



(10) 授权公告号 CN 113302205 B

(45) 授权公告日 2024.12.06

(21) 申请号 201980089022.0

(22) 申请日 2019.11.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113302205 A

(43) 申请公布日 2021.08.24

(30) 优先权数据
62/767735 2018.11.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.07.14

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/061828 2019.11.15

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/102739 EN 2020.05.22

(73) 专利权人 综合医院公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D·L·福斯特曼

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李志强 黄希贵

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101084014 A, 2007.12.05
CN 107441491 A, 2017.12.08

审查员 杨添淇

权利要求书9页 说明书90页
序列表35页 附图22页

(54) 发明名称

激动性肿瘤坏死因子受体超家族多肽

(57) 摘要

本公开描述了激动性TNFR2多肽,诸如抗体及其抗原结合片段,还描述了这些多肽在刺激调节性T细胞(Treg细胞)和/或髓源性抑制细胞(MDSC)的增殖,以及在抑制T效应细胞诸如CD8+T效应细胞的功能、减少其增殖和/或直接杀死所述T效应细胞中的用途。本公开内容的多肽,诸如抗体及其抗原结合片段,可以用于例如抑制自身免疫和炎症,以及促进多种组织和器官诸如含有TNFR2+细胞的组织和器官的保护、愈合、保存和/或再生。

1. 一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段在由富含半胱氨酸的结构域(CRD)1(CRD1)、CRD2和/或CRD3内的一个或多个氨基酸限定的表位处特异性结合人肿瘤坏死因子受体2(TNFR2)并且在由CRD4内的一个或多个氨基酸限定的表位处未特异性结合人TNFR2,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下的互补决定区(CDR):

(a) 由GYTFTDYNI(SEQ ID NO:3)或GYTFTDYNL(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列组成的CDR-重链1(CDR-H1);

(b) CDR-H2,其由氨基酸序列INPNYDST(SEQ ID NO:10)组成;

(c) CDR-H3,其由氨基酸序列CARGNSWYFDV(SEQ ID NO:11)组成;

(d) CDR-L1,其由氨基酸序列SSVRY(SEQ ID NO:12)组成;

(e) CDR-L2,其由氨基酸序列LTS组成;和

(f) CDR-L3,其由氨基酸序列CQQWSSNPLT(SEQ ID NO:13)组成。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含在半胱氨酸残基127处包含缺失或取代的人IgG1或IgG2重链恒定1(CH1)结构域。

3. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含彼此间隔小于133 Å的距离的抗原结合位点。

4. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含框架区,所述框架区具有:

TJDSJJJX¹YX²X³LJX⁴LJS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列或有SEQ ID NO:5的10个或更多个残基的氨基酸序列,其中每个J独立地为天然存在的氨基酸;每个X¹独立地为A、V或F;每个X²独立地为M或I;每个X³独立地为E或Q;并且每个X⁴独立地为S或R。

5. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含在半胱氨酸残基127处包含缺失或取代的人IgG1或IgG2 CH1结构域。

6. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述CH1结构域包含C127S突变。

7. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG1 CH1结构域具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。

8. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG1 CH1结构域具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

9. 根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG1 CH1结构域具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

10. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG1 CH1结构域具有SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

11. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG2 CH1结构域具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。

12. 根据权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG2CH1结构域具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

13. 根据权利要求12所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG2CH1结构域具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

14. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG2 CH1结构域具有SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

15. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有IgG3或IgG4同种型。

16. 根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合位点间隔90 Å至132 Å的距离。

17. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有IgG1同种型。

18. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有IgG3同种型。

19. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段在由CRD1内的一个或多个氨基酸限定的表位处特异性结合人TNFR2。

20. 根据权利要求19所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位由SEQ ID NO:1的氨基酸残基56-60(KCSPG)中的一个或多个限定。

21. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段在由CRD2内的一个或多个氨基酸限定的表位处特异性结合人TNFR2。

22. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段在由CRD3内的一个或多个氨基酸限定的表位处特异性结合人TNFR2。

23. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR-H1具有氨基酸序列GYTFTDYNI (SEQ ID NO:3)。

24. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述CDR-H1具有氨基酸序列GYTFTDYNL (SEQ ID NO:4)。

25. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含具有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列的重链可变结构域(V_H)。

26. 根据权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变结构域(V_H)。

27. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含具有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列的重链可变结构域(V_H)。

28. 根据权利要求27所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变结构域(V_H)。

29. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含非天然恒定区。

30. 根据权利要求29所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述非天然恒定区为人恒定区。

31. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段缺少全部或部分的Fc结构域、缺少全部或部分的天然Fc结构域、或缺少Fc结构域。

32. 根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含框架区,所述框架区具有:TJDJSJJX¹YX²X³LJX⁴LJS (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列,其中每个J独立地为天然存在的氨基酸;每个X¹独立地为A、V或F;每个X²独立地为M或I;每个X³独立地为E或Q;并且每个X⁴独立地为S或R。

33. 根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包

含具有选自以下项组成的组的氨基酸序列的框架区：

(a) TVDKSSSTAYMELRSLTS (SEQ ID NO:16) 或相对于所述序列具有至多两个保守氨基酸取代的氨基酸序列；

(b) TADTSSNTAYIQLSSLTS (SEQ ID NO:17) 或相对于所述序列具有至多两个保守氨基酸取代的氨基酸序列；

(c) TADTSTDAYMELSSLRS (SEQ ID NO:18) 或相对于所述序列具有至多两个保守氨基酸取代的氨基酸序列；

(d) TRDTSISTAYMELRSLTS (SEQ ID NO:19) 或相对于所述序列具有至多两个保守氨基酸取代的氨基酸序列；

(e) TFYMELSSLRS (SEQ ID NO:20) 或相对于所述序列具有至多两个保守氨基酸取代的氨基酸序列；

(f) TRDTSISTAYMELNRLTS (SEQ ID NO:21) 或相对于所述序列具有至多两个保守氨基酸取代的氨基酸序列；

(g) TRDTSTNTVYMELTSLRS (SEQ ID NO:22) 或相对于所述序列具有至多两个保守氨基酸取代的氨基酸序列；和

(h) TADTSTDRAVMELSSLRS (SEQ ID NO:23) 或相对于所述序列具有至多两个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

34. 根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述框架区位于所述CDR-H2和所述CDR-H3之间。

35. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段在以下位置内的表位处特异性结合所述TNFR2：

(a) SEQ ID NO:1的氨基酸56-60 (KCSPG)；

(b) SEQ ID NO:1的氨基酸101-107 (CSSDQVET)；

(c) SEQ ID NO:1的氨基酸115-142
(NRICTCRPGWYCALSQEGCRLCAPLRK)；

(d) SEQ ID NO:1的氨基酸26-45
(QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC)；

(e) SEQ ID NO:1的氨基酸90-109
(REQNRICTCRPGWYCALSQ)；

(f) SEQ ID NO:1的氨基酸98-117
(CRPGWYCALSQEGCRLCAP)；

(g) SEQ ID NO:1的氨基酸106-125
(LSQEGCRLCAPLRKCRPGF)；或

(h) SEQ ID NO:1的氨基酸108-127
(KQEGCRLCAPLRKCRPGFV)。

36. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段

(a) 活化TNFR2信号传导；

(b) 以不大于10nM的 K_D 结合TNFR2；

(c) 结合TNFR2以形成具有至少 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 的 k_{on} 的抗体-抗原复合物；

(d) 结合TNFR2以形成抗体-抗原复合物,并且其中所述复合物以不大于 10^{-3}s^{-1} 的 k_{off} 解离;

(e) 促进T调节(Treg)细胞的增殖;

(f) 直接杀死CD8+T细胞或促进其死亡;

(g) 促进一种或多种编码选自以下项组成的组的蛋白质的mRNA分子的水平的增加: cIAP2、TRAF2、Etk、VEGFR2、PI3K、Akt、参与血管生成途径的蛋白质、IKK复合物、RIP、NIK、MAP3K、参与NF κ B途径的蛋白质、NIK、JNK、AP-1、MEK、MKK3、NEMO、IL2R、Foxp3、IL2、TNF、淋巴毒素、淋巴毒素 α 和淋巴毒素 β ;

(h) 促进一种或多种选自以下项组成的组的蛋白质的水平的增加: cIAP2、TRAF2、Etk、VEGFR2、PI3K、Akt、参与血管生成途径的蛋白质、IKK复合物、RIP、NIK、MAP3K、参与NF κ B途径的蛋白质、NIK、JNK、AP-1、MEK、MKK3、NEMO、IL2R、Foxp3、IL2、TNF、淋巴毒素、淋巴毒素 α 和淋巴毒素 β ;或

(i) 在施用于人受试者时促进衣康酸酯水平的增加。

37. 根据权利要求36所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

(a) 所述抗体或其抗原结合片段以不大于1nM的 K_{D} 结合TNFR2;

(b) 所述抗体或其抗原结合片段结合TNFR2以形成具有至少 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 的 k_{on} 的抗体-抗原复合物;

(c) 所述抗体或其抗原结合片段以不大于 10^{-4}s^{-1} 的 k_{off} 从TNFR2解离;或

(d) 所述Treg细胞表达CD25^{Hi}和CD45RA^{Low};或

(e) 所述MEK是MEK1或MEK7。

38. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段为单链多肽。

39. 一种编码根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

40. 一种编码根据权利要求38所述的单链多肽的多核苷酸。

41. 一种包含根据权利要求39所述的多核苷酸的载体。

42. 根据权利要求41所述的载体,其中所述载体为表达载体。

43. 根据权利要求42所述的载体,其中所述表达载体为真核表达载体。

44. 根据权利要求41所述的载体,其中所述载体为病毒载体。

45. 根据权利要求44所述的载体,其中所述病毒载体选自以下项组成的组:腺病毒(Ad)、逆转录病毒、痘病毒、腺相关病毒、杆状病毒、单纯性疱疹病毒和牛痘病毒。

46. 根据权利要求45所述的载体,其中所述腺病毒为血清型2、5、11、12、24、26、34、35、40、48、49、50、52或Pan9腺病毒,或人、黑猩猩或恒河猴腺病毒。

47. 根据权利要求45所述的载体,其中所述逆转录病毒为 γ 逆转录病毒或慢病毒。

48. 根据权利要求45所述的载体,其中所述牛痘病毒为修饰的牛痘安卡拉病毒(MVA)。

49. 一种包含根据权利要求41所述的载体的分离的宿主细胞。

50. 根据权利要求49所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞为原核细胞。

51. 根据权利要求49所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞为真核细胞。

52. 根据权利要求51所述的宿主细胞,其中所述真核细胞为哺乳动物细胞。

53. 根据权利要求52所述的宿主细胞,其中所述哺乳动物细胞为CHO细胞或HEK细胞。

54. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述药物组合物中至少50%的所述抗体或其抗原结合片段以单个二硫键结合的同等型存在。

55. 根据权利要求54所述的药物组合物,其中所述药物组合物中的所述抗体或其抗原结合片段的75%至99.9%以单个二硫键结合的同等型存在。

56. 根据权利要求54所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段在非还原条件下进行凝胶电泳分析时产生一条可检测的条带。

57. 根据权利要求54所述的药物组合物,其中所述单个二硫键结合的同等型为IgG2-B。

58. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39或40所述的多核苷酸、根据权利要求41-48中任一项所述的载体、或根据权利要求49-53中任一项所述的宿主细胞、以及药学上可接受的载剂或赋形剂。

59. 根据权利要求54所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段在所述药物组合物中以0.001mg/ml至100mg/ml的量存在。

60. 根据权利要求54所述的药物组合物,其中所述药物组合物进一步包含另外的治疗剂。

61. 根据权利要求60所述的药物组合物,其中所述另外的治疗剂为免疫治疗剂。

62. 根据权利要求61所述的药物组合物,其中所述免疫治疗剂选自由以下项组成的组: 抗CTLA-4激动剂、抗PD-1激动剂、抗PD-L1激动剂、抗PD-L2激动剂、抗CD27激动剂、抗CD30激动剂、抗CD40激动剂、抗4-1BB激动剂、抗GITR激动剂、抗OX40剂激动剂、抗TRAILR1激动剂、抗TRAILR2激动剂、抗TWEAK激动剂、抗TWEAKR激动剂、抗细胞表面淋巴细胞蛋白激动剂、抗BRAF激动剂、抗MEK激动剂、抗CD33激动剂、抗CD20激动剂、抗HLA-DR激动剂、抗HLA I类激动剂、抗CD52激动剂、抗A33激动剂、抗GD3激动剂、抗PSMA激动剂、抗Ceacan 1激动剂、抗Galedin 9激动剂、抗HVEM激动剂、抗VISTA激动剂、抗B7 H4激动剂、抗HHLA2激动剂、抗CD155激动剂、抗CD80激动剂、抗BTLA激动剂、抗CD160激动剂、抗CD28激动剂、抗CD226激动剂、抗CEACAM1激动剂、抗TIM3激动剂、抗TIGIT激动剂、抗CD96激动剂、抗CD70激动剂、抗CD27激动剂、抗LIGHT激动剂、抗CD137激动剂、抗DR4激动剂、抗CR5激动剂、抗TNFRS激动剂、抗TNFR1激动剂、抗FAS激动剂、抗CD95激动剂、抗TRAIL激动剂、抗DR6激动剂、抗EDAR激动剂、抗NGFR激动剂、抗OPG激动剂、抗RANKL激动剂、抗LT β 受体激动剂、抗BCMA激动剂、抗TACI激动剂、抗BAFFR激动剂、抗EDAR2激动剂、抗TROY激动剂和抗REL T激动剂,任选地其中所述免疫治疗剂为激动性抗PD-1抗体或激动性抗PD-L1抗体。

63. 根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述免疫治疗剂选自由以下项组成的组: 激动性抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-1抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-L2抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD27抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD30抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD40抗体或其抗原结合片段、激动性抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、激动性抗GITR抗体或其抗原结合片段、激动性抗OX40剂抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAILR1抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAILR2抗体或其抗原结合片段、激动性抗TWEAK抗体或其抗原结合片段、激动性抗TWEAKR抗体或其抗原结合片段、激动性抗细胞表面淋巴细胞蛋白抗体或其抗原结合片段、激动性

抗BRAF抗体或其抗原结合片段、激动性抗MEK抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD33抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD20抗体或其抗原结合片段、激动性抗HLA-DR抗体或其抗原结合片段、激动性抗HLA I类抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD52抗体或其抗原结合片段、激动性抗A33抗体或其抗原结合片段、激动性抗GD3抗体或其抗原结合片段、激动性抗PSMA抗体或其抗原结合片段、激动性抗Ceacan 1抗体或其抗原结合片段、激动性抗Galedin 9抗体或其抗原结合片段、激动性抗HVEM抗体或其抗原结合片段、激动性抗VISTA抗体或其抗原结合片段、激动性抗B7 H4抗体或其抗原结合片段、激动性抗HHLA2抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD155抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD80抗体或其抗原结合片段、激动性抗BTLA抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD160抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD28抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD226抗体或其抗原结合片段、激动性抗CEACAM1抗体或其抗原结合片段、激动性抗TIM3抗体或其抗原结合片段、激动性抗TIGIT抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD96抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD70抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD27抗体或其抗原结合片段、激动性抗LIGHT抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD137抗体或其抗原结合片段、激动性抗DR4抗体或其抗原结合片段、激动性抗CR5抗体或其抗原结合片段、激动性抗TNFRS抗体或其抗原结合片段、激动性抗TNFR1抗体或其抗原结合片段、激动性抗FAS抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD95抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAIL抗体或其抗原结合片段、激动性抗DR6抗体或其抗原结合片段、激动性抗EDAR抗体或其抗原结合片段、激动性抗NGFR抗体或其抗原结合片段、激动性抗OPG抗体或其抗原结合片段、激动性抗RANKL抗体或其抗原结合片段、激动性抗LT β 受体抗体或其抗原结合片段、激动性抗BCMA抗体或其抗原结合片段、激动性抗TACI抗体或其抗原结合片段、激动性抗BAFFR抗体或其抗原结合片段、激动性抗EDAR2抗体或其抗原结合片段、激动性抗TROY抗体或其抗原结合片段、和激动性抗RELT抗体或其抗原结合片段。

64. 根据权利要求62所述的药物组合物,其中所述免疫治疗剂为抗CTLA-4激动剂或抗PD-1激动剂。

65. 根据权利要求64所述的药物组合物,其中所述免疫治疗剂为激动性抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段、或激动性抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

66. 一种产生根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在宿主细胞中表达编码所述抗体或其抗原结合片段的多核苷酸,以及从宿主细胞培养基中回收所述抗体或其抗原结合片段。

67. 根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39或40所述的多核苷酸、根据权利要求41-48中任一项所述的载体、或根据权利要求49-53中任一项所述的宿主细胞在制备用于促进人受试者的Treg细胞的增殖的药物中的用途,所述人受试者患有选自以下的疾病或病症: I型糖尿病、银屑病、重症肌无力、炎症性肠病、多发性硬化、移植物抗宿主病、同种异体移植物排斥、类风湿性关节炎、自身免疫性淋巴组织增生综合征和过敏。

68. 根据权利要求67所述的用途,其中所述过敏选自由以下项组成的组: 食物过敏、季节性过敏、宠物过敏、荨麻疹、花粉热、过敏性结膜炎、毒葛过敏、橡木过敏、霉菌过敏、药物过敏、粉尘过敏、化妆品过敏和化学过敏。

69. 根据权利要求67所述的用途,其中所述同种异体移植物排斥选自由以下项组成的

组:皮肤移植物排斥、骨移植物排斥、血管组织移植物排斥、韧带移植物排斥和器官移植物排斥。

70. 根据权利要求69所述的用途,其中所述韧带移植物排斥选自以下项组成的组:环甲韧带移植物排斥、牙周韧带移植物排斥、晶状体悬韧带移植物排斥、掌侧桡腕韧带移植物排斥、背侧桡腕韧带移植物排斥、尺侧副韧带移植物排斥、桡侧副韧带移植物排斥、乳房悬韧带移植物排斥、骶髂前韧带移植物排斥、骶髂后韧带移植物排斥、骶结节韧带移植物排斥、骶棘韧带移植物排斥、耻骨弓状韧带移植物排斥、耻骨上韧带移植物排斥、前十字韧带移植物排斥、外侧副韧带移植物排斥、后十字韧带移植物排斥、内侧副韧带移植物排斥、颅十字韧带移植物排斥、尾十字韧带移植物排斥和膝韧带移植物排斥。

71. 根据权利要求69所述的用途,其中所述器官移植物排斥选自以下项组成的组:心脏移植物排斥、肺移植物排斥、肾移植物排斥、肝移植物排斥、胰腺移植物排斥、肠移植物排斥和胸腺移植物排斥。

72. 根据权利要求67所述的用途,其中所述移植物抗宿主病源自骨髓移植或选自以下项组成的组的一种或多种血细胞:造血干细胞、常见髓系祖细胞、常见淋巴样祖细胞、巨核细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、T细胞、B细胞、天然杀伤细胞和树突状细胞。

73. 包含根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和免疫治疗剂的组合在制备用于促进人受试者的Treg细胞的增殖的药物中的用途,所述人受试者患有选自以下的疾病或病症:I型糖尿病、银屑病、重症肌无力、炎症性肠病、多发性硬化、移植物抗宿主病、同种异体移植物排斥、类风湿性关节炎、自身免疫性淋巴组织增生综合征和过敏。

74. 根据权利要求73所述的用途,其中所述免疫治疗剂选自以下项组成的组:抗CTLA-4激动剂、抗PD-1激动剂、抗PD-L1激动剂、抗PD-L2激动剂、抗CD27激动剂、抗CD30激动剂、抗CD40激动剂、抗4-1BB激动剂、抗GITR激动剂、抗OX40激动剂、抗TRAILR1激动剂、抗TRAILR2激动剂、抗TWEAK激动剂、抗TWEAKR激动剂、抗细胞表面淋巴细胞蛋白激动剂、抗BRAF激动剂、抗MEK激动剂、抗CD33激动剂、抗CD20激动剂、抗HLA-DR激动剂、抗HLA I类激动剂、抗CD52激动剂、抗A33激动剂、抗GD3激动剂、抗PSMA激动剂、抗Ceacan 1激动剂、抗Galedin 9激动剂、抗HVEM激动剂、抗VISTA激动剂、抗B7 H4激动剂、抗HHLA2激动剂、抗CD155激动剂、抗CD80激动剂、抗BTLA激动剂、抗CD160激动剂、抗CD28激动剂、抗CD226激动剂、抗CEACAM1激动剂、抗TIM3激动剂、抗TIGIT激动剂、抗CD96激动剂、抗CD70激动剂、抗CD27激动剂、抗LIGHT激动剂、抗CD137激动剂、抗DR4激动剂、抗CR5激动剂、抗TNFRS激动剂、抗TNFR1激动剂、抗FAS激动剂、抗CD95激动剂、抗TRAIL激动剂、抗DR6激动剂、抗EDAR激动剂、抗NGFR激动剂、抗OPG激动剂、抗RANKL激动剂、抗LT β 受体激动剂、抗BCMA激动剂、抗TACI激动剂、抗BAFFR激动剂、抗EDAR2激动剂、抗TROY激动剂和抗RELT激动剂,任选地其中所述免疫治疗剂为激动性抗PD-1抗体或激动性抗PD-L1抗体。

75. 根据权利要求74所述的用途,其中所述免疫治疗剂选自以下项组成的组:激动性抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-1抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-L2抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD27抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD30抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD40抗体或其抗原结合片段、激动性抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、激动性抗GITR抗体或其抗原结合片段、激动性抗OX40

剂抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAILR1抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAILR2抗体或其抗原结合片段、激动性抗TWEAK抗体或其抗原结合片段、激动性抗TWEAKR抗体或其抗原结合片段、激动性抗细胞表面淋巴细胞蛋白抗体或其抗原结合片段、激动性抗BRAF抗体或其抗原结合片段、激动性抗MEK抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD33抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD20抗体或其抗原结合片段、激动性抗HLA-DR抗体或其抗原结合片段、激动性抗HLA I类抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD52抗体或其抗原结合片段、激动性抗A33抗体或其抗原结合片段、激动性抗GD3抗体或其抗原结合片段、激动性抗PSMA抗体或其抗原结合片段、激动性抗Ceacan 1抗体或其抗原结合片段、激动性抗Galedin 9抗体或其抗原结合片段、激动性抗HVEM抗体或其抗原结合片段、激动性抗VISTA抗体或其抗原结合片段、激动性抗B7 H4抗体或其抗原结合片段、激动性抗HHLA2抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD155抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD80抗体或其抗原结合片段、激动性抗BTLA抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD160抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD28抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD226抗体或其抗原结合片段、激动性抗CEACAM1抗体或其抗原结合片段、激动性抗TIM3抗体或其抗原结合片段、激动性抗TIGIT抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD96抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD70抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD27抗体或其抗原结合片段、激动性抗LIGHT抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD137抗体或其抗原结合片段、激动性抗DR4抗体或其抗原结合片段、激动性抗CR5抗体或其抗原结合片段、激动性抗TNFRS抗体或其抗原结合片段、激动性抗TNFR1抗体或其抗原结合片段、激动性抗FAS抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD95抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAIL抗体或其抗原结合片段、激动性抗DR6抗体或其抗原结合片段、激动性抗EDAR抗体或其抗原结合片段、激动性抗NGFR抗体或其抗原结合片段、激动性抗OPG抗体或其抗原结合片段、激动性抗RANKL抗体或其抗原结合片段、激动性抗LT β 受体抗体或其抗原结合片段、激动性抗BCMA抗体或其抗原结合片段、激动性抗TACI抗体或其抗原结合片段、激动性抗BAFFR抗体或其抗原结合片段、激动性抗EDAR2抗体或其抗原结合片段、激动性抗TROY抗体或其抗原结合片段、和激动性抗RELT抗体或其抗原结合片段。

76. 根据权利要求74所述的用途,其中所述免疫治疗剂为抗CTLA-4激动剂或抗PD-1激动剂。

77. 根据权利要求76所述的用途,其中所述免疫治疗剂为激动性抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段、或激动性抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

78. 根据权利要求73所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段和所述免疫治疗剂被配制为单独的组合物。

79. 包含根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和另外的药剂的组合在制备用于促进人受试者的Treg细胞的增殖的药物中的用途,其中所述另外的药剂选自自由TNF α 、激动性TNF α 突变蛋白和卡介苗 (BCG) 组成的组,所述人受试者患有选自以下的疾病或病症: I型糖尿病、银屑病、重症肌无力、炎症性肠病、多发性硬化、移植物抗宿主病、同种异体移植物排斥、类风湿性关节炎、自身免疫性淋巴组织增生综合征和过敏。

80. 根据权利要求79所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段和所述另外的药剂被配制为单独的组合物。

81. 根据权利要求67所述的用途,其中所述药物配制为提供0.001mg/kg至100mg/kg的

量的所述抗体或其抗原结合片段。

82. 一种试剂盒,其包括根据权利要求58所述的药物组合物。

83. 根据权利要求82所述的试剂盒,其中所述试剂盒的所述药物组合物包括所述抗体或其抗原结合片段。

84. 根据权利要求82所述的试剂盒,其中所述试剂盒的所述药物组合物包括所述多核苷酸。

85. 根据权利要求82所述的试剂盒,其中所述试剂盒的所述药物组合物包括所述载体。

86. 根据权利要求85所述的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括关于将所述载体转染到宿主细胞中的说明书。

87. 根据权利要求86所述的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括关于在所述宿主细胞中从所述载体表达所述抗体或其抗原结合片段的说明书。

88. 根据权利要求82所述的试剂盒,其中所述试剂盒的所述药物组合物包括所述宿主细胞。

89. 根据权利要求88所述的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括可用于在所述宿主细胞中表达抗体或其抗原结合片段的试剂。

90. 一种试剂盒,所述试剂盒包括根据权利要求54所述的药物组合物。

91. 根据权利要求82所述的试剂盒,其进一步包括关于向人受试者施用所述药物组合物的说明书。

92. 根据权利要求82所述的试剂盒,其进一步包括关于制备或使用所述药物组合物的说明书。

激动性肿瘤坏死因子受体超家族多肽

[0001] 序列表

[0002] 本申请含有序列表,所述序列表已经以ASCII格式通过电子方式提交并且据此以全文引用的方式并入本文。所述ASCII副本创建于2019年11月15日,命名为00786-582W02_SEQUENCE_LISTING_11.15.19_ST25,大小为28,722字节。

背景技术

[0003] 维持对细胞介导免疫应答和体液免疫应答的控制是健康免疫系统活动的一个重要方面。T细胞和B细胞驱动免疫反应的异常调节与多种人类疾病相关,因为针对各种自身和外来抗原免疫应答的不当增加在诸如自身免疫性疾病、哮喘、过敏反应、移植物抗宿主病、移植物排斥等免疫性疾病的病理中起着因果作用。T淋巴细胞和B淋巴细胞可对自身抗原和衍生自非威胁性来源的那些抗原(诸如过敏原或同种异体移植物)表现出反应性,从而介导这些疾病。调节性T细胞(Treg细胞)的进化是为了抑制与“自身”主要组织相容性复合体(MHC)蛋白和其他良性抗原发生交叉反应的免疫细胞的活性。Treg细胞是一种异质T细胞,可根据其独特的表面蛋白表达予以区分。最广为人知的Treg细胞群包括CD4+、CD25+、FoxP3+Treg细胞和CD17+Treg细胞。所述细胞通过精确机制介导自身反应性T细胞发生抑制,该精确机制是目前正在研究的课题,尽管已有研究表明,某些类别的Treg细胞可抑制靶T细胞中增殖诱导细胞因子IL-2的生成,并可凭借CD25(IL-2受体的一个亚结构域)对IL-2的亲合力将IL-2从自身反应性细胞中分离出去(Josefowicz等人,Ann.Rev.Immun.,30:531-564,2012)。此外,还有研究已表明,CD4+、CD25+、FoxP3+Treg细胞也存在于富含B细胞的部位,并且能够直接抑制免疫球蛋白的生成,而与其减弱 T_H2 细胞活性的能力无关(Lim等人,J.Immunol.,175:4180-4183,2005)。

[0004] 目前亟需能够增强Treg细胞存活性和增殖的改进疗法,用于治疗此类如自身免疫性疾病、移植物抗宿主病、同种异体移植物排斥、过敏反应、哮喘和炎症等疾病。

发明内容

[0005] 本文所述为激动性肿瘤坏死因子受体超家族多肽,例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体。例如,提供激动性肿瘤坏死因子受体2(TNFR2)结合多肽,例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体。人TNFR2含有以下四个富含半胱氨酸结构域(CRD):CRD1(SEQ IDNO:1的氨基酸残基48-76)、CRD2(SEQ ID NO:1的氨基酸残基78-120)、CRD3(SEQ ID NO:1的氨基酸残基121-162)和CRD4(SEQ IDNO:1的氨基酸残基162-202)。本文所述的激动性TNFR2多肽包括在TNFR2的CRD1、CRD2和/或CRD3内结合一个或多个表位的多肽,例如仅在CRD1和/或CRD2内结合TNFR2的一个或多个表位的多肽,而不在CRD4内结合TNFR2。

[0006] 本文所述的激动性TNFR2多肽包括人IgG1同种型抗体、人IgG2同种型抗体、人IgG3同种型抗体和人IgG4同种型抗体,以及它们的抗原结合片段,其在上文详述的表位中的一个或多个表位处特异性结合TNFR2。在一些实施例中,本公开内容的TNFR2多肽含有突变人

IgG1或IgG2重链恒定1(CH1)结构域,该结构域在CH1结构域氨基酸序列的127位缺少半胱氨酸残基,诸如含有具有C127S(根据Kabat编号)突变的人IgG1或IgG2 CH1结构域的TNFR2多肽(例如抗体或其抗原结合片段)。本公开内容部分基于一个惊人的发现,当这些分子以IgG2-B同种型的形式相对于其他抗体同种型时,抗体及其抗原结合片段会表现出明显优越的TNFR2激动剂特性。

[0007] 本文所述的激动性TNFR2多肽还包括在至少两个位点结合TNFR2的多肽(例如具有两个或更多个抗原结合位点的多肽,其中TNFR2为“抗原”)。这些结合位点可在空间上彼此间隔小于约133 Å的距离。有利的是,抗原结合位点间隔小于133 Å的激动性TNFR2多肽比在上述表位中的一个或多个表位处特异性结合TNFR2但是含有彼此间隔大于约133 Å的TNFR2结合位点的多肽以更大的潜能激活TNFR2信号转导。例如,本公开内容的激动性TNFR2多肽包括IgG1抗体及其抗原结合片段,其含有彼此间隔约117 Å的TNFR2结合位点;以及IgG3抗体及其抗原结合片段,其含有彼此间隔约125 Å的TNFR2结合位点。

[0008] 同样具有特点的是采用单个二硫键结合的同等型的激动性TNFR2多肽和含有所述多肽的药物组合物。例如,本公开内容的药物组合物包括含有激动剂TNFR2结合多肽的药物组合物,其中药物组合物中例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或以上的多肽均以单个二硫键结合的同等型存在。相对于采用其他人IgG2同等型(诸如IgG2-A、IgG2-A/B₁和IgG2-A/B₂)的TNFR2结合多肽,采用人IgG2-B同等型的激动性TNFR2结合多肽表现出了基本上优越的TNFR2激动剂效应。因此,采用单个二硫键结合的同等型的TNFR2多肽可制备作为药物组合物,并以本文所述的治疗方法施用以促进稳健的TNFR2激动效应。

[0009] 本公开内容的激动性TNFR2多肽表现出一种或多种有益的生物学特性,诸如促进调节性T细胞(Treg细胞)和/或髓源性抑制细胞(MDSC)增殖和稳定化的能力。另外地或替代性地,激动性TNFR2多肽可经施用以促进T效应细胞(例如细胞毒性CD8+T细胞)的交互收缩和/或直接杀伤T效应细胞。这可以例如通过间接扩增Treg细胞的增殖和活性或通过直接杀伤T效应细胞而发生。因此,将TNFR2多肽指定作为激动剂是指它们能够促进Treg细胞和/或MDSC的增殖和活性,并且为清楚起见,确实指示非期望的T效应细胞反应的激活。本文所述的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可用于治疗多种病状,包括自身免疫性疾病、炎症性疾病等,以及促进表达TNFR2的组织(诸如神经元和脑相关组织)的增殖、愈合、保护和/或再生,致使本公开内容的多肽可用于例如治疗神经性疾病,诸如帕金森氏病、多发性硬化、阿尔茨海默病以及其他神经退行性疾病。

[0010] 在第一方面中,本发明的特征是多肽(诸如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体),所述多肽在由富含半胱氨酸的结构域(CRD)1(CRD1)、CRD2和/或CRD3内的一个或多个氨基酸限定的表位处特异性结合人TNFR2,并且在由CRD4内的一个或多个氨基酸限定的表位处未特异性结合人TNFR2。在一些实施例中,多肽:

[0011] (a) 含有在半胱氨酸残基127处具有缺失或取代的人IgG1或IgG2CH1结构域;

[0012] (b) 含有彼此间隔小于约133 Å的距离的抗原结合位点;

[0013] (c) 含有具有以下项的氨基酸序列的互补决定区-重链1(CDR-H1):

[0014] (i) GZ¹TFZ³Z²YZ³Z⁴ (SEQ ID NO:2);

[0015] (ii)GYTFTDYNI (SEQ ID NO:3) 或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;或

[0016] (iii)GYTFTDYNL (SEQ ID NO:4) 或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0017] 其中每个Z¹独立地为天然存在的氨基酸,该天然存在的氨基酸包含含有芳族取代基的侧链;

[0018] 每个Z²独立地为天然存在的氨基酸,该天然存在的氨基酸包含在生理pH下的阴离子侧链;

[0019] 每个Z³独立地为天然存在的氨基酸,该天然存在的氨基酸包含在生理pH下的极性、不带电荷的侧链;并且

[0020] 每个Z⁴独立地为亮氨酸或异亮氨酸;和/或

[0021] (d) 含有框架区,该框架区具有:TJDJSJJX¹YX²X³LJX⁴LJS (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列或有SEQ ID NO:5的10个或更多个残基的氨基酸序列,其中每个J独立地为天然存在的氨基酸;每个X¹独立地为A、V或F;每个X²独立地为M或I;每个X³独立地为E或Q;并且每个X⁴独立地为S或R。

[0022] 在一些实施例中,多肽(诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)含有人IgG1或IgG2 CH1结构域,所述结构域在IgG1或IgG2CH1结构域的氨基酸序列的127位处缺少半胱氨酸残基(根据Kabat编号方案)。例如,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可含有人IgG1或IgG2 CH1结构域,该结构域在CH1结构域的氨基酸序列的127位处具有除半胱氨酸以外的氨基酸,例如丝氨酸残基。

[0023] 在一些实施例中,IgG1 CH1结构域具有与以下项的氨基酸序列至少85%相同(例如,至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或95%相同或更高)的氨基酸序列:

[0024] ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV (SEQ ID NO:6),例如前提条件是IgG1 CH1结构域在IgG1 CH1结构域的氨基酸序列的127位处含有丝氨酸残基(根据Kabat编号,如本文所述)。例如,IgG1 CH1结构域可具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少90%相同(例如,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列,例如前提条件是IgG1CH1结构域在IgG1 CH1结构域的氨基酸序列的127位处含有丝氨酸残基。在一些实施例中,IgG1 CH1结构域具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,例如前提条件是IgG1 CH1结构域在IgG1CH1结构域的氨基酸序列的127位处含有丝氨酸残基。在一些实施例中,IgG1 CH1结构域具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一些实施例中,IgG1CH1结构域仅通过C127S取代(根据Kabat编号,如本文所述)就有不同于SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在这些实施例中,IgG1 CH1结构域具有以下项的氨基酸序列:

[0025] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV (SEQ ID NO:7)。

[0026] 在一些实施例中,IgG2 CH1结构域具有与以下项的氨基酸序列至少85%相同(例如,至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列:

[0027] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO:8), 例如前提条件是IgG2 CH1结构域在IgG2 CH1结构域的氨基酸序列的127位处含有丝氨酸残基(根据Kabat编号,如本文所述)。例如,IgG2 CH1结构域可具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少90%相同(例如,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列,例如前提条件是IgG2CH1结构域在IgG2 CH1结构域的氨基酸序列的127位处含有丝氨酸残基。在一些实施例中,IgG2 CH1结构域具有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,例如前提条件是IgG2 CH1结构域在IgG2CH1结构域的氨基酸序列的127位处含有丝氨酸残基。在一些实施例中,IgG2 CH1结构域具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施例中,IgG2CH1结构域仅通过C127S取代(根据Kabat编号,如本文所述)就有不同于SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在这些实施例中,IgG2 CH1结构域具有以下项的氨基酸序列:

[0028] ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO:9)。

[0029] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)具有IgG3或IgG4同种型。

[0030] 多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可含有抗原结合位点(例如,两个或更多个抗原结合位点,诸如两个至十个、两个至九个、两个至八个、两个至七个、两个至六个、两个至五个、两个或三个抗原结合位点),所述抗原结合位点彼此间隔开小于约133 Å 的距离(例如,约90 Å 至约132 Å 的距离,诸如约90 Å、91 Å、92 Å、93 Å、94 Å、95 Å、96 Å、97 Å、98 Å、99 Å、100 Å、101 Å、102 Å、103 Å、104 Å、105 Å、106 Å、107 Å、108 Å、109 Å、110 Å、111 Å、112 Å、113 Å、114 Å、115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å、127 Å、128 Å、129 Å、130 Å、131 Å 或 132 Å 的距离)。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约95 Å 至约130 Å 的距离,诸如约95 Å、96 Å、97 Å、98 Å、99 Å、100 Å、101 Å、102 Å、103 Å、104 Å、105 Å、106 Å、107 Å、108 Å、109 Å、110 Å、111 Å、112 Å、113 Å、114 Å、115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å、127 Å、128 Å、129 Å 或130 Å 的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约98 Å 至约128 Å 的距离,诸如约98 Å、99 Å、100 Å、101 Å、102 Å、103 Å、104 Å、105 Å、106 Å、107 Å、108 Å、109 Å、110 Å、111 Å、112 Å、113 Å、114 Å、115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å、127 Å 或128 Å 的距离。

[0031] 例如,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可含有抗原结合位点,所述抗原结合位点彼此间隔开约105 Å 至约127 Å 的距离,诸如约

105 Å、106 Å、107 Å、108 Å、109 Å、110 Å、111 Å、112 Å、113 Å、114 Å、115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å或127 Å的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约110 Å至约122 Å的距离,例如约110 Å、111 Å、112 Å、113 Å、114 Å、115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å或122 Å的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约115 Å至约119 Å的距离,例如约115 Å、116 Å、117 Å、118 Å或119 Å的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约117 Å的距离。在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)具有上述抗原结合臂分离、以及IgG1同种型。

[0032] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有抗原结合位点,所述抗原结合位点彼此间隔开约115 Å至约132 Å的距离,诸如约115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å、127 Å、128 Å、129 Å、130 Å、131 Å或132 Å的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约120 Å至约129 Å的距离,例如约120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å、127 Å、128 Å或129 Å的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约123 Å至约127 Å的距离,例如约123 Å、124 Å、125 Å、126 Å或127 Å的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约125 Å的距离。在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)具有上述抗原结合臂分离、以及IgG3同种型。

[0033] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有具有以下项的氨基酸序列的CDR-H1:

[0034] (a) $GZ^1TFZ^3Z^2YZ^3Z^4$ (SEQ ID NO:2);

[0035] (b) GYTFTDYNI (SEQ ID NO:3) 或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;或

[0036] (c) GYTFTDYNL (SEQ ID NO:4) 或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0037] 其中每个 Z^1 独立地为天然存在的氨基酸,该天然存在的氨基酸包含含有芳族取代基的侧链;

[0038] 每个 Z^2 独立地为天然存在的氨基酸,该天然存在的氨基酸包含在生理pH下的阴离子侧链;

[0039] 每个 Z^3 独立地为天然存在的氨基酸,该天然存在的氨基酸包含在生理pH下的极性、不带电荷的侧链;并且

[0040] 每个 Z^4 独立地为亮氨酸或异亮氨酸。

[0041] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)在由

CRD1内的一个或多个氨基酸限定的表位处特异性结合人TNFR2,例如在由一个或多个SEQ ID NO:1内的氨基酸残基56-60(KCSPG)限定的表位处。在一些实施例中,多肽在由CRD2内的一个或多个氨基酸限定的表位处特异性结合人TNFR2。在一些实施例中,其多肽在由CRD3内的一个或多个氨基酸限定的表位处特异性结合人TNFR2。

[0042] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)进一步含有一个或多个、或以下全部CDR:

[0043] (a) CDR-H2,其具有氨基酸序列INPNYDST(SEQ ID NO:10)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0044] (b) CDR-H3,其具有氨基酸序列CARGNSWYFDV(SEQ ID NO:11)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0045] (c) CDR-L1,其具有氨基酸序列SSVRY(SEQ ID NO:12)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0046] (d) 一种具有LTS氨基酸序列的CDR-L2,或一种相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;以及

[0047] (e) CDR-L3,其具有氨基酸序列CQQWSSNPLT(SEQ ID NO:13)或一种相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0048] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有一个或多个、或以下全部CDR:

[0049] (a) CDR-H2,其具有氨基酸序列INPNYDST(SEQ ID NO:10);

[0050] (b) CDR-H3,其具有氨基酸序列CARGNSWYFDV(SEQ ID NO:11);

[0051] (c) CDR-L1,其具有氨基酸序列SSVRY(SEQ ID NO:12);

[0052] (d) CDR-L2,其具有氨基酸序列LTS;和

[0053] (e) CDR-L3,其具有氨基酸序列CQQWSSNPLT(SEQ ID NO:13)。

[0054] 在一些实施例中,CDR-H1具有氨基酸序列GYTFTDYNI(SEQ ID NO:3)或一种相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0055] 在一些实施例中,多肽含有以下CDR:

[0056] (a) CDR-H1,其具有氨基酸序列GYTFTDYNI(SEQ ID NO:3);

[0057] (b) CDR-H2,其具有氨基酸序列INPNYDST(SEQ ID NO:10);

[0058] (c) CDR-H3,其具有氨基酸序列CARGNSWYFDV(SEQ ID NO:11);

[0059] (d) CDR-L1,其具有氨基酸序列SSVRY(SEQ ID NO:12);

[0060] (e) CDR-L2,其具有氨基酸序列LTS;和

[0061] (f) CDR-L3,其具有氨基酸序列CQQWSSNPLT(SEQ ID NO:13)。

[0062] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少85%相同(例如,至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少90%相同(例如,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少95%相同(例如,至少95%、96%、97%、

98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0063] 在一些实施例中,CDR-H1具有氨基酸序列GYTFTDYNL(SEQ ID NO:4)或一种相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0064] 在一些实施例中,多肽含有以下CDR:

[0065] (a) CDR-H1,其具有氨基酸序列GYTFTDYNL(SEQ ID NO:4);

[0066] (b) CDR-H2,其具有氨基酸序列INPNYDST(SEQ ID NO:10);

[0067] (c) CDR-H3,其具有氨基酸序列CARGNSWYFDV(SEQ ID NO:11);

[0068] (d) CDR-L1,其具有氨基酸序列SSVRY(SEQ ID NO:12);

[0069] (e) CDR-L2,其具有氨基酸序列LTS;和

[0070] (f) CDR-L3,其具有氨基酸序列CQQWSSNPLT(SEQ ID NO:13)。

[0071] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少85%相同(例如,至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少90%相同(例如,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少95%相同(例如,至少95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0072] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有非天然恒定区,例如人恒定区。在一些实施例中,多肽缺少全部或部分Fc结构域、缺少全部或部分天然Fc结构域、或者缺少全部Fc结构域。

[0073] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有一个框架区,该框架区具有TJDJSJJX¹YX²X³LJX⁴LJS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列或有SEQ ID NO:5的10个或更多个残基的氨基酸序列,其中每个J独立地为天然存在的氨基酸;每个X¹独立地为A、V或F;每个X²独立地为M或I;每个X³独立地为E或Q;以及每个X⁴独立地为S或R。例如,多肽可含有一个具有选自以下项的氨基酸序列的框架区:

[0074] (a) TVDKSSSTAYMELRSLTS(SEQ ID NO:16)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0075] (b) TADTSSNTAYIQLSSLTS(SEQ ID NO:17)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0076] (c) TADTSTDTAYMELSSLRS(SEQ ID NO:18)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0077] (d) TRDTSISTAYMELSRSLTS(SEQ ID NO:19)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0078] (e) TFYMELSSLRS(SEQ ID NO:20)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0079] (f) TRDTSISTAYMELNRLTS(SEQ ID NO:21)或相对于该序列具有多达两个保守氨基

酸取代的氨基酸序列；

[0080] (g) TRDTSTNTVYMELTSLRS (SEQ ID NO:22) 或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列；以及

[0081] (h) TADTSTDRAYMELSSLRS (SEQ ID NO:23) 或一种相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0082] 在一些实施例中，框架区位于多肽（例如，单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体）内的CDR-H2附近。在一些实施例中，框架区位于多肽内的CDR-H3附近。在一些实施例中，框架区位于CDR-H2与CDR-H3之间。

[0083] 在一些实施例中，多肽（例如，单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体）特异性结合TNFR2的一个表位，该表位与以下一个或多个氨基酸残基相对应：

[0084] (a) SEQ ID NO:1的氨基酸56-60 (KCSPG) ；

[0085] (b) SEQ ID NO:1的氨基酸101-107 (CSSDQVET) ；

[0086] (c) SEQ ID NO:1的氨基酸115-142

[0087] (NRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK) ；

[0088] (d) SEQ ID NO:1的氨基酸26-45 (QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC) ；

[0089] (e) SEQ ID NO:1的氨基酸90-109 (REQNRICTCRPGWYCALSKQ) ；

[0090] (f) SEQ ID NO:1的氨基酸98-117

[0091] (CRPGWYCALSKQEGCRLCAP) ；

[0092] (g) SEQ ID NO:1的氨基酸106-125

[0093] (LSKQEGCRLCAPLRKCRPGF) ；和/或

[0094] (h) SEQ ID NO:1的氨基酸108-127

[0095] (KQEGCRLCAPLRKCRPGFV) 。

[0096] 在一些实施例中，多肽（例如，单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体）特异性结合 K_D 不大于约10nM，诸如 K_D 不大于约1nM的TNFR2（例如人TNFR2）。例如，多肽（例如，单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体）可特异性结合 K_D 在约1pM至约10nM之间的TNFR2，诸如 K_D 为约1pM、5pM、10pM、15pM、20pM、25pM、30pM、35pM、40pM、45pM、50pM、55pM、60pM、65pM、70pM、75pM、80pM、85pM、90pM、95pM、100pM、105pM、110pM、115pM、120pM、125pM、130pM、135pM、140pM、145pM、150pM、155pM、160pM、165pM、170pM、175pM、180pM、185pM、190pM、195pM、200pM、205pM、210pM、215pM、220pM、225pM、230pM、235pM、240pM、245pM、250pM、255pM、260pM、265pM、270pM、275pM、280pM、285pM、290pM、295pM、300pM、305pM、310pM、315pM、320pM、325pM、330pM、335pM、340pM、345pM、350pM、355pM、360pM、365pM、370pM、375pM、380pM、385pM、390pM、395pM、400pM、405pM、410pM、415pM、420pM、425pM、430pM、435pM、440pM、445pM、450pM、455pM、460pM、465pM、470pM、475pM、480pM、485pM、490pM、495pM、500pM、505pM、510pM、515pM、520pM、525pM、530pM、535pM、540pM、545pM、550pM、555pM、560pM、565pM、570pM、575pM、580pM、585pM、590pM、595pM、600pM、605pM、610pM、615pM、620pM、625pM、630pM、635pM、640pM、645pM、650pM、655pM、660pM、665pM、670pM、675pM、680pM、685pM、690pM、695pM、700pM、705pM、710pM、715pM、720pM、725pM、730pM、735pM、740pM、745pM、750pM、755pM、760pM、765pM、770pM、775pM、780pM、785pM、790pM、795pM、800pM、805pM、810pM、815pM、820pM、825pM、830pM、835pM、840pM、845pM、850pM、

