合物)可用于治疗多种癌症,如但不限于:卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、成髓细胞早幼粒细胞粒单核细胞单核细胞性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病、慢性淋巴细胞性白血病、套细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)和边缘区B细胞淋巴瘤、真性红细胞增多症淋巴瘤、霍奇金氏病(Hodgkin'sdisease)、非霍奇金氏病、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特仑氏巨球蛋白血症、重链病、实体肿瘤、肉瘤和癌瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮细胞肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肿瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠肉瘤、结肠直肠癌、胰腺

癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、威尔姆氏肿瘤(Wilm's tumor)、子宫颈癌、子宫癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜细胞瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、鼻咽癌、食道癌、基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑和中枢神经系统(CNS)癌、子宫颈癌、绒毛膜癌、结肠直肠癌、结缔组织癌、消化系统癌症、子宫内膜癌、食道癌、眼癌、头颈癌、胃癌、上皮内瘤变、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌(小细胞、大细胞肺癌)、黑色素瘤、神经母细胞瘤;口腔癌(例如唇、舌、口和咽部癌症)、卵巢癌、胰腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌;呼吸系统癌症、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌以及泌尿系统癌症。

[1231] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体或其抗原结合片段可作为单药疗法施用给受试者。或者,如上所述,所述抗体或其片段可与另一种治疗,例如另一种癌症治疗一起作为组合疗法施用给受试者。例如,组合疗法可包括向受试者(例如人类患者)施用一种或多种额外试剂,所述一种或多种额外试剂向患有癌症或有风险发展癌症的受试者提供治疗益处。适于与本发明的组合物共同施用的化学治疗剂包括例如:紫杉醇(taxol)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、短杆菌肽D(gramicidin D)、溴化乙锭(ethidium bromide)、依米丁(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋水仙素(colchicin)、多柔比星(doxorubicin)、佐柔比星(daunorubicin)、二羟基蒽二酮(dihydroxyanthrancindione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光辉霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)和嘌呤霉素(puromycin),以及其类似物或同源物。另外的试剂包括例如抗代谢物(例如甲氨蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪(decarbazine))、烷基化剂(例如氮芥(mechlorethamine)、塞替哌(thioTEPA)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露糖醇(dibromomannitol)、链脲菌素(streptozotocin)、丝裂霉素C(mitomycin C)、顺二氯二胺铂(II)(DDP)、丙卡巴肼(procarbazine)、六甲蜜胺(altretamine)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、奈达铂(nedaplatin)、赛特铂(satraplatin)或四硝酸三铂(triplatin tetranitrate))、蒽环霉素(anthracycline)(例如佐柔比星(先前称为道诺霉素(daunomycin)和多柔比星)、抗生素(例如放线菌素D(先前称为放线菌素))、博来霉素(bleomycin)、光辉霉素和蒽环霉素(AMC))以及抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)和替莫唑胺(temozolomide)。在一些实施方案中,抗CD137抗体和一种或多种额外活性剂是同时施用。在其它实施方案中,首先施用抗CD137抗体,并且其次施用所述一种或多种额外活性剂。在一些实施方案中,首先施用所述一种或多种额外活性剂,并且其次施用抗CD137抗体。

[1232] 本文所述的抗CD137抗体或其抗原结合片段可替代或增强先前或当前施用的疗

法。例如,在用抗CD137抗体或其抗原结合片段治疗时,可停止或减少所述一种或多种额外活性剂的施用,例如以较低水平或剂量施用。在一些实施方案中,可维持先前疗法的施用。在一些实施方案中,先前疗法将维持直到抗CD137抗体的水平达到足以提供治疗作用的水平。所述两种疗法可组合施用。

[1233] 如本文所定义,监测受试者(例如人类患者)的癌症的改善意味着评价受试者的疾病参数的变化,例如肿瘤生长的减少。在一些实施方案中,所述评价是在施用后至少一(1)小时,例如至少2小时、4小时、6小时、8小时、12小时、24小时或48小时、或至少1天、2天、4天、10天、13天、20天或更长时间、或至少1周、2周、4周、10周、13周、20周或更长时间进行。受试者可在以下时期中的一个或多个进行评价:在治疗开始之前;在治疗期间;或在施用了治疗的一种或多种成分之后。评价可包括评价对进一步治疗的需求,例如评价是否应改变治疗的剂量、施用频率或持续时间。它还可以包括评价对增加或减少所选治疗方式的需求,例如增加或减少针对本文所述癌症的任何治疗。

[1234] 在一些实施方案中,施用本文所述的抗CD137抗体或其抗原结合片段以例如通过增加T细胞激活和/或增殖来调节患者体内的T细胞应答。CD137交联使T细胞增殖、IFNγ产生和分泌、以及T细胞的细胞溶解活性明显增强。因此,在一些实施方案中,将本公开的抗CD137激动剂抗体或其抗原结合片段施用给有需要的患者以诱导或增加T细胞激活,增强T细胞增殖,诱导IFNγ的产生和/或分泌,和/或诱导细胞溶解T细胞应答。

[1235] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体或其抗原结合片段可用于调节患者体内的T细胞群或将患者体内的T细胞群从T_H2/T_{reg} T细胞群转变成T_H1/T_H17T细胞群,由此改善或增强患者体内的抗肿瘤应答。研究显示,虽然CD137在Th1和Th2T细胞两种T细胞亚群中表达,但CD137在CD8+T细胞上的表达水平比在CD4+T细胞上的表达水平高。因此,CD137主要共刺激CD8+T细胞。因此,将本文所述的抗CD137抗体或其抗原结合片段施用给患者,例如通过调节患者体内的T细胞应答和/或T细胞群,或将患者体内的T细胞应答和/或T细胞群从T_H2/T_{reg} T细胞应答和或T细胞群转变成患者体内的T_H1/T_H17T细胞应答和/或T细胞群,由此增强抗肿瘤应答。

[1236] 在一些癌症(例如黑色素瘤和卵巢癌)中,可通过优化的细胞培养方法富集天然肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)并提供可用于过继性免疫疗法的肿瘤反应性淋巴细胞源。过继性TIL疗法可使某些类型癌症的持久肿瘤消退,这保证了针对癌症的基于TIL的方法的开发和优化。目前,由于抗原特异性CD8+T细胞水平较低和/或稀少,使得天然肿瘤反应性TIL的鉴别和扩增仍具有挑战性。T细胞的CD137表达是依赖于激活的,这提供了从循环或从肿瘤样品捕捉表达CD137的激活的T细胞的机会。因此,本文所述的抗CD137抗体或其抗原结合片段可用于选择性富集激活的抗原特异性T细胞。

[1237] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体的功效取决于有能力的免疫系统。确切地说,在一些实施方案中,耗尽CD4+T细胞、CD8+T细胞和/或自然杀伤细胞使抗CD137抗体的功效降低。在一些实施方案中,耗尽CD4+T细胞、CD8+T细胞和/或自然杀伤细胞使本文所述的抗CD137抗体的肿瘤生长抑制或减少作用降低。在一些实施方案中,耗尽CD4+T细胞、CD8+T细胞和/或自然杀伤细胞使本文所述的抗CD137抗体的肿瘤生长抑制或减少作用降低。在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体的功效取决于免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润。在一些实施方案中,免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润与对脾和/或肝中浸润的缺乏相

结合。

[1238] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体诱导保护性抗肿瘤记忆性免疫应答。记忆性T细胞是在遇到并响应于其同源抗原之后长期存在的抗原特异性T细胞亚群。此类细胞在再暴露于其同源抗原后迅速扩增至大量效应细胞。因此,在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体刺激产生针对癌症抗原的记忆性T细胞。在一些实施方案中,接受了本文所述的抗CD137抗体以治疗或治愈癌症的受试者将产生癌症特异性记忆性T细胞。在一些实施方案中,接受了本文所述的抗CD137抗体以治疗或治愈癌症的受试者在再暴露于癌症时产生抗肿瘤记忆性免疫应答。在一些实施方案中,抗肿瘤记忆性免疫应答包含刺激记忆性T细胞,使其变成效应细胞。在一些实施方案中,接受了本文所述的抗CD137抗体以治疗或治愈癌症的受试者将对癌症抗原产生抗肿瘤记忆性免疫应答。

[1239] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体在肿瘤微环境下诱导免疫重新编程。确切地说,在一些实施方案中,所述抗CD137抗体诱导免疫浸润;减少、抑制或防止Treg增殖;减少、抑制或防止肿瘤相关巨噬细胞增殖;以及保护或逆转T细胞耗竭。

[1240] 在一些实施方案中,所述抗CD137抗体诱导免疫细胞浸润至相关肿瘤微环境中。在一些实施方案中,所述抗CD137抗体使免疫细胞浸润增加至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少105%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%或至少150%。在一些实施方案中,通过测量从肿瘤微环境分离的细胞上CD45的表达水平来测定免疫细胞浸润。用于测量蛋白质表达的方法是本领域技术人员已知的并且描述于本文中。

[1241] 在一些实施方案中,抗CD137抗体防止或抑制肿瘤微环境中Treg细胞的增加。在一些实施方案中,防止或抑制是相对于在无抗CD137抗体存在下肿瘤微环境中Treg细胞的量。在一些实施方案中,对Treg细胞增加的防止或抑制是相对于参考抗体。在一些实施方案中,通过从肿瘤微环境分离的CD4+T细胞上CD25和FOX-3P的表达来检测Treg细胞。用于测量蛋白质表达的方法是本领域技术人员已知的并且描述于本文中。

[1242] 在一些实施方案中,抗CD137抗体防止或抑制肿瘤微环境中肿瘤相关巨噬细胞的增加。在一些实施方案中,防止或抑制是相对于在无抗CD137抗体存在下肿瘤微环境中肿瘤相关巨噬细胞的量。在一些实施方案中,对肿瘤相关巨噬细胞增加的防止或抑制是相对于参考抗体。在一些实施方案中,通过从肿瘤微环境分离的CD45+免疫细胞上CD11b和F4/80的表达来检测肿瘤相关巨噬细胞。用于测量蛋白质表达的方法是本领域技术人员已知的并且描述于本文中。

[1243] 在一些实施方案中,抗CD137抗体保护T细胞免于在肿瘤微环境中发生T细胞耗竭。在一些实施方案中,抗CD137抗体逆转肿瘤微环境中的T细胞耗竭。在一些实施方案中,相对于在无抗CD137抗体存在下的肿瘤微环境,在本文所述的抗CD137抗体存在下肿瘤微环境中的T细胞耗竭减少。在一些实施方案中,T细胞耗竭通过分析CD8+T细胞或CD4+T细胞中共抑制受体(例如PD-1、TIGIT或LAG-3)的表达来测定T细胞耗竭。在一些实施方案中,通过从肿瘤微环境中分离的CD4+或CD8+T细胞上PD-1和TIGIT的表达来检测T细胞耗竭。

[1244] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD137抗体或其抗原结合片段可用于检测和/或

定量生物样品中的人CD137的方法中。因此,本文所述的抗CD137抗体或其抗原结合片段被用于诊断、预测和/或测定患者疾病(例如癌症)的进展。

[1245] 其它实施方案

[1246] E1.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含选自由以下组成的组的重链和轻链CDR:

[1247] (a)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1248] (b)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:70、79和90中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1249] (c)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:71、80和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1250] (d)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:72、81和92中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1251] (e)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:73、82和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1252] (f)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:74、83和93中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1253] (g)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:75、84和91中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1254] (h)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:74、85和94中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1255] (i)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:76、86和95中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1256] (j)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:77、87和93中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1257] (k)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、88和90中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1258] (l)分别如SEQ ID NO:49、57和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1259] (m)分别如SEQ ID NO:49、58和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1260] (n)分别如SEQ ID NO:49、59和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1261] (o)分别如SEQ ID NO:49、60和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1262] (p)分别如SEQ ID NO:50、61和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1263] (q)分别如SEQ ID NO:50、58和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1264] (r)分别如SEQ ID NO:51、62和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1265] (s)分别如SEQ ID NO:52、63和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1266] (t)分别如SEQ ID NO:50、64和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1267] (u)分别如SEQ ID NO:50、65和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1268] (v)分别如SEQ ID NO:51、108和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1269] (w)分别如SEQ ID NO:107、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;以及

[1270] (x)分别如SEQ ID NO:48、56和68中示出的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,以及分别如SEQ ID NO:109、110和92中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[1271] E2.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、101和103;并且其中所述轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46和105。

[1272] E3.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

[1273] E4.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[1274] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;

[1275] (b)分别地SEQ ID NO:4和28;

[1276] (c)分别地SEQ ID NO:4和30;

[1277] (d)分别地SEQ ID NO:4和32;

[1278] (e)分别地SEQ ID NO:4和34;

[1279] (f)分别地SEQ ID NO:4和36;

[1280] (g)分别地SEQ ID NO:4和38;

[1281] (h)分别地SEQ ID NO:4和40;

[1282] (i)分别地SEQ ID NO:4和42;

[1283] (j)分别地SEQ ID NO:4和44;

[1284] (k)分别地SEQ ID NO:4和46;

[1285] (l)分别地SEQ ID NO:8和6;

[1286] (m)分别地SEQ ID NO:10和6;

[1287] (n)分别地SEQ ID NO:12和6;

[1288] (o)分别地SEQ ID NO:14和6;

[1289] (p)分别地SEQ ID NO:16和6;

[1290] (q)分别地SEQ ID NO:18和6;

[1291] (r)分别地SEQ ID NO:20和6;

[1292] (s)分别地SEQ ID NO:22和6;

[1293] (t)分别地SEQ ID NO:24和6;

[1294] (u)分别地SEQ ID NO:26和6;

[1295] (v)分别地SEQ ID NO:101和6;

[1296] (w)分别地SEQ ID NO:103和6;以及

[1297] (x)分别地SEQ ID NO:4和105。

[1298] E5.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、101和103;并且其中所述轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46和105。

[1299] E6.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:

[1300] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;

[1301] (b)分别地SEQ ID NO:4和28;

[1302] (c)分别地SEQ ID NO:4和30;

[1303] (d)分别地SEQ ID NO:4和32;

[1304] (e)分别地SEQ ID NO:4和34;

[1305] (f)分别地SEQ ID NO:4和36;

[1306] (g)分别地SEQ ID NO:4和38;

[1307] (h)分别地SEQ ID NO:4和40;

[1308] (i)分别地SEQ ID NO:4和42;

[1309] (j)分别地SEQ ID NO:4和44;

[1310] (k)分别地SEQ ID NO:4和46;

[1311] (l)分别地SEQ ID NO:8和6;

[1312] (m)分别地SEQ ID NO:10和6;

[1313] (n)分别地SEQ ID NO:12和6;

[1314] (o)分别地SEQ ID NO:14和6;

[1315] (p)分别地SEQ ID NO:16和6;

[1316] (q)分别地SEQ ID NO:18和6;

[1317] (r)分别地SEQ ID NO:20和6;

[1318] (s)分别地SEQ ID NO:22和6;

[1319] (t)分别地SEQ ID NO:24和6;

[1320] (u)分别地SEQ ID NO:26和6;

[1321] (v)分别地SEQ ID NO:101和6;

[1322] (w)分别地SEQ ID NO:103和6;以及

[1323] (x)分别地SEQ ID NO:4和105。

[1324] E7.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

[1325] E8.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX,其中X是任何氨基酸。

[1326] E9.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX,其中X是任何氨基酸。

[1327] E10.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX,其中X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[1328] E11.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX,其中X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[1329] E12.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX,其中X是任何氨基酸,并且其中残基D95、L100、Y100E、Y100G、Y100H或其组合的突变引起与人CD137的结合丧失。

[1330] E13.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX,其中X是任何氨基酸,并且其中残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合的突变引起与人CD137的结合减少。

[1331] E14.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX,其中X是任何氨基酸,并且其中残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合突变成除丙氨酸外的任何残基引起与人CD137的结合增加。

[1332] E15.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体,或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR,其中重链CDR3包含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$,其中$X_1$是任何氨基酸,其中$X_2$是非极性氨基酸,其中$X_3$是非极性氨基酸,其中$X_4$是任何氨基酸,其中$X_5$是极性氨基酸,其中$X_6$是任何氨基酸,其中$X_7$是任何氨基酸,其中$X_8$是极性氨基酸,其中$X_9$是极性氨基酸,并且其中$X_{10}$是任何氨基酸。

[1333] E16.根据实施方案15所述的分离的单克隆抗体,其中X_2是脯氨酸,其中X_3是苯丙氨酸或色氨酸,其中X_5是天冬氨酸或谷氨酸,其中X_8是酪氨酸,并且其中X_9是酪氨酸。

[1334] E17.根据实施方案8至16中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,

其中所述抗体或其抗原结合部分与mAb1交叉竞争。

[1335] E18.根据实施方案8至16中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分与mAb1、mAb8或mAb10交叉竞争。

[1336] E19.根据实施方案8至18中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分至少包含mAb1的功能特性。

[1337] E20.根据实施方案8至18中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分至少包含mAb1、mAb8或mAb10的功能特性。

[1338] E21.根据实施方案8至20中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分具有至少等于mAb1的K_D值。

[1339] E22.根据实施方案8至20中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分具有至少等于mAb1、mAb8或mAb10的K_D值。

[1340] E23.一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中当结合至人CD137时，所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分结合至由mAb1或mAb1的抗原结合片段所结合的氨基酸残基中的至少一个。

[1341] E24.一种特异性结合至人CD137的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中当结合至人CD137时，所述分离的单克隆抗体或其抗原结合部分：(i)结合至由mAb1或mAb1的抗原结合片段所结合的氨基酸残基中的至少一个，以及(ii)使人CD137激动。

[1342] E25.根据实施方案23至24中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中构成所述抗体所结合的表位的氨基酸残基位于构成mAb1抗体的互补位的氨基酸残基的4埃范围内。

[1343] E26.根据实施方案23至25中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体所结合的表位的突变抑制、减少或阻断与所述抗体和与抗体mAb1两者的结合。

[1344] E27.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体，或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分以约40100nM的亲和力(K_D)结合人CD137。

[1345] E28.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体，或其抗原结合部分，其中

[1346] (i)所述抗体或抗原结合部分以约40100nM的亲和力(K_D)结合人CD137；以及

[1347] (ii)所述抗体或抗原结合部分包含重链CDR3，所述重链CDR3包含氨基酸序列DXXXXLXXXXYXYYX，其中X是任何氨基酸。

[1348] E29.一种特异性结合人CD137的分离的单克隆抗体，或其抗原结合部分，其中

[1349] (i)所述抗体或抗原结合部分以约40-100nM的亲和力(K_D)结合人CD137；以及

[1350] (ii)所述抗体或抗原结合部分包含重链CDR3，所述重链CDR3包含氨基酸序列$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$，其中$X_1$是任何氨基酸，其中$X_2$是非极性氨基酸，其中$X_3$是非极性氨基酸，其中$X_4$是任何氨基酸，其中$X_5$是极性氨基酸，其中$X_6$是任何氨基酸，其中$X_7$是任何氨基酸，其中$X_8$是极性氨基酸，其中$X_9$是极性氨基酸，并且其中$X_{10}$是任何氨基酸。

[1351] E30.根据实施方案27所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链CDR3，所述重链CDR3包含氨基酸序列DXPFXLDXXYYYYYX，其中X是任何氨基酸。

[1352] E31.根据实施方案28至30中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，

其中所述重链CDR3的残基D95、L100、Y100E、Y100G、Y100H或其组合的突变引起与人CD137的结合丧失。

[1353] E32.根据实施方案28至31中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合突变成丙氨酸引起与人CD137的结合减少。

[1354] E33.根据实施方案28至31中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中残基P97、F98、D100A、Y100D、Y100F或其组合突变成除丙氨酸外的任何残基引起与人CD137的结合增加。

[1355] E34.根据实施方案28和29至33中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中X是除丙氨酸外的任何氨基酸。

[1356] E35.根据实施方案29和31至33中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中X_2是脯氨酸，其中X_3是苯丙氨酸或色氨酸，其中X_5是天冬氨酸或谷氨酸，其中X_8是酪氨酸，并且其中X_9是酪氨酸。

[1357] E36.根据前述实施方案中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分以约45-95nM、50-90nM、5585nM、6080nM、6575nM、5575nM、4070nM、5080nM或6090nM的亲和力(K_D)结合人CD137。

[1358] E37.根据实施方案27至36中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链CDR，其中重链CDR3包含SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

[1359] E38.根据实施方案27至37中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分包含选自由以下组成的组的重链和轻链CDR：

[1360] (a)分别如SEQ ID NO:48、56和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；以及

[1361] (b)分别如SEQ ID NO:51、108和68中所示的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别如SEQ ID NO:69、78和89中所示的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[1362] E39.根据实施方案27至37中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含选自由SEQ ID NO:4和101组成的组的氨基酸序列；并且其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[1363] E40.根据实施方案27至37中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：

[1364] (a)分别地SEQ ID NO:4和6；以及

[1365] (b)分别地SEQ ID NO:101和6。

[1366] E41.根据实施方案27至37中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区包含与选自由SEQ ID NO:4和101组成的组的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列；并且其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列。

[1367] E42.根据实施方案27至37中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可

变区包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列至少90％相同的氨基酸序列：

[1368] (a)分别地SEQ ID NO:4和6;以及

[1369] (b)分别地SEQ ID NO:101和6。

[1370] E43.根据前述实施方案中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分特异性结合至人CD137并使其激动。

[1371] E44.根据前述实施方案中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分展现出以下特性中的至少一种或多种：

[1372] (a)诱导或增强CD137三聚体的二聚化；

[1373] (b)诱导或增强CD137三聚体的多聚化；

[1374] (c)诱导或增强人CD137介导的T细胞激活；

[1375] (d)诱导或增强人CD137介导的细胞毒性T细胞应答；

[1376] (e)诱导或增强人CD137介导的T细胞增殖；

[1377] (f)诱导或增强人CD137介导的细胞因子产生；

[1378] (g)不显著诱导或增强肝内和/或脾内T细胞激活和/或T细胞增殖；

[1379] (h)以1×10^{6}或更低的平衡解离常数K_D结合至人CD137;或

[1380] (i)特性(a)-(h)的任何组合。

[1381] E45.根据实施方案44所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分诱导或增强肿瘤微环境中人CD137介导的T细胞激活,但不会显著诱导或增强脾和/或肝中人CD137介导的T细胞激活。

[1382] E46.根据实施方案44所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分诱导或增强肿瘤微环境中人CD137介导的细胞毒性T细胞应答,但不会显著诱导或增强脾和/或肝中人CD137介导的细胞毒性T细胞应答。

[1383] E47.根据实施方案44所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分诱导肿瘤微环境中人CD137介导的T细胞增殖,但不会显著诱导脾和/或肝中人CD137介导的T细胞增殖。

[1384] E48.根据实施方案44所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合片段诱导或增强肿瘤微环境中人CD137介导的细胞因子产生,但不会显著诱导或增强脾和/或肝中人CD137介导的细胞因子产生。

[1385] E49.根据实施方案44至48中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分的特性不依赖于Fc受体结合。

[1386] E50.根据实施方案44至49中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分的特性通过Fc受体结合而增强。

[1387] E51.根据前述实施方案中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分与食蟹猕猴CD137和/或小鼠CD137交叉反应。

[1388] E52.一种结合至人CD137的激动性分离的单克隆抗体,所述激动性分离的单克隆抗体展现出以下特性中的至少一种：

[1389] (a)诱导或增强人CD137三聚体的二聚化；

[1390] (b)诱导或增强人CD137三聚体的多聚化；

[1391] (c)诱导或增强肿瘤微环境中人CD137介导的T细胞激活,但不会显著诱导或增强

脾和/或肝中人CD137介导的T细胞激活;

[1392] (d)诱导或增强肿瘤微环境中人CD137介导的细胞毒性T细胞应答,但不会显著诱导或增强脾和/或肝中人CD137介导的细胞毒性T细胞应答;

[1393] (e)诱导或增强肿瘤微环境中人CD137介导的细胞因子产生,但不会显著诱导或增强脾和/或肝中人CD137介导的细胞因子产生;

[1394] (f)诱导或增强肿瘤微环境中人CD137介导的T细胞增殖,但不会显著诱导或增强脾和/或肝中人CD137介导的T细胞增殖;

[1395] (g)以1×10^{6}或更低的平衡解离常数K_D结合至人CD137;或

[1396] (h)特性(a)-(g)的任何组合。

[1397] E53.根据前述实施方案中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体选自由以下组成的组:IgG1、IgG2和IgG3、IgG4、和IgM、和IgA1、和IgA2、和IgD、以及IgE抗体。

[1398] E54.根据实施方案53所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是IgG1抗体或IgG4抗体。

[1399] E55.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据前述实施方案中任一项的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,以及药学上可接受的载体。

[1400] E56.一种核酸,所述核酸包含编码根据实施方案1至54中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分的轻链、重链、或轻链和重链两者的核苷酸序列。

[1401] E57.一种表达载体,所述表达载体包含根据实施方案56所述的核酸。

[1402] E58.一种细胞,所述细胞用根据实施方案57所述的表达载体转化。

[1403] E59.一种用于产生特异性结合人CD137的单克隆抗体或其抗原结合部分的方法,所述方法包括在允许所述单克隆抗体或其抗原结合部分表达的条件下维持根据实施方案58所述的细胞。

[1404] E60.根据实施方案59所述的方法,所述方法还包括获得所述单克隆抗体或其抗原结合部分。

[1405] E61.一种用于诱导或增强受试者体内人CD137三聚体的二聚化的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1至54中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或根据实施方案55所述的药物组合物。

[1406] E62.一种用于诱导或增强受试者体内人CD137三聚体的多聚化的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1至54中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或根据实施方案55所述的药物组合物。

[1407] E63.一种用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的T细胞激活的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1至54中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或者根据实施方案55所述的药物组合物。

[1408] E64.根据实施方案63所述的方法,其中所述T细胞激活在肿瘤微环境中发生。

[1409] E65.根据实施方案63所述的方法,其中所述T细胞激活在所述受试者的脾和/或肝中不会显著发生。

[1410] E66.一种用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的细胞毒性T细胞应答的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1至54中任一项所述的分离的

单克隆抗体或其抗原结合部分,或根据实施方案55所述的药物组合物。

[1411] E67.根据实施方案66所述的方法,其中所述细胞毒性T细胞应答在肿瘤微环境中发生。

[1412] E68.根据实施方案66所述的方法,其中所述细胞毒性T细胞应答在所述受试者的脾和/或肝中不会显著发生。

[1413] E69.一种用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的细胞因子产生的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1至54中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或根据实施方案55所述的药物组合物。

[1414] E70.根据实施方案69所述的方法,其中所产生的细胞因子是IL-2、TNFα、IL-13、IFNγ或其组合。

[1415] E71.根据实施方案69或实施方案70所述的方法,其中所述细胞因子产生在肿瘤微环境中发生。

[1416] E72.根据实施方案69或实施方案70所述的方法,其中所述细胞因子产生在所述受试者的脾和/或肝中不会显著发生。

[1417] E73.一种用于诱导或增强受试者体内人CD137介导的T细胞增殖的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1至54中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或根据实施方案55所述的药物组合物。

[1418] E74.根据实施方案73所述的方法,其中所述T细胞增殖在肿瘤微环境中发生。

[1419] E75.根据实施方案73所述的方法,其中所述T细胞增殖在所述受试者的脾和/或肝中不会显著发生。

[1420] E76.一种用于减少或抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1至54中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或根据实施方案55所述的药物组合物。

[1421] E77.一种用于治疗受试者的人CD137介导的病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1至54中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或根据实施方案55所述的药物组合物。

[1422] E78.一种用于治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1至54中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,或根据实施方案55所述的药物组合物。

[1423] E79.根据实施方案78所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:黑色素瘤、神经胶质瘤、肾癌以及头颈癌。

[1424] E80.根据实施方案76至79中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合部分结合FcγR。

[1425] E81.根据实施方案76至80中任一项所述的方法,其中CD4+T细胞、CD8+T细胞、自然杀伤细胞或其组合的耗尽使所述抗体或其抗原结合部分的功效降低。

[1426] E82.一种用于检测生物样品中人CD137的存在或不存在的方法,所述方法包括:

[1427] (i)使生物样品与根据实施方案1至54中任一项所述的抗体接触,其中所述抗体用可检测物质标记;以及

[1428] (ii)检测结合至人CD137的所述抗体,由此检测所述生物样品中人CD137的存在或

不存在。

[1429] 实施例

[1430] 虽然已参照具体实施方案描述了本公开,但本领域的技术人员应理解,在不脱离本公开的真实精神和范围的情况下,可以进行各种改变并且等效物可被取代。另外,可进行许多修改以适应本公开的目标、精神和范围的特定情况、材料、物质组合物、方法、一个或多个方法步骤。所有此类修改都意图在本公开的范围内。

[1431] 实施例1:在酵母中产生的合成人单克隆抗体展现与重组人CD137的结合

[1432] 使用EZLink磺基NHS生物素化试剂盒(Thermo Scientific)使纯化的CD137蛋白质抗原生物素化。将CD137抗原浓缩至约1mg/mL,并将缓冲液交换成PBS,随后添加1:7.5摩尔比的生物素化试剂(EZ-Link磺基-NHS-生物素化试剂盒,Thermo Scientific,目录号21425)。将混合物在4℃下保持过夜,随后再进行缓冲液交换以去除溶液中的游离生物素。通过抗生蛋白链菌素传感器结合ForteBio上标记的蛋白质来确定生物素化。根据制造商的指南,通过与ForteBio Octet™ Red384干涉仪(加利福尼亚州门洛帕克(Menlo Park,CA)的Pall ForteBio)上安装的抗生蛋白链菌素连接的生物传感器可检测结合来确定CD137蛋白质抗原的成功生物素化(数据未示出)。

[1433] 如先前所述(参见例如WO2009036379;WO2010105256;WO2012009568;Xu等人,《蛋白质工程、设计与精选(Protein Eng Des Sel.)》2013年10月;26(10):663-70),设计、产生并繁殖八个天然人合成酵母基抗体文库,每个抗体文库具有约10^9多样性。使用针对生物素化人CD137Fc融合物的八个天然文库执行八次平行选择。

[1434] 对于前两轮选择,基本上如所述(Siegel等人,《免疫学方法(JImmunol Methods.)》2004年3月;286(1-2):141-53),利用Miltenyi MACS系统执行磁珠分选技术。简单点说,在室温下,在含0.1% BSA的FACS洗涤缓冲液PBS中,将酵母细胞(约10^{10}个细胞/文库)与10mL的10nM生物素化人CD137Fc融合抗原一起培育15分钟。在用50mL冰冷的洗涤缓冲液洗涤一次后,使细胞沉淀物再悬浮于40mL洗涤缓冲液中,并将500μl抗生蛋白链菌素微珠(Streptavidin MicroBeads)(德国贝吉施格拉德巴赫(Bergisch Gladbach,Germany)的Miltenyi Biotec,目录号130-048-101)添加至酵母中,并在4℃下培育15分钟。接下来,使酵母沉淀,再悬浮于5mL洗涤缓冲液中并将其装载至MACS LS柱(德国贝吉施-格拉德巴赫的Miltenyi Biotec,目录号130-042-401)上。在装载5mL之后,用3mL FACS洗涤缓冲液洗涤柱三次。然后,将柱从磁场移出,并用5mL生长培养基洗脱酵母,随后使其生长过夜。

[1435] 在两轮MACS之后,使用流式细胞术(FACS)执行三轮分选,FACS描述于以下三个段落中。

[1436] 在Fc抗原存在下采用8次平行选择的选择策略

[1437] 通过三轮FACS选择,从MACS选择获得八个文库。使每个文库约1×10^8个酵母沉淀,用洗涤缓冲液洗涤三次,并在室温下,使其分别与10nM生物素化人CD137-Fc融合抗原和10nM生物素化鼠类CD137Fc融合抗原一起培育10分钟。然后,将酵母洗涤两次,并用1:100稀释的山羊抗人$F(ab')_2$κFITC(阿拉巴马州伯明翰(Birmingham,Alabama)的Southern Biotech,目录号206202),以及二次试剂1:500稀释的抗生蛋白链菌素-Alexa Fluor 633(纽约州格兰德岛(Grand Island,NY)的Life Technologies,目录号S21375)或1:50稀释的埃曲阿维汀藻红蛋白(Extravidinphycoerthyrin)(圣路易斯(St Louis)的Sigma-

Aldrich,目录号E4011)染色,在4℃下保持15分钟。在用冰冷的洗涤缓冲液洗涤两次之后,使细胞沉淀物再悬浮于0.4mL洗涤缓冲液中并转移至过滤器封盖的分选管中。使用FACS ARIA分选器(BD Biosciences)执行分选,并确定分选门以仅选择CD137结合。来自第一轮FACS的鼠类和人选择的群体进入下一轮中。

[1438] 针对以上选择的群体进行的第二轮和第三轮FACS涉及针对与人和/或鼠类CD137试剂的结合物的阳性分选;或减少多特异性试剂结合物的阴性分选(Xu等人,PEDS.2013年10月;26(10):66370)。取决于特异性选择输出的多特异性结合或靶结合的量,先进行阳性分选,随后阴性分选,或反之亦然,以富集具有有限量多特异性结合的完整结合群体。另外,利用来自文献的对照mAb执行竞争选择。对于竞争选择,将mAb4(乌瑞鲁单抗;Bristol-Myers Squibb;CAS编号:934823491)和mAb5(乌托米单抗;Pfizer;CAS编号:1417318274)与生物素化人CD137Fc融合物形成预复合物。在FACS上选择在对照mAb存在下结合和不结合的抗体。将这些轮的输出涂板,并拣选出分离株以进行测序和表征。

[1439] 在原初选择中鉴别的克隆的亲和力成熟

[1440] 使用针对生物素化人CD137Fc融合输出进行第一轮FACS分选得到的重链来制备轻链多样化文库,再进行四轮选择。这几轮选择中的第一轮利用了与作为抗原的10nM生物素化人CD137-Fc融合物缀合的Miltenyi MACs珠粒。

