



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119053340 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 29

(21) 申请号 202280079918.2

(22) 申请日 2022.10.05

(30) 优先权数据

63/253,106 2021.10.06 US

63/257,901 2021.10.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/077749 2022.10.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/057535 EN 2023.04.13

(71) 申请人 健玛保

地址 丹麦-哥本哈根市威尔比

申请人 生物技术公司

默沙东国际商务有限公司

(72) 发明人 A·穆克 K·纽伦堡 N·彭切娃

M·N·朱尔-昆克尔 U·萨欣

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 陈桢

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书10页 说明书93页

序列表(电子公布) 附图16页

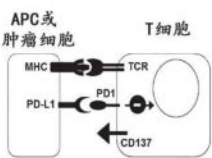
(54) 发明名称

针对PD-L1和CD137的多特异性结合剂与抗PD-1抗体组合用于治疗癌症

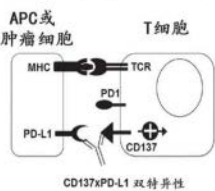
(57) 摘要

本公开文本涉及使用与人PD-L1和人CD137结合的结合剂与派姆单抗的组合以减少或预防肿瘤进展或治疗癌症的组合疗法。

A. PD1介导的T细胞抑制



B. PD-L1阻断 + T细胞共刺激



1. 一种结合剂,所述结合剂用于在减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法中使用,所述方法包括在施用与程序性死亡蛋白1 (PD-1) 结合的抗体或其抗原结合片段之前、同时或之后,向所述受试者施用所述结合剂,

其中

所述结合剂包含与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区;

a) 所述第一结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:2、3和4,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:6、7和8;

并且

b) 所述第二抗原结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:12、13和14,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:

SEQ ID NO:16、17和18

并且

与PD-1结合的所述抗体包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:43、44和45,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:46、47和48;或者与PD-1结合的所述抗体包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:62、63和64,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:65、66和67。

2. 根据权利要求1所述的用于所述用途的结合剂,其中与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的轻链可变区。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的轻链。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中与PD-1结合的所述抗体是派姆单抗或其生物类似物。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中PD-L1是人PD-L1,特别是包含SEQ ID NO:40中所示的序列的人PD-L1,和/或CD137是人CD137,特别是包含SEQ ID NO:38中所示的序列的人CD137。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中

所述结合剂的第一结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),所述重链可变区包含与SEQ ID NO:1或9具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:5或10具有至少90%、至少95%、至少97%、

至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中

所述结合剂的第二结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含与SEQ ID NO:11具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或25-100%序列同一性的氨基酸序列, 所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:15具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂的第一结合区包含含有SEQ ID NO:1或9中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO:5或10中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂的第二结合区包含含有SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中

a) 所述结合剂的第一结合区包含含有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL); 并且

b) 所述结合剂的第二结合区包含含有SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂是多特异性抗体, 如双特异性抗体。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂呈全长抗体或抗体片段的形式。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中每个可变区包含三个互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3) 和四个框架区 (FR1、FR2、FR3和FR4)。

15. 根据权利要求13所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述互补决定区和所述框架区按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂包含

i) 含有所述第一重链可变区 (VH) 和第一重链恒定区 (CH)、由其组成或基本上由其组成的多肽, 以及

ii) 含有所述第二重链可变区 (VH) 和第二重链恒定区 (CH)、由其组成或基本上由其组成的多肽。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂包含

i) 含有所述第一轻链可变区 (VL) 并且进一步含有第一轻链恒定区 (CL) 的多肽, 以及

ii) 含有所述第二轻链可变区 (VL) 并且进一步含有第二轻链恒定区 (CL) 的多肽。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体, 其中

所述第一结合臂包含

i) 含有所述第一重链可变区 (VH) 和第一重链恒定区 (CH) 的多肽, 以及

ii) 含有所述第一轻链可变区 (VL) 和第一轻链恒定区 (CL) 的多肽;

并且所述第二结合臂包含

iii) 含有所述第二重链可变区 (VH) 和第二重链恒定区 (CH) 的多肽, 以及

iv) 含有所述第二轻链可变区 (VL) 和第二轻链恒定区 (CL) 的多肽。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂包含

i) 含有能够与CD137结合的所述抗原结合区的第一重链和第一轻链, 以及

ii) 含有能够与PD-L1结合的所述抗原结合区的第二重链和第二轻链。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂包含

i) 含有能够与CD137结合的所述抗原结合区的第一重链和第一轻链, 所述第一重链包含第一重链恒定区并且所述第一轻链包含第一轻链恒定区; 以及

ii) 含有能够与PD-L1结合的所述抗原结合区的第二重链和第二轻链, 所述第二重链包含第二重链恒定区并且所述第二轻链包含第二轻链恒定区。

21. 根据权利要求16-20中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区 (CH) 中的每一个包含恒定重链1 (CH1) 区、铰链区、恒定重链2 (CH2) 区和恒定重链3 (CH3) 区中的一个或多个, 优选至少铰链区、CH2区和CH3区。

22. 根据权利要求16-21中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区 (CH) 中的每一个包含CH3区并且其中所述两个CH3区包含不对称突变。

23. 根据权利要求16-21中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中在所述第一重链恒定区 (CH) 中, 如下位置中的氨基酸中的至少一个被取代, 所述位置对应于选自人IgG1重链中的根据EU编号的T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置, 并且在所述第二重链恒定区 (CH) 中, 如下位置中的氨基酸中的至少一个被取代, 所述位置对应于选自人IgG1重链中的根据EU编号的T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置, 并且其中所述第一重链和所述第二重链不在相同位置被取代。

24. 根据权利要求23所述的用于所述用途的结合剂, 其中 (i) 在所述第一重链恒定区 (CH) 中在对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置中的氨基酸是L, 并且在所述第二重链恒定区 (CH) 中在对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置中的氨基酸是R, 或者 (ii) 在所述第一重链中在对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置中的氨基酸是R, 并且在所述第二重链中在对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置中的氨基酸是L。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中与另一种包含相同第一抗原结合区和第二抗原结合区以及含有人IgG1铰链、CH2区和CH3区的两个重链恒定区 (CH) 的抗体相比, 所述结合剂以更小程度诱导Fc介导的效应子功能。

26. 根据权利要求25所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述第一重链恒定区和第二重链恒定区 (CH) 已被修饰, 使得与除了包含未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区 (CH) 之外相同的抗体相比, 所述抗体以更小程度诱导Fc介导的效应子功能。

27. 根据权利要求26所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区 (CH) 中的每一个包含SEQ ID NO:19或25中所示的氨基酸序列。

28. 根据权利要求26或27所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述Fc介导的效应子功能通过与Fc γ 受体的结合、与C1q的结合或者Fc介导的Fc γ 受体的交联的诱导来测量。

29. 根据权利要求28所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述Fc介导的效应子功能通过与C1q的结合来测量。

30. 根据权利要求25-29中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区已被修饰,使得C1q与所述抗体的结合与野生型抗体相比减少,优选减少至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%,其中C1q结合优选通过ELISA来确定。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中在所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区(CH)的至少一个中,在对应于人IgG1重链中根据EU编号的位置L234、L235、D265、N297和P331的位置中的一个或多个氨基酸分别不是L、L、D、N和P。

32. 根据权利要求31所述的用于所述用途的结合剂,其中对应于人IgG1重链中根据EU编号的位置L234和L235的位置在所述第一重链和所述第二重链中分别是F和E。

33. 根据权利要求31或32所述的用于所述用途的结合剂,其中在所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区(HC)中,对应于人IgG1重链中根据EU编号的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A。

34. 根据权利要求31-33中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区两者的对应于人IgG1重链中根据EU编号的位置L234和L235的位置分别是F和E,并且其中(i)所述第一重链恒定区的对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置是L,并且所述第二重链的对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置是R,或(ii)所述第一重链恒定区的对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置是R,并且所述第二重链的对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置是L。

35. 根据权利要求31-34中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区两者的对应于人IgG1重链中根据EU编号的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A,并且其中(i)所述第一重链恒定区的对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置是L,并且所述第二重链恒定区的对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置是R,或(ii)所述第一重链的对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置是R,并且所述第二重链的对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置是L。

36. 根据权利要求16-35中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链和/或所述第二重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

a) SEQ ID NO:19或25中所示的序列[IgG1-FC];

b) a)中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a)中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

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

37. 根据权利要求16-36中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链或所述第二重链如所述第二重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

a) SEQ ID NO:20或26中所示的序列[IgG1-F405L];

b) a)中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a)中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

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

38. 根据权利要求16-36中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链或所述第二重链如所述第一重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

a) SEQ ID NO:21或27中所示的序列[IgG1-K409R];

b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

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

39. 根据权利要求16-15中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链和/或所述第二重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

a) SEQ ID NO:22或28中所示的序列[IgG1-Fc_FEA];

b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

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

40. 根据权利要求16-39中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链和/或所述第二重链如所述第二重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

a) SEQ ID NO:24或30中所示的序列[IgG1-Fc_FEAL];

b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

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

41. 根据权利要求16-40中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链和/或所述第二重链如所述第一重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

a) SEQ ID NO:23或29中所示的序列[IgG1-Fc_FEAR];

b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

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

42. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂包含卡帕(κ)轻链恒定区。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂包含兰布达(λ)轻链恒定区。

44. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一轻链恒定区是卡帕(κ)轻链恒定区或兰布达(λ)轻链恒定区。

45. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第二轻链恒定区是兰布达(λ)轻链恒定区或卡帕(κ)轻链恒定区。

46. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述第一轻链恒定区是卡帕(κ)轻链恒定区并且所述第二轻链恒定区是兰布达(λ)轻链恒定区, 或所述第一轻链恒定区是兰布达(λ)轻链恒定区并且所述第二轻链恒定区是卡帕(κ)轻链恒定区。

47. 根据权利要求42-46中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述卡帕(κ)轻链包含选自以下的氨基酸序列:

a) SEQ ID NO: 35中所示的序列,

b) a) 中的所述序列的子序列, 如如下子序列, 其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始, 缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸; 以及

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

48. 根据权利要求43-47中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述兰布达(λ)轻链包含选自以下的氨基酸序列:

a) SEQ ID NO: 36中所示的序列,

b) a) 中的所述序列的子序列, 如如下子序列, 其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始, 缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸; 以及

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

49. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型的。

50. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂是全长IgG1抗体。

51. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂是IgG1m(f) 同种异型的抗体。

52. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂包含

i) 含有能够与CD137结合的所述抗原结合区的第一重链和第一轻链, 其中所述第一重链包含SEQ ID NO: 31中所示的序列, 并且所述第一轻链包含SEQ ID NO:

32中所示的序列;

ii) 含有能够与PD-L1结合的所述抗原结合区的第二重链和第二轻链, 其中所述第二重链包含SEQ ID NO: 33中所示的序列, 并且所述第二轻链包含SEQ ID NO:

34中所示的序列。

53. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂是阿卡顺利单抗(acasunlimab) 或其生物类似物。

54. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂在包含组氨酸、蔗糖和聚山梨醇酯-80的组合物或配制品中, 并且具有5至6的pH。

55. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂在包含约20mM组氨酸、约250mM蔗糖、约0.02%聚山梨醇酯-80并且具有约5.5的pH的组合物或配制品中。

56. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂在包含10-30mg结合剂/mL如20mg结合剂/mL的组合物或配制品中。

57. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂在如权利要求54至56中任一项所定义的组合物中并且在施用之前在0.9%NaCl (盐水) 中稀释。

58. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述受试者是人受试者。

59. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述肿瘤或癌症是实体瘤或癌症。

60. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述肿瘤是PD-L1阳性肿瘤。

61. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述肿瘤或癌症选自黑色素瘤、卵巢癌、肺癌(例如, 非小细胞肺癌(NSCLC))、结直肠癌、头颈癌、胃癌、乳腺癌、肾癌、尿路上皮癌、膀胱癌、食道癌、胰腺癌、肝癌、胸腺瘤和胸腺癌、脑癌、神经胶质瘤、肾上腺皮质癌、甲状腺癌、其他皮肤癌、肉瘤、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓增生异常综合征、子宫内膜癌、前列腺癌、阴茎癌、宫颈癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、梅克尔细胞癌和间皮瘤。

62. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述肿瘤或癌症选自肺癌(例如, 非小细胞肺癌(NSCLC))、尿路上皮癌(膀胱癌、输尿管癌、尿道癌或肾盂癌)、子宫内膜癌(EC)、乳腺癌(例如, 三阴性乳腺癌(TNBC))和头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)(例如, 口腔癌、咽癌或喉癌)。

63. 根据权利要求61或62所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述肿瘤或癌症是肺癌, 特别是非小细胞肺癌(NSCLC), 如鳞状或非鳞状NSCLC。

64. 根据权利要求61至63中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述肿瘤或癌症是转移性的, 如转移性NSCLC。

65. 根据权利要求61至64所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述肺癌、特别是NSCLC不具有表皮生长因子(EGFR)敏感突变和/或间变性淋巴瘤(ALK)易位/ROS1重排。

66. 根据权利要求61至65中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述肺癌、特别是NSCLC包含癌细胞, 并且例如如通过免疫组织化学(IHC)评估的, PD-L1在 $\geq 1\%$ 的所述癌细胞或肿瘤细胞中表达。

67. 根据权利要求66所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述肺癌、特别是NSCLC包含癌细胞, 并且例如如通过免疫组织化学(IHC)评估的, PD-L1在1%至49%的所述癌细胞或肿瘤细胞中表达。

68. 根据权利要求66所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述肺癌、特别是NSCLC包含癌细胞, 并且例如如通过免疫组织化学(IHC)评估的, PD-L1在 $\geq 50\%$ 的所述癌细胞或肿瘤细胞中表达。

69. 根据前述权利要求所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述受试者未接受过转移性疾病的先前全身治疗。

70. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述受试者未接受过用检查点抑制剂的先前治疗; 例如, PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂, 如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

71. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述受试者未接

受过用4-1BB(CD137)靶向剂如抗4-1BB(CD137)抗体、用抗肿瘤疫苗或用自体细胞免疫疗法的先前治疗。

72. 根据权利要求1至68中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤或癌症在治疗如用检查点抑制剂的全身治疗后已复发和/或是难治性的。

73. 根据权利要求1至68和72中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述受试者接受过至少1个先前全身疗法线,如包含PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的全身疗法。

74. 根据权利要求1至68、72和73中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中在用PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗后,所述癌症或肿瘤已复发和/或是难治性的,或者所述受试者已进展,其中将所述PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。

75. 根据权利要求1至68和72至74中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中最后的先前治疗是用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂,如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体,其中将所述PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。

76. 根据权利要求1至68和72至74中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中自在用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的最后治疗中进展以来的时间是8个月或更少,如7个月或更少、6个月或更少、5个月或更少、4个月或更少、3个月或更少、2个月或更少、1个月或更少、3周或更少或者如2周或更少。

77. 根据权利要求1至68和72至74中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中自作为最后的先前治疗的一部分的PD1抑制剂或PD-L1抑制剂如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的最后给药以来的时间是8个月或更少,如7个月或更少、6个月或更少、5个月或更少、4个月或更少、3个月或更少、2个月或更少、1个月或更少、3周或更少或者如2周或更少。

78. 根据权利要求1至68和72至74中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中在以下期间或之后,所述癌症或肿瘤已复发和/或是难治性的,或者所述受试者已进展:

- i) 在用抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗后的含铂双药化学疗法,或者
- ii) 在含铂双药化学疗法后的用抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的治疗。

79. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述受试者未接受过用紫杉烷化学治疗剂例如多西他赛的先前治疗,如用紫杉烷化学治疗剂例如多西他赛对NSCLC的先前治疗。

80. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将所述结合剂和与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段在至少一个治疗周期中施用,每个治疗周期是三周(21天)或六周(42天)。

81. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将一个剂量的所述结合剂和一个剂量的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段每三周施用一次(1Q3W)。

82. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将一个剂量的所述结合剂和一个剂量的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段每六周施用一次(1Q6W)。

83. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将一个剂量的所述结合剂和一个剂量的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段在每个治疗周期的第1天施用。

84. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的所述结合剂的量为100mg。

85. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段的量为200mg。

86. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段的量为400mg。

87. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将100mg剂量的所述结合剂和200mg剂量的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段每三周施用一次(1Q3W)。

88. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将100mg剂量的所述结合剂和400mg剂量的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段每六周施用一次(1Q6W)。

89. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤或癌症是NSCLC;并且其中将100mg剂量的所述结合剂和200mg剂量的与PD-1结合的所述抗体每三周施用一次(1Q3W),如在每个三周治疗周期的第一天施用,所述结合剂是阿卡顺利单抗或其生物类似物,所述抗体是派姆单抗。

90. 根据权利要求1-88中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤或癌症是NSCLC;并且其中将100mg剂量的所述结合剂和400mg剂量的与PD-1结合的所述抗体每六周施用一次(1Q6W),如在每个六周治疗周期的第一天施用,所述结合剂是阿卡顺利单抗或其生物类似物,所述抗体是派姆单抗。

91. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中首先施用与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段,随后是所述结合剂。

92. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将所述结合剂通过使用静脉内(IV)输注经最少30分钟如经最少60分钟施用。

93. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将所述结合剂通过使用静脉内(IV)输注经30分钟施用。

94. 根据前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将所述PD-1抑制剂以静脉内输注经30分钟施用。

95. 一种试剂盒,所述试剂盒包含

(i) 含有与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区的结合剂

a) 所述第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:2、3和4,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:

SEQ ID NO:6、7和8,

b) 所述第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:

12、13和14,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:16、17和18,

以及

(ii) 与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:43、44和45,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:46、47和48;或者所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:62、63和64,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:65、66和67。

96. 根据权利要求95所述的试剂盒,其中所述结合剂和/或与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段是如权利要求1至94中任一项所定义的。

97. 根据权利要求95或96所述的试剂盒,其中所述结合剂和与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段用于全身施用,特别是用于注射或输注,如静脉内注射或输注。

98. 根据权利要求95-97中任一项所述的试剂盒,所述试剂盒用于在减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法中使用。

99. 根据权利要求98所述的用于所述用途的试剂盒,其中所述肿瘤或癌症和/或所述受试者和/或所述方法是如权利要求1-94中任一项所定义的。

100. 一种用于减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括在施用与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段之前、同时或之后,向所述受试者施用结合剂,其中所述结合剂包含与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区

c) 所述第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:2、3和4,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:6、7和8;

并且

d) 所述第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:12、13和14,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:

SEQ ID NO:16、17和18

并且

其中与PD-1结合的所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:43、44和45,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:46、47和48,或者与PD-1结合的所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:62、63和64,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:65、66和67。

101. 根据权利要求100所述的方法,其中所述肿瘤或癌症和/或所述受试者和/或所述方法和/或所述结合剂和/或所述PD-1抑制剂是如权利要求1-94中任一项所定义的。

针对PD-L1和CD137的多特异性结合剂与抗PD-1抗体组合用于 治疗癌症

技术领域

[0001] 本发明涉及使用与人PD-L1和人CD137结合的结合剂与派姆单抗的组合以减少或预防肿瘤进展或治疗癌症的组合疗法。

背景技术

[0002] CD137(4-1BB)是TNFR家族的成员并且是CD8⁺和CD4⁺ T细胞、调节性T细胞(Treg)、自然杀伤T细胞(NK(T)细胞)、B细胞和嗜中性粒细胞的共刺激分子。在T细胞上,CD137不是组成性表达的,而是在T细胞受体(TCR)激活后诱导的(例如,在肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)上(Gros等人,J.Clin Invest 2014;124(5):2246-59))。经由其天然配体4-1BBL或激动剂抗体的刺激导致使用TRAF-2和TRAF-1作为衔接子的信号传导。通过CD137的早期信号传导涉及K-63多聚泛素化反应,其最终导致核因子(NF)- κ B和丝裂原激活蛋白(MAP)-激酶途径的激活。信号传导导致增加的T细胞共刺激、增殖、细胞因子产生、成熟和延长的CD8⁺ T细胞存活。针对CD137的激动性抗体已被证明在各种临床前模型中通过T细胞促进抗肿瘤控制(Murillo等人,Clin Cancer Res 2008;14(21):6895-906)。刺激CD137的抗体可以诱导T细胞的存活和增殖,从而增强抗肿瘤免疫应答。刺激CD137的抗体已经在现有技术中披露,并且包括乌瑞芦单抗、人IgG4抗体(AU 2004279877)和乌托鲁单抗(人IgG2抗体)(Fisher等人,2012,Cancer Immunol.Immunother.61:1721-1733)。

[0003] 程序性死亡蛋白配体1(PD-L1、PDL1、CD274、B7H1)是33kDa的单跨越I型膜蛋白。基于选择性剪接,已经描述了PD-L1的三种亚型。PD-L1属于免疫球蛋白(Ig)超家族并且含有一个Ig样C2型结构域和一个Ig样V型结构域。新鲜分离的T和B细胞表达可忽略的量的PD-L1并且CD14⁺单核细胞的一部分(约16%)组成性表达PD-L1。然而,已知干扰素- γ (IFN γ)上调肿瘤细胞上的PD-L1。

[0004] PD-L1通过以下方式阻碍抗肿瘤免疫:1)通过与激活的T细胞上的其受体即程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)(CD279)结合来耐受肿瘤反应性T细胞;2)通过经由肿瘤细胞表达的PD-L1进行的PD-1信号传导使肿瘤细胞抵抗CD8⁺ T细胞和Fas配体介导的裂解;3)通过经由T细胞表达的CD80(B7.1)进行的反向信号传导而耐受T细胞;以及4)促进诱导的T调节性细胞的发育和维持。PD-L1在许多人类癌症中表达,包括黑色素瘤、卵巢癌、肺癌和结肠癌(Latchman等人,2004Proc Natl Acad Sci USA 101,10691-6)。

[0005] PD-L1阻断抗体在已知过表达PD-L1的几种癌症(包括黑色素瘤、NSCLC)中显示出临床活性。例如,阿替利珠单抗是针对PD-L1的人源化IgG1单克隆抗体。它目前正在作为用于包括各种类型的实体瘤在内的多种适应证的免疫疗法而处于临床试验中(参见例如,Rittmeyer等人,2017Lancet 389:255-265),并且被批准用于非小细胞肺癌和膀胱癌适应证。阿维鲁单抗(PD-L1抗体)(Kaufman等人Lancet Oncol.2016;17(10):1374-1385)已被FDA批准用于治疗患有转移性梅克尔细胞癌的12岁及以上的成人和儿科患者,并且目前正处于几种癌症适应证(包括膀胱癌、胃癌、头颈癌、间皮瘤、NSCLC、卵巢癌和肾癌)的临床试

验中。度伐鲁单抗 (PD-L1 抗体) 已被批准用于局部晚期或转移性尿路上皮癌适应证, 并且正处于多发性实体瘤和血瘤的临床开发中 (参见例如, Massard 等人, 2016J Clin Oncol. 34 (26): 3119-25)。例如在 WO 2004004771 中已经描述了另外的抗 PD-L1 抗体。

[0006] Horton 等人 (J Immunother Cancer. 2015; 3 (增刊2): 010) 披露了激动性 4-1BB 抗体与中和性 PD-L1 抗体的组合。WO 2019/025545 提供了结合人 PD-L1 并且结合人 CD137 的结合剂 (如双特异性抗体)。

[0007] 然而, 尽管在本领域中取得了这些进展, 但对于用于预防肿瘤的进展或治疗癌症的改进疗法仍有相当大的需要。

发明内容

[0008] 诸位发明人出人意料地发现, (i) 用结合人 PD-L1 并且结合人 CD137 的结合剂的刺激与 (ii) 结合程序性死亡蛋白 1 (PD-1) 的抗体的组合扩大了免疫应答。

[0009] 因此, 在第一方面, 本公开文本提供了一种结合剂, 所述结合剂用于在减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法中使用, 所述方法包括在施用与程序性死亡蛋白 1 (PD-1) 结合的抗体或其抗原结合片段之前、同时或之后, 向所述受试者施用所述结合剂, 其中所述结合剂包含与 CD137 结合的第一结合区和与 PD-L1 结合的第二结合区; a) 所述第一结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 2、3 和 4, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 6、7 和 8;

[0010] 并且

[0011] b) 所述第二抗原结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 12、13 和 14, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 16、17 和 18,

[0012] 并且, 其中与 PD-1 结合的所述抗体包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 43、44 和 45, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 46、47 和 48, 或者与 PD-1 结合的所述抗体包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 62、63 和 64, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 65、66 和 67。

[0013] 在第二方面, 本公开文本提供了一种试剂盒, 所述试剂盒包含 (i) 含有与 CD137 结合的第一结合区和与 PD-L1 结合的第二结合区的结合剂

[0014] a) 所述第一结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 2、3 和 4, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 6、7 和 8,

[0015] 并且

[0016] b) 所述第二抗原结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 12、13 和 14, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列: SEQ ID NO: 16、17 和 18,

[0017] 以及

[0018] (ii) 与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:43、44和45,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:46、47和48,或者所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:62、63和64,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:65、66和67。

[0019] 在第三方面,本公开文本提供了第二方面的试剂盒,所述试剂盒用于在减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法中使用。

[0020] 在第四方面,本公开文本提供了一种用于减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括在施用与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段之前、同时或之后,向所述受试者施用包含与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区的结合剂

[0021] a) 所述第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:2、3和4,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:6、7和8;

[0022] 并且

[0023] b) 所述第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:12、13和14,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:16、17和18,

[0024] 其中所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:43、44和45,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:46、47和48,或者所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:62、63和64,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:65、66和67。

附图说明

[0025] 图1显示了CD137xPD-L1双特异性抗体的预期作用模式的示意图。(A)PD-L1在抗原呈递细胞(APC)以及肿瘤细胞上表达。PD-L1与表达负调节分子PD-1的T细胞的结合有效覆盖了T细胞激活信号并且最终导致T细胞抑制。(B)在CD137xPD-L1双特异性抗体的添加后,抑制性PD-1:PD-L1相互作用经由PD-L1特异性臂被阻断,并且同时,双特异性抗体通过细胞之间的相互作用向在T细胞上表达的CD137提供激动性信号传导,从而导致强烈的T细胞共刺激。

[0026] 图2显示了在LPS成熟mDC和纯化的CD8⁺ T细胞的MLR测定中,通过GEN1046与派姆单抗的组合诱导的IL-2产生。在存在单独的或组合的GEN1046(0.001-30 μ g/mL)、派姆单抗(0.01-100 μ g/mL),对照抗体的情况下,或在不存在任何抗体(无Tx)的情况下,将纯化的CD8⁺ T细胞与同种异体mDC共培养5天。通过Luminex分析IL-2分泌。所示出的数据是重复孔的平均IL-2 $\pm$ SD。每个单独的图形表示三个供体对中的一个。

[0027] 图3显示了在LPS成熟树突细胞(mDC)和纯化的CD8⁺ T细胞的混合淋巴细胞反应

(MLR) 中,由GEN1046与派姆单抗的组合诱导的IFN γ 产生。在存在单独的或组合的GEN1046 (0.001-30 μ g/mL)、派姆单抗 (0.01-100 μ g/mL),对照抗体的情况下,或在不存在任何抗体 (无Tx) 的情况下,将纯化的CD8⁺ T细胞与同种异体mDC共培养5天。通过ELISA分析IFN γ 分泌。所示出的数据是重复孔的平均IFN γ $\pm$ 标准差 (SD)。每个单独的图形表示三个DC/T细胞供体对中的一个。

[0028] 图4显示了在LPS成熟mDC和纯化的CD8⁺ T细胞的MLR测定中,由GEN1046与派姆单抗的组合诱导的TNF α 产生。在存在单独的或组合的GEN1046 (0.001-30 μ g/mL)、派姆单抗 (0.01-100 μ g/mL),对照抗体的情况下,或在不存在任何抗体 (无Tx) 的情况下,将纯化的CD8⁺ T细胞与同种异体mDC共培养5天。通过Luminex分析TNF α 分泌。所示出的数据是重复孔的平均TNF α $\pm$ SD。每个单独的图形表示三个供体对中的一个。

[0029] 图5显示了通过将 1×10^6 个MC38细胞皮下接种到C57BL/6小鼠中建立的MC38同基因肿瘤模型。当肿瘤达到平均体积64mm³时,将小鼠随机化并且用单独的或组合的mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB (5mg/kg)、抗小鼠PD-1抗体 (抗mPD-1;10mg/kg) 处理,或用PBS处理 (全部为2QW $\times$ 3)。A.所示出的数据是每个处理组 (n=10) 的中值肿瘤体积,其中达到终止标准的动物的数据被结转。当处理组内<50%的动物保持存活时 (PBS、mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB、抗mPD-1) 或直至第35天 (mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB与抗mPD-1的组合),生长曲线停止。箭头表示处理天数。B.无进展存活率 (定义为具有小于500mm³的肿瘤体积的小鼠的百分比) 示出为卡普兰-迈耶曲线。使用Mantel Cox分析来比较在第45天处理组之间的存活率 (表Y)。

[0030] 图6显示了在具有活性PD1/PD-L1轴的抗原特异性T细胞测定中,GEN1046 (DuoBody-PD-L1 $\times$ 4-1BB) 和抗PD-1抗体派姆单抗的增殖剂量反应的分析。将用密封蛋白6特异性T细胞受体 (TCR) -RNA和PD-1-体外翻译 (IVT) -RNA电穿孔的羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 标记的T细胞与密封蛋白6-IVT-RNA电穿孔的未成熟树突细胞在存在 (A) GEN1046 (以3倍连续稀释从1至0.00015 μ g/mL) 或 (B) 派姆单抗 (以4倍连续稀释从0.8至0.00005 μ g/mL) 的情况下一起孵育五天。通过流式细胞术测量CD8⁺ T细胞增殖。所示出的数据是使用FlowJo软件v10.7.1计算的随抗体浓度变化的扩增指数。误差条 (SD) 指示实验 (在 (A) 中n=3个重复;在 (B) 中n=2个重复,使用来自一个代表性供体的细胞) 内的变化。通过四参数对数拟合法拟合曲线,并且使用GraphPad Prism软件v9.0确定EC₅₀值和希尔斜率 (如表1和表2中所示)。

[0031] 图7显示了在不存在或存在抗PD-1抗体派姆单抗的情况下,通过GEN1046实现的PD-1/PD-L1介导的T细胞抑制的释放以及对CD8⁺ T细胞增殖的另外的共刺激。将用密封蛋白6特异性TCR-RNA和PD-1-体外翻译 (IVT) -RNA电穿孔的CFSE标记的T细胞与密封蛋白6-IVT-RNA电穿孔的未成熟树突细胞在存在0.2 μ g/mL、0.0067 μ g/mL或0.0022 μ g/mL GEN1046与0.8 μ g/mL固定浓度的派姆单抗或同种型对照抗体IgG1-ctrl1的组合的情况下一起孵育五天 (在每个条件下n=2个技术重复,使用来自n=3个单独供体的细胞)。在不存在GEN1046的情况下,使用仅培养基、仅0.8 μ g/mL IgG1-ctrl1以及仅0.8 μ g/mL派姆单抗来确定基线增殖。通过流式细胞术测量CD8⁺ T细胞增殖。条形图表示使用FlowJo软件v10.7.1计算的在每个指示条件下的扩增指数的平均值 $\pm$ SD。虚线表示在存在抗PD-1抗体派姆单抗的情况下的基线增殖。

[0032] 图8是首次人体、开放标签、剂量递增试验的示意图,所述试验具有用于评价

GEN1046在患有恶性实体瘤的受试者中的安全性的扩展队列。

[0033] 图9是瀑布图,其显示了接受过用检查点抑制剂的先前疗法的受试者(灰线)和未用检查点抑制剂治疗过的患者(黑线)的无进展存活率。

[0034] 图10比较了与具有疾病稳定(SD)或疾病进展(PD)的受试者相比,在具有临床反应(PR)的经历CPI的扩展队列(GEN1046单一疗法)中的受试者中,自最后的先前抗PD-(L)1以来的时间。使用Wilcoxon检验对反应组进行比较。PR相比于PD: $p=0.0017$;PR相比于SD: $p=0.034$ 。

[0035] 图11显示了在综合定量系统药理学(QSP)模型中,以100mg Q3W或Q6W与派姆单抗组合给予的GEN1046的预测的部分反应(PR)和完全反应(CR)率。

[0036] 图12显示了两轮CD3/CD28刺激之后CD3⁺ T细胞的耗竭表型的表征。(A)用CD3/CD28珠刺激体外耗竭的CD3⁺ T细胞或幼稚T细胞。通过ELISA分析IFN γ 的分泌。所示出的数据是一个代表性供体对的重复孔的平均值+标准差(SD)。(B)通过流式细胞术测定幼稚和体外耗竭的CD3⁺ T细胞上TIM3、LAG3、PD-1和4-1BB的表达。所示出的数据是针对背景荧光校正的中值荧光强度(Δ MFI)。(C)通过流式细胞术测定幼稚和体外耗竭的CD3⁺ T细胞上Ki67的表达。

[0037] 图13显示了在成熟树突细胞(mDC)和体外耗竭的CD3⁺ T细胞(Tex)的混合淋巴细胞反应(MLR)中,由GEN1046与派姆单抗的组合诱导的IFN γ 的分泌。将Tex与同种异体LPS成熟DC(DC:T细胞比率为1:4)在存在单独的或组合的GEN1046(0.001-30 μ g/mL)或派姆单抗(1 μ g/mL)的情况下共培养5天。包括未经抗体处理(不具有抗体)的共培养物或用bsIgG1-PD-L1 $\times$ ctrl(30 μ g/mL)、bsIgG1-ctrl $\times$ 4-1BB(30 μ g/mL)、IgG4同种型对照(1 μ g/mL)或IgG1-ctrl-FEAL(30 μ g/mL)处理的共培养物作为对照。通过ELISA分析IFN γ 的分泌。所示出的数据是四个测试的供体对中的一个代表性供体对的重复孔的平均值+标准差(SD)。

[0038] 图14显示了在mDC和Tex的MLR中GEN1046与派姆单抗的组合的最高单一药剂(HSA)协同作用得分。将Tex与同种异体LPS成熟DC(DC:T细胞比率为1:4)在存在单独的或组合的GEN1046(0.001-30 μ g/mL)或派姆单抗(1 μ g/mL)的情况下共培养5天。所示出的数据是所测试的四个供体对中的一个代表性供体对(如图13所示的相同供体)的HSA协同作用得分。在该模型中得分 >10 指示协同作用。

[0039] 图15显示了通过将 1×10^6 个MC38细胞皮下接种到C57BL/6小鼠中建立的MC38结肠癌模型。当肿瘤达到平均体积60mm³时,将小鼠随机化并且用所指示的抗体或其组合处理(全部为2QW $\times$ 3)。A.所示出的数据是每个处理组($n=10$)的中值肿瘤体积,其中达到终止标准的动物的数据被结转。当处理组内 $<50\%$ 的动物保持存活时(mIgG2a-ctrl-AAKR、mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB、抗小鼠PD-1抗体[抗mPD-1])或直至第60天(mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB与抗mPD-1的组合),生长曲线停止。向下的三角形指示治疗的天数。B.无进展存活率(定义为具有小于500mm³的肿瘤体积的小鼠的百分比)示出为卡普兰-迈耶曲线。使用Mantel Cox分析来比较在第69天处理组之间的存活率(表19)。

[0040] 图16显示了处理后肿瘤完全消退的小鼠和肿瘤未经处理的小鼠对照组的(再)激发。将小鼠用在开始用抗体处理之后第121天用皮下注射的 1×10^6 个MC38肿瘤细胞(再)激发。所示出的数据是平均肿瘤体积 $\pm$ SEM。

[0041] 图17显示了在来自MC38结肠癌模型的切除肿瘤组织中的细胞免疫和表达的肿瘤

标记物的定量IHC和ISH数据。给C57BL/6小鼠接种 1×10^6 个MC38细胞。当肿瘤达到平均体积 $50-70\text{mm}^3$ 时,将小鼠随机化并且用mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB、抗mPD-1或其组合处理。在处理开始之后第7天(每个处理组n=5)或第14天(每个处理组n=5)切除肿瘤。一些切除的肿瘤样品太小,无法进行IHC分析,导致每个处理组分析4-5个肿瘤。将切除肿瘤的切片($4\mu\text{m}$)通过免疫组织化学(IHC)使用抗CD3、抗CD4、抗CD8或抗PD-L1抗体进行染色,或通过原位杂交(ISH)对4-1BB和PD-L2进行染色。来自IHC的数据被描述为在载玻片中计数的总细胞的标记物阳性细胞%以及每个处理组的平均值 $\pm$ SEM。来自ISH的数据被描述为每个载玻片的RNAscope H评分以及每个处理组的平均值 $\pm$ SEM。

[0042] 图18显示了来自MC38结肠癌模型的分离的肿瘤组织中CD8T细胞亚群中的GzmB和Ki67表达。给C57BL/6小鼠接种 1×10^6 个MC38细胞。当肿瘤达到平均体积 $50-70\text{mm}^3$ 时,将小鼠随机化并且用mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB、抗mPD-1或其组合处理。在处理开始之后第7天(每个处理组n=5)切除肿瘤,将其解离成单细胞悬浮液并且通过流式细胞术进行分析。所示出的数据是在单独小鼠的CD8⁺T细胞群体内的GzmB⁺细胞(A)或Ki67⁺细胞(B)百分比和每个处理组的平均值 $\pm$ SEM。进行曼-惠特尼(Mann-Whitney)统计分析以比较处理组之间CD8⁺T细胞群体内GzmB⁺细胞或Ki67⁺细胞的百分比,其中*p<0.05并且**p<0.01。

[0043] 图19显示了用作为单一药剂或组合的mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB、抗mPD-1抗体处理或用非结合对照抗体IgG2a-ctrl-AAKR处理的荷MC38肿瘤C57BL/6小鼠的外周血中的细胞因子水平。在基线时(处理的前一天[第-1天],虚线)和在每个处理之后两天(第2天和第5天)采集外周血样品。通过ECLIA进行细胞因子分析。

[0044] 表1-序列:粗体和加下划线的是F;E;A;L和R,分别对应于位置234和235;265;405和409,所述位置按照EU编号。在SEQ ID No:63和64中,粗体氨基酸表示对于受控制的Fab臂交换所需的-AAKR或-AALT突变。在可变区中,根据IMGT定义注释的所述CDR区(除非另有说明或与上下文相矛盾)加下划线。

[0045]

SEQ ID	名称	序列	生物体
1	VH_CD137-009-H7	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDY	合成构建体

[0046]

		<u>WMSWVRQAPGKGLEWVG</u> <u>YIDVGGSLYYAAS</u> VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYY CARGGLTYGFDLWGQGLTLTVSS	
2	VH_CD137-009-H7_CDR1	GFSLNDYW	合成构建体
3	VH_CD137-009-H7_CDR2	IDVGGSL	合成构建体
4	VH_CD137-009-H7_CDR3	ARGGLTYGFDL	合成构建体
5	VL_CD137-009-L2	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDISSYL AWYQQKPGKAPKRLIYGASDLASGVPSRFSA SGSGTDYFTISSLQPEDIATYYCHYYATISGL GVAFGGGTKVEIK	合成构建体
6	VL_CD137-009-L2_CDR1	EDISSY	合成构建体
7	VL_CD137-009-L2_CDR2	GAS	合成构建体
8	VL_CD137-009-L2_CDR3	HYYATISGLGVA	合成构建体
9	VH_CD137-009	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNDYW MSWVRQAPGKGLEWIGYIDVGGSLYYASWA KGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCAR GGLTYGFDLWGPGLTLTVSS	合成构建体
10	VL_CD137-009	DIVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASEDISSYL AWYQQKPGQRPKRLIYGASDLASGVPSRFSA SGSGTEYALTISDLESADAATYYCHYYATISG LGVAFGGGTEVVVK	合成构建体
11	VH-PD-L1-547	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGTFSTY <u>AMSWVRQAPGKGLEWVSGFSGSGGFTFYAD</u> SVRGRFTISRDSKNTLFLQMSSLRAEDTAVY YCAIPARGYNYGSFQHWGQGLTLTVSS	合成构建体
12	VH- PD-L1-547-CDR1	GSTFSTYA	合成构建体
13	VH- PD-L1-547-CDR2	FSGSGGFT	合成构建体
14	VH- PD-L1-547-CDR3	AIPARGYNYGSFQH	合成构建体
15	VL- PD-L1-547	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSV HWYQQKPGQAPVLVYDDNDRPSGLPERFSG SNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSS DHVVFGGGTKLTVL	合成构建体
16	VL- PD-L1-547-CDR1	NIGSKS	合成构建体
17	VL- PD-L1-547-CDR2	DDN	合成构建体
18	VL- PD-L1-547-CDR3	QVWDSSSDHVV	合成构建体
19	IgG1-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	合成构建体
20	IgG1-Fc_F405L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG	合成构建体

[0047]

		SFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK	
21	IgG1-Fc_K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK	合成构建体
22	IgG1-Fc_FEA	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFE ~~EG~~ GPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVA ~~V~~ SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK	合成构建体
23	IgG1- ~~FEAR~~ -Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFE ~~EG~~ GPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVA ~~V~~ SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK	合成构建体
24	IgG1- ~~FEAL~~ -Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFE ~~EG~~ GPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVA ~~V~~ SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK	合成构建体
25	没有 C 末端赖氨酸的 IgG1-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPG	合成构建体
26	没有 C 末端赖氨酸的 IgG1-Fc_F405L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK	合成构建体

[0048]

		RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG SFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	
27	没有 C 末端赖氨酸的 IgG1-Fc_K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	合成构建体
28	没有 C 末端赖氨酸的 IgG1-Fc_FEA	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	合成构建体
29	没有 C 末端赖氨酸的 IgG1-FCAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	合成构建体
30	没有 C 末端赖氨酸的 IgG1-FCAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG SFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	合成构建体
31	CD137-009重链	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLN WMSWVRQAPGKGLEWVGIDVGGSLYYAAS VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYY CARGGLTYGFDLWGQGTLLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS	合成构建体

[0049]

		RTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	
32	CD137-009轻链	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASEDISSYL AWYQQKPGKAPKRLIYGASDLASGVPSRFSA SGSGTDYFTISSLQPEDIAITYCHYYATISGL GVAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK KYYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	合成构建体
33	PD-L1-547重链	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFSTY AMSWVRQAPGKGLEWVSGFSGSGGFTFYAD SVRGRFTISRDSKNTLFLQMSSLRAED TAVYYCAIPARGYNYGSFQHWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	合成构建体
34	PD-L1-547轻链	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSV HWYQQKPGQAPVLVYDDNDRPSGLPERFSG SNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSS DHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	合成构建体
35	κ -C	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	合成构建体
36	λ -C	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS	合成构建体
37	人 CD137(UniProtKB - Q07011; 包括信号肽序 列: aa 1-23)	MGNSCYNIVALLVLNFERTRSLQDPCSNCPA GTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICR QCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCGLGA GCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFND QKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVC GPSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSPQIISFFL ALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	智人(Homo sapiens)
38	人 CD137(UniProtKB - Q07011; 成熟序列)	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSA GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECD TPGFHCGLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK DCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVN GTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPAPAREP GHSPQIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCEL	智人

[0050]

39	人 PD-L1(UniProtKB - Q9NZQ7; 包括信号肽序列: aa 1-18)	MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLVYVE YGSNMTIECFVVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLG NAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRI TVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAE GYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKL FNVSTLRLNTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAE LVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTF IFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLE ET	智人
40	人 PD-L1(UniProtKB - Q9NZQ7; 成熟序列)	FTVTVPKDLVYVEYGSNMTIECKFPVEKQLDL AALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSY RQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVY RCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILV DPTSEHELTCQAE GYPKAEVIWTSSDHQVLS GKTTTTNSKREEKLFNVSTLRLNTTTNEIFYC TFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLV ILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGI QDTNSKKQSDTHLEET	智人
41	人PD-1	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDR PWNPPFTSPALLVVTEDGNATFTCSFSNTSESF VLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCR FRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGA ISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPS SPRPAGQFQTLVVG VVGGLLSLVLLVWVLA VICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSV DYGELDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEYATIVF PSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCS WPL	智人
42	CTLA-4	MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIP VFCKAMHVAQPAVVLASSRGIA SFVCEYASP GKATEVRVTVLRLQADSQVTEVCAATYMMGN ELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTG LYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCP DSDFLWLAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKML KKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN	智人
43	派姆单抗VH CDR1	GYTFTNYY	合成构建体
44	派姆单抗VH CDR2	INPSNGGT	合成构建体
45	派姆单抗VH CDR3	ARRDYRFDMGFDY	合成构建体
46	派姆单抗VL CDR1	KGVSTSGYSY	合成构建体
47	派姆单抗VL CDR2	LAS	合成构建体
48	派姆单抗VL CDR3	QHSRDLPLT	合成构建体
49	派姆单抗VH	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTN YYMYWVRQAPGQGLEWMGINPSNGGTNFN EKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTA VYICARRDYRFDMGFDYWGQGTTTVTVSS	合成构建体
50	派姆单抗VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSG YSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLA SYLESGVPA RFGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRD LPLTFGGGTKVEIK	合成构建体
51	派姆单抗重链	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTN YYMYWVRQAPGQGLEWMGINPSNGGTNFN EKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTA VYICARRDYRFDMGFDYWGQGTTTVTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVE SKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPETVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE	合成构建体