855pM、860pM、865pM、870pM、875pM、880pM、885pM、890pM、895pM、900pM、905pM、910pM、915pM、920pM、925pM、930pM、935pM、940pM、945pM、950pM、955pM、960pM、965pM、970pM、975pM、980pM、985pM、990pM、995pM、1nM、5nM或10nM,除其他值之外。

[0097] 多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可特异性结合TNFR2,从而形成 k_{on} 为至少约 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 或 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 的抗体-抗原复合物,例如, k_{on} 在约 $1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 之间。例如,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可特异性结合TNFR2,从而形成抗体-抗原复合物,该抗体-抗原复合物的 k_{on} 约为 $1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 或 $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 。

[0098] 多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可特异性结合TNFR2,从而形成以 k_{off} 例如不大于约 $10^{-3} s^{-1}$ 或 $10^{-4} s^{-1}$ 解离的抗体-抗原复合物,诸如, k_{off} 在约 $10^{-6} s^{-1}$ 至约 $10^{-3} s^{-1}$ 之间(例如, k_{off} 约为 $1 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、 $2 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、 $3 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、 $4 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、 $6 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、 $7 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、 $8 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、 $9 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $2 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $3 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $4 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $6 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $7 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $8 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $9 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $2 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $3 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $4 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $6 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $7 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $8 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $9 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$)。

[0099] 本文所述的多肽(诸如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可例如在表达TNFR2的细胞中刺激TNFR2信号传导,该细胞为例如Treg细胞(例如,表达CD25^{Hi}的Treg细胞)、髓源性抑制细胞(MDSC)和/或TNFR2+组织细胞,诸如神经元或中枢神经系统的其他细胞,从而促进细胞的愈合、再生、增殖和/或保护。在一些实施例中,多肽增加选自由以下项组成的组的一种或多种基因的表达:cIAP2、TRAF2、Etk、VEGFR2、PI3K、Akt、参与血管生成途径的蛋白质、IKK复合物、RIP、NIK、MAP3K、参与NFkB途径的蛋白质、NIK、JNK、AP-1、MEK(例如MEK1、MEK7)、MKK3、NEMO、IL2R、Foxp3、IL2、TNF、淋巴毒素、淋巴毒素 α 、淋巴毒素 β 、TNFSF18、IL2RA、IKZF2/4、CTLA4、TGF β 、CHUK、NFKBIE、NFKBIA、MAP3K11、TRAF3、re1B、TNF、CXCR3、PDL1(CD274)、IL2RA、IL7R、MAP3K1、MAP、MAP3K4、NFKBIB、TANK、TBK1、TNFAIP3、NFKBIA、TNFRSF1B、TRAF2、re1B、LTA、EP300和CREBBP,以上为通过观察一种或多种上述基因表达的增加,或通过本领域已知的其他基因活化评估方法而得出的评估结果。例如,激动剂TNFR2单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体可促进参与Treg、MDSC和/或TNFR2+细胞活化的一种或多种蛋白质的表达或翻译后修饰(例如磷酸化)。例如,多肽可降低IL4的表达。

[0100] 例如,相对于从未经本文所述的激动性TNFR2单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体处理的样品中分离出的选自由以下项组成的组的一种或多种蛋白质的表达或翻译后修饰(例如磷酸化),本公开内容的多肽可增加选自由以下项组成的组的一种或多种蛋白质的表达或翻译后修饰(例如磷酸化):cIAP2、TRAF2、Etk、VEGFR2、PI3K、Akt、参与血管生成途径的蛋白质、IKK复合物、RIP、NIK、MAP3K、参与NFkB途径的蛋白质、NIK、JNK、AP-1、MEK(例如MEK1、MEK7)、MKK3、NEMO、IL2R、Foxp3、IL2、TNF、淋巴毒素、淋巴毒素 α 、淋巴毒素 β 、TNFSF18、IL2RA、IKZF2/4、CTLA4、TGF β 、CHUK、NFKBIE、NFKBIA、MAP3K11、TRAF3、re1B、TNF、CXCR3、PDL1(CD274)、IL2RA、IL7R、MAP3K1、MAP、MAP3K4、NFKBIB、TANK、TBK1、TNFAIP3、

NFKBIA、TNFRSF1B、TRAF2、relB、LTA、EP300和CREBBP,增加比例约为1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。可用于确定表达水平和磷酸化状态的示例性化验在本领域中是已知的,例如包括确定蛋白质含量的蛋白质印迹法和确定mRNA含量的定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)实验。在一些实施例中,TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)是显性TNFR2激动剂,当与TNF α 等天然TNFR2配体、卡介苗(BCG)和/或IL-2等促生长剂结合使用时,其激动活性可进一步增强。

[0101] 本文所述的激动剂TNFR2多肽,诸如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体,可刺激外周淋巴细胞(例如人外周淋巴细胞)中从糖酵解到谷氨酰胺分解和脂肪酸氧化的代谢转移,这也是Treg细胞增殖增加的证据。

[0102] 相对于未经激动剂TNFR2多肽处理的细胞(例如外周淋巴细胞),本文所述的激动剂TNFR2多肽,例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体,可诱导衣康酸酯产物的增加,例如增加比例约为1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、200%、300%、400%、500%、1,000%或更高。

[0103] 本文所述的激动剂TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可表现出以下一种或多种,或全部特性:

[0104] (a) 例如,通过结合并激活Treg细胞表面上的TNFR2,促进Treg细胞的增殖或增加其稳定性和维持性(从而相对于未暴露于多肽中的细胞群,增加细胞群中Treg细胞的数量或质量,例如增加倍数约为1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、5.6倍、5.7倍、5.8倍、5.9倍、6倍、6.1倍、6.2倍、6.3倍、6.4倍、6.5倍、6.6倍、6.7倍、6.8倍、6.9倍、7倍、7.1倍、7.2倍、7.3倍、7.4倍、7.5倍、7.6倍、7.7倍、7.8倍、7.9倍、8倍、8.1倍、8.2倍、8.3倍、8.4倍、8.5倍、8.6倍、8.7倍、8.8倍、8.9倍、9倍、9.1倍、9.2倍、9.3倍、9.4倍、9.5倍、9.6倍、9.7倍、9.8倍、9.9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更高);

[0105] (b) 例如,通过结合并激活MDSC表面上的TNFR2,促进MDSC的增殖或增加其稳定性(从而相对于未暴露于多肽中的细胞群,增加细胞群中MDSC的数量或质量,例如增加倍数约为1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、5.6倍、5.7倍、5.8倍、5.9倍、6倍、6.1倍、6.2倍、6.3倍、6.4倍、6.5倍、6.6倍、6.7倍、6.8倍、6.9倍、7倍、7.1倍、7.2倍、7.3倍、7.4倍、7.5倍、7.6倍、7.7倍、7.8倍、7.9倍、8倍、8.1倍、8.2倍、8.3倍、8.4倍、8.5倍、8.6倍、8.7倍、8.8倍、8.9倍、9倍、9.1倍、9.2倍、9.3倍、9.4倍、9.5倍、9.6倍、9.7倍、9.8倍、9.9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更高);

[0106] (c) 杀伤或抑制T效应细胞的扩增,例如CD8+T细胞(从而相对于未暴露于多肽中的细胞群,可降低细胞群中CD8+T效应细胞的数量,例如降低倍数约为1.1倍、1.2倍、1.3倍、

1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、5.6倍、5.7倍、5.8倍、5.9倍、6倍、6.1倍、6.2倍、6.3倍、6.4倍、6.5倍、6.6倍、6.7倍、6.8倍、6.9倍、7倍、7.1倍、7.2倍、7.3倍、7.4倍、7.5倍、7.6倍、7.7倍、7.8倍、7.9倍、8倍、8.1倍、8.2倍、8.3倍、8.4倍、8.5倍、8.6倍、8.7倍、8.8倍、8.9倍、9倍、9.1倍、9.2倍、9.3倍、9.4倍、9.5倍、9.6倍、9.7倍、9.8倍、9.9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更高) ;和/或

[0107] (d) 促进表达TNFR2的实质细胞的增殖和/或直接扩增,诸如中枢和周围神经系统的细胞及其相关结构(例如,相对于未暴露于多肽中的细胞群,增加倍数约为1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、5.6倍、5.7倍、5.8倍、5.9倍、6倍、6.1倍、6.2倍、6.3倍、6.4倍、6.5倍、6.6倍、6.7倍、6.8倍、6.9倍、7倍、7.1倍、7.2倍、7.3倍、7.4倍、7.5倍、7.6倍、7.7倍、7.8倍、7.9倍、8倍、8.1倍、8.2倍、8.3倍、8.4倍、8.5倍、8.6倍、8.7倍、8.8倍、8.9倍、9倍、9.1倍、9.2倍、9.3倍、9.4倍、9.5倍、9.6倍、9.7倍、9.8倍、9.9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更高)。

[0108] 例如,本文所述的激动性TNFR2多肽,诸如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段、或构建体,分别相对于未使用该多肽治疗的患者或样品,可用于增加患者(例如人患者)或样品(从患者,例如接受针对本文所述疾病的治疗的人患者,体内分离出的样品)中Treg、MDSC和/或实质细胞的总量。例如,实质细胞可以是淋巴细胞或中枢神经系统相关细胞(例如神经元)的各种子集中的一个。

[0109] 在一些实施例中,TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可用于增加Treg细胞(例如表达CD25^{Hi}的活化Treg细胞)、MDSC和/或表达TNFR2的实质细胞的增殖或扩增,和/或直接增强。例如,实质细胞可以是淋巴细胞或中枢神经系统相关细胞(例如神经元)的各种子集中的一个。

[0110] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可在MDSC的表面结合TNFR2,该MDSC包括表达全部或部分选自由以下项组成的组的蛋白质和小分子的细胞:例如B7-1(CD80)、B7-H1(PD-L1)、CCR2、CD1d、CD1d1、CD2、CD31(PECAM-1)、CD43、CD44、补体成分C5a R1、F4/80(EMR1)、Fc γ R1II(CD16)、Fc γ R1I(CD32)、Fc γ R1IIA(CD32a)、Fc γ R1IIB(CD32b)、Fc γ R1IIB/C(CD32b/c)、Fc γ R1IIC(CD32c)、Fc γ R1IIIA(CD16A)、Fc γ R1IIIB(CD16b)、半乳糖凝集素3、GP130、Gr-1(Ly-6G)、ICAM-1(CD54)、IL-1RI、IL-4R α 、IL-6R α 、整合素 α 4(CD49d)、整合素 α L(CD11a)、整合素 α M(CD11b)、M-CSFR、MGL1(CD301a)、MGL1/2(CD301a/b)、MGL2(CD301b)、一氧化氮、PSGL-1(CD162)、L-选择素(CD62L)、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-3(CD33)、转铁蛋白受体(TfR)、VEGFR1(F1t-1)和VEGFR2(KDR或F1k-1)。特别地,MDSC不表达选自由以下项组成的组蛋白质:B7-2(CD86)、B7-H4、CD11c、CD14、CD21、CD23(Fc ϵ R1I)、CD34、CD35、CD40(TNFRSF5)、CD117(c-kit)、HLA-DR和Sca-1(Ly6)。TNFR2在MDSC上的结合可能会例如通过防止MDSC的细胞凋亡来增加MDSC的增殖或稳

定性,和/或可能会直接扩增MDSC。本文所述的多肽, (诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体) 无需通过TNF α 促进Treg细胞、实质细胞 (例如表达TNFR2的细胞) 和/或MDSC的增殖, 尽管在某些情况下, TNF α 或激动性TNF α 突变蛋白 (例如W02016/029043中所述的激动性TNF α 突变蛋白, 其公开内容以全文引用的方式并入本文) 可与本公开内容的激动性TNFR2多肽结合, 从而进一步增强增殖效应。

[0111] 在一些实施例中, 本文所述的多肽 (诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体) 相对于没有自身免疫的受试者, 在患有自身免疫性疾病的患者体内, 能够以更大的潜力增强Treg细胞的增殖, 和/或直接稳定或增殖Treg细胞。在一些实施例中, 本文所述的多肽 (诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体) 相对于无自身免疫的部位, 在自身免疫的微环境中, 能够以更大的潜力增强Treg细胞的增殖, 和/或直接扩增Treg细胞。

[0112] 在一些实施例中, 本文所述的多肽 (诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体) 相对于没有移植物抗宿主病 (GVHD) 的受试者, 在患有GVHD的患者中, 能够以更大的潜力增强或稳定MDSC的增殖, 和/或直接杀伤MDSC。在一些实施例中, 本文所述的多肽 (诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体) 相对于没有GVHD的部位, 在GVHD的微环境中, 能够以更大的潜力增加MDSC的增殖, 和/或直接扩增MDSC。

[0113] 例如, 本文所述的激动性TNFR2多肽 (例如, 单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体) 可在患有自身免疫或GVHD患者细胞毒性T细胞的表面上结合TNFR2, 并可增加MDSC的增殖, 和/或促进CTL的死亡。例如, 本文所述的多肽 (诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体) 可在自身免疫或GVHD的微环境中表现出用于扩增Treg细胞和/或MDSC的增殖的IC₅₀, 其小于多肽在远离疾病的部位扩增Treg细胞和/或MDSC的增殖的IC₅₀, 诸如减少倍数约为1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、100倍、1,000倍、10,000倍或更高的IC₅₀。

[0114] 在一些实施例中, 本文所述的多肽, 诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体, 相对于没有这些疾病的受试者, 在患有自身免疫或GVHD的患者体内, 能够以更大的潜力杀伤或清除T效应细胞, 例如CD8+细胞毒性T细胞。在一些实施例中, 本文所述的多肽, 诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体, 相对于没有自身免疫或GVHD的部位, 在自身免疫反应或GVHD的微环境中, 能够以更大的潜力收缩T效应细胞, 例如CD8+细胞毒性T细胞。

[0115] 例如, 在一些实施例中, 本文所述的多肽, 诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体, 可以以小于多肽在无自身免疫性疾病的受试者体内杀伤T效应细胞的EC₅₀的EC₅₀在患有自身免疫性疾病的患者体内直接杀伤T效应细胞, 例如CD8+细胞毒性T细胞, 其减少倍数为例如1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、100倍、1,000倍、10,000倍或更高。

[0116] 在一些实施例中, TNFR2激动剂多肽是通过本公开内容的方法识别和/或生产的多肽。用于识别和/或生产TNFR2激动剂多肽的本公开内容的方法包括具有以下步骤的方法:

[0117] (a) 将抗体及其片段的混合物与至少一种肽接触, 所述肽在TNFR2的CRD1和/或CRD2中含有五个或更多个连续或不连续的氨基酸残基;

[0118] (b) 从混合物中分离特异性结合肽的抗体或其片段,从而产生含有至少一种TNFR2激动剂抗体或抗原结合片段的富含抗体混合物;以及

[0119] (c) 将富含抗体混合物暴露于至少一种肽,所述肽在TNFR2的CRD3和/或CRD4中含有五个或更多个连续或不连续的氨基酸残基,并保留非特异性结合肽的抗体或其片段,从而产生含有至少一种TNFR2激动剂抗体或其抗原结合片段的抗体混合物。

[0120] 在一些实施例中,该方法包括测定富含抗体混合物中抗体或其抗原结合片段中的一种或多种的氨基酸序列。在一些实施例中,(a)和/或(c)所述的肽结合到一个表面上。抗体或其抗原结合片段可表达在噬菌体、细菌细胞或酵母细胞的表面上。在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段表达为一个或多个非共价结合到核糖体或共价结合到mRNA或cDNA的多肽链。在一些实施例中,(a)和/或(c)的肽与可检测的标记缀合,诸如荧光分子(例如,绿色荧光蛋白、青色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、藻红蛋白、别藻蓝蛋白、hoechst、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、碘化丙啶、荧光素、香豆素、罗丹明、四甲基罗丹明或青色素)或表位标签(例如,麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、聚组氨酸标签、FLAG标签、myc标签、人流感血凝素(HA)标签、生物素或链霉亲和素)。在一些实施例中,步骤(a)和(b)被顺序重复一次或多次(例如,一次至十次、二次至九次、三次至八次、或四次至七次,诸如二次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、或十次、或更多次)。

[0121] 在一些实施例中,该多肽是选自由以下项组成的组的抗体或其抗原结合片段:单克隆抗体或其抗原结合片段、多克隆抗体或其抗原结合片段、人抗体或其抗原结合片段、人源化抗体或其抗原结合片段、灵长类化抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、多特异性抗体或其抗原结合片段、双可变免疫球蛋白结构域、单价抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、单链Fv分子(scFv)、双抗体、三抗体、纳米抗体、抗体样蛋白支架、结构域抗体、Fv片段、Fab片段、F(ab')₂分子和串联scFv(taFv)。

[0122] 在一些实施例中,该多肽是人抗体或其抗原结合片段、人源化抗体或其抗原结合片段、或嵌合抗体或其抗原结合片段。

[0123] 在一些实施例中,该多肽是单链多肽。

[0124] 在一些实施例中,该多肽是双特异性抗体,诸如双特异性单克隆抗体,其中该抗体的一个臂特异性结合TNFR2,并且另一臂特异性结合免疫检查点蛋白,诸如本文所述的PD-1、PD-L1或CTLA-4等。特异性结合TNFR2的双特异性抗体的臂可以特异性结合,例如,由CRD1、CRD2和/或CRD3内的一个或多个氨基酸限定的人TNFR2的表位,但不结合由CRD4中一个或多个氨基酸限定的人TNFR2的表位。在一些实施例中,特异性结合TNFR2的双特异性抗体的臂特异性结合人TNFR2的表位,其对应于以下一种或多种:

[0125] (a) SEQ ID NO:1的氨基酸56-60(KCSPG);

[0126] (b) SEQ ID NO:1的氨基酸101-107(CSSDQVET);

[0127] (c) SEQ ID NO:1的氨基酸115-142

[0128] (NRICTCRPGWYCALSKEGECRLCAPLRK);

[0129] (d) SEQ ID NO:1的氨基酸26-45(QTQMCCSKCSPGQHAKVFC);

[0130] (e) SEQ ID NO:1的氨基酸90-109(REQNRICTCRPGWYCALSKEG);

[0131] (f) SEQ ID NO:1的氨基酸98-117

[0132] (CRPGWYCALSKEGECRLCAP);

[0133] (g) SEQ ID NO:1的氨基酸106-125

[0134] (LSKQEGCRLCAPLRKCRPGF);和/或

[0135] (h) SEQ ID NO:1的氨基酸108-127

[0136] (KQEGCRLCAPLRKCRPGFGV)。

[0137] 在一些实施例中,双特异性抗体含有特异性结合TNFR2的臂,诸如上述人TNFR2的表位,和特异性结合免疫检查点蛋白的一个臂特异性结合PD-1。在一些实施例中,特异性结合PD-1的双特异性抗体的臂是PD-1活性的激动剂。

[0138] 在一些实施例中,双特异性抗体含有特异性结合TNFR2的臂,诸如上述人TNFR2的表位,和特异性结合PD-L1的臂。在一些实施例中,特异性结合PD-L1的双特异性抗体的臂是PD-L1活性的激动剂。

[0139] 在一些实施例中,双特异性抗体含有特异性结合TNFR2的臂,诸如上述人TNFR2的表位,和特异性结合CTLA-4的臂。在一些实施例中,特异性结合CTLA-4的双特异性抗体的臂是CTLA-4活性的激动剂。

[0140] 第二方面的特征是含有第一多肽结构域和第二多肽结构域的构建体。该第一多肽结构域和该第二多肽结构域各自独立地为第一方面或其任何实施例的抗原结合片段。该第一多肽结构域和该第二多肽结构域可以,例如,通过共价接头彼此结合,该共价接头诸如含有(例如,是)酰胺键或二硫键。

[0141] 第三方面的特征是编码第一方面的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)和/或第二方面或其任何实施例的构建体的多核苷酸。

[0142] 第四方面的特征是编码第三方面的多核苷酸的载体。该载体可以是表达载体,诸如真核表达载体。在一些实施例中,该载体是病毒载体,诸如腺病毒(例如,血清型1-57腺病毒,诸如血清型2、5、11、12、24、26、34、35、40、48、49、50、52或Pan9腺病毒)、逆转录病毒(例如, γ 逆转录病毒或慢病毒)、痘病毒、腺相关病毒、杆状病毒、单纯性疱疹病毒或牛痘病毒(例如,修饰的牛痘安卡拉病毒)。

[0143] 第五方面的特征是含有第三方面的多核苷酸和/或第四方面的载体的分离的宿主细胞。该宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞,诸如哺乳动物细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或HEK细胞)。该宿主细胞可以是,例如,Dinnis and James, *Biotechnology and Bioengineering* 91:180-189, 2005中所述的宿主细胞,其公开内容通过引用并入本文。

[0144] 第六方面的特征是药物组合物,该药物组合物含有特异性结合人TNFR2并且在结合后对TNFR2活性表现出激动效应的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)。该多肽可以是,例如,第一方面或其任何实施例的抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少10%以单个二硫键结合的同等型存在,诸如IgG2-B或IgG2-A二硫键结合的同等型。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的约10%至约99.999%以单个二硫键结合的同等型存在,诸如抗体或其抗原结合片段的约11%至约99.9%、约12%至约99.9%、约13%至约99.9%、约14%至约99.9%、约15%至约99.9%、约16%至约99.9%、约17%至约99.9%、约18%至约99.9%、约19%至约99.9%、约20%至约99.9%、约21%至约99.9%、约22%至约99.9%、约23%至约99.9%、约24%至约99.9%、约25%至约99.9%、约26%至约99.9%、约27%至约99.9%、约28%至约99.9%、约29%至约99.9%、约30%至约99.9%、约31%至约99.9%、约32%至约

99.9%、约33%至约99.9%、约34%至约99.9%、约35%至约99.9%、约36%至约99.9%、约37%至约99.9%、约38%至约99.9%、约39%至约99.9%、约40%至约99.9%、约41%至约99.9%、约42%至约99.9%、约43%至约99.9%、约44%至约99.9%、约45%至约99.9%、约46%至约99.9%、约47%至约99.9%、约48%至约99.9%、约49%至约99.9%、约50%至约99.9%、约51%至约99.9%、约52%至约99.9%、约53%至约99.9%、约54%至约99.9%、约55%至约99.9%、约56%至约99.9%、约57%至约99.9%、约58%至约99.9%、约59%至约99.9%、约60%至约99.9%、约61%至约99.9%、约62%至约99.9%、约63%至约99.9%、约64%至约99.9%、约65%至约99.9%、约66%至约99.9%、约67%至约99.9%、约68%至约99.9%、约69%至约99.9%、约70%至约99.9%、约71%至约99.9%、约72%至约99.9%、约73%至约99.9%、约74%至约99.9%、约75%至约99.9%、约76%至约99.9%、约77%至约99.9%、约78%至约99.9%、约79%至约99.9%、约80%至约99.9%、约81%至约99.9%、约82%至约99.9%、约83%至约99.9%、约84%至约99.9%、约85%至约99.9%、约86%至约99.9%、约87%至约99.9%、约88%至约99.9%、约89%至约99.9%、约90%至约99.9%、约91%至约99.9%、约92%至约99.9%、约93%至约99.9%、约94%至约99.9%、约95%至约99.9%、约96%至约99.9%、约97%至约99.9%、约98%至约99.9%、或约99%至约99.99%。

[0145] 在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约10%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约15%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约20%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约25%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约30%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约35%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约40%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约45%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约50%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约60%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约65%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约70%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约75%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约80%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约85%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约90%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约95%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约96%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约97%以单个二硫键结合的同等型存在。

在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约98%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约99%以单个二硫键结合的同等型存在。在一些实施例中,该药物组合物中的抗体或其抗原结合片段的至少约99.9%以单个二硫键结合的同等型存在。

[0146] 在一些实施例中,在非还原条件下进行的凝胶电泳分析中,抗体或其抗原结合片段仅产生单条可检测的条带。

[0147] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段的单个二硫键结合的同等型是IgG2-B,如本文所述。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段的单个二硫键结合的同等型是IgG2-A,如本文所述。

[0148] 另外地或替代性地,该药物组合物可以含有第二方面或其任何实施例的构建体、第三方面或其任何实施例的多核苷酸、第四方面或其任何实施例的载体、和/或第五方面或其任何实施例的宿主细胞。该药物组合物可以进一步含有药学上可接受的载剂(carrier)或赋形剂。

[0149] 在一些实施例中,该多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)以约0.001mg/ml至约100mg/ml的量(诸如约0.01mg/ml至约10mg/ml的量)存在于药物组合物中。

[0150] 该药物组合物可以进一步含有另外的治疗剂,诸如免疫治疗剂。在一些实施例中,免疫治疗剂选自由以下项组成的组:抗CTLA-4激动剂、抗PD-1激动剂、抗PD-L1激动剂、抗PD-L2激动剂、抗CD27激动剂、抗CD30激动剂、抗CD40激动剂、抗4-1BB激动剂、抗GITR激动剂、抗OX40激动剂、抗TRAILR1激动剂、抗TRAILR2激动剂、抗TWEAK激动剂、抗TWEAKR激动剂、抗细胞表面淋巴细胞蛋白激动剂、抗BRAF激动剂、抗MEK激动剂、抗CD33激动剂、抗CD20激动剂、抗HLA-DR激动剂、抗HLA I类激动剂、抗CD52激动剂、抗A33激动剂、抗GD3激动剂、抗PSMA激动剂、抗Ceacan 1激动剂、抗Galedin 9激动剂、抗HVEM激动剂、抗VISTA激动剂、抗B7 H4激动剂、抗HHLA2激动剂、抗CD155激动剂、抗CD80激动剂、抗BTLA激动剂、抗CD160激动剂、抗CD28激动剂、抗CD226激动剂、抗CEACAM1激动剂、抗TIM3激动剂、抗TIGIT激动剂、抗CD96激动剂、抗CD70激动剂、抗CD27激动剂、抗LIGHT激动剂、抗CD137激动剂、抗DR4激动剂、抗CR5激动剂、抗TNFRS激动剂、抗TNFR1激动剂、抗FAS激动剂、抗CD95激动剂、抗TRAIL激动剂、抗DR6激动剂、抗EDAR激动剂、抗NGFR激动剂、抗OPG激动剂、抗RANKL激动剂、抗LT β 受体激动剂、抗BCMA激动剂、抗TACI激动剂、抗BAFFR激动剂、抗EDAR2激动剂、抗TROY激动剂和抗RELT激动剂。例如,免疫治疗剂可以是抗CTLA-4激动剂、抗PD-1激动剂或抗PD-L1激动剂。

[0151] 在一些实施例中,免疫治疗剂选自由以下项组成的组:激动性抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-1抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-L2抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD27抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD30抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD40抗体或其抗原结合片段、激动性抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、激动性抗GITR抗体或其抗原结合片段、激动性抗OX40剂抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAILR1抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAILR2抗体或其抗原结合片段、激动性抗TWEAK抗体或其抗原结合片段、激动性抗TWEAKR抗体或其抗原结合片段、激动性抗细胞表面淋巴细胞蛋白抗体或其抗原结合片段、激动性抗BRAF抗体或其抗原结合片段、激动性抗MEK抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD33抗体或其抗原结合片段、激动性抗

CD20抗体或其抗原结合片段、激动性抗HLA-DR抗体或其抗原结合片段、激动性抗HLA I类抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD52抗体或其抗原结合片段、激动性抗A33抗体或其抗原结合片段、激动性抗GD3抗体或其抗原结合片段、激动性抗PSMA抗体或其抗原结合片段、激动性抗Ceacan 1抗体或其抗原结合片段、激动性抗Galedin 9抗体或其抗原结合片段、激动性抗HVEM抗体或其抗原结合片段、激动性抗VISTA抗体或其抗原结合片段、激动性抗B7 H4抗体或其抗原结合片段、激动性抗HHLA2抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD155抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD80抗体或其抗原结合片段、激动性抗BTLA抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD160抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD28抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD226抗体或其抗原结合片段、激动性抗CEACAM1抗体或其抗原结合片段、激动性抗TIM3抗体或其抗原结合片段、激动性抗TIGIT抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD96抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD70抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD27抗体或其抗原结合片段、激动性抗LIGHT抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD137抗体或其抗原结合片段、激动性抗DR4抗体或其抗原结合片段、激动性抗CR5抗体或其抗原结合片段、激动性抗TNFRS抗体或其抗原结合片段、激动性抗TNFR1抗体或其抗原结合片段、激动性抗FAS抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD95抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAIL抗体或其抗原结合片段、激动性抗DR6抗体或其抗原结合片段、激动性抗EDAR抗体或其抗原结合片段、激动性抗NGFR抗体或其抗原结合片段、激动性抗OPG抗体或其抗原结合片段、激动性抗RANKL抗体或其抗原结合片段、激动性抗LTP β 受体抗体或其抗原结合片段、激动性抗BCMA抗体或其抗原结合片段、激动性抗TACI抗体或其抗原结合片段、激动性抗BAFFR抗体或其抗原结合片段、激动性抗EDAR2抗体或其抗原结合片段、激动性抗TROY抗体或其抗原结合片段、和激动性抗RELT抗体或其抗原结合片段。例如,免疫治疗剂可以是激动性抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-1抗体或其抗原结合片段、或激动性抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。

[0152] 在一些实施例中,免疫治疗剂是激动性抗细胞表面淋巴细胞蛋白抗体或其抗原结合片段,诸如结合并促进以下项中的一种或多种的活性的抗体或其抗原结合片段:CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11、CD12、CD13、CD14、CD15、CD16、CD17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD46、CD47、CD48、CD49、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60、CD61、CD62、CD63、CD64、CD65、CD66、CD67、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD76、CD77、CD78、CD79、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120、CD121、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD128、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140、CD141、CD142、CD143、CD144、CD145、CD146、CD147、CD148、CD149、CD150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156、CD157、CD158、CD159、CD160、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172、CD173、CD174、CD175、CD176、CD177、CD178、CD179、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD187、CD188、CD189、CD190、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CD198、CD199、CD200、CD201、CD202、

CD203、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210、CD211、CD212、CD213、CD214、CD215、CD216、CD217、CD218、CD219、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235、CD236、CD237、CD238、CD239、CD240、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD250、CD251、CD252、CD253、CD254、CD255、CD256、CD257、CD258、CD259、CD260、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD270、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、CD283、CD284、CD285、CD286、CD287、CD288、CD289、CD290、CD291、CD292、CD293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、CD306、CD307、CD308、CD309、CD310、CD311、CD312、CD313、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319和/或CD320。

[0153] 在一些实施例中,免疫治疗剂是结合趋化因子或淋巴因子的药剂(例如,多肽、抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或其构建体)。例如,免疫治疗剂可以是结合并活化CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL8、CCL2和CCL5中的一种或多种或全部的药剂(例如,多肽、抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或其构建体)。在一些实施例中,免疫治疗剂可以是结合并活化CCL3、CCL4、CCL8和CCL22中的一种或多种或全部的药剂(例如,多肽、抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或其构建体)。

[0154] 在一些实施例中,该药物组合物含有双特异性抗体,诸如双特异性单克隆抗体,其中该抗体的一个臂特异性结合TNFR2,并且另一臂特异性结合免疫检查点蛋白,诸如本文所述的PD-1、PD-L1或CTLA-4等。特异性结合TNFR2的双特异性抗体的臂可以特异性结合,例如,由CRD1、CRD2和/或CRD3内的一个或多个氨基酸限定的人TNFR2的表位,而不是由CRD4内的一个或多个氨基酸限定的表位。

[0155] 在一些实施例中,双特异性抗体含有特异性结合TNFR2的臂,诸如上述人TNFR2的表位,和特异性结合免疫检查点蛋白的一个臂特异性结合PD-1。在一些实施例中,特异性结合PD-1的双特异性抗体的臂是PD-1活性的激动剂。

[0156] 在一些实施例中,双特异性抗体含有特异性结合TNFR2的臂,诸如上述人TNFR2的表位,和特异性结合PD-L1的臂。在一些实施例中,特异性结合PD-L1的双特异性抗体的臂是PD-L1活性的激动剂。

[0157] 在一些实施例中,双特异性抗体含有特异性结合TNFR2的臂,诸如上述人TNFR2的表位,和特异性结合CTLA-4的臂。在一些实施例中,特异性结合CTLA-4的双特异性抗体的臂是CTLA-4活性的激动剂。

[0158] 在一些实施例中,药物组合物中的另外的治疗剂是TNF α 、激动性TNF α 突变蛋白(例如,WO 2016/029043中描述的激动性TNF α 突变蛋白,其公开内容通过引用以其全文并入本文)或BCG。

[0159] 在一些实施例中,药物组合物不含有抗TNF α 剂,诸如抗TNF α 抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,药物组合物不含有英夫利西单抗、依那西普、培塞利珠单抗、戈利木单抗或阿达木单抗。

[0160] 第七方面的特征是产生第一方面的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)和/或第二方面或其任何实施例的构建体的方法。该方法可以包括在宿主细胞(例如,本文所述的宿主细胞)中表达编码多肽或构建体的多核苷酸,并从宿主细胞培养基

中回收该多肽。

[0161] 第八方面的特征是通过向哺乳动物受试者(例如,人受试者)施用以下项以抑制该受试者的免疫应答(诸如由B细胞或T细胞(例如CD8+T效应细胞)介导的免疫应答)的方法:第一方面或其任何实施例的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)、第二方面或其任何实施例的构建体、第三方面或其任何实施例的多核苷酸、第四方面或其任何实施例的载体、第五方面或其任何实施例的宿主细胞、和/或第六方面或其任何实施例的药物组合物。

[0162] 第九方面的特征是通过向哺乳动物受试者(例如,人受试者)施用以下项以治疗该受试者的免疫性疾病的方法:第一方面或其任何实施例的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)、第二方面或其任何实施例的构建体、第三方面或其任何实施例的多核苷酸、第四方面或其任何实施例的载体、第五方面或其任何实施例的宿主细胞、和/或第六方面或其任何实施例的药物组合物。

[0163] 在一些实施例中,受试者需要组织或器官再生。组织或器官可以是,例如,胰腺、唾液腺、垂体、肾脏、心脏、肺、造血系统、颅神经、心脏、主动脉、嗅腺、耳朵、神经、头部结构、眼睛、胸腺、舌、骨、肝脏、小肠、大肠、肠道、肺、脑、皮肤、周围神经系统、中枢神经系统、脊髓、乳房、胚胎结构、胚胎或睾丸。

[0164] 在一些实施例中,免疫性疾病是自身免疫性疾病、神经性病症、过敏、哮喘、黄斑变性、肌肉萎缩、流产有关的疾病、动脉粥样硬化、骨质流失、肌肉骨骼疾病、肥胖、GVHD或同种异体移植物排斥。

[0165] 在一些实施例中,自身免疫性疾病是I型糖尿病、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性Addison病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、Behcet病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻性皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、Churg-Strauss综合征、瘢痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、Crohn病、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、Graves病、Guillain-Barré、Hashimoto甲状腺炎、甲状腺功能减退、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、青少年关节炎、扁平苔藓、狼疮、Ménière病、混合性结缔组织病、多发性硬化、重症肌无力、寻常型天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、Raynaud现象、Raynaud综合征、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、Sjögren综合征、Stiff-Man综合征、Takayasu动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风或Wegener肉芽肿病。

[0166] 在一些实施例中,神经性病症是脑肿瘤、脑转移、脊髓损伤、精神分裂症、癫痫、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿病或中风。

[0167] 在一些实施例中,过敏是食物过敏、季节性过敏、宠物过敏、荨麻疹、花粉热、过敏性结膜炎、毒葛过敏、橡木过敏、霉菌过敏、药物过敏、粉尘过敏、化妆品过敏或化学过敏。

[0168] 在一些实施例中,同种异体移植物排斥是皮肤移植物排斥、骨移植物排斥、血管组织移植物排斥、韧带移植物排斥或器官移植物排斥。

[0169] 在一些实施例中,韧带移植物排斥是环甲韧带移植物排斥、牙周韧带移植物排斥、晶状体悬韧带移植物排斥、掌侧桡腕韧带移植物排斥、背侧桡腕韧带移植物排斥、尺侧副韧带

带移植物排斥、桡侧副韧带移植物排斥、乳房悬韧带移植物排斥、骶髂前韧带移植物排斥、骶髂后韧带移植物排斥、骶结节韧带移植物排斥、骶棘韧带移植物排斥、耻骨弓状韧带移植物排斥、耻骨上韧带移植物排斥、前十字韧带移植物排斥、外侧副韧带移植物排斥、后十字韧带移植物排斥、内侧副韧带移植物排斥、颅十字韧带移植物排斥、尾十字韧带移植物排斥、或膝韧带移植物排斥。

[0170] 在一些实施例中,器官移植物排斥是心脏移植物排斥、肺移植物排斥、肾移植物排斥、肝移植物排斥、胰腺移植物排斥、肠移植物排斥或胸腺移植物排斥。

[0171] 在一些实施例中,GVHD源自骨髓移植或选自以下项组成的组的一种或多种血细胞:造血干细胞、常见髓系祖细胞、常见淋巴样祖细胞、巨核细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、T细胞、B细胞、天然杀伤细胞和树突状细胞。

[0172] 第十方面的特征是通过向哺乳动物受试者(例如,人受试者)施用以下项以治疗该受试者的炎性疾病的方法:第一方面或其任何实施例的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)、第二方面或其任何实施例的构建体、第三方面或其任何实施例的多核苷酸、第四方面或其任何实施例的载体、第五方面或其任何实施例的宿主细胞、和/或第六方面或其任何实施例的药物组合物。

[0173] 在一些实施例中,炎性疾病是急性或慢性炎症。在一些实施例中,炎性疾病选自自由骨关节炎、纤维化肺疾病和心脏炎症组成的组。

[0174] 第十一方面的特征是通过向哺乳动物受试者(例如,人受试者)施用以下项以愈合、保护、增殖和/或再生该受试者中的TNFR2+组织的方法:第一方面或其任何实施例的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)、第二方面或其任何实施例的构建体、第三方面或其任何实施例的多核苷酸、第四方面或其任何实施例的载体、第五方面或其任何实施例的宿主细胞、和/或第六方面或其任何实施例的药物组合物。

[0175] 在一些实施例中,TNFR2+组织选自以下项组成的组:胰腺、唾液腺、垂体、肾脏、心脏、肺、造血系统、颅神经、心脏、主动脉、嗅腺、耳朵、神经、眼睛、胸腺、舌、骨、肝脏、小肠、大肠、胃肠、肺、脑、皮肤、周围神经系统、中枢神经系统、脊髓、乳房、胚胎结构、胚胎或睾丸组织。

[0176] 在第八、第九、第十和/或第十一方面的一些实施例中,该方法进一步包括向人施用免疫治疗剂。免疫治疗剂可以,例如,选自以下项组成的组:抗CTLA-4激动剂、抗PD-1激动剂、抗PD-L1激动剂、抗PD-L2激动剂、抗CD27激动剂、抗CD30激动剂、抗CD40激动剂、抗4-1BB激动剂、抗GITR激动剂、抗OX40激动剂、抗TRAILR1激动剂、抗TRAILR2激动剂、抗TWEAK激动剂、抗TWEAKR激动剂、抗细胞表面淋巴细胞蛋白激动剂、抗BRAF激动剂、抗MEK激动剂、抗CD33激动剂、抗CD20激动剂、抗HLA-DR激动剂、抗HLA I类激动剂、抗CD52激动剂、抗A33激动剂、抗GD3激动剂、抗PSMA激动剂、抗Ceacac 1激动剂、抗Galedin 9激动剂、抗HVEM激动剂、抗VISTA激动剂、抗B7H4激动剂、抗HHLA2激动剂、抗CD155激动剂、抗CD80激动剂、抗BTLA激动剂、抗CD160激动剂、抗CD28激动剂、抗CD226激动剂、抗CEACAM1激动剂、抗TIM3激动剂、抗TIGIT激动剂、抗CD96激动剂、抗CD70激动剂、抗CD27激动剂、抗LIGHT激动剂、抗CD137激动剂、抗DR4激动剂、抗CR5激动剂、抗TNFRS激动剂、抗TNFR1激动剂、抗FAS激动剂、抗CD95激动剂、抗TRAIL激动剂、抗DR6激动剂、抗EDAR激动剂、抗NGFR激动剂、抗OPG激动剂、抗RANKL激动剂、抗LT β 受体激动剂、抗BCMA激动剂、抗TACI激动剂、抗BAFFR激动剂、抗EDAR2激动剂、

抗TROY激动剂和抗RELT激动剂。例如,免疫治疗剂可以是抗CTLA-4激动剂、抗PD-1激动剂或抗PD-L1激动剂。

[0177] 向人施用的免疫治疗剂可以,例如,选自由以下项组成的组:激动性抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-1抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-L2抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD27抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD30抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD40抗体或其抗原结合片段、激动性抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、激动性抗GITR抗体或其抗原结合片段、激动性抗OX40抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAILR1抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAILR2抗体或其抗原结合片段、激动性抗TWEAK抗体或其抗原结合片段、激动性抗TWEAKR抗体或其抗原结合片段、激动性抗细胞表面淋巴细胞蛋白抗体或其抗原结合片段、激动性抗BRAF抗体或其抗原结合片段、激动性抗MEK抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD33抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD20抗体或其抗原结合片段、激动性抗HLA-DR抗体或其抗原结合片段、激动性抗HLA I类抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD52抗体或其抗原结合片段、激动性抗A33抗体或其抗原结合片段、激动性抗GD3抗体或其抗原结合片段、激动性抗PSMA抗体或其抗原结合片段、激动性抗Ceacan 1抗体或其抗原结合片段、激动性抗Galedin 9抗体或其抗原结合片段、激动性抗HVEM抗体或其抗原结合片段、激动性抗VISTA抗体或其抗原结合片段、激动性抗B7 H4抗体或其抗原结合片段、激动性抗HHLA2抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD155抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD80抗体或其抗原结合片段、激动性抗BTLA抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD160抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD28抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD226抗体或其抗原结合片段、激动性抗CEACAM1抗体或其抗原结合片段、激动性抗TIM3抗体或其抗原结合片段、激动性抗TIGIT抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD96抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD70抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD27抗体或其抗原结合片段、激动性抗LIGHT抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD137抗体或其抗原结合片段、激动性抗DR4抗体或其抗原结合片段、激动性抗CR5抗体或其抗原结合片段、激动性抗TNFRS抗体或其抗原结合片段、激动性抗TNFR1抗体或其抗原结合片段、激动性抗FAS抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD95抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAIL抗体或其抗原结合片段、激动性抗DR6抗体或其抗原结合片段、激动性抗EDAR抗体或其抗原结合片段、激动性抗NGFR抗体或其抗原结合片段、激动性抗OPG抗体或其抗原结合片段、激动性抗RANKL抗体或其抗原结合片段、激动性抗LT β 受体抗体或其抗原结合片段、激动性抗BCMA抗体或其抗原结合片段、激动性抗TACI抗体或其抗原结合片段、激动性抗BAFFR抗体或其抗原结合片段、激动性抗EDAR2抗体或其抗原结合片段、激动性抗TROY抗体或其抗原结合片段、和激动性抗RELT抗体或其抗原结合片段。例如,免疫治疗剂可以是激动性抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-1抗体或其抗原结合片段、或激动性抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。

[0178] 在第八、第九、第十和/或第十一方面的一些实施例中,该方法包括向哺乳动物(例如,人)施用激动性抗细胞表面淋巴细胞蛋白抗体或其抗原结合片段,诸如结合并活化以下项中的一种或多种的抗体或其抗原结合片段:CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11、CD12、CD13、CD14、CD15、CD16、CD17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD46、CD47、CD48、CD49、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、

CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60、CD61、CD62、CD63、CD64、CD65、CD66、CD67、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD76、CD77、CD78、CD79、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120、CD121、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD128、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140、CD141、CD142、CD143、CD144、CD145、CD146、CD147、CD148、CD149、CD150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156、CD157、CD158、CD159、CD160、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172、CD173、CD174、CD175、CD176、CD177、CD178、CD179、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD187、CD188、CD189、CD190、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CD198、CD199、CD200、CD201、CD202、CD203、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210、CD211、CD212、CD213、CD214、CD215、CD216、CD217、CD218、CD219、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235、CD236、CD237、CD238、CD239、CD240、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD250、CD251、CD252、CD253、CD254、CD255、CD256、CD257、CD258、CD259、CD260、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD270、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、CD283、CD284、CD285、CD286、CD287、CD288、CD289、CD290、CD291、CD292、CD293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、CD306、CD307、CD308、CD309、CD310、CD311、CD312、CD313、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319和/或CD320。

[0179] 在第八、第九、第十和/或第十一方面的一些实施例中,该方法包括向哺乳动物(例如,人)施用结合并活化趋化因子或淋巴因子的药剂(例如,多肽、抗体、其抗原结合片段、单链多肽或其构建体)。例如,免疫治疗剂可以是结合并且活化CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL8、CCL2和CCL5中的一种或多种或全部的活性的药剂(例如,多肽、抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或其构建体)。在一些实施例中,免疫治疗剂可以是结合并活化CCL3、CCL4、CCL8和CCL22中的一种或多种或全部的药剂(例如,多肽、抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或其构建体)。

[0180] 在第八、第九、第十和/或第十一方面的一些实施例中,未向哺乳动物(例如,人)施用抗TNF α 剂,诸如抗TNF α 抗体或其抗原结合片段。在第八、第九、第十和/或第十一方面的一些实施例中,未向哺乳动物(例如,人)施用英夫利西单抗、依那西普、培塞利珠单抗、戈利木单抗或阿达木单抗。

[0181] 在第八、第九、第十和/或第十一方面的一些实施例中,以约0.001mg/kg至约100mg/kg的量,例如以约0.01mg/kg至约10mg/kg的量,向哺乳动物(例如,人)施用特异性结合TNFR2的多肽,诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段、或构建体。

[0182] 第十二方面的特征是一种试剂盒,该试剂盒含有第一方面或其任何实施例的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)、第二方面或其任何实施例的构建体、第三方面或其任何实施例的多核苷酸、第四方面或其任何实施例的载体、第五方面或其任

何实施例的宿主细胞、和/或第六方面或其任何实施例的药物组合物。

[0183] 在一些实施例中,该试剂盒含有关于将载体转染到宿主细胞中的说明书。另外地或替代性地,该试剂盒可以含有关于在宿主细胞中表达多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)的说明书。该试剂盒可以包括可用于在宿主细胞中表达多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)的试剂。在一些实施例中,该试剂盒包括关于向哺乳动物(例如,人),诸如患有本文所述的细胞增殖病症和/或感染性疾病的人患者施用药剂的说明书。在一些实施例中,该试剂盒含有关于制备或使用药剂的说明书。