[1441] 在MACs珠粒选择后,执行三轮FACS分选。这几轮中的第一轮使用了10nM的生物素化人CD137Fc融合物。如上文所述,关于上述的第二轮FACS涉及针对与小鼠CD137试剂的结合物的阳性分选、与先前提到的对照mAb的竞争分选或用以减少多特异性试剂结合物的阴性分选。使用10nM生物素化鼠类CD137Fc融合物或50nM生物素化人单体CD137进行第三轮和最后一轮FACS选择。从上述每一轮FACS选择拣选出单个集落进行测序表征。

[1442] IgG和Fab制造和纯化

[1443] 使酵母克隆生长至饱和,随后在30℃下,在振荡下诱导48小时。诱导后,使酵母细胞沉淀并收集上清液进行纯化。使用蛋白质A柱纯化IgG并用pH 2.0乙酸洗脱。通过木瓜蛋白酶消化产生Fab片段,并通过CaptureSelect IgG-CH1亲和基质(LifeTechnologies,目录号1943200250)上纯化。

[1444] 实施例2:针对重组CD137的人抗CD137抗体的表位分组和其亲和力测定

[1445] 使用标准夹心式分组分析,在Forte Bio Octet Red384系统(加利福尼亚州门洛帕克的Pall Forte Bio Corporation)上对实施例1中分离的抗体执行表位分组。将CD137对照抗体IgG装载至AHQ传感器上,并用不相关的人IgG1抗体阻断传感器上未被占用的Fc结合位点。然后,使传感器暴露于100nM靶抗原,随后使其暴露于如实施例1中所述鉴别的分离的抗体。使用ForteBio的数据分析软件7.0处理数据。在抗原缔合后第二抗体的额外结合指示未被占用的表位(非竞争剂),而没有结合指示表位阻断(竞争剂)(数据未示出)。

[1446] 在ForteBio Octet上,通过测量动力学常数(k_a、k_d、K_D)测定CD137抗体的亲和力。大体上如先前所述(Estep等人,MAbs.20135(2):2708),测量ForteBio亲和力。简单点说,通过将抗体(IgG)在线装载到AHQ传感器上来测量ForteBio亲和力。在分析缓冲液中离线平衡传感器30分钟,然后在线监测60秒以确定基线。为进行结合测量,使装载有IgG的传感器暴露于100nM抗原(人、食蟹猕猴或鼠类CD137)3分钟,然后将其转移到分析缓冲液中,保持3分钟,以测量解离速率。通过将人CD137-Fc融合物装载于AHQ传感器上,随后暴露于含200nM抗

体Fab的溶液,获得单价结合测量值。在由ForteBio提供的数据分析软件中,使用1:1结合模型拟合动力学数据(数据未示出)。

[1447] 还评估了关于抗体是否是配体阻断抗体的测定。确切地说,在Octet HTX(ForteBio)上并且在无标记MX96SPRi(Caterra)上执行配体阻断实验。在Octet传感器或MX96芯片传感器上捕捉mAb1。将CD137和CD137L依序施加至预先装载mAb1的传感器上。在暴露于CD137L后应答的增加指示了mAb1与CD137L之间关于与CD137结合无竞争。另一方面,信号没有变化指示有竞争,对照抗体mAb5正是这种情况。mAb1不抑制CD137L与CD137的结合(数据未示出),并因此被视为非配体阻断抗体。

[1448] 实施例3:亲和力成熟的抗CD137抗体的结合亲和力分布

[1449] 使用2个突变体文库产生亲和力成熟的抗CD137抗体。第一个文库在重链中含有突变并且第二个文库在轻链中含有突变,其中产生轻链CDR1、CDR2和CDR3中的供体多样性。突变体文库通过3轮噬菌体淘选,目的是增加亲和力并维持与小鼠CD137的交叉反应性。在每一轮中,在最初结合至生物素化抗原后,采用解离速率竞争步骤(即,在37℃下与过量未标记的抗原或亲本IgG一起培育1小时)。

[1450] 绘制由数轮不同选择得到的抗CD137抗体的k_d/k_a双对数图。在SPRi读取器(MX96,Carterra)上,在PBST 0.01%操作缓冲液中测定表观缔合和解离动力学速率常数(k_a和k_d值)。将抗人CD137抗体共价印于在CFM(Carterra)上的羧甲基葡聚糖水凝胶50L芯片(Xantec bioanalytics)上。使用新鲜混合的激活试剂(150ml的0.4M EDC和150ml的0.1M SuloNHS的H2O溶液)激活SPR基底的表面,保持7分钟。使用含10mg/ml抗体的乙酸缓冲液pH 4.5印刷15分钟。然后,在SPRi读取器(MX96,Carterra)上,用1M乙醇胺淬灭印刷的芯片15分钟。对于动力学分析,依序注射纯化的重组his标记的人CD137(0、2.05、5.12、12.8、32、80、200、500nM)。对于每种浓度,有5分钟缔合,随后是10分钟的解离。在SPR Inspection Tool and Scrubber软件中处理并分析数据。引用具有间隙引用点的动力学数据并且被双引用到缓冲周期,然后全局拟合至1:1结合模型,以确定其表观缔合和解离动力学速率常数(k_a和k_d值)。使用比率k_d/k_a得出每一抗原/mAb相互作用的K_D值,即$K_D=k_d/k_a$。

[1451] K_D(k_d/k_a)介于10-20nM之间的抗体显示为直立三角形,而K_D低于10nM的抗体显示为倒置三角形(图1)。仅重链(顶图)或仅轻链(底图)亲和力成熟均使得分离出结合亲和力高于亲本抗体(mAb1)的抗CD137抗体(图1)。mAb1的重链和轻链可变区分别如SEQ ID NO:4和6中所示。

[1452] 实施例4:包含抗CD137抗体的重链CDR3(CDRH3)的关键结合残基的鉴别

[1453] 为了确定CDRH3内对于mAb1与小鼠和人CD137多肽的结合至关重要的氨基酸残基,执行丙氨酸扫描。产生编码mAb1开放阅读框的衍生物的一组多核苷酸,其中每一衍生物在构成CDRH3的野生型氨基酸残基位置处含有单一丙氨酸残基取代。通过用丙氨酸密码子GCC置换野生型密码子,使SEQ ID NO:4中的位置D95至M100I分别突变为丙氨酸。每种mAb1丙氨酸取代的衍生物中每个CDRH3的氨基酸序列示于SEQ ID NO:111125中。通过Gibson Assembly将编码15种mAb1丙氨酸取代的衍生物中每一种的多核苷酸分别克隆到表达载体(无糖基化IgG1,DID2600)中。使用本领域中已知的标准技术表达并纯化每种mAb1丙氨酸取代的衍生物。通过对人CD137(hUcD137)使用Wasatch SPR动力学测量,或对小鼠CD137(mCD137)使用平衡细胞结合分析来测定每种mAb1丙氨酸取代的衍生物对人和小鼠CD137的

结合亲和力。

[1454] 表1提供了每种突变体的解离常数(K_D)计算值。当表中标示“弱”时,存在高于背景值但在曲线拟合中没有足够置信度的可测量的结合,以分配准确的K_D值。在表1中,“NB”表示,在结合亲和力测定期间未观察到结合(no binding),并且指示CDRH3中使抗体不结合至CD137的丙氨酸取代。

[1455] 表1:针对人和小鼠CD137的丙氨酸扫描克隆的结合亲和力(K_D)

[1456]

取代	huCD137	mCD137	取代	huCD137	mCD137
D95A	NB	NB	Y(100C)A	1nM	25nM
S96A	1.8nM	40nM	Y(100D)A	弱	170nM
P97A	弱	弱	Y(100E)A	NB	NB
F98A	.弱	.弱	Y(100F)A	弱	弱
L99A	2.7nM	33nM	Y(100G)A	NB	NB
L100A	NB	NB	Y(100H)A	NB	NB
D(100A)A	弱	.弱	M(100I)A	1.8nM	21nM
D(100B)A	1.3nM	54nM	WT K_D	1nM	11nM

[1457] 由突变成丙氨酸引起的结合亲和力的保持、减弱或损失表明有关CD137结合所需的残基以及容许突变的残基的确定。图2概述在每个位置具有指定野生型氨基酸同一性的CDRH3的丙氨酸扫描的结合数据。如所示,CDRH3位置基于所述位置突变为丙氨酸的影响来进行颜色编码。这一分析产生以下共同序列:**DX*PF*XL*D*XX*Y*Y*Y*YX**。当共同序列中的粗体残基突变为丙氨酸时,结合完全丧失,并因此,这些残基是mAb1与CD137结合必需的。当共同序列中的斜体残基突变为丙氨酸时,所述抗体仍能够结合CD137,但具有较弱亲和力,指示这些残基在结合中起到部分作用,但不是绝对必要的。当共同序列中用X表示的残基位置突变为丙氨酸时,结合亲和力几乎没有变化。因此,这些残基容许突变并且对于结合相互作用并不重要。

[1458] 实施例5:通过扫描饱和诱变和同源比较进行的表位定位

[1459] 通过扫描饱和诱变文库和同源比较对CD137表位执行功能定位以鉴别对于抗体结合至CD137至关重要的残基。产生在所有残基位置单点突变引起除半胱氨酸外的每一可能的氨基酸取代的CD137突变体的组合文库,并测试其结合至mAb1、mAb4和mAb5的能力。由商业供应商合成由编码CD137的每个点突变体的基因组成的文库,并将其克隆到哺乳动物展示表达载体中。使用哺乳动物展示来呈递变体人CD137胞外域的文库,其中每个变体相对于野生型人CD137具有至少一个点突变。

[1460] 用非重叠抗体(i)mAb4和mAb1或(ii)mAb4和mAb5对展示CD137变体的细胞文库染色。通过FACS富集与一种抗体的结合减少但不与另一种抗体结合的细胞群。通过Illumina测序对每个群进行测序,以鉴别特异性破坏与每种抗体的结合但不影响CD137的正确折叠或与非重叠抗体结合的位置的突变。

[1461] 对于mAb1,K114被鉴别为对与CD137结合至关重要的最重要残基,其中观察到所有突变中有34%出现在该位置,并且观察到所有氨基酸取代。E111、T113和P135对于结合也很重要,其中在这些位置中的每一个中观察到所述突变的10%。另外,在群体中观察到N126和I132,其使与mAb1的结合部分减少。图3A显示构成mAb1、mAb4和mAb5的表位的残基。mAb4和

mAb5具有不同于mAb1的结合表位。对于mAb4,N42是最重要的残基,其中在该位置观察到所有突变中的50％,随后是R41和D38。对于mAb5,I132是最重要的,其中所有突变中的32％出现在该位置,随后是N126、G96、K114和L95。

[1462] 从文库筛选分离的点突变体表达为可溶性蛋白质并测试其与mAb1的结合。在K114处测试的全部4种突变(R、E、N、T)消除与mAb1的结合。在T113和P135处的突变也破坏结合。在E111处的2种点突变体中的1种、在N126处的3种突变体中的1种以及在I132处的4种突变体中的1种显示不结合。同样,在N42处的3种突变体中的3种都不结合至mAb4,并且在I132处的4种突变体中的3种不结合至mAb5。

[1463] 另外,测试CD137同源物与mAb1的结合。mAb1能够结合至小鼠CD137,但不结合至大鼠CD137,如图3B中所示。为了确定小鼠CD137与大鼠CD137之间构成mAb1表位的残基的差异,将来自人、食蟹猕猴、大鼠和小鼠的CD137同源物的氨基酸序列对准以进行比较。构成mAb1表位的所有氨基酸残基存在于人、食蟹猕猴和小鼠中,但不存在于大鼠中。人CD137序列中的赖氨酸114(K114)以及食蟹猕猴和小鼠CD137序列中的对应赖氨酸是大鼠CD137序列中的谷氨酸(E),进一步指示人CD137序列中的K114是mAb1的关键结合残基中的至少一个。

[1464] 图3C和3D显示结合至CD137L的人CD137的晶体结构(Bitra A等人,《生物化学杂志》2018,293(26):9958-9969),其中残基E111、T113、K114和P135以球形显示。可以看出,这些残基远离以灰色显示的CD137配体(CD137L)结合域。

[1465] 实施例6:抗CD137抗体对小鼠体内的免疫调节因子和CD8+T细胞的影响

[1466] 进一步分析实施例1中产生的三种抗CD137抗体mAb1、mAb2和mAb3的功效。这些抗体具有小鼠交叉反应性并且包括含S228P突变的人IgG4同型的恒定区以防止Fab改组。使用3H3单克隆抗体作为比较物(BioXcell目录号BE0239;批号5926/1115),所述抗体已知在体内刺激小鼠CD137信号传导并引起抗肿瘤免疫(Melero等人(1997)《自然-医学》3(6):682-685;Uno等人(2006)《自然-医学》12(6):693-696)。值得注意的是,抗体3H3具有与乌瑞鲁单抗(BristolMyers Squibb;CAS编号:934823491)类似的特性,该抗体是靶向CD137的胞外域,但不阻断配体结合的完全人IgG4-S228P激动性抗体。此外,还使用抗大鼠IgG4作为同型对照(BioXcell目录号BE0089;批号5533/5679316J1)。在PBS中进行稀释以在100μl注射体积中实现所指示的每只小鼠所希望的剂量。

[1467] 在第0天、第3天、第6天,将抗体(100μg)腹膜内施用至不带肿瘤的雌性Balb/c小鼠,并在第9天收集脾。通过流式细胞术测量CD8+CD44+T细胞上PD1和TIGIT的表达水平。确切地说,通过机械破坏并穿过40μm细胞过滤器获得来自脾的单细胞悬浮液。使用ACK缓冲液溶解红细胞。用以下抗体对细胞悬浮液染色:CD45(克隆30-F11,eBioscience)、CD8(克隆53-6.7,BD Biosciences)、CD4(克隆RM45,BD Biosciences)、CD44(克隆IM7,eBioscience)、PD1(RMP130,eBioscience)和TIGIT(GIGD7,eBioscience)。在MACSQuant分析仪流式细胞计(Milenyi)上进行数据采集,并使用FlowJo软件10版分析数据。

[1468] 抗体3H3使PD1和TIGIT两者的表达显著增加,而相较于mAb2和mAb3,仅抗体mAb1使表达增加(图4A和4B)。此外,通过分析脾CD45+细胞的百分比或每个脾中CD8+T细胞的数量来评估CD8+T细胞的扩增。类似地,抗体3H3引起CD8+T细胞的最高扩增,其中相对于mAb2和mAb3,mAb1引起最高水平的CD8+T细胞扩增(图4C)。因此,选择mAb1进行进一步测试。

[1469] 实施例7:抗CD137抗体在荷瘤小鼠中的功效

[1470] 考虑到如实施例6所示的mAb1增强CD8+T细胞扩增的能力,使用同基因结肠癌的皮下模型进一步分析mAb1的抗肿瘤活性。确切地说,在无菌条件下,将CT26肿瘤细胞(第3代)维持在DMEM培养基(Gibco目录号11965-092)中,该培养基含有10%的56℃热灭活FBS(Gibco 10438-034)、1mM丙酮酸钠(Gibco目录号11360-070)、1X NEAA(Gibco目录号11140-050)和1X MEM维生素溶液(Gibco目录号11120052)。将细胞维持在37℃和5% CO_2。在达到5070%汇合后,将细胞以1:10的比率传代,总计两代,随后进行体内植入。收集细胞并使用血球计(Hausser Scientific BrightLine#1492)计数。

[1471] Balb/c雌性小鼠购自Charles River Laboratories并在研究开始时是九周龄。将CT26肿瘤细胞(含1×10^5个细胞/小鼠的0.1mL PBS)皮下注射至每只小鼠的右侧腹中,并且每周两次使用带表卡尺计算肿瘤体积(长度*(宽度^2)/2)。在肿瘤接种后第7天,将动物分成数组,每组八只,并起始治疗。在研究持续时间内,每周三次记录下体重。

[1472] 施用三种不同剂量(每只小鼠100μg、50μg或25μg)的mAb1,即两种不同剂量(每只小鼠50μg或10μg)的3H3和每只小鼠50μg剂量的同型对照抗体。在第0天、第3天、第6天和第9天经腹膜内对所有小鼠给药。

[1473] 对于mAb1和3H3抗体,确定体内肿瘤中CD8+ T细胞的扩增情况(数据未示出)。单个肿瘤体积示于图5A中并且平均肿瘤体积示于图5B中。相较于对照组,mAb1治疗在全部三种剂量下引起肿瘤生长抑制。此外,mAb1治疗在25μg剂量水平在8只小鼠中的6只中、在50μg剂量水平下在8只小鼠中的5只中以及在100μg剂量水平下在8只小鼠中的3只中引起完全消退。

[1474] 每个治疗组中的总体存活率显示于图5C中。mAb1针对CT26肿瘤的强抗肿瘤活性以总体存活期延长反映。在25μg剂量水平下在80%的小鼠中、在50μg剂量水平下在62%小鼠中以及在100μg剂量水平下在38%小鼠中观察到长期存活(>60天)。

[1475] 在第70天没有可触知肿瘤的小鼠被视为治愈并通过在相对侧腹中皮下注射CT26细胞进行再激发。确切地说,再次对肿瘤根除的小鼠的左侧腹注射1×10^5个CT26细胞,并且每周两次,使用带表卡尺计算肿瘤体积(长度*(宽度^2)/2)。分别以与对照相同的方式对五只未经过免疫接种的(未处理的)小鼠进行注射。再激发实验的结果示于图5中。在皮下注射CT26细胞后二十二天,经过再激发的小鼠都没有形成肿瘤。相比之下,被注射相同细胞的所有未治疗的小鼠都形成肿瘤。因此,被视为治愈的所有小鼠都除去CT26肿瘤,表明mAb1可诱导长期保护性记忆。

[1476] 实施例8:在荷瘤小鼠中亲和力成熟的抗CD137抗体的功效

[1477] 使用基本上如实施例7中所述的同基因结肠癌(CT26)的皮下模型分析实施例4中产生的亲和力成熟的单克隆抗体的抗肿瘤活性。确切地说,产生具有IgG4恒定区的6个亲和力成熟的克隆(mAb7mAb12)并相应地进行测试。重链和轻链可变区的序列以及其与小鼠CD137(如实施例2中所描述,由ForteBio Octet测定)和人CD137(如实施例4中所描述,由Carterra测定)的K_D值提供于下表中。

[1478]

抗体	V_H 链	V_L 链	与小鼠 CD137 的结合 K_D (nM)	与人 CD137 结合的 K_D (nM)
mAb7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 6	1.2	6.8
mAb8	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 6	72	3.2
mAb9	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 6	6.9	41.4
mAb10	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 6	8.4	20
mAb11	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 28	4.8	4.1
mAb12	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 105	25.8	12.1

[1479] 亲本mAb1、3H3抗体(数据未示出)和IgG4同型抗体用作对照。在第0天、第3天、第7天和第10天,向所有小鼠腹膜内给与每只小鼠50μg mAb。在治疗起始后第13天,收集脾和肝。

[1480] 单个肿瘤体积示于图6A中并且平均肿瘤体积示于图6B中。与实施例7的结果相同,用亲本mAb1治疗使肿瘤体积减小。此外,相较于用同型对照抗体治疗的小鼠,将来源于mAb1(mAb7-mAb12)的所有亲和力成熟的克隆施用给荷瘤小鼠引起肿瘤生长抑制。

[1481] 实施例9:抗CD137抗体对荷瘤小鼠中的T细胞的影响

[1482] 为了确定抗CD137抗体(即,3H3和mAb1)对荷瘤小鼠中T细胞水平的影响,在第0天和第3天,如实施例7中所述,向具有CT26肿瘤的Balb/c小鼠腹膜内注射抗体,并在第7天,收集组织。施用三种不同剂量(每只小鼠100μg、50μg或25μg)的mAb1,即两种不同剂量(每只小鼠50μg或10μg)的3H3和每只小鼠50μg剂量的同型对照抗体。

[1483] 如实施例6所述获得来自脾的单细胞悬浮液,并使用肿瘤解离试剂盒(Miltenyi目录号130-096-730),通过的酶和机械消化获得肿瘤细胞悬浮液。用完全培养基处理细胞悬浮液以使酶失活,然后使其穿过40μm细胞过滤器。使用ACK缓冲液溶解红细胞。用针对CD45、CD8和CD4的抗体对细胞染色,并如实施例6中所述进行分析。

[1484] 图7显示在脾和肿瘤中发现的CD4+和CD8+T细胞的数量,以CD45+细胞的百分比表示。这些结果表明,与脾CD8+T细胞相比,mAb1选择性扩增肿瘤浸润CD8+T细胞。

[1485] 实施例10:CD4+、CD8+或NK淋巴细胞耗尽对于抗CD137抗体的体内抗肿瘤功效的影响

[1486] 为了评估抗CD137抗体的作用机制,如实施例7中所述,对具有CT26肿瘤的Balb/c小鼠腹膜内注射单独mAb1或其与抗CD4抗体(GK1.5)、抗CD8抗体(YTS169.4)或抗无唾液酸-GM1抗体(靶向NK细胞)的组合以耗尽来自动物的这些特异性淋巴细胞亚群。在第6天、第9天、第12天、第19天和第26天,对仅用mAb1抗体治疗的小鼠施用150μg抗体。在第-1天、第0天、第5天、第10天、第15天和第20天,通施用150μg mAb1与500μg抗CD4抗体、抗CD8抗体或50μL抗无唾液酸GM1抗体的组合治疗小鼠。通过FACS分析确定有效耗尽(数据未示出)。

[1487] 单个肿瘤体积示于图8中。与实施例7的结果相同,用亲本mAb1治疗使肿瘤体积减小。此外,施用mAb1与淋巴细胞耗尽抗CD4抗体、抗CD8抗体或抗无唾液酸GM1抗体的组合使mAb1抗体的抗肿瘤活性降低。这些结果指示了本文所述的抗CD137抗体的先天性和适应性免疫之间的协作。

[1488] 实施例11:抗CD137抗体在各种肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[1489] 为了确定抗CD137抗体在不同肿瘤模型中是否具有抗肿瘤功效,将mAb8施用给具有CT26肿瘤(结肠癌;如上所述)、EMT-6肿瘤(乳腺癌)、A20肿瘤(B细胞淋巴瘤)或MC38肿瘤

(结肠癌)的小鼠。

[1490] 对于所有肿瘤模型,雌性小鼠购自Charles River Laboratories并在研究开始时是79周龄。对于每种肿瘤类型,使用适当的同基因小鼠品系(用于CT26、EMT6和A20的Balb/c;用于MC38的C57BL/6)。将EMT6肿瘤细胞(含每只小鼠5×10^4个细胞的0.05mL PBS)注射至每只小鼠的右侧乳腺脂肪垫中。将CT26肿瘤细胞(每只小鼠1×10^5个细胞)、A20肿瘤细胞(每只小鼠5×10^6个细胞)和MC38肿瘤细胞(每只小鼠5×10^5个细胞)皮下注射至每只小鼠的右侧腹中,并且每周两次,使用带表卡尺计算肿瘤体积(长度*(宽度^2)/2)。在肿瘤达到50-100mm^3大小后,将小鼠随机分成接受mAb8或同型对照(第0天)。在第0天、第3天、第6天和第9天,具有原位EMT6肿瘤的小鼠接受12.5μg。具有A20肿瘤(每只小鼠200μg)和MC38肿瘤(每只小鼠12.5μg)的小鼠一周一次接受5剂。所有小鼠都是腹膜内给药。

[1491] 如图9所示,mAb8在测试的全部四个肿瘤模型中都是有效的,表明对于不同癌症类型的较宽功效范围。用mAb8治疗使8只携带CT26肿瘤的小鼠中的8只、8只携带EMT6肿瘤的小鼠中的3只以及8只携带A20肿瘤的小鼠中的5只的肿瘤消退,并延迟其余携带EMT6、A20和MC38的大部分小鼠中的生长。

[1492] 实施例12:抗CD137抗体的剂量的影响

[1493] 为了进一步表征抗CD137抗体的抗肿瘤功效,基本上如实施例7中所述,使用同基因结肠癌(CT26)的皮下模型执行剂量研究。确切地说,在第0天、第3天、第6天和第9天,对每只小鼠腹膜内施用150μg(高剂量)或20μg(低剂量)剂量的亲本mAb1以及亲和力成熟的抗体mAb8和mAb10,其中每个治疗组有8只小鼠。对一组小鼠(n=8)施用150μg剂量的IgG4同型对照。

[1494] 以150μg治疗的小鼠的单个肿瘤体积、平均肿瘤体积以及存活率百分比分别示于图10A、图10B和图10C中。以20μg治疗的小鼠的单个肿瘤体积、平均肿瘤体积和存活率百分比分别示于图11A、图11B和图11C中。这些结果表明,用亲本mAb1以及亲和力成熟的mAb8和mAb10抗体治疗在高剂量和低剂量下使肿瘤体积减小以及小鼠存活率增加。

[1495] 在利用CT26肿瘤模型的单独剂量研究中,测试了额外剂量的亲本mAb1。确切地说,腹膜内施用以下剂量的mAb1:12.5μg、25μg、50μg、100μg和200μg。图12显示了剂量研究的结果,表明在宽剂量范围内的功效。用mAb1治疗在每种剂量水平下在8只小鼠中的至少3只中引起肿瘤消退,其中最佳剂量范围(每只小鼠50100μg)在8只小鼠中的7只中引起肿瘤根除。

[1496] 实施例13:Fc-受体结合对于抗CD137抗体的抗肿瘤功效的影响

[1497] 为了确定Fc-受体结合对于抗CD137抗体的抗肿瘤活性的贡献,产生无糖基化IgG1和IgG4形式的mAb1。如实施例7中所述,在小鼠中产生CT26肿瘤。小鼠接受150μg的(a)同型对照;(b)呈IgG4形式的mAb1;(c)呈IgG4形式的无糖基化mAb1;或(d)呈IgG1形式的无糖基化mAb1。

[1498] 如图13A和13B中所示,相较于mAb1,亲本mAb1抗体的无糖基化IgG4和IgG1同型对肿瘤体积具有较小影响。不过,功效没有完全消除。因此,这些结果表明,虽然mAb1的抗肿瘤功效并非完全依赖于Fc的,但是它通过Fc受体结合而增强。

[1499] 实施例14:抗CD137抗体的跨物种亲和力

[1500] 进一步测试抗CD137抗体与来自多个物种的CD137的结合。确切地说,分析mAb1、mAb8和mAb10与人、小鼠、食蟹猕猴和犬类CD137的结合。动力学实验是在Octet HTX

(ForteBio)上,在动力学缓冲液(1x PBS、pH 7.4;0.1mg/ml BSA;和0.002%Tween 20)中执行。将Fc标记、小鼠IgG2a标记或His标记的CD137(人、小鼠、食蟹猕猴或犬类)分别装载于预先水合的生物传感器AHC、AMC或NTA上,保持5分钟。然后,将传感器浸渍于Fab(0、5.12、12.8、32、80、200和500nM)中进行5分钟缔合,随后进行15分钟的解离。使用ForteBio Data Analysis 9.0分析结果,并全局拟合至1:1结合模型,以测定表观K_D。通过使用来自不同来源的抗原(ACRO Biosystems、Sino Biological和内部)确定人和小鼠CD137结合的K_D。结果示于下表2中。

[1501] 表2:跨物种亲和力

[1502]

CD137的物种	mAb1	mAb8	mAb10
人	50-70nM	3-5nM	0.9nM
小鼠	300-500nM	50-90nM	10-30nM
食蟹猕猴	30-100nM	3-7nM	1.8nM
犬类	拟合不良	拟合不良	拟合不良

[1503] 实施例15:肿瘤大小对于抗CD137抗体的抗肿瘤功效的影响

[1504] 为了进一步表征抗CD137抗体的抗肿瘤功效,评估针对大肿瘤的抗肿瘤功效。在治疗之前,使CT26肿瘤生长至约500mm^3。在肿瘤产生后第0天、第3天、第6天和第9天,施用每只小鼠150μg的亲本mAb1以及亲和力成熟的mAb8和mAb10抗体(n=6只小鼠/治疗组)。IgG4同型对照抗体用作比较物。

[1505] 如图14A-14C中所示,相对于同型对照,亲本mAb1以及亲和力成熟的mAb8和mAb10使肿瘤体积减小(图14A-14B)并使小鼠存活率增加(图14C)。mAb8的抗肿瘤功效明显高于mAb1和mAb10。进行独立研究,使用相同研究设计,但在第0天、第7天和第14天施用25μg抗体,以比较mAb8和3H3针对大肿瘤的功效。图14D提供了结果,显示3H3对大肿瘤没有功效,而mAb8诱导肿瘤消退。

[1506] 如实施例14所述,mAb8对小鼠CD137的亲和力与mAb1对人CD137的亲和力相当。虽然本公开不受任何特定理论或作用机制束缚,但相信具有中间亲和力的激动剂抗CD137抗体对治疗癌症甚至更有用。

[1507] 在第70天没有可触知肿瘤的小鼠被视为治愈并通过在相对侧腹中皮下注射CT26细胞进行再激发。确切地说,再次对肿瘤根除的小鼠的左侧腹注射1×10^5个CT26细胞,并且每周两次,使用带表卡尺计算肿瘤体积(长度*(宽度^2)/2)。分别以与对照相同的方式对五只未经过免疫接种的(未处理的)小鼠进行注射。再激发实验的结果示于图15中。在皮下注射CT26细胞后八十天,再激发的小鼠都没有形成肿瘤。相比之下,被注射相同细胞的所有未治疗的小鼠都形成肿瘤。因此,被视为治愈的所有小鼠都除去CT26肿瘤,表明mAb1可诱导长期保护性记忆免疫。

[1508] 实施例16:抗CD137抗体在荷瘤小鼠中的毒性

[1509] 为了确定抗CD137抗体(即,3H3和mAb1)对荷瘤小鼠的肝内T细胞水平的影响,对来自实施例7的小鼠进行分析。收集肝淋巴细胞并通过流式细胞术进行分析。确切地说,使用肝解离试剂盒(Miltenyi目录号130105807)和gentle MACS解离器(Miltenyi)获得来自肝的单细胞悬浮液。用完全培养基处理细胞悬浮液以使酶失活,然后使其穿过40μm细胞过滤器。使用ACK缓冲液溶解红细胞。用针对CD45、CD8和CD4的抗体对细胞染色,并如实施例3中

所述进行分析。

[1510] 图16A和16B显示在治疗过的小鼠的肝中发现的CD4+和CD8+T细胞的数量,以CD45+细胞的百分比表示。结果指示mAb1不诱导肝内T细胞浸润,证实相对于抗体3H3具有较低毒性。

[1511] 实施例17:亲和力成熟的抗CD137抗体在荷瘤小鼠中的毒性

[1512] 为了评估由抗CD137抗体(即,3H3、mAb1和mAb7mAb12)介导的毒性相关作用,在施用抗体后分析来自实施例8的荷瘤小鼠的脾和肝中的细胞组成。

[1513] 收集来自实施例8的荷瘤小鼠中的肝内(肝)和脾内(脾)T细胞并通过流式细胞术进行分析。如所指示,在施用抗CD137抗体或同型对照抗体之后,评估来自肝和脾的CD45+细胞中CD3+、CD4+或CD8+的表达。结果示于图17A(脾)和17B(肝)中。结果表明,相对于施用同型对照抗体,施用亲本mAb1以及亲和力成熟的抗体(mAb7-mAb12)对肝内或脾内T细胞的百分比几乎没有影响。相比之下,施用3H3抗体使脾和肝中的T细胞相对于同型对照抗体升高,特别是使CD3+T细胞和CD8+T细胞升高。

[1514] 另外,在施用抗CD137抗体或同型对照抗体后,评估来自治疗过的小鼠的肝和脾的CD45+CD8+T细胞和CD45+CD4+T细胞中TIGIT、PD1或LAG3共抑制受体的表达,作为T细胞激活或耗竭的指标。如先前实施例中所述,通过流式细胞术测量CD8+T细胞和CD4+T细胞上TIGIT、PD1和LAG3的表达水平。图18A-18B和19A-19B显示施用3H3抗体使得CD8+T细胞和CD4+T细胞两者中这些共抑制受体的表达显著增加,而施用亲本mAb1或亲和力成熟的mAb7-mAb12抗体引起的TIGIT、PD1或LAG3表达程度与施用同型对照抗体后所见到的程度类似。这些结果表明,亲和力成熟的抗体不诱导全身CD8+T细胞或CD4+T细胞激活。

[1515] 总的来说,这些结果表明,相对于3H3比较物抗体,亲本mAb1和亲和力成熟的mAb7mAb12抗体展现出较低的体内毒性潜力。在用mAb1和亲和力成熟的mAb7-mAb12抗体治疗后,不存在全身T细胞激活和扩增,特别是在肝中不存在,可解释为患者发生肝毒性(转氨酶升高)的可能性较低。

[1516] 实施例18:多剂量的抗CD137抗体在荷瘤小鼠中的毒性

[1517] 为了确定不存在由mAb1诱导的毒性,进行了重复剂量毒性研究。确切地说,对小鼠每周施用抗CD137抗体mAb1、mAb8或3H3,持续4周。mAb1和mAb8是以10、20、40或80mg/kg施用,而3H3是以10或80mg/kg施用。在第35天,使用荧光度活性分析(Sigma,目录号MAK052)测定血浆中丙氨酸氨基转氨酶(ALT)的水平,使用流式细胞术(如上所述)测定肝中的CD8+T细胞,并根据制造商的说明书,使用电化学发光分析(Meso Scale Discovery,定制试剂盒)测定血浆中TNFα的浓度。