[0051]

		VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSLGK	
52	派姆单抗轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSG YSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESQVPA RFGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRD LPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	合成构建体
53	VH_IgG1-b12	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSN</u> <u>FVIHWVRQAPGQRFQWGMWINPYNGNKEFS</u> AKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTA VYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGT TVIVSS	合成构建体
54	VL_IgG1-b12	EIVLTQSPGTLTLSPGERATFSCRSSHISIRRRV AWYQHKGPGQAPRLVIHGVSNNRASGISDRFSGS SGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYT FGQGTKLERK	合成构建体
55	m4-1BB-3H3 VH	EMQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAGSGFTLSD <u>YGVAWVRQAPKKGLEWVAYISYAGGTTYR</u> ESVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSDDTAT YYCTIDGYGGYSGSHWYFDFWGPMTMTVSS	合成构建体
56	m4-1BB-3H3 VL	DIQMTQSPSLLSASVGDRTLNCRISQNVYK <u>NLAWYQQKLGEAPKLLIYNANSLQAGIPSRFS</u> GSGSGTDFTLTISLQPEDVATYFCQQYYSGN TFGAGTNLELK	合成构建体
57	AALT	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT LSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDK KIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPK IKDVLMISSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPK GSRAPQVYVLPPEEEEMTKKQVTLTCMVT FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSG SYLMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNHHTTKSFSRTPGK	合成构建体
58	AAKR	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT LSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDK KIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPK IKDVLMISSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPK GSRAPQVYVLPPEEEEMTKKQVTLTCMVKD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSG SYFMYSRLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNHHTTKSFSRTPGK	合成构建体
59	恒定区小鼠κ LC	RADAAPTVISFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDS TYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTS PIVKSFNRNEC	合成构建体
60	MPDL3280A VH	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDS</u> <u>WIHWYRQAPKGLEWYAWISPYGGSTYYAD</u> SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCARRHWPGGFDYWGQGLTVSS	合成构建体

[0052]

61	MPDL3280A VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG SGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQYLYHPAT FGQGTKVEIK	合成构建体
62	派姆单抗VH CDR1(Kabat 编号)	NYYMY	合成构建体
63	派姆单抗VH CDR2(Kabat 编号)	GINPSNGGTNFNEKFKN	合成构建体
64	派姆单抗VH CDR3(Kabat 编号)	RDYRFDMGFDY	合成构建体
65	派姆单抗VL CDR1(Kabat 编号)	RASKGVSTSGYSYLH	合成构建体
66	派姆单抗VL CDR2(Kabat 编号)	LASYLES	合成构建体
67	派姆单抗VL CDR3(Kabat 编号)	QHSRDPLT	合成构建体

具体实施方式

[0053] 尽管在下文更详细地进一步描述了本公开文本,但应理解,本公开文本不限于本文所述的具体方法、方案和试剂,因为这些可以改变。还应理解,本文所用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在限制本公开文本的范围,本发明的范围将仅由随附权利要求限定。除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0054] 在下文中,将更详细地描述本公开文本的要素。这些要素是用具体实施方案来列出,然而,应理解,它们可以按任何方式和以任何数量组合以产生另外的实施方案。差异性描述的实施例和优选实施方案不应当解释为将本公开文本限制于仅明确描述的实施方案。本说明书应当被理解为支持并且涵盖组合明确描述的实施方案与任何数量的所公开和/或优选要素的实施方案。此外,除非上下文另有指示,否则应当考虑本申请的说明书公开本申请中所有所描述要素的任何排列和组合。例如,如果在本文所用的结合剂的优选的实施方案中,第一重链包含SEQ ID NO:23或29中所示的氨基酸序列[IgG1-Fc_FEAR]或基本上由其组成或由其组成,并且在本文所用的结合剂的另一个优选的实施方案中,第二重链包含SEQ ID NO:24或30中所示的氨基酸序列[IgG1-Fc_FEAL]或基本上由其组成或由其组成,那么在本文所用的结合剂的另外优选的实施方案中,第一重链包含SEQ ID NO:23或29中所示的氨基酸序列[IgG1-Fc_FEAR]或基本上由其组成或由其组成,并且第二重链包含SEQ ID NO:24或30中所示的氨基酸序列[IgG1-Fc_FEAL]或基本上由其组成或由其组成。

[0055] 优选地,本文所用的术语如“A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”,H.G.W.Leuenberger,B.Nagel和H. Kölbl编辑,Helvetica Chimica Acta,CH-4010Basel,Switzerland,(1995)中描述的进行定义。

[0056] 除非另有指示,否则本公开文本的实践将使用在本领域的文献中解释的常规化学、生物化学、细胞生物学、免疫学和重组DNA技术(参见例如,Organikum,Deutscher Verlag der Wissenschaften,Berlin 1990;Streitwieser/Heathcook,“Organische Chemie”,VCH,1990;Beyer/Walter,“Lehrbuch der Organischen Chemie”,S.Hirzel Verlag Stuttgart,1988;Carey/Sundberg,“Organische Chemie”,VCH,1995;March,

“Advanced Organic Chemistry”, John Wiley & Sons, 1985; Römpp Chemie Lexikon, Falbe/Regitz (Hrsg.), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1989; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, J. Sambrook 等人编辑, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989)。

[0057] 除非本文另有指示或另外与上下文明显矛盾, 否则本文所述的所有方法都可以以任何合适的顺序来进行。在本文中提供的任何和所有例子或示例性语言(例如, “如”)的使用都仅旨在更好地说明本公开文本, 并且不对原本要求保护的本公开文本的范围施加任何限制。在本说明书中的任何语言均不应当被解释为指示任何未要求保护的实践本公开文本所必需的要素。

[0058] 在本文中列举值的范围仅旨在用作单独提到落在所述范围内的每个单独值的速记法。除非本文另有指示, 否则将每一单独的值并入说明书中, 如同在本文中单独列举所述值一样。

[0059] 贯穿本说明书的正文引用了若干文献。将本文无论在上文还是在下文引用的每个文献(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商说明书、指导等)都通过引用以它们的整体特此并入。本文的任何内容都不应解释为承认本发明因在先发明而有权早于这样的披露内容。

[0060] 定义

[0061] 在下文中, 将提供适用于本公开文本的所有方面的定义。除非另有指示, 否则以下术语具有以下含义。任何未定义的术语都有其领域公认的含义。

[0062] 贯穿本说明书及其后的权利要求, 除非上下文另有要求, 否则词语“包含(comprise)”以及变型如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”应当被理解为是指包含所述的成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组, 但不排除任何其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组。术语“基本上由……组成”意指不包括具有任何实质性意义的其他成员、整数或步骤。术语“包含”涵盖术语“基本上由……组成”, 术语“基本上由……组成”进而涵盖术语“由……组成”。因此, 在本申请中每次出现时, 术语“包含”可以被术语“基本上由……组成”或“由……组成”替代。同样, 在本申请中每次出现时, 术语“基本上由……组成”可以被术语“由……组成”替代。

[0063] 除非本文另有指示或与上下文明显矛盾, 否则在描述本公开文本的上下文中(特别是在权利要求书的上下文中)所用的术语“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”和“所述”以及类似的引用应解释为同时包括单数和复数两者。

[0064] 当在本文中使用, “和/或”将被视为对两个指定特征或组分中的每一个在有或没有另一个特征或组分的情况下的具体公开。例如, “X和/或Y”应被视为对(i) X、(ii) Y、以及(iii) X和Y中的每一个的具体公开, 如同每一个在本文中单独阐述一样。

[0065] 在本公开文本的上下文中, 术语“约”表示普通技术人员将理解的能仍然确保所讨论的特征的技术效果的准确度区间。所述术语通常指示与所指示的数值偏差 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.9\%$ 、 $\pm 0.8\%$ 、 $\pm 0.7\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.4\%$ 、 $\pm 0.3\%$ 、 $\pm 0.2\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.05\%$, 以及例如 $\pm 0.01\%$ 。如普通技术人员将理解的, 给定技术效果的数值的具体的这种偏差将取决于技术效果的性质。例如, 自然或生物技术效果通常可能比人造或工程化技术效果具有更大的这种偏差。

[0066] 在本公开文本的上下文中的术语“结合剂”是指能够与所需抗原结合的任何药剂。在本公开文本的某些实施方案中,结合剂是抗体、抗体片段或其构建体。结合剂还可以包含合成的、经修饰的或非天然存在的部分,特别是非肽部分。此类部分可以例如连接所需的抗原结合官能团或区域(如抗体或抗体片段)。在一个实施方案中,结合剂是包含抗原结合CDR或可变区的合成构建体。

[0067] 如本文所用,“免疫检查点”是指免疫系统的调节物,并且特别是调节T细胞受体识别抗原的广度和质量的共刺激和抑制性信号。在某些实施方案中,免疫检查点是抑制性信号。在某些实施方案中,抑制性信号是PD-1与PD-L1和/或PD-L2之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是CTLA-4与CD80或CD86之间的相互作用以代替CD28结合。在某些实施方案中,抑制性信号是LAG-3与MHC II类分子之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是TIM-3与其配体(如半乳凝素9、PtdSer、HMGB1和CEACAM1)中的一种或多种之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是一个或几个KIR与其配体之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是TIGIT与其配体(PVR、PVRL2和PVRL3)中的一种或多种之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是CD94/NKG2A与HLA-E之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是VISTA与其一个或多个结合配偶体之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是一个或多个Siglec与其配体之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是GARP与其配体中的一种或多种之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是CD47与SIRP α 之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是PVRIG与PVRL2之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是CSF1R与CSF1之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是BTLA与HVEM之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号是由CD39和CD73产生的腺苷能(adenosinergic)途径的一部分(例如,A2AR和/或A2BR与腺苷之间的相互作用)。在某些实施方案中,抑制性信号是B7-H3与其受体和/或B7-H4与其受体之间的相互作用。在某些实施方案中,抑制性信号由IDO、CD20、NOX或TDO介导。

[0068] 术语“检查点抑制剂(CPI)”和“免疫检查点(ICP)抑制剂”在本文中同义使用。所述术语是指这样的分子(如结合剂),其完全或部分减少、抑制、干扰或负调节一个或多个检查点蛋白或者完全或部分减少、抑制、干扰或负调节一个或多个检查点蛋白的表达,所述分子例如抑制免疫检查点的分子(如结合剂),特别是抑制免疫检查点的抑制性信号的分子(如结合剂)。在一个实施方案中,免疫检查点抑制剂与一个或多个检查点蛋白结合。在一个实施方案中,免疫检查点抑制剂与一个或多个调节检查点蛋白的分子结合。在一个实施方案中,免疫检查点抑制剂与一个或多个检查点蛋白的前体(例如,在DNA或RNA水平上)结合。可以使用根据本公开文本的起检查点抑制剂作用的任何药剂。如本文所用,术语“部分”意指至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的水平(例如,抑制检查点蛋白的水平)。

[0069] 在一个实施方案中,检查点抑制剂可以是抑制免疫检查点的抑制性信号的任何化合物(如任何结合剂),其中抑制性信号选自:PD-1与PD-L1和/或PD-L2之间的相互作用;CTLA-4与CD80或CD86之间的相互作用以代替CD28结合;LAG-3与MHC II类分子之间的相互作用;TIM-3与其配体(如半乳凝素9、PtdSer、HMGB1和CEACAM1)中的一种或多种之间的相互作用;一个或几个KIR与其配体之间的相互作用;TIGIT与其配体(PVR、PVRL2和PVRL3)中的

一种或多种之间的相互作用;CD94/NKG2A与HLA-E之间的相互作用;VISTA与其一个或多个结合配偶体之间的相互作用;一个或多个Siglec与其配体之间的相互作用;GARP与其配体中的一种或多种之间的相互作用;CD47与SIRP α 之间的相互作用;PVRIG与PVRL2之间的相互作用;CSF1R与CSF1之间的相互作用;BTLA与HVEM之间的相互作用;由CD39和CD73产生的腺苷能途径的一部分(例如,A2AR和/或A2BR与腺苷之间的相互作用);B7-H3与其受体和/或B7-H4与其受体之间的相互作用;由IDO、CD20、NOX或TDO介导的抑制性信号。在一个实施方案中,检查点抑制剂是选自以下的至少一种:PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、PD-L2抑制剂、CTLA-4抑制剂、TIM-3抑制剂、KIR抑制剂、LAG-3抑制剂、TIGIT抑制剂、VISTA抑制剂和GARP抑制剂。在一个实施方案中,检查点抑制剂可以是阻断抗体,如PD-1阻断抗体、CTLA4阻断抗体、PD-L1阻断抗体、PD-L2阻断抗体、TIM-3阻断抗体、KIR阻断抗体、LAG-3阻断抗体、TIGIT阻断抗体、VISTA阻断抗体或GARP阻断抗体。PD-1阻断抗体的例子包括派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗和斯巴达珠单抗。CTLA4阻断抗体的例子包括伊匹单抗和曲美木单抗。PD-L1阻断抗体的例子包括阿替利珠单抗、度伐鲁单抗和阿维鲁单抗。

[0070] 术语“免疫球蛋白”涉及免疫球蛋白超家族的蛋白质,优选抗原受体(如抗体或B细胞受体(BCR))。免疫球蛋白的特征在于具有独特的免疫球蛋白(Ig)折叠的结构域(即,免疫球蛋白结构域)。所述术语涵盖膜结合免疫球蛋白以及可溶性免疫球蛋白。膜结合免疫球蛋白也称为表面免疫球蛋白或膜免疫球蛋白,其通常是BCR的一部分。可溶性免疫球蛋白通常称为抗体。

[0071] 免疫球蛋白的结构已被很好地表征。参见例如,Fundamental Immunology第7章(Paul,W.编辑,第2版Raven Press,N.Y.(1989))。简言之,免疫球蛋白总体上包含几条链,通常是经由二硫键连接的两条相同的重链和两条相同的轻链。这些链主要由免疫球蛋白结构域或区域构成,如V_L或VL(可变轻链)结构域/区域,C_L或CL(恒定轻链)结构域/区域,V_H或VH(可变重链)结构域/区域,以及C_H或CH(恒定重链)结构域/区域C_H1(CH1)、C_H2(CH2)、C_H3(CH3)和C_H4(CH4)。重链恒定区通常由三个结构域(CH1、CH2和CH3)构成。铰链区是重链的CH1与CH2结构域之间的区域并且是高度柔性的。铰链区中的二硫键是IgG分子中两条重链之间相互作用的一部分。每条轻链通常由VL和CL构成。轻链恒定区通常由一个结构域(CL)构成。VH和VL区可以进一步细分为高变性区域(或高变区,其在呈序列和/或结构定义环的形式时可能是高变的),也称为互补决定区(CDR),其间穿插有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL都通常由三个CDR和四个FR构成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(还参见Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196,901-917(1987))。除非另有说明或与上下文相矛盾,否则本文中的CDR序列根据IMGT规则使用DomainGapAlign(LefrancMP.,Nucleic Acids Research 1999;27:209-212以及Ehrenmann F.,Kaas Q.和Lefranc M.-P.Nucleic Acids Res.,38,D301-307(2010);也参见互联网[http地址www.imgt.org](http://www.imgt.org))来鉴定。除非另有说明或与上下文相矛盾,本公开文本中对恒定区中的氨基酸位置的引用是根据EU编号(Edelman等人,Proc Natl Acad Sci USA.1969年5月;63(1):78-85;Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版1991NIH公开号91-3242)。

[0072] 有五种类型的哺乳动物免疫球蛋白重链(即, α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ),其代表不同类别的抗体(即,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM)。与可溶性免疫球蛋白的重链形成对比,膜或表面免疫球蛋白

白的重链在它们的羧基末端处包含跨膜结构域和短胞质结构域。在哺乳动物中,有两种类型的轻链,即 λ 和 κ 。免疫球蛋白链包含可变区和恒定区。恒定区在免疫球蛋白的不同的同种型中基本上是保守的,其中可变部分是高度多样化的并且负责抗原识别。

[0073] 术语“氨基酸”和“氨基酸残基”在本文中可以互换使用,并且不应被理解为限制性的。氨基酸是含有胺($-\text{NH}_2$)和羧基($-\text{COOH}$)官能团以及每个氨基酸特有的侧链(R基团)的有机化合物。在本公开文本的上下文中,可以基于结构和化学特征对氨基酸进行分类。因此,以下表中之一或二者可以反映氨基酸的类别:

[0074] 表2:基于R基团的结构和一般化学表征的主要分类

[0075]	类别	氨基酸
	酸性残基	D和E
	碱性残基	K、R和H
	亲水性不带电荷的残基	S、T、N和Q
	脂肪族不带电荷的残基	G、A、V、L和I
	非极性不带电荷的残基	C、M和P
	芳族残基	F、Y和W

[0076] 表3:氨基酸残基的可替代性物理和功能分类

	类别	氨基酸
	含羟基的残基	S和T
	脂肪族残基	I、L、V和M
	环烯基相关残基	F、H、W和Y
[0077]	疏水性残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W和Y
	带负电荷的残基	D和E
	极性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S和T
	带正电的残基	H、K和R
	小残基	A、C、D、G、N、P、S、T和V
	非常小的残基	A、G和S
	参与转弯形成的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P和T
	柔性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E和R

为了本公开文本的目的,氨基酸序列(肽、蛋白质或多肽)的“变体”包括氨基酸插入变体、氨基酸添加变体、氨基酸缺失变体和/或氨基酸取代变体。术语“变体”包括所有突变体、剪接变体、翻译后修饰的变体、构象、亚型、等位基因变体、物种变体和物种同源物,特别是天然存在的变体。术语“变体”特别包括氨基酸序列的片段。

[0078] 氨基酸插入变体包括在特定氨基酸序列中插入单个或两个或更多个氨基酸。在具有插入的氨基酸序列变体的情况下,一个或多个氨基酸残基被插入到氨基酸序列中的特定位点中,但也可以随机插入并且适当筛选所得产物。

[0079] 氨基酸添加变体包含一个或多个氨基酸(如1、2、3、5、10、20、30、50个或更多个氨基酸)的氨基和/或羧基末端融合。

[0080] 氨基酸缺失变体的特征在于如通过去除1、2、3、5、10、20、30、50个或更多个氨基酸从序列去除一个或多个氨基酸。缺失可以发生在蛋白质的任何位置。包含在蛋白质的N末端和/或C末端的缺失的氨基酸缺失变体也被称为N末端和/或C末端截短变体。

[0081] 氨基酸取代变体的特征在于序列中的至少一个残基被去除并且在其位置插入另

一个残基。一个氨基酸被取代为另一个氨基酸可以分为保守取代和非保守取代。优先考虑在氨基酸序列中的在同源蛋白质或肽之间不保守的位置上的修饰和/或优先考虑将氨基酸用具有类似特性的其他氨基酸替代。优选地,肽和蛋白质变体中的氨基酸变化是保守的氨基酸变化,即类似带电荷或不带电荷的氨基酸的取代。保守的氨基酸变化涉及与其侧链相关的氨基酸家族中的一种的取代。在本公开文本的上下文中,“保守取代”是一个氨基酸被具有类似结构和/或化学特征的另一个氨基酸的取代,一个氨基酸残基被如以上两个表中的任一个所定义的同类的另一个氨基酸残基的这种取代:例如,亮氨酸可以被异亮氨酸取代,因为它们两者均是脂肪族的、分支的疏水物。同样,天冬氨酸可以被谷氨酸取代,因为它们两者都是小的、带负电荷的残基。天然存在的氨基酸总体上也可以分为四个家族:酸性氨基酸(天冬氨酸盐、谷氨酸盐)、碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、非极性氨基酸(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)以及不带电荷的极性氨基酸(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时被共同归类为芳族氨基酸。在一个实施方案中,保守氨基酸取代包括在以下组内的取代:

[0082] -甘氨酸、丙氨酸;

[0083] -缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;

[0084] -天冬氨酸、谷氨酸;

[0085] -天冬酰胺、谷氨酰胺;

[0086] -丝氨酸、苏氨酸;

[0087] -赖氨酸、精氨酸;以及

[0088] -苯丙氨酸、酪氨酸。

[0089] 如本文所用的术语“对应于位置…的氨基酸”和类似表达是指人IgG1重链中的氨基酸位置编号。通过与人IgG1的比对,可以找到其他免疫球蛋白中对应的氨基酸位置。因此,一个序列中的氨基酸或区段(其“对应于”另一个序列中的氨基酸或区段)是这样的氨基酸或区段:使用通常在默认设置下的标准序列比对程序(如ALIGN、ClustalW或类似程序)将所述氨基酸或区段与另一个氨基酸或区段比对并且与人IgG1重链具有至少50%、至少80%、至少90%或至少95%同一性。如何对序列或序列中的区段进行比对并且从而确定序列中与根据本公开文本的氨基酸位置对应的位置被认为是本领域熟知的。

[0090] 在本公开文本的上下文中,术语“抗体”(Ab)是指具有在典型生理条件下与抗原(特别是抗原上的表位)特异性结合的能力的免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的片段或其任一种的衍生物,优选地其中半衰期为显著的时间段,如至少约30分钟、至少约45分钟、至少约一小时、至少约两小时、至少约四小时、至少约8小时、至少约12小时、约24小时或更长、约48小时或更长,约3、4、5、6、7或更多天等,或任何其他相关的功能定义的时间段(如足以诱导、促进、增强和/或调节与结合抗原的抗体相关的生理反应的时间和/或足以使抗体招募效应子活性的时间)。特别地,术语“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。术语“抗体”包括单克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体以及任何前述项的组合。每条重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)构成。每条轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)构成。可变区和恒定区在本文中也分别称为可变结构域和恒定结构域。VH区和VL区可以进一步细分为具有高变性区域,称为互补决定

区(CDR),散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR构成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。VH的CDR称为HCDR1、HCDR2和HCDR3(或CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3),VL的CDR称为LCDR1、LCDR2和LCDR3(或CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区包含重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL),其中CH可以进一步细分为恒定结构域CH1、铰链区以及恒定结构域CH2和CH3(按以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:CH1、CH2、CH3)。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和补体系统的组分(如C1q)。抗体可以是源自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫活性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。抗体可以以包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab)₂以及单链抗体和人源化抗体在内的各种形式存在。

[0091] 免疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。术语“结合区”和“抗原结合区”在本文中可互换使用并且是指与抗原相互作用的区域并且包含VH区和VL区两者。如本文所用的抗体不仅包括单特异性抗体,还包括多特异性抗体,所述多特异性抗体包含多个(如两个或更多个,例如三个或更多个)不同的抗原结合区。

[0092] 如上所指示的,除非另有说明或与上下文明显矛盾,否则本文中的术语抗体包括作为抗原结合片段(即,保留与抗原特异性结合的能力)的抗体片段。已经证明抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。在术语“抗体”内涵盖的抗原结合片段的例子包括(i) Fab' 或Fab片段(由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段)或如W02007/059782(Genmab)中描述的单价抗体;(ii) F(ab')₂片段,即包含由在铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)基本上由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)基本上由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) dAb片段(Ward等人,Nature 341,544-546(1989)),其基本上由VH结构域组成并且也称为结构域抗体(Holt等人;Trends Biotechnol.2003年11月;21(11):484-90);(vi)骆驼或纳米抗体分子(Reverts等人;Expert Opin Biol Ther.2005年1月;5(1):111-24);以及(vii)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码,但它们可以使用重组方法通过合成接头来连接,从而使得它们能够被制备为单条蛋白质链,其中VL和VH区配对以形成单价分子(称为单链抗体或单链Fv(scFv),参见例如,Bird等人,Science 242,423-426(1988)以及Huston等人,PNAS USA 85,5879-5883(1988))。除非上下文中另有说明或明确指示,否则此类单链抗体涵盖在术语抗体内。虽然此类片段总体上包括在抗体的含义内,但它们共同并且各自独立地是本公开文本的独特特征,展现出不同的生物学特性和实用性。在本文中进一步讨论在本公开文本的上下文中的这些和其他可用的抗体片段以及此类片段的双特异性形式。还应当理解,除非另有说明,否则术语抗体还包括多克隆抗体、单克隆抗体(mAb)、抗体样多肽(如嵌合抗体和人源化抗体)以及保留通过任何已知技术(如酶切割、肽合成和重组技术)提供的与抗原(抗原结合片段)特异性结合的能力的抗体片段。

[0093] 生成的抗体可以具有任何同种型。如本文所用,术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋白类别(例如,IgG(如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgD、IgA(如IgA1、IgA2)、IgE、IgM或IgY)。当本文提到特定的同种型(例如IgG1)时,所述术语不限于特定的同种型序列(例如特定的IgG1序列),而是用于指示抗体的序列更接近于该同种型(例如IgG1)

的序列而不是其他同种型的序列。因此,例如,本文公开的IgG1抗体可以是天然存在的IgG1抗体的序列变体,包括恒定区中的变异。

[0094] IgG1抗体可以以多种称为同种异型的多态变体存在(综述于Jefferis和Lefranc 2009.mAbs第1卷第4期1-7中),其中的任一种适合于在本文的一些实施方案中使用。人群中的常见同种异型变体是通过字母a、f、n、z或其组合命名的那些。在本文的任一实施方案中,抗体可以包含含有人IgG Fc区的重链Fc区。在另外的实施方案中,人IgG Fc区包含人IgG1。

[0095] 在本公开文本的上下文中,术语“多特异性抗体”是指具有至少两个由不同抗体序列定义的不同抗原结合区的抗体。在一些实施方案中,所述不同的抗原结合区结合相同抗原上的不同表位。然而,在优选的实施方案中,所述不同的抗原结合区结合不同的靶抗原。在一个实施方案中,多特异性抗体是“双特异性抗体”或“bs”。多特异性抗体(如双特异性抗体)可以是任何形式,包括下文描述的任何双特异性或多特异性抗体形式。

[0096] 当在抗体的上下文中使用时,术语“全长”指示抗体不是片段,而是含有特定同种型的所有结构域(这些结构域是对于该同种型在自然界中通常所见的)(例如,IgG1抗体的VH、CH1、CH2、CH3、铰链、VL和CL结构域)。

[0097] 如本文所用的术语“人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和框架区以及人免疫球蛋白恒定结构域的抗体。本文公开的人抗体可以包含不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变、插入或缺失)。然而,如本文所用的术语“人抗体”不旨在包括源自另一种非人物种(如小鼠)的种系的CDR序列已被移植到人框架序列上的抗体。

[0098] 如本文所用的术语“嵌合抗体”是指其中所述可变区源自非人物种(例如源自啮齿动物)并且所述恒定区源自不同物种(如人)的抗体。嵌合抗体可以通过抗体工程化生成。“抗体工程化”是一般用于抗体的不同种类的修饰的术语,并且抗体工程化的过程是技术人员来说所熟知的。特别地,嵌合抗体可以通过使用如在Sambrook等人,1989,Molecular Cloning:A laboratory Manual,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,第15章中所述的标准DNA技术来生成。因此,嵌合抗体可以是基因工程化或酶工程化重组抗体。生成嵌合抗体在技术人员的知识范围内,因此,嵌合抗体的生成可以通过除本文所述的那些之外的其他方法进行。开发用于人的治疗性应用的嵌合单克隆抗体以降低非人抗体(例如啮齿动物抗体)的预期抗体免疫原性。它们可以典型地含有对于目的抗原具有特异性的非人(例如鼠或兔)可变区以及人恒定抗体重链和轻链结构域。在嵌合抗体的上下文中使用的术语“可变区”或“可变结构域”是指包含免疫球蛋白的重链和轻链的CDR和框架区的区域,如下所述。

[0099] 如本文所用的术语“人源化抗体”是指基因工程化的非人抗体,其含有人抗体恒定结构域和经修饰以含有与人可变结构域具有高水平序列同源性的非人可变结构域。这可以通过将共同形成抗原结合位点的六个非人抗体互补决定区(CDR)移植到同源人受体框架区(FR)来实现(参见WO 92/22653和EP 0 629 240)。为了完全重构亲本抗体的结合亲和力和特异性,可能需要将来自亲本抗体(即非人抗体)的框架残基取代为人框架区(回复突变)。结构同源性建模可能有助于识别框架区中对抗体的结合特性而言重要的氨基酸残基。因此,人源化抗体可以包含非人CDR序列、任选地含有非人氨基酸序列的一个或多个氨基酸回

复突变的主要人框架区、以及完全人恒定区。任选地,可以应用另外的氨基酸修饰(其不一定是回复突变)来获得具有优选特征(如亲和力和生化特性)的人源化抗体。

[0100] 如本文所用,“源自”另一种蛋白质(例如,亲本蛋白质)的蛋白质意指蛋白质的一个或多个氨基酸序列与另一种蛋白质或亲本蛋白质中的一个或多个氨基酸序列相同或相似。例如,在源自另一种或亲本抗体、结合臂、抗原结合区或恒定区的抗体、结合臂、抗原结合区、恒定区等中,一个或多个氨基酸序列与另一种或亲本抗体、结合臂、抗原结合区或恒定区的氨基酸序列相同或相似。此类一个或多个氨基酸序列的例子包括但不限于VH和VL CDR和/或框架区、VH、VL、CL、铰链或CH区中的一个或多个或所有的氨基酸序列。例如,人源化抗体在本文中可以被描述为“源自”非人亲本抗体,意味着至少VL和VH CDR序列与所述非人亲本抗体的VH和VL CDR序列相同或相似。嵌合抗体在本文中可以被描述为“源自”非人亲本抗体,意味着通常VH和VL序列可以与非人亲本抗体的序列相同或相似。另一个例子是结合臂或抗原结合区,其在本文中可以被描述为“源自”特定亲本抗体,意味着所述结合臂或抗原结合区通常包含与所述亲本抗体的结合臂或抗原结合区相同或相似的VH和/或VL CDR、或VH和/或VL序列。然而,如本文别处所述,可以CDR、恒定区或者在抗体、结合臂、抗原结合区等中的其他地方进行氨基酸修饰(如突变)以引入所需的特征。当在源自第一或亲本蛋白质的一个或多个序列的上下文中使用时,“相似的”氨基酸序列优选地具有至少约50%的序列同一性,如至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%或至少约97%、98%或99%的序列同一性。

[0101] 非人抗体可以在许多不同的物种(如小鼠、兔、鸡、豚鼠、美洲驼和山羊)中生成。

[0102] 单克隆抗体可通过各种技术(包括常规的单克隆抗体方法,例如,Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975)的标准体细胞杂交技术)产生。可以采用用于产生单克隆抗体的其他技术,例如,B淋巴细胞的病毒转化或致癌性转化或使用抗体基因文库的噬菌体展示技术,并且此类方法是本领域的技术人员所熟知的。

[0103] 在此类非人物种中产生杂交瘤是非常成熟的程序。用于分离免疫动物/非人物种的脾细胞以用于融合的免疫接种方案和技术是本领域已知的。融合配偶体(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。

[0104] 在本文中使用时,除非与上下文相矛盾,否则术语“Fab臂”或“臂”是指一个重链-轻链对并且在本文中可与“半分子”互换使用。

[0105] 术语“包含抗原结合区的结合臂”意指包含抗原结合区的抗体分子或片段。因此,结合臂可以包含例如六个VH和VL CDR序列、VH和VL序列、Fab或Fab'片段或Fab臂。

[0106] 在本文中使用时,除非与上下文相矛盾,否则术语“Fc区”是指由免疫球蛋白重链的两个Fc序列组成的抗体区,其中所述Fc序列至少包含铰链区、CH2结构域和CH3结构域。在一个实施方案中,如本文所用的术语“Fc区”是指在从抗体的N末端到C末端的方向上至少包含铰链区、CH2区和CH3区的区域。抗体的Fc区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(如效应细胞)和补体系统的组分。

[0107] 在本公开文本的上下文中,关于抗体(包括多特异性抗体)所用的术语“以更小程度诱导Fc介导的效应子功能”意味着与人IgG1抗体相比,所述抗体以更小程度诱导Fc介导的效应子功能(这种功能特别地选自IgG Fc受体(FcγR),FcγR结合、C1q结合、ADCC或CDC的列表),所述人IgG1抗体包含(i)与所述抗体相同的CDR序列,特别地包含相同的第一

和第二抗原结合区,和(ii)含有人IgG1铰链、CH2和CH3区的两条重链。

[0108] Fc介导的效应子功能可以通过与Fc γ R的结合、与C1q的结合或Fc介导的经由Fc γ R的交联的诱导来测量。

[0109] 如本文所用的术语“铰链区”是指免疫球蛋白重链的铰链区。因此,例如,根据如Kabat(Kabat,E.A.等人,Sequences of proteins of immunological interest.第5版-US Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242,第662、680、689页(1991))中所示的EU编号,人IgG1抗体的铰链区对应于氨基酸216-230。然而,铰链区也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0110] 如本文所用的术语“CH1区”或“CH1结构域”是指免疫球蛋白重链的CH1区。因此,例如,根据如Kabat(同上)中所示的EU编号,人IgG1抗体的CH1区对应于氨基酸118-215。然而,CH1区也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0111] 如本文所用的术语“CH2区”或“CH2结构域”是指免疫球蛋白重链的CH2区。因此,例如,根据如Kabat(同上)中所示的EU编号,人IgG1抗体的CH2区对应于氨基酸231-340。然而,CH2区也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0112] 如本文所用的术语“CH3区”或“CH3结构域”是指免疫球蛋白重链的CH3区。因此,例如,根据如Kabat(同上)中所示的EU编号,人IgG1抗体的CH3区对应于氨基酸341-447。然而,CH3区也可以是如本文所述的任何其他亚型。

[0113] 在本公开文本的上下文中,术语“单价抗体”意味着抗体分子能够结合单一抗原分子,并且因此不能实现抗原交联。

[0114] “CD137抗体”或“抗CD137抗体”是如上所述的抗体,其与抗原CD137特异性结合。

[0115] “CD137xPD-L1抗体”或“抗CD137xPD-L1抗体”是双特异性抗体,其包含两个不同的抗原结合区,其中一个与抗原CD137特异性结合并且其中一个与抗原PD-L1特异性结合。

[0116] 如本文所用的术语“生物类似物”(例如,批准的参考产品/生物药物的生物类似物)是指基于来自以下研究的数据与参考产品类似的生物产品:(a) 分析研究,其证明尽管临床非活性组分有微小差异,但生物产品与参考产品高度类似;(b) 动物研究(包括毒性的评估);和/或(c) 一项或多项临床研究(包括免疫原性和药代动力学或药效学的评估),其足以证明在一个或多个适当的使用条件下的安全性、纯度和效力(例如,就产品的安全性、纯度和效力而言,生物产品与参考产品之间没有临床上有意义的差异),所述使用条件是参考产品被批准使用的条件并且旨在使用的条件以及寻求批准的条件。在一些实施方案中,生物类似物生物产品和参考产品针对拟议标签中规定、推荐或建议的一个或多个使用条件使用相同的一个或多个作用机制,但仅限于对于参考产品已知的一个或多个作用机制。在一些实施方案中,在针对生物产品的拟议标签中规定、推荐或建议的一个或多个使用条件已经被预先批准用于参考产品。在一些实施方案中,生物产品的施用途径、剂型和/或强度与参考产品相同。生物类似物可以是例如具有与市售抗体相同的初级氨基酸序列的目前已知抗体,但可以在不同的细胞类型中制备或通过不同的生产、纯化或配制方法来制备。

[0117] 如本文所用,在抗体与预定抗原或表位的结合的上下文中,术语“结合”或“能够结合”通常是以如下亲和力的结合,所述亲和力对应于如下测定的约 10^{-7} M或更少(如约 10^{-8} M或更少,如约 10^{-9} M或更少、约 10^{-10} M或更少或约 10^{-11} M或甚至更少)的 K_D :使用抗原作为配体以及抗体作为分析物,使用生物层干涉测量法(BLI)测定或者例如在BIAcore 3000仪器中

使用表面等离子体共振 (SPR) 技术测定。抗体以如下亲和力与预定抗原结合,所述亲和力对应的 K_D 至少十倍低于,如至少100倍低于,例如至少1,000倍低于,如至少10,000倍低于,例如至少100,000倍低于其与除预定抗原或密切相关抗原之外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)结合的 K_D 。亲和力更高的量取决于抗体的 K_D ,使得当抗体的 K_D 非常低时(即,抗体是高度特异性的),那么对抗原的亲和力低于对非特异性抗原的亲和力的程度可以为至少10,000倍。

[0118] 如本文所用的术语“ k_d ”(sec⁻¹)是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值也被称为 k_{off} 值。

[0119] 如本文所用的术语“ K_D ”(M)是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0120] 如果两个抗体与相同的抗原并且与相同的表位结合,则所述两个抗体具有“相同的特异性”。待测试的抗体是否与特定的抗原结合抗体识别相同的表位(即,抗体与相同的表位结合),可以通过本领域技术人员熟知的不同方法来测试。

[0121] 抗体之间的竞争可以通过交叉阻断测定来检测。例如,竞争性ELISA测定可以用作交叉阻断测定。例如,靶抗原可以包被在微量滴定板的孔上,并且可以添加抗原结合抗体和候选竞争测试抗体。与孔中的抗原结合的抗原结合抗体的量与候选竞争测试抗体(其与所述抗原结合抗体竞争结合相同表位)的结合能力间接相关。具体地,候选竞争测试抗体对相同表位的亲和力越大,与抗原包被孔结合的抗原结合抗体的量就越小。可以通过用可检测或可测量的标记物质标记抗体来测量与孔结合的抗原结合抗体的量。

[0122] 与另一种抗体竞争结合抗原的抗体(例如,如本文所述的包含重链可变区和轻链可变区的抗体)或对另一种抗体的抗原具有特异性的抗体(例如,如本文所述的包含重链可变区和轻链可变区的抗体)可以是如本文所述的包含所述重链可变区和/或所述轻链可变区的变体(例如,如本文所述的在CDR中的修饰和/或一定程度的同一性)的抗体。

[0123] 如本文所用的“分离的多特异性抗体”旨在指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的多特异性抗体(例如,与CD137和PD-L1特异性结合的分离的双特异性抗体基本上不含与CD137或PD-L1特异性结合的单特异性抗体)。

[0124] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指具有单一分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物对特定表位展示出单一结合特异性和亲和力。

[0125] 在本文中使用时,术语“第一与第二CH3区之间的异二聚体相互作用”是指在第一CH3/第二CH3异二聚体抗体中第一CH3区与第二CH3区之间的相互作用。

[0126] 在本文中使用时,术语“第一和第二CH3区的同二聚体相互作用”是指在第一CH3/第一CH3同二聚体抗体中第一CH3区与另一个第一CH3区之间的相互作用以及在第二CH3/第二CH3同二聚体抗体中第二CH3区与另一个第二CH3区之间的相互作用。

[0127] 在本文中使用时,术语“同二聚体抗体”是指包含两个第一Fab臂或半分子的抗体,其中所述Fab臂或半分子的氨基酸序列是相同的。

[0128] 在本文中使用时,术语“异二聚体抗体”是指包含第一和第二Fab臂或第一和第二半分子的抗体,其中所述第一和第二Fab臂或第一和第二半分子的氨基酸序列是不同的。特别地,所述第一和第二Fab臂/第一和第二半分子的CH3区或抗原结合区是不同的或者所述CH3区和所述抗原结合区是不同的。

[0129] 术语“还原条件”或“还原环境”是指其中底物(如抗体铰链区的半胱氨酸残基)比

起被氧化更有可能被还原的条件或环境。

[0130] 本公开文本还描述了多特异性抗体,如双特异性抗体,其包含例子的双特异性抗体的VL区、VH区或一个或多个CDR的功能变体。在双特异性抗体的上下文中使用的VL、VH或CDR的功能变体仍然允许双特异性抗体的每个抗原结合区保持亲本双特异性抗体的亲和力和/或特异性/选择性的至少相当大比例(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更大),并且在一些情况下,这种双特异性抗体可以与比亲本双特异性抗体更大的亲和力、选择性和/或特异性相关。

[0131] 此类功能变体通常与亲本双特异性抗体保持显著的序列同一性。两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置数的函数(即,同源性% = 相同位置数/总位置数 $\times 100$),其中考虑了空位数以及每个空位的长度,需要引入空位以实现两个序列的最佳比对。可以例如使用已并入ALIGN程序(2.0版)中的E. Meyers和W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988)的算法,使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4来确定两个核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比。此外,可以使用Needleman和Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970) 算法来确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比。

[0132] 在本公开文本的上下文中,除非另有指示,否则使用以下符号来描述突变:i) 给定位置的氨基酸的取代被写作例如K409R,其意指在蛋白质的位置409的赖氨酸被精氨酸取代;以及ii) 对于特定的变体,使用特定的三字母代码或一字母代码,包括代码Xaa和X用于指示任何氨基酸残基。因此,在位置409的赖氨酸被精氨酸取代命名为:K409R,在位置409的赖氨酸被任何氨基酸残基取代命名为K409X。在位置409的赖氨酸缺失的情况下,通过K409*指示。

[0133] 示例性变体包括主要通过保守取代而与亲本序列的VH和/或VL和/或CDR不同的变体;例如,变体中的12个(如11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个)取代是保守的氨基酸残基替代。

[0134] 在本公开文本的上下文中,保守取代可以通过如表2和表3中定义的氨基酸类别中的取代来定义。

[0135] 如本文所用的术语“CD137”是指CD137 (4-1BB),也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员9 (TNFRSF9),其是配体TNFSF9/4-1BBL的受体。CD137 (4-1BB) 被认为参与T细胞激活。CD137的其他同义词包括但不限于4-1BB配体受体、CDw137、T细胞抗原4-1BB同源物和T细胞抗原ILA。在一个实施方案中,CD137 (4-1BB) 是人CD137 (4-1BB),具有UniProt登录号Q07011。人CD137的序列也示出于SEQ ID NO:37中。SEQ ID NO:37的氨基酸1-23对应于人CD137的信号肽;而SEQ ID NO:37的氨基酸24-186对应于人CD137的胞外结构域;并且蛋白质的剩余部分,即SEQ ID NO:37的氨基酸187-213和214-255分别是跨膜结构域和胞质结构域。

[0136] “程序性死亡蛋白1 (PD-1)”受体是属于CD28家族的免疫抑制性受体。PD-1 (也称为CD279) 主要在体内先前激活的T细胞上表达,并且与两种配体PD-L1 (也称为B7-H1或CD274) 和PD-L2 (也称为B7-DC或CD273) 结合。如本文所用的术语“PD-1”包括人PD-1 (hPD-1), hPD-1的变体、亚型和物种同源物,以及与hPD-1具有至少一个共同表位的类似物。人PD-1的序列也示出于SEQ ID NO:39中。“程序性死亡蛋白配体1 (PD-L1)”是PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体之一(另一种是PD-L2),其在与PD-1结合后下调T细胞激活和细胞因子分泌。

[0137] 如本文所用的术语“PD-L1”包括人PD-L1 (hPD-L1), hPD-L1的变体、亚型和物种同源物,如猕猴(食蟹猴)、非洲象、野猪和小鼠PD-L1 (参见例如,Genbank登录号分别为NP_054862.1、XP_005581836、XP_003413533、XP_005665023和NP_068693),以及与hPD-L1具有至少一个共同表位的类似物。人PD-L1的序列也示出于SEQ ID NO:40中,其中氨基酸1-18被预测为信号肽。如本文所用的术语“PD-L2”包括人PD-L2 (hPD-L2), hPD-L2的变体、亚型和物种同源物,以及与hPD-L2具有至少一个共同表位的类似物。PD-1的配体 (PD-L1和PD-L2) 在抗原呈递细胞(如树突细胞或巨噬细胞)和其他免疫细胞的表面上表达。PD-1与PD-L1或PD-L2的结合导致T细胞激活的下调。表达PD-L1和/或PD-L2的癌细胞能够关闭表达PD-1的T细胞,这导致对抗癌免疫应答的抑制。PD-1与其配体之间的相互作用导致肿瘤浸润淋巴细胞的减少、T细胞受体介导的增殖的减少以及癌性细胞的免疫逃逸。免疫抑制可以通过抑制PD-1与PD-L1的局部相互作用逆转,并且在PD-1与PD-L2的相互作用也被阻断时效应是加性的。

[0138] 如本文所用的术语“功能障碍”是指在对抗原刺激的免疫反应性降低的状态下的免疫细胞。功能障碍包括对抗原识别无反应以及将抗原识别转化为下游T细胞效应子功能(如增殖、细胞因子(例如,IL-2)产生和/或靶细胞杀伤)的能力受损。

[0139] 如本文所用的术语“无能性”是指由于通过T细胞受体 (TCR) 递送的信号不完整或不充足而导致的对抗原刺激无反应的状态。在没有共刺激的情况下用抗原刺激后也可以导致T细胞无能性,从而导致即使在共刺激的情境下细胞随后也难以被抗原激活。无反应状态通常可以被IL-2的存在推翻。无能性T细胞不经历克隆性扩增和/或不获得效应子功能。