[0184] 定义

[0185] 如本文所用,术语“约”是指在所描述的值之上或之下不超过10%的值。例如,术语“约5nM”表示4.5nM至5.5nM的范围。

[0186] 如本文所用,术语“激动剂TNFR2抗体”和“激动性TNFR2抗体”是指能够促进或增加TNFR2的活化和/或增强由TNFR2介导的一种或多种信号转导通路的TNFR2抗体。例如,本发明的激动性TNFR2抗体可以促进或增加Treg细胞群的增殖。本发明的激动性TNFR2抗体可以通过结合TNFR2以促进或增加TNFR2活化,例如,从而诱导使受体具有生物学活性的构象变化。例如,激动性TNFR2抗体可以以类似于TNFR2与其同源配体TNF α 之间的相互作用的方式使TNFR2三聚化成核,因而诱导TNFR2介导的信号传导。本发明的激动性TNFR2抗体可以能够诱导CD4⁺、CD25⁺、FOXP3⁺Treg细胞增殖。本发明的激动性TNFR2抗体还可以,例如,通过活化免疫调节性Treg细胞或通过直接结合在免疫效应细胞(诸如自身反应性细胞毒性T细胞)表面上的TNFR2并诱导细胞凋亡而抑制B淋巴细胞和/或细胞毒性T淋巴细胞(例如,CD8⁺T细胞)增殖。除非另有说明,否则术语“激动剂TNFR2抗体”和“激动性TNFR2抗体”还包括保留结合TNFR2并增强TNFR2信号转导能力的抗体片段,例如,如下所述的那些。

[0187] 如本文所用,术语“抗体”(Ab)是指与特定抗原特异性结合或与之免疫反应的免疫球蛋白分子,并且包括多克隆、单克隆、基因化的和其他修饰形式的抗体,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、异源偶联抗体(例如,双、三和四特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)以及抗体的抗原结合片段,包括,例如,Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、重组IgG(rIgG)片段和scFv片段。此外,除非另有说明,否则术语“单克隆抗体”(mAb)旨在包括完整分子,以及能够与靶蛋白特异性结合的抗体片段(诸如,例如,Fab和F(ab')₂片段)。Fab和F(ab')₂片段缺少完整抗体的Fc片段,从动物循环中清除得更快,并且可以比完整抗体具有更少的非特异性组织结合(参见Wahl等人,J.Nucl.Med.24:316,1983;其通过引用并入本文)。

[0188] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指保留特异性结合靶抗原的能力的抗体的一个或多个片段。抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来执行。抗体片段可以是,例如,Fab、F(ab')₂、scFv、SMIP、双抗体、三抗体、亲和抗体、纳米抗体、适体或结构域抗体。术语抗体的“抗原结合片段”涵盖的结合片段的示例包括但不限于:(i)Fab片段,由V_L、V_H、C_L和C_H1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')₂片段,包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由V_H和C_H1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段,(v)包括V_H和V_L结构域的dAb;(vi)dAb片段(Ward等人,Nature 341:544-546,1989),其由V_H结构域组成;(vii)dAb,其由V_H或V_L结构域组成;(viii)分离的互补决定区(CDR);以及(ix)可以任选地通过合成接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合。此外,尽管Fv片段的两个结构域V_L和V_H由单独的基因编码,但可以使用重组方法通过接头将它们连

接起来,该接头使它们可以形成单一蛋白链,其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见,例如,Bird等人,Science 242:423-426,1988,以及Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883,1988)。这些抗体片段可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且可以以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。抗原结合片段可以通过重组DNA技术、完整免疫球蛋白的酶促或化学切割,或在一些实施例中,通过本领域已知的化学肽合成方法产生。

[0189] 如本文所用,术语“抗肿瘤坏死因子受体2抗体”、“TNFR2抗体”、“抗TNFR2抗体部分”和/或“抗TNFR2抗体片段”等包括任何蛋白或含肽分子,所述任何蛋白或含肽分子包括能够与TNFR2特异性结合的免疫球蛋白分子的至少一部分,诸如但不限于重链或轻链的至少一个互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架区或其任何部分。TNFR2抗体还包括抗体样蛋白支架,诸如第十纤连蛋白III型结构域(10 F_n3),其中含有与抗体CDR相似的结构和溶剂可及性的BC、DE和FG结构环。 10 F_n3结构域的三级结构类似于IgG重链可变区的三级结构,并且本领域技术人员可以,例如,通过用TNFR2单克隆抗体的CDRH-1、CDRH-2或CDRH-3区的残基取代 10 F_n3的BC、DE和FG环的残基,将TNFR2单克隆抗体的CDR移植到纤连蛋白支架上。 10 F_n3结构域用作表位移植的支架的用途描述于,例如,WO 2000/034784,其公开内容通过引用并入本文。术语“抗肿瘤坏死因子受体2抗体”、“TNFR2抗体”等涵盖的另外的支架蛋白包括肽-Fc融合蛋白(描述于,例如,WO 2012/122378;以及US 8,633,297;其公开内容各自通过引用并入本文)。

[0190] 如本文所用,术语“双特异性抗体”是指对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体,通常是人抗体或人源化抗体。本发明的双特异性TNFR2抗体可以具有针对TNFR2和任何其他抗原(例如,对于细胞表面蛋白、受体、受体亚基或组织特异性抗原)的结合特异性。双特异性抗体也可以是包括两个单独的抗原结合结构域(例如,通过接头连接的两个scFv)的抗体或其抗原结合片段。scFv可以结合相同的抗原或不同的抗原。

[0191] 如本文所用,术语“嵌合”抗体是指具有衍生自一种来源生物体(诸如大鼠或小鼠)的免疫球蛋白的可变结构域序列(例如,CDR序列),和衍生自不同生物体(例如,人、另一灵长类动物、猪、山羊、兔、仓鼠、猫、犬、豚鼠、牛科家族成员(诸如牛、野牛、水牛、麋鹿和牦牛等)、奶牛、绵羊、马或野牛等)的免疫球蛋白的恒定区的抗体。产生嵌合抗体的方法是本领域已知的。参见,例如,Morrison,1985,Science 229(4719):1202-7;O'i等人,1986,BioTechniques 4:214-221;Gillies等人,1985,J.Immunol.Methods 125:191-202;美国专利号5,807,715;4,816,567;和4,816,397;其通过引用并入本文。

[0192] 如本文所用,术语“互补决定区”(CDR)是指在轻链和重链可变结构域中均发现的高变区。可变结构域的高度保守部分称为框架区(FR)。如本领域所理解的,根据背景和本领域已知的各种定义,描述抗体的高变区的氨基酸位置可以变化。可变结构域内的一些位置可以被视为混合高变位置,因为在一组标准下这些位置可以被视为在高变区内,而在另一组标准下这些位置可以被视为在高变区之外。这些位置中的一个或多个也可见于扩增的高变区域中。本发明包括在这些杂交高变位置上包含修饰的抗体。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个框架区,这些框架区主要采用 β -片状结构,并通过三个CDR连接,其形成环,这些环连接并且在某些情况下形成 β -片状结构的一部分。每条链中的CDR通过FR区以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的顺序紧密结合在一起,并且与其他抗体链中的CDR一

起有助于抗体靶结合位点的形成(参见Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md.1987;其通过引用并入本文)。如本文所用,除非另有说明,否则免疫球蛋白氨基酸残基的编号根据Kabat等人的免疫球蛋白氨基酸残基的编号系统进行。

[0193] 如本文所用,术语“保守突变”、“保守取代”或“保守氨基酸取代”是指用一种或多种氨基酸取代表现出相似理化性质(诸如极性、静电荷和/或空间体积)的一种或多种不同的氨基酸。下表1中总结了二十种天然存在的氨基酸中的每一种的这些性质。

[0194] 表1.天然氨基酸的代表性理化性质

[0195]

氨基酸	3字母代码	1字母代码	侧链极性	生理 pH (7.4) 下的静电特性	空间体积 [†]
丙氨酸	Ala	A	非极性	中性	小
精氨酸	Arg	R	极性	带正电荷的	大
天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	中间
天冬氨酸	Asp	D	极性	阴离子的	中间
半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性	中间
谷氨酸	Glu	E	极性	阴离子的	中间
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	中间
甘氨酸	Gly	G	非极性	中性	小
组氨酸	His	H	极性	在 pH 7.4 下中性和带正电荷的形式处于平衡状态	大
异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性	大
亮氨酸	Leu	L	非极性	中性	大
赖氨酸	Lys	K	极性	带正电荷的	大
蛋氨酸	Met	M	非极性	中性	大
苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性	大
脯氨酸	Pro	P	非极性	中性	中间
丝氨酸	Ser	S	极性	中性	小
苏氨酸	Thr	T	极性	中性	中间
色氨酸	Trp	W	非极性	中性	大体积
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	大
缬氨酸	Val	V	非极性	中性	中间

[†] 基于以 A³ 表示的体积: 50-100 为小, 100-150 为中间, 150-200 为大, >200 为大体积

[0196] 从该表中可以看出,保守氨基酸家族包括,例如,(i)G、A、V、L、I、P和M;(ii)D和E;(iii)C、S和T;(iv)H、K和R;(v)N和Q;以及(vi)F、Y和W。因此,保守突变或取代是将一种氨基酸取代为相同氨基酸家族的成员的突变或取代(例如,Ser取代为Thr或Lys取代为Arg)。

[0197] 如本文所用,术语“缀合物”是指通过一个分子的反应性官能团与另一分子的适当

反应性官能团的化学键合形成的化合物。可以另外产生缀合物,例如,作为彼此共价结合的两个多肽结构域,作为单个多肽链的一部分,其通过编码彼此在框架中的两个多肽的单个RNA转录物的翻译而合成。

[0198] 如本文在TNFR2激动剂的背景下所使用的,术语“构建体”是指含有与第二多肽结构域结合的第一多肽结构域的融合蛋白。多肽结构域可以各自独立地为激动剂TNFR2单链多肽,例如,如本文所述。第一多肽结构域可以与第二多肽结构域共价结合,例如,通过接头(诸如肽接头或二硫键等)。可用于连接激动性TNFR2构建体的多肽结构域的示例性接头包括但不限于Leriche等人,Bioorg. Med. Chem., 20: 571-582 (2012) 中所述的那些,其公开内容通过引用以其全文并入本文。

[0199] 如本文所用,术语“衍生的抗体”是指通过化学反应修饰以切割残基或添加非产自分离抗体的化学部分的抗体。衍生的抗体可通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过添加已知的化学保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割和/或与细胞配体或其他蛋白质连接而获得。可以通过已知的技术进行多种化学修饰中的任何一种,包括但不限于使用已建立的程序进行特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。另外,衍生物可以含有一种或多种非天然氨基酸,例如,使用琥珀抑制技术(参见,例如,美国专利号6,964,859;其通过引用并入本文)。

[0200] 如本文所用,术语“双抗体”是指包含两条多肽链的二价抗体,其中每个多肽链包括通过接头(例如,由五个氨基酸组成的接头)连接的 V_H 和 V_L 结构域,该接头过短以至在同一条肽链上无法实现 VH 和 VL 结构域的分子内缔合。这种构型迫使每个结构域与另一条多肽链上的互补结构域配对,从而形成同源二聚体结构。因此,术语“三抗体”是指包含三条肽链的三价抗体,每条肽链含有通过极短的接头(例如,由1-2个氨基酸组成的接头)连接的一个 VH 结构域和一个 VL 结构域,以在同一条肽链中实现 VH 和 VL 结构域的分子内缔合。为了折叠成它们的天然结构,以这种方式配置的肽通常发生三聚以使相邻肽链的 VH 和 VL 结构域在空间上彼此相邻,以实现正确折叠(参见Holliger等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-48, 1993;其通过引用并入本文)。

[0201] 如本文所用,抗体或其抗原结合片段的“二硫键结合的同等型”是具有特定内部二硫键结合模式的抗体或其抗原结合片段的形式。二硫键结合的同等型是给定抗体或其抗原结合片段的结构异构体,其氨基酸序列彼此没有区别,但表现出不同的二硫键连接性。例如,在人IgG2抗体或其变体的情况下,抗体可以以四种可能的二硫键结合的同等型中的一种存在,在本文中表示为同等型IgG2-A、IgG2-B、IgG2-A/B₁和IgG2-A/B₂。这些同等型中的每一种内的二硫键结合连接性在图5A-5D中以图形方式显示。

[0202] 如本文所用,TNFR2的“显性激动剂”是即使在不存在TNFR2配体(诸如TNF α)的情况下也能够促进TNFR2活化的激动剂(例如,激动性多肽,诸如单链多肽、抗体或其抗原结合片段)。例如,在不存在天然TNFR2配体(例如TNF α)的情况下,如果激动剂的EC₅₀增加小于200%(例如,小于200%、100%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%或更少),则TNFR2激动剂是显性激动剂。TNFR2活化可以,例如,通过测量TNFR2+细胞(诸如Treg细胞、MDSC、实质细胞和中枢神经系统细胞等)的增殖,以及通过测量NF κ B信号传导的活化(例如,通过在基因表达测定中监测选自CHUK、NFKBIE、NFKBIA、MAP3K11、TRAF2、TRAF3、relB和cIAP2/BIRC3组成的组的一种或多种基因的表达)进行评估。

[0203] 如本文所用,“双可变结构域免疫球蛋白”(“DVD-Ig”)是指通过接头结合两个单克隆抗体的靶结合可变结构域以产生四价、双靶向单剂的抗体。(Gu等人,Meth.Enzymol., 502:25-41,2012;其通过引用并入本文)。适用于本文所述的DVD轻链的接头包括Gu等人第30页表2.1所示的接头:短K链接头ADAAP(SEQ ID NO:24)(鼠)和TVAAP(SEQ ID NO:25)(人);长κ链接头ADAAPTVSIFP(SEQ ID NO:26)(鼠)和TVAAPSVFIFPP(SEQ ID NO:27)(人);短λ链接头QPKAAP(SEQ ID NO:28)(人);长λ链接头QPKAAPSVTLFPP(SEQ ID NO:29)(人);GS-短接头GGSGG(SEQ ID NO:30),GS-中等接头GGSGGGSG(SEQ ID NO:31),和GS-长接头GGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:32)(所有GS接头均是鼠或人接头)。用于DVD重链的合适的接头包括在Gu&Ghayur,2012,Methods in Enzymology 502:25-41的第30页的表2.1中标识的那些接头,通过引用并入本文:短接头AKTTAP(SEQ ID NO:33)(鼠)和ASTKGP(SEQ ID NO:34)(人);长接头AKTTAPSVYPLAP(SEQ ID NO:35)(鼠)和ASTKGPSVFPLAP(SEQ ID NO:36)(人);GS-短接头GGGGSG(SEQ ID NO:37),GS-中等接头GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:38),和GS-长接头GGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:39)(所有GS接头均是鼠或人接头)。

[0204] 如本文所用,术语“内源的”描述了天然存在于特定生物体(例如,人)或生物体中特定位置(例如,器官、组织或细胞,例如人细胞)的分子(例如,多肽、核酸或辅因子)。

[0205] 如本文所用,术语“表位”是指由多肽(诸如本文所述的抗体、其抗原结合片段、单链多肽或构建体)识别并结合的抗原的一部分。在蛋白抗原(例如TNFR2,例如,SEQ ID NO:1所示的人TNFR2或非人哺乳动物(例如本文所述的非人哺乳动物)的TNFR2)的背景下,表位可以是连续表位,其是通过肽键彼此共价连接的一个或多个氨基酸的单个不间断片段,其中表位的组成氨基酸被多肽(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽或构建体)结合。在以下实例1中描述了确定激动性TNFR2多肽与抗原内特定氨基酸结合的示例性测定。连续表位可以,例如,由抗原(诸如本文所述的TNFR2蛋白(例如,SEQ ID NO:1所示的人TNFR2))内的1、5、10、15、20或更多个氨基酸组成。例如,连续表位可以由抗原内的1、2、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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40个或更多个氨基酸组成。本文所述的由激动性多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段和构建体)结合的TNFR2上连续表位的示例包括KCSPG基序(SEQ ID NO:40),以及非人哺乳动物(例如,野牛、牛和本文所述的其他动物)的TNFR2蛋白上的相应区域的一个或多个连续残基或全部残基。在一些实施例中,表位可以是不连续的表位,其含有两个或更多个氨基酸片段,每个氨基酸片段在抗原的氨基酸序列中被一个或多个中间氨基酸残基彼此间隔。不连续的表位可以,例如,由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸残基的片段组成,诸如含有(i)人TNFR2的KCSPG基序(SEQ ID NO:40)或非人TNFR2的等效区域内的一种或多种氨基酸,以及(ii)人TNFR2的富含半胱氨酸的半胱氨酸结构域1(CRD1,残基48-76)或非人TNFR2的等效区域中其他位置的一种或多种氨基酸。

[0206] 如本文所用,术语“外源的”描述了未天然存在于特定生物体(例如,人)或生物体中特定位置(例如,器官、组织或细胞,例如人细胞)的分子(例如,多肽、核酸或辅因子)。外源物质包括从外部来源提供给生物体或从中提取的培养物的那些物质。

[0207] 如本文所用,术语“框架区”或“FW区”包括与CDR相邻的氨基酸残基。FW区残基可以存在于,例如,人抗体、啮齿动物衍生的抗体(例如,鼠抗体)、人源化抗体、灵长类化抗体、嵌合抗体、抗体片段(例如,Fab片段)、单链抗体片段(例如,scFv片段)、抗体结构域和双特异

性抗体等。

[0208] 如本文所用,术语“融合蛋白”是指通过共价键与另一分子连接的蛋白。融合蛋白可以通过,例如,一种蛋白的N末端与另一种蛋白的C末端之间的酰胺键形成反应化学合成。替代性地,含有与另一种蛋白共价结合的一种蛋白的融合蛋白可以通过编码融合蛋白的多核苷酸的表达(例如,从载体或细胞基因组)在细胞(例如,真核细胞或原核细胞)中重组表达。融合蛋白可以含有与接头共价结合的一种蛋白,而该接头又与另一分子共价结合。可用于形成融合蛋白的接头的示例包括含肽的接头,诸如含有天然存在或非天然存在的氨基酸的那些接头。在一些实施例中,可能期望在接头中包括D-氨基酸,因为这些残基在天然存在的蛋白中不存在,因此对内源蛋白酶的降解具有更大耐受性。可以使用本领域熟知的多种策略来制备接头,并且取决于接头的反应性组分,可以通过酶促水解、光解、酸性条件下的水解、碱性条件下的水解、氧化、二硫化物还原、亲核裂解或有机金属裂解进行裂解(Lerliche等人,Bioorg.Med.Chem.,20:571-582,2012)。

[0209] 如本文所用,术语“异种特异性抗体”是指对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体,优选为人或人源化抗体。传统上,异种特异性抗体的重组产生基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两个重链具有不同的特异性(Milstein等人,Nature 305:537,1983)。公开了类似的程序,例如,WO 93/08829,美国专利号6,210,668;6,193,967;6,132,992;6,106,833;6,060,285;6,037,453;6,010,902;5,989,530;5,959,084;5,959,083;5,932,448;5,833,985;5,821,333;5,807,706;5,643,759,5,601,819;5,582,996,5,496,549,4,676,980,WO 91/00360,WO 92/00373,EP 03089,Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991),Suresh等人,Methods in Enzymology 121:210(1986);其通过引用并入本文。异种特异性抗体可以包括Fc突变,这些突变迫使多特异性抗体中的正确链缔合,如Klein等人,mAbs 4(6):653-663,2012所述;其通过引用并入本文。

[0210] 如本文所用,术语“人抗体”是指其中基本上蛋白的每个部分(例如,CDR、框架、 C_L 、 C_H 结构域(例如, C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3})、铰链、(V_L 、 V_H))在人中基本上是非免疫原性的,仅具有极小序列变化或变异。人抗体可以在人细胞中产生(例如,通过重组表达),或者由能够表达功能重排的人免疫球蛋白(例如,重链和/或轻链)基因的非人动物或原核或真核细胞产生。此外,当人抗体是单链抗体时,它可以包括在天然人抗体中未发现的接头肽。例如,Fv可以包含接头肽,诸如两个至约八个甘氨酸或其他氨基酸残基,其连接重链的可变区和轻链的可变区。可以通过本领域已知的多种方法来制备人抗体,包括使用衍生自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。参见美国专利号4,444,887和4,716,111;以及PCT公开WO 1998/46645;WO 1998/50433;WO 1998/24893;WO 1998/16654;WO 1996/34096;WO 1996/33735;和WO 1991/10741;其通过引用并入本文。人抗体还可以使用不能表达功能性内源性免疫球蛋白,但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生。参见,例如,PCT公开WO 98/24893;WO 92/01047;WO 96/34096;WO 96/33735;美国专利号5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;5,885,793;5,916,771;和5,939,598;其通过引用并入本文。

[0211] 如本文所用,术语“人源化”抗体是指非人(例如,鼠)抗体的形式,其是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他靶结合亚结构域),其含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。通常,人源化抗体将基本上包含至少一个并且

通常是两个可变结构域的全部,其中所有或基本上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些。全部或基本上全部的FR区还可以是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白共有序列的一部分。抗体人源化的方法是本领域已知的。参见,例如,Riechmann等人,Nature 332:323-7,1988;美国专利号:5,530,101;5,585,089;5,693,761;5,693,762;和6,180,370至Queen等人;EP239400;PCT公开W0 91/09967;美国专利号5,225,539;EP592106;和EP519596;其通过引用并入本文。

[0212] 如本文所用,术语“疏水性侧链”是指相对于,例如,存在于侧链中的化学部分的空间或电子性质,在水中表现出低溶解度的氨基酸侧链。含有疏水性侧链的氨基酸的示例包括含有不饱和脂族烃的氨基酸,诸如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸和蛋氨酸,以及含有在生理pH下呈静电中性的芳香环系统的氨基酸,诸如色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。

[0213] 如本文所用,术语“免疫治疗剂”是指特异性结合免疫检查点蛋白(例如,免疫检查点受体或配体)并对受体或配体产生激动效应,从而促进受体或配体的信号转导并,例如,下调免疫应答的化合物,诸如本文所述的抗体、其抗原结合片段、单链多肽或构建体。免疫治疗剂包括能够特异性结合在造血细胞(诸如淋巴细胞(例如,T细胞))的表面上表达的受体,并活化由受体或配体诱导的信号传导,从而导致对例如内源性(“自身”)抗原的耐受性的化合物,诸如抗体、抗原结合片段、单链多肽或构建体。相对于在不存在免疫治疗剂的情况下表现出的由受体或配体诱导的信号传导,免疫治疗剂可以增强由受体或配体诱导的信号传导,例如,1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、100%、200%、300%、400%、500%或更多。可用于测量受体或配体信号传导程度的示例性测定包括,例如,酶联免疫吸附测定(ELISA)技术,用于测量与特定信号转导通路相关的蛋白表达变化的技术,以及基于聚合酶链反应(PCR)的技术,诸如定量PCR、逆转录PCR和实时PCR实验,可用于确定与特定信号转导通路相关的基因表达的变化等。免疫治疗剂的示例包括,例如,特异性结合并活化以下项中的一种或多种的抗体或其抗原结合片段:OX40L、TL1A、CD40L、LIGHT、BTLA、LAG3、TIM3、Singlecs、ICOS、B7-H3、B7-H4、VISTA、TMIGD2、BTNL2、CD48、KIR、LIR、LIR抗体、ILT、NKG2D、NKG2A、MICA、MICB、CD244、CSF1R、IDO、TGF β 、CD39、CD73、CXCR4、CXCL12、SIRPA、CD47、VEGF和神经纤毛蛋白。可以与本文所述的组合物和方法结合使用的免疫治疗剂的特定示例包括激动性抗PD-1抗体及其抗原结合片段,以及激动性抗PD-L1抗体及其抗原结合片段,和激动性抗CTLA-4抗体及其抗原结合片段。

[0214] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指衍生自单个克隆(包括任何真核、原核或噬菌体克隆)的抗体,而不是其产生方法。

[0215] 如本文所用,术语“多特异性抗体”是指对一种以上靶抗原表现出亲和力的抗体。多特异性抗体可以具有类似于完整免疫球蛋白分子的结构,并且包括Fc区,例如IgG Fc区。此类结构可以包括但不限于IgG-Fv、IgG-(scFv)₂、DVD-Ig、(scFv)₂-(scFv)₂-Fc和(scFv)₂-Fc-(scFv)₂。在IgG-(scFv)₂的情况下,scFv可以附接至重链或轻链的N末端或C末端。包括Fc区并且可以掺入TNFR2抗体或其抗原结合片段的示例性多特异性分子已由Kontermann, 2012,mAbs 4(2):182-197,Yazaki等人,2013,Protein Engineering,Design&Selection 26(3):187-193以及Grote等人,2012,in Proetzal&Ebersbach(编辑),Antibody Methods

and Protocols, Methods in Molecular Biology第901卷,第16章:247-263综述;其通过引用并入本文。在一些实施例中,基于IgG或DVD的片段或scFv,抗体片段可以是不具有Fc区的多特异性分子的组分。缺少Fc区并且可以掺入抗体或抗体片段的示例性多特异性分子包括scFv二聚体(双抗体)、三聚体(三抗体)和四聚体(四抗体)、Fab二聚体(通过粘附性多肽或蛋白质结构域缀合)和Fab三聚体(化学缀合)由Hudson and Souriau,2003,Nature Medicine 9:129-134所述;其通过引用并入本文。

[0216] 如本文所用,术语“髓源性抑制细胞”或“MDSC”是指免疫系统的细胞,其调节多种效应细胞和抗原呈递细胞(诸如T细胞、NK细胞、树突状细胞和巨噬细胞等)的活性。髓源性抑制细胞通过其基因表达谱进行区分,并表达全部或部分蛋白质和小分子,这些蛋白和小分子选自由以下项组成的组:B7-1(CD80)、B7-H1(PD-L1)、CCR2、CD1d、CD1d1、CD2、CD31(PECAM-1)、CD43、CD44、补体组分C5a R1、F4/80(EMR1)、Fc γ RIII(CD16)、Fc γ RII(CD32)、Fc γ RIIA(CD32a)、Fc γ RIIB(CD32b)、Fc γ RIIB/C(CD32b/c)、Fc γ RIIC(CD32c)、Fc γ RIIIA(CD16A)、Fc γ RIIIB(CD16b)、半乳糖凝集素-3、GP130、Gr-1(Ly-6G)、ICAM-1(CD54)、IL-1RI、IL-4R α 、IL-6R α 、整合素 α 4(CD49d)、整合素 α L(CD11a)、整合素 α M(CD11b)、M-CSFR、MGL1(CD301a)、MGL1/2(CD301a/b)、MGL2(CD301b)、一氧化氮、PSGL-1(CD162)、L-选择素(CD62L)、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-3(CD33)、转铁蛋白受体(TfR)、VEGFR1(Flt-1)和VEGFR2(KDR或Flk-1)。特别地,MDSC不表达选自由以下项组成的组蛋白质:B7-2(CD86)、B7-H4、CD11c、CD14、CD21、CD23(Fc ϵ RII)、CD34、CD35、CD40(TNFRSF5)、CD117(c-kit)、HLA-DR和Sca-1(Ly6)。

[0217] 如本文所用,术语“非天然恒定区”是指衍生自与抗体可变区不同的来源的抗体恒定区,或者是人产生的合成多肽,其氨基酸序列不同于天然抗体恒定区序列。例如,含有非天然恒定区的抗体可以具有衍生自非人来源(例如,小鼠、大鼠或兔)的可变区和衍生自人来源的恒定区(例如,人抗体恒定区),或衍生自其他灵长类动物、猪、山羊、兔、仓鼠、猫、犬、豚鼠、牛科家族成员(诸如牛、野牛、水牛、麋鹿和牦牛等)、牛、绵羊、马或野牛等的恒定区。

[0218] 如本文所用,术语“百分比(%)序列同一性”是指在比对序列并引入缺口,如有必要,以达到最大百分比序列同一性后(例如,可以在候选序列和参考序列中的一者或两者中引入缺口以实现最佳比对,而为了比较,可以忽略非同源序列),候选序列与参考序列的氨基酸(或核酸)残基相同的氨基酸(或核酸)残基的百分比。为了确定百分比序列同一性的目的,比对可以以本领域技术范围内的各种方式来实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。例如,经比对与候选序列进行比较的参考序列可以表明,候选序列在候选序列的全长或候选序列的连续氨基酸(或核酸)残基的选定部分中具有50%至100%的序列同一性。为了比较而比对的候选序列的长度可以是,例如,参考序列长度的至少30%(例如,30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%)。当候选序列中的位置被与参考序列中相应位置相同的氨基酸残基占据时,则分子在该位置相同。

[0219] 如本文所用,术语“灵长类化抗体”是指包含灵长类动物衍生的抗体的框架区和非灵长类动物来源的抗体的其他区域,诸如CDR和/或恒定区的抗体。产生灵长类化抗体的方法是本领域已知的。参见例如,美国专利号5,658,570;5,681,722;和5,693,780;其通过引

用并入本文。例如,本文所述的灵长类化抗体或其抗原结合片段可以通过将非灵长类动物抗体或其抗原结合片段的CDR插入含有灵长类动物的一个或多个框架区的抗体或其抗原结合片段中产生。

[0220] 如本文所用,在多核苷酸片段的背景中的术语“可操作地连接”旨在表示两个多核苷酸片段被连接,使得由两个多核苷酸片段编码的氨基酸序列保持在框内。

[0221] 如本文所用,术语“药代动力学特征”是指在将药物施用于患者之后,治疗剂(例如,多肽,诸如本公开内容的激动性TNFR2抗体、其抗原结合片段、单链多肽或构建体)随时间的吸收、分布、代谢和清除。

[0222] 如本文所用,术语“调控序列”包括控制,例如,抗体链基因的转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,聚腺苷酸化信号)。此类调控序列描述于,例如,Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185(Academic Press, San Diego, CA, 1990);其通过引用并入本文。

[0223] 如本文所用,术语“scFv”是指单链Fv抗体,其中抗体的重链和轻链的可变结构域已连接形成一条链。scFv片段含有一条多肽链,该多肽链包括由接头分开的抗体轻链(VL)的可变区(例如,CDR-L1、CDR-L2和/或CDR-L3)和抗体重链(VH)的可变区(例如,CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3)。连接scFv片段的VL和VH区的接头可以是由蛋白原性氨基酸组成的肽接头。可以使用其他接头以增加scFv片段对蛋白水解降解的耐受性(例如,含有D-氨基酸的接头),以增强scFv片段(例如,亲水性接头,诸如含有聚乙二醇的接头或含有重复甘氨酸和丝氨酸残基的多肽)的溶解度,以改善分子的生物物理稳定性(例如,含有形成分子内或分子间二硫键的半胱氨酸残基的接头),或减弱scFv片段的免疫原性(例如,含有糖基化位点的接头)。scFv分子是本领域已知的,并且例如描述于美国专利5,892,019, Flo等人, (*Gene* 77:51, 1989); Bird等人, (*Science* 242:423, 1988); Pantoliano等人, (*Biochemistry* 30:10117, 1991); Milenic等人, (*Cancer Research* 51:6363, 1991); 和 Takkinen等人, (*Protein Engineering* 4:837, 1991)。scFv分子的VL和VH结构域可以衍生自一种或多种抗体分子。本领域普通技术人员还将理解,本文所述的scFv分子的可变区可以经修饰使得它们的氨基酸序列与衍生它们的抗体分子不同。例如,在一个实施例中,可以进行导致在氨基酸残基处发生保守取代或改变的核苷酸或氨基酸取代(例如,在CDR和/或框架残基中)。替代性地或另外地,使用本领域公认的技术对CDR氨基酸残基进行突变以优化抗原结合。scFv片段描述于,例如, WO 2011/084714;其通过引用并入本文。

[0224] 如本文所用,短语“特异性结合”是指确定抗原在蛋白的异质群和其他生物分子(例如,被抗体或其抗原结合片段特异性地识别)中存在抗原的结合反应。与抗原特异性结合的抗体或其抗原结合片段将以小于100nM的 K_D 与抗原结合。例如,特异性结合抗原的抗体或其抗原结合片段将以至多100nM(例如,1pM至100nM之间)的 K_D 与抗原结合。不显示与特定抗原或其表位特异性结合的抗体或其抗原结合片段,对于该特定抗原或其表位,其 K_D 大于100nM(例如,大于500nm、1 μ M、100 μ M、500 μ M或1mM)。可以使用多种免疫测定形式以选择与特定蛋白或碳水化合物发生特异性免疫反应的抗体。例如,常规使用固相ELISA免疫测定以选择与蛋白或碳水化合物发生特异性免疫反应的抗体。有关可以用于确定特定免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述参见Harlow&Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York (1988) and Harlow&Lane, *Using Antibodies, A*

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York (1999)。

[0225] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”是指针对特定疾病或病况,诸如免疫性疾病(例如,自身免疫性疾病),接受治疗(例如,通过施用激动性TNFR2多肽,诸如本文所述的抗体、其抗原结合片段、单链多肽或构建体)的生物体。受试者和患者的示例包括接受针对免疫性疾病或病况(例如,自身免疫性疾病、移植物抗宿主病、同种异体移植物排斥、过敏反应和哮喘等)的治疗的哺乳动物,诸如人、灵长类动物、猪、山羊、兔、仓鼠、猫、犬、豚鼠、牛科家族成员(诸如牛、野牛、水牛和牦牛等)、绵羊和马等。可以使用本文所述的组合物和方法治疗的患者可能患有已确诊的疾病(例如,已确诊的免疫性疾病,例如自身免疫性疾病),在这种情况下,患者已确诊患有该疾病,并已长时间显示出该疾病的症状(例如,经过数天、数周、数月或数年的过程)。替代性地,患者可具有特定疾病的症状,诸如本文所述的免疫病症,但是尚未由医师确诊。可以使用本文所述的组合物和方法治疗的其他患者包括那些已确诊患有免疫病症的患者,并且迄今可能显示或可能尚未显示该疾病的症状。例如,有资格使用本文所述的组合物和方法进行治疗的患者可被描述为已确诊但无症状,前提是该患者已接受免疫性病症的诊断,例如多发性硬化,例如,通过检测由于自身反应性T细胞活性而导致的患者一个或多个神经元周围的髓鞘耗竭,即使患者可能尚未出现多发性硬化的症状(例如,缺乏平衡、认知能力下降、视力模糊或协调能力减弱等)。已确诊患有免疫性病况但无症状的患者的另一示例包括已确诊患有类风湿性关节炎的患者,例如,通过检测从患者体内分离出的淋巴样品中的自身反应性T细胞,即使患者尚未出现与该疾病相关的症状,例如关节痛、关节僵硬、肌肉范围或运动减少等。

[0226] 如本文所用,术语“转染”是指通常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞中的多种技术中的任一种,例如,电穿孔、脂转染、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。

[0227] 如本文所用,术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗,其中目的是抑制或减缓(减轻)非期望的生理变化或病症,诸如免疫性病症(例如,自身免疫性疾病、过敏反应、移植物抗宿主病或同种异体移植物排斥)。有益或期望的临床治疗结果包括但不限于,症状的减轻、疾病程度的减少、疾病状态的稳定(即不恶化)、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或缓解、以及可检测或不可检测的缓解(部分或全部)。需要治疗的那些患者包括已患有病况或病症的那些患者,以及易于患病况或病症的那些患者或其中病况或病症将被抑制的那些患者。

[0228] 如本文所用,术语“肿瘤坏死因子受体超家族”、“TNFR超家族”或“TNFRS”是指一组具有羧基末端细胞内结构域和氨基末端细胞外结构域的I型跨膜蛋白,其特征在于常见的富含半胱氨酸的结构域(CRD)。TNFR超家族包括由于与TNF超家族中的一种或多种配体结合而介导细胞信号传导的受体。TNFR超家族可分为两个亚组:含有细胞内死亡结构域的受体和缺乏该结构域的受体。死亡结构域是80个氨基酸的基序,可在受体活化后传播凋亡信号转导级联反应。含有细胞内死亡结构域的示例性TNFR超家族成员包括TNFR1,而TNFR2代表未含有该结构域的TNFR超家族蛋白。TNFR超家族的成员包括TNFR1、TNFR2、RANK、CD30、CD40、淋巴毒素 β 受体(LT- β R)、OX40、Fas受体、Decoy受体3(DCR3)、CD27、4-1BB、死亡受体4(DR4)、死亡受体5(DR5)、Decoy受体1(DCR1)、Decoy受体2(DCR2)、护骨素、TWEAK受体、TACI、BAFF受体、疱疹病毒进入介体、神经生长因子受体、B细胞成熟抗原、糖皮质激素诱导的TNFR相关TROY、死亡受体6(DR6)、死亡受体3(DR3)和蜕皮生长素A2受体。

[0229] 如本文所用,术语“可变区CDR”包括CDR或互补决定区中的氨基酸,如使用基于序列或结构的方法所识别的。如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”是指在重链和轻链多肽的可变区中发现的非连续抗原结合位点。这些特定区描述于Kabat等人,J.Biol.Chem.252:6609-6616,1977和Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242,1991;by Chothia等人(J.Mol.Biol.196:901-917,1987),和MacCallum等人,(J.Mol.Biol.262:732-745,1996),其中的定义包括彼此比较时重叠的氨基酸残基或氨基酸残基的子集。在某些实施例中,术语“CDR”是基于序列比较由Kabat定义的CDR。

[0230] 如本文所用,术语“载体”包括核酸载体,例如,DNA载体,诸如质粒、RNA载体、病毒或其他合适的复制子(例如,病毒载体)。已开发多种载体用于将编码外源蛋白的多核苷酸递送至原核或真核细胞中。此类表达载体的示例公开于,例如,WO 1994/11026;其通过引用并入本文。本文所述的表达载体含有多核苷酸序列以及,例如,用于蛋白表达和/或将这些多核苷酸序列整合到哺乳动物细胞的基因组中的其他序列元件。可用于表达本文所述的抗体和抗体片段的某些载体包括含有调控序列的质粒,诸如指导基因转录的启动子和增强子区。用于表达含有多核苷酸的抗体和抗体片段的其他有用的载体含有提高这些基因的翻译速率或改善基因转录产生的mRNA的稳定性或核输出的多核苷酸序列。这些序列元件包括,例如,5'和3'非翻译区、内部核糖体进入位点(IRES)和聚腺苷酸化信号位点,以指导表达载体上携带的基因的有效转录。本文所述的表达载体还可以含有编码用于选择含有载体的细胞的标志物的多核苷酸。合适的标志物的示例包括编码对抗生素(诸如氨基青霉素、氯霉素、卡那霉素或诺尔丝菌素)的耐受性的基因。

[0231] 如本文所用,术语“VH”是指抗体的免疫球蛋白重链的可变区,包括Fv、scFv或Fab的重链。提及“VL”是指免疫球蛋白轻链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab的轻链。抗体(Ab)和免疫球蛋白(Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。尽管抗体表现出对特定靶标的结合特异性,但免疫球蛋白包括抗体和缺乏靶标特异性的其他抗体样分子。天然抗体和免疫球蛋白通常是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成。天然抗体的每条重链在氨基末端具有可变结构域(VH),其后是多个恒定结构域。天然抗体的每条轻链在氨基末端具有可变结构域(VL),并且在羧基末端具有恒定结构域

附图说明

[0232] 图1显示了人TNFR2的氨基酸序列,突出显示的区域显示了可以由本公开内容的TNFR2激动性抗体结合的示例性表位。人TNFR2在本文中进行编号,以在1位的N末端蛋氨酸开始并在461位的C末端丝氨酸结束(SEQ ID NO:1)。对TNFR2中氨基酸位置的所有参考均以图1所示的TNFR2编号方案为背景。

[0233] 图2是显示了本公开内容的示例性TNFR2激动性抗体对Treg细胞的增殖效应的图。该图中所示的结果通过将本文所述的激动性TNFR2抗体TNFRAG1(以不同浓度(沿X轴显示))与Treg细胞孵育48-72小时获得。沿y轴的值表示Treg细胞在所研究细胞群中的百分比。数据代表35项独立实验的平均值。

[0234] 图3是显示天然TNFR2激动剂TNF α 对由本公开内容的TNFR2激动剂抗体TNFRAG1诱导的Treg细胞扩增的效应的图。沿x轴的值表示在体外Treg细胞群中,存在单独的IL-2、TNF

α 或抗体TNFRAG1,或存在与20ng/ml的TNF α 组合增加浓度的抗体TNFRAG1。沿y轴的值表示Treg细胞在所研究细胞群中的百分比。这些数据证明TNF α 的存在进一步增加了本公开内容的TNFR2激动剂抗体(诸如TNFRAG1)刺激Treg细胞增殖的能力。这些数据与本公开内容的TNFR2激动剂抗体通过结合TNFR2单体从而形成三聚体结构以促进TNFR2活化的能力相一致。该结合事件使各个TNFR2分子彼此紧密接近,并在空间上暴露TNFR2表面上可能由内源性配体(例如TNF α)结合的位点。在不受机制限制的情况下,该事件序列表示一种通路,本公开内容的TNFR2激动剂多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段和构建体)通过该通路可以在体内实现TNFR2活化。

[0235] 图4是显示抗TNF α 抗体对本公开内容的激动性TNFR2抗体TNFRAG1刺激Treg细胞增殖的能力的抑制效应的图。沿x轴的值表示存在于体外Treg细胞群中的抗TNF α 抗体的浓度,以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 计。沿x轴显示的所有条件均包括2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的TNFRAG1。沿y轴的值表示Treg细胞在所研究细胞群中的百分比。

[0236] 图5A-5D是比较存在于人IgG2同种型抗体的IgG2-A(图5A)、IgG2-B(图5B)、IgG2-A/B₁(图5C)和IgG2-A/B₂(图5D)同等型的二硫键结合布置的一系列示意图。细线表示连接每个抗体重链或轻链各个部分的二硫键,由阴影矩形表示。重链由每种抗体的更长、最外面的矩形表示。在每个重链中,黑色阴影表示恒定区,浅阴影表示可变区。轻链由每种抗体的最短、最内面的矩形表示。在每个轻链中,较深的阴影表示恒定区,较浅的阴影表示可变区。

[0237] 图6A是显示通过免疫荧光评估的来自患有癌症的人受试者的Treg细胞、来自健康人受试者的Treg细胞和来自1型糖尿病患者患者的Treg细胞中TNFR2的表达密度的图。从患有癌症的受试者获得的Treg细胞中TNFR2的平均荧光强度(MFI)为147.435(SEM 29.053, n=10);从健康受试者获得的Treg细胞中TNFR2的MFI为59.055(SEM 9.545, n=10);从1型糖尿病患者获得的Treg细胞中TNFR2的MFI为29.313(SEM 2.894, n=24)。去除Grubbs检验离群值。

[0238] 图6B是显示通过免疫荧光评估的来自患有癌症的人受试者的Teff细胞、来自健康人受试者的Teff细胞和来自1型糖尿病患者患者的Teff细胞中TNFR2的表达密度的图。从患有癌症的受试者获得的Teff细胞中TNFR2的平均荧光强度(MFI)为32.070(SEM 6.290, n=10);从健康受试者获得的Teff细胞中TNFR2的MFI为40.811(SEM 6.466, n=10);从1型糖尿病患者获得的Teff细胞中TNFR2的MFI为66.600(SEM 1.815, n=10)。去除Grubbs检验离群值。

[0239] 图6C是显示在将TNFRAG1与新鲜分离的外周人CD4⁺细胞群孵育48小时后,激动剂TNFR2抗体TNFRAG1对Treg细胞增殖的影响(n=13)的图。沿x轴的值代表抗体的浓度;沿y轴的值代表淋巴细胞群中Treg细胞的百分比。数据是平均值 \pm SEM。

[0240] 图6D是显示在存在内源性TNFR2配体TNF α (20ng/ml)的情况下,将TNFRAG1与新鲜分离的外周人CD4⁺细胞群孵育48小时后,激动剂TNFR2抗体TNFRAG1对Treg细胞增殖的影响(n=2)的图。沿x轴的值代表抗体的浓度;沿y轴的值代表淋巴细胞群中Treg细胞的百分比。数据是平均值 \pm SEM。

[0241] 图7A是显示具有TNFRAG1的互补决定区(CDR)的F(ab')₂抗体片段对Treg细胞增殖的影响的图。沿x轴的值代表抗体片段的浓度;沿y轴的值表示相对于经白介素2(IL-2)处理的Treg细胞标准化的Treg细胞数量的相对增加。数据是平均值 \pm SEM。这些数据表明,F

(ab')₂抗体片段中不存在的功能性Fc区对于TNFRAG1诱导Treg增殖不是必需的。

[0242] 图7B是显示在交联抗体(2.5μg/ml)存在下TNFRAG1对Treg细胞增殖的影响的图。交联抗体ab9165(Abcam)与相邻TNFRAG1抗体的Fc区结合,从而增加Treg细胞表面上TNFRAG1的局部密度。数据是平均值±SEM。

[0243] 图7C显示了比较在TNFα存在下(20mg/ml,左),激动剂TNFR2抗体MR2-1(Abcam)对Treg细胞增殖的影响,以及TNFα单独使用对Treg细胞增殖的影响(右)的两个图。沿x轴的值代表TNFR2激动剂的浓度;沿y轴的值代表Treg细胞量的相对增加。

[0244] 图7D是显示IL-2、TNFα和TNFRAG1对外周人CD4+细胞群中可溶性TNFR2分泌的影响的图。沿y轴的值是从定量可溶性TNFR2的酶联免疫吸附测定(ELISA)获得的荧光强度测量值。

[0245] 图8A-8E是显示TNFRAG1对外周人淋巴细胞中Treg增殖的影响的图。图8A显示了外周淋巴细胞与TNFRAG1孵育时观察到的CD8+Teff细胞减少的总体趋势。图8B显示了TNFRAG1对单独Teff细胞的影响。图8C显示了在不存在雷帕霉素和TNFα的情况下(左),在不存在雷帕霉素和存在TNFα的情况下(中),或者在存在雷帕霉素和不存在TNFα的情况下(右),与含有以4:1比例的Teff细胞和Treg细胞的混合物孵育时TNFRAG1对Teff细胞量的影响。图8D显示了在不存在雷帕霉素和TNFα的情况下(左),在不存在雷帕霉素和存在TNFα的情况下(中),或者在存在雷帕霉素和不存在TNFα的情况下(右),与含有以2:1比例的Teff细胞和Treg细胞的混合物孵育时TNFRAG1对Teff细胞量的影响。图8E显示了在不存在雷帕霉素和TNFα的情况下(左),在不存在雷帕霉素和存在TNFα的情况下(中),或者在存在雷帕霉素和不存在TNFα的情况下(右),与含有以1:1比例的Teff细胞和Treg细胞的混合物孵育时TNFRAG1对Teff细胞量的影响。在所有实验中,将细胞与可溶性抗CD3抗体(Hit3a)和IL-2(50U/ml)在10%FBS RPMI中孵育4天。

