



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116333123 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 27

(21) 申请号 202210764994.9

C12N 5/10 (2006.01)

(22) 申请日 2022.06.29

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/140487 2021.12.22 CN

(71) 申请人 宝船生物医药科技(上海)有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技

园区春晓路122弄34号5幢

(72) 发明人 杨勇飞 曹淑贞 张静 邵喆

蒋雪园

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

专利代理师 水文钰 黄益澍

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书5页 说明书42页

序列表34页 附图19页

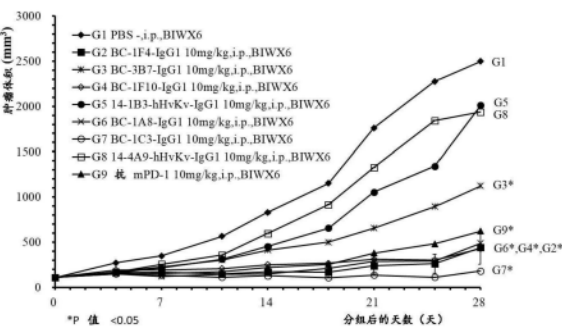
(54) 发明名称

抗TNFR2抗体及其用途

(57) 摘要

本披露提供了抗TNFR2(肿瘤坏死因子受体

2) 抗体、其抗原结合片段及其用途。



1. 一种结合TNFR2的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

包含互补决定区(CDR)1、2和3的重链可变区(VH),其中该VH CDR1区包含与选定的VH CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,该VH CDR2区包含与选定的VH CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且该VH CDR3区包含与选定的VH CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;以及

包含CDR 1、2和3的轻链可变区(VL),其中该VL CDR1区包含与选定的VL CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,该VL CDR2区包含与选定的VL CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且该VL CDR3区包含与选定的VL CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,

其中这些选定的VH CDR 1、2和3氨基酸序列和这些选定的VL CDR 1、2和3氨基酸序列是以下之一:

(1) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:6、7、8所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:9、10、11所示;

(2) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:12、13、14所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:15、16、17所示;

(3) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:18、19、20所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:21、22、23所示;

(4) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:24、25、26所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:27、28、29所示;

(5) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:30、31、32所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:33、34、35所示;

(6) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:42、43、44所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:45、46、47所示;

(7) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:48、49、50所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:51、52、53所示;

(8) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:54、55、56所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:57、58、59所示;

(9) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:60、61、62所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:63、64、65所示;或

(10) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:66、67、68所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:69、70、71所示。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中根据Kabat编号,该VH包含分别具有SEQ ID NO:6、7和8所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且该VL包含分别具有SEQ ID NO:9、10和11所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

3. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中根据Kabat编号,该VH包含分别具有SEQ ID NO:12、13和14所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且该VL包含分别具有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

4. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中根据Kabat编号,该VH包含分别具有SEQ ID NO:18、19和20所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且该VL包含分别具有SEQ ID

NO:21、22和23所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

5. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中根据Kabat编号,该VH包含分别具有SEQ ID NO:24、25和26所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且该VL包含分别具有SEQ ID NO:27、28和29所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

6. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中根据Kabat编号,该VH包含分别具有SEQ ID NO:30、31和32所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且该VL包含分别具有SEQ ID NO:33、34和35所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或抗原结合片段特异性结合人TNFR2。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或抗原结合片段是人抗体或其抗原结合片段(例如人IgG1抗体)。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或抗原结合片段是单链可变片段(scFV)。

10. 一种核酸,其包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含:

(1) 含有重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,该重链可变区包含分别含有由SEQ ID NO:6、7和8所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR)1、2和3,并且其中该VH在与包含由SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合TNFR2;

(2) 含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:9、10和11所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VL在与包含由SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的VH配对时结合TNFR2;

(3) 含有重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,该重链可变区包含分别含有由SEQ ID NO:12、13和14所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VH在与包含由SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合TNFR2;

(4) 含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VL在与包含由SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的VH配对时结合TNFR2;

(5) 含有重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,该重链可变区包含分别含有由SEQ ID NO:18、19和20所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VH在与包含由SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合TNFR2;

(6) 含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:21、22和23所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VL在与包含由SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的VH配对时结合TNFR2;

(7) 含有重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,该重链可变区包含分别含有由SEQ ID NO:24、25和26所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VH在与包含由SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合TNFR2;

(8) 含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:27、28和29所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VL在与包含由SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列的VH配对时结合TNFR2;

(9) 含有重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,该重链可变区包含分别含有由

SEQ ID NO:30、31和32所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VH在与包含由SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 配对时结合TNFR2;或

(10) 含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:33、34和35所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VL在与包含由SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列的VH配对时结合TNFR2。

11. 根据权利要求10所述的核酸,其中该核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段,该VH包含分别含有由SEQ ID NO:6、7和8所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

12. 根据权利要求10所述的核酸,其中该核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:9、10和11所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

13. 根据权利要求10所述的核酸,其中该核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段,该VH包含分别含有由SEQ ID NO:12、13和14所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

14. 根据权利要求10所述的核酸,其中该核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

15. 根据权利要求10所述的核酸,其中该核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段,该VH包含分别含有由SEQ ID NO:18、19和20所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

16. 根据权利要求10所述的核酸,其中该核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:21、22和23所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

17. 根据权利要求10所述的核酸,其中该核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段,该VH包含分别含有由SEQ ID NO:24、25和26所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

18. 根据权利要求10所述的核酸,其中该核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:27、28和29所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

19. 根据权利要求10所述的核酸,其中该核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段,该VH包含分别含有由SEQ ID NO:30、31和32所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

20. 根据权利要求10所述的核酸,其中该核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:33、34和35所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

21. 根据权利要求10-20中任一项所述的核酸,其中该VH在与VL配对时特异性结合人TNFR2,或该VL在与VH配对时特异性结合人TNFR2。

22. 根据权利要求10-21中任一项所述的核酸,其中该免疫球蛋白重链或其片段是人免疫球蛋白重链或其片段,并且该免疫球蛋白轻链或其片段是人免疫球蛋白轻链或其片段。

23. 根据权利要求10-22中任一项所述的核酸,其中该核酸编码单链可变片段(scFv)。
24. 根据权利要求10-23中任一项所述的核酸,其中该核酸是cDNA。
25. 一种载体,该载体包含根据权利要求10-24中任一项所述的核酸中的一种或多种。
26. 一种载体,该载体包含根据权利要求10-24中任一项所述的核酸中的两种,其中该载体编码VH区和VL区,该VH区和VL区一起结合TNFR2。
27. 一种载体对,其中每个载体包含根据权利要求10-24中任一项所述的核酸中的一种,其中该载体对共同编码VH区和VL区,该VH区和VL区一起结合TNFR2。
28. 一种细胞,该细胞包含根据权利要求25或26所述的载体、或根据权利要求27所述的载体对。
29. 根据权利要求28所述的细胞,其中该细胞是CHO细胞。
30. 一种细胞,该细胞包含根据权利要求10-24中任一项所述的核酸中的一种或多种。
31. 一种细胞,该细胞包含根据权利要求10-24中任一项所述的核酸中的两种。
32. 根据权利要求31所述的细胞,其中该两种核酸共同编码VH区和VL区,该VH区和VL区一起结合TNFR2。
33. 一种产生抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括
- (a) 在足以使根据权利要求28-32中任一项所述的细胞产生该抗体或抗原结合片段的条件下培养该细胞;以及
- (b) 收集由该细胞产生的该抗体或抗原结合片段。
34. 一种结合TNFR2的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区(VH)包含与选定的VH序列至少80%相同的氨基酸序列,并且该轻链可变区(VL)包含与选定的VL序列至少80%相同的氨基酸序列,其中该选定的VH序列和该选定的VL序列是以下之一:
- (1) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:36,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:37;
- (2) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:38,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:39;
- (3) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:40,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:41;
- (4) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:72,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:73;或
- (5) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:74,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:75。
35. 根据权利要求34所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:36的序列,并且该VL包含SEQ ID NO:37的序列。
36. 根据权利要求34所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:72的序列,并且该VL包含SEQ ID NO:73的序列。
37. 根据权利要求34所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:38的序列,并且该VL包含SEQ ID NO:39的序列。
38. 根据权利要求34所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:40的序列,并且该VL包含SEQ ID NO:41的序列。
39. 根据权利要求34所述的抗体或其抗原结合片段,其中该VH包含SEQ ID NO:74的序列,并且该VL包含SEQ ID NO:75的序列。
40. 根据权利要求34-39中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或抗原结合片段特异性结合人TNFR2。

41. 根据权利要求34-40中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段是人抗体或其抗原结合片段。

42. 根据权利要求34-41中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中该抗体或抗原结合片段是单链可变片段(scFV)。

43. 一种抗体或其抗原结合片段, 该抗体或其抗原结合片段与根据权利要求1-9和34-42中任一项所述的抗体或其抗原结合片段交叉竞争。

44. 一种结合TNFR2的抗体或其抗原结合片段, 该抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH), 该重链可变区(VH)包含与选定的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3相同的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3; 以及

轻链可变区(VL), 该轻链可变区(VL)包含与选定的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3相同的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3, 其中该选定的VH序列和该选定的VL序列是以下之一:

- (1) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:36, 以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:37;
- (2) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:38, 以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:39;
- (3) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:40, 以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:41;
- (4) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:72, 以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:73; 或
- (5) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:74, 以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:75。

45. 一种抗体-药物缀合物, 该抗体-药物缀合物包含与治疗剂共价结合的、根据权利要求1-9和34-44中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

46. 根据权利要求45所述的抗体药物缀合物, 其中该治疗剂是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。

47. 一种治疗患有癌症的受试者的方法, 该方法包括向该受试者施用治疗有效量的组合物, 该组合物包含根据权利要求1-9和34-44中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求45或46所述的抗体-药物缀合物。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中该受试者患有结直肠癌、卵巢癌、急性髓系白血病、Lewis肺癌、乳腺癌、肝细胞癌、神经癌症和结肠癌。

49. 根据权利要求47所述的方法, 其中该受试者患有肾细胞癌、多发性骨髓瘤、结肠癌、卵巢癌或皮肤T细胞淋巴瘤。

50. 根据权利要求47所述的方法, 其中该癌症是结肠癌或卵巢癌。

51. 一种降低肿瘤生长速率的方法, 该方法包括

使肿瘤细胞与有效量的组合物接触, 该组合物包含根据权利要求1-9和34-44中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求45或46所述的抗体-药物缀合物。

52. 一种杀死肿瘤细胞的方法, 该方法包括

使肿瘤细胞与有效量的组合物接触, 该组合物包含根据权利要求1-9和34-44中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求45或46所述的抗体-药物缀合物。

53. 一种药物组合物, 该药物组合物包含根据权利要求1-9和34-44中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 以及药学上可接受的载剂。

54. 一种药物组合物, 该药物组合物包含根据权利要求45或46所述的抗体药物缀合物, 以及药学上可接受的载剂。

抗TNFR2抗体及其用途

[0001] 本申请要求申请日为2021/12/22的专利国际申请PCT/CN2021/140487的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

[0002] 本披露涉及抗TNFR2 (肿瘤坏死因子受体2) 抗体及其用途。

背景技术

[0003] 癌症是目前造成人类死亡率最高的疾病之一。根据世界卫生组织的统计数据, 2012年全球癌症发病和死亡病例分别达到1400万和820万。在中国, 新诊断的癌症病例为307万, 并且死亡人数为220万。

[0004] 抗癌抗体的最新临床和商业成功引起了对基于抗体的疗法的极大兴趣。需要开发用于在各种基于抗体的疗法中使用的抗体以治疗癌症或自身免疫性疾病。

发明内容

[0005] 本披露涉及抗TNFR2抗体、其抗原结合片段及其用途。

[0006] 在一个方面, 本披露涉及结合TNFR2的抗体或其抗原结合片段, 该抗体或其抗原结合片段包含: 包含互补决定区 (CDR) 1、2和3的重链可变区 (VH), 其中VH CDR1区包含与选定的VH CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列, VH CDR2区包含与选定的VH CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列, 并且VH CDR3区包含与选定的VH CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列; 以及包含CDR 1、2和3的轻链可变区 (VL), 其中VL CDR1区包含与选定的VL CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列, VL CDR2区包含与选定的VL CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列, 并且VL CDR3区包含与选定的VL CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列, 其中这些选定的VH CDR 1、2和3氨基酸序列和这些选定的VL CDR 1、2和3氨基酸序列是以下之一:

[0007] (1) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:6、7、8所示, 以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:9、10、11所示;

[0008] (2) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:12、13、14所示, 以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:15、16、17所示;

[0009] (3) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:18、19、20所示, 以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:21、22、23所示;

[0010] (4) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:24、25、26所示, 以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:27、28、29所示;

[0011] (5) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:30、31、32所示, 以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:33、34、35所示;

[0012] (6) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:42、43、44所示, 以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:45、46、47所示;

[0013] (7) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:48、49、50所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:51、52、53所示;

[0014] (8) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:54、55、56所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:57、58、59所示;

[0015] (9) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:60、61、62所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:63、64、65所示;或

[0016] (10) 这些选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:66、67、68所示,以及这些选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:69、70、71所示。

[0017] 在一些实施例中,根据Kabat编号,VH包含分别具有SEQ ID NO:6、7和8所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且VL包含分别具有SEQ ID NO:9、10和11所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0018] 在一些实施例中,根据Kabat编号,VH包含分别具有SEQ ID NO:12、13和14所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且VL包含分别具有SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0019] 在一些实施例中,根据Kabat编号,VH包含分别具有SEQ ID NO:18、19和20所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且VL包含分别具有SEQ ID NO:21、22和23所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0020] 在一些实施例中,根据Kabat编号,VH包含分别具有SEQ ID NO:24、25和26所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且VL包含分别具有SEQ ID NO:27、28和29所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0021] 在一些实施例中,根据Kabat编号,VH包含分别具有SEQ ID NO:30、31和32所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且VL包含分别具有SEQ ID NO:33、34和35所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0022] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段特异性结合人TNFR2。

[0023] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段是人抗体或其抗原结合片段(例如人IgG1抗体)。

[0024] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段是单链可变片段(scFV)。

[0025] 在一个方面,本披露涉及核酸,该核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含:

[0026] (1) 含有重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,该重链可变区包含分别含有由SEQ ID NO:6、7和8所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR)1、2和3,并且其中该VH在与包含由SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合TNFR2;

[0027] (2) 含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:9、10和11所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VL在与包含由SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的VH配对时结合TNFR2;

[0028] (3) 含有重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,该重链可变区包含分别含有由SEQ ID NO:12、13和14所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VH在与包含由SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合TNFR2;

[0029] (4) 含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中该VL在与包含由SEQ ID NO:38所示的氨基酸

序列的VH配对时结合TNFR2；

[0030] (5) 含有重链可变区 (VH) 的免疫球蛋白重链或其片段, 该重链可变区包含分别含有由SEQ ID NO:18、19和20所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3, 并且其中该VH在与包含由SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 配对时结合TNFR2；

[0031] (6) 含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段, 该VL包含分别含有由SEQ ID NO:21、22和23所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3, 并且其中该VL在与包含由SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的VH配对时结合TNFR2；

[0032] (7) 含有重链可变区 (VH) 的免疫球蛋白重链或其片段, 该重链可变区包含分别含有由SEQ ID NO:24、25和26所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3, 并且其中该VH在与包含由SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 配对时结合TNFR2；

[0033] (8) 含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段, 该VL包含分别含有由SEQ ID NO:27、28和29所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3, 并且其中该VL在与包含由SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列的VH配对时结合TNFR2；

[0034] (9) 含有重链可变区 (VH) 的免疫球蛋白重链或其片段, 该重链可变区包含分别含有由SEQ ID NO:30、31和32所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3, 并且其中该VH在与包含由SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 配对时结合TNFR2；或

[0035] (10) 含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段, 该VL包含分别含有由SEQ ID NO:33、34和35所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3, 并且其中该VL在与包含由SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列的VH配对时结合TNFR2。

[0036] 在一些实施例中, 核酸包含编码多肽的多核苷酸, 该多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段, 该VH包含分别含有由SEQ ID NO:6、7和8所示的氨基酸序列的CDR1、2和3。

[0037] 在一些实施例中, 核酸包含编码多肽的多核苷酸, 该多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段, 该VL包含分别含有由SEQ ID NO:9、10和11所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0038] 在一些实施例中, 核酸包含编码多肽的多核苷酸, 该多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段, 该VH包含分别含有由SEQ ID NO:12、13和14所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0039] 在一些实施例中, 核酸包含编码多肽的多核苷酸, 该多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段, 该VL包含分别含有由SEQ ID NO:15、16和17所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0040] 在一些实施例中, 核酸包含编码多肽的多核苷酸, 该多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段, 该VH包含分别含有由SEQ ID NO:18、19和20所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0041] 在一些实施例中, 核酸包含编码多肽的多核苷酸, 该多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段, 该VL包含分别含有由SEQ ID NO:21、22和23所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0042] 在一些实施例中, 核酸包含编码多肽的多核苷酸, 该多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段, 该VH包含分别含有由SEQ ID NO:24、25和26所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0043] 在一些实施例中,核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:27、28和29所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0044] 在一些实施例中,核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段,该VH包含分别含有由SEQ ID NO:30、31和32所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0045] 在一些实施例中,核酸包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,该VL包含分别含有由SEQ ID NO:33、34和35所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0046] 在一些实施例中,VH在与VL配对时特异性结合人TNFR2,或VL在与VH配对时特异性结合人TNFR2。

[0047] 在一些实施例中,免疫球蛋白重链或其片段是人免疫球蛋白重链或其片段,并且免疫球蛋白轻链或其片段是人免疫球蛋白轻链或其片段。

[0048] 在一些实施例中,核酸编码单链可变片段(scFv)。

[0049] 在一些实施例中,核酸是cDNA。

[0050] 在一个方面,本披露涉及载体,该载体包含本文所述的核酸中的一种或多种。

[0051] 在一个方面,本披露涉及包含本文所述的核酸中的两种的载体,其中该载体编码VH区和VL区,该VH区和VL区一起结合TNFR2。

[0052] 在一个方面,本披露涉及载体对,其中每个载体包含本文所述的核酸中的一种,其中该载体对共同编码VH区和VL区,该VH区和VL区一起结合TNFR2。

[0053] 在一个方面,本披露涉及细胞,该细胞包含本文所述的载体、或本文所述的载体对。在一些实施例中,细胞是CHO细胞。

[0054] 在一个方面,本披露涉及细胞,该细胞包含本文所述的核酸中的一种或多种。

[0055] 在一个方面,本披露涉及细胞,该细胞包含本文所述的核酸中的两种。在一些实施例中,两种核酸共同编码VH区和VL区,该VH区和VL区一起结合TNFR2。

[0056] 在一个方面,本披露涉及产生抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括(a)在足以使本文所述的细胞产生抗体或抗原结合片段的条件下培养该细胞;以及(b)收集由该细胞产生的抗体或抗原结合片段。

[0057] 在一个方面,本披露涉及结合TNFR2的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区(VH)包含与选定的VH序列至少80%相同的氨基酸序列,并且该轻链可变区(VL)包含与选定的VL序列至少80%相同的氨基酸序列,其中该选定的VH序列和该选定的VL序列是以下之一:

[0058] (1) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:36,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:37;

[0059] (2) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:38,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:39;

[0060] (3) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:40,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:41;

[0061] (4) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:72,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:73;或

[0062] (5) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:74,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:75。

[0063] 在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:36的序列,并且VL包含SEQ ID NO:37的序列。

[0064] 在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:72的序列,并且VL包含SEQ ID NO:73的序列。

- [0065] 在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:38的序列,并且VL包含SEQ ID NO:39的序列。
- [0066] 在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:40的序列,并且VL包含SEQ ID NO:41的序列。
- [0067] 在一些实施例中,VH包含SEQ ID NO:74的序列,并且VL包含SEQ ID NO:75的序列。
- [0068] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段特异性结合人TNFR2。
- [0069] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段是人抗体或其抗原结合片段。
- [0070] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段是单链可变片段(scFV)。
- [0071] 在一个方面,本披露涉及与本文所述的抗体或其抗原结合片段交叉竞争的抗体或其抗原结合片段。
- [0072] 在一个方面,本披露涉及结合TNFR2的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:重链可变区(VH),该重链可变区(VH)包含与选定的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3相同的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;以及轻链可变区(VL),该轻链可变区(VL)包含与选定的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3相同的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中该选定的VH序列和该选定的VL序列是以下之一:
- [0073] (1) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:36,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:37;
- [0074] (2) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:38,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:39;
- [0075] (3) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:40,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:41;
- [0076] (4) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:72,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:73;或
- [0077] (5) 该选定的VH序列是SEQ ID NO:74,以及该选定的VL序列是SEQ ID NO:75。
- [0078] 在一个方面,本披露涉及抗体-药物缀合物,该抗体-药物缀合物包含与治疗剂共价结合的、本文所述的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,治疗剂是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。
- [0079] 在一个方面,本披露涉及治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括施用治疗有效量的组合物,该组合物包含本文所述的抗体或其抗原结合片段、或本文所述的抗体-药物缀合物。
- [0080] 在一些实施例中,受试者患有结直肠癌、卵巢癌、急性髓系白血病、Lewis肺癌、乳腺癌、肝细胞癌和结肠癌。在一些实施例中,受试者患有肾细胞癌、多发性骨髓瘤、结肠癌、卵巢癌或皮肤T细胞淋巴瘤。在一些实施例中,癌症是结肠癌或卵巢癌。
- [0081] 在一个方面,本披露涉及降低肿瘤生长速率的方法,该方法包括:使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,该组合物包含本文所述的抗体或其抗原结合片段、或本文所述的抗体-药物缀合物。
- [0082] 在一个方面,本披露涉及杀死肿瘤细胞的方法,该方法包括:使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,该组合物包含本文所述的抗体或其抗原结合片段、或本文所述的抗体-药物缀合物。
- [0083] 在一个方面,本披露涉及药物组合物,该药物组合物包含本文所述的抗体或其抗原结合片段,以及药学上可接受的载剂。
- [0084] 在一个方面,本披露涉及药物组合物,该药物组合物包含本文所述的抗体药物缀合物,以及药学上可接受的载剂。
- [0085] 如本文所用术语“癌症”是指具有自主生长能力的细胞。此类细胞的实例包括具有以迅速增殖细胞生长为特征的异常状态或状况的细胞。该术语旨在包括癌性生长,例如,肿

瘤;致癌过程,转移性组织以及恶性转化的细胞、组织或器官,不论组织病理类型或浸润程度如何。还包括各种器官系统的恶性病,例如头颈部、呼吸系统、心血管系统、肾脏系统、生殖系统、血液系统、神经系统、肝脏系统、胃肠系统和内分泌系统的恶性病;以及腺癌,其包括恶性病,例如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、肺部非小细胞癌和小肠癌。“天然产生的”癌症包括除了通过将癌细胞植入受试者而实验性诱导的癌症之外的任何癌症,并且包括例如自发产生的癌症、由患者暴露于一种或多种致癌物引起的癌症、由插入转基因致癌基因或敲除肿瘤抑制基因引起的癌症、以及由感染(例如病毒感染)引起的癌症。术语“癌”是本领域公认的并且是指上皮或内分泌组织的恶性病。该术语还包括癌肉瘤,这些癌肉瘤包括由癌性组织和肉瘤组织组成的恶性肿瘤。“腺癌”是指源自腺体组织的癌或其中肿瘤细胞形成可识别的腺体结构的癌。术语“肉瘤”是本领域公认的并且是指间充质衍生的恶性肿瘤。术语“造血性肿瘤障碍(hematopoietic neoplastic disorder)”包括涉及造血起源的增生性细胞/肿瘤细胞的疾病。造血性肿瘤障碍可由骨髓、淋巴或红系或其前体细胞引起。血液学癌症是在血液形成组织(例如骨髓)中或在免疫系统的细胞中开始的癌症。血液学癌症的实例包括例如白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤等。

[0086] 如本文所用术语“抗体”是指含有至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或六个)互补决定区(CDR)(例如,来自免疫球蛋白轻链的三个CDR中的任一个或来自免疫球蛋白重链的三个CDR中的任一个)并且能够特异性结合表位的任何抗原结合分子。抗体的非限制性实例包括:单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、单链抗体、嵌合抗体、人抗体和人源化抗体。在一些实施例中,抗体可以含有人抗体的Fc区。术语抗体还包括衍生物,例如双特异性抗体、单链抗体、双抗体、线性抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0087] 如本文所用术语“抗原结合片段”是指全长抗体的一部分,其中抗体的该部分能够特异性结合抗原。在一些实施例中,抗原结合片段含有至少一个可变结构域(例如,重链的可变结构域或轻链的可变结构域)。抗体片段的非限制性实例包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。

[0088] 如本文所用术语“人抗体”是指由源自人的内源性核酸(例如,重排的人免疫球蛋白重链或轻链基因座)编码的抗体。在一些实施例中,人抗体从人收集或人细胞培养物(例如,人杂交瘤细胞)中产生。在一些实施例中,人抗体在非人细胞(例如,小鼠或仓鼠细胞系)中产生。在一些实施例中,人抗体在细菌或酵母细胞中产生。在一些实施例中,人抗体在含有未重排或重排的人免疫球蛋白基因座(例如,重链或轻链人免疫球蛋白基因座)的转基因非人动物(例如牛科动物)中产生。

[0089] 如本文所用术语“嵌合抗体”是指含有存在于至少两种不同物种(例如,来自两种不同哺乳动物物种的抗体,例如人抗体和小鼠抗体)中的序列的抗体。嵌合抗体的非限制性实例是含有非人(例如小鼠)抗体的可变结构域序列(例如,轻链和/或重链可变结构域序列的全部或部分)和人抗体的恒定结构域的抗体。嵌合抗体的另外的实例描述于本文中并且是本领域已知的。

[0090] 如本文所用术语“人源化抗体”是指含有源自非人(例如,小鼠)免疫球蛋白的最小序列并且含有源自人免疫球蛋白的序列的非人抗体。在非限制性实例中,人源化抗体是人抗体(受体抗体),其中该受体抗体的高变区(例如CDR)残基被来自具有期望特异性、亲和

力、以及能力的例如小鼠、大鼠或兔抗体的非人抗体(例如供体抗体)的高变区(例如,CDR)残基替代。在一些实施例中,人免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人(例如小鼠)免疫球蛋白残基替代。在一些实施例中,人源化抗体可以含有在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。这些修饰可以进一步改善抗体性能。在一些实施例中,人源化抗体含有至少一个、并且通常两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部的高变环(CDR)对应于非人(例如小鼠)免疫球蛋白的高变环,并且全部或基本上全部的框架区是人免疫球蛋白的框架区。人源化抗体还可以含有至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白恒定区。可以使用本领域已知的分子生物学方法产生人源化抗体。本文描述了用于产生人源化抗体的方法的非限制性实例。

[0091] 如本文所用术语“单链抗体”是指含有能够特异性结合抗原的至少两个免疫球蛋白可变结构域(例如,哺乳动物免疫球蛋白重链或轻链的可变结构域)的单个多肽。本文描述了单链抗体的非限制性实例。

[0092] 如本文所用术语“多聚体抗体”是指含有四个或更多个(例如六个、八个或十个)免疫球蛋白可变结构域的抗体。

[0093] 如本文所用术语“受试者”和“患者”在整个说明书中可互换使用,并且描述了根据本发明的方法对其提供治疗的人或非人动物。本披露涵盖了兽医和非兽医应用。人患者可以是成年人或未成年人(例如,18岁以下的人)。除人外,患者包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、雪貂、猫、狗和灵长类动物。包括例如非人灵长类动物(例如猴、黑猩猩、大猩猩等)、啮齿动物(例如大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔)、兔形目动物、猪(例如小猪、微型猪(miniature pig))、马、犬、猫科动物、牛科动物及其他家养动物、农场动物和动物园动物。

[0094] 如本文所用,当提及抗体时,短语“与……特异性结合”和“特异性结合……”是指抗体与其靶分子(例如,TNFR2)相互作用,优选与其他分子相互作用,因为该相互作用取决于靶分子上特定结构(即抗原决定簇或表位)的存在;换句话说,试剂通常识别并结合包括特定结构的分子,而不是所有分子。可以将特异性结合靶分子的抗体称为靶标特异性抗体。例如,可以将特异性结合TNFR2分子的抗体称为TNFR2特异性抗体或抗TNFR2抗体。

[0095] 如本文所用术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,是指具有至少两个氨基酸的任何长度的氨基酸聚合物。

[0096] 如本文所用术语“多核苷酸”、“核酸分子”和“核酸序列”在本文中可互换使用,是指具有至少两个核苷酸的任何长度的核苷酸聚合物,并且包括但不限于DNA、RNA、DNA/RNA杂合体及其修饰。

[0097] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域之内的普通技术人员通常所理解的相同的含义。本文描述了用于在本发明中使用的方法及材料;还可使用本领域已知的其他合适方法及材料。这些材料、方法及实例仅为说明性而不旨在限制。本文所提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目及其他参考文献均通过引用以其全文并入本文。在出现冲突情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0098] 根据以下具体实施方式以及附图和权利要求,本发明的其他特征和优点将变得明显。