[1518] 图20A显示在施用全部4种剂量的mAb1和mAb8的小鼠的肝中CD8+T细胞水平较低,而3H3在低剂量(10mg/kg)和高剂量(80mg/kg)下都诱导高水平的CD8+T细胞。图20B显示在施用全部4种剂量的mAb1和mAb8的小鼠的血浆中ALT的活性水平较低,而3H3在80mg/kg剂量下诱导高水平的ALT。图20C显示在施用低剂量(10mg/kg)和高剂量(80mg/kg)的mAb1和mAb8的小鼠的血浆中TNFα的水平较低,而3H3在低剂量(10mg/kg)和高剂量(80mg/kg)下都诱导高水平的TNFα。

[1519] 另外,对来自接受80mg/kg抗CD137激动性抗体的治疗过的小鼠的肝切片并用H&E染色。将来自每只动物的一半肝叶包埋于OCT中并在液氮中新鲜冷冻。切片和H&E染色都由

组织病理学实验室(Mass Histology Service,Inc)根据标准程序执行。图21提供了结果,结果显示在接受3H3的小鼠(参见箭头)中显示炎性肝小叶中心病灶,但在接受mAb1或亲和力成熟的mAb1的小鼠中则没有。

[1520] 实施例19:用抗CD137抗体进行免疫重编程

[1521] 为了确定抗CD137抗体对肿瘤微环境中免疫细胞的作用,利用CT26肿瘤模型。确切地说,如实施例7所述产生CT26肿瘤。在第0天、第3天、第6天和第9天,对小鼠施用25μg剂量的mAb8。如实施例16中所述,在第11天分析肿瘤。

[1522] 通过测量CD45+活细胞的数量来测定肿瘤微环境中免疫细胞的总体浸润。如图22A所示,mAb8使免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润显著增加。

[1523] 通过测量CD25+FOXP-3+CD4+肿瘤浸润淋巴细胞的数量来测定肿瘤微环境中Treg细胞的水平。如图22B所示,mAb8使肿瘤微环境中Treg的水平显著降低。

[1524] 通过测量CD8+或CD4+肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)上PD1+TIGIT+的表达水平来测定mAb8对T细胞耗竭的影响。图22C显示了CD8+TIL的结果,其中当施用mAb8时,肿瘤微环境中的PD1+TIGIT+细胞减少。关于CD4+TIL观察到类似结果(数据未示出)。这些结果指示mAb8防止和/或逆转T细胞耗竭。

[1525] 此外,还分析mAb8对肿瘤相关巨噬细胞的影响。确切地说,测量F4/80+CD11b+CD45+细胞,并且用mAb8治疗观察到肿瘤相关巨噬细胞减少。

[1526] 在独立研究中,评估了抗CD137抗体(即,mAb1和3H3)对外周免疫细胞的影响。确切地说,在第7天,对来自在第0天和第3天用150μg剂量mAb1或3H3治疗的带有CT26肿瘤的小鼠的脾进行分析。如图23所示,抗CD137抗体3H3诱导CD8+和CD4+T细胞上TIGIT和PD1的表达,并且使CD8+CD25+和CD4+Foxp3+细胞增加。此外,3H3诱导CD8+和CD4+效应记忆性细胞两者。相比之下,抗CD137抗体mAb1不显著诱导CD8+TIGIT+PD-1+T细胞、CD8+CD25+T细胞和CD4+Foxp3+T细胞。另外,mAb1不诱导CD8+或CD4+效应记忆性细胞。

[1527] 总的说来,这些结果指示抗CD137抗体mAb1和mAb8诱导肿瘤微环境内的显著免疫重编程,并且对外周免疫细胞具有较少影响(如果有的话)。

[1528] 实施例20:抗CD137抗体增强鼠类T细胞激活

[1529] 通过在鼠类卵清蛋白刺激分析中评估对IL2产生的刺激来进一步分析抗CD137抗体的激动活性。在96孔板中,以10^4个细胞/孔涂铺JSPCII树突状细胞样细胞并在鼠类IFNγ(10ng/mL)存在下培育过夜。将细胞与2μg/mL OVA/A2肽一起培育并在37℃下培育2小时,随后与10^5个从OT-I小鼠脾分离的CD8+T细胞,所述细胞表达OVA。同时添加抗体。阿特珠单抗(抗PDL1抗体)和小鼠抗PD1抗体(RMP114)以及IgG4同型对照用作比较物。通过Meso Scale Discovery(MSD)测定IL-2浓度。

[1530] 如图24所示,mAb8和mAb10显著增强IL-2产生。

[1531] 除了测量IL2产生外,还使用所述鼠类卵清蛋白刺激分析法分析CD25+CD8+T细胞和TIGIT+CD8+T细胞的百分比。包括抗体3H3作为比较物。图25A和25B显示,mAb8和mAb10增强激活标记物CD25的表达,并且阻碍耗竭标记物TIGIT的诱导。相比之下,3H3增强TIGIT的表达。

[1532] 实施例21:抗CD137抗体对细胞因子诱导的影响

[1533] 为了确定抗CD137抗体对T细胞的细胞因子诱导作用的影响,利用了板结合的抗

体。使用三种抗体作为比较物:mAb4,对应于乌瑞鲁单抗(BristolMyers Squibb;CAS编号:934823491),该抗体是靶向CD137的胞外域但不阻断配体结合的完全人IgG4S228P激动性抗体;mAb5,对应于乌托米单抗(Pfizer;CAS编号:1417318-27-4),该抗体是靶向CD137的胞外域并阻断配体结合的完全人IgG2-S228P激动性抗体;以及mAb6,该抗体是选自与mAb1相同的文库的一种完全人IgG4S228P激动性抗体并靶向CD137的胞外域。mAb6抗体不阻断配体结合。

[1534] 通过阴性选择分离出人CD3+T细胞,并将其添加至与抗CD137抗体和1μg/ml抗CD3结合的板中。抗CD137抗体是以1nM、10nM、50nM或100nM添加。抗体在4℃下涂覆过夜。

[1535] 在添加T细胞后72小时,利用Luminex试剂盒(德克萨斯州奥斯汀(Austin,TX)的Luminex Corporation),遵循制造商的说明书,评估IL-2、IFNγ、TNFα和IL-13的水平。可溶性抗CD28(2μg/mL)用作T细胞激活对照,并使用板结合的抗CD3设置激活基线。图26显示了每个细胞因子水平相对于激活基线的倍数变化。mAb4(乌瑞鲁单抗)显示出对每种细胞因子的最高水平诱导,且mAb1显示较低水平的诱导,但高于mAb5(乌托米单抗)和mAb6。这些结果表明,在相同浓度下,mAb1对CD137的激动作用小于mAb4(乌瑞鲁单抗)。

[1536] 实施例22:抗CD137抗体诱导干扰素-γ(IFNγ)

[1537] 为了进一步评估抗CD137抗体的激动活性,在混合淋巴细胞反应(MLR)中产生IFNγ。mAb2、mAb4(乌瑞鲁单抗)、mAb5(乌托米单抗)和可瑞达(Merck)用作比较物,可瑞达是阻断PD-1的人源化抗体并且已知它诱导IFNγ产生。

[1538] 从来源于三名独立人供体(D985、D7603和D5004)的leukopak(加利福尼亚州凡奈斯(Van Nuys,CA)的HemaCare)分离出外周血单核细胞(PBMC)。使用免疫磁性细胞分离(EasySep™;不列颠哥伦比亚省温哥华(Vancouver BC)的Stemcell Technologies),通过阴性选择从PBMC富集总T细胞。使用免疫磁性细胞分离(EasySep™;不列颠哥伦比亚省温哥华的Stemcell Technologies)从PBMC分离出单核细胞。使T细胞以1×10^6个细胞/毫升浓度再悬浮于完全RPMI中并将单核细胞分别调至5×10^5个细胞/毫升。在96孔板中,以1×10^5个细胞/孔涂铺100μl含有T细胞的培养基,随后添加100μl单核细胞悬浮液(E:T比率2:1)。接下来,添加50μl含有CD137抗体的各种稀释液的培养基。在CO_2培育箱中,在37℃下培育各板五天。在培育期结束时,收集培养物上清液并通过MSD分析法(马里兰州罗克维尔(Rockville,MD)的Mesoscale Diagnostics)分析IFNγ水平。图27A-27C显示在所指示的测试抗体的最终浓度下IFNγ的浓度,以pg/ML表示。这些结果表明,mAb1对CD137的激动作用小于mAb4(乌瑞鲁单抗),但在相同浓度下其激动作用程度与mAb5(乌托米单抗)类似。

[1539] 在独立研究中,通过利用被工程改造成表达CD32(FCyRIIb)的CHO细胞(CHO-CD32细胞)来测量IFNγ诱导。确切地说,在可溶性抗CD3抗体以及抗CD137抗体mAb1、mAb8、mAb4和mAb5存在下,将CHO-CD32细胞与人T细胞共培养。

[1540] 将冷冻的PBMC解冻,并使其在潮湿的37℃、5% CO2培育箱中在T细胞培养基(TCM)中休眠过夜。次日,用untouched CD3T细胞分离试剂盒(Stemcell#17951)分离出CD3+T细胞,随后将其与被转导以表达人CD32的CHO细胞(Gibco#A29127)(CHO-CD32)、250ng/ml抗CD3抗体(克隆OKT3)和抗CD137抗体或对照抗体混合在一起。将100,000个T细胞与50,000个CHO-CD32细胞混合在一起。在37℃下培育3天后,收集上清液,通过MesoScale Discovery(MSD)分析分泌的干扰素-γ(IFNγ)。

[1541] 图28提供结果,显示mAb4在低剂量下诱导IFNγ达到最高水平。相比之下,mAb5几乎不诱导产生IFNγ。值得注意的是,mAb1和mAb8提供剂量依赖性应答并且对IFNγ产生的诱导水平在mAb4与mAb5所诱导的水平之间。总体而言,这些结果表明,mAb4具有超级激动剂活性,mAb5具有较弱活性,并且相较于mAb4和mAb5,mAb1和mAb8具有中间活性。

[1542] 实施例23:抗CD137抗体对Treg细胞的影响

[1543] 为了进一步表征抗CD137抗体的作用机制,测定了所述抗体对Treg细胞的影响。使用EasySep™人CD4+CD127低CD25+调节性T细胞分离试剂盒(Stemcell Technologies,目录号18063)分离出人Treg,并在immunocult抗CD3/28(Stemcell#10971)存在下,使其在含10%FBS的完全T细胞培养基中扩增13天。确切地说,将实施例21中所述的CHO-CD32细胞与扩增的人Treg细胞共培养,所述扩增的人Treg细胞在可溶性抗CD3抗体(克隆OKT3)以及抗CD137抗体mAb1、mAb8、mAb4、mAb5和同型对照存在下用Celltrace紫色染料(Thermo Fisher,目录号C34557)标记。在第4天测定Treg细胞的增殖。

[1544] 图29提供结果,显示mAb4强烈诱导Treg增殖,甚至在低浓度下也是如此。相比之下,mAb5对Treg增殖具有极弱的作用。值得注意的是,mAb1和mAb8显示出Treg增殖的适度增加。总体而言,这些结果确定,mAb4具有超级激动剂活性,mAb5具有较弱活性,并且mAb1和mAb8具有中间活性。

[1545] 实施例24:抗CD137抗体对细胞内信号传导的影响

[1546] 为了进一步评估各抗CD137激动性抗体之间的差异,在体外评估细胞内信号传导。确切地说,将用

[1547] NFkβ(Qiagen;目录号CLS-013L-1)或SRF(Qiagen;目录号CLS-010L1)经慢病毒感染的CCL119T细胞(ATCC;目录号ATCC CCL119)用250ng/mL板结合的抗CD3抗体(克隆OKT3)以及不同浓度板结合的mAb1、mAb8、mAb4、mAb5和同型对照进行刺激。在不含添加剂的RPMI培养基中刺激16小时之后,在荧光素酶缓冲液(Promega;目录号E263B)中溶解细胞,并在BioTek Synergy H1微孔板读取器(目录号11120533)上获取相对光单位(RLU)。然后,将原始RLU数据输出至Microsoft Excel,并通过将由刺激条件得到的RLU除以由未刺激对照得到的RLU来计算倍数诱导。

[1548] 图30提供结果,显示mAb4和mAb5相对于mAb1及其亲和力成熟变体mAb8的最小NFkβ和SRF活性。总体而言,这些结果表明,mAb1对细胞内信号传导的诱导作用不同于mAb4和mAb5的细胞内信号传导诱导作用。

[1549] 实施例25:抗CD137抗体对巨噬细胞激活和分化的影响

[1550] 先前已显示,抗mCD137激动性抗体3H3诱导的肝毒性与肝中巨噬细胞和CD8+T细胞的扩增以及血清中细胞因子水平和ALT活性增加相关。此外,抗体3H3已被表征为具有与乌瑞鲁单抗相似的特性。如本文所述,mAb1不诱导肝毒性。因此,分析抗CD137激动性抗体在体外对巨噬细胞激活的影响。

[1551] 确切地说,由10周龄的雌性C57BL/6小鼠(Charles River Laboratories)产生鼠类骨髓源性小鼠巨噬细胞。从小鼠肌肉组织提取股骨和胫骨,并用PBS将骨髓冲洗到在冰上的15mL锥形管中。将细胞以1500rpm离心5分钟,并丢弃上清液。破坏细胞沉淀物并添加培养基(RPMI、20% FBS、50μg/mL MCSF(Shenandoah Biotechnology,Inc.;目录号200-08100)和pen/strep)。在40微米筛网过滤器上过滤细胞,并将其涂铺至未用组织培养物处理的培

养皿中。3天后,将10mL培养基添加至每个培养皿中。在培养的第7天,去除培养基,并用PBS(10mL)洗涤细胞两次。将MACS缓冲液(PBS、2μM EDTA和0.5%FBS)添加至每个培养皿中并在37℃下培育10分钟。从培养皿收集细胞,并以1500rpm离心5分钟。然后,在50nm抗CD137抗体mAb1、3H3或LOB12.3(小鼠特异性CD137激动剂抗体)存在下,用TLR9激动剂CpG刺激这些骨髓源性巨噬细胞。48小时后,使用电化学发光分析(Meso Scale Discovery,定制试剂盒),根据制造商的说明书,评估来自培养物上清液的鼠类骨髓源性巨噬细胞的IL6、TNFα和IL27的产生。图31提供结果,所述结果指示mAb1不诱导巨噬细胞分泌促炎细胞因子,而抗体3H3和LOB12.3则诱导。

[1552] 通过使用抗CD14微珠(Miltenyi Biotech,目录号130-050201)以磁力分离$CD14^+$细胞并使其在50ng/mL m-CSF存在下成熟7天,由此产生人单核细胞源性巨噬细胞。然后,在5nm抗CD137抗体mAb1、mAb4或mAb5存在下,用10ng/mL LPS刺激人单核细胞源性巨噬细胞。48小时后,使用电化学发光分析(Meso Scale Discovery,定制试剂盒),根据制造商的说明书,评估TNFα的产生。图32提供结果,所述结果指示mAb4和mAb5对巨噬细胞激活的诱导作用明显大于mAb1。

[1553] 此外,THP1单核细胞在2μM

[1554] 佛波醇12肉豆蔻酸13-乙酸酯(PMA;Sigma;P1585)存在下分化成巨噬细胞过夜。然后,在50nm抗CD137抗体mAb1、mAb4或mAb5存在下培养巨噬细胞,并在48小时后,使用流式细胞术(APC抗人CD64抗体克隆10.1;BioLegend;目录号305013)测量CD64的表达。图33提供结果,所述结果指示mAb4和mAb5对巨噬细胞分化的诱导作用明显大于mAb1。

[1555] 虽然本公开不受任何特定理论或作用机制束缚,但总体而言,这些结果表明mAb1因巨噬细胞激活的可能性降低而无肝毒性。

[1556] 实施例26:抗CD137激动性抗体在体内使人CD8+T细胞扩增

[1557] 为了测试CD137激动性抗体在体内对人细胞的影响,将人PBMC(7×10^6个)静脉内注射至免疫受损的NSG小鼠(NOD.Cg-$Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}$/SzJ;Jackson Laboratory;目录号005557)中。将小鼠随机分成数组,每组8只,并在第0天、第7天和第14天,使其接受CD137抗体(每只小鼠200μg)或媒剂对照。在第10天、第20天和第29天,收集来自每只小鼠的外周血,使用流式细胞术测定人$CD45^+$(FITC抗人CD45克隆HI30;BioLegend;目录号304038)、$CD8^+$(Alexa Fluor®647抗人CD8a克隆HIT8a;BioLegend;目录号300918);以及$CD4^+$(APCCy7抗人CD4克隆RPAT4;Bd;目录号557871)的植入。

[1558] 图34A-34C显示接受mAb4的小鼠体内$hCD45^+$细胞的数量总体增加和人CD8+T细胞的全身大量扩增,且人CD4+T细胞减少。值得注意的是,mAb1不诱导人T细胞的激活。mAb1激活外周中人T细胞的潜力降低可能有助于降低毒性发生的可能性。

[1559] 表3:抗体组合表

[1560]

V_H	V_L	V_H CDR			V_L CDR		
		CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
4	6	48	56	68	69	78	89
4	28	48	56	68	70	79	90
4	30	48	56	68	71	80	91
4	32	48	56	68	72	81	92
4	34	48	56	68	73	82	91
4	36	48	56	68	74	83	93
4	38	48	56	68	75	84	91
4	40	48	56	68	74	85	94
4	42	48	56	68	76	86	95
4	44	48	56	68	77	87	93
4	46	48	56	68	69	88	90
4	105	48	56	68	109	110	92
8	6	49	57	68	69	78	89
10	6	49	58	68	69	78	89
12	6	49	59	68	69	78	89
14	6	49	60	68	69	78	89
16	6	50	61	68	69	78	89
18	6	50	58	68	69	78	89
20	6	51	62	68	69	78	89
22	6	52	63	68	69	78	89
24	6	50	64	68	69	78	89
26	6	50	65	68	69	78	89
101	6	51	108	68	69	78	89
103	6	107	56	68	69	78	89
8	28	49	57	68	70	79	90
8	30	49	57	68	71	80	91
8	32	49	57	68	72	81	92
8	34	49	57	68	73	82	91
8	36	49	57	68	74	83	93
8	38	49	57	68	75	84	91
8	40	49	57	68	74	85	94
8	42	49	57	68	76	86	95
8	44	49	57	68	77	87	93
8	46	49	57	68	69	88	90
8	105	49	57	68	109	110	92
10	28	49	58	68	70	79	90
10	30	49	58	68	71	80	91
10	32	49	58	68	72	81	92
10	34	49	58	68	73	82	91
10	36	49	58	68	74	83	93
10	38	49	58	68	75	84	91
10	40	49	58	68	74	85	94
10	42	49	58	68	76	86	95
10	44	49	58	68	77	87	93
10	46	49	58	68	69	88	90

[1561]

10	105	49	58	68	109	110	92
12	28	49	59	68	70	79	90
12	30	49	59	68	71	80	91
12	32	49	59	68	72	81	92
12	34	49	59	68	73	82	91
12	36	49	59	68	74	83	93
12	38	49	59	68	75	84	91
12	40	49	59	68	74	85	94
12	42	49	59	68	76	86	95
12	44	49	59	68	77	87	93
12	46	49	59	68	69	88	90
12	105	49	59	68	109	110	92
14	28	49	60	68	70	79	90
14	30	49	60	68	71	80	91
14	32	49	60	68	72	81	92
14	34	49	60	68	73	82	91
14	36	49	60	68	74	83	93
14	38	49	60	68	75	84	91
14	40	49	60	68	74	85	94
14	42	49	60	68	76	86	95
14	44	49	60	68	77	87	93
14	46	49	60	68	69	88	90
14	105	49	60	68	109	110	92
16	28	50	61	68	70	79	90
16	30	50	61	68	71	80	91
16	32	50	61	68	72	81	92
16	34	50	61	68	73	82	91
16	36	50	61	68	74	83	93
16	38	50	61	68	75	84	91
16	40	50	61	68	74	85	94
16	42	50	61	68	76	86	95
16	44	50	61	68	77	87	93
16	46	50	61	68	69	88	90
16	105	50	61	68	109	110	92
18	28	50	58	68	70	79	90
18	30	50	58	68	71	80	91
18	32	50	58	68	72	81	92
18	34	50	58	68	73	82	91
18	36	50	58	68	74	83	93
18	38	50	58	68	75	84	91
18	40	50	58	68	74	85	94
18	42	50	58	68	76	86	95
18	44	50	58	68	77	87	93
18	46	50	58	68	69	88	90
18	105	50	58	68	109	110	92
20	28	51	62	68	70	79	90
20	30	51	62	68	71	80	91
20	32	51	62	68	72	81	92

[1562]

20	34	51	62	68	73	82	91
20	36	51	62	68	74	83	93
20	38	51	62	68	75	84	91
20	40	51	62	68	74	85	94
20	42	51	62	68	76	86	95
20	44	51	62	68	77	87	93
20	46	51	62	68	69	88	90
20	105	51	62	68	109	110	92
22	28	52	63	68	70	79	90
22	30	52	63	68	71	80	91
22	32	52	63	68	72	81	92
22	34	52	63	68	73	82	91
22	36	52	63	68	74	83	93
22	38	52	63	68	75	84	91
22	40	52	63	68	74	85	94
22	42	52	63	68	76	86	95
22	44	52	63	68	77	87	93
22	46	52	63	68	69	88	90
22	105	52	63	68	109	110	92
24	28	50	64	68	70	79	90
24	30	50	64	68	71	80	91
24	32	50	64	68	72	81	92
24	34	50	64	68	73	82	91
24	36	50	64	68	74	83	93
24	38	50	64	68	75	84	91
24	40	50	64	68	74	85	94
24	42	50	64	68	76	86	95
24	44	50	64	68	77	87	93
24	46	50	64	68	69	88	90
24	105	50	64	68	109	110	92
26	28	50	65	68	70	79	90
26	30	50	65	68	71	80	91
26	32	50	65	68	72	81	92
26	34	50	65	68	73	82	91
26	36	50	65	68	74	83	93
26	38	50	65	68	75	84	91
26	40	50	65	68	74	85	94
26	42	50	65	68	76	86	95
26	44	50	65	68	77	87	93
26	46	50	65	68	69	88	90
26	105	50	65	68	109	110	92
101	28	51	108	68	70	79	90
101	30	51	108	68	71	80	91
101	32	51	108	68	72	81	92
101	34	51	108	68	73	82	91
101	36	51	108	68	74	83	93
101	38	51	108	68	75	84	91
101	40	51	108	68	74	85	94

[1563]

101	42	51	108	68	76	86	95
101	44	51	108	68	77	87	93
101	46	51	108	68	69	88	90
101	105	51	108	68	109	110	92
103	28	107	56	68	70	79	90
103	30	107	56	68	71	80	91
103	32	107	56	68	72	81	92
103	34	107	56	68	73	82	91
103	36	107	56	68	74	83	93
103	38	107	56	68	75	84	91
103	40	107	56	68	74	85	94
103	42	107	56	68	76	86	95
103	44	107	56	68	77	87	93
103	46	107	56	68	69	88	90
103	105	107	56	68	109	110	92

[1564] 表4:序列表

[1565]

SEQ ID NO	描述	序列
1	人 IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	人 IgG4 突变体（S228P/C 末端 K 截短）	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
3	人 CD137（登录号 NP_001552）	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRN QICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNA ECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFN DQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPG ASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRF SVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
4	V_H1 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[1566]

5	V_H1 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACT TTTAGTTCGTATGCAATGTCGTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGAGTGCTATTTCCGGCTCTGGCGGA TCTACCTATTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
6	V_L1 氨基酸序列	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGHLFPITFGGGTKVEIK
7	V_L1 核酸序列	GATATTCAGATGACACAGAGCCCGTCATCAGTAAGTGCAAGC GTCGGAGATCGGGTTACAATAACATGTCGTGCCTCGCAAGGA ATTTCCTCCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCAAA GCCCCCAAATTACTAATTTATGCCGCAAGCTCTCTGCAATCG GGTGTTCCTTCGCGGTTTTCTGGCTCTGGAAGTGGCACCGAC TTCACGCTTACTATCTCTAGCCTTCAGCCGGAGGATTTTGCT ACCTACTACTGCCAACAAGGCCATTTATTCCCTATTACCTTT GGGGGCGGTACAAAAGTCGAGATCAAGCGTACG
8	V_H2 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMSWVRQAPG KGLEWVSAIDGSGDNTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS
9	V_H2 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAACTATTACGCAATGTCTTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCGATGGTTCTGGTGAT AACACTACTTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
10	V_H3 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMSWVRQAPG KGLEWVAAISGSGDGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS
11	V_H3 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAACTATTACGCAATGTCTTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGGCAGCAATCTCTGGTTCTGGTGAT GGTACTTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
12	V_H4 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[1567]

13	V_H4 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAACTATTACGCAATGTCTTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCTCTGGTTCTGGTGAT TCTACTTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
14	V_H5 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMSWVRQAPG KGLEWVAAISGGGDATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS
15	V_H5 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAACTATTACGCAATGTCTTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGGCAGCAATCTCTGGTGGTGGTGAT GCAACTTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
16	V_H6 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGDVTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS
17	V_H6 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTTATGGTTACGCAATGTCTTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTTCTATCTCTGGTTCTGGTGAT GTTACTTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
18	V_H7 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQAPG KGLEWVAAISGSGDGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS
19	V_H7 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTTATGGTTACGCAATGTCTTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGGCAGCAATCTCTGGTTCTGGTGAT GGTACTTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC

[1568]

20	V_H8 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGFGESTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS
21	V_H8 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAGAAACTACGCAATGTCTTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCTCTGGTTTTGGTGAA TCTACTTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
22	V_H9 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMNWVRQAPG KGLEWVAAISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS
23	V_H9 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAACTATTACGCAATGAACTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGGCAGCAATCTCTGGTTCTGGTGGT AGAACTTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
24	V_H10 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGNTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS
25	V_H10 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTTATGGTTACGCAATGTCTTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCTCTGGTTCTGGTGGT AACACTTCTTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
26	V_H11 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQAPG KGLEWVAAISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[1569]

27	V_H11 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTTATGGTTACGCAATGTCTTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGGCAGCAATCTCTGGTTCTGGTGAT TCTACTTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
28	V_L2 氨基酸序列	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNIHNWLAWYQQKPGK APKLLIYKASGLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQGDRFPLTFGGGTKVEIK
29	V_L2 核酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAAT ATTCATAACTGGTTGGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTGGTTTGGAAAGT GGGGTCCCATCAAGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAG TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAACCTGATGATTTTGCA ACTTACTACTGTCAACAGGGTGACAGATTCCCTCTCACTTTC GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACG
30	V_L3 氨基酸序列	DIQMTQSPSILSASVGDRVTITCRASQSISRWLAWYQQKPGK PPKLLIFKASALESGVPSRFSGSGYGTDFTLTISNLQPEDFA TYFCQQGNSFPLTFGGGTKVDIK
31	V_L3 核酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCATCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACTATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGT ATCAGTAGGTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAA CCCCCTAAACTCCTGATCTTTAAGGCGTCTGCTTTAGAAAGT GGGGTCCCATCGAGGTTCAGCGGCAGTGGATATGGGACAGAT TTCACTCTCACCATCAGCAACCTGCAGCCTGAAGACTTTGCA ACTTACTTCTGTCAACAGGGTAATAGTTTCCCTCTCACTTTC GGCGGAGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACG
32	V_L4 氨基酸序列	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNIDIWLAWYQWKPGK APKLLIYKASGLETGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGNQFPLTFGQGTRLEIK
33	V_L4 核酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAAT ATTGATATCTGGTTGGCCTGGTATCAGTGGAAACCAGGGAAG GCCCCTAAACTCCTGATCTATAAGGCGTCTGGTTTAGAAACT GGGGTCCCTTCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAA TTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGATTTTGCG ACTTACTATTGTCAACAGGGTAACCAGTTCCCGCTCACCTTC GGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGTACG
34	V_L5 氨基酸序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGRWLAWYQQKPGK APKLLIFKASALEVGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGNSFPLTFGGGTKVDIK

[1570]

35	V_L5 核酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGT ATCGGTAGGTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAACTCCTGATCTTTAAGGCGTCTGCTTTAGAAGTT GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGGTCTGGGACAGAT TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA ACTTACTATTGTCAACAGGGTAACAGTTTCCCGCTCACTTTC GGCGGAGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACG
36	V_L6 氨基酸序列	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGDSFPLTFGGGTKVEIK
37	V_L6 核酸序列	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGT ATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCGCTTTGCAAAGT GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGCGGATCTGGGACAGAT TTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCCGAAGATTTTGCA ACTTACTATTGTCAACAGGGTGACAGTTTCCCTCTCACTTTC GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACG
38	V_L7 氨基酸序列	DIQMTQSPSTLSASVGDTVTFSCRASQSINTWLAWYQQKPGK APKLLIYKASALENGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGNSFPLTFGGGTKVEIK
39	V_L7 核酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACACAGTCACCTTCAGTTGCCGGGCCAGTCAGAGT ATTAACACCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAAAAGCCAGGGAAA GCCCCTAAACTCCTTATCTATAAGGCGTCTGCTTTAGAAAAT GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAG TTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA ACTTACTATTGTCAACAGGGGAACAGTTTCCCTCTCACTTTC GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACG
40	V_L8 氨基酸序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASALESGVPSRFSGGGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGHSFPLTFGGGTKLEIK
41	V_L8 核酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGT ATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAACTCCTCATCTATAAGGCGTCTGCTTTAGAAAGT GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCGGTGGATCTGGGACAGAA TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA ACTTACTATTGTCAACAGGGTCACAGTTTCCCTCTCACTTTC GGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACG
42	V_L9 氨基酸序列	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISDWLAWYQQKPGK APKLLIFKASALEGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGNSFPITFGQGTRLEIK

[1571]

43	V_L9 核酸序列	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGT ATTAGTGACTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGTAAA GCCCCTAAACTCCTGATCTTTAAGGCTTCTGCTTTAGAAGGT GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA ACTTACTATTGTCAACAGGGTAACAGTTTCCCGATCACCTTC GGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGTACG
44	V_L10 氨基酸序列	DIQMTQSPATLSASVGDRVTITCRASQSVDRWLAWYQQKPGK APNLLIYEASALQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGDSFPLTFGGGTKVEIK
45	V_L10 核酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGCATCT GTTGGAGACAGGGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGT GTTGATAGGTGGTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAACCTCCTAATCTATGAGGCGTCTGCCTTACAAGGT GGGGTCCCGTCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA ACTTACTATTGTCAACAGGGTGATAGTTTCCCTCTCACTTTC GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACG
46	V_L11 氨基酸序列	DIQLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASGLQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGDRFPLTFGGGTKVEIK
47	V_L11 核酸序列	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGT ATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCGGTTTGCAAAAT GGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA ACTTACTATTGTCAACAGGGTGACAGGTTCCCGCTCACTTTC GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACG
48	V_H CDR1	FTFSSYAMS
49	V_H CDR1.1	FTFNYYAMS
50	V_H CDR1.2	FTFYGYAMS
51	V_H CDR1.3	FTFRNYAMS
52	V_H CDR1.4	FTFNYYAMN
53	V_H CDR1.5	FTFNYYAMXaa_1，其中 Xaa_1 = S 或 N
54	V_H CDR1.6	FTFXaa_1Xaa_2YAMS，其中 Xaa1 = S、N、Y、R；Xaa2 = S、N、Y、G
55	V_H CDR1.7	FTFXaa_1Xaa_2YAMXaa_3，其中 Xaa1 = S、N、Y、R；Xaa2 = S、N、Y、G；Xaa3 = S 或 N。
56	V_H CDR2	SAISGSGGSTYY
57	V_H CDR2.1	SAIDGSGDNTTY
58	V_H CDR2.2	AAISGSGDGTYY
59	V_H CDR2.3	SAISGSGDSTYY
60	V_H CDR2.4	AAISGGGDATYY
61	V_H CDR2.5	SSISGSGDVTYY
62	V_H CDR2.6	SAISGFGESTYY
63	V_H CDR2.7	AAISGSGGRTYY
64	V_H CDR2.8	SAISGSGGNTSY

[1572]

65	V_H CDR2.9	AAISGSGDSTYY
66	V_H CDR2.10	AAISGXaa1GXaa2Xaa3TYY，其中 Xaa1 = S 或 G；Xaa2 = D 或 G；Xaa3 = S、R、G、A
67	V_H CDR2.11	$Xaa_1Xaa_2IXaa_3GXaa_4GXaa_5Xaa_6TXaa_7Y$
68	V_H CDR3	AKDSPFLLDDYYYYYYMD
69	V_L CDR1	RASQGISSWLAW
70	V_L CDR1.1	RASQNIHNWLAW
71	V_L CDR1.2	RASQSISRWLAW
72	V_L CDR1.3	RASQNIDIWLAW
73	V_L CDR1.4	RASQSIGRWLAW
74	V_L CDR1.5	RASQSISSWLAW
75	V_L CDR1.6	RASQSINTWLAW
76	V_L CDR1.7	RASQSISDWLAW
77	V_L CDR1.8	RASQSVDRWLAW
78	V_L CDR2	YAASSLQS
79	V_L CDR2.1	YKASGLES
80	V_L CDR2.2	FKASALES
81	V_L CDR2.3	YKASGLET
82	V_L CDR2.4	FKASALEV
83	V_L CDR2.5	YAASALQS
84	V_L CDR2.6	YKASALEN
85	V_L CDR2.7	YKASALES
86	V_L CDR2.8	FKASALEG
87	V_L CDR2.9	YEASALQG
88	V_L CDR2.10	YAASGLQN
89	V_L CDR3	QQGHLFPITF
90	V_L CDR3.1	QQGDRFPLTF
91	V_L CDR3.2	QQGNSFPLTF
92	V_L CDR3.3	QQGNQFPLTF
93	V_L CDR3.4	QQGDSFPLTF
94	V_L CDR3.5	QQGHSFPLTF
95	V_L CDR3.6	QQGNSFPITF
96	V_L CDR3.7	$QQGXaa_1Xaa_2FPXaa_3TF$
97	人 CD137L Uniprot ID -- P41273	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLLA AACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGL LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPR SE
98	FLAG	DYKDDDDK
99	6-His	HHHHHH
100	HA	YPYDVPDYA
101	V_H12 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGDTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[1573]