[0140] 如本文所用的术语“耗竭”是指免疫细胞耗竭,如作为一种在许多慢性感染和癌症期间发生的持续的TCR信号传导引起的T细胞功能障碍的状态的T细胞耗竭。它与无能性的区别在于,它不是通过不完整或有缺陷的信号传导引起的,而是由持续的信号传导引起的。耗竭通过效应子功能差、抑制性受体的持续表达和不同于功能性效应或记忆T细胞的转录状态来定义。耗竭阻止了对疾病(例如,感染和肿瘤)的最佳控制。耗竭可以由外在负调节途径(例如,免疫调节细胞因子)以及细胞内在负调节途径(抑制性免疫检查点途径,如本文所述的)两者引起。

[0141] “增强T细胞功能”意指诱导、导致或刺激T细胞以具有持续或扩大的生物功能,或者更新或重新激活耗竭或未激活的T细胞。增强T细胞功能的例子包括相对于干预之前的此类水平,从CD8⁺ T细胞分泌 γ 干扰素增加、增殖增加、抗原应答性(例如,肿瘤清除)增加。在一个实施方案中,增强的水平为至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%或更多。测量该增强的方式是本领域普通技术人员已知的。

[0142] 如本文所用的术语“抑制性核酸”或“抑制性核酸分子”是指完全或部分减少、抑制、干扰或负调节一种或多种PD-1蛋白的核酸分子(例如,DNA或RNA)。抑制性核酸分子包括但不限于寡核苷酸、siRNA、shRNA、反义DNA或RNA分子以及适配体(例如,DNA或RNA适配体)。

[0143] 如本文所用的术语“寡核苷酸”是指能够减少蛋白质表达(特别是PD-1蛋白(如本文所述的PD-1蛋白)的表达)的核酸分子。寡核苷酸是短的DNA或RNA分子,通常包含2至50个核苷酸。寡核苷酸可以是单链的或双链的。PD-1抑制剂寡核苷酸可以是反义寡核苷酸。

[0144] 反义寡核苷酸是与给定序列互补(特别是与PD-1蛋白的核酸序列(或其片段)的序

列互补)的单链DNA或RNA分子。反义RNA通常用于通过与mRNA(例如,编码PD-1蛋白的mRNA)结合来防止所述mRNA的蛋白质翻译。反义DNA通常用于靶向特定的、互补的(编码或非编码)RNA。如果发生结合,这种DNA/RNA杂交体可以被酶RNA酶H降解。此外,吗啉代反义寡核苷酸可以用于脊椎动物的基因敲低。例如,Kryczek等人,2006(J Exp Med,203:871-81)设计了特异性阻断巨噬细胞中的B7-H4表达的B7-H4特异性吗啉代反义寡核苷酸,导致在具有肿瘤相关抗原(TAA)特异性T细胞的小鼠中T细胞增殖增加并且肿瘤体积减小。

[0145] 术语“siRNA”或“小干扰RNA”或“小抑制性RNA”在本文中可互换使用并且是指具有20-25个碱基对的典型长度的双链RNA分子,其干扰具有互补核苷酸序列的特定基因(如编码PD-1蛋白的基因)的表达。在一个实施方案中,siRNA干扰mRNA,因而阻断翻译(例如,PD-1蛋白的翻译)。外源siRNA的转染可以用于基因敲低,然而,作用可能只是暂时的,尤其是在快速分裂的细胞中。可以例如通过RNA修饰或通过使用表达载体来实现稳定的转染。用于用siRNA稳定转染细胞的可用的修饰和载体是本领域已知的。也可以对siRNA序列进行修饰以在两条链之间引入短环,产生“小发夹RNA”或“shRNA”。shRNA可以由Dicer加工成功能性siRNA。shRNA的降解和周转速度相对较低。因此,PD-1抑制剂可以是shRNA。

[0146] 如本文所用的术语“适配体”是指能够与靶分子(如多肽)结合的长度通常为25-70个核苷酸的单链核酸分子(如DNA或RNA)。在一个实施方案中,适配体与PD-1蛋白(如本文所述的PD-1蛋白)结合。例如,根据本公开文本的适配体可以与PD-1蛋白或多肽特异性结合,或与调节PD-1蛋白或多肽的表达的信号传导途径中的分子特异性结合。适配体的生成和治疗用途是本领域熟知的(参见例如,US 5,475,096)。

[0147] 术语“小分子抑制剂”或“小分子”在本文中可互换使用并且是指如上所述完全或部分地减少、抑制、干扰或负调节一种或多种PD-1蛋白的低分子量(通常至多1000道尔顿)有机化合物。此类小分子抑制剂通常是通过有机化学合成的,但也可以分离自天然来源(如植物、真菌和微生物)中。小分子量允许小分子抑制剂迅速扩散跨越细胞膜。例如,本领域已知的各种A2AR拮抗剂是分子量低于500道尔顿的有机化合物。

[0148] 术语“基于细胞的疗法”是指出于治疗疾病或障碍(例如,癌症疾病)的目的将表达PD-1抑制剂的细胞(例如,T淋巴细胞、树突细胞或干细胞)移植到受试者中。

[0149] 如本文所用的术语“溶瘤病毒”是指这样的病毒,其能够在体外或体内选择性地在癌细胞或过度增殖的细胞中复制并且减缓癌细胞或过度增殖的细胞的生长或诱导其死亡,而对正常细胞没有影响或影响极小。用于递送PD-1抑制剂的溶瘤病毒包含可编码PD-1抑制剂的表达盒,所述PD-1抑制剂是抑制性核酸分子(如siRNA、shRNA、寡核苷酸、反义DNA或RNA)、适配体、抗体或其片段或可溶性PD-1蛋白或融合物。溶瘤病毒优选是有复制能力的并且表达盒在病毒启动子(例如,合成的早期/晚期痘病毒启动子)的控制下。示例性溶瘤病毒包括水疱性口炎病毒(VSV)、弹状病毒(例如,小核糖核酸病毒,如塞内卡谷病毒(Seneca Valley virus);SVV-001)、柯萨奇病毒、细小病毒、新城疫病毒(NDV)、单纯疱疹病毒(HSV; OncoVEX GMCSF)、逆转录病毒(例如,流感病毒)、麻疹病毒、呼肠孤病毒、Sinbis病毒、痘苗病毒(如WO 2017/209053中例示描述的(包括Copenhagen毒株、Western Reserve毒株、Wyeth毒株))以及腺病毒(例如,Delta-24、Delta-24-RGD、ICOVIR-5、ICOVIR-7、Onyx-015、ColoAd1、H101、AD5/3-D24-GMCSF)。包含可溶形式的PD-1抑制剂的重组溶瘤病毒的产生及其使用方法在WO 2018/022831(通过引用以其整体并入本文)中披露。溶瘤病毒可以用作减

毒病毒。

[0150] 本文中“治疗周期”被定义为在单独剂量的结合剂的效果加上由于结合剂的药理学所致效果之内的时间段,或者换言之,在受试者的身体基本上清除所施用的结合剂后的时间段。在小的时间窗口内(例如在2-24个小时(如2-12小时)内)或在同一天的多个小剂量可以等于更大的单剂量。

[0151] 在本发明上下文中,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”或“治疗性干预”涉及出于对抗诸如疾病或障碍的病症的目的而对受试者进行的管理和护理。所述术语旨在包括针对受试者所患有的给定病症的全方位治疗,如施用治疗有效的化合物以减轻症状或并发症,延缓疾病、障碍或病症的进展,减轻或缓解症状和并发症,和/或治愈或消除疾病、障碍或病症以及预防病症,其中预防应理解为出于对抗疾病、病症或障碍的目的而对个体进行的管理和护理并且包括施用活性化合物以预防症状或并发症的发作。在一个实施方案中,“治疗”是指以减轻、改善、阻止或根除(治愈)症状或疾病状态为目的施用有效量的本公开文本的治疗活性结合剂(如治疗活性抗体)。

[0152] 对治疗的反应以及对用本公开文本的结合剂治疗有耐药性、无反应和/或在用本公开文本的结合剂治疗后复发可以根据实体瘤疗效评价标准1.1版(RECIST标准v1.1)来确定。RECIST标准如下表所示(LD:最长尺寸)。

[0153] 表4:反应的定义(RECIST标准v1.1)

[0154]		类别	标准
	基于靶病变	完全反应(CR)	所有靶病变消失。任何病理性淋巴结必须在短轴上减小至 < 10 mm。
		部分反应(PR)	以基线LD总和作为参考,使靶病变的LD总和减少 ≥ 30%。
		疾病稳定(SD)	以自治疗开始以来最小的LD总和作为参考,既没有足够缩小以符合PR,也没有足够增加以符合PD。
		疾病进展(PD)	以自治疗开始或出现一个或多个新病变以来记录的最小LD总和为参考,靶病变的LD总和增加 ≥ 20%。
	基于非靶病变	CR	所有非靶病变消失,并且肿瘤标记物水平正常化。所有淋巴结的大小必须是非病理性的(短轴 < 10 mm)。
		SD	一个或多个非靶病变的持续存在或/和肿瘤标记物水平高于正常限值的维持。
		PD	一个或多个新病变的出现和/或现有非靶病变的明确进展。

[0155] “最佳总体反应”是从治疗开始直到疾病进展/复发记录的最佳反应(自治疗开始以来记录的最小测量结果将被用作PD的参考)。具有CR或PR的受试者被认为是客观反应。具有CR、PR或SD的受试者被认为处于疾病控制下。具有NE的受试者被计为无反应者。最佳总体反应是从治疗开始直到疾病进展/复发记录的最佳反应(自治疗开始以来记录的最小测量结果将被用作PD的参考)。具有CR、PR或SD的受试者被认为处于疾病控制下。具有NE的受试者被计为无反应者。

[0156] “反应持续时间(DOR)”仅适用于确认最佳总体反应为CR或PR的受试者,并且被定义为从第一次记录客观肿瘤反应(CR或PR)到第一次PD或由于潜在癌症而死亡的日期的时间。

[0157] “无进展存活期(PFS)”被定义为从第1周期的第1天到第一次记录的进展或因任何原因而死亡的天数。

[0158] “总存活期(OS)”被定义为从第1周期的第1天到因任何原因而死亡的天数。如果不

知道受试者是否已经死亡,那么将在已知受试者活着的最晚日期(在截止日期或截止日期之前)审查OS。

[0159] 在本公开文本的上下文中,术语“治疗方案”是指旨在改善和维持健康的结构化治疗计划。

[0160] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指以所需的剂量并且在所需的时间段内有效实现期望的治疗结果的量。结合剂(如抗体,像多特异性抗体或单克隆抗体)的治疗有效量可以根据诸如以下的因素而变:疾病状态、个体的年龄、性别和体重以及结合剂在个体中引起所需反应的能力。治疗有效量也是这样的量,其中治疗上有益的效果超过结合剂或其片段的任何毒性或有害影响。在初始剂量在患者中引起的反应不足的情况下,可以使用更高剂量(或通过不同的更局部的施用途径实现的有效更高的剂量)。在剂量在患者中出现不希望的副作用的情况下,可以使用更低的剂量(或通过不同的更局部的施用途径实现的有效更低的剂量)。

[0161] 如本文所用,术语“癌症”包括特征在于异常调节的细胞生长、增殖、分化、粘附和/或迁移的疾病。“癌细胞”意指通过快速、不受控制的细胞增殖而生长并且在启动新生长的刺激停止后继续生长的异常细胞。

[0162] 根据本公开文本的术语“癌症”还包括癌症转移瘤。“转移”意指癌细胞从其原始部位向身体的另一部分的扩散。转移的形成是一种非常复杂的过程,并且取决于恶性细胞从原发肿瘤脱离、侵袭细胞外基质、渗透内皮基底膜进入体腔和血管、以及然后在经血液运输后浸润目标器官。最后,新肿瘤(即,继发性肿瘤或转移性肿瘤)在靶位点的生长取决于血管生成。肿瘤转移经常即使在原发肿瘤去除后也发生,因为肿瘤细胞或组分可能保留并且发展转移潜力。在一个实施方案中,根据本公开文本的术语“转移”涉及“远处转移”,其涉及远离原发肿瘤和区域淋巴结系统的转移。

[0163] 如本文所用的诸如“减少”、“抑制”、“干扰”和“负调节”的术语意指引起水平总体降低例如约5%或更大、约10%或更大、约15%或更大、约20%或更大、约25%或更大、约30%或更大、约40%或更大、约50%或更大、或约75%或更大。术语“抑制”或类似短语包括完全或基本上完全抑制,即减少到零或基本上减少到零。

[0164] 在一个实施方案中,诸如“增加”或“增强”的术语涉及至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约80%或至少约100%的增加或增强。

[0165] 如本文所用的“生理pH”是指pH为7.5或约7.5。

[0166] 如在本公开文本中所用的,“按重量计%”是指重量百分比,它是测量以克(g)为单位的物质的量的浓度单位,表示为以克(g)为单位的总组合物的总重量的百分比。

[0167] 术语“TPS”或“肿瘤比例得分”是指在细胞膜上表达PD-L1的肿瘤细胞的百分比。TPS通常包括以任何强度(弱、中或强)表达PD-L1的肿瘤细胞的百分比,其可以使用W0 2014/100079中描述的利用诊断性抗人PD-L1mAb(例如,抗体20C3和抗体22C3)的免疫组织化学测定来测定。如果存在膜染色,则认为细胞(包括具有部分膜染色的细胞)表达PD-L1。

[0168] 术语“冷冻”涉及液体的凝固,通常伴随着热量的去除。

[0169] 术语“冻干(lyophilizing)”或“冻干(lyophilization)”是指通过以下进行的物质的冷冻干燥:将物质冷冻,然后降低周围压力(例如,低于15Pa,如低于10Pa、低于5Pa或1Pa或更低)以允许物质中的冷冻介质直接从固相升华至气相。因此,术语“冻干”和“冷冻干

燥”在本文中可互换使用。

[0170] 在本公开文本的上下文中,术语“重组的”意指“通过基因工程化制备的”。在一个实施方案中,本公开文本的上下文中的“重组对象”不是天然存在的。

[0171] 如本文所用的术语“天然存在的”是指对象可以在自然界中发现的事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中并且可以分离自天然来源并且尚未经实验室的人员有意修饰的肽或核酸是天然存在的。术语“在自然界中发现”意指“在自然界中存在”并且包括已知对象,以及尚未被发现和/或分离自自然界但将来可能被发现和/或分离自天然来源的对象

[0172] 根据本公开文本,术语“肽”包括寡肽和多肽并且是指包含约两个或更多个、约3个或更多个、约4个或更多个、约6个或更多个、约8个或更多个、约10个或更多个、约13个或更多个、约16个或更多个、约20个或更多个、以及多达约50个、约100个或约150个经由肽键相互连接的连续氨基酸的物质。术语“蛋白质”是指大肽,特别是具有至少约151个氨基酸的肽,但术语“肽”和“蛋白质”在本文中通常用作同义词。

[0173] 当以治疗有效量向受试者提供时,“治疗性蛋白质”对受试者的病症或疾病状态具有积极或有利的效果。在一个实施方案中,治疗性蛋白质具有治愈特性或缓解特性,并且可以被施用以改善、缓解、减轻、逆转、延迟疾病或障碍的一种或多种症状的发作或减小其严重程度。治疗性蛋白质可以具有预防特性并且可以用于延迟疾病的发作或减小这种疾病或病理状况的严重程度。术语“治疗性蛋白质”包括整个蛋白质或肽并且还可以指其治疗活性片段。它还可以包括蛋白质的治疗活性变体。治疗活性蛋白质的例子包括但不限于用于疫苗接种的抗原和免疫刺激剂(如细胞因子)。

[0174] 术语“部分(portion)”是指小部分(fraction)。关于特定结构(如氨基酸序列或蛋白质),术语其“部分(portion)”可以表示所述结构的连续或不连续部分(fraction)。

[0175] 术语“部分(part)”和“片段”在本文中可互换使用并且是指连续的元件。例如,诸如氨基酸序列或蛋白质的结构的一部分是指所述结构的连续元件。当在组合物的上下文中使用时,术语“部分(part)”意指组合物的一部分(portion)。例如,组合物的一部分可以是所述组合物的0.1%至99.9%(如0.1%、0.5%、1%、5%、10%、50%、90%或99%)的任何部分。

[0176] 关于氨基酸序列(肽或蛋白质)的“片段”涉及氨基酸序列的一部分,即,表示在N末端和/或C末端处缩短的氨基酸序列的序列。在C末端处缩短的片段(N末端片段)是可获得的,例如通过翻译缺少开放阅读框的3'端的截短的开放阅读框获得。在N末端处缩短的片段(C末端片段)是可获得的,例如通过翻译缺少开放阅读框的5'端的截短的开放阅读框获得,只要截短的开放阅读框包含用于启动翻译的起始密码子即可。氨基酸序列的片段包含来自氨基酸序列的例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%的氨基酸残基。氨基酸序列的片段优选包含来自氨基酸序列的至少6个,特别地至少8个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个、至少50个或至少100个连续氨基酸。

[0177] 根据本公开文本,肽或蛋白质的一部分或片段优选具有所述部分或片段所来源的肽或蛋白质的至少一种功能特性。此类功能特性包括药理活性、与其他肽或蛋白质的相互作用、酶活性、与抗体的相互作用以及核酸的选择性结合。例如,肽或蛋白质的药理活性片段具有所述片段所来源的肽或蛋白质的至少一种药理活性。肽或蛋白质的一部分或片段优选包含肽或蛋白质的至少6个,特别地至少8个、至少10个、至少12个、至少15个、至少20个、

至少30个或至少50个连续氨基酸的序列。肽或蛋白质的一部分或片段优选包含肽或蛋白质的至多8个,特别地至多10个、至多12个、至多15个、至多20个、至多30个或至多55个连续氨基酸的序列。

[0178] 本文的“变体”意指由于至少一个氨基酸修饰而不同于亲本氨基酸序列的氨基酸序列。亲本氨基酸序列可以是天然存在的或野生型(WT)氨基酸序列,或者可以是野生型氨基酸序列的修饰形式。优选地,与亲本氨基酸序列相比,变体氨基酸序列具有至少一个氨基酸修饰(例如,与亲本相比,1至约20个氨基酸修饰,并且优选1至约10个或1至约5个氨基酸修饰)。

[0179] 本文中的“野生型”或“WT”或“天然”意指在自然界中发现的氨基酸序列,包括等位基因变异。野生型氨基酸序列、肽或蛋白质具有未经有意修饰的氨基酸序列。

[0180] 优选地,给定的氨基酸序列与作为所述给定的氨基酸序列的变体的氨基酸序列之间的相似性、优选同一性的程度将是至少约60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。优选地给出对于如下氨基酸区域的相似性或同一性程度,所述氨基酸区域是参考氨基酸序列的整体长度的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。例如,如果参考氨基酸序列由200个氨基酸组成,优选地给出对于至少约20个、至少约40个、至少约60个、至少约80个、至少约100个、至少约120个、至少约140个、至少约160个、至少约180个或约200个氨基酸(在一些实施方案中为连续氨基酸)的相似性或同一性程度。在一些实施方案中,给出对于参考氨基酸序列的整个长度的相似性或同一性程度。用于确定序列相似性、优选序列同一性的比对可以如下进行:使用本领域已知的工具,优选地使用最佳序列比对,例如使用Align,使用标准设置,优选EMBOSS::needle、Matrix:Blosum62、Gap Open 10.0、Gap Extend 0.5。

[0181] “序列相似性”指示相同或表示保守氨基酸取代的氨基酸的百分比。两个氨基酸序列之间的“序列同一性”指示序列之间相同的氨基酸的百分比。两个核酸序列之间的“序列同一性”指示序列之间相同的核苷酸的百分比。

[0182] 术语“相同%”和“同一性%”或类似术语旨在特别地指在待比较的序列之间的最佳比对中相同的核苷酸或氨基酸的百分比。所述百分比是纯粹统计学的,并且两个序列之间的差异可以但不一定随机分布在待比较的序列的整个长度上。两个序列的比较通常通过以下方式进行:在最佳比对之后,关于区段或“比较窗口”比较所述序列,以识别对应序列的局部区域。用于比较的最佳比对可以手动或借助于以下进行:Smith和Waterman,1981,Ads App.Math.2,482的局部同源性算法、Neddleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48,443的局部同源性算法、Pearson和Lipman,1988,Proc.Natl Acad.Sci.USA 88,2444的相似性搜索算法或使用所述算法的计算机程序(在威斯康星州麦迪逊市科学大道575号遗传学计算机组的Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N和TFASTA)。在一些实施方案中,两个序列的同一性百分比使用BLASTN或BLASTP算法来确定,所述算法如可在美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站(例如,在blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)获得。在一些实施方案中,NCBI网站上用于BLASTN算法的算法参数包括:(i) 设置为10的预期阈值;(ii) 设置为28的字长;(iii) 在设置为0的查询范围内的最大匹配;(iv) 设置为1、-2的匹配/不匹配得分;(v) 设置为线性的空位成本;和(vi) 用于所使用的低复杂性区域的过

滤器。在一些实施方案中,NCBI网站上用于BLASTP算法的算法参数包括:(i) 设置为10的预期阈值;(ii) 设置为3的字长;(iii) 在设置为0的查询范围内的最大匹配;(iv) 设置为BLOSUM62的矩阵;(v) 设置为Existence:11Extension:1的空位成本;和(vi) 条件组合得分矩阵调整。

[0183] 百分比同一性通过以下方式获得:确定待比较的序列对应的相同位置的数目,用此数目除以比较的位置的数目(例如,参考序列中的位置的数目),并且然后将此结果乘以100。

[0184] 在一些实施方案中,给出对于如下区域的相似性或同一性程度,所述区域是参考序列的整个长度的至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。例如,如果参考氨基酸序列由200个氨基酸残基组成,则给出对于至少约100个、至少约120个、至少约140个、至少约160个、至少约180个或约200个氨基酸残基(在一些实施方案中为连续氨基酸残基)的同一性程度。在一些实施方案中,给出对于参考序列的整个长度的相似性或同一性程度。

[0185] 同源氨基酸序列根据本公开文本展现出氨基酸残基的至少40%,特别地至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%,以及优选至少95%、至少98%或至少99%同一性。

[0186] 技术人员可以容易地例如通过重组DNA操纵来制备本文所述的氨基酸序列变体。例如,Sambrook等人(1989)中详细描述了用于制备具有取代、添加、插入或缺失的肽或蛋白质的DNA序列的操纵。此外,本文描述的肽和氨基酸变体可以借助于已知的肽合成技术(例如像,通过固相合成和类似方法)容易地制备。

[0187] 在一个实施方案中,氨基酸序列(肽或蛋白质)的片段或变体优选为“功能片段”或“功能变体”。术语氨基酸序列的“功能片段”或“功能变体”涉及任何这样的片段或变体,所述片段或变体展现出与所述片段或变体所来源的那些氨基酸序列相同或相似的一种或多种功能特性。关于抗原或抗原序列,一个特定的功能是由所述片段或变体所来源的氨基酸序列展示的一种或多种免疫原性活性。如本文所用的术语“功能片段”或“功能变体”特别是指包含如下氨基酸序列的变体分子或序列,所述氨基酸序列与亲本分子或序列的氨基酸序列相比有一个或多个氨基酸改变,并且仍然能够实现亲本分子或序列的一个或多个功能(例如,诱导免疫应答)。在一个实施方案中,亲本分子或序列的氨基酸序列中的修饰不会显著影响或改变分子或序列的特征。在不同的实施方案中,功能片段或功能变体的功能可以降低但仍显著存在,例如,功能变体的免疫原性可以是亲本分子或序列的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。然而,在其他实施方案中,与亲本分子或序列相比,功能片段或功能变体的免疫原性可以增强。

[0188] “源自”指定的氨基酸序列(肽、蛋白质或多肽)的氨基酸序列(肽、蛋白质或多肽)是指起源为第一个氨基酸序列。优选地,源自特定氨基酸序列的氨基酸序列具有与该特定序列或其片段相同、基本上相同或同源的氨基酸序列。源自特定氨基酸序列的氨基酸序列可以是该特定序列或其片段的变体。例如,本领域的普通技术人员将理解,可以改变适合于本文使用的抗原,使得它们在序列上与它们所来源的天然存在的或天然的序列不同,同时保留天然序列的期望活性。

[0189] “分离的”意指从其天然状态改变或移出。例如,天然存在于活动物体内的核酸或

肽不是“分离的”但是与其天然状态的共存物质部分或完全分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以基本上纯化的形式存在,或者可以存在于非天然环境(例如宿主细胞)中。在优选的实施方案中,本公开文本中使用的结合剂呈基本上纯化的形式。

[0190] 术语“基因修饰”或简称“修饰”包括用核酸转染细胞。术语“转染”涉及将核酸、特别是RNA引入细胞中。为了本公开文本的目的,术语“转染”还包括将核酸引入细胞中或由这种细胞摄取核酸,其中细胞可以存在于受试者(例如,患者)中。因此,根据本公开文本,本文所述的用于核酸转染的细胞可以存在于体外或体内,例如,细胞可以形成患者的器官、组织和/或有机体的一部分。根据本公开文本,转染可以是瞬时的或稳定的。对于转染的一些应用,只要瞬时表达转染的遗传物质就足够了。RNA可以被转染到细胞中,以瞬时表达其编码的蛋白质。由于在转染过程中引入的核酸通常不会整合到核基因组中,因此外来核酸将通过有丝分裂被稀释或降解。细胞允许核酸的游离型扩增大大降低了稀释率。如果希望转染的核酸实际保留在细胞及其子细胞的基因组中,则必须进行稳定的转染。这种稳定的转染可以通过使用基于病毒的系统或基于转座子的系统进行转染来实现。通常,编码抗原的核酸被瞬时转染到细胞中。RNA可以被转染到细胞中,以瞬时表达其编码的蛋白质。

[0191] 根据本公开文本,肽或蛋白质的类似物是所述肽或蛋白质的修饰形式,其源自所述肽或蛋白质并且具有所述肽或蛋白质的至少一种功能特性。例如,肽或蛋白质的药理活性类似物具有类似物所来源的肽或蛋白质的至少一种药理活性。此类修饰包括任何化学修饰并且包括与蛋白质或肽(如碳水化合物、脂质和/或蛋白质或肽)相关的任何分子的单个或多个取代、缺失和/或添加。在一个实施方案中,蛋白质或肽的“类似物”包括由糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、棕榈酰化、豆蔻酰化、异戊二烯化、脂化、烷基化、衍生化、引入保护/封闭基团、蛋白水解切割或与抗体或另一种细胞配体结合而引起的那些修饰形式。术语“类似物”也延伸到所述蛋白质和肽的所有功能化学等效物。

[0192] 如本文所用的“激活”或“刺激”是指免疫效应细胞(如T细胞)已被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的状态。激活还可以与信号传导途径的开始、诱导的细胞因子产生和可检测的效应子功能相关。术语“激活的免疫效应细胞”尤其是指正在经历细胞分裂的免疫效应细胞。

[0193] 术语“引发”是指免疫效应细胞(如T细胞)与其特异性抗原首次接触并且导致分化为效应细胞(如效应T细胞)的过程。

[0194] 术语“克隆扩增”或“扩增”是指特定实体倍增的过程。在本公开文本的上下文中,所述术语优选地用于免疫应答的上下文中,其中免疫效应细胞被抗原刺激,增殖,并且识别所述抗原的特异性免疫效应细胞被扩大。优选地,克隆扩增导致免疫效应细胞的分化。

[0195] 根据本公开文本的“抗原”包括将引起免疫应答的任何物质和/或免疫应答或免疫机制(如细胞应答)所针对的任何物质。这也包括这样的情形,其中抗原被加工成抗原肽并且免疫应答或免疫机制针对一种或多种抗原肽,特别是如果在MHC分子的情况下呈现的话。特别地,“抗原”是指与抗体或T淋巴细胞(T细胞)发生特异性反应的任何物质、优选肽或蛋白质。根据本公开文本,术语“抗原”包括包含至少一个表位(如T细胞表位)的任何分子。优选地,在本公开文本的上下文中的抗原是任选地在加工后诱导免疫应答的分子,所述免疫应答优选地对所述抗原(包括表达所述抗原的细胞)具有特异性。在一个实施方案中,抗原

是疾病相关抗原(如肿瘤抗原、病毒抗原或细菌抗原)或源自这种抗原的表位。

[0196] 术语“表位”是指分子(如抗原)中的抗原决定簇,即被免疫系统识别(例如,特别是在MHC分子的情况下呈现时,被抗体T细胞或B细胞识别)的分子的一部分或片段。在一个实施方案中,“表位”意指能够与抗体特异性结合的蛋白质决定簇。表位通常由分子的表面基团(如氨基酸或糖侧链)组成并且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于,在变性溶剂的存在下,与前者的结合会丧失,但是与后者的结合不会丧失。表位可以包含直接涉及结合的氨基酸残基和并不直接涉及结合的其他氨基酸残基,如被特异性抗原结合肽有效阻断或覆盖的氨基酸残基(换言之,氨基酸残基是在特异性抗原结合肽的占位区域(footprint)内)。

[0197] 蛋白质的表位优选包含所述蛋白质的连续或不连续的部分并且长度优选在约5与约100个氨基酸之间,优选在约5与约50个氨基酸之间,更优选在约8与约20个氨基酸之间,最优选在约10与约25个氨基酸之间,例如,表位的长度可以优选地是9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。特别优选的是,本公开文本的上下文中的表位是T细胞表位。

[0198] 如本文所用的术语“任选的”或“任选地”意味着随后描述的事件、情况或状况可以发生或者可以不发生,并且所述描述包括发生所述事件、情况或状况的例子和不发生所述事件、情况或状况的例子。

[0199] 如本文所用,术语“连接的”、“融合的”或“融合”可互换使用。这些术语是指将两个或更多个元件或组分或结构域连接在一起。

[0200] 术语“疾病”(本文中也称为“障碍”)是指影响个体身体的异常状况。疾病通常被解释为与特定症状和体征相关的医学病症。疾病可以是由最初来自外部来源(如感染性疾病)的因素引起,或者可以是由内部功能障碍(如自身免疫疾病)引起的。在人中,“疾病”通常更广泛地用于指对受困扰的个体造成疼痛、功能障碍、痛苦、社交问题或死亡的任何病症,或对与个体接触的人造成类似问题的任何病症。在这个更广泛的意义上,它有时包括损伤、残疾、障碍、综合征、感染、孤立症状、异常行为以及结构和功能的非典型变化,而在其他情况下以及出于其他目的,这些可以被认为是可区分的类别。疾病通常不仅对个人有身体上的影响,也有情感上的影响,因为患上许多疾病以及伴随着许多疾病生活可以改变一个人对生活的看法和一个人的个性。

[0201] 术语“治疗性治疗”涉及改善个体的健康状况和/或延长(增加)个体的寿命的任何治疗。所述治疗可以消除个体的疾病、阻止或减缓个体的疾病的发展,抑制或减缓个体的疾病的发展,减少个体的症状的频率或严重程度,和/或减少当前患有或以前患有疾病的个体的复发。

[0202] 术语“预防性治疗(prophylactic treatment)”或“预防性治疗(preventive treatment)”涉及旨在预防个体出现疾病的任何治疗。术语“预防性治疗(prophylactic treatment)”或“预防性治疗(preventive treatment)”在本文中可互换使用。类似地,在疾病进展(如肿瘤或癌症的进展)的上下文中,术语“用于预防的方法”涉及旨在预防个体的疾病进展的任何方法。

[0203] 术语“个体”和“受试者”在本文中可互换使用。它们是指人或另一种哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物),或任何其他非哺乳动物,包括鸟

(鸡)、鱼或可以受疾病或障碍(例如,癌症)困扰或易受疾病或障碍(例如,癌症)影响的任何其他动物物种。除非另有说明,否则术语“个体”和“受试者”并不表示特定的年龄,并且因此涵盖成年人、老年人、儿童和新生儿。在本公开文本的实施方案中,“个体”或“受试者”是“患者”。

[0204] 术语“患者”意指进行治疗的个体或受试者,特别是患病的个体或受试者。

[0205] 本公开文本的方面和实施方案

[0206] 在第一方面,本公开文本提供了一种结合剂,所述结合剂用于在减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法中使用,所述方法包括在施用与程序性死亡蛋白1(PD-1)结合的抗体或其抗原结合片段之前、同时或之后,向所述受试者施用所述结合剂,其中所述结合剂包含与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区,

[0207] a)所述第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:2、3和4,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:6、7和8;

[0208] 并且

[0209] b)所述第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:12、13和14,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:16、17和18,

[0210] 并且

[0211] 所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:43、44和45,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:46、47和48,或者,所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:62、63和64,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:65、66和67。

[0212] 与CD137和PD-L1结合的结合剂

[0213] 在一个实施方案中,CD137是人CD137,特别是包含SEQ ID NO:38中所示的序列的人CD137。在一个实施方案中,PD-L1是人PD-L1,特别是包含SEQ ID NO:40中所示的序列的人PD-L1。在一个实施方案中,CD137是人CD137并且PD-L1是人PD-L1。在一个实施方案中,CD137是包含SEQ ID NO:38中所示的序列的人CD137,并且PD-L1是包含SEQ ID NO:40中所示的序列的人PD-L1。

[0214] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中,与人CD137结合的第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含与SEQ ID NO:1或9具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:5或10具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0215] 在根据第一方面的结合剂的另外的实施方案中,与人PD-L1结合的第二结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含与SEQ ID NO:11具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或25-100%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:15具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性

的氨基酸序列。

[0216] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中，

[0217] a) 与人CD137结合的第一结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，所述重链可变区包含与SEQ ID NO:1或9具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:5或10具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列；并且

[0218] b) 与人PD-L1结合的第二结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，所述重链可变区包含与SEQ ID NO:11具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或25 100%序列同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:15具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0219] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中，与人CD137结合的第一结合区包含含有SEQ ID NO:1或9中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO:5或10中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

[0220] 在根据第一方面的结合剂的另外的实施方案中，与人PD-L1结合的第二结合区包含含有SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

[0221] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中，

[0222] a) 与人CD137结合的第一结合区包含含有SEQ ID NO:1或9中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO:5或10中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)；

[0223] 并且

[0224] b) 与人PD-L1结合的第二结合区包含含有SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

[0225] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中，

[0226] a) 与人CD137结合的第一结合区包含含有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)；

[0227] 并且

[0228] b) 与人PD-L1结合的第二结合区包含含有SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

[0229] 结合剂可以特别地是抗体，如多特异性抗体，例如，双特异性抗体。此外，结合剂可以呈全长抗体或抗体片段的形式。

[0230] 进一步优选的是，结合剂是人抗体或人源化抗体。

[0231] 每个可变区可以包含三个互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3) 和四个框架区 (FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0232] 互补决定区 (CDR) 和框架区 (FR) 可以按以下顺序从氨基末端到羧基末端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0233] 在第一方面的一个实施方案中，结合剂包含

[0234] i) 含有所述第一重链可变区 (VH) 和第一重链恒定区 (CH) 的多肽，以及ii) 含有所述第二重链可变区 (VH) 和第二重链恒定区 (CH) 的多肽。

[0235] 在第一方面的一个实施方案中，结合剂包含

- [0236] i) 含有所述第一轻链可变区 (VL) 并且进一步含有第一轻链恒定区 (CL) 的多肽,
- [0237] 以及
- [0238] ii) 含有所述第二轻链可变区 (VL) 并且进一步含有第二轻链恒定区 (CL) 的多肽。
- [0239] 在第一方面的一个实施方案中, 结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体, 其中第一结合臂包含
- [0240] i) 含有所述第一重链可变区 (VH) 和所述第一重链恒定区 (CH) 的多肽, 以及
- [0241] ii) 含有所述第一轻链可变区 (VL) 和所述第一轻链恒定区 (CL) 的多肽;
- [0242] 并且所述第二结合臂包含
- [0243] iii) 含有所述第二重链可变区 (VH) 和所述第二重链恒定区 (CH) 的多肽, 以及
- [0244] iv) 含有所述第二轻链可变区 (VL) 和所述第二轻链恒定区 (CL) 的多肽。
- [0245] 在第一方面的一个实施方案中, 结合剂包含 i) 含有能够与 CD137 结合的所述抗原结合区的第一重链和第一轻链, 所述第一重链包含第一重链恒定区并且所述第一轻链包含第一轻链恒定区; 以及 ii) 含有能够与 PD-L1 结合的所述抗原结合区的第二重链和第二轻链, 所述第二重链包含第二重链恒定区并且所述第二轻链包含第二轻链恒定区。
- [0246] 所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区 (CH) 中的每一个可以包含恒定重链 1 (CH1) 区、铰链区、恒定重链 2 (CH2) 区和恒定重链 3 (CH3) 区中的一个或多个, 优选至少铰链区、CH2 区和 CH3 区。
- [0247] 所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区 (CH) 中的每一个可以包含 CH3 区, 其中所述两个 CH3 区包含不对称突变。不对称突变意指所述第一和第二 CH3 区的序列在不同的位置含有氨基酸取代。例如, 所述第一和第二 CH3 区中的一个在对应于人 IgG1 重链中的根据 EU 编号的位置 405 的位置处含有突变, 并且所述第一和第二 CH3 区中的另一个在对应于人 IgG1 重链中的根据 EU 编号的位置 409 的位置处含有突变。
- [0248] 在所述第一重链恒定区 (CH) 中, 如下位置中的氨基酸中的至少一个可以被取代, 所述位置对应于选自人 IgG1 重链中的根据 EU 编号的 T366、L368、K370、D399、F405、Y407 和 K409 的位置, 并且在所述第二重链恒定区 (CH) 中, 如下位置中的氨基酸中的至少一个可以被取代, 所述位置对应于选自人 IgG1 重链中的根据 EU 编号的 T366、L368、K370、D399、F405、Y407 和 K409 的位置。在特定实施方案中, 第一和第二重链不在相同位置被取代 (即, 第一和第二重链含有不对称突变)。
- [0249] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中, (i) 在所述第一重链恒定区 (CH) 中在对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 F405 的位置中的氨基酸是 L, 并且在所述第二重链恒定区 (CH) 中在对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 K409 的位置中的氨基酸是 R, 或者 (ii) 在所述第一重链中在对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 K409 的位置中的氨基酸是 R, 并且在所述第二重链中在对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 F405 的位置中的氨基酸是 L。
- [0250] 在第一方面的一个实施方案中, 与另一种包含相同第一和第二抗原结合区以及包含人 IgG1 铰链、CH2 和 CH3 区的两个重链恒定区 (CH) 的抗体相比, 结合剂以更小程度诱导 Fc 介导的效应子功能。
- [0251] 在根据第一方面的结合剂的一个特定实施方案中, 所述第一重链恒定区和第二重链恒定区 (CH) 已被修饰, 使得与除了包含未经修饰的第一和第二重链恒定区 (CH) 之外相同的抗体相比, 所述抗体以更小程度诱导 Fc 介导的效应子功能。特别地, 所述未经修饰的第一

重链恒定区和第二重链恒定区 (CH) 中的每一个或两者可以包含 SEQ ID NO:19 或 25 中所示的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成。

[0252] Fc 介导的效应子功能可以通过测量结合剂与 Fc γ 受体的结合、与 C1q 的结合或 Fc 介导的 Fc γ 受体的交联的诱导来确定。特别地, Fc 介导的效应子功能可以通过测量结合剂与 C1q 的结合来确定。

[0253] 结合剂的第一和第二重链恒定区可以被修饰, 使得 C1q 与所述抗体的结合与野生型抗体相比减少, 优选减少至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 97% 或 100%, 其中 C1q 结合优选通过 ELISA 来确定。

[0254] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中, 在所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区 (CH) 的至少一个中, 在对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的位置 L234、L235、D265、N297 和 P331 的位置中的一个或多个氨基酸分别不是 L、L、D、N 和 P。

[0255] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中, 对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的位置 L234 和 L235 的位置在所述第一和第二重链中分别可以是 F 和 E。

[0256] 特别地, 对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的位置 L234、L235 和 D265 的位置在所述第一和第二重链恒定区 (HC) 中分别可以是 F、E 和 A。

[0257] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中, 所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区两者的对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的位置 L234 和 L235 的位置分别是 F 和 E, 其中 (i) 所述第一重链恒定区的对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 F405 的位置是 L, 并且所述第二重链的对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 K409 的位置是 R, 或 (ii) 所述第一重链恒定区的对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 K409 的位置是 R, 并且所述第二重链的对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 F405 的位置是 L。

[0258] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中, 所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区两者的对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的位置 L234、L235 和 D265 的位置分别是 F、E 和 A, 其中 (i) 所述第一重链恒定区的对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 F405 的位置是 L, 并且所述第二重链恒定区的对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 K409 的位置是 R, 或 (ii) 所述第一重链的对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 K409 的位置是 R, 并且所述第二重链的对应于人 IgG1 重链中根据 EU 编号的 F405 的位置是 L。

[0259] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中, 所述第一和/或第二重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列:

[0260] a) SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:25 中所示的序列 [IgG1-FC];

[0261] b) a) 中的所述序列的子序列, 如如下子序列, 其中从 a) 中定义的序列的 N 末端或 C 末端开始, 缺失了 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个连续氨基酸; 以及

[0262] c) 与 a) 或 b) 中定义的氨基酸序列相比, 具有至多 10 个取代, 如至多 9 个取代、至多 8、至多 7、至多 6、至多 5、至多 4、至多 3、至多 2 或至多 1 个取代的序列。

[0263] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中, 所述第一重链或所述第二重链如所述第二重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

[0264] a) SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:26 中所示的序列 [IgG1-F405L];

[0265] b) a) 中的所述序列的子序列, 如如下子序列, 其中从 a) 中定义的序列的 N 末端或 C 末端开始, 缺失了 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个连续氨基酸; 以及

[0266] c) 与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多9个取代,如至多8、至多7、至多6、至多5、至多4、至多3、至多2或至多1个取代的序列。

[0267] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中,所述第一重链或所述第二重链如所述第一重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

[0268] a) SEQ ID NO:21或27中所示的序列[IgG1-F409R];

[0269] b) a)中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a)中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0270] c) 与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,如至多9个取代、至多8、至多7、至多6、至多5、至多4个取代、至多3、至多2或至多1个取代的序列。

[0271] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中,所述第一重链和/或所述第二重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

[0272] a) SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:28中所示的序列[IgG1-Fc_FEA];

[0273] b) a)中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a)中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0274] c) 与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多7个取代,如至多6个取代、至多5、至多4、至多3、至多2或至多1个取代的序列。

[0275] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中,所述第一重链和/或所述第二重链如第二重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

[0276] a) SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:30中所示的序列[IgG1-Fc_FEAL];

[0277] b) a)中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a)中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0278] c) 与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多6个取代,如至多5个取代、至多4个取代、至多3、至多2或至多1个取代的序列。

[0279] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中,所述第一重链和/或所述第二重链如所述第一重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

[0280] a) SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:29[IgG1-Fc_FEAR]中所示的序列;

[0281] b) a)中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a)中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0282] c) 与a)或b)中定义的氨基酸序列相比,具有至多6个取代,如至多5个取代、至多4、至多3、至多2或至多1个取代的序列。

[0283] 在第一方面的一个实施方案中,结合剂包含卡帕(κ)轻链恒定区。

[0284] 在第一方面的一个实施方案中,结合剂包含兰布达(λ)轻链恒定区。

[0285] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中,第一轻链恒定区是卡帕(κ)轻链恒定区或兰布达(λ)轻链恒定区。

[0286] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中,第二轻链恒定区是兰布达(λ)轻链恒定区或卡帕(κ)轻链恒定区。

[0287] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中,第一轻链恒定区是卡帕(κ)轻链恒定区并且第二轻链恒定区是兰布达(λ)轻链恒定区,或第一轻链恒定区是兰布达(λ)轻链恒定区并且第二轻链恒定区是卡帕(κ)轻链恒定区。

[0288] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中,卡帕(κ)轻链包含选自以下的氨基酸序列:

[0289] a) SEQ ID NO:35中所示的序列;

[0290] b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0291] c) 与a) 或b) 中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,如至多9个取代、至多8、至多7、至多6、至多5、至多4个取代、至多3、至多2或至多1个取代的序列。

[0292] 在根据第一方面的结合剂的一个实施方案中,兰布达(λ)轻链包含选自以下的氨基酸序列:

[0293] a) SEQ ID NO:36中所示的序列;

[0294] b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0295] c) 与a) 或b) 中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,如至多9个取代、至多8、至多7、至多6、至多5、至多4个取代、至多3、至多2或至多1个取代的序列。

[0296] 根据第一方面的结合剂(特别是抗体)是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型的。特别地,结合剂可以是全长IgG1抗体。在第一方面的优选实施方案中,结合剂(特别是抗体)是IgG1m(f)同种异型的。

[0297] 在根据第一方面的结合剂的优选实施方案中,结合剂包含

[0298] i) 含有能够与CD137结合的所述抗原结合区的第一重链和第一轻链,其中所述第一重链包含SEQ ID NO:31中所示的序列,并且所述第一轻链包含SEQ ID NO:32中所示的序列;

[0299] ii) 含有能够与PD-L1结合的所述抗原结合区的第二重链和第二轻链,其中所述第二重链包含SEQ ID NO:33中所示的序列,并且所述第二轻链包含SEQ ID NO:34中所示的序列。

[0300] 用于根据第一方面的用途的结合剂可以特别地是阿卡顺利单抗(acasunlimab)或其生物类似物。

[0301] 在当前优选的实施方案中,在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量为

[0302] a) 约0.3-5mg/kg体重或总计约25-400mg;和/或

[0303] b) 约 2.1×10^{-9} - 3.4×10^{-8} mol/kg体重或总计约 1.7×10^{-7} - 2.7×10^{-6} mol。