附图说明

[0099] 图1是显示用MC38癌细胞注射的、并用以下处理的小鼠中肿瘤大小随时间变化的图:PBS(磷酸盐缓冲盐水)作为对照(G1)、抗hTNFR2抗体BC-1F4-IgG1(G2)、BC-3B7-IgG1(G3)、BC-1F10-IgG1(G4)、14-1B3-hHvKv-IgG1(G5)、BC-1A8-IgG1(G6)、BC-1C3-IgG1(G7)、14-4A9-hHvKv-IgG1(G8)和抗mPD-1(G9)。

[0100] 图2是显示用MC38癌细胞注射的、并用以下处理的小鼠中肿瘤大小随时间变化的图:PBS作为对照(G1)、抗体BC-1A8-IgG1(G2)、BC-1F10-IgG1(G3)、BC-1F4-IgG1(G4)、抗mPD-1(G5)、抗mCTLA4(G6)。

[0101] 图3是显示用MC38癌细胞注射的、并用以下处理的小鼠中肿瘤大小随时间变化的图:PBS作为对照(G1)、抗体BC-1C3-IgG1(G2)、抗mPD-1(G3)、抗mCTLA4(G4)。

[0102] 图4是显示用MC38癌细胞注射的、并用以下处理的小鼠中肿瘤大小随时间变化的图:PBS作为对照(G1)、抗体BC-1A8-IgG1(G2)、BC-1C3-IgG1(G3)、BC-1F10-IgG1(G4)、BC-1F4-IgG1(G5)、BC-1B6-IgG1(G6)。

[0103] 图5是显示用MC38癌细胞注射的、并用以下处理的小鼠中肿瘤大小随时间变化的图:PBS作为对照(G1)、BC-1A8-IgG1(G2)、BC-1C3-IgG1(G3)、BC-1F10-IgG1(G4)、BC-1F4-IgG1(G5)、BC-1B6-IgG1(G6)。

[0104] 图6是显示用MC38癌细胞注射的、并用以下处理的hTNF α /hTNFR2小鼠中肿瘤大小随时间变化的图:PBS作为对照(G1)、BC-1C3-IgG1(G2)、抗mPD-1(G3)。

[0105] 图7A-7B显示分组后第5天(D5)小鼠外周血的血液生化指标(AST、ALT)的测试结果。

[0106] 图8显示抗hTNFR2抗体之间的表位相关性。

[0107] 图9显示BC-1C3-IgG1、BC-1C3-IgG1-SI、BC-1C3-IgG1-LALA和人IgG1的细胞毒性数据。

[0108] 图10是显示注射不同抗体药物后人源化TNFR2小鼠血清中抗体药物浓度变化的药物浓度-时间曲线。

[0109] 图11显示指示报告细胞(Jurkat-GFP-TNFR2细胞)激活的荧光信号。

[0110] 图12显示指示报告细胞(Jurkat-GFP-TNFR2细胞)激活的荧光信号。

[0111] 图13A-13B显示小鼠外周血的血液生化指标(AST、ALT)的测试结果。

[0112] 图14列出了由Kabat编号方案定义的抗TNFR2抗体BC-1A8(“1A8”)、BC-1B6(“1B6”)、BC-1C3(“1C3”)、BC-1F4(“1F4”)、BC-1F10(“1F10”)的CDR序列。

[0113] 图15列出了由Chothia编号方案定义的抗TNFR2抗体BC-1A8(“1A8”)、BC-1B6(“1B6”)、BC-1C3(“1C3”)、BC-1F4(“1F4”)、BC-1F10(“1F10”)的CDR序列。

[0114] 图16列出了抗TNFR2抗体(1A8、1B6、1C3、1F4和1F10)的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0115] 图17列出了人TNFR2、小鼠TNFR2、猴TNFR2、狗TNFR2、人-小鼠嵌合TNFR2、IgG1重链恒定区、具有SI突变的IgG1重链恒定区、具有LALA突变的IgG1重链恒定区和人TNF α 蛋白的氨基酸序列。

具体实施方式

[0116] 肿瘤坏死因子 (TNF) 通常被认为是主要的促炎性细胞因子 (Al-Hatamleh 等人 “A perspective review on the role of nanomedicine in the modulation of TNF-TNFR2 axis in breast cancer immunotherapy [关于纳米药物在乳腺癌免疫疗法中调节 TNF-TNFR2 轴的作用的前瞻性回顾].” *Journal of oncology* [肿瘤学杂志] 2019 (2019))。在炎性过程 (包括癌症微环境) 中, TNF 是首先产生、分泌的一种炎性介质。它促进细胞因子级联的产生并促进其他炎性介质 (例如转录因子、白细胞介素 (IL) -1、IL-6) 的产生。有两种类型的 TNF 受体 (TNFR1 和 TNFR2) 位于细胞表面。炎症相关癌症的实验表明, TNFR2 优先于 TNFR1 上调, 并且抗 TNF 单克隆抗体治疗减少肿瘤的数量和大小。因此, TNF-TNFR2 轴参与免疫应答的抑制并影响肿瘤进展和转移。

[0117] 本披露提供了结合 TNFR2 (肿瘤坏死因子受体 2) 的抗体、其抗原结合片段的实例。

[0118] TNFR2 和癌症

[0119] 如果 T 细胞是 CD8+ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) (也称为 CD8+ 效应 T 细胞 (Teff)), 它们因其直接杀死肿瘤细胞的能力而成为癌症免疫疗法的重要焦点。然而, Treg 细胞可以抑制 Teff 细胞, 从而阻止适当的宿主免疫应答来消除肿瘤。因此, 抑制抑制性 Treg 细胞并同时激活细胞毒性 CD8+Teff 可以是治疗癌症的潜在策略 (Vanamee, Éva S. 等人 “TNFR2: a novel target for cancer immunotherapy [TNFR2: 癌症免疫疗法的新靶点].” *Trends in molecular medicine* [分子医学趋势] 23.11 (2017): 1037-1046)。

[0120] TNFR2 是 TNFR 超家族 (TNFRSF) 的成员, 被 TNF 激活。它是调节细胞存活和增殖的细胞表面受体, 靶向该受体已成为潜在的下一代癌症治疗方法。某些人肿瘤细胞可以异常表达 TNFR2, 并且肿瘤浸润由高度抑制的 TNFR2+Treg 细胞主导。

[0121] TNFR2 主要在免疫系统的细胞中表达, 尤其是调节性 T (Treg) 细胞和内皮细胞, 并优先结合跨膜 TNF (tmTNF)。TNFR1 和 TNFR2 是单次跨膜糖蛋白, 主要在细胞外结构域具有 28% 的同源性, 该细胞外结构域由四个富含半胱氨酸的基序组成。然而, TNF 受体的细胞内结构域在很大程度上是不相关的, 缺乏同源序列, 这表明不同的信号传导功能源自两种不同的受体。TNFR1 含有细胞内死亡结构域 (DD), 该细胞内死亡结构域与 Fas 相关死亡结构域 (FADD) 的 TNFR1 相关死亡结构域蛋白 (TRADD) 结合, 主要参与细胞死亡的信号传导。虽然 TNFR2 不含细胞质 DD, 但它与 TNF 相关因子 2 (TRAF2) 相互作用, 并且主要产生细胞存活。TNFR2 的信号传导电路不同于其他 TNFR 的信号传导电路。TNFR1 含有细胞内死亡结构域, 并且可以激活凋亡或炎性途径, 而 TNFR2 结合 TNF 受体相关因子 (TRAF), 并且可以激活典型的和非典型的 NF- κ B 途径, 以控制人和小鼠的细胞存活和增殖。

[0122] TNFR2 具有 461 个氨基酸, 氨基酸 1-22 是信号肽, 氨基酸 23-257 是细胞外结构域, 氨基酸 258-287 是跨膜结构域, 并且氨基酸 288-461 是具有 TRAF2 结合位点的细胞质结构域。TRAF2 可以结合 TRAF1、TRAF3、凋亡蛋白 1 (cIAP1) 的抑制剂和凋亡蛋白 2 (cIAP2) 的抑制剂。

[0123] 拮抗性抗 TNFR2 抗体可以阻断配体结合并将膜受体锁定在静止 (非信号传导)、反向平行的二聚体排列中, 而激动性交联抗体可以稳定平行的 TNF-TNFR2 复合物, 即提供活性信号传导网络的结构稳定。此外, 现在已经公认, TNFR2 有助于炎性环境中 CD4+Foxp3+Treg 表型的稳定。

[0124] TNFR2 及其功能的详细描述可以见于例如 Al-Hatamleh 等人 “A perspective

review on the role of nanomedicine in the modulation of TNF-TNFR2 axis in breast cancer immunotherapy[关于纳米药物在乳腺癌免疫疗法中调节TNF-TNFR2轴的作用的前瞻性回顾].”Journal of oncology[肿瘤学杂志]2019(2019);Vanamee等人“TNFR2: a novel target for cancer immunotherapy[TNFR2:癌症免疫疗法的新靶点].”Trends in molecular medicine[分子医学趋势]23.11(2017):1037-1046;Ortí-Casañ 等人“Targeting TNFR2 as a novel therapeutic strategy for Alzheimer’s disease[靶向TNFR2作为阿尔茨海默病的新治疗策略].”Frontiers in neuroscience[神经科学前沿]13(2019):49;Chen等人“Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+T regulatory cells[TNF与2型TNF受体的相互作用促进小鼠CD4+CD25+T调节性细胞的扩增和功能].”The Journal of Immunology[免疫学杂志]179.1(2007):154-161;将其各自通过引用以其全文并入。

[0125] 本披露提供了抗TNFR2抗体、其抗原结合片段、以及使用这些抗TNFR2抗体和抗原结合片段来抑制肿瘤生长和治疗各种疾病(包括例如癌症)的方法。

[0126] 抗TNFR2抗体和抗原结合片段

[0127] 本披露提供了特异性结合TNFR2(例如人TNFR2)的抗体及其抗原结合片段。本文所述的抗体和抗原结合片段能够结合TNFR2。在一些实施例中,这些抗体可以阻断TNFR2信号传导途径,从而增加免疫应答。在一些实施例中,这些抗体可以引发补体依赖性细胞毒性(CMC)或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0128] 本披露提供例如抗TNFR2抗体BC-1A8(“1A8”)、BC-1B6(“1B6”)、BC-1C3(“1C3”)、BC-1F4(“1F4”)、BC-1F10(“1F10”)、BC-3B7(“3B7”),其修饰的抗体(包括例如嵌合抗体、人源化抗体和人抗体)。

[0129] 如由Kabat编号定义的,1A8和1A8衍生的抗体(例如人源化抗体)的CDR序列包括重链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:6、7、8)和轻链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:9、10、11)。CDR也可以由Chothia系统定义。根据Chothia编号,重链可变结构域的CDR序列由SEQ ID NO:42、43、44所示,并且轻链可变结构域的CDR序列由SEQ ID NO:45、46、47所示。

[0130] 如由Kabat编号定义的,1B6和1B6衍生的抗体的CDR序列包括重链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:12、13、14)和轻链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:15、16、17)。根据Chothia编号,重链可变结构域的CDR序列由SEQ ID NO:48、49、50所示,并且轻链可变结构域的CDR由SEQ ID NO:51、52、53所示。

[0131] 如由Kabat编号定义的,1C3和1C3衍生的抗体的CDR序列包括重链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:18、19、20)和轻链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:21、22、23)。根据Chothia编号,重链可变结构域的CDR序列由SEQ ID NO:54、55、56所示,并且轻链可变结构域的CDR由SEQ ID NO:57、58、59所示。

[0132] 如由Kabat编号定义的,1F4和1F4衍生的抗体的CDR序列包括重链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:24、25、26)和轻链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:27、28、29)。根据Chothia编号,重链可变结构域的CDR序列由SEQ ID NO:60、61、62所示,并且轻链可变结构域的CDR由SEQ ID NO:63、64、65所示。

[0133] 如由Kabat编号定义的,1F10和1F10衍生的抗体的CDR序列包括重链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:30、31、32)和轻链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:33、34、35)。根据Chothia

编号,重链可变结构域的CDR序列由SEQ ID NO:66、67、68所示,并且轻链可变结构域的CDR由SEQ ID NO:69、70、71所示。

[0134] 1A8抗体的重链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:36所示。1A8抗体的轻链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:37所示。

[0135] 1B6抗体的重链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:38所示。1B6抗体的轻链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:39所示。

[0136] 1C3抗体的重链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:40所示。1C3抗体的轻链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:41所示。

[0137] 1F4抗体的重链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:72所示。1F4抗体的轻链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:73所示。

[0138] 1F10抗体的重链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:74所示。1F10抗体的轻链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:75所示。

[0139] 还提供了修饰的抗体的重链可变区和轻可变区的氨基酸序列。在一些实施例中,重链可变区与SEQ ID NO:36、38、40、72或74至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。在一些实施例中,轻链可变区与SEQ ID NO:37、39、41、73或75至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。重链可变区序列可以与相应的轻链可变区序列配对,并且它们一起与TNFR2结合。

[0140] 人源化百分比意指重链或轻链可变区序列与国际免疫遗传学信息系统 (IMGT) 数据库中的人抗体序列相比的百分比同一性。最高命中 (top hit) 意指相对于其他物种,重链或轻链可变区序列更接近特定物种。例如,与人的最高命中意指序列相比于其他物种更接近人。与人和食蟹猴 (*Macaca fascicular*) 的最高命中意指序列与人序列和食蟹猴序列具有相同的百分比同一性,并且与其他物种的序列相比,这些百分比同一性最高。在一些实施例中,人源化百分比大于80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或95%。关于如何确定人源化百分比和如何确定最高命中的详细描述在本领域中是已知的,并且描述于:例如Jones等人“The INNs and outs of antibody nonproprietary names [INN和抗体非专有名称的输出].”MAbs. [单克隆抗体]第8卷.第1期. Taylor&Francis [泰勒弗朗西斯集团]2016,其通过引用以其全文并入本文。高人源化百分比通常具有多种优势,例如在人中更安全且更有效、人受试者更容易耐受、和/或更不容易产生副作用。在一些实施例中,可变区是完全人的,例如,源自人重链免疫球蛋白基因座序列(例如,人IGHV、IGHD和IGHJ基因的重组),和/或人κ链免疫球蛋白基因座序列(例如,人IGKV和IGKJ基因的重组)。

[0141] 此外,在一些实施例中,本文描述的抗体或其抗原结合片段还可以含有选自下组的一个、两个或三个重链可变区CDR:SEQ ID NO:6-8、SEQ ID NO:12-14、SEQ ID NO:18-20、SEQ ID NO:24-26和SEQ ID NO:30-32 (Kabat编号);和/或选自下组的一个、两个或三个轻链可变区CDR:SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:15-17、SEQ ID NO:21-23、SEQ ID NO:27-29和SEQ ID NO:33-35 (Kabat编号)。

[0142] 在一些实施例中,抗体可以具有包含互补决定区 (CDR) 1、2、3的重链可变区 (VH),其中CDR1区包含与选定的VH CDR1氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成,CDR2区包含与选定的VH CDR2氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同

的氨基酸序列或由其组成,并且CDR3区包含与选定的VH CDR3氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,抗体可以具有包含CDR 1、2、3的轻链可变区(VL),其中CDR1区包含与选定的VL CDR1氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成,CDR2区包含与选定的VL CDR2氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成,并且CDR3区包含与选定的VL CDR3氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成。图14(Kabat CDR)和图15(Chothia CDR)中示出了选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列和选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列。

[0143] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链可变结构域,该重链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:6;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:7;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:8。

[0144] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链可变结构域,该重链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:12;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:13;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:14。

[0145] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链可变结构域,该重链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:18;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:19;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:20。

[0146] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链可变结构域,该重链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:24;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:25;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:26。

[0147] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链可变结构域,该重链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:30;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:31;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:32。

[0148] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有轻链可变结构域,该轻链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:9;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:10;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:11。

[0149] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有轻链可变结构域,该轻链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:15;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:16;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:17。

[0150] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有轻链可变结构域,该轻链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:21;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:

22;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:23。

[0151] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有轻链可变结构域,该轻链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:27;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:28;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:29。

[0152] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有轻链可变结构域,该轻链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:33;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:34;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:35。

[0153] 插入、缺失和取代可以在CDR序列内,或在CDR序列的一个末端或两个末端处。在一些实施例中,CDR是基于Kabat编号方案确定的。在一些实施例中,CDR是基于Chothia编号方案确定的。在一些实施例中,CDR是基于Kabat和Chothia编号方案的组合确定的。

[0154] 本披露还提供了结合TNFR2的抗体或其抗原结合片段。抗体或其抗原结合片段含有重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区包含与选定的VH序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成,该轻链可变区包含或与选定的VL序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,选定的VH序列是SEQ ID NO:36,以及选定的VL序列是SEQ ID NO:37。在一些实施例中,选定的VH序列是SEQ ID NO:38,以及选定的VL序列是SEQ ID NO:39。在一些实施例中,选定的VH序列是SEQ ID NO:40,以及选定的VL序列是SEQ ID NO:41。在一些实施例中,选定的VH序列是SEQ ID NO:72,以及选定的VL序列是SEQ ID NO:73。在一些实施例中,选定的VH序列是SEQ ID NO:74,以及选定的VL序列是SEQ ID NO:75。

[0155] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性,出于最佳比较目的对序列进行比对(例如,在第一氨基酸和第二氨基酸或第一核酸序列和第二核酸序列的一者或二者中引入缺口以用于最佳比对,并且出于比较目的,非同源序列可以忽略)。出于比较目的的比对的参考序列的长度是参考序列长度的至少80%,并且在一些实施例中是参考序列长度的至少90%、95%或100%。然后比较相应的氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置处相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,分子在该位置处是一致的。将缺口的数量和每个缺口的长度考虑在内,两个序列之间的百分比同一性是这些序列共有的相同位置的数量的函数,需要引入这些缺口以进行两个序列的最佳比对。例如,两个序列的比较和两个序列之间同一性百分数的确定可以使用具有缺口罚分12、缺口延伸罚分4、以及移码缺口罚分5的Blosum62评分矩阵实现。

[0156] 本披露还提供了包含编码多肽的多核苷酸的核酸,该多肽包含免疫球蛋白重链或免疫球蛋白轻链。免疫球蛋白重链或免疫球蛋白轻链包含如在图14或图15中所示的CDR,或具有如图16中所示的序列。当多肽与相应的多肽(例如,相应的重链可变区或相应的轻链可变区)配对时,这些配对的多肽结合TNFR2。

[0157] 抗TNFR2抗体和抗原结合片段也可以是抗体或抗体片段的抗体变体(包括衍生物和缀合物)以及多特异性(例如双特异性)抗体或抗体片段。本文提供的另外的抗体是多克隆抗体、单克隆抗体、多聚体抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、嵌合抗体(例如,人-小鼠嵌合体)、单链抗体、细胞内产生的抗体(即胞内抗体)及其抗原结合片段。抗

体或其抗原结合片段可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段是IgG抗体或其抗原结合片段。

[0158] 抗体的片段适合用于所提供的方法,只要其保留了全长抗体的期望亲和力和特异性。因此,结合TNFR2的抗体片段将保留结合TNFR2的能力。Fv片段是含有完整抗原识别位点和结合位点的抗体片段。此区域由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的紧密结合的二聚体组成,在自然界中可以是共价的,例如scFv。在此结构中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以定义VH-VL二聚体表面的抗原结合位点。总之,六个CDR或其子集赋予抗体抗原结合特异性。然而,甚至是一个单一可变结构域(或一个Fv的仅包含三个CDR对抗原具有特异性的一半)也具有识别并结合抗原的能力,尽管通常亲和力比整个结合位点低。单链Fv或(scFv)抗体片段包含抗体的VH和VL结构域(或区域),其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,scFv多肽进一步包含在VH与VL结构域之间的多肽接头,该多肽接头能够使scFv形成抗原结合的期望结构。

[0159] 本披露还提供了与如本文所述的任何抗体或抗原结合片段交叉竞争的抗体或其抗原结合片段。交叉竞争测定是本领域已知的,例如描述于Moore等人,“Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1gp120 exterior envelope glycoprotein[人免疫缺陷病毒1型gp120外包膜糖蛋白的抗体交叉竞争分析].”*Journal of virology*[病毒学杂志]70.3(1996):1863-1872,其通过引用以其全文并入本文。在一个方面,本披露还提供了与如本文所述的任何抗体或抗原结合片段结合相同表位或区域的抗体或其抗原结合片段。表位分箱测定在本领域中是已知的,例如描述于Estep等人“High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning[抗体-抗原亲和力和表位分箱的基于溶液的高通量测量].”*MAbs*. [单克隆抗体]第5卷.第2期.Taylor和Francis,2013,将其通过引用以其全文并入本文。

[0160] 抗体和抗原结合片段

[0161] 本披露提供了源自本文所述的抗TNFR2抗体的各种抗体及其抗原结合片段。通常,抗体(也称为免疫球蛋白)由轻链和重链两类多肽链组成。本披露的抗体的非限制性实例可以是包含两条重链和两条轻链的完整的四种免疫球蛋白链抗体。抗体的重链可以是任何同种型(包括IgM、IgG、IgE、IgA或IgD)或亚同种型(包括IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE1、IgE2等)。轻链可以是 κ 轻链或 λ 轻链。抗体可以包含轻链的两个相同拷贝和重链的两个相同拷贝。各自含有一个可变结构域(或可变区, V_H)和多个恒定结构域(或恒定区)的重链在其恒定结构域内经由二硫键彼此结合,以形成抗体的“柄”。各自含有一个可变结构域(或可变区, V_L)和一个恒定结构域(或恒定区)的轻链分别经由二硫键结合一条重链。每条轻链的可变区和与其结合的重链的可变区配对。轻链和重链的可变区都包含夹在更保守的框架区(FR)之间的三个高变区。

[0162] 这些高变区(称为互补决定区(CDR))形成了包含抗体的抗原结合表面的环。四个框架区主要采用 β -折叠构象,并且CDR形成连接 β -折叠结构的环,并且在一些情况下这些环形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的CDR通过框架区紧密靠近,并且与来自另一个链的CDR一起形成了抗原结合区。

[0163] 通过分析抗体的氨基酸序列来鉴定该抗体的CDR区的方法是熟知的,并且CDR的许

多定义是常用的。Kabat定义是基于序列可变性,而Chothia定义是基于结构环区域的位置。这些方法和定义描述于:例如Martin,“Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains[抗体可变结构域的蛋白质序列和结构分析]”,Antibody Engineering[抗体工程化],Springer Berlin Heidelberg[柏林海德尔堡斯普林格出版社],2001.422-439;Abhinandan等人“Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains[Kabat的分析和改进以及抗体可变结构域的结构正确编号]”Molecular immunology[分子免疫学]45.14 (2008):3832-3839;Wu,T.T.和Kabat,E.A. (1970) J. Exp. Med. [实验医学杂志]132:211-250;Martin等人,Methods Enzymol. [酶学方法]203:121-53 (1991);Morea等人,Biophys Chem. [生物物理化学]68 (1-3):9-16 (1997年10月);Morea等人,J Mol Biol. [分子生物学杂志]275 (2):269-94 (1998年1月);Chothia等人,Nature[自然]342 (6252):877-83 (1989年12月);Ponomarenko和Bourne,BMC Structural Biology[BMC结构生物学]7:64 (2007);将其各自通过引用以其全文并入本文。

[0164] CDR对于识别抗原表位很重要。如本文所用,“表位”是能够被抗体的抗原结合结构域特异性结合的靶分子的最小部分。表位的最小尺寸可能为约三、四、五、六或七个氨基酸,但这些氨基酸不是必须位于抗原一级结构的连续线性序列中,因为表位可能取决于基于抗原的二级和三级结构的抗原的三维构型。

[0165] 在一些实施例中,抗体是完整的免疫球蛋白分子(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgD、IgE、IgA)。IgG亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)是高度保守的,不同之处在于其恒定区,尤其是其铰链和CH2上部结构域。IgG亚类的序列和差异是本领域已知的,并且描述于:例如Vidarsson等人,“IgG subclasses and allotypes:from structure to effector functions[IgG亚类和同种异型:从结构到效应子功能].”Frontiers in immunology[免疫学前沿]5 (2014);Irani等人“Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases[人IgG亚类的分子特性及其对设计针对传染性疾病的的治疗性单克隆抗体的影响].”Molecular immunology[分子免疫学]67.2 (2015):171-182;Shakib, Farouk,编辑The human IgG subclasses:molecular analysis of structure,function and regulation[人IgG亚类:结构、功能和调控的分子分析].Elsevier,2016;将其各自通过引用以其全文并入本文。

[0166] 抗体还可以是源自任何物种(例如人、啮齿动物、小鼠、骆驼科动物)的免疫球蛋白分子。本文披露的抗体还包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体、以及包括与另一个多肽融合的免疫球蛋白结合结构域的嵌合抗体。术语“抗原结合结构域”或“抗原结合片段”是保留完整抗体的特异性结合活性的抗体部分,即抗体能够与完整抗体的靶分子上的表位特异性结合的任何部分。其包括例如Fab、Fab’、F(ab’)2和这些片段的变体。因此,在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段可以是例如scFv、Fv、Fd、dAb、双特异性抗体、双特异性scFv、双抗体、线性抗体、单链抗体分子、由抗体片段形成的多特异性抗体、以及包括作为抗体结合结构域或与其同源的结合结构域的任何多肽。抗原结合结构域的非限制性实例包括例如完整抗体的重链和/或轻链CDR、完整抗体的重链和/或轻链可变区、完整抗体的全长重链或轻链、或来自完整抗体的重链或轻链的单独CDR。

[0167] 还提供了适于在本文所述的方法中使用的抗体片段。Fab片段含有轻链的可变结构域和恒定结构域以及重链的可变结构域和第一恒定结构域(CH1)。F(ab')₂抗体片段包含一对Fab片段,这些片段通常在其羧基端附近通过它们之间的铰链半胱氨酸来共价连接。抗体片段的其他化学偶联也是本领域已知的。

[0168] 双抗体是具有两个抗原结合位点的小抗体片段,这些片段包含同一多肽链中的VL连接VH(VH和VL)。通过使用太短而无法使同一链上的两个结构域之间配对的接头,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。

[0169] 线性抗体包含一对串联Fd区段(VH-CH1-VH-CH1),其与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0170] 本披露的抗体和抗体片段可以在Fc区中被修饰以提供期望的效应子功能或血清半衰期。

[0171] 抗体的多聚化可以通过抗体的天然聚集或通过本领域已知的化学或重组连接技术来实现。例如,一定百分比的纯化的抗体制品(例如,纯化的IgG₁分子)自发形成含有抗体同二聚体以及其他更高阶抗体多聚体的蛋白质聚集体。

[0172] 可替代地,可以通过本领域已知的化学连接技术形成抗体同二聚体。例如,可以使用异双功能交联接头(包括但不限于SMCC(琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯)和SATA(N-琥珀酰亚胺基S-乙硫基-乙酰胺))来形成抗体多聚体。形成抗体同二聚体的示例性方案描述于:Ghetie等人(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]94:7509-7514,1997)。可以通过用胃蛋白酶消化将抗体同二聚体转化为Fab'₂同二聚体。形成抗体同二聚体的另一种方式是通过使用描述于以下中的自体(autophilic)T15肽:Zhao等人(J.Immunol.[免疫学杂志]25:396-404,2002)。

[0173] 在一些实施例中,多特异性抗体是双特异性抗体。可通过将一对抗体分子之间的界面工程化以使从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化来制备双特异性抗体。例如,界面可以含有抗体恒定结构域的CH3结构域的至少一部分。在此方法中,来自第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链被较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替代。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替代大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生与一个或多个大侧链相同或相似大小的补偿“腔”。这提供了用于增加异二聚体相对于其他不需要的终产物如同二聚体的产量的机制。此方法描述于例如W096/27011中,其通过引用以其全文并入。

[0174] 双特异性抗体包括交联的或“异缀合物(heteroconjugate)”抗体。例如,异缀合物中的抗体中的一个可以偶联至亲和素,而另一个可以偶联至生物素。异缀合物抗体也可以使用任何常规的交联方法制备。合适的交联剂和交联技术在本领域中是熟知的,并且披露于美国专利号4,676,980中,其通过引用以其全文并入本文。

[0175] 本文所述的任何抗体或抗原结合片段可与稳定分子(例如,增加抗体或其抗原结合片段在受试者或溶液中的半衰期的分子)缀合。稳定分子的非限制性实例包括:聚合物(例如聚乙二醇)或蛋白质(例如血清白蛋白,如人血清白蛋白)。稳定分子的缀合可以增加抗体或抗原结合片段的半衰期或提高其在体外(例如,在组织培养中或当以药物组合物形式存储时)或在体内(例如,在人体内)的生物学活性。

[0176] 在一些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以与治疗剂缀合。包含抗体

或其抗原结合片段的抗体-药物缀合物可以共价或非共价结合治疗剂。在一些实施例中,治疗剂是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂(例如,细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽菌素、美登素类(maytansinoid)(例如DM-1和DM-4)、二酮类、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、表柔比星和环磷酰胺及类似物)。

[0177] 在一些实施例中,抗原结合片段可以形成嵌合抗原受体(CAR)的一部分。在一些实施例中,嵌合抗原受体是如本文所述的单链可变片段(scFv)与CD3- ζ 跨膜结构域和内结构域融合的融合物。在一些实施例中,嵌合抗原受体还包含来自多种共刺激蛋白受体(例如,CD28、41BB、ICOS)的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,嵌合抗原受体包含多个信号传导结构域,例如CD3 ζ -CD28-41BB或CD3 ζ -CD28- α 40,以提高效力。因此,在一个方面,本披露进一步提供了表达如本文所述的嵌合抗原受体的细胞(例如,T细胞)。