102	V_H12 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAGAAACTACGCAATGTCTTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCTCTGGTTCTGGTGAT ACTACTTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
103	V_H13 氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS
104	V_H13 核酸序列	GAAGTGCAATTATTGGAATCCGGCGGCGGTTTAGTTCAGCCA GGTGGCTCTTTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGATTCACC TTTGGTTCTTACGCAATGTCTTGGGTTCGCCAGGCGCCCGGT AAGGGTCTGGAGTGGGTGTCTGCAATCTCTGGTTCTGGTGGT TCTACTTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGTCGTTTTACCATA AGCCGCGACAATTCTAAGAATACTTTATATCTTCAAATGAAT TCGCTGCGGGCAGAAGACACGGCCGTCTATTACTGCGCAAAG GACTCACCTTTTCTATTAGACGACTACTACTACTACTACTAC ATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACTGTCACCGTCTCCTCA GCTAGC
105	V_L12 氨基酸序列	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGDWLAWYQQKPGK APKLLIYKASGLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFA TYYCQQGNQFPLTFGQGTRLE
106	V_L12 核酸序列	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTAACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGAT ATTGGTGACTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTGGTTTACAAAGT GGGGTCCCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAA TTCACTCTCACTATCAGCAACCTGCAGCCAGAGGATTTTGCG ACTTACTATTGTCAACAGGGTAACCAGTTCCCGCTCACCTTC GGCCAAGGGACACGACTGGAG
107	V_H CDR1.8	FTFGWYAMS
108	V_H CDR2.12	SAISGSGDTTYY
109	V_L CDR1.9	RASQDIGDWLAW
110	V_L CDR2.11	YKASGLQS
111	V_H CDR3.1	AKASPFLLDDYYYYYYMD
112	V_H CDR3.2	AKDAPFLLDDYYYYYYMD
113	V_H CDR3.3	AKDSAFLLDDYYYYYYMD
114	V_H CDR3.4	AKDSPALLDDYYYYYYMD
115	V_H CDR3.5	AKDSPFALDDYYYYYYMD
116	V_H CDR3.6	AKDSPFLADDYYYYYYMD
117	V_H CDR3.7	AKDSPFLLADYYYYYYMD
118	V_H CDR3.8	AKDSPFLLDAYYYYYYMD
119	V_H CDR3.9	AKDSPFLLDDAYYYYYMD
120	V_H CDR3.10	AKDSPFLLDDYAYYYYMD
121	V_H CDR3.11	AKDSPFLLDDYYAYYYMD
122	V_H CDR3.12	AKDSPFLLDDYYYAYYMD

[1574]

123	V_H CDR3.13	AKDSPFLLDDYYYYAYMD
124	V_H CDR3.14	AKDSPFLLDDYYYYYAMD
125	V_H CDR3.15	AKDSPFLLDDYYYYYYAD
126	V_H CDR3.16	DXXXXLXXXXYXYYX
127	V_H CDR3.17	DXPFXLDXXYYYYYX
128	V_H CDR3.18	$DX_1X_2X_3X_4LX_5X_6X_7X_8YX_9YYX_{10}$
129	mAb1 重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
130	mAb8 重链 V1	GTEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGDTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
131	mAb8 重链 V2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGDTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
132	mAb10 重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYGYAMSWVRQAPG KGLEWVAAISGSGDSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSPFLLDDYYYYYYMDVWGKGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

[1575]

133	mAb1、mAb8和mAb10轻链	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQGHLFPITFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC

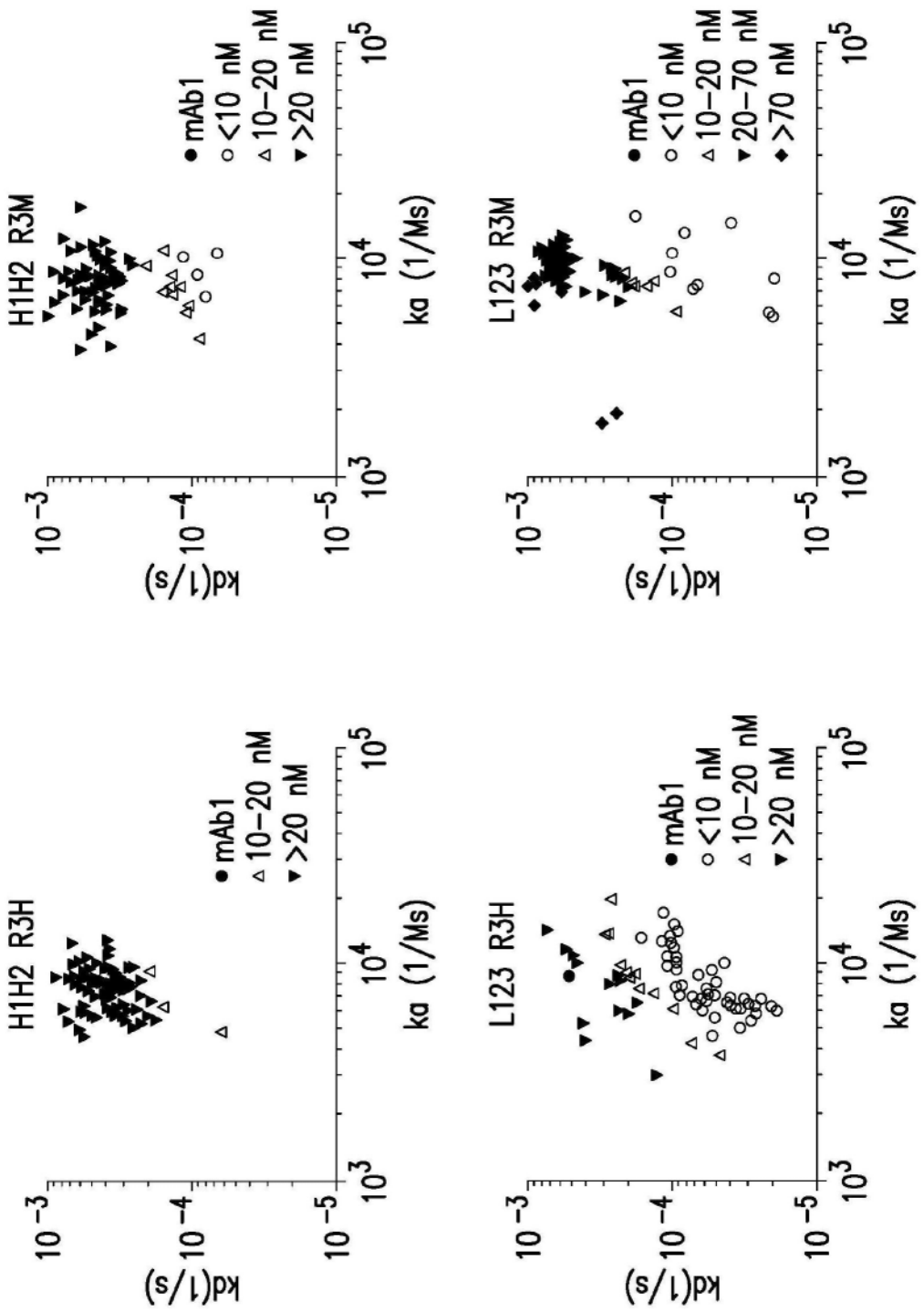

H1H2 R3M
mAb1
<10 nM
10–20 nM
>20 nM
kd(1/s)
ka (1/Ms)
L123 R3M
mAb1
<10 nM
10–20 nM
20–70 nM
>70 nM
kd(1/s)
ka (1/Ms)
H1H2 R3H
mAb1
10–20 nM
>20 nM
kd(1/s)
ka (1/Ms)
L123 R3H
mAb1
<10 nM
10–20 nM
>20 nM
kd(1/s)
ka (1/Ms)

图1

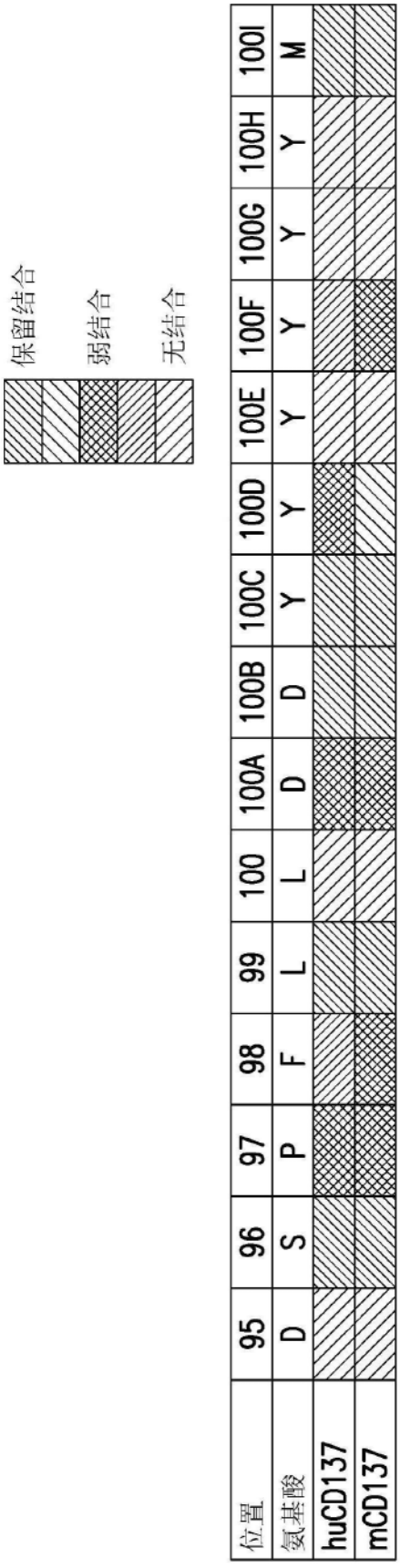

保留结合
弱结合
无结合
位置 95 96 97 98 99 100 100A 100B 100C 100D 100E 100F 100G 100H 100I
氨基酸 D S P F L L D D Y Y Y Y Y M
huCD137
mCD137

图2

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC
SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC
DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK
DCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG

mAb1

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC
SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC
DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK
DCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG

mAb4

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC
SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC
DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK
DCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG

mAb5

图3A

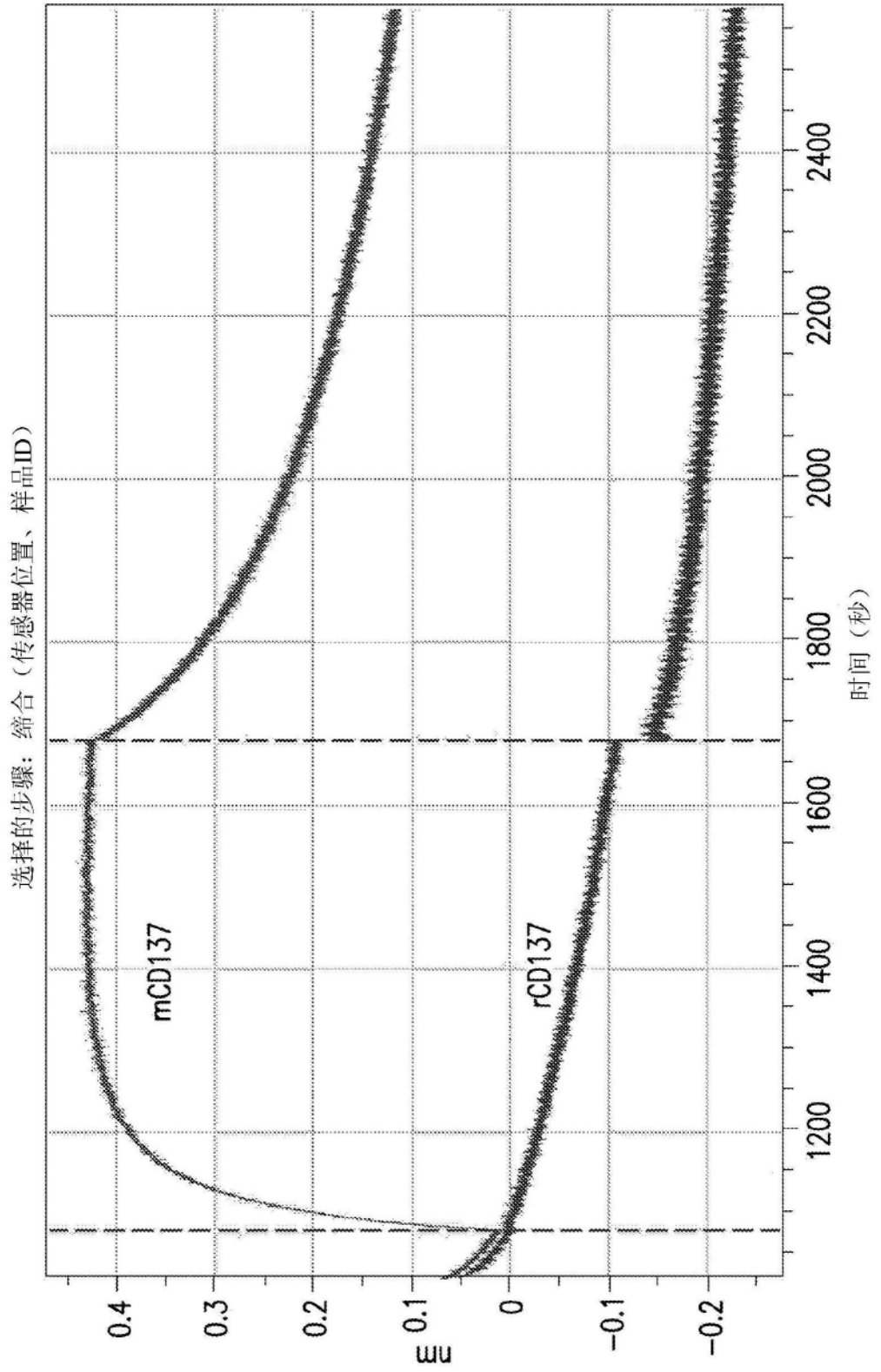

选择的步骤：综合（传感器位置、样品ID）
mCD137
rCD137
nm
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
1200
1400
1600
1800
2000
2200
2400
时间（秒）

图3B

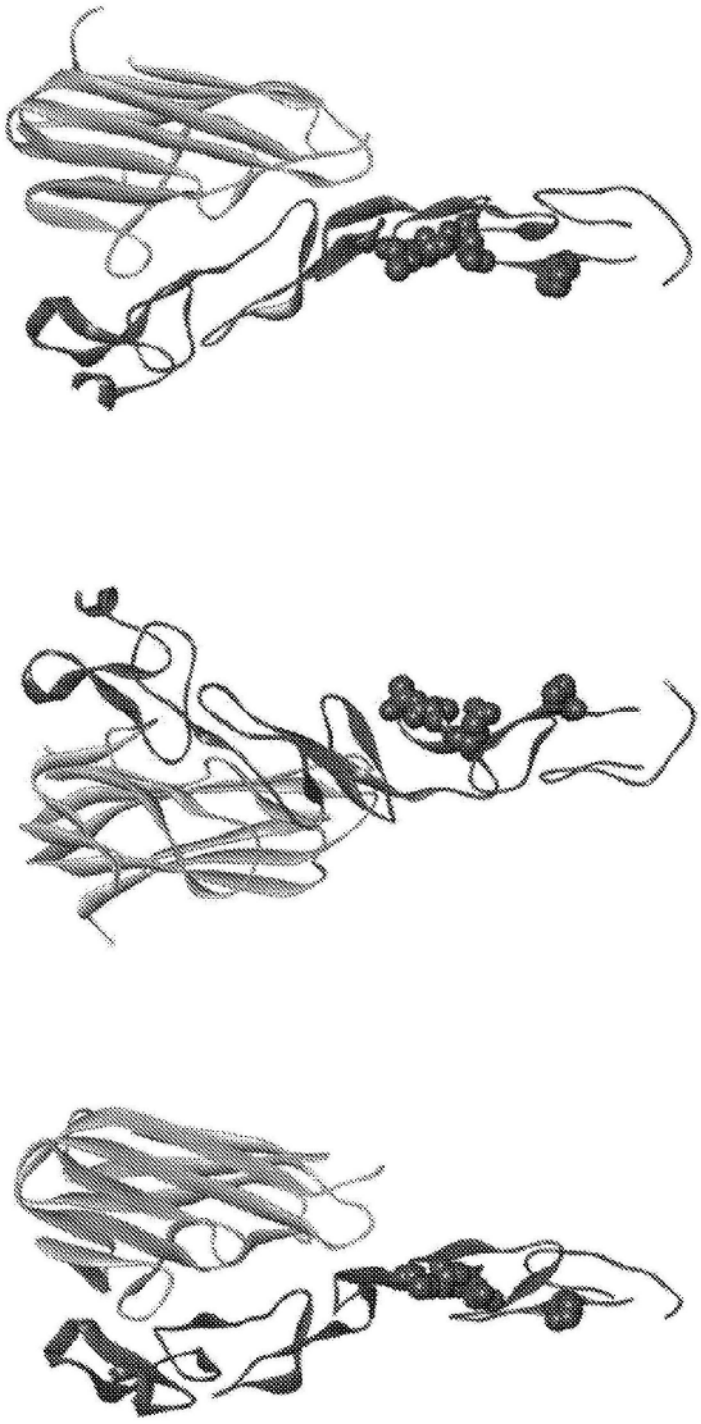


图3C

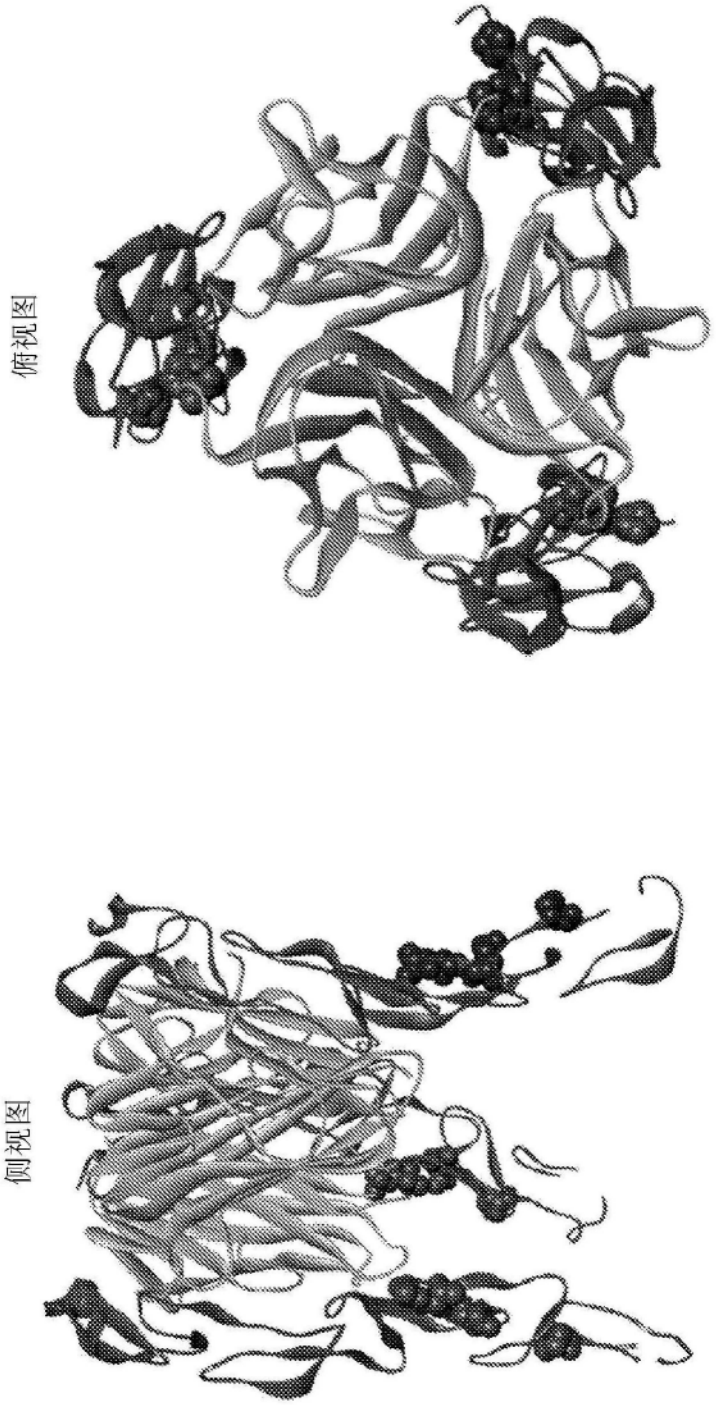


图3D

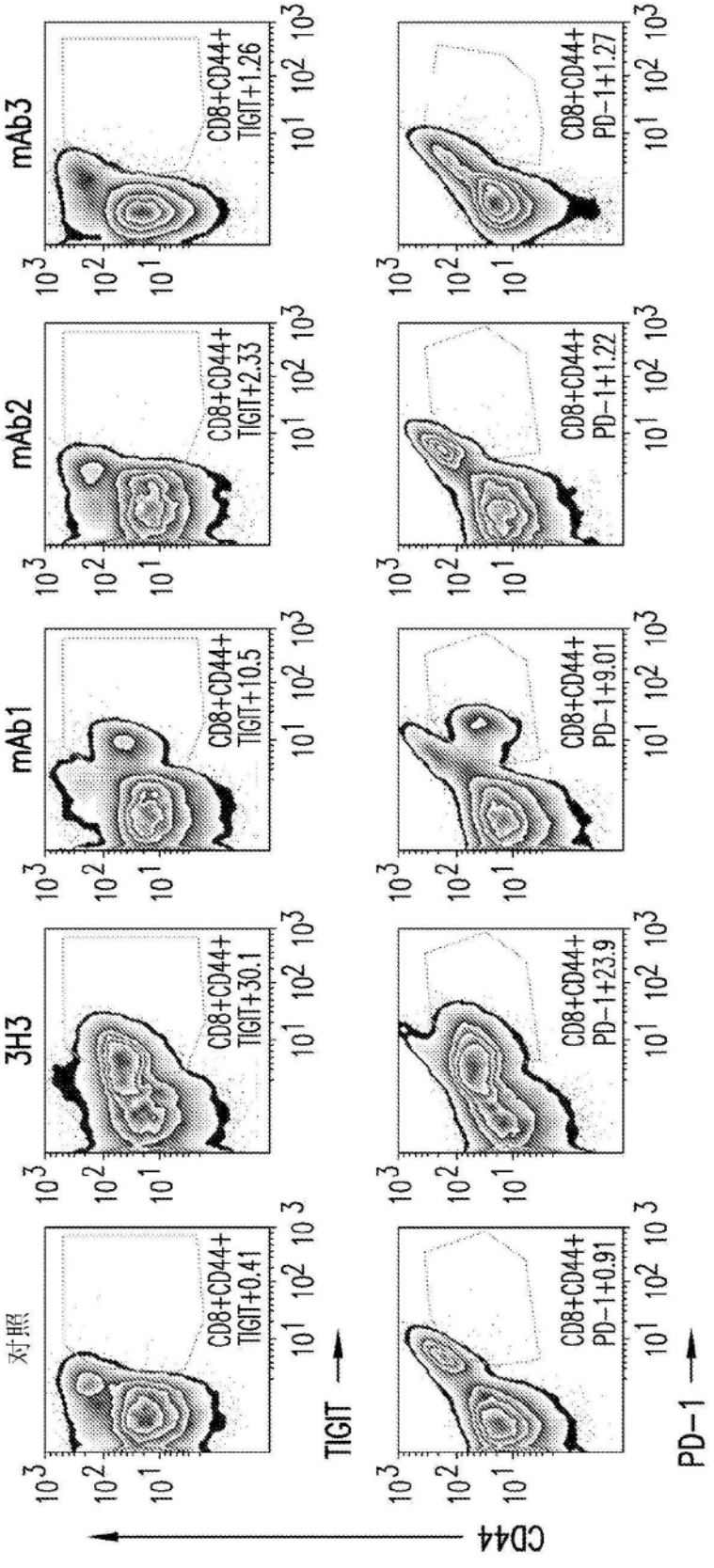

对照
3H3
mAb1
mAb2
mAb3
CD8+CD44+ TIGIT+0.41
CD8+CD44+ TIGIT+30.1
CD8+CD44+ TIGIT+10.5
CD8+CD44+ TIGIT+2.33
CD8+CD44+ TIGIT+1.26
CD8+CD44+ PD-1+0.91
CD8+CD44+ PD-1+23.9
CD8+CD44+ PD-1+9.01
CD8+CD44+ PD-1+1.22
CD8+CD44+ PD-1+1.27
TIGIT
PD-1
CD44

图4A

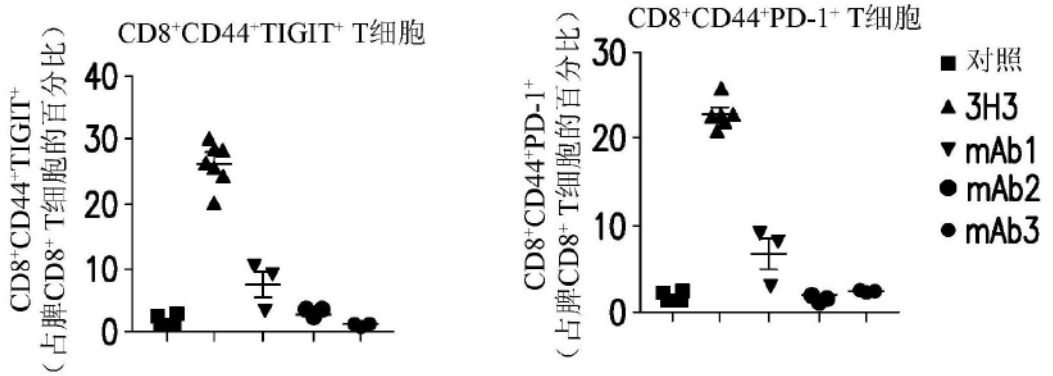

CD8+CD44+TIGIT+ T细胞
CD8+CD44+TIGIT+（占脾CD8+ T细胞的百分比）
40
30
20
10
0
CD8+CD44+PD-1+ T细胞
CD8+CD44+PD-1+（占脾CD8+ T细胞的百分比）
30
20
10
0
对照
3H3
mAb1
mAb2
mAb3

图4B

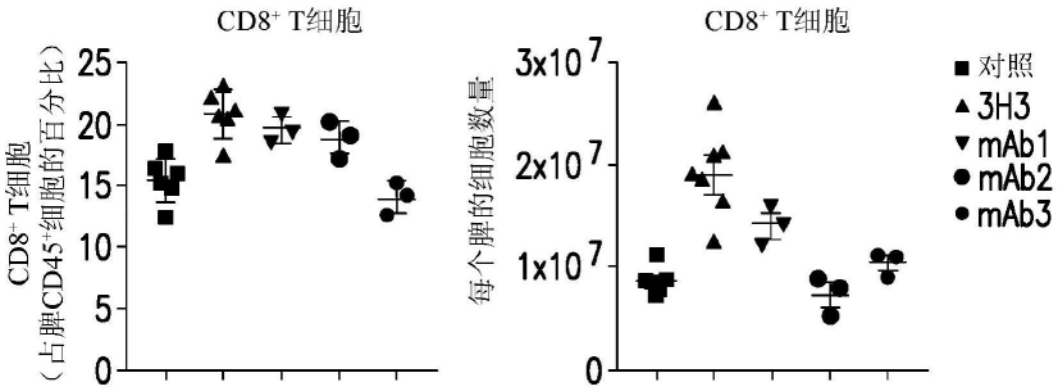

CD8+ T细胞
CD8+ T细胞（占脾CD45+细胞的百分比）
25
20
15
10
5
0
CD8+ T细胞
每个脾的细胞数量
3x10 7
2x10 7
1x10 7
0
对照
3H3
mAb1
mAb2
mAb3

图4C

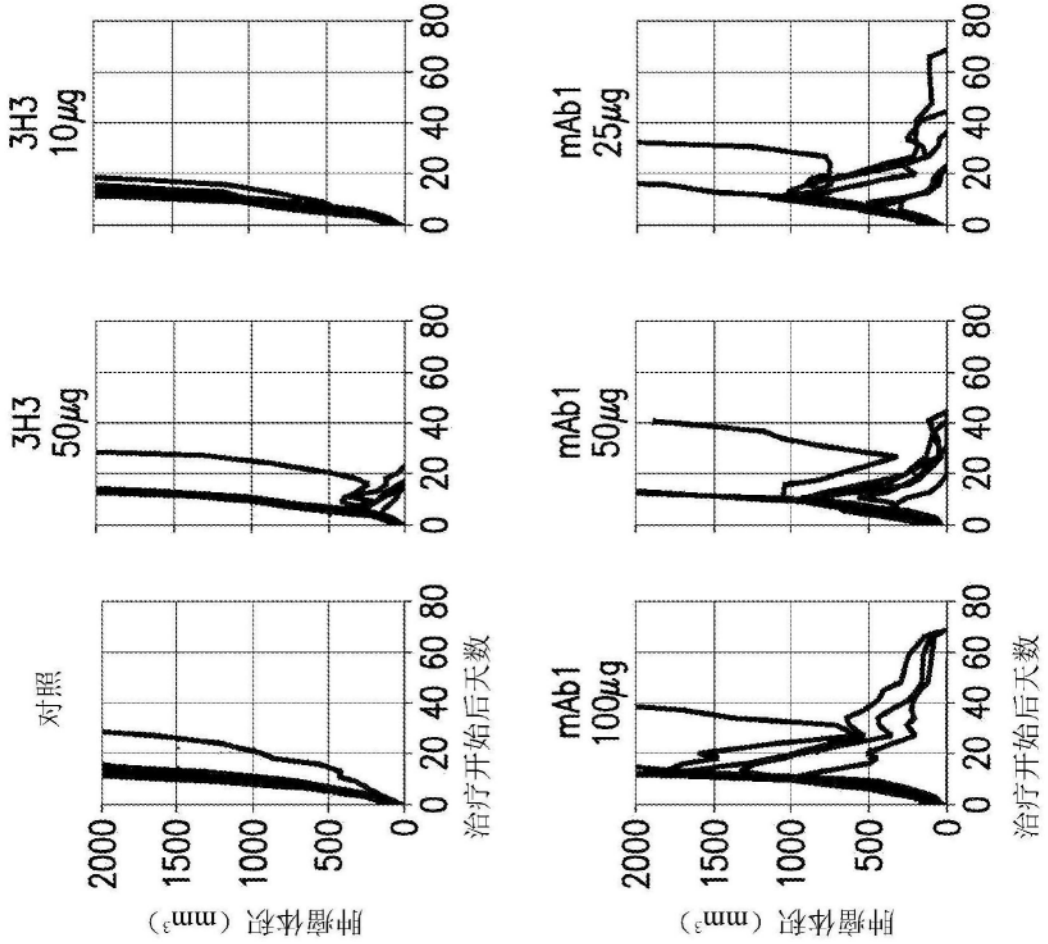

对照
3H3 10μg
3H3 50μg
mAb1 25μg
mAb1 50μg
mAb1 100μg
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0 20 40 60 80
治疗开始后天数

图5A

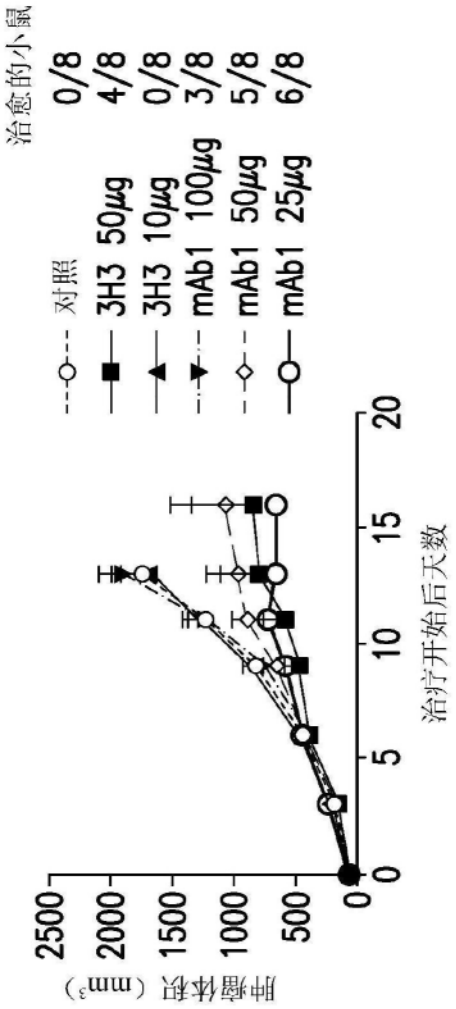

治愈的小鼠
对照 0/8
3H3 50μg 4/8
3H3 10μg 0/8
mAb1 100μg 3/8
mAb1 50μg 5/8
mAb1 25μg 6/8
肿瘤体积（mm³）
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
治疗开始后天数