[0246] 图9A是显示TNFRAG1对外周人CD4+细胞中基因表达的影响的图。选择性上调具有Treg细胞特征的基因的表达(用星号表示)。

[0247] 图9B是显示外周CD4+细胞与TNFRAG1孵育后被上调的特定基因的图。

[0248] 图9C是显示表明TNFRAG1对Treg细胞特有的基因ETS(左)、EP300(中)和CREB(右)的表达的影响的图。为了比较,用单独的IL-2(“无”)、TNFRAG1(“TNFR2激动剂”)或TNFR2拮抗剂抗体(“TNFR2拮抗剂”)处理细胞。

[0249] 图10A是显示糖酵解途径,以及在糖酵解过程中表达的各种基因,和谷氨酰胺分解途径,以及在谷氨酰胺分解过程中表达的各种基因的图。

[0250] 图10B是显示TNFRAG1与外周人CD4+细胞孵育后,TNFRAG1对糖酵解相关基因表达的影响的图。Treg细胞的特征在于糖酵解减少。这些数据表明,TNFRAG1在与外周人CD4+细胞孵育后诱导Treg细胞相对量的增加。

[0251] 图10C是显示TNFRAG1与外周人CD4+细胞孵育后,TNFRAG1对谷氨酰胺分解相关基因表达的影响的图。Treg细胞的特征在于谷氨酰胺分解增加。这些数据表明,TNFRAG1在与外周人CD4+细胞孵育后诱导Treg细胞相对量的增加。

[0252] 图11A是显示Krebs循环以及该途径的早期步骤对上调衣康酸酯(自身免疫抑制剂)的影响的图。

[0253] 图11B是显示TNFRAG1与外周人CD4+细胞孵育后,TNFRAG1对参与Krebs循环的基因

表达的影响的图。这些数据表明, TNFRAG1上调Krebs循环中早期基因的表达, 从而导致衣康酸酯增加。

[0254] 图11C是显示TNFRAG1与外周人CD4+细胞孵育后, TNFRAG1对KEAP1 (已知的炎症和自身免疫的诱导剂) 表达的影响的图。

[0255] 图12A是显示Treg细胞的代谢偏好的图。Treg细胞表现出糖酵解减少、谷氨酰胺分解升高和脂肪酸消耗增加。

[0256] 图12B-12D是显示TNFRAG1与外周人CD4+细胞孵育后, TNFRAG1对参与脂肪酸代谢的基因CPT1A (图12B)、CPT1B (图12C) 和AMPK (图12D) 的表达的影响的一系列图。这些数据进一步表明TNFRAG1选择性诱导Treg细胞增殖的能力。

[0257] 图13A和13B是显示ELISA实验结果的表, 该实验证实TNFRAG1结合的TNFR2上的表位。富含半胱氨酸的结构域2 (CRD2) 中的表位用方括号指示。图13A和13B所示的氨基酸序列从第一个序列到最后一个序列分别对应于SEQ ID NO:49-SEQ ID NO:70。

[0258] 图14是与TNFR2的CRD2结合的TNFR2激动剂抗体的结构模型。

[0259] 图15是显示ELISA实验结果的表, 该实验进一步证实由TNFRAG1结合的TNFR2上的表位。图15中所示的氨基酸序列从第一个序列到最后一个序列分别对应于SEQ ID NO:49-SEQ ID NO:71。

具体实施方式

[0260] 本文所述的激动性TNFR2多肽, 诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体, 可以促进表达TNFR2的细胞的增殖、保护、愈合和/或再生。这可以, 例如, 通过结合TNFR2 (例如, 在调节性T细胞 (Treg细胞)、髓源性抑制细胞 (MDSC) 或TNFR2+体细胞 (例如, 实质细胞, 诸如中枢神经系统的细胞 (例如, 神经元) 等) 并诱导受体三聚化实现。天然配体TNF α , 诸如结合膜的三聚体TNF α , 可以增强TNFR2激动剂多肽的活性。不受机制限制, 该三聚事件可通过使各个TNFR2蛋白彼此紧邻而促进TNFR2活化, 从而通过MAPK/NF κ B/TRAF2/3通路促进细胞增殖。TNFR2信号转导的特征还在于三聚体状态下可溶性TNFR2 (sTNFR2) 的分泌, 以及p300和CBP (与Foxp3转录位点结合的两种胞内蛋白) 的双重活化, 从而增强细胞的稳定性和维持性。重要的是, TNFR2信号传导的活化对T效应细胞 (诸如CD8+T细胞) 具有抑制作用。对于这些细胞, TNFR2激动导致细胞死亡。

[0261] 本文所述的激动性TNFR2多肽可用于促进多种TNFR2+组织中的这种三聚化事件。因此, 本文所述的组合物和方法提供了重要的生理益处, 因为本公开内容的激动性TNFR2多肽可用于提高Treg细胞和/或MDSC活性, 并减少T效应细胞的活性, 从而抑制自身免疫、移植物抗宿主病 (GVHD)、炎症和移植物排斥以及本文所述的其他病理。本公开内容的组合物和方法还可用于直接杀死效应T细胞, 例如CD8+T细胞, 包括与内源性 (“自身”) 抗原反应的那些。本文所述的激动性TNFR2多肽另外提供了刺激TNFR2+组织和器官再生的有益特征, 并且可以用于治疗以组织变性和器官衰竭为特征的多种疾病。

[0262] 本文所述的TNFR2多肽 (例如, 抗体、其抗原结合片段、单链多肽和构建体) 特异性结合TNFR2内的表位, 其促进受体活化和上述各种有利的生物学活性。人TNFR2含有以下四个富含半胱氨酸结构域 (CRD): CRD1 (SEQ ID NO:1的氨基酸残基48-76)、CRD2 (SEQ ID NO:1的氨基酸残基78-120)、CRD3 (SEQ ID NO:1的氨基酸残基121-162) 和CRD4 (SEQ ID NO:1的

氨基酸残基162-202)。本文所述的激动性TNFR2多肽在CRD1、CRD2和/或CRD3内的一个或多个表位处特异性结合TNFR2。在一些实施例中,激动性TNFR2多肽不结合CRD4内的表位。例如,本公开内容的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可以在对应于一个或多个以下残基的表位处结合人TNFR2:

[0263] (a) SEQ ID NO:1的氨基酸56-60 (KCSPG);

[0264] (b) SEQ ID NO:1的氨基酸101-107 (CSSDQVET);

[0265] (c) SEQ ID NO:1的氨基酸115-142

[0266] (NRICTCRPGWYCALSQEGCRLCAPLRK);

[0267] (d) SEQ ID NO:1的氨基酸26-45 (QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC);

[0268] (e) SEQ ID NO:1的氨基酸90-109 (REQNRICTCRPGWYCALSQ);

[0269] (f) SEQ ID NO:1的氨基酸98-117

[0270] (CRPGWYCALSQEGCRLCAP);

[0271] (g) SEQ ID NO:1的氨基酸106-125

[0272] (LSQEGCRLCAPLRKCRPGF);和/或

[0273] (h) SEQ ID NO:1的氨基酸108-127

[0274] (KQEGCRLCAPLRKCRPGFV),

[0275] 或非人哺乳动物(例如本文所述的非人哺乳动物)的TNFR2内的等效表位。

[0276] 本公开内容部分基于以下发现:当这些分子为IgG2-B同种型时,激动性TNFR2多肽(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽和构建体)显示出基本上改善的TNFR2活化效应。如以下实施例中所述,目前已经发现,相对于其他同种型的TNFR2多肽,这类TNFR2多肽在以下方面表现出令人惊讶的优越能力:活化TNFR2信号传导,促进Treg细胞和MDSC增殖,以及愈合、保护和再生表达TNFR2的组织和器官。

[0277] 本公开内容潜在的另一发现是发现,相对于在一个或多个如上所述的表位处特异性结合TNFR2的多肽,含有在空间上彼此分离小于约133 Å的抗原结合位点的激动性TNFR2多肽表现出出乎意料的优越的TNFR2活化效应,但含有彼此分离约133 Å或更多的抗原结合位点。此类多肽的示例包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4抗体及其抗原结合片段,其含有彼此分离约90 Å至约133 Å的抗原结合位点,并且特别包括IgG1抗体及其抗原结合片段,其含有彼此分离约117 Å的抗原结合位点,以及含有彼此分离约125 Å的抗原结合位点的IgG3抗体及其抗原结合片段。

[0278] 可以将本公开内容的激动性TNFR2多肽配制成药物组合物。优选地,存在于药物组合物中的多肽采用单个二硫键结合的同等型。例如,本公开内容的药物组合物包括含有激动性TNFR2多肽的那些药物组合物,其中,例如,药物组合物中10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或更高的多肽以单个二硫键结合的同等型存在。本公开内容的激动性TNFR2多肽可以有利地采用IgG2-B二硫键结合的同等型,令人惊讶地发现,相对于其他IgG2二硫键结合的同等型,诸如IgG2-A、IgG2-A/B₁和IgG2-A/B₂同等型,该同等型促进基本上更稳健水平的TNFR2活化。这些同等型在图5A-5D中以图形方式显示。本公开内容的多肽可以经工程化以主要采用IgG2-B同等型,例如,通过将突变引入禁止其他二硫键结合的同等型的形成的IgG2重链恒定1(CH1)结构域。

在排除上述其余同等型时,促进IgG2-B同等型形成的人IgG2 CH1结构域中的氨基酸序列的示例性突变包括SEQ ID NO:8所示的人IgG2 CH1结构域氨基酸序列的127位处的半胱氨酸残基(根据本文所述的Kabat编号方案)的缺失和/或取代。例如,为了工程化IgG2抗体或其抗原结合片段以主要采用IgG2-B同等型,可以在SEQ ID NO:8的半胱氨酸残基127处引入保守的氨基酸取代。主要存在于IgG2-B同等型中的示例性IgG2 CH1结构域具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列,其相对于SEQ ID NO:8含有C127S取代。

[0279] 以下生物学活性是,相对于(i)含有彼此分离大于133 Å的抗原结合位点,和/或(ii)主要不存在于单个二硫键结合的同等型(例如,IgG2-B同等型)中的TNFR2结合多肽,由本公开内容的多肽实现的激动性TNFR2表型的示例:

[0280] (a) 例如,通过结合并活化Treg细胞表面上的TNFR2以增强Treg细胞的增殖和/或直接扩增;

[0281] (b) 例如,通过结合并活化MDSC表面上的TNFR2以增强MDSC的增殖和/或直接扩增;

[0282] (c) T效应细胞,诸如CD8+T细胞(例如,自身反应性CD8+T细胞)耗竭;和/或

[0283] (d) 增强表达TNFR2的实质细胞的增殖和/或直接扩增。

[0284] 以下各节提供了本文所述激动性TNFR2多肽的示例性特征的描述,诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体,以及它们在治疗方法中的用途。

[0285] 激动性TNFR2多肽

[0286] IgG同种型抗体促进优异的TNFR2激动作用

[0287] 如上文和本文所述,通过本文所述的TNFR2激动剂多肽(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽和构建体)实现了稳健的TNFR2活化。此类多肽可以具有本文所述的激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中一个或多个、或全部,或与相应的TNFRAG1的CDR具有至少85%序列同一性(例如,至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%序列同一性)的一个或多个CDR具有人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。具有修饰的IgG1和IgG2同等型的那些多肽特别有利,诸如那些含有有利于IgG2-B二硫键结合的同等型的CH1结构域的那些多肽。人IgG2抗体各种同等型的二硫键结合模式如图5A-5D所示。如图5B所示,IgG2-B同等型表现出二硫键结合模式,相对于其他IgG2同等型,该二硫键结合模式产生更窄且构象受限的结构。此结构非常适合在细胞(例如,Treg细胞、MDSC或表达TNFR2的实质细胞)表面结合TNFR2,并使受体单体彼此接近,从而促进受体三聚化,进而促进受体活化。

[0288] 为了稳定IgG2-B二硫键结合的同等型,可以将突变引入IgG2 CH1结构域,以防止或减少在IgG2-B同等型中以非键合硫醇形式存在的半胱氨酸残基之间的二硫键结合。还可以将突变引入到IgG2 CH1结构域中,以防止在向患者(例如,哺乳动物患者,例如人)施用抗体后形成所有四个同等型变体,这可能是由于体内半胱氨酸的氧化和还原过程所致。此类突变的示例是人IgG2 CH1结构域的残基C127处的氨基酸取代或缺失。通过缺失该残基和/或通过氨基酸取代(例如,保守氨基酸取代)修饰该位点,可以使IgG2同等型群体中的二硫键结合模式偏向IgG2-B同等型。可用于促进IgG2-B同等型的CH1结构域中特别有利的突变是C127S突变。

[0289] 抗原结合位点之间的间隔

[0290] 本文所述的激动剂TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建

体)可以含有彼此分离小于133 Å的抗原结合位点(即抗原结合臂),其是在人IgG2同种型抗体中抗原结合臂之间观察到的间隔。如以下示例中所述,已经发现该间隔产生具有最佳TNFR2激动特性的抗体。本公开内容的TNFR2激动剂多肽包括那些含有分离例如小于约133 Å的距离的抗原结合臂的多肽,诸如90 Å、91 Å、92 Å、93 Å、94 Å、95 Å、96 Å、97 Å、98 Å、99 Å、100 Å、101 Å、102 Å、103 Å、104 Å、105 Å、106 Å、107 Å、108 Å、109 Å、110 Å、111 Å、112 Å、113 Å、114 Å、115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å、127 Å、128 Å、129 Å、130 Å、131 Å或132 Å的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约95 Å至约130 Å的距离,诸如约95 Å、96 Å、97 Å、98 Å、99 Å、100 Å、101 Å、102 Å、103 Å、104 Å、105 Å、106 Å、107 Å、108 Å、109 Å、110 Å、111 Å、112 Å、113 Å、114 Å、115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å、127 Å、128 Å、129 Å或130 Å的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约98 Å至约128 Å的距离,诸如约98 Å、99 Å、100 Å、101 Å、102 Å、103 Å、104 Å、105 Å、106 Å、107 Å、108 Å、109 Å、110 Å、111 Å、112 Å、113 Å、114 Å、115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å、127 Å或128 Å的距离。

[0291] 例如,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可含有抗原结合位点,所述抗原结合位点彼此间隔开约105 Å至约127 Å的距离,诸如约105 Å、106 Å、107 Å、108 Å、109 Å、110 Å、111 Å、112 Å、113 Å、114 Å、115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å或127 Å的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约110 Å至约122 Å的距离,例如约110 Å、111 Å、112 Å、113 Å、114 Å、115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å或122 Å的距离。

[0292] 例如,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可含有抗原结合位点,所述抗原结合位点彼此间隔开约115 Å至约119 Å的距离,诸如约115 Å、116 Å、117 Å、118 Å或119 Å的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约117 Å的距离。在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)具有上述抗原结合臂分离、以及IgG1同种型。

[0293] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有抗原结合位点,所述抗原结合位点彼此间隔开约115 Å至约132 Å的距离,诸如约

115 Å、116 Å、117 Å、118 Å、119 Å、120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å、127 Å、128 Å、129 Å、130 Å、131 Å 或132 Å 的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约120 Å 至约129 Å 的距离,例如约120 Å、121 Å、122 Å、123 Å、124 Å、125 Å、126 Å、127 Å、128 Å 或129 Å 的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约123 Å 至约127 Å 的距离,例如约123 Å、124 Å、125 Å、126 Å 或127 Å 的距离。在一些实施例中,抗原结合位点彼此间隔开约125 Å 的距离。在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)具有上述抗原结合臂分离、以及IgG3同种型。

[0294] 本文所述的TNFR2激动性多肽可以具有,例如,两个、三个、四个、五个或更多个以上述距离分离的抗原结合臂。具有两个或更多个抗原结合臂的抗体片段的示例包括但不限于双抗体、三抗体、F(ab')₂分子和串联scFv(taFv)分子等。产生这些抗体片段的方法包括本文所述和本领域已知的肽合成和重组蛋白表达技术。

[0295] 存在多种用于测量抗体或抗体片段的抗原结合臂之间的距离的方法。例如,可以通过使用计算机软件(诸如通过使用PYMOL®和其他分子成像软件)分析抗体或抗体片段的三维结构来确定抗体的抗原结合臂之间的距离。可以使用从X射线晶体学实验和本领域已知的核磁共振(NMR)技术获得的数据来计算多肽(诸如抗体和抗体片段)的三维结构。描述了可用于获得三维多肽结构的X射线晶体学和NMR方法的示例,例如,Eigenbrot等人, *Journal of Molecular Biology*, 229:969-995, 1993;和Huang等人, *Science*, 317:1930-1934, 2007,其公开内容各自通过引用以其全文并入本文。

[0296] 激动性TNFR2多肽的可变区和恒定区的结构特征

[0297] 在激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段和构建体)的分子特征中,互补决定区-重链1(CDR-H1)可以决定该分子的TNFR2结合特性。特别地,具有如下所述的CDR-H1的TNFR2多肽在本文所述的一个或多个表位处结合TNFR2,以赋予激动活性。例如,本公开内容的激动性TNFR2多肽包括具有CDR-H1的氨基酸,其具有以下项的氨基酸序列:

[0298] (a)GZ¹TFZ³Z²YZ³Z⁴(SEQ ID NO:2);

[0299] (b)GYTFTDYNI(SEQ ID NO:3)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;或

[0300] (c)GYTFTDYNL(SEQ ID NO:4)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0301] 其中每个Z¹独立地为天然存在的氨基酸,该天然存在的氨基酸包含含有芳族取代基的侧链;

[0302] 每个Z²独立地为天然存在的氨基酸,该天然存在的氨基酸包含在生理pH下的阴离子侧链;

[0303] 每个Z³独立地为天然存在的氨基酸,该天然存在的氨基酸包含在生理pH下的极性、不带电荷的侧链;并且

[0304] 每个Z⁴独立地为亮氨酸或异亮氨酸。

[0305] 上述CDR-H1基序的存在可以赋予多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)在由CRD1内的一个或多个氨基酸限定的表位处,诸如在由SEQ ID NO:1内的一个或多个氨基酸残基56-60(KCSPG)限定的表位处,特异性结合人TNFR2的能力。在一些实施例中,在存在CDR-H1的情况下,多肽在由CRD2内的一个或多个氨基酸限定的表位处特异性结合人TNFR2。在一些实施例中,在存在CDR-H1的情况下,其多肽在由CRD3内的一个或多个氨基酸限定的表位处特异性结合人TNFR2。

[0306] 本公开内容的激动性TNFR2多肽可以进一步含有以下CDR中的一个或多个、或全部:

[0307] (a) CDR-H2,其具有氨基酸序列INPNYDST(SEQ ID NO:10)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0308] (b) CDR-H3,其具有氨基酸序列CARGNSWYFDV(SEQ ID NO:11)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0309] (c) CDR-L1,其具有氨基酸序列SSVRY(SEQ ID NO:12)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0310] (d) 一种具有LTS氨基酸序列的CDR-L2,或一种相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;以及

[0311] (e) CDR-L3,其具有氨基酸序列CQQWSSNPLT(SEQ ID NO:13)或一种相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0312] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有如上所述的CDR-H1与以下CDR中的一个或多个、或全部组合:

[0313] (a) CDR-H2,其具有氨基酸序列INPNYDST(SEQ ID NO:10);

[0314] (b) CDR-H3,其具有氨基酸序列CARGNSWYFDV(SEQ ID NO:11);

[0315] (c) CDR-L1,其具有氨基酸序列SSVRY(SEQ ID NO:12);

[0316] (d) CDR-L2,其具有氨基酸序列LTS;和

[0317] (e) CDR-L3,其具有氨基酸序列CQQWSSNPLT(SEQ ID NO:13)。

[0318] 在一些实施例中,CDR-H1具有氨基酸序列GYTFTDYNI(SEQ ID NO:3)或一种相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列。例如,本文所述的激动性TNFR2多肽可以具有以下CDR:

[0319] (a) CDR-H1,其具有氨基酸序列GYTFTDYNI(SEQ ID NO:3);

[0320] (b) CDR-H2,其具有氨基酸序列INPNYDST(SEQ ID NO:10);

[0321] (c) CDR-H3,其具有氨基酸序列CARGNSWYFDV(SEQ ID NO:11);

[0322] (d) CDR-L1,其具有氨基酸序列SSVRY(SEQ ID NO:12);

[0323] (e) CDR-L2,其具有氨基酸序列LTS;和

[0324] (f) CDR-L3,其具有氨基酸序列CQQWSSNPLT(SEQ ID NO:13)。

[0325] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少85%相同(例如,至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少90%相同(例如,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少95%相同(例如,至少95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0326] 在一些实施例中,CDR-H1具有氨基酸序列GYTFTDYNL(SEQ ID NO:4)或一种相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0327] 在一些实施例中,多肽含有以下CDR:

[0328] (a) CDR-H1,其具有氨基酸序列GYTFTDYNL(SEQ ID NO:4);

[0329] (b) CDR-H2,其具有氨基酸序列INPNYDST(SEQ ID NO:10);

[0330] (c) CDR-H3,其具有氨基酸序列CARGNSWYFDV(SEQ ID NO:11);

[0331] (d) CDR-L1,其具有氨基酸序列SSVRY(SEQ ID NO:12);

[0332] (e) CDR-L2,其具有氨基酸序列LTS;和

[0333] (f) CDR-L3,其具有氨基酸序列CQQWSSNPLT(SEQ ID NO:13)。

[0334] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少85%相同(例如,至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少90%相同(例如,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少95%相同(例如,至少95%、96%、97%、98%、99%或100%相同)的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽含有重链可变结构域(V_H),该 V_H 具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0335] 在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)含有非天然恒定区,例如人恒定区。在一些实施例中,多肽缺少全部或部分Fc结构域、缺少全部或部分天然Fc结构域、或者缺少全部Fc结构域。

[0336] 激动性TNFR2多肽的框架区。

[0337] 本公开内容的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可以含有具有TJDJSJJX¹YX²X³LJX⁴LJS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列或有SEQ ID NO:5的10个或更多个残基的氨基酸序列,其中每个J独立地为天然存在的氨基酸;每个X¹独立地为A、V或F;每个X²独立地为M或I;每个X³独立地为E或Q;以及每个X⁴独立地为S或R。例如,多肽可含有一个具有选自以下项的氨基酸序列的框架区:

[0338] (a) TVDKSSSTAYMELRSLTS(SEQ ID NO:16)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0339] (b) TADTSSNTAYIQLSSLTS(SEQ ID NO:17)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0340] (c) TADTSTDTAYMELSSLRS(SEQ ID NO:18)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0341] (d) TRDTSISTAYMELSRSLTS(SEQ ID NO:19)或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0342] (e) TFYMELSSLRS (SEQ ID NO:20) 或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0343] (f) TRDTSISTAYMELNRLTS (SEQ ID NO:21) 或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0344] (g) TRDTSTNTVYMELTSLRS (SEQ ID NO:22) 或相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列;以及

[0345] (h) TADTSTDRAYMELSSLRS (SEQ ID NO:23) 或一种相对于该序列具有多达两个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0346] 前述氨基酸序列识别MHC II类蛋白(包括人白细胞抗原(HLA)DR和DQ等)并与之结合。通常,发现含有结合MHC蛋白的氨基酸序列的抗体经工程化以去除此类基序,由于结合MHC蛋白的抗体在向患者(例如,哺乳动物患者,例如人患者)施用后很容易降解,并位于免疫系统抗原呈递细胞的外部,从而引发针对所施用抗体的不适当的免疫应答。确定特定氨基酸序列是否易于结合MHC分子的方法在本领域中是已知的,并且描述于,例如,Wang等人,BMC Bioinformatics 11:568,2010;Nielsen等人,BMC Bioinformatics 8:238,2007;Gonzalez-Galarza等人,Nucleic Acid Research 39:D913-D919,2011;以及Greenbaum等人,Immunogenetics 63:325,2011,其公开内容各自通过引用以其全文并入本文。

[0347] 尽管上述框架区倾向于结合II类MHC分子,但它们不是免疫原性肽。而是,这些氨基酸序列赋予高亲和力的TNFR2结合。含有任何前述框架区序列的本公开内容的激动性TNFR2多肽表现出高TNFR2亲和力的出乎意料且有益的特性,而未在向患者(例如,哺乳动物患者,例如人)施用后诱导针对该多肽的免疫原性应答。

[0348] TNFR2激动性多肽群体的均质性

[0349] 可以产生药物组合物,其中本文所述的TNFR2激动性多肽(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽或其构建体)以单个二硫键结合的同等型存在。例如,药物组合物中的多肽的至少10%或更多可以以单个二硫键结合的同等型(例如,IgG2-B同等型)存在。例如,这可以通过在野生型人IgG1或IgG2 CH1结构域的半胱氨酸残基127处的氨基酸取代或缺失来实现,从而防止或减少二硫键结合的发生,该二硫键结合可能引起除例如IgG2-B以外的同等型(参见,例如,图5A-5D)。本公开内容的药物组合物包括其中,例如,药物组合物中的约10%至约99.999%的激动性TNFR2多肽以单个二硫键结合的同等型(例如IgG2-B同等型)存在的那些药物组合物。例如,本公开内容的药物组合物包括含有激动剂TNFR2多肽的那些药物组合物,其中,例如,药物组合物中10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或更高的多肽以单个二硫键结合的同等型存在。

[0350] 测量存在于激动剂TNFR2多肽样品中的各种二硫键结合的同等型的相对量的技术包括本领域已知的并且在本文中描述的液相色谱技术,诸如在Wypych等人,The Journal of Biological Chemistry,283:16194-16205,2008中列举的那些技术,其公开内容通过引用以其全文并入本文。

[0351] 对TNFR2信号转导级联反应的影响

[0352] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体及其抗原结合片段)能够与TNFR2相互作用并增强其活性。本公开内容的TNFR2多肽可以通过使相邻的TNFR2单体彼此

紧密接近而在有利于TNFR2三聚体形成的一个或多个特定表位处结合TNFR2。TNFR2三聚化对受体活化特别有利,因为它使TNFR2单体处于TNF α 结合位点在空间上可获得的构象。该三聚事件可以活化TNFR2的细胞内信号传导,而TNFR2又可以促进表达TNFR2的细胞(诸如Treg细胞、MDSC和/或TNFR2+实质细胞)的增殖。TNFR2活化还可以导致CD274(PDL1)、PDCD1LG2(PDL2)、CD137(4-1BB)和IKZF2的表达水平升高。

[0353] 尽管TNFR2活化引起可发挥重要疗效的多种基因的表达,但是本文所述的TNFR2激动剂多肽可以促进具有特殊治疗意义的几种蛋白的表达。不受机制的限制,本文所述的TNFR2多肽可通过刺激两种促进Foxp3转录的组蛋白乙酰基转移酶EP300和CREB的表达以诱导TNFR2介导的细胞愈合、保护、增殖和/或再生。这种生物学活性特别重要,因为它可以促进TNFR2+细胞中整个细胞周期的通量,同时导致T效应细胞(例如CD8+T细胞)死亡。TNFR2+细胞的选择性扩增和T效应细胞的抑制是一些表型,这些表型是激动性TNFR2多肽治疗自身免疫、GVHD、炎症和本文所述其他适应症的能力的基础。

[0354] 例如,可以通过测量与MAPK和TRAF2/3信号级联反应相关的基因的表达以监测TNFR2的活化,诸如其转录由NF κ B介导的基因的表达(Faustman, 等人, Nat. Rev. Drug Disc., 9:482-493, 2010, 其公开内容通过引用并入本文)。

[0355] TNFR2激动剂多肽的双重增殖和细胞杀伤效应

[0356] 本文公开的激动性TNFR2多肽,诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体,不仅可以促进Treg细胞、MDSC和/或TNFR2+实质细胞增殖,而且还可以诱导T效应细胞(诸如CD8+T效应细胞)(例如,在患者体内,例如人患者)死亡。相对于未经激动剂TNFR2抗体或其抗原结合片段处理的样品,本文所述的激动性TNFR2多肽可以能够,例如,增加经激动剂TNFR2抗体或其抗原结合片段处理的样品(诸如从接受针对自身免疫、GVHD、移植物排斥、过敏、慢性炎性疾病、哮喘或本文所述其他疾病的治疗的人患者中分离的样品)中的Treg细胞、MDSC和/或TNFR2+实质细胞的总量,例如,增加1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更高。本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体和抗原结合片段)增强Treg、MDSC和/或实质细胞生长的能力可能部分归因于这些多肽增加样品(例如,从接受针对或自身免疫、GVHD、移植物排斥、过敏、慢性炎性疾病、哮喘或本文所述的另一种疾病的治疗的人患者中分离的样品)中可溶性TNFR2的量的能力。

[0357] Treg和MDSC增殖的刺激带来重要的治疗益处,因为这些细胞抑制T效应细胞(诸如自身反应性CD8+T细胞,对自身组织产生不适当的免疫应答)的活性。类似地,T效应细胞的直接杀伤可赋予治疗活性,因为TNFR2激动剂多肽可用于减少患有自身免疫、GVHD、移植物排斥、过敏、慢性炎性疾病、哮喘、或本文所述的另一种疾病的患者中自身反应性T细胞的量。

[0358] 通过这些机制中的一种或两种,本公开内容的TNFR2激动剂多肽可用于抑制患者(诸如哺乳动物患者(例如,人患者))的免疫学病况。

[0359] 另外,本公开内容的TNFR2激动剂多肽刺激TNFR2+实质细胞增殖的能力提供了诱导组织和器官再生的有益效应。可以使用本公开内容的TNFR2激动剂多肽诱导增殖的示例性TNFR2+细胞包括但不限于以下项的细胞:胰腺、唾液腺、垂体、肾脏、心脏、肺、造血系统、颅神经、心脏、主动脉、嗅腺、耳朵、神经、头部结构、眼睛、胸腺、舌、骨、肝脏、小肠、大肠、肠

道、肺、脑、皮肤、周围神经系统、中枢神经系统、脊髓、乳房、胚胎结构、胚胎和睾丸。因此,本文所述的TNFR2激动剂多肽可用于治疗其中需要一种或多种这些细胞类型的再生、保护和/或愈合的疾病。本文描述了可以使用本公开内容的TNFR2激动剂多肽治疗的示例性疾病。

[0360] 活性(CD25^{Hi}和CD45RA^{Low})reg细胞的选择性调节

[0361] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、抗原结合片段及其构建体)可以能够增强样品(例如,从接受自身免疫、GVHD、移植物排斥、过敏、慢性炎症性疾病、哮喘或本文所述另一种疾病治疗的人患者中分离的样品)中Treg细胞的增殖或总量并且可以在主动分裂状态下选择性地作用于Treg细胞。例如,相对于不表达CD25^{Hi}和CD45RA^{Low}蛋白的Treg细胞,诸如表达CD25^{Med}和CD45RA^{Hi}蛋白的Treg细胞,甚至不是Treg细胞的T细胞,本文所述的激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段可以能够使表达CD25^{Hi}和CD45RA^{Low}的Treg细胞的增殖增加,例如,1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更高。

[0362] TNFR2激动剂多肽不为了活性而依赖另外的TNFR2结合剂

[0363] 重要地,激动性TNFR2多肽,诸如本文所述的单链多肽、抗体或其抗原结合片段,能够结合TNFR2并增强TNFR2介导的信号传导,而无需天然TNFR2配体TNF α 。此类激动剂在本文中称为显性TNFR2激动剂。激动性TNFR2多肽,诸如本文所述的抗体、其抗原结合片段、单链多肽和构建体,不需要TNF α 以增殖Treg细胞、MDSC和/或TNFR2+实质细胞。不受机制的限制,由于这些分子在特定表位(该表位在结合时稳定受体及其相邻单体的三聚体构象)处结合TNFR2的能力,本公开内容的激动性TNFR2多肽可以表现出该特性。这种结构构型增强了NF κ B信号传导,并增强了与Treg、MDSC和TNFR2+实质细胞活化相关的一些基本信号转导级联反应。

[0364] 例如,激动性TNFR2多肽,诸如本文所述的单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体,可以与TNFR2+细胞(诸如Treg细胞、MDSC和/或TNFR2+实质细胞)的表面上的TNFR2结合,并在存在或不存在TNF α 的情况下增强此类细胞的增殖。例如,相对于未经TNFR2激动剂多肽处理的细胞,本文所述的激动性TNFR2多肽可以使此类细胞的增殖增加,例如,1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、200%、300%、400%、500%或更高。激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体或其抗原结合片段)在细胞增殖测定中可能表现出EC₅₀值,在存在或不存在TNF α 的情况下,该值在很大程度上未变化(例如,相对于在不存在TNF α 的情况下在相同细胞增殖测定中激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体或其抗原结合片段)的EC₅₀值,在存在TNF α 的情况下,EC₅₀变化小于50%、45%、40%、35%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于1%)。本文描述了可用于测量TNFR2抗体的激动效应的Treg测定的示例,例如,如以下实例2所述。类似地,如通过测量一种或多种选自以下项组成的组的基因的表达所评估的:Foxp3、TNFSF18、IL2RA、IKZF2/4、CTLA4、TGF- β 、CHUK、NFKBIE、NFKBIA、MAP3K11、TRAF2、TRAF3、relB、TNF、CXCR3、PDL1(CD274)、IL2RA、IL7R、MAP3K1、MAP3K4、NFKBIB、TANK、TBK1、TNF、TNFAIP3、NFKBIA、MAP3K11、TNFRSF1B、TRAF2、relB、LTA、EP300、CREBBP、NF κ B信号传导蛋白,相对于未经TNFR2激动剂多肽处理的此类细胞,激动性TNFR2多肽,诸如本文所述的单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体,可以使TNFR2信号传导增强,例如,1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、

8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更高。激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体或其抗原结合片段)在此类基因表达测定中可能表现出 EC_{50} 值,在存在或不存在 $TNF\alpha$ 的情况下,该值在很大程度上未变化或增强(例如,相对于在不存在 $TNF\alpha$ 的情况下在相同基因表达测定中激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体或其抗原结合片段)的 EC_{50} 值,在存在 $TNF\alpha$ 的情况下, EC_{50} 变化小于50%、45%、40%、35%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于1%)。

[0365] 全长TNFR2激动剂抗体的抗原结合片段活性

[0366] 本文所述的激动性TNFR2抗体可以增强Treg细胞、MDSC和/或实质细胞的增殖,和/或促进T效应细胞死亡,其效能与此类抗体的抗原结合片段所显示的相似。例如,去除本文所述的激动性TNFR2抗体的Fc区可能未改变分子促进样品(例如,从接受自身免疫、GVHD、过敏、移植物排斥或本文所述另一种病况治疗的人患者中分离的样品)中Treg细胞、MDSC和/或实质细胞增殖和/或直接杀死T效应细胞(例如,CD8+自身反应性T细胞)。本文所述的激动性TNFR2抗体及其抗原结合片段可以,例如,通过不同于抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的途径起作用,其中需要Fc区来募集效应蛋白以诱导细胞死亡。另外,激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段可以多种形式表现出治疗活性,诸如单链多肽(例如,含有一个或多个例如通过酰胺键、硫醚键、碳-碳键或二硫键彼此共价结合的CDR的单链多肽)、单克隆抗体或其抗原结合片段、多克隆抗体或其抗原结合片段、人抗体或其抗原结合片段、人源化抗体或其抗原结合片段、灵长类抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其抗原结合片段、多特异性抗体或其抗原结合片段、双可变免疫球蛋白结构域、单价抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、单链Fv分子(scFv)、双抗体、三抗体、纳米抗体、抗体样蛋白支架、结构域抗体、Fv片段、Fab片段、 $F(ab')_2$ 分子和串联scFv(taFv)等。

[0367] 激动性TNFR2多肽的特异性结合特性

[0368] 多肽,诸如本文所述的单链多肽、抗体或抗体片段,与人TNFR2的特异性结合可以通过多种已建立的方法中的任何一种来确定。亲和力可以通过各种测量以定量表示,包括在体外或体内实现TNFR2受体半最大活化所需的抗体浓度(EC_{50})和抗体-TNFR2复合物解离的平衡常数(K_D)。TNFR2与本文所述的抗体的相互作用的平衡常数 K_D 是用于TNFR2抗体复合物解离为溶剂分离的TNFR2的抗体和彼此不相互作用的抗体分子的化学平衡常数。

[0369] 本文所述的多肽(例如,单链多肽、抗体和抗原结合片段)包括以小于100nM的 K_D 值(例如,95nM、90nM、85nM、80nM、75nM、70nM、65nM、60nM、55nM、50nM、45nM、40nM、35nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM)特异性结合TNFR2的多肽。在一些实施例中,本文所述的多肽(例如单链多肽,抗体,抗原结合片段及其构建体)以小于1nM的 K_D 值(例如,990pM、980pM、970pM、960pM、950pM、940pM、930pM、920pM、910pM、900pM、890pM、880pM、870pM、860pM、850pM、840pM、830pM、820pM、810pM、800pM、790pM、780pM、770pM、760pM、750pM、740pM、730pM、720pM、710pM、700pM、690pM、680pM、670pM、660pM、650pM、640pM、630pM、620pM、610pM、600pM、590pM、580pM、570pM、560pM、550pM、540pM、530pM、520pM、510pM、500pM、490pM、480pM、470pM、460pM、450pM、440pM、430pM、420pM、410pM、400pM、390pM、380pM、370pM、360pM、350pM、340pM、330pM、320pM、310pM、300pM、290pM、280pM、270pM、260pM、250pM、240pM、230pM、220pM、210pM、200pM、190pM、180pM、170pM、160pM、

150pM、140pM、130pM、120pM、110pM、100pM、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、20pM、10pM、5pM或1pM) 特异性结合TNFR2。

[0370] 本文所述的多肽还可以通过多种体外结合测定进行表征。可用于确定激动性TNFR2多肽的 K_D 或 EC_{50} 的实验示例包括,例如,表面等离子共振、等温滴定量热法、荧光各向异性、基于ELISA的测定、基因表达测定和蛋白表达测定等。ELISA代表用于分析抗体活性的特别有用的方法,因为此类分析通常需要最低浓度的抗体。在典型的ELISA分析中分析的常见信号是发光,其通常是过氧化物酶与特异性结合一抗(例如,本文所述的TNFR2抗体)的二抗缀合的活性的结果。本文所述的多肽(例如,单链多肽、抗体和抗原结合片段)能够结合其中的TNFR2和表位,诸如在人TNFR2的CRD1、CRD2和/或CRD3中含有一个或多个连续或不连续残基的表位。本文所述的激动性多肽可以另外结合衍生自TNFR2的分离肽,该分离肽以模拟天然蛋白中上述表位的构象的方式在结构上预组织各种残基。在直接ELISA实验中,这种结合可以定量,例如,通过分析将HRP底物(例如,2,2'-叠氨基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐)与缀合HRP的二抗结合的抗原抗体复合物孵育后产生的发光。

[0371] 激动性TNFR2多肽的动力学特性

[0372] 除了TNFR2-多肽相互作用的热力学参数之外,还可以定量表征本文所述的多肽与TNFR2的动力学缔合和解离。这可以例如通过根据已建立的程序监测多肽-抗原(例如,抗体-抗原)复合物形成的速率来完成。例如,可以使用表面等离子共振(SPR)来确定抗体-TNFR2复合物的形成(k_{on})和解离(k_{off})的速率常数。这些数据还能够计算抗体-TNFR2复合物解离的(K_D)平衡常数,因为这种单分子解离的平衡常数可以表示为 k_{off} 与 k_{on} 值的比。SPR是对确定受体-抗体相互作用的动力学和热力学参数特别有利的技术,因为该实验不需要通过化学标记的附接以修饰一个组分。而是,受体通常被固定在固体金属表面上,该固体金属表面用逐渐增加的抗体浓度的溶液脉冲处理。抗体-受体结合引起金属表面入射光的反射角发生畸变,并且随着抗体引入系统,折射率随时间的变化可以与已建立的回归模型相适应,以计算抗体-受体相互作用的缔合和解离速率常数。

[0373] 本文所述的多肽(例如,单链多肽、抗体、抗原结合片段及其构建体)在与TNFR2相互作用时可表现出高 k_{on} 和低 k_{off} 值,这与高亲和力受体结合一致。例如,本文所述的多肽在存在TNFR2的情况下可显示 k_{on} 值大于 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ (例如, $1.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $3.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $4.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $5.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $6.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $8.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9.0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、 $9.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 或 $1.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$)。当与TNFR2结合时,本文所述的多肽(例如,单链多肽、抗体、抗原结合片段及其构建体)可表现出低 k_{off} 值,因为这些多肽能够以高亲和力与不同的TNFR2表位相互作用。这些表位中的残基可以与TNFR2形成强分子间接触,这可减慢抗体-TNFR2复合物的解离。这种高受体亲和力可表现为低 k_{off} 值。例如,当与TNFR2复合时,本文所述的多肽可表现出小于 $10^{-3} s^{-1}$ 的 k_{off} 值(例如, $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $9.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $9.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $8.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $8.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $7.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $6.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $6.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $5.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $4.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $4.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $3.5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、

$3.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、 $9.5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $9.0 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $8.5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $8.0 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $7.0 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $6.5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $6.0 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $5.5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $4.5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $4.0 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $3.5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $3.0 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $2.5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 或 $1.0 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 。

[0374] 由激动性TNFR2多肽结合的TNFR2中的表位

[0375] 本文所述的激动性TNFR2多肽,诸如显性激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、抗原结合片段及其构建体),可以特异性结合以下TNFR2的一个或多个残基:

[0376] (a) 人TNFR2内的SEQ ID NO:1的氨基酸56-60 (KCSPG);

[0377] (b) 人TNFR2内的SEQ ID NO:1的氨基酸101-107 (CSSDQVET);

[0378] (c) 人TNFR2内的SEQ ID NO:1的氨基酸115-142

[0379] (NRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRK);

[0380] (d) 人TNFR2内的SEQ ID NO:1的氨基酸26-45

[0381] (QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC);

[0382] (e) 人TNFR2内的SEQ ID NO:1的氨基酸90-109

[0383] (REQNRICTCRPGWYCALSKQ);

[0384] (f) 人TNFR2内的SEQ ID NO:1的氨基酸98-117

[0385] (CRPGWYCALSKQEGCRLCAP);

[0386] (g) 人TNFR2内的SEQ ID NO:1的氨基酸106-125

[0387] (LSKQEGCRLCAPLRKCRPGF);

[0388] (h) 人TNFR2内的SEQ ID NO:1的氨基酸108-127

[0389] (KQEGCRLCAPLRKCRPGFV);和/或

[0390] (i) 非人哺乳动物(诸如本文所述的非人哺乳动物)的TNFR2内的等效表位与任何上述表位具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、97%、99%或100%序列同一性)的表位,和/或相对于任何上述表位含有一个或多个保守氨基酸取代的表位。

[0391] 在一些实施例中,本文所述的激动性TNFR2多肽,例如显性激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、抗原结合片段及其构建体)不结合含有人TNFR2(KCRPG,SEQ ID NO:41)内SEQ ID NO:1的142-146残基的或多个或所有的表位。

[0392] 可用于预测本文所述的TNFR2多肽的增殖、再生、愈合或保护活性的一种示例性程序用于确定抗体或抗体片段对含有KCSPG基序(SEQ ID NO:40)的肽的亲合力,例如含有该基序的线性或环状肽。该肽可以,例如,通过一种或多种构象限制(例如,主链或侧链至侧链环化)以模拟KCSPG基序(SEQ ID NO:40)的三维取向的方式在结构上预组织。例如,本文所述的激动性TNFR2多肽可以与含有KCSPG基序(SEQ ID NO:40)的肽结合,其亲合力高于激动性多肽对含有KCRPG氨基酸序列(SEQ ID NO:41)的肽的亲合力,例如,10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍或高于1000倍。

[0393] 激动性TNFR2抗体TNFRAG1

[0394] 本文所述的示例性激动性TNFR2多肽,诸如单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体,可以包括TNFRAG1的CDR中的一个或多个、或全部,其是单克隆抗体,可以在促进TNFR2信号转导的表位处特异性结合TNFR2,从而促进Treg细胞和MDSC增殖,TNFR2+实质细

胞再生、愈合和保护,以及T效应细胞(例如,CD8+T效应细胞)死亡。例如,TNFRAG1的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和/或CDR-L3,以及这些CDR的变体(例如,相对于这些CDR序列表现出保守氨基酸取代的变体)可用于产生本公开内容的另外的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段和构建体),例如,通过本文所述或本领域已知的抗体人源化方法。

[0395] 本公开内容的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体和抗原结合片段)可以表现出与TNFRAG1的结合特性相同或相似的结合特性。特别是,TNFRAG1在以下一个或多个残基处特异性结合人TNFR2:

[0396] (a) SEQ ID NO:1的氨基酸56-60 (KCSPG);

[0397] (b) SEQ ID NO:1的氨基酸101-107 (CSSDQVET);

[0398] (c) SEQ ID NO:1的氨基酸115-142

[0399] (NRICTCRPGWYCALSKEGCRCLCAPLRK);

[0400] (d) SEQ ID NO:1的氨基酸26-45 (QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC);

[0401] (e) SEQ ID NO:1的氨基酸90-109 (REQNRICTCRPGWYCALSKEG);

[0402] (f) SEQ ID NO:1的氨基酸98-117

[0403] (CRPGWYCALSKEGCRCLCAP);

[0404] (g) SEQ ID NO:1的氨基酸106-125

[0405] (LSKEGCRCLCAPLRKCRPGF);和/或

[0406] (h) SEQ ID NO:1的氨基酸108-127

[0407] (KEGCRCLCAPLRKCRPGF)。

[0408] TNFRAG1可以含有以下SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15所示的重链可变区中的一个或两个。这些区中每个区的CDR均以粗体显示:

**EVQLQQFGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNIDWVKQSHGKSLEWIG
DINPNYDSTSYSQKFRGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCAR
GNSWYFDVWGAGTTVTVSS**

(SEQ ID NO: 14)

[0409]

**EVQLQQFGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNLDWVKQSHGKSLEWI
GDINPNYDSTSYSQKFRGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCA
RGNSWYFDVWGAGTTVTVSS**

(SEQ ID NO: 15)

[0410] 另外,TNFRAG1含有以下SEQ ID NO:42所示的轻链可变区。该区的CDR以粗体显示。

**QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVRYMYWYQQKPRSSPKPWIYL
TSNLAGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEDAATYYCQQWSSNPLTFGA
GTKLELK**

[0411]

(SEQ ID NO: 42)

[0412] 接下来的部分提供了可用于制备人多肽、人源化多肽、灵长类化多肽、嵌合多肽和其他多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段和构建体)的方法的详细说明,例如,基于

TNFRAG1的分子特征。

[0413] 完全人抗体、人源化抗体、灵长类化抗体和嵌合抗体

[0414] 本文所述的抗体包括含有TNFRAG1的一个或多个、或全部CDR序列的完全人抗体、人源化抗体,灵长类化抗体和嵌合抗体。另外,本文所述的抗体包括完全人抗体、人源化抗体、灵长类化抗体和嵌合抗体,其含有CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列中的一个或多个、或全部,其中CDR序列中的一个或多个、或全部与相应的TNFRAG1的CDR序列具有至少85%序列同一性(例如,90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)。本文所述的激动性TNFR2抗体进一步包括完全人抗体、人源化抗体、灵长类化抗体和嵌合抗体,其含有CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列中的一个或多个、或全部,其中CDR序列中的一个或多个、或全部含有一个或多个(例如,最多3个)相对于相应CDR序列的氨基酸取代(例如,一个或多个保守氨基酸取代),并且对于共有重链框架序列也很重要,其中在人重链序列中也可以找到版本。