[0178] 在一些实施例中,scFv具有一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域。在一些实施例中,scFv具有两个重链可变结构域和两个轻链可变结构域。

[0179] 抗体特征

[0180] 本文所述的抗体或其抗原结合片段可以阻断TNFR2和TNFR2配体之间的结合。在一些实施例中,通过结合TNFR2,抗体可以抑制TNFR2信号传导途径。在一些实施例中,抗体可以上调免疫应答。在一些实施例中,抗体可以减小具有表达TNFR2的肿瘤的动物中的肿瘤体积。

[0181] 在一些实施方式中,抗体(或其抗原结合片段)特异性结合TNFR2(人TNFR2、小鼠TNFR2、猴TNFR2、狗TNFR2、嵌合TNFR2),其中解离速率(koff)小于 0.1s^{-1} 、小于 0.01s^{-1} 、小于 0.001s^{-1} 、小于 0.0001s^{-1} 或小于 0.00001s^{-1} 。在一些实施例中,解离速率(koff)大于 0.01s^{-1} 、大于 0.001s^{-1} 、大于 0.0001s^{-1} 、大于 0.00001s^{-1} 或大于 0.000001s^{-1} 。

[0182] 在一些实施例中,动力学缔合速率(kon)大于 $1\times 10^2/\text{Ms}$ 、大于 $1\times 10^3/\text{Ms}$ 、大于 $1\times 10^4/\text{Ms}$ 、大于 $1\times 10^5/\text{Ms}$ 或大于 $1\times 10^6/\text{Ms}$ 。在一些实施例中,动力学缔合速率(kon)小于 $1\times 10^5/\text{Ms}$ 、小于 $1\times 10^6/\text{Ms}$ 或小于 $1\times 10^7/\text{Ms}$ 。

[0183] 可以从动力学速率常数的商推导亲和力($KD=koff/kon$)。在一些实施例中, KD 小于 $1\times 10^{-6}\text{M}$ 、小于 $1\times 10^{-7}\text{M}$ 、小于 $1\times 10^{-8}\text{M}$ 、小于 $1\times 10^{-9}\text{M}$ 或小于 $1\times 10^{-10}\text{M}$ 。在一些实施例中, KD 小于 50nM 、 30nM 、 20nM 、 15nM 、 10nM 、 9nM 、 8nM 、 7nM 、 6nM 、 5nM 、 4nM 、 3nM 、 2nM 或 1nM 。在一些实施例中, KD 大于 $1\times 10^{-7}\text{M}$ 、大于 $1\times 10^{-8}\text{M}$ 、大于 $1\times 10^{-9}\text{M}$ 、大于 $1\times 10^{-10}\text{M}$ 、大于 $1\times 10^{-11}\text{M}$ 、或大于 $1\times 10^{-12}\text{M}$ 。

[0184] 用于测量抗体对抗原的亲合力的通用技术包括例如ELISA、RIA和表面等离子体共振(SPR)。在一些实施例中,抗体结合人TNFR2(SEQ ID NO:1)、小鼠TNFR2(例如,SEQ ID NO:2)、猴TNFR2(例如,SEQ ID NO:3)、狗TNFR2(SEQ ID NO:4)、和/或嵌合TNFR2(SEQ ID NO:5)。在一些实施例中,抗体不结合猴TNFR2、狗TNFR2、嵌合TNFR2和/或小鼠TNFR2。

[0185] TNFR2具有四个富含半胱氨酸的结构域(CRD)。CRD1是SEQ ID NO:1的39aa-76aa,CRD2是SEQ ID NO:1的77aa-118aa,CRD3是SEQ ID NO:1的119aa-162aa,并且CRD4是SEQ ID NO:1的168aa-196aa。在一些实施例中,抗体(或其抗原结合片段)特异性结合CRD1、CRD2、CRD3和/或CRD4。在一些实施例中,表位位于CRD3和CRD4的连接处。

[0186] 在一些实施例中,抗体的肿瘤生长抑制百分比($TGI_{TV}\%$)大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%。在一些实施例中,抗体的肿瘤生长抑制百分比小于60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%。例如,在治疗开始后3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、或30天,或治疗开始后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或12个月,可以确定 $TGI_{TV}\%$ 。如本文所用,使用以下公式计算肿瘤生长抑制百分比($TGI_{TV}\%$):

$$[0187] \quad TGI_{TV}(\%) = [1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)] \times 100$$

[0188] Ti 是治疗组在第*i*天的平均肿瘤体积。 $T0$ 是治疗组在第零天的平均肿瘤体积。 Vi 是对照组在第*i*天的平均肿瘤体积。 $V0$ 是对照组在第零天的平均肿瘤体积。

[0189] 在一些实施例中,如本文所述的抗体或其抗原结合片段例如对于表达TNFR2的细胞具有细胞毒性。测量细胞毒性的方法是本领域已知的。在一些实施例中,通过以下公式计算细胞毒性:

$$[0190] \quad \text{细胞毒性}\% = \left(\frac{(\text{实验} - \text{自发}) - (\text{效应子} - \text{自发}) - (\text{靶} - \text{自发})}{\text{靶最大} - \text{自发}^*} \right) \times 100\%$$

[0191] 其中实验是指实验孔(效应细胞+靶细胞+测试产品)的吸光度值;效应子是指效应细胞(仅效应细胞)的吸光度值。靶是指靶细胞(仅靶细胞)的吸光度值。自发是指细胞培养基(仅细胞培养基,无效应细胞、靶细胞)的自发荧光吸光度值。靶最大是指靶细胞(靶细胞+裂解物)的最高吸光度值。自发*是指细胞培养基体积对照孔(仅培养基+裂解物)的吸光度值。 EC_{50} 也可以计算出来。在一些实施例中, EC_{50} 小于200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20或10 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0192] 在一些实施例中,如本文所述的抗体或其抗原结合片段是TNFR2拮抗剂。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段降低表达TNFR2的靶细胞(例如,T细胞如Treg)中的TNFR2信号转导。

[0193] 在一些实施例中,如本文所述的抗体或其抗原结合片段是无毒的。在一些实施例中,例如在0.3mg/kg、1mg/kg、10mg/kg或25mg/kg时,在治疗组和对照组之间不能观察到显著的体重差异。

[0194] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段可以结合表达TNFR2的肿瘤细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段可以诱导补体依赖性细胞毒性(CMC)和/或抗体依赖性细胞毒性(ADCC),并杀死肿瘤细胞。

[0195] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段具有功能性Fc区。在一些实施例中,功能性Fc区的效应子功能是抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一些实施例中,功能性Fc区的效应子功能是吞噬作用。在一些实施例中,功能性Fc区的效应子功能是ADCC和吞噬作用。

[0196] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段可以诱导补体介导的细胞毒性(CMC)。

[0197] 在一些实施例中,Fc区是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4。在一些实施例中,抗体是人IgG1抗体。

[0198] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段不具有功能性Fc区。例如,抗体或抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。在一些实施例中,Fc区具有LALA突变(以EU编号的

L234A和L235A突变)、或LALA-PG突变(以EU编号的L234A、L235A、P329G突变)。

[0199] 在一些实施例中,Fc具有SI突变(以EU编号的S239D和I332E突变)。

[0200] 制备抗TNFR2抗体的方法

[0201] 可以使用多克隆和单克隆抗体制备的标准技术,将人TNFR2的分离片段(例如,细胞外区域)用作免疫原以产生抗体。可以通过多次注射(例如皮下或腹膜内注射)抗原肽或蛋白质而在动物中产生多克隆抗体。在一些实施例中,将抗原肽或蛋白质与至少一种佐剂一起注射。在一些实施例中,可以将抗原肽或蛋白质与待免疫物种中具有免疫原性的药剂缀合。可以向动物注射抗原肽或蛋白质超过一次(例如两次、三次或四次)。

[0202] 可以使用全长多肽或蛋白质;或者可替代地,其抗原肽片段可以用作免疫原。蛋白质的抗原肽包含TNFR2的氨基酸序列的至少8个(例如,至少10个、15个、20个或30个)氨基酸残基,并且涵盖蛋白质的表位,使得产生的针对该肽的抗体与该蛋白质形成特异性免疫复合物。如上所述,人TNFR2的全长序列是本领域已知的(SEQ ID NO:1)。在一些实施例中,使用加Fc标签的人TNFR2蛋白(Fc融合蛋白含有人TNFR2细胞外结构域,SEQ ID NO:1的23-257位)作为免疫原。

[0203] 免疫原通常用于通过免疫合适的受试者(例如表达至少一个人免疫球蛋白基因座的人或转基因动物)来制备抗体。合适的免疫原性制剂可以含有例如重组表达的多肽或化学合成的多肽(例如人TNFR2的片段)。制剂可以进一步包含佐剂,例如弗氏完全或不完全佐剂、或类似的免疫刺激剂。

[0204] 如上所述,可以通过用TNFR2多肽或其抗原肽(例如,TNFR2的一部分如细胞外区域)作为免疫原来免疫合适的受试者以制备多克隆抗体。可以通过标准技术(例如使用固定化的TNFR2多肽或肽的酶联免疫吸附测定(ELISA))监测经免疫的受试者的抗体效价随时间的变化。如果需要,可以将抗体分子从哺乳动物(例如从血液)分离,并通过熟知的技术(例如蛋白A或蛋白G色谱法)进一步纯化以获得IgG部分。在免疫后的合适时间,例如当特异性抗体效价最高时,产生抗体的细胞可以从受试者获得并通过以下标准技术用于制备单克隆抗体:例如最初由Kohler等人(Nature[自然]256:495-497,1975)描述的杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人,Immunol.Today[当代免疫]4:72,1983)、EBV杂交瘤技术(Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy[单克隆抗体和癌症治疗],Alan R.Liss,Inc.[艾伦利斯有限公司],第77-96页,1985)、或三源杂交瘤(trioma)技术。用于产生杂交瘤的技术是熟知的(通常参见Current Protocols in Immunology[当代免疫学指南],1994,Coligan等人(编辑),John Wiley&Sons,Inc.[约翰威利父子出版公司],纽约州,纽约)。例如使用标准ELISA测定法筛选杂交瘤培养物上清液中结合目的多肽或表位的抗体,检测产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0205] 可以通过将适当的核苷酸变化引入编码本文所述的人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、或其抗原结合片段的DNA中或通过肽合成来制备本文所述的抗体或抗原结合片段的变体。此类变体包括例如组成抗体的抗原结合位点或抗原结合结构域的氨基酸序列内残基的缺失、插入或取代。在此类变体的群体中,一些抗体或抗原结合片段将对靶蛋白(例如TNFR2)具有增加的亲和力。可以对缺失、插入和/或组合进行任意组合,以获得对靶标具有增加的结合亲和力的抗体或其抗原结合片段。引入到抗体或抗原结合片段中的氨基酸变化还可以改变新的翻译后修饰或将新的翻译后修饰引入抗体或抗原结合片段中,例如改变

(例如,增加或减少)糖基化位点的数量、改变糖基化位点的类型(例如,改变氨基酸序列,使得细胞中存在的酶连接不同的糖)、或引入新的糖基化位点。

[0206] 本文披露的抗体可以源自任何动物物种,包括哺乳动物。天然抗体的非限制性实例包括源自以下的抗体:人、灵长类动物(例如猴和猿)、牛、猪、马、绵羊、骆驼科动物(例如骆驼和美洲驼)、鸡、山羊和啮齿动物(例如大鼠、小鼠、仓鼠和兔),包括经过基因工程化以产生人抗体的转基因啮齿动物。

[0207] 人和人源化抗体包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(或具有与来源于人种系免疫球蛋白序列的氨基酸序列相同的氨基酸序列)的抗体。人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变而引入的突变),例如在CDR中。

[0208] 人源化抗体通常具有移植了非人CDR的人框架(FR)。因此,人源化抗体具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸序列。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,它们通常取自一种“输入”可变结构域。人源化基本上可以通过将例如啮齿动物CDR或CDR序列取代为人抗体的相应序列来进行。这些方法描述于例如,Jones等人“Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from amouse[用来自小鼠的互补决定区替待人抗体中的互补决定区].”Nature[自然]321.6069 (1986):522;Riechmann等人“Reshaping human antibodies for therapy[重塑用于治疗的人抗体].”Nature[自然]332.6162(1988):323;Dall’Acqua等人“Antibody humanization by framework shuffling[通过框架改组实现抗体人源化].”Methods[方法]36.1(2005):43-60;将其各自通过引用以其全文并入本文。因此,“人源化”抗体是嵌合抗体,其中基本上少于完整的人V结构域被来自非人物种的相应序列取代。在实践中,人源化抗体通常是小鼠抗体,其中一些CDR残基和一些FR残基被来自人抗体中类似位点的残基取代。

[0209] 选择用于制备人源化抗体的人VH和VL结构域对于降低免疫原性非常重要。根据所谓的“最高拟合(best-fit)”方法,可针对已知人结构域序列的整个文库来筛选小鼠抗体的V结构域的序列。然后接受与小鼠序列最接近的人序列作为人源化抗体的人FR(Sims等人“A humanized CD18 antibody can block function without cell destruction[人源化CD18抗体可以在不破坏细胞的情况下阻断功能].”The Journal of Immunology[免疫学杂志]151.4(1993):2296-2308;Chothia等人,“Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins[免疫球蛋白高变区的典型结构].”Journal of molecular biology[分子生物学杂志]196.4(1987):901-917)。

[0210] 进一步重要的是将抗体人源化,同时保留对抗原的高特异性和亲和力以及其他有利的生物学特性。为了实现这个目标,可以通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型,分析亲本序列和多种概念性人源化产物的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可得到的,并且对于本领域普通技术人员而言是熟悉的。说明并展示选定的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。对这些显示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以从受体序列和输入序列选出并且组合FR残基,从而达到所需的抗体特征,如对一种或多种靶抗原亲和力增加。

[0211] 通常,人抗TNFR2抗体、人源化抗TNFR2抗体或嵌合抗TNFR2抗体的氨基酸序列变体将含有与原始抗体的轻链或重链中存在的序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%百分比同一性的氨基酸序列。

[0212] 在一些实施例中,使用具有人源化重链免疫球蛋白基因座和人源化 κ 链免疫球蛋白基因座的小鼠(例如, RenMab小鼠)产生抗体。重链免疫球蛋白基因座是染色体上含有抗体重链基因的区域。该基因座可以包括例如人IGHV(可变)基因、人IGHD(多样性)基因、人IGHJ(连接)基因和小鼠重链恒定结构域基因。 κ 链免疫球蛋白基因座是染色体上含有编码抗体轻链(κ 链)的基因的区域。 κ 链免疫球蛋白基因座可以包括例如人IGKV(可变)基因、人IGKJ(连接)基因和小鼠轻链恒定结构域基因。关于RenMab小鼠的详细描述可见于PCT/CN2020/075698中,其通过引用以其全文并入本文。小鼠产生的抗体具有完整的人VH、完整的人VL和小鼠恒定区。在一些实施例中,人VH和人VL与人IgG恒定区(例如, IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)连接。在一些实施例中,恒定区具有与SEQ ID NO:76、77或78至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列。

[0213] 关于原始序列的同一性或同源性通常是在比对序列并引入空位(必要时)以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代作为序列同一性的一部分后,候选序列中存在的氨基酸残基与人抗TNFR2抗体、人源化抗TNFR2抗体或嵌合抗TNFR2抗体或片段中存在的序列相同的氨基酸残基的百分比。

[0214] 可以对抗TNFR2抗体或抗原结合片段进行额外的修饰。例如,可以将一个或多个半胱氨酸残基引入Fc区,从而允许在该区域中形成链间二硫键。由此产生的同二聚体抗体可以具有任何增加的体外和/或体内半衰期。还可以使用如例如Wolff等人("Monoclonal antibody homodimers: enhanced antitumor activity in nude mice[单克隆抗体同二聚体:增强的裸鼠的抗肿瘤活性]". Cancer research[癌症研究]53.11(1993):2560-2565)描述的异双功能交联接头来制备具有增加的体外和/或体内半衰期的同二聚体抗体。可替代地,可以将具有两个Fc区的抗体进行工程化。

[0215] 在一些实施例中,可以对抗TNFR2抗体或其抗原结合片段进行共价修饰。这些共价修饰可以通过化学合成或酶促合成、或通过酶促裂解或化学裂解来进行。抗体或抗体片段的其他类型的共价修饰通过使抗体或片段的靶向氨基酸残基与能够与选定侧链或N-末端或C-末端残基反应的有机衍生剂进行反应而引入分子中。

[0216] 在一些实施例中,提供了具有碳水化合物结构的抗体变体,该碳水化合物结构缺少(直接或间接)附接至Fc区的岩藻糖。例如,此种抗体组合物中的岩藻糖的量可以为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。例如,如WO 2008/077546中所述,计算相对于通过MALDI-TOF质谱测量的与Asn 297附接的所有糖结构(例如,络合、杂合和高甘露糖结构)的总和的Asn297糖链内岩藻糖的平均量来确定的岩藻糖的量。Asn297是指位于Fc区中约297位的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号,或以Kabat编号的314位);然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可位于位置297上游或下游约 ± 3 个氨基酸,即在位置294和300之间。这类岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。在一些实施例中,为了降低聚糖异质性,可以将抗体的Fc区进一步工程化以用丙氨酸替代297位的天冬酰胺(N297A)。

[0217] 在一些实施例中,为了通过避免Fab-臂交换来提高生产效率,将抗体的Fc区进一步工程化,以用脯氨酸替代IgG4的228位(EU编号)的丝氨酸(S228P)。关于S228突变的详细

描述在以下中进行了描述:例如Silva等人“The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation.[如使用新的定量免疫测定和生理基质制备的组合所证明,S228P突变防止体内和体外IgG4 Fab臂交换]”Journal of Biological Chemistry[生物化学杂志]290.9(2015):5462-5469,其通过引用以其全文并入。

[0218] 重组载体

[0219] 本披露还提供了包括本文披露的分离的多核苷酸(例如,编码本文披露的多肽的多核苷酸)的重组载体(例如表达载体)、引入了重组载体的宿主细胞(即,使得这些宿主细胞含有多核苷酸和/或包含多核苷酸的载体)、以及通过重组技术产生重组抗体多肽或其片段。

[0220] 如本文所用,“载体”是当载体被引入宿主细胞时能够将一种或多种目的多核苷酸递送至该宿主细胞的任何构建体。“表达载体”能够在已引入表达载体的宿主细胞中递送和表达一种或多种目的多核苷酸作为编码的多肽。因此,在表达载体中,目的多核苷酸通过与调控元件诸如启动子、增强子和/或多聚腺苷酸尾可操作地连接而定位于载体中表达,这些调控元件位于载体内或宿主细胞的基因组中的目的多核苷酸的整合位点处或该整合位点附近或该整合位点两侧,使得目的多核苷酸将在引入了该表达载体的宿主细胞中得以翻译。

[0221] 可以通过本领域已知的方法,例如电穿孔、化学转染(例如DEAE-葡聚糖)、转化、转染以及感染和/或转导(例如用重组病毒)将载体引入到宿主细胞中。因此,载体的非限制性实例包括病毒载体(可用于产生重组病毒)、裸DNA或RNA、质粒、粘粒、噬菌体载体以及与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体。

[0222] 在一些实施方式中,使用病毒表达系统(例如牛痘或其他痘病毒、逆转录病毒或腺病毒)引入本文披露的多核苷酸(例如,编码本文披露的多肽的多核苷酸),这可能涉及使用非致病性(缺陷型)、可复制型病毒,或可以使用复制缺陷性病毒。在后一种情况下,病毒繁殖通常仅发生在互补的病毒包装细胞中。合适的系统披露于:例如Fisher-Hoch等人,1989, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]86:317-321;Flexner等人,1989, Ann.N.Y.Acad.Sci.[纽约科学院年报]569:86-103;Flexner等人,1990,Vaccine[疫苗],8:17-21;美国专利号4,603,112、4,769,330和5,017,487;WO 89/01973;美国专利号4,777,127;GB 2,200,651;EP 0,345,242;WO 91/02805;Berkner-Biotechniques[生物技术],6:616-627,1988;Rosenfeld等人,1991,Science[科学],252:431-434;Kolls等人,1994, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],91:215-219;Kass-Eisler等人,1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],90:11498-11502;Guzman等人,1993, Circulation[循环],88:2838-2848;以及Guzman等人,1993,Cir.Res.[循环研究],73:1202-1207。将DNA整合到此类表达系统的技术是本领域普通技术人员所熟知的。DNA也可以是“裸的”,如例如描述于Ulmer等人,1993,Science[科学],259:1745-1749,和Cohen,1993, Science[科学],259:1691-1692。可以通过将DNA包覆在可生物降解的珠粒上来增加裸DNA的摄取,这些珠粒可有效地转运到细胞中。

[0223] 为了表达,可以将本文披露的包含编码抗体或编码多肽的多核苷酸的DNA插入序

列可操作地连接至合适的启动子(例如异源启动子),例如噬菌体 λ PL启动子、大肠杆菌lac启动子、大肠杆菌trp启动子和大肠杆菌tac启动子、SV40早期和晚期启动子以及逆转录病毒LTR的启动子,仅举几例。其他合适的启动子是技术人员已知的。在一些实施例中,启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子。表达构建体可以进一步含有用于转录起始、终止的位点,以及(在转录区中)用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的成熟转录的编码部分可以包括在开始处的翻译起始密码子和适当地位于待翻译多肽末端的终止密码子(UAA、UGA或UAG)。

[0224] 如所指出的,表达载体可以包括至少一种可选择标记。此类标记包括用于真核细胞培养的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性,以及用于在大肠杆菌和其他细菌中培养的四环素或氨苄青霉素抗性基因。合适宿主的代表性实例包括但不限于细菌细胞,例如大肠杆菌(*E. coli*)细胞、链霉菌属(*Streptomyces*)细胞和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)细胞;真菌细胞,例如酵母细胞;昆虫细胞,例如果蝇(*Drosophila*) S2细胞和夜蛾(*Spodoptera*) Sf9细胞;动物细胞,例如CHO细胞、COS细胞、鲍斯(Bowes)黑色素瘤细胞和HK 293细胞;以及植物细胞。用于本文所述的宿主细胞的适当培养基和条件是本领域已知的。

[0225] 用于在细菌中使用的非限制性载体包括可获得自凯杰公司(Qiagen)的pQE70、pQE60和pQE-9;可获得自斯特拉塔基因公司(Stratagene)的pBS载体、Phagescript载体、Bluescript载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A;以及可获得自玛西亚公司(Pharmacia)的ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5。非限制性真核载体包括可获得自斯特拉塔基因公司的pWLNE0、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG;以及可获得自玛西亚公司的pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL。其他合适的载体对于技术人员将是显而易见的。

[0226] 适用的非限制性细菌启动子包括大肠杆菌lacI启动子和lacZ启动子、T3和T7启动子、gpt启动子、 λ PR和PL启动子、以及trp启动子。合适的真核启动子包括CMV即早期启动子(immediate early promoter)、HSV胸苷激酶启动子、SV40早期和晚期启动子、逆转录病毒LTR的启动子,例如劳斯肉瘤病毒(RSV)的启动子、以及金属硫蛋白启动子,例如小鼠金属硫蛋白-I启动子。

[0227] 在酵母酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,可以使用含有组成型或诱导型启动子如 α 因子、醇氧化酶和PGH的多种载体。

[0228] 可以通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他方法将构建体引入宿主细胞中。此类方法描述于许多标准实验室手册中,例如Davis等人, *Basic Methods In Molecular Biology* [分子生物学的基本方法] (1986), 其通过引用以其全文并入本文。

[0229] 可以通过将增强子序列插入载体中来增加高等真核生物对编码本披露抗体的DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常约10至300bp,在给定宿主细胞类型中起到增加启动子转录活性的作用。增强子的实例包括SV40增强子(其位于碱基对100至270的复制起点的后侧)、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点后侧的多瘤病毒增强子、和腺病毒增强子。

[0230] 为了将翻译的蛋白质分泌到内质网腔、周质间隙或细胞外环境中,可以将适当的分泌信号整合到表达的多肽中。信号可以是多肽内源信号,也可以是异源信号。

[0231] 多肽(例如抗体)可以以修饰形式,例如融合蛋白(例如GST融合物)或具有组氨酸

标签表达,并且不仅可以包括分泌信号,还可以包括另外的异源功能区。例如,可以将另外的氨基酸、特别是带电荷的氨基酸的区域添加到多肽的N-末端,以改善在纯化期间或在随后的处理和储存期间在宿主细胞中的稳定性和持久性。同样,可以将肽部分添加到多肽中以促进纯化。可以在最终制备多肽之前除去此类区域。向多肽中添加肽部分以引起分泌或排泄,从而提高稳定性并促进纯化,这尤其是本领域熟悉和常规的技术。

[0232] 治疗方法

[0233] 本披露的抗体或其抗原结合片段可以用于多种治疗目的。

[0234] 在一个方面,本披露提供了用于治疗受试者癌症的方法、降低受试者肿瘤体积随时间增加的速率的方法、降低发生转移的风险的方法、或降低受试者发生另外转移的风险的方法。在一些实施例中,治疗可以停止、减慢、延缓或抑制癌症的进展。在一些实施例中,治疗可导致受试者癌症的一个或多个症状的数量、严重程度和/或持续时间减少。

[0235] 在一个方面,本披露的特征在于如下方法,这些方法包括向有需要的受试者(例如,患有、或鉴定为患有或诊断为患有癌症的受试者)施用治疗有效量的本文披露的抗体或其抗原结合片段,该癌症是例如乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、类癌、宫颈癌、子宫内膜癌、神经癌、头颈癌、肝癌、肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、结直肠癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、膀胱癌、尿道癌、或血液恶性病。在一些实施例中,癌症是不可切除的黑色素瘤或转移性黑色素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、膀胱癌或转移性激素难治性前列腺癌。在一些实施例中,受试者患有实体瘤。在一些实施例中,癌症是头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、肾细胞癌(RCC)、三阴性乳腺癌(TNBC)或结直肠癌。在一些实施例中,受试者患有霍奇金淋巴瘤。在一些实施例中,受试者患有三阴性乳腺癌(TNBC)、胃癌、尿路上皮癌、默克尔细胞癌、或头颈癌。在一些实施例中,癌症是黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤、血液恶性病,尤其是非霍奇金氏淋巴瘤、淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病或晚期实体瘤。

[0236] 在一些实施例中,本文披露的组合物和方法可用于治疗有癌症风险的患者。可以用本领域已知的多种方法来鉴定患有癌症的患者。

[0237] 在一些方面,本披露涉及治疗自身免疫性疾病或炎症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的组合物,该组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段、或如本文所述的抗体-药物缀合物。

[0238] 在一个方面,本披露提供了例如通过影响Treg的功能来治疗、预防与异常或不希望的免疫应答相关的障碍(例如自身免疫性障碍)或降低其发展风险的方法。这些自身免疫性障碍包括但不限于斑秃、狼疮、强直性脊柱炎、美尼尔氏病、抗磷脂综合征、混合性结缔组织病、自身免疫性爱迪生氏病、多发性硬化症、自身免疫性溶血性贫血、重症肌无力、自身免疫性肝炎、寻常型天疱疮、白塞氏病、恶性贫血、大疱性类天疱疮、结节性多发性关节炎、心肌病、多软骨炎、乳糜泻-皮炎、多腺综合征、慢性疲劳综合征(CFIDS)、风湿性多肌痛、慢性炎性脱髓鞘病、多发性肌炎以及皮肌炎、慢性炎性多发性神经病、原发性无丙种球蛋白血症、丘-施二氏综合征(Churg-Strauss syndrome)、原发性胆汁性肝硬化、瘢痕性类天疱疮、牛皮癣、CREST综合征、雷诺氏现象、冷凝集素病、莱特尔氏综合征、克罗恩氏病、风湿热、盘状狼疮、类风湿性关节炎、冷球蛋白血症结节病、纤维肌痛、硬皮病、格雷夫斯病、干燥综合征、吉兰-巴雷病、僵人综合症、桥本甲状腺炎、高安氏动脉炎(Takayasu arteritis)、特发

性肺纤维化、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、溃疡性结肠炎、IgA肾病、葡萄膜炎、糖尿病 (例如I型)、血管炎、扁平苔藓和白癜风。还可以向受试者施用抗CD40抗体或其抗原结合片段以治疗、预防与跟细胞、组织或器官移植 (例如肾移植、肝移植和心脏移植) 有关的异常或不希望的免疫应答相关的障碍 (例如移植物抗宿主疾病 (GVHD)) 或降低其发展风险,或防止同种异体移植物排斥。在一些实施例中,受试者患有克罗恩氏病、溃疡性结肠炎或1型糖尿病。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段可用于治疗炎症。

[0239] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段是TNFR2激动剂。

[0240] 在一些方面,本披露涉及抑制受试者的免疫应答的方法,该方法包括向受试者施用有效量的组合物,该组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段、或如本文所述的抗体-药物缀合物。在一些实施例中,受试者患有自身免疫性疾病。

[0241] 如本文所用,“有效量”是指足以实现有益或期望结果 (包括停止、减慢、延缓或抑制疾病 (例如,癌症) 的进展) 的量或剂量。有效量将取决于例如待施用抗体、抗原结合片段、编码抗体的多核苷酸、包含多核苷酸的载体和/或其组合物的受试者的年龄和体重,症状的严重程度和施用途径,因此可以根据个体情况确定施用。