图5B

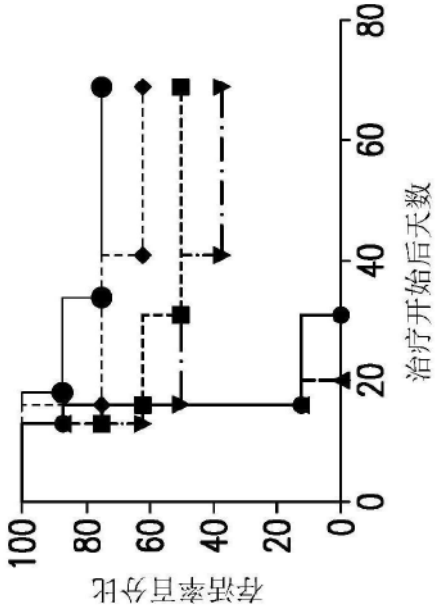

存活率百分比
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
治疗开始后天数

图5C

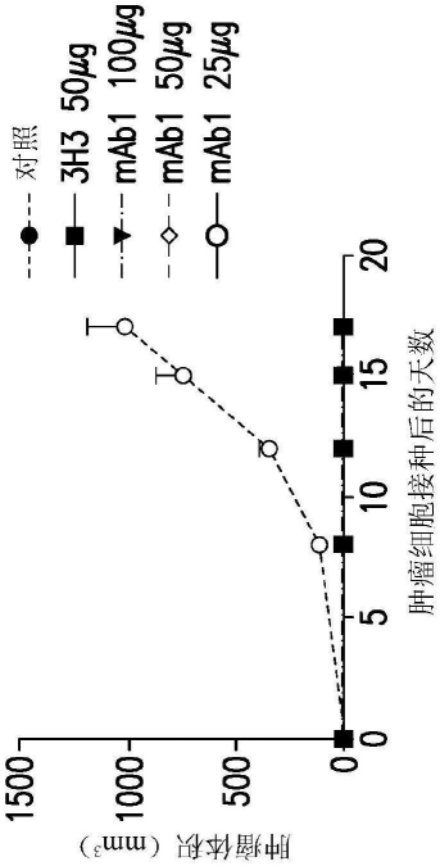

肿瘤体积（mm³）
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
肿瘤细胞接种后的天数
对照
3H3 50μg
mAb1 100μg
mAb1 50μg
mAb1 25μg

图5D

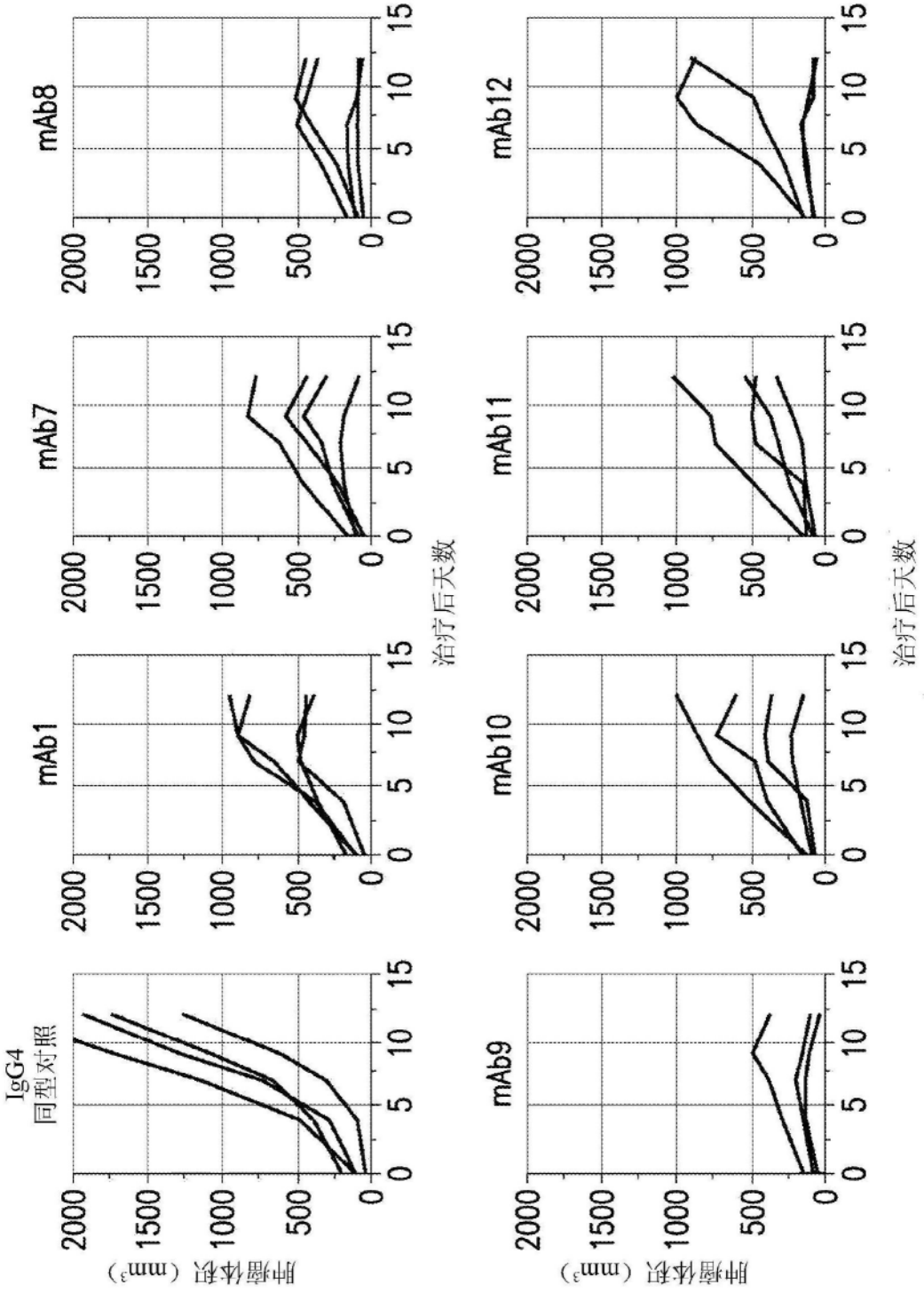

IgG4
同型对照
mAb1
mAb7
mAb8
mAb9
mAb10
mAb11
mAb12
肿瘤体积（mm³）
治疗后天数
0
500
1000
1500
2000
0
5
10
15

图6A

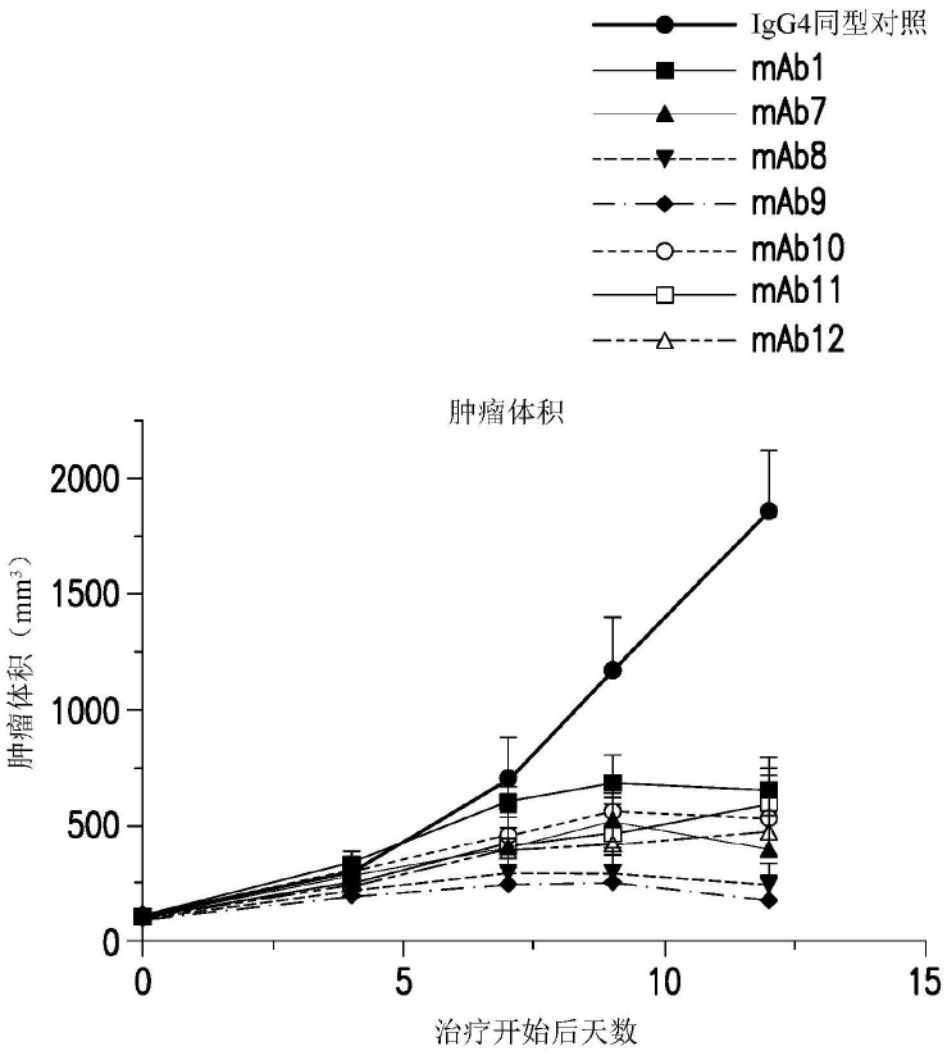

IgG4同型对照
mAb1
mAb7
mAb8
mAb9
mAb10
mAb11
mAb12
肿瘤体积
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
治疗开始后天数

图6B

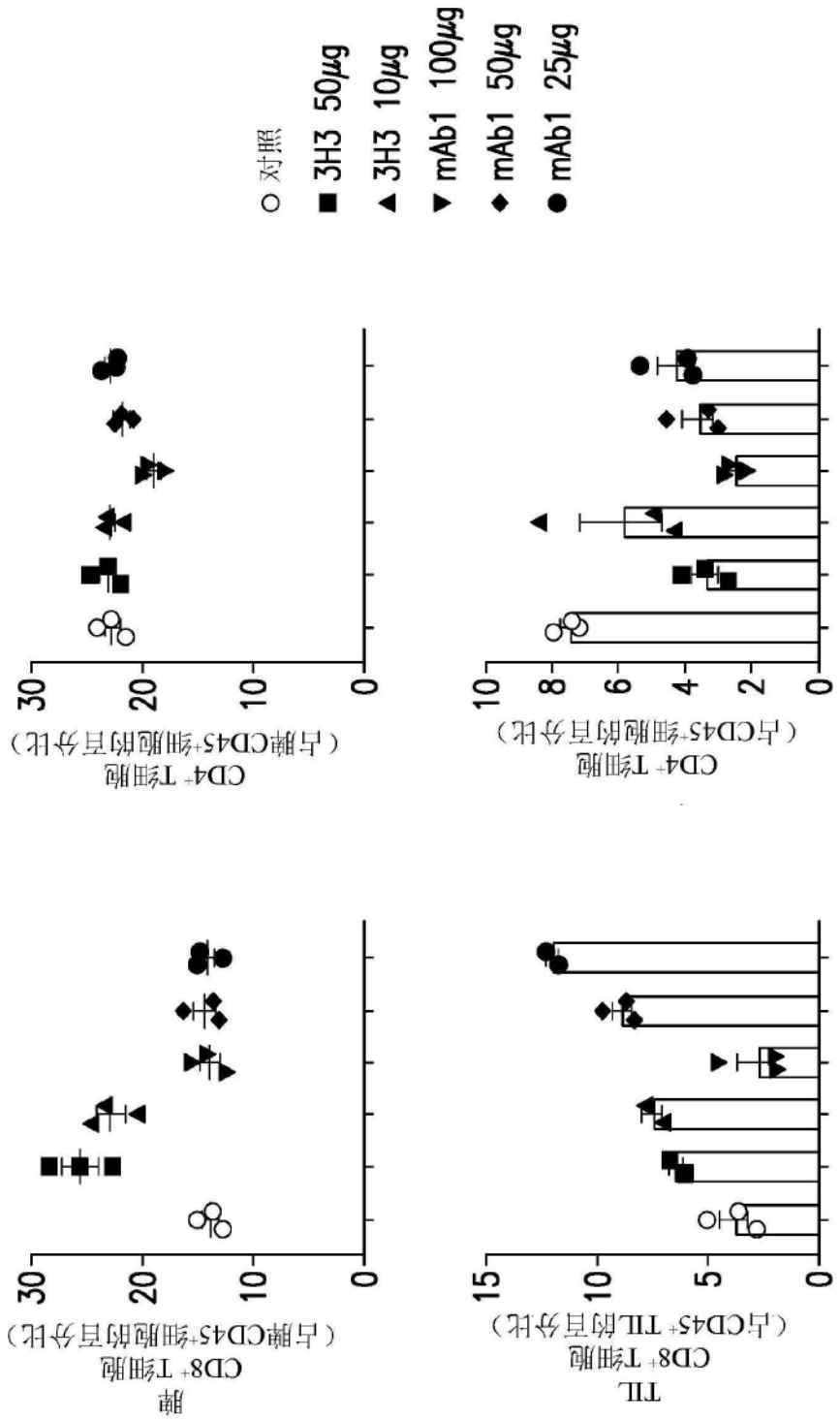

对照
3H3 50μg
3H3 10μg
mAb1 100μg
mAb1 50μg
mAb1 25μg
TIL
CD8+ T细胞
（占CD45+ TIL的百分比）
CD4+ T细胞
（占CD45+细胞的百分比）
脾
CD8+ T细胞
（占脾CD45+细胞的百分比）
CD4+ T细胞
（占脾CD45+细胞的百分比）

图7

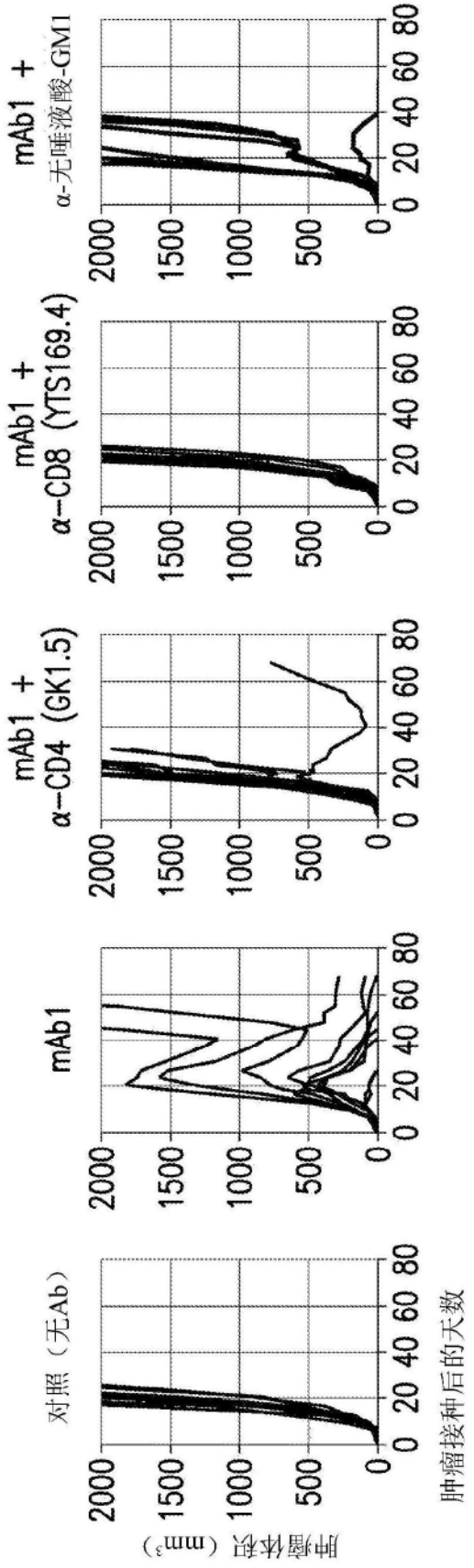

对照（无Ab）
mAb1
mAb1 + α-CD4 (GK1.5)
mAb1 + α-CD8 (YTS169.4)
mAb1 + α-无唾液酸-GM1
肿瘤体积（mm³）
肿瘤接种后的天数
0
500
1000
1500
2000
0 20 40 60 80

图8

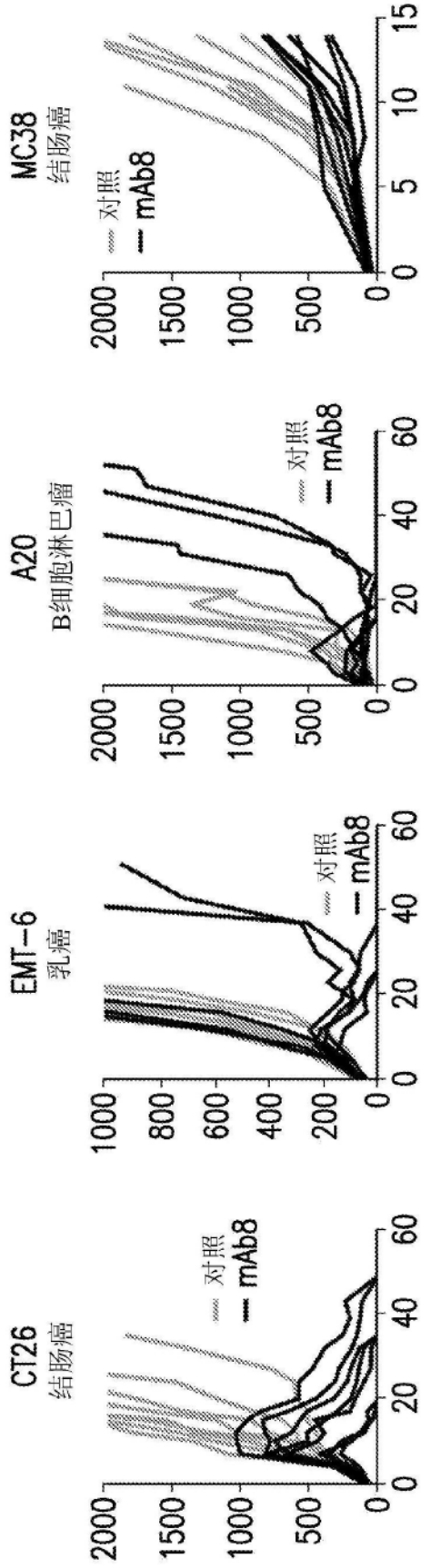

CT26
结肠癌
对照
mAb8
EMT-6
乳癌
对照
mAb8
A20
B细胞淋巴瘤
对照
mAb8
MC38
结肠癌
对照
mAb8

图9

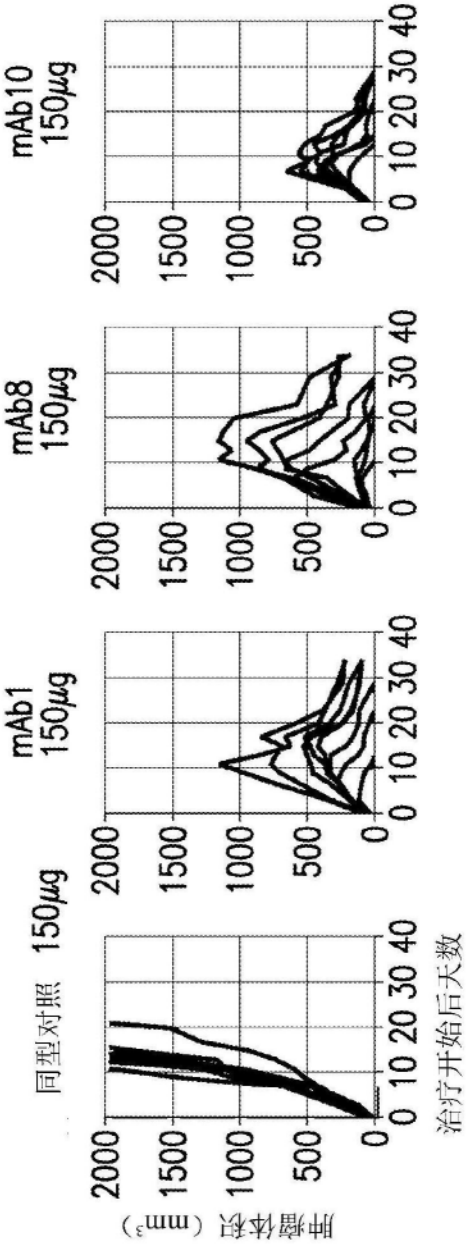

同型对照 150μg
mAb1 150μg
mAb8 150μg
mAb10 150μg
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0 10 20 30 40
治疗开始后天数

图10A

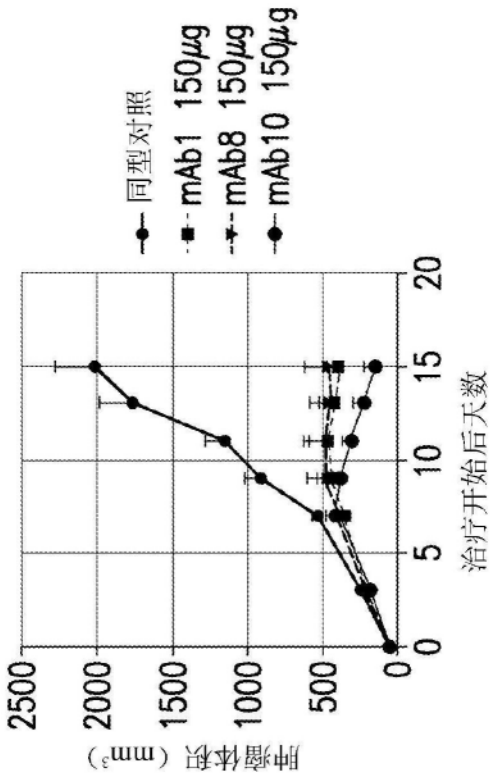

同型对照
mAb1 150μg
mAb8 150μg
mAb10 150μg
肿瘤体积（mm³）
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
治疗开始后天数

图10B

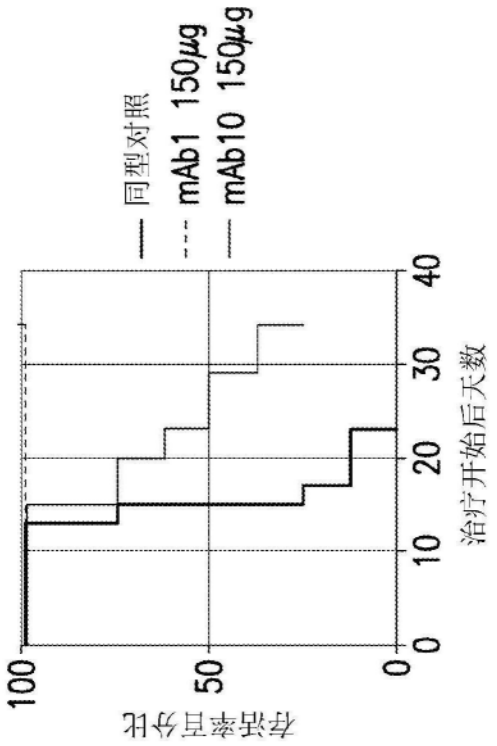

同型对照
mAb1 150μg
mAb10 150μg
存活率百分比
100
50
0
0
10
20
30
40
治疗开始后天数

图10C

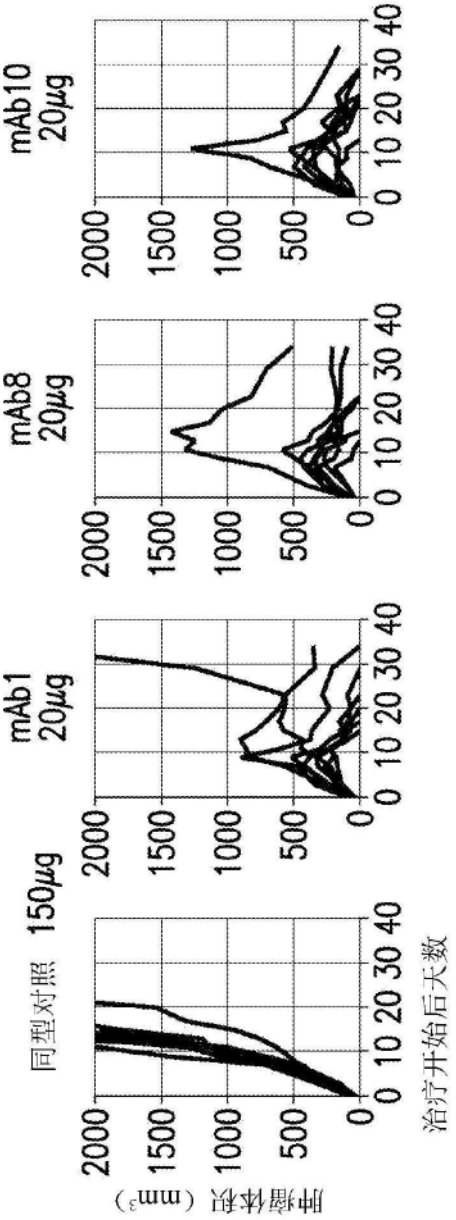

同型对照 150μg
mAb1 20μg
mAb8 20μg
mAb10 20μg
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0 10 20 30 40
治疗开始后天数

图11A

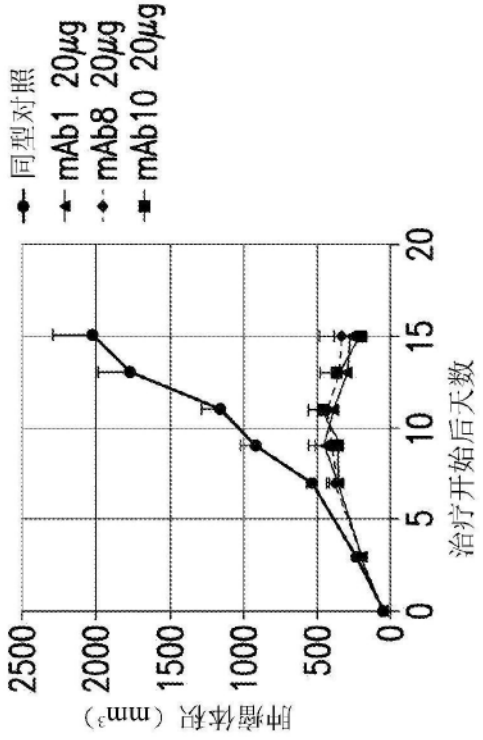

同型对照
mAb1 20μg
mAb8 20μg
mAb10 20μg
肿瘤体积（mm³）
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
治疗开始后天数

图11B

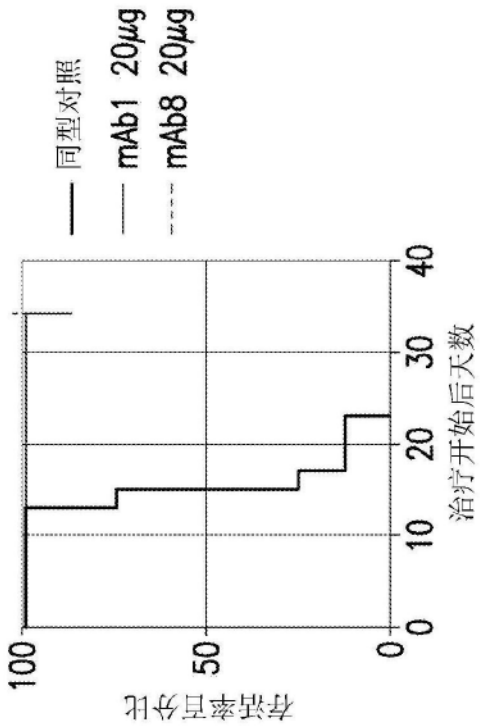

同型对照
mAb1 20μg
mAb8 20μg
存活率百分比
100
50
0
0
10
20
30
40
治疗开始后天数

图11C

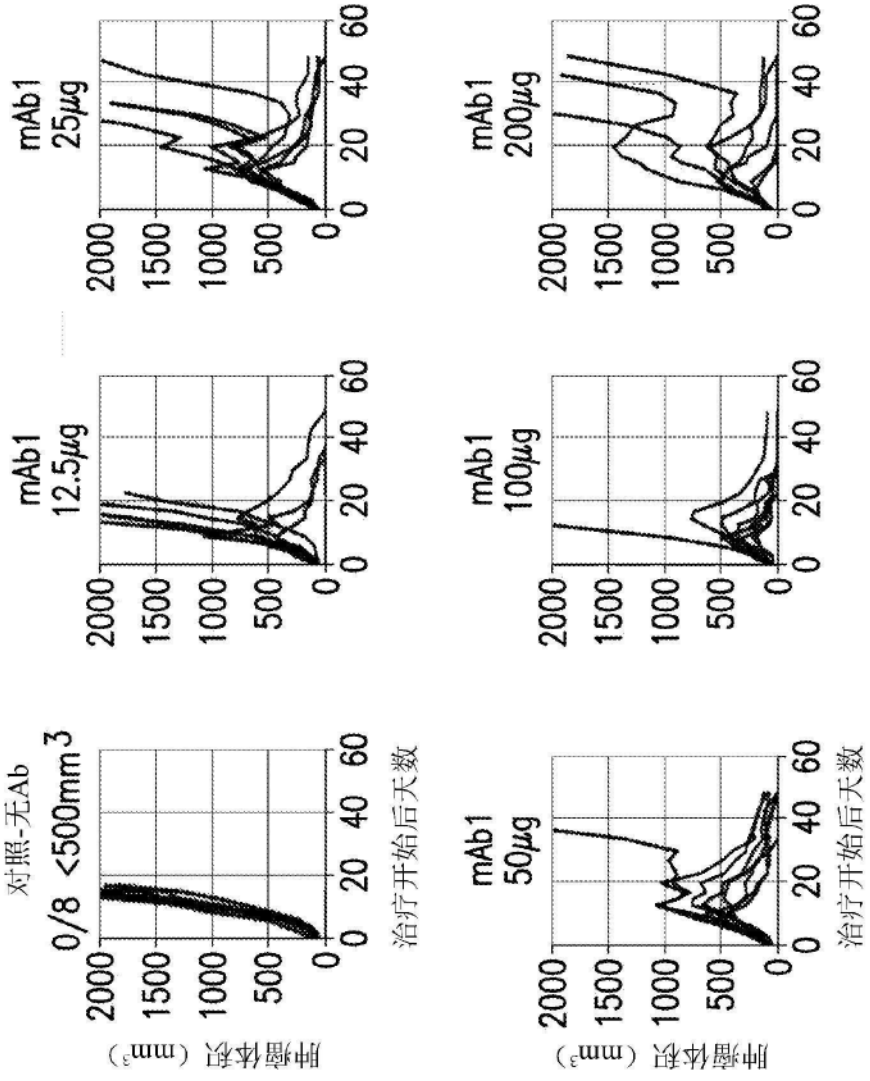

对照-无Ab
0/8 <500mm3
mAb1 12.5μg
mAb1 25μg
mAb1 50μg
mAb1 100μg
mAb1 200μg
肿瘤体积（mm3）
治疗开始后天数
0
500
1000
1500
2000
0
20
40
60

图12

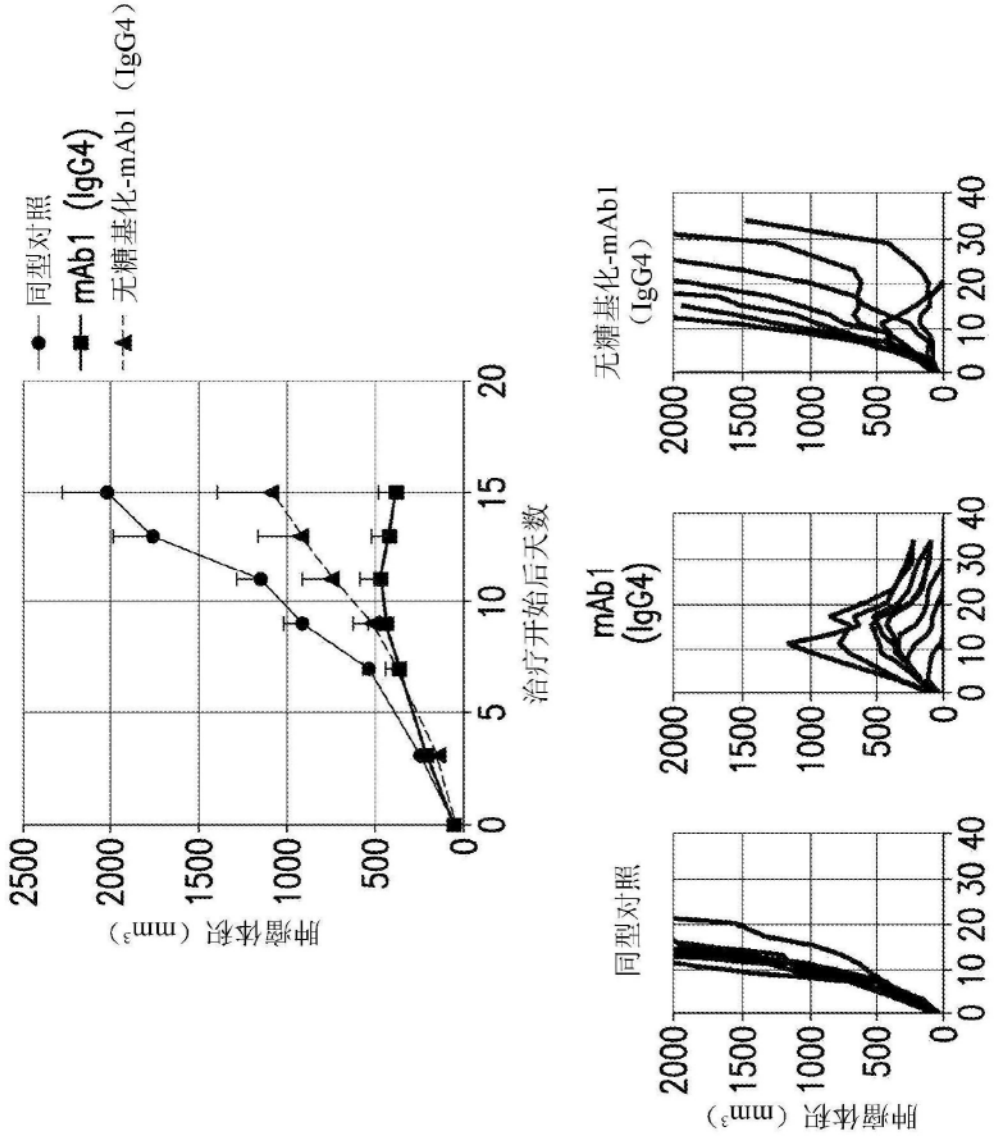

同型对照
mAb1 (IgG4)
无糖基化-mAb1（IgG4）
肿瘤体积（mm³）
治疗开始后天数
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
同型对照
mAb1 (IgG4)
无糖基化-mAb1 (IgG4)
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0 10 20 30 40