[0304] 根据这些实施方案,基于被施用结合剂的受试者的中值体重为80kg,以mg/kg定义的剂量可以转换为平剂量,反之亦然。

[0305] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是约0.3-4.0mg/kg体重或总计约25-320mg;和/或

[0306] 约 2.1×10^{-9} - 2.7×10^{-8} mol/kg体重或总计约 1.7×10^{-7} - 2.2×10^{-6} mol。

[0307] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是约0.38-4.0mg/kg体重或总计约30-320mg;和/或

[0308] 约 2.6×10^{-9} - 2.7×10^{-8} mol/kg体重或总计约 2.4×10^{-7} - 2.2×10^{-6} mol。

[0309] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是约0.5-

3.3mg/kg体重或总计约40-260mg;和/或

[0310] 约 3.4×10^{-9} - 2.2×10^{-8} mol/kg体重或总计约 2.7×10^{-7} - 1.8×10^{-6} mol。

[0311] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是约0.6-2.5mg/kg体重或总计约50-200mg;和/或

[0312] 约 4.3×10^{-9} - 1.7×10^{-8} mol/kg体重或总计约 3.4×10^{-7} - 1.4×10^{-6} mol。

[0313] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是约0.8-1.8mg/kg体重或总计约60-140mg;和/或

[0314] 约 5.1×10^{-9} - 1.2×10^{-8} mol/kg体重或总计约 4.1×10^{-7} - 9.5×10^{-7} mol。

[0315] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是约0.9-1.8mg/kg体重或总计约70-140mg;和/或

[0316] 约 6.0×10^{-9} - 1.2×10^{-8} mol/kg体重或总计约 4.8×10^{-7} - 9.5×10^{-7} mol。

[0317] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是约1-1.5mg/kg体重或总计约80-120mg;和/或

[0318] 约 6.8×10^{-9} - 1.0×10^{-8} mol/kg体重或总计约 5.5×10^{-7} - 8.2×10^{-7} mol。

[0319] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是约1.1-1.4mg/kg体重或总计约90-110mg;和/或

[0320] 约 7.7×10^{-9} - 9.4×10^{-9} mol/kg体重或总计约 6.1×10^{-7} - 7.5×10^{-7} mol。

[0321] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是约1.2-1.3mg/kg体重或总计约95-105mg;和/或

[0322] 约 6.8×10^{-9} - 8.9×10^{-9} mol/kg体重或总计约 6.5×10^{-7} - 7.2×10^{-7} mol。

[0323] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是约0.8-1.5mg/kg体重或总计约65-120mg;和/或

[0324] 约 5.5×10^{-9} - 1.0×10^{-8} mol/kg体重或总计约 4.4×10^{-7} - 8.2×10^{-7} mol。

[0325] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是约0.9-1.3mg/kg体重或总计约70-100mg;和/或

[0326] 约 6.0×10^{-9} - 8.5×10^{-9} mol/kg体重或总计约 4.8×10^{-7} - 6.8×10^{-7} mol。

[0327] 约0.9-1.1mg/kg体重或总计约75-90mg;和/或

[0328] 约 6.4×10^{-9} - 7.7×10^{-9} mol/kg体重或总计约 5.1×10^{-7} - 6.1×10^{-7} mol。

[0329] 另外,在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是0.3-4.0mg/kg体重或总计25-320mg;和/或

[0330] 2.1×10^{-9} - 2.7×10^{-8} mol/kg体重或总计 1.7×10^{-7} - 2.2×10^{-6} mol。

[0331] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是0.38-4.0mg/kg体重或总计30-320mg;和/或

[0332] 2.6×10^{-9} - 2.7×10^{-8} mol/kg体重或总计 2.4×10^{-7} - 2.2×10^{-6} mol。

[0333] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是0.5-3.3mg/kg体重或总计40-260mg;和/或

[0334] 3.4×10^{-9} - 2.2×10^{-8} mol/kg体重或总计 2.7×10^{-7} - 1.8×10^{-6} mol。

[0335] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是0.6-2.5mg/kg体重或总计50-200mg;和/或

- [0336] 4.3×10^{-9} - 1.7×10^{-8} mol/kg 体重或总计 3.4×10^{-7} - 1.4×10^{-6} mol。
- [0337] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是 0.8-1.8mg/kg 体重或总计 60-140mg; 和/或
- [0338] 5.1×10^{-9} - 1.2×10^{-8} mol/kg 体重或总计 4.1×10^{-7} - 9.5×10^{-7} mol。
- [0339] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是 0.9-1.8mg/kg 体重或总计 70-140mg; 和/或
- [0340] 6.0×10^{-9} - 1.2×10^{-8} mol/kg 体重或总计 4.8×10^{-7} - 9.5×10^{-7} mol。
- [0341] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是 1-1.5mg/kg 体重或总计 80-120mg; 和/或
- [0342] 6.8×10^{-9} - 1.0×10^{-8} mol/kg 体重或总计 5.5×10^{-7} - 8.2×10^{-7} mol。
- [0343] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是 1.1-1.4mg/kg 体重或总计 90-110mg; 和/或
- [0344] 7.7×10^{-9} - 9.4×10^{-9} mol/kg 体重或总计 6.1×10^{-7} - 7.5×10^{-7} mol。
- [0345] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是 1.2-1.3mg/kg 体重或总计 95-105mg; 和/或
- [0346] 6.8×10^{-9} - 8.9×10^{-9} mol/kg 体重或总计 6.5×10^{-7} - 7.2×10^{-7} mol。
- [0347] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是 0.8-1.5mg/kg 体重或总计 65-120mg; 和/或
- [0348] 5.5×10^{-9} - 1.0×10^{-8} mol/kg 体重或总计 4.4×10^{-7} - 8.2×10^{-7} mol。
- [0349] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是 0.9-1.3mg/kg 体重或总计 70-100mg; 和/或
- [0350] 6.0×10^{-9} - 8.5×10^{-9} mol/kg 体重或总计 4.8×10^{-7} - 6.8×10^{-7} mol。
- [0351] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以特别地是 0.9-1.1mg/kg 体重或总计 75-90mg; 和/或
- [0352] 6.4×10^{-9} - 7.7×10^{-9} mol/kg 体重或总计 5.1×10^{-7} - 6.1×10^{-7} mol。
- [0353] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以为
- [0354] a) 约 1.1mg/kg 体重或总计约 80mg; 和/或
- [0355] b) 约 6.8×10^{-9} mol/kg 体重或总计约 5.5×10^{-7} mol。
- [0356] 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量可以为
- [0357] a) 1.1mg/kg 体重或总计 80mg; 和/或
- [0358] b) 6.8×10^{-9} mol/kg 体重或总计 5.5×10^{-7} mol。
- [0359] 当前优选的是, 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量为
- [0360] a) 约 1.25mg/kg 体重或总计约 100mg; 和/或
- [0361] b) 约 8.5×10^{-9} mol/kg 体重或总计约 6.8×10^{-7} mol。
- [0362] 同样优选的是, 在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的结合剂的量为
- [0363] a) 1.25mg/kg 体重或总计 100mg; 和/或
- [0364] b) 8.5×10^{-9} mol/kg 体重或总计 6.8×10^{-7} mol。
- [0365] 结合剂可以以任何方式并且通过本领域已知的任何途径施用。在优选的实施方案中, 将结合剂全身施用, 如肠胃外、特别是静脉内。

[0366] 结合剂可以以如本文所述的任何合适的药物组合物的形式施用。在优选的实施方案中,以输注的形式施用结合剂。

[0367] 用于根据本发明使用的结合剂可以通过使用静脉内 (IV) 输注来施用,如通过静脉内输注经最少30分钟(如经最少60分钟)施用,例如通过使用静脉内输注经30至120分钟施用。优选地,将用于根据本发明使用的结合剂通过使用静脉内 (IV) 输注经30分钟施用。

[0368] 结合剂可以在施用PD-1抑制剂之前、同时或之后施用。

[0369] 在一个实施方案中,将结合剂在施用PD-1抑制剂之前施用。例如,结合剂施用结束与PD-1抑制剂施用开始之间的间隔可以是至少约10min(如至少约15min、至少约20min、至少约25min、至少约30min、至少约35min、至少约40min、至少约45min、至少约50min、至少约55min、至少约60min、至少约90min或至少约120min)且至多约14天(至多约2周)(如至多约13天、至多约12天、至多约11天、至多约10天、至多约9天、至多约8天、至多约7天(至多约1周)、至多约6天、至多约5天、至多约4天、至多约3天、至多约2天、至多约1天(至多约24h)、至多约18h、至多约12h、至多约6h、至多约5h、至多约4h、至多约3h、至多约2.5h或至多约2h)。

[0370] 在一个实施方案中,将结合剂在PD-1抑制剂施用之后施用。例如,PD-1抑制剂施用结束与结合剂施用开始之间的间隔可以是至少约10min(如至少约15min、至少约20min、至少约25min、至少约30min、至少约35min、至少约40min、至少约45min、至少约50min、至少约55min、至少约60min、至少约90min或至少约120min)且至多约14天(至多约2周)(如至多约13天、至多约12天、至多约11天、至多约10天、至多约9天、至多约8天、至多约7天(至多约1周)、至多约6天、至多约5天、至多约4天、至多约3天、至多约2天、至多约1天(至多约24h)、至多约18h、至多约12h、至多约6h、至多约5h、至多约4h、至多约3h、至多约2.5h或至多约2h)。

[0371] 在一个实施方案中,将结合剂与PD-1抑制剂同时施用。例如,结合剂和PD-1抑制剂可以使用包含两种药物的组合物施用。可替代地,可以将结合剂施用于受试者的一个肢体,并且可以将PD-1抑制剂施用于受试者的另一个肢体。

[0372] 与PD-1结合的抗体

[0373] 与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段优选包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列具有至少85%序列同一性如至少90%序列同一性、95%序列同一性、98%序列同一性或99%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列具有至少85%序列同一性如至少90%序列同一性、95%序列同一性、98%序列同一性或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0374] 在当前最优选的实施方案中,与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO: 49的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成的重链可变区和含有SEQ ID NO: 50的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成的轻链可变区。

[0375] 与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段可以包含含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成的重链和含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成的轻链。

[0376] 根据本发明使用的与PD-1结合的抗体优选防止与PD-1相关的抑制性信号。与PD-1结合的抗体优选破坏或抑制与PD-1相关的抑制性信号传导。

[0377] 如本文所述,抑制或阻断PD-1信号传导导致防止或逆转免疫抑制并且建立或增强针对癌细胞的T细胞免疫。在一个实施方案中,如本文所述的抑制PD-1信号传导减少或抑制

免疫系统的功能障碍。在一个实施方案中,如本文所述的抑制PD-1信号传导使功能障碍的免疫细胞有较少功能障碍。在一个实施方案中,如本文所述的抑制PD-1信号传导使功能障碍的T细胞有较少功能障碍。

[0378] 在一个实施方案中,PD-1抑制剂阻止PD-1与PD-L1之间的相互作用。在另一个实施方案中,PD-1抑制剂阻止PD-1与PD-L2之间的相互作用。

[0379] 特别地,与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的或人抗体。

[0380] 在优选的实施方案中,与PD-1结合的抗体是分离的抗体。

[0381] 在不受理论约束的情况下,如上定义的包含与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区的结合剂与如上定义的与PD-1结合的抗体的组合被认为增加反应率并且导致在接受组合疗法的受试者中改善的反应持续时间,因为组合疗法导致完全阻断PD-1途径以及同时条件性激活4-1BB。PD-1阻断抗体阻断了与PD-L1和PD-L2两者的相互作用。进一步认为,具有与PD-1结合的抗体的组合疗法使增加量的PD-L1可被结合剂结合。

[0382] PD-1抑制剂可以特别地是派姆单抗或其生物类似物。

[0383] 在另外的实施方案中,PD-1抑制剂是包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的抗体,所述重链可变区包含SEQ ID NO:49中所示的序列或由其组成或基本上由其组成,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:50中所示的序列、由其组成或基本上由其组成。PD-1抑制剂可以特别地是包含重链和轻链的抗体,所述重链包含SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成,所述轻链包含SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成。

[0384] 本公开文本的抗PD-1抗体优选地是单克隆的,并且可以是多特异性抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、由Fab表达文库产生的片段以及上述任一者的PD-1结合片段。在一些实施方案中,本文所述的抗PD-1抗体与PD-1(例如,人PD-1)特异性结合。本公开文本的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白分子的任何同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或子类。

[0385] 如本文所述的抗原结合片段(例如,人抗原结合片段)包括但不限于Fab、Fab'和F(ab')₂、Fd、单链Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)和包含V_L或V_H结构域的片段。包含单链抗体的抗原结合片段可以包含单独的或与以下全部或部分组合的一个或多个可变区:铰链区、CH1、CH2、CH3和CL结构域。本公开文本还包括抗原结合片段,所述抗原结合片段包含一个或多个可变区与铰链区、CH1、CH2、CH3和CL结构域的任何组合。在一些实施方案中,所述抗PD-1抗体或其抗原结合片段是人、鼠(例如,小鼠和大鼠)、驴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡的抗体。

[0386] 在一些实施方案中,本文提供的抗PD-1抗体或其抗原结合片段的CDR序列中氨基酸残基的编号是根据如Lefranc, M.P.等人, Dev. Comp. Immunol., 2003, 27, 55-77中描述的IMGT编号方案。

[0387] 与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段还包括经修饰的衍生物和构建体,所述修饰即通过任何类型的分子与抗体共价附接,使得共价附接不阻止抗体与PD-1结合。例如但非限制性地,抗PD-1抗体衍生物包括已经例如通过以下方式修饰的抗体:糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/阻断基团衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其他蛋白质连接等。可以通过已知技术进行多种化学修饰中的任何一种,所述已知技术

包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外,衍生物或构建体可以含有一种或多种非经典氨基酸。

[0388] 优选地,将与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段以合适的量施用。在每个剂量和/或治疗周期中施用的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段的量可以特别地在一定范围内,其中超过5%、优选超过10%、更优选超过15%、甚至更优选超过20%、甚至更优选超过25%、甚至更优选超过30%、甚至更优选超过35%、甚至更优选超过40%、甚至更优选超过45%、最优选超过50%的所述PD-1抑制剂与PD-1结合。

[0389] 在某些实施方案中,与PD-1结合的抗体是派姆单抗或其生物类似物并且施用的PD-1抑制剂的量(例如,在每个剂量中和/或在每个治疗周期中)为总计约10-约1000mg,如总计约100-约600mg,例如,总计约150-约600mg、总计约150-约500mg、总计约175-约500mg、总计约175-约450mg、总计约200-约450mg或者如总计约200-约400mg。

[0390] 在某些实施方案中,与PD-1结合的抗体是派姆单抗或其生物类似物并且施用的PD-1抑制剂的量(例如,在每个剂量中和/或在每个治疗周期中)为总计10-1000mg,如总计100-600mg,例如,总计150-600mg、总计150-500mg、总计175-500mg、总计175-450mg、总计200-450mg或者如总计200-400mg。

[0391] 在某些实施方案中,与PD-1结合的抗体是派姆单抗或其生物类似物并且施用的与PD-1结合的抗体的量(例如,在每个剂量中和/或在每个治疗周期中)为

[0392] 总计约100-600mg;和/或

[0393] 总计约 6.84×10^{-7} - 4.11×10^{-7} mol。

[0394] 在某些实施方案中,与PD-1结合的抗体是派姆单抗或其生物类似物并且施用的与PD-1结合的抗体的量(例如,在每个剂量中和/或在每个治疗周期中)为总计约100-400mg;和/或总计约 6.84×10^{-7} - 2.73×10^{-6} mol,如总计100-400mg;和/或总计 6.84×10^{-7} - 2.73×10^{-6} mol。

[0395] 在某些实施方案中,与PD-1结合的抗体是派姆单抗或其生物类似物并且施用的与PD-1结合的抗体的量(例如,在每个剂量中和/或在每个治疗周期中)为总计约200-400mg;和/或总计约 6.84×10^{-7} - 2.73×10^{-6} mol,如总计200-400mg;和/或总计 6.84×10^{-7} - 2.73×10^{-6} mol。

[0396] 在某些实施方案中,施用的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段的量(例如,在每个剂量中和/或在每个治疗周期中)为总计约200mg或约 1.37×10^{-6} mol,如总计200mg或 1.37×10^{-6} mol。

[0397] 在某些实施方案中,与PD-1结合的抗体是派姆单抗或其生物类似物并且施用的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段的量(例如,在每个剂量中和/或在每个治疗周期中)为总计约200mg或约 1.37×10^{-6} mol,如总计200mg或 1.37×10^{-6} mol。

[0398] 在某些实施方案中,施用的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段的量(例如,在每个剂量中和/或在每个治疗周期中)为总计约400mg或总计约 2.73×10^{-6} ,如总计400mg或总计 2.73×10^{-6} 。

[0399] 在某些实施方案中,与PD-1结合的抗体是派姆单抗或其生物类似物并且施用的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段的量(例如,在每个剂量中和/或在每个治疗周期中)为总计约400mg或总计约 2.73×10^{-6} ,如总计400mg或总计 2.73×10^{-6} 。

[0400] 与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段可以以任何方式并且通过本领域已知的任何途径施用。施用方式和途径将取决于所使用的抗体类型。在优选的实施方案中,将与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段全身(如肠胃外、特别是静脉内)施用。

[0401] 与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段可以以如本文所述的任何合适的药物组合物的形式施用。在优选的实施方案中,将与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段以输注(如静脉内输注)的形式施用。

[0402] 待治疗的受试者和肿瘤或癌症

[0403] 根据本公开文本的待治疗的受试者优选是人受试者。

[0404] 在一个优选的实施方案中,待治疗的肿瘤或癌症是实体瘤或癌症。肿瘤或癌症可以是转移性肿瘤或癌症。

[0405] 优选地,肿瘤或癌症可以选自黑色素瘤、卵巢癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌(NSCLC))、结直肠癌、头颈癌、胃癌、乳腺癌、肾癌、尿路上皮癌、膀胱癌、食道癌、胰腺癌、肝癌、胸腺瘤和胸腺癌、脑癌、神经胶质瘤、肾上腺皮质癌、甲状腺癌、其他皮肤癌、肉瘤、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓增生异常综合征、子宫内膜癌、前列腺癌、阴茎癌、宫颈癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、梅克尔细胞癌和间皮瘤。更优选地,肿瘤或癌症选自黑色素瘤、肺癌、结直肠癌、胰腺癌和头颈癌。

[0406] 在特定的实施方案中,肿瘤或癌症选自肺癌(例如,非小细胞肺癌(NSCLC)、尿路上皮癌(膀胱癌、输尿管癌、尿道癌或肾盂癌)、子宫内膜癌(EC)、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌(TNBC))、头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)(例如,口腔癌、咽癌或喉癌)和宫颈癌。

[0407] 优选地,肿瘤是PD-L1阳性肿瘤。在某些实施方案中,优选PD-L1在 $\geq 1\%$ 的癌细胞或肿瘤细胞中表达。PD-L1的表达可以使用本领域技术人员已知的技术来确定,并且可以例如通过免疫组织化学(IHC)来评估。

[0408] 肿瘤或癌症可以特别地是肺癌。肺癌可以是非小细胞肺癌(NSCLC),如鳞状或非鳞状NSCLC。肺癌是第二常见的恶性肿瘤,其中预计的年龄标准化发病率为每100,000人中22.4人发病并且对于男性和女性两者皆是癌症死亡的主要原因(Kantar, 2021)。在2020年全世界大约有2,206,771例新的肺癌病例和1,796,144例死亡(GLOBOCAN, 2020)。非小细胞肺癌(NSCLC)占有所有病例的85%至90%,其中在疾病的所有阶段中5年存活率为大约18%,并且对于转移性疾病仅为3.5%(Jemal等人, 2011年)(Kantar, 2021; SEER, 2018)。在1L环境中,治疗通常由基于铂的化疗与免疫疗法或靶向疗法组合组成,这取决于分子和生物标记物分析以及肿瘤的组织学(NCCN, 2021d)。最近,PD-1和程序性死亡蛋白配体1(PD-L1)抑制剂的出现改善了没有驱动突变的患者(大约62%的非鳞状群体和77%的鳞状群体(Kantar, 2021))的结局。对于肿瘤不具有某些致癌突变或不表达检查点抑制剂(CPI)选项的生物标记物的患者,需要更多的治疗替代方案。与用于增强反应的补充方法一起的新型组合可以进一步解决该群体未满足的需求。对于2L环境中的患者,SOC被限制于基于铂的化疗、CPI单一疗法或多西他赛,其中根据先前所接受的疗法使用或不使用雷莫芦单抗。对于三线(3L)环境中的患者,化学疗法单一疗法是标准。需要新型疗法来限制毒性并且潜在地提高该群体的功效(NCCN, 2021d)。

[0409] 在一个实施方案中,其中肿瘤或癌症是肺癌,该肿瘤或癌症是非小细胞肺癌(NSCLC),如鳞状或非鳞状NSCLC。肿瘤或癌症可以特别地是转移癌,如转移性NSCLC。

[0410] 在一个实施方案中,其中肿瘤或癌症是肺癌,特别是NSCLC,所述肿瘤或癌症不具有表皮生长因子(EGFR)敏感突变和/或间变性淋巴瘤(ALK)易位/ROS1重排。EGFR敏感突变是可以用经批准的酪氨酸激酶抑制剂(TKI)治疗的那些突变。

[0411] 在一个实施方案中,其中肿瘤或癌症是肺癌,特别是NSCLC,所述肿瘤或癌症包含癌细胞并且PD-L1在 $\geq 1\%$ 的癌细胞中表达。这种表达可以通过本领域技术人员已知的任何手段和方法(如通过免疫组织化学(IHC),如通过当地SOC测试(优选FDA批准的测试)或在中心实验室确定)来确定。

[0412] 在一个实施方案中,其中肿瘤或癌症是肺癌,特别是NSCLC,所述肿瘤或癌症包含癌细胞并且PD-L1在1%至49%的癌细胞中表达。这种表达可以通过本领域技术人员已知的任何手段和方法(如通过免疫组织化学(IHC),如通过当地SOC测试(优选FDA批准的测试)或在中心实验室确定)来确定。

[0413] 在一个实施方案中,其中肿瘤或癌症是肺癌,特别是NSCLC,所述肿瘤或癌症包含癌细胞并且PD-L1在 $\geq 50\%$ 的癌细胞中表达。这种表达可以通过本领域技术人员已知的任何手段和方法(如通过免疫组织化学(IHC),如通过当地SOC测试(优选FDA批准的测试)或在中心实验室确定)来确定。

[0414] 在一个实施方案中,受试者未接受过转移性疾病的先前全身治疗,即,受试者在接受根据本发明的治疗之前未接受过转移性疾病的任何全身治疗。根据该实施方案,肿瘤或癌症优选为肺癌(如NSCLC)。

[0415] 在一个实施方案中,受试者未接受过用检查点抑制剂/免疫检查点(ICP)抑制剂的先前治疗,即在根据第一方面的治疗之前,受试者未接受过用ICP抑制剂的治疗。在另外的实施方案中,受试者未接受过用PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂(如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)的先前治疗。在这些实施方案中,肿瘤或癌症优选为肺癌(如NSCLC)。

[0416] 在另外的实施方案中,受试者未接受过用4-1BB(CD137)靶向剂、用抗肿瘤疫苗或用自体细胞免疫疗法的先前治疗。在一个实施方案中,受试者未接受过用抗4-1BB(CD137)抗体的先前治疗。在这些实施方案中,肿瘤或癌症优选为肺癌(如NSCLC)。

[0417] 在其他实施方案中,肿瘤或癌症在治疗如用检查点抑制剂的全身治疗后已复发和/或是难治性的。

[0418] 受试者可以接受过至少一个先前全身疗法线,如包含PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的全身疗法。在用PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗后,癌症或肿瘤可以特别地已复发和/或是难治性的,或者所述受试者已进展,其中将所述PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。

[0419] 在特定的实施方案中,将根据本发明的治疗提供给已接受先前治疗的受试者;例如,如上定义的,其中最后的先前治疗是用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂,如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体,所述PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。最后的先前治疗可以用以上定义的PD1抑制剂或PD-L1抑制剂。

[0420] 优选地,当自受试者在使用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂(如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体)的最后治疗中进展以来的时间是8个月或更少,如7个月或更少、6个月或更少、5个月或更少、4个月或更少、3个月或更少、2个月或更少、1个月或更少、3周或更少或者如2周或更少时,向受试者提供根据本发明的疗法。

[0421] 类比地,可以优选的是,当自作为最后的先前治疗的一部分的PD1抑制剂或PD-L1抑制剂如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的最后给药以来的时间是8个月或更少,如7个月或更少、6个月或更少、5个月或更少、4个月或更少、3个月或更少、2个月或更少、1个月或更少、3周或更少或者如2周或更少时,向受试者提供根据本发明的疗法。

[0422] 在另外的实施方案中,在以下期间或之后,癌症或肿瘤已复发和/或是难治性的,或者所述受试者已进展:

[0423] i) 在用抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗后的含铂双药化学疗法,或者

[0424] ii) 在含铂双药化学疗法后的用抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的治疗。

[0425] 此外,在这些实施方案中,肿瘤或癌症优选为肺癌(如NSCLC)。

[0426] 接受根据本发明的治疗的受试者可以特别地是未接受过用紫杉烷化学治疗剂(例如,多西他赛或紫杉醇)的先前治疗(如用紫杉烷化学治疗剂(例如多西他赛)对NSCLC的先前治疗)的受试者。

[0427] 治疗方案

[0428] 结合剂和PD-1抑制剂可以通过任何合适的方式施用,如静脉内、动脉内、皮下、皮内、肌内、结(节)内或肿瘤内施用。

[0429] 在第一方面的一个实施方案中,通过全身施用将以上定义的结合剂施用于受试者。优选地,将结合剂通过静脉内注射或输注施用于受试者。在一个实施方案中,在至少一个治疗周期中施用结合剂。

[0430] 在一个实施方案中,通过全身施用将与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段特别地施用于受试者。优选地,将与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段通过静脉内注射或输注施用于受试者。在一个实施方案中,在至少一个治疗周期中施用与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段。

[0431] 在一个实施方案中,通过全身施用将以上定义的结合剂和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段特别地施用于受试者。优选地,将结合剂和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段通过静脉内注射或输注施用于受试者。在一个实施方案中,在至少一个治疗周期中施用结合剂和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段。

[0432] 在一个实施方案中,每个治疗周期为约两周(14天)、三周(21天)或四周(28天)、五周(35天)或6周(48天)。在优选的实施方案中,每个治疗周期是三周(21天)。在其他优选的实施方案中,每个治疗周期为6周(48天)。

[0433] 在特定实施方案中,将一个剂量的以上定义的结合剂和一个剂量的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段每两周(1Q2W)、每三周(1Q3W)或每四周(1Q4W)、每五周(1Q5W)(优选每三周(1Q3W))施用或输注一次。在其他实施方案中,将一个剂量的以上定义的结合剂和一个剂量的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段每六周施用一次(1Q6W)。结合剂的量和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段的量优选如上定义。

[0434] 在一些实施方案中,将一个剂量或每个剂量在每个治疗周期的第1天施用或输注。例如,一个剂量的以上定义的结合剂和一个剂量的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段可以在每个治疗周期的第1天施用。

[0435] 在一些实施方案中,将100mg剂量的以上定义的结合剂和200mg剂量的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段每三周施用一次(1Q3W)。

[0436] 其他实施方案中,将100mg剂量的以上定义的结合剂和400mg剂量的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段每六周施用一次(1Q6W)。

[0437] 在特定实施方案中,将100mg剂量的结合剂(其是阿卡顺利单抗或其生物类似物)和200mg剂量的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段(其是派姆单抗或其生物类似物)每三周施用一次(1Q3W),如在每三周治疗周期的第一天。

[0438] 在特定实施方案中,肿瘤或癌症是NSCLC;并且将100mg剂量的结合剂(其是阿卡顺利单抗或其生物类似物)和200mg剂量的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段(其是派姆单抗或其生物类似物)每三周施用一次(1Q3W),如在每三周治疗周期的第一天。

[0439] 在其他实施方案中,将100mg剂量的结合剂(其是阿卡顺利单抗或其生物类似物)和400mg剂量的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段(其是派姆单抗或其生物类似物)每六周施用一次(1Q6W),如在每六周治疗周期的第一天。

[0440] 在还其他的实施方案中,肿瘤或癌症是NSCLC;并且其中将100mg剂量的结合剂(其是阿卡顺利单抗或其生物类似物)和400mg剂量的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段(其是派姆单抗)每六周施用一次(1Q6W),如在每六周治疗周期的第一天。

[0441] 可以首先施用与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段,随后是结合剂。可替代地,首先施用结合剂,随后是与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段。

[0442] 每个剂量可以经最少30分钟(如经最少60分钟、最少90分钟、最少120分钟或最少240分钟)施用或输注。

[0443] 结合剂可以特别地通过使用经30分钟(如经最少40分钟、最少50分钟或如经最少60分钟)的静脉内(IV)输注施用。

[0444] 与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段可以特别地以经30分钟(如经最少40分钟、最少50分钟或如经最少60分钟)的静脉内输注施用。

[0445] 以上定义的结合剂和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段可以同时施用。在可替代的优选的实施方案中,将结合剂和PD-1抑制剂分开施用。

[0446] 以上定义的结合剂和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段可以以任何合适的形式(例如,原样)同时施用。然而,优选的是将结合剂和PD-1抑制剂以如本文所述的任何合适的药物组合物的形式施用。在一个实施方案中,将至少结合剂和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段以分开的药物组合物(即,结合剂的一个药物组合物和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段的一个药物组合物)的形式施用,优选地将结合剂和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段以分开的药物组合物的形式施用(即,结合剂的一个药物组合物和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段的一个药物组合物)。

[0447] 组合物或药物组合物可以根据常规技术(如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,Gennaro编辑,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1995中披露的那些)用载体、赋形剂和/或稀释液以及适合于药物组合物的任何其他组分(包括已知的佐剂)配制。药学上可接受的载体或稀释剂以及任何已知的佐剂和赋形剂应适合于结合剂和/或与PD-1结合的抗体或抗原结合片段和所选择的施用方式。基于对所选的化合物或药物组合物的所需生物特性的显著负面影响的缺乏(例如,在抗原结合后小于基本影响[10%或更少的相对抑制、5%或更少的相对抑制等])来确定药物组合物的载体和其他组分的适合性。

[0448] 组合物、特别是以上定义的结合剂的药物组合物、与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段的药物组合物可以包含稀释剂、填充剂、盐、缓冲液、洗涤剂(例如,非离子洗涤剂,如Tween-20或Tween-80)、稳定剂(例如,糖或不含蛋白质的氨基酸(protein-free amino acid))、防腐剂、增溶剂和/或适合于包含在药物组合物中的其他材料。

[0449] 用于治疗性用途的药理学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂是制药领域熟知的,并且例如在Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R Gennaro编辑1985)中描述。

[0450] 药物载体、赋形剂或稀释剂可以关于预期的施用途径和标准的药学实践进行选择。

[0451] 药理学上可接受的载体包括与活性化合物生理上相容的任何和所有合适的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂、抗氧化剂和吸附延迟剂等,所述活性化合物特别是以上定义的结合剂和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段。

[0452] 在(药物)组合物中可以使用的合适的水性和非水性载体的例子包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、乙醇、右旋糖、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(如橄榄油、玉米油、花生油、棉籽油和芝麻油)、羧甲基纤维素胶体溶液、黄芪胶和可注射的有机酯(如油酸乙酯)和/或各种缓冲液。其他载体是制药领域熟知的。

[0453] 药理学上可接受的载体包括无菌水性溶液或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。此类介质和药剂用于药学活性物质的用途是本领域已知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容,否则考虑在(药物)组合物中使用它们。

[0454] 如本文所用的术语“赋形剂”是指可以存在于本公开文本的(药物)组合物中但不是活性成分的物质。赋形剂的例子包括而限于载体、粘合剂、稀释剂、润滑剂、增稠剂、表面活性剂、防腐剂、稳定剂、乳化剂、缓冲液、调味剂或着色剂。

[0455] 术语“稀释剂(diluent)”是指稀释剂(diluting agent)和/或稀释剂(thinning agent)。此外,术语“稀释剂”包括流体、液体或固体悬浮液和/或混合介质中的任何一种或多种。合适的稀释剂的例子包括乙醇、甘油和水。

[0456] (药物)组合物也可以包含药理学上可接受的抗氧化剂,例如(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;以及(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0457] (药物)组合物还可以包含组合物中的等渗剂(如糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨糖醇)、甘油或氯化钠)。

[0458] (药物)组合物还可以含有适合于所选的施用途径的一种或多种佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、防腐剂或缓冲液(其可以增强组合物的保质期或有效性)。可以将如本文所用的组合物与将保护化合物免于快速释放的载体一起制备,如控释配制品,包括植入物、透皮贴剂和微囊密封的递送系统。此类载体可以包括明胶、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、可生物降解的生物相容性聚合物(如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸),单独的或与蜡或本领域熟知的其他材料一起。用于制备此类配制品的方法对本领域技术人员通常是已知的,参见例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson编辑, Marcel Dekker, Inc., New York,

1978。

[0459] “药学上可接受的盐”包括例如可例如通过使用药学上可接受的酸(如盐酸、硫酸、富马酸、马来酸、琥珀酸、乙酸、苯甲酸、柠檬酸、酒石酸、碳酸或磷酸)形成的酸加成盐。此外,合适的药学上可接受的盐可以包括碱金属盐(例如,钠盐或钾盐);碱土金属盐(例如,钙盐或镁盐);铵盐(NH_4^+);以及合适的有机配体形成的盐(例如,使用抗衡阴离子(counteranion,如卤根、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、烷基磺酸根和芳基磺酸根)形成的铵、季铵和胺阳离子)。药学上可接受的盐的说明性例子包括但不限于:乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、精氨酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、酒石酸氢盐、硼酸盐、溴化物、丁酸盐、依地酸钙、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐(camphorsulfonate)、右旋樟脑磺酸盐(camsylate)、碳酸盐、氯化物、柠檬酸盐、克拉维酸盐、环戊烷丙酸盐、双葡萄糖酸盐、二盐酸盐、十二烷基硫酸盐、依地酸盐、乙二磺酸盐、依托酸盐、乙磺酸盐、乙烷磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、半乳糖酸盐(galactate)、半乳糖醛酸盐(galacturonate)、葡庚糖酸盐、葡庚糖酸盐(glucoheptonate)、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、甘油磷酸盐、羧乙酰基对氨基苯磺酸盐(glycolylarsanilate)、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、己基间苯二酚盐、哈胺盐(hydrabamine)、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙烷磺酸盐、羟基萘甲酸盐、碘化物、异丁酸盐、异硫代硫酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲烷磺酸盐、甲基硫酸盐、粘酸盐、2-萘磺酸盐(naphthalenesulfonate)、萘磺酸盐(napsylate)、烟酸盐、硝酸盐、N-甲基葡萄糖胺铵盐、油酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐(pamoate)(恩波酸盐(embonate))、棕榈酸盐、泛酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯丙酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、邻苯二甲酸盐、苦酸盐、新戊酸盐、聚半乳糖酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、硫酸盐、辛二酸盐、琥珀酸盐、丹宁酸盐、酒石酸盐、茶氯酸盐(teoclolate)、甲苯磺酸盐、三乙基碘化物(triethiodide)、十一酸盐、戊酸盐等(参见例如,S.M.Berge等人,“Pharmaceutical Salts”,J.Pharm.Sci.,66,第1-19页(1977))。并非药学上可接受的盐可以用于制备药学上可接受的盐,并且被包括在本公开文本中。

[0460] 在一个实施方案中,本文所用的结合剂和PD-1抑制剂可以被配制成确保适当的体内分布。药学上可接受的用于肠胃外施用的载体包括无菌水性溶液或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。此类介质和药剂用于药学活性物质的用途是本领域已知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容,否则考虑了其在组合物中的用途。其他活性或治疗性化合物也可以掺入组合物中。

[0461] 在制造和储存条件下,用于注射的药物组合物典型地必须是无菌且稳定的。可以将组合物配制成溶液、微乳剂、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯(如油酸乙酯)的水性或非水性的溶剂或分散介质。可以例如通过使用包衣(如卵磷脂)、在分散液的情况下通过维持所需粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当流动性。在许多情况下,将优选地在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇(如甘油、甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠。可以通过在组合物中包括延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸盐和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。无菌可注射溶液可以通过以下方式来制备:将活性化合物以所需量掺入视需要具有例如如上文所列举的成分中的一种或组合的适当溶剂中,随

后微过滤灭菌。通常,通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散液,所述无菌媒介物含有基本分散介质和例如来自上文所列举成分的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法的例子为真空干燥和冷冻干燥(冻干),其由先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何另外的所需成分的粉末。

[0462] 无菌可注射溶液可以通过以下方式来制备:将活性化合物以所需量掺入视需要具有上文所列举成分中的一种或组合的适当溶剂中,随后微过滤灭菌。通常,通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散液,所述无菌媒介物含有基本分散介质和来自上文所列举成分的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法的例子为真空干燥和冷冻干燥(冻干),其由先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何另外的所需成分的粉末。

[0463] 在某些实施方案中,将用于根据本发明使用的结合剂配制在包含组氨酸、蔗糖和聚山梨醇酯-80并且具有约5至约6的pH(如5至6)的组合物或配制品中。特别地,用于根据本发明使用的结合剂可以在包含约20mM组氨酸、约250mM蔗糖、约0.02%聚山梨醇酯-80并且具有约5.5的pH的组合物或配制品中,如包含20mM组氨酸、250mM蔗糖、0.02%聚山梨醇酯-80并且具有5.5的pH的组合物或配制品。在特定实施方案中,配制品可以包含约10至约30mg结合剂/mL,如10-30mg结合剂/mL,特别是约20mg结合剂/mL,如20mg结合剂/mL。

[0464] 用于根据本发明使用的结合剂可以在如上定义的组合物中提供并且然后可以在施用之前在0.9%NaCl(盐水)中稀释。

[0465] 在第二方面,本公开文本提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含(i)含有与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区的结合剂

[0466] a)所述第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:2、3和4,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:6、7和8,

[0467] 并且

[0468] b)所述第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:12、13和14,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:16、17和18,以及

[0469] (ii)与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体抑制PD-1活性,并且包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:43、44和45,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:46、47和48;或者所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:62、63和64,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:65、66和67。

[0470] 关于第一方面(特别是关于结合剂和与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段)的本文公开的实施方案也适用于第二方面的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒包含至少两个容器,其中一个容器含有结合剂(原样或以(药物)组合物的形式)并且第二个容器含有与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段(原样或以(药物)组合物的形式)。

[0471] 在第三方面,本公开文本提供了第二方面的试剂盒,所述试剂盒用于在减少或预

防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法中使用。关于第一方面(特别是关于结合剂、PD-1抑制剂、治疗方案、特定肿瘤/癌症和受试者)和/或第二方面的本文公开的实施方案也适用于用于第三方面的试剂盒。

[0472] 在第四方面,本公开文本提供了一种用于减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括在施用与程序性死亡蛋白(PD-1)结合的抗体或其抗原结合片段之前、同时或之后,向所述受试者施用所述结合剂,其中所述结合剂包含与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区;

[0473] a) 所述第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:2、3和4,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:6、7和8,

[0474] 并且

[0475] b) 所述第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:12、13和14,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:16、17和18,

[0476] 并且其中所述抗体抑制PD-1活性,并且包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:43、44和45,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:46、47和48,或者所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:62、63和64,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:65、66和67。

[0477] 关于第一方面(特别是关于结合剂、PD-1抑制剂、治疗方案、特定肿瘤/癌症和受试者)的本文公开的实施方案也适用于第四方面的方法。

[0478] 在另外的方面,本公开文本提供了用于在减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法中使用的与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段,所述方法包括在施用与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段之前、同时或之后,向所述受试者施用PD-1抑制剂,其中所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:43、44和45,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:46、47和48,或者所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:62、63和64,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:65、66和67,并且其中所述结合剂包含与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区

[0479] a) 所述第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:2、3和4,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:6、7和8,

[0480] 并且

[0481] b) 所述第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:12、13和14,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:16、17和18。

[0482] 关于第一方面(特别是关于结合剂、PD-1抑制剂、任选的一个或多个另外的治疗剂、治疗方案、特定肿瘤/癌症和受试者)的本文公开的实施方案也适用于用于该另外的方面的PD-1抑制剂。

[0483] 引用本文引用的文件和研究并不旨在承认前述中的任一个是相关的现有技术。关于这些文件内容的所有陈述均基于申请人可获得的信息,并且不构成对这些文件的内容的正确性的任何承认。

[0484] 提供描述(包括以下例子)以使本领域普通技术人员能够制备并且使用各种实施方案。对特定设备、技术和应用的描述仅作为例子提供。对本文描述的例子和各种修改对于本领域普通技术人员来说将是容易清楚的,并且在不脱离各种实施方案的精神和范围的情况下,本文定义的一般原理可以应用于其他例子和应用。因此,各种实施方案不旨在限于本文描述和示出的实施例,而是符合与权利要求一致的范围。

[0485] 本公开文本的项

[0486] 1. 一种结合剂,所述结合剂用于在减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法中使用,所述方法包括在施用与程序性死亡蛋白1(PD-1)结合的抗体或其抗原结合片段之前、同时或之后,向所述受试者施用所述结合剂,

[0487] 其中

[0488] 所述结合剂包含与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区;

[0489] a) 所述第一结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:2、3和4,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:6、7和8;

[0490] 并且

[0491] b) 所述第二抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:12、13和14,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:16、17和18

[0492] 并且与PD-1结合的所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:43、44和45,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:46、47和48;或者与PD-1结合的所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:62、63和64,所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:65、66和67。

[0493] 2. 根据项1所述的用于所述用途的结合剂,其中与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0494] 3. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的轻链可变区。

[0495] 4. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:52的

氨基酸序列的轻链。

[0496] 5. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中与PD-1结合的所述抗体是派姆单抗或其生物类似物。

[0497] 6. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中PD-L1是人PD-L1, 特别是包含SEQ ID NO: 40中所示的序列的人PD-L1, 和/或CD137是人CD137, 特别是包含SEQ ID NO: 38中所示的序列的人CD137。

[0498] 7. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中

[0499] 所述结合剂的第一结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含与SEQ ID NO: 1或9具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列, 所述轻链可变区包含与SEQ ID NO: 5或10具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0500] 8. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中

[0501] 所述结合剂的第二结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含与SEQ ID NO: 11具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或25 100%序列同一性的氨基酸序列, 所述轻链可变区包含与SEQ ID NO: 15具有至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0502] 9. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂的第一结合区包含含有SEQ ID NO: 1或9中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO: 5或10中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

[0503] 10. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂的第二结合区包含含有SEQ ID NO: 11中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO: 15中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

[0504] 11. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中

[0505] a) 所述结合剂的第一结合区包含含有SEQ ID NO: 1中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO: 5中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL);

[0506] 并且

[0507] b) 所述结合剂的第二结合区包含含有SEQ ID NO: 11中所示的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和含有SEQ ID NO: 15中所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

[0508] 12. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂是多特异性抗体, 如双特异性抗体。

[0509] 13. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂呈全长抗体或抗体片段的形式。

[0510] 14. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中每个可变区包含三个互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3) 和四个框架区 (FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0511] 15. 根据项13所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述互补决定区和所述框架区按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0512] 16. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂包含

[0513] i) 含有所述第一重链可变区 (VH) 和第一重链恒定区 (CH)、由其组成或基本上由其组成的多肽, 以及

[0514] ii) 含有所述第二重链可变区 (VH) 和第二重链恒定区 (CH)、由其组成或基本上由其组成的多肽。

[0515] 17. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂包含

[0516] i) 含有所述第一轻链可变区 (VL) 并且进一步含有第一轻链恒定区 (CL) 的多肽, 以及

[0517] ii) 含有所述第二轻链可变区 (VL) 并且进一步含有第二轻链恒定区 (CL) 的多肽。

[0518] 18. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂是包含第一结合臂和第二结合臂的抗体, 其中

[0519] 所述第一结合臂包含

[0520] i) 含有所述第一重链可变区 (VH) 和第一重链恒定区 (CH) 的多肽, 以及

[0521] ii) 含有所述第一轻链可变区 (VL) 和第一轻链恒定区 (CL) 的多肽;

[0522] 并且所述第二结合臂包含

[0523] iii) 含有所述第二重链可变区 (VH) 和第二重链恒定区 (CH) 的多肽, 以及

[0524] iv) 含有所述第二轻链可变区 (VL) 和第二轻链恒定区 (CL) 的多肽。

[0525] 19. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂包含

[0526] i) 含有能够与CD137结合的所述抗原结合区的第一重链和第一轻链, 以及

[0527] ii) 含有能够与PD-L1结合的所述抗原结合区的第二重链和第二轻链。

[0528] 20. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述结合剂包含

[0529] i) 含有能够与CD137结合的所述抗原结合区的第一重链和第一轻链, 所述第一重链包含第一重链恒定区并且所述第一轻链包含第一轻链恒定区; 以及

[0530] ii) 含有能够与PD-L1结合的所述抗原结合区的第二重链和第二轻链, 所述第二重链包含第二重链恒定区并且所述第二轻链包含第二轻链恒定区。

[0531] 21. 根据项16-20中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区 (CH) 中的每一个包含恒定重链1 (CH1) 区、铰链区、恒定重链2 (CH2) 区和恒定重链3 (CH3) 区中的一个或多个, 优选至少铰链区、CH2区和CH3区。