[0242] 有效量可以一次或多次施用。例如,抗体或抗原结合片段的有效量是足以改善、终止、稳定、逆转、抑制、减慢和/或延缓患者自身免疫性疾病或癌症进展的量,或者是足以改善、停止、稳定、逆转、减慢和/或延缓体外细胞 (例如,活检细胞、本文所述的任何癌细胞、或细胞系 (例如,癌细胞系)) 增殖的量。如本领域所理解的,抗体或抗原结合片段的有效量可能有所不同,具体可以取决于患者病史以及其他因素,例如所用抗体的类型 (和/或剂量)。

[0243] 可以凭经验确定施用本文披露的抗体、编码抗体的多核苷酸和/或组合物的有效量和方案,并且进行此类确定在本领域技术范围内。本领域技术人员将理解,必须施用的剂量将取决于例如将接受本文披露的抗体、编码抗体的多核苷酸和/或组合物的哺乳动物,施用途径,使用的本文披露的抗体、编码抗体的多核苷酸、抗原结合片段和/或组合物的特定类型,以及向哺乳动物施用的其他药物。

[0244] 有效量的抗体的典型日剂量是0.01mg/kg至100mg/kg (mg/kg患者体重)。在一些实施例中,剂量可以小于100mg/kg、50mg/kg、40mg/kg、30mg/kg、25mg/kg、20mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg、0.3mg/kg或0.1mg/kg。在一些实施例中,剂量可以大于50mg/kg、40mg/kg、30mg/kg、20mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg、0.3mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg或0.01mg/kg。在一些实施例中,剂量约为50mg/kg、40mg/kg、30mg/kg、25mg/kg、20mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.9mg/kg、0.8mg/kg、0.7mg/kg、0.6mg/kg、0.5mg/kg、0.4mg/kg、0.3mg/kg、0.2mg/kg或0.1mg/kg。

[0245] 在本文描述的任何方法中,可以至少每周一次 (例如,每周一次、每周两次、每周三次、每周四次、每天一次、每天两次或每天三次) 向受试者施用至少一种抗体、其抗原结合片段或药物组合物 (例如,本文描述的任何抗体、抗原结合片段或药物组合物) 以及任选地至少一种另外的治疗剂。在一些实施例中,至少两种不同的抗体和/或抗原结合片段以同一组合物 (例如液体组合物) 施用。在一些实施例中,至少一种抗体或抗原结合片段和至少一种另外的治疗剂以同一组合物 (例如液体组合物) 施用。在一些实施例中,至少一种抗体或抗

原结合片段以及至少一种另外的治疗剂以两种不同的组合物(例如,含有至少一种抗体或抗原结合片段的液体组合物和含有至少一种另外的治疗剂的固体口服组合物)施用。在一些实施例中,至少一种另外的治疗剂以丸剂、片剂或胶囊的形式施用。在一些实施例中,至少一种另外的治疗剂以持续释放的口服配制品施用。

[0246] 在一些实施例中,可以在施用至少一种抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物)之前或之后向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。在一些实施例中,向受试者施用一种或多种另外的治疗剂和至少一种抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物),使得受试者中该一种或多种另外的治疗剂和该至少一种抗体或抗原结合片段(例如,本文所述的任何抗体或抗原结合片段)的生物活性期重叠。

[0247] 在一些实施例中,可以在延长的时间段内(例如,在至少1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1年、2年、3年、4年或5年的时间段内)向受试者施用至少一种抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物)。熟练的医学专业人员可以使用本文所述的任何用于诊断或跟进治疗有效性(例如,观察到至少一种癌症症状)的方法来确定治疗期的长短。如本文所述,熟练的医学专业人员还可以改变向受试者施用的抗体或抗原结合抗体片段(和/或一种或多种另外的治疗剂)的类型和数量(例如,增加或减少),并且还可以根据治疗有效性的评估(例如,使用本文所述的和本领域已知的任何方法)来调整(例如,增加或减少)向受试者施用的至少一种抗体或抗原结合抗体片段(和/或一种或多种另外的治疗剂)的剂量或频率。

[0248] 在一些实施例中,可以向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。另外的治疗剂可以包含选自由以下组成的组的一种或多种抑制剂:B-Raf抑制剂、EGFR抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、K-Ras抑制剂、c-Met抑制剂、间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、Akt抑制剂、mTOR抑制剂、PI3K/mTOR双重抑制剂、布鲁顿(Bruton)酪氨酸激酶(BTK)抑制剂、以及异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)抑制剂和/或异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)抑制剂。在一些实施例中,另外的治疗剂是吡咯胺2,3-双加氧酶-1(IDO1)抑制剂(例如依多司他(epacadostat))。

[0249] 在一些实施例中,另外的治疗剂可以包含选自由以下组成的组的一种或多种抑制剂:HER3抑制剂、LSD1抑制剂、MDM2抑制剂、BCL2抑制剂、CHK1抑制剂、活化刺猬信号传导途径抑制剂、和选择性降解雌激素受体的药剂。

[0250] 在一些实施例中,另外的治疗剂可以包含选自由以下组成的组的一种或多种治疗剂:曲贝替定(Trabectedin)、白蛋白结合型紫杉醇(Nab-paclitaxel)、曲班尼布(trebananib)、帕唑帕尼、西地尼布、帕博西尼、依维莫司、氟嘧啶、IFL、瑞格拉非尼、Reolysin、爱宁达、色瑞替尼、舒尼替尼、西罗莫司(temsirolimus)、阿昔替尼、依维莫司、索拉非尼、沃特瑞特(Votrient)、帕唑帕尼、IMA-901、AGS-003、卡博替尼、长春氟宁、Hsp90抑制剂、Ad-GM-CSF、替莫唑胺(Temazolomide)、IL-2、IFN α 、长春碱、沙利度胺、达卡巴嗪、环磷酸胺、来那度胺、氮杂胞苷、来那度胺、硼替佐米(bortezomid)、氨柔比星(amrubicine)、卡非佐米、普拉曲沙和恩扎妥林(enzastaurin)。

[0251] 在一些实施例中,另外的治疗剂可以包含选自由以下组成的组的一种或多种治疗

剂：佐剂、TLR激动剂、IL-1、HMGB1、IL-10拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-6拮抗剂（例如，IL-6受体）、IL-13拮抗剂、IL-17拮抗剂、HVEM拮抗剂、ICOS激动剂、靶向CX3CL1的治疗、靶向CXCL9的治疗、靶向CXCL10的治疗、靶向CCL5的治疗、LFA-1激动剂、ICAM1激动剂和选择激动剂。

[0252] 在一些实施例中，向受试者施用卡铂、白蛋白结合型紫杉醇、紫杉醇、顺铂、培美曲塞、吉西他滨、FOLFOLX或FOLFIRI。

[0253] 在一些实施例中，另外的治疗剂是抗OX40抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗CTLA-4抗体或抗GITR抗体。

[0254] 药物组合物和施用途径

[0255] 本文还提供了含有本文所述的抗体或抗原结合片段中的至少一种（例如，一种、两种、三种或四种）的药物组合物。本文所述的任何抗体或抗原结合片段中的两种或更多种（例如，两种、三种或四种）可以以任何组合存在于药物组合物中。可以以本领域已知的任何方式配制药组合物。

[0256] 将药物组合物配制成与其预期施用途径（例如静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下或腹膜内）相容。组合物可以包括无菌稀释剂（例如无菌水或无菌盐水）、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂、抗菌剂或抗真菌剂（例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等）、抗氧化剂（例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠）、螯合剂（例如乙二胺四乙酸）、缓冲剂（例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐）以及等渗剂（例如糖，如葡萄糖）、多元醇（例如甘露醇或山梨糖醇）或盐（例如氯化钠）或其任何组合。脂质体悬浮液也可以用作药理学上可接受的载剂。可以配制组合物的制剂并将其封装在安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。如果需要（例如，以可注射配制品形式），可以通过例如使用包衣（如卵磷脂或表面活性剂）来保持适当的流动性。可以通过整合延迟吸收的药剂（例如，单硬脂酸铝和明胶）来延长抗体或其抗原结合片段的吸收。可替代地，可以通过植入物和微胶囊化的递送系统（可以包括可生物降解的生物相容性聚合物（例如，乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸））来实现控释。

[0257] 含有本文所述的任何抗体或抗原结合片段中的一种或多种的组合物可以配制为以剂量单位形式（即，含有预定量活性化合物的物理离散单位，以便于施用和剂量均匀）进行肠胃外（例如静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下或腹膜内）施用。

[0258] 用于肠胃外施用的药物组合物优选是无菌的和基本上等渗的，并且在优质生产规范（GMP）条件下制造。药物组合物可以以单位剂型（即，单次施用的剂量）提供。可以使用一种或多种生理学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂或助剂来配制药组合物。配制品取决于所选择的施用途径。对于注射，抗体可以在水溶液中配制，优选在生理相容的缓冲液中配制，以减少注射部位的不适。溶液可以含有配制剂，例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可替代地，抗体在使用前可处于冻干形式，用于与适合的媒介物（例如无菌无热原的水）组构。

[0259] 组合物的毒性和治疗功效可以通过标准制药学程序在细胞培养物或实验动物（例如猴）中测定。例如，可以确定LD50（对50%群体的致死剂量）和ED50（对50%群体的治疗有效量）：治疗指数是LD50:ED50的比率。表现出高治疗指数的药剂是优选的。当药剂表现出不良副作用时，应注意将潜在损害降到最低（即减少不期望的副作用）。毒性和治疗功效可通过其他标准制药学程序确定。

[0260] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制适当剂量的用于在受试者（例

如人)中使用的任何给定药剂。一种或多种(例如,一种、两种、三种或四种)抗体或其抗原结合片段(例如,本文所述的任何抗体或抗体片段)的治疗有效量将是在受试者(例如,被鉴定为患有癌症的人受试者或被鉴定为有发展疾病风险中的受试者,例如先前患有癌症但现在已经治愈的受试者)中治疗受试者的疾病(例如,杀死癌细胞),降低受试者(例如,人)的一个或多个症状的严重程度、频率和/或持续时间的量。可以使用本领域已知的方法,以及通过观察受试者(例如人)的一个或多个症状,由医疗保健专业人员或兽医专业人员确定本文所述的任何抗体或抗原结合片段的有效性和给药。某些因素(例如疾病或障碍的严重程度、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄、以及存在的其他疾病)可以影响有效治疗受试者所需的剂量和时程。

[0261] 示例性剂量包括本文所述的任何抗体或抗原结合片段的毫克或微克量/千克受试者体重(例如,约1 μ g/kg至约500mg/kg;约100 μ g/kg至约500mg/kg;约100 μ g/kg至约50mg/kg;约10 μ g/kg至约5mg/kg;约10 μ g/kg至约0.5mg/kg;约1 μ g/kg至约50 μ g/kg;约0.3mg/kg至约25mg/kg,约1mg/kg至约10mg/kg;或约1mg/kg至约5mg/kg)。尽管这些剂量覆盖范围广,但是本领域普通技术人员将理解,包括抗体及其抗原结合片段的治疗剂在其功效方面不同,并且可以通过本领域已知的方法确定有效量。通常,首先施用相对较低的剂量,并且主治医师或兽医专业人员(在治疗应用的情况下)或研究人员(在仍处于发展阶段时)可以随后并逐步增加剂量,直到获得适当的应答。此外,应理解,针对任何特定受试者的特定剂量水平将取决于多种因素,包括所用的特定化合物的活性,受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和受试者的饮食,施用时间,施用途径,排泄速率以及抗体或抗体片段的体内半衰期。

[0262] 药物组合物可以同施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。本披露还提供了制造用于如本文所述的多种用途的抗体或其抗原结合片段的方法。

[0263] 实例

[0264] 在以下实例中进一步描述本发明,这些实例不限制权利要求中所描述的本发明的范围。

[0265] 实例1.产生抗hTNFR2抗体

[0266] 为了产生针对人TNFR2 (TNFR2;SEQ ID NO:1)的抗体,用人TNFR2免疫RenMab小鼠。通过如下所述的方法制备抗TNFR2抗体。

[0267] RenMab小鼠具有人源化重链免疫球蛋白基因座和人源化 κ 链免疫球蛋白基因座两者。重链免疫球蛋白基因座是染色体上含有抗体重链基因的区域。基因座包括IGHV(可变)、IGHD(多样性)、IGHJ(连接)和重链恒定结构域基因。 κ 链免疫球蛋白基因座是染色体上含有编码抗体轻链(κ 链)的基因的区域。 κ 链免疫球蛋白基因座包括IGKV(可变)、IGKJ(连接)和轻链恒定结构域基因。关于RenMab小鼠的详细描述可见于PCT/CN2020/075698中,其通过引用以其全文并入本文。

[0268] 小鼠免疫

[0269] 用加Fc标签的人TNFR2蛋白(Fc融合蛋白含有人TNFR2细胞外结构域,SEQ ID NO:1的23aa-257aa位)免疫RenMab小鼠。用佐剂将加Fc标签的人TNFR2蛋白乳化,并将其注射到小鼠背部的四个位置。对于第一次皮下注射(s.c.),将稀释的抗原用等体积的完全弗氏佐剂(CFA)乳化。在随后的皮下注射中,将蛋白质用等体积的不完全弗氏佐剂(IFA)乳化。进行

至少四次注射,其中每两次注射之间至少间隔14天。第三次注射或加强免疫后七天,收集血液(血清)并使用荧光激活细胞分选术(FACS)分析其抗体效价。

[0270] 在另一个实验中,通过将编码人TNFR2的表达质粒注射到小鼠中对几个小鼠进行免疫。将编码抗原的质粒注射到胫骨前肌中(肌肉注射;i.m.注射)。进行至少四次注射,其中每两次注射之间至少间隔14天。在最后一次免疫后七天收集血液(血清),并通过ELISA测试血清的抗体效价。

[0271] 此外,在免疫(通过注射质粒或注射蛋白质)后至少十四天进行增强免疫的程序。通过尾静脉,向小鼠静脉内注射在表面表达TNFR2抗原的CHO细胞。然后在注射后四天收集免疫系统器官(例如,骨髓、淋巴结、脾脏等)。

[0272] 收集脾细胞并与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其活力并形成杂交瘤细胞系。筛选并选择杂交瘤细胞以鉴定产生TNFR2特异性抗体的细胞系。使用该技术和上述免疫原,获得了几种抗TNFR2嵌合抗体(即具有人可变结构域和小鼠恒定结构域的抗体)。特定地,在脉冲免疫后,收获小鼠免疫器官并将浆细胞通过磁珠分离。使用杂交瘤融合技术筛选出分泌抗原特异性单克隆抗体的单克隆杂交瘤细胞。在选定的单克隆杂交瘤细胞中通过逆转录和PCR测序获得抗体轻链和重链V区序列。将抗体轻链和重链V区序列构建到抗体表达载体中,并通过Expi CHO-STM细胞表达系统进行验证。在24孔系统中转染细胞,并在第3天在上清液中收集抗体。FACS用于验证抗体与TNFR2之间结合的特异性。使用该技术,获得了几种抗TNFR2嵌合抗体(即具有人可变结构域和小鼠恒定结构域的抗体)。这些抗体中的恒定结构域可以很容易地被替代以获得全人抗TNFR2抗体(抗hTNFR2抗体)。通过该方法获得的示例性全人抗体命名如下:14-1B3-hHvKv(“14-1B3”或“1B3”)和14-4A9-hHvKv(“14-4A9”或“4A9”)等。以14-4A9-hHvKv为例,当抗体VH\VL与IgG1亚型等不同亚型连接时,抗体命名为14-4A9-hHvKv-IgG1。

[0273] 抗原阳性B细胞也直接从免疫小鼠中分离出来,未与骨髓瘤细胞融合。进一步从抗原阳性B细胞中分离出抗TNFR2抗体。抗体的轻链和重链V区序列直接获得自抗原阳性B细胞。例如,单细胞技术(例如,Beacon® Optofluidic系统,数字细胞生物学公司(Berkeley Lights Inc.))用于筛选和发现分泌抗原特异性单克隆抗体的浆细胞。使用逆转录和PCR测序获得抗体V区序列。表达抗体。FACS用于验证抗体与TNFR2之间的结合。通过该方法获得的示例性抗体包括:BC-1A8(“1A8”)、BC-1B6(“1B6”)、BC-1C3(“1C3”)、BC-1F4(“1F4”)、BC-1F10(“1F10”)、BC-3B7(“3B7”)。以BC-1F4为例,当抗体VH\VL与IgG1亚型等不同亚型连接时,该抗体命名为BC-1F4-IgG1。其他亚型的实例如下:BC-1F4-IgG1-SI、BC-1F4-IgG1-LALA。

[0274] SEQ ID NO:6-11(Kabat编号)或SEQ ID NO:42-47(Chothia编号)中示出了1A8的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37中示出了抗体的人重链可变区和人轻链可变区。

[0275] SEQ ID NO:12-17(Kabat编号)或SEQ ID NO:48-53(Chothia编号)中示出了1B6的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39中示出了抗体的人重链可变区和人轻链可变区。

[0276] SEQ ID NO:18-23(Kabat编号)或SEQ ID NO:54-59(Chothia编号)中示出了1C3的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:41中示出了抗体的

人重链可变区和人轻链可变区。

[0277] SEQ ID NO:24-29 (Kabat编号)或SEQ ID NO:60-65 (Chothia编号)中示出了1F4的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:73中示出了抗体的人重链可变区和人轻链可变区。

[0278] SEQ ID NO:30-35 (Kabat编号)或SEQ ID NO:66-71 (Chothia编号)中示出了1F10的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:75中示出了抗体的人重链可变区和人轻链可变区。

[0279] 抗体制备

[0280] 将序列验证阶段的阳性抗体序列进行质粒提取并转染到25mL系统中。在细胞培养10-12天后收集表达上清液并进行亲和层析。将获得的抗体样品用于以下体外测试和筛选。

[0281] 实例2. 抗TNFR2抗体的体外测试

[0282] 阻断人TNFR2与TNF α 的结合

[0283] 进行阻断测定以确定抗TNFR2抗体是否可以阻断TNFR2与其配体hTNF α 之间的结合。

[0284] 特定地,将用人TNF受体2 (TNFR2)瞬时转染的30 μ l CHO细胞 (1×10^5 个细胞)添加到板中的每个孔中。将纯化的抗体滴定至最终浓度为10、2.5、0.625、0.1565、0.039 μ g/ml。在4 $^{\circ}$ C下,将滴定的抗体以30 μ l/孔添加到每个孔中,并孵育30分钟。

[0285] 将30 μ l生物素-hTNF α (百普赛斯生物科技股份有限公司 (Acro Biosystems), 目录号:TNA-H82E1)添加到每个孔中(每个孔中的最终浓度为0.5 μ g/ml)。将具有生物素-hTNF α 和抗体的细胞在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。

[0286] 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤两次后,将50 μ l以1:100稀释的PE标记的抗人IgG Fc抗体 (PE抗人IgG Fc, 杰克逊免疫研究公司 (Jackson ImmunoResearch), 目录号:109-115-098) 和以1:500稀释的Alexa Fluor $^{\circledR}$ 647标记的链霉亲和素 (AF647链霉亲和素, 杰克逊免疫研究公司, 目录号:016-600-084) 添加到每个孔中,并在4 $^{\circ}$ C下孵育15分钟,随后用PBS洗涤。通过流式细胞术 (Thermo Attune NX) 确定AF647和PE的信号。

[0287] 下表1示出了流式细胞术分析中具有链霉亲和素信号的测试的细胞的百分比。如果具有链霉亲和素信号 (AF647) 的测试细胞的百分比增加而抗体浓度降低,则抗体具有阻断亲和力 (表明结合亲和力强)。根据数据,BC-1A8-IgG1、BC-1F4-IgG1、BC-3B7-IgG1和BC-1F10-IgG1具有强阻断作用。但BC-1B6-IgG1、BC-1C3-IgG1、14-1B3-hHvKv-IgG1和14-4A9-hHvKv-IgG1不能有效阻断TNFR2与TNF α 之间的结合。

[0288] 表1

[0289]

抗体	10 μ g/ml	2.5 μ g/ml	0.625 μ g/ml	0.1565 μ g/ml	0.039 μ g/ml	阻断
BC-1A8-IgG1	12.0%	29.9%	58.6%	67.4%	62.8%	有
BC-1B6-IgG1	75.1%	87.2%	80.4%	82.7%	78.9%	无
BC-1C3-IgG1	71.1%	81.5%	77.3%	74.3%	77.0%	无
BC-1F4-IgG1	18.5%	59.5%	61.9%	76.2%	84.6%	有
BC-1F10-IgG1	51.9%	54.5%	60.2%	55.2%	59.0%	有
BC-3B7-IgG1	19.4%	46.6%	69.7%	70.1%	64.5%	有
14-1B3-hHvKv-IgG1	66.6%	65.1%	62.5%	63.2%	63.8%	无

14-4A9-hHvKv-IgG1	66.1%	65.7%	60.7%	63.2%	63.0%	无
-------------------	-------	-------	-------	-------	-------	---

[0290] 抗TNFR2抗体对人TNFR2和TNFR1的结合亲和力

[0291] 使用Biacore (拜尔科有限公司 (Biacore, INC), 新泽西州皮斯卡特维 (Piscataway NJ)) 8K生物传感器 (配备有预先固定的蛋白质A传感器芯片), 用表面等离子共振 (SPR) 测量抗TNFR2抗体对人TNFR2和TNFR1 (肿瘤坏死因子受体1) 的结合亲和力。

[0292] 将纯化的抗TNFR2抗体稀释至1 μ g/ml, 然后以10 μ L/min注射到Biacore 8K生物传感器中约50秒, 以达到期望的蛋白质密度 (例如, 约50个响应单位 (RU))。然后将加His标签的人TNFR1 (人TNFR1/CD120a/TNFRSF1A蛋白, His标签, 北京百普赛斯生物科技股份有限公司 (Beijing Acrobiosystems CO.LTD.), 目录号: TN1-5222) 或TNFR2 (人TNFR2/CD120b/TNFRSF1B蛋白, His标签, 北京百普赛斯生物科技股份有限公司, 目录号: TN2-5227) 以200、100、50、25、6.25或1.56nM的浓度, 以30 μ L/min注射120秒。监测解离600秒。在每种甘氨酸滴定 (pH 2.0, 30 μ L/min, 持续30秒) 的最后一次注射后芯片再生。

[0293] 通过使用Biacore 8K评估软件3.0将数据整体拟合为1:1朗缪尔 (Langmuir) 结合模型 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B., 1994. Methods Enzymology [酶学方法] 6.99-110), 从而同时获得动力学缔合速率 (kon) 和解离速率 (koff)。从动力学速率常数的商推导亲和力 (KD=koff/kon)。

[0294] 如本领域普通技术人员理解的, 对每种测试的抗体进行相同的方法, 其中将参数 (例如抗体浓度) 做适当调整。下表2总结了测试的抗体的结果。

[0295] 表2

[0296]

抗 TNFR2 抗体	分析物	缔合速率 kon (1/Ms)	解离速率 koff (1/s)	亲和力 KD (M)
BC-1A8-IgG1	hTNFR2-His	9.24E+05	1.26E-03	1.36E-09
BC-1A8-IgG1	hTNFR1-His	阴性		
BC-1B6-IgG1	hTNFR2-His	1.66E+06	6.44E-03	3.89E-09
BC-1B6-IgG1	hTNFR1-His	阴性		
BC-1C3-IgG1	hTNFR2-His	1.21E+05	1.15E-03	9.50E-09
BC-1C3-IgG1	hTNFR1-His	阴性		
BC-1F4-IgG1	hTNFR2-His	7.18E+05	1.59E-03	2.21E-09
BC-1F4-IgG1	hTNFR1-His	阴性		
BC-1F10-IgG1	hTNFR2-His	9.15E+04	4.67E-04	5.10E-09
BC-1F10-IgG1	hTNFR1-His	阴性		
14-1B3-hHvKv-IgG1	hTNFR2-His	4.85E+04	4.22E-04	8.70E-09
14-1B3-hHvKv-IgG1	hTNFR1-His	阴性		
14-4A9-hHvKv-IgG1	hTNFR2-His	3.95E+04	1.82E-03	4.61E-08
14-4A9-hHvKv-IgG1	hTNFR1-His	阴性		

[0297] 结果显示这些人抗体与人TNFR2具有非常高的结合亲和力。八种抗体 (BC-1A8-

IgG1、BC-1B6-IgG1、BC-1C3-IgG1、BC-1F4-IgG1、BC-1F10-IgG1、14-1B3-hHvKv-IgG1和14-4A9-hHvKv-IgG1)均不能与TNFR1结合。

[0298] 抗TNFR2抗体对小鼠、犬和猴TNFR2的交叉反应性

[0299] 在每个实验中,用EGFP和人TNFR2 (TNFR2,SEQ ID NO:1)、小鼠TNFR2 (mTNFR2,SEQ ID NO:2)、猴(食蟹猴(Crab-eating monkey))TNFR2 (fTNFR2,SEQ ID NO:3)或狗(犬)TNFR2 (dTNR2,SEQ ID NO:4)转染CHO细胞。

[0300] 将30 μ l CHO细胞(1×10^5 个细胞)添加到每个孔中。将30 μ l纯化的抗TNFR2抗体(10 μ g/ml)(如表3所列)添加到每个孔中,并在4℃下孵育30分钟。

[0301] 用PBS(1600rpm,6min)洗涤两次后,将50 μ l Alexa Fluor标记的抗人IgG Fc抗体(BC-1A8-IgG1、BC-1B6-IgG1、BC-1C3-IgG1、BC-1F4-IgG1、BC-1F10-IgG1、BC-3B7-IgG1、14-1B3-hHvKv-IgG1、14-4A9-hHvKv-IgG1)以1:500稀释添加到每个孔中,在4℃下孵育15分钟,随后用PBS洗涤(1200rpm,5min)。通过流式细胞术检测AF647的信号。

[0302] 下表总结了测试的抗体与人(TNFR2)、小鼠(mTNFR2)、猴(fTNFR2)和狗(dTNFR2)TNFR2的交叉反应性。

[0303] 表3

[0304]

	TNFR2 (人)	mTNFR2 (小鼠)	fTNFR2 (猴)	dTNFR2 (狗)
BC-1A8-IgG1	有	无	有	无
BC-1B6-IgG1	有	无	有	无
BC-1C3-IgG1	有	无	有	无
BC-1F4-IgG1	有	无	有	无
BC-1F10-IgG1	有	无	有	无
BC-3B7-IgG1	有	无	有	无
14-1B3-hHvKv-IgG1	有	无	有	无
14-4A9-hHvKv-IgG1	有	无	有	无

[0305] 纯化的抗hTNFR2抗体的表位相关性分析

[0306] 通过表面等离子共振 (SPR) 竞争实验分析了一对纯化的抗TNFR2单克隆抗体之间靶蛋白表位的相对位置。共使用5种单克隆抗体来研究每种抗体对另一种抗体的结合抑制(阻断)作用:BC-1A8-IgG1、BC-1F4-IgG1、BC-3B7-IgG1、BC-1C3-IgG1和BC-1F10-IgG1。HBS-EP+缓冲液(10mM 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、150mM NaCl、3mM 乙二胺四乙酸(EDTA)和0.05%P20,pH 7.4)在整个实验过程中用作运行缓冲液。将抗His抗体通过氨基偶联固定在S系列传感器芯片CM5的表面上,以产生抗His芯片(即CM5-抗-His-通道1,8-芯片)。然后,注入1M乙醇胺(pH 8.5)以阻断芯片表面剩余的活性羧基,随后使用HBS-EP+缓冲液平衡2小时。将具有His标签的重组人TNFR2蛋白(1 μ g/ml)以10 μ L/min注射到Biacore 8K生物传感器中50秒,并在抗His芯片上捕获以达到期望的蛋白质密度(即200RU)。将一对抗体(每个200nM)以30 μ L/min连续注射到芯片上。第一次注射的抗体(分析物1)的结合时间为250秒,然后第二抗体(分析物2)的结合时间为250秒。在每个分析循环中注入抗体后,将芯片用甘氨酸缓冲液(pH 1.7;30 μ L/min,持续30秒)再生两次。当每种单克隆抗体与另一种抗体配对时,每对单克隆抗体进行相同的实验步骤以获得结合抑制数据。

[0307] 使用Biacore Insight评估软件获得每种抗体的结合值。为了量化一种抗体与另

一种抗体结合的干扰,计算结合率以比较每对抗体。结合率定义为第二抗体(分析物2)的结合值除以第一抗体(分析物1)的结合值。统计软件也用于聚类分析。分析表位相关性并将5种抗hTNFR2抗体分类为4个表位簇(图8)。总之,1A8和1F4共享相同或重叠的表位。3B7、1C3和F10不表现出与其他抗体的表位相关性。