图13A

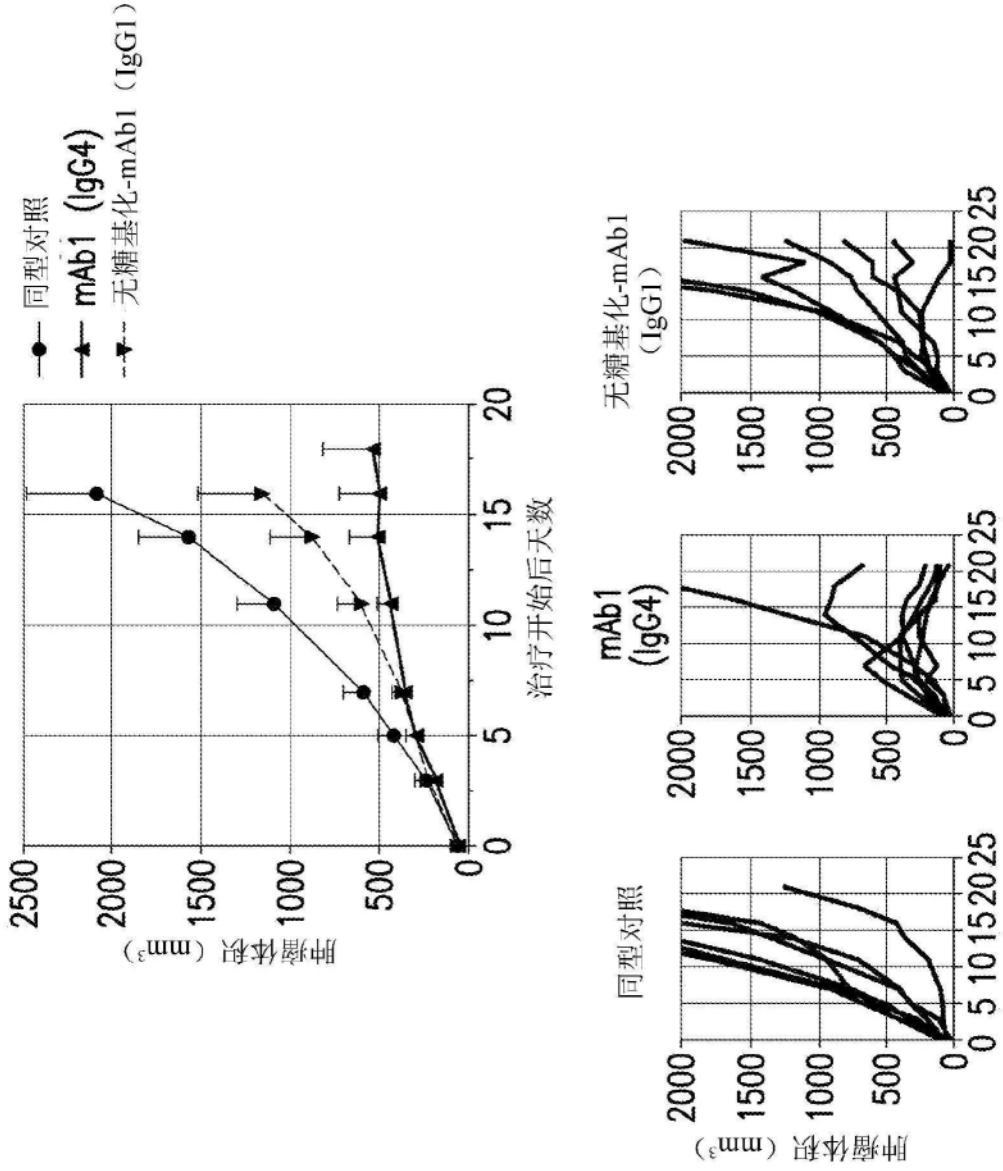

同型对照
mAb1 (IgG4)
无糖基化-mAb1（IgG1）
肿瘤体积（mm³）
治疗开始后天数
0
500
1000
1500
2000
2500
0
5
10
15
20
25

图13B

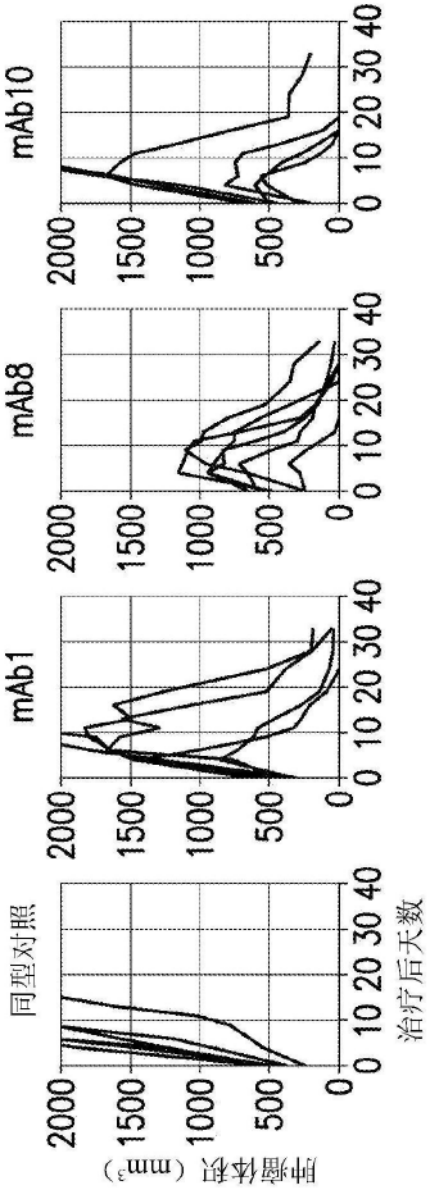

同型对照
mAb1
mAb8
mAb10
肿瘤体积（mm³）
治疗后天数
0
500
1000
1500
2000
0 10 20 30 40

图14A

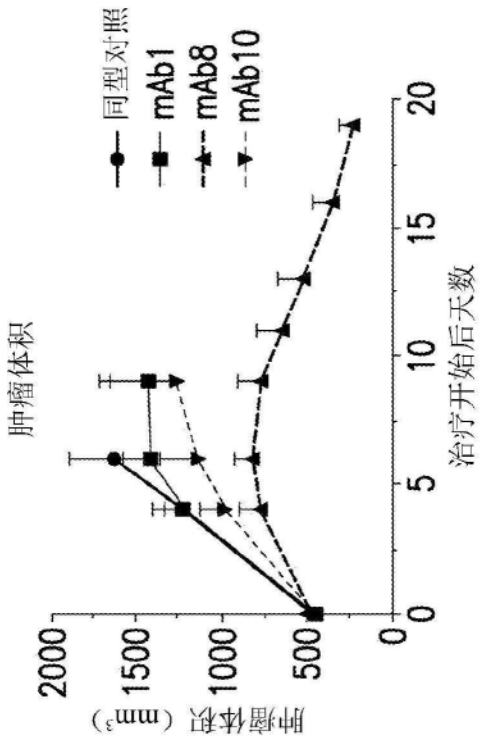

同型对照
mAb1
mAb8
mAb10
肿瘤体积
肿瘤体积（mm³）
治疗开始后天数
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20

图14B

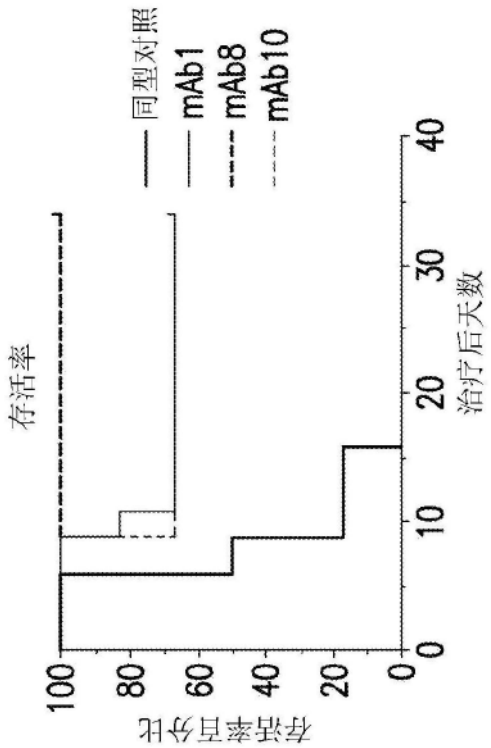

同型对照
mAb1
mAb8
mAb10
存活率
存活率百分比
治疗后天数
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40

图14C

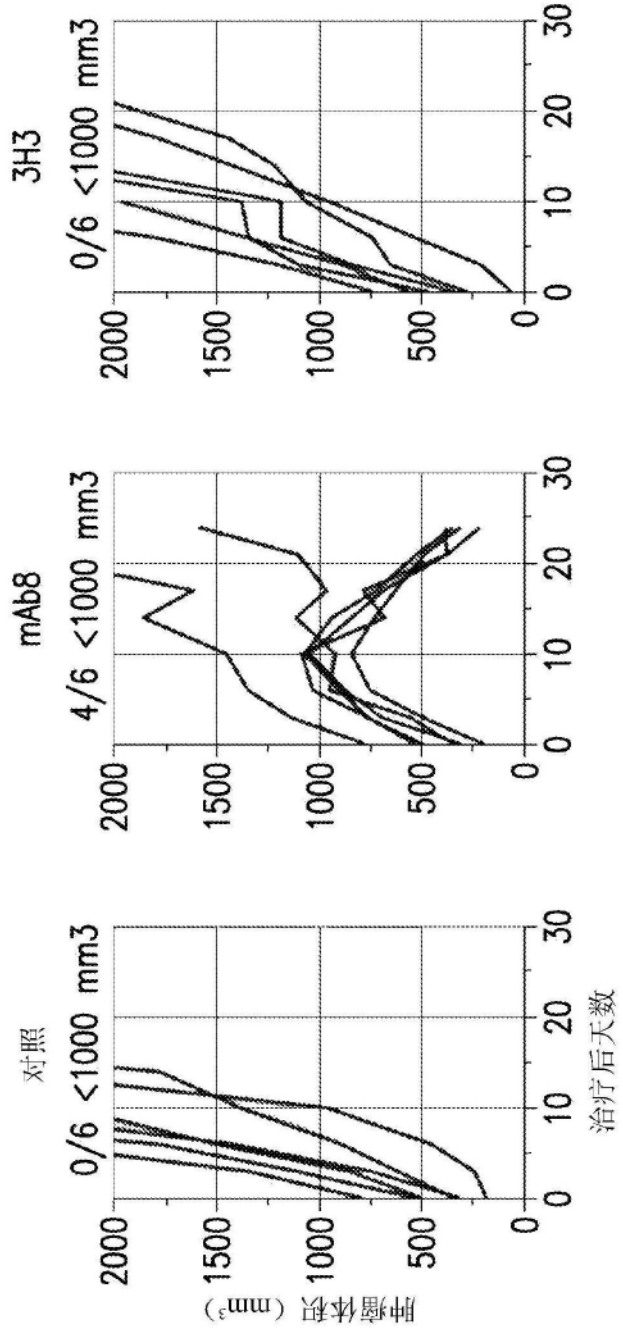

3H3
0/6 <1000 mm3
mAb8
4/6 <1000 mm3
对照
0/6 <1000 mm3
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
肿瘤体积（mm³）
治疗后天数

图14D

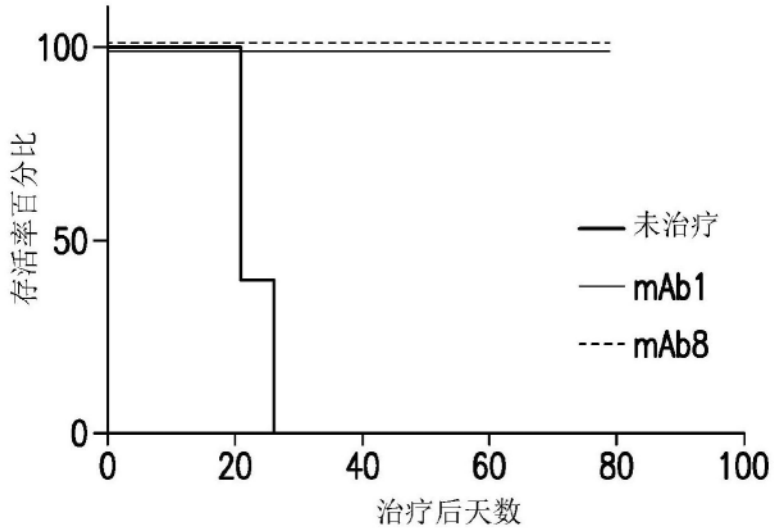

100
50
0
存活率百分比
0
20
40
60
80
100
治疗后天数
未治疗
mAb1
mAb8

图15

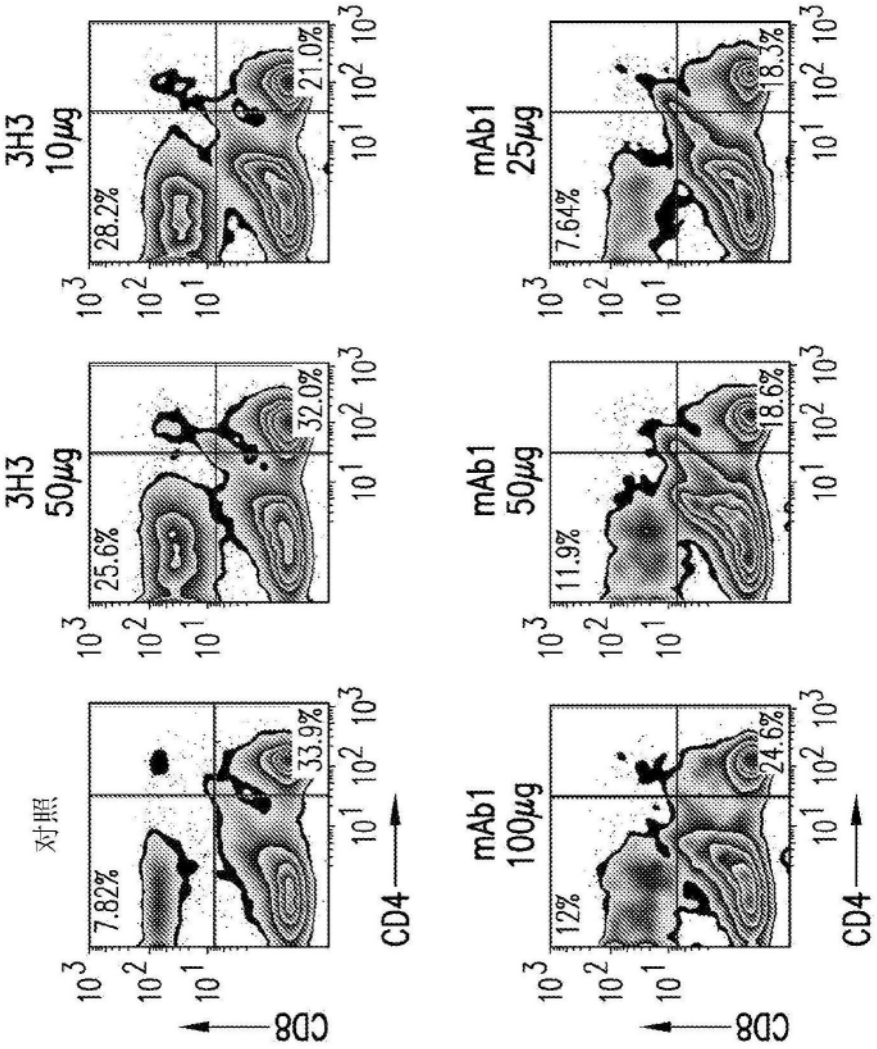

3H3
10μg
28.2%
21.0%
mAb1
25μg
7.64%
18.3%
3H3
50μg
25.6%
32.0%
mAb1
50μg
11.9%
18.6%
对照
7.82%
33.9%
mAb1
100μg
12%
24.6%
CD4
CD8

图16A

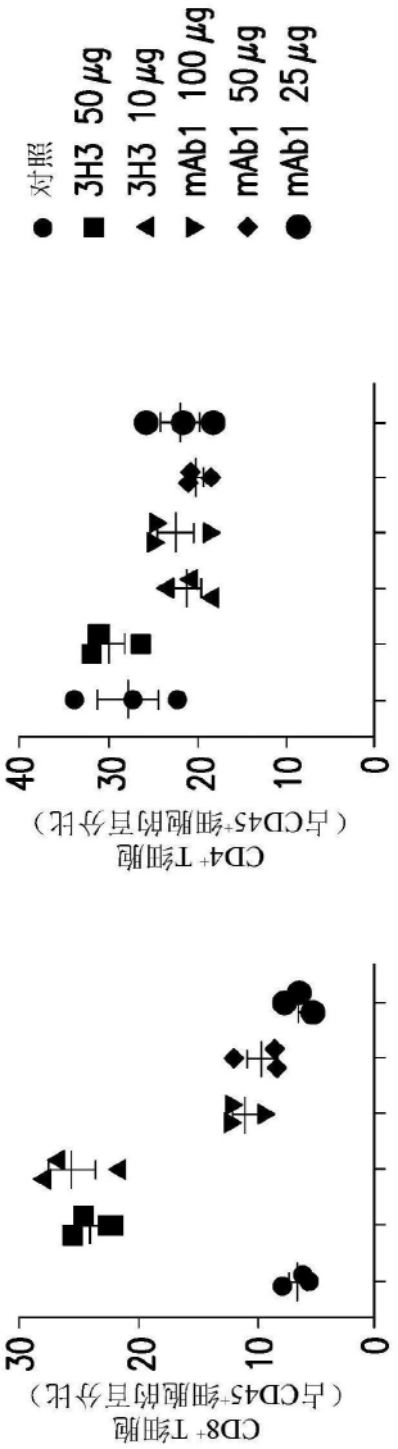

对照
3H3 50μg
3H3 10μg
mAb1 100μg
mAb1 50μg
mAb1 25μg
CD4+ T细胞
（占CD45+细胞的百分比）
0
10
20
30
40
CD8+ T细胞
（占CD45+细胞的百分比）
0
10
20
30

图16B

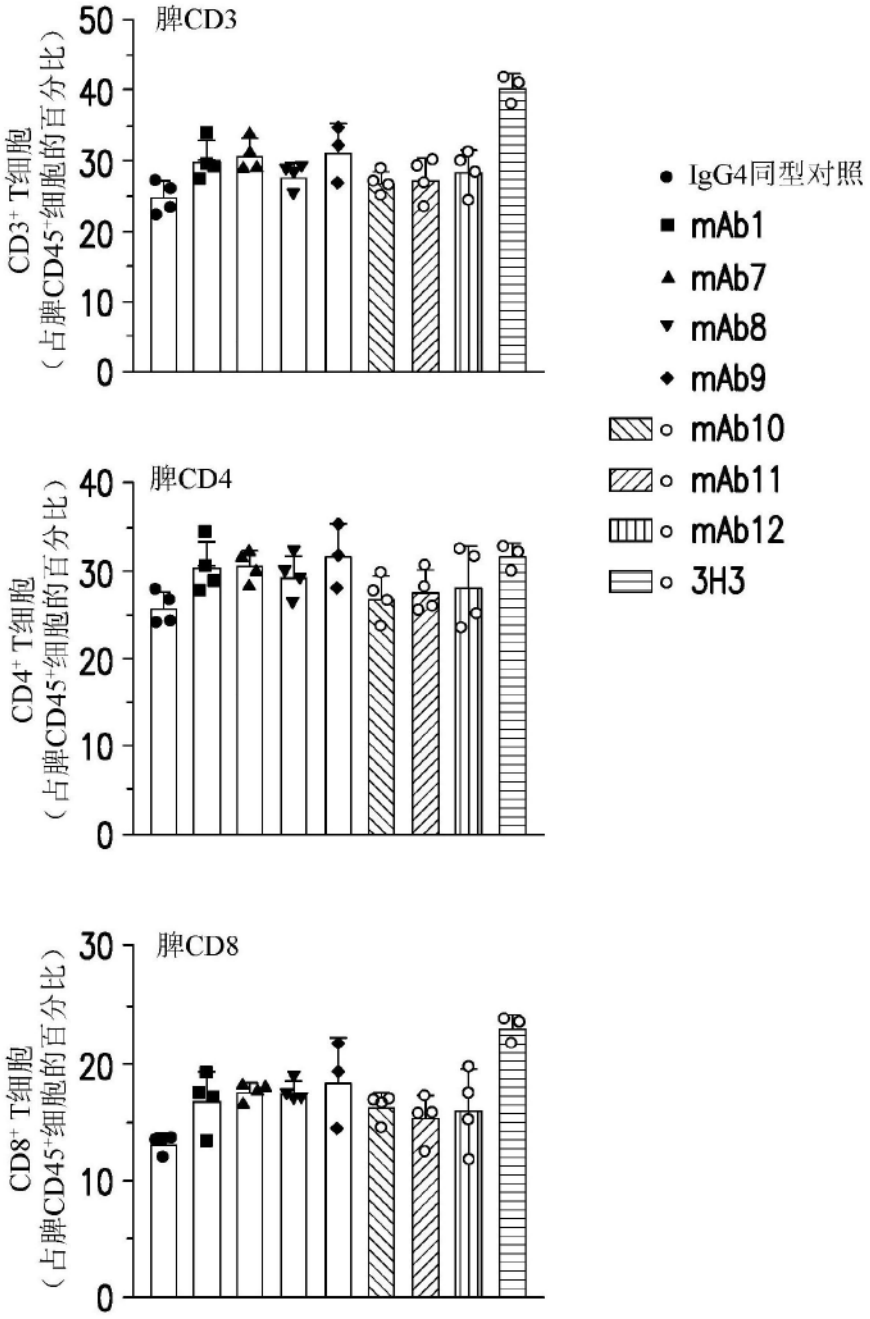

脾CD3
CD3+ T细胞
（占脾CD45+细胞的百分比）
50
40
30
20
10
0
脾CD4
CD4+ T细胞
（占脾CD45+细胞的百分比）
40
30
20
10
0
脾CD8
CD8+ T细胞
（占脾CD45+细胞的百分比）
30
20
10
0
IgG4同型对照
mAb1
mAb7
mAb8
mAb9
mAb10
mAb11
mAb12
3H3

图17A

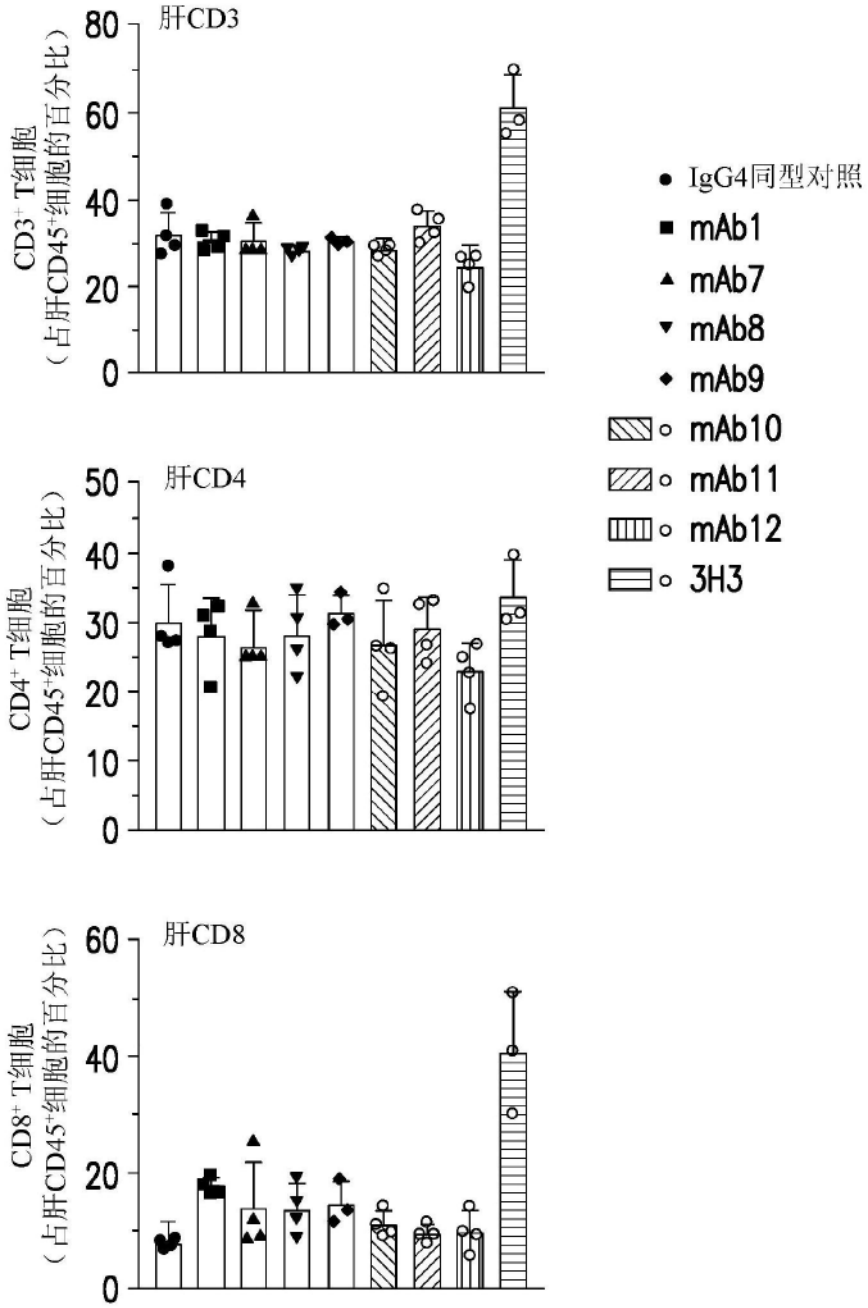

肝CD3
CD3+ T细胞
（占肝CD45+细胞的百分比）
80
60
40
20
0
肝CD4
CD4+ T细胞
（占肝CD45+细胞的百分比）
50
40
30
20
10
0
肝CD8
CD8+ T细胞
（占肝CD45+细胞的百分比）
60
40
20
0
IgG4同型对照
mAb1
mAb7
mAb8
mAb9
mAb10
mAb11
mAb12
3H3

图17B

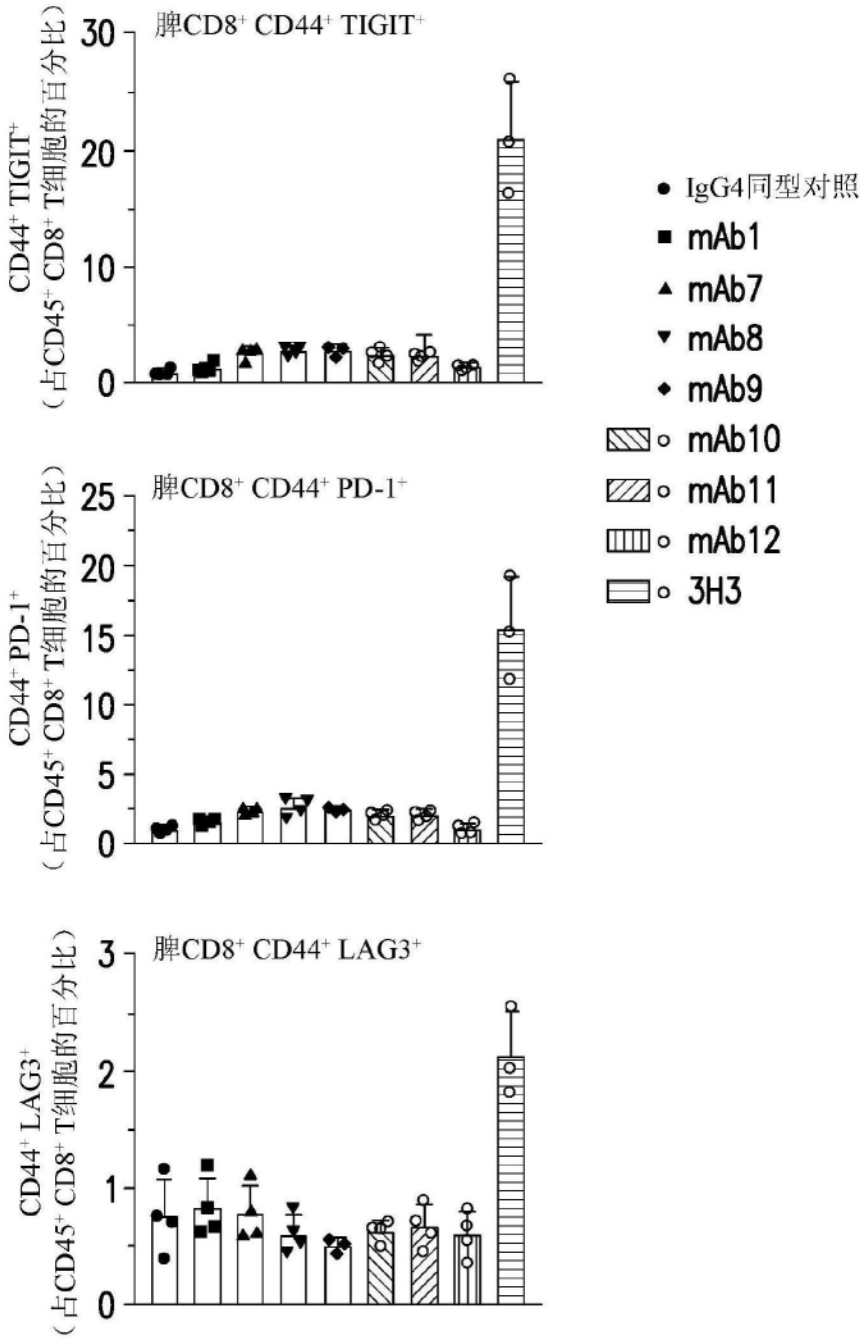

脾CD8+ CD44+ TIGIT+
CD44+ TIGIT+
（占CD45+ CD8+ T细胞的百分比）
30
20
10
0
脾CD8+ CD44+ PD-1+
CD44+ PD-1+
（占CD45+ CD8+ T细胞的百分比）
25
20
15
10
5
0
脾CD8+ CD44+ LAG3+
CD44+ LAG3+
（占CD45+ CD8+ T细胞的百分比）
3
2
1
0
IgG4同型对照
mAb1
mAb7
mAb8
mAb9
mAb10
mAb11
mAb12
3H3

图18A

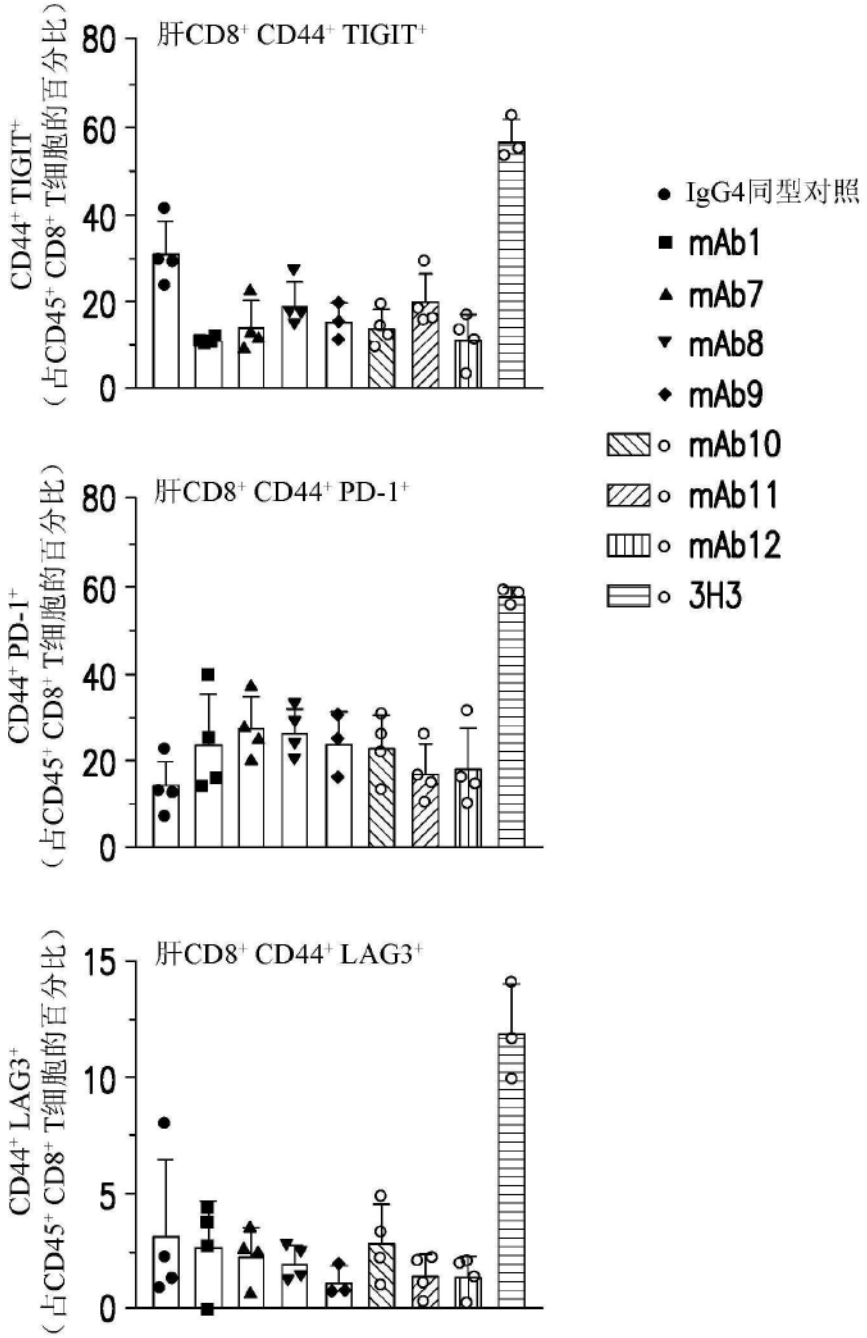

肝CD8+ CD44+ TIGIT+
CD44+ TIGIT+
（占CD45+ CD8+ T细胞的百分比）
80
60
40
20
0
肝CD8+ CD44+ PD-1+
CD44+ PD-1+
（占CD45+ CD8+ T细胞的百分比）
80
60
40
20
0
肝CD8+ CD44+ LAG3+
CD44+ LAG3+
（占CD45+ CD8+ T细胞的百分比）
15
10
5
0
IgG4同型对照
mAb1
mAb7
mAb8
mAb9
mAb10
mAb11
mAb12
3H3