[0532] 22. 根据项16-21中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区 (CH) 中的每一个包含CH3区并且其中所述两个CH3区包含不对称突变。

[0533] 23. 根据项16-21中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中在所述第一重链恒定区 (CH) 中, 如下位置中的氨基酸中的至少一个被取代, 所述位置对应于选自人IgG1重链中的根据EU编号的T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置, 并且在所述第二重链恒定区 (CH) 中, 如下位置中的氨基酸中的至少一个被取代, 所述位置对应于选自人IgG1重链中的根据EU编号的T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置, 并且其中所述第一重链和所述第二重链不在相同位置被取代。

[0534] 24. 根据项23所述的用于所述用途的结合剂, 其中 (i) 在所述第一重链恒定区 (CH) 中在对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置中的氨基酸是L, 并且在所述第二重链恒定区 (CH) 中在对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置中的氨基酸是R, 或者 (ii) 在所述第一重链中在对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置中的氨基酸是R, 并且在所述第二重链中在对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置中的氨基酸是L。

[0535] 25. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中与另一种包含相同第一抗原结合区和第二抗原结合区以及含有人IgG1铰链、CH2区和CH3区的两个重链恒定区(CH)的抗体相比, 所述结合剂以更小程度诱导Fc介导的效应子功能。

[0536] 26. 根据项25所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)已被修饰, 使得与除了包含未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)之外相同的抗体相比, 所述抗体以更小程度诱导Fc介导的效应子功能。

[0537] 27. 根据项26所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述未经修饰的第一重链恒定区和第二重链恒定区(CH)中的每一个包含SEQ ID NO:19或25中所示的氨基酸序列。

[0538] 28. 根据项26或27所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述Fc介导的效应子功能通过与Fc γ 受体的结合、与C1q的结合或Fc介导的Fc γ 受体的交联的诱导来测量。

[0539] 29. 根据项28所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述Fc介导的效应子功能通过与C1q的结合测量。

[0540] 30. 根据项25-29中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述第一和第二重链恒定区已被修饰, 使得C1q与所述抗体的结合与野生型抗体相比减少, 优选减少至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或100%, 其中C1q结合优选通过ELISA确定。

[0541] 31. 在前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中在所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区(CH)的至少一个中, 在对应于人IgG1重链中根据EU编号的位置L234、L235、D265、N297和P331的位置中的一个或多个氨基酸分别不是L、L、D、N和P。

[0542] 32. 根据项31所述的用于所述用途的结合剂, 其中对应于人IgG1重链中根据EU编号的位置L234和L235的位置在所述第一重链和所述第二重链中分别是F和E。

[0543] 33. 根据项31或32所述的用于所述用途的结合剂, 其中在所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区(HC)中, 对应于人IgG1重链中根据EU编号的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A。

[0544] 34. 根据项31-33中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区两者的对应于人IgG1重链中根据EU编号的位置L234和L235的位置分别是F和E, 并且其中(i)所述第一重链恒定区的对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置是L, 并且所述第二重链的对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置是R, 或(ii)所述第一重链恒定区的对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置是R, 并且所述第二重链的对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置是L。

[0545] 35. 根据项31-34中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区两者的对应于人IgG1重链中根据EU编号的位置L234、L235和D265的位置分别是F、E和A, 并且其中(i)所述第一重链恒定区的对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置是L, 并且所述第二重链恒定区的对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置是R, 或(ii)所述第一重链的对应于人IgG1重链中根据EU编号的K409的位置是R, 并且所述第二重链的对应于人IgG1重链中根据EU编号的F405的位置是L。

[0546] 36. 根据项16-35中任一项所述的用于所述用途的结合剂, 其中所述第一和/或第二重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

[0547] a) SEQ ID NO:19或25中所示的序列[IgG1-FC];

[0548] b) a)中的所述序列的子序列, 如如下子序列, 其中从a)中定义的序列的N末端或C

末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0549] c) 与a) 或b) 中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,如至多9个取代、至多8、至多7、至多6、至多5、至多4、至多3、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0550] 37. 根据项16-36中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链或所述第二重链的恒定区如所述第二重链包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

[0551] a) SEQ ID NO:20或26中所示的序列[IgG1-F405L];

[0552] b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0553] c) 与a) 或b) 中定义的氨基酸序列相比,具有至多9个取代,如至多8、至多7、至多6、至多5、至多4、至多3、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0554] 38. 根据项16-36中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链或所述第二重链如所述第一重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

[0555] a) SEQ ID NO:21或27中所示的序列[IgG1-K409R];

[0556] b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0557] c) 与a) 或b) 中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,如至多9个取代、至多8、至多7、至多6、至多5、至多4个取代、至多3、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0558] 39. 根据项16-15中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一和/或第二重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

[0559] a) SEQ ID NO:22或28中所示的序列[IgG1-Fc_FEA];

[0560] b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0561] c) 与a) 或b) 中定义的氨基酸序列相比,具有至多7个取代,如至多6个取代、至多5、至多4、至多3、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0562] 40. 根据项16-39中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一和/或第二重链的恒定区如所述第二重链包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

[0563] a) SEQ ID NO:24或30中所示的序列[IgG1-Fc_FEAL];

[0564] b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0565] c) 与a) 或b) 中定义的氨基酸序列相比,具有至多6个取代,如至多5个取代、至多4个取代、至多3、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0566] 41. 根据项16-40中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一重链和/或所述第二重链如所述第一重链的恒定区包含选自以下的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成:

[0567] a) SEQ ID NO:23或29中所示的序列[IgG1-Fc_FEAR];

[0568] b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C

末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0569] c) 与a) 或b) 中定义的氨基酸序列相比,具有至多6个取代,如至多5个取代、至多4、至多3、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0570] 42. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂包含卡帕(κ)轻链恒定区。

[0571] 43. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂包含兰布达(λ)轻链恒定区。

[0572] 44. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一轻链恒定区是卡帕(κ)轻链恒定区或兰布达(λ)轻链恒定区。

[0573] 45. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第二轻链恒定区是兰布达(λ)轻链恒定区或卡帕(κ)轻链恒定区。

[0574] 46. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述第一轻链恒定区是卡帕(κ)轻链恒定区并且所述第二轻链恒定区是兰布达(λ)轻链恒定区,或所述第一轻链恒定区是兰布达(λ)轻链恒定区并且所述第二轻链恒定区是卡帕(κ)轻链恒定区。

[0575] 47. 根据项42-46中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述卡帕(κ)轻链包含选自以下的氨基酸序列:

[0576] a) SEQ ID NO:35中所示的序列,

[0577] b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0578] c) 与a) 或b) 中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,如至多9个取代、至多8、至多7、至多6、至多5、至多4个取代、至多3、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0579] 48. 根据项43-47中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述兰布达(λ)轻链包含选自以下的氨基酸序列:

[0580] a) SEQ ID NO:36中所示的序列,

[0581] b) a) 中的所述序列的子序列,如如下子序列,其中从a) 中定义的序列的N末端或C末端开始,缺失了1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸;以及

[0582] c) 与a) 或b) 中定义的氨基酸序列相比,具有至多10个取代,如至多9个取代、至多8、至多7、至多6、至多5、至多4个取代、至多3、至多2个取代或至多1个取代的序列。

[0583] 49. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型的。

[0584] 50. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂是全长IgG1抗体。

[0585] 51. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂是IgG1m(f) 同种异型的抗体。

[0586] 52. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂包含

[0587] i) 含有能够与CD137结合的所述抗原结合区的第一重链和第一轻链,其中所述第一重链包含SEQ ID NO:31中所示的序列,并且所述第一轻链包含SEQ ID NO:32中所示的序列;

[0588] ii) 含有能够与PD-L1结合的所述抗原结合区的第二重链和第二轻链,其中所述第

二重链包含SEQ ID NO:33中所示的序列,并且所述第二轻链包含SEQ ID NO:34中所示的序列。

[0589] 53.根据前述项中的任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂是阿卡顺利单抗或其生物类似物。

[0590] 54.根据前述项中的任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂在包含组氨酸、蔗糖和聚山梨醇酯-80的组合物或配制品中,并且具有5至6的pH。

[0591] 55.根据前述项中的任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂在包含约20mM组氨酸、约250mM蔗糖、约0.02%聚山梨醇酯-80并且具有约5.5的pH的组合物或配制品中。

[0592] 56.根据前述项中的任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂在包含10-30mg结合剂/mL如20mg结合剂/mL的组合物或配制品中。

[0593] 57.根据前述项中的任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂在如项54至56中任一项所定义的组合物中并且在施用之前在0.9%NaCl(盐水)中稀释。

[0594] 58.根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述受试者是人受试者。

[0595] 59.根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤或癌症是实体瘤或癌症。

[0596] 60.根据前述项中的任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤是PD-L1阳性肿瘤。

[0597] 61.根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤或癌症选自黑色素瘤、卵巢癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌(NSCLC))、结直肠癌、头颈癌、胃癌、乳腺癌、肾癌、尿路上皮癌、膀胱癌、食道癌、胰腺癌、肝癌、胸腺瘤和胸腺癌、脑癌、神经胶质瘤、肾上腺皮质瘤、甲状腺癌、其他皮肤癌、肉瘤、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓增生异常综合征、子宫内膜癌、前列腺癌、阴茎癌、宫颈癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、梅克尔细胞癌和间皮瘤。

[0598] 62.根据前述项中的任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤或癌症选自肺癌(例如,非小细胞肺癌(NSCLC))、尿路上皮癌(膀胱癌、输尿管癌、尿道癌或肾盂癌)、子宫内膜癌(EC)、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌(TNBC))和头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)(例如,口腔癌、咽癌或喉癌)。

[0599] 63.根据项61或62所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤或癌症是肺癌,特别是非小细胞肺癌(NSCLC),如鳞状或非鳞状NSCLC。

[0600] 64.根据项61至63中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤或癌症是转移性的,如转移性NSCLC。

[0601] 65.根据项61至64所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肺癌、特别是NSCLC不具有表皮生长因子(EGFR)敏感突变和/或间变性淋巴瘤(ALK)易位/ROS1重排。

[0602] 66.根据项61至65中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肺癌、特别是NSCLC包含癌细胞,并且例如如通过免疫组织化学(IHC)评估的,PD-L1在 $\geq 1\%$ 的所述癌细胞或肿瘤细胞中表达。

[0603] 67.根据项66所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肺癌、特别是NSCLC包含癌

细胞,并且例如如通过免疫组织化学(IHC)评估的,PD-L1在1%至49%的所述癌细胞或肿瘤细胞中表达。

[0604] 68.根据项66所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肺癌、特别是NSCLC包含癌细胞,并且例如如通过免疫组织化学(IHC)评估的,PD-L1在 $\geq 50\%$ 的所述癌细胞或肿瘤细胞中表达。

[0605] 69.根据前述项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述受试者未接受过转移性疾病的先前全身治疗。

[0606] 70.根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述受试者未接受过用检查点抑制剂的先前治疗;例如,PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂,如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0607] 71.根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述受试者未接受过用4-1BB(CD137)靶向剂如抗4-1BB(CD137)抗体、用抗肿瘤疫苗或用自体细胞免疫疗法的先前治疗。

[0608] 72.根据项1至68中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤或癌症在治疗如用检查点抑制剂的全身治疗后已复发和/或是难治性的。

[0609] 73.根据项1至68和72中任一项所述的结合剂,其中所述受试者接受过至少1个先前全身疗法线,如包含PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的全身疗法。

[0610] 74.根据项1至68、72和73中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中在用PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗后,所述癌症或肿瘤已复发和/或是难治性的,或者所述受试者已进展,其中所述PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。

[0611] 75.根据项1至68和72至74中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中最后的先前治疗是用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂,如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体,其中将所述PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂作为单一疗法或作为组合疗法的一部分施用。

[0612] 76.根据项1至68和72至74中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中自在用PD1抑制剂或PD-L1抑制剂如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的最后治疗中进展以来的时间是8个月或更少,如7个月或更少、6个月或更少、5个月或更少、4个月或更少、3个月或更少、2个月或更少、1个月或更少、3周或更少或者如2周或更少。

[0613] 77.根据项1至68和72至74中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中自作为最后的先前治疗的一部分的PD1抑制剂或PD-L1抑制剂如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的最后给药以来的时间是8个月或更少,如7个月或更少、6个月或更少、5个月或更少、4个月或更少、3个月或更少、2个月或更少、1个月或更少、3周或更少或者如2周或更少。

[0614] 78.根据项1至68和72至74中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中在以下期间或之后,所述癌症或肿瘤已复发和/或是难治性的,或者所述受试者已进展:

[0615] i) 在用抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗后的含铂双药化学疗法,或者

[0616] ii) 在含铂双药化学疗法后的用抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的治疗。

[0617] 79.根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述受试者未接受过用紫杉烷化学治疗剂例如多西他赛的先前治疗,如用紫杉烷化学治疗剂例如多西他赛对

NSCLC的先前治疗。

[0618] 80. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述结合剂和与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段在至少一个治疗周期中施用,每个治疗周期是三周(21天)或六周(42天)。

[0619] 81. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将一个剂量的所述结合剂和一个剂量的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段每三周施用一次(1Q3W)。

[0620] 82. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将一个剂量的所述结合剂和一个剂量的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段每六周施用一次(1Q6W)。

[0621] 83. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将一个剂量的所述结合剂和一个剂量的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段在每个治疗周期的第1天施用。

[0622] 84. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的所述结合剂的量为100mg。

[0623] 85. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段的量为200mg。

[0624] 86. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中在每个剂量中和/或在每个治疗周期中施用的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段的量为400mg。

[0625] 87. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将100mg剂量的所述结合剂和200mg剂量的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段每三周施用一次(1Q3W)。

[0626] 88. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将100mg剂量的所述结合剂和400mg剂量的与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段每六周施用一次(1Q6W)。

[0627] 89. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤或癌症是NSCLC;并且其中将100mg剂量的所述结合剂和200mg剂量的与PD-1结合的所述抗体每三周施用一次(1Q3W),如在每个三周治疗周期的第一天施用,所述结合剂是阿卡顺利单抗或其生物类似物,所述抗体是派姆单抗。

[0628] 90. 根据项1-88中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中所述肿瘤或癌症是NSCLC;并且其中将100mg剂量的所述结合剂和400mg剂量的与PD-1结合的所述抗体每六周施用一次(1Q6W),如在每个六周治疗周期的第一天施用,所述结合剂是阿卡顺利单抗或其生物类似物,所述抗体是派姆单抗。

[0629] 91. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中首先施用与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段,随后是所述结合剂。

[0630] 92. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将所述结合剂通过使用静脉内(IV)输注经最少30分钟如经最少60分钟施用。

[0631] 93. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将所述结合剂通过使用静脉内(IV)输注经30分钟施用。

[0632] 94. 根据前述项中任一项所述的用于所述用途的结合剂,其中将所述PD-1抑制剂以静脉内输注经30分钟施用。

[0633] 95. 一种试剂盒,所述试剂盒包含

[0634] (i) 含有与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区的结合剂

[0635] a) 所述第一结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 2、3和4, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 6、7和8,

[0636] b) 所述第二抗原结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 12、13和14, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 16、17和18,

[0637] 以及

[0638] (ii) 与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 43、44和45, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 46、47和48; 或者所述抗体包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 62、63和64, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 65、66和67。

[0639] 96. 根据项95所述的试剂盒, 其中所述结合剂和/或与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段是如项1至94中任一项所定义的。

[0640] 97. 根据项95或96所述的试剂盒, 其中所述结合剂和与PD-1结合的所述抗体或其抗原结合片段用于全身施用, 特别是用于注射或输注, 如静脉内注射或输注。

[0641] 98. 根据项95-97中任一项所述的试剂盒, 所述试剂盒用于在减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法中使用。

[0642] 99. 根据项98所述的用于所述用途的试剂盒, 其中所述肿瘤或癌症和/或所述受试者和/或所述方法是如项1-94中任一项所定义的。

[0643] 100. 一种用于减少或预防受试者的肿瘤进展或治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括在施用与PD-1结合的抗体或其抗原结合片段之前、同时或之后, 向所述受试者施用结合剂,

[0644] 其中所述结合剂包含与CD137结合的第一结合区和与PD-L1结合的第二结合区

[0645] a) 所述第一结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 2、3和4, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 6、7和8;

[0646] 并且

[0647] b) 所述第二抗原结合区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 12、13和14, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 16、17和18

[0648] 并且其中与PD-1结合的所述抗体包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 43、44和45, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 46、47和48, 或者与PD-1结合的所述抗体包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 62、63和64, 所述轻链可变区包含分别在以下中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列: SEQ ID NO: 65、66和67。

[0649] 101. 根据项100所述的方法, 其中所述肿瘤或癌症和/或所述受试者和/或所述方

法和/或所述结合剂和/或所述PD-1抑制剂是如项1-94中任一项所定义的。本公开文本的进一步方面在本文中公开。

[0650] 实施例

[0651] 实施例1:在纯化的CD8⁺ T细胞和同种异体成熟树突细胞 (mDC) 的共培养物中的细胞因子分泌

[0652] 方法

[0653] 来自健康供体的单核细胞和T细胞

[0654] CD14⁺单核细胞和纯化的CD8⁺ T细胞获自Precision Medicine或BioIVT。将同种异体供体对用于同种异体混合淋巴细胞反应 (MLR测定)。

[0655] 单核细胞向未成熟树突细胞的分化

[0656] 人CD14⁺单核细胞获自健康供体 (参见上文)。为了分化为未成熟树突细胞 (iDC), 将 $1-1.5 \times 10^6$ 个单核细胞/mL在37°C下在T25培养瓶 (Falcon, 目录号353108) 中的洛斯维帕克纪念研究所 (Roswell Park Memorial Institute, RPMI) 1640完全培养基 (ATCC改良配方; ThermoFisher, 目录号A1049101) 中培养六天, 所述完全培养基补充有10%热灭活胎牛血清 (FBS; Gibco, 目录号16140071)、100ng/mL粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF; BioLegend, 目录号766106) 和300ng/mL白介素-4 (IL-4; BioLegend, 目录号766206)。在这六天期间后, 将培养基用具有补充物的新鲜培养基替代。

[0657] iDC的成熟

[0658] 为使iDC成熟, 通过收集非贴壁细胞收获细胞, 将其计数, 以 $1-1.5 \times 10^6$ 个细胞/mL在补充有10%FBS、100ng/mL GM-CSF、300ng/mL IL-4和 $1 \times$ 脂多糖 (LPS; ThermoFisher, 目录号00-4976-93) 的RPMI 1640完全培养基中在37°C下孵育24h, 然后开始MLR测定。

[0659] 混合淋巴细胞反应 (MLR)

[0660] 在MLR测定开始的前一天, 将获自同种异体健康供体的纯化的CD8⁺ T细胞解冻。将细胞以 1×10^6 个细胞/mL在补充有10%FBS和10ng/mL IL-2 (BioLegend, 目录号589106) 的RPMI 1640完全培养基中重悬并且在37°C下孵育过夜。

[0661] 次日, 将LPS成熟的树突细胞 (mDC, 参见iDC的成熟) 和同种异体纯化的CD8⁺ T细胞收获, 并且分别以 4×10^5 个细胞/mL和 4×10^6 个细胞/mL在AIM-V培养基 (ThermoFisher, 目录号12055091) 中重悬。

[0662] 在共培养物中, 将20,000个mDC与200,000个同种异体纯化的CD8⁺ T细胞 (DC:T细胞比率为1:10) 在存在以下抗体的情况下在96孔圆底板 (Falcon, 目录号353227) 中的AIM-V培养基中在37°C下一起孵育: 单独的或与研究级派姆单抗 (0.1-30 μ g/mL或0.1-100 μ g/mL) 组合的GEN1046 (0.001-30 μ g/mL)、研究级派姆单抗 (0.1-30 μ g/mL或0.1-100 μ g/mL)、bsIgG1-PD-L1 $\times$ ctrl (30 μ g/mL)、bsIgG1-ctrl $\times$ 4-1BB (30 μ g/mL)、同种型对照抗体IgG4 (100 μ g/mL) 或IgG1-ctrl-FEAL (30 μ g/mL; 表5)。在5天后, 将板在500 $\times$ g下离心5min并且将上清液从每个孔小心地转移到新的96孔圆底板中。

[0663] 根据制造商的说明书, 在Envision仪器上使用Alpha Lisa IFN γ 试剂盒 (Perkin Elmer, 目录号AL217) 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 分析从MLR测定收集的上清液中的干扰素 (IFN) γ 水平。将TNF α 和IL-2作为Milliplex MAP-人细胞因子/TH17测试组套 (Millipore Sigma, 目录号SPR1526) 的一部分在Luminex FLEXMAP 3D仪器上进行测量。

[0664] 表5:

测试化合物	供应商, 目录号	包含SEQ ID NO
GEN1046	N/A	CD137结合臂: SEQ ID NO: 1、5、35、29 PD-L1结合臂: SEQ ID NO: 11、15、36、30
bsIgG1-PD-L1xctrl ¹	N/A	SEQ ID NO: 11、15、53、54、35、36、29、30
bsIgG1-ctrlx4-1BB ¹	N/A	SEQ ID NO: 35、36、1、5、35、36、29、30
IgG1-ctrl-FEAL ²	N/A	SEQ ID NO: 53、54、30
派姆单抗	Selleckchem, 目录号A2005(非临床/研究级形式的临床产品派姆单抗;批号A200504)	N/A
IgG4	Biolegend, 目录号403702(派姆单抗的同种型对照抗体)	N/A

[0666] ¹基于抗HIV gp120抗体IgG1-b12的对照结合部分 (Barbas等人, J Mol Biol 230: 812-823)

[0667] 结果

[0668] 在三个供体对中,与IgG1-ctrl-FEAL相比,GEN1046在纯化的CD8⁺ T细胞与同种异体mDC的共培养物中诱导IL-2分泌 (参见图2)。相比之下,与同种型对照IgG4抗体相比,派姆单抗仅诱导有限的IL-2增加(<50pg/mL)。与单独的GEN1046或派姆单抗相比,同时暴露于GEN1046和派姆单抗诱导IL-2的强效增加,与单独的GEN1046相比,IL-2的最大浓度增加约2-3倍。

[0669] 另外,在三个供体对中,与IgG1-ctrl-FEAL相比,GEN1046在纯化的CD8⁺ T细胞与同种异体mDC的共培养物中诱导IFN γ 分泌 (参见图3)。类似地,在所有三个供体对中,派姆单抗增强了IFN γ 分泌,但与GEN1046相比,其程度更有限。与单独的GEN1046或派姆单抗相比,同时暴露于GEN1046和派姆单抗诱导IFN γ 的进一步增加,尤其是在较低剂量的GEN1046 (<1 μ g/mL) 下。

[0670] 此外,在三个供体对中,与IgG1-ctrl-FEAL相比,GEN1046在纯化的CD8⁺ T细胞与同种异体mDC的共培养物中诱导TNF α 分泌 (参见图4)。相比之下,与GEN1046相比,派姆单抗仅诱导有限量的TNF α 。与单独的GEN1046相比,同时暴露于GEN1046和派姆单抗诱导TNF α 的轻微增加,尤其是在0.1 μ g/mL GEN1046与测试的所有浓度的派姆单抗下,指示效力左移。

[0671] 总之,这些结果表明,在mDC/CD8⁺ T细胞MLR测定中,相对于单独的每种抗体,组合GEN1046与派姆单抗增强了IFN γ 、IL-2和TNF α 分泌。虽然主要在低浓度的GEN1046下观察到IFN γ 的增强,但GEN1046与派姆单抗的组合在多种浓度下显示了IL-2的增强。

[0672] 实施例2:MC38小鼠结肠癌肿瘤生长

[0673] 方法

[0674] 将MC38小鼠结肠癌细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下在补充有10%热灭活胎牛血清的杜氏改良伊格尔培养基中培养。从在对数期生长的细胞培养物收获MC38细胞并且对所述细胞进行定量。

[0675] 将MC38细胞 (1 $\times$ 10⁶个肿瘤细胞/100 μ L PBS) 皮下注射于雌性C57BL/6小鼠 (获自Vital River Laboratories Research Models and Services;在实验开始时6-8周龄) 的

右下腹中。

[0676] 使用卡尺每周评价肿瘤生长三次。肿瘤体积 (mm³) 由卡尺测量结果计算为 ([长度] × [宽度]²) / 2, 其中长度是最长的肿瘤尺寸并且宽度是垂直于长度的最长肿瘤尺寸。

[0677] 当肿瘤的中值体积达到64mm³时开始处理。在处理之前将小鼠随机化到具有相等的平均肿瘤体积 (64mm³) 的组 (n=10/组) 中。在处理日, 向小鼠腹膜内注射mbsIgG2a-PD-L1x4-1BB (5mg/kg; 注射体积为10μL/g体重; 每周两剂持续三周[2QW×3])、抗小鼠PD-1抗体 (抗mPD-1; 10mg/kg; 注射体积为10μL/g体重; 2QW×3; 克隆RMP1-14; Leinco Technologies, 目录号P372)、mbsIgG2a-PD-L1x4-1BB (5mg/kg) 与抗mPD-1 (10mg/kg; 分两次注射 [mbsIgG2a-PD-L1x4-1BB, 随后在20min后抗mPD-1], 其中注射体积为10μL/g体重; 2QW×3) 的组合、或注射体积为10μL/g体重的PBS (表6)。

[0678] 每日监测小鼠的疾患的临床体征。在随机化后, 每周进行三次体重测量。当肿瘤体积超过1500mm³或当动物达到人道终点时 (例如, 当小鼠显示体重减轻>20%时、当肿瘤显示溃疡[>75%]时、当观察到严重的临床体征时和/或当肿瘤生长阻断小鼠的身体活动时), 对于单独小鼠的实验结束。

[0679] 表6. 处理组和给药方案

处理组	N/组	处理	剂量 ^a	给药途径	给药方案	Seq ID/ 供应商, 目录号
1	10	PBS	N/A	IP	2QW× 3 ^a	N/A
2	10	抗mPD-1	10 mg/kg	IP	2QW× 3 ^a	Leinco Technologies, 目录号P372
3	10	mbsIgG2a-PD-L1x4-1BB	5 mg/kg	IP	2QW× 3 ^a	Seq ID: 60、61、55、56、57、58、59
4	10	mbsIgG2a-PD-L1x4-1BB + 抗mPD-1	5 mg/kg + 10 mg/kg	IP	2QW× 3 ^a	Seq ID: 60、61、55、56、57、58、59 Leinco Technologies, 目录号P372

[0681] ^a 2QW×3; 每周两剂, 持续三周

[0682] 结果

[0683] 在用PBS处理的荷MC38小鼠中观察到迅速的肿瘤生长 (图5A)。在用抗mPD-1 (10mg/kg) 或mbsIgG2a-PD-L1x4-1BB (5mg/kg) 处理的小鼠中, 观察到延迟的肿瘤生长, 其中mbsIgG2a-PD-L1x4-1BB诱导的肿瘤生长延迟更明显 (图5A)。在用mbsIgG2a-PD-L1x4-1BB (5mg/kg) 与抗mPD-1 (10mg/kg; 二者均为2QW×3) 的组合处理的小鼠中, 在处理开始后第21天, 在6/10小鼠中观察到完全的肿瘤消退, 相比之下, 在该模型中对于单独的任一种药剂均未观察到完全的肿瘤消退 (图5A)。卡普兰-迈耶分析显示, 当与PBS处理组 (p<0.001) 相比以及单独的任一种抗体 (p≤0.001; Mantel-Cox; 图5B, 表7) 相比时, 用mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合处理诱导无进展存活率 (定义为具有小于500mm³的肿瘤体积的小鼠的百分比) 的显著增加。因此, 观察到该组合的治疗性协同作用, 其定义为与由作为单一疗法的每种药剂显示的活性相比更优的 (p<0.05) 抗肿瘤功效。

[0684] 这些结果为评价GEN1046与抗PD-1抗体的组合提供了理论基础, 所述GEN1046与抗PD-1抗体的组合用于进一步放大癌症患者的抗肿瘤免疫应答, 以产生持久且深入的临床反应并且提高存活率。

[0685] 表7. 通过mbsIgG2a-PD-L1x4-1BB、抗mPD-1 (单独的或组合的) 在C57BL/6小鼠的

MC38模型中诱导的无进展存活率的Mantel-Cox分析

所比较的处理组	无进展存活率 ¹		
	Mantel-Cox P值		
PBS	vs	抗mPD-1	0.012
PBS	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	<0.001
PBS	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB + 抗mPD-1	<0.001
抗mPD-1	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	0.515
抗mPD-1	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB + 抗mPD-1	0.001
mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB(5 mg/kg)	vs	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB + 抗mPD-1	<0.001

[0687] ¹将肿瘤体积<500mm³用作无进展存活率的截止点。在第45天进行Mantel-Cox分析。

[0688] 实施例3:用于确定在具有活性PD1/PD-L1轴的抗原特异性T细胞测定中GEN1046和抗PD-1抗体派姆单抗的增殖剂量反应的抗原特异性CD8⁺ T细胞增殖测定。

[0689] 为了测量DuoBody-PD-L1×4-1BB或派姆单抗对T细胞增殖的诱导,进行具有活性PD1/PD-L1轴的抗原特异性T细胞增殖测定。

[0690] HLA-A2+外周血单个核细胞(PBMC)获自健康供体(Transfusionszentale,大学医院,德国美因茨)。根据制造商的说明书,使用抗CD14微珠(Miltenyi;目录号130-050-201)通过磁激活细胞分选(MACS)技术从PBMC分离单核细胞。将外周血淋巴细胞(PBL,CD14阴性级分)冷冻以用于将来T细胞分离。为了分化为未成熟DC(iDC),将1x 10⁶个单核细胞/mL在含有以下的RPMI GlutaMAX(Life technologies GmbH,目录号61870-044)中培养五天:5%人AB血清(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,目录号H4522-100ML)、丙酮酸钠(Life technologies GmbH,目录号11360-039)、非必需氨基酸(Life technologies GmbH,目录号11140-035)、100IU/mL青霉素-链霉素(Life technologies GmbH,目录号15140-122)、1000IU/mL粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF;Miltenyi,目录号130-093-868)和1000IU/mL白介素-4(IL-4;Miltenyi,目录号130-093-924)。在这五天期间后,将一半的培养基用新鲜的培养基替代。通过收集非贴壁细胞收获iDC,并且通过在37℃下与含有2mM EDTA的PBS一起孵育10min来分离出贴壁细胞。在洗涤后,将iDC在含有10%v/v DMSO(AppliChem GmbH,目录号A3672,0050)+50%v/v人AB血清的RPMI GlutaMAX中冷冻,以用于将来的抗原特异性T细胞测定。

[0691] 在抗原特异性CD8⁺ T细胞增殖测定开始前一天,将来自同一供体的冷冻PBL和iDC解冻。根据制造商的说明书,使用抗CD8微珠(Miltenyi,目录号130-045-201)通过MACS技术从PBL分离CD8⁺ T细胞。将约10-15x 10⁶个CD8⁺ T细胞使用BTX ECM® 830电穿孔系统装置(BTX;500V,1x 3ms脉冲)在4mm电穿孔比色皿(VWR International GmbH,目录号732-0023)中使用以下进行电穿孔:在250μL X-Vivo15(Biozym Scientific GmbH,目录号881026)中的10μg的编码密封蛋白6特异性鼠TCR(HLA-A2限制性;描述于W02015150327A1中)的α链的体外翻译(IVT)-RNA加10μg的编码密封蛋白6特异性鼠TCR的β链的IVT-RNA加10μg的编码PD-1的IVT-RNA。电穿孔后立即将细胞转移到新鲜的补充有5%人AB血清的IMDM培养基(Life Technologies GmbH,目录号12440-061)中并且在37℃、5%CO₂下静置至少1小时。根据制造商的说明书使用在PBS中的1.6μM羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE;Invitrogen,目录号C34564)标记T细胞,并且将所述T细胞在补充有5%人AB血清的IMDM培养基中孵育过夜。

[0692] 使用如上所述的电穿孔系统(300V,1x 12ms脉冲),将至多 5×10^6 个解冻的iDC使用在250 μ L X-Vivo15培养基中的1 μ g (GEN1046剂量反应) 或3 μ g (派姆单抗剂量反应)的编码全长密封蛋白6的IVT-RNA进行电穿孔,并且在补充有5%人AB血清的IMDM培养基中孵育过夜。

[0693] 次日,收获细胞。通过流式细胞术检查DC上的密封蛋白6和PD-L1以及T细胞上的TCR和PD-1的细胞表面表达。将DC用Alexa647缀合的CLDN6特异性抗体(不可商购的;内部生产)以及用抗人CD274抗体(PD-L1,eBiosciences,目录号12-5983)染色,并且将T细胞用抗小鼠TCR β 链抗体(Becton Dickinson GmbH,目录号553174)以及用抗人CD279抗体(PD-1,eBioscience,目录号17-2799)染色。将电穿孔的DC与电穿孔的CFSE标记的T细胞以1:10的比率在存在GEN1046(以3倍连续稀释从1至0.00015 μ g/mL)或临床级派姆单抗(以4倍连续稀释从0.8至0.00005 μ g/mL;可瑞达(Keytruda),Phoenix Apotheke,PZN 10749897)的情况下在96孔圆底板中的补充有5%人AB血清的IMDM GlutaMAX中一起孵育。5天后在BD FACSCanto™II或BD FACSCelesta™流式细胞仪(Becton Dickinson GmbH)上进行基于CFSE稀释的T细胞增殖的流式细胞术分析。使用FlowJo软件10.7.1版分析所获取的数据。计算并且绘制随GEN1046或派姆单抗浓度变化的在每个处理条件下的扩增指数值(决定整个培养物的扩增倍数)。生成剂量反应曲线并且使用四参数对数拟合法在GraphPad Prism版本9(GraphPad Software, Inc.)中计算EC₂₀、EC₅₀、EC₉₀和希尔斜率值。

[0694] 以3倍连续稀释从1至0.00015 μ g/mL分析GEN1046剂量反应(图6A),其中EC₂₀、EC₅₀、EC₉₀和希尔斜率值在表8中给出。在所测试的四种供体中在平均EC₅₀为0.0064 μ g/mL的情况下观察到强的增殖诱导作用。

[0695] 以4倍连续稀释从0.8至0.00005 μ g/mL分析派姆单抗剂量反应(图6B),其中EC₅₀、EC₉₀和希尔斜率值在表9中给出。在所测试的四种供体中在平均EC₅₀为0.0149 μ g/mL的情况下观察到强的增殖诱导作用。

[0696] 表8. 基于如通过抗原特异性T细胞增殖测定测量的CD8⁺ T细胞扩增数据确定GEN1046的EC₂₀、EC₅₀和EC₉₀值。所示出的数据是基于四参数对数拟合法计算的值。

供体	EC ₅₀ 值 [μ g/mL]	希尔斜率	计算EC ₂₀ [μ g/mL]	计算EC ₉₀ [μ g/mL]
28	0.00754	1.485	0.00296	0.03311
89	0.00776	1.469	0.00302	0.03464
02	0.00523	1.910	0.00253	0.01651
72	0.00506	1.334	0.00179	0.02626
平均值	0.0064	1.549	0.0026	0.0276

[0698] 表9. 基于如通过抗原特异性T细胞增殖测定测量的CD8⁺ T细胞扩增数据确定批准的抗PD-1抗体派姆单抗的EC₅₀和EC₉₀值。所示出的数据是基于四参数对数拟合法计算的值。

[0699] 平均值是算术平均值。

[0700]

供体	EC ₅₀ 值 [μg/ml]	希尔斜率	计算EC ₉₀ [μg/ml]
26268_B	0.0218	1.122	0.1545
26685_A	0.0115	0.974	0.1098
26395_B	0.0113	0.9689	0.1091
平均值	0.0149	1.021	0.1245

[0701] 实施例4:在存在或不存在抗PD-1抗体派姆单抗的情况下,通过GEN1046实现的PD-1/PD-L1介导的T细胞抑制的释放以及对CD8⁺ T细胞增殖的另外的共刺激。

[0702] 为了测量GEN1046与抗PD-1抗体派姆单抗或IgG1-ctrl抗体的组合对T细胞增殖的诱导,进行了具有活性PD1/PD-L1轴的抗原特异性T细胞增殖测定(通用测定设置与实施例1类似)。简而言之,将密封蛋白6-IVT-RNA电穿孔的DC与密封蛋白6特异性TCR-RNA和PD1-IVT-RNA电穿孔的CFSE标记的T细胞(比率为1:10)在存在GEN1046与固定浓度的派姆单抗或同种型对照抗体IgG1-ctrl的组合的情况下在96孔圆底板中的补充有5%人AB血清的IMDM GlutaMAX中一起孵育。测试了三种不同浓度的GEN1046,表示先前实验中确定的最佳、半最大和次佳有效浓度(0.2μg/mL>EC90;0.0067μg/mL≈EC50;0.0022μg/mL≈EC20,参见实施例1,表1)。在0.8μg/mL的浓度(远高于派姆单抗的EC90值的浓度)下测试派姆单抗和IgG1-ctrl抗体(参见实施例1,表2)。培养基和0.8μg/mL IgG1-ctrl仅用于确定基线增殖。将派姆单抗(0.8μg/mL)用作另外的检查点抑制对照。5天后在BD FACSCanto™II或BD FACSCelesta™流式细胞仪(Becton Dickinson GmbH)上进行基于CFSE稀释的T细胞增殖的流式细胞术分析。使用FlowJo软件10.7.1版分析所获取的数据。使用GraphPad Prism版本9(GraphPad Software, Inc.)计算并且绘制在每个处理条件下的扩增指数值。

[0703] 对于测试的所有三个供体,在仅培养基中和在IgG1-ctrl处理的培养物中,表达PD-1和密封蛋白6特异性TCR的CD8⁺ T细胞与表达PD-L1和同源抗原的DC的孵育导致极小的增殖诱导,其中扩增指数值略高于1(参见图7)。通过向共培养环境中添加派姆单抗来释放PD-1:PD-L1介导的抑制,导致扩增指数适度增加,如图中虚线所指示的。在添加GEN1046后,观察到T细胞增殖的更明显的且剂量依赖性的增加,其中与中等和低浓度单一化合物处理条件相比,所测试的最高浓度导致最高的增殖诱导。值得注意的是,最低浓度为0.0022μg/mL的GEN1046(不与派姆单抗组合)导致这样的扩增指数值,其与对于仅派姆单抗对照记录的那些值持平或者甚至低于那些值,这表明次佳的PD-1:PD-L1检查点阻断。形成鲜明对比的是,不依赖所测试的GEN1046浓度,GEN1046与派姆单抗的组合的T细胞增殖诱导始终优于不具有派姆单抗的条件下的DuoBody-PD-L1x4-1BB。对于中等和低GEN1046浓度,在具有和不具有派姆单抗的条件之间扩增指数的差异特别大。特别地,在次佳GEN1046条件(0.0022μg/mL≈EC20)的情况下,派姆单抗的添加以与对于仅派姆单抗对照观察到的扩增指数相比显著更高的扩增指数诱导CD8⁺ T细胞增殖。

[0704] 实施例6:具有用于评价GEN1046在患有恶性实体瘤的受试者中的安全性的扩展队列的首次人体、开放标签、剂量递增试验

[0705] 本研究是GEN1046(DuoBody®PD L1×4 1BB)的开放标签、多中心、1/2a期安全性试验。试验由2部分组成:首次人体(FIH)剂量递增(1期)和扩展(2a期)。在患有实体恶性肿

瘤的受试者中通过剂量递增评价了GEN1046,以确定最大耐受剂量 (MTD) 或最大施用剂量和/或推荐的2期剂量 (RP2D)。

[0706] 对于以下癌症,扩展进一步评价在选择的实体瘤扩展队列中一个或多个所选剂量的安全性、耐受性、PK和抗肿瘤活性:非小细胞肺癌 (NSCLC) (PD-1/L1预治疗的和PD-1/L1未经治疗的)、尿路上皮癌 (UC)、子宫内膜癌 (EC)、三阴性乳腺癌 (TNBC) (在接受过用PD-1/L1抑制剂的先前治疗的受试者中以及在未接受过这种治疗的受试者中) 和头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)。

[0707] 表10:扩展队列

队列号	n	癌症类型	子队列	先前治疗	试验治疗
EC1	140	NSCLC		先前CPI治疗	GEN1046 100 mg 1Q3W
EC2	40	NSCLC		PD-1/L1未治疗过的	GEN1046 100 mg 1Q3W
EC3	40	UC		先前CPI治疗	GEN1046 100 mg 1Q3W
EC4	40	子宫内膜癌		PD-1/L1未治疗过的	GEN1046 100 mg 1Q3W

队列号	n	癌症类型	子队列	先前治疗	试验治疗
EC5	40	TNBC	5a	先前CPI治疗	GEN1046 100 mg 1Q3W
			5b	PD-1/L1未治疗过的	GEN1046 100 mg 1Q3W
EC6	40	SCCHN	6a	先前CPI治疗	GEN1046 100 mg 1Q3W
			6b	PD-1/L1未治疗过的	GEN1046 100 mg 1Q3W

[0710] 图8中提供了试验设计的示意图。在国际专利申请W0 2021/156326中提供了剂量递增和扩展队列的进一步披露内容,以及剂量递增的初步结果。

[0711] 扩展队列 (EC) A和B:用于转移性疾病的NSCLC初治:GEN1046与派姆单抗的组合

[0712] 扩展队列ECA and ECB在2个不同的给药时间表下评价100 mg GEN1046与派姆单抗的组合:

[0713] ECA测试100 mg 1Q3W的GEN1046方案与200 mg 1Q3W的派姆单抗方案。基于PK/药效学建模,预计该GEN1046方案导致峰值三聚体形成和持续的4-1BB激活,其与派姆单抗的组合可以允许两种靶标/途径的最佳接合和改善的抗肿瘤功效。

[0714] ECB评价100 mg 1Q6W的GEN1046方案与400 mg 1Q6W的派姆单抗方案。基于PK/药效学建模,与在3周给药周期中持续的4-1BB激活相比,该GEN1046方案预计在6周给药周期中提供4-1BB的间歇性/瞬时激活。4-1BB的瞬时激活预计允许T细胞应答的重置,并且减少慢性干扰素信号传导(Weber, E.W.等人(2021), Science 372(6537)),这可以预防由于连续的4-1BB激活导致的肿瘤浸润CD8⁺ T细胞的耗竭,并且与派姆单抗的组合可以提供改善应答深度和应答持续时间 (DoR)。

[0715] 200 mg Q3W和400 mg Q6W的派姆单抗方案已分别被批准作为用于NSCLC的第一线和第二线SOC治疗。

[0716] 治疗中止

- [0717] 治疗继续进行直到受试者满足治疗中止标准中的一个(请参见下文)。
- [0718] 入选标准
- [0719] 扩展队列A和B
- [0720] a. 未接受过用于转移性疾病的先前全身治疗方案的患有转移性NSCLC的受试者。受试者不得接受过用PD-1/L1抑制剂的先前治疗。受试者在最后的先前治疗中或之后必须具有射线照相的疾病进展。对于患有新诊断的疾病的受试者来说,这不是必需的。
- [0721] b. 患有任何组织学的NSCLC的受试者均入组。组织学或细胞学诊断为非鳞状NSCLC的受试者不得有EGFR敏感突变和/或ALK易位/ROS1重排。EGFR敏感突变是可以用批准的TKI治疗的那些突变。
- [0722] c. 受试者必须具有在第1周期的第1天(C1D1)之前可用的来自中心实验室的PD-L1表达结果,所述结果来自通过芯针或切除活检获得的新鲜肿瘤样品或者来自在转移性疾病确诊时切除的肿瘤组织。
- [0723] d. 肿瘤展示出在 $\geq 1\%$ 的肿瘤细胞(TPS $\geq 1\%$)中的PD-L1表达,如通过由中心实验室测试确定的免疫组织化学(IHC)评估的。
- [0724] 对于剂量递增和扩展两者
- [0725] 3. 受试者必须是年龄 ≥ 18 岁的男性或女性。
- [0726] 4. 受试者必须在任何试验相关的评估或程序之前签署知情同意书(ICF),表明他或她了解试验的目的和所需程序并且愿意参与试验。
- [0727] 5. 受试者必须患有符合RECIST 1.1的可测量的疾病。
- [0728] 6. 受试者必须具有东部肿瘤协作组(ECOG)0-1。
- [0729] 7. 受试者必须具有如下的器官和骨髓功能:
- [0730] a. 骨髓/血液学功能:
- [0731] 绝对嗜中性粒细胞计数(ANC) $\geq 1.5 \times 10^9/L$;血红蛋白 $\geq 9.0g/dL$;血小板计数 $\geq 100 \times 10^9/L$
- [0732] b. 肝功能:
- [0733] -总胆红素 $\leq$ 正常值上限(ULN)
- [0734] -ALT $\leq 1.5 \times$ ULN
- [0735] -AST $\leq 1.5 \times$ ULN
- [0736] -白蛋白 $\geq 30g/L$
- [0737] c. 凝血状态:
- [0738] -凝血酶原时间(PT)/国际标准化比率(INR) ≤ 1.5
- [0739] -活化部分凝血活酶时间(aPTT) $\leq 1.5 \times$ ULN(无抗凝疗法)
- [0740] -接受抗凝血疗法的受试者在预期使用抗凝血药的治疗范围内应进行PT和aPTT测试
- [0741] d. 肾功能:
- [0742] 肾小球滤过率(GFR) $\geq 45mL/min/1.73m^2$,例如根据简写的肾脏病饮食改良方程式:
- [0743] $GFR = 186 \times (SCr^{-1.154}) \times (\text{年龄}^{-0.203})$
- [0744] (其中SCr即血清肌酐水平以mg/dL表示;如果受试者是女性则乘以0.742;