[0308] TNFR2具有四个富含半胱氨酸的结构域(CRD)。在另一个实验中,FACS用于检测抗hTNFR2抗体与具有不同结构域的TNFR2蛋白的结合。使用二抗(Alexa Fluor® 647AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人IgG,Fcγ片段特异性,杰克逊免疫研究实验室公司(Jackson ImmunoResearch Laboratories,Inc.),目录号:151524)。荧光标记的二抗可以附接在抗hTNFR2抗体的Fc区,从而可以通过FACS检测与ΔCRD细胞结合的抗hTNFR2抗体。特定地,ΔCRD1-TNFR2蛋白(CRD1缺失)、ΔCRD2-TNFR2蛋白(CRD2缺失)、ΔCRD3-TNFR2蛋白(CRD3缺失)或ΔCRD4-TNFR2蛋白(CRD4缺失)分别在CHO-S细胞中表达,然后检测细胞与不同抗hTNFR2抗体之间的结合。SEQ ID NO:1中示出了TNFR2蛋白,CRD1是序列的39aa-76aa,CRD2是序列的77aa-118aa,CRD3是序列的119aa-162aa,并且CRD4是序列的168aa-196aa。流式细胞术实验的结果在下表4中示出。

[0309] 结果显示,1A8和1F4不与缺乏CRD3的TNFR2结合,与缺乏CRD4的TNFR2结合的阳性率也显著下降,说明1A8和1F4对于人TNFR2具有相似的结合表位,并且这些表位很可能位于CRD3(I类表位)。1B6和1C3不与缺乏CRD3或CRD4的TNFR2结合,表明1B6和1C3对于人TNFR2具有相似的结合表位,并且这些表位很可能位于CRD3和CRD4的连接处(III类表位)。1F10与缺乏CRD3或CRD4的TNFR2之间结合的阳性率显著下降,表明1F10的结合表位不同于I类表位和III类表位(属于IV类表位)。结果与SPR表位表征一致。

[0310] 表4

蛋白质	CHO-S				
	CHO-SACRD1-TNFR2	CHO-SACRD2-TNFR2	CHO-SACRD3-TNFR2	CHO-SACRD4-TNFR2	CHO-S
BC-1A8-IgG1	64.6%	71.2%	0.52%	29.4%	1.44%
BC-1B6-IgG1-LALA	66.5%	75.6%	0.44%	0.83%	1.67%
BC-1C3-IgG1	72.6%	80.3%	0.81%	1.85%	1.64%
BC-1F4-IgG1	53.1%	59.1%	0.47%	21.3%	1.44%
BC-1F10-IgG1	55.3%	65.7%	23.1%	38.3%	0.95%
二抗	10.2%	7.33%	0.62%	1.02%	1.64%

[0312] 体外ADCC检测实验

[0313] 进行实验以评估抗TNFR2抗体的ADCC效应。在实验中,使用BC-1A8-IgG1、BC-1C3-IgG1、BC-1F4-IgG1、BC-1F10-IgG1、BC-1B6-IgG1和同种型对照人IgG1(科洛恩生物科技有限公司(Crown Bioscience Inc.),C0001-3)。

[0314] 乳酸脱氢酶(LDH)是在许多不同细胞类型中发现的细胞质酶,并在质膜损伤后释放到细胞培养基中。使用CyQUANT LDH细胞毒性检测试剂盒(英杰公司(Invitrogen),目录号:C20301)准确定量测量细胞外LDH,以评估抗体的ADCC效应。

[0315] 将抗TNFR2抗体连续稀释(10倍),最高浓度为100 μ g/mL。将靶细胞(过表达人TNFR2的MC38细胞)接种在96孔板中(细胞密度为 2×10^4 个细胞/孔,100 μ L)并在37 $^{\circ}$ C下孵育3-4小时。将效应细胞(外周血单核细胞(PBMC))复苏(细胞密度为 2×10^4 个细胞/孔)。将相同体积(100 μ L)的效应细胞与10 μ L抗体一起添加到96孔板的每个孔中。将上述96孔板在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。通过酶标仪检测490nm和680nm的吸光度值,并用于计算每组抗体对靶细胞的杀伤(细胞毒性%)。使用抗体浓度作为横轴,细胞毒性作为纵轴,使用非线性拟合计算EC50值。

$$[0316] \quad \text{细胞毒性}\% = \left(\frac{(\text{实验} - \text{自发}) - (\text{效应子} - \text{自发}) - (\text{靶} - \text{自发})}{\text{靶最大} - \text{自发}^*} \right) \times 100\%$$

[0317] 上式中,实验是指实验孔的吸光度值;效应子是指效应细胞的吸光度值。靶是指靶细胞的吸光度值。自发是指细胞培养基的自发荧光吸光度值。靶最大是指靶细胞的最高吸光度值。自发*是指细胞培养基体积对照孔的吸光度值。

[0318] EC50结果在表5中示出。与同种型对照hIgG1相比,抗TNFR2抗体(BC-1A8-IgG1、BC-1C3-IgG1、BC-1F4-IgG1、BC-1F10-IgG1或BC-1B6-IgG1)对靶细胞的杀伤(细胞毒性%)随着这些抗体剂量的增加而增加,表明BC-1A8-IgG1、BC-1C3-IgG1、BC-1F4-IgG1、BC-1F10-IgG1和BC-1B6-IgG1均具有ADCC活性。

[0319] 表5

[0320]	蛋白质	ADCC	EC50 值 ng/mL
	BC-1A8-IgG1	有	86.41
	BC-1B6-IgG1	有	16.00
	BC-1C3-IgG1	有	96.94
	BC-1F4-IgG1	有	40.25
	BC-1F10-IgG1	有	161.50
	hIgG1	无	—

[0321] 在另一个类似的实验中,使用靶细胞(过表达人TNFR2的MC38细胞)和效应细胞(FcR-TANK (CD16a-158V)细胞系,宜明昂科生物医药技术(上海)有限公司(ImmuneOnco Biopharmaceuticals (Shanghai) Co., Ltd.))来评估抗TNFR2抗体(BC-1C3-IgG1、BC-1C3-IgG1-SI和BC-1C3-IgG1-LALA)的ADCC效应。

[0322] 细胞毒性数据在图9中示出。EC50结果在表6中示出。与同种型对照hIgG1相比,抗hTNFR2抗体(BC-1C3-IgG1和BC-1C3-IgG1-SI)对靶细胞的杀伤(细胞毒性%)随着这些抗体剂量的增加而增加,表明BC-1C3-IgG1-SI都具有较强的ADCC活性。

[0323] 表6

[0324]	蛋白质	ADCC	EC50 值 ng/mL
	BC-1C3-IgG1	有	80.69
	BC-1C3-IgG1-SI	有	31.92
	BC-1C3-IgG1-LALA	无	—
	hIgG1	无	—

[0325] 实例3. 抗hTNFR2抗体的体内测试

[0326] 为了在体内测试抗体并预测这些抗体在人体中的作用,产生了人源化TNFR2小鼠

模型。将人源化TNFR2小鼠模型进行工程化以表达嵌合TNFR2蛋白 (SEQ ID NO:5), 其中该小鼠TNFR2蛋白的细胞外区域被相应的人TNFR2细胞外区域替代。小鼠TNFR2 (SEQ ID NO:2) 的氨基酸残基33-260被人TNFR2 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基33-259替代。

[0327] 人源化TNFR2小鼠模型 (例如, B-TNFR2小鼠) 通过显著减少人和表达小鼠TNFR2的普通小鼠的临床结果之间的差异, 提供了在临床环境中测试新治疗性治疗的新工具。关于人源化TNFR2小鼠模型的详细描述可见于PCT/CN2020/113618中; 其通过引用以其全文并入本文。

[0328] 在TNFR2人源化小鼠 (B-TNFR2) 中测试了抗hTNFR2抗体, 以证明其对体内肿瘤生长的作用。

[0329] 具有MC38, 10mg/kg的B-TNFR2小鼠的体内功效

[0330] 将MC-38肿瘤细胞 (结肠腺癌细胞) 皮下注射到B-TNFR2小鼠中。当小鼠的肿瘤体积达到 100mm^3 - 150mm^3 时, 根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组 (每组六只小鼠)。

[0331] 然后给小鼠注射PBS作为对照 (G1)、抗hTNFR2抗体BC-1F4-IgG1 (G2)、BC-3B7-IgG1 (G3)、BC-1F10-IgG1 (G4)、14-1B3-hHvKv-IgG1 (G5)、BC-1A8-IgG1 (G6)、BC-1C3-IgG1 (G7)、14-4A9-hHvKv-IgG1 (G8) 和抗mPD-1 (G9) (BIO X CELL公司, 目录号: BE0146)。将已证明对小鼠有效的抗mPD-1用作阳性对照。在每周第一天和第四天以10mg/kg通过腹膜内注射来给予抗体, 持续3周 (共注射6次)。

[0332] 在整个治疗期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠体重均增加, 无统计学上显著的差异 ($P>0.05$)。在分组当天 (第0天; “D0”), 每组的平均体重在20.3g-21.4g的范围内。实验结束时 (分组后28天, D28), 每组的平均体重在22.7g-24.7g的范围内, 体重变化在107.4%-116.5%的范围内。结果显示抗hTNFR2抗体耐受性良好并且对小鼠无毒。

[0333] 在用抗hTNFR2抗体治疗的组中肿瘤大小 (图1) 显示出显著差异。每个治疗组在第28天 (分组后28天) 的 $\text{TGI}_{\text{TV}}\%$ 在下表7中示出。阳性对照 (抗mPD-1, G9) 在上述剂量和频率下表现出良好的治疗效果 ($\text{TGI}_{\text{TV}}\%=78.5\%$)。包括BC-1F4-IgG1 (G2)、BC-1F10-IgG1 (G4)、BC-1A8-IgG1 (G6)、BC-1C3-IgG1 (G7) 的多种抗体均显示出良好的治疗效果 ($\text{TGI}_{\text{TV}}\%>60$)。除G3和G5外, TNFR2抗体的 $\text{TGI}_{\text{TV}}\%$ 大于80%。该 $\text{TGI}_{\text{TV}}\%$ 优于阳性对照组 (G19/抗mPD-1 $\text{TGI}_{\text{TV}}\%=78.5\%$)。

[0334] 表7

		肿瘤体积 (mm^3)				存活	无 肿 瘤	$\text{TGI}_{\text{TV}}\%$	P 值	
		D0	D11	D21	D28				体重	肿瘤体积
[0335]	对照	G1	109 ± 5	565 ± 115	1761 ± 310	2497 ± 231	4/6	0	n.a.	n.a.
		G2	109 ± 6	148 ± 30	238 ± 93	441 ± 185	6/6	2	86.1%	0.374 6.09E-05
		G3	109 ± 5	302 ± 114	655 ± 237	1124 ± 442	6/6	1	57.5%	0.433 0.030
	治疗	G4	109 ± 5	208 ± 33	310 ± 71	429 ± 131	6/6	1	86.6%	0.420 1.91E-05
		G5	109 ± 6	312 ± 49	1055 ± 152	2012 ± 153	6/6	0	20.3%	0.384 0.105

[0336]	G6	109 ± 5	142 ± 20	290 ± 64	491 ± 113	6/6	0	84.0%	0.474	1.74E-05
	G7	109 ± 5	112 ± 13	136 ± 43	181 ± 70	6/6	1	97.0%	0.310	2.57E-06
	G8	109 ± 4	358 ± 70	1327 ± 282	1936 ± 391	4/6	0	23.5%	0.660	0.253
	G9	109 ± 6	171 ± 34	379 ± 102	622 ± 164	6/6	0	78.5%	0.526	8.05E-05

[0337] 具有MC38, 1mg/kg的B-TNFR2小鼠的体内功效

[0338] 与前述体内药效实验类似, 在构建肿瘤模型后, 给小鼠注射PBS作为对照 (G1)、抗hTNFR2抗体BC-1A8-IgG1 (G2)、BC-1F10-IgG1 (G3)、BC-1F4-IgG1 (G4)、抗mPD-1 (G5)、抗mCTLA4 (G6) (BIO X CELL公司, 目录号: BE0164)。在每周第一天和第四天以1mg/kg通过腹膜内注射来给予抗体, 持续3周 (共注射6次)。

[0339] 在整个实验期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠体重均增加, 组间无显著差异 ($P > 0.05$)。分组时 (D0), 每组的平均体重在20.4g-20.8g范围内。实验结束时 (分组后24天, D24), 每组的平均体重在21.6g-23.7g范围内, 体重变化在102.5%-114.7%范围内。与之前的实验类似, 结果显示抗hTNFR2抗体耐受性良好并且对小鼠无毒。

[0340] 在用抗TNFR2抗体治疗的组中肿瘤大小显示出显著差异 (图2)。特别地, G3、G4和G5的肿瘤大小明显小于G1 ($G3: P = 0.005$, $G7: P = 0.001$, $G8: P = 0.011$)。如下表8所示, 还计算了每个治疗组在第24天 (分组后24天) 的 $TGI_{TV}\%$ 。与阳性对照 (G5、G6) 相比, G2、G3和G4显示出更好的肿瘤抑制 ($TGI_{TV}\%$)。

[0341] 表8

		肿瘤体积 (mm ³)				存活	$TGI_{TV}\%$	P 值	
		D0	D7	D17	D24			体重	肿瘤体积
[0342]	对 照	G1	114 ± 5	447 ± 52	1476 ± 182	2486 ± 302	4/6	n.a.	n.a.
		G2	114 ± 7	221 ± 45	528 ± 96	1203 ± 186	6/6	54.1%	0.241
		G3	114 ± 6	252 ± 39	435 ± 80	957 ± 174	6/6	64.5%	0.450
	治 疗	G4	113 ± 6	254 ± 44	659 ± 114	1366 ± 199	6/6	47.2%	0.385
		G5	114 ± 5	233 ± 28	685 ± 84	1558 ± 187	6/6	39.1%	0.436
		G6	114 ± 6	277 ± 32	720 ± 137	1675 ± 301	6/6	34.2%	0.332

[0343] 具有MC38, 0.3mg/kg的B-TNFR2小鼠的体内功效

[0344] 在另一个类似的实验中, 待测抗hTNFR2抗体的剂量降低到0.3mg/kg。当小鼠的肿瘤体积达到 $100 \pm 50 \text{ mm}^3$ 时 (每组六只小鼠), 将小鼠 (具有MC38肿瘤) 随机分成不同的组。

[0345] 然后给小鼠注射PBS作为对照 (G1)、抗hTNFR2抗体BC-1C3-IgG1 (G2)、抗mPD-1 (G3)、抗mCTLA4 (G4)。在每周第一天和第四天以0.3mg/kg通过腹膜内注射来给予抗体, 持续3周 (共注射6次)。

[0346] 在实验期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠体重均增加, 组间无显著差异 ($P > 0.05$)。分组时 (D0) 每组的平均体重在19.5g-19.8g范围内。实验结束时 (分组后25天, D25), 平均体重在21.6g-23.3g范围内, 体重变化在108.9%-118.2%范围内。与之前的结果类似,

结果显示抗TNFR2抗体耐受性良好并且对小鼠无毒。

[0347] 在用抗hTNFR2抗体治疗的组中肿瘤大小(图3)显示出显著差异。如下表9所示,计算了每个治疗组在第25天(分组后25天)的 $TGI_{TV}\%$ 。BC-1C3-1gG1 (G2) 在该剂量下显示最佳功效,并且功效优于阳性对照 (G3、G4)。

[0348] 表9

		肿瘤体积 (mm ³)				存活	$TGI_{TV}\%$	P 值	
		D0	D7	D18	D25			体重	肿瘤体积
[0349]	对照 G1	101 ± 5	311 ± 23	1083 ± 224	2053 ± 457	5/6	n.a.	n.a.	n.a.
	治疗 G2	101 ± 6	245 ± 33	796 ± 108	1680 ± 177	6/6	19.1%	0.431	0.465
	G3	102 ± 6	309 ± 48	835 ± 167	1758 ± 289	5/6	15.1%	0.489	0.598
	G4	101 ± 4	304 ± 32	904 ± 146	1838 ± 300	5/6	11.0%	0.406	0.716

[0350] 具有B16,10mg/kg的B-TNFR2小鼠的体内功效

[0351] 将B16F10肿瘤细胞(黑色素瘤细胞)皮下注射到B-TNFR2小鼠中。当小鼠的肿瘤体积达到 $100 \pm 50 \text{ mm}^3$ 时,根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组(每组六只小鼠)。

[0352] 然后给小鼠注射PBS作为对照 (G1)、抗hTNFR2抗体BC-1A8-IgG1 (G2)、BC-1C3-1gG1 (G3)、BC-1F10-1gG1 (G4)、BC-1F4-1gG1 (G5)、BC-1B6-1gG1 (G6)。在每周第一天和第四天以10mg/kg通过腹膜内注射来给予抗体,持续2周(共注射3次)。

[0353] 在实验期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠体重均增加,组间无差异($P > 0.05$)。分组时(D0),每组的平均体重在19.2g-19.7g范围内。分组后第10天(D10),每组的平均体重在22.1g-24.5g范围内,体重变化在114.3%-126.8%范围内。结果显示抗hTNFR2抗体耐受性良好并且对小鼠无毒。

[0354] 在用抗TNFR2抗体治疗的组中肿瘤大小显示出显著差异(图4)。BC-1A8-IgG1 (G2)、BC-1C3-1gG1 (G3)、BC-1F10-1gG1 (G4)和BC-1B6-1gG1 (G6)在B16F10黑色素瘤模型中均显示出抗肿瘤功效。每个治疗组在第10天(分组后10天)的 $TGI_{TV}\%$ 在下表10中示出。

[0355] 表10

		肿瘤体积 (mm ³)				存活	$TGI_{TV}\%$	P 值	
		D0	D3	D7	D10			体重	肿瘤体积
[0356]	对照 G1	105 ± 5	492 ± 66	1928 ± 290	4386 ± 500	5/6	n.a.	n.a.	n.a.
	G2	104 ± 5	391 ± 36	1240 ± 316	2515 ± 833	6/6	43.7%	0.292	0.101
	G3	105 ± 5	459 ± 61	1458 ± 245	2957 ± 401	6/6	33.4%	0.698	0.050
	治疗 G4	105 ± 4	413 ± 61	1275 ± 318	2895 ± 752	6/6	34.8%	0.437	0.150
	G5	105 ± 4	446 ± 20	1615 ± 2235	3674 ± 546	6/6	16.6%	0.608	0.364
	G6	105 ± 3	452 ± 41	1640 ± 548	2688 ± 518	5/6	39.7%	0.436	0.046

[0357] 具有MC38,25mg/kg的B-TNFR2小鼠的体内功效和毒性

[0358] 在另一个类似的实验中,将待测抗hTNFR2抗体的剂量调整为25mg/kg,以测试体内

功效和毒性。将MC38癌肿瘤细胞(结肠腺癌细胞)皮下注射到B-TNFR2小鼠中。当小鼠的肿瘤体积达到 $100 \pm 50 \text{ mm}^3$ 时,根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组(每组四只小鼠)。

[0359] 然后给小鼠注射PBS作为对照(G1)、抗hTNFR2抗体BC-1A8-IgG1(G2)、BC-1C3-IgG1(G3)、BC-1F10-IgG1(G4)、BC-1F4-IgG1(G5)、BC-1B6-IgG1(G6)。在分组当天(D0)和分组后第3天(D3)以25mg/kg通过腹膜内注射来给予抗体(总共注射2次)。

[0360] 在实验期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠体重均增加,组间无显著差异。分组时每组的平均体重在18.5g-19.2g范围内。实验结束时(分组后21天),每组的平均体重在21.1g-23.3g范围内,体重变化在110.0%-122.7%之间。分组后第5天(D5)取小鼠外周血测试血液生化指标(AST、ALT)。D5的生化指标测试结果(图7A-7B)显示,与对照相比,ALT和AST没有显著变化。与之前的结果类似,结果显示25mg/kg的抗TNFR2抗体耐受性良好并且对小鼠无毒。

[0361] 在用抗TNFR2抗体治疗的组中肿瘤大小(图5)显示出显著差异。与对照组G1相比,用抗hTNFR2抗体BC-1A8-IgG1(G2)、BC-1C3-IgG1(G3)、BC-1F10-IgG1(G4)、BC-1F4-IgG1(G5)和BC-1B6-IgG1(G6)治疗的治疗组的肿瘤体积显著减小。 $\text{TGI}_{\text{TV}}\%$ 在81.6%-98.4%之间,显示明显的肿瘤抑瘤作用。如下表11所示,还计算了每个治疗组在第21天(分组后21天)的 $\text{TGI}_{\text{TV}}\%$ 。

[0362] 表11

		肿瘤体积 (mm^3)				存活	无肿瘤	$\text{TGI}_{\text{TV}}\%$	P 值	
		第0天	第7天	第13天	第21天				体重	肿瘤体积
[0363]	对照 G1	92 ± 7	251 ± 34	609 ± 83	1650 ± 376	4/4	0	n.a.	n.a.	n.a.
	G2	91 ± 10	186 ± 39	147 ± 45	246 ± 86	4/4	0	90.1%	0.106	0.011
	G3	91 ± 6	149 ± 31	77 ± 42	117 ± 93	4/4	1	98.4%	0.036	0.007
	治疗 G4	91 ± 7	173 ± 31	144 ± 58	378 ± 171	4/4	1	81.6%	0.060	0.022
	G5	92 ± 11	145 ± 28	228 ± 89	337 ± 194	4/4	1	84.3%	0.039	0.021
	G6	91 ± 10	152 ± 23	110 ± 71	210 ± 180	4/4	1	92.4%	0.144	0.014

[0364] 具有MC38, 3mg/kg的hTNF α /hTNFR2小鼠体内功效和毒性

[0365] 将人源化TNF α 小鼠模型进行工程化以表达人TNF α 蛋白(SEQ ID NO:79),其中小鼠TNFR2蛋白的编码序列被相应的人编码序列替代。通过将TNF α 人源化小鼠与TNFR2人源化小鼠杂交,还产生了双人源化TNF α /TNFR2小鼠模型。

[0366] 关于人源化TNF α 小鼠模型的详细描述可见于PCT/CN2020/072714中;其通过引用以其全文并入本文。

[0367] 与之前的体内药物功效实验类似,在双人源化TNF α /TNFR2小鼠模型中测试了这些抗hTNFR2抗体对体内肿瘤生长的影响。在每组中,通过腹膜内(i.p.)施用向双人源化TNF α /TNFR2小鼠注射磷酸盐缓冲盐水(PBS, G1)、BC-1C3-1gG1(G2)和抗mPD-1(G3)。每周两次以3mg/kg通过腹膜内注射来给予抗体,持续3周(共注射6次)。

[0368] 在整个实验期间中监测重量和肿瘤大小。不同组中小鼠体重均增加,组间无显著差异 ($P>0.05$)。分组时 (D0) 每组的平均体重在20.0g-20.6g范围内。实验结束时 (D28), 平均体重在23.5g-25.1g范围内, 体重变化在115.7%-127.2%范围内。与之前的结果类似, 结果显示抗hTNFR2抗体耐受性良好并且对小鼠无毒。

[0369] 在用抗hTNFR2抗体治疗的组中肿瘤大小 (图6) 显示出显著差异。如下表12所示, 计算了每个治疗组在第28天的TGI_{TV}%。BC-1C3-IgG1 (G2) 在该剂量下显示最佳功效, 并且功效优于阳性对照 (G3)。

[0370] 表12

		肿瘤体积 (mm ³)				存活	TGI _{TV} %	P 值	
		D0	D10	D21	D28			体重	肿瘤体积
[0371]	对照 G1	91 ± 5	669 ± 108	1861 ± 384	2713 ± 309	5/6	n.a.	n.a.	n.a.
	治疗 G2	91 ± 7	411 ± 56	910 ± 147	1375 ± 113	6/6	51.0%	0.333	0.003
	G3	91 ± 6	508 ± 64	987 ± 140	1664 ± 261	6/6	40.0%	0.250	0.035

[0372] 实例4.PK和TILS分析

[0373] 具有MC38模型, 10mg/kg的B-TNFR2小鼠的PK分析

[0374] 在人源化TNFR2小鼠中测定抗TNFR2抗体的药代动力学清除率。将MC38细胞 (5×10^5) 皮下注射到人源化TNFR2小鼠中, 待肿瘤长至300mm³时将小鼠分为8组 (n=4)。通过静脉内注射施用10mg/kg的BC-1C3-IgG1 (G2)、BC-1F4-IgG1 (G3)、BC-1B6-IgG1 (G4)、BC-1C3-IgG1-SI (G5)、BC-1F4-IgG1-SI (G6)、BC-1B6-IgG1-SI (G7) 或同种型对照IgG1 (G1)。在施用后15min、6小时、24小时、第3天、第5天和第7天收集血样。

[0375] 通过夹心ELISA酶联免疫测定法测定人抗体的血清水平。简而言之, 用0.1M碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 将山羊多克隆抗人IgG (Fc特异性) 捕获抗体 (杰克逊免疫研究公司, 目录号: 109-036-098) 稀释至终浓度为2.0μg/mL, 以100μL/孔添加到96孔板 (ELISA板), 并在4℃下孵育过夜。然后, 将200μL封闭缓冲液 (2% BSA) 添加到每个孔中。将孔密封并在室温下孵育1小时。用洗板机洗板后, 以100μL/孔向ELISA板的每个孔中添加辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的山羊多克隆抗人IgG (Fc特异性) 抗体 (杰克逊免疫研究公司, 目录号: 109-005-088), 并在37℃下孵育1小时。洗板后, 将四甲基联苯胺 (TMB) 溶液以100μL/孔添加到96孔板中作为底物与HRP反应。在室温下避光孵育后, 向每个孔中添加100μL终止溶液 (碧云天公司 (Beyotime), 目录号: P0215)。使用酶标仪读取每个孔在450nm和630nm波长处的吸光度值。使用数据分析软件Gen5来分析数据。使用由每个测试产品制备的校准样品的吸光度值和相应浓度来创建四个参数的标准曲线。并用标准曲线计算各血清样品的抗体浓度。使用每个时间点计算的样品浓度创建药物浓度-时间曲线。使用Phoenix winnolin 8.3计算药代动力学参数。结果在下表13中示出。

[0376] 表13

[0377]	组别	T _{1/2} (天)	C _{max} (ug/ml)	AUC _{0-7 天} (hr*ug/ml)	CL (ml/hr/kg)
--------	----	-------------------------	-----------------------------	------------------------------------	------------------

[0378]	G1	平均值	11.05	185.95	418.90	9.13
		CV	18.9%	5.2%	8.8%	15.3%
	G2	平均值	2.99	152.90	250.93	28.85
		CV	26.3%	5.4%	5.4%	15.3%
	G3	平均值	2.38	134.41	168.89	47.07
		CV	12.3%	9.4%	3.0%	6.9%
	G4	平均值	1.89	134.99	144.27	61.19
		CV	15.3%	6.0%	13.5%	14.5%
	G5	平均值	2.00	130.01	152.27	56.43
		CV	3.2%	4.0%	7.8%	7.9%
	G6	平均值	1.69	130.35	156.65	58.09
		CV	17.8%	8.4%	15.5%	16.9%
	G7	平均值	0.86	111.90	77.90	119.02
		CV	92.0%	4.3%	12.2%	8.7%

[0379] $T_{1/2}$: 终末半衰期;

[0380] C_{max} : 最大浓度;

[0381] $AUC_{0-7天}$: 0-7天的血液浓度-时间曲线下面积

[0382] CL: 清除率

[0383] 上述结果表明, 注射不同抗体后, TNFR2人源化小鼠血清中抗体浓度随时间降低 (参见图10), 这与药代动力学特征一致。BC-1C3-IgG1 (G2) 抗体在小鼠中的最长半衰期 $T_{1/2}$ 为2.99天。BC-1B6-IgG1-SI (G7) 抗体在小鼠中的最短半衰期为0.86天。其他抗体在小鼠中的半衰期在1.69天到2.38天的范围内, 比较接近。到采样第七天结束时, BC-1C3-IgG1 (G2) 抗体的药物浓度-时间曲线的曲线下面积 (AUC) 为250.93hr*ug/ml, 大于其他抗体的AUC (AUC0-7天77.90-168.89hr*ug/ml)。BC-1C3-IgG1 (G2) 抗体的清除率 (CL) 为28.85ml/hr/kg, 其他抗体的CL在47.07-61.19ml/hr/kg范围内。结果表明, 与其他抗体相比, BC-1C3-IgG1 (G2) 清除效率较低, 并且BC-1C3-IgG1 (G2) 抗体在小鼠中的代谢较慢。

[0384] 实例5. 报告细胞激活和结合测定

[0385] 对报告细胞的激活作用

[0386] 进行该实验以测试抗TNFR2抗体是否可以激活TNFR2途径。

[0387] 将人TNF α 蛋白 (义翘神州公司 (Sino Biological Inc.), 目录号: 10602-HNAE) 连续稀释 (3倍), 最高浓度为10ng/ml作为阳性对照。将抗TNFR2抗体BC-1F4-IgG1、BC-1C3-IgG1、BC-1B6-IgG1和BC-1F10-IgG1连续稀释 (3倍), 最高浓度为60 μ g/ml。将Jurkat-GFP-TNFR2细胞接种于96孔板 (细胞密度为 1×10^5 个细胞/孔, 每孔100 μ L), 然后将100 μ L人TNF α 蛋白或100 μ L抗TNFR2抗体添加到每个孔中, 并在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。孵育后, 将板取出, 并转移至96孔板。将每个孔用150 μ L PBS洗涤。弃去上清液。将100 μ L PBS添加到每个孔中以重悬细胞。然后将板置于发光检测器中以检测荧光信号。如果抗体可以激活TNFR2, 则报告细胞将报告GFP信号。