[0415] 例如,可用于设计本文所述的人源化抗体的一种策略是将TNFRAG1的重链可变区和轻链可变区的序列与共有人抗体的重链可变区和轻链可变区进行比对。共有人抗体重链和轻链序列是本领域已知的(例如,参见“VBASE”人类种系序列数据库;另参见Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公开号91-3242, 1991; Tomlinson等人, *J. Mol. Biol.* 227: 776-98, 1992; 和Cox等人, *Eur. J. Immunol.* 24: 827-836, 1994; 其公开内容通过引用并入本文)。以这种方式,可变结构域框架残基和CDR可以通过序列比对识别(参见Kabat, 同上)。为了产生人源化TNFR2激动剂抗体,可以用例如TNFRAG1的相应CDR取代例如共有人抗体的一个或多个CDR。共有人抗体的示例性可变结构域包括重链可变结构域:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWV

[0416] **AVISENGSDTYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGGAVSYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 43)**

[0417] 和轻链可变结构域:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSSYLAWYQQKPKAPKLLIYA

[0418] **ASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNLPLPYTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 44),**

[0419] 如美国专利号6,054,297中所识别;其公开内容通过引用并入本文(粗体显示的CDR根据Chothia, 等人, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987的方法确定)。这些氨基酸取代可以,例如,通过使用本领域已知的或本文所述的方法在宿主细胞中重组表达编码人源化抗体的重链和轻链的多核苷酸进行。

[0420] 类似地,这种策略也可以用于产生灵长类化激动性TNFR2抗体,因为它可以取代,例如,灵长类动物抗体共有序列的CDR中的一个或多个、或全部,例如, TNFRAG1的CDR中的一个或多个、或全部。本领域已知的共有灵长类动物抗体序列(参见,例如,美国专利号5,658,570; 5,681,722; 和5,693,780; 其公开内容各自通过引用并入本文)。

[0421] 在一些实施例中,可期望从激动性TNFR2抗体(诸如TNFRAG1)将除了CDR序列以外的特定框架残基导入人抗体的重链和/或轻链可变结构域中。例如,美国专利号6,054,297

识别出几种示例,其中可能有利的是将来自特定抗体重链或轻链可变区的某些框架残基保留在所得人源化抗体中。在一些实施例中,框架残基可与抗原进行非共价相互作用,因此有助于抗体对靶抗原的亲合力。在一些实施例中,单个框架残基可调节CDR的构象,并因此间接影响抗体与抗原的相互作用。某些框架残基可以形成VH和VL结构域之间的界面,因此可有助于整体抗体结构。在一些情况下,框架残基可构成功能性糖基化位点(例如,Asn-X-Ser/Thr),其可在附接至碳水化合物部分时决定抗体结构和抗原亲合力。在上述情况下,将TNFR2激动剂抗体(例如,TNFRAG1)的某些框架残基保留在,例如,人源化或灵长类化激动性抗体或其抗原结合片段中可能是有益的,因为各种框架残基可以促进抗体或其抗原结合片段的高表位亲和力和改善的生化活性。

[0422] 本文所述的抗体还包括抗体片段、Fab结构域、F(ab')₂分子、单链可变片段(scFv)、串联scFv片段、双抗体、三抗体、双可变结构域免疫球蛋白、多特异性抗体、双特异性抗体和异种特异性抗体,其(i)含有TNFRAG1的CDR中的一个或多个、或全部,和/或(ii)具有CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列中的一个或多个、或全部,其中CDR序列中的一个或多个、或全部与相应的TNFRAG1的CDR序列具有至少85%序列同一性(例如,90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)。这些分子可以重组表达,例如,通过使用本文所述或本领域已知的技术将编码这些蛋白的多核苷酸掺入表达载体以在真核或原核细胞中转染,或化学合成,例如,通过本文所述或本领域已知的固相肽合成方法。

[0423] 本文所述的多肽另外包括抗体样支架,其含有,例如,TNFRAG1的CDR中的一个或多个、或全部,或其中CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列中的一个或多个、或全部与TNFRAG1的相应CDR序列具有至少85%序列同一性(例如,90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或相对于TNFRAG1相应CDR序列含有一个或多个(例如,最多3个)氨基酸取代(例如,一个或多个保守氨基酸取代)。抗体样支架的示例包括含有第十纤连蛋白III型结构域(¹⁰F_n3)的蛋白,该结构域含有类似于典型抗体的BC、DE和FG结构环。¹⁰F_n3结构域的三级结构类似于IgG重链可变区的三级结构,并且本领域技术人员可以通过将¹⁰F_n3的BC、DE和FG环的残基替换为相应的TNFRAG1的CDR序列的残基,例如,将TNFRAG1的CDR序列中的一个或多个、或全部,或与这些CDR序列中的任何一个或多个具有至少85%序列同一性(例如,90%、95%、97%、99%或100%序列同一性)的序列,或相对于这些CDR序列中的一个或多个含有氨基酸取代(诸如保守或非保守氨基酸取代(例如,最多3个氨基酸取代))的序列移植到纤连蛋白支架上。这可以通过在原核或真核细胞中重组表达修饰的¹⁰F_n3结构域来实现(例如,使用本文所述的载体和技术)。使用¹⁰F_n3结构域作为抗体样支架将CDR从抗体移植到BC、DE和FG结构环上的示例报告于WO 2000/034784、WO 2009/142773、WO 2012/088006和美国专利号8,278,419;其公开内容各自通过引用并入本文。

[0424] TNFR2亲和力和激动作用的分子决定因素

[0425] 本公开内容的多肽可以表现出一系列共有结构特征,其引起TNFR2激动剂表型(例如,显性TNFR2激动剂表型)。例如,将TNFRAG1中的每个CDR-H1的氨基酸序列与另外两个激动性TNFR2单克隆抗体TNFRAG2和TNFRAG3进行比对,证明这些抗体具有保守的共有CDR-H1序列,如下所示:

[0426] G Y T F T D Y N(I/L) (TNFRAG1 CDR-H1, SEQ ID NO:45)

[0427] G F T F T D Y D(TNFRAG2 CDR-H1,SEQ ID NO:46)

[0428] G Y T F T D Y-I(TNFRAG3 CDR-H1,SEQ ID NO:47)

[0429] G(Y/F)T F T D Y(N/D) - (共有序列,SEQ ID NO:48)

[0430] 序列的比对揭示了共享的CDR-H1基序,诸如如下所示的基序GZ¹TFZ³Z²YZ³Z⁴(SEQ ID NO:2),其中每个Z¹独立地为包括侧链的天然存在的氨基酸,该侧链包括芳族取代基,每个Z²独立地为天然存在的氨基酸,该天然存在的氨基酸包括在生理pH下的阴离子侧链,每个Z³独立地为天然存在的氨基酸,该天然存在的氨基酸包括在生理pH下的极性、不带电荷的侧链,并且每个Z⁴独立地为亮氨酸或异亮氨酸。本公开内容的激动性TNFR2多肽可具有如上文SEQ ID NO:45-SEQ ID NO:47中任一项所述的CDR-H1序列,和/或由SEQ ID NO:2的保守基序表示的CDR-H1。

[0431] 核酸和表达系统

[0432] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可以通过多种已建立的技术中的任何一种进行制备。例如,可以通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链基因来制备本文所述的激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段。为了重组表达抗体,可以用一种或多种携带编码抗体的免疫球蛋白轻链和重链的DNA片段的重组表达载体转染宿主细胞,从而使轻链和重链在宿主细胞中表达,并任选地分泌到培养宿主细胞的培养基中,可以从该培养基中回收抗体。使用标准重组DNA方法来获得抗体重链和轻链基因,将这些基因整合到重组表达载体中,并将载体引入宿主细胞,诸如Molecular Cloning;A Laboratory Manual,第二版(Sambrook,Fritsch and Maniatis(编辑),Cold Spring Harbor,N.Y.,1989),Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人编辑,Green Publishing Associates,1989),以及美国专利号4,816,397;其公开内容各自通过引用并入本文。

[0433] 用于表达激动性TNFR2多肽的载体

[0434] 病毒基因组提供了丰富的载体来源,可用于将外源基因有效地递送到细胞(例如,真核或原核细胞)的基因组中。病毒基因组是用于基因递送的特别有用的载体,因为此类基因组中含有的多核苷酸通常通过广义或专门的转导掺入靶细胞的基因组中。这些过程是天然病毒复制周期的一部分,不需要添加蛋白或试剂以诱导基因整合。病毒载体的示例包括逆转录病毒、腺病毒(例如,Ad5、Ad26、Ad34、Ad35和Ad48)、细小病毒(如腺相关病毒)、冠状病毒、负链RNA病毒(例如正粘病毒(例如,流感病毒))、弹状病毒(例如,狂犬病和水疱性口炎病毒)、副粘病毒(例如麻疹和仙台病毒)、正链RNA病毒(诸如小核糖核酸病毒和甲型病毒)、和双链DNA病毒(包括腺病毒|疱疹病毒(例如,1型和2型单纯性疱疹病毒、Epstein-Barr病毒、巨细胞病毒))以及痘病毒(例如,牛痘、修饰的牛痘安卡拉病毒(MVA)、鸡痘和金丝雀痘)。例如,可用于递送编码本文所述的抗体轻链和重链或抗体片段的多核苷酸的其他病毒包括Norwalk病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳头瘤病毒、嗜肝DNA病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的示例包括:禽白血病-肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒,HTLV-BLV组、慢病毒、泡沫病毒(Coffin,J.M.,Retroviridae:The viruses and their replication,In Fundamental Virology,第三版,B.N.Fields等人编辑,Lippincott-Raven Publishers,Philadelphia,1996)。其他示例包括鼠白血病病毒、鼠肉瘤病毒、小鼠乳腺肿瘤病毒、牛白血病病毒、猫白血病病毒、猫肉瘤病毒、禽白血病病毒、人T细胞白血病病毒、狒狒内源性病

毒、长臂猿类白血病病毒、Mason Pfizer猴病毒、猿猴免疫缺陷病毒、猿猴肉瘤病毒、Rous肉瘤病毒和慢病毒。载体的其他示例描述于,例如,McVey等人,(美国专利号5,801,030);其公开内容各自通过引用并入本文。

[0435] 非病毒载体,诸如质粒,也是本领域熟知的,包括但不限于原核和真核载体(例如,基于酵母和细菌的质粒),以及用于在哺乳动物细胞中表达的质粒。将载体引入宿主细胞并分离和纯化表达的蛋白的方法也是本领域熟知的(例如,Molecular Cloning; A Laboratory Manual,第二版(Sambrook,Fritsch and Maniatis(编辑) Cold Spring Harbor, N.Y., 1989))。

[0436] 基因组编辑技术

[0437] 除了病毒载体外,还开发了多种其他方法用于整合基因,例如,那些将抗体轻链和重链、单链多肽、单链可变片段(scFv)、串联scFv、Fab结构域、F(ab')₂结构域、双抗体和三抗体等编码到多肽表达的靶细胞基因组。可用于将编码激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)的多核苷酸掺入原核或真核细胞中的一种这样的方法包括使用转座子。转座子是编码转座酶的多核苷酸,含有在5'和3'位置侧接切除位点的目标多核苷酸序列或目的基因。一旦转座子已被递送到细胞中,转座酶基因的表达开始,并产生从转座子上切下目的基因的活性酶。该活性由转座酶对转座子切除位点的位点特异性识别介导。在一些实施例中,这些切除位点可以是末端重复序列或反向末端重复序列。一旦从转座子中切除,目的基因可以通过转座酶催化存在于细胞核基因组中的类似切除位点的切割而整合到原核或真核细胞的基因组中。这使得编码本文所述的激动性TNFR2多肽的基因在切除位点处插入切割的核DNA中,随后将目的基因连接到原核或真核细胞基因组DNA的磷酸二酯键的连接完成整合过程。在一些实施例中,转座子是逆转座子,使得编码多肽的基因首先被转录成RNA产物,然后被逆转录成DNA,然后掺入原核或真核细胞基因组中。示例性转座子系统包括piggybac转座子(如WO 2010/085699详述)和sleeping beauty转座子(如US20050112764详述);其公开内容各自通过引用并入本文。

[0438] 将编码激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体或其抗原结合片段)的核酸分子整合到原核或真核细胞基因组中的另一种有用方法是规律间隔成簇短回文重复序列(CRISPR)/Cas系统,该系统最初作为细菌和古细菌中的自适应防御机制演变而来,可抵抗病毒感染。CRISPR/Cas系统由质粒DNA内的回文重复序列和相关Cas9核酸酶组成。DNA和蛋白的这种结合通过首先将外源DNA整合到CRISPR基因座中以指导靶序列的位点特异性DNA切割。含有这些外源序列和CRISPR基因座的重复间隔子元件的多核苷酸依次在宿主细胞中转录以产生向导RNA,随后可以将其退火至靶序列并将Cas9核酸酶定位于该位点。以这种方式,可以在外源多核苷酸中进行高度位点特异性cas9介导的DNA切割,因为将cas9置于目标DNA分子附近的相互作用是由RNA:DNA杂交控制的。结果,从理论上讲,人们可以设计CRISPR/Cas系统来切割任何目标DNA分子。为了编辑真核基因组已经利用了该技术(Hwang等人,Nat. Biotech., 31:227-229, 2013),并且该技术可以用作位点特异性编辑真核或原核基因组的有效手段,以在掺入本文所述的编码激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体或其抗原结合片段)的多核苷酸之前,先切割DNA。CRISPR/Cas用于调节基因表达的用途已在美国专利号8,697,359中描述,其公开内容通过引用并入本文。

[0439] 在掺入本文描述的编码TNFR2抗体或抗体片段的多核苷酸之前,用于位点特异性

切割基因组DNA的替代方法包括使用锌指核酸酶和转录活化因子样效应核酸酶 (TALEN)。与 CRISPR/Cas 系统不同,这些酶不含有向导多核苷酸以定位到特定靶序列。相反,靶标特异性由这些酶中的DNA结合结构域控制。在基因组编辑应用中使用的锌指核酸酶和TALEN描述于 Urnov 等人 (Nat. Rev. Genet., 11: 636-646, 2010); 和 Joung 等人, (Nat. Rev. Mol. Cell. Bio. 14: 49-55, 2013); 其通过引用并入本文。可用于将编码本文所述抗体的多核苷酸掺入原核或真核细胞的基因组中的其他基因组编辑技术包括使用可以合理设计以便位点特异性切割基因组DNA的ARCUS™大范围核酸酶。考虑到已确定此类酶的结构-活性关系,这些酶用于将本文所述的编码激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)的多核苷酸掺入原核或真核细胞的基因组中的用途是特别有利的。因此,可以在某些氨基酸位置修饰单链大范围核酸酶,以产生可在期望位置选择性切割DNA的核酸酶。这些单链核酸酶已被广泛描述,例如,美国专利号8,021,867和8,445,251;其公开内容各自通过引用并入本文。

[0440] 多核苷酸序列元件

[0441] 为了表达本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体),可以将编码部分或全长轻链和重链的多核苷酸,例如,编码本文所述抗体或其抗原结合片段的CDR序列中的一个或多个、或全部的多核苷酸插入表达载体,从而使基因与转录和翻译控制序列可操作地连接。选择表达载体和表达控制序列以使其与所使用的表达宿主细胞相容。可以将编码TNFR2多肽的轻链基因和重链的多核苷酸插入单独的载体中,或任选地,可以使用本文描述的或本领域已知的技术将两种多核苷酸掺入相同的表达载体中。

[0442] 除了编码抗体的重链和轻链的多核苷酸(或编码本文所述的单链多肽、抗体片段(例如scFv分子)或构建体的多核苷酸)以外,本文所述的重组表达载体可以携带调控序列,该调控序列控制宿主细胞中抗体链基因的表达。表达载体的设计,包括调控序列的选择,可能取决于诸如待转化的宿主细胞的选择或期望蛋白的表达水平之类的因素。例如,适合哺乳动物宿主细胞表达的调控序列包括指导哺乳动物细胞中高水平蛋白表达的病毒元件,诸如衍生自巨细胞病毒(CMV)的启动子和/或增强子(诸如CMV启动子/增强子)、猿猴病毒40(SV40)(诸如SV40启动子/增强子)、腺病毒(例如,腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒。病毒调节元件及其序列描述于,例如,美国专利号5,168,062、美国专利号4,510,245和美国专利号4,968,615,其公开内容各自通过引用并入本文。

[0443] 除抗体链基因和调控序列外,本文所述的重组表达载体还可携带其他序列,诸如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起点)和选择标记基因。选择标记基因有助于选择已导入载体的宿主细胞(参见,例如,美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,通常,选择标记基因赋予已引入载体的宿主细胞对细胞毒性药物诸如G418、嘌呤霉素、杀稻瘟素、潮霉素或氨甲蝶呤的耐受性。合适的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于带有甲氨蝶呤选择/扩增的DHFR^r宿主细胞)和neo基因(用于G418选择)。为了表达TNFR2抗体或TNFR2抗体片段的轻链和重链,可以通过标准技术将含有编码重链和轻链的多核苷酸的表达载体转染到宿主细胞中。

[0444] 编码修饰的激动性TNFR2多肽的多核苷酸

[0445] 使用本公开内容的组合物和方法,可以例如通过将来自既定TNFR2激动剂多肽的

一个或多个CDR导入种系抗体序列,诸如在开发人抗体或人源化抗体的情况下的人种系抗体序列,来产生激动性TNFR2多肽。举例来说,本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可以含有TNFRAG1的CDR中的一个或多个、或全部(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示),或者CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列中的一个或多个、或全部,其中CDR序列中的一个或多个、或全部与TNFRAG1的相应CDR序列具有至少85%序列同一性(例如,90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)或者相对于TNFRAG1相应CDR序列含有一个或多个(例如,最多3个)氨基酸取代(例如,一个或多个保守氨基酸取代)。任选地,相对于TNFRAG1的那些多肽,TNFR2激动剂多肽可以在一个或多个框架区中表现出差异,诸如位于CDR-H1和CDR-H2之间的框架区。例如,TNFRAG1的一个或多个框架区可以被入抗体的框架区取代。示例性框架区包括,例如,US7,829,086中所述的人框架区和EP 1945668中所述的灵长类动物框架区;其公开内容各自通过引用并入本文。为了产生编码此类TNFR2抗体的核酸,可以通过化学合成(例如,通过固相多核苷酸合成技术)、体外基因扩增(例如,通过聚合酶链反应技术)、或通过宿主生物体中复制多核苷酸而产生编码,例如,轻链可变区和重链可变区中至少一个或两个的DNA片段。

[0446] 在一些实施例中,人源化激动性TNFR2抗体可以包括CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列中的一个或多个、或全部,其中CDR序列中的一个或多个、或全部与TNFRAG1的相应CDR序列具有至少85%序列同一性(例如,90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)或者相对于TNFRAG1相应CDR序列含有一个或多个(例如,最多3个)氨基酸取代(例如,一个或多个保守氨基酸取代)。例如,这可以通过对种系DNA或cDNA进行定点诱变,并根据已建立的程序使用聚合酶链反应(PCR)扩增所得的多核苷酸来实现。人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列是本领域已知的(例如,参见“VBASE”人类种系序列数据库;另参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242,1991;Tomlinson等人,J.Mol.Biol.227:776-798,1992;和Cox等人,Eur.J.Immunol.24:827-836,1994;其通过引用并入本文)。编码含有TNFRAG1的CDR中的一个或多个、或全部或者上述类似序列的人重链和轻链可变区的嵌合核酸构建体可以,例如,使用本领域已知的成熟克隆技术产生。另外,可以合成编码含有TNFRAG1的CDR中的一个或多个或所有或者上述类似序列的重链可变区的多核苷酸,并用作诱变的模板以使用常规诱变技术生成本文所述的变体。替代性地,可以直接合成编码该变体的DNA片段(例如,通过建立的固相核酸化学合成程序)。

[0447] 可以通过标准重组DNA技术进一步操纵编码含有TNFRAG1的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列中一个或多个、或全部的VH片段的DNA片段,例如,以将可变区基因转化为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操纵中,将编码VL或VH的DNA片段可操作地连接至编码另一蛋白(诸如抗体恒定区或柔性接头)的另一DNA片段。

[0448] 例如,通过将编码VH的DNA与编码重链恒定区结构域(CH1、CH2、CH3和(任选地)CH4)的另一DNA分子可操作地连接,可以将本文所述的编码激动性TNFR2抗体的VH区的分离DNA转化为全长重链基因(以及Fab重链基因)。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见,例如,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242,1991),并且可以通

过标准PCR扩增获得包含这些区的DNA片段。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,并且在某些实施例中是IgG1恒定区。对于Fab片段重链基因,可以将编码VH的DNA与仅编码重链CH1结构域的另一DNA分子可操作地连接。

[0449] 通过将编码VL的DNA与编码轻链恒定区CL的另一DNA分子可操作地连接,可以将编码激动性TNFR2抗体的VL区的分离DNA转换为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见,例如,Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版(U.S. Department of Health and Human Services, NIH 公开号91-3242, 1991)), 并且可以,例如,通过原核或真核细胞中扩增编码这些区的多核苷酸、通过PCR扩增或通过化学多核苷酸合成来获得包含这些区的DNA片段。轻链恒定区可以是kappa (κ) 或lambda (λ) 恒定区,但是在某些实施例中是 κ 恒定区。为了构建scFv基因,将编码VH和VL的DNA片段可操作地连接至另一编码柔性接头的片段,例如,编码柔性亲水氨基酸序列(例如氨基酸序列(Gly₄Ser)₃)的多核苷酸,使得V_H和V_L序列可以表达为连续的单链蛋白,其中V_L和V_H区通过接头连接(参见,例如,Bird等人, *Science* 242:423-426, 1988; Huston等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988; McCafferty等人, *Nature* 348:552-554, 1990)。

[0450] 重组DNA技术还可以用于去除编码轻链和重链中的一个或两个的部分或全部DNA,该轻链和重链对于与TNFR2结合是非必需的。由此类截短DNA分子表达的分子也被本文所述的抗体涵盖。此外,可以产生双功能抗体,其中一个重链含有TNFRAG1的CDR中的一个或多个、或全部,或如上所述的类似CDR序列,并且其他重链和/或轻链对TNFR2以外的抗原具有特异性。此类抗体可以,例如,通过将含有TNFRAG1的CDR中的一个或多个、或全部或者上述相似CDR序列的重链和轻链与对不同抗原具有特异性的二抗的重链和轻链交联而产生,例如,使用标准的化学交联方法(例如,通过形成二硫键)。也可以通过在原核或真核细胞中表达经工程化以编码双功能抗体的核酸分子来制备双功能抗体。

[0451] 可以通过使轻链和/或重链CDR中的氨基酸残基突变来产生双特异性抗体,即使用相同的结合位点结合TNFR2和不同抗原的抗体。在一些实施例中,可以通过突变抗原结合位点外围的氨基酸残基来产生结合两种抗原,诸如TNFR2和第二细胞表面受体的双特异性抗体(Bostrom等人, *Science* 323:1610-1614, 2009)。双功能抗体可以通过表达经工程化以编码双特异性抗体的多核苷酸来制备。

[0452] 本文所述的修饰的激动性TNFR2抗体和抗体片段还可以通过化学合成产生(例如,通过固相肽合成,第2版,1984, Pierce Chemical Co., Rockford, 111中描述的方法;其通过引用并入本文)。还可以使用无细胞合成平台生成变体抗体(参见,例如,Chu等人, *Biochemia No.2*, 2001(Roche Molecular Biologicals);其通过引用并入本文)。

[0453] 表达激动性TNFR2多肽的宿主细胞

[0454] 可以在原核或真核宿主细胞中表达本文所述的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)。在一些实施例中,多肽(例如,单链多肽、抗体或其抗原结合片段)的表达在真核细胞(例如,哺乳动物)宿主细胞中进行,以最佳分泌适当折叠和具有免疫活性的抗体。用于表达本文所述的重组抗体或其抗原结合片段的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括DHFR CHO细胞,描述于Urlaub and Chasin(1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220), 与DHFR选择标记一起使用,例如,描述于

Kaufman and Sharp(1982,Mol.Biol.159:601-621)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞、293细胞和SP2/0细胞。可用于表达抗体及其片段的其他细胞类型包括细菌细胞,例如BL-21(DE3)大肠杆菌细胞,可以根据已建立的方案用含有外源DNA的载体对其进行转化。可用于表达抗体的其他真核细胞包括酵母细胞,例如酿酒酵母的营养缺陷型菌株,其可以根据本领域已知的已建立的程序进行转化并在不完全培养基中选择性生长。当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时,通过将宿主细胞培养足以实现抗体在宿主细胞中表达或抗体分泌到其中生长宿主细胞的培养基中的时间段来产生抗体。

[0455] 可以使用标准蛋白纯化方法从培养基中回收多肽(例如,单链多肽,抗体、其抗原结合片段及其构建体)。宿主细胞还可用于产生完整抗体的一部分,诸如Fab片段或scFv分子。本文还包括根据本领域已知的已建立的方案改变上述程序的方法。例如,可期望用编码本文所述的激动性TNFR2抗体的轻链或重链(但不是二者)的DNA转染宿主细胞,以产生抗体的抗原结合片段。

[0456] 通过重组表达产生本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)后,可以通过本领域已知的任何方法纯化,诸如可用于纯化免疫球蛋白分子的方法,例如,通过色谱法(例如,离子交换,亲和力,特别是通过选择蛋白A或蛋白G后与TNFR2的亲和力,以及通过柱色谱法)、离心、差异溶解度或通过任何其他纯化蛋白的标准技术。此外,本文所述的激动性TNFR2多肽或其片段可以与本文所述或本领域其他已知的异源多肽序列融合,以促进纯化或产生治疗性缀合物。

[0457] 一旦分离,如有需要,可以例如通过高效液相色谱法(参见,例如,Fisher,Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology(Work and Burdon编辑,Elsevier,1980);其通过引用并入本文)或通过凝胶过滤色谱法(诸如在Superdex™ 75色谱柱(Pharmacia Biotech AB,Uppsala,Sweden))进一步纯化激动性TNFR2单链多肽、抗体、其抗原结合片段、或构建体。

[0458] 产生和亲和力成熟的激动性TNFR2多肽的平台

[0459] 促进受体激动的TNFR2的表位作图

[0460] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可以通过筛选多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)的文库中能够结合TNFR2内表位的功能分子(其选择性地促进受体激动而不是抑制受体)而产生。可以通过针对一系列线性或环状肽筛选抗体或其抗原结合片段来建模此类表位,该线性或环状肽含有与TNFR2内期望表位相对应的残基。

[0461] 例如,可以通过本文所述或本领域已知的肽合成技术合成含有促进受体激动的分离自TNFR2的单个片段的肽。可以将这些肽固定在固体表面上并筛选结合激动性TNFR2多肽的分子(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体),使用已建立的程序的基于ELISA的筛选平台。使用该测定,以高亲和力特异性结合,例如,TNFRAG1的肽,因此在TNFR2的表位内含有优先结合这些抗体的残基。以此方式识别的肽可用于筛选多肽文库(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体),以识别激动性TNFR2多肽。而且,由于这些肽充当促进受体激动的TNFR2内表位的替代物,因此使用该筛选技术产生的多肽可结合TNFR2中的相应表位,并且预期对受体活性具有激动性。

[0462] 筛选激动性TNFR2多肽的文库

[0463] 用于高通量筛选多肽(例如,单链多肽、抗体、抗体片段或其构建体)文库中能够结合TNFR2中表位(例如,SEQ ID NO:1的氨基酸56-60、101-107和/或115-142)的分子的方法包括但不限于,展示技术,包括噬菌体展示、细菌展示、酵母展示、哺乳动物展示、核糖体展示、mRNA展示和cDNA展示。噬菌体展示分离结合生物学相关分子的配体的用途已综述于,例如,Felici等人(*Biotechnol. Annual Rev.* 1:149-183,1995),Katz(*Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45,1997)和Hoogenboom等人(*Immunotechnology* 4:1-20,1998)。已构建数种随机组合肽文库以选择结合不同靶标(例如细胞表面受体或DNA)的多肽,(综述于Kay(*Perspect. Drug Discovery Des.* 2,251-268,1995),Kay等人,(*Mol. Divers.* 1:139-140,1996))。蛋白和多聚体蛋白已成功通过噬菌体展示为功能分子(参见EP 0349578A,EP 4527839A,EP 0589877A;Chiswell and McCafferty(*Trends Biotechnol.* 10,80-84 1992))。此外,已表达功能性抗体片段(例如,Fab、单链Fv[scFv])(McCafferty等人(*Nature* 348:552-554,1990),Barbas等人(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982,1991),Clackson等人(*Nature* 352:624-628,1991))。这些参考文献据此通过引用以其全文并入本文。

[0464] (i) 噬菌体展示技术

[0465] 例如,可以使用噬菌体展示技术筛选多肽文库(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体),以筛选多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)文库中能够结合可促进受体活化的TNFR2内含有表位的环状或多环肽的功能分子(例如,SEQ ID NO:1的氨基酸56-60、101-107和/或115-142)。例如,可以使用已建立的程序(例如,固相多核苷酸合成或易错PCR技术)获得编码含有随机高变区的单链抗体片段(例如scFv片段)的多核苷酸文库,参见McCullum等人(*Meth. Mol. Biol.*, 634:103-109,2010);其通过引用并入本文)。随后可以将这些随机化的多核苷酸掺入病毒基因组中,从而使这些基因编码的随机化抗体链在丝状噬菌体表面表达,例如,通过抗体链和外壳蛋白之间的共价键(例如,M13噬菌体表面的pIII外壳蛋白)。这提供了抗体链的基因型和表型之间的物理连接。如此,可以筛选在高变区中展示含有随机突变的多样抗体链的噬菌体文库中的外部抗体链使用已建立的程序来结合固定在表面的TNFR2表位(例如,SEQ ID NO:1的氨基酸56-60、101-107和/或115-142)的能力。例如,通过在肽与表位标签(例如,生物素)之间形成共价键并将肽在微量滴定板的孔中孵育(这些微量滴定板先前已用互补标签(例如,抗生物素蛋白)包被,该互补标签以高亲和力结合与肽附接的标签),此类肽可以物理结合到微量滴定板的表面。合适的表位标签包括但不限于麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、聚组氨酸标签、FLAG标签、myc标签、人流感血凝素(HA)标签、生物素、链霉亲和素。含有这些分子呈现的表位的肽能够固定在包含互补分子的表面上,这些互补分子分别含有此类互补分子,诸如麦芽糖、谷胱甘肽、含镍复合物、抗FLAG抗体、抗myc抗体、抗HA抗体、链霉亲和素或生物素。如此,可以将噬菌体与含有固定的TNFR2衍生的肽的表面孵育一段适合的时间并在适当的缓冲液系统(例如,含有生理盐浓度,离子强度并通过缓冲剂维持在生理pH值的系统)的存在下,以使抗体与受约束的肽结合。然后可以洗涤表面(例如,用含有0.1% Tween-20的磷酸盐缓冲液),以去除不存在于亲和力大于特定阈值的TNFR2衍生的肽相互作用的抗体链的噬菌体。

[0466] 可以通过调节洗涤步骤的条件来调节在该初始淘选(即筛选)步骤之后剩余的多肽的亲和力(例如,通过包含弱酸性或碱性成分,或通过以低浓度包含其他TNFR2衍生的肽,

以与固定的肽竞争抗原结合位点)。如此,在洗涤步骤后仍结合在微量滴定板表面上的噬菌体群被富集结合TNFR2衍生的肽表位的噬菌体,该肽表位促进受体活化。然后可以通过从含有这些肽的表面洗脱噬菌体来扩增剩余的噬菌体(例如,通过改变环境pH、离子强度或温度),从而减小蛋白质-蛋白质相互作用强度。然后可以,例如,通过感染细菌细胞以扩增分离的噬菌体,并且可以任选地通过另外的筛选迭代对所得噬菌体进行淘选,以进一步富集那些具有更高亲和性和激动性TNFR2多肽的噬菌体群。在这些淘选阶段之后,随后可以分离展示高亲和力抗体或其抗原结合片段的噬菌体,并且可以对这些噬菌体的基因组进行测序,以识别编码的抗体的多核苷酸和多肽序列。诸如此类的噬菌体展示技术可用于产生,例如,抗体链,诸如scFv片段、串联scFv片段和本文所述的可用作TNFR2激动剂的其他抗原结合片段。用于识别以高亲和力结合特定抗原的抗体链及其抗原结合片段的示例性噬菌体展示方案已被广泛确立并描述于,例如,美国专利号7,846,892、WO 1997/002342、美国专利号8,846,867和WO 2007/132917;其公开内容各自通过引用并入本文。相似的噬菌体展示技术可用于产生本文所述的抗体样支架(例如,¹⁰F_n3结构域),该抗体样支架与TNFR2内能促进受体活化的表位结合(例如,SEQ ID NO:1的氨基酸56-60、101-107和/或115-142)。用于识别抗体样支架蛋白的示例性噬菌体展示方案描述于,例如,WO 2009/086116;其公开内容通过引用并入本文)。

[0467] (ii) 基于细胞的展示技术

[0468] 利用溶剂暴露多肽的基因型与表型之间的连接的其他体外展示技术包括酵母和细菌展示。酵母展示技术是本领域已建立的,并且通常具有优势,因为可以在单个酵母细胞的表面上呈现大量抗体(通常多达30,000)(参见,例如,Boder等人(Nat Biotechnol.15:553,1997);其通过引用并入本文)。丝状噬菌体上更大尺寸的酵母细胞可以实现另一种筛选策略,因为人们可以使用流式细胞仪来分析和分选酵母文库。例如,可以使用已建立的程序产生细菌细胞或酵母细胞的文库,该细菌细胞或酵母细胞表达含有随机化的高变区的多肽(例如,单链多肽、抗体及其抗原结合片段)(参见,例如,参见美国专利号7,749,501和US 2013/0085072;其教导各自通过引用并入本文)。例如,可以使用已建立的程序制备表达编码原始scFv片段的多核苷酸的酵母细胞大文库(de Bruin等人,Nat Biotechnol 17:397,1999;其通过引用并入本文)。然后可以在淘选步骤中将表达这些多核苷酸的酵母细胞与两种不同的荧光分子一起孵育:一种染料结合抗体中的保守残基,从而反映所展示的抗体量,另一种染料以不同的波长发出荧光并与抗原结合,因此表明抗原结合量。例如,本领域技术人员可以使用含有已与表位标签(例如,生物素)缀合的SEQ ID NO:1的氨基酸56-60、101-107和/或115-142的TNFR2衍生的肽,任选地在肽的N末端或C末端或预期不会干扰抗体-抗原结合的残基处。这使得用互补标签(例如,抗生物素蛋白)标记的荧光染料能够定位于抗体-抗原复合物。这可以带来很大的灵活性,并可以立即对选择的进程进行反馈。与噬菌体展示相反,通过标准化抗体展示水平,可以轻松选择亲和力更高而不是更高表达水平的抗体。实际上,可以对亲和力仅相差两倍的抗体进行区分和分类(VanAntwerp and Wittrup (Biotechnol Prog 16:31,2000))。

[0469] (iii) 核苷酸展示技术

[0470] 利用随机化的多核苷酸文库的体外翻译的展示技术也提供了产生本文所述的激动性TNFR2多肽的有力方法。例如,可以例如使用本文所述的基于PCR的已建立的诱变技术

获得编码在指定的高变区内含有突变的编码多肽(例如,单链多肽、抗体及其抗原结合片段)的随机DNA文库。这些文库的多核苷酸可以含有转录调节序列,诸如启动子和转录终止序列,并可另外编码增加所得mRNA构建体翻译速率的序列(例如,IRES序列、5'和3'UTR、聚腺苷酸化道等)。这些多核苷酸文库可以在含有RNA聚合酶和RNA核苷三磷酸(NTP)的适当缓冲溶液中孵育,以使DNA序列转录为能表达的mRNA分子,随后可以通过大小不等的核糖体亚基、氨酰基tRNA分子以及溶液中存在的翻译起始和延伸因子进行翻译(例如,使用PURExpress®体外蛋白合成试剂盒,New England Biolabs®)。设计的mRNA修饰可以使抗体产物通过与嘌呤霉素的化学键保持与mRNA模板共价结合(例如,参见Keefe(Curr.Protoc.Mol.Biol.,第24章,24.5单元2001);其通过引用并入本文)。因此,通过与固定在表面的肽一起孵育mRNA抗体融合构建体并以类似于噬菌体展示技术的方式淘选,该基因型-表型连接可用于选择与TNFR2衍生的肽结合的抗体(参见,例如,WO 2006/072773;其通过引用并入本文)。

[0471] 任选地,本文所述的多肽(例如,单链多肽、抗体及其抗原结合片段)可以使用类似的技术来产生,除了抗体产物可以与核糖体-mRNA复合物非共价结合,而不是通过嘌呤霉素接头共价结合。该平台,称为核糖体展示,已描述于,例如,美国专利号7,074,557;其通过引用并入本文。替代性地,可以使用cDNA展示产生抗体,cDNA展示是类似于mRNA展示的技术,不同之处在于cDNA通过嘌呤霉素接头与抗体产物共价结合,而不是mRNA。cDNA展示技术具有以下优势:能够在越来越严格的条件下执行淘选步骤,例如,在调节盐浓度、离子强度、pH和/或环境温度的条件下,以筛选对TNFR2衍生的肽具有特别高亲和力的抗体。这是由于双链cDNA相对于单链mRNA具有更高的自然稳定性。cDNA展示筛选技术描述于,例如,Ueno等人(Methods Mol.Biol.,805:113-135,2012);其通过引用并入本文。

[0472] 除了产生本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体),体外展示技术(例如,本文所述的那些和本领域已知的那些)还提供了用于改善本文所述的激动性TNFR2多肽的亲合力的方法。例如,人们可以筛选较窄的抗体及其抗原结合片段文库,这些文库在高变区内的特定位点处具有靶向突变,而不是筛选含有完全随机的高变区的抗体及其片段的文库。这可以,例如,通过组装编码仅在高变区内的特定位点编码随机突变的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的文库来实现。然后可以使用,例如,核糖体展示、mRNA展示或cDNA展示技术在,例如,丝状噬菌体、细菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞中或体外表达这些多核苷酸,以筛选以提高的结合亲和力特异性结合TNFR2表位的抗体或其抗原结合片段。例如,酵母展示非常适合亲和力成熟,并且先前已用于提高单链抗体的亲和力至 K_D 为48fM(Boder等人(Proc Natl Acad Sci USA 97:10701,2000))。

[0473] 可用于本文描述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体及其抗原结合片段)的生成和亲和力成熟的其他体外技术包括筛选抗体或其抗原结合片段的组合文库中的能够特异性结合TNFR2衍生的肽的功能分子。可以,例如,通过在真核或原核细胞中表达编码抗体或其抗原结合片段的随机高变区的多核苷酸来获得组合抗体文库。这可以,例如,使用本文所述或本领域已知的基因表达技术来实现。抗体的异质混合物可以,例如,通过蛋白A或蛋白G选择、定径柱色谱法、离心、差异溶解度和/或通过任何其他用于蛋白纯化的标准技术来纯化。可以例如通过将这些抗体的异质混合物与已经固定在表面上的衍生自TNFR2的肽孵育足以允许抗体-抗原结合的一段时间来筛选由此获得的组合文库的文库。通过使用适

当的缓冲液(例如,在生理pH(约7.4)下缓冲并含有生理盐浓度和离子强度、并任选地含有去污剂例如TWEEN-20的溶液)洗涤表面,来除去未结合的抗体或其片段。随后可以,例如,使用基于ELISA的检测方案来检测保持结合的抗体(参见,例如,美国专利号4,661,445;其公开内容通过引用并入本文)。

[0474] 用于筛选多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)的组合文库中的特异性结合TNFR2衍生的肽的那些多肽的另外的技术包括抗体片段的一珠一化合物文库的筛选。抗体片段可以在由亲水的、水可溶胀的材料组成的固体珠粒上化学合成(例如,使用已建立的拆分-聚合固相肽合成方案),使得每个珠粒展示单个抗体片段。然后可以将异质珠混合物与TNFR2衍生的肽一起孵育,该肽任选地标记有可检测的部分(例如,荧光染料)或与表位标签缀合(例如,生物素、抗生物素蛋白、FLAG标签、HA标签),随后可以通过用互补标签(例如,抗生物素蛋白、生物素、抗FLAG抗体、抗HA抗体)处理进行检测。含有与TNFR2衍生的肽特异性结合的抗体片段的珠可以通过与荧光标记的抗原或互补标签孵育后分析珠的荧光特性进行识别(例如,通过共聚焦荧光显微镜或通过荧光活化的珠子分选;参见,例如,Muller等人(J.Biol.Chem.,16500-16505,1996);其通过引用并入本文)。因此,可以将含有特异性结合TNFR2衍生的肽的抗体片段的珠与不包含高亲和力抗体片段的那些珠分离。特异性结合TNFR2衍生的肽的抗体片段的序列可以通过本领域已知的技术确定,包括,例如,Edman降解、串联质谱、基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)、核磁共振(NMR)和2D凝胶电泳等(参见,例如,W02004/062553;其公开内容各自通过引用并入本文)。

[0475] 多肽的阴性筛选

[0476] 除了上述用于筛选与衍生自人TNFR2的促进受体活化的表位特异性结合的单链多肽、抗体或抗体片段的方法以外,该方法还可以进行阴性筛选,以消除也可以结合促进受体拮抗作用的表位(诸如KCRPG序列)的抗体或抗体片段。这可以使用任何上述方法或其变体实现,例如,使得所筛选的抗体或抗体片段是先前被识别为具有激动性TNFR2活性的那些。用于阴性筛选的示例性技术包括上述或本领域已知的技术,诸如噬菌体展示、酵母展示、细菌展示、核糖体展示、mRNA展示、cDNA展示或基于表面的组合文库筛选(例如,以ELISA形式)。该筛选技术代表识别激动性TNFR2抗体或抗体片段的有用策略,因为能够结合含有KCRPG序列的TNFR2表位的抗体或抗体片段缺乏或显著降低了激动活性。

[0477] 非人哺乳动物的免疫

[0478] 可用于产生本文所述的激动性TNFR2抗体及其抗原结合片段的另一种策略包括使非人哺乳动物免疫。可以被免疫以产生本文所述的激动性TNFR2抗体及其片段的非人哺乳动物的示例包括兔、小鼠、大鼠、山羊、豚鼠、仓鼠、马和绵羊,以及非人灵长类动物。例如,使灵长类动物免疫的已建立的程序是本领域已知的(参见,例如,W0 1986/6004782;其通过引用并入本文)。免疫代表通过利用B淋巴细胞的抗原特异性产生单克隆抗体的可靠方法。例如,单克隆抗体可以通过Kohler-Millstein方法(例如,在EP 0110716中描述;其通过引用并入本文)进行制备,其中来自非人动物(例如,灵长类动物)的脾细胞用呈递促进受体活化的TNFR2衍生的抗原肽来进行免疫。可以从动物血清中分离出通过免疫产生的克隆扩增的B淋巴细胞,然后与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤。杂交瘤是对于产生抗体特别有用的药剂,因为这些永生化的细胞可以提供持久的抗原特异性抗体。随后可以使用本领域已知的技术分离来自此类杂交瘤的抗体,例如,通过使用诸如蛋白A或蛋白G的试剂通过亲和色谱法从

细胞培养基中纯化抗体。

[0479] 激动性TNFR2多肽缀合物

[0480] 在向哺乳动物受试者(例如,人)施用本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体及其抗原结合片段)之前,可能需要将抗体或其片段缀合至第二分子,例如,以调节抗体的体内活性。可以使用本领域熟知的多种已建立的缀合策略中的任一种,将激动性TNFR2抗体及其片段与抗体的轻链或重链的N末端或C末端的其他分子缀合。可用于将激动性TNFR2抗体或其片段与另一分子共价连接的成对反应性官能团的示例包括但不限于:硫醇对、羧酸和氨基、酮和氨基、醛和氨基、硫醇和 α 、 β -不饱和部分(诸如马来酰亚胺或脱氢丙氨酸)、硫醇和 α -卤代酰胺、羧酸和酰肼、醛和酰肼以及酮和酰肼。

[0481] 激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可以通过所述的化学缀合直接共价附着于另一分子。替代性地,可以从细胞(例如,真核细胞或原核细胞)重组表达含有激动性TNFR2抗体及其片段的融合蛋白。例如,这可以通过将编码融合蛋白的多核苷酸掺入细胞的核基因组中来实现(例如,使用本文所述或本领域已知的技术)。任选地,本文所述的抗体及其片段可以通过在抗体和接头之间形成共价键而连接至第二分子。然后将该接头与另一分子缀合,或者可以在与激动性TNFR2抗体或其片段连接之前将该接头与另一分子缀合。可用于形成缀合物的接头的示例包括多肽接头,诸如含有天然存在或非天然存在的氨基酸的那些接头。在一些实施例中,可能期望在接头中包括D-氨基酸,因为这些残基在天然存在的蛋白中不存在,因此对内源蛋白酶的降解具有更大耐受性。可以使用化学合成技术,诸如本文所述的那些技术,或通过细胞(例如,原核或真核细胞)中重组表达编码融合蛋白的多核苷酸来制备含有多肽接头的融合蛋白。可以使用本领域熟知的多种策略来制备接头,并且取决于接头的反应性组分,可以通过酶促水解、光解、酸性条件下的水解、碱性条件下的水解、氧化、二硫化物还原、亲核裂解或有机金属裂解进行裂解(Leriche等人,Bioorg.Med.Chem.,20:571-582,2012)。

[0482] 药物多肽缀合物

[0483] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体及其抗原结合片段)可以另外与治疗剂(诸如用于治疗自身免疫和/或炎症的药剂)缀合、混合或分开施用。可以与本文所述的激动性TNFR2多肽缀合、混合或分开施用的示例性药剂包括卡介苗(BCG)。可与本文所述的激动性TNFR2多肽缀合、混合或分开施用的另外的药剂包括非甾体类抗炎药(NSAID),诸如(i)水杨酸衍生物,包括乙酰水杨酸(阿司匹林)、二氟尼柳和柳氮磺吡啶,(ii)对氨基苯酚衍生物,包括对乙酰氨基酚,(iii)芬那酯,包括甲芬那酸、甲氯芬那酸酯和氟芬那酸,(iv)丙酸衍生物,包括布洛芬、萘普生、非诺洛芬、酮洛芬、氟比洛芬和奥沙普嗪,以及(v)烯酸(oxicam)衍生物,包括吡罗昔康和替诺昔康。可与本文所述的激动性TNFR2多肽缀合、混合或分开施用的另外的药剂包括糖皮质激素。本文所述的激动性TNFR2多肽可以另外地或替代性地与疾病修饰的抗风湿药(DMARD)缀合、混合或分开施用,该抗风湿药为诸如甲氨蝶呤、来氟米特、金化合物、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、环磷酰胺、抗疟药、D-青霉胺和环孢菌素。可以与本文所述的激动性TNFR2多肽缀合、混合或分开施用的另外的药剂包括英夫利西单抗、依那西普、阿达木单抗、戈利木单抗和培塞利珠单抗聚乙二醇等。例如,可以与本公开内容的激动性TNFR2多肽缀合、混合或分开施用的另外的药剂描述于,例如,Li等人,Front.Pharmacol.8:460,2017,其公开内容通过引用以其全文并入本文。