[0745] 如果受试者是非洲裔美国人则乘以1.212 (Levey等人, 1999)。

[0746] 12.A) 在剂量递增部分, 所有受试者必须提供肿瘤组织样品 (福尔马林固定石蜡包埋块/载玻片), 所述肿瘤组织样品来自在第1周期第1天之前收集 (优选源自晚期疾病阶段) 的归档组织或新鲜活检物。

[0747] B) 在扩展部分, 所有受试者必须提供强制性新鲜活检物 (福尔马林固定石蜡包埋 [FFPE] 块/载玻片) (支气管镜引导活检物、细针抽吸物、细胞块、细胞沉淀、凝块、骨髓和细胞学样本是不可接受的), 所述强制性新鲜活检物含有肿瘤组织并且是在最后的先前治疗失败/停止后采集的。

[0748] 排除标准

[0749] 符合任何以下标准的任何潜在受试者都将被排除在参与试验之外。

[0750] 1. 受试者患有未被控制的并发症, 包括但不限于:

[0751] a. 持续感染或活动性感染, 需要用抗感染疗法的静脉内治疗并且在第一剂量之前小于2周已经施用。

[0752] b. 症状性充血性心力衰竭 (由纽约心脏协会分类为III或IV级)、不稳定型心绞痛或心律失常。

[0753] c. 定义为收缩压 ≥ 160 mmHg和/或舒张压 ≥ 100 mmHg的未被控制的高血压, 尽管有最佳的医疗管理。

[0754] d. 需要用全身免疫抑制治疗来治疗的重大自身免疫疾病的持续存在的或最近的 (在1年内) 证据, 这可能表明有免疫相关不良事件 (irAE) 的风险。

[0755] e. 应排除具有导致先前免疫疗法治疗的治疗中止的3级或更高级别的irAE病史的受试者。对于具有导致中止的低于3级的irAE的受试者, 应与申办者讨论。

[0756] f. 具有任何级别的肌炎、吉兰-巴雷综合征或重症肌无力的既往病史的受试者均被排除。

[0757] g. 具有慢性肝脏疾病的病史或具有肝硬化的证据。

[0758] h. 需要类固醇的非感染性肺炎的病史或目前患有肺炎。

[0759] i. 在第一剂量的GEN1046之前3个月内有器官同种异体移植史 (角膜移植除外) 或自体或同种异体骨髓移植史或干细胞救援史。

[0760] j. 严重的无法治愈的伤口、皮肤溃疡 (任何级别的) 或骨折。

[0761] 2. 所有受试者都应该经历脑的计算机断层扫描 (CT) 扫描或磁共振成像 (MRI) 以记录新的或现有的CNS病变。脑内动静脉畸形、脑动脉瘤、脊髓压迫 (疾病所致)、癌性脑膜炎或中风病史将被排除。

[0762] a. 允许在筛选之前 >1 个月的短暂性脑缺血发作。

[0763] b. 患有新鉴定的或已知不稳定的或症状性CNS转移瘤的受试者将被排除。先前治疗过脑转移瘤的受试者可以参加, 只要他们通过重复成像 (注意重复成像应该在试验筛选期间进行) 在放射学上稳定 (即, 没有进展的证据) 持续至少28天即可。受试者应该是临床上稳定的, 并且不应该在C1D1之前的14天内经历急性皮质类固醇疗法或类固醇逐渐减量或者接受过立体定向辐射或全脑辐射。慢性类固醇疗法是可接受的, 只要剂量在C1D1之前的最后14天是稳定的 (≤ 10 mg每日泼尼松或等效物) 即可。

[0764] 3. 先前疗法:

- [0765] a. 放射疗法：在第一次GEN1046施用之前14天内进行放射疗法。将允许姑息性放射疗法。
- [0766] b. 除非下文另有说明，否则在施用GEN1046之前（在28天内或在药物的至少5个半衰期后，以更短的时间为准），用抗癌剂治疗。可接收的例外是二磷酸盐（例如，帕米膦酸盐、唑来膦酸等）和地诺单抗。
- [0767] c. 受试者在计划的第一剂量的GEN1046之前28天内接受过任何研究药剂（包括研究疫苗）或使用过侵入性研究医疗装置或者当前入组了干预试验。
- [0768] 注：处于干预试验的随访阶段的受试者可以参加，条件是受试者在第一剂量的GEN1046的28天内未接受过研究药剂。
- [0769] d. 在GEN1046治疗开始之前3周内用减毒活疫苗进行的先前治疗。
- [0770] e. 慢性全身免疫抑制皮质类固醇剂量，即>10mg每日泼尼松，或在首次GEN1046施用之前14天内累积剂量>150mg泼尼松。替代疗法（例如，针对肾上腺或垂体功能不全的甲状腺素、胰岛素或生理性皮质类固醇替代疗法）不被认为是全身治疗的形式并且是被允许的。
- [0771] f. 在首次GEN1046施用之前4周接受过粒细胞集落刺激因子（G-CSF）或粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）支持或长期依赖输血。
- [0772] g. 对单克隆抗体（mAb）疗法的≥3级过敏反应的病史，以及对该试验过程中给予的任何药剂的已知或疑似过敏或不耐受。
- [0773] h. 在含CPI的治疗的前6周内因疾病进展而中止治疗的受试者。
- [0774] i. 用4-1BB（CD137）靶向剂的先前治疗。
- [0775] j. 在治疗开始之前12周内用T细胞激动剂或抗细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4靶向剂进行的先前治疗。
- [0776] 4. 尚未消退至基线水平或尚未消退至1级或更低级别的来自先前抗癌疗法的毒性，除了脱发、厌食、白癜风、疲劳、甲状腺功能亢进、甲状腺功能减退和周围神经病以外。厌食、甲状腺功能亢进、甲状腺功能减退和周围神经病必须恢复至≤2级。
- [0777] 5. 除了入选诊断之外的已知的过去或当前恶性肿瘤，以下情况除外：
- [0778] a. 1B期或更早期的宫颈癌。
- [0779] b. 非侵袭性基底细胞或鳞状细胞皮肤癌。
- [0780] c. 非侵袭性浅表性膀胱癌。
- [0781] d. 目前未检测到PSA的前列腺癌。
- [0782] e. BRCA1或BRCA2阳性卵巢癌受试者中的乳腺癌（不适用于乳腺癌扩展队列）。
- [0783] f. CR>2年持续时间的任何可治愈的癌症。
- [0784] 6. 已知对GEN1046或其赋形剂过敏、超敏感性或不耐受的受试者。
- [0785] 7. 受试者患有任何如下病症，对于所述病症，研究人员认为参与将不符合受试者的最大利益（例如损害安康）或可能阻止、限制或混淆协议规定的评估的任何病症。
- [0786] 8. 受试者在筛选之前4周内进行了大手术（例如，需要全身麻醉），或尚未完全从手术中恢复，或在受试者预期参与试验的时间期间有计划进行的手术。
- [0787] 注：将在局部麻醉下进行计划的手术程序的受试者可以参加。
- [0788] 9. 已知的人类免疫缺陷病毒（HIV）的血清阳性史。
- [0789] 10. 已知的乙型肝炎病史/阳性血清学（除非由于疫苗接种或已消退的自然感染而

免疫

[0790] ,或除非由于免疫球蛋白疗法而被动免疫接种):

[0791] a.乙型肝炎核心抗原的抗体的阳性测试结果

[0792] 和

[0793] b.乙型肝炎表面抗原的抗体的阴性测试结果。

[0794] 11.已知的病史或尚未治愈的持续存在的丙型肝炎感染。

[0795] 12.可能干扰受试者参与试验或对试验结果的评价的药物滥用、医疗、心理或社会状况。

[0796] 13.受试者之前在该试验中已经被给药。

[0797] 14.受试者是妊娠期或哺乳期的女性。

[0798] 15.按照当地处方信息,受试者有使用派姆单抗的禁忌证。

[0799] GEN1046的施用

[0800] 在所有程序和评估完成之后,在每个21天或42天治疗周期的第1天使用静脉内(IV)输注经最少60分钟施用GEN1046。

[0801] 在ECA and ECB中,受试者接受GEN1046 100mg 1Q3W与派姆单抗200mg 1Q3W的组合(ECA)或者GEN1046 100mg 1Q6W与派姆单抗400mg 1Q6W的组合(ECB)。

[0802] 派姆单抗的施用

[0803] ECA and ECB:在所有治疗前程序和评估完成之后,在每个3周或6周治疗周期的第1天分别施用派姆单抗200mg或400mg。

[0804] 首先施用派姆单抗,随后是GEN1046。将派姆单抗以静脉内输注经30分钟施用。在开始输注GEN1046之前,在派姆单抗之后必须迅速进行盐水冲洗以清洗管线。视情形而定,输注之间的时间为大约30分钟或更长时间。不建议派姆单抗的剂量减少。

[0805] 试验药物信息

[0806] GEN1046 (20mg/mL,在20mM组氨酸、250mM蔗糖、0.02%聚山梨醇酯80 (pH 5.5) 中配制) 是透明至乳白色的、无色至微黄色的溶液,其作为有待于(在现场) 在0.9%NaCl (盐水) 中稀释的用于输注的溶液浓缩液提供。

[0807] 派姆单抗(Keytruda®)输注液是无菌、不含防腐剂、透明至微乳白色、无色至微黄色的溶液,其需要稀释以用于静脉内输注。

[0808] 对GEN1046的输注相关反应(IRR)

[0809] 对于经历与GEN1046的施用相关的IRR的受试者:

[0810] • 1级:如果发生1级IRR,输注不需要中断,并且可以在密切的医疗监督下,由研究人员自行决定以输注速率的一半继续进行。

[0811] • 2-3级:如果发生2或3级IRR,输注应中断,并且制定适当的医疗管理。如果症状在一小时内消退至≤1级,可以在密切的医疗监督下,由研究人员自行决定

[0812] 以输注速率的一半重新开始输注。

[0813] o在试验中经历了先前输注相关的2或3级反应的受试者应预先用药。在随后的输注中预防IRR的预先用药可以根据当地指南由研究人员自行决定施用,但优选包括抗组胺(例如,苯海拉明50mg或等效的抗组胺药)、对乙酰氨基酚(acetaminophen/paracetamol)(例如,对乙酰氨基酚500-1000mg或等效物),并且如果认为有必要,受试者应接受100mg泼

尼松或等效物的建议的最大剂量下的皮质类固醇。

[0814] o如果受试者尽管预先用药但仍有第二次3级IRR, 则应停止输注并且受试者应退出治疗。

[0815] • 4级: 如果发生过敏反应或4级IRR, 应立即并且永久地中止施用GEN1046, 并且应进行适当的医学疗法。

[0816] 对派姆单抗的输注相关反应

[0817] 派姆单抗可以引起严重或危及生命的IRR, 包括严重超敏感性或过敏反应。体征和症状通常在药物输注期间或之后不久出现并且总体上在输注完成后24小时内完全消退。

[0818] 表11: 与派姆单抗相关的副作用

[0819]	最常见的副作用(≥ 20%的患者)	较不常见的副作用(可以是严重或危及生命的)
	• 疲劳 • 咳嗽 • 恶心 • 瘙痒 • 皮疹 • 食欲下降 • 便秘 • 关节痛 • 腹泻	• 免疫相关AE • 输注相关反应 • 请参考派姆单抗的局部标记

[0820] 治疗的中止

[0821] 受试者在每个3周或6周治疗周期的第1天接受GEN1046治疗, 直到符合预定义的中止治疗标准 (以下) 之一。

[0822] 队列ECA and ECB中的受试者分别在每个3周治疗周期的第1天或每个6周治疗周期的第1天接受派姆单抗与GEN1046的 combination 治疗, 直到疾病进展或者直到符合预定义的中止治疗标准中的1个。GEN1046和派姆单抗两者都应该中止。如果申办者的医学监查员批准, 受试者可以仅继续进行GEN1046或派姆单抗单一疗法。在两种药物都中止后, 受试者进入安全性随访期。

[0823] • 射线照相的疾病进展或通过iRECIST确认的射线照相的疾病进展

[0824] • 临床进展

[0825] • 失访

[0826] • 受试者要求中止治疗

[0827] • 死亡

[0828] • 需要中止试验治疗的不可接受的AE

[0829] • 研究人员认为停止试验治疗最符合受试者的利益

[0830] • 撤回同意书

[0831] • 妊娠功效评估

[0832] 所有受试者在筛选期间都进行了脑、胸部、腹部和骨盆的成像。对于患有SCCHN的受试者总是需要进行头和颈部成像。

[0833] 肿瘤成像优选通过计算机断层扫描 (CT) 获取。在筛选时定义至多5个靶病变 (每个

器官最多2个),并且在整个试验过程中进行跟踪。在整个试验过程中还对非靶病变进行了评估。筛选时的初始肿瘤成像在第一个剂量的日期之前21天内进行。现场审查筛选成像以确认受试者患有符合RECIST 1.1的可测量的疾病。

[0834] 试验中的成像每6周(± 7 天)进行一次持续50周,并且自第一剂量的日期之后每12周(± 7 天)进行一次,直到由研究人员评估疾病进展(除非研究人员选择继续治疗并且遵循iRECIST)、开始新的抗癌疗法、撤回同意书或死亡(以先发生者为准)。

[0835] RECIST 1.1标准用于次要终点反应评价(Eisenhauer等人,2009,Eur J Cancer 45,228-247.);iRECIST用于探索性终点反应评价(Seymour等人,2017,Lancet Oncol 18,e143-e152)。如果研究人员选择应用iRECIST,治疗应该继续直到PD得到验证。

[0836] 研究人员可以自行决定进行另外的CT扫描或MRI扫描,以确认反应或新症状。用于确认PR或CR的肿瘤成像应在观察到第一个反应指示后至少4周进行。

[0837] 疾病的iRECIST评估

[0838] iRECIST基于RECIST 1.1,但已进行修改,以解释使用免疫疗法观察到的独特反应模式。在该试验中,iRECIST作为探索性终点进行评价(Seymour等人,2017,Lancet Oncol 18,e143-e152)。

[0839] 在临床上稳定的参与者的PD的首个放射学证据之后至少4至7周,iRECIST疾病进展应得到确认。具有未经确认的疾病进展的受试者可以继续GEN1046治疗直到进展得到确认,只要受试者是临床上稳定的即可。临床上稳定的受试者必须符合以下标准:

[0840] • 受试者必须从继续GEN1046治疗中获得临床益处(如由研究人员评估的),并且不得有快速的疾病进展

[0841] • 受试者耐受GEN1046治疗

[0842] • 受试者必须具有稳定的ECOG状态

[0843] • 进展后的治疗将不会延迟用于预防疾病进展的严重并发症(例如,需要立即治疗的中枢神经系统转移瘤)的临近干预。

[0844] 任何临床上不稳定的受试者在首次出现射线照相的疾病进展时中止GEN1046治疗。如果重复成像显示iRECIST确认的疾病进展(iCPD),受试者将中止GEN1046治疗。

[0845] ECOG体能状态

[0846] 研究人员将在筛选时、每个周期的第1天以及治疗中止访视时评估ECOG体能状态。将使用ECOG体能状态量表指数(表12)对体能状态进行评分。

[0847] 表12:

得分	定义
0	完全活动,能够没有限制地进行所有正常活动。
1	重体力活动受限,但可自由走动并能够进行轻体力或静态性质的工作,例如轻体力家务、办公室工作。
[0848] 2	可自由走动并能够完全自理,但不能进行任何工作活动。 约超过50%的清醒时间可下地走动。
3	仅能够有限自理,超过50%的清醒时间卧床或坐在椅子上。
4	完全失能。不能进行任何自理。只能卧床或坐在椅子上。
5	死亡。

[0849] ECOG=东部肿瘤协作组。

[0850] 初步结果和结论

[0851] • 在FIH试验的递增阶段评价的25至1200mg Q3W的剂量是安全的并且总体上耐受性良好。未达到MTD。

[0852] • 安全性数据的初步评价显示没有剂量依赖性,表明关于AE的频率没有剂量反应。

[0853] • 在FIH试验的剂量递增阶段在80至200mg Q3W的GEN1046剂量下观察到符合RECIST v1.1的反应。另外,在100mg Q3W剂量的扩展中也观察到了反应。

[0854] • 在剂量水平 $\leq 200\text{mg}$ 下在外周血中观察到药效学标记物的一致调节(增殖[Ki67+]效应记忆CD8+ T细胞和总CD8+ T细胞以及增加的IFN γ 和IP-10水平)。在更高的剂量水平($\geq 400\text{mg}$)下观察到这些终点的调节减少。

[0855] • 半机械PK/药效学模型(参见WO 2021/156326中的实施例13)预测对三聚体形成的钟形反应,其在100mg Q3W附近达到峰值。为了平衡三聚体水平和与PD-L1R0相关的靶接合,选择100mg Q3W的剂量,所述剂量可以提供对GEN1046的最佳初始反应。

[0856] • 对于GEN1046单一疗法,接受过用检查点抑制剂的先前治疗的受试者的无进展存活期(PFS)更长(图9)。

[0857] • 在检查点抑制剂预治疗的NSCLC受试者中,对GEN1046单一疗法的临床反应与自最后的先前抗PD-1疗法起的时间相关(图12)

[0858] o 受益于GEN1046单一疗法的NSCLC受试者显示了倾向于更近期的用最后的抗PD-1剂治疗的趋势自含抗PD-1剂的疗法以来更短的时间可以表明残留的抗PD-1活性促进对GEN1046的反应。支持这一点的是,临床中用抗PD-1剂治疗的患者展现出治疗性抗体对PD-1受体的长期占有,这种占有可以持续超过200天(Brahmer等人, JCO 2010;28(19):3167-3175)。使治疗性 α -PD-1剂仍然与PD-1受体结合进而可以导致更大数量的可用于与GEN1046结合的游离PD-L1分子。残留的 α -PD-1活性的存在也可以允许更完全地阻断PD-1途径(阻断PD-1与PD-L1和PD-L2两者的相互作用),这可能对在CPI后环境中的GEN1046的生物活性是重要的。

[0859] 更近期的抗PD-1治疗可以例如通过启动抗肿瘤免疫应答对肿瘤微环境产生直接影响,所述抗肿瘤免疫应答可以通过GEN1046来增强,条件是在含抗PD-1的疗法中进展后立即给予或其后不久给予GEN1046。

[0860] o 反应者呈现出“低”PD-1+CD8T细胞频率,其可以反映通过先前 α -PD-1治疗实现的受体占有率(R0)

[0861] o 相反,无反应者呈现出总体上高的PD-1+CD8T细胞频率,其可以指示更耗竭的表型

[0862] 实施例8:在用具有免疫检查点抑制剂的标准护理疗法进行治疗后,在患有复发性/难治性转移性非小细胞肺癌的受试者中GEN1046作为单一疗法以及与派姆单抗组合的2期、多中心、随机化、开放标签试验

[0863] 试验设计

[0864] 试验是一项2期、多中心、随机化、开放标签试验,其评价GEN1046作为单一疗法以及派姆单抗的组合疗法在用含CPI的疗法治疗后在患有局部晚期或转移性NSCLC的成人受试者中的安全性和功效。

[0865] 大约126名受试者将入组试验,并且120名符合条件的受试者(每组中40名)将被随

机化到下文描述的治疗组之一。受试者必须提供新鲜的和/或归档的肿瘤组织,以用于对肿瘤中PD-L1的表达进行前瞻性的中心确认。具有非鳞状组织学的受试者的百分比将被限制在大约70%。随机化将依据PD-L1表达 (TPS $\geq$ 50%相比于1%至49%) 和组织学 (鳞状相比于非鳞状) 进行分层。

[0866] A.GEN1046 100mg Q3W用于前2个周期,随后GEN1046 500mg Q6W用于随后的周期

[0867] B.GEN1046 100mg Q3W与派姆单抗200mg Q3W组合

[0868] C.GEN1046 100mg Q6W与派姆单抗400mg Q6W组合

[0869] 在初步的安全性导入期间,6名受试者将入组到B组和C组 (每组3名受试者)。这些受试者将被密切监测并且随访持续最少3周。在这些队列的安全性导入完成后,将对收集的数据 (包括但不限于所有相关的安全性和临床数据) 进行评价。在此审查后,如果认为组合方案耐受良好,则将开始A组、B组和C组的随机化。

[0870] 受试者的治疗应继续进行,直到受试者达到以下定义的治疗中止标准之一。

[0871] 在试验药物的第一剂量之前在基线时以及在第一剂量之后6、12、18和24周 ($\pm$ 7天) 以及此后每9周 ($\pm$ 7天) 获得使用造影剂的计算机断层扫描 (CT) 或磁共振成像 (MRI)。将继续获得CT或MRI,直到疾病进展 (如由研究人员评估的)、随后的抗癌疗法开始、撤回同意书或死亡 (以先发生者为准)。实体瘤疗效评价标准 (RECIST) v1.1定义的疾病进展必须在最初记录的疾病进展 (PD) 后通过另外的确认性扫描来确认。任何临床上不稳定的受试者在首次出现射线照相的疾病进展时中止试验治疗,并且不需要重复成像以确认PD。如果怀疑对治疗的反应延迟,研究人员可以在RECIST v1.1定义的进展的时间之后继续治疗,条件是受试者正在经历临床益处。在受试者经历PD后,每12周收集一次存活状态,直到死亡、撤回同意书、失访或试验结束 (以先发生者为准)。还收集了随后的抗癌治疗和受试者对这些治疗的反应。在RECIST v1.1定义的进展之后的治疗期间,iRECIST用于评估后续进展。

[0872] 试验设计理论基础

[0873] 试验是一项随机化、开放标签试验,其评价GEN1046作为单一疗法或与派姆单抗组合在用含CPI的疗法治疗后在患有复发性/难治性转移性NSCLC的成人受试者中的安全性和功效。随机化用于消除潜在的分配偏倚,而开放标签设计将允许高效的AE/SAE管理。PD L1表达水平与派姆单抗的功效相关并且组织学是重要的基线疾病特征。随机化将分层以确保这2个因素在各组之间的平衡。

[0874] 主要目的是评价GEN1046作为单一疗法以及与派姆单抗组合的抗肿瘤活性客观反应率 (ORR)。ORR是在NSCLC的概念验证试验中用于评估抗肿瘤活性的完善的功效参数。

[0875] 剂量和时间表的理论依据

[0876] GEN1046的100mg Q3W剂量的选择是基于FIH试验 (GCT1046-01) 的临床数据,在所述试验中,在61名受试者中评价了在剂量递增阶段中从25至1200mg Q3W范围的剂量。此外,开发了PK/药效学模型来预测肿瘤中4-1BB、GEN1046、PD-L1三分子复合物 (三聚体) 形成和PD-L1的R0,以了解PK/药效学/功效的关系 (参见实施例9)。

[0877] 总之,基于实施例7中的剂量递增研究选择了100mg Q3W的GEN1046剂量。

[0878] A组将测试如下方案,即激活剂量的GEN1046 (100mg Q3W持续2个周期),随后更高的维持剂量的GEN1046 (对于随后的周期,施用500mg Q6W),所述方案基于以下:

[0879] • 半机械PK/药效学模型显示,在100mg Q3W的GEN1046方案下肿瘤中的三聚体形

成达到峰值,预计其提供连续的4-1BB激活并且被选为前2个周期的激活剂量。在GCT1046-01试验中,来自扩展队列的临床数据显示100mg Q3W剂量在前2个周期内导致反应。

[0880] • 在前2个周期之后将使用GEN1046 500mg Q6W的维持方案,并且与100mg Q3W相比,预计在给药周期中提供更高的PD-L1RO并且提供更小程度的经由接合三聚体的间歇性4-1BB激活。该剂量预计提供改善的反应持续时间(DOR)。

[0881] B组和C组将在2种不同的给药时间表下评价GEN1046与派姆单抗的组合:

[0882] • B组将测试100mg Q3W的GEN1046方案和200mg Q3W的派姆单抗方案。在该方案中,预计GEN1046导致峰值三聚体形成和持续的4-1BB激活,其与派姆单抗的组合可以允许两种靶标/途径的最佳接合和改善的抗肿瘤功效。

[0883] • C组将评价100mg Q6W的GEN1046方案与400mg Q6W的派姆单抗方案。基于PK/药效学模型,与在3周给药周期中持续的4-1BB激活相比,GEN1046预计在6周的给药周期中提供4-1BB的间歇性/瞬时激活。4-1BB的瞬时激活预计允许T细胞应答的重置并且减少慢性干扰素信号传导(Weber, E.W.等人(2021), Science 372 (6537)),这可以预防由于连续的4-1BB激活导致的肿瘤浸润CD8⁺ T细胞的耗竭,并且与派姆单抗组合可以提供改善的深度和DOR。

[0884] 200mg Q3W和400mg Q6W的派姆单抗方案已分别被批准作为用于NSCLC的第一线和第二线SOC治疗。派姆单抗200mg Q3W和400mg Q6W预计提供可比较的功效和安全性特征(Lala等人, 2020, Eur J Cancer 131, 68-75)。

[0885] 入选标准

[0886] 1. 受试者必须至少18岁。

[0887] 2. 受试者必须具有组织学或细胞学证实的4期NSCLC诊断,并且接受过用于转移性疾病的至少1个先前的含抗PD-1/PD-L1mAb的全身疗法线。

[0888] 注意:受试者必须接受过至少2个剂量的批准用于NSCLC的经批准的抗PD-1/PD-L1mAb。

[0889] a. 受试者在使用作为单一疗法或作为SOC组合施用的1个抗PD-1/PD-L1mAb的治疗期间或之后有进展。

[0890] b. 受试者在抗PD-1/PD-L1mAb后的含铂双药化学疗法期间或之后有进展。

[0891] c. 受试者在含铂双药化学疗法后的抗PD-1/PD-L1mAb期间或之后有进展。

[0892] 3. 受试者必须具有在筛查期间由中心实验室评估的TPS $\geq 1\%$ 的PD-L1肿瘤表达得分。

[0893] 4. 受试者必须患有符合RECIST v1.1的可测量的疾病。

[0894] 5. 受试者的东部肿瘤协作组(ECOG)体能状态(PS)必须 ≤ 1 。

[0895] 6. 受试者必须具有至少3个月的期望寿命。

[0896] 7. 受试者必须具有如下的器官和骨髓功能:

[0897] a. 绝对嗜中性粒细胞计数(ANC) $\geq 1500/L$ 。

[0898] b. 血小板 $\geq 100,000/L$ 。

[0899] c. 血红蛋白 $\geq 9.0g/dL$ (在随机化之前4周内没有输血)。

[0900] d. 总胆红素 $\leq 1.5 \times$ 机构正常值上限(ULN) (吉尔伯特综合征除外,则直接胆红素 $\leq 2 \times$ 机构ULN并且总胆红素 $< 3mg/dL$)。

[0901] e. 丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST) $\leq 3 \times$ ULN。在伴有碱性磷酸酶增加

>2.5×ULN的情况下,ALT和AST水平必须≤1.5×ULN。

[0902] f.根据简写的肾脏病饮食改良方程式的肾小球滤过率≥45mL/min/1.73m²。

[0903] g.凝血酶原时间(PT)/国际标准化比率(INR)≤1.5×ULN(除非受试者正在接受抗凝血疗法,在这种情况下,PT应在抗凝血药预期使用的治疗范围内)。

[0904] h.活化部分凝血活酶时间(aPTT)≤1.5x ULN(除非受试者正在接受抗凝血疗法,在这种情况下,aPTT应在抗凝血药预期使用的治疗范围内)。

[0905] 排除标准

[0906] 符合任何以下标准的任何潜在受试者都将被排除在参与试验之外。

[0907] 1.已知的EGFR、ROS1或ALK突变或基因重排的记录。如果突变状态的记录是不可用的,对于具有非鳞状组织学或非鳞状和鳞状的混合组织学的受试者,任何年龄的福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)肿瘤组织都应该提交给申办者指定的中心实验室以进行生物标记物检测组套测试(其可以包括但不限于BRAF、METex 14跳跃、KRAS突变、RET重排、高水平MET扩增或NTRK基因融合(infusion))。不得随机化受试者,直到在现场的源记录中可获得生物标记物状态。

[0908] 2.受试者已暴露于以下先前疗法中的任一个:

[0909] a.用于NSCLC的使用多西他赛的先前治疗。

[0910] b.使用4-1BB(CD137)靶向剂、任何类型的抗肿瘤疫苗或自体细胞免疫疗法的先前治疗。

[0911] c.在GEN1046施用之前28天内用抗癌剂治疗。

[0912] d.用于治疗4期NSCLC的任何研究药剂。

[0913] e.在GEN1046启动之前30天内用减毒活疫苗进行的先前治疗。活疫苗的例子包括但不限于以下:麻疹、腮腺炎、风疹、水痘(varicella)/带状疱疹(水痘(chickenpox))、黄热病、狂犬病、卡介苗和伤寒疫苗。注射用季节性流感疫苗通常是灭活病毒疫苗并且是被允许的;然而,鼻内流感疫苗(例如FluMist®)是减毒活疫苗并且是不被允许的。不允许进行实验性和/或未经授权的SARS-CoV-2疫苗接种。

[0914] f.在第一次GEN1046施用之前14天内的放射疗法。如果受试者接受了>30Gy的放射疗法,他们必须已从来自干预的毒性和/或并发症中恢复。

[0915] g.慢性全身免疫抑制皮质类固醇剂量,即>10mg每日泼尼松,或在首次GEN1046施用之前14天内累积剂量>150mg泼尼松。替代疗法(例如,针对肾上腺或垂体功能不全的甲状腺素、胰岛素或生理性皮质类固醇替代疗法)不被认为是全身治疗的形式并且是被允许的。

[0916] h.在首次GEN1046施用之前4周接受过粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子支持或长期依赖输血。

[0917] 3.受试者在计划的第一剂量的GEN1046之前28天内使用过侵入性研究医疗装置或者当前入组了干预试验。

[0918] 4.受试者在含免疫CPI的治疗的前6周内因疾病进展而中止治疗。

[0919] 5.受试者在入组该试验之前>250天接受过他们最后剂量的抗PD-1/PD-L1 mAb。

[0920] 6.受试者患有除了入选诊断之外的已知的过去或当前恶性肿瘤,以下情况除外:非黑色素瘤皮肤癌;膀胱、胃、结肠、宫颈/异型增生、子宫内膜、黑色素瘤或乳腺的原位癌;以及具有完全反应>2年持续时间并且不需要或预计不需要任何另外的疗法的任何可治愈

癌症。

[0921] 7. 所有受试者都应该经历脑的CT扫描或MRI,以记录新的或现有的中枢神经系统(CNS)病变。具有脑内动静脉畸形、脑动脉瘤、进行性脑转移瘤、脊髓压迫(因疾病所致)或中风病史的受试者将被排除。

[0922] 8. 具有已知的不稳定CNS转移瘤和任何活动性癌性脑膜炎或其病史的受试者将被排除。先前治疗过脑转移瘤的受试者可以参加,只要他们通过重复成像(注意重复成像应该在试验筛选期间进行)在放射学上稳定(即,没有进展的证据)持续至少28天即可。受试者应该是临床上稳定的,并且不应该在C1D1之前的14天内经历急性皮质类固醇疗法或类固醇逐渐减量或者接受过立体定向辐射或全脑辐射。慢性类固醇疗法是可接受的,只要剂量在C1D1之前的最后14天是稳定的(≤ 10 mg每日泼尼松或等效物)即可。

[0923] 9. 已知对GEN1046或其赋形剂过敏、超敏感性或不耐受的受试者。

[0924] 10. 按照当地处方信息,受试者有使用派姆单抗的禁忌证。

[0925] 11. 在入组该试验时或在最后剂量的GEN1046之后6个月内,受试者是妊娠期、哺乳期或计划要妊娠的女性。

[0926] 12. 在入组该试验时或在最后剂量的GEN1046之后6个月内,受试者是计划要孩子的男性。

[0927] 13. 受试者具有活动性间质性肺疾病或活动性非传染性肺炎的证据。

[0928] 14. 受试者具有以下中的任一种:

[0929] a. 持续感染或活动性感染,需要用抗感染疗法的静脉内治疗并且在第一剂量之前 < 2 周已经施用。

[0930] b. 症状性充血性心力衰竭(由纽约心脏协会分类为III或IV级)、不稳定型心绞痛或心律失常。

[0931] c. 定义为收缩压 ≥ 160 mmHg和/或舒张压 ≥ 100 mmHg的未被控制的高血压,尽管有最佳的医疗管理。

[0932] d. 需要用全身免疫抑制治疗来治疗的重大自身免疫疾病的持续存在的或最近的(在6个月内)证据,这可能表明有irAE的风险。

[0933] e. 持续存在的 ≥ 2 级感觉或运动神经病。

[0934] a. 严重的、无法愈合的伤口、皮肤溃疡或骨折。

[0935] f. 可能干扰受试者参与试验或对试验结果的评价的药物滥用、医疗、心理或社会状况。

[0936] 15. 受试者具有以下任一种的已知病史:

[0937] a. 导致先前免疫疗法治疗的治疗中止的3级或更高级别的irAE。

[0938] b. 肌炎、吉兰-巴雷综合征或任何级别的重症肌无力。

[0939] c. 肝脏疾病(例如,酒精性肝炎或非酒精性脂肪性肝炎、药物相关的肝炎或自身免疫肝炎或者肝硬化的证据)。

[0940] d. 在第一剂量的GEN1046之前3个月内有器官同种异体移植(角膜移植除外)或自体或同种异体骨髓移植或干细胞救援史。

[0941] e. 对单克隆抗体疗法的3级或更高级别的过敏反应,以及对该试验过程中给予的任何药剂的已知或疑似过敏或不耐受。

[0942] f.与先前治疗相关的持续存在的 ≥ 2 级毒性(脱发除外),除非研究人员认为AE是临床上不显著的和/或在支持疗法后稳定。

[0943] 16.受试者接受过大手术(例如,需要延长的恢复期),并且在参加该试验之前不会完全恢复到其先前基线状态。

[0944] 17.受试者具有已知的人类免疫缺陷病毒HIV的血清阳性史。

[0945] 18.受试者具有乙型肝炎病毒(HBV)史/阳性血清学(除非因疫苗接种或已消退的自然感染而免疫,或除非因免疫球蛋白疗法而被动免疫接种):

[0946] a.乙型肝炎核心抗原的抗体(抗HBc)的阳性测试结果

[0947] 和

[0948] b.乙型肝炎表面抗原的抗体(抗HBs)的阴性测试结果。

[0949] 19.受试者具有尚未治愈的持续存在的丙型肝炎病毒(HCV)感染病史。

[0950] 20.受试者具有HBV(定义为乙型肝炎表面抗原[HBsAg]或HBV DNA阳性)或已知的活动性HCV病毒(定义为检测到HCV RNA[定性])感染病史。

[0951] 21.受试者患有任何如下病症,对于所述病症,研究人员认为参与将不符合受试者的最大利益(例如损害安康)或可能阻止、限制或混淆协议规定的评估的任何病症。

[0952] 施用的试验治疗

[0953] 如表13中所述施用试验治疗,直到符合以下中止标准中的1个或多个。

[0954] GEN1046和派姆单抗将作为静脉内输注液由合格的现场人员施用。在药物产品制备和处理期间,应避免剧烈混合或摇动。因为产品不含任何抗微生物防腐剂或抑菌剂,所以必须小心确保制备的溶液是无菌的。

[0955] 表13:治疗施用

[0956]	组	治疗	剂量 (mg)	剂量 配制品	途径	给药说明	时间表	周期长度
	A	GEN1046	100	溶液浓缩液	IV	30分钟输注	一次	3周
[0957]	A	GEN1046	500	溶液浓缩液	IV	30分钟输注	一次	6周
	B	GEN1046	100	溶液浓缩液	IV	30分钟输注	一次	3周
	B	派姆单抗	200	溶液	IV	按照处方信息,30分钟输注	一次	3周
	C	GEN1046	100	溶液浓缩液	IV	30分钟输注	一次	6周
	C	派姆单抗	400	溶液	IV	按照处方信息,30分钟输注	一次	6周

[0958] GEN1046单一疗法

[0959] 在A组中,将GEN1046 100mg Q3W在前2个治疗周期的第1天以30分钟静脉内输注施用;之后,将GEN1046 500mg Q6W在随后6周治疗周期的第1天以30分钟静脉内输注施用。不允许减少GEN1046剂量。

[0960] GEN1046和派姆单抗

[0961] 在B组中,将在每3周周期的第1天施用GEN1046 100mg和派姆单抗200mg。

[0962] 在C组中,将在每6周周期的第1天施用GEN1046 100mg和派姆单抗400mg。

[0963] 首先施用派姆单抗,随后是GEN1046。在开始输注GEN1046之前,在派姆单抗之后迅速进行盐水冲洗以清洗管线。视情形而定,输注之间的时间为大约30分钟或更长时间。不允许GEN1046和/或派姆单抗的剂量减少。

[0964] 试验治疗的说明

[0965] GEN1046 (20mg/mL, 在20mM组氨酸、250mM蔗糖、0.02%聚山梨醇酯80 (pH 5.5) 中配制) 是透明至乳白色的、无色至微黄色的溶液, 其作为有待于 (在现场) 在0.9%NaCl (盐水) 中稀释的用于输注的溶液浓缩液提供。

[0966] 派姆单抗 (Keytruda®) 输注液是无菌、不含防腐剂、透明至微乳白色、无色至微黄色的溶液, 其需要稀释以用于静脉内输注。

[0967] 试验治疗中止

[0968] 如果发生以下事件则受试者的试验治疗必须中止:

[0969] • 不可接受的需要治疗中止的AE*

[0970] • 受试者不依从

[0971] • 受试者要求中止试验治疗*

[0972] • 妊娠

[0973] • 临床进展*

[0974] • 疾病进展 (根据反应标准)

[0975] 存活状态

[0976] 从最后的GEN1046剂量的当天开始并且持续直到受试者死亡或退出试验, 每12周 (±14天) 评估一次存活状态。不能进行该评估的受试者或其指定家庭成员不能进行该评估的受试者, 将被输入为“失访”。

[0977] 受试者退出试验

[0978] 受试者将因以下原因之一退出试验:

[0979] • 死亡

[0980] • 失访

[0981] • 受试者撤回同意书

[0982] • 试验停止

[0983] • 申办者终止试验

[0984] 如果受试者在展示PD之前中止试验治疗并且退出试验, 则应获得治疗结束评估。

[0985] 功效评估

[0986] 根据RECIST v1.1标准 (Eisenhauer等人, 2009) 对肿瘤反应进行本地评估。成像评估收集计划呈现如下。另外, 如果可行, 收集先前的肿瘤扫描图像。

[0987] 成像数据通过由申办者指定的成像合同研究组织 (CRO) 集中收集并且检查质量。当地研究人员的评估将用于主要终点分析以及用于做出治疗决策。

[0988] 表14: 成像评估收集计划

程序	筛选/基线	在治疗/随访期间
胸部、腹部和骨盆CT或MRI(使用静脉内造影剂增强)	获授权的	获授权的
脑CT或MRI	如果临床上有指示	如果在基线时记录了病变,则遵循与胸部、腹部和骨盆的CT/MRI相同的时间表
全身骨扫描 (按照机构的护理标准 [例如, Tc-99骨扫描、全身骨MRI、FDG-PET或NaF PET])	如果临床上有指示	如果临床上有指示
定位的骨CT、MRI或X射线	在胸部、腹部和骨盆CT或MRI上不可见,在全身骨扫描上鉴定的任何病变	如果在基线时记录了病变,则遵循与胸部、腹部和骨盆的CT/MRI相同的时间表
其他转移性部位(例如,颈部)的CT或MRI	如果临床上有指示	如果在基线时记录了病变,则遵循与胸部、腹部和骨盆的CT/MRI相同的时间表

[0990] 缩写:CT=计算机断层扫描;MRI=磁共振成像;PET=正电子发射断层扫描。

[0991] 对于在初始RECIST定义的疾病进展之后继续试验治疗的受试者,必须继续进行功效评估。

[0992] 如果在不具有如由研究人员评估的RECIST定义的疾病进展的情况下受试者中止试验治疗,则必须继续进行试验中成像,直到RECIST定义的疾病进展、随后的抗癌疗法开始、撤回同意书、死亡或失访(以先发生者为准)。

[0993] 基线成像评估

[0994] 在第一剂量的试验治疗施用的21天内(C1D1之前的第-21天至第-1天)在筛选/基线时进行成像评估。转移性疾病的所有部位在基线时都被报告为靶病变或非靶病变,并且在整个试验过程中进行跟踪。

[0995] 在治疗开始之前21天内对受试者进行常规评价期间(包括在签署主要试验ICF之前)已经完成的任何成像评估,只有在它们满足试验的技术成像要求的情况下才可以被视为该试验的基线图像。在随机化后获得的任何成像评估都不能被视为基线图像。

[0996] 所有预先安排的肿瘤成像(包括筛选)必须包括胸部、腹部和骨盆的完整成像。肿瘤成像强烈优选通过使用碘化造影剂的CT来获取。对于腹部和骨盆,在以下情况下可以使用MRI:禁用使用碘化造影剂的CT,或当地实践要求使用MRI。胸部成像必须通过CT进行,但当禁用碘化造影剂时可以在没有造影剂的情况下进行。

[0997] MRI是用于大脑成像的强烈优选方式。在已知或疑似脑转移瘤的情况下,在基线时完成脑MRI。造影剂增强的脑MRI是优选的;然而,如果禁用MRI造影剂,那么可以接受未使用造影剂的MRI或使用/未使用造影剂的CT。

[0998] 先前用放射疗法治疗过的任何潜在可测量的病变都应被视为不可测量的病变。然而,如果先前用放射疗法治疗的病变自放射疗法后有清晰进展,则它可以被视为可测量的病变。

[0999] 基线后成像评估

[1000] 如表14中描述的成像评估使用在基线时使用的相同成像方式进行,而不考虑试验治疗中断或实际给药。试验中成像在前24周每6周(±7天)进行一次,并且从第一剂量的日期之后每9周(±7天)进行一次,直到疾病进展(如由研究人员评估的)、开始随后的抗癌疗

法、撤回同意书、死亡或失访(以先发生者为准)。使用第一剂量的试验治疗的日期作为参考来安排成像评估,并且这种安排无论用试验药物的治疗是暂时停用或进行预先安排的评估都会被遵守。

[1001] 如有必要,可以在试验期间的任何时间由研究人员自行决定进行另外的成像评估,以支持受试者的功效评价。在任何时间有临床怀疑的疾病进展都要求立即进行体格检查和成像评估,而不是等待下一次预先安排的成像评估。

[1002] 在整个试验过程中,在基线时评估的每个病变都必须通过成像方法以及在可能的情况下由相同的当地放射科医生/医师进行评估,使得比较是一致的。如果因为怀疑有进展而进行计划外的成像评估,则随后的成像评估应按照原始成像时间表进行。

[1003] 只有在以下情况下才可以使用组合的正电子发射断层扫描(PET)-CT:CT与不使用PET的情况下进行的CT(包括使用静脉内造影剂)具有类似的诊断质量。由研究人员自行决定,可以进行FDG-PET扫描以记载符合RECIST 1.1的PD。

[1004] 无进展存活期2

[1005] 无进展存活期2(PFS2)被定义为从第一次输注到在下一线治疗中客观肿瘤进展或因任何原因而死亡的时间。对于PFS2,客观肿瘤进展将基于研究人员对在下一线疗法中的进展的评估来确定。为此,将记录随后的抗肿瘤疗法,包括开始/结束日期、中止的原因和疾病进展的日期。

[1006] 疾病的iRECIST评估

[1007] 在临床上稳定的参与者的PD的首个放射学证据之后至少4-7周,iRECIST疾病进展应得到确认。具有未经确认的疾病进展的受试者可以继续试验治疗直到进展得到确认,只要受试者是临床上稳定的即可。

[1008] 临床上稳定的受试者必须符合以下标准:

[1009] • 受试者必须从继续GEN1046或GEN1046组合方案中获得临床益处(如由研究人员评估的),并且不得有快速的疾病进展。

[1010] • 受试者耐受试验治疗。

[1011] • 受试者必须具有稳定的ECOG状态。

[1012] • 进展后的治疗将不会延迟用于预防疾病进展的严重并发症(例如,需要立即治疗的中枢神经系统转移瘤)的临近干预。

[1013] 任何临床上不稳定的受试者在首次出现射线照相的疾病进展时中止试验治疗。不需要对临床上不稳定的受试者进行重复成像以按iRECIST确认PD;然而,在与申办者商讨后,研究人员可以自行决定获得进展确认扫描。