[0388] 如图11所示, 当存在抗TNFR2抗体BC-1F4-IgG1、BC-1C3-IgG1、BC-1B6-IgG1和BC-1F10-IgG1时, 未检测到荧光信号。抗TNFR2抗体BC-1F4-IgG1、BC-1C3-IgG1、BC-1B6-IgG1和BC-1F10-IgG1均未表现出报告细胞激活。所有抗TNFR2抗体均未激活Jurkat-GFP-TNFR2细

胞中的TNFR2途径。

[0389] 对报告细胞的阻断作用

[0390] 进行实验以测试抗TNFR2抗体是否可以阻断TNFR2与其配体TNF α 之间的结合。

[0391] 将报告Jurkat-GFP-TNFR2细胞接种在96孔板中(细胞密度为 1×10^5 个细胞/孔)。将TNF α 蛋白稀释至1ng/ml。将抗TNFR2抗体BC-1F4-IgG1、BC-1C3-IgG1、BC-1B6-IgG1和BC-1F10-IgG1连续稀释(3倍),最高浓度为10 μ g/mL。将50 μ l人TNF α 蛋白和50 μ l抗体添加到每个孔中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育24小时。孵育后,将板取出,并转移至96孔板。将每个孔用150 μ l PBS洗涤。弃去上清液。将100 μ L PBS添加到每个孔中以重悬细胞。通过流式细胞术确定GFP的信号。

[0392] 如图12所示,当抗TNFR2抗体BC-1F10-IgG1和BC-1F4-IgG1的浓度增加时,GFP信号(表明细胞与TNF α 结合)降低(y轴),表明人TNF α 与TNFR2之间的结合被抗TNFR2抗体BC-1F10-IgG1和BC-1F4-IgG1阻断。

[0393] 实例6. 体内毒性实验(非荷瘤模型)

[0394] 将TNFR2人源化小鼠(6-8周)根据它们的体重随机分为对照组和治疗组(每组4只小鼠)。给对照组注射等体积的PBS,并且给施用组注射抗h TNFR2抗体(BC-1C3-IgG1、BC-1F4-IgG1或BC-1B6-IgG1)或CTLA4抗体(抗mCTLA4)。抗hTNFR2抗体和CTLA4抗体的注射剂量为30mg/kg或100mg/kg。施用频率为每周一次,共施用4次。特定的施用剂量、方式和频率在下表14中示出。在实验中,监测体重变化和任何异常情况。在分组后第1天、第8天、第15天、第22天和第28天监测血液生化指标。血液生化指标包括:天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、肌酸激酶(CK)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、淀粉酶(AMY)、尿素(UREA)、肌酐(CREA)、葡萄糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、钙(Ca)、无机磷(P)。分组后第28天进行血常规测试。血常规测试包括以下测试:白细胞计数(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞比容(HCT)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、PLT(血小板计数)、淋巴细胞(LYMPH#)、淋巴细胞百分比(LYMPH%)、单核细胞(MONO#)、单核细胞百分比(MONO%)、中性粒细胞百分比(NEUT%)。实验结束时,将小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾和肠放入福尔马林中进行HE染色,并测量肝、脾和肾的重量。

[0395] 表14

[0396]

组别	药物	治疗
G1	PBS	腹膜内注射,每周一次,共4次
G2	BC-1C3-IgG1	30mg/kg,腹膜内注射,每周一次,共4次
G3	BC-1C3-IgG1	100mg/kg,腹膜内注射,每周一次,共4次
G4	BC-1F4-IgG1	30mg/kg,腹膜内注射,每周一次,共4次
G5	BC-1F4-IgG1	100mg/kg,腹膜内注射,每周一次,共4次
G6	BC-1B6-IgG1	30mg/kg,腹膜内注射,每周一次,共4次
G7	BC-1B6-IgG1	100mg/kg,腹膜内注射,每周一次,共4次
G8	抗mCTLA4	30mg/kg,腹膜内注射,每周一次,共4次
G9	抗mCTLA4	100mg/kg,腹膜内注射,每周一次,共4次

[0397] 结果显示,对照组和治疗组中所有小鼠的体重在整个实验期间均呈上升趋势,并

且各组间体重变化无显著差异。血液生化指标测试结果(参见图13A-13B的在第28天的示例性血液生化指标)和血常规测试结果显示与对照相比没有显著差异。与之前的结果类似,体内毒性结果显示抗hTNFR2抗体耐受性良好并且对小鼠无毒。

[0398] 其他实施例

[0399] 应当理解,虽然已经结合具体实施方式对本发明进行了描述,但前面的描述旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附的权利要求书的范围限定。其他方面、优点以及修改在以下权利要求的范围内。

SEQUENCE LISTING

<110> 宝船生物医药科技(上海)有限公司

<120> 抗TNFR2抗体及其用途

<130> P22011607CF

<150> PCT/CN2021/140487

<151> 2021-12-22

<160> 79

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人TNFR2蛋白

<400> 1

```

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1           5           10           15
Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
          20           25           30
Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
          35           40           45
Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
          50           55           60
Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65           70           75           80
Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
          85           90           95
Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
          100          105          110
Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
          115          120          125
Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
          130          135          140
Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145          150          155          160
Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
          165          170          175
Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly

```

180	185	190
Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser		
195	200	205
Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser		
210	215	220
Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser		
225	230	235
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly		
245	250	255
Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly		
260	265	270
Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys		
275	280	285
Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro		
290	295	300
Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu		
305	310	315
Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser		
325	330	335
Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly		
340	345	350
Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser		
355	360	365
Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile		
370	375	380
Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln		
385	390	395
Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro		
405	410	415
Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser		
420	425	430
Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro		
435	440	445
Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser		
450	455	460
<210> 2		
<211> 474		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		

<220>

<223> 小鼠TNFR2蛋白

<400> 2

Met	Ala	Pro	Ala	Ala	Leu	Trp	Val	Ala	Leu	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Leu
1				5					10					15	
Trp	Ala	Thr	Gly	His	Thr	Val	Pro	Ala	Gln	Val	Val	Leu	Thr	Pro	Tyr
			20					25						30	
Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Tyr	Glu	Cys	Gln	Ile	Ser	Gln	Glu	Tyr	Tyr	Asp
			35				40					45			
Arg	Lys	Ala	Gln	Met	Cys	Cys	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Gln	Tyr	Val
			50				55					60			
Lys	His	Phe	Cys	Asn	Lys	Thr	Ser	Asp	Thr	Val	Cys	Ala	Asp	Cys	Glu
65					70					75					80
Ala	Ser	Met	Tyr	Thr	Gln	Val	Trp	Asn	Gln	Phe	Arg	Thr	Cys	Leu	Ser
					85					90					95
Cys	Ser	Ser	Ser	Cys	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Glu	Ile	Arg	Ala	Cys	Thr
					100					105					110
Lys	Gln	Gln	Asn	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Glu	Ala	Gly	Arg	Tyr	Cys	Ala
					115					120					125
Leu	Lys	Thr	His	Ser	Gly	Ser	Cys	Arg	Gln	Cys	Met	Arg	Leu	Ser	Lys
					130					135					140
Cys	Gly	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Pro	Asn	Gly	Asn
145						150					155				160
Val	Leu	Cys	Lys	Ala	Cys	Ala	Pro	Gly	Thr	Phe	Ser	Asp	Thr	Thr	Ser
						165						170			175
Ser	Thr	Asp	Val	Cys	Arg	Pro	His	Arg	Ile	Cys	Ser	Ile	Leu	Ala	Ile
					180					185					190
Pro	Gly	Asn	Ala	Ser	Thr	Asp	Ala	Val	Cys	Ala	Pro	Glu	Ser	Pro	Thr
					195					200					205
Leu	Ser	Ala	Ile	Pro	Arg	Thr	Leu	Tyr	Val	Ser	Gln	Pro	Glu	Pro	Thr
						210						215			220
Arg	Ser	Gln	Pro	Leu	Asp	Gln	Glu	Pro	Gly	Pro	Ser	Gln	Thr	Pro	Ser
225						230					235				240
Ile	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Pro	Ile	Ile	Glu	Gln	Ser	Thr	Lys
						245						250			255
Gly	Gly	Ile	Ser	Leu	Pro	Ile	Gly	Leu	Ile	Val	Gly	Val	Thr	Ser	Leu
						260									270
Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Gly	Leu	Val	Asn	Cys	Ile	Ile	Leu	Val	Gln	Arg
						275									285

Lys	Lys	Lys	Pro	Ser	Cys	Leu	Gln	Arg	Asp	Ala	Lys	Val	Pro	His	Val
290						295					300				
Pro	Asp	Glu	Lys	Ser	Gln	Asp	Ala	Val	Gly	Leu	Glu	Gln	Gln	His	Leu
305					310				315					320	
Leu	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser	Ala
				325					330					335	
Ser	Ala	Gly	Asp	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Gly	Gly	His	Pro	Gln	Ala	Arg
			340						345				350		
Val	Met	Ala	Glu	Ala	Gln	Gly	Phe	Gln	Glu	Ala	Arg	Ala	Ser	Ser	Arg
		355					360					365			
Ile	Ser	Asp	Ser	Ser	His	Gly	Ser	His	Gly	Thr	His	Val	Asn	Val	Thr
		370				375					380				
Cys	Ile	Val	Asn	Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Asp	His	Ser	Ser	Gln	Cys	Ser
385					390					395				400	
Ser	Gln	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Gly	Asp	Pro	Asp	Ala	Lys	Pro	Ser	Ala
				405					410					415	
Ser	Pro	Lys	Asp	Glu	Gln	Val	Pro	Phe	Ser	Gln	Glu	Glu	Cys	Pro	Ser
			420					425					430		
Gln	Ser	Pro	Cys	Glu	Thr	Thr	Glu	Thr	Leu	Gln	Ser	His	Glu	Lys	Pro
		435					440					445			
Leu	Pro	Leu	Gly	Val	Pro	Asp	Met	Gly	Met	Lys	Pro	Ser	Gln	Ala	Gly
		450				455					460				
Trp	Phe	Asp	Gln	Ile	Ala	Val	Lys	Val	Ala						
465					470										
<210>	3														
<211>	463														
<212>	PRT														
<213>	Artificial Sequence														
<220>															
<223>	猴TNFR2蛋白														
<400>	3														
Gly	His	His	Ser	Ala	Ser	Trp	Gly	Ala	Met	Gly	Val	Gln	Leu	Val	Glu
1				5				10					15		
Thr	Trp	Ala	Ser	Gly	Met	Ala	Glu	Pro	Arg	Ala	Val	Ala	Phe	Thr	Pro
			20					25					30		
Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Gly	Thr	Cys	Arg	Leu	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Asp
		35					40					45			
Gln	Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys	Ser	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Gln	His	Ala
		50				55						60			

Lys	Val	Phe	Cys	Thr	Lys	Thr	Ser	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Ser	Cys	Glu
65					70					75					80
Asp	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln	Leu	Trp	Asn	Trp	Val	Pro	Glu	Cys	Leu	Ser
				85					90					95	
Cys	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Cys	Thr
			100					105					110		
Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala
		115					120					125			
Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Cys	Ala	Gln	Leu	Arg	Lys	Cys
	130					135				140					
Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val
145					150					155					160
Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Ala	Pro	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser
				165					170					175	
Thr	Asp	Ile	Cys	Arg	Pro	His	Gln	Ile	Cys	His	Val	Val	Ala	Ile	Pro
			180					185					190		
Gly	Asn	Ala	Ser	Met	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg
	195						200					205			
Ser	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Val	His	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg
	210					215				220					
Ser	Gln	His	Thr	Gln	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Gly	Thr
225					230					235					240
Ser	Phe	Leu	Leu	Pro	Val	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr
				245					250				255		
Gly	Asp	Ile	Val	Leu	Pro	Val	Gly	Leu	Ile	Val	Gly	Val	Thr	Ala	Leu
			260					265					270		
Gly	Leu	Leu	Ile	Ile	Gly	Val	Val	Asn	Cys	Val	Ile	Met	Thr	Gln	Val
		275					280					285			
Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Cys	Leu	Gln	Arg	Glu	Thr	Lys	Val	Pro	His	Leu
	290					295					300				
Pro	Ala	Asp	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Gln	Gly	Pro	Glu	Gln	Gln	His	Leu
305					310					315					320
Leu	Thr	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser	Ala
				325					330				335		
Ser	Ala	Leu	Asp	Arg	Arg	Ala	Pro	Thr	Arg	Asn	Gln	Pro	Gln	Ala	Pro
			340					345					350		
Gly	Ala	Glu	Lys	Ala	Ser	Gly	Ala	Gly	Glu	Ala	Arg	Ala	Ser	Thr	Gly
		355					360				365				
Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	His	Gly	Thr	Gln	Val	Asn	Val	Thr

370	375	380
Cys Ile Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser		
385	390	395
Ser Gln Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ala Ser Pro Ser Gly		400
	405	410
Ser Pro Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Ser Ala Phe		415
	420	425
Arg Ser Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu		430
	435	440
Lys Pro Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser		445
450	455	460
<210> 4		
<211> 482		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> 狗TNFR2蛋白		
<400> 4		
Met Thr Tyr Val Gly Ala Gly Val Asn Glu Gly Thr His Glu Val Pro		
1	5	10
Ser Ala Val Cys Ile Gln Gln Val Phe Ile Leu Gly Pro Arg Pro Cys		15
	20	25
Pro His Leu Ser Asp Ser Val Asn Arg Ala Thr Gln Leu Pro Tyr Val		30
	35	40
Pro Asp Pro Glu Leu Gly Ser Ser Cys Gln Gln Ser Glu Tyr Phe Asp		45
	50	55
Gln Arg Thr Gln Met Cys Cys Ser Met Cys Pro Pro Gly Ser His Ala		60
65	70	75
Arg Leu Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asn Thr Val Cys Ala Arg Cys Glu		80
	85	90
Asn Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser		95
	100	105
Cys Gly Ser Arg Cys Gly Ala Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr		110
	115	120
Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Ser Cys Lys Ser Gly Trp Tyr Cys Thr		125
	130	135
Leu Arg Arg Gln Gly Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Arg Cys		140
145	150	155
Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Lys Pro Gly Thr Ala Thr Ser Asp Val		160

165								170					175				
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Ala	Pro	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser		
180								185					190				
Thr	Asp	Thr	Cys	Arg	Pro	His	Arg	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Ala	Val	Pro		
195								200					205				
Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Asp	Ala	Val	Cys	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Thr	Val		
210								215					220				
Arg	Thr	Ala	Pro	Arg	Pro	Ala	Ser	Thr	Arg	Gln	Pro	Gly	Ser	Thr	Gln		
225								230					235				
Pro	Arg	Pro	Ala	Glu	Pro	Thr	Pro	Gly	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Arg	Thr		
245								250					255				
Ser	Val	Leu	Phe	Pro	Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Leu	Ser		
260								265					270				
Thr	Gly	Asp	Ile	Ser	Leu	Pro	Ile	Gly	Leu	Ile	Val	Gly	Val	Thr	Thr		
275								280					285				
Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Ile	Gly	Leu	Val	Asn	Cys	Val	Ile	Val	Thr	Gln		
290								295					300				
Lys	Lys	Lys	Lys	Pro	Phe	Cys	Leu	Gln	Gly	Glu	Ala	Lys	Val	Pro	His		
305								310					315				
Leu	Pro	Ala	Asp	Lys	Ala	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Pro	Glu	Gln	Gln	His		
325								330					335				
Leu	Leu	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala		
340								345					350				
Ala	Ser	Ser	Ala	Asp	Gly	Arg	Ala	Pro	Pro	Arg	Ala	Gln	Pro	Pro	Ala		
355								360					365				
Pro	Gly	Thr	Gly	Lys	Ala	His	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Gln	Ala	Ser	Ser		
370								375					380				
Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	Ser	Cys	Gly	Gly	His	Gly	Thr	Gln	Val	Asn	Val		
385								390					395				
Thr	Cys	Ile	Val	Asn	Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Asp	His	Gly	Pro		
405								410					415				
Gln	Cys	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	His	Thr	Thr	Gly	Asp	Val	Asp	Ala	Gly		
420								425					430				
Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Asp	Asp	Gln	Gln	Val	Pro	Phe	Ser	Gln	Glu	Glu		
435								440					445				
Cys	Pro	Phe	Gln	Phe	Gln	Pro	Gly	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Glu	Asn		
450								455					460				
Pro	Glu	Asp	Lys	Pro	Leu	Pro	Leu	Gly	Val	Pro	Asp	Ala	Gly	Met	Lys		
465								470					475				
480																	

Ser Ser

<210> 5

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 嵌合TNFR2蛋白 (33-259aa是人序列)

<400> 5

Met	Ala	Pro	Ala	Ala	Leu	Trp	Val	Ala	Leu	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Leu
1				5				10						15	
Trp	Ala	Thr	Gly	His	Thr	Val	Pro	Ala	Gln	Val	Val	Leu	Thr	Pro	Tyr
			20					25						30	
Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Ser	Thr	Cys	Arg	Leu	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Gln
			35					40						45	
Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys	Ser	Lys	Cys	Ser	Pro	Gly	Gln	His	Ala	Lys
			50					55						60	
Val	Phe	Cys	Thr	Lys	Thr	Ser	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Ser	Cys	Glu	Asp
65							70							75	80
Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln	Leu	Trp	Asn	Trp	Val	Pro	Glu	Cys	Leu	Ser	Cys
				85						90					95
Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Cys	Thr	Arg
				100						105				110	
Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu
				115						120				125	
Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Cys	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg
				130						135				140	
Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Val
145						150				155				160	
Cys	Lys	Pro	Cys	Ala	Pro	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr
				165						170				175	
Asp	Ile	Cys	Arg	Pro	His	Gln	Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Gly
				180						185				190	
Asn	Ala	Ser	Met	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser
				195						200				205	
Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Val	His	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Ser
				210						215				220	
Gln	His	Thr	Gln	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser
225						230					235			240	
Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly

	245		250		255
Asp Phe Ala Leu Pro Ile Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ser Leu Gly					
	260		265		270
Leu Leu Met Leu Gly Leu Val Asn Cys Ile Ile Leu Val Gln Arg Lys					
	275		280		285
Lys Lys Pro Ser Cys Leu Gln Arg Asp Ala Lys Val Pro His Val Pro					
	290		295		300
Asp Glu Lys Ser Gln Asp Ala Val Gly Leu Glu Gln Gln His Leu Leu					
305		310		315	320
Thr Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser					
	325		330		335
Ala Gly Asp Arg Arg Ala Pro Pro Gly Gly His Pro Gln Ala Arg Val					
	340		345		350
Met Ala Glu Ala Gln Gly Phe Gln Glu Ala Arg Ala Ser Ser Arg Ile					
	355		360		365
Ser Asp Ser Ser His Gly Ser His Gly Thr His Val Asn Val Thr Cys					
	370		375		380
Ile Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser					
385		390		395	400
Gln Ala Ser Ala Thr Val Gly Asp Pro Asp Ala Lys Pro Ser Ala Ser					
	405		410		415
Pro Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Gln Glu Glu Cys Pro Ser Gln					
	420		425		430
Ser Pro Cys Glu Thr Thr Glu Thr Leu Gln Ser His Glu Lys Pro Leu					
	435		440		445
Pro Leu Gly Val Pro Asp Met Gly Met Lys Pro Ser Gln Ala Gly Trp					
	450		455		460

Phe Asp Gln Ile Ala Val Lys Val Ala

465

470

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1A8的VH CDR1 (Kabat)

<400> 6

Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn

1

5

<210> 7

<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1A8的VH CDR2 (Kabat)
<400> 7
Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Leu Ser Val
1 5 10 15
Lys Ser
<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1A8的VH CDR3 (Kabat)
<400> 8
Glu Asp Gly Val Gly Gly Thr Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1A8的VL CDR1 (Kabat)
<400> 9
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asn Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1A8的VL CDR2 (Kabat)
<400> 10
Asp Val Ser Asn Leu Glu Ile
1 5
<210> 11
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1A8的VL CDR3 (Kabat)

<400> 11

Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1B6的VH CDR1 (Kabat)

<400> 12

Asn Phe Gly Met His

1 5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1B6的VH CDR2 (Kabat)

<400> 13

Val Ile Trp Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1B6的VH CDR3 (Kabat)

<400> 14

Asp Ser Ser Trp Gly Phe Leu Leu Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1B6的VL CDR1 (Kabat)

<400> 15

Arg Ser Ser Arg Ser Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1B6的VL CDR2 (Kabat)

<400> 16

Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1B6的VL CDR3 (Kabat)

<400> 17

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Thr

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1C3的VH CDR1 (Kabat)

<400> 18

Ile Tyr Gly Met His

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1C3的VH CDR2 (Kabat)

<400> 19

Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val Lys

1	5	10	15
Gly			
<210> 20			
<211> 12			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> BC-1C3的VH CDR3 (Kabat)			
<400> 20			
Ala Val Asp Thr Ala Val Val Thr Phe Phe Asp Tyr			
1	5	10	
<210> 21			
<211> 11			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> BC-1C3的VL CDR1 (Kabat)			
<400> 21			
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala			
1	5	10	
<210> 22			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> BC-1C3的VL CDR2 (Kabat)			
<400> 22			
Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr			
1	5		
<210> 23			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> BC-1C3的VL CDR3 (Kabat)			
<400> 23			
Gln Gln Tyr Ser Asn Trp Pro Phe Thr			
1	5		
<210> 24			

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1F4的VH CDR1 (Kabat)
<400> 24
Ser Asp Ser Ser Ala Trp Asn
1 5
<210> 25
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1F4的VH CDR2 (Kabat)
<400> 25
Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Thr Val Ser Val
1 5 10 15
Lys Ser
<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1F4的VH CDR3 (Kabat)
<400> 26
Glu Asp Gly Val Gly Gly Thr Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1F4的VL CDR1 (Kabat)
<400> 27
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 28
<211> 7
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F4的VL CDR2 (Kabat)

<400> 28

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F4的VL CDR3 (Kabat)

<400> 29

Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Ile Thr

1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F10的VH CDR1 (Kabat)

<400> 30

Gly Asp Tyr Trp Ser

1 5

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F10的VH CDR2 (Kabat)

<400> 31

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F10的VH CDR3 (Kabat)

<400> 32

Gly His Trp Asn Tyr Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F10的VL CDR1 (Kabat)

<400> 33

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F10的VL CDR2 (Kabat)

<400> 34

Leu Asn Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F10的VL CDR3 (Kabat)

<400> 35

Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 36

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1A8人重链可变区

<400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
20				25				30							
Ser	Ala	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu
35				40				45							
Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Asn	Asp	Tyr	Ala
50				55				60							
Leu	Ser	Val	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile	Asn	Pro	Glu	Thr	Ser	Lys	Asn
65				70				75				80			
Gln	Phe	Ser	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
85				90				95							
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Asp	Gly	Val	Gly	Gly	Thr	Lys	Asp	Tyr	Phe
100				105				110							
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
115				120				125							

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1A8人轻链可变区

<400> 37

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1	5				10				15						
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asp	Asn	Tyr
20				25				30							
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
35				40				45							
Tyr	Asp	Val	Ser	Asn	Leu	Glu	Ile	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50				55				60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70				75				80			
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asp	Asn	Leu	Pro	Leu
85				90				95							
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys					
100				105											

<210> 38

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1B6重链可变区

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Ser Trp Gly Phe Leu Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1B6人轻链可变区

<400> 39

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100	105	110
<210> 40		
<211> 121		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> 1C3人重链可变区		
<400> 40		
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val His Pro Gly Lys		
1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ile Tyr		
20 25 30		
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val		
50 55 60		
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65 70 75 80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Lys Ala Val Asp Thr Ala Val Val Thr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly		
100 105 110		
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115 120		
<210> 41		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> 1C3人轻链可变区		
<400> 41		
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Val Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly		
1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn		
20 25 30		
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
35 40 45		
Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
50 55 60		

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Trp Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1A8的VH CDR1 (Chothia)

<400> 42

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1A8的VH CDR2 (Chothia)

<400> 43

Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
1 5

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1A8的VH CDR3 (Chothia)

<400> 44

Glu Asp Gly Val Gly Gly Thr Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1A8的VL CDR1 (Chothia)

<400> 45
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asn Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1A8的VL CDR2 (Chothia)
<400> 46
Asp Val Ser Asn Leu Glu Ile
1 5
<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1A8的VL CDR3 (Chothia)
<400> 47
Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu Thr
1 5
<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1B6的VH CDR1 (Chothia)
<400> 48
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly Met His
1 5 10
<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1B6的VH CDR2 (Chothia)
<400> 49
Trp Tyr Glu Gly Ser Asp
1 5

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1B6的VH CDR3 (Chothia)

<400> 50

Asp Ser Ser Trp Gly Phe Leu Leu Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 51

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1B6的VL CDR1 (Chothia)

<400> 51

Arg Ser Ser Arg Ser Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1B6的VL CDR2 (Chothia)

<400> 52

Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1B6的VL CDR3 (Chothia)

<400> 53

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Thr

1 5

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1C3的VH CDR1 (Chothia)
<400> 54
Gly Phe Thr Phe Asn Ile Tyr Gly Met His
1 5 10
<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1C3的VH CDR2 (Chothia)
<400> 55
Ser Tyr Asp Gly Asn Asp
1 5
<210> 56
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1C3的VH CDR3 (Chothia)
<400> 56
Ala Val Asp Thr Ala Val Val Thr Phe Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1C3的VL CDR1 (Chothia)
<400> 57
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10
<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1C3的VL CDR2 (Chothia)

<400> 58
Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5
<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1C3的VL CDR3 (Chothia)
<400> 59
Gln Gln Tyr Ser Asn Trp Pro Phe Thr
1 5
<210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1F4的VH CDR1 (Chothia)
<400> 60
Gly Asp Ser Val Ser Ser Asp Ser Ser Ala Trp Asn
1 5 10
<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1F4的VH CDR2 (Chothia)
<400> 61
Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
1 5
<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1F4的VH CDR3 (Chothia)
<400> 62
Glu Asp Gly Val Gly Gly Thr Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1F4的VL CDR1 (Chothia)
<400> 63
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1F4的VL CDR2 (Chothia)
<400> 64
Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5
<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1F4的VL CDR3 (Chothia)
<400> 65
Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Ile Thr
1 5
<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BC-1F10的VH CDR1 (Chothia)
<400> 66
Asp Gly Ser Phe Ser Gly Asp Tyr Trp Ser
1 5 10
<210> 67
<211> 5
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F10的VH CDR2 (Chothia)

<400> 67

Asn His Ser Gly Ser

1 5

<210> 68

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F10的VH CDR3 (Chothia)

<400> 68

Gly His Trp Asn Tyr Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F10的VL CDR1 (Chothia)

<400> 69

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F10的VL CDR2 (Chothia)

<400> 70

Leu Asn Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BC-1F10的VL CDR3 (Chothia)

<400> 71

Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 72

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1F4人重链可变区

<400> 72

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asp

20 25 30

Ser Ser Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Thr

50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Gly Val Gly Gly Thr Lys Asp Tyr Phe

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 73

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1F4人轻链可变区

<400> 73

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 74

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1F10人重链可变区

<400> 74

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Ile Cys Ala Val Tyr Asp Gly Ser Phe Ser Gly Asp
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly His Trp Asn Tyr Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 75

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1F10人轻链可变区

<400> 75

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1	5	10	15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser			
20	25	30	
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Asn Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln Ala			
85	90	95	
Arg Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 76

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG1重链恒定区

<400> 76

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
20	25	30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
100	105	110	
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
115	120	125	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
130	135	140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			

145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
225	230	235	240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
	290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325	330	

<210> 77

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 具有SI突变的IgG1重链恒定区

<400> 77

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			

65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val	Asn His Lys Pro Ser	Asn Thr Lys Val	Asp Lys
85	90	95	
Lys Val Glu Pro Lys	Ser Cys Asp Lys Thr	His Thr Cys Pro	Pro Cys
100	105	110	
Pro Ala Pro Glu Leu	Leu Gly Gly Pro Asp	Val Phe Leu Phe	Pro Pro
115	120	125	
Lys Pro Lys Asp Thr	Leu Met Ile Ser Arg	Thr Pro Glu Val	Thr Cys
130	135	140	
Val Val Val Asp Val	Ser His Glu Asp Pro	Glu Val Lys Phe	Asn Trp
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val	Glu Val His Asn Ala	Lys Thr Lys Pro	Arg Glu
165	170	175	
Glu Gln Tyr Asn Ser	Thr Tyr Arg Val Val	Ser Val Leu Thr	Val Leu
180	185	190	
His Gln Asp Trp Leu	Asn Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val	Ser Asn
195	200	205	
Lys Ala Leu Pro Ala	Pro Glu Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala	Lys Gly
210	215	220	
Gln Pro Arg Glu Pro	Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg	Glu Glu
225	230	235	240
Met Thr Lys Asn Gln	Val Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly	Phe Tyr
245	250	255	
Pro Ser Asp Ile Ala	Val Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro	Glu Asn
260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser	Phe Phe
275	280	285	
Leu Tyr Ser Lys Leu	Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln	Gly Asn
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala	Leu His Asn His	Tyr Thr
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330		

<210> 78

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 具有LALA突变的IgG1重链恒定区

<400> 78

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
		100						105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
	115						120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150				155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165					170						175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
		180						185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
	195					200						205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230				235					240	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245					250						255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		260						265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
	275						280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295						300			

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 79
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 人TNF α 蛋白
 <400> 79
 Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
 20 25 30
 Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
 35 40 45
 Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
 50 55 60
 Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
 65 70 75 80
 Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
 85 90 95
 Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
 100 105 110
 Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
 115 120 125
 Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
 130 135 140
 Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
 165 170 175
 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
 180 185 190
 Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
 195 200 205
 Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
 210 215 220

Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu
225					230			

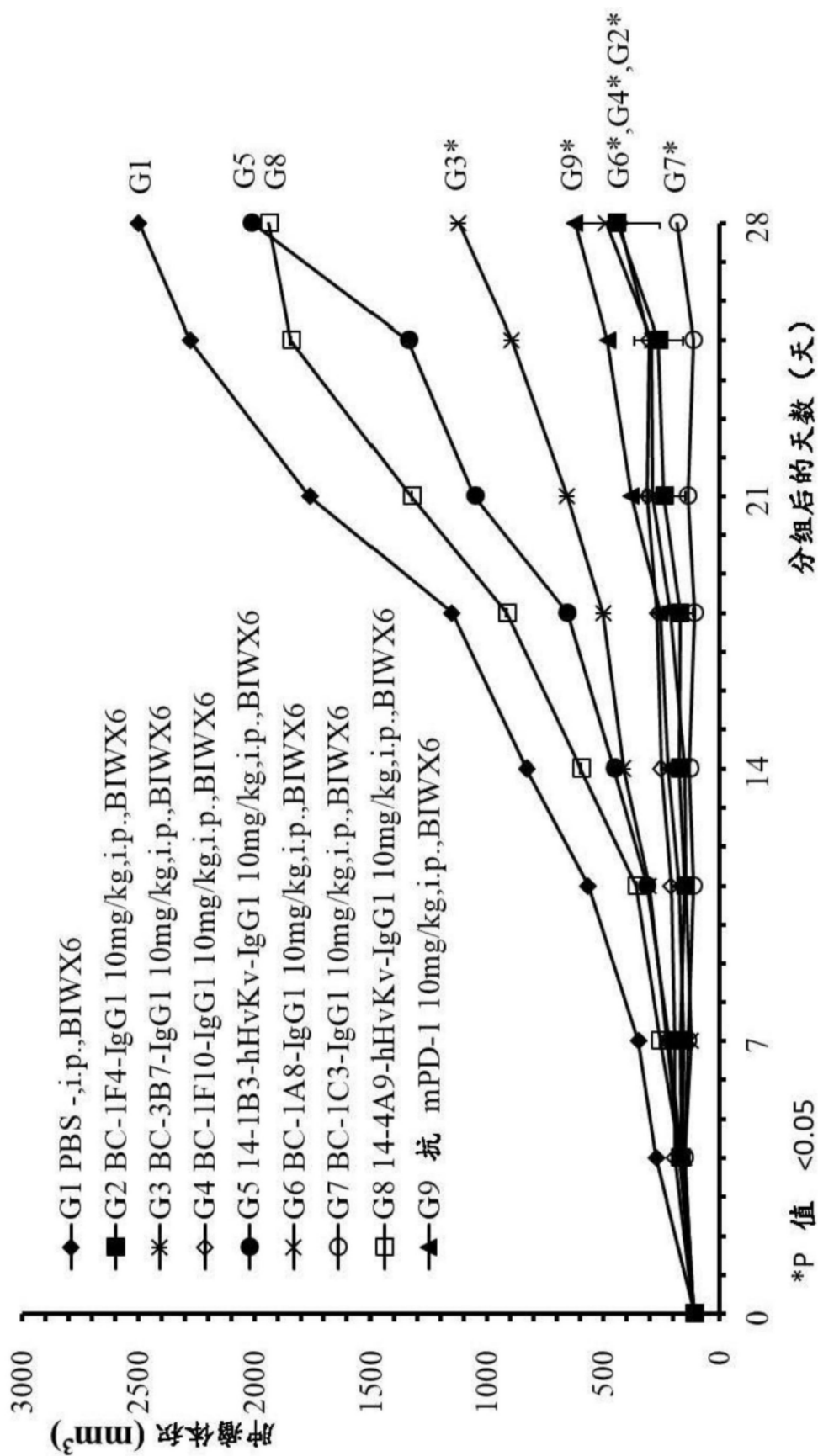


图1

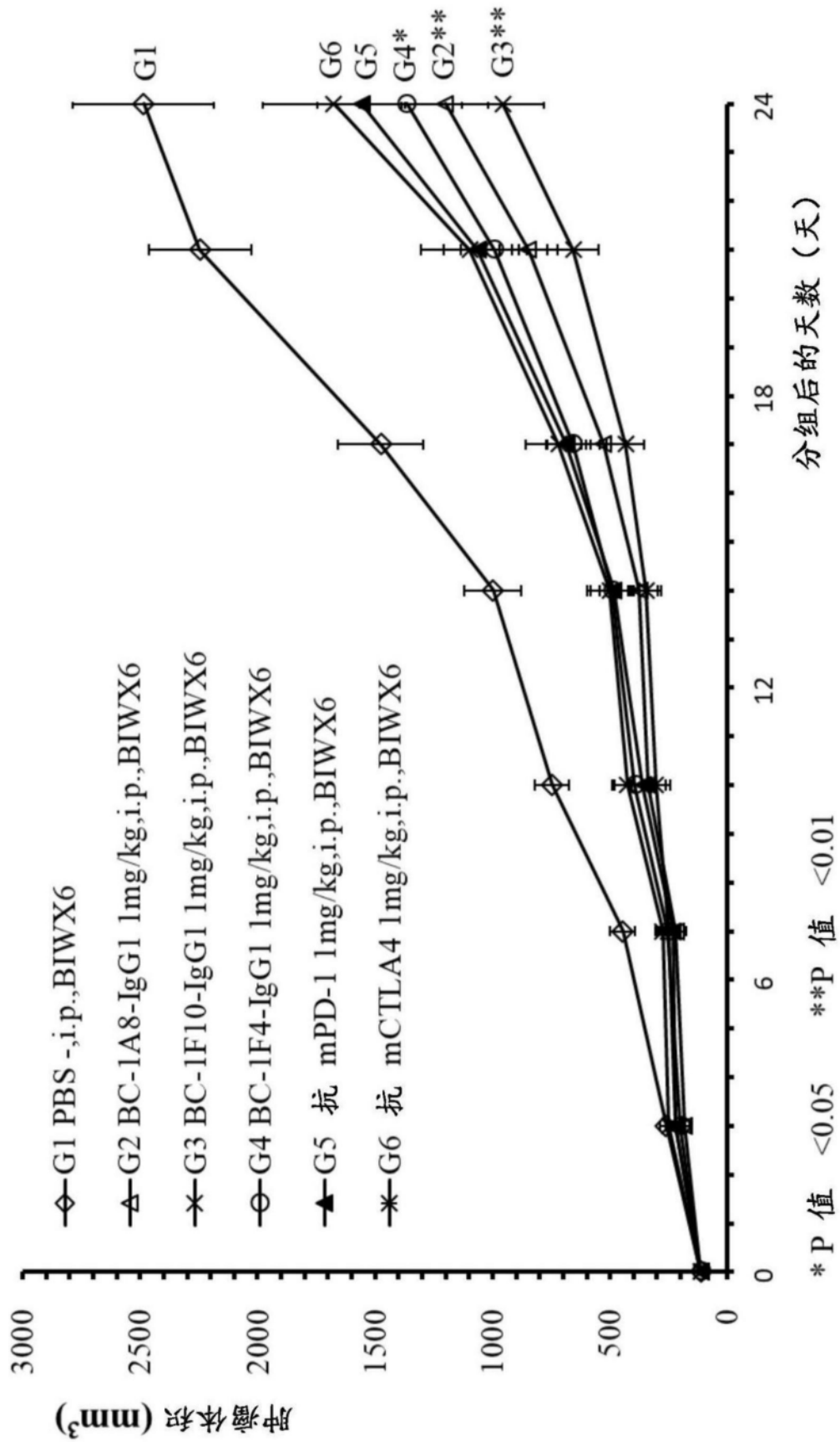


图2

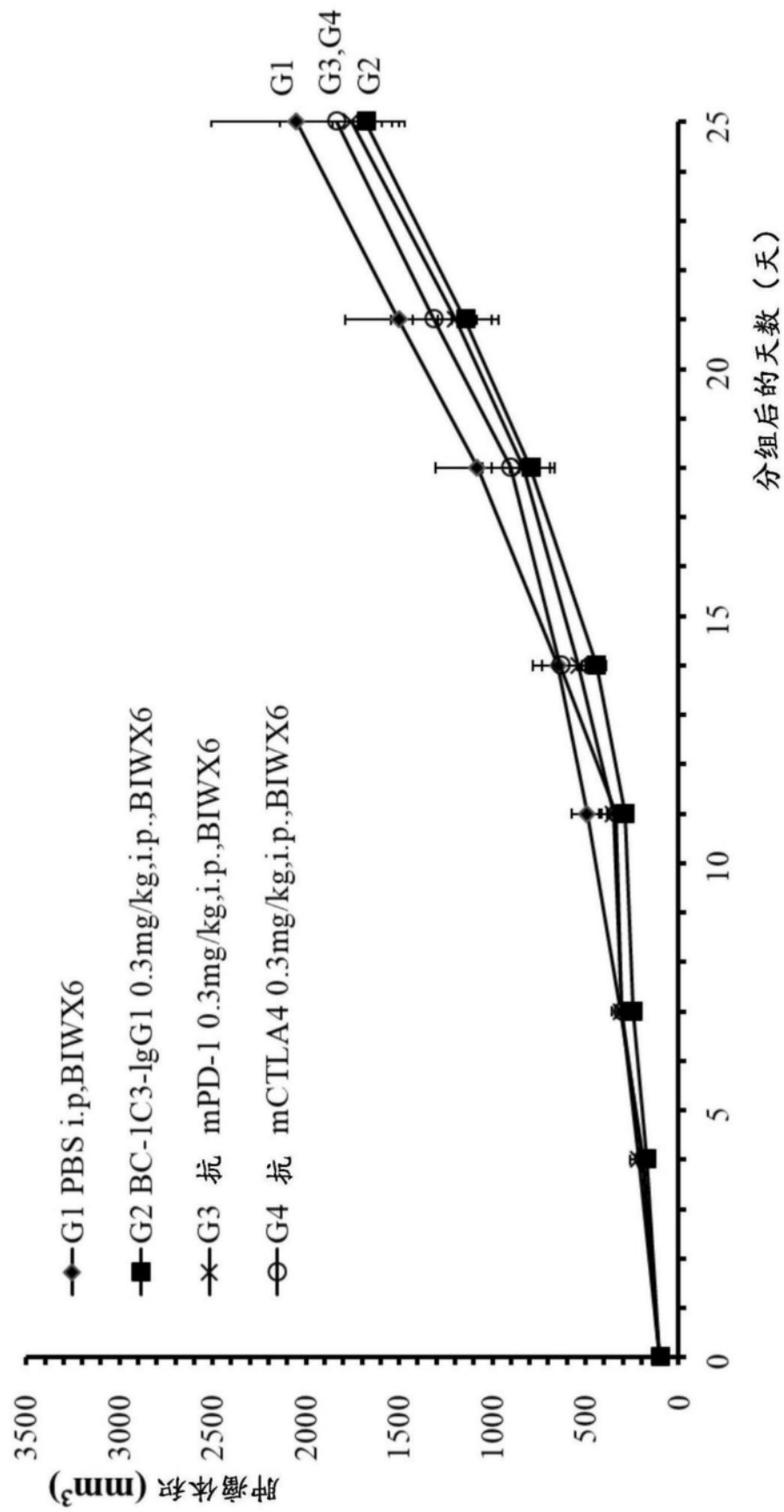


图3

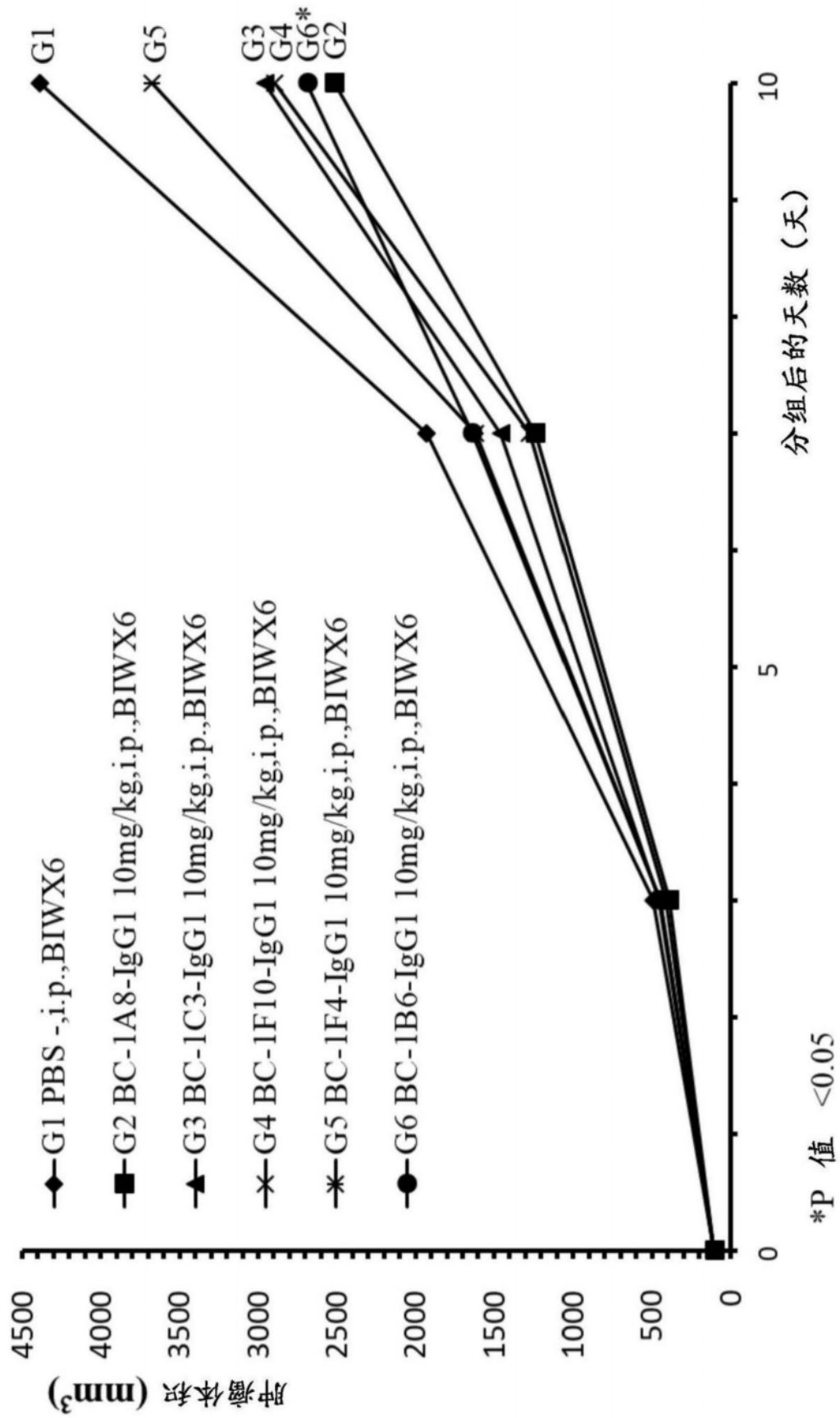


图4

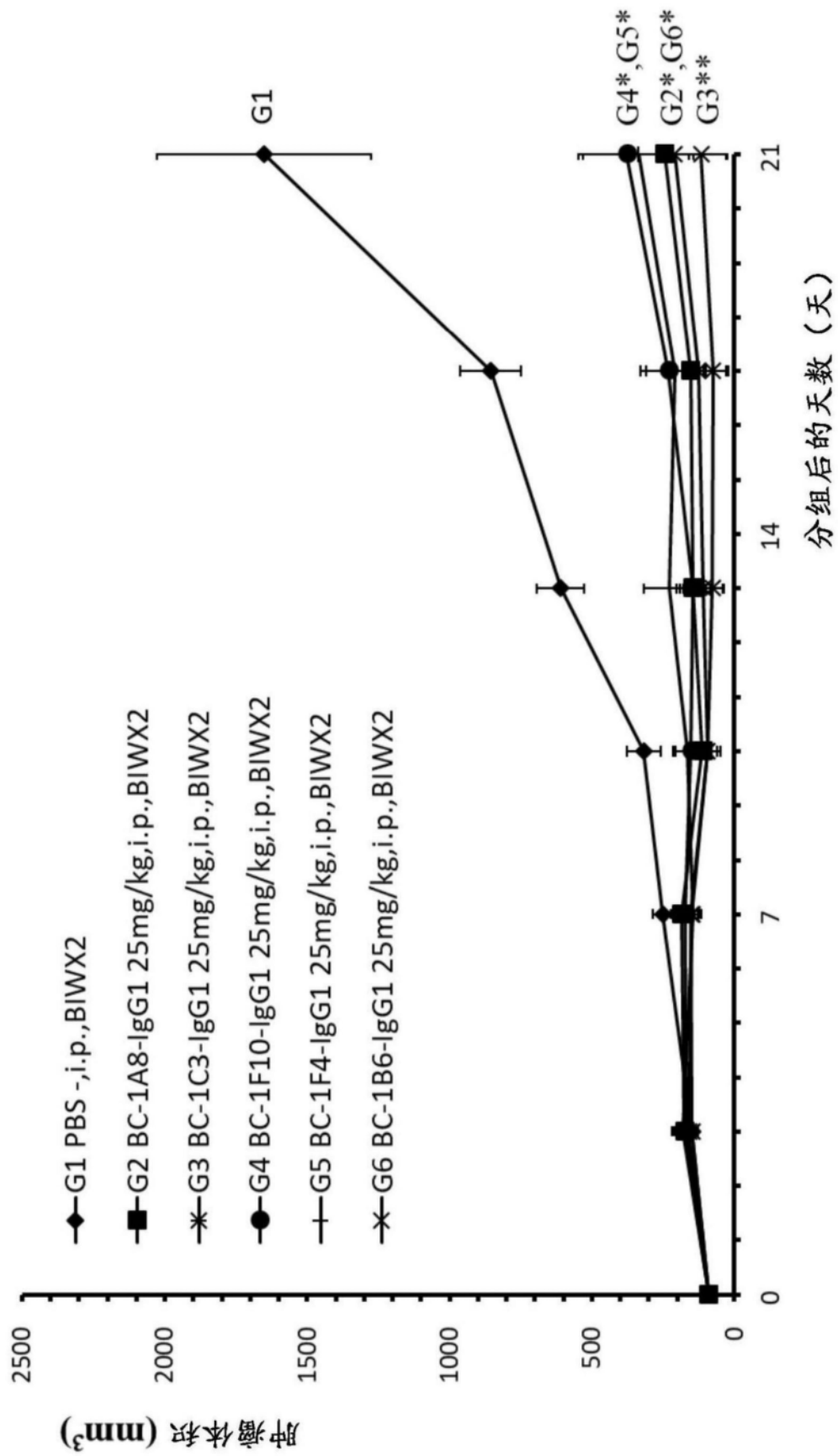


图5

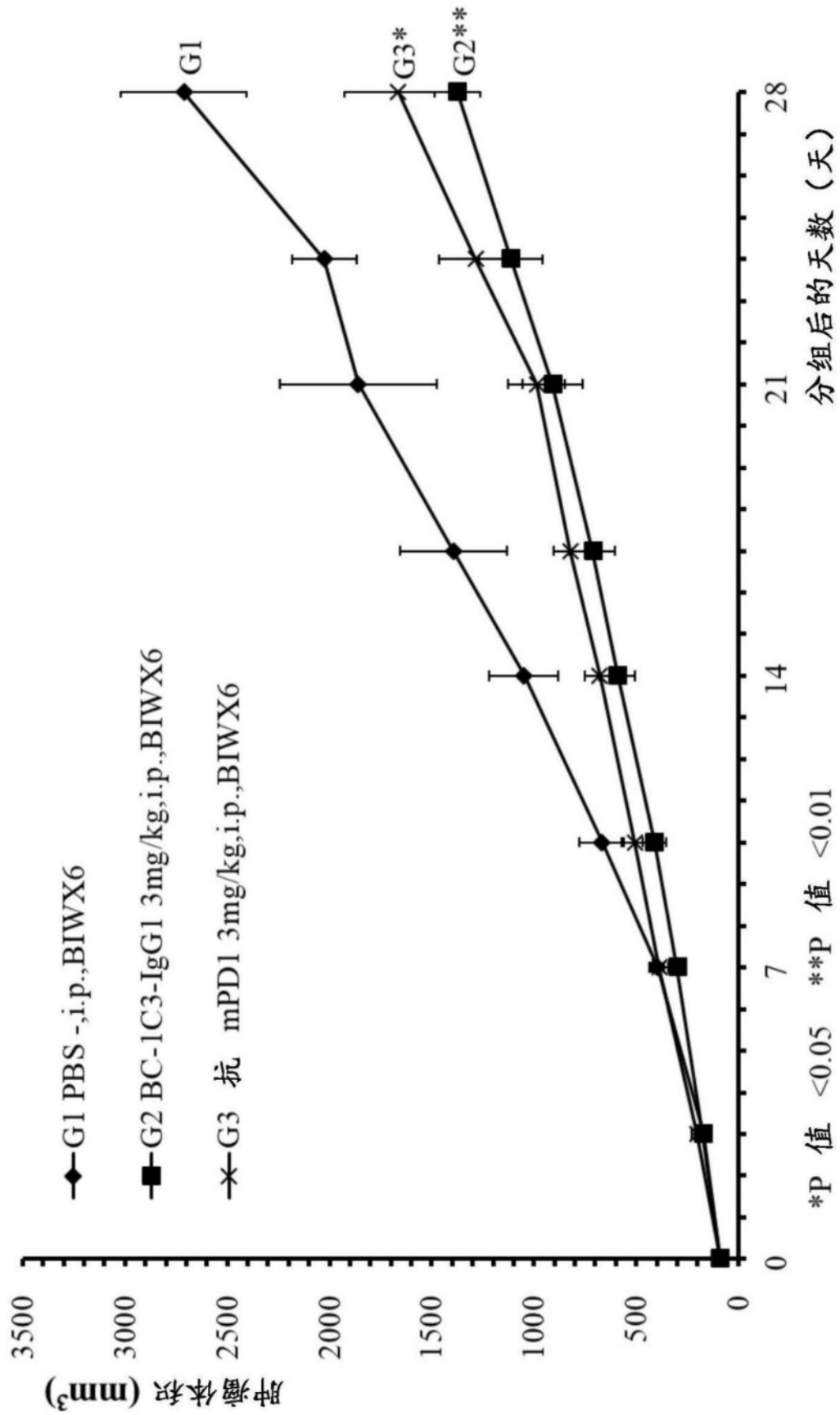


图6

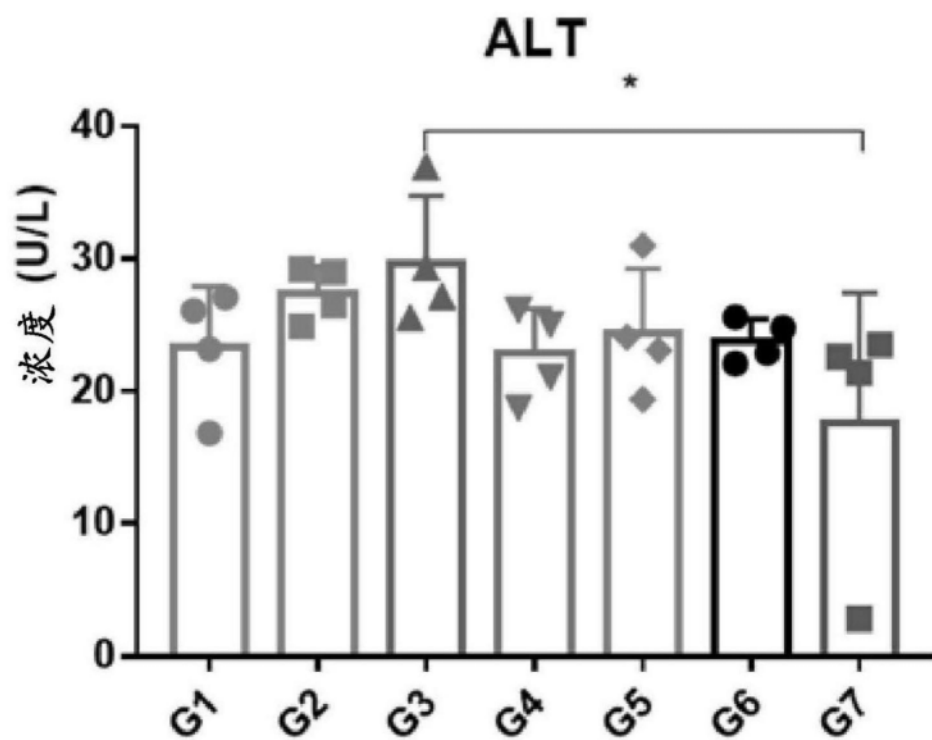


图7A

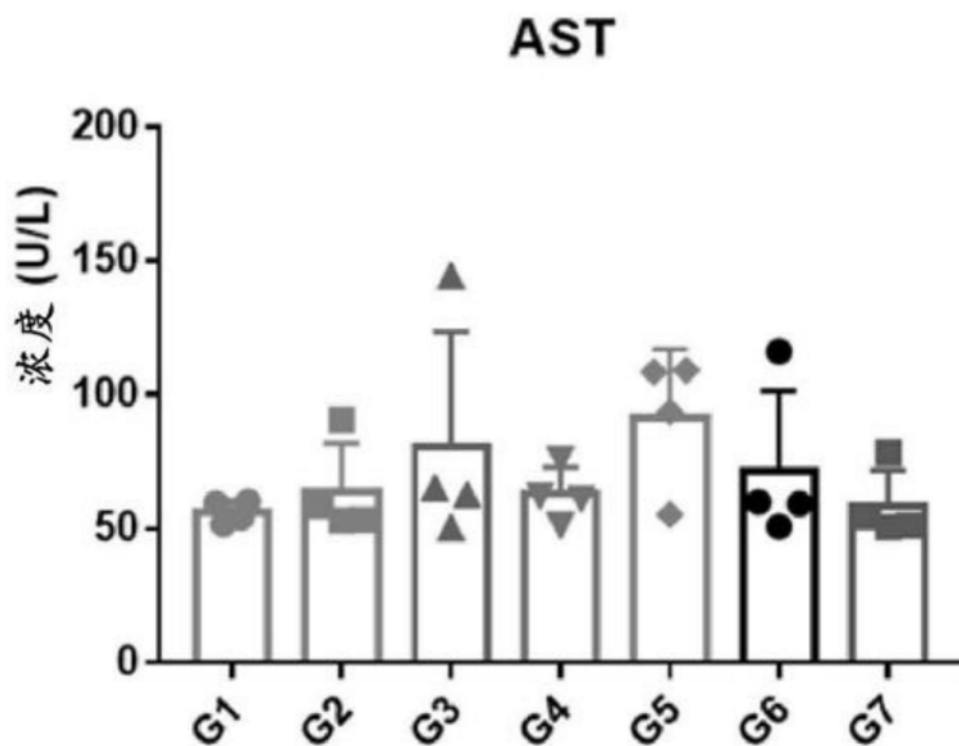


图7B

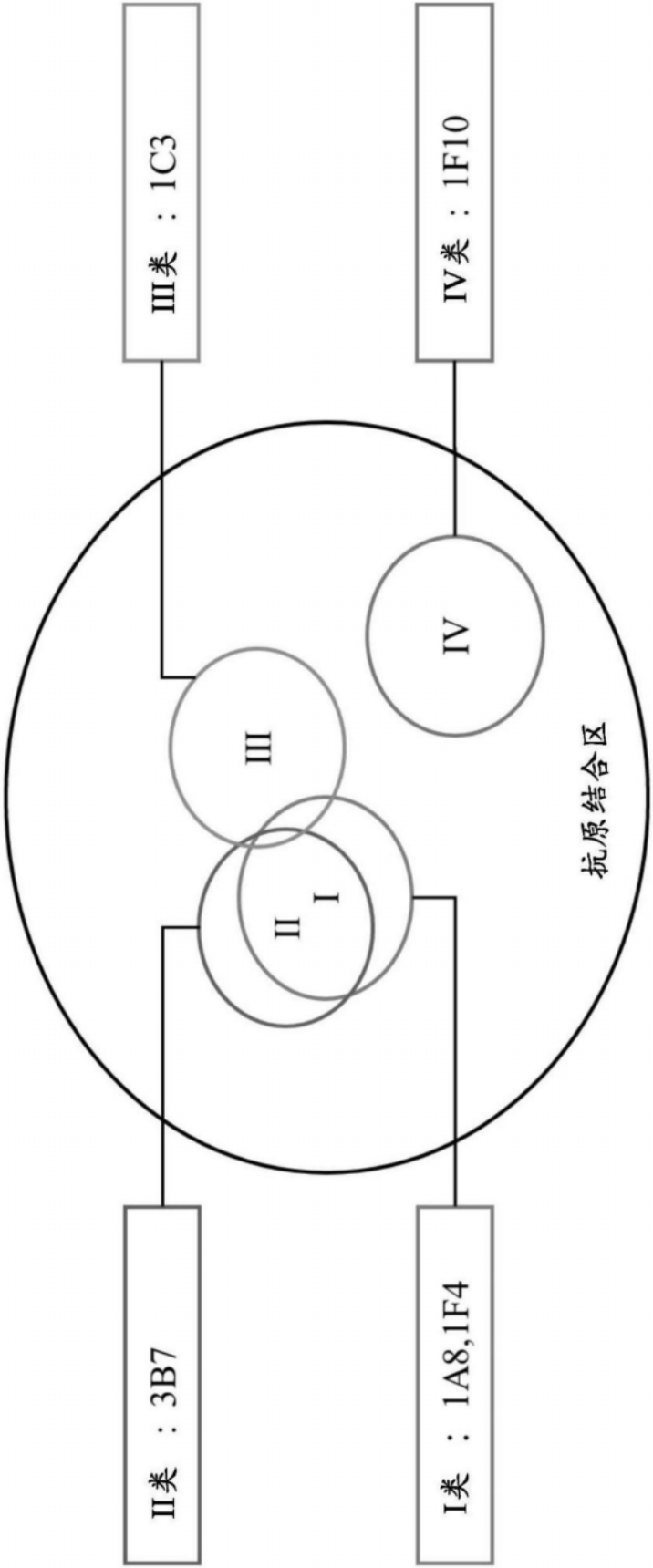


图8

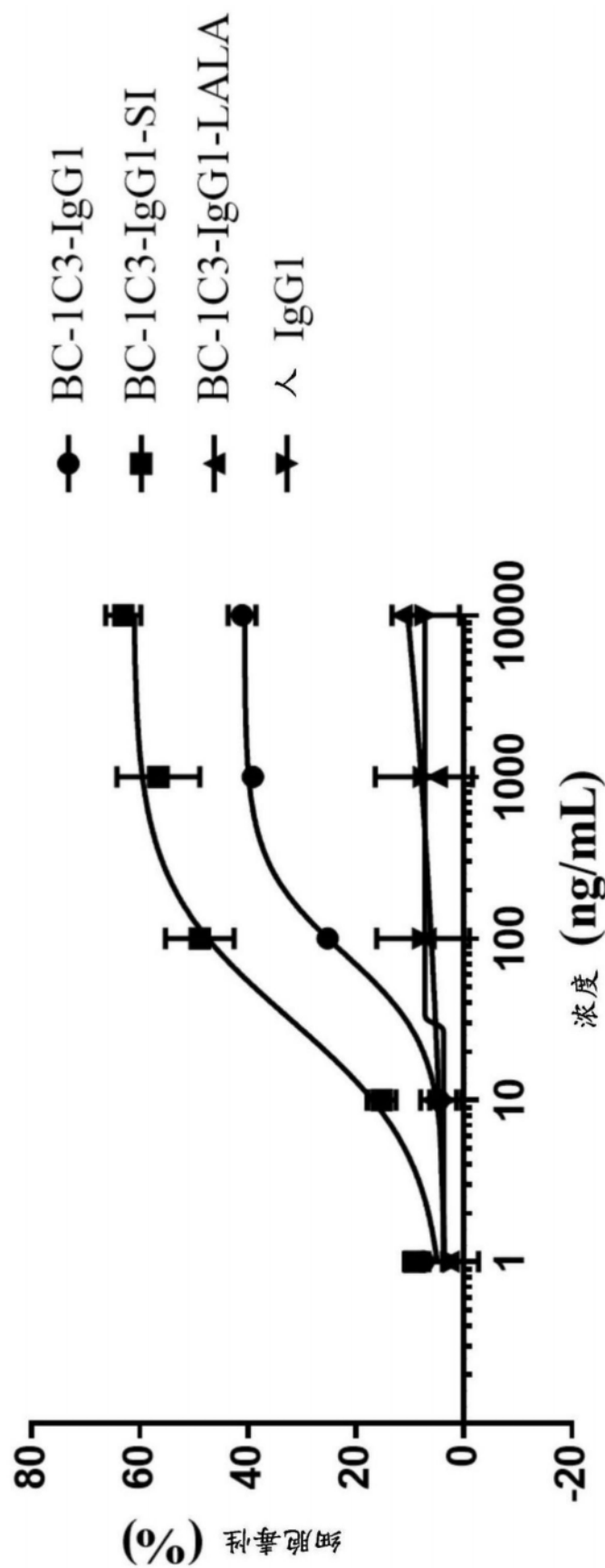


图9

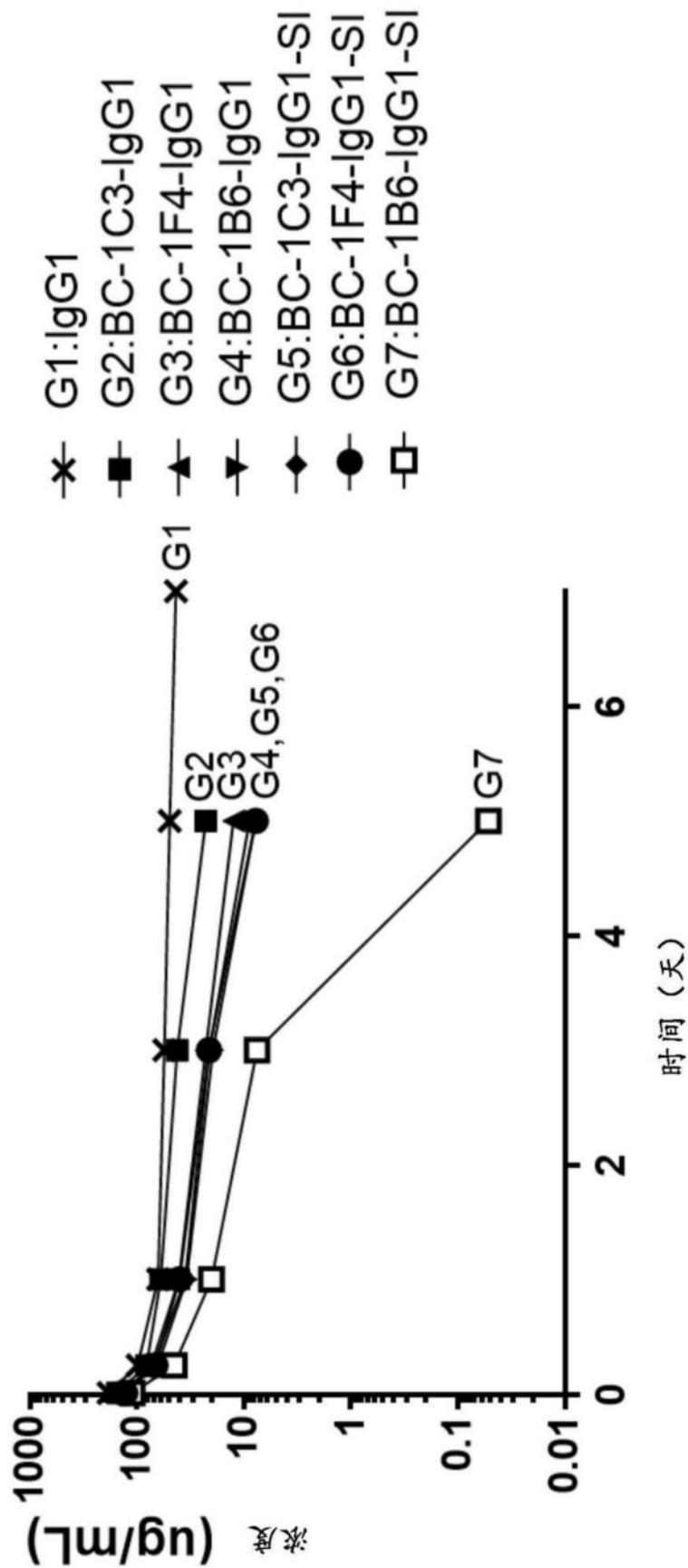


图10

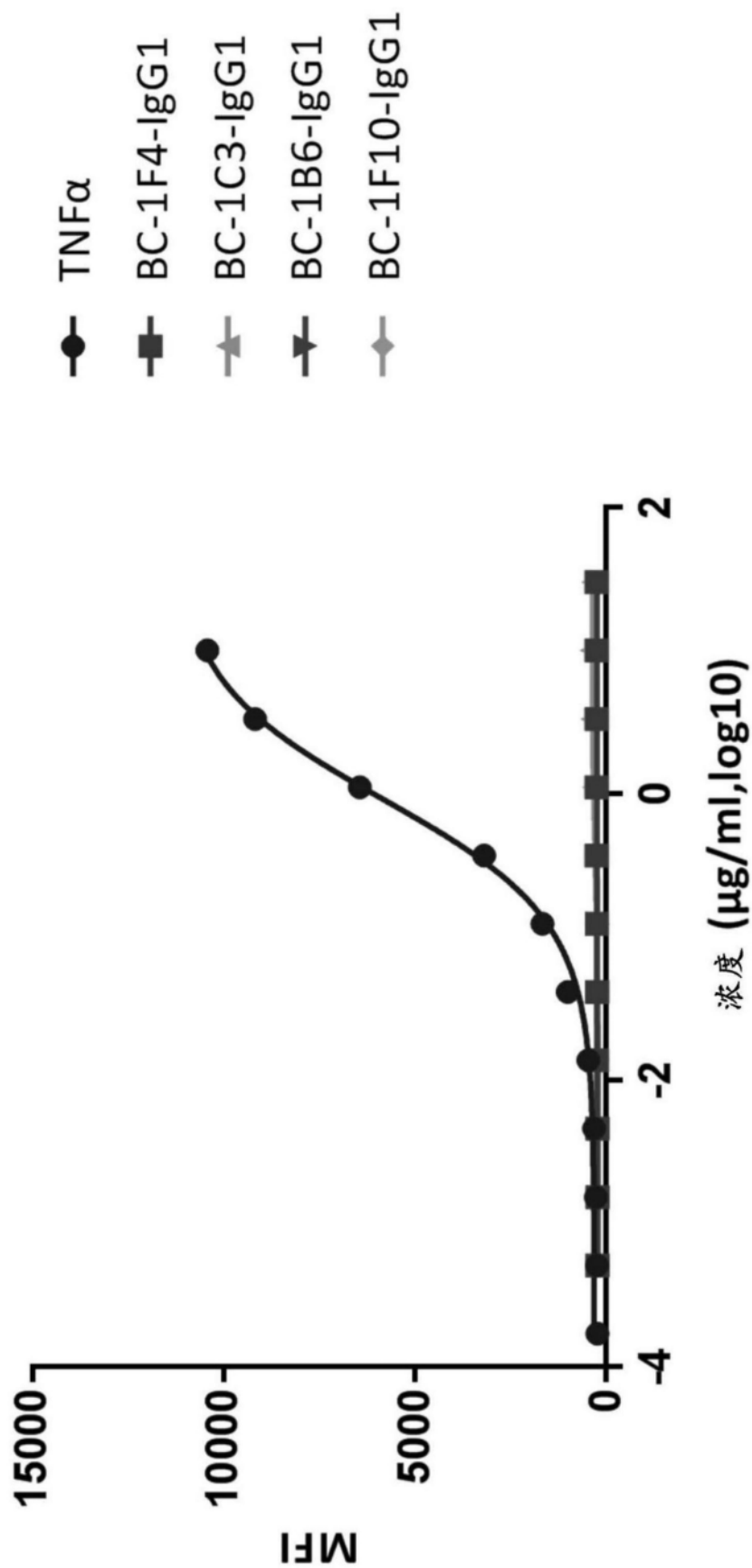


图11

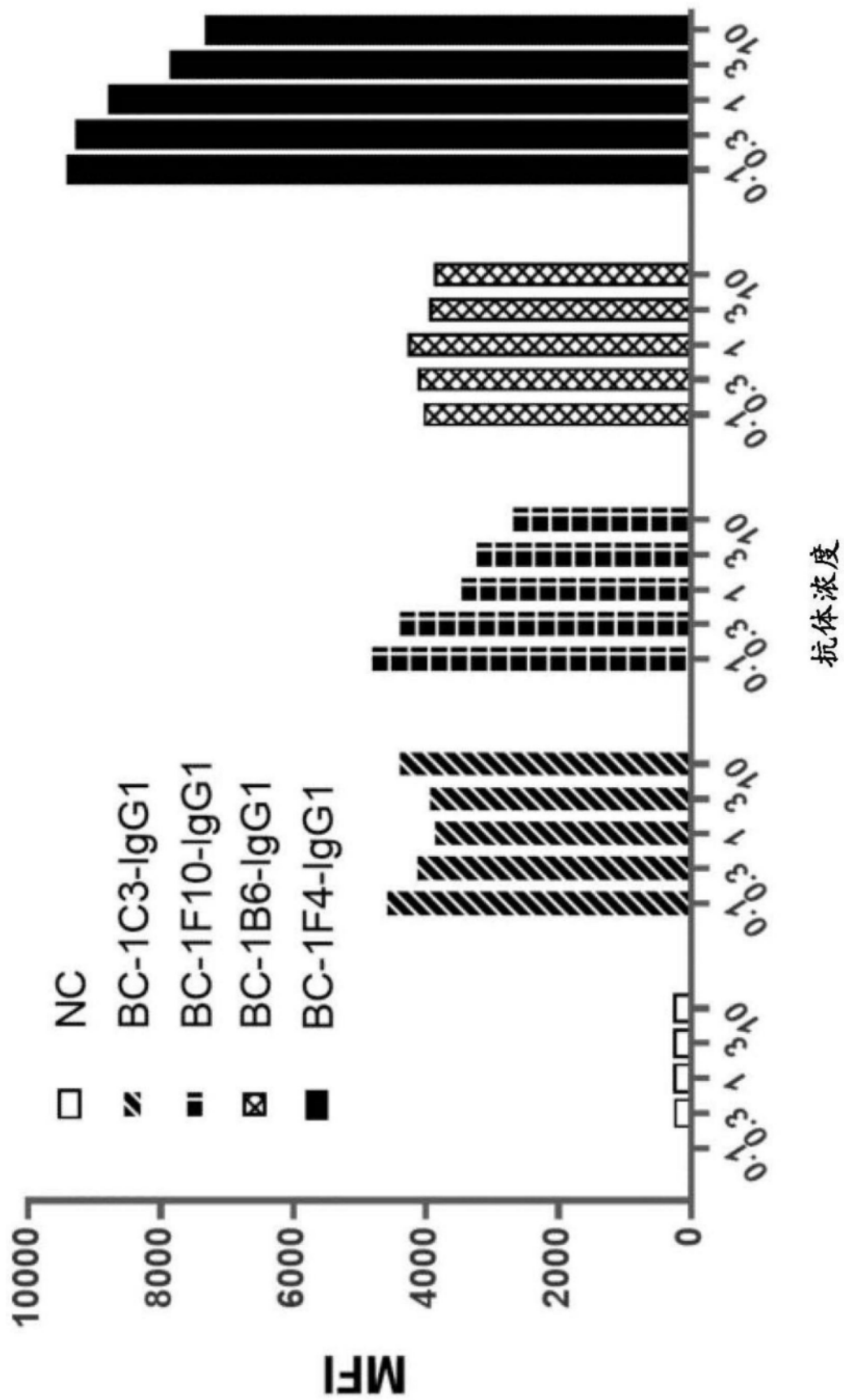


图12

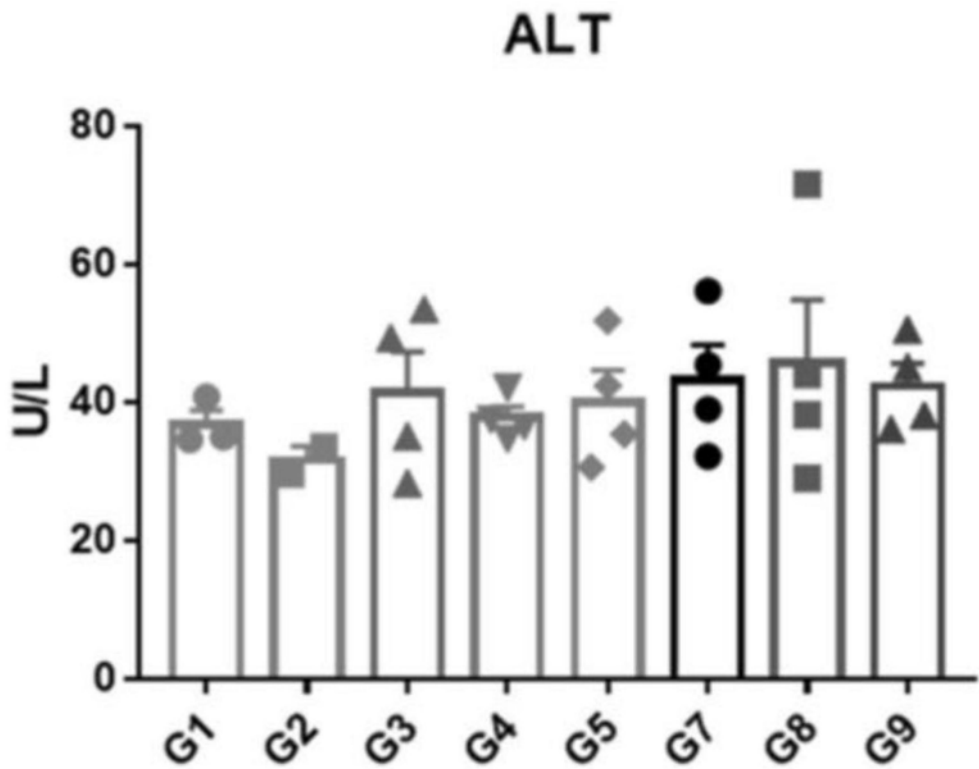


图13A

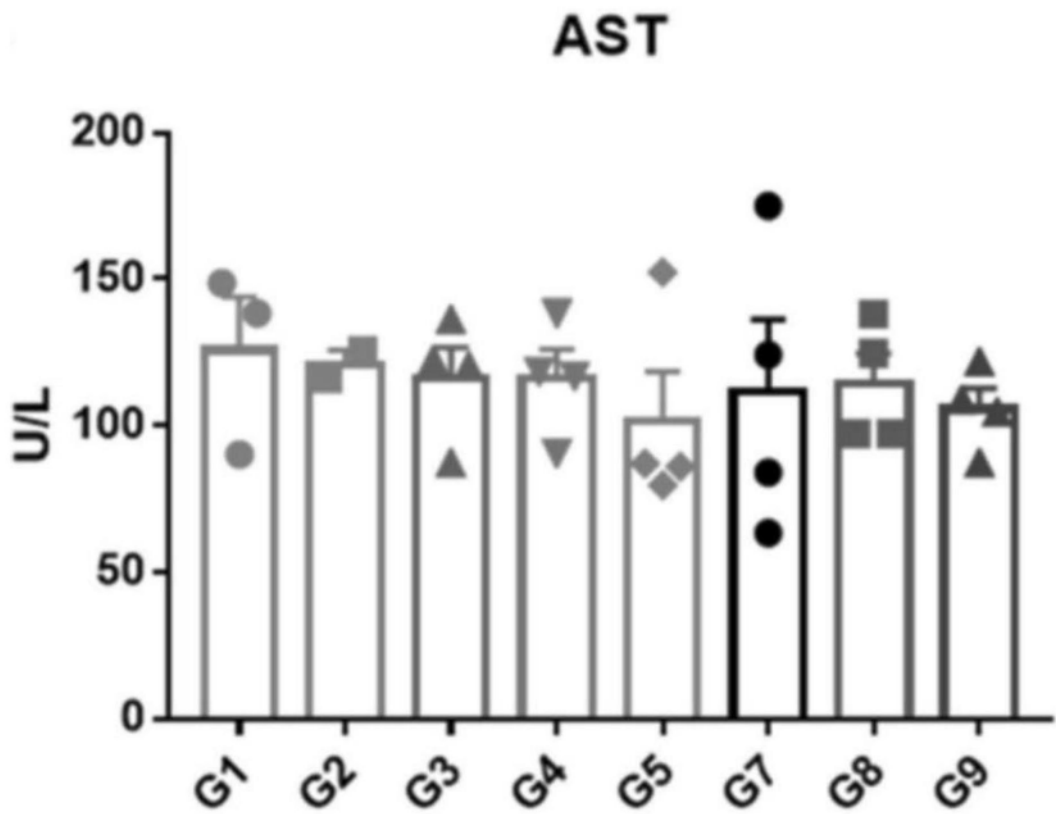


图13B

Kabat CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
BC-1A8	SNSAA WN	6	RTYYRSK WYNDYA LSVKS	7	EDGVGGT KDYFDY	8	QASQDID NYLN	9	DVSNLE I	10	QQYDNLPLT	11
BC-1B6	NFGMH	12	VIWYEGS DKYYADS VKG	13	DSSWGFL LYGMDV	14	RSSRSLE YSDGNT YLN	15	KVSNRD S	16	MQGTHWPPT	17
BC-1C3	IYGMH	18	LISYDGN DKYFADS VKG	19	AVDTAVT FFDY	20	RASQSV SSNLA	21	SASTRA T	22	QQYSNWPFT	23
BC-1F4	SDSSA WN	24	RTYYRSK WYNDYT VSVKS	25	EDGVGGT KDYFDY	26	QASQDIS NYLN	27	DASNLE T	28	QQYDNLPT	29
BC-1F10	GDYWS	30	EINHSGS TNYNPSL KS	31	GHWNVDY YYGMDV	32	RSSQSLL HSNGYN YLD	33	LNSNRA S	34	MQARQTPLT	35

图14

Chothia CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
BC-1A8	GDSVS SNSAA WN	42	YYRSKW Y	43	EDGVGG TKDYFDY	44	QASQDID NYLN	45	DVSNLEI	46	QQYDNLPLT	47
BC-1B6	GFTFSN FGMH	48	WYEGSD	49	DSSWGF LLYGMDV	50	RSSRSLE YSDGNT YLN	51	KVSNRD S	52	MQGTHWPP T	53
BC-1C3	GFTFNI YGMH	54	SYDGND	55	AVDTAW TFFDY	56	RASQSV SSNLA	57	SASTRAT	58	QQYSNWPFF T	59
BC-1F4	GDSVS SDSSA WN	60	YYRSKW Y	61	EDGVGG TKDYFDY	62	QASQDIS NYLN	63	DASNLET	64	QQYDNLPLT	65
BC-1F10	DGSFS GDYWS	66	NHSGS	67	GHWNYD YYYGMD V	68	RSSQSLL HSNGYN YLD	69	LNSNRAS	70	MQARQTPL T	71

图15

抗体可变结构域	氨基酸序列	SEQ ID NO
1A8 人重链可变区	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYA LSVKSRITINPETSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREDEGVGGTKDYFDYWGGGLTVTVSS	36
1A8 人轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIDNLYNWYQQKPGKAPKLLIYDVSNLEIGVPSRFSGSG SGTDFTFTISSLPEDVATYYCQYDNLPLTFGGGTRLEIK	37
1B6 重链可变区	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTSNFGMHWWVRQAPGKGLEWVAWIWYEGSDKYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSSWGFLLYGMDVWGGGTTTVTVSS	38
1B6 人轻链可变区	DVWMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSRSLEYSDGNTYLNWFQQRPQGQSPRRLIYKVSNRDSDGVPD RFSGSGGTAFITLKISGVEAEDGVVYCMQGTWPPTFGGGTKVEIK	39
1C3 人重链可变区	QVQLVESGGGVVHPGKSLRLSCAASGFTFNIGMHWWVRQAPGKGLEWVALISYDGNDKYFADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAVDTAVTFFDYWGQGLTVTVSS	40
1C3 人轻链可变区	EIVMTQSPVTLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPARFSGSG SGTEFTLTISLQSEDLAVYYCQYSNWPFTFGPGTKVDIK	41
1F4 人重链可变区	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSDSSAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYT VSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREDEGVGGTKDYFDYWGGGLTVTVSS	72
1F4 人轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNLYNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSG SGTDFTFTINSLQPEDFATYFCQQYDNLPTTFGGGTRLEIK	73
1F10 人重链可变区	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLICAVYDGSFSGDYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSNSTNYPNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSTVTAADTAVYYCARGHWNYYDYGMVDVWGGGTTTVTVSS	74