图18B

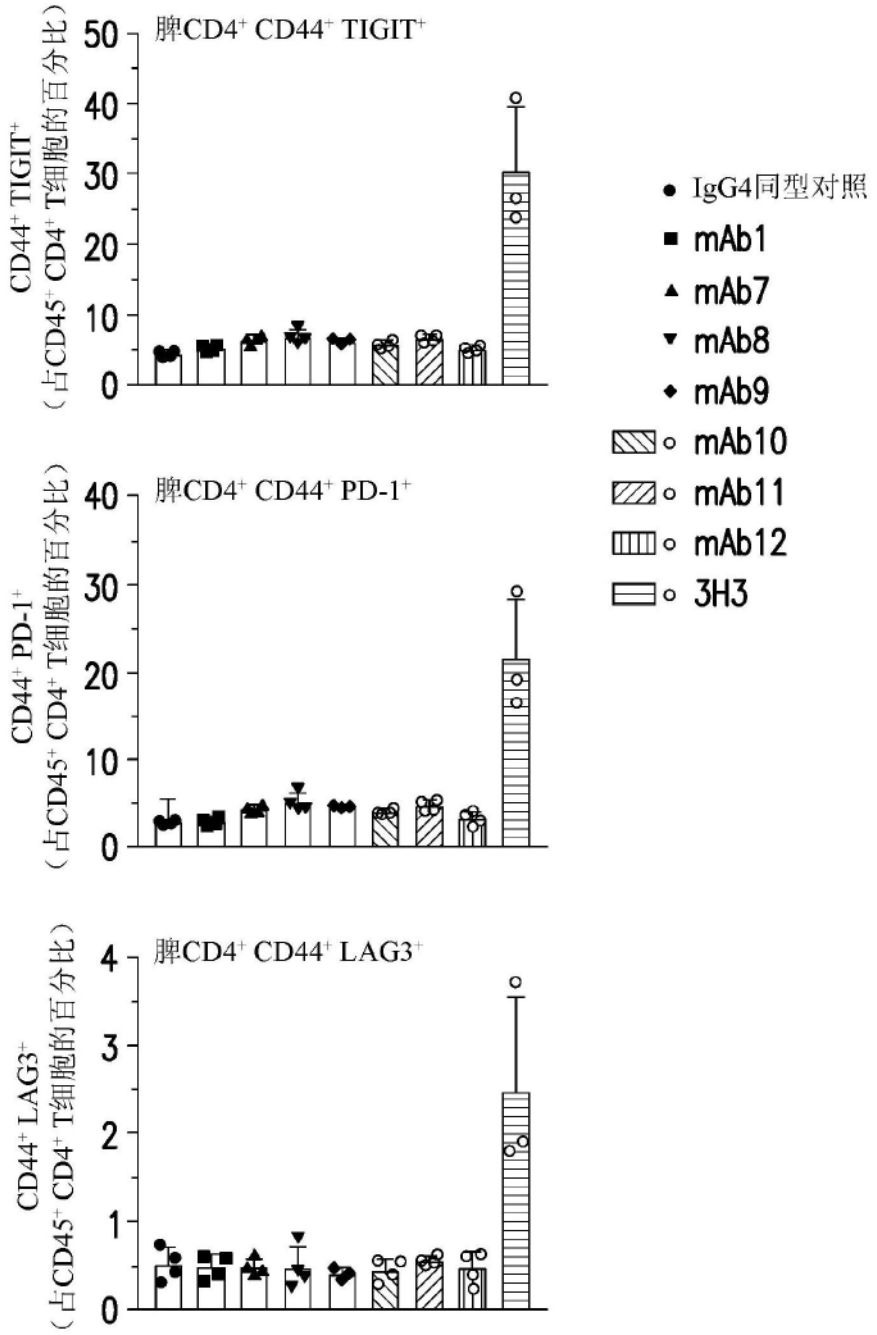

脾CD4+ CD44+ TIGIT+
CD44+ TIGIT+
（占CD45+ CD4+ T细胞的百分比）
50
40
30
20
10
0
脾CD4+ CD44+ PD-1+
CD44+ PD-1+
（占CD45+ CD4+ T细胞的百分比）
40
30
20
10
0
脾CD4+ CD44+ LAG3+
CD44+ LAG3+
（占CD45+ CD4+ T细胞的百分比）
4
3
2
1
0
IgG4同型对照
mAb1
mAb7
mAb8
mAb9
mAb10
mAb11
mAb12
3H3

图19A

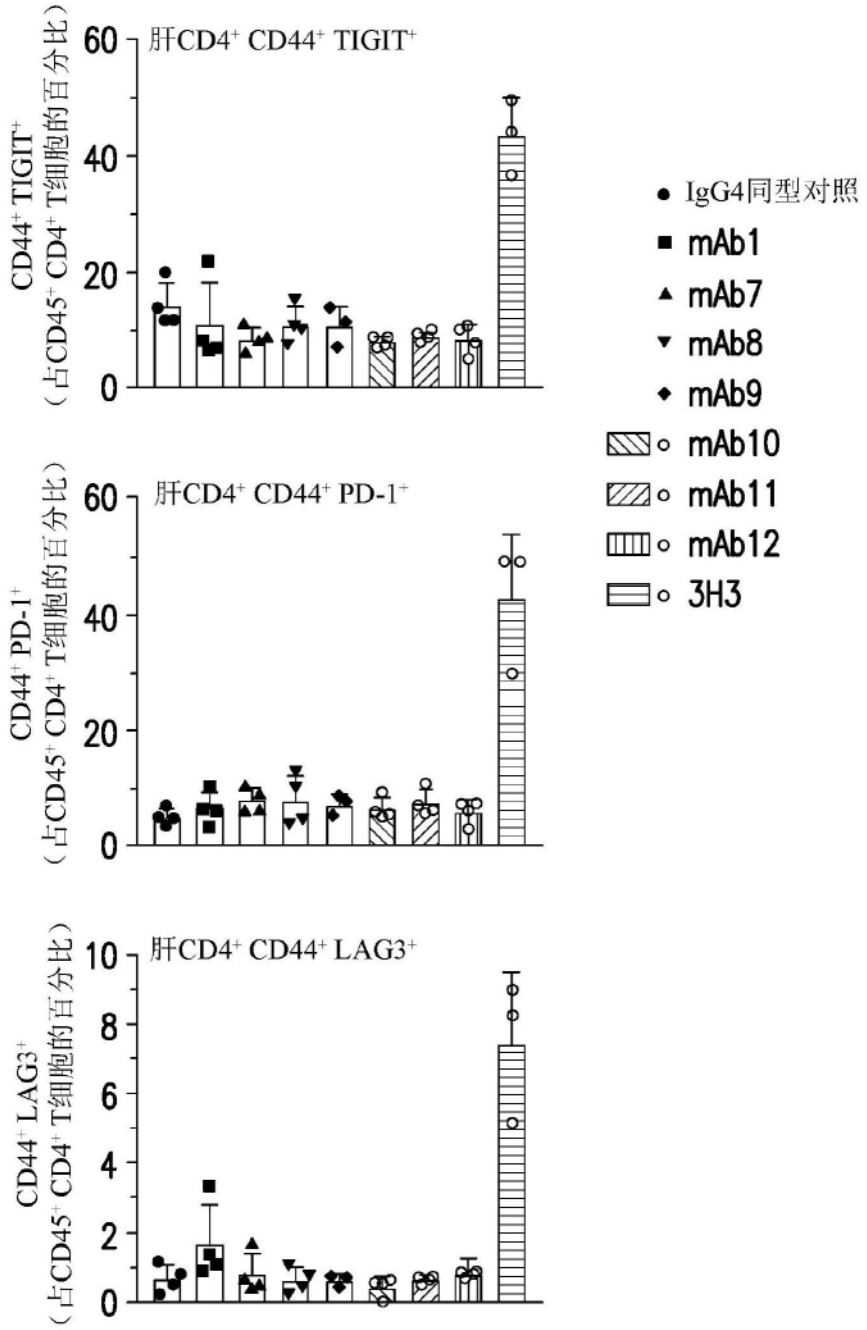

肝CD4+ CD44+ TIGIT+
CD44+ TIGIT+
（占CD45+ CD4+ T细胞的百分比）
60
40
20
0
肝CD4+ CD44+ PD-1+
CD44+ PD-1+
（占CD45+ CD4+ T细胞的百分比）
60
40
20
0
肝CD4+ CD44+ LAG3+
CD44+ LAG3+
（占CD45+ CD4+ T细胞的百分比）
10
8
6
4
2
0
IgG4同型对照
mAb1
mAb7
mAb8
mAb9
mAb10
mAb11
mAb12
3H3

图19B

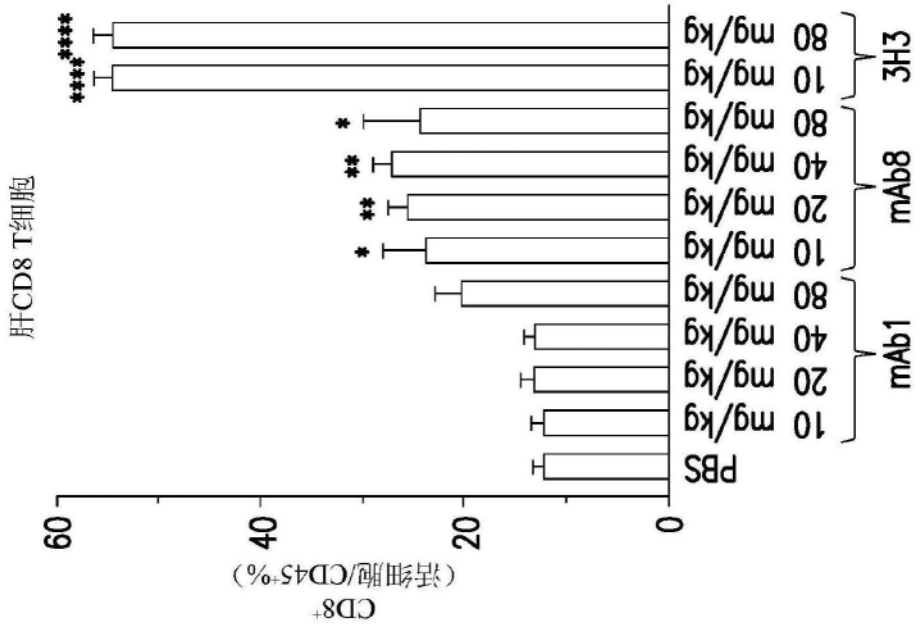

肝CD8 T细胞
CD8+（活细胞/CD45+%）
0
20
40
60
PBS
10 mg/kg
20 mg/kg
40 mg/kg
80 mg/kg
mAb1
10 mg/kg
20 mg/kg
40 mg/kg
80 mg/kg
mAb8
3H3
10 mg/kg
80 mg/kg
*
**
**
*
****
****

图20A

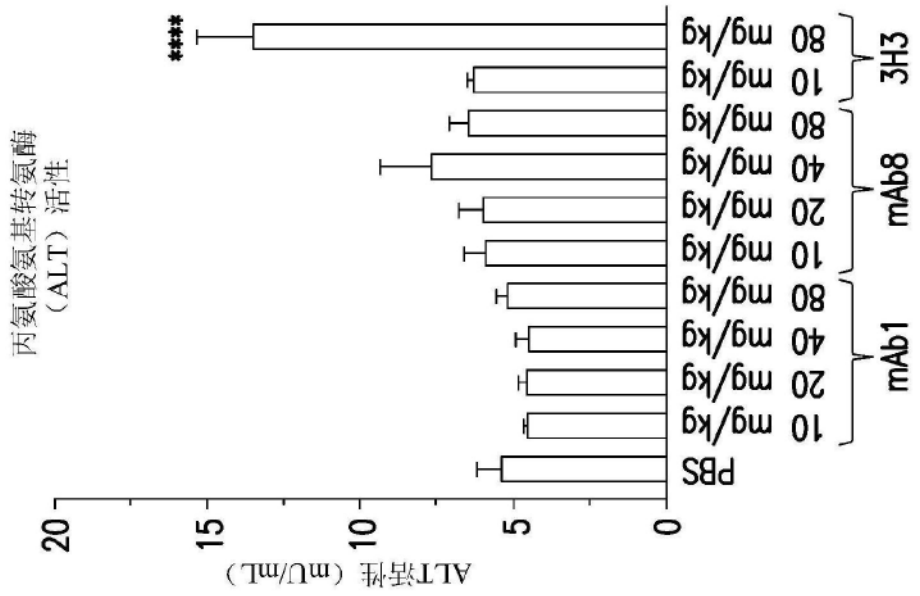

丙氨酸氨基转氨酶（ALT）活性
ALT活性（mU/mL）
0
5
10
15
20
PBS
10 mg/kg
20 mg/kg
40 mg/kg
80 mg/kg
mAb1
10 mg/kg
20 mg/kg
40 mg/kg
80 mg/kg
mAb8
3H3
10 mg/kg
80 mg/kg
****

图20B

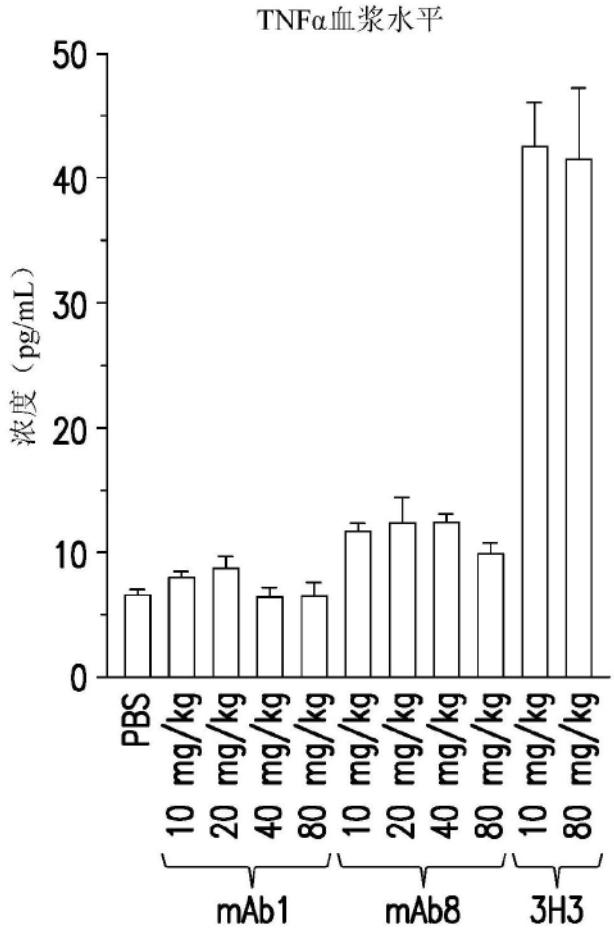

TNFα血浆水平
浓度（pg/mL）
50
40
30
20
10
0
PBS
10 mg/kg
20 mg/kg
40 mg/kg
80 mg/kg
10 mg/kg
20 mg/kg
40 mg/kg
80 mg/kg
10 mg/kg
80 mg/kg
mAb1
mAb8
3H3

图20C

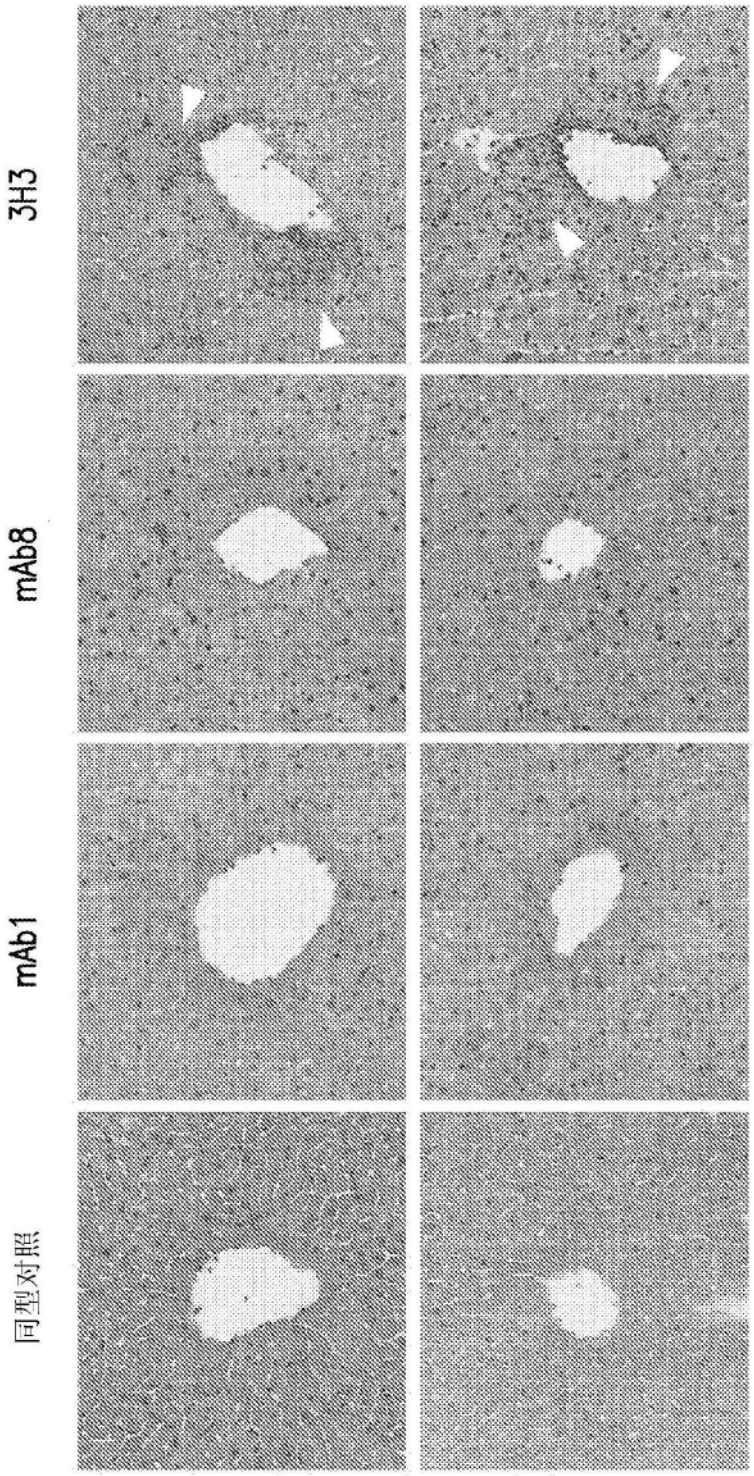


图21

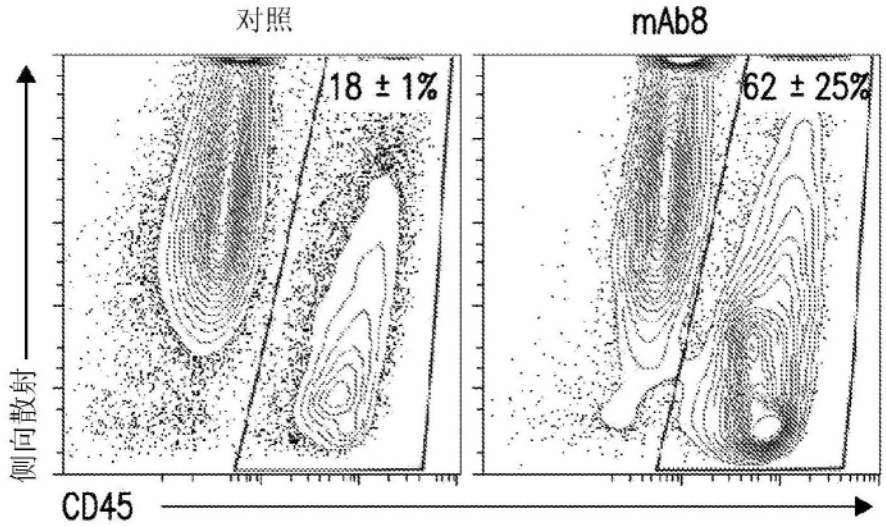


图22A

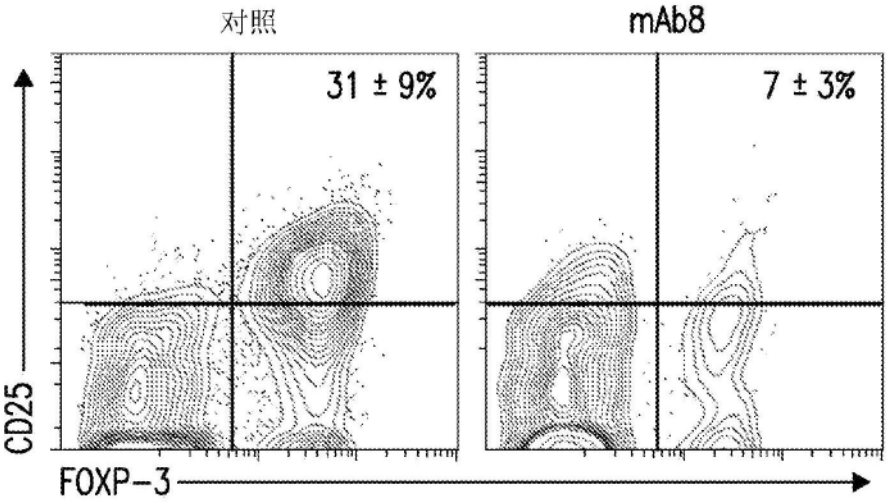


图22B

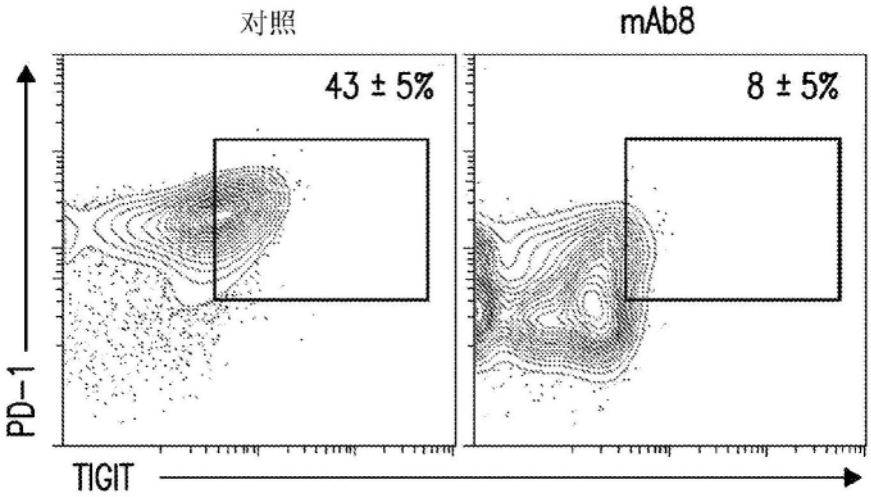


图22C

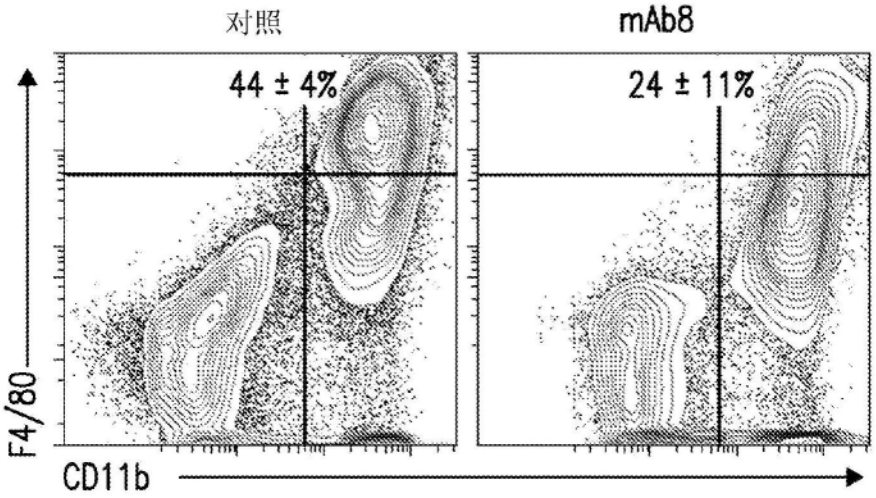


图22D

CD4+ T细胞
（占CD45+ /活细胞的百分比）
对照
mAb1
3H3
TIGIT+ PD-1+细胞
（占CD45+ CD4+细胞的百分比）
CD4+ TIGIT+ PD-1+细胞
Foxp3+细胞
（占CD45+ CD4+细胞的百分比）
CD4+ Foxp3+
CD62L- CD44+细胞
（占CD45+ CD4+细胞的百分比）
CD4+效应记忆性细胞
CD8+ T细胞
（占CD45+ /活细胞的百分比）
CD8+ TIGIT+ PD-1+细胞
CD8+ CD25+细胞
（占CD45+ /活细胞的百分比）
CD8+ CD25+细胞
CD62L- CD44+细胞
（占CD45+ CD8+细胞的百分比）
CD8+效应记忆性细胞

图23

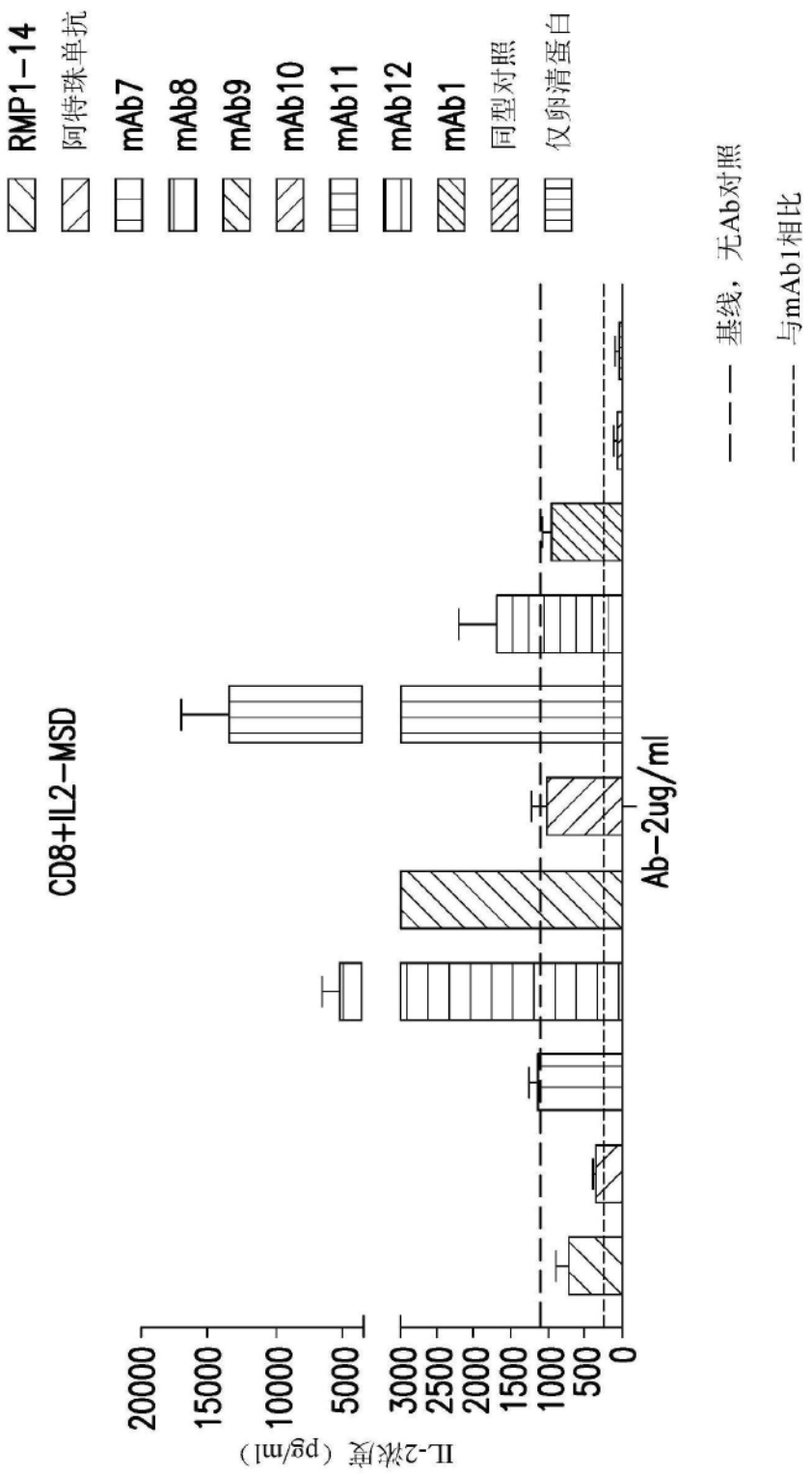

RMP1-14
阿特珠单抗
mAb7
mAb8
mAb9
mAb10
mAb11
mAb12
mAb1
同型对照
仅卵清蛋白
基线，无Ab对照
与mAb1相比
CD8+IL2-MSD
IL-2浓度（pg/ml）
20000
15000
10000
5000
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Ab-2ug/ml

图24

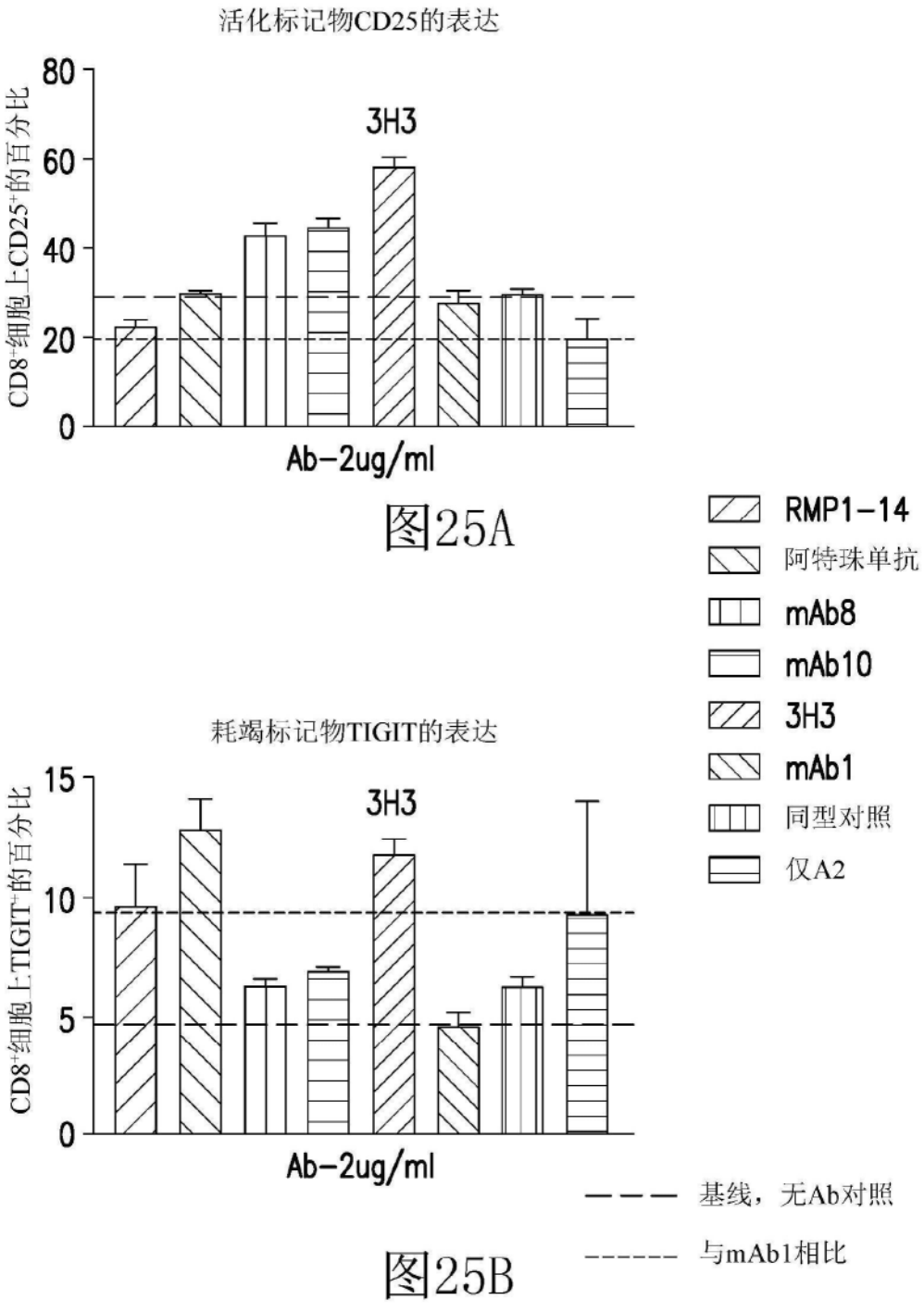

活化标记物CD25的表达
CD8+细胞上CD25+的百分比
80
60
40
20
0
3H3
Ab-2ug/ml
RMP1-14
阿特珠单抗
mAb8
mAb10
3H3
mAb1
同型对照
仅A2
耗竭标记物TIGIT的表达
CD8+细胞上TIGIT+的百分比
15
10
5
0
3H3
Ab-2ug/ml
基线，无Ab对照
与mAb1相比