[1014] 如果重复成像显示iRECIST确认的疾病进展(iCPD),则受试者将中止试验治疗。然而,如果在观察到iCPD后受试者得到益处,则继续试验治疗的例外情况必须获得申办者医学监查员的批准。如果重复成像显示iRECIST疾病稳定(iSD)、iRECIST部分反应(iPR)或iRECIST完全反应(iCR),则应继续每6周(± 7 天)进行成像并且受试者应继续试验治疗。

[1015] 初步结果

[1016] 截至2022年8月10日,4名患者已入组C组的安全性导入部分并且第4名患者的DLT期已完成。在可评价的受试者中没有报告DLT,并且没有一个报告的SAE与研究药物(GEN1046或派姆单抗)相关。1名受试者经历部分反应并且1名受试者疾病稳定。

[1017] 实施例9:药代动力学/药效学模型

[1018] 开发了综合定量系统药理学(QSP)模型,所述模型将多室生理药代动力学(PBPK)模型与机械系统生物模型组合,表示发生于肿瘤微环境和引流淋巴结中的肿瘤/免疫过程和相互作用。PBPK模型描述了FcRn介导的GEN1046在健康组织空间和肿瘤空间(其中通过淋巴流介导返回血浆)中的转运和分布。机械系统生物学模型旨在重演涉及肿瘤增殖的已知生物学、癌症/免疫循环以及与GEN1046和抗PD1药物派姆单抗的活性直接相关的机制。模型充分利用了广泛的文献、临床前数据、药代动力学数据和药效学数据以用于这些途径的参数化。将模型用于生成涵盖观察到的关键标记物(例如,基线时PD-1和PD-L1表达)变化性的虚拟患者群体,并且用于预测当GEN1046和派姆单抗作为单一疗法或组合给予时的客观反应率(ORR)。基于对于派姆单抗(来自文献的数据)和GEN1046单一疗法临床试验观察到的客观反应率(ORR)来验证模型。对作为单一疗法或与200mg Q3W或400mg Q6W的批准剂量的派姆单抗组合给予的100mg Q3W或100mg Q6W的GEN1046进行评价。

[1019] 在对于以100mg Q3W或Q6W与派姆单抗组合给予的GEN1046的部分反应(PR)率和完全反应(CR)率两者中均观察到弱剂量依赖性关系。对PR率和CR率的预测显示了在GEN1046 100mg与300mg Q3W之间的最大反应。另外,预测显示了在以Q3W或Q6W给予时在GEN1046与派姆单抗之间的最小差异(图11)。

[1020] 实施例10:在LPS成熟树突细胞和体外耗竭的T细胞的同种异体MLR测定中GEN1046与派姆单抗的组合对细胞因子分泌的影响

[1021] 目的:为了分析GEN1046与派姆单抗的组合是否可以在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中逆转T细胞耗竭,将人成熟树突细胞(mDC)和体外耗竭的T细胞(Tex)的四个独特同种异体对在存在单独的GEN1046、单独的派姆单抗或两种抗体的组合的情况下共培养。通过流式细胞术确定Tex上抑制性受体的表达并且在共培养的上清液中评估干扰素(IFN) γ 的分泌。

[1022] 方法

[1023] 来自健康供体的单核细胞和T细胞

[1024] CD14⁺单核细胞和纯化的CD3⁺ T细胞获自BioIVT。四个独特的同种异体供体对用于MLR测定。

[1025] 单核细胞向未成熟树突细胞的分化

[1026] 人CD14⁺单核细胞获自健康供体。为了分化为未成熟树突细胞(iDC),将 $1-1.5 \times 10^6$ 个单核细胞/mL在37℃下在T25培养瓶(Falcon,目录号353108)中的洛斯维帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute, RPMI) 1640完全培养基(ATCC改良配方; ThermoFisher,目录号A1049101)中培养六天,所述完全培养基补充有10%热灭活胎牛血清(FBS; Gibco,目录号16140071)、100ng/mL粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF; BioLegend,目录号766106)和300ng/mL白介素(IL)-4(BioLegend,目录号766206)。在四天后,将培养基用新鲜培养基和补充物替代。

[1027] iDC向mDC的分化

[1028] 在MLR测定开始之前,通过收集非贴壁细胞收获iDC,并且通过将 $1-1.5 \times 10^6$ 个细胞/mL在补充有10%FBS、100ng/mL GM-CSF、300ng/mL IL-4和5 μ g/mL脂多糖(LPS; ThermoFisher,目录号00-4976-93)的RPMI 1640完全培养基中在37℃下孵育24h来分化为mDC。

[1029] T细胞的耗竭

[1030] 将获自健康供体的纯化CD3⁺ T细胞解冻,并且以 1×10^6 个细胞/mL在补充有5%FBS和10ng/mL IL-2 (BioLegend, 目录号589106)的AIM-V培养基(ThermoFisher, 目录号12055091)中重悬。为了生成具有耗竭样表型的T细胞,将细胞用Dynabeads™人T激活剂CD3/CD28 (Gibco, 目录号11161D)以1:1的珠:细胞比率在37℃和5%CO₂下刺激两轮,持续48小时。通过对CD3/CD28再刺激的低反应性(缺乏IFN γ 的分泌)确认T细胞的耗竭表型,如下所述。抑制性受体TIM3、LAG3和PD-1的高表达与耗竭表型一致。在两轮刺激后,使耗竭的CD3⁺ T细胞(Tex)静息24h。

[1031] 作为幼稚对照,将获自健康供体的纯化的CD3⁺ T细胞在开始MLR测定的前一天解冻,以 1×10^6 个细胞/mL在补充有10%FBS和10ng/mL IL-2的RPMI 1640完全培养基中重悬并且在37℃下孵育过夜。在MLR测定之前,收集幼稚T细胞和Tex的等分试样以用于流式细胞术。

[1032] 流式细胞术

[1033] 为了在Tex上的抑制性受体的流式细胞术分析,将细胞在400×g下沉淀5min,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤,再次沉淀,在补充有LIVE/DEAD™可固定近IR死细胞染色剂(ThermoFisher Scientific, 目录号L10119, 1:500稀释)或活力活/死蓝(ThermoFisher Scientific, 目录号L2305, 1:500稀释)的1mL PBS中重悬,并且在4℃下在黑暗中孵育20min。接下来,将细胞洗涤,沉淀,在含5%人血清(Sigma, 目录号H4522)的FACS缓冲液(补充有0.5%牛血清白蛋白[BSA, Sigma, 目录号A9576]和2mM乙二胺四乙酸[EDTA, Invitrogen, 目录号15575-038]的杜氏磷酸盐缓冲盐水[DPBS, Gibco, 目录号14190136])中重悬至 8×10^6 个细胞/mL,并且在4℃下孵育15min。然后将含 2×10^5 个细胞的25μL转移到新的96孔板(含有具有在补充有Brilliant Stain Buffer Plus (BD Horizon, 目录号566385)的FACS缓冲液中稀释的表15中所示的荧光标记的抗体的150μL染色混合物)中,并且在黑暗中在室温下孵育20min。将细胞沉淀,使用FACS缓冲液洗涤,在100μL固定缓冲液(Biolegend, 目录号420801)中重悬并且在4℃下在黑暗中孵育15min。将细胞再次沉淀,洗涤并且在100μL FACS缓冲液中重悬。将样品在Cytex® Aurora流式细胞仪(Cytex Biosciences)上分析。

[1034] 表15:用于流式细胞术的抗体

[1035]

标记物	荧光色素	克隆	供应商	目录号	滴度
TIM3	BV421	7D3	BD	565562	1:60
PD-1	PerCP-eFluor 710	J105	Thermofisher	46-2799-42	1:15
Lag3	PE	11C3C65	Biolegend	369306	1:30
4-1BB	PE-Cy5	4B4-1	Biolegend	309808	1:30
Ki67	BV786	B56	BD	563756	1:150

[1036] MLR测定

[1037] 收获mDC(参见iDC向mDC的分化)并且将其以 4×10^5 个细胞/mL在AIM-V培养基中重悬。收获Tex和幼稚CD3⁺ T细胞(参见T细胞的耗竭)并且将其以 4×10^6 个细胞/mL在AIM-V培养基中重悬。将mDC与Tex的共培养物以1:4或1:10的DC:T细胞比率(对应于将 2×10^4 个mDC与 8×10^4 或 2×10^5 个Tex一起孵育)接种,并且在存在派姆单抗(1μg/mL;非临床/研究级形式

的临床产品派姆单抗;Selleckchem,目录号A2005)或GEN1046(0.001-30 μ g/mL)作为单一药剂或这两种药剂的组合的情况下在96孔圆底板(Falcon,目录号353227)中的AIM-V培养基中在37 $^{\circ}$ C下培养5天。包括用bsIgG1-PD-L1 $\times$ ctrl(30 μ g/mL)、bsIgG1-ctrl $\times$ 4-1BB(30 μ g/mL)、IgG1-ctrl-FEAL(30 μ g/mL)或IgG4同种型对照(1 μ g/mL)处理的共培养物作为对照(表16)。同时,将在1:10的DC:T细胞比率(对应于将 2×10^4 个mDC与 2×10^5 个T细胞一起孵育)下的mDC和幼稚CD3 $^{+}$ T细胞的共培养物在具有和不具有1 μ g/mL派姆单抗的情况下培养。在5天后,将板在500 $\times$ g下离心5min并且将上清液从每个孔小心地转移到新的96孔圆底板中。

[1038] 根据制造商的说明书,在Envision仪器上使用AlphaLISA IFN γ 试剂盒(Perkin Elmer,目录号AL217)通过酶联免疫吸附测定(ELISA)分析收集的上清液中的IFN γ 水平。

[1039] 表16:抗体

测试化合物	供应商, 目录号	包含SEQ ID NO
GEN1046	N/A	CD137结合臂: SEQ ID NO: 1、5、35、29 PD-L1结合臂: SEQ ID NO: 11、15、36、30
bsIgG1-PD-L1 $\times$ ctrl ¹	N/A	SEQ ID NO: 11、15、53、54、35、36、29、30
bsIgG1-ctrl $\times$ 4-1BB ¹	N/A	SEQ ID NO: 35、36、1、5、53、54、29、30
IgG1-ctrl-FEAL ¹	N/A	SEQ ID NO: 53、54、30、35
派姆单抗	Selleckchem, 目录号A2005, 批号A200504(非临床/研究级形式的临床产品派姆单抗)	N/A
IgG4同种型对照	Biolegend, 目录号403702(派姆单抗的同种型对照抗体)	N/A

[1041] ¹基于抗HIV gp120抗体IgG1-b12的对照结合部分(Barbas等人,J Mol Biol 1993,230:812-823)

[1042] 最高单一药剂(HSA)协同作用分析

[1043] 将每个处理条件下的细胞因子浓度值通过减去背景对照值(无处理对照孔)进行归一化,并且表示为测定中最大值的百分比。通过将观察到的反应与使用最高单一药剂(HSA)参考模型得到的预期反应进行比较来定量组合效果,所述预期反应被定义为在对应浓度下的最大单一药物反应。

[1044] 结果与结论

[1045] 在用CD3/CD28珠的刺激两轮后,T细胞变得对双重抗CD3和抗CD28刺激具有低反应性,这与如通过IFN γ 分泌减少所展示的耗竭表型一致(图12A)。此外,与幼稚T细胞相比,T细胞显示了抑制性受体TIM3、LAG3和PD-1的表达增加(图12B)以及增殖标记物Ki67的表达减少(图12C),这与耗竭样表型一致。

[1046] 与mDC和幼稚CD3 $^{+}$ T细胞的MLR测定相比,mDC和Tex的MLR测定中IFN γ 分泌减少也是明显的(图13)。用作为单一药剂的派姆单抗或GEN1046的治疗部分地挽救IFN γ 分泌。与这些mDC:Tex MLR测定中的单一药剂活性相比, $\geq 0.1\mu$ g/mL GEN1046与1 μ g/mL派姆单抗的组合进一步加强了IFN γ 的分泌(图13),并且基于HSA模型显示了协同作用(图14)。这些数据表明,耗竭的T细胞的细胞因子分泌的丧失可以通过GEN1046与派姆单抗的组合而部分逆转。

[1047] 实施例11:在用mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合处理后对MC38小鼠结肠癌肿瘤生长的抗肿瘤活性

[1048] 目的:为了研究在C57BL/6小鼠中MC38结肠癌模型中单独的或与抗mPD-1组合的mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB抗体的抗肿瘤活性。

[1049] 方法

[1050] 将MC38小鼠结肠癌细胞在37℃、5%CO₂下在补充有10%热灭活胎牛血清的杜氏改良伊格尔培养基中培养。从在对数期生长的细胞培养物收获MC38细胞并且对所述细胞进行定量。

[1051] 将MC38细胞(在100μL PBS中的1×10⁶个肿瘤细胞)注射于雌性C57BL/6小鼠(获自Shanghai Lingchang Biotechnology Co.,Ltd and Services;在实验开始时6-8周龄)的右下腹中。

[1052] 使用卡尺每周评价肿瘤生长三次。肿瘤体积(mm³)由卡尺测量结果计算为([长度]×[宽度]²)/2,其中长度是最长的肿瘤尺寸并且宽度是垂直于长度的最长肿瘤尺寸。

[1053] 当肿瘤的平均体积达到60mm³时开始处理。在处理之前将小鼠随机化到具有相等的平均肿瘤体积的组(n=10/组)中。在处理日(每周两剂持续三周[2QW×3]),向小鼠腹膜内注射10μL/g体重的注射体积的表17中所指示的抗体。对于组合处理,以两次分开的注射(其中间隔20min)来注射抗体(表17)。剂量水平基于先前在MC38小鼠模型中用这些抗体的经验。

[1054] 每日监测小鼠的疾患的临床体征。在随机化后,每周进行三次体重测量。抗体及其组合耐受良好,因为小鼠显示处理后最小的体重减轻(<20%),而不是体重增加。当肿瘤体积超过1500mm³或当动物达到人道终点时(例如,当小鼠显示体重减轻20%时、当肿瘤显示溃疡[>75%]时、当观察到严重的临床体征时和/或当肿瘤生长阻断小鼠的身体活动时),对于单独小鼠的实验结束。

[1055] 表17.处理组和给药方案

处理组	N/组	处理	剂量	给药方案	Seq id/ 供应商, 目录号
1	10	mIgG2a-ctrl-AAKR	5 mg/kg	2QW×3	Seq id: 53、54、58、59
2	10	抗mPD-1	10 mg/kg	2QW×3	克隆RMP1-14, Leinco Technologies, 目录号P372
3	10	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB	5 mg/kg	2QW×3	Seq id: 55、56、57、58、59、60、61
4	10	mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB ^a + 抗mPD-1	5 mg/kg + 10 mg/kg	2QW×3	参见上文: 2组和3组

[1057] ^a首先注射mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB并且在20min后注射第二抗体

[1058] 在开始处理后121天,将在抗体处理后显示肿瘤完全消退的小鼠用MC38肿瘤细胞再激发。在小鼠的原始肿瘤细胞接种的对侧腹部接种1×10⁶个新鲜MC38肿瘤细胞。作为肿瘤生长的对照处理,一组年龄匹配的未经处理的C57BL/6小鼠(n=6)接种来自相同细胞培养物的MC38肿瘤细胞。

[1059] 结果

[1060] 在用非结合对照抗体mIgG2a-ctrl-AAKR(5mg/kg;图15A)处理的荷MC38小鼠中观

观察到迅速的肿瘤生长。在用作为单一药剂的抗小鼠PD-1抗体(抗mPD-1;10mg/kg)或mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB(5mg/kg;图15A)处理的小鼠中观察到延迟的肿瘤生长,其中由mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB诱导的肿瘤生长延迟更明显。与单独的每一种药剂相比,在用mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB(5mg/kg)与抗mPD-1(10mg/kg;两者均为2QW $\times$ 3)的组合处理的小鼠中,肿瘤生长进一步延迟(图15A),并且在处理开始后第23天在4/10小鼠中观察到完全的肿瘤消退(相比之下,对于单独的mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB和抗mPD-1分别在1/10和0/10小鼠中观察到完全的肿瘤消退;表18)。卡普兰-迈耶分析显示,当与对照抗体处理组($p < 0.001$)相比以及与单独的任一种抗体($p < 0.05$;Mantel-Cox;图15B,表19)相比时,用mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB与抗mPD-1的组合处理导致无进展存活率(定义为具有小于500mm³的肿瘤体积的小鼠的百分比)的显著增加。因此,观察到该组合的治疗性协同作用,其定义为与由作为单一疗法的每种药剂显示的活性相比更优的($p < 0.05$)抗肿瘤功效。

[1061] 在开始用抗体处理之后第121天,将肿瘤完全消退(例如,其中在观察期的持续时间内肿瘤完全消失)的小鼠(表18)和对照组的六只年龄匹配的肿瘤未经处理的小鼠用皮下注射的MC38肿瘤细胞(再)激发。将对照组的六只年龄匹配的肿瘤未经处理的小鼠同时皮下注射MC38肿瘤细胞。在所有未经处理的小鼠中,MC38肿瘤在接种肿瘤之后第24天生长至1,500mm³,而在再激发的小鼠中,在再刺激之后35天的整个随访时间段(最初接种MC38肿瘤细胞之后156天)期间没有观察到肿瘤生长,这与免疫记忆的发展一致(图16)。

[1062] 这些结果为评价GEN1046与抗PD-1抗体的组合提供了理论基础,所述GEN1046与抗PD-1抗体的组合用于进一步放大癌症患者的抗肿瘤免疫应答,以产生持久且深入的临床反应并且提高存活率。

[1063] 表18. 在处理荷MC38肿瘤小鼠之后的完全肿瘤消退。

处理组	处理	剂量	完全肿瘤消退 (具有CR的小鼠数量/ 每组小鼠的总数量)
[1064]	1	mIgG2a-ctrl-AAKR	5 mg/kg
	2	抗mPD-1	10 mg/kg
	3	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB	5 mg/kg
	4	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	5 mg/kg + 10 mg/kg
			0/10
			0/10
			1/10
			4/10

[1065] 表19. 对通过mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB、抗mPD-1或其组合在C57BL/6小鼠的MC38模型中诱导无进展存活率的Mantel-Cox分析

所比较的处理组				无进展存活率 ¹
				Mantel-Cox P值
[1066]	mIgG2a-ctrl-AAKR	相比于	抗mPD-1	0.008
	mIgG2a-ctrl-AAKR	相比于	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB	0.002
	mIgG2a-ctrl-AAKR	相比于	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	<0.001
	抗mPD-1	相比于	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB	0.070
	抗mPD-1	相比于	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	<0.001
	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB	相比于	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	0.043

[1067] ¹将肿瘤体积<500mm³用作无进展存活率的截止点。在第69天进行Mantel-Cox分析。

[1068] ²p值<0.05被认为是显著的实施例12:mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB与抗mPD-1的组合经由不同的和互补的免疫调节作用加强MC38小鼠结肠癌肿瘤模型中的抗肿瘤免疫

[1069] 目的:如实施例2和实施例11中所述的,在C57BL/6小鼠的MC38结肠癌模型中,

mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合显示了具有持久反应的强效抗肿瘤活性。因此，将该模型用于进一步研究mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合在体内的作用机制。将荷MC38小鼠用mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB、抗mPD-1或其组合处理。

[1070] 方法

[1071] MC38结肠癌模型

[1072] 将来自两个独立研究的MC38小鼠结肠癌肿瘤收集以用于免疫组织化学和流式细胞术评估，以表征mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB和抗mPD-1作为单一疗法和组合的体内活性。

[1073] 如实施例2和实施例11中所述建立MC38肿瘤模型。当肿瘤达到肿瘤体积50-70mm³时，开始对荷MC38SC肿瘤小鼠的处理。在处理之前将小鼠随机化到具有相等的平均肿瘤体积的组中。在处理日（每周两剂持续两周[2QW×2]），向小鼠腹膜内注射10μL/g体重的注射体积的表20中所指示的抗体。对于组合处理，以两次分开的注射（其中间隔20 min）来注射抗体（表20）。

[1074] 每日监测小鼠的疾患的临床体征。在随机化后，每周进行三次体重测量。在处理开始之后第7天或第14天，将小鼠（每组n=5）安乐死以切除肿瘤。

[1075] 表20. 处理组和给药方案

[1076]	处理组	处理	剂量	给药方案	Seq id/ 供应商，目录号
	1	PBS	N/a	2QW×2	n/a
	2	抗mPD-1	10 mg/kg	2QW×2	克隆RMP1-14, Leinco Technologies, 目录号P372
	3	mbsIgG2a-PD-L1×4-1 BB	5 mg/kg	2QW×2	Seq id: 55、56、57、58、59、60、61
	4	mbsIgG2a-PD-L1×4-1 BB ^a + 抗mPD-1	5 mg/kg + 10 mg/kg	2QW×2	参见上文：2组和3组

[1077] ^a首先注射mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB并且在20 min后注射第二抗体

[1078] 肿瘤组织的免疫组织化学和原位杂交

[1079] 将肿瘤剖开，在福尔马林中固定，用石蜡包埋并且切片（4μm）。为了组织学评估，将肿瘤切片脱石蜡并且使用Tissue-Tek Prisma Plus自动化载玻片着色器（Sakura）用Tissue-Tek Prisma H&E染色试剂盒（Sakura[加利福尼亚州托伦斯]，6190）进行染色。为了评价肿瘤内CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺细胞，将切片脱石蜡并且将抗原使用CC1缓冲液（Roche，950-124）修复，随后淬灭内源性过氧化物酶（Dako Agilent，S2003）并且使用Roche VentanaDiscovery（DISC）自动染色器平台用阻断缓冲液（Roche，05268869001）阻断非特异性结合位点。将切片与一抗（表21中列出的）一起孵育，所述一抗使用抗兔免疫组织化学检测试剂盒检测：对于CD3和CD4仅用抗兔DISC，Omnimap（Roche，05269679001），对于CD8相继用DISC抗兔HQ（Roche，07017812001）和DISC，并且对于扩增使用抗HQHRP多聚体（Roche，06442544001）。将HRP根据制造商的说明书使用3，3'-二氨基联苯胺（ChromoMap DAB；Roche，05266645001）可视化。为了评价肿瘤内的PD-L1⁺细胞，将切片脱石蜡并且将抗原使用ER2缓冲液（Leica Biosystems，AR9640）修复，随后淬灭内源性过氧化物酶（Dako Agilent，S2003）并且使用Leica Bond Rx自动染色器平台用阻断缓冲液（Leica Biosystems，DS9800）阻断非特异性结合位点。将切片与一抗（表21中列出的）一起孵育，所述一抗根据制造商的说明书使用抗兔免疫组织化学检测试剂盒（LeicaBiosystems，

DS9800) 进行检测。为了评价肿瘤内的4-1BB⁺和PD-L2⁺细胞,在Leica BondRx上用对应的RNAscope探针(ACDBio,分别为493658和447788)和RNAscope检测试剂盒(ACDBio,322150)进行RNAscope测定,以检测基因特异性mRNA分子。在所有测定中,将核通过与Mayer苏木精一起孵育进行复染。通过在连续的组织切片上掺入同种型、阳性和阴性对照染色来控制染色特异性。对染色的载玻片进行全玻片成像(Zeiss,Axioscan),并且将全玻片图像上传到Halo软件(Indica Labs,新墨西哥州阿尔伯克基),并且使用预编程软件分析工具用Halo软件进行分析,以确定CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和PD-L1⁺细胞(CytoNuclear v2.0.9)以及确定4-1BB⁺和PD-L2⁺细胞(ISH v4.1.3)。对CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和PD-L1⁺细胞的定量数据随后表示为标记物阳性细胞占细胞总数的百分比。通过创建四个RNAscope强度桶并且用以下式计算H得分,将4-1BB⁺和PD-L2⁺细胞的定量数据表示为RNAscope H得分:H得分=[(0 x具有0个点的细胞/细胞%)+(1 x具有1-3个点的细胞/细胞%)+(2 x具有4-9个点的细胞/细胞%)+(3 x具有10-15个点的细胞/细胞%)+(4 x具有>15个点的细胞/细胞%)]。

[1080] 表21. 用于免疫组织化学的抗体

靶标	标记	克隆	供应商	目录号
CD3	未缀合	2GV6	Ventana	790-4341
CD4	未缀合	EPR19514	Abcam	Ab183685
CD8 α	未缀合	D4W2Z	Cell Signaling Technology	98941
PD-L1	未缀合	D5V3B	Cell Signalling Technology	64988

[1082] 肿瘤组织的流式细胞术

[1083] 将分离的肿瘤细胞用1 μ g/mL小鼠BD Fc Block(Fc阻断缓冲液;BD,目录号553141)在4℃下在黑暗中阻断10min。为了细胞表面标记物的染色,将在Fc阻断缓冲液中稀释的表22中描述的荧光标记的抗体混合物(Ki67和GzmB除外)添加到细胞中,并且在4℃下避光孵育30min。对于细胞内染色(Ki67和GzmB),将细胞通过以下方式透化:与在Fix/Perm稀释缓冲液(1:4;eBioscience,目录号00-5223)中稀释的200 μ L Fix/Perm浓缩液(eBioscience,目录号00-5123)在室温下避光孵育30min。在透化缓冲液(eBioscience,目录号00-8333)中洗涤两次后,将细胞与在透化缓冲液中稀释的Ki67和GzmB抗体(表22)在室温下避光孵育30min。最后,将细胞在250 μ L FACS缓冲液(补充有10%FBS[Gibco,目录号10099-141]和40mM EDTA[Boston BioProducts,目录号BM-711-K]的PBS)中重悬,并且在BD LSRFortessa X20细胞分析仪(BD Biosciences,美国加利福尼亚州圣何塞)上测量。使用Kaluza分析软件对数据进行分析。

[1084] 表22. 用于流式细胞术的抗体

靶标	标记 ¹	克隆	供应商	目录号
CD45	BV785	30-F11	Biolegend	103149
CD3	BUV395	17A2	BD	740268
CD4	BV510	GK1.5	Biolegend	100449
CD8	PE-eFluor610	53-6.7	eBiosciences	61-0081-82
Ki67	PerCP/Cy5.5	SolA15	eBioscience	46-5698-82
GzmB	AF700	QA16A02	Biolegend	372222
活/死	eFluor780	N/A	eBioscience	65-0865

[1086] 结果与结论

[1087] 在处理开始之后第7天和第14天,通过免疫组织化学(IHC)和原位杂交(ISH)评价肿瘤组织切片的T细胞亚群和靶标表达(图17),并且在处理开始之后第7天,通过流式细胞术评价分离的肿瘤组织的Ki.67+增殖和GzmB+细胞毒性瘤内CD8⁺ T细胞(图18)。

[1088] 在处理之后第7天和第14天,用作为单一药剂的mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB和抗mPD-1的处理提高了肿瘤内CD3⁺细胞的百分比。在第14天,mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合进一步增加了CD3⁺细胞的百分比(图17A)。

[1089] 在第7天,在处理组之间未观察到CD4⁺细胞的百分比差异。相反,在第14天,与PBS处理组相比,通过用作为单一药剂的mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB和抗mPD-1处理增加了CD4⁺细胞的百分比,并且甚至通过mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合进一步提高了CD4⁺细胞的百分比(图17B)。

[1090] 在第7天和第14天两天,与PBS组相比,mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB增加了CD8⁺细胞的百分比,但抗mPD-1并非如此。与单独的mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB相比,mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合显示了类似的CD8⁺细胞水平,表明CD8⁺细胞的增加是由mbsIg G2a-PD-L1×4-1BB驱动的(图17C)。

[1091] 在第7天和/或第14天,与PBS处理的小鼠相比,作为单一药剂的mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB和抗mPD-1增加了瘤内PD-L1和PD-L2表达。相反,mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合没有显示这种增加,因为瘤内PD-L1和PD-L2的水平与PBS处理的小鼠中的所述水平是可比较的(图17D-图17E)。

[1092] 最后,在第7天,mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB增加了肿瘤的4-1BB表达。相反,在第14天,通过作为单一药剂的抗mPD-1以及通过mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合降低了4-1BB的表达(图17F)。

[1093] 在分离的肿瘤组织中,发现与每种单一药剂相比,mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合显著提高在瘤内总CD8⁺ T细胞群体内的GzmB⁺的百分比(图18A),表明了增加的CD8T细胞细胞毒性。同样,与单独的每种单一药剂相比,mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合提高了总肿瘤浸润CD8⁺ T细胞群体内的Ki67⁺的百分比,表明了增加的CD8T细胞增殖(图18B)。

[1094] 总之,这些结果表明,与用作为单一药剂的mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB或抗mPD-1的处理相比,mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1的组合导致不同并且互补的肿瘤免疫环境调节。特别地,在mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗PD1的组合处理的组中更大频率的增殖和细胞毒性CD8⁺ TIL表明了很可能与改善的抗肿瘤活性相关的TIL的增强的功能性和效应子功能。

[1095] 实施例13:用mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB与抗mPD-1抗体的组合处理的荷MC38肿瘤小鼠的外周血中的细胞因子分析

[1096] 目的:为了研究用单独的或与抗mPD-1抗体组合的mbsIgG2a-PD-L1×4-1BB处理的荷MC38肿瘤的C57BL/6小鼠的外周血中的细胞因子水平。

[1097] 方法

[1098] 在实施例11中描述的实验中,在以下时间点从荷MC38肿瘤的C57BL/6小鼠采集血液样品:第-1天(基线;在用第一剂量处理的前一天)、在处理开始之后第2天(在第一剂量之

后2天)和第5天(在第二剂量之后2天)。

[1099] 根据制造商的说明书,在MESO QuickPlex SQ 120仪器(MSD,LLC.R31QQ-3)上使用V-PLEX促炎性测试组套1小鼠试剂盒(MSD LLC,目录号K15048D-2)和V-PLEX细胞因子测试组套1小鼠试剂盒(MSD LLC,目录号K15245D-2)通过电化学发光(ECLIA)对血浆样品中的细胞因子进行分析。

[1100] 结果

[1101] 在用作为单一药剂的mIgG2a-ctrl-AAKR (5mg/kg) 或抗小鼠PD-1抗体(抗mPD-1; 10mg/kg)处理的小鼠中,与第-1天相比,在第2天或第5天观察到IFN γ 、TNF α 、IL-2和IP-10水平没有变化或有轻微变化(图19)。在用mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB (5mg/kg)处理的小鼠中,IFN γ 、TNF α 、IL-2和IP-10的血浆水平在第2天增加并且在第5天进一步提高。相对于每种单一药剂,在用mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB (5mg/kg) 和抗mPD-1 (10mg/kg) 的组合处理的小鼠中,IFN γ 、TNF α 、IL-2和IP-10水平的增加在第2天和/或第5天被加强(图19)。在第5天,在用mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB与抗mPD-1的组合处理的小鼠中,IFN γ 、TNF α 和IP-10的水平与mIgG2a-ctrl-AAKR处理组和抗PD-1处理组两者中的水平相比,是后者的>3倍,并且TNF α 和IP-10的水平与mbsIgG2-PD-L1 $\times$ 4-1BB处理组中的水平相比,是后者的>1.48倍(表23)。

[1102] 这些结果为评价GEN1046与抗PD-1抗体的组合提供了理论基础,以进一步放大癌症患者的抗肿瘤免疫应答。

[1103] 表23. 与单一药剂相比响应于mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB与抗mPD-1的组的细胞因子水平的变化倍数

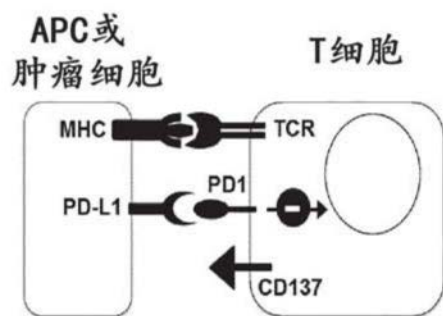
[1104]

细 胞 因 子	所比较的处理组			中值变化倍数的比 率	
				第2天	第5天
IFN γ	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	mIgG2a-ctrl-AAKR	1.77	3.39

[1105]

IFN γ	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	抗mPD-1	1.93	3.42
IFN γ	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB	0.98	0.99
TNF α	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	mIgG2a-ctrl-AAKR	3.07	3.56
TNF α	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	抗mPD-1	2.59	3.44
TNF α	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB	1.97	1.87
IL-2	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	mIgG2a-ctrl-AAKR	2.66	1.85
IL-2	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	抗mPD-1	2.87	2.87
IL-2	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB	1.39	1.17
IP-10	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	mIgG2a-ctrl-AAKR	3.54	6.41
IP-10	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	抗mPD-1	4.70	4.94
IP-10	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB + 抗mPD-1	相比于	mbsIgG2a-PD-L1 $\times$ 4-1BB	1.41	1.48