1F10 人轻链可变区	DIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHNSGYNLYDWYKQPGQSPQLLIYNSNRASGVDPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQARQTPLTFGGGTKVEIK	75

图16

人 TNFR2 蛋白 (SEQ ID NO: 1)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCCTKSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPEC
 LSCGSRSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVCKPCAPGTFSNTTSSDIDICRPHQICN
 WAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDFALPVGLIVGVTALGLLIIGVWNCVI
 MTQVKKKPLCLQREAKVPHLPADKARGTQGPEQQHLLITAPSSSSSSLESSASALDRRAPTRNQAPQPGVEASGAGEARASTGSSDSSPPGGHG
 TQVNVTCIVNVCSDDHSSQCSSQASSTMGDTDSSPSESPPKDEQVPFSKEECAFRSQLETPETLLGSTEEKPLPLGVDPDAGMKPS

小鼠 TNFR2 蛋白 (SEQ ID NO: 2)

MAPAALWWALVFELQLWATGHTVPAQWLTPYKPEPGYECQISQYDYDRKAQMCCAKCPPGQYVKHFCNKTSDTVCAECEASMYTQVWNQFR
 TCLSCSSSCTTDQVEIRACTKQNNRVCAECEAGRYCALKTHSGSCRQCMRLSKCGPGFGVASSRAPNGNVLCACAPGTFSDDTSSDIDICRPH
 RICSILAIPGNASTDAVCAPEPTLSAIPRTLVSQPEPTRSQPLDQEPGPSQTPSILTSLSGTPIIEQSTKGGISLPIGLIVGVTSLGLMLGLVNCIIL
 VQRKKKPSCLQRDAKVPHPVDEKSDQAVGLEQQHLLTAPSSSSSSLESSASAGDRRAPPGGHPQARVMAEAQGFQEARASSRISDSSHSGSH
 GTHVNVTCIVNVCSDDHSSQCSSQASATVGDPAKPSASPKDEQVPFSQEECPSPCETTETLQSHEKPLPLGVDPDMGMKPSQAGWFDQIA
 VKVA

猴 TNFR2 蛋白 (SEQ ID NO: 3)

GHSASWGAMGVQLVETWASGMAEPRAVAFPTYAPEPGGTCTRLREYYDQTAQMCCSKCPPGQYHAKVFCCTKSDTVCDSCEDSTYTQLWNW
 VPECLSCGSRSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAQLRKCRPGFGVARPGTETSDVCKPCAPGTFSNTTSSDIDICRPH
 QICHVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTAPSTAPGTSFLLPVGPSPPAEGSTGDIVLPVGLIVGVTALGLLIIGV
 NCVIMTQVKKKPLCLQRETKVPHLPADKARGAQGPQQHLLTTPSSSSSSLESSASALDRRAPTRNQAPQPGAEKASGAGEARASTGSSDSS
 PGGHGTQVNVTCIVNVCSDDHSSQCSSQASSTMGDTDASPSGSPKDEQVPFSKEESAFRSQLETPETLLGSTEEKPLPLGVDPDAGMKPS

狗 TNFR2 蛋白 (SEQ ID NO: 4)

(续上页)

MTYVGAGVNEGTHEVPSAVCIQVFIQPRPCPHLSDSVNRATQLPYVPDPELGSSCQSQSEYFDQRTQMCCSMCPGSHARLFCCTKTSNTVCA
RCENSTYTQLWNWVPECLSCGSRGADQVETQACTREQNRICCKSGWYCTLRQGGCRLCAPLRRCRPGFGVAKPGTATSDVWCAPCAPG
TFSNTTSSDTCRPHRICSSVAVPGNASVDVAVCPAPPTVRTAPRPASTRQPGSTQPRPAEPTPGPSTPRTSVLFPVPSPPAEGLSTGDISLPI
GLIVGVTTLGLLLIGLVNVCVITQKKKPFCLQGEAKVPHLPADKAHGGPGPEQQHLLTTAPSSSSSSLESAASSADGRAPPRAPQPPAPGTGKAH
GSGEAQASSSSSEPSCGGHGTQVNVTCIVNVCSGSDHGPQCSSQASHTTGDVDAGPSSPDDQVQVPSQEECPFFQPGGALETLLNPED
KPLPLGVDPDAGMKSS

嵌合 TNFR2 蛋白 (33-259aa 是人序列) (SEQ ID NO: 5)

MAPAALWVALVFELQLWATGHTVPAQWVLTPTVAPEPGSTCRLREYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPEC
LSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICCTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRCRPGFGVAKPGTATSDVWCAPCAPGTSNTTSSDTCRPHQICN
VVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQVPVSTRSQHTQTPPEPSTAPSTSFLLPMGSPPAEGSTGDFALPIGLIVGVTSLGLMLGLVNCII
LVQRKKKPSCLQRDAKVPHVPDEKSDAVGLEQQHLLTTAPSSSSSSLESAASSADGRAPPRAPQPPAPGTGKAH
GTHVNVTCIVNVCSGSDHSSQCSQASATVGDPAKPSASPKDEQVQVPSQEECPSPCETTETLQSHKEKPLPLGVDPDMGMKPSQAGWFDQIA
VKVA

IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO: 76)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

具有SI突变的IgG1重链恒定区 (SEQ ID NO: 77)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHHTCPAPPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(续上页)

具有LALA突变的IgG1重链恒定区 (SEQ ID NO: 78)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTYLPDSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK

人 TNFα 蛋白 (SEQ ID NO: 79)

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCFLSLSFLIVAGATTLCLLHFGVIGPQREEFPRLSLISPLAQAVRSSRTPSDKPVAVHVNIPQ
AEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGPCSTHVLTTHTISIAVSQTKVNLLSAISKPCQRETPEGAEEKPWYEP
IYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIL

图17

101