图25A

图25B

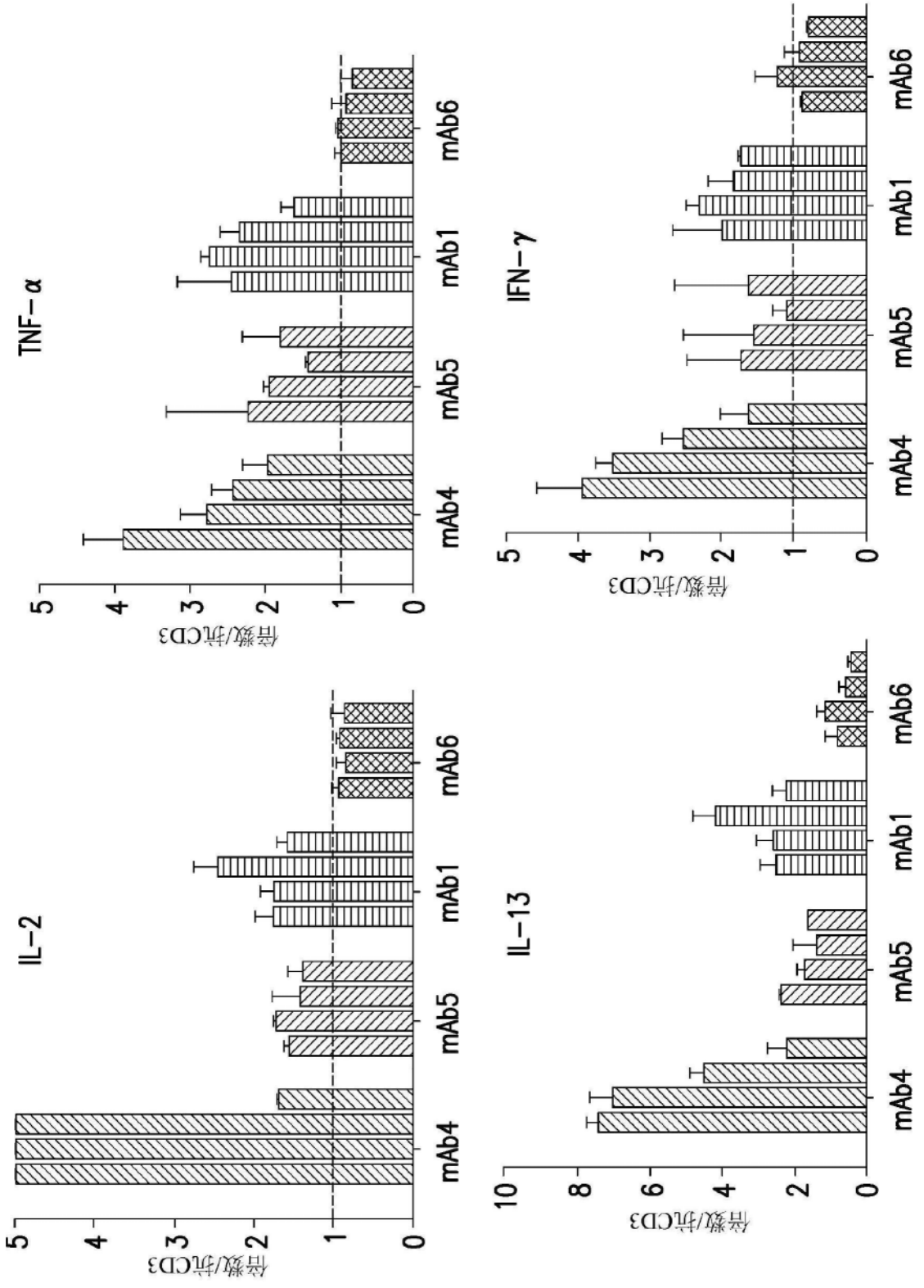


图26

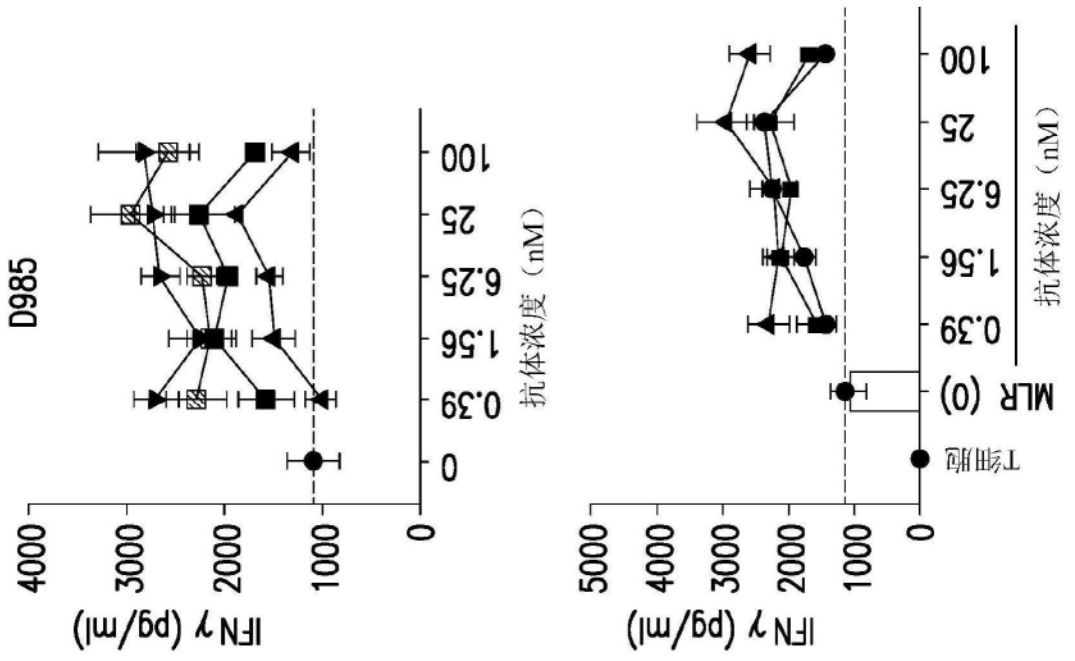

D985
IFN γ (pg/ml)
抗体浓度（nM）
T细胞
MLR (0)
0
0.39
1.56
6.25
25
100

图27A

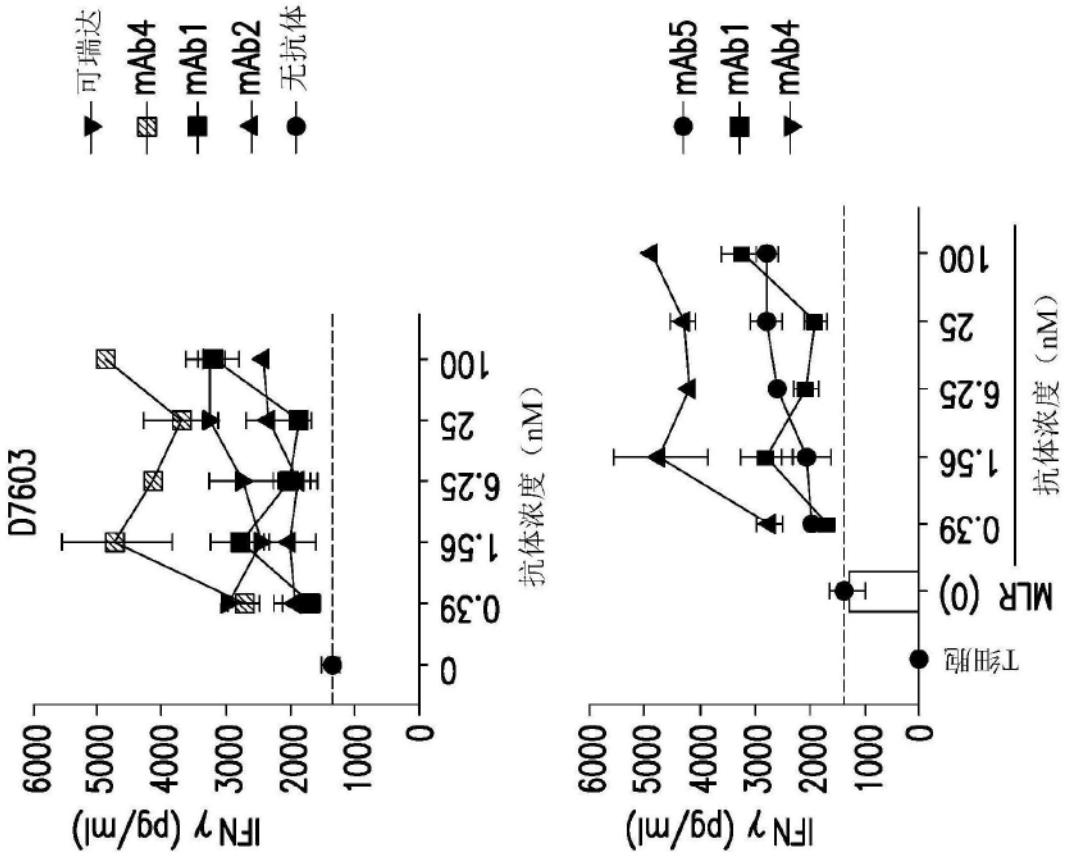

可瑞达
mAb4
mAb1
mAb2
无抗体
mAb5
mAb1
mAb4
D7603
IFN γ (pg/ml)
抗体浓度（nM）
T细胞
MLR (0)
0
0.39
1.56
6.25
25
100

图27B

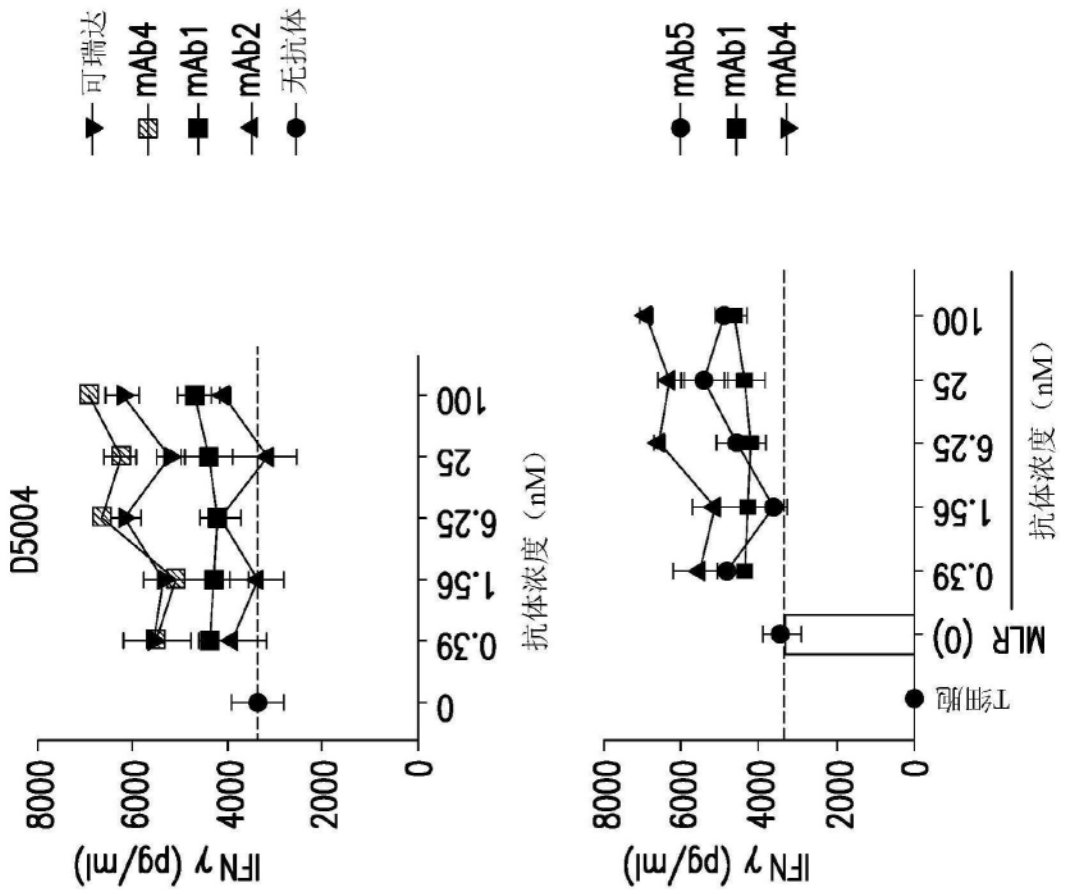

可瑞达
mAb4
mAb1
mAb2
无抗体
D5004
IFN γ (pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
0
0.39
1.56
6.25
25
100
抗体浓度（nM）
mAb5
mAb1
mAb4
MLR (0)
T细胞
抗体浓度（nM）

图27C

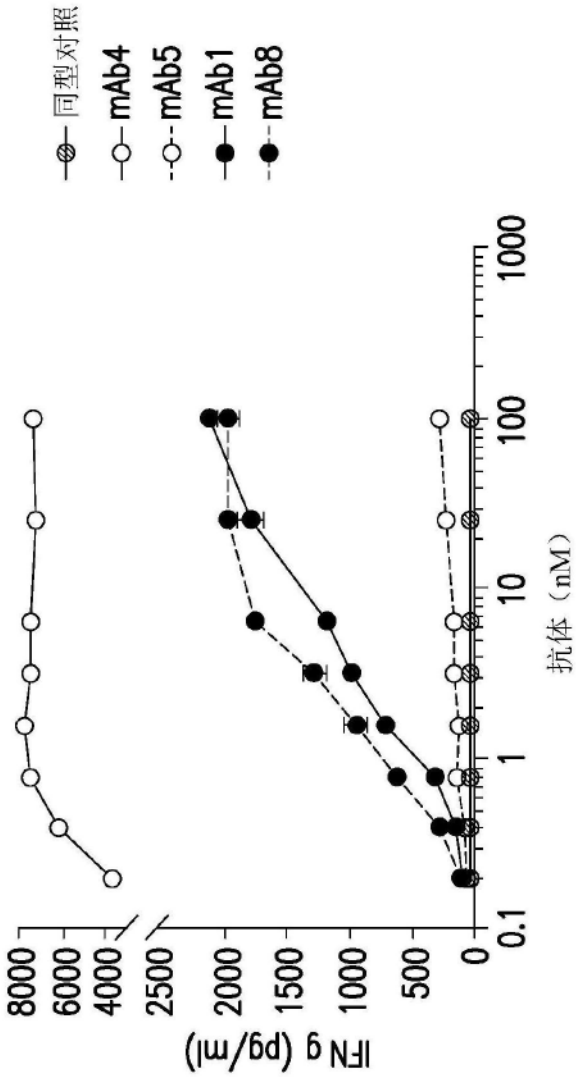

同型对照
mAb4
mAb5
mAb1
mAb8
IFN g (pg/ml)
8000
6000
4000
2500
2000
1500
1000
500
0
0.1
1
10
100
1000
抗体（nM）

图28

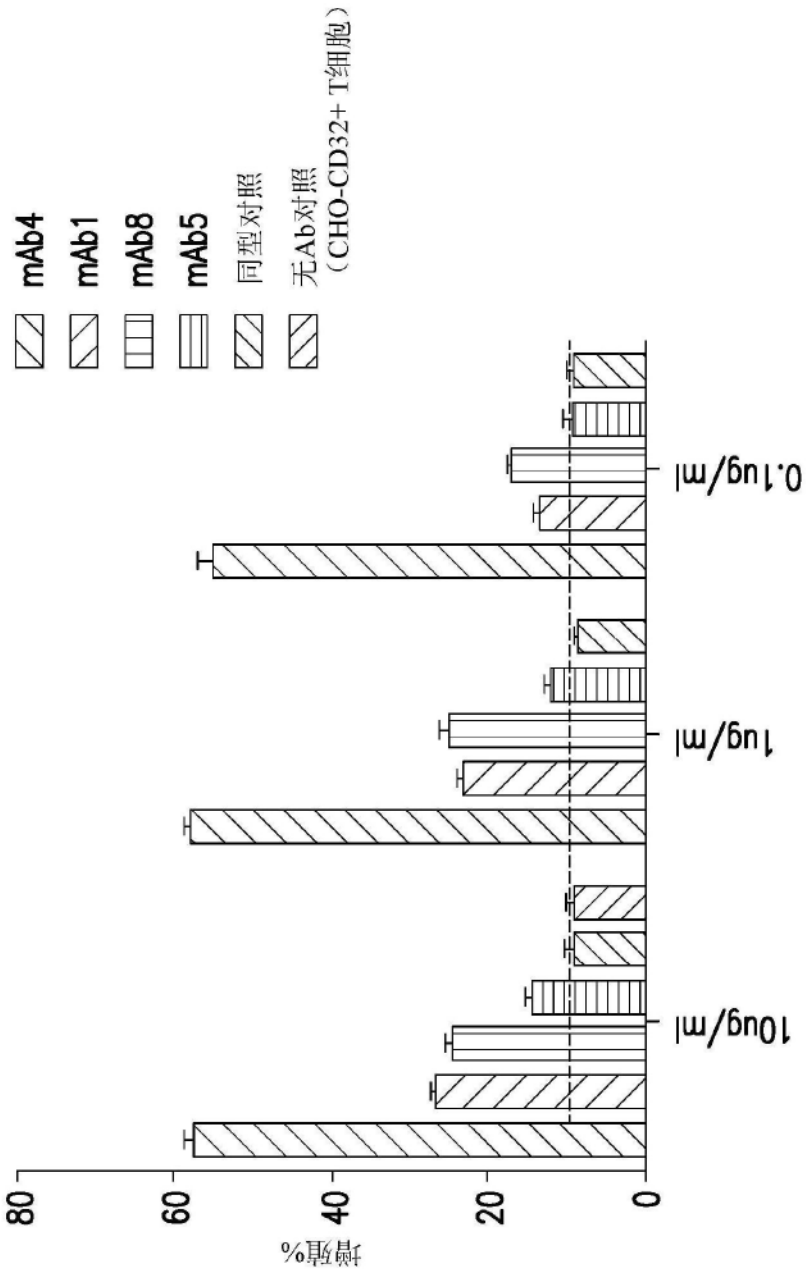

mAb4
mAb1
mAb8
mAb5
同型对照
无Ab对照
（CHO-CD32+ T细胞）
0.1ug/ml
1ug/ml
10ug/ml
增殖%
0
20
40
60
80

图29

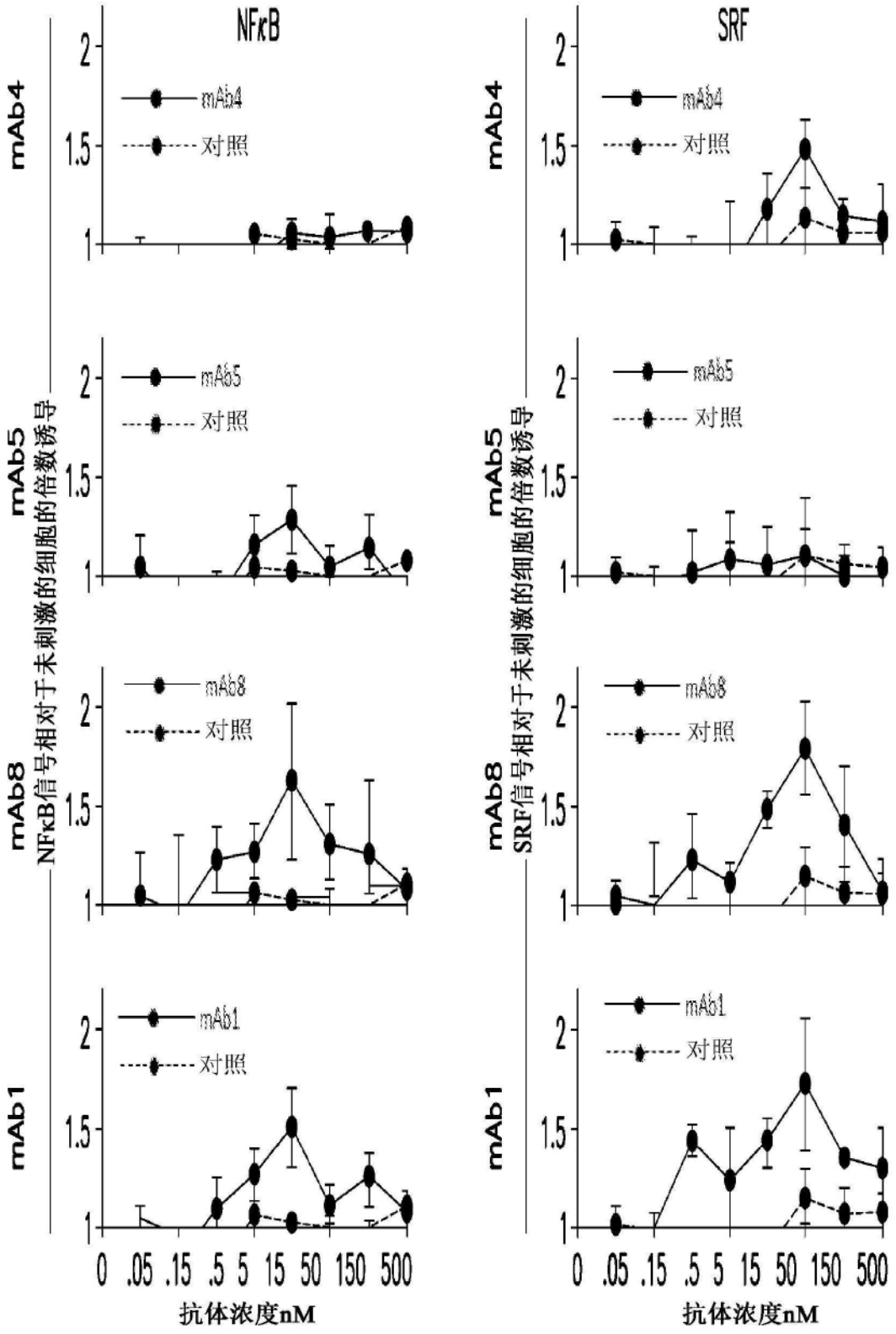

NFκB
SRF
mAb4
mAb5
mAb8
mAb1
对照
NFκB信号相对于未刺激的细胞的倍数诱导
SRF信号相对于未刺激的细胞的倍数诱导
抗体浓度nM
0 .05 .15 .5 5 15 50 150 500
1
1.5
2

图30

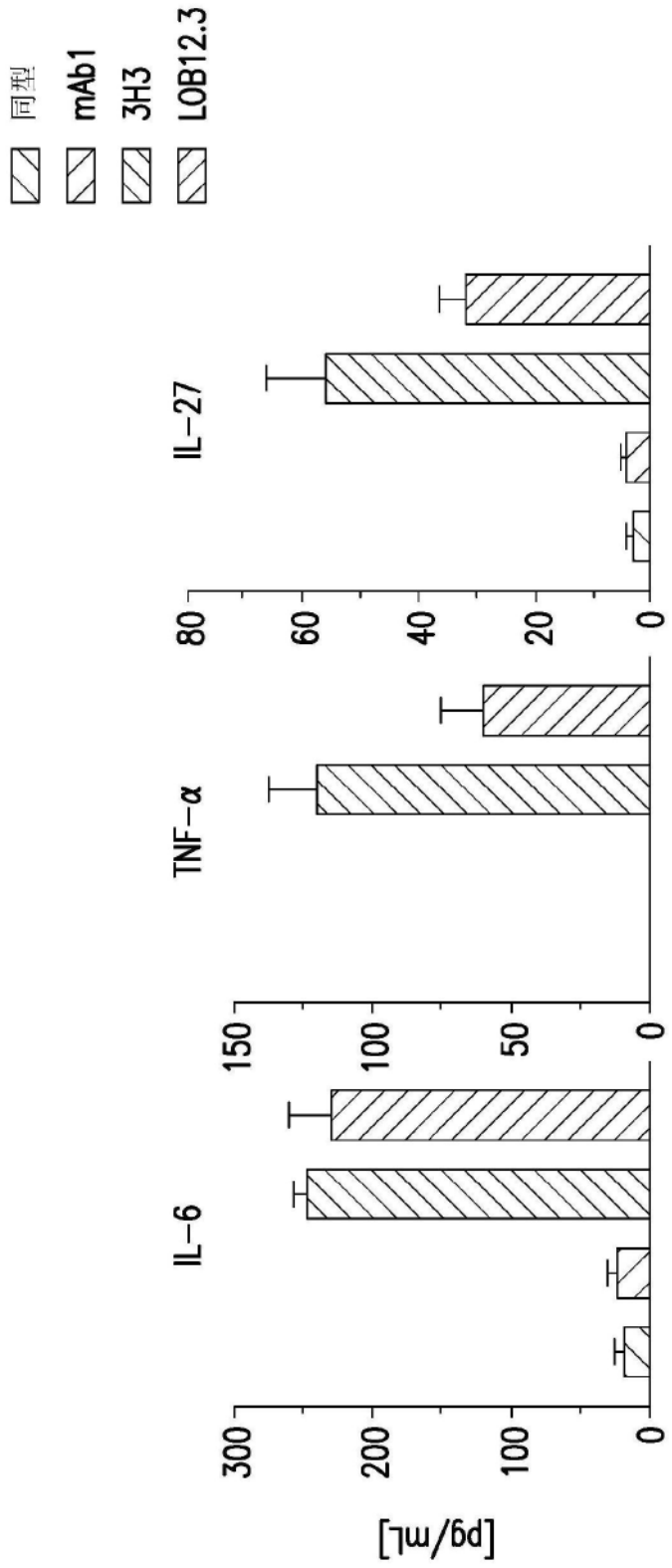

同型
mAb1
3H3
LOB12.3
IL-6
TNF-α
IL-27
[pg/mL]
0
100
200
300
0
50
100
150
0
20
40
60
80

图31

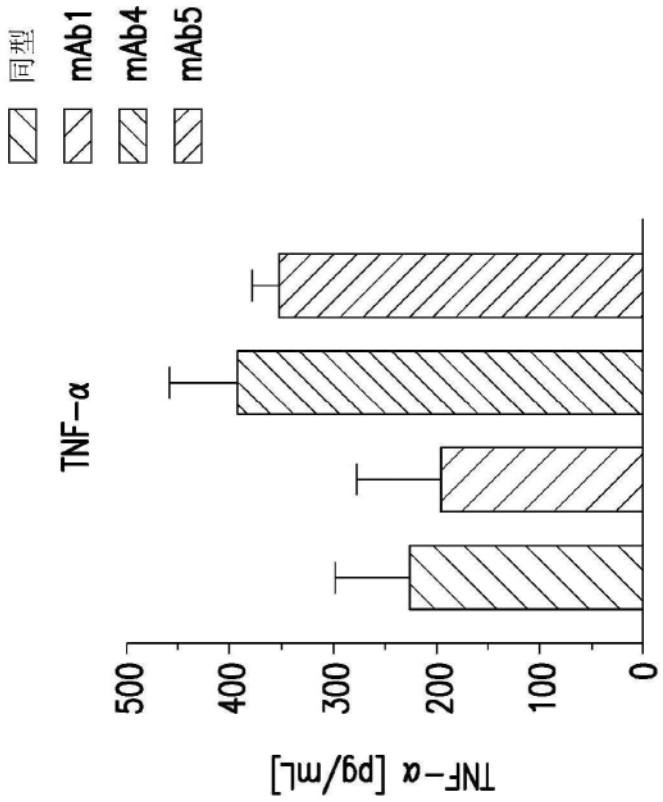

同型
mAb1
mAb4
mAb5
TNF-α
TNF-α [pg/mL]
500
400
300
200
100
0

图32

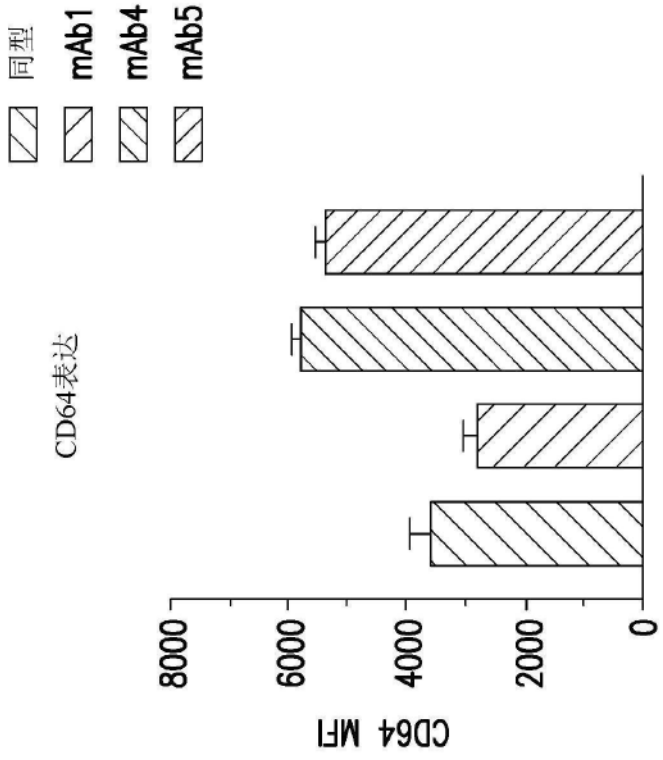

同型
mAb1
mAb4
mAb5
CD64表达
CD64 MFI
8000
6000
4000
2000
0

图33

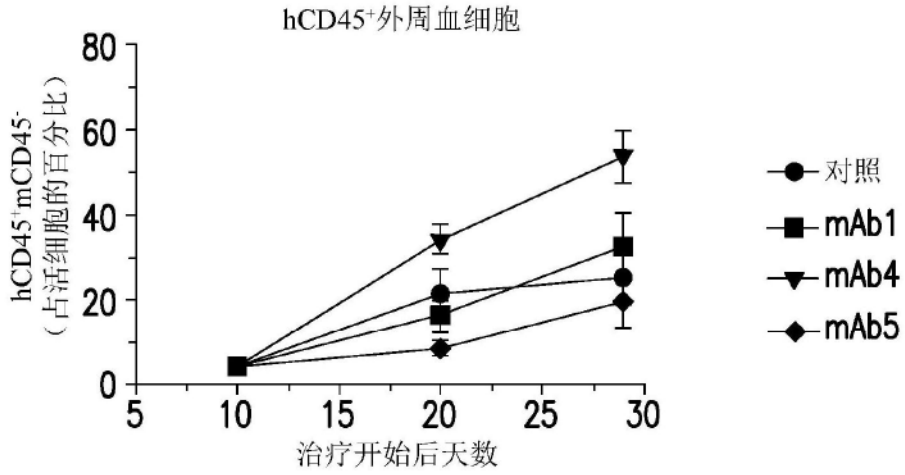


图34A

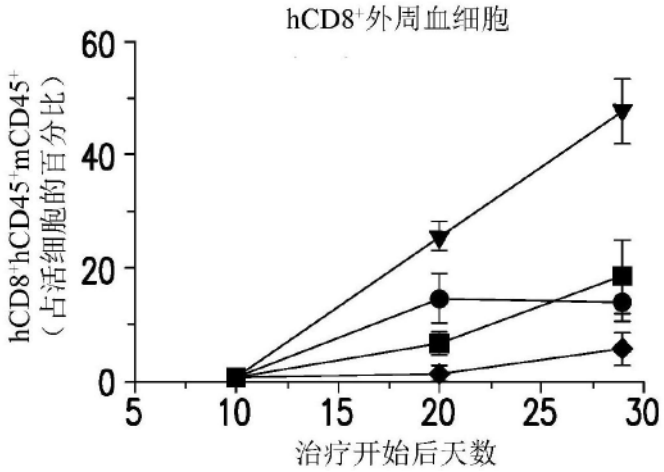


图34B

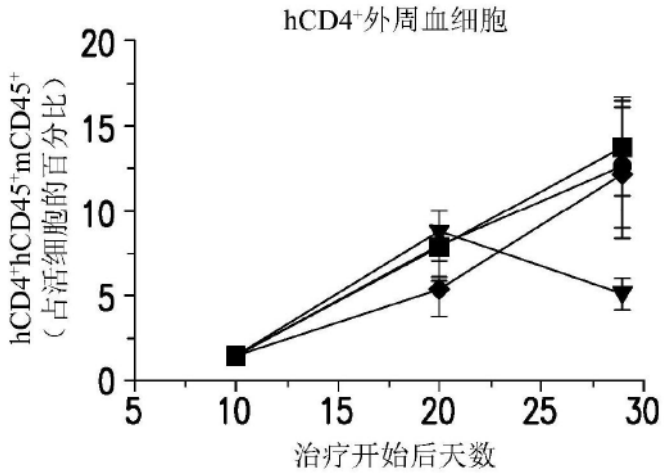


图34C