A. PD1介导的T细胞抑制



B. PD-L1阻断 + T细胞共刺激

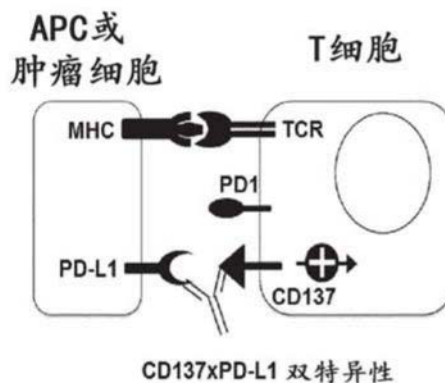


图1

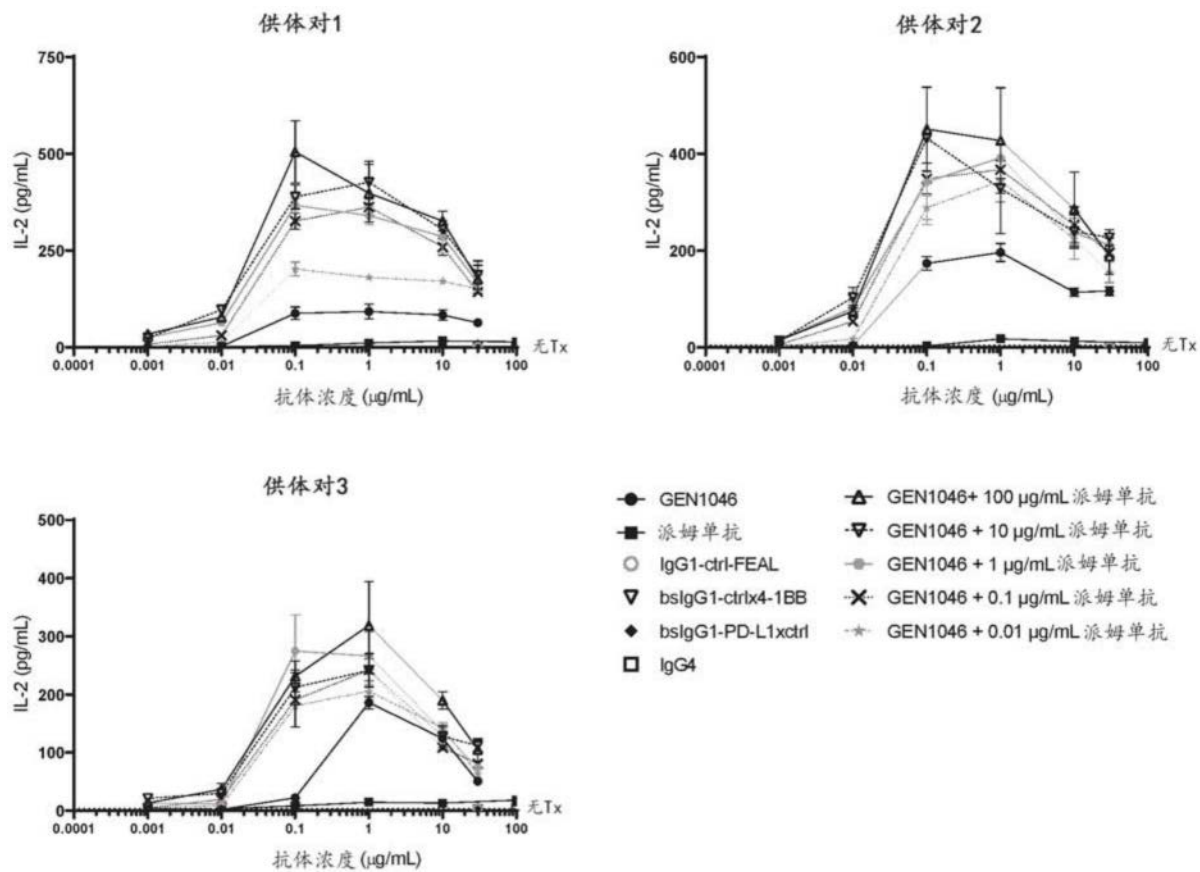


图2

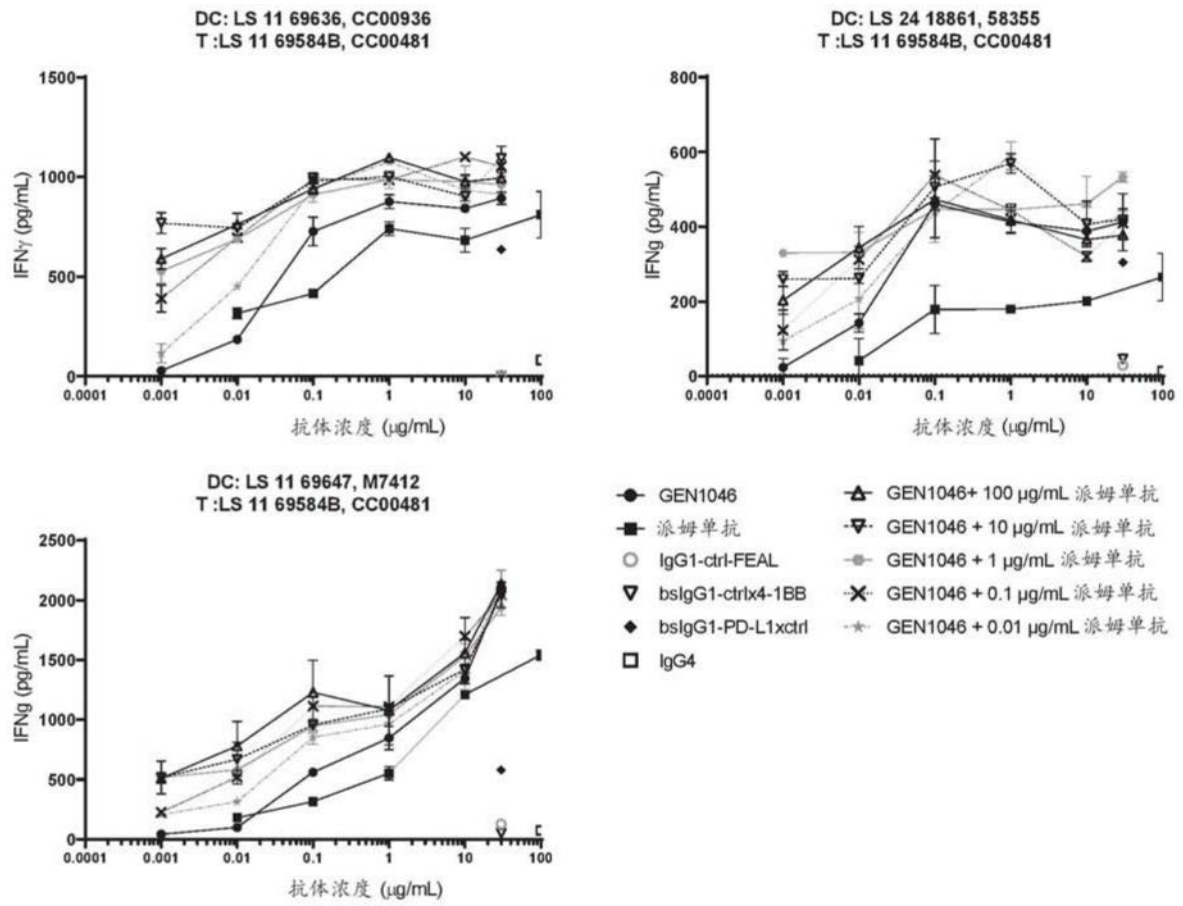


图3

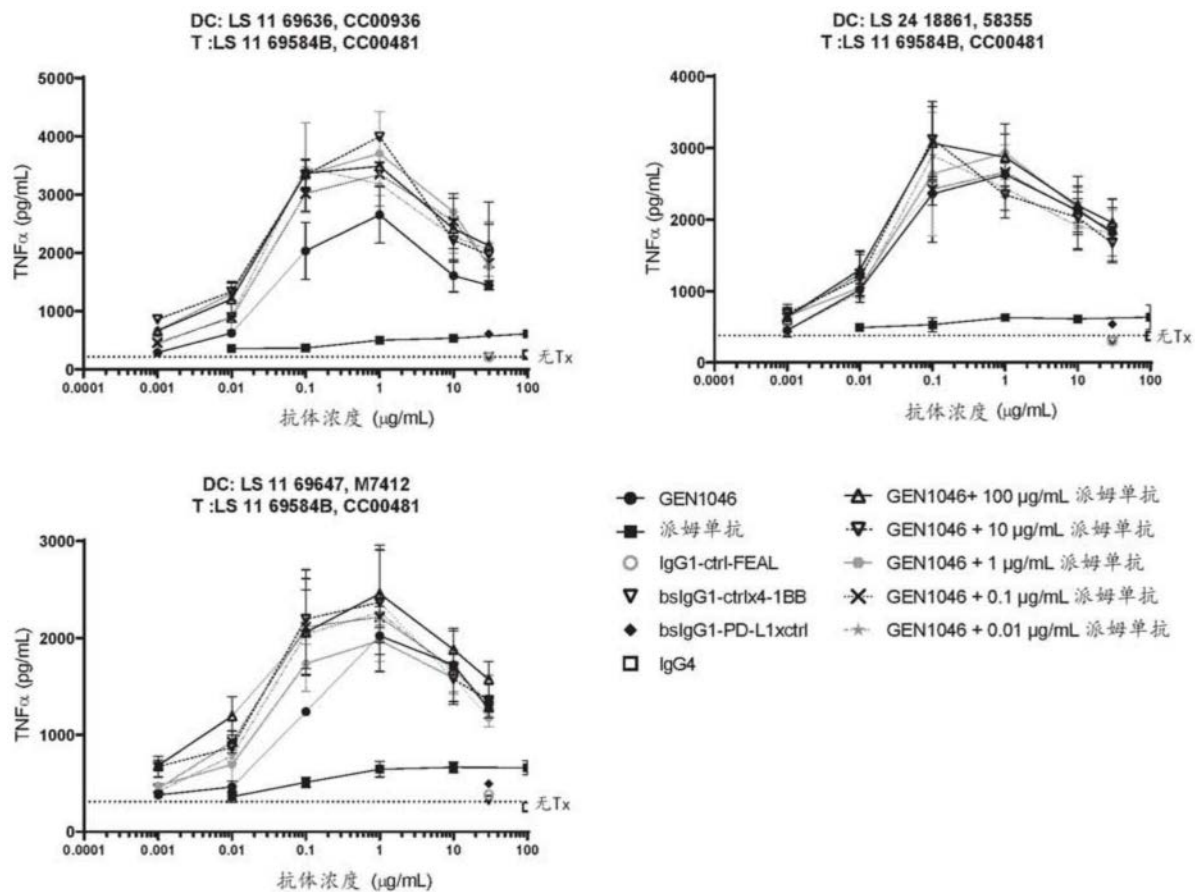


图4

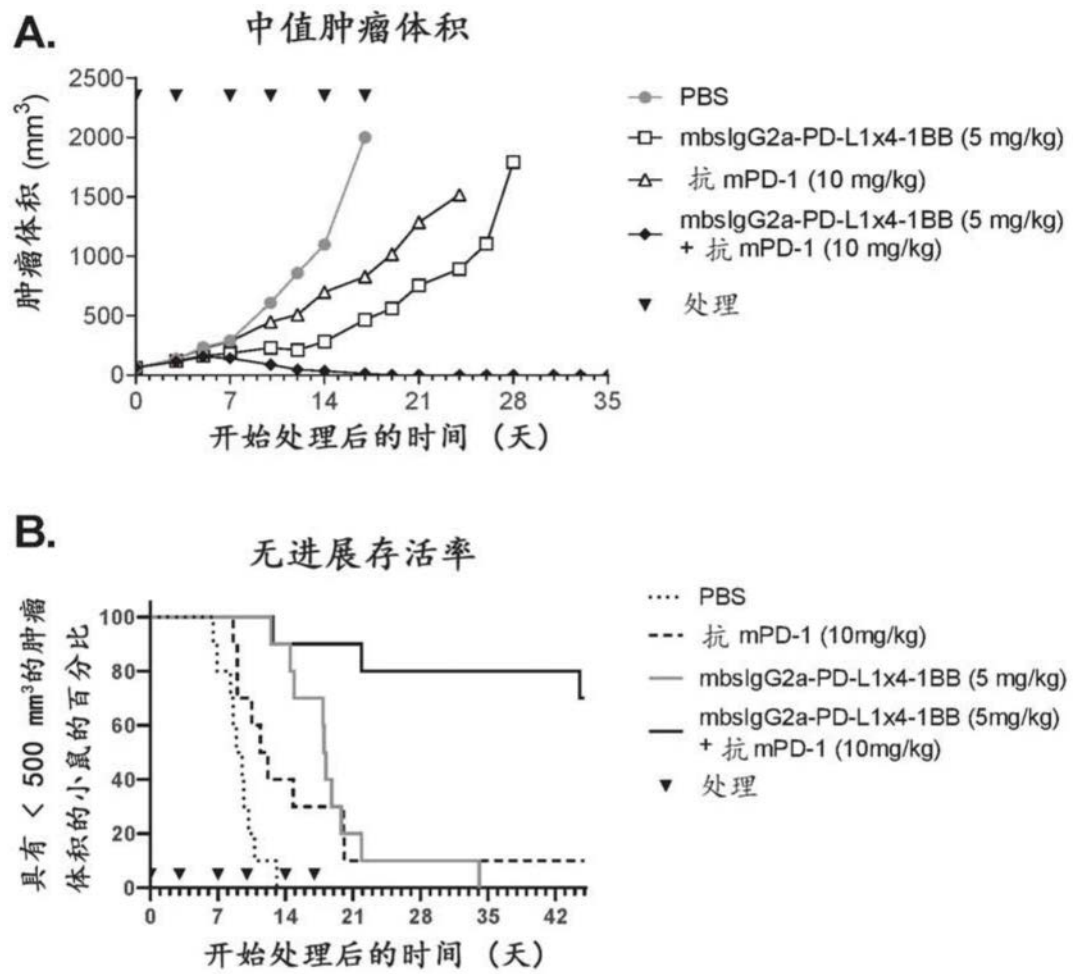


图5

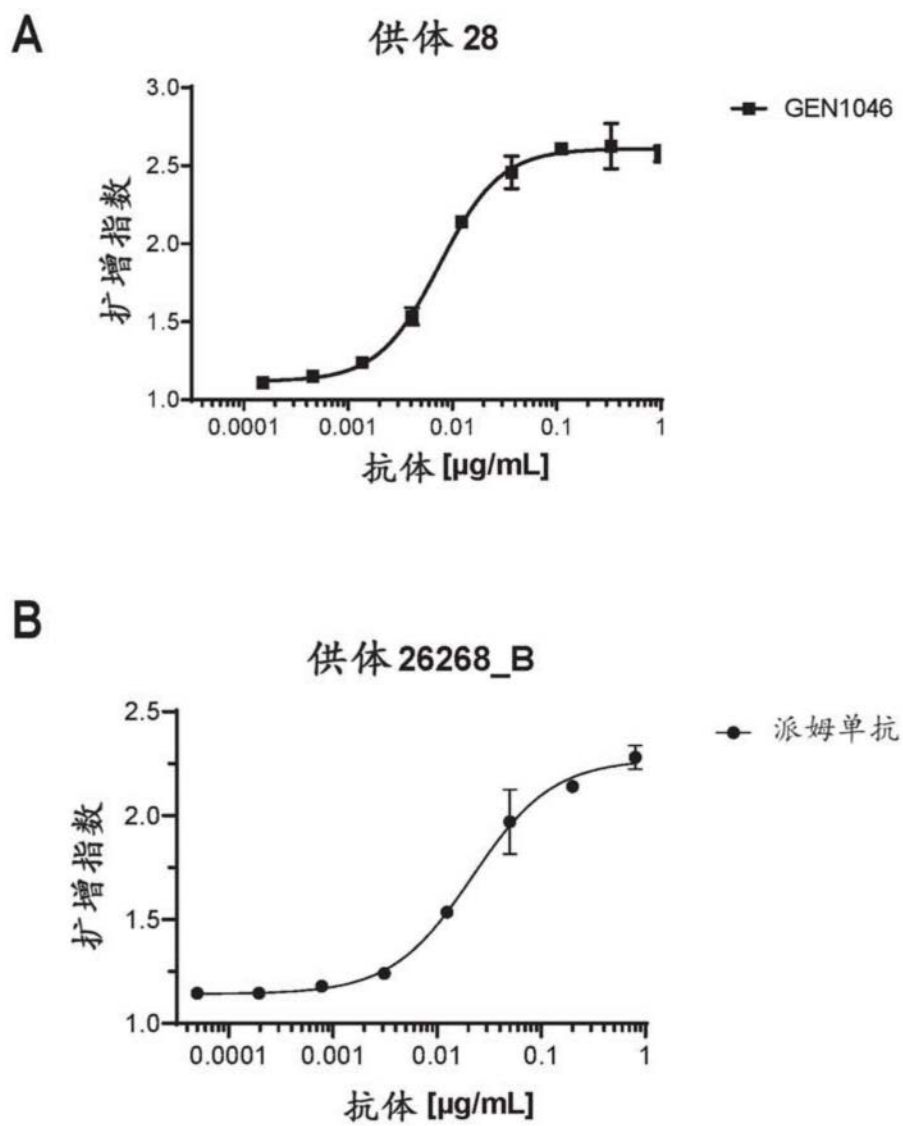


图6

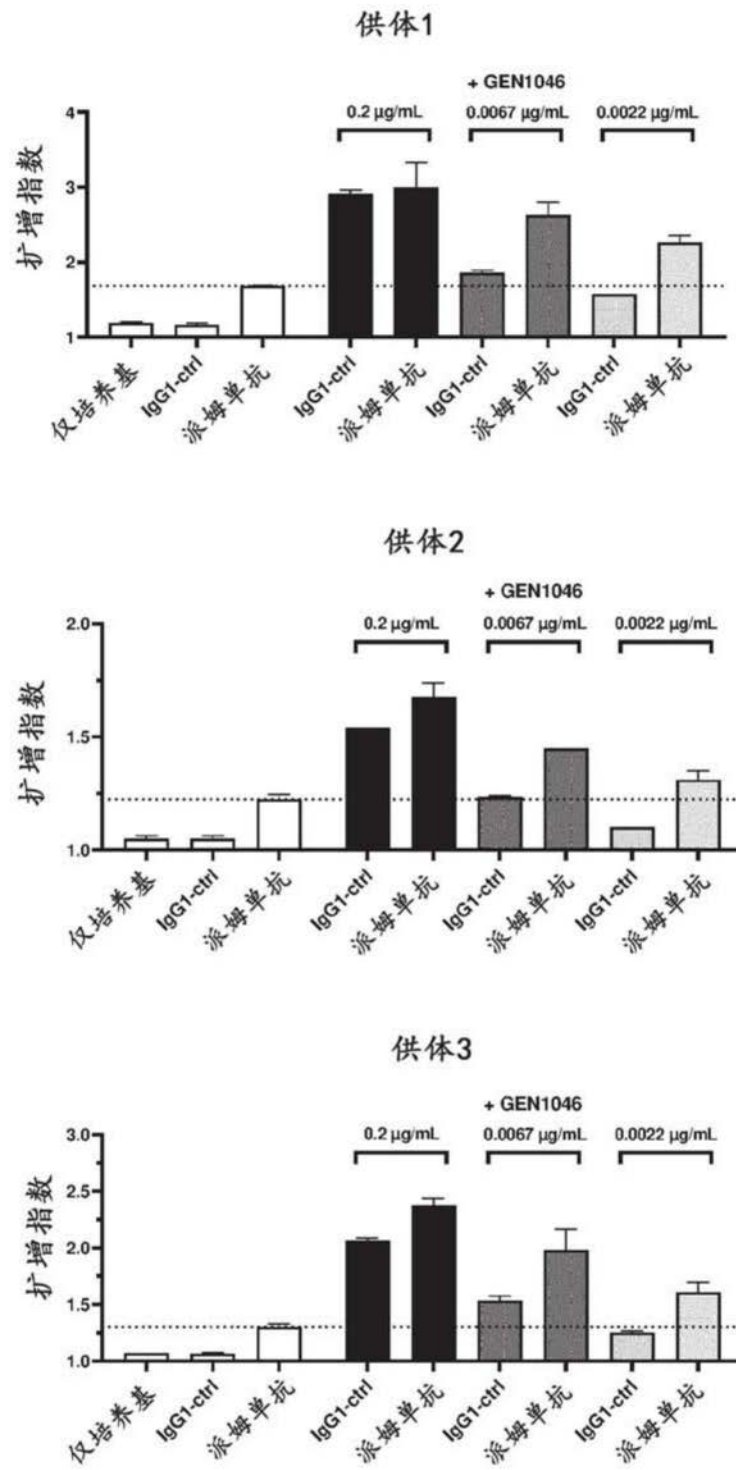


图7

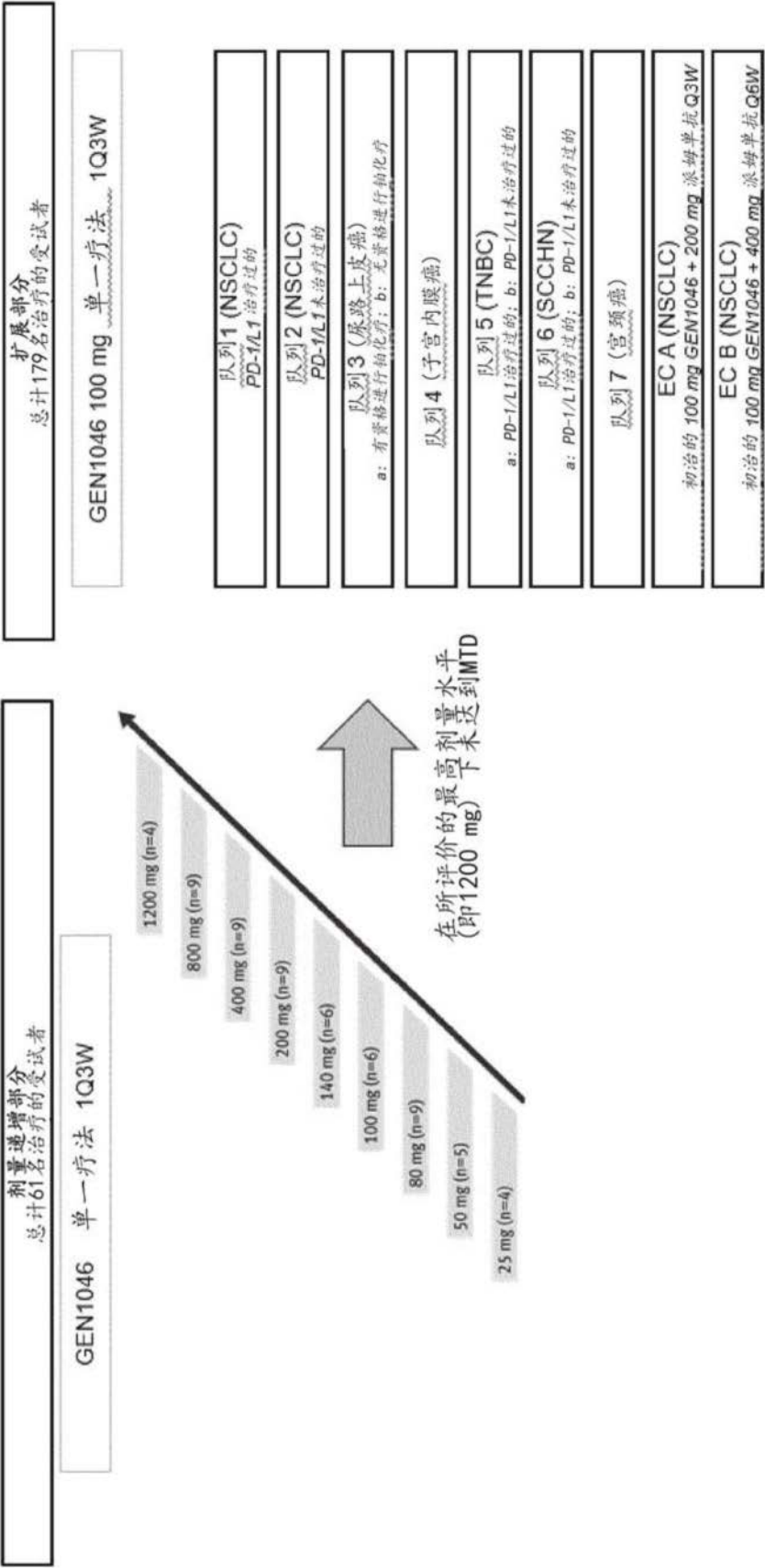


图8

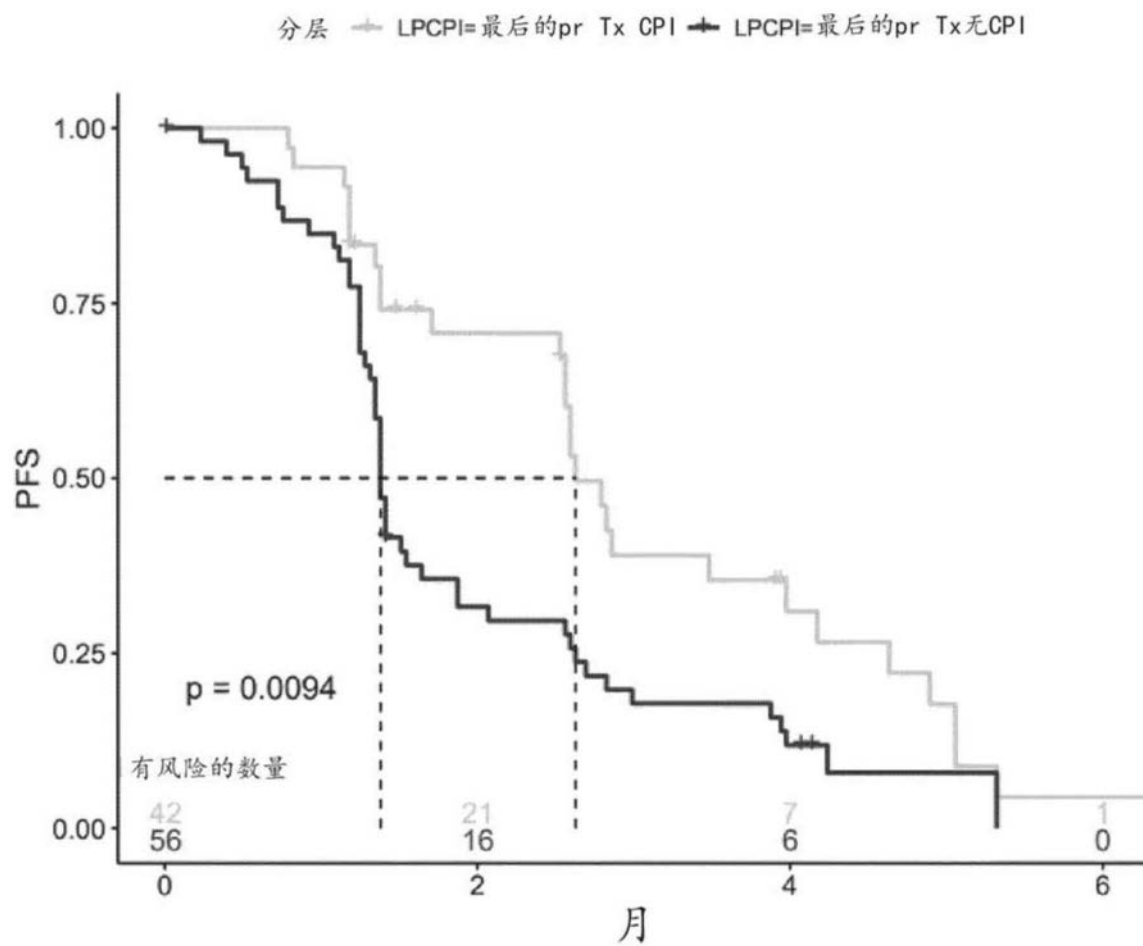


图9

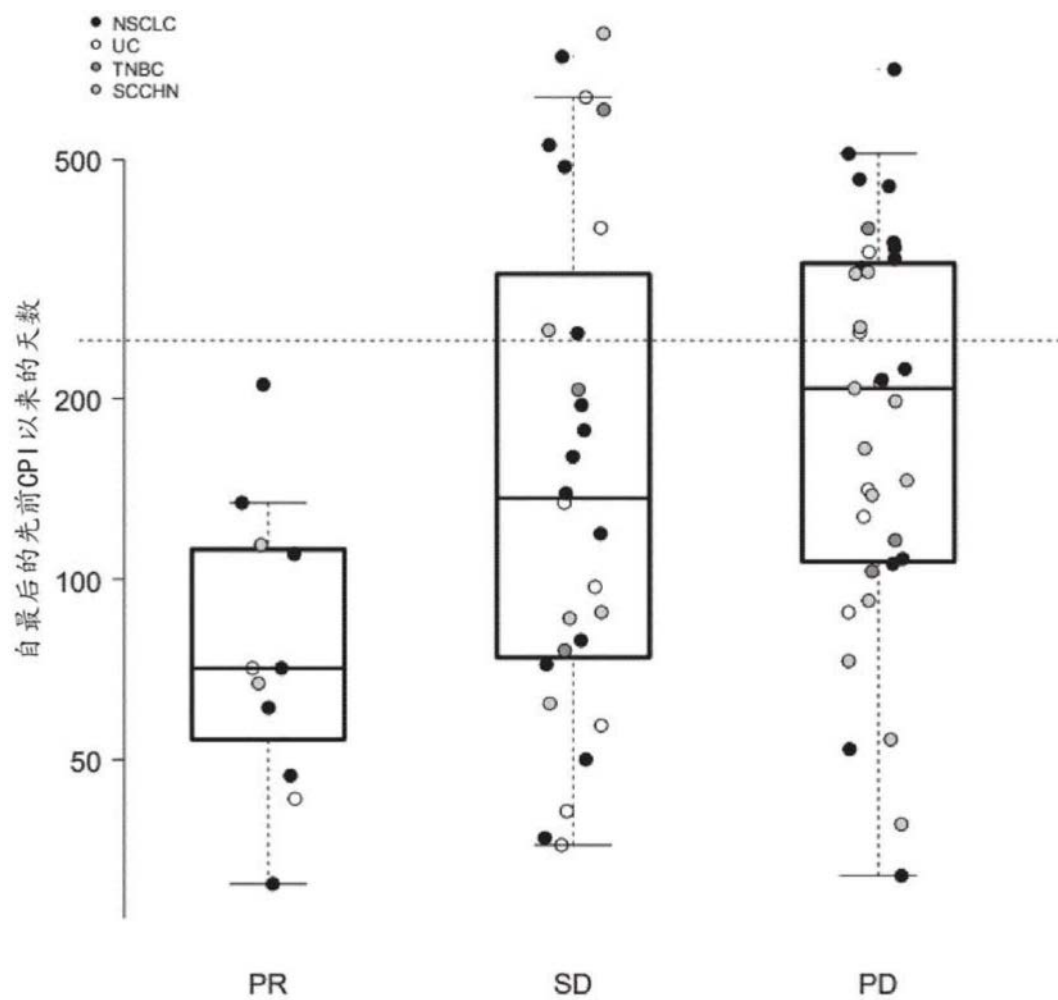


图10

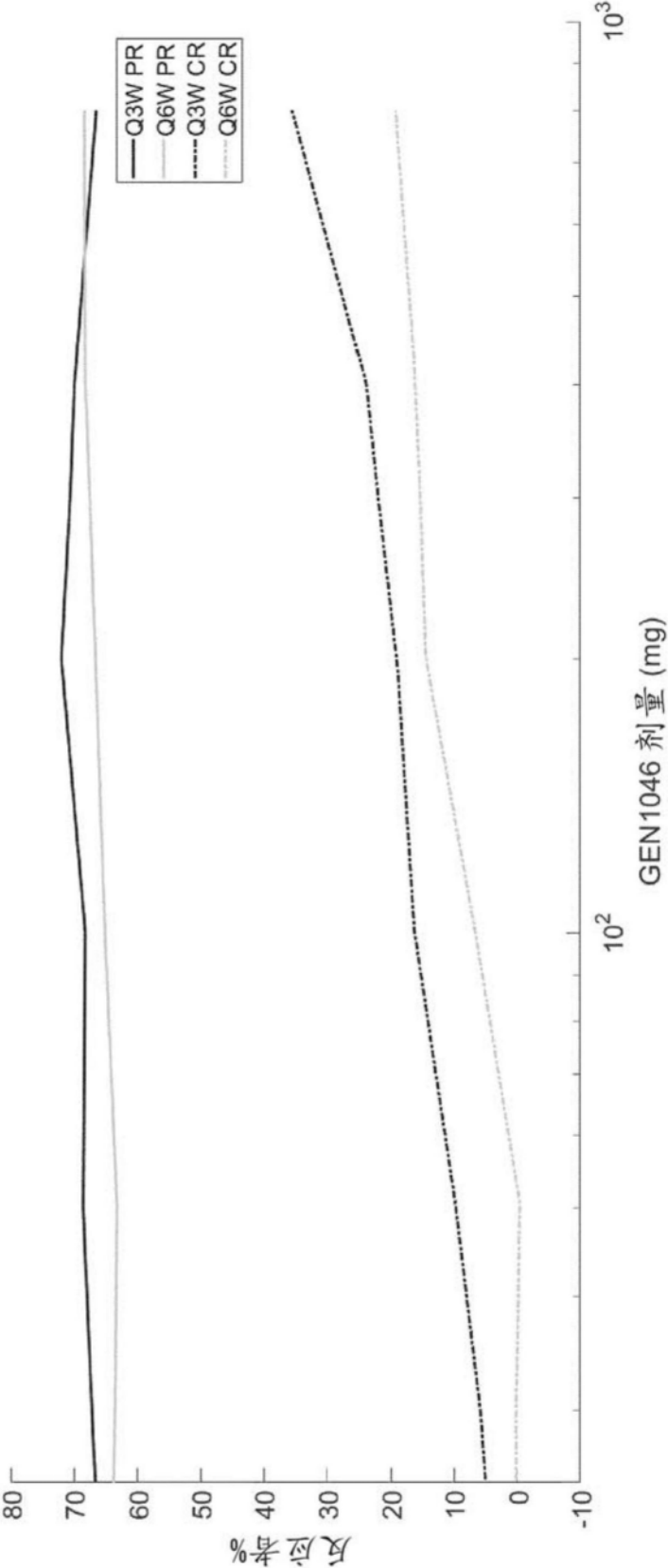


图11

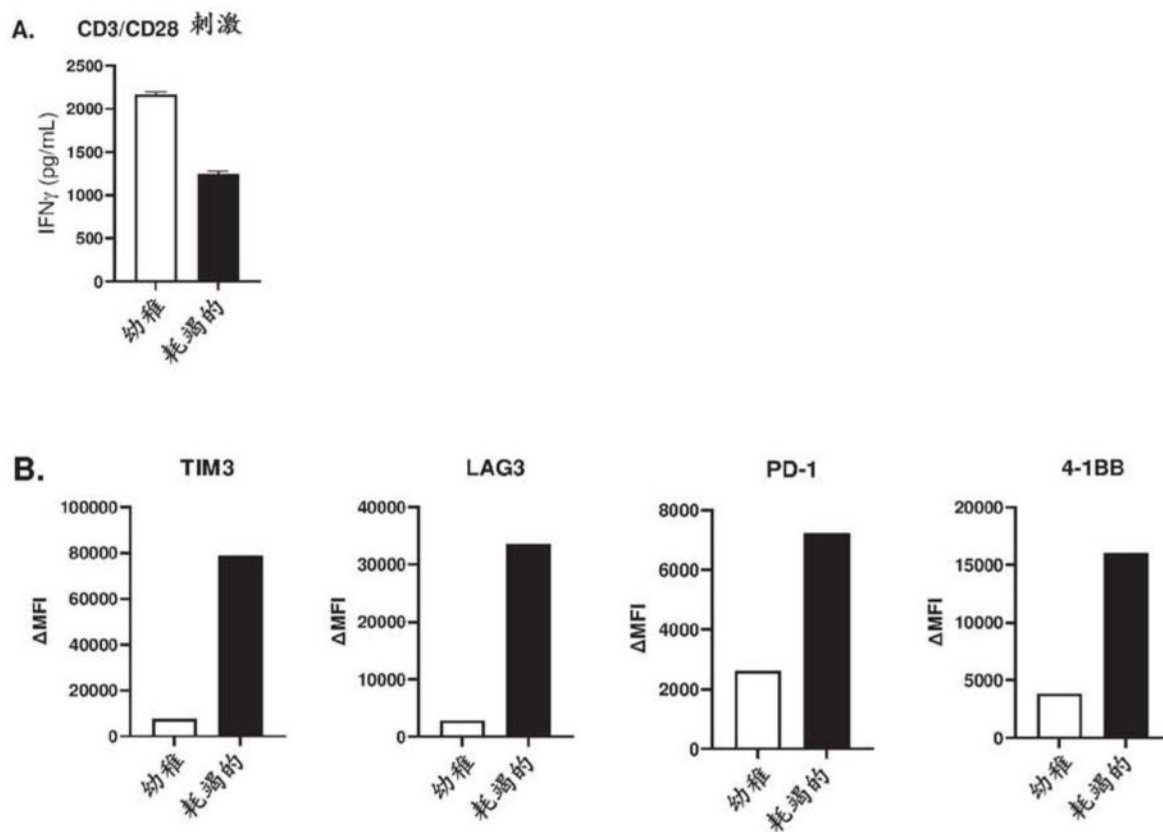


图12

C.

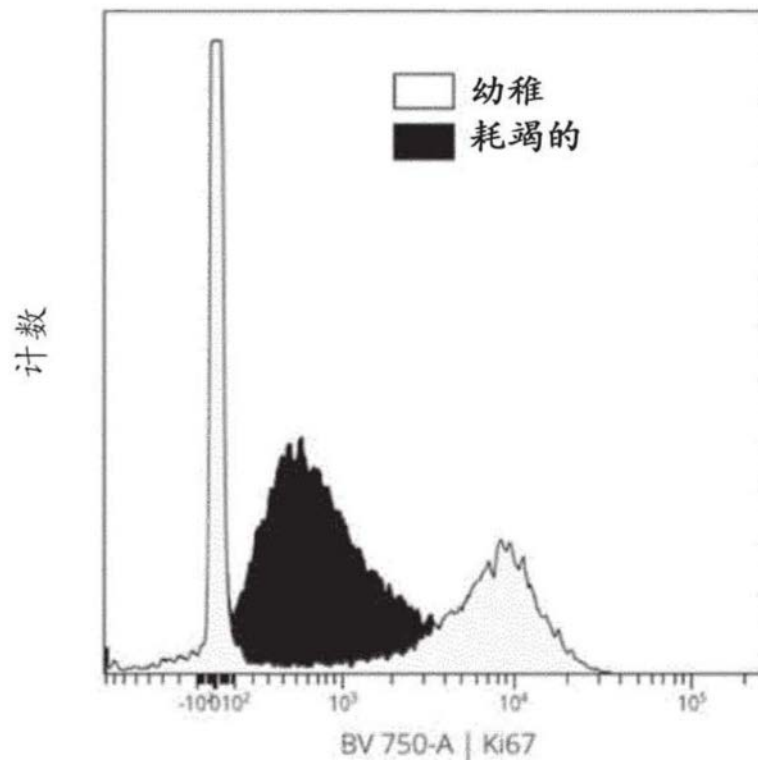


图12续

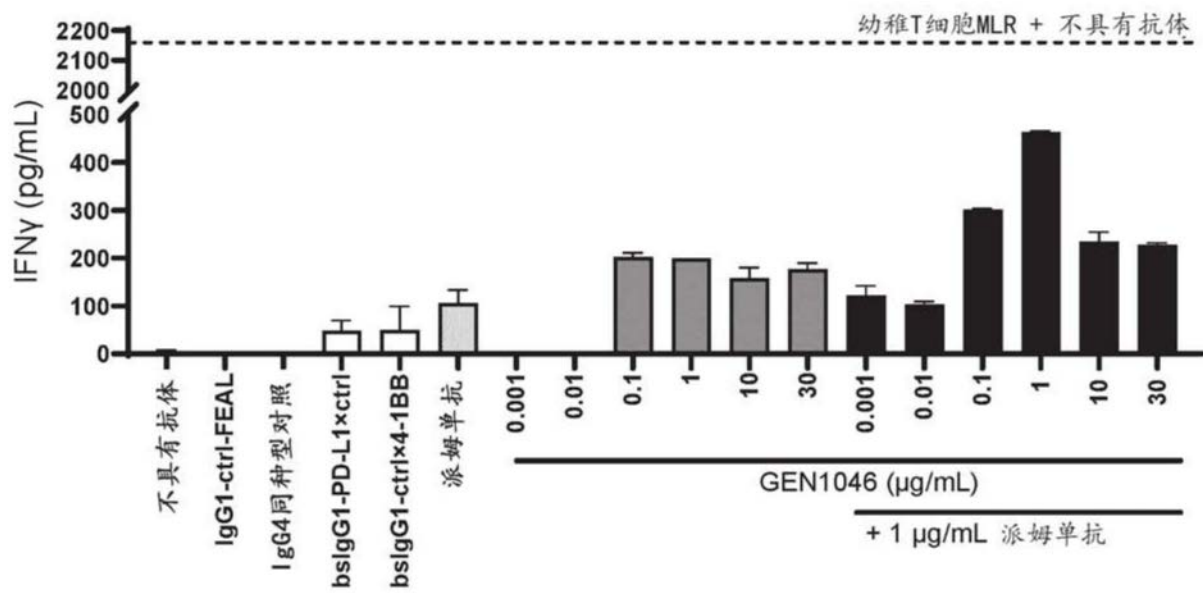


图13

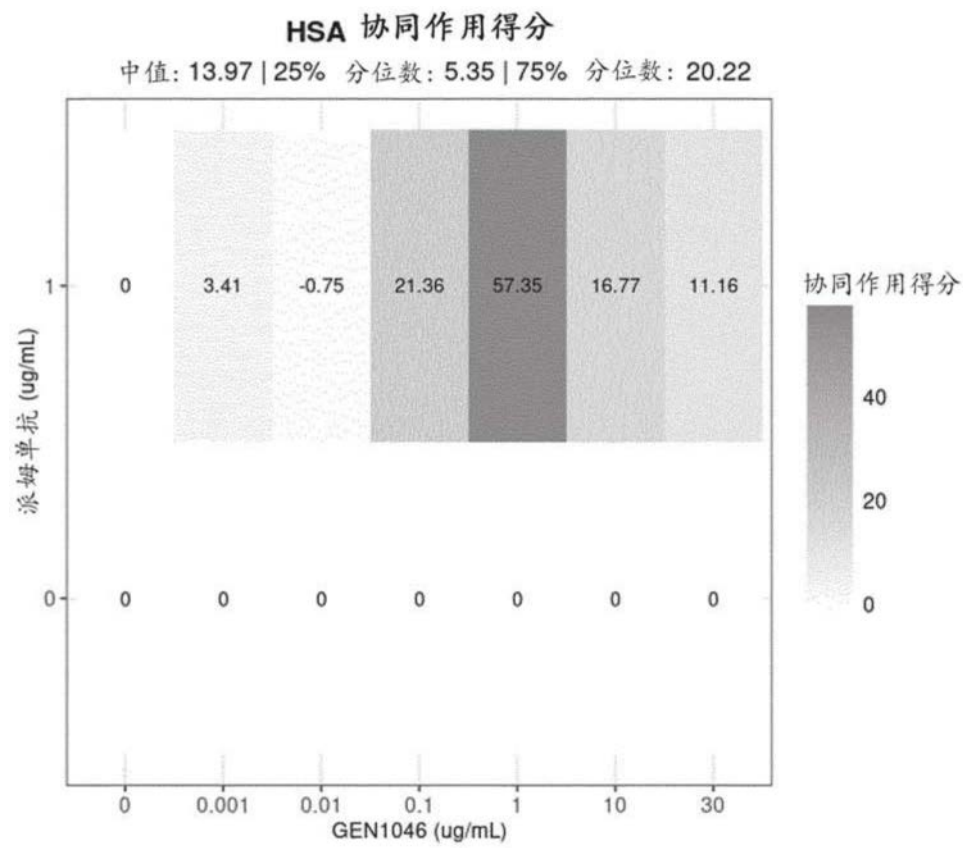


图14

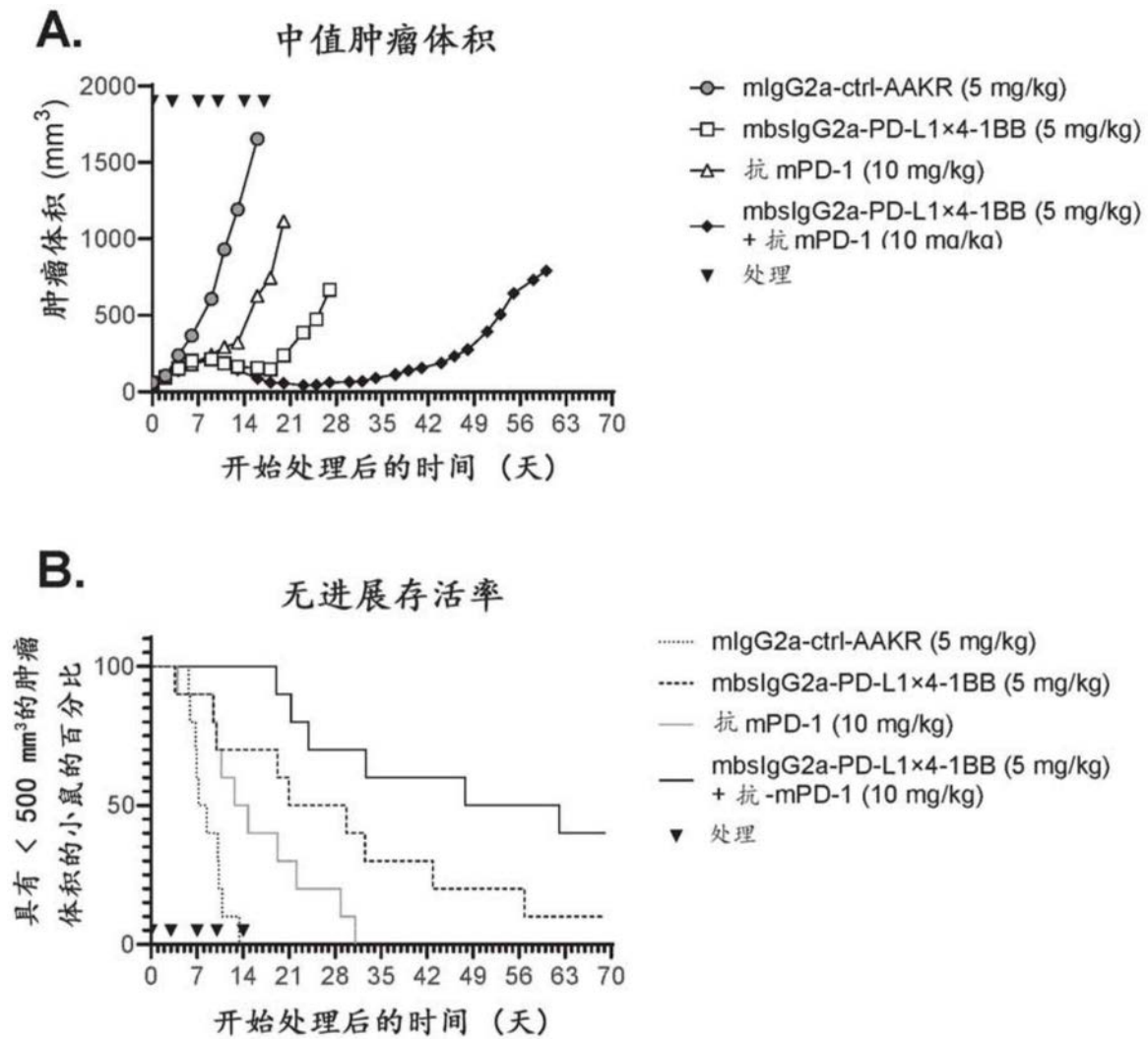


图15

用MC38肿瘤细胞再激发CR小鼠

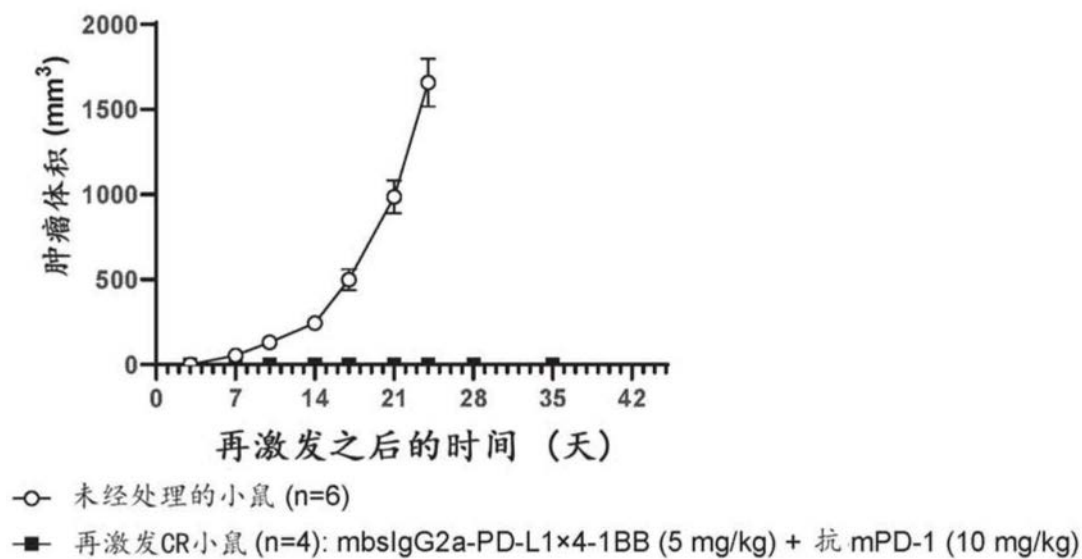


图16

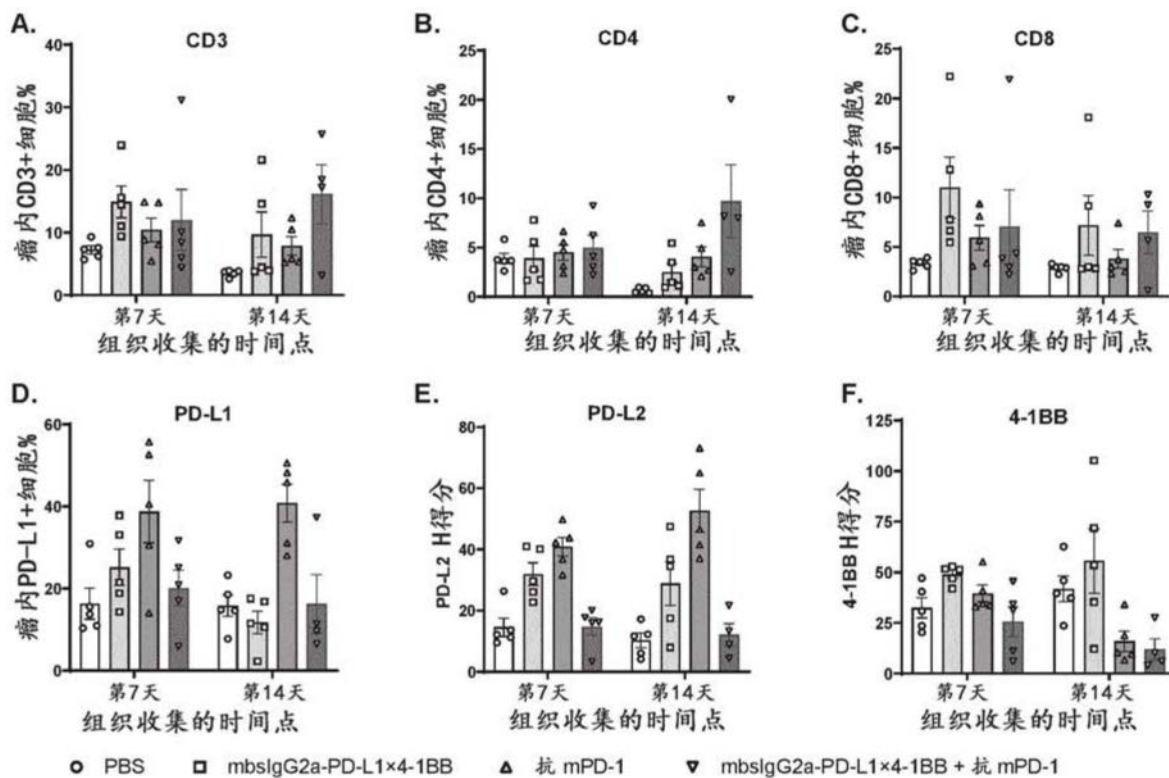


图17

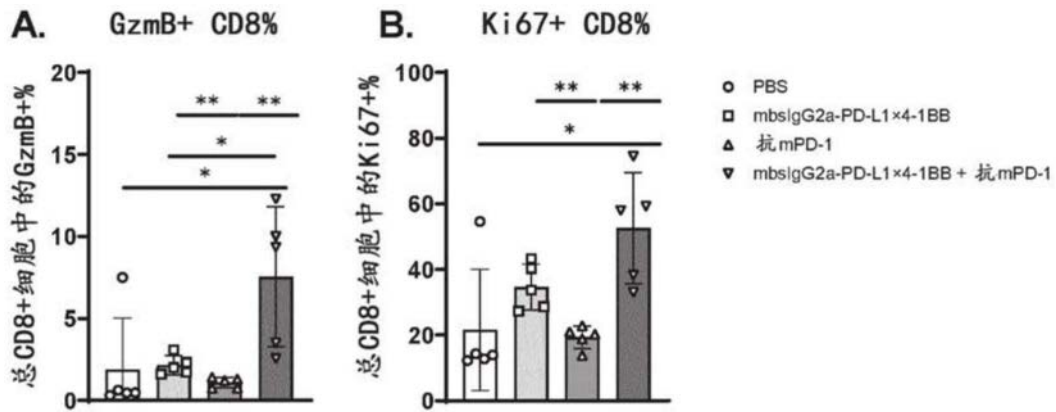


图18

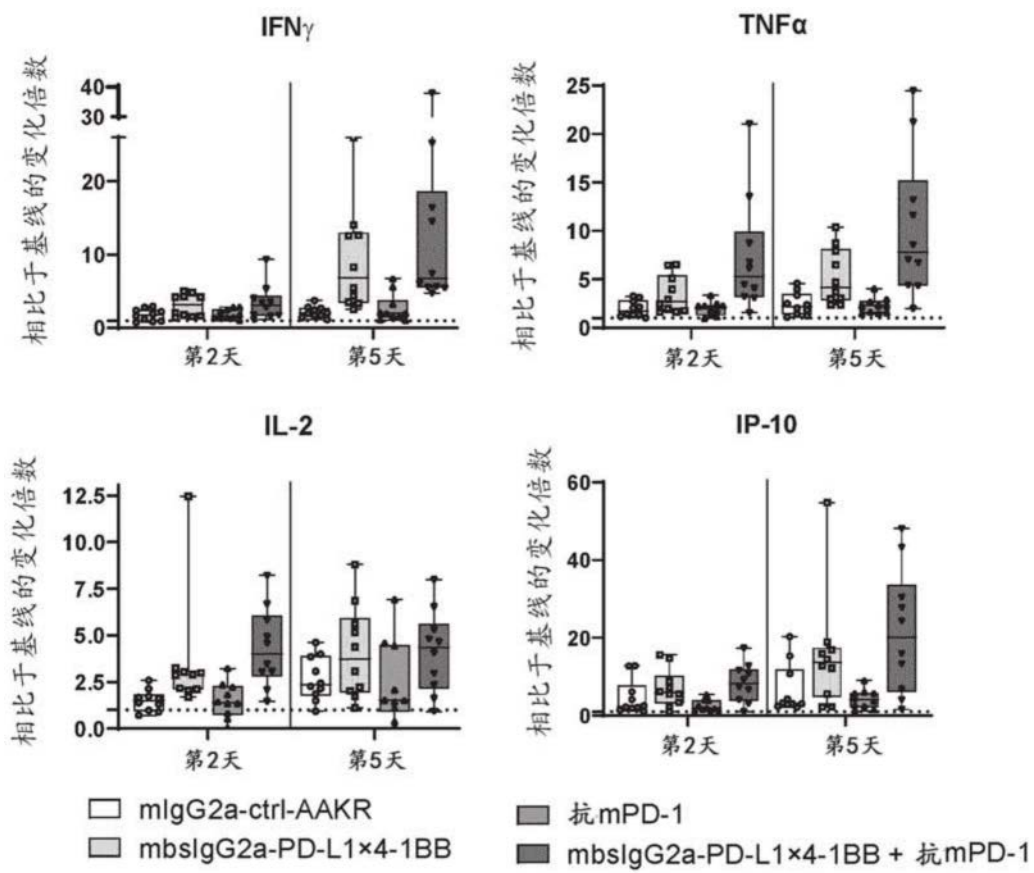


图19