[0484] 在一些实施例中,本文所述的激动性TNFR2多肽与免疫治疗剂缀合、混合或分开施用,诸如抗CTLA-4激动剂、抗PD-1激动剂、抗PD-L1激动剂、抗PD-L2激动剂、抗CD27激动剂、抗CD30激动剂、抗CD40激动剂、抗4-1BB激动剂、抗GITR激动剂、抗OX40激动剂、抗TRAILR1激动剂、抗TRAILR2激动剂、抗TWEAK激动剂、抗TWEAKR激动剂、抗细胞表面淋巴细胞蛋白激动剂、抗BRAF激动剂、抗MEK激动剂、抗CD33激动剂、抗CD20激动剂、抗HLA-DR激动剂、抗HLA I类激动剂、抗CD52激动剂、抗A33激动剂、抗GD3激动剂、抗PSMA激动剂、抗Ceacan 1激动剂、抗Galedin 9激动剂、抗HVEM激动剂、抗VISTA激动剂、抗B7 H4激动剂、抗HHLA2激动剂、抗CD155激动剂、抗CD80激动剂、抗BTLA激动剂、抗CD160激动剂、抗CD28激动剂、抗CD226激动剂、抗CEACAM1激动剂、抗TIM3激动剂、抗TIGIT激动剂、抗CD96激动剂、抗CD70激动剂、抗CD27激动剂、抗LIGHT激动剂、抗CD137激动剂、抗DR4激动剂、抗CR5激动剂、抗TNFRS激动剂、抗TNFR1激动剂、抗FAS激动剂、抗CD95激动剂、抗TRAIL激动剂、抗DR6激动剂、抗EDAR激动剂、抗NGFR激动剂、抗OPG激动剂、抗RANKL激动剂、抗LT β 受体激动剂、抗BCMA激动剂、抗TACI激动剂、抗BAFFR激动剂、抗EDAR2激动剂、抗TROY激动剂和抗RELT激动剂。例如,免疫治疗剂可以是抗CTLA-4激动剂、抗PD-1激动剂或抗PD-L1激动剂。

[0485] 在一些实施例中,免疫治疗剂选自自由以下项组成的组:激动性抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-1抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-L2抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD27抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD30抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD40抗体或其抗原结合片段、激动性抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、激动性抗GITR抗体或其抗原结合片段、激动性抗OX40抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAILR1抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAILR2抗体或其抗原结合片段、激动性抗TWEAK抗体或其抗原结合片段、激动性抗TWEAKR抗体或其抗原结合片段、激动性抗细胞表面淋巴细胞蛋白抗体或其抗原结合片段、激动性抗BRAF抗体或其抗原结合片段、激动性抗MEK抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD33抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD20抗体或其抗原结合片段、激动性抗HLA-DR抗体或其抗原结合片段、激动性抗HLA I类抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD52抗体或其抗原结合片段、激动性抗A33抗体或其抗原结合片段、激动性抗GD3抗体或其抗原结合片段、激动性抗PSMA抗体或其抗原结合片段、激动性抗Ceacan 1抗体或其抗原结合片段、激动性抗Galedin 9抗体或其抗原结合片段、激动性抗HVEM抗体或其抗原结合片段、激动性抗VISTA抗体或其抗原结合片段、激动性抗B7 H4抗体或其抗原结合片段、激动性抗HHLA2抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD155抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD80抗体或其抗原结合片段、激动性抗BTLA抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD160抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD28抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD226抗体或其抗原结合片段、激动性抗CEACAM1抗体或其抗原结合片段、激动性抗TIM3抗体或其抗原结合片段、激动性抗TIGIT抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD96抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD70抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD27抗体或其抗原结合片段、激动性抗LIGHT抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD137抗体或其抗原结合片段、激动性抗DR4抗体或其抗原结合片段、激动性抗CR5抗体或其抗原结合片段、激动性抗TNFRS抗体或其抗原结合片段、激动性抗TNFR1抗体或其抗原结合片段、激动性抗FAS抗体或其抗原结合片段、激动性抗CD95抗体或其抗原结合片段、激动性抗TRAIL抗体或其抗原结合片段、激动性抗DR6抗体或其抗原结合片段、激动性抗EDAR抗体或其抗原结合片段、激动性抗NGFR抗体或其

抗原结合片段、激动性抗OPG抗体或其抗原结合片段、激动性抗RANKL抗体或其抗原结合片段、激动性抗LT β 受体抗体或其抗原结合片段、激动性抗BCMA抗体或其抗原结合片段、激动性抗TACI抗体或其抗原结合片段、激动性抗BAFFR抗体或其抗原结合片段、激动性抗EDAR2抗体或其抗原结合片段、激动性抗TROY抗体或其抗原结合片段、和激动性抗RELT抗体或其抗原结合片段。例如,免疫治疗剂可以是激动性抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段、激动性抗PD-1抗体或其抗原结合片段、或激动性抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。

[0486] 在一些实施例中,免疫治疗剂是激动性抗细胞表面淋巴细胞蛋白抗体或其抗原结合片段,诸如结合并促进以下项中的一种或多种的活性的抗体或其抗原结合片段:CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11、CD12、CD13、CD14、CD15、CD16、CD17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD46、CD47、CD48、CD49、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60、CD61、CD62、CD63、CD64、CD65、CD66、CD67、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD76、CD77、CD78、CD79、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120、CD121、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD128、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140、CD141、CD142、CD143、CD144、CD145、CD146、CD147、CD148、CD149、CD150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156、CD157、CD158、CD159、CD160、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172、CD173、CD174、CD175、CD176、CD177、CD178、CD179、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD187、CD188、CD189、CD190、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CD198、CD199、CD200、CD201、CD202、CD203、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210、CD211、CD212、CD213、CD214、CD215、CD216、CD217、CD218、CD219、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235、CD236、CD237、CD238、CD239、CD240、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD250、CD251、CD252、CD253、CD254、CD255、CD256、CD257、CD258、CD259、CD260、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD270、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、CD283、CD284、CD285、CD286、CD287、CD288、CD289、CD290、CD291、CD292、CD293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、CD306、CD307、CD308、CD309、CD310、CD311、CD312、CD313、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319和/或CD320。

[0487] 在一些实施例中,免疫治疗剂是结合趋化因子或淋巴因子的药剂(例如,多肽、抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或其构建体)。例如,免疫治疗剂可以是结合并活化CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL8、CCL2和CCL5中的一种或多种或全部的药剂(例如,多肽、抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或其构建体)。在一些实施例中,免疫治疗剂可以是结合并活化CCL3、CCL4、CCL8和CCL22中的一种或多种或全部的药剂(例如,多肽、抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或其构建体)。

[0488] 标记的TNFR2多肽

[0489] 在一些实施例中,出于纯化或检测的目的,将本文所述的激动性TNFR2单链多肽、抗体、其抗原结合片段或构建体缀合至另一分子(例如,表位标签)。在蛋白纯化中有用的此类分子的示例包括那些呈递能够被第二分子识别的结构表位的分子。这是通过亲和色谱法纯化蛋白质的常用策略,其中将分子固定在固相支持物上,并暴露于含有与能结合固定化合物的分子缀合的目标蛋白的异质混合物中。出于分子识别的目的,可以与激动性TNFR2多肽缀合的表位标签分子的示例包括但不限于麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、聚组氨酸标签、FLAG标签、myc标签、人流感血凝素(HA)标签、生物素、链霉亲和素。含有这些分子呈现的表位的缀合物能够分别被以下互补分子识别,诸如麦芽糖、谷胱甘肽、含镍复合物、抗FLAG抗体、抗myc抗体、抗HA抗体、链霉亲和素或生物素。例如,可以通过用含有可选择性识别并结合激动性TNFR2抗体或其片段的表位标签的互补分子的固相树脂处理混合物,人们可以从其他蛋白和生物分子(例如,DNA、RNA、碳水化合物、磷脂等)的复杂混合物中纯化已与表位标签缀合的本文所述的激动性TNFR2抗体或其片段。固相树脂的示例包括琼脂糖珠,其与水溶液中的纯化相容。

[0490] 本文所述的激动性TNFR2多肽还可以共价附着于荧光分子,例如,以通过荧光测定法和/或通过使用荧光显微镜直接观察以检测抗体或其抗原结合片段。可以与本文所述的抗体缀合的示例性荧光分子包括绿色荧光蛋白、青色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、藻红蛋白、别藻蓝蛋白、hoechst、4',6-双脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、碘化丙啶、荧光素、香豆素、罗丹明、四甲基罗丹明和青色素。适用于与本文所述的抗体缀合的荧光分子的另外的示例是本领域公知的,并且已详述于,例如,美国专利号7,417,131和7,413,874,其各自通过引用并入本文。

[0491] 含有荧光分子的激动性TNFR2多肽对于监测本文所述的抗体及其片段的细胞表面定位特性特别有用。例如,可以将培养的哺乳动物细胞(例如,Treg细胞)暴露于本文所述的激动性TNFR2多肽,其已经共价缀合至荧光分子,随后使用本领域已知的常规荧光显微镜技术分析这些细胞。共聚焦荧光显微镜是确定激动性TNFR2多肽在细胞表面定位的一种特别有效的方法,因为可以分析细胞的各个平面,以将已通过受体介导的内吞作用(例如,通过受体介导的内化作用)内化到细胞内部的抗体或其片段与结合到细胞膜外表面的抗体或其片段区分。此外,可以用与发射特定波长可见光的荧光分子缀合的激动性TNFR2抗体处理细胞(例如,在约535nm处发出荧光的荧光素)和另外的已知位于Treg细胞表面特定定位点并在不同波长处发出荧光的荧光分子(例如,定位于CD25并在约599nm处发出荧光的分子)。可以通过共聚焦荧光显微镜观察所得的发射模式,并且可以合并来自这两个波长的图像,以揭示有关激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段在Treg细胞表面上相对于其他受体的位置的信息。

[0492] 为了检测和可视化激动性TNFR2多肽,诸如单链多肽、抗体或其片段,也可以将生物发光蛋白掺入融合蛋白中。生物发光蛋白,诸如荧光素酶和水母发光蛋白,在与底物(例如,荧光素和腔肠素)的化学反应中发光。适合用作诊断序列的示例性生物发光蛋白及其使用方法描述于,例如,美国专利号5,292,658、5,670,356、6,171,809和7,183,092,其各自通过引用并入本文。用生物发光蛋白标记的激动性TNFR2抗体或其片段是在体外测定后用于检测本文所述抗体的有用工具。例如,通过使用本领域已知的凝胶电泳方法(例如,天然凝

胶分析)分离混合物的组分,可以在另外的蛋白的复杂混合物中检测已经与生物发光蛋白缀合的激动性TNFR2抗体的存在,随后将分离的蛋白质转移到膜上进行Western印迹。可以通过用适当的荧光素酶底物处理膜,然后使用已建立的方案在膜上可视化蛋白的混合物,以检测其他蛋白混合物中的激动性TNFR2多肽。

[0493] 本文所述的多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)也可以与含有放射性核的分子缀合,从而可以通过分析细胞核的放射性发射模式来检测本文所述的抗体或其片段。替代性地,可以通过在蛋白的制备过程中将放射性核掺入抗体中来直接修饰激动性TNFR2抗体或其片段。蛋氨酸(^{35}S)、氮(^{15}N)或碳(^{13}C)的放射性同位素可以通过,例如,在补充了含有这些同位素的营养物的培养基中培养细菌从而掺入本文所述的抗体或其片段中。任选地,通过,例如,在补充有放射性标记的酪氨酸的培养基中培养细菌细胞,可以将含有放射性卤素的酪氨酸衍生物掺入到激动性TNFR2多肽中。已显示在体内使用内源翻译酶将在酚系统的C2位置被放射性卤素官能化的酪氨酸迅速掺入延长的多肽链中(美国专利号4,925,651;其通过引用并入本文)。卤素包括氟、氯、溴、碘和砒。另外,在从细胞培养物中分离和纯化后,可以通过用放射性同位素官能化本文所述的多肽以修饰激动性TNFR2多肽。卤素代表一类同位素,其可容易地通过酪氨酸或色氨酸上的芳族取代,例如,通过这些残基中的一个或多个与亲电卤素物质的反应从而掺入纯化的蛋白中。放射性卤素同位素的示例包括 ^{18}F 、 ^{75}Br 、 ^{77}Br 、 ^{122}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{129}I 、 ^{131}I 或 ^{211}At 。

[0494] 掺入放射性同位素的另一种替代性的策略是将螯合基团共价附接至激动性TNFR2多肽,诸如单链多肽、抗体、其片段、或构建体。螯合基团可以通过与反应性官能团(诸如硫醇、氨基、醇或羧酸)附接而共价附着于激动性TNFR2抗体或其片段。然后可以修饰螯合基团以含有多种金属放射性同位素中的任何一种,包括但不限于诸如 ^{125}I 、 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{169}Yb 、 ^{186}Re 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{77}As 、 ^{72}As 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 或 ^{225}Ac 等放射性核素。

[0495] 在一些实施例中,可能需要将本文所述的多肽(例如,单链多肽、抗体、其片段或其构建体)与能够结合来自重元素或稀土离子的金属离子的螯合基团共价缀合,诸如 Gd^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{3+} 或 Cr^{2+} 。含有与这类顺磁性金属配位的螯合基团的缀合物可用于MRI成像应用。顺磁性金属包括但不限于铬(III)、锰(II)、铁(II)、铁(III)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、镓(III)、钆(III)、钷(III)、钆(III)、钷(III)、铽(III)、铈(III)、铈(III)和镱(III)。如此,可以通过MRI光谱法检测激动性TNFR2多肽。例如,可以将与顺磁性离子结合的螯合基团缀合的激动性TNFR2抗体或其片段施用于哺乳动物受试者(例如,人患者),以在施用后监测抗体的分布。这可以通过以下方式实现:通过本文所述的任何施用途径将抗体给予患者,诸如静脉内施用,然后根据已建立的方案通过记录患者的MRI分析施用的抗体的位置。

[0496] 可以将激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)与其他分子缀合,以改善蛋白在水溶液中的溶解性和稳定性。此类分子的示例包括PEG、PSA、牛血清白蛋白(BSA)和人血清白蛋白(HSA)等。例如,可以将激动性TNFR2多肽缀合到碳水化合物部分,以逃避接受治疗的患者的免疫系统对抗体或其片段的检测。高糖基化的这一过程通过在空间上抑制蛋白与B细胞受体的相互作用来降低治疗性蛋白的免疫原性。替代性地,可以将激动性TNFR2抗体或其片段与防止从人血清中清除并改善本文所述抗体的药代动力学特征的分子缀合。可以缀合或插入本文所述的TNFR2抗体或其片段以减弱清除并改

善这些抗体和片段的药代动力学特征的示例性分子包括挽救受体结合表位。这些表位在IgG免疫球蛋白的Fc区内发现,并已显示可结合Fc受体并延长人血清中的抗体半衰期。可以实现将挽救受体结合表位插入TNFR2抗体或其片段中,例如,如美国专利号5,739,277所述;其通过引用并入本文。

[0497] 修饰的激动性TNFR2多肽

[0498] 除了与其他治疗剂和标记缀合以进行识别或可视化外,还可以修饰本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体),从而改善它们的药代动力学特征、生物物理稳定性或激动能力。例如,不参与维持激动性TNFR2多肽的适当构象的任何半胱氨酸残基可以被等排或等电子氨基酸(例如,丝氨酸)取代,以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可将胱氨酸键添加至抗体或其片段以改善其稳定性(特别是当抗体是抗体片段,诸如Fv片段时)。例如,可以通过改变编码抗体重链和轻链的多核苷酸或编码抗体片段的多核苷酸,以编码可以在氧化条件下形成二硫键的一对或多对另外的半胱氨酸残基来实现,以增强抗体三级结构(参见,例如,美国专利号7,422,899;其通过引用并入本文)。

[0499] 可对本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)进行的另一有用的修饰包括改变这些抗体及其片段的糖基化谱。这可以,例如,通过取代、插入或缺失激动性TNFR2抗体中的氨基酸以插入或去除糖基化位点来实现。抗体的糖基化通常以N-连接或O-连接的方式发生。N-连接的糖基化是一种过程,其中碳水化合物部分与抗体的附接发生在天冬酰胺残基的侧链处。用于N-连接的糖基化的共有氨基酸序列包括三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸(NXS)和天冬酰胺-X-苏氨酸(NXT),其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸。这些三肽序列中的任何一个在多肽(例如,激动性TNFR2抗体)中的插入产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种与羟基氨基酸(最常见为丝氨酸或苏氨酸)的附接,尽管5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸也是糖苷形成的有效底物。糖基化位点向TNFR2抗体的添加因此可以通过改变抗体的氨基酸序列来实现(例如,使用本文所述的重组表达技术),使得其含有一个或多个上述三肽序列以促进N-连接的糖基化,或一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基与原始抗体的序列产生O-连接的糖基化(参见,例如,美国专利号7,422,899;其通过引用并入本文)。

[0500] 在替代情况下,可能需要修饰关于效应子功能的本文描述的抗体或其片段,例如,从而增强抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可以通过在抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸取代来实现。例如,可以将半胱氨酸残基引入TNFR2抗体或其片段的Fc区中(例如,通过本文所述的重组表达技术),以促进该区中另外的链间二硫键形成。由此产生的同型二聚体抗体可具有增加的构象约束,其可促进改善的内化能力和/或增强的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚体抗体也可以使用异双功能交联剂进行制备,例如,如Wolff等人(Canc. Res., 53:2560-2565, 1993)所述;其通过引用并入本文。替代性地,抗体可经工程化以具有双Fc区,从而可以具有增强的补体裂解和ADCC能力((参见,Stevenson等人(Anti-Canc. Drug Des., 3:219-230, 1989);其通过引用并入本文)。

[0501] 在一些实施例中,可以通过掺入一个或多个氨基酸修饰,例如通过改变Fab结构域的CH1或CL区以引入挽救受体基序,例如,在IgG的Fc区的CH2结构域的两个环中发现的基

序,可以改善本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体及其抗原结合片段)的血清半衰期。此类改变描述于,例如,美国专利号5,869,046和美国专利号6,121,022;其通过引用并入本文。还可以进行另外的框架修饰以降低抗体或其片段的免疫原性或减少或去除其中存在的T细胞表位,例如,如US2003/0153043所述;其通过引用并入本文。

[0502] 治疗方法

[0503] 本公开内容的激动性TNFR2多肽(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过本文所述的保守氨基酸取代和/或其他激动剂TNFR2抗体与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR)对于治疗多种免疫性疾病是有用的疗法。本文所述的激动性TNFR2多肽可施用于受试者,例如,哺乳动物受试者,例如人,以治疗病况,诸如自身免疫性疾病、神经系统疾病、代谢性疾病(例如,糖尿病)、黄斑疾病(例如,黄斑变性)、肌肉萎缩、流产有关的疾病、血管疾病(例如,动脉粥样硬化)、骨质流失有关的疾病(例如,由于更年期或骨质疏松症引起的骨质流失)、过敏、哮喘、血液病(例如,血友病)、肌肉骨骼疾病、生长受体表达或活性有关的疾病、肥胖、移植物抗宿主病(GVHD)或同种异体移植物排斥等适应症。本公开内容的激动性TNFR2多肽还可用于,例如,通过诱导受损组织或器官内的细胞增殖来治疗需要器官修复或再生的患者。可将本文所述的激动性TNFR2多肽施用于哺乳动物受试者,例如人,以刺激Treg细胞(例如,CD4⁺、CD25⁺、FOXP3⁺Treg细胞)和/或MDSC增殖。该反应可以具有减少细胞毒性T淋巴细胞(例如,CD8⁺T细胞)群的效应,该细胞毒性T淋巴细胞通常与加剧可引起免疫病症的不适当免疫应答有关。另外地或替代性地,激动性TNFR2多肽可以直接杀死T效应细胞,例如CD8⁺T效应细胞,并且可以促进表达TNFR2的实质细胞的增殖、再生、愈合和/或保护,如本文所述。

[0504] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR)可以施用于患有移植物排斥的受试者,例如,哺乳动物受试者,例如人。本文所述的激动性TNFR2多肽可以,例如,通过结合自身反应性CD8⁺T细胞表面上的TNFR2受体而结合移植物表面上存在的抗原并诱导这些CD8⁺T细胞中的细胞凋亡,或诱导Treg细胞和/或MDSC扩增,随后可能消除自身反应性CD8⁺T细胞。可以通过施用本文所述的多肽进行治疗的移植物排斥的示例包括但不限于,皮肤移植物排斥、骨移植物排斥、血管组织移植物排斥、韧带移植物排斥(例如,环甲韧带移植物排斥、牙周韧带移植物排斥、晶状体悬韧带移植物排斥、掌侧桡腕韧带移植物排斥、背侧桡腕韧带移植物排斥、尺侧副韧带移植物排斥、桡侧副韧带移植物排斥、乳房悬韧带移植物排斥、骶髂前韧带移植物排斥、骶髂后韧带移植物排斥、骶结节韧带移植物排斥、骶棘韧带移植物排斥、耻骨弓状韧带移植物排斥、耻骨上韧带移植物排斥、前十字韧带移植物排斥、外侧副韧带移植物排斥、后十字韧带移植物排斥、内侧副韧带移植物排斥、颅十字韧带移植物排斥、尾十字韧带移植物排斥、膝

韧带移植物排斥)和器官移植物排斥(例如,心脏、肺、肾脏、肝脏、胰腺、肠和胸腺移植物排斥等)。

[0505] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR)可以,另外地或替代性地,施用于患有移植物抗宿主病(GVHD)的受试者,例如,哺乳动物受试者,例如人。可以使用本发明的组合物和方法治疗的示例性移植物抗宿主病包括那些由骨髓移植以及血细胞移植引起的疾病,该血细胞为诸如造血干细胞、常见髓系祖细胞、常见淋巴样祖细胞、巨核细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、T细胞、B细胞、天然杀伤细胞和/或树突状细胞。

[0506] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR)还可以施用于患有免疫性疾病的受试者,例如,哺乳动物受试者,例如人,例如,以结合自身反应性T细胞表面的TNFR2受体并诱导细胞凋亡,和/或促进Treg细胞生长,从而抑制患者体内不适当反应的细胞毒性T淋巴细胞和B淋巴细胞的活性。本发明的抗体可以,例如,通过本文所述的任何施用途径施用于受试者。

[0507] 可以通过施用本文所述的多肽治疗的免疫性疾病(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR)包括过敏,诸如食物过敏、季节性过敏、宠物过敏、荨麻疹、花粉症、过敏性结膜炎、常春藤过敏、橡木过敏、霉菌过敏、药物过敏、粉尘过敏、化妆品过敏和化学过敏。

[0508] 可以通过施用本文所述的激动性TNFR2多肽治疗的疾病(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR)包括自身免疫性疾病,诸如I型糖尿病、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性Addison病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、Behcet病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻性皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、Churg-Strauss综合征、瘢痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、Crohn病、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-

纤维肌炎、Graves病、Guillain-Barré、Hashimoto甲状腺炎、甲状腺功能减退、炎症性肠病、自身免疫性淋巴组织增生综合征 (ALPS)、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA肾病、青少年关节炎、扁平苔藓、狼疮、Ménière病、混合性结缔组织病、多发性硬化、重症肌无力、寻常型天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、Raynaud现象、Raynaud综合征、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、Sjögren综合征、Stiff-Man综合征、Takayasu动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风和Wegener肉芽肿病。

[0509] 本文所述的激动性TNFR2多肽 (例如, 抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体, 该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个 (如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性 (例如, 85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性) 和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR) 可以另外地用于治疗需要器官修复或再生的患者。例如, 本发明的激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段可以用于刺激器官修复或再生, 例如, 通过在受损组织内的细胞表面上结合TNFR2, 从而诱导TRAF2/3介导的和/或NF κ B介导的细胞增殖。可以通过将本发明的激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段施用于受试者 (例如, 哺乳动物受试者, 例如人) 以诱导再生的组织和器官的示例包括胰腺、唾液腺、垂体、肾脏、心脏、肺、造血系统、颅神经、心脏、血管 (包括主动脉)、嗅腺、耳朵、神经、头部结构、眼睛、胸腺、舌、骨、肝脏、小肠、大肠、肠道、肺、脑、皮肤、周围神经系统、中枢神经系统、脊髓、乳房、胚胎结构、胚胎或睾丸。

[0510] 本文所述的激动性TNFR2多肽 (例如, 抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体, 该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个 (如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性 (例如, 85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性) 和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR) 还可以施用于受试者 (例如, 哺乳动物受试者, 例如人), 以治疗神经系统疾病或病况, 诸如脑肿瘤、脑转移、脊髓损伤、精神分裂症、癫痫、肌萎缩性侧索硬化症 (ALS)、帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿病或中风。

[0511] 本领域普通技术人员可以容易地确定本文所述的激动性TNFR2多肽的有效量, 以施用于需要其的哺乳动物受试者 (例如, 人)。例如, 医师可以开始以低于达到期望疗效所需水平的剂量来指定激动性TNFR2多肽的剂量, 并逐渐增加剂量直至达到期望效应。替代性地, 医师可以通过以高剂量施用激动性TNFR2多肽并随后逐渐降低剂量来开始治疗方案, 直到达到治疗效果为止 (例如, CD8⁺T细胞群的增殖减少或IFN γ 的外周分泌减少)。通常, 本发明的抗体或其抗原结合片段的合适的日剂量将是有效产生疗效的最低剂量的抗体量。本发明的抗体或其抗原结合片段可以通过注射施用, 例如, 通过静脉内、肌内、腹膜内或皮下注射, 任选地在靶组织部位附近。本发明的抗体或其抗原结合片段的治疗性组合物的日剂量可以单剂量施用, 或以两个剂量、三个剂量、四个剂量、五个剂量、六个剂量或更多个剂量单独施用, 以适当的间隔整天、整周、整月或整年, 任选地, 以单位剂型。尽管本发明的抗体或

其片段可以单独施用,但是也可以与赋形剂、载剂和任选的另外的治疗剂组合作为药物制剂施用。

[0512] 可以通过本领域已知的多种方法中的任一种来监测本公开内容的多肽减弱免疫性疾病(诸如自身免疫性疾病)进展的能力。例如,医师可以通过分析特定患者内CD8+T细胞分泌的IFN γ 的量来监测哺乳动物受试者(例如,人)对用激动性TNFR2多肽治疗的反应。例如,本发明的抗体可以能够将IFN γ 分泌减少1%至100%(例如,1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%)。替代性地,医师可以通过分析特定受试者淋巴中的Treg细胞群来监测受试者(例如人)对用本发明的激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段治疗的反应性。例如,医师可以使用已建立的程序从哺乳动物受试者(例如,人)中抽取血液样品,并确定Treg细胞(例如,CD4+CD25+FOXP3+Treg细胞或CD17+Treg细胞)群的量或密度,诸如荧光活化细胞分选。在这些情况下,高数量的Treg细胞指示有效的治疗,而较低的Treg细胞计数可以指示应当给患者开处方或施用更高剂量的本发明的TNFR2抗体,直到例如达到理想的Treg细胞计数。另外,本领域技术人员可通过分析从患者体内分离出的淋巴样品中的自身反应性CD8+T细胞的量,通过向患有免疫性疾病(诸如本文所述的自身免疫性疾病)的患者施用其抗原结合片段的激动性TNFR2抗体来监测疗效。本发明的激动性TNFR2抗体及其抗原结合片段可以,例如,通过在自身反应性T细胞表面结合TNFR2并诱导细胞凋亡和/或通过刺激Treg细胞的扩增来减弱自身反应性T细胞的增殖,随后消除自身反应性T淋巴细胞。激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段的治疗可导致从接受治疗的患者中分离出的淋巴中的自身反应性T细胞的量减少,并且从此类患者身上分离出来的淋巴样品中自身反应性T细胞群的量的快速下降表明治疗有效。如果从患者身上分离出的淋巴样品的自身反应性T细胞计数并未因激动性TNFR2抗体疗法而下降,则医师可给患者开具更高剂量的抗体或其抗原结合片段处方或施用激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段的频率较高,例如,每天、每周或每月多次。

[0513] 药物组合物

[0514] 可以使用本领域已知的方法制备含有激动性TNFR2多肽,诸如本文所述的单链多肽、抗体、其抗原结合片段、或构建体的药物组合物。可以掺入本公开内容的药物组合物中的示例性激动性TNFR2多肽包括具有至少两个TNFR2结合位点的那些多肽,其中结合位点在空间上彼此间隔小于约133 Å,以及具有人IgG1同种型、IgG2同种型(例如,在CH1结构域中具有C127S突变,从而产生,例如,人IgG2-B同种型)、IgG3同种型或IgG4同种型的那些多肽。TNFR2激动剂可以是,例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR。

[0515] 本文所述的药物组合物可以含有与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合的本文所述的激动性TNFR2多肽。例如,本文所述的药物组合物可以使用,例如,生理上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂进行制备(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980);其通过引用并入本文),并以期望的形式,例如冻干制剂或水溶液的形式进行

制备。还可以制备组合物以含有期望浓度的活性剂(例如,激动性TNFR2抗体或其片段)。例如,本文所述的药物组合物可以含有至少10%(例如,10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或100%)的活性剂,以重量计(w/w)。

[0516] 另外,可以掺入药物制剂中的活性剂(例如,本文所述的激动性TNFR2多肽,诸如本文所述的显性激动性TNFR2多肽)本身可以具有期望的纯度水平。例如,本文所述的多肽,诸如单链多肽、抗体或其抗原结合片段,其特征在于在从细胞培养基中分离抗体后或通过如本文所述的建立的固相肽合成方法或天然化学连接来化学合成例如单链抗体片段(例如scFv)后,其具有一定程度的纯度。在将抗体掺入药物组合物中之前,本文所述的激动性TNFR2多肽可以具有至少10%纯度(例如,10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%或100%纯度)。

[0517] 此外,本公开内容的激动性TNFR2多肽(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR)可以掺入药物组合物中,使得存在于药物组合物中的许多多肽采用单个二硫键结合的同等型。例如,本公开内容的药物组合物包括含有激动剂TNFR2多肽的那些药物组合物,其中,例如,药物组合物中10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或更高的多肽以单个二硫键结合的同等型(例如本文所述的IgG2-B同等型)存在。

[0518] 通过将具有期望纯度的抗体与本领域通常使用的任选的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(例如,缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子型去污剂、抗氧化剂和其他混杂添加剂)混合,可以制备本文所述的激动性TNFR2多肽的药物组合物,以冻干制剂或水溶液的形式进储存。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版(Osol,编辑1980;其通过引用并入本文)。此类添加剂在所采用的剂量和浓度下必须对受体无毒。

[0519] 缓冲剂

[0520] 缓冲剂有助于将pH维持在接近生理条件的范围内。它们可以约2mM至约50mM的浓度存在。与本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体及其抗原结合片段)一起使用的合适的缓冲剂包括有机酸和无机酸及其盐,诸如柠檬酸盐缓冲剂(例如,柠檬酸钠-柠檬酸二钠混合物、柠檬酸-柠檬酸三钠混合物、柠檬酸-柠檬酸单钠混合物等),琥珀酸盐缓冲液(例如,琥珀酸-琥珀酸钠混合物、琥珀酸-氢氧化钠混合物、琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等),酒石酸缓冲液(例如,酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠混合物等),富马酸缓冲液(例如,富马酸-富马酸单钠混合物、富马酸-富马酸二钠混合物、富马酸单钠-富马酸二钠混合物等),葡萄糖酸盐缓冲液(例如,葡萄糖酸-葡萄糖酸钠混合物、葡萄糖酸-氢氧化钠混合物、葡萄糖酸-葡萄糖酸钾混合物等),草酸盐缓冲液(例如,草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等),乳酸盐缓冲液(例如,乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等)和醋酸盐缓冲液(例如,醋酸-醋酸钠混合物、醋酸-氢氧化钠混合物等)。另外,可以使用磷酸盐缓冲液、组氨酸

缓冲液和三甲胺盐,诸如Tris。

[0521] 防腐剂

[0522] 可以将防腐剂添加到本文所述的组合物中以阻止微生物生长,并且可以以0.2%-1% (w/v) 范围内的量添加防腐剂。本文描述的与激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)一起使用的合适的防腐剂包括苯酚、苯甲醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苄基氯化铵、卤化苄索氯铵(例如,氯化物、溴化物和碘化物)、氯化六甲铵和对羟基苯甲酸烷基酯(诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯)、邻苯二酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。可以添加有时被称为“稳定剂”的等渗剂以确保本文所述的液体组合物的等渗性,并包括多元醇,例如三元或更高级的糖醇,诸如甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨醇和甘露醇。稳定剂是指广泛类型的赋形剂,其功能范围可以从填充剂到可溶解治疗剂或有助于防止变性或粘附于容器壁的添加剂。典型的稳定剂可以是多元糖醇(以上已列举);氨基酸,诸如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等),有机糖或糖醇,诸如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌醇、半乳糖醇、甘油等,包括环醇诸如肌醇;聚乙二醇;氨基酸聚合物;含硫还原剂,诸如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(例如,10个残基或更少的肽);蛋白,诸如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮单糖,诸如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖;二糖(诸如乳糖、麦芽糖、蔗糖)和三糖(诸如棉子糖);以及多糖(诸如右旋糖酐)。稳定剂可以以每份重量活性蛋白0.1至10,000重量的范围存在。

[0523] 去污剂

[0524] 可以添加非离子表面活性剂或去污剂(也称为“湿润剂”)以助于溶解治疗剂,并保护治疗蛋白免受搅动引起的聚集,这也使该制剂暴露于受应力的剪切表面而未引起蛋白变性。合适的非离子型表面活性剂包括聚聚山梨酯(20、80等)、泊洛沙姆(184、188等)、Pluronic多元醇、聚氧乙烯山梨糖醇酐单醚(TWEEN®-20、TWEEN®-80等)。非离子表面活性剂可以约0.05mg/mL至约1.0mg/mL的范围存在,例如约0.07mg/mL至约0.2mg/mL。

[0525] 另外的混杂赋形剂包括填充剂(例如,淀粉)、螯合剂(例如,EDTA)、抗氧化剂(例如,抗坏血酸、蛋氨酸、维生素E)和助溶剂。

[0526] 其他药物载剂

[0527] 可以掺入本文所述的药物组合物中的替代性药学上可接受的载剂可以包括葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、淀粉、橡胶arable、磷酸钾、精氨酸盐、明胶、硅酸钾、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、苯甲酸丙羟基酯、滑石粉、硬脂酸镁和矿物油,但不限于此。本文所述的含有激动性TNFR2抗体的组合物可以进一步包含润滑剂、润湿剂、甜味剂、调味剂、乳化剂、悬浮剂和防腐剂。合适的药学上可接受的载剂和制剂的详细信息可见Remington's Pharmaceutical Sciences(第19版,1995),其通过引用并入本文。

[0528] 免疫治疗剂

[0529] 使用本文所述的方法,本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段或其构建体)可以与免疫治疗剂共施用(或与之混合)或分开施用。例如,可以将

本文所述的激动性TNFR2多肽(诸如本文所述的单链多肽、抗体、其抗原结合片段、或构建体)施用于患者,例如患有炎症的人患者。在一些实施例中,在向患者施用免疫治疗剂或其他药剂以减轻炎症或疼痛之前,向患者施用激动性TNFR2多肽(例如,本文所述的单链多肽、抗体、其抗原结合片段、或构建体)。替代性地,可以在免疫治疗剂之后向患者施用激动性TNFR2多肽(例如,本文所述的单链多肽、抗体、其抗原结合片段、或构建体)。例如,可以在免疫疗法治疗失败后向患者施用激动性TNFR2多肽(例如,本文所述的单链多肽、抗体、其抗原结合片段、或构建体)。

[0530] 血脑屏障渗透

[0531] 在某些实施例中,可以配制本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)以确保在体内的适当分布。例如,血脑屏障(BBB)排除了许多高度亲水的化合物。为了确保本文所述的治疗组合物穿过BBB(如有需要),可以将它们配制在例如脂质体中。生产脂质体的方法已描述于,例如,美国专利号4,522,811;5,374,548;和5,399,331。脂质体可以包含一个或多个部分,该部分被选择性地运输到特定细胞或器官中,从而增强靶向药物的递送(参见,例如,V.V.Ranade(J.Clin.Pharmacol.29:685,1989))。示例性靶向部分包括,例如,叶酸或生物素(参见,例如,美国专利号5,416,016);甘露糖苷(Umezawa等人(Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038,1988));抗体(P.G.Bloeman等人(FEBS Lett.357:140,1995);M.Owais等人(Antimicrob.Agents Chemother.39:180,1995));表面活性剂蛋白A受体(Briscoe等人(Am.J.Physiol.1233:134,1995));其公开内容各自通过引用并入本文。

[0532] 施用途径和给药

[0533] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可以通过多种途径(诸如口服、经皮、皮下、鼻内、静脉内、肌内、眼内、肿瘤内、肠胃外、局部、鞘内和脑室内)施用于哺乳动物受试者(例如,人)。在任何给定情况下,最合适的施用途径将取决于待施用的特定多肽、患者、药物制剂方法、施用方法(例如,施用时间和施用途径)、患者的年龄、体重、性别、所治疗疾病的严重程度、患者的饮食和患者的排泄率。

[0534] 本文所述的激动性TNFR2多肽的有效剂量可以为,例如,每单次(例如,推注)施用、多次施用或连续施用(例如,连续输注)约0.0001至约100mg/kg体重,或达到每单次(例如,推注)施用、多次施用或连续施用(例如,连续输注)的血清浓度为0.0001-5000 μ g/mL血清浓度,或其中任何有效范围或值(取决于所治疗的病况、施用途径以及受试者的年龄、体重和病况)。在某些实施例中,每个剂量可以在约0.0001mg至约500mg/kg体重的范围内。例如,本文所述的药物组合物可以0.001-100mg/kg(体重)范围的日剂量施用。该剂量可以每天、每周、每月或每年一次或多次(例如,2-10次)施用于需要其的哺乳动物受试者(例如,人)。

[0535] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可以通过连续静脉内输注或作为单次推注施用的方式施用于患者。本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可以以,例如,0.01 μ g至约5g的体积(例如,10 μ L至10mL的体积)施用于患者。激动性TNFR2多肽可以在几分钟到几小时的过程中施用于患者。例如,本文所述的激动性TNFR2多肽可在5分钟至5小时的过程中施用于患者,诸如在5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、60分钟、65分钟、70分钟、80分钟、90分钟、95分钟、100分钟、105分钟、110分

钟、115分钟、120分钟、125分钟、130分钟、135分钟、140分钟、145分钟、150分钟、155分钟、160分钟、165分钟、170分钟、175分钟、180分钟、185分钟、190分钟、195分钟、200分钟、205分钟、210分钟、215分钟、220分钟、225分钟、230分钟、235分钟、240分钟、245分钟、250分钟、255分钟、260分钟、265分钟、270分钟、275分钟、280分钟、285分钟、290分钟、295分钟、或300分钟或更多的过程中。

[0536] 本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)可以与免疫治疗剂(例如PD-1的激动剂,诸如其抗体或其抗原结合片段,PD-L1激动剂抗体或其抗原结合片段,和/或激动性CTLA-4抗体或其抗原结合片段)组合施用。

[0537] 含有激动性TNFR2多肽的试剂盒

[0538] 本文还包括含有激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)的试剂盒。本文提供的试剂盒可以含有上述任何激动性TNFR2多肽,以及编码这些多肽的任何多核苷酸、含有这些多核苷酸的载体或经工程化以表达和分泌本文所述抗体的细胞(例如,原核或真核细胞)。

[0539] 可掺入本文所述试剂盒的本公开内容的示例性组合物包括激动性TNFR2多肽,诸如具有至少两个TNFR2结合位点的那些多肽,其中结合位点在空间上彼此间隔约133 Å或更小,以及具有人IgG2同种型(例如,人IgG2-B同种型)的那些多肽。可掺入本文所述的试剂盒中的本公开内容的组合物还包括含有采用单个二硫键结合的同种型的激动性TNFR2多肽的药物组合物,诸如,其中药物组合物中10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或更多的多肽以单个二硫键结合的同种型形式存在。

[0540] 本文所述的试剂盒可以包括可用于产生本文所述的组合物的试剂(例如,激动性TNFR2多肽,诸如单链多肽、抗体、构建体、含有激动性TNFR2多肽的缀合物、编码激动性TNFR2多肽的多核苷酸、含有这些多核苷酸的载体)。任选地,本文所述的试剂盒可以包括可诱导细胞(例如,哺乳动物细胞)内激动性TNFR2多肽表达的试剂,诸如强力霉素或四环素。在其他情况下,本文所述的试剂盒可以含有能够结合和检测含有激动性TNFR2抗体和表位标签的融合蛋白的化合物。例如,在此类情况下,本文所述的试剂盒可含有麦芽糖、谷胱甘肽、含镍复合物、抗FLAG抗体、抗myc抗体、抗HA抗体、生物素或链霉亲和素。

[0541] 本文所述的试剂盒还可包括能够直接检测激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其片段或其构建体)的试剂。此类试剂的示例包括选择性识别并结合本文所述的TNFR2抗体的Fc区内的特定结构特征的二抗。本文所述的试剂盒可以含有识别激动性TNFR2抗体的Fc区并与荧光分子缀合的二抗。使用已建立的免疫荧光技术,这些抗体-荧光团缀合物为分析激动性TNFR2抗体例如在特定组织或哺乳动物细胞中的定位提供了工具。在一些实施例中,本文所述的试剂盒可包括表现出已知的亚细胞定位模式的另外的荧光化合物。这些试剂可以与另一抗体-荧光团缀合物组合使用,例如,特异性识别细胞表面上不同受体的一种缀合物,以分析TNFR2抗体相对于其他细胞表面蛋白的定位。

[0542] 本文所述的试剂盒还可以含有可用于通过施用本文所述的激动性TNFR2多肽(例如,单链多肽、抗体、其抗原结合片段及其构建体)以分析患者对治疗的反应的试剂。例如,本文所述的试剂盒可以包括激动性TNFR2抗体和一种或多种试剂,该试剂可用于确定从接受本文所述抗体治疗的受试者(例如,人)抽取的血液样品中的Treg细胞的量。此类试剂盒

可以含有,例如,选择性结合由Treg细胞呈递的细胞表面抗原(诸如CD4和CD25)的抗体。任选地,这些抗体可以用荧光染料诸如荧光素或四甲基罗丹明标记,以便于通过本领域已知的荧光活化细胞分选(FACS)方法分析Treg细胞。本文所述的试剂盒可任选地含有一种或多种可用于定量肿瘤反应性T淋巴细胞的试剂,以确定本文所述的激动性TNFR2多肽在恢复肿瘤浸润的淋巴细胞增殖中的有效性。例如,本文所述的试剂盒可以含有与细胞毒性T细胞(诸如CD8或CD3)的表面的细胞表面标志物选择性结合的抗体。任选地,这些抗体可以用荧光分子标记,以能够通过FACS分析进行定量。

[0543] 本文所述的试剂盒还可以含有用于确定本文所述的激动性TNFR2多肽对衍生自TNFR2的一种或多种肽的亲力和选择性的一种或多种试剂。例如,试剂盒可以含有激动性TNFR2多肽和一种或多种试剂,其可用于ELISA分析中,以确定一种或多种以与天然蛋白中的表位相似的构象呈递TNFR2表位的肽的本文所述抗体的 K_D 。试剂盒可以含有,例如,微量滴定板,该微量滴定板含有预先与抗生物素蛋白缀合的孔,并且可以含有TNFR2衍生的肽的文库,每个肽均与生物素部分缀合。此类试剂盒可以任选地含有与本文所述的激动性TNFR2抗体的Fc区特异性结合的二抗,并且该二抗可以与酶(例如,辣根过氧化物酶)缀合,该酶催化化学反应,从而导致发出发光。

[0544] 本文所述的试剂盒还可以含有本文所述的激动性TNFR2多肽和可与此类抗体缀合的试剂,包括先前所述的试剂(例如,细胞毒剂、荧光分子、生物发光分子、含有放射性同位素的分子、含有与顺磁性离子结合的螯合基团等)。这些试剂盒可另外含有关于如何实现本文所述的激动性TNFR2抗体与第二分子(诸如上述分子)缀合的说明书。

[0545] 本文所述的试剂盒还可包含含有编码激动性TNFR2多肽的多核苷酸的载体,诸如本文所述的任何载体。替代性地,试剂盒可以包括哺乳动物细胞(例如,CHO细胞),其已经基因改变以表达和分泌来自细胞核基因组的激动性TNFR2抗体或其片段。此类试剂盒还可以含有描述如何诱导来自多核苷酸的激动性TNFR2抗体或其片段的表达的说明书,并且可以另外包括可用于促进这些多核苷酸转录的试剂(诸如,强力霉素或四环素)。此类试剂盒可用于生产本文所述的激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段。

[0546] 本文所述的其他试剂盒可包括用于工程化原核或真核细胞(例如,CHO细胞或BL21(DE3)大肠杆菌细胞)的工具,以从细胞的核基因组表达和分泌本文所述的激动性TNFR2多肽。例如,试剂盒可以含有储存在适当培养基中的CHO细胞,并任选地根据本领域已知的方法冷冻。试剂盒还可提供载体,该载体含有编码核酸酶的多核苷酸(例如,本文所述的CRISPER/Cas、锌指核酸酶、TALEN、ARCUSTM核酸酶),以及用于在细胞中表达核酸酶的试剂。该试剂盒可以另外提供用于修饰编码核酸酶的多核苷酸的工具,以使其能够改变核酸酶的DNA序列,以指导特定目标DNA序列的切割。此类工具的示例包括用于扩增和定点诱变编码目标核酸酶的多核苷酸的引物。试剂盒还可含有限制性酶,其可用于从载体中选择性地切除编码核酸酶的多核苷酸,并且一旦使用者已修饰基因,随后将修饰的多核苷酸重新引入载体中。此类试剂盒还可包括可用于催化修饰的编码核酸酶的多核苷酸与靶载体之间的共价磷酸二酯键形成的DNA连接酶。本文所述的试剂盒还可提供编码激动性TNFR2多肽的多核苷酸,以及描述一种方法的包装插页,该方法可用于选择性地裂解细胞基因组中的特定DNA序列,以将编码激动性TNFR2抗体的多核苷酸掺入该位点的基因组中。任选地,试剂盒可以提供编码融合蛋白的多核苷酸,该融合蛋白含有激动性TNFR2抗体或其片段和另外的多肽,

诸如,例如,本文所述的那些。

[0547] 实例

[0548] 提出以下实例以向本领域普通技术人员提供对本文所要求保护的组合物和方法如何进行、制备和评估的描述,并且仅用于示例性描述,而并不旨在限制发明人认为其发明的范围。

[0549] 实例1.由激动性TNFR2多肽结合的TNFR2中的离散表位作图

[0550] 筛选衍生自人TNFR2的线性、环状和双环肽文库中蛋白内对单克隆TNFR2抗体TNFRAG1具有高亲和力的不同序列。为了筛选TNFR2中的构象表位,将来自一级蛋白序列不同区的肽彼此缀合以形成嵌合肽。这些肽在其一级序列内的关键位置上含有半胱氨酸残基。这促进了分子内交联策略,该策略用于将单个肽限制为多种三维构象中的一个。半胱氨酸残基的未保护硫醇通过亲核取代反应与二价和三价亲电试剂(诸如2,6-双(溴甲基)吡啶和1,3,5-三(溴甲基)苯)进行交联,从而分别形成构象受限的环和双环肽。以这种方式,含有来自TNFR2一级序列不同区的氨基酸的独特组合的肽被限制,以在结构上预组织表位,该表位可能类似于天然TNFR2三级结构中呈现的那些。筛选含有这些肽的文库,通过将肽固定在固体表面的不同区并在存在过氧化氢的情况依次用激动性TNFR2抗体TNFRAG1,随后是与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的二抗和HRP底物(2,2'-叠氮基二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐)处理表面。在用连续的试剂处理之间,将固体表面洗涤,以除去过量的或非特异性结合的材料。随后使用电荷耦合器件(CCD)-相机和图像处理系统分析每个表面的每个区域的发光。

[0551] 使用组合矩阵设计,“表面上的多肽受限文库”(CLIPS)平台首先将目标蛋白(例如,TNFR2)转换为最多10,000个重叠的肽构建体的文库(Timmerman等人,J.Mol.Recognit.,20:283-29,2007)。在固体载体上,合成线性肽的基质,随后将其成形为空间限定的CLIPS构建体。代表具有正确构象的不连续表位的多个部分的构建体以高亲和力结合抗体,该抗体被检测和定量。呈现不完整表位的构建体以较低的亲和力结合抗体,而不含表位的构建体根本不结合。亲和力信息用于迭代筛选中,以详细定义表位的序列和构象。从这些ELISA实验获得的原始发光数据有助于分析与激动性TNFR2抗体结合的TNFR2表面上存在的表位。

[0552] 肽合成

[0553] 为了重建靶分子的表位,合成肽文库。使用二环己基碳二亚胺(DCC)及N-羟基苯并三唑(HOBt),随后使用三氟乙酸(TFA)裂解Boc-基团,通过与叔丁氧羰基-六亚甲基二胺(BocHMDA)反应接枝专有的亲水性聚合物配方,获得氨基官能化的聚丙烯载体。通过定制的改良的JANUS®液体处理站(Perkin Elmer),使用标准的Fmoc-肽合成方法在氨基官能化的固相支持物上合成肽。CLIPS技术允许将肽结构化为单环、双环、三环、片状折叠、螺旋状折叠及其组合。CLIPS模板与半胱氨酸残基偶联。肽中的多个半胱氨酸的侧链与一个或两个CLIPS模板偶联。例如,将0.5mM CLIPS模板溶液(2,6-双(溴甲基)吡啶)溶解在碳酸氢铵(20mM,pH 7.8)/乙腈(1:3(v/v))中。将该溶液添加到表面结合的肽阵列中。CLIPS模板将与肽阵列固相结合的两个半胱氨酸的侧链反应(455孔板,含3 μ l孔)。将肽阵列在溶液中轻轻摇动30至60分钟,同时将其完全覆盖在溶液中。最后,将肽阵列用过量的H₂O充分洗涤,并在70°C下PBS(pH 7.2)中的含1%SDS/0.1% β -巯基乙醇的破坏缓冲液中超声处理30分钟,然后在H₂O中超声处理45分钟。

[0554] 通过表面等离子共振分析激动性TNFR2抗体的结合亲和力

[0555] 使用BIAcore™ Analysis Services (Precision Antibody) 测量激动性TNFR2抗体对重组人TNFR2的亲和力。简而言之, 使用在PBS中的生物素-LC-LC-NOSE (Thermo-Fisher) 以5:1化学计量比将抗体生物素化。通过离心色谱除去过量的生物素化试剂, 并将生物素化的抗体捕获在3000RU的链霉亲和素表面上至100RU的水平。具有该抗体捕获水平的TNFR2的理论信号最大值为26RU, 并且该信号通过在运行缓冲液中使用500nMTNFR2进行的初步实验达到。进样2min, 以60 μ L/min的流量进行抗原结合动力学分析。以1mg/ml的浓度进样抗体, 以最终捕获100RU。使用的仪器是带有BioCap芯片的BIAcore™ 3000 (GE Healthcare)。使用双重参照法进行分析。参考通道含有相同水平的链霉亲和素。

[0556] ELISA筛选

[0557] 以ELISA形式检测抗体与每种合成肽的结合。将表面固定的肽阵列与一抗溶液孵育(在4 $^{\circ}$ C过夜)。洗涤后, 将肽阵列与合适的抗体过氧化物酶缀合物(SBA)的1/1000稀释液在25 $^{\circ}$ C下孵育一小时。洗涤后, 加入过氧化物酶底物2,2'-叠氮基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐 (ABTS) 和2 μ l/ml的3% H₂O₂。一小时后, 测量显色。使用电荷耦合器件 (CCD) -相机和图像处理系统对显色进行定量。从CCD相机获得的值范围为0至3000mAU, 类似于标准的96孔板ELISA读数器。

[0558] 通过ELISA评估的人TNFR2的一系列肽片段对TNFR1的亲和力总结在下表2中。使用分类四点量表定性报告亲和力, 使得亲和力评分“0”表示最低亲和力, 而亲和力评分“4”表示最高亲和力。

[0559] 表2. 人TNFR2肽片段对激动性TNFR2抗体TNFR1的亲和力

[0560]

SEQ ID NO.	人 TNFR2 的一部分	氨基酸序列	亲和力评分
1	全长人 TNFR2	MAPVAVWAALAVGLELWAAHALP AQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQT AQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTV CDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSR CSSDQVETQACTREQNRICTCRPGW YCALSQEGCRLCAPLRKCRPGFGV ARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSS TDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCT STSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHT QPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGS TGDFALPVGLIVGVTALGLLIIGVVN CVIMTQVKKKPLCLQREAKVPHLPA DKARGTQGPEQQHLLITAPSSSSSSLE SSASALDRRAPTRNQPQAPGVEASG AGEARASTGSSDSSPGGHGTQVNVT CIVNVCSSSDHSSQCSSQASSTMGDT DSSPSESPKDEQVPFSKEECAFRSQLE TPETLLGSTEEKPLPLGVPDAGMKPS	4
49	人 TNFR2 的氨基酸残基 1-20	LPAQVAFTPYAPEPGSTCRL	0

[0561]

50	人 TNFR2 的氨基酸残基 9-28	PYAPEPGSTCRLREYYDQTA	0
51	人 TNFR2 的氨基酸残基 17-36	TCRLREYYDQTAQMCCSKCS	0
52	人 TNFR2 的氨基酸残基 26-45	QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC	1
53	人 TNFR2 的氨基酸残基 34-53	KCSPGQHAKVFCTKTSDTV	0
54	人 TNFR2 的氨基酸残基 42-61	KVFCTKTSDTVCDSCEDSTY	0
55	人 TNFR2 的氨基酸残基 50-69	DTVCDSCEDSTYTQLWNWVP	0
56	人 TNFR2 的氨基酸残基 58-77	DSTYTQLWNWVPECLSCGSR	0
57	人 TNFR2 的氨基酸残基 66-85	NWVPECLSCGSRCSQVET	0
58	人 TNFR2 的氨基酸残基 74-93	CGSRCSQVETQACTREQN	0
59	人 TNFR2 的氨基酸残基 82-101	QVETQACTREQNRICRPG	0
60	人 TNFR2 的氨基酸残基 90-109	REQNRICRPGWYCALSKQ	2
61	人 TNFR2 的氨基酸残基 98-117	CRPGWYCALSKQEGCRLCAP	1
62	人 TNFR2 的氨基酸残基 106-125	LSKQEGCRLCAPLRKCRPGF	2
63	人 TNFR2 的氨基酸残基 108-127	KQEGCRLCAPLRKCRPGFGV	2
64	人 TNFR2 的氨基酸残基 114-133	LCAPLRKCRPGFGVARPGTE	0
65	人 TNFR2 的氨基酸残基 122-141	RPGFGVARPGTETSDVVCKP	0
66	人 TNFR2 的氨基酸残基 130-149	PGTETSDVVCKPCAPGTFSN	0

[0562]	67	人 TNFR2 的氨基酸残基 138-157	VCKPCAPGTFSTNTSSTDIC	0
	68	人 TNFR2 的氨基酸残基 146-165	TFSNTTSSSTDICRPHQICNV	0
	69	人 TNFR2 的氨基酸残基 154-174	TDICRPHQICNVVAIPGNAS	0
	70	人 TNFR2 的氨基酸残基 162-181	ICNVVAIPGNASMDAVCTST	0
	71	人 TNFR2 的氨基酸残基 170-189	GNASMDAVCTSTSPTRSMAP	0

[0563] 为了验证合成肽的质量,平行合成一组独立的阳性和阴性对照肽。用阴性对照抗体57.9筛选这些肽,该抗体未特异性结合TNFR2 (Posthumus等人(J.Virology.64:3304-3309,1990))。

[0564] 表位作图

[0565] ELISA还用于确定TNFR2细胞外表面上存在的线性表位。从GenScript (Piscataway,NJ) 购买对应于TNFR2一级序列各个区的线性肽,在包被缓冲液中稀释并以1 μ g/孔的浓度置于Immulon 4HBX平底微量滴定板(Thermo Scientific)上。TNFR2激动性一抗(0.1 μ g/孔)与底物一起孵育。抗啮齿动物IgG的二抗用于检测一抗。使用SPECTRAMAX[®] 190吸光度板读数器测量吸光度,并使用SoftMax Pro 6.3(Molecular Devices)进行分析。

[0566] 表位作图分析的结果显示在图1中,其显示人TNFR2的一级结构,突出了由本公开内容的示例性激动性TNFR2抗体(诸如TNFRAG1)结合的区。表位作图研究的其他结果显示在图13A和13B中。总之,这些数据证明TNFRAG1在人TNFR2的互补决定区2(CRD2)内的表位上特异性结合TNFR2,其对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基78-120。图14显示了与TNFR2的CRD2结合的激动性TNFR2抗体的结构模型。

[0567] 实例2.激动性TNFR2多肽以可被内源性TNFR2配体促进并被抗TNF α 抗体抑制的方式扩增Treg细胞

[0568] 为了研究激动性TNFR2抗体TNFRAG1促进Treg细胞增殖的能力,进行一系列实验,其中将Treg细胞群与不同浓度的TNFRAG1体外孵育48-72小时。在潜伏期结束时,使用流式细胞术方法评估每个群体中Treg细胞的比例。如图2所示,发现激动性TNFR2抗体TNFRAG1对Treg细胞具有剂量依赖性的增殖作用。图2中显示的数据代表35个独立实验的平均值。这些结果表明,具有与TNFRAG1相似的分子特性的激动性TNFR2多肽(例如(i)含有在残基Cys 127处具有缺失或取代的人IgG1或IgG2CH1结构域,例如C127S突变;(ii)含有彼此间隔小于约133 Å的距离的抗原结合位点;(iii)含有具有SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4中任一项的氨基酸序列的CDR-H1或通过保守的氨基酸取代的方式不同于SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4中任一项的氨基酸序列;(iv)含有具有SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:16-SEQ ID NO:23中任一项的

氨基酸序列或通过保守的氨基酸取代的方式不同于SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:16-SEQ ID NO:23中任一项的氨基酸序列的框架区;和/或结合SEQ ID NO:1的残基56-60、101-107和/或115-142内的人TNFR2上的表位)能够实现Treg细胞的扩增。

[0569] 确定了TNFRAG1对Treg细胞的增殖作用后,进行了一系列实验,以研究激动性TNFR2配体(诸如TNF α)对TNFRAG1的Treg扩增能力的影响。将Treg细胞群与20ng/ml TNF α 单独或与不同浓度的TNFRAG1一起体外孵育。如图3所示,发现TNF α 的存在进一步增加了TNFRAG1刺激Treg细胞增殖的能力。在不受机制限制的情况下,这些数据支持TNFRAG1-TNFR2结合模型,其中TNFRAG1结合TNFR2单体,并使这些单个分子接近并足以形成三聚体结构。该结合事件在空间上暴露了可以与另一种TNFR2配体(诸如TNF α)结合的TNFR2表面上的位点,从而进一步促进TNFR2活化。这些结果表明,本公开内容的TNFR2激动剂多肽,诸如具有与TNFRAG1相似的分子特性的那些多肽,可以与TNF α 或本文所述的另一种激动性TNFR2配体组合,以进一步增强表达TNFR2的细胞(诸如Treg细胞、MDSC或TNFR2+体细胞)的扩增。

[0570] 为了进一步检测上述TNFRAG1-TNFR2结合模型,将Treg细胞与2.5 μ g/ml TNFRAG1和不同浓度的抗TNF α 抗体在体外孵育。该组合对Treg增殖的作用如图4所示,其表明抗TNF α 抗体具有抑制由本公开内容的激动性TNFR2多肽(诸如TNFRAG1)诱导的Treg扩增的能力。

[0571] 综上所述,这些数据表明本文所述的激动性TNFR2多肽(例如TNFRAG1)和具有与TNFRAG1相似结合特性的TNFR2结合特性的那些多肽,具有促进表达TNFR2的细胞(诸如Treg细胞、MDSC和TNFR+体细胞)增殖的能力(例如,胰腺、唾液腺、垂体、肾脏、心脏、肺、造血系统、颅神经、心脏、主动脉、嗅腺、耳朵、神经、头部结构、眼睛、胸腺、舌、骨、肝脏、小肠、大肠、肠道、肺、脑、皮肤、周围神经系统、中枢神经系统、脊髓、乳房、胚胎结构、胚胎或睾丸)。这些结果进一步说明,本公开内容的激动性TNFR2多肽对表达TNFR2的细胞的扩增可以通过TNFR2活化配体,诸如TNF α 或激动性TNF α 突变蛋白而进一步增强。

[0572] 实例3.通过噬菌体展示产生激动性TNFR2抗体

[0573] 本文所述的激动性TNFR2抗体的体外蛋白进化的示例性方法是噬菌体展示,这是本领域熟知的技术。可以通过在抗体的CDR或抗体样支架的类似区域(例如,¹⁰Fn3结构域的BC、CD和DE环)的编码序列中进行一系列设计的突变或变异来创建噬菌体展示文库。可以将这些突变引入其中的模板抗体编码序列可以是例如本文所述的天然人种系序列。可以使用本文所述或本领域已知的标准诱变技术来进行这些突变。因此,每个突变序列编码在总体结构上与模板相对应的抗体,除了在模板的序列中具有一个或多个氨基酸变异之外。逆转录病毒和噬菌体展示载体可以使用本文所述或本领域已知的标准载体构建技术进行工程化。如本领域熟知的,P3噬菌体展示载体与相容的蛋白表达载体一起可用于产生用于抗体多样化的噬菌体展示载体,如本文所述。

[0574] 突变DNA提供了序列多样性,每个转化噬菌体均显示了该DNA编码的初始模板氨基酸序列的一个变体,从而导致噬菌体群体(文库)显示出大量不同但与结构相关的氨基酸序列。由于抗体高变区的结构明确,在噬菌体展示屏幕中引入的氨基酸变异有望在不显著改变其结构的情况下改变结合肽或结构域的结合特性。

[0575] 在典型的筛选中,使噬菌体文库与TNFR2衍生的肽或其特定亚成分接触并使其与之结合。为了促进粘合剂和非粘合剂的分离,方便将靶标固定在固相支持物上。带有TNFR2结合部分的噬菌体可以与固相支持物上的靶标形成复合物,而未结合的噬菌体保留在溶液

中,并且可以用过量的缓冲液洗去。然后,可以通过将缓冲液更改为极端pH(pH 2或pH 10),更改缓冲液的离子强度,添加变性剂或其他已知方法,从目标中释放出结合的噬菌体。为了分离结合噬菌体,可以进行蛋白洗脱。

[0576] 然后可以通过感染细菌细胞来扩增回收的噬菌体,并可以用新的池重复筛选过程,该池现在已耗尽未结合的抗体,并富集了结合靶肽的抗体。甚至几个结合噬菌体的回收也足以扩增噬菌体,用于随后的筛选迭代。经过几轮选择后,通过常规方法确定了衍生自结合池中所选噬菌体克隆的编码抗体或其抗原结合片段的基因序列,从而揭示了赋予噬菌体与靶标结合亲和力的肽序列。在淘选过程中,群体的序列多样性随着每一轮选择而减小,直到剩下所需的肽结合抗体为止。所述序列可以在少数相关抗体或其抗原结合片段上收敛,通常为来自每个文库的约 10^9 至 10^{10} 个原始候选物中的10-50个。在每一轮选择中回收的噬菌体数量的增加很好地表明了文库的收敛已在筛选中发生。在识别一组结合多肽之后,该序列信息可用于设计其他二级噬菌体文库,偏向具有其他所需特性的成员(参见,例如,WO 2014/152660;其公开内容通过引用并入本文)。

[0577] 实例4. 产生人源化激动性TNFR2抗体

[0578] 产生本文所述的人源化TNFR2抗体的一种方法是将非人激动性TNFR2抗体的CDR中的一个或多个、或全部导入人抗体共有序列。共有人抗体重链和轻链序列是本领域已知的(参见,例如,“VBASE”人种系序列数据库;Kabat等人(Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242,1991);Tomlinson等人(J.Mol.Biol.227:776-798,1992);和Cox等人(Eur.J.Immunol.24:827-836,1994);其公开内容各自通过引用并入本文)。使用已建立的程序,可以识别共有抗体序列的可变结构域框架残基和CDR(例如,通过序列比对(参见Kabat,同上))。例如,共有抗体的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列中的一个或多个、或全部可以被本文所述的非人激动性TNFR2抗体的相应CDR序列取代(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR),以产生本文所述的人源化激动性TNFR2抗体。编码上述CDR序列的多核苷酸可以,例如,使用本文所述或本领域已知的技术合成或重组产生。

[0579] 共有人抗体的可变结构域的一个实例包括重链可变结构域

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWV
AVISENGSDTYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RDRGGAVSYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 43)**和轻链可变结构域
**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYA
ASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSLPYTFGQG
TKVEIKRT (SEQ ID NO: 44)**,如美国专利号6,054,297中所识别;其公开内

容通过引用并入本文(CDR以粗体显示)。为了产生本公开内容的人源化激动性TNFR2抗体,

可以重组表达编码上述共有序列可变结构域的多核苷酸,其中CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列中的一个或多个、或全部被非人激动性TNFR2抗体的相应CDR序列取代(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR)。

[0580] 可将可操作地彼此连接的编码上述重链和轻链可变结构域的多核苷酸掺入表达载体(例如,如本文所述或本领域已知的为在原核或真核细胞中蛋白表达而优化的表达载体)。可以在宿主细胞中表达人源化抗体,然后使用已建立的技术,例如本文所述的尺寸排阻色谱法和/或亲和色谱法,从宿主细胞培养基或宿主细胞中纯化人源化抗体。

[0581] 实例5. 通过施用激动性TNFR2多肽治疗人患者的I型糖尿病

[0582] 可以将本公开内容的激动性TNFR2多肽施用于人患者以治疗I型糖尿病。例如,患有I型糖尿病的人患者可以通过施用本发明的激动性TNFR2抗体进行治疗(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR),在数天、数周、数个月、或数年的过程中,以特定的剂量(例如,0.001至100mg/kg/天)通过适当的途径(例如,静脉内注射)进行该治疗。如有需要,可以将激动性TNFR2抗体与有效治疗I型糖尿病的另一治疗剂(诸如BCG)共施用、混合或分开施用。

[0583] 用本发明的激动性TNFR2抗体治疗的I型糖尿病的进展可以通过几种已建立方法中的任何一种或多种进行监测。医师可以通过直接观察来监测患者,以评估患者所表现出的症状如何响应于治疗而改变。可以分析从患者身上分离出的尿液样品,以确定样品中的葡萄糖含量,这可以表明TNFR2抗体疗法的有效性。例如,如果尿液样品中的葡萄糖含量高,则可能指示要向患者施用更高剂量的本发明的激动性TNFR2抗体,直到维持最低尿液葡萄糖浓度为止。

[0584] 实例6. 通过施用激动性TNFR2多肽治疗人患者的同种异体移植物排斥

[0585] 可以将本公开内容的激动性TNFR2多肽施用于人患者以治疗同种异体移植物排斥。施用这些抗体可诱导Treg细胞群增殖,从而减弱由自身反应性细胞毒性T细胞产生的免疫应答,这些细胞与移植后组织移植物排斥有关。例如,可以通过施用本发明的激动性TNFR2抗体来治疗表现出同种异体移植物排斥的人患者(例如,特异性结合含有TNFR2的KCSPG序列的一个或多个残基(SEQ ID NO:1的残基56-60)的表位的TNFR2抗体),诸如抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR),在数天、数周、数个

月、或数年的过程中,以特定的剂量(例如,0.001至100mg/kg/天)通过适当的途径(例如,静脉内注射)进行该治疗。如有需要,可以例如通过高糖基化或通过PEG缀合来修饰激动性TNFR2抗体,从而逃逸免疫识别和/或改善抗体的药代动力学特征。

[0586] 用本发明的激动性TNFR2抗体治疗的同种异体移植排斥的进展可以通过几种已建立方法中的任何一种或多种进行监测。医师可以通过直接观察来监测患者,以评估患者所表现出的症状如何响应于治疗而改变。还可以从患者中抽取血液样品,以分析一个或多个CD8+T细胞的细胞计数,以确定是否响应于本发明的激动性TNFR2抗体的治疗而使细胞量发生了变化(例如减少)。在TNFR2抗体治疗过程中,医师还可以监测患者体内同种异体移植物的体积波动。基于这些分析的结果,医师可以在随后的治疗中开具更高/更低剂量的或以更高/更低频率给药的激动性TNFR2抗体,以保留同种异体移植物。

[0587] 实例7. 通过施用激动性TNFR2多肽治疗人患者的类风湿性关节炎

[0588] 可以将本公开内容的激动性TNFR2多肽施用于人患者以治疗类风湿性关节炎。例如,患有类风湿性关节炎的人患者可以通过施用本发明的激动性TNFR2抗体进行治疗(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR),在数天、数周、数个月、或数年的过程中,以特定的剂量(例如,0.001至100mg/kg/天)通过适当的途径(例如,静脉内注射)进行该治疗。如有需要,可以将激动性TNFR2抗体与有效治疗类风湿性关节炎的另一治疗剂(诸如BCG)共施用、混合或分开施用。

[0589] 用本发明的激动性TNFR2抗体治疗的类风湿性关节炎的进展可以通过几种已建立方法中的任何一种或多种进行监测。医师可以通过直接观察来监测患者,以评估患者所表现出的症状如何响应于治疗而改变。例如,本领域技术人员可以监测患者响应于TNFR2抗体治疗而表现出的关节疼痛、关节僵硬或肌肉范围的水平。另外,可以分析分离自患者的淋巴样品,以例如通过FACS分析确定样品中自身反应性CD8+T细胞的量,这可以表明TNFR2抗体疗法的有效性。例如,如果淋巴样品中的自身反应性CD8+T细胞计数高,则可能表明将向患者施用更高剂量的本发明的激动性TNFR2抗体,例如,直到消除患者体内的自身反应性T细胞群。

[0590] 实例8. 通过施用激动性TNFR2多肽治疗人患者的多发性硬化

[0591] 可以将本公开内容的激动性TNFR2多肽施用于人患者以治疗多发性硬化。例如,患有多发性硬化的人患者可以通过施用本发明的激动性TNFR2抗体进行治疗(例如,抗体、其抗原结合片段、单链多肽、或构建体,该构建体具有激动性TNFR2抗体TNFRAG1的CDR中的一个或多个(如SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13所示)、或具有显示与TNFRAG1的相应CDR具有至少85%序列同一性(例如,85%、97%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)和/或通过保守的氨基酸取代的方式与TNFRAG1的相应CDR不同的一个或多个CDR),在数天、数周、数个月、或数年的过程中,以特定的剂量(例如,0.001至100mg/kg/天)通过适当的途径(例如,静脉内注射)进行该治疗。如有需要,可以将激动性TNFR2抗体与有效治疗多发性硬化(诸如BCG)的

另一治疗剂(诸如BCG)共施用、混合或分开施用。

[0592] 用本发明的激动性TNFR2抗体治疗的多发性硬化的进展可以通过几种已建立方法中的任何一种或多种进行监测。医师可以通过直接观察来监测患者,以评估患者所表现出的症状如何响应于治疗而改变。例如,本领域技术人员可以监测患者以确定他或她是否响应于TNFR2抗体疗法而表现出改善的视力和/或协调性、更快的反射、增加的运动活动和/或改善的认知能力。如果未观察到这些特征的改善,则医师可以给患者开具更高剂量或更频繁地施用激动性TNFR2抗体或其抗原结合片段。另外,可以分析分离自患者的淋巴样品,以例如通过FACS分析确定样品中自身反应性CD8⁺T细胞的量,这可以表明TNFR2抗体疗法的有效性。例如,如果淋巴样品中识别髓鞘产生细胞的自身反应性CD8⁺T细胞计数高,则可能表明将向患者施用更高剂量的本发明的激动性TNFR2抗体,例如,直到消除患者体内的自身反应性T细胞群。

[0593] 实例9. 与外周人CD4⁺细胞孵育后, TNFR2激动剂抗体选择性上调Treg增殖

[0594] TNFR2激动剂抗体可用于上调Treg细胞活性, Treg细胞活性是治疗以自身免疫应答为特征的疾病的有益属性。与外周人CD4⁺细胞孵育后, 激动性TNFR2抗体TNFR2G1选择性诱导Treg细胞。通过与TNFR2激动剂抗体孵育后评估分离的外周人CD4⁺细胞的基因表达和代谢特性来确定这一点。TNFR2激动剂抗体选择性诱导Treg细胞的能力进一步证明了此类抗体在治疗与异常或过度免疫应答有关的病理学中的实用性。

[0595] 材料和方法

[0596] 研究参与者

[0597] 涉及抽血的人体研究已获得马萨诸塞州总医院和合作伙伴医疗保健的批准(研究#2007P001347、2012P002243和2013P002633)。获得所有受试者的知情同意,并且实验符合世界医学协会赫尔辛基宣言和卫生与公众服务部 Belmont 报告中规定的原则。在BD Vacutainer EDTA管(BD Diagnostics)中从研究参与者采集全血,并在取血两小时内进行处理。

[0598] 人CD4⁺T细胞的分离

[0599] 新鲜的人全血用1x HBSS (Invitrogen) 加2% FBS (Sigma-Aldrich) 洗涤两次。按照生产商的说明,使用磁性EASYSEPTM直接人单核细胞分离试剂盒或EASYSEPTM直接人CD4⁺T细胞分离试剂盒(STEMCELL Technologies)分离CD4⁺T细胞。简而言之,在50mL离心管中将1,200 μ L的Isolation Cocktail和1,200 μ L的RAPIDSPHERESTM与24mL全血混合,并在室温下孵育5min。然后,添加24mL不含Ca²⁺和Mg²⁺的PBS,然后将试管放入Easy 50EASYSEPTM磁体(STEMCELL Technologies)中。这将不需要的细胞固定在管的侧面。10min后,将富含CD4⁺T细胞的悬浮液转移到新试管中,并用新鲜的RAPIDSPHERESTM重复磁分离过程5min。将所得的高度富集的CD4⁺T细胞悬浮液转移到新试管中,并使用EasySepTM磁体进行第三次纯化。最终CD4⁺T细胞制剂的所得纯度 > 95%。分离的CD4⁺细胞在RPMI GLUTAMAXTM (Life Technologies) 加10% FBS (Sigma-Aldrich), 含1% 青霉素-链霉素 (Life Technologies) 中培养。将细胞以0.2至1x10⁶个细胞/孔的浓度接种到96孔圆底板中,用各种试剂处理,并在5% CO₂下于37°C孵育72小时。所有体外细胞培养实验均在培养基中包括低水平的IL-2 (200U/ml)。

[0600] 试剂和流式细胞仪

[0601] 针对人TNFR2和分泌的TNFR2 (sTNFR2) 的试剂和流式细胞术mAb在内部生产或从外部商业供应商处获得。重组人TNF α 和IL-2购自Sigma-Aldrich。使用Pierce F(ab')₂制备试剂盒 (Life Technologies) 制备mAb的F(ab')₂片段。抗体MAB2261 (R&D Systems) 用于测量TNFR2细胞表面表达。抗啮齿动物IgG的交联抗体 (ab9165) 购自Abcam。根据生产商的说明, 使用Human Treg Flow Kit (BioLegend) 制备用于流式细胞术的细胞。将荧光染色的细胞重悬于1x HBSS (Invitrogen) 中, 并使用BD FACSCalibur流式细胞仪 (Becton Dickinson) 进行分析。用于Treg的FACS分析的抗体包括用于FoxP3细胞内染色的Alexa Fluor 488抗人FoxP3 (Clone 259D; BioLegend); 用于CD25细胞表面染色的藻红蛋白抗人CD25 (Clone BC96; BioLegend)。通过FACS用FL2 (红色) 对FL1 (绿色) 评估Treg群, 定义为CD25^{hi}和FoxP3⁺, 而Teff群定义为CD25^{hi}和FoxP3⁻。对于细胞抑制测定, 将反应物用羧基荧光素二乙酸丁二酰亚胺琥珀酸酯 (CFSE) (BioLegend) 和CD8-藻蓝蛋白 (APC) (Clone SK1; BD Biosciences) 染色, 并通过FACS用FL4 (深红色) 和FL1 (绿色) 进行分析 (图3)。如先前关于本文所述, 针对TNFR2的单克隆抗体可在内部生产或从商业销售商处购买。使用FlowJo软件 (版本10.0.8) 处理FACS数据, 并在Prism上进行分析 (GraphPad Software, La Jolla, CA)。

[0602] 分泌型TNFR2的测定

[0603] 使用有一些改良的Quantikine ELISA (R&D Systems) 从细胞培养上清液中测量分泌型TNFR2 (sTNFR2)。简而言之, 将CD4⁺细胞与单独的IL-2 (200U/ml) 或与TNF α (20ng/ml) 或TNFR2 mAbs (12.5mg/ml) 孵育24-42小时后, 收集上清液, 并在市售的板或定制板上孵育, 每孔用2mg TNFR2定向抗体包被。ELISA根据生产商的说明进行。使用SPECTRAMAX™ 190吸光度板读数器测量吸光度, 并使用SOFTMAX PRO™ 6.3 (Molecular Devices) 进行分析。为了进行RNA分离和基因表达分析, 将分离的CD4⁺T细胞在IL-2 (50U/ml) 和TNF α (20ng/ml) 或TNFR2拮抗剂mAb (2.5 μ g/ml) 存在下孵育3小时。

[0604] 细胞增殖和抑制测定

[0605] 对于外周血白细胞 (PBL) 增殖实验, PBL用1 μ M的CFSE染色。将细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度铺板在预包被抗CD3 mAb (5 μ g ml⁻¹) (OKT3, eBiosciences) 的96孔板中。四天后, 收集细胞并通过流式细胞仪分析。通过经历分裂的细胞的百分比来计算增殖速率。对于Treg抑制测定, 将自身PBMC用作应答细胞。在静脉穿刺当天, 使用Ficoll-Hypaque Plus (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 在-80 $^{\circ}$ C下冷冻保存, 通过密度梯度分离收集PBMC, 并在与Treg混合前一天解冻, 并在补充有1%FBS和10U/mL IL-2的RPMI 1640培养基中过夜。在第二天, 将反应细胞用CFSE (1 μ M) 染色。在培养基中以0:1、1:1、2:1和4:1的比例混合反应细胞 (5×10^4 个细胞) 和扩增的Treg, 并用抗CD3 mAb (HIT3a, BD Biosciences) 和IL-2 (50U ml⁻¹) 刺激。4天后, 收集细胞并通过流式细胞仪分析。抑制指数通过CD8⁺T细胞在分裂后的反应细胞中所占的百分比计算得出。使用以下公式计算抑制指数: (没有Treg的Treg增殖 - 有Treg的Tresp增殖) / 没有Treg的Tresp增殖。

[0606] 细胞抑制测定

[0607] 对于抑制测定, 将外周血单核细胞 (PBMC) 用作反应者。在静脉穿刺当天使用Ficoll-Plaque Plus (GE Healthcare) 密度梯度分离PBMC, 并在-80 $^{\circ}$ C下冷冻保存。在与Treg混合之前将细胞解冻, 并在RPMI 1640和IL-2 (10U/ml) 中过夜。第二天, 将反应细胞用1mM CFSE染色。然后将反应细胞 (5×10^4 个细胞) 以多种比例 (0:1、4:1、2:1、1:1) 与已扩增

14-17天的Treg混合。用抗CD3 mAb、定向人CD3蛋白的抗体 (HIT3a, BD Biosciences) 或 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco) (其比例为2:1 (细胞/珠)) 和IL-2 (50至200U/ml) 刺激混合物。4至6天后收集细胞,并用CD8-APC (Clone SK1; BD Biosciences) 染色,并通过FACS分析CD8⁺T细胞计数相对于CFSE评估细胞分裂的抑制作用。

[0608] 转录谱分析 (RNAseq)

[0609] 使用QIAGEN (QIAGEN Sciences) 的RNeasy Plus Mini试剂盒从正常供体的外周血CD4⁺T细胞中分离总RNA,并由Dana Farber癌症研究所 (Boston, Mass) 的CCCB (癌症计算生物学中心) 进行处理。从分离的新鲜CD4⁺T细胞 (含或不合TNFR2抗体) 中以2.5ug/ml的浓度培养6小时来制备mRNA。使用Agilent 2100生物分析仪确定RNA质量。RIN值大于6且DNA污染小于10%的RNA用于文库制备。使用100ng总RNA输入,使用NEBNEXTTM Poly (A) mRNA磁性分离模块进行poly-A选择。使用用于Illumina[®]的NEBNEXTTM UltraTM Directional RNA文库制备试剂盒,将所得的mRNA用于文库制备。RNAseq文库在Agilent 2100生物分析仪上的高灵敏度DNA芯片上运行,并使用KAPA Biosystems Illumina文库定量试剂盒通过qPCR确定文库的功能浓度。将待测序的文库以2nM的浓度合并,然后变性并稀释至2pM的最终浓度,然后加载到Illumina NextSeq 500上。使用TopHat对参考基因组HG19进行读段比对,并使用Cufflinks进行分析。然后,使用DESeq (R-Bioconductor软件包的一部分) 对所得数据进行归一化 (Anders, Huber REF)。使用Ingenuity Pathway Analysis软件 (QIAGEN Sciences), R统计编程语言 (Ref) 和Microsoft Excel对归一化的数据进行分析。

[0610] 统计方法

[0611] 统计显著性使用ANOVA和Tukey或Dunnnett多重比较检验, Student t检验以及Grubb检验 (使用Excel (Microsoft) 或GraphPad Prism-5软件 (GraphPad Software, La Jolla, CA) 去除离群值) 确定。使用SAS版本9.4 (SAS Institute, Inc, Cary, NC)、R统计计算语言或Microsoft Excel进行计算。置信度设置为0.05。

[0612] 结果

[0613] TNFR2表达和TNFR2激动

[0614] 对人T细胞群中TNFR2表达的评估表明,在人受试者队列之间存在显著差异。在平均荧光强度 (MFI) 方面,癌症受试者在Treg上表达TNFR2的水平显著高于正常健康受试者或1型糖尿病患者 (T1D) (图6A)。相反, T1D受试者在Teff上表达TNFR2的水平显著高于正常受试者或癌症患者 (图6B)。当CD4⁺T细胞用TNFR2激动剂抗体处理时, Treg细胞存在剂量依赖性增殖 (图6C)。即使存在天然配体TNF α (20ng/ml), TNFR2激动剂抗体的浓度不断升高也没有显著差异 (配对T检验, $p > 0.5$) (图6D)。这表明即使TNF α 本身对Treg增殖有效, TNF α 也未增强TNFR2激动剂抗体的有效性。因此, 激动剂抗体TNFRAG1以TNF α 非依赖的方式起作用。

[0615] Treg扩增和可溶性TNFR2评估

[0616] 对TNFR2激动剂抗体的F(ab')₂片段的评估表明, TNFR2激动剂抗体对Treg增殖的活性不取决于Fc区 (图7A)。TNFR2激动剂抗体的功能活性也不取决于受体交联, 正如下观察所证明的那样: 啮齿动物抗IgG抗体与TNFR2激动剂的共培养未抑制剂量依赖性Treg的增殖 (图7B)。这些数据表明, TNFR2激动剂抗体的作用机制是通过覆盖交联或Fc结合作用的活化途径进行的。一致地, 当与由TNFR2激动剂抗体介导的活化相比时, 随着天然配体TNF α 浓度的升高, 对于Tregs的比例观察到相似的剂量依赖性增加 (图7C)。此外, 在存在TNFR2激

动剂的情况下,用TNF α 处理CD4+细胞导致培养基中可溶性TNFR2含量增加的趋势(图7D)。

[0617] 扩增的Treg细胞的功能评估

[0618] 为了确定用TNFR2激动剂体外扩增的Treg细胞的功能能力,检测它们抑制1型糖尿病患者自身CD8+T细胞的能力。在共培养中,发现相对于反应者,存在较大比例的Tregs抑制反应者CD8+T细胞(用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)染色)的增殖能力(图8C-8E,左)。此外,反应者,CD8+T细胞(用CFSE染色)的增殖能力受Treg细胞的抑制,这些Treg细胞在(i) TNF α (图8C-8E,中)或TNFR2激动剂抗体和雷帕霉素的存在下扩增(图8C-8E,右)。在检测条件下,当以最低的Treg:反应者(1:1)比例将反应细胞与Treg细胞孵育时,以及将反应细胞与已用TNFR2激动剂抗体扩增的Treg细胞孵育时,观察到最大程度的抑制CD8+T细胞增殖。

[0619] 综上所述,这些实验证明了TNFR2激动剂抗体TNFRAG1以及具有类似结构特性(例如,具有TNFRAG1的CDR中的一个或多个、或全部的抗体)和/或作为TNFRAG1的TNFR2结合特性的抗体抑制CD8+T细胞增殖的能力。该表型提供了重要的治疗益处,尤其是用于治疗由自身组织异常免疫应答引起的自身免疫性疾病和其他病况,诸如本文所述的疾病,因为TNFRAG1和类似的抗体可以抑制CD8+T细胞,该CD8+T细胞针对自身组织产生不适当的免疫应答,并引起自身免疫性疾病或其他病况。

[0620] 通过评估代谢活性来评估Treg的扩增

[0621] 通过观察到激动剂抗体在分离的外周CD4+细胞中诱导代谢转移,提供了TNFRAG1扩增Treg细胞的其他证据。特别是,将TNFRAG1与此类细胞孵育后,观察到这些细胞显示出降低的糖酵解(图10B)、谷氨酰胺分解(图10C)升高和脂肪酸代谢升高(图12A-12D)。这种代谢转移表明,TNFR2激动剂抗体(例如TNFRAG1)选择性地上调分离淋巴细胞中Treg细胞的增殖。此外,发现TNFRAG1可以增加Krebs周期中涉及的早期基因的表达,并减少Krebs周期中后期涉及的基因的表达(图11A-11C)。该观察结果具有意义,不仅因为它是Treg扩增的进一步证据,而且还因为Krebs周期早期产生的一种代谢产物衣康酸酯是一种有效的自身免疫抑制剂。综上所述,这些数据表明TNFRAG1和具有相似结构特性的抗体(例如,具有TNFRAG1的CDR中的一个或多个、或全的抗体,或与TNFRAG1中的相应CDR具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的CDR的抗体)和/或表位结合特性的抗体可以通过选择性诱导Treg细胞增殖和上调抗炎代谢物来抑制自身免疫。

[0622] 结论

[0623] 这些实验的结果表明,激动性TNFR2抗体TNFRAG1以及具有相似结构和/或表位结合特性的抗体可用于选择性上调(i) Treg细胞和(ii)重要的抗炎代谢物。在不受机制限制的情况下,这些特征代表了两种可能的方式,通过这些方式本公开内容的TNFR2激动剂抗体可以用于治疗与抗自身抗原的异常免疫应答有关的疾病。

[0624] 其他实施例

[0625] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均以相同的程度通过引用并入本文,如同每个独立出版物或专利申请被具体地和单独地指示通过引用并入一样。

[0626] 尽管已经结合本发明的特定实施例对本发明进行描述,但是应当理解,本发明能够进行进一步的修改,并且本申请旨在覆盖以下在此描述的任何变型、用途或改编,通常,本文描述的原理以及包括与本发明的此类偏离均落入本发明所属领域的已知或惯常实践

之内,并且可以应用于前文阐述的基本特征,并落入权利要求的范围内。

[0627] 其他实施例在权利要求的范围内。

序列表

<110> 综合医院公司 (The General Hospital Corporation)

<120> 激动性肿瘤坏死因子受体超家族多肽

<130> 00786-582W02

<150> US 62/767,735

<151> 2018-11-15

<160> 71

<170> PatentIn 3.5 版本

<210> 1

<211> 461

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

[0001]

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
	Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr		
	165	170	175
[0002]	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
 305 310 315 320

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

[0003]

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
 385 390 395 400

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> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2).. (2)

<223> Xaa 是 Tyr, Phe, Trp 或 His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (5)

[0004]

<223> Xaa 是 Ser, Thr, Cys, Gln 或 Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6).. (6)

<223> Xaa 是 Glu 或 Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8).. (8)

<223> Xaa 是 Ser, Thr, Cys, Gln 或 Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9).. (9)

<223> Xaa 是 Leu 或 Ile

<400> 2

Gly Xaa Thr Phe Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa

1

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(8)
 <223> Xaa 是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa 是 Ala, Val 或 Phe

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa 是 Met 或 Ile

[0006] <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa 是 Glu 或 Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa 是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa 是 Ser 或 Arg

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa 是任何氨基酸

<400> 5

Thr Xaa Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Leu
 1 5 10 15

Xaa Ser

<210> 6

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys 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

[0007]

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

<210> 7

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

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

[0008]

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

<210> 8

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

[0009]

Thr Val

<210> 9

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val

[0010] <210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 10

Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 11

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Ile Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ser Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0012]

Ala Arg Gly Asn Ser Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 15

Glu Val Gln Leu Gln Gln Phe Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Leu Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ser Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0013] Ala Arg Gly Asn Ser Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 16

Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu
 1 5 10 15

Thr Ser

<210> 17
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 17

Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Leu
1 5 10 15

Thr Ser

[0014]

<210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 18

Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
1 5 10 15

Arg Ser

<210> 19
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 19

Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu
1 5 10 15

Thr Ser

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

[0015] <400> 20

Thr Phe Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 21

Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Asn Arg Leu
1 5 10 15

Thr Ser

<210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 22

Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Ser Leu
 1 5 10 15

Arg Ser

[0016]

<210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 23

Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Arg Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
 1 5 10 15

Arg Ser

<210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 24

Ala Asp Ala Ala Pro

1 5

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 25

Thr Val Ala Ala Pro
 1 5

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 26

[0017]

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
 1 5 10

<210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 27

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 1 5 10

<210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28

Gln Pro Lys Ala Ala Pro

1 5

<210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 29

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
 1 5 10

<210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

[0018]

<400> 30

Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 31

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5

<210> 32
 <211> 13

<210> 36
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 36

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 1 5 10

<210> 37
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 37

[0020] Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5

<210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 39
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95

[0022] Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 43

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Glu Asn Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp 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 Arg Gly Gly Ala Val Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0023] <210> 44
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 44

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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 47

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ile
1 5

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

[0025]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2).. (2)
<223> Xaa 是 Tyr 或 Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8).. (8)
<223> Xaa 是 Asn 或 Asp

<400> 48

Gly Xaa Thr Phe Thr Asp Tyr Xaa
1 5

<210> 49
<211> 20
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 49

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu
 20

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0026]

<223> 合成构建体

<400> 50

Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr
1 5 10 15

Asp Gln Thr Ala
 20

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 51

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys

1 5 10 15

Ser Lys Cys Ser
20

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 52

Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala
1 5 10 15

[0027] Lys Val Phe Cys
20

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 53

Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser
1 5 10 15

Asp Thr Val Cys
20

<210> 54

<211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 54

Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu
 1 5 10 15

Asp Ser Thr Tyr
 20

<210> 55
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0028]

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 55

Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp
 1 5 10 15

Asn Trp Val Pro
 20

<210> 56
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 56

<210> 59
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 59

Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr
 1 5 10 15

Cys Arg Pro Gly
 20

<210> 60
 <211> 20
 <212> PRT
 [0030] <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 60

Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala
 1 5 10 15

Leu Ser Lys Gln
 20

<210> 61
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 61

Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg
1 5 10 15

Leu Cys Ala Pro
 20

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 62

[0031] Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys
1 5 10 15

Arg Pro Gly Phe
 20

<210> 63

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 63

Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro
1 5 10 15

Gly Phe Gly Val

20

<210> 64
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 64

Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg
 1 5 10 15

Pro Gly Thr Glu
 20

[0032] <210> 65
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 65

Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val
 1 5 10 15

Val Cys Lys Pro
 20

<210> 66
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 66

Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly

1 5 10 15

Thr Phe Ser Asn

20

<210> 67

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

[0033] <400> 67

Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser

1 5 10 15

Thr Asp Ile Cys

20

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 68

Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln

1 5 10 15

Ile Cys Asn Val
20

<210> 69
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 69

Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro
1 5 10 15

Gly Asn Ala Ser
20

[0034]

<210> 70
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 70

Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val
1 5 10 15

Cys Thr Ser Thr
20

<210> 71
<211> 20
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 71

[0035]

Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg
1 5 10 15

Ser Met Ala Pro
 20

10	20	30	40	50
MAPVAVWAAL	AVGLELWAAA	HALPAQVAFT	PYAPEPGSTC	RLREYYDQTA
60	70	80	90	100
QMCCSKCSPG	QHAKVFCTKT	SDTVCDSCED	STYTQLWNWV	PECLSCGSRG
110	120	130	140	150
SSDQVETQAC	TREQNRICTC	RPGWYCALS	QEGCRLCAPL	RKCRPGFGVA
160	170	180	190	200
RPGTETSDVV	CKPCAPGTFS	NTTSSTDICR	PHQICNVVAI	PGNASMDAVC
210	220	230	240	250
TSTSPTRSMA	PGAVHLPQPV	STRSQHTQPT	PEPSTAPSTS	FLLPMGPSPP
260	270	280	290	300
AEGSTGDFAL	PVGLIVGVTA	LGLLIIGVVN	CVIMTQVKKK	PLCLQREAKV
310	320	330	340	350
PHLPADKARG	TQGPEQQHLL	ITAPSSSSSS	LESSASALDR	RAPTRNQPOA
360	370	380	390	400
PGVEASGAGE	ARASTGSSDS	SPGGHGTQVN	VTCIVNVCSS	SDHSSQCSSQ
410	420	430	440	450
ASSTMGDTDS	SPSESPKDEQ	VPFSKEECA	RSQLETPETL	LGSTEEKPLP
460				
LGVPDAGMKP	S			

图1

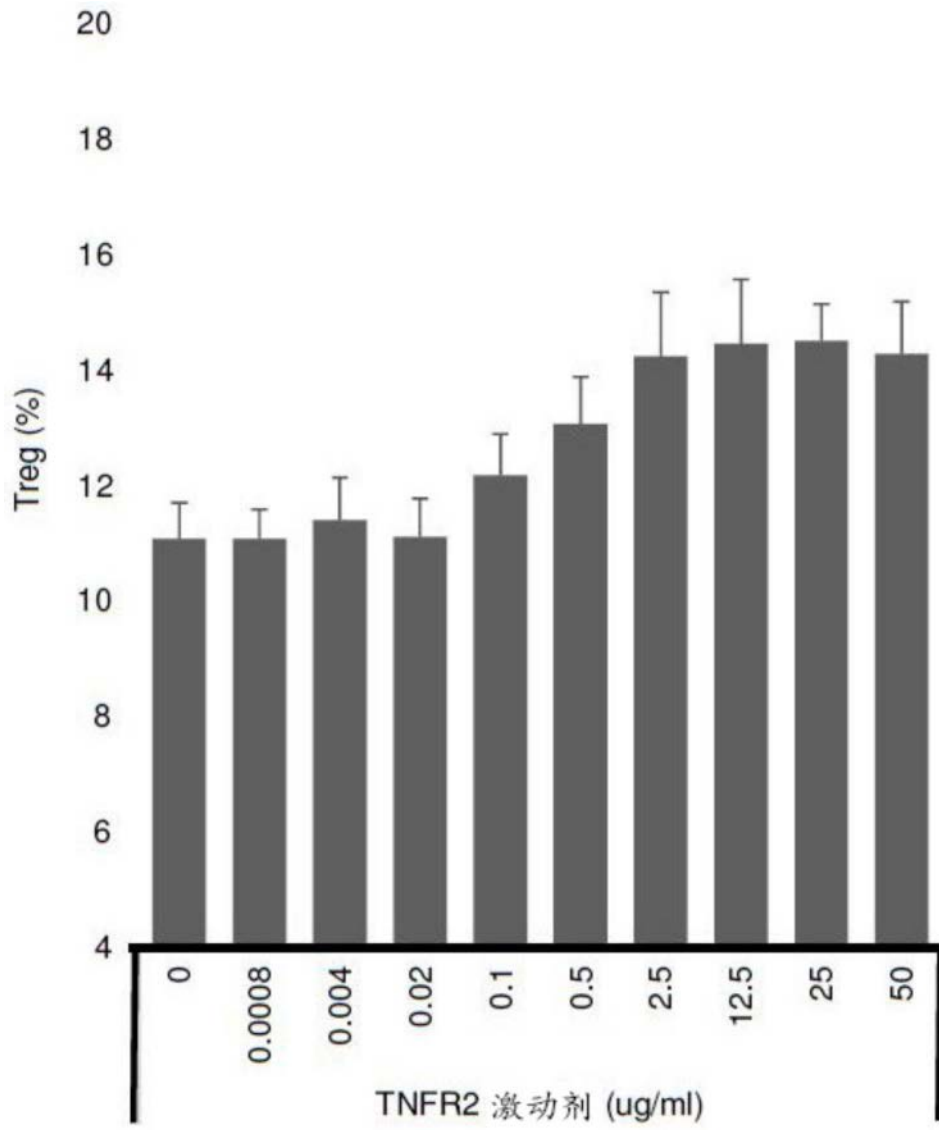


图2

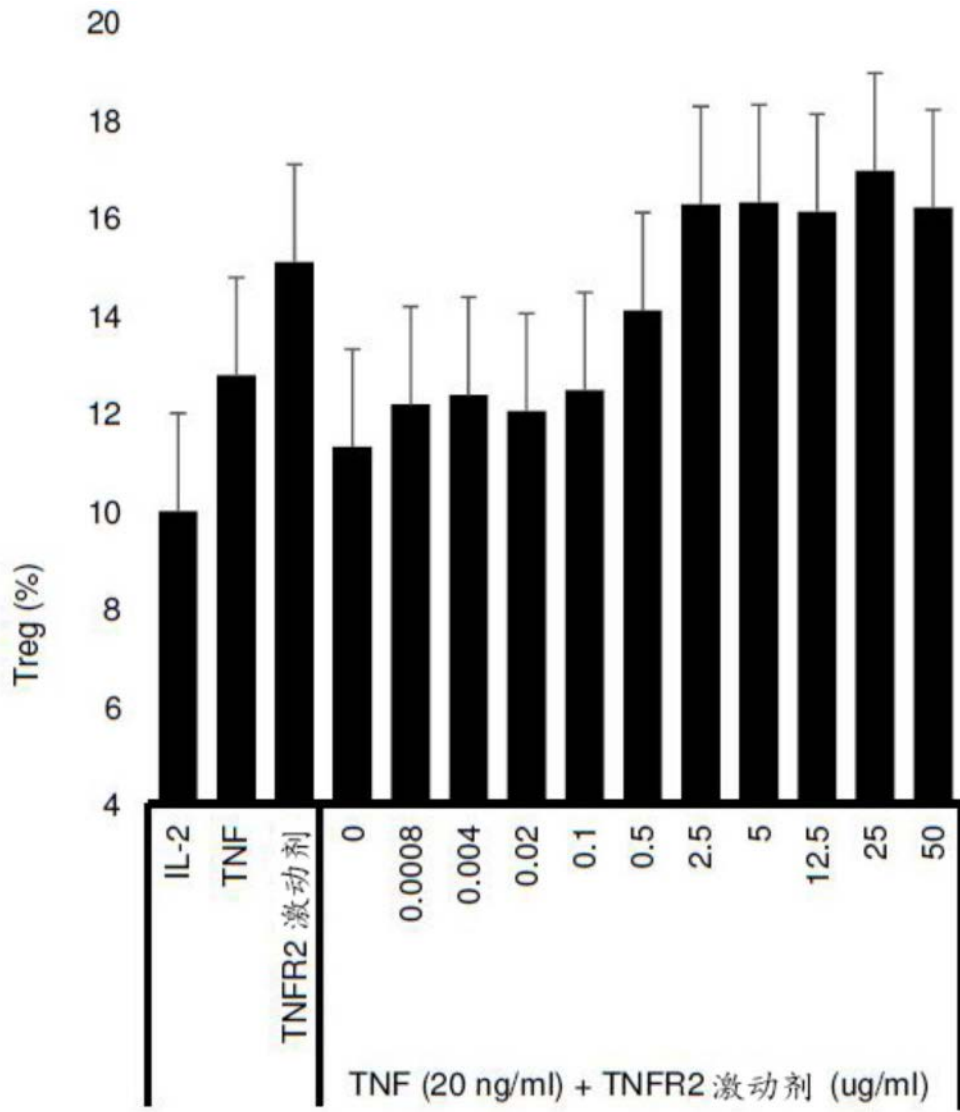


图3

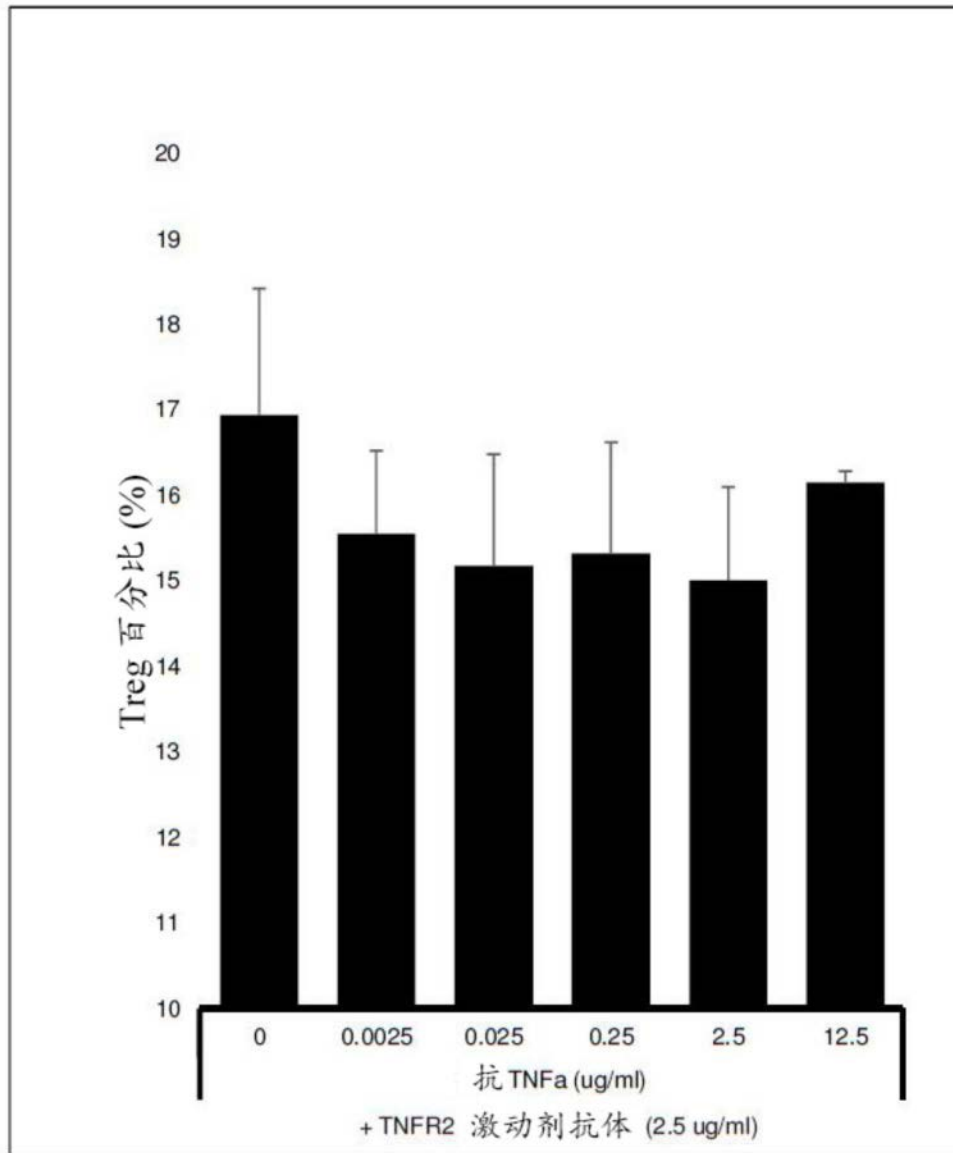


图4

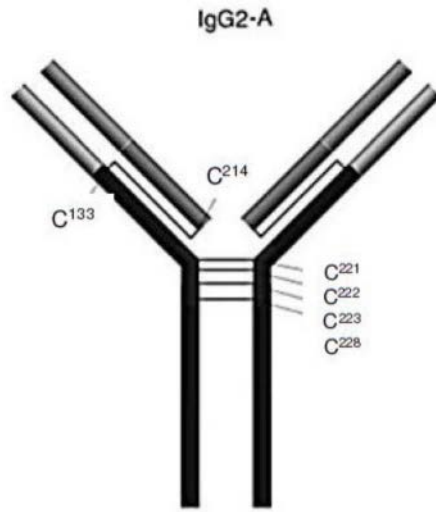


图5A



图5B

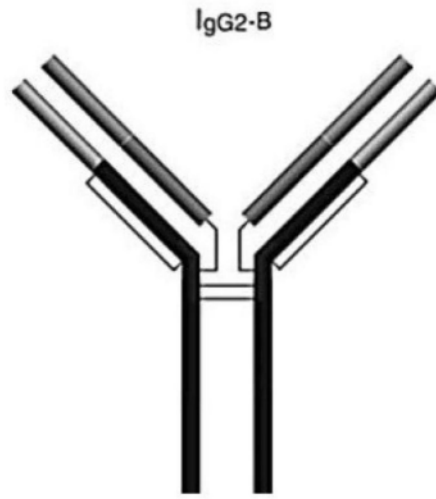


图5C



图5D

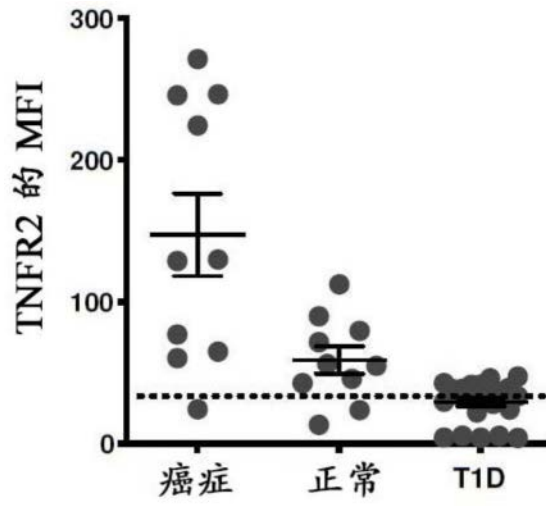


图6A

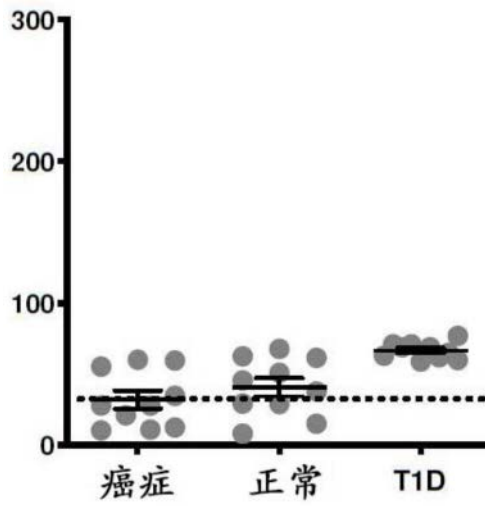


图6B

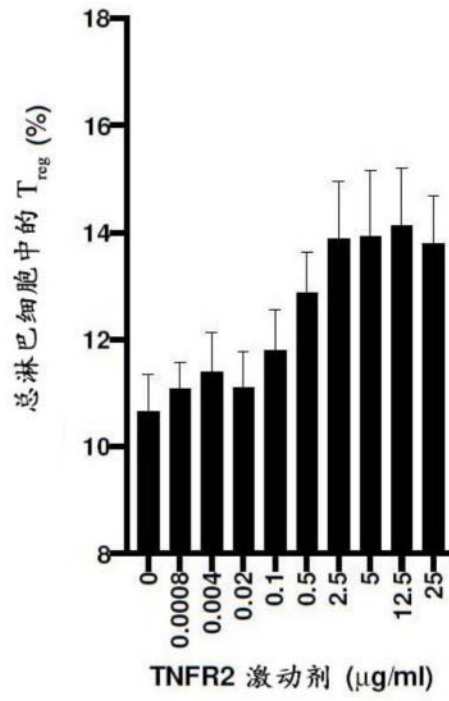


图6C

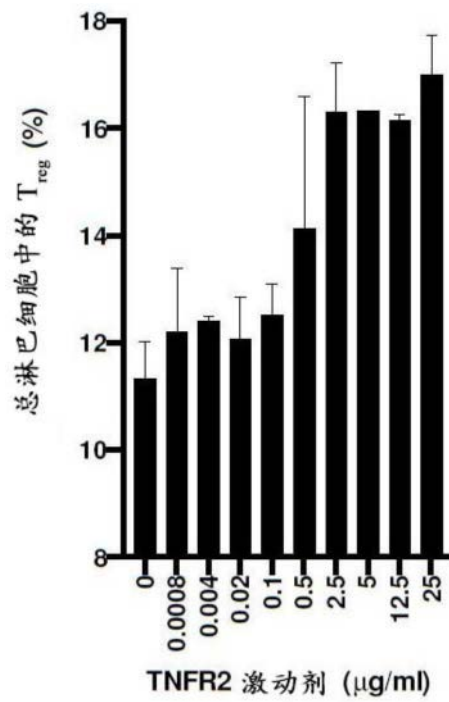


图6D

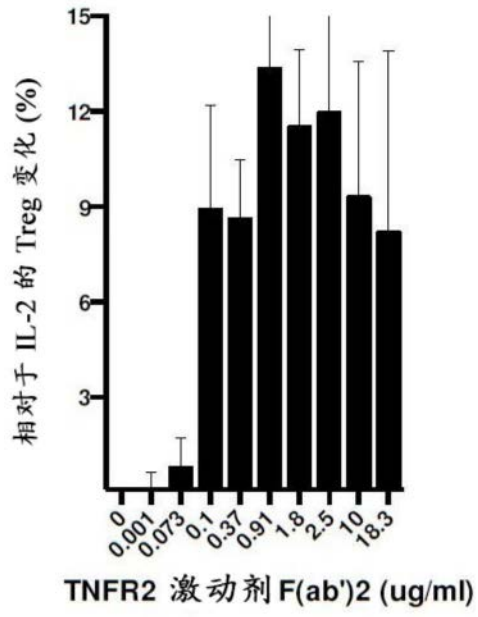


图7A

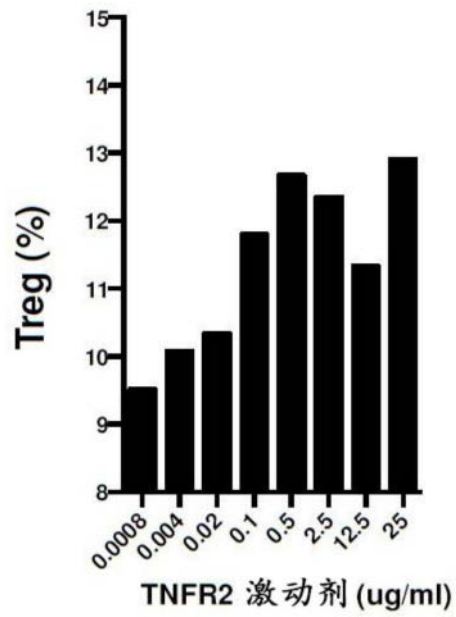


图7B

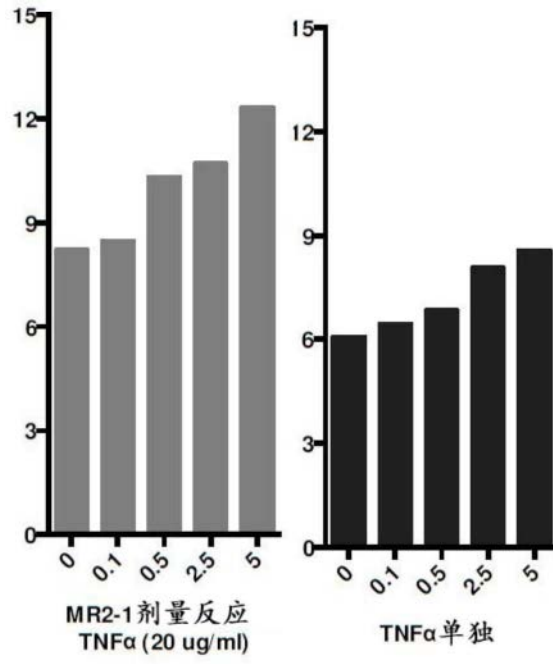


图7C

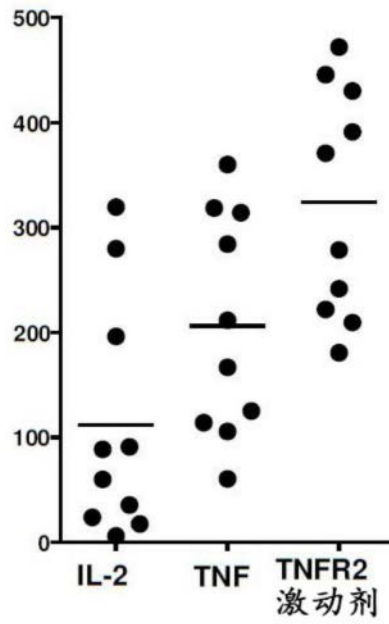


图7D



图8A

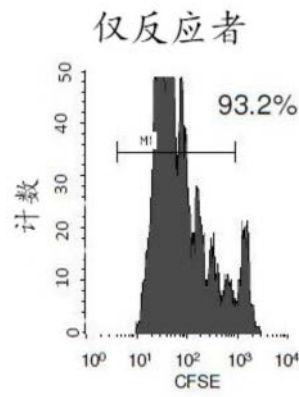


图8B

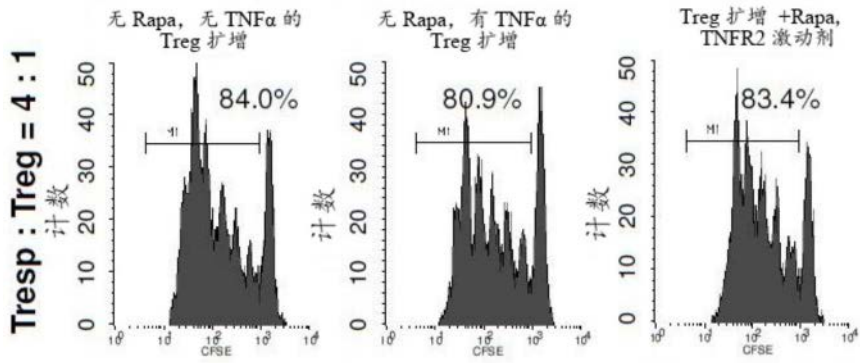


图8C

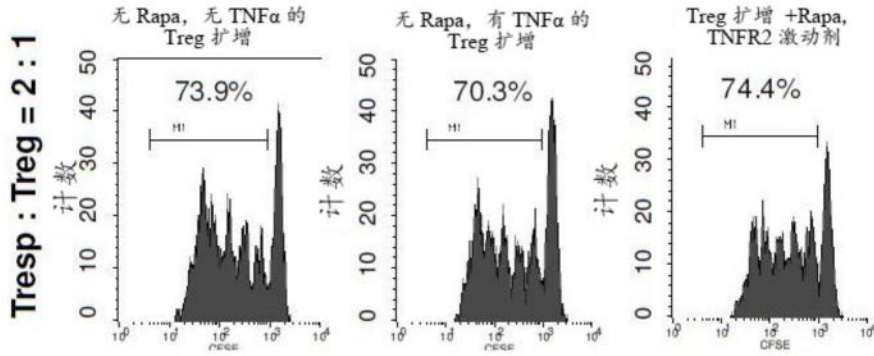


图8D

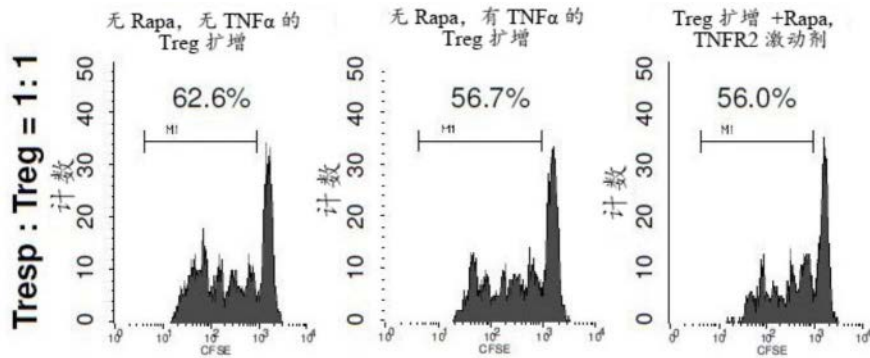


图8E

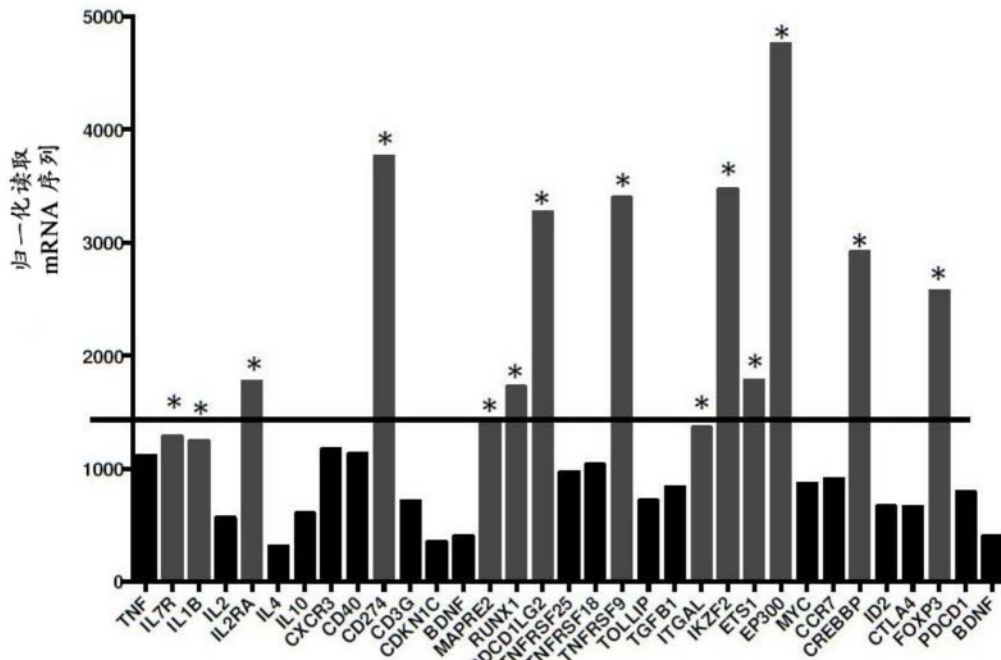


图9A

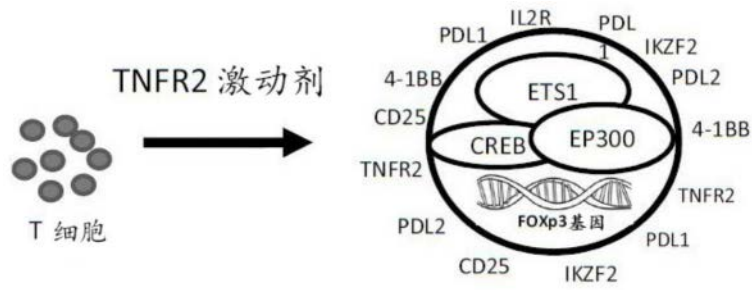


图9B

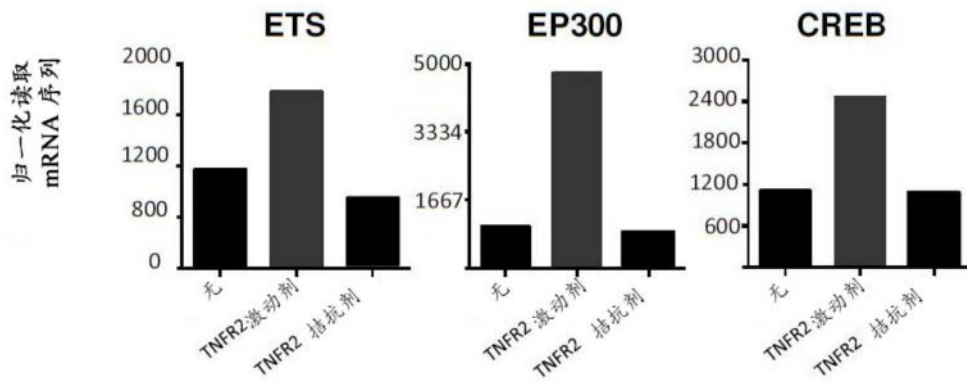


图9C

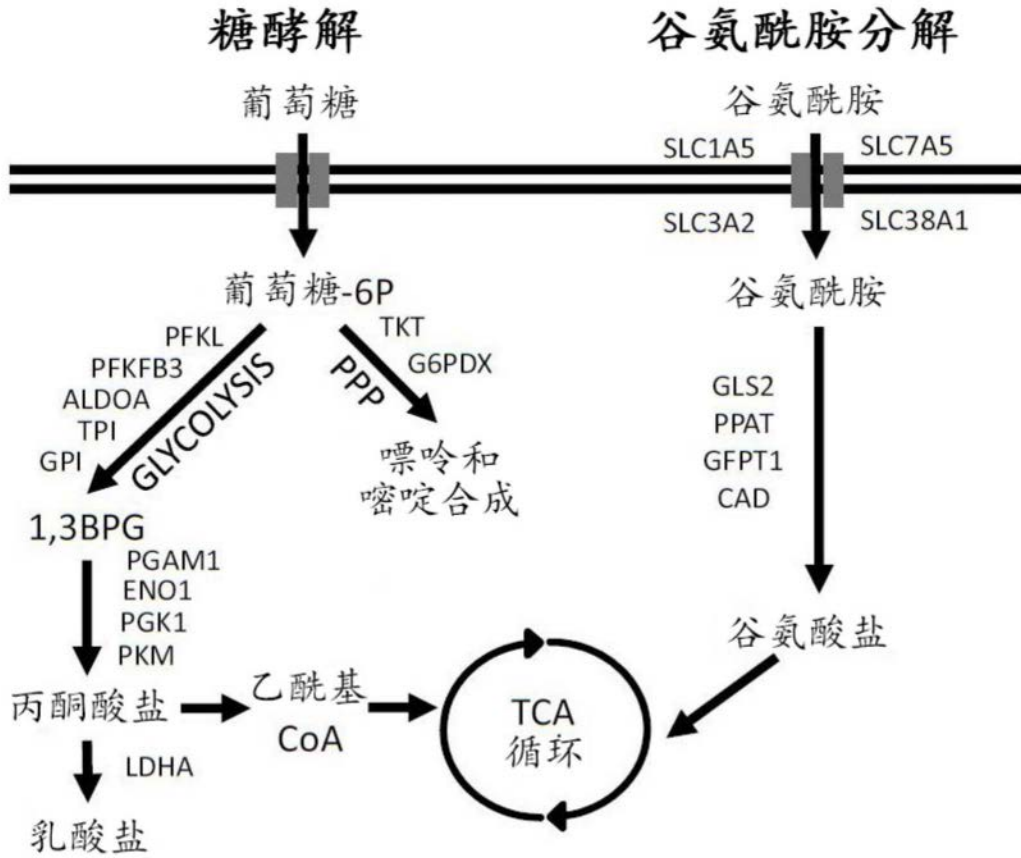


图10A

糖酵解

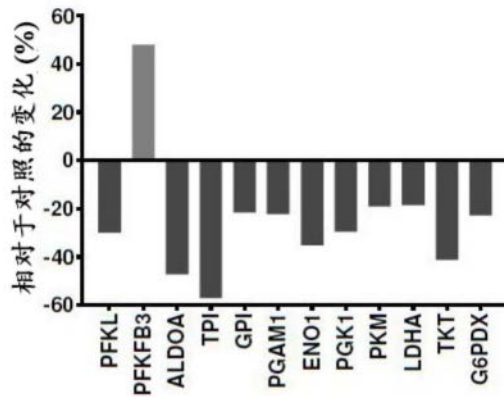


图10B

谷氨酰胺分解

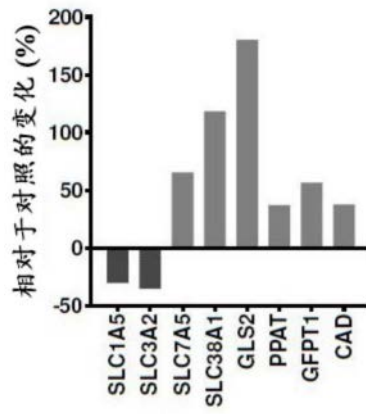


图10C

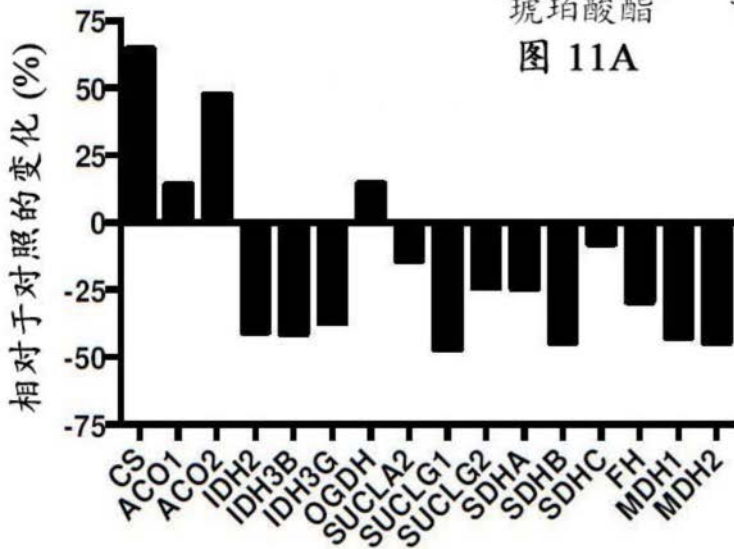
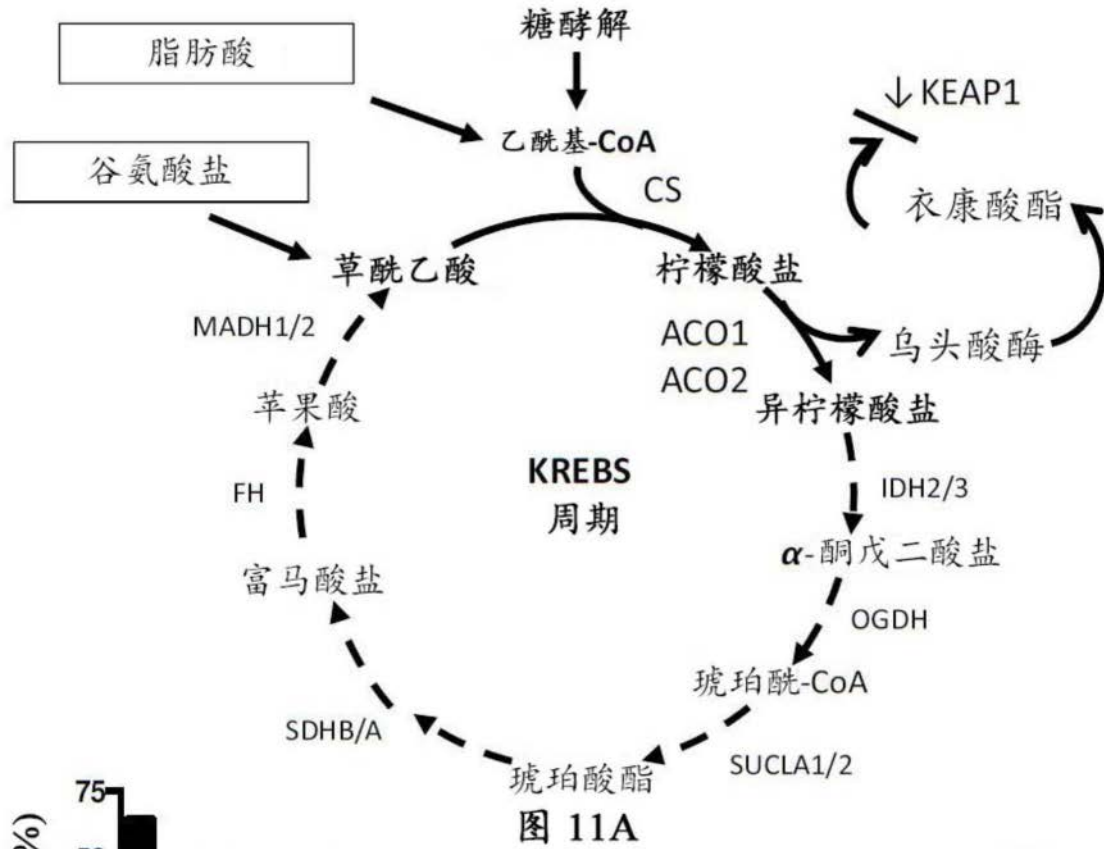


图 11B

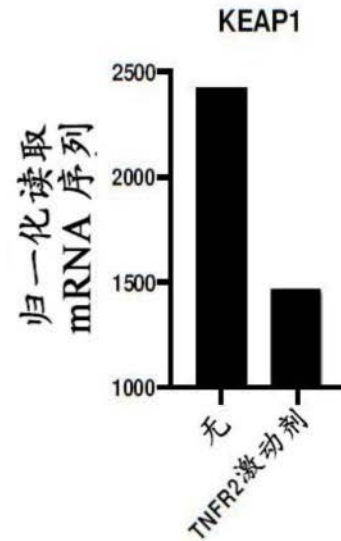


图 11C

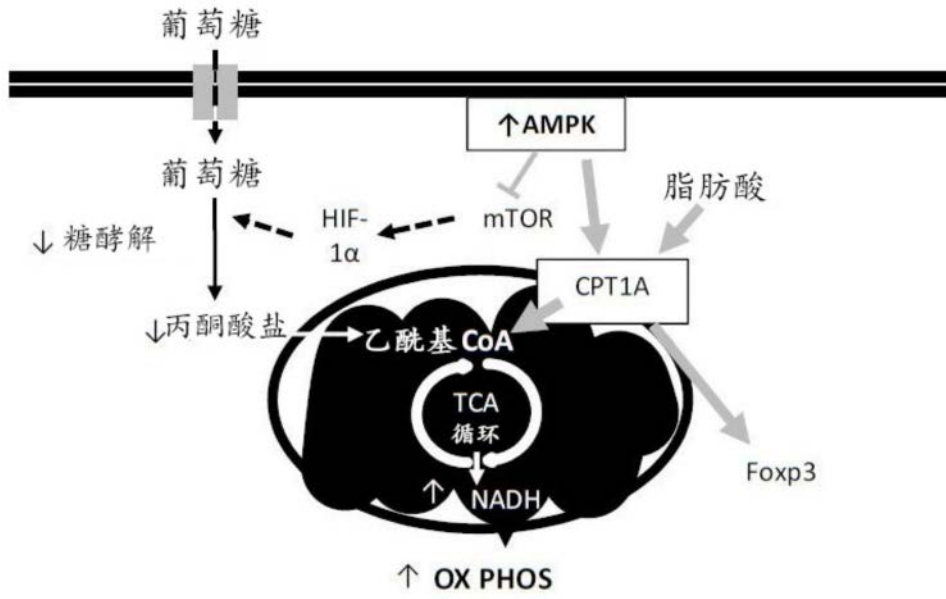


图12A

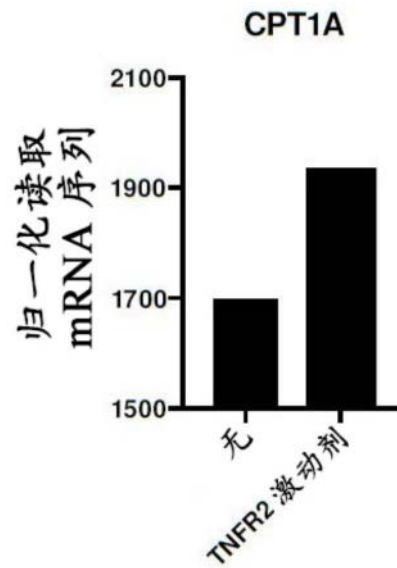


图12B

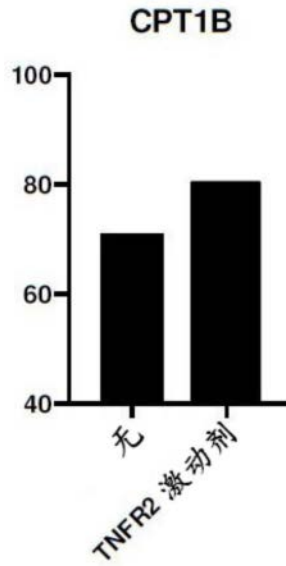


图12C

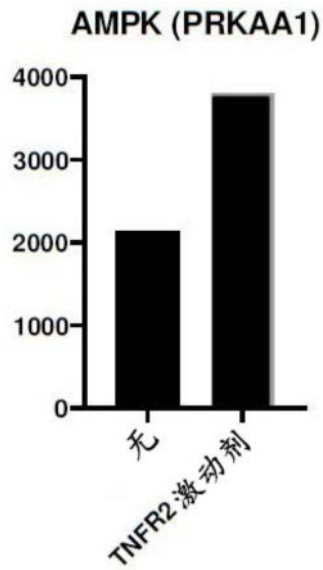


图12D

肽	位置	序列	激动剂	
			亲和力	读数
TNFR2	hTNFR2 (23-207)	20kD	4+	1.2
S04062	hTNFR2 (1-20)	LPAQVAFTPYAPEPGSTC RL	-	0
S03931	hTNFR2 (9-28)	PYAPEPGSTCRLREYYD QTA	-	0
S04063	hTNFR2 (17-36)	TCRLREYYDQTAQMCCS KCS	-	0
S03933	hTNFR2(26-45)	QTAQMCCSKCSPGQHA KVFC	1+	0
S04064	hTNFR2(34-53)	KCSPGQHAKVFCTKTS TVC	-	0
S04065	hTNFR2 (42-61)	KVFCTKTSDTVCDSCED STY	-	0
S04066	hTNFR2 (50-69)	DTVCDSCEDSTYTQLWN WVP	-	0
S04067	hTNFR2 (58-77)	DSTYTQLWNWVPECLSC GSR	-	0
S04068	hTNFR2 (66-85)	NWVPECLSCGSRCS QVET	-	0

图13A

	肽	位置	序列	激动剂	
				亲和力	读数
CRD2	S04069	hTNFR2 (74-93)	CGSRCSSDQVETQACT REQN	-	0
	S04070	hTNFR2 (82-101)	QVETQACTREQNRICTC RPG	-	0
	S04071	hTNFR2 (90-109)	REQNRICTCRPGWYCAL SKQ	2+	0
	S04072	hTNFR2(98-117)	CRPGWYCALSKQEGCR LCAP	1+	0
	S04073	hTNFR2(106-125)	LSKQEGCRLCAPLRKCR PGF	2+	0
	S03935	hTNFR2 (108- 127)	KQEGCRLCAPLRKCRPG FGV	2+-	0
	S04074	hTNFR2(114-133)	LCAPLRKCRPGFGVARP GTE	-	0
	S04075	hTNFR2 (122- 141)	RPGFGVARPGETETSDVV CKP	-	0
	S04076	hTNFR2 (130- 149)	PGTETSDVVCKPCAPGT FSN	-	0
	S04077	hTNFR2 (138- 157)	VCKPCAPGTFSNTTSST DIC	-	0
	S04078	hTNFR2 (146- 165)	TFSNTTSSTDICRPHQIC NV	-	0
	S04079	hTNFR2 (154- 174)	TDICRPHQICNVVAIPGN AS	-	0
	S04080	hTNFR2 (162- 181)	ICNVVAIPGNASMDAVCT ST	-	0

图13B

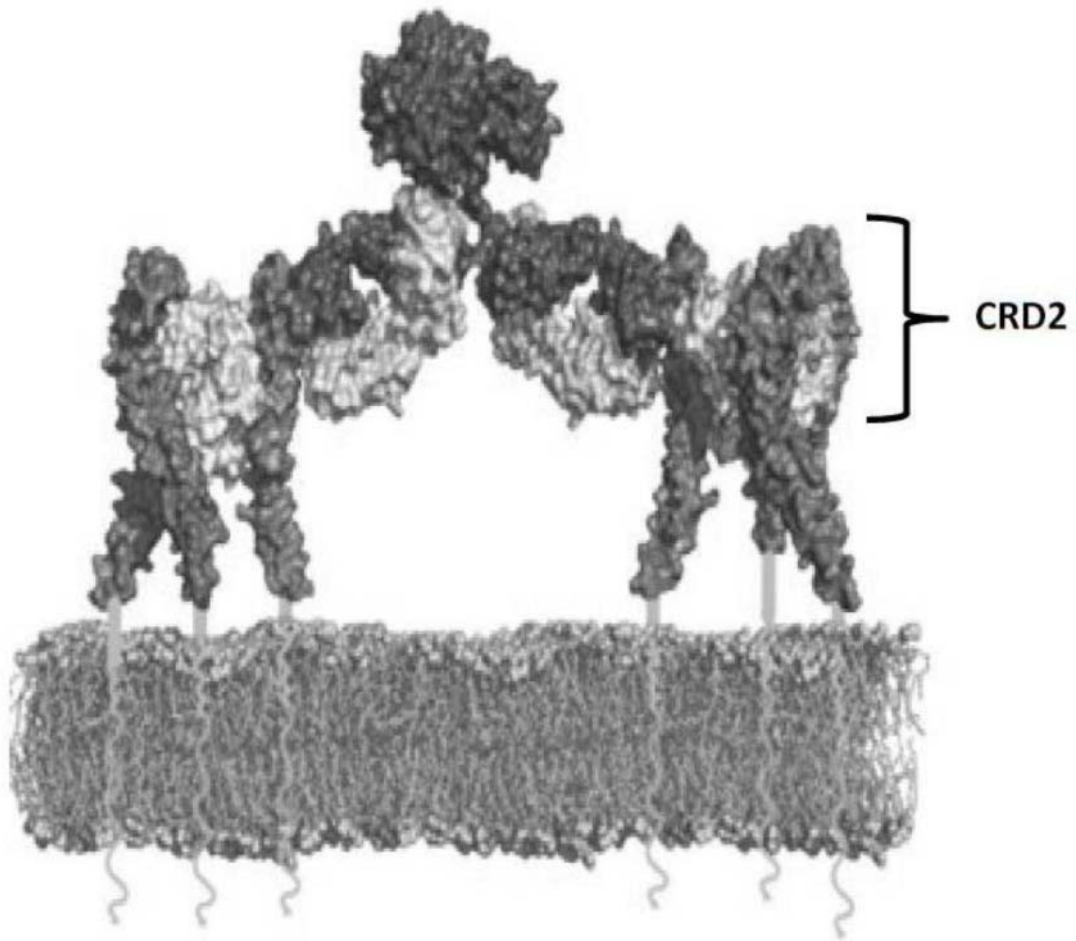


图14

位置	序列	TNFR2 激动剂		TNFR2 激动剂 + TNF α	
		亲和力	读数	亲和力	读数
hTNFR2 (23-207)	20kD	4+	1.2	4+	1.2
hTNFR2 (1-20)	LPAQVAFTPYAPEPGSTCRL	-	0	-	0
hTNFR2 (9-28)	PYAPEPGSTCRLREYYDQTA	-	0	-	0
hTNFR2 (17-36)	TCRLREYYDQTAQMCCSKCS	-	0	-	0
hTNFR2(26-45)	QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC	1+	0.1	-	0
hTNFR2(34-53)	KCSPGQHAKVFC TKTSDTV	1+	0	-	0
hTNFR2 (42-61)	KVFCTKTSDTVCDSCEDSTY	-	0	-	0
hTNFR2 (50-69)	DTVCDSCEDSTYQLWNWVP	-	0	-	0
hTNFR2 (58-77)	DSTYQLWNWVPECLSCGSR	-	0	-	0
hTNFR2 (66-85)	NWVPECLSCGSRSSDQVET	-	2	-	0
hTNFR2 (74-93)	CGSRCSSDQVETQACTREQN	-	2	-	0
hTNFR2 (82-101)	QVETQACTREQNRICRCPG	-	2	-	0
hTNFR2 (90-109)	REQNRICRPGWYCALSQ	2+	2	-	0
hTNFR2(98-117)	CRPGWYCALSQEGCRLCAP	1+	2	-	0
hTNFR2(106-125)	LSKQEGCRLCAPLRKCRPGF	-	2	-	0
hTNFR2 (108-127)	KQEGCRLCAPLRKCRPGFV	-	0	-	0
hTNFR2(114-133)	LCAPLRKCRPGFVARPGTE	-	0	-	0
hTNFR2 (122-141)	RPGFVARPGTETSDVVCKP	-	0	-	0
hTNFR2 (130-149)	PGTETSDVVCKPCAPGTFN	-	0	-	0
hTNFR2 (138-157)	VCKPCAPGTFNNTSSDID	-	0	-	0
hTNFR2 (146-165)	TFSNTSSDIDICRPHQICNV	-	0	-	0
hTNFR2 (154-174)	TDICRPHQICNVVAIPGNAS	-	0	-	0
hTNFR2 (162-181)	ICNVVAIPGNASMDAVCTST	-	0	-	0
hTNFR2 (170-189)	GNASMDAVCTSTSPTRSMAP	-	0	-	0

图15